

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.03.014

超声波联合研磨破壁法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究

孟 昂¹, 王 萌¹, 赵晓燕¹, 朱运平², 张晓伟¹, 刘红开¹, 朱海涛¹

(1. 济南大学 食品科学与营养系, 山东 济南 250022;

2. 北京工商大学 食品与健康学院, 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048)

摘 要: 在比较研究并确定破壁方法与溶解试剂的基础上, 利用超声辅助提取方法探索不同条件下从雨生红球藻中提取虾青素的效果, 并通过响应面法进一步优化提取工艺参数。结果表明, 采用液氮研磨破壁处理, 以乙酸乙酯-乙醇 (v/v: 1:2) 作为提取溶剂在超声时间 18 mins、超声温度 39 °C、液料比 9:50 (mL/mg)、超声功率 200 W 条件下进行震荡超声处理, 最后于 40 °C 水浴振荡 20 mins, 虾青素提取率可达 85.1%。

关键词: 雨生红球藻; 虾青素; 液氮研磨破壁; 溶解试剂; 超声辅助提取

中图分类号: TS202 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)03-0091-07

Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by ultrasonic combined grinding and wall breaking

MENG Ang¹, WANG Meng¹, ZHAO Xiao-yan¹, ZHU Yun-ping²,
ZHANG Xiao-wei¹, LIU Hong-kai¹, ZHU Hai-tao¹

(1. Department of Food Science and Nutrition, Culinary School, University of Jinan, Jinan, Shandong 250022, China; 2. School of Food and Health Engineering, Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Based on the determination of wall breaking method and dissolving reagent, ultrasonic-assisted extraction was used in this study to explore the effect of extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* under different conditions, and further optimize the test results by response surface methodology. The results showed that under the conditions of ultrasonic time of 18 mins, ultrasonic temperature of 39 °C, liquid-material ratio of 9:50 (mL/mg), and ultrasonic power of 200 W, ultrasonic treatment was carried out under the condition of oscillating ultrasound. Finally, the treatment was carried out under the condition of water bath oscillation at 40 °C for 20 mins, the astaxanthin extraction rate can be 85.1% using Liquid nitrogen grinding broken wall treatment with ethyl acetate-ethanol (v/v: 1:2) as the extraction solvent.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; liquid nitrogen grinding broken wall; solubilizing reagent; ultrasonic-assisted extraction

虾青素 (Astaxanthin, AXT) 是一种橙红色

色素, 主要存在于藻类 (如雨生红球藻) 和海洋生物 (如撒蒙鱼) 中。其生物合成途径可分为两个阶段, 一部分是先经 MEP 途径及 MVA 途径合成 β -胡萝卜素, 然后由 β -胡萝卜素经 β -隐黄素 $\rightarrow$ 金盏花黄质 $\rightarrow$ 玉米质途径或经 β -胡萝卜素-4-酮 $\rightarrow$ 斑蝥黄质 $\rightarrow$ 金盏花红素途径合成 AXT^[1]。由于 AXT 分子中含有亲脂性主体长链和亲水性端部,

收稿日期: 2019-11-28

基金项目: 国家自然科学基金 (21406133), 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心开放基金 (20181018)

作者简介: 孟昂, 1993 年出生, 男, 在读硕士生, 研究方向为天然产物与功能食品开发。

通讯作者: 赵晓燕, 1975 年出生, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为食品理论与加工应用及生物粉体技术研究。

可使其较好的嵌入细胞膜内且不对膜造成损伤,从而有效发挥抗氧化等生物活性。

从天然材料中提取 AXT 的常规技术通常依赖于使用有机溶剂的固液萃取而无较多辅助因素的参与,导致提取率较低^[2]。目前发展的一些高效提取方法如超分子溶剂提取、磁辅助提取、离子液体介导,由于成本太高而无法普遍应用^[3]。超声辅助提取(UAE)是一种声波辅助分离系统,即在常规提取方法的基础上,利用超声机械作用,使溶剂最大程度地渗透到材料组织中,从而增加固相和液相之间的接触表面积,使溶质迅速从固相扩散到溶剂中,提高提取率^[4]。本实验以雨生红球藻为原料,先进行破壁条件与浸提溶剂的筛选,在此基础上利用 UAE 探索不同条件下从雨生红球藻中提取 AXT 的效果,并通过进一步优化实验得出最佳提取工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

AXT 标准品:美国 Sigma 公司;雨生红球藻:云南时光印记生物科技有限公司;乙醇、乙酸乙酯:国药集团化学试剂有限公司。

SHZ-C 恒温水浴震荡锅:常州市国旺仪器制造有限公司;V-5000 可见分光光度计:上海元析仪器有限公司;KQ3200DB 数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;LCJ-IIB 低速大容量多管离心机:上海安亭科学仪器厂;电子分析天平:上海佑科仪器仪表有限公司;TGL16M 台式高速冷冻离心机:盐城市凯特实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 AXT 标准曲线的绘制

准确称取 5 mg AXT 标品,用乙酸乙酯:乙醇(v/v: 1:2)溶液溶解并定容至 50 mL,即得到 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 AXT 标准溶液,然后稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$,经紫外可见光谱扫描^[5-6],如图 1 所示,可得到最大吸收波长(480 nm)。在测定标准曲线时用 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液分别稀释至 0.2、0.4、0.6、0.8、1、2、3、4 $\mu\text{g/mL}$,然后在 480 nm 处测定吸光度。

1.2.2 破壁方法的确定

玻璃珠振荡破壁^[7]:称取 200 mg 藻粉置于棕

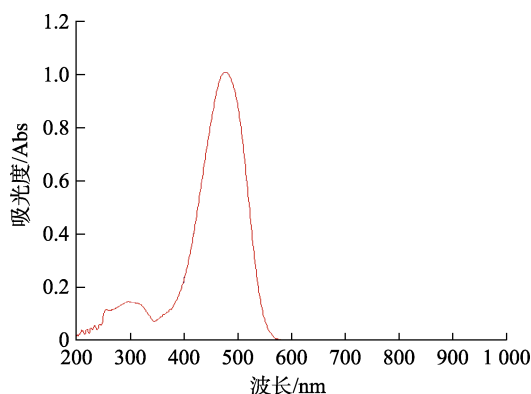


图 1 AXT 标准品全波长扫描图谱

色带盖锥形瓶,沿瓶壁依次放入 10 个玻璃球,加入 10 mL 乙酸乙酯-乙醇(v/v: 1:2)混合试剂,盖盖并用封口膜密封,将样品瓶置于恒温水浴振荡器,40 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡提取 60 min,经 10 000 r/min 离心并过滤,收集滤液然后进行定容、稀释、比色测定。以不加玻璃球作对照。

低温研磨法破壁^[8]:称取适量藻粉经液氮研磨两次,每次 0.5 min,准确称 200 mg 藻粉置于棕色锥形瓶,加入 10 mL 乙酸乙酯-乙醇(v/v: 1:2)混合试剂,将样品瓶置于恒温水浴振荡器,40 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡提取 60 min,经 10 000 r/min 离心并过滤,收集滤液然后进行定容、稀释、比色测定。以不用液氮研磨作对照。

1.2.3 提取溶剂的确定

有文献已表明乙酸乙酯-乙醇混合试剂对 AXT 的提取效果明显优于乙酸乙酯^[9],故本文选择乙酸乙酯-乙醇混合试剂作为提取试剂,研究不同混合比例对提取效果的影响。分别称取 200 mg 经低温研磨处理后的藻粉放入棕色三角瓶,各加入 10 mL 乙酸乙酯-乙醇(v/v: 1:1; 1:2; 1:3)混合试剂,将样品瓶置于恒温水浴振荡器,40 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡提取 60 min,经 10 000 r/min 离心并过滤,收集滤液然后进行定容、稀释、比色测定。

1.2.4 超声辅助提取雨生红球藻中 AXT 及 AXT 含量的测算

提取步骤:称取 100 mg 处理后的藻粉→加入适量乙酸乙酯-乙醇(v/v: 1:2)混合试剂→超声处理→40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡 20 min→4 800 r/min 离心 20 min→收集上清液→稀释 100 倍→480 nm 下测吸光度。

取 0.1 mL AXT 提取液置于 10 mL 容量瓶中,并用乙酸乙酯-乙醇 (v/v: 1:2) 混合试剂定容至刻度线,在 480 nm 处测定吸光值。根据公式 (1) 计算 AXT 提取率^[9]:

$$Y(\%) = \frac{C \times N \times V}{M \times 5.1\%} \quad (1)$$

Y: AXT 提取率; C: AXT 浓度; N: 稀释倍数; V: 提取液定容体积; M: 藻粉质量。

1.2.5 紫外吸收光谱的检测

取适量 AXT 提取液,以乙酸乙酯-乙醇 (v/v: 1:2) 混合试剂作空白对照,在 200~1 000 nm 波长范围内进行紫外可见分光光度扫描,检测提取液性质^[10]。

1.2.6 超声处理单因素实验

1.2.6.1 超声时间对提取率的影响 选择超声时间为 0、5、10、15、20、25、30、40 min,在超声功率为 200 W,超声温度 40 °C,添加试剂 20 mL (100 mg 藻粉) 的条件下进行震荡超声处理,以提取率作为衡量指标,确定最佳超声时间。

1.2.6.2 超声温度对提取率的影响 选择超声温度为 0、30、35、40、45、50 °C,在超声功率为 200 W,超声时间 15 min,添加试剂 20 mL (100 mg 藻粉) 的条件下进行震荡超声处理,以提取率作为衡量指标,确定最佳超声温度。

1.2.6.3 超声功率对提取率的影响 选择超声功率为 80、120、160、200 W,在超声温度 40 °C,超声时间 15 min,添加试剂 20 mL (100 mg 藻粉) 的条件下进行震荡超声处理,以提取率作为衡量指标,确定最佳超声功率。

1.2.6.4 液料比对提取率的影响 选择添加试剂为 5、10、15、20、25、30、40 mL (100 mg 藻粉),在超声温度 40 °C,超声时间 15 min,超声功率 200 W 的条件下进行震荡超声处理,以提取率作为衡量指标,确定最佳液料比。

1.2.6.5 震荡超声对提取率的影响 在超声温度 40 °C,超声时间 15 min,超声功率 200 W,添加试剂 20 mL (100 mg 藻粉) 的条件下,一份选择震荡超声处理,一份选择则静置超声处理,以提取率作为衡量指标,确定震荡超声处理效果。

1.2.7 响应面优化实验

利用 Design-Expert.V8. 0.6 软件^[11],以 AXT

提取率为响应值 (Y),选择 A 液料比 (100 mg 藻粉)、B 超声时间、C 超声温度为变量进行响应面设计。实验参数安排如表 1。

表 1 因素水平表

水平	因素		
	A 液料比/mL	B 超声温度/°C	C 超声时间/min
-1	15	30	10
0	20	40	20
1	25	50	30

2 结果与分析

2.1 AXT 标准曲线的绘制

根据方法 1.2.1 得出 AXT 浓度与吸光值的关系并绘制 AXT 标准曲线,如图 2。可得回归方程 $y = 0.2818x + 0.0284$, $R^2 = 0.9987$,其中 x 为 AXT 浓度, y 为吸光值。

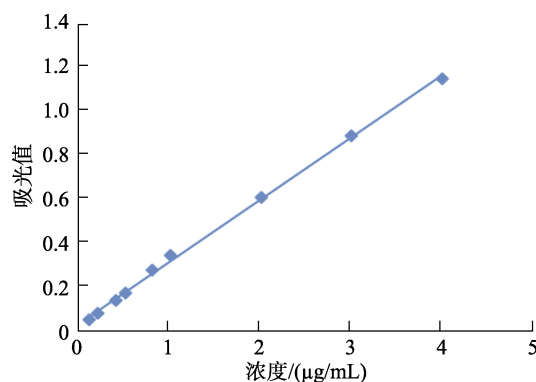


图 2 AXT 标准曲线

2.2 破壁方法的确定

以不经任何处理样品作为对照,选择不同破壁方法处理藻粉结果如图 3。以吸光值作为衡量标准,可以看出,与对照组 (0.767) 相比,藻粉经液氮研磨破壁处理后,AXT 的提取效果 (0.778)

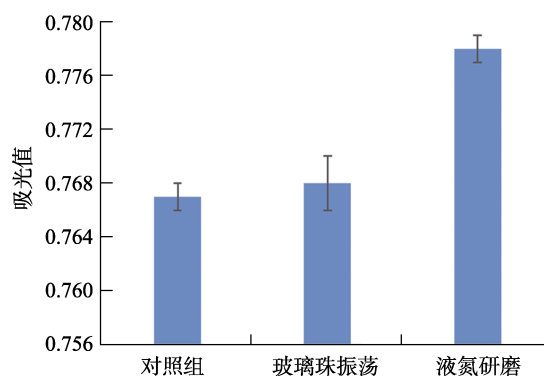


图 3 不同破壁方法对 AXT 提取效果的影响

增强, 而加入玻璃球震荡辅助提取 (0.768) 的作用效果无变化。故该实验选择破壁方法为液氮研磨破壁。

2.3 提取溶剂的确定

选择被批准用于食品加工工艺的有机溶剂^[12]: 乙醇和乙酸乙酯, 并进行提取试剂的筛选, 结果如图 4。以吸光值作为衡量标准, 从图中可以看出, 混合试剂的提取效果顺序为乙酸乙酯-乙醇混合试剂 $v/v: 1:2 > v/v: 1:1 > v/v: 1:3$, 且 $v/v: 1:1$ 与 $v/v: 1:3$, 提取效果无明显变化。本实验选择提取试剂为乙酸乙酯-乙醇 ($v/v: 1:2$) 混合试剂。

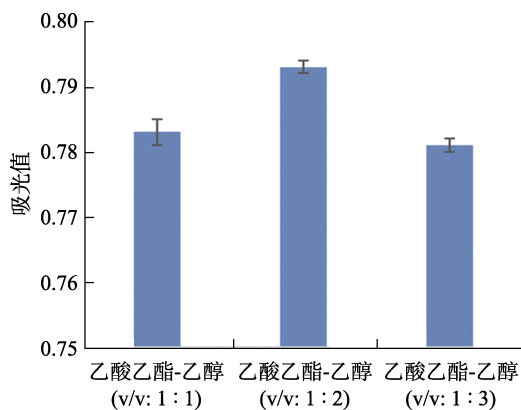


图 4 不同提取溶剂对 AXT 提取效果的影响

2.4 紫外吸收光谱的检测

图 5 为 AXT 提取液全波长扫描图谱, 可以看出, AXT 提取液在波长为 480 nm 处有最大吸收峰, 其测定结果与 AXT 标准品一致, 可以说明提取液中 AXT 作为主要成分存在。

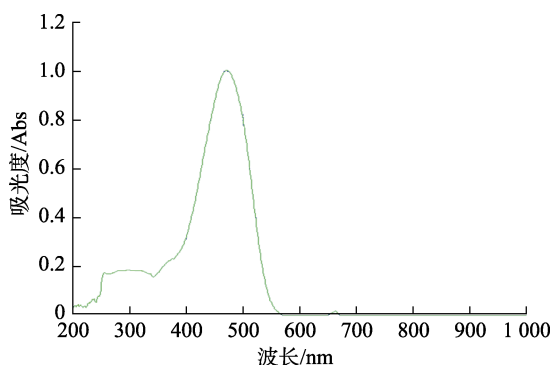


图 5 AXT 提取液全波长扫描图谱

2.5 超声处理单因素实验

2.5.1 超声时间对提取率的影响

以提取率及提取量作为比较参数, 实验结果

如图 6 所示。可以看出, AXT 提取率的变化趋势随超声时间的延长先升后降, 且在超声时间为 20 min 时达到最大, 提取效果可达 85.8%, AXT 含量为 17.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。而在超声 20 min 之后, AXT 的提取效果呈明显下降, 其原因是超声的穿透作用导致 AXT 的空间结构发生改变^[13], 体现在吸光值的降低。本实验选择超声提取时间为 20 min。

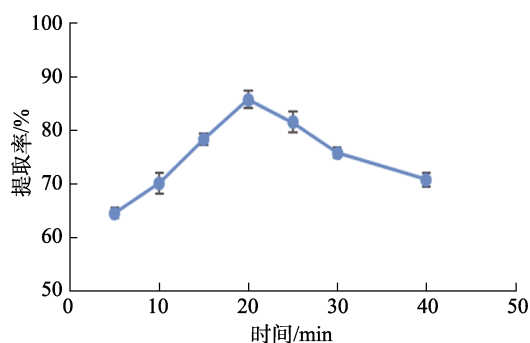


图 6 超声时间对 AXT 提取效果的影响

2.5.2 超声温度对提取率的影响

以提取率及提取量作为比较参数, 实验结果如图 7 所示。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 之前, AXT 提取率随温度的升高而升高, 达到 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 提取率达到最大 82.6%, AXT 含量为 16.52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。继续升高温度, 提取率不增反降, 其原因可能是在于 AXT 经超声波作用后, 其结构中 $\text{C}=\text{C}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CHO}$ 等基团更易受到热力作用而降解^[14], 从而影响提取量。考虑到 AXT 本身是一种不耐热分子, 本实验避免出现 40 $^{\circ}\text{C}$ 以上的温度。

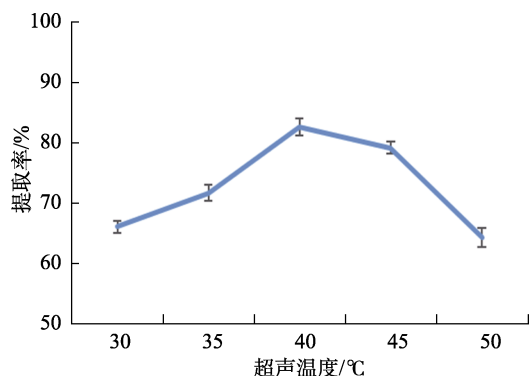


图 7 超声温度对 AXT 提取效果的影响

2.5.3 超声功率对提取率的影响

以提取率及提取量作为比较参数, 实验结果如图 8 所示。AXT 提取率随超声功率的增强而上升, 当超声功率达到最大时, AXT 提取率可达

80.9%，此时 AXT 含量为 16.17 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。从提升效果角度可以看出，在超声功率 160 W 以后，AXT 的提取效果趋于平缓，其原因是在超声波机械力的作用下，固液两相接触接近饱和^[15]，所以提取趋势增幅减缓。本实验选择超声功率 200 W。

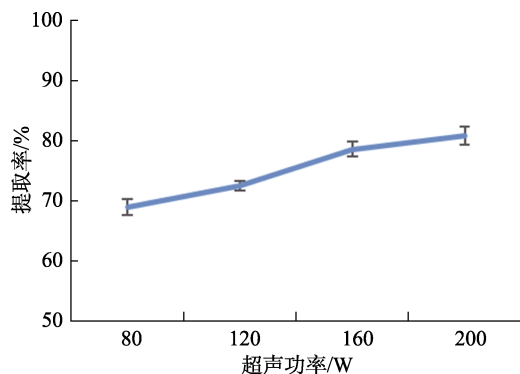


图 8 超声功率对 AXT 提取效果的影响

2.5.4 液料比对提取率的影响

以提取率及提取量作为比较参数，实验结果如图 9 所示。从总体变化趋势可以看出，随着提取试剂的加入，AXT 提取率呈先升高后下降趋势，AXT 最大提取率在料液比为 1:5 时，此时 AXT 提取量可达 16.86 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。在液料比 1:20 至 1:5 之间，AXT 提取率的变化平缓，而当液料比大于 1:5 后，AXT 的提取呈明显降低趋势，其原因是由于溶剂量的增大，超声波带来的空化作用增强^[16]，即进入溶液中气泡的数量增多而带入过多的氧气，AXT 与氧气的接触导致其结构的破坏呈现提取率的下降。本实验选择超声料液比为 1:5。

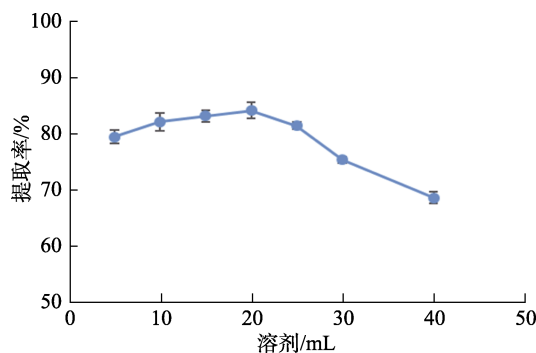


图 9 料液比对 AXT 提取效果的影响

2.5.5 震荡超声对提取率的影响

以提取率及提取量作为比较参数，实验结果图 10 所示。与静置超声处理藻粉相比，在震荡超

声条件下，AXT 提取效果有明显上升的趋势，提取量可从 14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 增加到 16.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。在震荡条件下，AXT 分子可以从粉体细胞中快速游离出来而充分溶解于提取溶剂，本实验选择震荡超声。

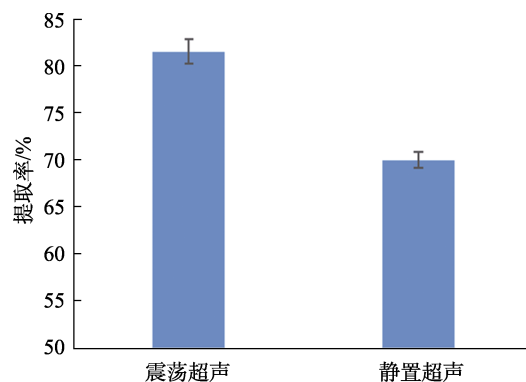


图 10 震荡超声对 AXT 提取效果的影响

2.6 响应面优化实验

2.6.1 回归模型的建立

通过方法 1.2.7 得出响应值如表 2 所示，利用表 2 响应面结果进一步做出方差分析如表 3，得到液料比 A、超声温度 B、超声时间 C 对提取率 Y 的影响模型 $Y(\%) = 85.00 - 2.25A - 3.14B - 1.89C - 1.45AB - 1.75AC - 0.075BC - 2.51A^2 - 9.59B^2 - 4.39C^2$ ， $R^2 = 0.9937$ 。由表 3 可知， $P < 0.0001$ ，显著水平极其明显，且失拟相 $p = 0.1109$ ，则该模型成立。通过 p 值可知，除 BC 项交互作用对 Y 的影响不

表 2 响应面实验设计和结果

实验编号	A	B	C	Y 提取率/%
1	1	0	1	71.4
2	-1	1	0	73.3
3	0	0	0	84.4
4	1	-1	0	75.4
5	0	0	0	85.8
6	0	-1	-1	75.9
7	1	0	-1	79.4
8	0	-1	1	73.0
9	0	0	0	84.7
10	-1	0	1	80.3
11	0	1	1	66.0
12	0	0	0	85.2
13	0	0	0	84.9
14	0	1	-1	69.2
15	-1	0	-1	81.3
16	1	1	0	66.8
17	-1	-1	0	76.1

表 3 回归方程方差分析表

来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	702.33	9	78.04	122.14	<0.000 1	**
A	40.5	1	40.5	63.39	<0.000 1	**
B	78.75	1	78.75	123.26	<0.000 1	**
C	28.5	1	28.5	44.61	0.000 3	**
AB	8.41	1	8.41	13.16	0.008 4	**
AC	12.25	1	12.25	19.17	0.003 2	**
BC	0.023	1	0.023	0.035	0.856 5	
A ²	26.58	1	26.58	41.6	0.000 4	**
B ²	387.03	1	387.03	605.75	<0.000 1	**
C ²	81.05	1	81.05	126.86	<0.000 1	**
残差	4.47	7	0.64			
失拟相	3.33	3	1.11	3.9	0.110 9	
净误差	1.14	4	0.28			
总误差	706.8	16				

注: **代表极显著水平 $P<0.01$ 。

显著外, A、B、C、AB、AC、A²、B²、C² 各项对 Y 均有显著影响。该模型 $R_{adj}^2=0.985 5$, 表明 AXT 提取效果的变化有 98.55% 来自于本实验设定因素, 可利用该模型对 AXT 的提取条件进行优化选择。

2.6.2 各因素的交互作用

设定因素交互作用对 AXT 提取率的影响如图 11~13 所示。通过曲面弧度及等高线陡度反应设定因素交互作用强度, 可以看出, AB、AC 项等高线图均呈现椭圆形, 且 3D 响应曲面弧度呈现先升后降趋势, 说明 AB、AC 项对 AXT 得率影响较大; 而 BC 项等高线几乎为圆形, 说明 BC 项对 AXT 的得率几乎无影响, 与 2.5.1 结论对应。通过 Design-Expert 8.0.6 可得设定单元提取 AXT

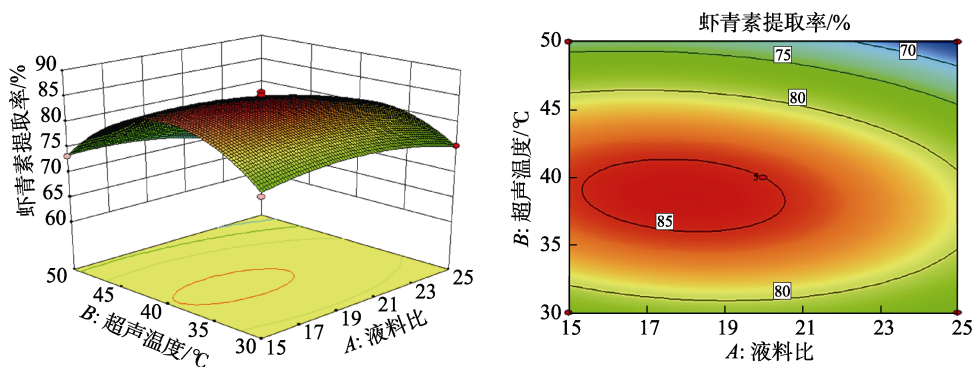


图 11 AB 响应面 3D 图及等高线

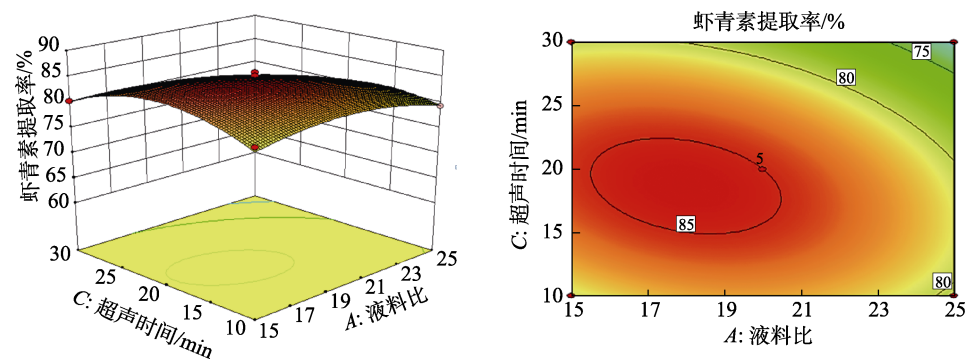


图 12 AC 响应面 3D 图及等高线

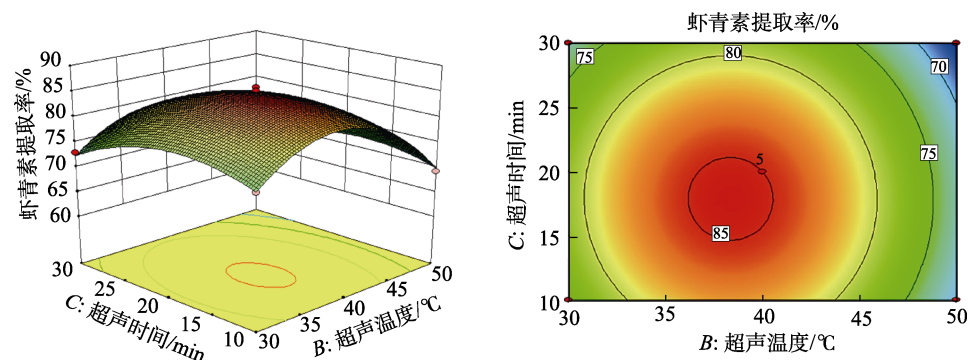


图 13 BC 响应面 3D 图及等高线

最优配比:液料比 18.21 mL, 超声时间 18.57 min, 超声温度 38.67 °C, 此配比下 AXT 提取率高达 85.75%。从实际操作角度考虑, 现把设定单元分别改成 18 mL、18 min、39 °C, 以此作为新设定单元并进行验证, 最终提取结果为 85.1%, 与统计软件预测分析值相比, 几乎无明显差异。说明该数据模型可用于实际操作当中。

3 结论

本研究利用 UAE 方法对破壁后的雨生红球藻进行 AXT 提取工艺参数的优化及确定。首先进行原料预处理以初步减少提取阻力, 然后通过对比选择溶解度最佳的提取试剂, 以此为基础筛选出最佳超声处理条件并得出优化数据。本研究实验结果为: 采用低温研磨对藻粉进行破壁, 进而以乙酸乙酯-乙醇 (v/v: 1:2) 作为提取溶剂在超声时间 18 min、超声温度 39 °C、液料比 9:50 (mL/mg)、超声功率 200 W 条件下进行震荡超声处理, 最后于 40 °C 水浴振荡 20 min, 提取效果高达 85.1%。

本实验通过机械方法对藻粉两次破壁处理 (低温研磨初次破壁, 震荡超声二次破壁), 大大提高 AXT 的提取效率。随着 AXT 功能价值进一步挖掘, 其相应价值也必然进一步提升, 目前天然 AXT 在全球市场上的价格高达 2.5~7 \$/g, 而 AXT 纯品价值更是高达 3 200 \$/g^[17-18], 可见对原材料中 AXT 的有效提取是获得 AXT 来源的有效保障。

参考文献:

- [1] WU Y Q, YAN P P, LIU X W, et al. Combinatorial expression of different β -carotene hydroxylases and ketolases in *Escherichia coli* for increased astaxanthin production[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, doi: 10. 1007/s10295-019-02214-1.
- [2] GAO J, FANG C, LIN Y, et al. Enhanced extraction of astaxanthin using aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and potassium phosphate[J]. *Food Chemistry*, 2020, 309: 125672.
- [3] KHOO K S, CHEW K W, OOI C W, et al. Extraction of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using liquid biphasic flotation system[J]. *Bioresource Technology*, 2019(8), 290: 121794.
- [4] YU R, KYUNGH. Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2016(6), 99: 197-203.
- [5] 符力丹. 雨生红球藻中虾青素的微胶囊化及其稳定性研究[D]. 济南大学, 2016.
- [6] 马密霞, 刘接卿, 胡文祥. 紫外分光光度法测定马钱子中土的宁的含量[J]. *中国医疗前沿*, 2007(18): 20-22.
- [7] 赵立艳. 雨生红球藻中虾青素的分离提取及其性质的研究[D]. 中国农业大学, 2006.
- [8] 周湘池, 刘必谦, 曾庆国, 等. 雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 破壁方法对虾青素提取率的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2006(5): 424-429.
- [9] 徐健. 雨生红球藻中虾青素的提取及虾青素对皮肤细胞损伤的保护作用[D]. 浙江大学, 2016.
- [10] 吴娇, 刁庆宇, 白雪, 等. 雨生红球藻的培养及虾青素的提取与检测[J]. *大连民族大学学报*, 2019, 21(5): 406-411.
- [11] 徐煜, 张琳, 李亚鹤, 等. 雨生红球藻中虾青素萃取工艺优化[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(1): 98-102.
- [12] ZEZE B, SILVA J M, PORTUGAL I, et al. Measurement of astaxanthin and squalene diffusivities in compressed liquid ethyl acetate by Taylor-Aris dispersion method[J]. *Separation and Purification Technology*, 2020(5), 234: 116046.
- [13] 马晓彬. 果胶酶促降解中的超声波作用途径及机理研究[D]. 浙江大学, 2017.
- [14] 张海华, 朱科学, 周惠明. 超声波对小麦面筋蛋白结构的影响[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(22): 4687-4693.
- [15] 张苗, 刘晓娟, 刘欣. 超声辅助提取雨生红球藻渣多糖工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(20): 254-257+262.
- [16] MACHADO I, FACCIO R, PISTON M. Characterization of the effects involved in ultrasound-assisted extraction of trace elements from artichoke leaves and soybean seeds[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 59: 104752.
- [17] BI W T, TIAN M L, ZHOU J, et al. Task-specific ionic liquid-assisted extraction and separation of astaxanthin from shrimp waste[J]. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(24): 2243-2248.
- [18] SHAN, MD M R, LIANG Y, et al. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7), 7: 531. 

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。