

超声协助吐温-20一步法制备水分散性虾青素工艺探究及其表征

李 佳, 齐祥明

One-step Preparation and Characterization of Water-dispersible Astaxanthin Emulsion by Tween-20 under Ultrasonic Condition

LI Jia and QI Xiangming

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020089>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于响应面法构建虾青素纳米乳液

Preparation of astaxanthin-loaded nanoemulsions by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(10): 204-210 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.037>

特种油脂纳米乳液超声制备工艺优化及其特性研究

Optimization of Special Oil Nanoemulsion Prepared using Ultrasonic by Response Surface Methodology and Its Characteristics Analysis

食品工业科技. 2020, 41(16): 131-139 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.022>

可切换亲水溶剂提取虾青素及其纳米粒抗氧化性探究

Extraction of Astaxanthin by Switchable Hydrophilic Solvents and Antioxidant Activity of Astaxanthin Nanoparticles

食品工业科技. 2019, 40(18): 165-170,176 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.18.027>

虾青素化学和生物合成研究进展

Research Progress on Chemical and Biological Synthesis of Astaxanthin

食品工业科技. 2021, 42(21): 445-453 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100037>

虾青素抗氧化能力研究进展

Research Progress on Antioxidant Ability of Astaxanthin

食品工业科技. 2019, 40(10): 350-354 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.057>

南极磷虾油中虾青素分子种组成及其消化吸收特性研究

Molecular Composition, Digestion and Absorption Characteristics of Astaxanthin in Antarctic Krill Oil

食品工业科技. 2021, 42(12): 347-353 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090089>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李佳, 齐祥明. 超声协助吐温-20 一步法制备水分散性虾青素工艺探究及其表征 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 182-190. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020089

LI Jia, QI Xiangming. One-step Preparation and Characterization of Water-dispersible Astaxanthin Emulsion by Tween-20 under Ultrasonic Condition[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 182-190. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020089

· 工艺技术 ·

超声协助吐温-20 一步法制备水分散性虾青素 工艺探究及其表征

李 佳^{1,2,3}, 齐祥明^{1,2,3,*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛市食品生物技术重点实验室, 山东青岛 266404;
2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东青岛 266237;
3. 中国轻工业水产品生物加工重点实验室, 山东青岛 266404)

摘要: 为同时实现雨生红球藻中虾青素的绿色提取和性质改良, 本文采用超声协助吐温-20 同步实现了对其中虾青素的高效释放和水分散性虾青素纳米乳液的制备, 进一步探究了该过程的影响因素和水分散性虾青素纳米乳液的形成机理, 并对所得水分散性虾青素进行基本成分分析和初步的性能表征。工艺探索结果表明: 在显著影响因素吐温-20 添加量、超声功率、料液比分别为 200 μ L、600 W、1:20 g/mL 时, 获得了高达 98.41% 的虾青素分散率。机理探究结果显示: 超声处理具有实现雨生红球藻有限破胞和充分协助吐温-20 分散虾青素的双重作用, 比高压均质更具工艺优越性。产品表征结果显示: 该条件下所获得的水分散性虾青素乳液颗粒平均粒径为 115.55 nm, Zeta 电位为 -23.35 mV; 虾青素包封量高达产品干重的 43.82%, 且全部为无定形非晶态; 被选择性包封的脂质中饱和脂肪酸量偏高, 占干重的 17.93%。总的来说, 本文所开发的超声协助吐温-20 一步法制备水分散性虾青素乳液工艺可直接从雨生红球藻中获得虾青素产品, 操作简便、提取高效、绿色可行, 且产品部分性能优于纯虾青素包封产品。

关键词: 虾青素, 超声处理, 释放, 吐温-20, 纳米乳液, 成分分析, 性能表征

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)22-0182-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020089



本文网刊:

One-step Preparation and Characterization of Water-dispersible Astaxanthin Emulsion by Tween-20 under Ultrasonic Condition

LI Jia^{1,2,3}, QI Xiangming^{1,2,3,*}

(1. Qingdao Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Food Science and Engineering,
Ocean University of China, Qingdao 266404, China;

2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao National Laboratory for
Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China;

3. Key Laboratory of Biological Processing of Aquatic Products, China National Light Industry, Qingdao 266404, China)

Abstract: In order to achieve sustainable extraction and enhance the properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, a green and efficient approach was developed by utilizing Tween-20 under ultrasonic conditions. This approach allowed for the efficient release of astaxanthin while simultaneously preparing water-dispersible astaxanthin emulsions. The factors influencing the process, the formation mechanism of the water-dispersible astaxanthin emulsion, and the composition and performance characterization of the obtained product were investigated. Exploration of the process

收稿日期: 2023-02-10

基金项目: 山东省重点研发项目 (2019JZZY010814)。

作者简介: 李佳 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物资源与生化工程, E-mail: lijia1658784705@163.com。

* 通信作者: 齐祥明 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 绿色食品生物技术, E-mail: qixm@ouc.edu.cn。

revealed that Tween-20 dosage, ultrasonic power, and solid-to-liquid ratio significantly influenced the release and dispersion efficiency of astaxanthin, with 98.41% astaxanthin being released and dispersed when Tween-20 dosage, ultrasonic power, and solid-to-liquid ratio were 200 μL , 600 W, and 1:20 g/mL, respectively. The mechanism exploration results demonstrated that ultrasound had a dual effect of disrupting the cells of *H. pluvialis* to a limited extent and assisting Tween-20 to disperse astaxanthin, which was superior to high-pressure homogenization. The characterization results showed that the water-dispersible astaxanthin emulsion obtained under these conditions had an average particle size of 115.55 nm, a Zeta potential of -23.35 mV, and an encapsulated astaxanthin content of up to 43.82% in the dry product. Astaxanthin was found to be encapsulated in an amorphous non-crystalline state, with selective encapsulation of saturated fatty acids. The amount of saturated fatty acids was up to 17.93% (wt.%). Overall, this one-step, ultrasonic approach to preparing water-dispersible astaxanthin emulsions from *H. pluvialis* using Tween-20 is easy to operate, highly efficient, green and feasible, with some of the product properties being superior to those of pure astaxanthin encapsulated products.

Key words: astaxanthin; ultrasound; release; Tween-20; nanoemulsion; component analysis; performance characterization

虾青素作为一种重要的类胡萝卜素,具有强抗氧化性,因此作为功能性成分在保健食品的开发中应用已久,商业价值很大^[1-3]。然而,只在有限数量的生物材料中发现该物质,其中虾蟹壳内的虾青素含量往往过低(35~153 $\mu\text{g/g}$ 湿重),且难以提取^[4]。对比而言,雨生红球藻具有的极高虾青素积累能力(可高达细胞干重的 4%~5%)更具备产业化前景^[5],因此该微藻近年来正逐渐成为天然虾青素提取的主要原料^[6]。

天然虾青素比合成虾青素更活跃、更安全,市场认可度更高^[6]。基于前文所述原因,近年从雨生红球藻中提取虾青素的各种技术正不断被开发^[4,7-10]。这些技术的关键在于,通过各种物理(高压均质、超声波、微波)、化学(水热液化、酸处理、离子液体处理)或生物(酶裂解)手段,首先实现雨生红球藻的细胞破碎^[7-8],进而提取得到纯度较高的天然虾青素产品。其中,物理方法因其工业可操作性更强而受到更多的关注^[7]。从细胞破碎的机理来看,三种常见的物理方法中,微波是基于细胞内极性物质对微波能的吸收,而达到破胞效果,在该过程中会产生大量的热能,并致使胞内温度迅速升高,因此不适用于提取虾青素等热敏性物质^[7]。而超声和高压均质的热效应相对较小,且试验操作简单,更适用于雨生红球藻中虾青素的提取。

然而,各种形式的虾青素(天然的或合成的;单体、单酯或双酯)均表现出较差的水溶性和稳定性,这大幅降低了其生物可利用性;且这些虾青素容易被环境中的光和热降解^[11-12]。为提高虾青素的水溶性、稳定性和生物可利用性等应用性能,研究者们通常会对合成的或提取自天然产物的虾青素进一步进行物理或化学的改性^[13-14]。其中,物理包封技术相对简单、对活性物质的保护良好,所获得纳米颗粒水分散效果好且生物可及性较高,因而具有更高的关注度^[13]。

从以上内容可以看出,目前具有较好利用性能的天然虾青素产品往往需要以雨生红球藻为原料,然后经过提取和改性两步制得^[15],过程繁琐复杂、有机试剂残留且成本较高。齐祥明等^[16]和 Zhang 等^[17]

率先报道在超声协助下,以有机酸缓冲溶液通过一步法工艺制得水分散虾青素,但其单次虾青素释放率仅为 37.45%;多次释放、分散后也仅达到 68.05%,未能充分提取出雨生红球藻原料中的天然虾青素。有文献表明,吐温-20 可以较好地实现对纯虾青素的分散^[18]。但利用超声和吐温-20 协同作用直接一步从雨生红球藻获得水分散虾青素产品的工艺研究尚未见报道。

本研究以雨生红球藻为原料,通过超声辅助乳化剂(吐温-20)进行水分散虾青素的一步法制备工艺的探索;并基于工艺探索实验数据(乳化剂添加比例、超声功率、料液比等对虾青素分散效果的影响),探讨了该工艺可能的过程机理;同时对所得的水分散虾青素纳米乳液进行了基本化学成分和结构的表征以及性能的简单调查,为虾青素的同步绿色、简易、高效提取和性质改良提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雨生红球藻(湿藻) 云南绿 A 生物有限公司提供,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏;吐温-20 分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司;虾青素标准品 美国 Sigma 公司;甲基叔丁基醚 色谱纯,德国 Meker 公司;甲醇 色谱纯,美国 Tedia 公司。

JY92-II DN 超声波细胞破碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;JK-MSH-Pro-6B 磁力搅拌器 上海精学科学仪器有限公司;LC-20A 高效液相色谱仪 日本 Shimadzu 公司;FV1000 激光共聚焦电镜 日本 Olympus 公司;JSM-840 扫描电子显微镜 日本电子株式会社;CGJB 均质机 郑州玉祥食品机械设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水分散虾青素乳液的制备 如图 1 所示,称取 1 g 雨生红球藻泥(水分含量为 $52.21\% \pm 0.92\%$)与 20 mL 超纯水、一定量吐温-20 后充分混合,在超声环境下处理 30 min。样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 8000 r/min 的转速离心 30 min,然后收集上清液,即得到水分散虾青素乳液。



图1 水分散虾青素乳液制备流程图

Fig.1 Flow chart for preparation of water-dispersible astaxanthin emulsion

1.2.2 虾青素含量的测定 所得水分散虾青素乳液中虾青素含量的测定参照 Zhang 等^[17]的方法,使用高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)进行。

雨生红球藻中的全部虾青素含量测定:取 1 g 雨生红球藻藻泥与 20 mL 超纯水充分混合后超声环境下处理 30 min,用甲醇:三氯甲烷为 3:1(v/v)萃取其中的虾青素至样品无色。使用高效液相色谱法测定有机试剂中的虾青素含量。基于水分散虾青素乳液中虾青素含量和雨生红球藻中全部虾青素的含量可求得分散率:

$$\text{分散率}(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

其中, m_1 为水分散虾青素乳液中的虾青素含量, mg; m_2 为雨生红球藻中的全部虾青素含量, mg。由此可知,本工艺中的分散率同时也是藻内虾青素释放到胞外的释放率,等同于虾青素提取工艺中的提取率。

参照 Tofani 等^[19]的方法,通过 ABTS⁺自由基清除率测定水分散虾青素乳液的抗氧化能力。水分散虾青素对 ABTS⁺自由基的清除率按下式进行计算:

$$\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100$$

式中, A_1 是样品与 ABTS⁺自由基反应后的吸光值; A_2 是样品本身的吸光值; A_0 : 空白组的吸光值。

参照袁巧月等^[20]的方法测定乳液中颗粒的平均粒径和 Zeta 电位。

1.2.3 水分散虾青素制备工艺探索

1.2.3.1 吐温-20 添加量的影响 参照图 1 的步骤,在 600 W 超声功率下,料液比(雨生红球藻与超纯水的比例)1:20 g/mL 时,考察乳化剂不同添加量(0、100、150、200、400、600、800 和 1000 μL)对工艺过程的影响。

1.2.3.2 超声功率的影响 在吐温-20 添加量为 200 μL ,料液比 1:20 g/mL 时,考察不同超声功率(200、300、400、500 和 600 W)对工艺过程的影响。

1.2.3.3 料液比的影响 在吐温-20 添加量为 200 μL ,超声功率 600 W 时,考察不同料液比(1:10、1:20、

1:30 和 1:40 g/mL)对工艺过程的影响。

1.2.4 水分散虾青素乳液的形成原理探究

1.2.4.1 超声处理和高压均质处理对雨生红球藻破胞效果的影响 将 1 g 藻泥与 20 mL 超纯水充分混合,分别作 600 W 超声处理 30 min 和 60 MPa 高压均质处理一次,用甲醇-三氯甲烷(1:2, v/v)提取其中的虾青素。在虾青素提取前后分别取混匀的样品稀释 10 倍,在 400 倍放大倍数下进行对比观察,并参考 Thunyakorn 等^[21]的方法,用血球计数板进行破胞率的计数。其中,未处理的雨生红球藻作为对照。

使用扫描电子显微镜对未处理和接受 30 min 600 W 超声处理后的雨生红球藻进行形态分析。在检测之前,样品先经真空冷冻干燥处理 36 h(冷阱温度 $-60\text{ }^\circ\text{C}$,真空压强 1 Pa)。

1.2.4.2 不同处理方式对虾青素分散效果的影响 为了研究提高虾青素分散率的方法,采用单纯超声、单纯高压均质、超声后加吐温-20、超声协助吐温-20 和高压均质协助吐温-20 分别处理雨生红球藻。称取 1 g 雨生红球藻泥与 20 mL 超纯水充分混合,分别经过上述处理后,以 4 $^\circ\text{C}$,8000 r/min 的转速离心 30 min,然后收集上清液,并测定其中虾青素含量。

其中,超声处理条件为:在 600 W 超声环境下处理 30 min;高压均质处理:在 60 MPa 环境下处理;超声后加吐温-20:在 600 W 超声环境下处理 30 min 破胞,然后加入 200 μL 吐温-20 混匀;超声协助吐温-20 处理:藻液加入 200 μL 吐温-20 充分混合后在 600 W 超声环境下处理 30 min;高压均质协助吐温-20 处理:藻液加入 200 μL 吐温-20 充分混合后在 60 MPa 环境下处理。

1.2.5 水分散虾青素的表征

1.2.5.1 化学成分分析 水分散虾青素溶液中的多糖含量采用以葡萄糖为标准的蒽酮-硫酸法进行测定^[22]。将 1 mL 水分散虾青素溶液和 4 mL 蒽酮-硫酸溶液(3.3 mg/mL)剧烈混合,在 95 $^\circ\text{C}$ 下反应 7 min。然后在 580 nm 处测量吸光度。水分散虾青素的蛋白质含量用凯氏定氮法测定^[23]。水分散虾青素中的脂类含量是用氯仿和甲醇通过重量法来测定的^[24]。核酸含量参照齐祥明等^[16]的方法,使用定磷法测定。

1.2.5.2 脂肪酸组成成分分析 参照 Damiani 等^[25]报道的方法并做了部分修改,在脂肪提取吹干后进行脂肪的皂化和脂肪酸的甲酯化:在脂肪提取物中加入 2% 氢氧化钠甲醇溶液 8 mL,连接回流冷凝器,80 °C 水浴上回流,直至油滴消失。从回流冷凝器上端加入 7 mL 5% 三氟化硼甲醇溶液,在 8±1 °C 水浴中继续回流 2 min。用少量水冲洗回流冷凝器。停止加热,从水浴上取下烧瓶。迅速冷却至室温。加入 10 mL 正庚烷,振摇 2 min,再加入饱和氯化钠水溶液,静置分层。吸取上层正庚烷提取溶液大约 5 mL,至 25 mL 试管中,加入大约 3~5 g 无水硫酸钠,振摇后静置 5 min,吸取上层溶液到进样瓶中待测。使用配备了 SP-2560(100 m×0.25 mm, 0.2 μm)柱的气相色谱仪在 260 °C 的温度下进行分析。所得数据利用 GC 软件进行积分,用内标法进行含量计算。

1.2.5.3 激光共聚焦扫描显微镜分析 使用配备 10 倍目镜和 60 倍油浸物镜的激光共聚焦扫描显微镜在激发波长为 488 nm 的荧光模式下对乳剂的微观结构进行观察。乳液中的油相用尼罗红溶液(1 mg/mL 乙醇)染色。

1.2.5.4 差示扫描量热分析 参照 Liu 等^[26]报道的方法,使用热分析仪进行差示扫描量热(Differential scanning calorimetry, DSC)分析。

1.3 数据处理

使用 Origin 2018 软件绘制图形,结果以平均值±标准差(n=3)表示。采用 SPSS 19.0 软件对组间差异性进行分析,*P*<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 一步法制备水分散性虾青素乳液工艺探索

直接从雨生红球藻中提取并一步制备水分散性虾青素乳液的工艺探索结果如图 2 所示。图 2A、图 2D 和图 2G 的结果显示在吐温-20 体积为 200 μL、超声功率为 600 W、料液比为 1:20 g/mL 时,虾青素的分散率最高,可达 98.41%。

如前文所述,之前文献可见的由雨生红球藻经一步法制备水分散性虾青素的报道里,单次虾青素释放率仅为 37.45%^[16](如 1.2.2 所述,该研究和本文中的虾青素释放率即分散率,等同于单纯虾青素提取工艺中的提取率)。本研究采用超声协助吐温-20 的方法,虾青素分散率得到了实质性提高(98.41%),已达

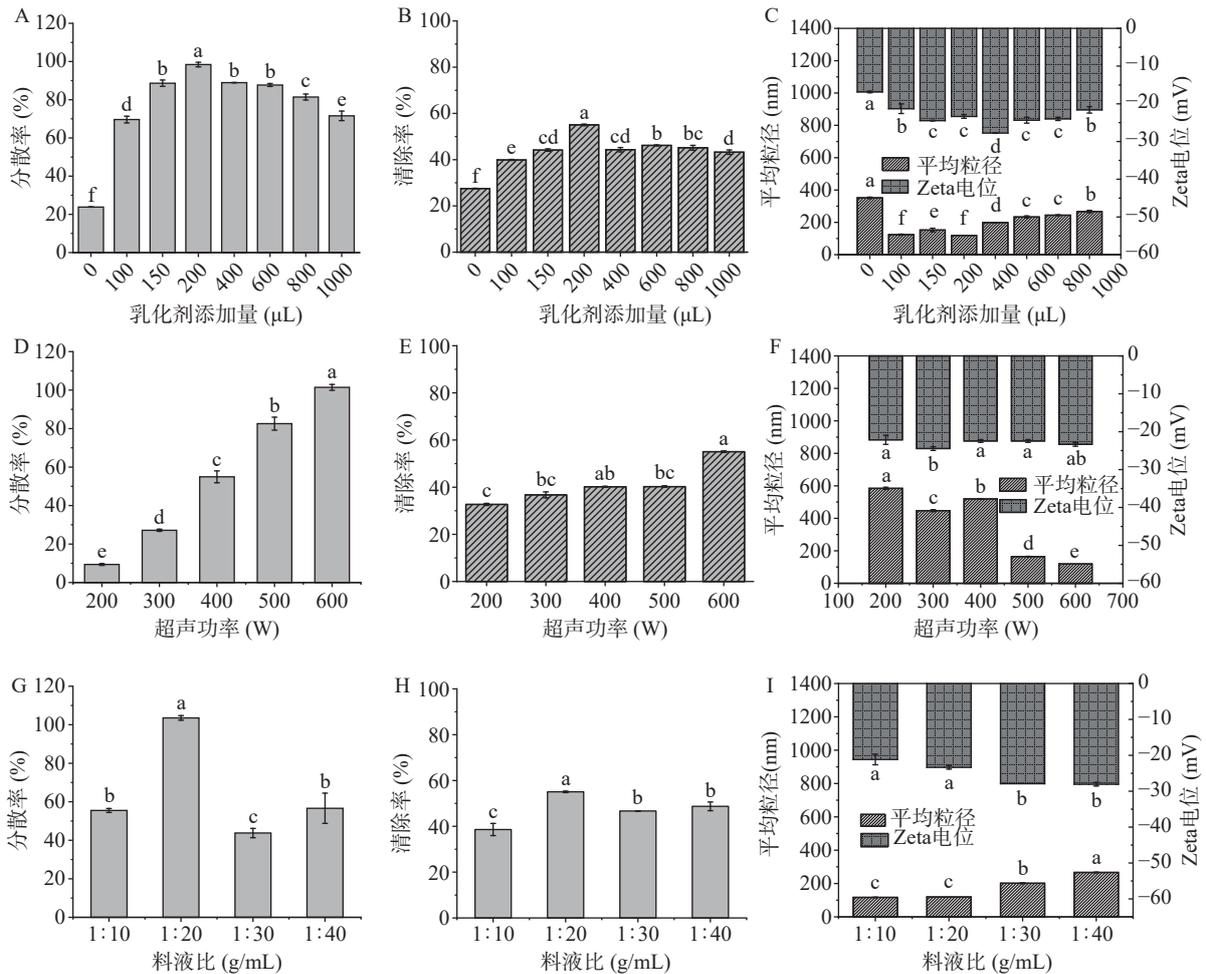


图 2 不同乳化剂添加量、超声功率和料液比对虾青素分散率、自由基清除率以及虾青素乳液的平均粒径和 Zeta 电位的影响
Fig.2 Effects of different emulsifier addition, ultrasonic power and material-to-liquid ratio on astaxanthin dispersion rate, free radical scavenging, and average particle size and Zeta potential of astaxanthin emulsions

注:不同小写字母表示差异显著(*P*<0.05),图 5 同。

到甚至超过了大多数单纯的虾青素提取工艺的提取率(2%~99%)^[4,9-10]。

系列探索性实验进一步显示,乳化剂添加量(图 2A、图 2B)对这一工艺过程中虾青素的分散率有显著的影响($P<0.05$)。当在 20 mL 溶液体系中加入 200 μL 吐温-20 时,分散到乳液体系中的虾青素量最高(98.41%)。在更高或更低的吐温-20 添加量下,虾青素的分散度均不够理想。图 2B 中 ABTS⁺ 自由基清除率结果的变化趋势和图 2A 大致相似,也在吐温-20 添加量为 200 μL 时达到了最高。这一方面进一步证明了 200 μL 吐温-20 添加量对虾青素的充分分散最适宜;另一方面显示,吐温-20 添加量的不同对所制备水分散虾青素的抗氧化活性影响较小。

不同功率的超声处理具有不同的细胞破坏作用^[10],图 2D、图 2E 也显示了这一规律:随超声功率的增加,虾青素分散率显著增加($P<0.05$)。在 600 W 超声功率的处理下,分散到乳液体系中的虾青素量已接近理论最高值 100%。因此,基于降低能耗和热效应的目的,未再考察更高的超声功率。与虾青素分散趋势不尽相同的是,图 2E 显示的自由基清除率增加幅度较小。这可能是由于包封处理使得虾青素的抗氧化活性具有一定的缓释效应^[27],导致在较短时的测试中,虾青素的抗氧化性未完全释放。

和梁康琳^[9]的研究相似,在本实验中,料液比同样是影响一步法制备水分散性虾青素的显著因素。图 2G 和图 2H 显示,当料液比为 1:20 g/mL 时,虾青素的分散率最高。当料液比低于或高于该比例时,虾青素分散效果都会显著降低($P<0.05$)。

此外,在最佳乳化剂添加量和超声功率下,本实验得到的水分散虾青素颗粒平均粒径为 115.55 nm,而其他条件下颗粒往往更大;Zeta 电位在此条件下为 -23.35 mV,而其他条件下则基本在 -16.85~-28.05 mV 内波动。与 Shen 等^[28]研究(通过超声协助吐温-20 在水中包封溶于中链三酰基甘油的虾青素,其粒径为 193.87 ± 3.84 nm, Zeta 电位 -7.10 mV)相比,本研究用一步法获得的水分散虾青素的粒径更小, Zeta 电位绝对值更高,这表明该乳液具有高稳定性^[28]。

2.2 水分散虾青素一步法制备工艺过程机理探究

基于上述探索性实验,研究组认为,超声协助和吐温-20 的添加是一步法制备水分散性虾青素不可缺少的两个条件。在这类研究中,通常认为超声的主要作用是破碎^[10,28],而吐温则用来具体实现虾青素的包封^[18,28]。因此,下文将对对比研究破胞效果更好的高压均质手段能否替代超声,并进一步揭示超声辅助吐温-20 一步法制备水分散虾青素的工艺过程机理。

2.2.1 超声与高压均质破胞作用差异分析

图 3 显示了超声和高压均质处理对雨生红球藻细胞破坏作用的差异。

对比图 3b 和图 3e 可以发现,超声的破胞效率

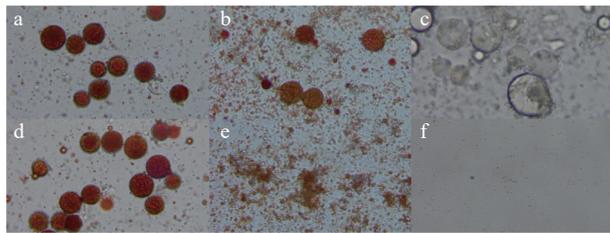


图 3 光镜观察雨生红球藻的状态图(400 \times)

Fig.3 Light microscopic observation of the state graphs of *Haematococcus pluvialis* (400 \times)

注:超声前(a)、超声后(b)、超声后用有机试剂提取虾青素后(c)、高压均质前(d)、高压均质后(e)、高压均质后用有机试剂提取虾青素后(f)。

明显不如高压均质。然而进一步对两样品中虾青素采用有机溶剂提取,结果显示,破胞率仅为 51.35% (血球计数板统计结果)的超声处理样品也和破胞率 97.3% 的高压均质样品一样,其中虾青素都会被完全提取(图 3c、图 3f)。进一步以高压均质的虾青素提取率为参照,测定得超声处理的虾青素提取率为 101.05%。

据此推测,在超声处理下,很多保持相对完整形态的细胞可能已经出现了漏洞,因为超声具有引起湍流和剪切应力进而推动细胞内含物外流的作用^[29]。图 4 给出的扫描电镜观察结果进一步支撑了这一推测:经超声处理后的雨生红球藻细胞表面开始出现漏洞,细胞内含物释放痕迹明显,且超声功率越大,释放物越多。

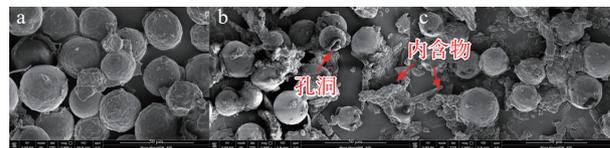


图 4 扫描电镜观察到的雨生红球藻的细胞状态图

Fig.4 Scanning electron microscopy images of the cellular state of *Haematococcus pluvialis*

注:超声处理前(a)、300 W 超声处理后(b)和 600 W 超声处理后(c)。

对于破胞率更高的高压均质是否可以替代超声完成一步法制备水分散虾青素,研究组首先对未加乳化剂的高压均质样品也进行了离心分离的尝试,结果显示,经同样的离心条件后,上清液呈浑浊状态,很难实现分离。估计这和细胞碎片过小有关(图 3e、图 3f)。文献显示,该均质条件下获得的颗粒往往在百纳米到微米级别^[30],与图 3e、图 3f 所示结果吻合。而吐温-20 形成的包封物粒径往往也是在百纳米范围内^[31]。因此,从这一方面来说,预计高压均质替代超声实现一步法制备水分散性虾青素将不可避免含有很多难分离的细胞碎片等。

2.2.2 超声、高压均质对虾青素分散的作用

图 5 的结果显示单纯的高压均质处理后,虾青素的分散率为 4.76%,单纯的超声处理后虾青素的分散率为

9.21%。这说明, 单纯高压均质和超声等物理作用很难实现虾青素的分散。进一步在超声之后加入吐温-20, 结果显示, 水分散虾青素的获得量有一定提高(21.49%), 但仍处于较低水平。这说明超声在协助吐温形成水分散虾青素方面, 同样有着重要作用。数据显示, 高压均质协助吐温-20 同样可以获得较高的分散率(89.82%), 但仍显著低于超声协助吐温-20 获得的虾青素分散率($P < 0.05$)。且因高压均质协助吐温-20 分散的样品中存在大量难分离细胞碎片, 很难获得超声处理后相似的半透明溶液(均匀纳米乳液的特征)。因此, 超声协助吐温-20 分散虾青素工艺更具有工业化前景。

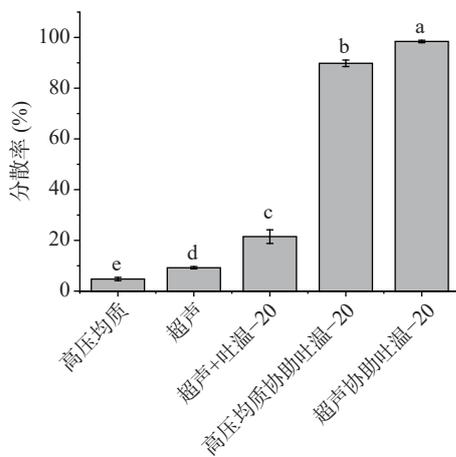


图 5 高压均质、超声、超声+吐温-20、高压均质协助吐温-20 和超声协助吐温-20 处理与虾青素分散率的关系

Fig.5 Relationship between high pressure homogenization, ultrasonication, ultrasonication+Tween-20, high pressure homogenization-assisted Tween-20 and ultrasound-assisted Tween-20 treatments and astaxanthin dispersion rate

2.2.3 一步法制备水分散虾青素中超声协同吐温-20 的作用分析 基于以上内容, 本研究组推测, 在协助吐温-20 从雨生红球藻原料中一步法获得虾青素的工艺中, 超声首先通过对细胞内容物的作用实现了对藻细胞的有限破坏(参见文献 [10] 和图 3b、图 3c; 图 4b、图 4c); 然后吐温-20 在超声的作用下分别对仍在胞内和释放到胞外的虾青素进行包封。此时超声在微观尺度层面所具有的促进传质能力^[7]对协助吐温-20 实现虾青素的包封具有重要意义, 超声处理后再加吐温-20 的虾青素分散结果进一步验证了该推测。相比于高压均质处理, 超声处理对藻细胞的有限破坏给后续的水分散虾青素乳液与藻渣、甚至残

余藻油的分离带来方便。

2.3 水分散虾青素的表征

2.3.1 主要成分分析 如表 1 所示, 本研究所水分散虾青素中虾青素含量高达 43.82%, 远高于齐祥明等^[16]获得的一步法制备产品; 而且, 这一数值也远高于使用纯虾青素封装的虾青素含量(约 3.0%)^[32-33]。这充分展示了这一工艺和产品的优越性。

进一步分析表 1 结果, 可以发现, 在本文和梁康琳等^[9,15]的一步法工艺中, 实现包埋虾青素的同时均包埋了一定量的脂类物质。两种样品中虾青素占脂类物质总量的比例接近, 分别为 57.91% 和 65.24%。结合文献中雨生红球藻虾青素和脂质含量的数据^[34], 不难发现, 两个工艺过程中, 溶于脂滴的虾青素均被选择性地富集包封了。而本研究所开发工艺中, 残余藻渣已不再能提取出虾青素, 这保留了其余藻油的再提取可能性。

此外, 本研究所样品中虽然也含有一定量的蛋白质和多糖, 但明显远低于齐祥明等^[16]的样品。这说明, 在本工艺中, 吐温-20 替代了齐祥明等工艺中蛋白质、多糖乃至核酸的包封作用。这可能也是本工艺中虾青素释放率大大增加的原因所在。另外, 图 2C、图 2F 和图 2I 的数据显示, 本研究所获水分散虾青素颗粒的 Zeta 电位绝对值明显高于文献中单纯的吐温-20 包封^[28], 可能也和其中含有一定量蛋白质、多糖等荷电物质有关。

2.3.2 脂肪酸分析 从表 1 数据可以发现, 雨生红球藻中的脂质并未被完全包封到水分散虾青素的纳米颗粒中, 表 2 进一步显示了被包封的脂质与雨生红球藻中原脂质在脂肪酸组成上的不同。表 2 中数据显示, 水分散虾青素中脂肪酸组成的不同在于饱和脂肪酸 C12:0 异常的大幅度增高。结合吐温-20 具有 12 碳的脂肪链结构, 研究组认为, 这些被选择性包封的饱和脂肪酸 C12:0 将可能因为结构的相似性而与吐温-20 有序地排列于脂滴表面, 降低被包封脂滴的表面张力^[35-36]。图 2C、图 2F 和图 2I 的数据显示, 本研究所获水分散虾青素颗粒粒径明显低于文献中纯吐温-20 包封纯虾青素的颗粒粒径^[28], 可能也与此有关, 这比文献中单纯借助吐温-20 来降低脂滴表面张力明显效果更好^[35-36]。

此外, 表 2 结果显示, 被包封的不饱和脂肪酸量明显偏低, 这可能与它们的结构有序性较低有关(与吐温-20 结构相似性低, 将不利于降低表面张力^[36])。

表 1 水分散虾青素乳液的主要成分

Table 1 Main compositions of water-dispersion astaxanthin emulsions

样品	组成成分(%)					总量(%)	虾青素(%)
	蛋白质	多糖	核酸	脂质	灰分		
本文样品	9.95±3.01 ^b	19.88±0.40 ^b	0.33±0.02 ^b	75.67±5.13 ^a	1.00±0.00	106.83±8.58	43.82±0.74 ^a
柠檬酸缓冲液制备的样品 ^[9]	30.16±2.43 ^a	33.02±1.38 ^a	18.31±2.96 ^a	9.09±0.21 ^b	#	90.58±6.89	5.93±1.48 ^b

注: #因该样品冻干时不可避免含有柠檬酸及柠檬酸钠成分, 因此原文献在进行成分分析时扣除了灰分; 同列不同字母表示同一成分间有显著性差异($P < 0.05$)。

表2 水分散虾青素乳液中的脂肪酸组成

Table 2 Fatty acid composition of water-dispersed astaxanthin emulsions

脂肪酸	含量(wt, %)	
	雨生红球藻	虾青素分散乳液
C11:0	0.09	-
C12:0	0.04	8.20
C14:0	0.25	0.20
C15:0	0.03	-
C16:0	9.75	8.20
C16:1	0.14	0.13
C17:0	0.06	-
C18:0	0.21	1.20
C18:1(n-9)	5.66	4.06
C18:2(n-6)	10.14	7.60
C18:3(n-6)	0.41	0.33
C18:3(n-3)	8.15	5.93
C20:0	-	0.07
C20:2(n-6)	1.25	-
C20:3(n-6)	0.07	-
C20:3(n-3)	0.01	-
C20:4(n-6)	0.27	0.20
C20:5(n-3)	0.25	0.20
C22:0	0.06	-
C24:0	0.06	0.07
C24:1	0.01	-
饱和脂肪酸	10.54	17.93
单不饱和脂肪酸	5.82	4.20
多不饱和脂肪酸	20.55	14.27
Ω3脂肪酸	8.41	6.13
Ω6脂肪酸	12.14	8.13
Ω9脂肪酸	5.66	4.07

注：“-”表示未检测到。

另一方面,这意味着残存的未被包封的藻油中将含有更高比例的不饱和脂肪酸,利于残余藻油的再提取。

2.3.3 激光共聚焦电镜分析 图6显示了添加与不添加吐温-20所获得水分散虾青素的微观状态。从图中可以看出,添加吐温-20后获得的含油颗粒大而且多。吐温-20会使分散颗粒有能力包封更多的脂质^[36],这可能是形成颗粒粒径更大的原因所在。相较而言,梁康琳等^[9]、齐祥明等^[16]未加吐温-20所获得

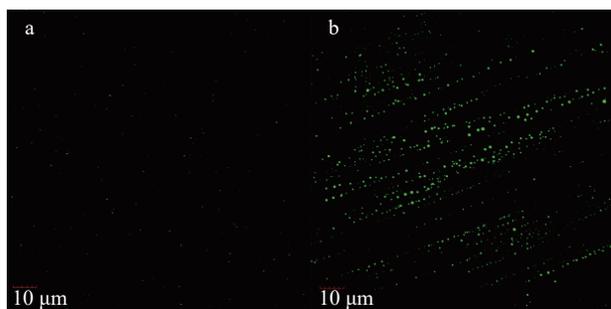


图6 激光共聚焦电镜观察无乳化剂的虾青素分散液(a)和水分散虾青素乳液(b)(600×)

Fig.6 CLSM observation of astaxanthin dispersion without emulsifier (a) and water-dispersible astaxanthin emulsion (b) (600×)

的颗粒粒径更小(40~100 nm)。

2.3.4 DSC分析 图7给出的游离虾青素和本研究制备水分散虾青素DSC曲线对比显示,游离虾青素在229℃附近有晶体的降解特征热吸收峰^[37](图6a);而本研究中所得样品不具备此热吸收峰(图6b)。这表明,该样品中的虾青素完全为非晶态^[26]。文献表明^[38],无定形非晶态虾青素将更利于溶解,从而显著改善难溶性药物的口服生物利用度。

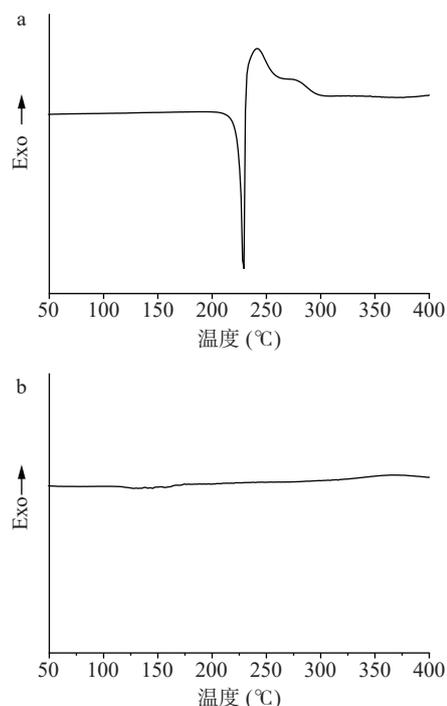


图7 游离虾青素(a)和水分散虾青素(b)的DSC曲线
Fig.7 DSC curves of free astaxanthin (a) and water-dispersed astaxanthin (b)

综合以上水分散虾青素样品的表征数据可以发现,本研究所得样品较纯虾青素包封样品具有更合理和高效的包封机制,因而将具有更高的稳定性(粒径更小、Zeta电位绝对值更高)和生物利用度(所包封的全为非晶型虾青素)。

3 结论

本文研究了超声辅助吐温-20从雨生红球藻中分散、释放虾青素从而一步制备水分散虾青素乳液的方法,所得结论如下:乳化剂添加量、超声功率、料液比均对该过程有极显著影响。在料液比1:20 g/mL、乳化剂添加量200 μL、超声功率600 W的条件下,雨生红球藻中虾青素分散、释放的比率可达98.41%。其中,在该一步法制备过程中超声处理具有破胞和协助吐温-20分散的双重作用。超声对细胞的有限破碎作用保证了虾青素的释放,同时为后续水分散虾青素的获取提供了方便,明显比高压均质更具工业化潜力。

水分散虾青素成分分析结果显示:其中富集有43.82%的虾青素;被选择性包封的脂质里饱和脂肪酸(尤其是C12:0)偏高。其他表征数据显示:乳液颗

粒平均粒径为 115.55 nm; Zeta 电位为 -23.35 mV; 被包封虾青素为无定形非晶态, 表明所得样品具有较高的水溶稳定性和生物利用度。

综上所述, 本文开发的超声辅助吐温-20 一步法制备水分散性虾青素乳液工艺为直接从雨生红球藻中获得虾青素产品提供了一种绿色可行方案。该方案简便、高效; 所得产品部分性能优于纯虾青素包封的产品, 同时该工艺保留了进一步提取残余藻油的可行性, 具有较高的工业化利用前景。

参考文献

- [1] JIANG G L, ZHOU L Y, WANG Y T, et al. Astaxanthin from Jerusalem artichoke: Production by fed-batch fermentation using *Phaffia rhodozyma* and application in cosmetics[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 63: 16–25.
- [2] REN Y Y, DENG J Q, HUANG J C, et al. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125736.
- [3] ELBAHNASWY S, ELSHOPAKY G E. Recent progress in practical applications of a potential carotenoid astaxanthin in aquaculture industry: A review[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013.
- [4] AHMADKELAYEH S, HAWBOLDT K. Extraction of lipids and astaxanthin from crustacean by-products: A review on supercritical CO₂ extraction[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 103: 94–108.
- [5] ZHANG C X, XU Y X, WU S, et al. Fabrication of astaxanthin-enriched colon-targeted alginate microspheres and its beneficial effect on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 205: 396–409.
- [6] 李一, 邱莉璐, 罗佳怡, 等. 利用雨生红球藻提取天然虾青素用于水产养殖业的研究[J]. *中国食品*, 2021(24): 142–143. [LI Y, QIU L J, LUO J Y, et al. Extraction of natural astaxanthin using *Haematococcus pluvialis* for aquaculture[J]. *China Food*, 2021(24): 142–143.]
- [7] LEE S Y, CHO J M, CHANG Y K, et al. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 1317–1328.
- [8] NITSOS C, FILALI R, TAIDI B, et al. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 45: 107650.
- [9] 梁康琳. 雨生红球藻源天然水溶性虾青素的制备工艺研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2020. [LIANG K L. Preparation and formation mechanism of natural Water-soluble astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2020.]
- [10] LIU Z W, ZENG X A, CHENG J H, et al. The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2018, 53(9): 2212–2219.
- [11] HIGUERA-CAPIPARA I, FELIX-VALENZUELA L, GOY-COOLEA F M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46(2): 185–196.
- [12] YAO Q M, MA J Q, CHEN X M, et al. A natural strategy for astaxanthin stabilization and color regulation: Interaction with proteins[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134343.
- [13] PAN L, ZHANG S W, GU K R, et al. Preparation of astaxanthin-loaded liposomes: Characterization, storage stability and antioxidant activity[J]. *Cyta-Journal of Food*, 2018, 16(1): 607–618.
- [14] BURGOS-DIAZ C, OPAZO-NAVARRETE M, SOTO-ANUAL M, et al. Food-grade pickering emulsion as a novel astaxanthin encapsulation system for making powder-based products: Evaluation of astaxanthin stability during processing, storage, and its bioaccessibility[J]. *Food Research International*, 2020, 134: 109244.
- [15] 高红. 虾青素的提取、纯化及其纳米脂质载体制备研究[D]. 西宁: 青海师范大学, 2022. [GAO H. Study on extraction and purification of astaxanthin and preparation of nanostructured lipid carrier[D]. Xining: Qinghai Normal University, 2022.]
- [16] 齐祥明, 梁康琳, 黄文灿, 等. 一种制备水溶性虾青素的方法及由其制得的虾青素水溶液: 中国, 202010733602.3[P]. 2020-07-27[2023-02-18]. [QI X M, LIANG K L, HUANG W C, et al. Method for preparing water-soluble astaxanthin and an aqueous solution of astaxanthin prepared thereby: China, 202010733602.3[P]. 2020-07-27[2023-02-18.]
- [17] ZHANG J, LI Q R, LU Y H, et al. Astaxanthin overproduction of *Phaffia rhodozyma* PR106 under titanium dioxide stress by transcriptomics and metabolic regulation analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125757.
- [18] 韩卿卿, 姜小燕, 黄鑫. 虾青素干乳剂制备工艺研究[J]. 现代职业教育, 2020, 204(30): 178–179. [HAN Q Q, JIANG X Y, HUANG X. Study on the preparation process of astaxanthin dry emulsion[J]. *Modern Vocational Education*, 2020, 204(30): 178–179.]
- [19] TOFANI D, BALDUCCI V, GASPERI T, et al. Fatty acid hydroxytyrosyl esters: Structure/antioxidant activity relationship by ABTS and in cell-culture DCF assays[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(9): 5292–5299.
- [20] 袁巧月, 吴梵, 王孝治, 等. 雨生红球藻虾青素纳米颗粒的制备及稳定性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(16): 98–104. [YUAN Q Y, WU F, WANG X Z, et al. Preparation and stability of nanoparticles containing astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(16): 98–104.]
- [21] THUNYAPORN R, DOH I, LEE D W. Multi-volume hemacytometer[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 14106.
- [22] TANG B Y, GONG T, ZHOU X D, et al. Deletion of Cas3 gene in *Streptococcus mutans* affects biofilm formation and increases fluoride sensitivity[J]. *Archives of Oral Biology*, 2019, 99: 190–197.
- [23] VINKLÁRKOVÁ B, CHROMÝ V, ŠPRONGL L, et al. The Kjeldahl method as a primary reference procedure for total protein in certified reference materials used in clinical chemistry. II. selection of direct Kjeldahl analysis and its preliminary performance parameters[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2015, 45(2): 112–118.
- [24] EL-SHEEKL M M, HAMOUDA R A. Lipids extraction from the green alga *Ankistrodesmus falcatus* using different methods[J]. *Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche E Naturali*, 2016, 27(3): 589–595.
- [25] DAMIANI M C, POPOVICH C A, CONSTENLA D, et al. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 3801–3807.
- [26] LIU G J, HU M, ZHAO Z Y, et al. Enhancing the stability of astaxanthin by encapsulation in poly (l-lactic acid) microspheres us-

- ing a supercritical anti-solvent process[J]. *Particuology*, 2019, 44: 54–62.
- [27] YANG J, ZHOU Q W, HUANG Z H, et al. Mechanisms of *in vitro* controlled release of astaxanthin from starch-based double emulsion carriers[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 119: 106837.
- [28] SHEN X, FANG T Q, ZHENG J, et al. Physicochemical properties and cellular uptake of astaxanthin-loaded emulsions[J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 727.
- [29] KIM B, LEE S Y, NARASIMHAN A L, et al. Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: Recent advances[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126124.
- [30] CHOI W Y, LEE H Y. Effective production of bioenergy from marine *Chlorella* sp. by high-pressure homogenization[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, 30(1): 81–89.
- [31] 许雯. 虾青素纳米给药体系的构建及其体内外增溶促吸研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019. [XU W. Establishment of astaxanthin delivery nanoparticle system and study on its solubility and absorption improvement *in vitro* [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.]
- [32] GUAN L, LIU J L, YU H J Y, et al. Water-dispersible astaxanthin-rich nanopowder: Preparation, oral safety and antioxidant activity *in vivo* [J]. *Food & Function*, 2019, 10(3): 1386–1397.
- [33] WU H Y, ZHANG H Y, LI X H, et al. Preparation and characterization of phosphatidyl-agar oligosaccharide liposomes for astaxanthin encapsulation [J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134601.
- [34] BUSTAMANTE A, MASSON L, VELASCO J, et al. Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 1013–1021.
- [35] HONG L, ZHOU C L, CHEN F P, et al. Development of a carboxymethyl chitosan functionalized nanoemulsion formulation for increasing aqueous solubility, stability and skin permeability of astaxanthin using low-energy method [J]. *Journal of Microencapsulation*, 2017, 34(8): 707–721.
- [36] 齐祥明, 赵小林, 郭彦玲. 直流电场下水包油型乳液中鱼油油滴聚并、析出行为的研究 [J]. *现代食品科技*, 2017, 33(1): 185–190. [QI X M, ZHAO X L, GUO Y L. Coalescence and separation of fish oil droplets in oil-in-water emulsions under direct-current fields [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 185–190.]
- [37] WANG J, CAO Y P, SUN B G, et al. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(3): 1069–1075.
- [38] 王亚男, 李芳, 程锦, 等. 无定形药物固相表征技术的研究进展及应用 [J]. *药学与临床研究*, 2022, 30(3): 246–251, 255. [WANG Y N, LI F, CHENG J, et al. Research progress and application of solid-phase characterization techniques for amorphous drugs [J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2022, 30(3): 246–251, 255.]