

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

技术领域

本申请涉及生物化工技术领域，尤其涉及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。

背景技术

虾青素具有保护皮肤免受光损伤，预防动脉硬化和相关疾病，抗癌活性，增强免疫系统功能，维护眼睛和中枢神经系统的健康，抗感染等生理活性，在食物、医药、化妆品和养殖业等领域具有广泛的应用，因此相关的虾青素提取和应用技术正引起越来越多人们的关注。

目前专利及相关文献研究中，关于虾青素提取的技术主要包括：有机溶剂萃取法、超临界 CO₂ 萃取法、酶解法和微波萃取法等，然而这些方法中都存在一些问题。

CN110724083A 公开了一种有机溶剂萃取法，在萃取时由于虾青素结构不稳定，可能会发生异构化反应而降低其抗氧化活性。且这类有机溶剂萃取法采用的多数有机溶剂都具有一定毒性，萃取之后会有试剂残留问题，限制了产品在食品工业中的应用。

CN109608376A 公开了一种超临界 CO₂ 萃取法，但该方法在生产应用中需要有几个大气压的耐压能力，设备要求高，资金投入大，生产成本低，且该技术牵涉到耐高压设备的操作，对生产技术要求高，也使其在工业化生产上的应用受到了限制。

CN107805215B 公开了一种酶解法提取虾青素的方法，虽然在提取过程中使用酶解法对雨生红球藻进行二次破壁，提高了虾青素的提取率，但反应对温度、pH 和时间等操作条件要求较高，且操作过程复杂，酶制剂的使用也增加了生产成本。

2007 年王灵昭等人在有机提取虾青素时加以微波法辅助（参见“微波法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究”，王灵昭等，食品研究与开发，第 28 卷第 12 期，第 96-100 页），提取率虽有提高，但微波萃取过程中温度升高，会造成虾青素的氧化分解，另外微波萃取的选择性相对较差，也不利于虾青素的分离。

上述各技术和方法均只涉及虾青素的提取，然而虾青素虽然具有诸多生理活性，在产品应用上却因为不溶于水而面临很多问题，因而提取出的虾青素往往需要经过再加工才能形成终端产品。因此，改善虾青素在水溶液中分散能力，并提高虾青素的稳定性，成为了虾青素产品化过程中的瓶颈问题。

目前，国内外改善虾青素水溶性方面的专利及相关研究主要包括：微胶囊法、乳化剂法、纳米沉淀法和包合法等。

CN108403666A 公开了一种微胶囊法，该方法虽可以改善生物分子的稳定性和物理性，然而存在着操作不连续，不利于联动化生产，包埋物不易再回收导致制备成本较高等问题。

2013 年 Navideh A 等人通过加入亲水性乳化剂（聚山梨酯和蔗糖酯）提高虾青素的水溶性，然而该技术依赖于合适的乳化均质手段和干燥技术，同时经乳化挥发后残留的有机溶剂也会对虾青素制品造成一定的生物安全问题（参见“Effects of Selected Polysorbate and Sucrose Ester Emulsifiers on the Physicochemical Properties of Astaxanthin Nanodispersions”，Navideh A 等，Molecules，第 18 期，第 768-777 页）。

2007 年 Xiaolin Chen 等人使用包合物法将虾青素包合在 β -环糊精中（参见“The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin”，Xiaolin Chen 等，Food Chemistry，第 101 期，第 1580-1584 页），虽提高了虾青素的溶解度和稳定性，然而该方法载药量低，一般仅为 9%~14%，造成了资源浪费，提高了生产成本，不利于工业化生产。

CN109646425 A 公开了一种壳聚糖与 DNA 构建虾青素纳米体系的方法，该方法虽操作简单、对设备要求不高，但是由于聚合物材料的成分大部分是通过人工合成等化学方法得到，导致聚合物材料在生物相容性、可降解能力、细胞毒性以及有机溶剂残留等方面存在一些不足。

综上所述，现有的天然虾青素产品制备工艺往往包括提取技术和水溶性虾青素制备技术两步，且两步工艺涉及的各种技术均存在一定的缺陷。

因此，需要开发一种能够缓解上述问题的水溶性虾青素制备方法，提高虾青素的水溶性和稳定性。

发明内容

鉴于现有技术中存在的问题，本申请提供一种制备水溶性虾青素的方法，

所述方法克服现有提取技术和水溶性虾青素制备技术两步中存在的技术缺陷，并通过将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合后进行细胞破碎，再进行浸取，实现了天然虾青素与原料中天然存在的蛋白质、核酸或多糖等成分间相互作用，从而实现天然虾青素提取和水溶性虾青素制备一步化耦合，无需再单独对虾青素进行改性，且虾青素来源天然，操作流程简单，设备要求低，生产成本低，绿色安全，无有机溶剂残留，易于工业化实现。

为达此目的，本申请采用以下技术方案：

第一方面，本申请提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法包括如下步骤：

(1) 将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合，进行细胞破碎，得到浸取液；和

(2) 步骤(1)所述浸取液经搅拌浸取，固液分离，得到水溶性虾青素。

本申请提供的制备水溶性虾青素的方法，通过将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合后再进行细胞破碎，通过有机酸的环境，促进虾青素与含虾青素的原料中天然存在的蛋白质、核酸或多糖成分的相互作用，形成自组装形式的水溶性虾青素，其中，这些天然的成分包裹在虾青素的外部，使其呈现稳定的水溶性，制得的虾青素水溶液中的虾青素不发生团聚等现象；而且本方法的虾青素来源天然，操作流程简单，设备要求低，生产成本低，绿色安全，无有机溶剂残留，易于工业化实现。

而且本申请采用可食用的食品级有机酸，最终得到的虾青素无溶剂残留，可有效保障虾青素在后续食品领域、生物医药领域或化妆品领域等领域的化学品安全性。

优选地，所述含虾青素的原料包括雨生红球藻、法夫红酵母、甲壳类动物或小球藻中的任意一种或至少两种的组合，其中典型但非限制性的组合为：雨生红球藻和法夫红酵母的组合，雨生红球藻和小球藻的组合，法夫红酵母和小球藻的组合，优选为雨生红球藻。

本申请中的含虾青素的原料优选选自雨生红球藻的湿藻藻泥。

优选地，步骤(1)中所述含有机酸的溶液中含有机酸的质量浓度为0.1~2.0mol/L，例如可以是0.1mol/L、0.2mol/L、0.5mol/L、0.8mol/L、1mol/L、1.2mol/L、1.3mol/L、1.5mol/L、1.8mol/L或2mol/L等。

优选地，所述含有机酸的溶液的 pH 为 3.0~6.5，例如可以是 3.0、3.2、3.5、3.8、4.0、4.2、4.5、4.8、5.0、5.2、5.5、5.8、6.0、6.2、6.3 或 6.5 等，优选为 5.0~6.3。

本申请中含有机酸的溶液的 pH 优选为 5.0~6.3，能够更好地促进溶液中虾青素与其他天然成分的相互作用，提高浸取率。

优选地，所述有机酸包括苹果酸、酒石酸、甘氨酸、草酸或柠檬酸中的任意一种或至少两种的组合，其中典型但非限制性的组合为：苹果酸和酒石酸的组合，苹果酸和甘氨酸的组合，苹果酸和草酸的组合，酒石酸和甘氨酸的组合，甘氨酸和柠檬酸的组合，优选为柠檬酸。

优选地，所述含有机酸的溶液为有机酸 pH 缓冲液。

本申请采用的含有机酸的溶液优选为有机酸 pH 缓冲液，这是因为 pH 对浸取液中各物质的等电点有较大的影响，从而将影响虾青素与溶液中天然物质的自组装程度，也就最终影响虾青素的提取率和抗氧化性，且细胞中细胞液原本存在一定的 pH 值，采用 pH 缓冲液能够有效保障长时间浸取过程中溶液 pH 的稳定，进一步提高浸取率。

优选地，所述有机酸 pH 缓冲液包括苹果酸和苹果酸钠缓冲液、酒石酸和酒石酸钠缓冲液、甘氨酸和 HCl 缓冲液、草酸和草酸钠溶液缓冲液或柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液中的任意一种或至少两种的组合，其中典型但非限制性的组合为：苹果酸和苹果酸钠缓冲液与甘氨酸和 HCl 缓冲液的组合，草酸和草酸钠溶液缓冲液与柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液的组合，柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液与苹果酸和苹果酸钠缓冲液的组合，草酸和草酸钠溶液缓冲液与甘氨酸和 HCl 缓冲液的组合，苹果酸和苹果酸钠缓冲液与甘氨酸和 HCl 缓冲液的组合，优选为柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液。

优选地，所述含虾青素的原料与含有机酸的溶液的料液比为 0.1~10g:10~40mL，例如可以是 0.1g:10mL、2g:10mL、5g:10mL、10g:10mL、0.1g:20mL、0.5g:20mL、1g:20mL、5g:20mL、10g:20mL、0.1g:30mL、0.5g:30mL、1g:30mL、2g:30mL、5g:30mL、10g:30mL、0.1g:40mL、0.5g:40mL、1g:40mL、2g:40mL、5g:40mL 或 10g:40mL 等。

优选地，步骤（1）中所述细胞破碎的方式包括采用超声破碎仪进行细胞破碎。

优选地，所述细胞破碎的时间为 30~60min，例如可以是 30min、35min、40min、45min、50min、55min 或 60min 等。

优选地，步骤（1）和/或步骤（2）中加入助剂辅助浸取。

本申请通过外加食品许用的助剂，能够实现天然虾青素与原料中天然存在的蛋白质、核酸、多糖等成分间相互作用，进而一步促进水溶性虾青素的组装，提高水溶性虾青素的提取率。

优选地，所述助剂包括蛋白质、核酸或多糖中的任意一种或至少两种的组合，其中典型但非限制性的组合为：蛋白质与核酸的组合，蛋白质与多糖的组合，核酸与多糖的组合。

优选地，步骤（2）中所述搅拌浸取的时间为 6~72h，例如可以是 6h、8h、10h、12h、15h、20h、24h、25h、30h、35h、40h、45h、48h、50h、60h 或 72h 等，优选为 12~48h。

优选地，所述搅拌浸取的温度为 20~35℃，例如可以是 20℃、22℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、32℃、33℃或 35℃等。

优选地，所述搅拌浸取在避光封闭条件中进行。

优选地，步骤（2）中所述固液分离包括离心分离。

优选地，所述离心分离的温度为 2~5℃，例如可以是 2℃、3℃、4℃或 5℃等。

优选地，所述离心分离的时间为 30~60min，例如可以是 30min、35min、40min、45min、50min、55min 或 60min 等。

优选地，所述离心分离的转速为 7000~9000r/min，例如可以是 7000r/min、7500r/min、7800r/min、8000r/min、8200r/min、8500r/min、8600r/min 或 9000r/min 等。

优选地，所述离心分离后采用过滤器对离心分离得到的上清液过滤，得到水溶性虾青素溶液。

优选地，所述方法还包括：（3）将步骤（2）中固液分离得到的含虾青素原料渣进行至少一次再浸取。

本申请中由于浸取环境相对温和，无法一次性将虾青素提取完整，可向固液分离后的含虾青素原料渣加入含有机酸的溶液，再次进行提取，且可循环多次，提高整体工艺的收率。

优选地，所述再浸取包括：将所述含虾青素原料渣与含有机酸的溶液混合，得到浸取液，循环至步骤（2）中。

优选地，所述再浸取采用与步骤（1）中相同和/或不同的含有机酸的溶液。

优选地，所述再浸取先采用与步骤（1）中相同的含有机酸的溶液，再采用不同的含有机酸的溶液。

本申请优选先采用相同的有机酸溶液进行浸取，至虾青素的提取率较低时，此时溶液中各物质的浓度在此 pH 条件下已达到等电点，更换不同 pH 的含有机酸溶液进行再提取，能够进一步提高提取率。

作为本申请优选的技术方案，所述方法包括如下步骤：

（1）将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合，进行细胞破碎，得到浸取液，所述有机酸的质量浓度为 0.1~2.0mol/L、pH 为 3.0~6.5 的有机酸 pH 缓冲液，含虾青素的原料与含有机酸的溶液的料液比为 0.1~10g:10~40mL；

（2）步骤（1）所述浸取液在 20~35℃避光封闭条件中经搅拌浸取 6~72h，再在 2~5℃、7000~9000r/min 下离心分离 30~60min 后采用过滤器对离心分离得到的上清液过滤，得到水溶性虾青素；和

（3）将步骤（2）中固液分离得到的含虾青素原料渣与含有机酸的溶液混合，得到浸取液，循环至步骤（2）中，进行至少一次再浸取。

第二方面，本申请提供一种虾青素水溶液，所述虾青素水溶液采用第一方面所述的制备水溶性虾青素的方法制得。

本申请提供的虾青素水溶液虾青素含量较高，且虾青素稳定不聚合，能够较好的储存。

第三方面，本申请提供一种虾青素冻干粉，所述冻干粉采用第二方面所述的虾青素水溶液冻干制得。

本申请还可将虾青素水溶液冻干制得虾青素冻干粉，不仅能够达到提高虾青素浓度的目的，而且再次溶于水时复溶性效果好。

与现有技术相比，本申请至少具有以下有益效果：

（1）本申请提供的制备水溶性虾青素的方法克服了现有需要先提取虾青素再制备水溶性虾青素的缺陷，将二者耦合，一步即可得到水溶性虾青素，且制得的虾青素水溶液中虾青素的浓度可达 72.66 μ g/mL 以上，首次提取率最高可达 37.45wt%以上，多次提取提取率综合能够达到 68.05wt%以上；

(2) 本申请提供的制备水溶性虾青素的方法采用食品安全的有机酸溶液，无溶剂残留，操作温和，适宜工业化生产；

(3) 本申请提供的虾青素水溶液性质稳定，虾青素含量高，且冻干后复溶效果好。

附图说明

图 1 是本申请提供的制备水溶性虾青素的方法的流程示意图。

图 2 是本申请实施例 1 制得的水溶性虾青素的透射电子显微镜图。

具体实施方式

下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本申请的技术方案。

下面对本申请进一步详细说明。但下述的实例仅仅是本申请的简易例子，并不代表或限制本申请的权利要求保护范围，本申请的保护范围以权利要求书为准。

本申请提供的制备水溶性虾青素的方法的流程示意图如图 1 所示，所述方法具体包括如下步骤：

(1) 将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合，进行细胞破碎，得到浸取液；

(2) 步骤 (1) 所述浸取液经搅拌浸取，再固液分离后，得到水溶性虾青素；和

(3) 将步骤 (2) 中固液分离得到的含虾青素原料渣与含有机酸的溶液混合，得到浸取液，循环至步骤 (2) 中，进行至少一次再浸取。

一、实施例

实施例 1

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法包括如下步骤：

(1) 从-20℃冰箱中取出雨生红球藻（湿藻）解冻，称取 1g 雨生红球藻藻泥，加入浓度为 0.1mol/L、pH 为 6.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液 20mL，然后充分混匀，将雨生红球藻混合液用超声破碎仪破碎 30min，得到浸取液；

(2) 将步骤 (1) 所述浸取液转移到 50mL 的棕色指形瓶内，置于磁力搅拌器上，在 25℃下避光密闭搅拌浸取 24h；

(3) 将步骤 (2) 浸取后的混合液转移至离心管中，使用离心机在 4℃、8000rpm 条件下离心 30min，离心后对上清液采用孔径为 3μm 的一次性滤器进

行过滤，得到均一稳定、呈橘红色半透明状态的浓度为 72.66 μ g/mL 水溶性虾青素。

对本实施例制得的水溶性虾青素进行形态表征，取一滴新鲜制备的水溶性虾青素滴于洁净的石蜡板上，将铜网轻轻放在液滴表面使液滴浸入铜网格中。10min 后取下铜网，用滤纸将铜网表面液体擦拭干净，然后将沾有液体表面的铜网为正面朝上放置。将铜网正面使用 1%的磷钨酸染色 10min，进行干燥处理，在透射电子显微镜（JEM-1400 透射电子显微镜，日本 JEOL 公司）下，调节视野，观察现象。

本实施例制得的水溶性虾青素的透射电子显微镜图如图 2 所示，制备的水溶性虾青素呈现形状规则完整，分散性良好的球形，且大部分虾青素颗粒直径在 40~100nm 范围内，没有发生凝聚的现象，具有较高的稳定性。

实施例 2

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法除将步骤（1）中的“pH 为 6.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”替换为“pH 为 3.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”外，其余均与实施例 1 相同。

实施例 3

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法除将步骤（1）中的“pH 为 6.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”替换为“pH 为 4.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”外，其余均与实施例 1 相同。

实施例 4

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法除将步骤（1）中的“pH 为 6.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”替换为“pH 为 5.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”外，其余均与实施例 1 相同。

实施例 5

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法除将步骤（1）中的“柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”替换为“甘氨酸/HCl 缓冲液”外，其余均与实施例 1 相同。

实施例 6

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法采用实施例 1 中步骤（3）离心分离得到的含虾青素原料渣进行 6 次再提取，具体包括如下步骤：

将步骤（3）中离心分离得到的含虾青素原料渣与浓度为 0.1mol/L、pH 为 6.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液混合，料液比为 1g:20mL，得到浸取液，循环至步骤（2）中，循环进行 6 次再浸取。

实施例 7

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法采用实施例 1 中步骤（3）离心分离得到的含虾青素原料渣进行 10 次再提取，具体包括如下步骤：

（4）将步骤（3）中离心分离得到的含虾青素原料渣与浓度为 0.1mol/L、pH 为 6.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液混合，料液比为 1g:20mL，得到浸取液，循环至步骤（2）中，循环进行前 6 次再浸取；

（5）将步骤（4）中离心分离得到的含虾青素原料渣与浓度为 0.1mol/L、pH 为 5.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液混合，料液比为 1g:20mL，得到浸取液，循环至步骤（2）中，循环进行后 4 次再浸取。

实施例 8

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法包括如下步骤：

（1）从-20℃冰箱中取出小球藻（湿藻）解冻，称取 10g 小球藻藻泥，加入浓度为 0.1mol/L、pH 为 3.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液 40mL，然后充分混匀，将雨生红球藻混合液用超声破碎仪破碎 60min，得到浸取液；

（2）将步骤（1）所述浸取液转移到 50mL 的棕色指形瓶内，置于磁力搅拌器上，在 35℃下避光密闭搅拌浸取 12h；

（3）将步骤（2）浸取后的混合液转移至离心管中，使用离心机在 3℃、7000rpm 条件下离心 60min，离心后对上清液采用孔径为 2.5μm 的一次性滤器进行过滤，得到均一稳定、呈橘红色半透明状态的水溶性虾青素。

实施例 9

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法，所述方法包括如下步骤：

（1）从-20℃冰箱中取出法夫红酵母解冻，称取 0.5g 法夫红酵母酵母泥，加入浓度为 0.15mol/L、pH 为 6.5 的苹果酸/苹果酸钠缓冲液 10mL，然后充分混匀，将雨生红球藻混合液用超声破碎仪破碎 60min，得到浸取液；

（2）将步骤（1）所述浸取液转移到 50mL 的棕色指形瓶内，置于磁力搅拌器上，在 20℃下避光密闭搅拌浸取 48h；

（3）将步骤（2）浸取后的混合液转移至离心管中，使用离心机在 5℃、

9000rpm 条件下离心 40min, 离心后对上清液采用孔径为 3 μ m 的一次性滤器进行过滤, 得到均一稳定、呈橘红色半透明状态的水溶性虾青素。

实施例 10

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法, 所述方法除将步骤(1)中的“柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”替换为“酒石酸/酒石酸钠缓冲液”外, 其余均与实施例 1 相同。

实施例 11

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法, 所述方法除将步骤(1)中的“柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液”替换为“柠檬酸溶液”外, 其余均与实施例 1 相同。

实施例 12

本实施例提供一种制备水溶性虾青素的方法, 所述方法除在步骤(5)的后 4 次再提取中加入 0.001gATP 合成酶 β 亚基外, 其余均与实施例 7 相同。

二、测试及结果

1、提取率

水溶性虾青素溶液中虾青素含量的测试方法: 使用甲醇和三氯甲烷从水溶性虾青素中提取虾青素, 取 1mL 水溶性虾青素用有机溶剂进行萃取, 依次加入 1mL 甲醇和 2mL 三氯甲烷。萃取至水相基本无色, 收集有机相, 用氮气吹干, 然后用甲醇和甲基叔丁基醚各 0.5mL (1/1, v/v), 过 0.22 μ m 有机滤膜收集样品备用分析。虾青素标准品 (1mg) 用甲醇和甲基叔丁基醚各 5mL (1/1, v/v) 充分溶解后, 过 0.22 μ m 有机滤膜收集样品备用分析, 采用 HPLC 测定其中的虾青素的含量。

色谱柱: YMC-Carotenoid-C30 色谱柱 (4.6mm $\times$ 250mm, 5 μ m); 流动相: A 是甲醇, B 是甲基叔丁基醚; 采用线性梯度洗脱: 0~15min, B 为 10%; 15~25min, B 由 10%升至 60%; 25~35min, B 由 60%降回 10%; 流速: 1mL/min; DAD 检测波长为 476nm; 柱温箱温度: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。根据公式(1)计算 1mL 水溶性虾青素中虾青素的含量:

$$\mu_g = \frac{S_1 \times m \times A}{S_2} \quad (1)$$

式(1)中, μ_g : 1mL 水溶性虾青素中虾青素的质量; S_1 : 水溶性虾青素中虾青素的峰面积; S_2 : 虾青素标准品峰面积; m : 20 μ L 虾青素标准溶液中虾青

素的质量，为 2mg；A：换算系数，为 50。

提取率的计算：按上述实验方法从含虾青素的原料中提取总的虾青素，得到原料中总虾青素的含量，并根据公式（2）计算虾青素提取率：

$$\text{提取率}\% = \frac{\text{水溶性虾青素中虾青素的含量}}{\text{含虾青素的原料中总虾青素的含量}} \times 100\% \quad (2)$$

根据上述方法计算得到实施例 1~4 中虾青素的提取率，如表 1 所示。

表 1

实施例	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5
提取率 (wt%)	37.45±0.87	3.93±0.34	14.17±1.22	24.13±1.41	1.44±0.25

根据上述方法计算实施例 6 中 6 次再提取的提取率，实施例 1 中首次提取和实施例 6 中 6 次再提取的结果如表 2 所示。

表 2

提取次数	提取率 (wt%)
首次提取	37.45±0.87
第 1 次再提取	11.66±0.98
第 2 次再提取	8.11±0.55
第 3 次再提取	3.71±1.29
第 4 次再提取	1.89±0.49
第 5 次再提取	0.52±0.22
第 6 次再提取	0.54±0.17

根据上述方法计算实施例 7 中后 4 次再提取的提取率，再提取的结果如表 3 所示。

表 3

提取次数	实施例 7 提取率 (wt%)
第 7 次再提取	1.67±0.44
第 8 次再提取	1.31±0.37
第 9 次再提取	0.61±0.24
第 10 次再提取	0.58±0.11

2、抗氧化性

抗氧化性分析方法：通过 ABTS⁺自由基清除率测定水溶性虾青素的抗氧化能力。将 2.6mmol/L 过硫酸钾溶液和 7.4mmol/L ABTS 溶液于棕色指形瓶中等量混合并在室温下避光反应 12h 获得工作溶液。用无水乙醇对已过夜的 ABTS⁺溶液进行稀释，使其在 734nm 处的吸光度为 0.700±0.20 即可使用。

取 10μL 水溶性虾青素于 96 孔板中，加入 200μL 稀释后的 ABTS⁺溶液，充分混合摇匀，在常温下避光反应 1h，使用酶标仪在波长为 734nm 处测定吸光度，记吸光值为 A₁。取 10μL 水溶性虾青素与 200μL 无水乙醇充分混合，在常温下避光反应 1h，使用酶标仪在波长为 734nm 处测定吸光度，记吸光值为 A₂。取 10μL 无水乙醇和 200μL ABTS⁺溶液充分混合，在常温下避光反应 1h，使用酶标仪在波长为 734nm 处测定吸光度，记吸光值为 A₀。

上述步骤重复三次并分别记录数据，水溶性虾青素对 ABTS⁺自由基的清除率按公式 (3) 进行计算：

$$\text{清除率}\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式 (3) 中，A₁：样品与 ABTS⁺自由基反应后的吸光值；A₂：样品本身的吸光值；A₀：空白组的吸光值。

根据上述方法计算得到实施例 1~5 中水溶性虾青素的抗氧化性，以 ABTS⁺自由基清除率表示，其结果如表 4 所示。

表 4

实施例	清除率 (wt%)
实施例 1	82.99±2.67
实施例 2	32.51±1.98
实施例 3	50.48±2.34
实施例 4	68.89±2.55
实施例 5	25.32±1.56

从表 1 和表 4 可以看出以下几点:

(1) 从实施例 1~4 可以看出, 柠檬酸/柠檬酸钠缓冲体系制备水溶性虾青素的效果与体系的 pH 有关, 在 pH 3.0~6.0 范围内虾青素的提取率随着 pH 的增加而增加, 且其得到的水溶性虾青素的抗氧化性能随着 pH 的增加而增加, 在 pH 5.0~6.0 时制备水溶性虾青素的效果较好, 最高虾青素提取率可达到 37.45%, 抗氧化性以 ABTS⁺ 自由基清除率计最高可达 82.99wt% 以上;

(2) 从实施例 1 和实施例 5 可以看出, 实施例 1 中采用柠檬酸/柠檬酸钠缓冲体系, 相较于实施例 5 采用甘氨酸/HCl 缓冲液而言, 实施例 1 中的提取率为 37.45wt%, ABTS⁺ 自由基清除率为 82.99wt%, 而实施例 5 中的提取率仅为 1.44wt%, ABTS⁺ 自由基清除率仅为 25.32wt%, 由此表明, 本申请通过选择特定的缓冲溶液体系, 提高了水溶性虾青素的提取率和抗氧化性。

从表 2 和表 3 可以看出, 经过浸提之后的虾青素原料渣中仍然含有虾青素并能够经过多次提取提高整体工艺的提取率, 且采用相同的 pH 缓冲液进行多次浸提后虾青素的提取率将逐渐降低, 此时更换 pH 缓冲液的配比或 pH 将再次提高浸提的提取率, 由于浸提条件温和, 无需过多的操作, 因此通过多次浸提提高提取率非常容易工业化生产, 其中实施例 7 中经过 10 次再提取后整体提取率达到 68.05wt%, 具有较高的工业应用价值。

而且实施例 8~9 能够取得与实施例 1 类似的提取效果, 同样能够一步制得水溶性虾青素, 在此不再赘述。

实施例 10 中采用酒石酸/酒石酸钠缓冲液, 相较于实施例 1 采用柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液, 提取率和制得的水溶性虾青素的抗氧化性比实施例 1 的差, 而本申请采用苹果酸/苹果酸钠体系提取虾青素时的效果介于二者之间, 能够取得

相对较好的提取率和抗氧化性。

实施例 11 中由于采用柠檬酸溶液，并非是 pH 缓冲液体系，在提取过程中难以保障 pH 的稳定，相对于采用柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液而言，提取率有所下降。

实施例 12 中通过在再次提取过程中补加蛋白质，促进溶液中虾青素的组装，提高了虾青素的提取率。

综上所述，本申请提供的制备水溶性虾青素的方法通过将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合后进行细胞破碎，再进行浸取，能够实现天然虾青素与原料中天然存在的蛋白质、核酸或多糖等成分间相互作用，其首次提取率在 1.44wt% 以上，首次提取率最高可达 37.45wt% 以上，多次提取提取率综合能够达到 68.05wt%，而且能够一步得到水溶性虾青素，无溶剂残留，虾青素来源天然，操作流程简单，易于工业化实现。

申请人声明，本申请通过上述实施例来说明本申请的详细结构特征，但本申请并不局限于上述详细结构特征，即不意味着本申请必须依赖上述详细结构特征才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本申请的任何改进，对本申请所选用部件的等效替换以及辅助部件的增加、具体方式的选择等，均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

权利要求书

1、一种制备水溶性虾青素的方法，其包括如下步骤：

(1) 将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合，进行细胞破碎，得到浸取液；和

(2) 步骤(1)所述浸取液经搅拌浸取，固液分离，得到水溶性虾青素。

2、根据权利要求1所述的方法，其中，所述含虾青素的原料包括雨生红球藻、法夫红酵母、甲壳类动物或小球藻中的任意一种或至少两种的组合，优选为雨生红球藻。

3、根据权利要求1或2所述的方法，其中，步骤(1)中所述含有机酸的溶液中含有机酸的质量浓度为0.1~2.0mol/L。

4、根据权利要求1至3中任一项所述的方法，其中，所述含有机酸的溶液的pH为3.0~6.5，优选为5.0~6.3。

5、根据权利要求1至4中任一项所述的方法，其中，所述有机酸包括苹果酸、酒石酸、甘氨酸、草酸或柠檬酸中的任意一种或至少两种的组合，优选为柠檬酸。

6、根据权利要求1至5中任一项所述的方法，其中，所述含有机酸的溶液为有机酸pH缓冲液。

7、根据权利要求6所述的方法，其中，所述有机酸pH缓冲液包括苹果酸和苹果酸钠缓冲液、酒石酸和酒石酸钠缓冲液、甘氨酸和HCl缓冲液、草酸和草酸钠溶液缓冲液或柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液中的任意一种或至少两种的组合，优选为柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液。

8、根据权利要求1至7中任一项所述的方法，其中，所述含虾青素的原料与含有机酸的溶液的料液比为0.1~10g:10~40mL。

9、根据权利要求1至8中任一项所述的方法，其中，步骤(1)和/或步骤(2)中加入助剂辅助浸取；

优选地，所述助剂包括蛋白质、核酸或多糖中的任意一种或至少两种的组合。

10、根据权利要求1至9中任一项所述的方法，其中，步骤(2)中所述搅拌浸取的时间为6~72h，优选为12~48h；

优选地，所述搅拌浸取的温度为20~35℃；

优选地，所述搅拌浸取在避光封闭条件中进行。

11、根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法，其中，步骤（2）中所述固液分离包括离心分离；

优选地，所述离心分离的温度为 2~5℃；

优选地，所述离心分离后采用过滤器对离心分离得到的上清液过滤，得到水溶性虾青素溶液。

12、根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法，其中，所述方法还包括：

（3）将步骤（2）中固液分离得到的含虾青素原料渣进行至少一次再浸取；

优选地，所述再浸取包括：将所述含虾青素原料渣与含有机酸的溶液混合，得到浸取液，循环至步骤（2）中；

优选地，所述再浸取采用与步骤（1）中相同和/或不同的含有机酸的溶液；

优选地，所述再浸取先采用与步骤（1）中相同的含有机酸的溶液，再采用不同的含有机酸的溶液。

13、根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的方法，其中，所述方法包括如下步骤：

（1）将含虾青素的原料与含有机酸的溶液混合，进行细胞破碎，得到浸取液，所述有机酸的质量浓度为 0.1~2.0mol/L、pH 为 3.0~6.5 的有机酸 pH 缓冲液，含虾青素的原料与含有机酸的溶液的料液比为 0.1~10g:10~40mL；

（2）步骤（1）所述浸取液在 20~35℃避光封闭条件中经搅拌浸取 6~72h，再在 2~5℃、7000~9000r/min 下离心分离 30~60min 后采用过滤器对离心分离得到的上清液过滤，得到水溶性虾青素；和

（3）将步骤（2）中固液分离得到的含虾青素原料渣与含有机酸的溶液混合，得到浸取液，循环至步骤（2）中，进行至少一次再浸取。

14、一种虾青素水溶液，其采用权利要求 1 至 13 中任一项所述的制备水溶性虾青素的方法制得。

15、一种虾青素冻干粉，其采用权利要求 14 所述的虾青素水溶液冻干制得。