



常温酶解法测定基于南极磷虾中虾青素酯的方法研究

高岩^{1,2}, 邢丽红¹, 孙伟红^{1*}, 孙晓杰¹, 祖露^{1,3}, 李兆新¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部极地渔业开发重点实验室, 山东青岛 266071;

2. 上海微谱化工技术服务有限公司, 上海 200082;

3. 上海市水产研究所, 上海 200433)

摘要: 由于虾青素酯具有多种存在形态, 其准确定量还存在难点, 将其有效转化成可定量的游离态是解决问题的关键。本实验将南极磷虾作为不同形态虾青素研究的代表性品种, 采用柱层析法从南极磷虾中分别制备了虾青素的单酯和双酯, 明确了其组成和含量, 作为典型特征样品, 进一步通过单因素和正交实验优化确立最佳酶解条件, 并对方法的准确性和适用性进行了评价。结果显示, ①从南极磷虾中制备并鉴定出 8 种虾青素单酯和 13 种双酯作为典型特征样品; ②单酯在底物浓度为 0.5 μg/mL, 反应体系酶浓度 1.14 U/mL, 反应温度 25 °C, 反应时间 75 min 时, 游离虾青素回收率达 94.56%±1.24%; 双酯在底物浓度为 1.0 μg/mL, 反应体系酶浓度 0.92 U/mL, 反应温度 25 °C, 反应时间 75min 时, 游离虾青素回收率为 98.28%±0.84%。③将常温酶解法应用于实际样品的测定中, 南极磷虾油中虾青素的含量为 (265.09±20.35) mg/kg, 雨生红球藻中虾青素的含量为 (21 759.36±90.19) mg/kg。为了验证方法的准确度, 分别采用标准 SC/T 3053-2019 和 GB/T 31520—2015 与酶解法进行比较, 结果分别为 (260.42±11.57) 和 (21 752.54±100.00) mg/kg, 偏差均小于 10%; 进一步通过在样品基质中添加全反式虾青素标准溶液的方式进行了验证, 南极磷虾中游离虾青素回收率为 95.24%, RSD 为 2.03%; 雨生红球藻中游离虾青素回收率为 98.56%, RSD 为 0.75%, 说明常温酶解法的准确度和精密度可以满足虾青素酯的准确定量。研究表明, 常温酶解法的反应条件温和, 减少了温度引起的虾青素氧化和异构化, 最大化的将酯态转化成游离态, 适用于水产品中虾青素酯的准确测定。

关键词: 南极磷虾; 虾青素酯; 常温酶解法; 定量测定

中图分类号: TS 254

文献标志码: A

虾青素 (3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β,β'-胡萝卜素, astaxanthin), 是一种含氧类胡萝卜素衍生物, 由 4 个异戊二烯单位以共轭双键形式连接, 两端又有 2 个异戊二烯单位组成的六节环结构^[1]。虾青素主要以 2 种形态存在: 游离态和酯化态, 酯化态虾青素 (单酯、双酯) 是由于虾青素两端的羟基

性质极其活泼, 易与脂肪酸结合。在自然界中, 鲑鳟鱼类和红法夫酵母中的虾青素主要以游离态形式存在^[2-3], 而在雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*)、虾和蟹中, 主要以酯化态的形式存在^[4]。其中南极磷虾 (*Euphausia superba*) 中虾青素 90% 以上都是以酯态存在, 单酯占 25%~35%, 双酯占

收稿日期: 2021-12-30 修回日期: 2022-02-19

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1406805); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助 (2020TD71)

第一作者: 高岩 (照片), 从事水产品安全性与质量控制研究, E-mail: 1156873972@qq.com

通信作者: 孙伟红, 从事水产品质量安全检测与评价技术研究, E-mail: swh200122@163.com



55%~64%^[5], 单双酯含量和组成都比较丰富, 因此可以作为虾青素酯类研究的代表性品种。

由于商品化虾青素酯类标准品缺乏, 导致无法直接对酯态虾青素进行准确定量分析, 需将其有效转化成游离态后才能准确定量。目前常用皂化法^[6-7]和生物酶解法^[8-9]进行该水解反应。皂化法容易引起虾青素的异构化, 而生物酶解法虽然反应温和, 但是酶解过程需要加热, 也会造成虾青素的损失和异构化。

与单酯相比, 双酯的稳定性更好, 二者由酯化态酶解成游离态所需条件可能有所不同。如果能够降低生物酶解法的反应温度, 优化其酶解条件, 将不同形态的虾青素酯有效转化成游离态, 可以实现不同形态虾青素的准确定量。因此, 本研究分别将从南极磷虾中分离鉴定的虾青素单、双酯作为典型特征样品, 胆固醇酯酶为催化剂, 探讨底物浓度、体系酶浓度、反应温度和反应时间等因素对游离虾青素回收率的影响, 再通过正交试验获得最佳酶解工艺, 建立准确定量虾青素酯的测定方法, 为虾青素资源的综合利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验原料

南极磷虾由项目组于 2018 年 12 月购自大连海洋渔业集团公司(水分含量 82.3%±1.9%), 全程冷链运输, 取出 1 kg 左右样品匀浆后于 -80 °C 保存待用; 南极磷虾油由大连海洋渔业集团公司提供; 雨生红球藻粉由上海海洋大学提供。虾青素标准品(纯度 95.8%±0.5%)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 胆固醇酯酶(500 U/mg)购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇、叔丁基甲醚、丙酮等色谱纯试剂均购自美国 Merck 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Q Exactive 高效液相色谱-高分辨质谱联用仪, 美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪(配紫外检测器), 美国安捷伦科技有限公司; CR22G 高速冷冻离心机, 日本 Hitachi 公司; N-EVAP112 氮吹仪, 美国 Organomation 公司; XW-80A 旋涡混合器, 上海医大仪器厂; IS-RDS3 叠加式恒温振荡器, 美国精骐国际有限公司; Milli-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司。

1.3 测定方法

南极磷虾虾青素单、双酯的分离和提纯参考丛心缘等^[10]方法。

单、双酯虾青素提取物的鉴定 采用高效液相色谱-高分辨质谱仪进行定性鉴定。

色谱条件和质谱条件 参照丛心缘等^[11]。

常温酶解方法 在 1.0 mL 酯态虾青素样液中, 分别加入 2 mL 丙酮和 2 mL Tris-HCl 缓冲液(将 6.06 g Tris 溶解在 750 mL 水中, 用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 到 7.0, 然后用水定容到 1000 mL。), 摇匀, 恒温放置 2 min, 加入适量胆固醇酯酶溶液(4 U/mL), 恒温振荡水解, 然后加入 1 g 无水硫酸钠和 2.0 mL 石油醚, 涡旋振荡约 1 min, 静置分层, 将上层石油醚层取出待用, 下层溶液再加入 2.0 mL 石油醚重复提取 2 次, 合并石油醚相, 氮吹至干, 用 1 mL 丙酮复溶, 过 0.45 μm 滤膜后, 采用 HPLC 进行测定。

磷虾和雨生红球藻中虾青素酯含量分析 虾青素的提取和测定方法分别参考 SC/T 3053—2019^[12]和 GB/T 31520—2015^[13], 水解方式采用本实验建立的酶解法。

常温酶解法单因素实验 酶解法水解虾青素酯影响游离虾青素回收率的因素主要有: 底物浓度、体系酶浓度、反应时间、反应温度, 进行单因素实验, 各反应条件平行测定 3 次, 取平均值。

① 底物浓度的选择。将单、双酯进行稀释, 底物浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0 μg/mL, 设置体系酶浓度为 0.67 U/mL, 酶解温度 25 °C, 反应时间 45 min, 按照 1.3 进行酶解反应。

② 体系酶浓度的选择。单酯样品浓度为 0.5 μg/mL, 双酯样品为 1.0 μg/mL, 酶浓度分别为 0.36、0.67、0.92、1.14 和 1.33 U/mL, 酶解温度 25 °C, 反应时间 45 min, 按照 1.3 进行酶解反应。

③ 反应温度的选择。单酯样品浓度为 0.5 μg/mL, 酶浓度为 1.14 U/mL; 双酯样品为 1.0 μg/mL, 酶浓度为 0.67 U/mL; 反应温度分别为 4、15、20、25 和 37 °C, 反应时间 45 min, 按照上述方法进行酶解反应。

④ 酶解时间的选择。单酯样品浓度为 0.5 μg/mL, 酶浓度为 1.14 U/mL; 双酯样品为 1.0 μg/mL, 酶浓度为 0.67 U/mL; 酶解温度 25 °C, 酶解时间分别为 30、45、60、75 和 90 min, 按照上述方法进行酶解反应。

常温酶解法正交实验 在单因素试验的基

基础上, 酶解反应采用 4 因素 3 水平设计, 以底物浓度 (A)、体系酶浓度 (B)、反应温度 (C) 及酶解时间 (D) 作为参考因素, 按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 正交设计方案见表 1 和表 2。各反应条件平行测定 3 次, 取平均值。

游离虾青素回收率测定

$$\text{游离虾青素回收率}(\%) = \frac{\text{游离虾青素含量}}{\text{酶解前虾青素的总量}} \times 100\%$$

1.4 数据分析

采用 SPSS 23.0 设计 4 因素 3 水平正交实验,

表 1 单酯正交试验因素及水平

Tab. 1 Code and level of independent variables used for orthogonal array design in monoester astaxanthin

水平 level	因素 factor			
	A 底物浓度/ ($\mu\text{g/mL}$) substrate concentration	B 体系酶浓度/ (U/mL) system enzyme concentration	C 温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	D 时间/min time
1	0.5	0.67	20	60
2	1.0	0.92	25	75
3	2.0	1.14	37	90

表 2 双酯正交试验因素及水平

Tab. 2 Code and level of independent variables used for orthogonal array design in diester astaxanthin

水平 level	因素 factor			
	A 底物浓度/ ($\mu\text{g/mL}$) substrate concentration	B 体系酶浓度/(U/mL) system enzyme concentration	C 温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	D 时间/min time
1	0.5	0.36	20	60
2	1.0	0.67	25	75
3	2.0	0.92	37	90

表 3 南极磷虾虾青素单酯质谱裂解信息及鉴定结果

Tab. 3 Mass spectrometry fragmentation information and identification results of astaxanthin monoesters in krill

峰 peak	保留时/min retention time	理论值/(m/z) theoretical value	实测值/(m/z) measured value	分子式 molecular formula	误差/ 10^{-6} deviation	MS/MS裂解碎片 MS/MS fragmentation	鉴定 identification
1	10.56	779.56090	779.560547	$\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{O}_5$	-0.45	761.542664、579.380737、183.17482	Asta-C12:0
2	11.91	807.59220	807.591553	$\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{O}_5$	-0.80	211.205505、579.391663、789.582581	Asta-C14:0
3	13.44	835.62350	835.62306	$\text{C}_{56}\text{H}_{82}\text{O}_5$	-0.53	817.60852、579.38025、239.17990	Asta-C16:0
4	11.89	833.60785	833.606506	$\text{C}_{56}\text{H}_{80}\text{O}_5$	-1.61	815.600891、579.382141、561.36731、	Asta-C16:1
5	13.33	861.63915	861.638123	$\text{C}_{58}\text{H}_{84}\text{O}_5$	-1.19	843.622742、579.380615、561.374573	Asta-C18:1
6	11.12	857.60785	857.607605	$\text{C}_{58}\text{H}_{80}\text{O}_5$	-0.27	839.601196、579.383789、561.368469、261.220184	Asta-C18:3
7	10.39	855.59220	855.58990	$\text{C}_{58}\text{H}_{78}\text{O}_5$	-2.69	579.38385、147.11746	Asta-C18:4
8	10.64	881.60785	881.60577	$\text{C}_{60}\text{H}_{80}\text{O}_5$	-2.36	863.59375、579.38074、561.36938、285.22128	Asta-C20:5

和 Excel 软件一起进行数据处理, 并对正交试验所得数据进行方差分析和 Tukey 氏检验进行差异显著性比较。

2 结果

2.1 单、双酯的鉴定结果

采用高效液相色谱-高分辨质谱仪, 采用 Full MS/dd MS2 模式采集数据, 比较目标物的精确分子量、保留时间以及虾青素二级碎片离子碎裂规律与特征碎片对提纯的虾青素提取物进行鉴定。在制备的南极磷虾的单酯提取物中鉴定出 8 种虾青素单酯, 在双酯提取物中鉴定出 13 种双酯 (表 3 和表 4)。

2.2 单因素实验结果与分析

底物浓度 底物浓度越小游离虾青素回收率越低, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 时损失最大 (图 1)。单、双酯随着底物浓度的增加, 游离虾青素的回收率先增后减, 当单酯浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、双酯为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时游离虾青素回收率达到最大, 且均在 95% 以上。但如果底物浓度超过该范围, 游离虾青素回收率就会减小。因此选择单酯浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 双酯为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 为酶解的最适底物浓度。

体系酶浓度 以体系酶浓度和游离虾青素回收率制作曲线, 随着体系酶浓度的增加, 单酯和双酯的游离虾青素回收率都是先增加后降低, 对于单酯, 当加酶量为 1.14 U/mL 时, 游离虾青素回收率达到最大 (94.07%); 对于双酯, 加酶量为 0.92 时, 达到最大值 (87.68%)。在 0.92~1.14 U/mL 体系酶浓度水平下, 全反式虾青素的损失率低于 12% (图 2)。

表4 南极磷虾虾青素双酯质谱裂解信息及鉴定结果

峰峰 peak	保留时/min retention time	理论值/(m/z) theoretical value	实测值/(m/z) measured value	分子式 molecular formula	误差/ 10^{-6} deviation	MS/MS裂解碎片 MS/MS fragmentation	鉴定 identification
1	16.9	961.72797	961.725083	C ₆₄ H ₉₆ O ₆	-3.00	761.54657、561.366089	Asta-C12:0/C12:0
2	18.15	989.75927	989.754944	C ₆₆ H ₁₀₀ O ₆	-4.37	789.575073、761.549622、561.368652	Asta-C12:0/C14:0
3	19.54	1043.80622	1043.80481	C ₇₀ H ₁₀₆ O ₆	-1.35	843.618408、761.545715、561.372559	Asta-C12:0/C18:1
4	19.64	1017.79057	1017.788025	C ₆₈ H ₁₀₄ O ₆	-2.50	999.792236、789.583496、561.371887	Asta-C14:0/C14:0
5	21.37	1045.82187	1045.820923	C ₇₀ H ₁₀₈ O ₆	-0.90	817.609375、789.589661、561.373291	Asta-C14:0/C16:0
6	23.52	1073.85317	1073.85510	C ₇₂ H ₁₁₂ O ₆	1.80	817.61682、579.38440、561.37292	Asta-C16:0/C16:0
7	21.29	1071.83752	1071.83728	C ₇₂ H ₁₁₀ O ₆	-0.22	843.631836、789.588318、561.370422	Asta-C16:0/C16:1
8	23.36	1099.86882	1099.868896	C ₇₄ H ₁₁₄ O ₆	0.07	843.629028、817.611023、561.370667	Asta-C16:0/C18:1
9	19.21	1093.83752	1093.83139	C ₇₄ H ₁₀₈ O ₆	-4.69	817.61627、147.11669、173.13256	Asta-C16:0/C18:4
10	19.73	1119.83752	1119.833862	C ₇₆ H ₁₁₀ O ₆	-3.27	863.598267、817.608398、561.368469	Asta-C16:0/C20:5
11	23.18	1125.88447	1125.882568	C ₇₆ H ₁₁₆ O ₆	-1.69	843.626953、561.371704	Asta-C18:1/C18:1
12	17.03	1139.80622	1139.80359	C ₇₈ H ₁₀₆ O ₆	-2.30	147.11708、173.13312	Asta-C18:4/C20:5
13	16.69	1165.82187	1165.82091	C ₈₀ H ₁₀₈ O ₆	-0.87	147.11667、173.13297	Asta-C20:5/C20:5

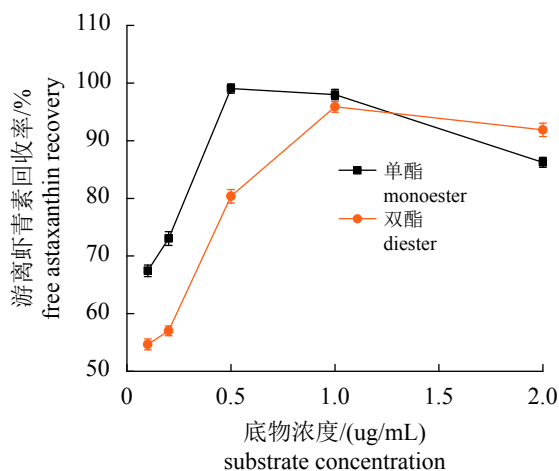


图1 底物浓度对游离虾青素回收率的影响

Fig. 1 Effect of substrate concentration on recovery of free astaxanthin

反应温度 反应温度是制约酶解反应的重要因素。有研究认为胆固醇酯酶的适宜酶解温度为37℃^[14],但是在此温度下,游离态虾青素容易发生降解和异构化。为了保证定量的准确,考虑降低酶解反应温度,本实验温度条件为4~37℃(图3)。结果表明,单酯在较低温度下,酶解速度仍然很快,在4℃时,游离虾青素回收率可达95%,随着温度的升高,游离虾青素回收率不断增加,在25℃时,达到最大值(99.14%),但是反应温度超过25℃后,虾青素的回收率减少,37℃时最低;双酯的反应温度在4~20℃范围内,虾青素回收

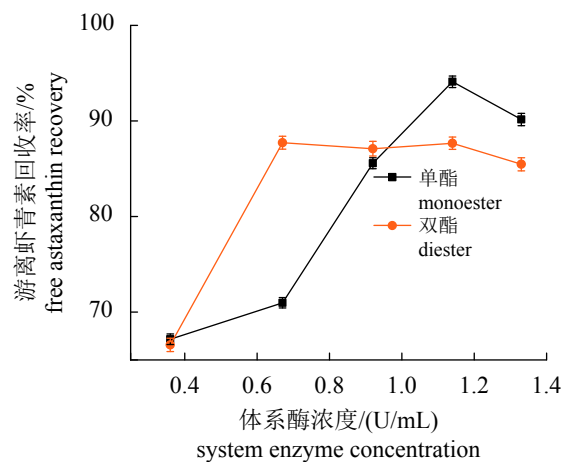


图2 体系酶浓度对游离虾青素回收率的影响

Fig. 2 Effect of system enzyme concentration on recovery of free astaxanthin

率不断升高,在25℃时,达到最大值(88.10%),37℃时回收率最低。因此,选择25℃作为单、双酯正交试验的温度条件。

酶解时间 酶解时间也是制约酶解反应的重要因素。在30~75 min时,单、双酯都是随着反应时间的延长,游离虾青素回收率增加,分别达到96.45%和99.00%,但是酶解时间超过75 min后,回收率开始降低(图4)。因此,可以将75 min作为单、双酯酶解反应最佳时长。

2.3 正交实验结果与分析

单酯正交实验 单酯正交实验中, $R_D > R_B >$

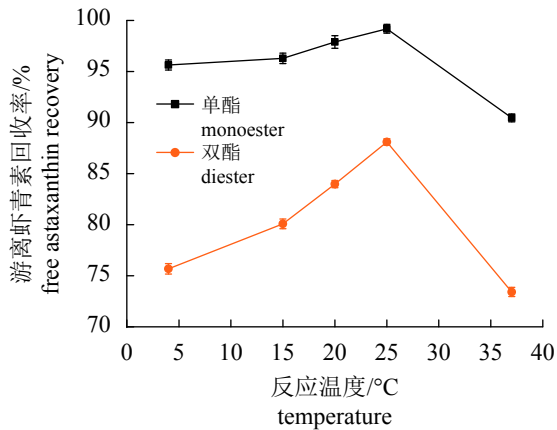


图3 反应温度对游离虾青素回收率的影响

Fig. 3 Effect of reaction temperature on recovery of free astaxanthin

$R_C > R_A$, 因此各因素影响游离虾青素回收率的主次作用为 D (酶解时间) > B (体系酶浓度) > C (反应温度) > A (底物浓度), 最佳水平组合为 $A_1B_3C_2D_2$, 即底物浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$, 反应体系酶浓度为 1.14 U/mL , 反应温度为 25°C , 反应时间为 75 min (表 5)。体系酶浓度和反应时间对游离虾青素回收率均有极显著影响 ($P < 0.01$) (表 6)。

双酯正交实验 双酯正交实验中, $R_B > R_A > R_D > R_C$, 因此各因素影响游离虾青素回收率的主次顺序为 B (体系酶浓度) > A (底物浓度) > D (酶解时间) > C (反应温度), 最佳水平组合为 $A_2B_3C_1D_2$,

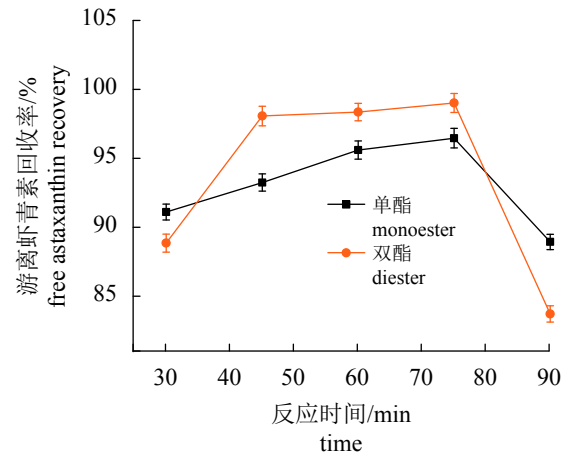


图4 反应时间对游离虾青素回收率的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on recovery of free astaxanthin

即底物浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$, 反应体系酶浓度为 0.92 U/mL , 反应温度为 25°C , 反应时间为 75 min (表 7)。体系酶浓度对虾青素回收率存在极显著影响 ($P < 0.01$), 底物浓度对虾青素回收率有显著影响 ($P < 0.05$) (表 8)。

2.4 最佳工艺条件验证

对实验中单、双酯酶解实验的最佳工艺条件, 进行 3 次验证实验, 单酯的游离虾青素回收率为 $94.56\% \pm 1.24\%$, 双酯的游离虾青素回收率为 $98.28\% \pm 0.84\%$, 与正交试验结果相符, 证明最佳

表 5 单酯正交实验结果

Tab. 5 Orthogonal experimental results of monoester

序号 serial number	因素 factor				游离虾青素回收率 % free astaxanthin yield
	A 底物浓度/($\mu\text{g/mL}$) substrate concentration	B 体系酶浓度/(U/mL) System enzyme concentraton	C 反应温度/ $^\circ\text{C}$ temperature	D 反应时间/min time	
1	0.5	0.67	20	60	67.85
2	0.5	0.92	25	75	91.64
3	0.5	1.14	37	90	90.92
4	1.0	0.67	25	90	78.97
5	1.0	0.92	37	60	77.11
6	1.0	1.14	20	75	90.23
7	2.0	0.67	37	75	79.1
8	2.0	0.92	20	90	87.9
9	2.0	1.14	25	60	80.59
K1	250.41	225.92	245.98	225.55	
K2	246.31	256.65	251.2	269.77	
K3	247.59	261.74	247.13	257.79	
R	1.37	11.94	1.74	14.74	
优水平 result			$A_1B_3C_2D_2$		

表 6 单酯正交实验的方差结果分析

Tab. 6 Analysis of variance results of monoester orthogonal experiment

因素 factor	偏差平方和 deviation sum of squares	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F	P值 P value
A 底物浓度 substrate concentration	0.001	2	0.000	0.218	0.806
B 体系酶浓度 system enzyme concentraton	0.075	2	0.038	18.535	<0.01
C 反应温度 temperature	0.002	2	0.001	0.370	0.696
D 反应时间 time	0.077	2	0.038	18.939	<0.01
误差 error	0.036	18	0.002		

表 7 双酯正交实验设计及结果

Tab. 7 Orthogonal experimental design and results of diester

序号 serial number	因素 factor				游离虾青素回收率 % free astaxanthin yield
	A 底物浓度/($\mu\text{g/mL}$) substrate concentration	B 体系酶浓度/(U/mL) system enzyme concentraton	C 反应温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	D 反应时间/min time	
1	0.5	0.36	20	60	70.04
2	0.5	0.67	25	75	80.71
3	0.5	0.92	37	90	78.00
4	1.0	0.36	25	90	78.01
5	1.0	0.67	37	60	75.40
6	1.0	0.92	20	75	97.01
7	2.0	0.36	37	75	70.40
8	2.0	0.67	20	90	82.03
9	2.0	0.92	25	60	79.94
K1	228.75	231.72	245.81	231.72	
K2	252.69	240.85	240.89	247.80	
K3	234.71	255.32	238.14	236.63	
R	5.99	7.87	2.56	5.36	
优水平 result			$A_2B_3C_1D_2$		

表 8 双酯正交实验的方差结果分析

Tab. 8 Analysis of variance results of diester orthogonal experiment

因素 factor	偏差平方和 deviation sum of squares	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F	p值 p value
A 底物浓度 substrate concentration	0.030	2	0.015	4.029	<0.05
B 体系酶浓度 system enzyme concentraton	0.059	2	0.029	8.039	<0.01
C 反应温度 temperature	0.013	2	0.006	1.744	0.205
D 反应时间 time	0.014	2	0.007	1.843	0.189
误差 error	0.062	18	0.004		

酶解工艺条件能有效将虾青素酯转化成游离虾青素。

2.5 方法适用性

生物样品中虾青素酯的组成存在差异, 雨生红球藻主要以虾青素单酯组成, 建议采用底物浓度 $0.5 \mu\text{g/mL}$, 反应体系酶浓度 1.14 U/mL , 反应温度

25°C , 反应时间 75 min ; 南极磷虾及其制品中虾青素双酯含量较高, 建议采用底物浓度 $1.0 \mu\text{g/mL}$, 反应体系酶浓度 0.92 U/mL , 反应温度 25°C , 反应时间 75 min 。采用上述方法进行测定, 南极磷虾油中虾青素的含量为 $(265.09 \pm 20.35) \text{ mg/kg}$, 雨生红球藻中虾青素的含量为 $(21759.36 \pm 90.19) \text{ mg/kg}$ 。此外, 为了验证方法的准确度, 分别采用 SC/T

3053—2019 和 GB/T 31520—2015 与酶解法的结果进行了比较, 结果分别为 (260.42 ± 11.57) mg/kg 和 (21752.54 ± 100.00) mg/kg, 偏差均小于 10%, 证明了方法的准确性; 然后进一步通过在样品基质中添加全反式虾青素的标准溶液进行了验证,

设置 3 次重复 (表 9)。南极磷虾中虾青素的平均回收率为 95.24%, RSD 为 2.03%, 雨生红球藻中虾青素的回收率为 98.56%, RSD 为 0.75%, 优化的最佳酶解条件稳定性好, 重复性强。

表 9 南极磷虾和雨生红球藻中游离虾青素回收率

Tab. 9 Recovery rates of free astaxanthin in *E. superba* and *H. pluvialis*

序号 serial number	南极磷虾 <i>Euphausia superba</i>			雨生红球藻 <i>Haematococcus Pluvialis</i>		
	全反式虾青素回收率/% free astaxanthin yield	平均值/% average value	相对标准偏差/% RSD	全反式虾青素回收率/% free astaxanthin yield	平均值/% average value	相对标准偏差/% RSD
1	96.92			99.32		
2	95.66	95.24	2.03	98.50	98.56	0.75
3	93.13			97.86		

3 讨论

3.1 常温酶解法的技术优势

当前虾青素酯的准确定量还存在难点, 将其有效转化成游离态虾青素是解决问题的关键。胆固醇酯酶被用于虾青素酯的水解^[14], 由于酶解过程加热, 容易造成虾青素的损失和异构化。标准 GB/T 31520—2015 和 SC/T 3053—2019 中都是采用了低温皂化法进行水解, 但是耗时长, 需要过夜水解, 反应中也可能会导致虾青素的异构化。

常温酶解法是在常温下进行水解, 反应温和, 酶解速度快, 总虾青素的回收率和准确度更高。此外, 虾青素单酯和双酯进行酶解反应的最佳工艺条件不同, 根据生物样品的虾青素酯组成进行区分, 可以获得更准确的结果。Fang 等^[15]也以雨生红球藻为样品, 在反应体系酶浓度为 0.67 U/mL、酶解温度为 37 °C、酶解时间 60~75 min 进行测定, 其游离虾青素回收率为 89.5%, 这个结果低于常温酶解法 98.56% 的平均回收率。

3.2 常温酶解法的影响因素

底物浓度、体系酶浓度、反应温度和酶解时间是影响酶解反应效果的重要因素。底物浓度过高, 酶就会被底物饱和^[16], 将虾青素酯水解成游离虾青素的速度不再加快, 抑制反应的进行。体系酶浓度增加时, 酶促反应速度随之增大^[16], 在本实验确立的底物浓度下, 随着酶浓度的增加, 游离虾青素回收率先增加后降低, 并非成比例增大。对于反应温度, 在达到最适温度之前, 酶的活性会随着随温度的升高而增大, 如果超过最适温度, 酶的活性反而会降低^[17], 而且虾青素结构不稳定, 超过一定温度就会造成其降解和异构化,

本研究发现酶解反应温度为 25 °C 时, 游离虾青素的回收率最高。在虾青素酯的酶解过程中, 刚开始时底物量充足, 反应速度较快, 游离虾青素快速增加, 随着底物逐渐减少, 虾青素酯全部被酶解, 就会抑制酶解反应, 游离虾青素的含量不再增加。随着时间的延长, 由于游离虾青素的稳定性差, 容易被氧化分解^[18], 也会导致虾青素回收率减少。

虽然常温酶解法在反应过程中也存在虾青素异构化的可能, 但是通过本次实验的验证, 该方法具有反应快速、操作简单、回收率高、定量准确等优势, 可为生物样品中虾青素酯的定量检测提供更优的选择。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 肖素荣, 李京东. 虾青素的特性及应用前景[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(5): 33-35.
Xiao S R, Li J D. Features of astaxanthin and its application prospects[J]. *Food and Nutrition in China*, 2011, 17(5): 33-35 (in Chinese).
- [2] 高岩, 邢丽红, 孙伟红, 等. 大西洋鲑和虹鳟不同部位中虾青素和脂肪酸的比较分析[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(14): 235-243.
Gao Y, Xing L H, Sun W H, et al. Comparison of astaxanthin and fatty acid in different parts of farmed *Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(14): 235-243 (in Chinese).
- [3] 孙伟红. 不同来源虾青素的分离制备及其构效关系研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
Sun W H. Isolation and preparation of astaxanthin from
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- different sources and the structure-activity relationship [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015 (in Chinese).
- [4] 苏芳. 类胡萝卜素在藻虾蟹鱼中的结构分布特征及虾青素异构化研究 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2018.
- Su F. A study on the structure distribution of carotenoids in algae, shrimps, crabs and fishes and the isomerization of astaxanthin[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018 (in Chinese).
- [5] Yamaguchi K, Miki W, Toriu N, *et al.* The composition of carotenoid pigments in the Antarctic krill *Euphausia superba*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1983, 49(9): 1411-1415.
- [6] 孙伟红, 邢丽红, 冷凯良, 等. 高效液相色谱法测定南极磷虾及其制品中虾青素的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(4): 1248-1253.
- Sun W H, Xing L H, Leng K L, *et al.* Determination of astaxanthin in Antarctic krill and its products by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(4): 1248-1253 (in Chinese).
- [7] 孙伟红, 肖荣辉, 冷凯良, 等. 再生红球藻中虾青素的 C₃₀-反相高效液相色谱法测定[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(8): 841-845.
- Sun W H, Xiao R H, Leng K L, *et al.* Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by C₃₀ reversed-phase high performance liquid chromatographic method[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(8): 841-845 (in Chinese).
- [8] Huang J J, Yang Z, Zhu R Y, *et al.* Efficient heterologous expression of an alkaline lipase and its application in hydrolytic production of free astaxanthin[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 181.
- [9] Mei J F, Zhao X Y, Yi Y, *et al.* Preparation of astaxanthin by lipase-catalyzed hydrolysis from its esters in a slug-flow microchannel reactor[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 98: 241-246.
- [10] 丛心缘, 孙伟红, 张辉珍, 等. 南极磷虾中不同形态虾青素的分离制备、结构鉴定及含量分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(2): 174-178.
- Cong X Y, Sun W H, Zhang H Z, *et al.* Separation, structure identification and content analysis of different forms of astaxanthin in Antarctic krill[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(2): 174-178 (in Chinese).
- [11] 丛心缘. 南极磷虾中虾青素的分离、鉴定及抗氧化活性研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- Cong X Y. Isolation, identification and antioxidant activity of astaxanthin from Antarctic krill[D]. Qingdao: Qingdao University, 2019 (in Chinese).
- [12] 中华人民共和国农业农村部. SC/T 3053—2019 水产品及其制品中虾青素含量的测定 高效液相色谱法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. SC/T 3053—2019 Determination of astaxanthin in fish and fishery products by high performance liquid chromatography method[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2019 (in Chinese).
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 31520—2015 红球藻中虾青素的测定 液相色谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration. GB/T 31520—2015 Determination of astaxanthin in *Haematococcus*-high performance liquid chromatography method[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015 (in Chinese).
- [14] Ogawara M, Ino Y, Yoshida M, *et al.* High Performance Liquid Chromatography Quantification of Total Astaxanthin in Health Foods[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2010, 57(5): 205-214.
- [15] Su F, Xu H R, Yang N, *et al.* Hydrolytic efficiency and isomerization during de-esterification of natural astaxanthin esters by saponification and enzymolysis[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 34: 37-42.
- [16] 吴静. 关于酶促反应速度与底物浓度关系曲线的几点探讨[J]. *中学生物教学*, 2013(5): 45-46.
- Wu J. Several discussions on the relationship between enzymatic reaction speed and substrate concentration[J]. *Biology Teaching in Middle School*, 2013(5): 45-46 (in Chinese).
- [17] 杨洪斌. 酶的最适温度的时间依赖性和温度依赖性[J]. *生物学通报*, 2019, 54(8): 4-6.
- Yang H B. Time and temperature dependence of optimum temperature for the enzyme[J]. *Bulletin of Biology*, 2019, 54(8): 4-6 (in Chinese).
- [18] 蹇华丽, 朱明军, 吴振强, 等. 环状芽孢杆菌胞壁溶解酶用于红发夫酵母虾青素提取的研究[J]. *高校化学工程学报*, 2006, 20(1): 147-151.
- Jian H L, Zhu M J, Wu Z Q, *et al.* Extracting astaxanthin of *Phaffia rhodozyma* with lytic enzyme produced by *Bacillus circulans* 1.383[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2006, 20(1): 147-151 (in Chinese).

A method for the determination of astaxanthin ester in Antarctic krill (*Euphausia superba*) by enzymatic hydrolysis at room temperature

GAO Yan^{1,2}, XING Lihong¹, SUN Weihong^{1*}, SUN Xiaojie¹, ZU Lu^{1,3}, LI Zhaoxin¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Shanghai WEIPU Chemical Technology Service Co., Ltd, Shanghai 200082, China;

3. Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: It's difficult for accurate quantification of astaxanthin esters because of their multiple forms, and hydrolysis of astaxanthin esters to free astaxanthin is the key to solve the problem. In this work, Antarctic krill (*Euphausia superba*) was used as a representative specie for the study of astaxanthins. The mono- and di-esters of astaxanthin were prepared from Antarctic krill by column chromatography, and the composition and content of them were clarified using high-resolution mass spectrometry with ultraviolet detection. The astaxanthin monoesters and the astaxanthin diesters were then taken as the typical research samples, the enzymatic hydrolysis conditions of which were optimized through single factor and orthogonal experiments, and the accuracy and applicability of the method were evaluated. Results showed that: (1) 8 astaxanthin monoesters and 13 astaxanthin diesters were prepared and identified as typical characteristic compounds from krill. (2) For the astaxanthin monoesters, as the substrate concentration was 0.5 µg/mL, the enzyme concentration of the reaction system was 1.14 U/mL, the reaction temperature was 25 °C, and the reaction time was 75 mins, the yield of free astaxanthin could reach (94.56±1.24)%; And for the astaxanthin diesters, as the substrate concentration was 1.0 µg/mL, the enzyme concentration of the reaction system was 0.92 U/mL, the reaction temperature was 25 °C, and the reaction time was 75 minutes, the free astaxanthin yield reached (98.28±0.84)%. (3) Enzymatic hydrolysis at room temperature was applied to the analysis of actual samples, the astaxanthin content was (265.09±20.35) mg/kg in Antarctic krill oil, and the content was (21 759.36±90.19) mg/kg in *Haematococcus pluvialis*. In order to verify the accuracy, the enzymatic hydrolysis method was compared with the standard methods from SC/T 3053—2019 and GB/T 31520—2015. The determination results were 260.42±11.57 mg/kg and 21 752.54±100.00 mg/kg respectively, and the deviations of the results were all less than 10%. Then the results were further verified by adding a standard solution of all-trans astaxanthin to the sample matrix was tested, the recovery rate of free astaxanthin was 95.24% in Antarctic krill and 98.56% in *Haematococcus pluvialis*, RSD was 2.03% and 0.75%, respectively. It proved that the enzymatic hydrolysis method has good accuracy and precision. Studies have shown that the enzymatic hydrolysis method has good stability and high repeatability, reduces the oxidation of astaxanthin in the reaction process, and maximizes the conversion of ester astaxanthin into free form, which is suitable for accurate quantification of esterified astaxanthin. Therefore, the scientific basis for the comprehensive utilization of astaxanthin resources could be provided from this study.

Key words: *Euphausia superba*; astaxanthin ester; enzymatic hydrolysis at room temperature; quantitative determination

Corresponding author: SUN Weihong. E-mail: swh200122@163.com

Funding projects: National Key R&D Program of China (2018YFC1406805); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (NO. 2020TD71)