DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260130009
引用格式: 崔函祎, 王颖, 李红艳, 等. 红法夫酵母中游离虾青素的检测与提取工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 13–23.
CUI HY, WANG Y, LI HY, *et al*. Study on the detection and extraction technology of free astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 13–23. (in Chinese with English abstract).

红法夫酵母中游离虾青素的检测与提取工艺研究

崔函祎[1,2], 王　颖[2,3], 李红艳[2,3], 仲　晨[2,3], 张帅中[2,3], 牟海津[1*], 刘天红[2,3*]

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛　266003; 2. 山东省海洋科学研究院, 青岛　266104;
3. 青岛市水产生物品质评价与利用工程研究中心, 青岛　266104)

摘　要: 目的　对游离虾青素检测方法进行优化, 并开发红法夫酵母粉中虾青素的提取工艺。**方法**　通过优化检测时间与流动相比例, 建立了基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的游离虾青素分析方法。在此基础上, 以红法夫酵母粉为原料, 采用单因素实验、Plackett-Burman 实验及响应面法, 以虾青素提取率为指标, 开发红法夫酵母粉中虾青素的提取工艺。**结果**　该方法检出限为 0.55 μg/g, 定量限为 0.16 μg/g; 加标回收率为 105.12%~127.70%; 精密度试验的相对标准偏差小于 0.14%。开发并优化了红法夫酵母粉中虾青素的提取工艺, 红法夫酵母超微粉平均粒径 5.25 μm, 水添加比例为 3.30:1 (mL:g), 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)添加比例为 41.25:1 (mL:g), 丙酮的添加比例为 137.50:1 (mL:g), 提取次数 2 次, 加水后 45 ℃保温 5 min, 加 DMSO 后 45 ℃保温 15 min, 提取率为 2.74 mg/g。**结论**　本研究建立的游离虾青素 HPLC 检测方法灵敏、准确、重复性好, 可实现红法夫酵母中游离虾青素的快速定量分析; 优化的红法夫酵母粉中游离虾青素提取工艺具有高效、稳定、绿色的优势, 为红法夫酵母虾青素在水产、食品等领域的应用提供技术支撑。

关键词: 红法夫酵母; 游离虾青素; 高效液相色谱法; 提取工艺

Study on the detection and extraction technology of free astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*

CUI Han-Yi[1,2], WANG Ying[2,3], LI Hong-Yan[2,3], ZHONG Chen[2,3], ZHANG Shuai-Zhong[2,3], MOU Hai-Jin[1*], LIU Tian-Hong[2,3*]

(1. *College of Food Science and Engineering*, *Ocean University of China*, *Qingdao* 266003, *China*; 2. *Marine Science Research Institute of Shandong Province*, *Qingdao* 266104, *China*; 3. *Qingdao Research Center for Aquatic Biological Quality Assessment and Utilization Engineering*, *Qingdao* 266104, *China*)

ABSTRACT: Objective　To optimize the method for free astaxanthin detection and develop an extraction process for astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* powder. **Methods**　By optimizing the detection time and mobile phase ratio, an analytical method for free astaxanthin based on high performance liquid chromatography

收稿日期: 2026-01-30
基金项目: 国家重点研发计划项目(2024YFD241604); 山东省现代农业虾蟹产业技术体系项目(SDARS-13-01)
第一作者: 崔函祎(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: 13345066328@163.com
***通信作者:** 牟海津(1973—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为海洋微生物工程。E-mail: mousun@ouc.edu.cn
刘天红(1982—), 女, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品安全与质量控制。E-mail: oucthl@126.com

(HPLC) was established. On this basis, using *Xanthophyllomyces dendrorhous* powder as raw material, the extraction process for astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* powder was developed via single-factor experiments, Plackett-Burman design, and response surface methodology, using astaxanthin extraction yield as the evaluation index. **Results** The limit of detection was 0.55 μg/g, and the limit of quantitation was 0.16 μg/g. The spike recoveries ranged from 105.12% to 127.70%, and the relative standard deviation in the precision test was less than 0.14%. The extraction process for astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* powder was developed and optimized as follows: The average particle size of superfine *Xanthophyllomyces dendrorhous* powder was 0.55 μm; the water addition ratio was 3.30:1 (mL:g); the dimethyl sulfoxide (DMSO) addition ratio was 41.25:1 (mL:g); the acetone addition ratio was 137.50:1 (mL:g); the extraction was performed twice; after water addition, the mixture was incubated at 45 ℃ for 5 min; and after DMSO addition, it was incubated at 45 ℃ for 15 min. The extraction yield was 2.74 mg/g. **Conclusion** The established HPLC method for free astaxanthin is sensitive, accurate and reproducible, enabling rapid quantitative analysis of free astaxanthin in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. The optimized extraction process is efficient, stable and environmentally friendly. This study provides technical support for the application of *Xanthophyllomyces dendrorhous* astaxanthin in aquaculture, food and other fields.

KEY WORDS: *Xanthophyllomyces dendrorhous*; free astaxanthin; high performance liquid chromatography; extraction process

0 引 言

虾青素是一种具有抗氧化性和着色性的类胡萝卜素，存在形式有游离和酯化两种方式。游离虾青素结构是由 4 个异戊二烯单位以共轭双键形式连接，两端各有 2 个异戊二烯单位组成的六元环结构[1]。酯化虾青素是由虾青素分子中一个羟基与脂肪酸反应生成单酯，两个羟基都与脂肪酸反应时，生成二酯。虾青素分子末端环甲基上的氢原子是一个自由基捕获点[2]，而其末端环位于亲水层，其多烯链位于亲脂区域，可将细胞膜从内向外连接起来，从而增强了细胞防御能力[3]。

虾青素可促进色素形成[4]，使水产动物增色[5]、提高免疫力[6–7]等。近年来作为饲料添加剂已被广泛用于水产养殖[8–9](如鲑鱼、鳟鱼、对虾、龙虾[10–14])。虾青素主要通过化学合成和生物提取两种途径获得，化学合成虾青素成本低(10% 虾青素约 4000 元/kg)，约占市场总产值的 95%[15]。但化学合成虾青素存在类似类胡萝卜素的异构体衍生物等中间产物，无法在体内转化[16]，可能带来安全隐患。相较于化学合成，天然虾青素抗氧化活性和着色较好[17]，主要存在于虾蟹壳、雨生红球藻[18](*Haematococcus pluvialis*)、佐夫色绿藻(*Chromochloris zofingiensis*)、红法夫酵母[19](*Xanthophyllomyces dendrorhous*)等。红法夫酵母是天然虾青素的重要微生物来源之一，允许作为饲料添加剂使用，具备高密度发酵培养的特性[20]。虾青素是红法夫酵母的细胞内色素，受酵母细胞壁较厚的影响，其生物利用度较低。

现有虾青素检测标准 GB/T 31520—2015《红球藻中虾青素的测定 液相色谱法》主要针对红球藻中酯化型虾青素，前处理时需要皂化，且梯度洗脱 35 min，检测周期长、前处理复杂，而红法夫酵母中的虾青素主要为游离型，该方法难以适用。红法夫酵母细胞壁的厚度较大，阻碍了虾青素的释放，但也能保护虾青素免受降解。破坏红法夫酵母的细胞壁是提高虾青素生物利用度的关键。常用的破壁方法有机械法[21]、化学法[22]、酶法[23–24]、酸法[25]等。破壁后一般使用甲醇、乙醇、丙酮、石油醚等提取其中虾青素[26]，但使用单一有机溶剂提取效果十分有限。因此，本研究基于 GB/T 31520—2015，建立了基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的游离虾青素分析方法，优化了红法夫酵母中虾青素的前处理方法及提取条件，以期实现游离型虾青素快速检测及红法夫酵母中虾青素的高效提取，建立红法夫酵母粉中虾青素的提取工艺，为天然虾青素在水产、食品等领域的标准化生产与产品评价提供理论依据，对推动天然色素及功能性活性物质的产业化开发具有科学与应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红法夫酵母为实验室保藏菌株(*Xanthophyllomyces dendrorhous* XD-UV2，保藏号: CCTCC 20231707)，经发酵后喷雾干燥制成红法夫酵母粉。

游离虾青素标准品(色谱纯 99.5%，德国 LGC Standards GmbH 公司)；甲基叔丁基醚、甲醇、磷酸、二甲基亚砜(色谱纯，上海麦克林生化科技有限公司)；其他试剂(分析纯，国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱、UV2450 紫外分光光度计(日本岛津公司)；XD-15J 超微粉碎机(济南达威机械有限公司)；

vortex Mixer 涡旋仪(大韩科学有限公司); T 10 basic ULTRA-TURRAX®分散机[艾卡(广州)仪器设备有限公司]; CR21N 离心机(日本日立公司); HB2DG 双模块干式金属浴[奥豪斯仪器(上海)有限公司]; Inertsil C_{30} S-Select C_{30} 色谱柱[4.6 mm×25 cm, 5 μm, 技尔(上海)商贸有限公司]; CPA225D 电子天平[精度 0.01 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3　实验方法

1.3.1　紫外吸收波长的确定

取游离虾青素标准品, 使用丙酮溶解配制成 105 mg/L 的标准母液并逐级稀释制成标准工作液; 另取红法夫酵母虾青素提取液, 使用丙酮稀释至合适浓度, 用紫外分光光度计进行波长全扫描(190~900 nm), 确定 HPLC 检测波长。

1.3.2　虾青素含量测定

参考 GB/T 31520—2015 做部分修改, 采用二元梯度泵, 考察流动相配比、洗脱时间对游离虾青素的检出限、定量限及精密度的影响。流动相包括甲醇、磷酸、甲基叔丁醚, 梯度洗脱, 色谱柱: Inertsil C_{30} S-Select C_{30} 色谱柱(4.6 mm×25 cm, 5 μm), 流速 1 mL/min, 进样量 20 μL 检测时间 20 min, 检测波长 472 nm, 洗脱程序如表 1 所示。

表 1　HPLC 洗脱程序
Table 1　Elution program of HPLC

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	85	15
20	70	30

1.3.3　虾青素提取方法

(1)红法夫酵母粉破壁

参考 SILVA 等[27]的方法, 比较水和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)对红法夫酵母细胞的破壁情况。称取 0.04 g 红法夫酵母粉, 分别加入 1 mL 水和 DMSO, 50 ℃保温 5 min。按如下方法提取: 加 3 mL 丙酮超声提取 2 min, 涡旋混匀, 6000 r/min 均质 30 s。4000 r/min 离心 1 min, 取上清, 沉淀加入丙酮多次重复操作至粉末变成乳白色, 合并上清定容。取 1 mL 上清过 0.22 μm 尼龙滤膜, 上机检测。

(2)单因素试验

参考 BATGHARE 等[28]的方法, 根据 1.3.3(1)考察不同粒径(超微粉碎前和粉碎后)对虾青素提取率的影响; 考察 *A*-水添加量(125、150、175、200、250、400、600 μL)、*B*-DMSO 添加量(0.40、0.60、0.80、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、3.00 mL)、*C*-丙酮添加量(1.0、3.0、4.5、6.0、9.0 mL)、提取次数(1、2、3、4、5、6)、*D*-加水后保温温度(40、45、50、55、60 ℃)、*E*-加水后保温时间(5、15、25、35 min)、*F*-加 DMSO 后保温温度(40、45、50、55、60 ℃)、*G*-加 DMSO 后保温时间(5、15、25、35、45 min)对虾青素提取率的影响。

(3) Plackett-Burman 实验

参考林嘉祺等[29]方法, 根据单因素实验结果, 以水添加量、加水后保温温度、加水后保温时间、DMSO 添加量、加 DMSO 后保温温度、加 DMSO 后保温时间、丙酮添加量、提取次数设计 Plackett-Burman 实验, 分析影响红法夫酵母粉中虾青素提取率的显著因素。

(4)响应面实验设计

基于单因素试验结果和 Plackett-Burman 实验结果, 采用 3 因素 3 水平的试验设计, 因素与水平见表 2。

表 2　响应面实验因素水平
Table 2　Factor level of response surface test

水平	*B*-DMSO 添加量/mL	*G*-丙酮 添加量/mL	*H*-提取 次数
−1	1.65	5.50	1
0	1.70	6.00	2
1	1.75	6.50	3

1.4　数据处理

各实验做 3 组平行, 结果以平均值±标准偏差表示, Plackett-Burman 实验和响应面实验采用软件 Design-Expert 13 进行设计和分析, 统计学分析使用软件 SPSS 26.0, $P<0.05$ 为显著差异。

2　结果与分析

2.1　游离虾青素检测方法的优化

2.1.1　波长的确定

采用紫外分光光度计在 190~900 nm 范围内对虾青素标准工作液和红法夫酵母虾青素提取液进行全波长扫描, 最大吸收波长分别为 477 nm 和 472 nm(图 1), 该红移现象可能源于红法夫酵母虾青素提取物中共存色素、溶剂极性或虾青素异构体比例的差异[30]。鉴于提取液在该波长下不同浓度均呈现良好峰形与一致性, 为更准确、灵敏地测定样品中虾青素的含量[31], 本研究选择 472 nm 作为高效液相色谱的检测波长, 与邱月等[32]研究结果类似。

2.1.2　洗脱时间对检测效果的影响

使用 GB/T 31520—2015 中 35 min 的多梯度洗脱方法, 检测样品和标准品虾青素, 出峰时间为 8.5 min 左右[图 2(A)、图 2(B)]; 采用 GB/T 31520—2015 中前 15 min 梯度洗脱检测样品和标准品虾青素, 出峰时间为 4.9 min 左右[图 2(C)、图 2(D)], 样品中的色素没有完全洗脱, 15 min 处峰值较高未回到基线, 且影响下一针样品基线, 0 min 基线不平, 影响检测值和色谱柱寿命; 采用 GB/T 31520—2015 中前 20 min 梯度洗脱检测样品和标准品虾青素, 出峰时间为 8.5 min 左右[图 2(E)、图 2(F)], 目标产物峰几乎完全分

离，且不影响下一针样品基线。考虑到检测时间、试剂成本及样品残留等问题，使用 20 min 二元高压梯度洗脱方法。

2.1.3 流动相的选择和比例对检测效果的影响

参考 GB/T 31520—2015，使用甲基叔丁基醚、甲醇和磷酸作为流动相。研究发现磷酸与甲基叔丁基醚不互溶，超声脱气后混合溶液为乳白色浊液，虾青素分离测定图谱不稳定，如图 3。

参照 GB/T 31520—2015 中 $V_{\text{甲基叔丁基醚}}$:$V_{\text{甲醇}}$:$V_{1\%\text{磷酸}}$=15:81:4，探究发现 $V_{\text{甲醇}}$:$V_{\text{磷酸}}$=100:4 和 $V_{\text{甲醇}}$:$V_{\text{磷酸}}$=96:4 对于虾青素色谱图从出峰时间、出峰效果影响不大。考虑到实验计算及操作的便利性，使用 $V_{\text{甲醇}}$:$V_{1\%\text{磷酸}}$=100:4 流动相 A，将甲基叔丁基醚作为流动相 B，上述流动相对于虾青素的分离效果如图 4，V_A:V_B=85:15 起始，20 min 内梯度洗脱至 V_A:V_B=70:30 对于虾青素的分离度较好。

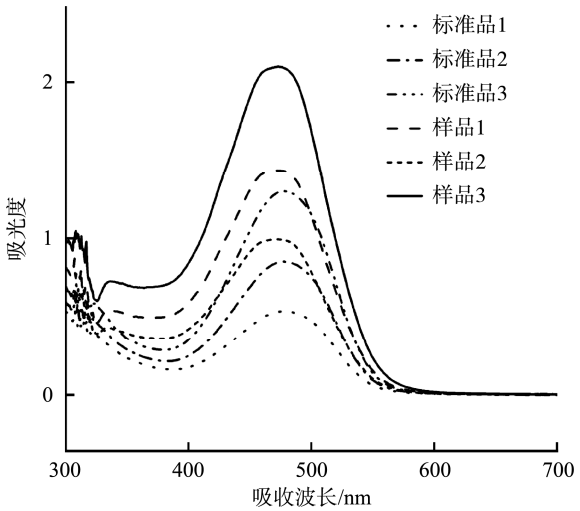
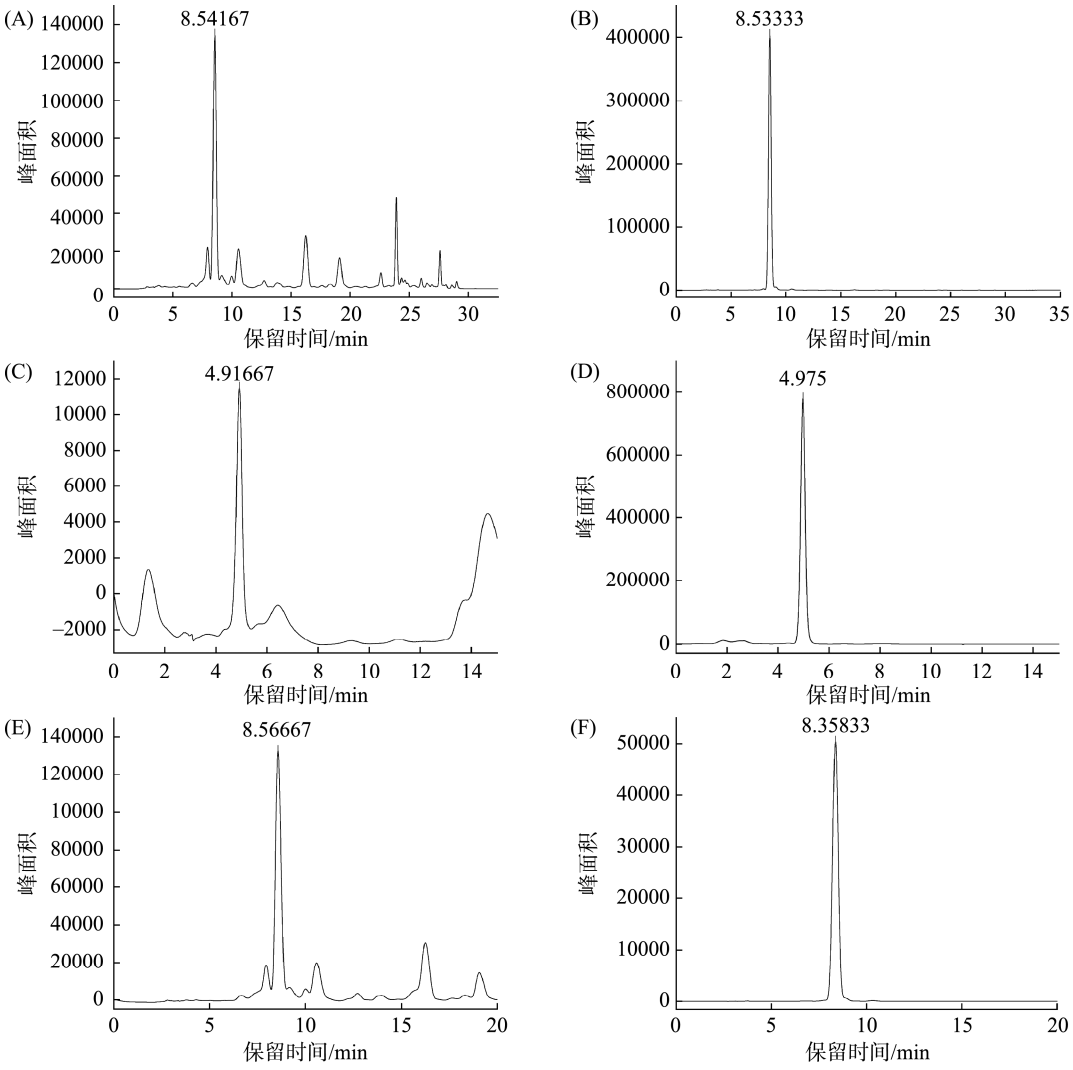


图 1 标准液和提取液的全扫描最大吸收波长

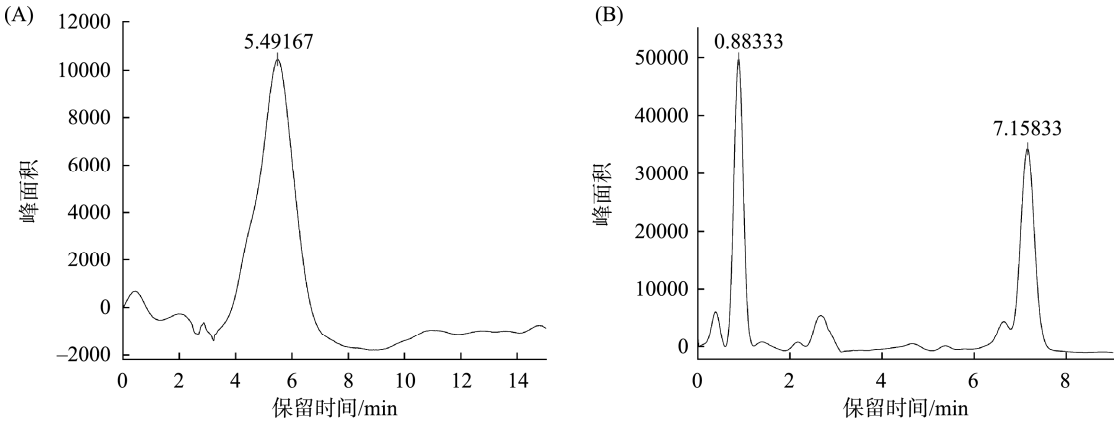
Fig.1 Full-scan maximum absorption wavelengths of standard solution and extraction solution



注：(A) 35 min 分离样品；(B) 35 min 分离标准品；(C) 15 min 分离样品；(D) 15 min 分离标准品；(E) 20 min 分离样品；(F) 20 min 分离标准品。

图 2 不同检测时间对虾青素分离效果的影响

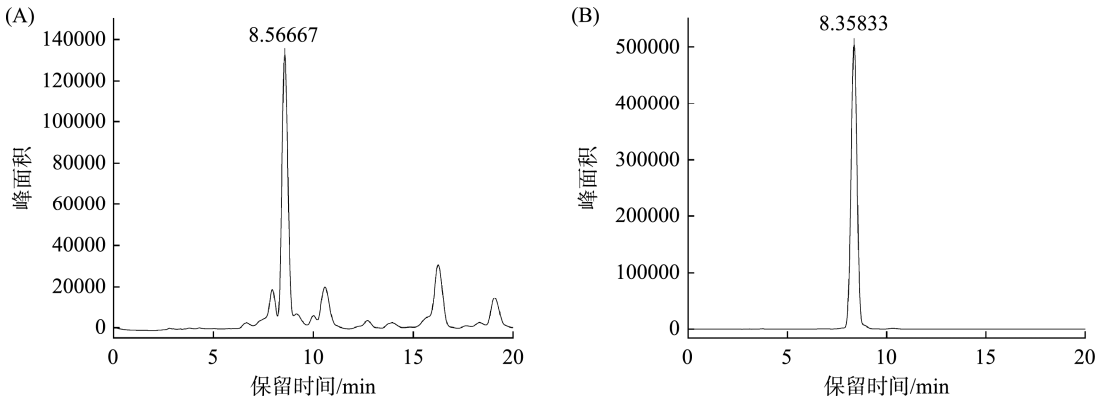
Fig.2 Effects of different detection times on the separation efficiency of astaxanthin



注: (A)低浓度样品; (B)高浓度样品。

图 3　甲基叔丁基醚+磷酸对虾青素样品分离情况的影响

Fig.3　Effects of methyl tert-butyl ether combined with phosphoric acid on the resolution of astaxanthin samples



注: (A)红法夫酵母虾青素提取样品分离效果; (B)虾青素标准品分离效果。

图 4　流动相对虾青素分离效果影响

Fig.4　Effects of flow on the separation effect of astaxanthin

2.1.4　标准曲线的建立及方法的精度和准确性

按上述方法以虾青素标准液质量浓度为横坐标(X, mg/L)、峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线方程 Y=151436X+3363.24, r^2=0.9997。检出限和定量限基于信噪比法确定: 将空白样品提取液逐级稀释后进样分析, 以信噪比 S/N=3 时的样品浓度作为检出限, S/N=10 时的浓度作为定量限。经测定分析, 检出限为 0.55 μg/g, 定量限为 0.16 μg/g, 满足实验要求。

以红法夫酵母粉中提取的虾青素为测试对象, 按照样品回收方法进行加标回收实验, 每个样品至少测定 6 次, 结果如表 3 所示。相对标准偏差为 0.05%~0.13%, 加标回收率为 105.12%~127.70%, 表明方法准确度良好、精密度高。以上结果表明, 本方法灵敏度高、准确度好、重复性强, 满足红法夫酵母中游离虾青素的定量分析要求。

表 3　精密度及加标回收率结果

Table 3　Results of precision and spiked recovery

指标		平行样品				
		样品 A	样品 B	样品 C	样品 D	样品 E
测定值/(mg/g)	1	2.34	2.77	3.20	5.76	10.57
	2	2.35	2.77	3.19	5.75	10.58
	3	2.34	2.78	3.20	5.75	10.58
	4	2.35	2.78	3.20	5.76	10.58
	5	2.35	2.78	3.19	5.76	10.59
	6	2.35	2.78	3.20	5.76	10.59
平均值/(mg/g)		2.35	2.78	3.20	5.76	10.58
加标量/μg		0	0.00	5.25	10.50	52.50
加标回收率/%		-	-	112.10	105.12	127.70

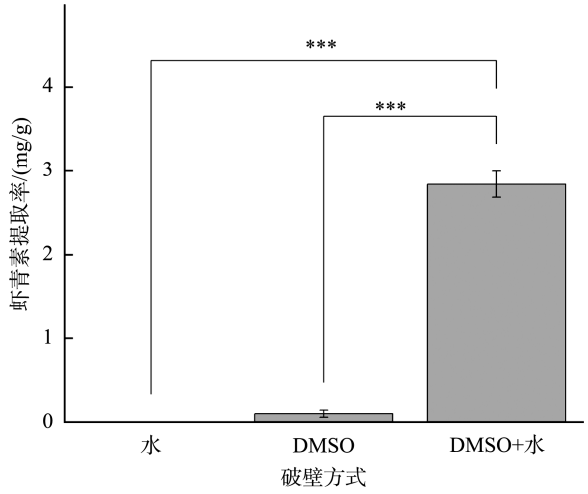
注: -为空白对照组, 未加标, 不计回收率。

2.2　红法夫酵母中虾青素提取方法的建立

2.2.1　不同破壁剂预处理对提取率的影响

水会引起红法夫酵母细胞壁某些亲水成分(如葡聚糖)溶胀, 弱化细胞壁结构, 有助于细胞壁的破碎[33], 而 DMSO 通过使酵母细胞壁的蛋白变性[34], 从而达到破壁效

果。实验发现，单一水无法达到破壁目的，导致胞内的虾青素无法释放，且由于虾青素不溶于水，故提取率为 0，单一 DMSO 的破壁提取效果比单一水的破壁效果好，但明显低于水+DMSO 破壁提取率，如图 5 所示。这一结果表明，水与 DMSO 联合使用具有协同增效作用。分析其原因可能是：水先使细胞壁亲水成分溶胀，疏松细胞壁结构，为 DMSO 渗透创造有利条件；随后 DMSO 使壁蛋白变性，进一步破坏细胞壁完整性，从而显著提高胞内虾青素的溶出效率类似地，黄莹等[34]也发现 DMSO 破壁效果优于单一水处理，但未联合使用；本研究在此基础上进一步证实了水-DMSO 联合预处理的协同增效作用。因此，选择水和 DMSO 联合破壁的方法进行后续实验。



注：***表示组间具有显著性差异，$P<0.01$。

图 5 不同破壁剂预处理对红法夫酵母虾青素提取率的影响

Fig.5 Effects of different cell wall disruption agents on the extraction yield of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*

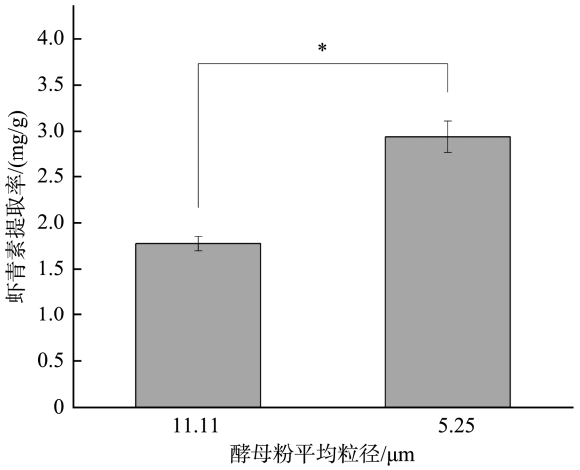
2.2.2 单因素试验结果

(1)粒径对虾青素提取率的影响

研究发现物料的粒径与活性物质提取率显著相关[35]，故将红法夫酵母喷干粉超微粉碎 15 min，得到 90%粒径小于 8.96 μm 的超微粉，平均粒径(50%)为 5.25 μm；未处理组 90%粒径小于 37.31 μm，平均粒径(50%)为 11.11 μm。实验发现超微粉碎后能有效提高虾青素的提取效果，以 2.2.1 中水和 DMSO 混合破壁预处理红法夫酵母超微粉，效果约为单一 DMSO 组的 3.6 倍，见图 6。因此，在后续研究中选取超微粉碎后的红法夫酵母粉进行进一步的优化研究。

(2)不同因素对虾青素提取率的影响

如图 7 所示，给出不同因素对虾青素提取率的影响。随着水添加量由 125 μL 增加至 250 μL，虾青素提取率整体保持较高水平，而当水添加量增加至 400 μL 和 600 μL 时，提取率显著下降[图 7(A)]。DMSO 添加量由 0.4 mL 增加至 1.75 mL 时，虾青素提取率逐渐升高，并在 1.5~1.75 mL 范围达到较高水平，而继续增加至 2 mL 和 3 mL 后提取率下降[图 7(B)]。虾青素提取率在丙酮添加量在 1 mL 后增加继续增加其添加量提取率几乎保持不变[图 7(C)]。提取次数 1 次后提取率急剧增加，在 3 次之后基本保持不变[图 7(D)]。虾青素提取率在加水后保温温度 40~60 ℃先增加后减少，在 45 ℃附近可能存在高点[图 7(E)]。虾青素提取率在加 DMSO 后保温温度 40~60 ℃先增加后减少，在 50 ℃附近可能存在高点[图 7(F)]，与张甲庆等[36]的研究结果类似。虾青素提取率在加水后保温时间 5~35 min 内逐渐升高[图 7(G)]，考虑到实际因素，过长的保温时间可能会带来更高的能源损耗，因此，在后续研究中加入水后保温时间选取 5 min 进行进一步的优化研究。提取率在加 DMSO 后保温时间 15 min 存在高点[图 7(H)]，因此，在后续实验中加入 DMSO 后保温时间选取 15 min 进行进一步的优化研究。



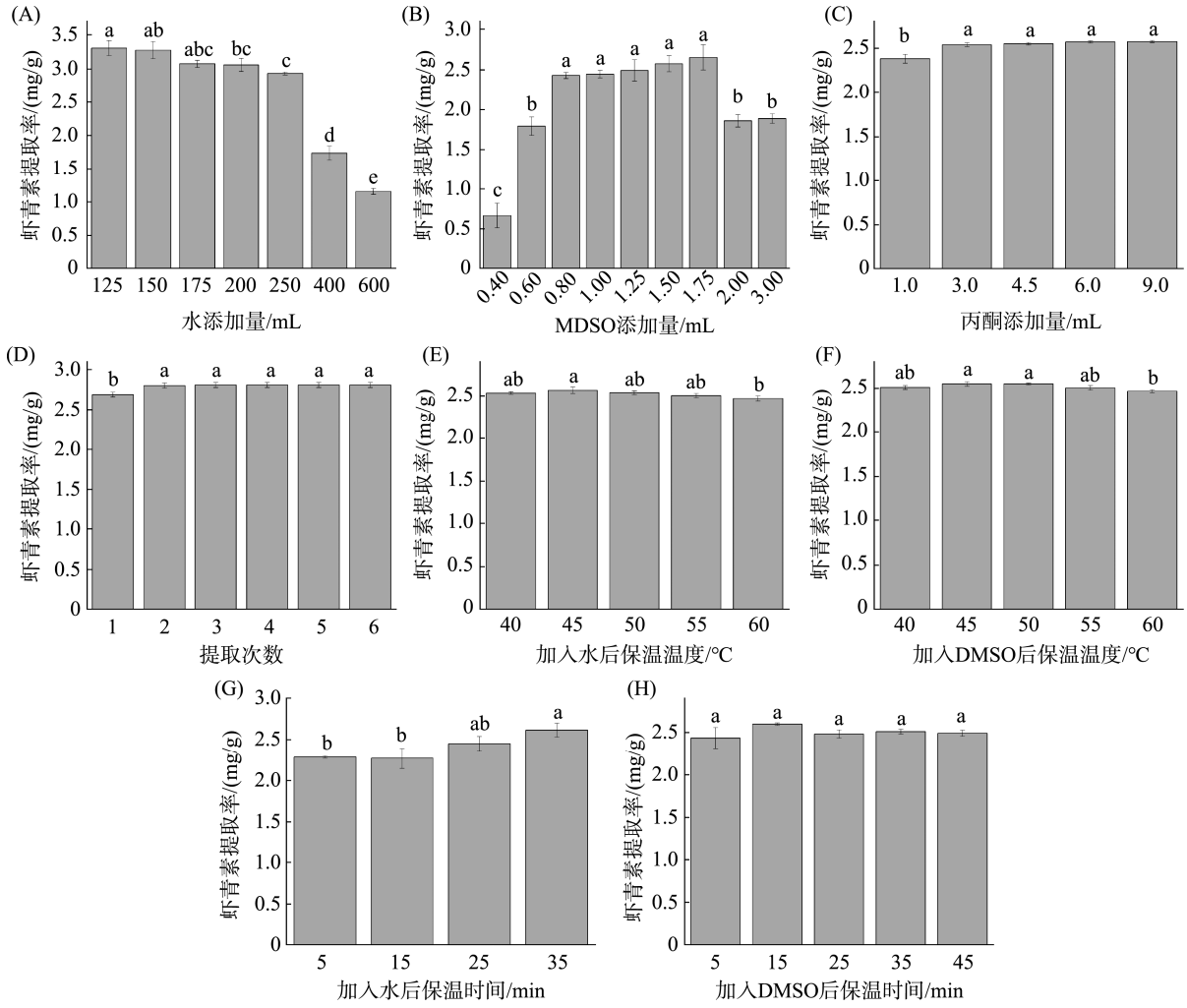
注：*表示组间具有显著性差异，$P<0.05$。

图 6 不同粒径对红法夫酵母虾青素提取率的影响

Fig.6 Effects of different particle sizes on the extraction yield of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*

2.2.3 Plackett-Burman 实验结果

关于 Plackett-Burman 实验的各组设计条件及相应结果见表 4。借助 Design-Expert 13 软件对 Plackett-Burman 实验获得的数据进行统计分析，其分析结果展示于表 5。由表可知，模型 P 为 0.04，满足 $P<0.05$ 的显著标准，证明模型可信。各考察因素对实验结果影响的重要程度从高到低依次为：*G*-丙酮添加量、*H*-提取次数、*B*-DMSO 添加量、*A*-水添加量、*C*-加水后保温温度、*E*-加水后保温时间、*F*-加 DMSO 后保温时间、*D*-加 DMSO 后保温温度。其中，丙酮添加量、提取次数、DMSO 添加量的影响较为显著。根据以上分析，选择丙酮添加量、提取次数、DMSO 添加量进行后续响应面优化实验。



注: 不同小写字母表示组间具有显著性差异, $P<0.05$。

图 7　不同因素对红法夫酵母虾青素提取率的影响

Fig.7　Effects of different factors on the extraction yield of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*

表 4　Plackett-Burman 实验结果

Table 4　Results of the Plackett-Burman experiment

分组	*A*-水添加量/μL	*B*-DMSO添加量/mL	*C* 加水后保温温度/℃	*D* 加 DMSO 后保温温度/℃	*E*-加水后保温时间/min	*F*-加 DMSO 后保温时间/min	*G*-丙酮添加量/mL	*H*-提取次数	提取率/(mg/g)
1	175	1.50	50	50	5.0	25	9.0	3	2.66
2	175	2.00	40	40	5.0	25	4.5	3	2.67
3	175	1.50	40	40	10.0	5	9.0	3	2.70
4	150	1.75	45	45	7.5	15	6.0	2	2.62
5	125	1.50	40	40	5.0	5	4.5	1	2.59
6	125	2.00	50	50	5.0	5	4.5	3	2.78
7	175	2.00	40	50	10.0	25	4.5	1	2.53
8	125	2.00	50	40	10.0	25	9.0	1	2.68
9	125	1.50	40	50	5.0	25	9.0	1	2.66
10	175	2.00	50	40	5.0	5	9.0	1	2.63
11	125	1.50	50	40	10.0	25	4.5	3	2.52
12	125	2.00	40	50	10.0	5	9.0	3	2.81
13	175	1.50	50	50	10.0	5	4.5	1	2.47

表 5 Design-Expert 回归模型方差分析结果
Table 5 Analysis of variance results of Design-Expert regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	165.10	8	20.64	7.02	0.04
A	15.82	1	15.82	5.38	0.08
B	28.76	1	28.76	9.78	0.04
C	8.75	1	8.75	2.97	0.16
D	1.35	1	1.35	0.46	0.53
E	8.36	1	8.36	2.84	0.17
F	8.34	1	8.34	2.83	0.17
G	50.90	1	50.9	17.30	0.01
H	42.82	1	42.82	14.56	0.02
残差	11.77	4	2.94		
总和	176.87	12			

2.2.4 响应面实验结果与分析

根据 Plackett-Burman 实验预测, 固定水添加量为 125 μL, 加水后保温温度为 45 ℃, 保温时间 5 min, 加 DMSO 后保温温度为 45 ℃, 保温时间 15 min 时, 能够获得最大虾青素提取率。按照上述条件选取 DMSO 添加量、丙酮添加量、提取次数 3 个因素作为自变量, 进行三因素三水平的 Box-Benhnken 设计, 共 17 组实验, 以虾青素提取率为响应值, 试验设计及结果见表 6。

响应面试验方差分析结果见表 7, 由表 7 中数据可知, 模型极显著(P<0.05)而失拟项不显著(P>0.05), 模型决定系数 R^2=0.8674。由表 7 可知, 因素一次项 *H* 对虾青素提取率的影响显著; 交互项 *BG* 对虾青素提取率的影响显著; 二次项 H^2 对虾青素提取率影响显著。这说明各因素与响应值之间不是简单的线性关系, 各因素的影响程度依次为: *H*>*G*>*B*, 即提取次数>丙酮添加量>DMSO 添加量。

通过对数据进行二次多元回归拟合, 得到二次多项式方程: Y=2.1–0.0487B+0.0488G–0.0075H+0.1975BG+0.0600BH–0.0883B^2+0.0017G^2–0.3157H^2。

表 6 Box-Behnken 试验设计及其结果
Table 6 Design and results of Box-Behnken experimental

分组	*B*-DMSO 添加量/mL	*G*-丙酮添加量/mL	*H*-提取次数	提取率/(mg/g)
1	2.00	6.0	1	1.51
2	1.75	6.0	2	2.14
3	1.50	9.0	2	1.91
4	2.00	6.0	3	1.66
5	1.75	6.0	2	1.97
6	1.75	4.5	3	1.77
7	1.75	4.5	1	1.83
8	1.75	9.0	1	1.81
9	1.5	4.5	2	2.09
10	1.75	6.0	2	2.05
11	1.75	6.0	2	2.14
12	1.75	6.0	2	2.22
13	2.00	9.0	2	2.34
14	2.00	4.5	2	1.73
15	1.75	9.0	3	1.75
16	1.50	6.0	3	1.77
17	1.50	6.0	1	1.86

表 7 响应面方差分析结果
Table 7 Analysis of variance results of response surface

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	1080.30	9	120.03	5.09	0.0217	显著
B-DMSO 添加量	0.34	1	0.34	0.01	0.9076	
G-丙酮添加量	9.55	1	9.55	0.41	0.5447	
H-提取次数	605.29	1	605.29	25.66	0.0015	显著
BG	253.91	1	253.91	10.77	0.0135	显著
BH	21.73	1	21.73	0.92	0.3690	
GH	7.87E-04	1	7.87E-04	3.34E-05	0.9956	
B^2	50.13	1	50.13	2.13	0.1882	
G^2	0.16	1	0.16	6.59E-03	0.9376	
H^2	671.16	1	671.16	28.46	0.0011	显著
残差	165.09	7	23.58			
失拟项	111.09	3	37.03	2.74	0.1772	不显著
纯误差	54.00	4	13.5			
总和	1245.39	16				
变异系数/%	6.34	R^2	0.8674			
$R_{Pred}{}^2$	0.4950	R^2_{adj}	0.6970			

依据回归方程，利用 Design-Expert 绘出响应面分析图，如图 8。由图 8 可得各个变量之间的交互作用对响应值的影响，等高线呈椭圆形表示两因素交互作用显著，呈圆形表示两因素交互作用不显著。在 3 个因素中，丙酮添加量和提取次数交互作用显著。通过响应面 3D 图可以明显看到所做试验的范围包括最大值所在区域。

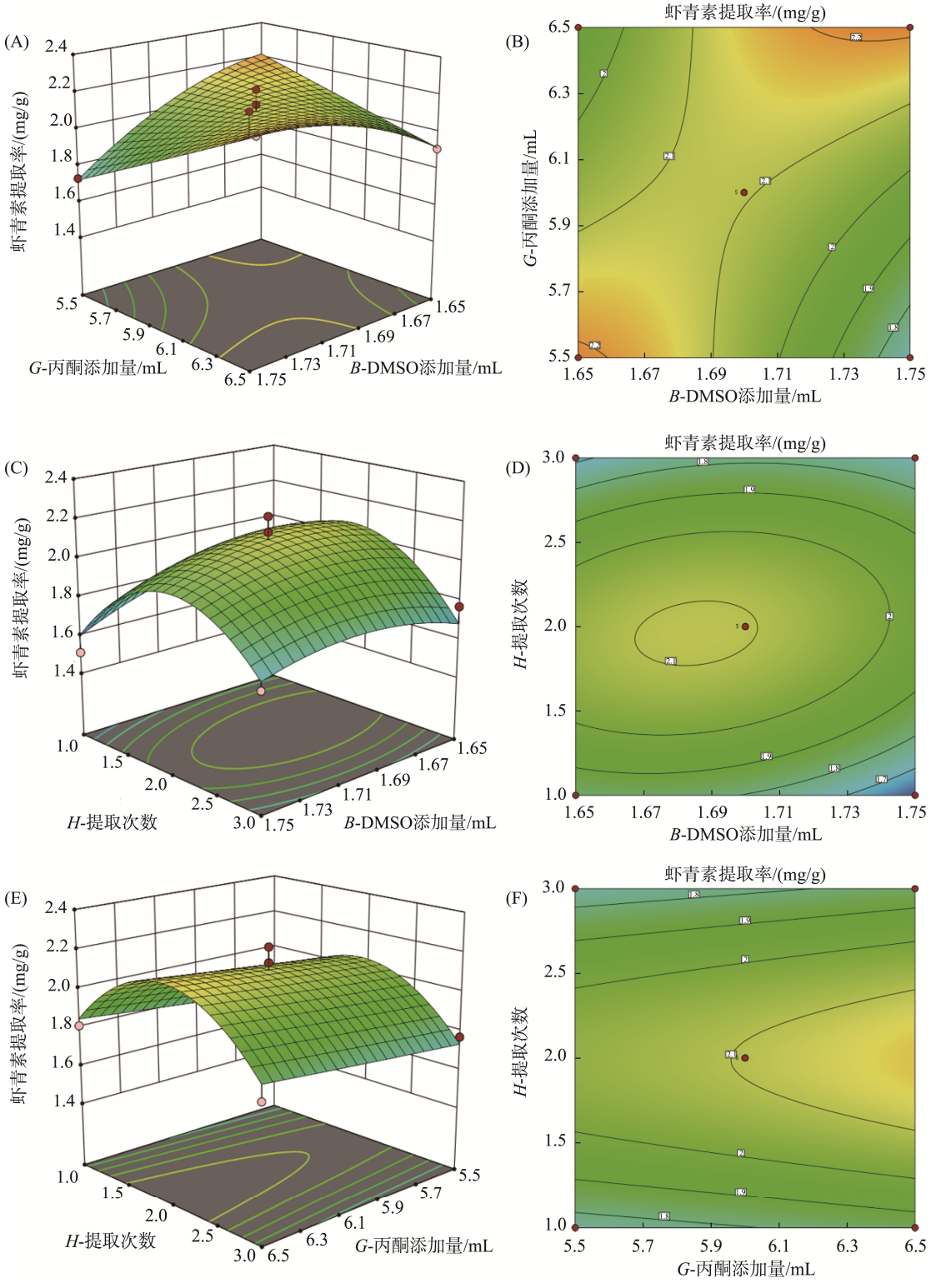


图 8　不同因素交互作用对虾青素提取率影响的响应面图

Fig.8　Response surface plots for the interactive effects of different factors on astaxanthin extraction yield

2.2.5 响应面实验优化结果

根据响应面预测结果，按红法夫酵母粉 0.04 g，DMSO添加量1.65 mL，即添加比例41.25:1 (mL:g)；丙酮添加量 5.5 mL，即添加比例为 137.50:1 (mL:g)；提取 2 次，进行 3 次验证实验，得提取率为 2.74 mg/g，在 95%置信区间内(2.51~3.15 mg/g)，实验预测最大提取度为 70.7%，实际提取度为 68.3%。

3 讨论与结论

GB/T 31520—2015 适用范围是针对红球藻中虾青素的测定，红球藻中虾青素为酯化型虾青素，需要复杂的前处理，且检测时长为35 min，而红法夫酵母粉中虾青素为游离虾青素，该方法并不适用。且国标 GB/T 31520—2015 要求使用四元梯度泵，对仪器要求较高，本研究采用二元梯度泵，建立优化了游离虾青素检测方法洗脱时间为 20 min，较国标 GB/T 31520—2015 缩短 15 min，提高了检测效率。

本研究采用红法夫酵母超微粉，以水和 DMSO 混合破壁预处理效果约为单一 DMSO 组的 3.6 倍，初步揭示了水与 DMSO 对红法夫酵母超微粉的溶胀-变性协同破壁机制，水分子预处理使细胞壁亲水成分溶胀，疏松壁结构，先打开细胞壁结构“缺口”，为 DMSO 渗透创造有利通道，DMSO 使壁蛋白变性，进一步破坏壁完整性，胞内虾青素得以高效释放。对于具有复杂细胞壁结构的微生物，采用“亲水溶胀剂+蛋白变性剂”的联合预处理策略，往往可获得优于单一处理的破壁效果。在水添加比例为 3.30:1 (mL:g)，DMSO 添加比例为 41.25:1 (mL:g)，丙酮添加比例为 137.5:1 (mL:g)，提取次数 2 次，加水后保温温度为 45 ℃，保温时间为 5 min；加 DMSO 后保温温度为 45 ℃，保温时间为 15 min 的最优条件下，提取率可达 2.74 mg/g，加标回收率为 105.12%~127.70%。目前国内提取红法夫酵母粉中虾青素提取报道较少，比 DU 等[37]从饲料中检测虾青素的加标回收率高 9%~50%；比赵唯雯等[38]从保健品中检测虾青素的加标回收率高 28.1%。本研究采用超微粉碎减小红法夫酵母粉粒径的方法，比 LI 等[39]采用玻璃珠减小粒径的方法省时，且本研究中虾青素提取率较 LI 等[39]高 3.3%；本研究使用水、DMSO 混合体系作为破壁预处理，比肖冬光等[40]仅使用 DMSO 破壁的提取虾青素量高 9.13 倍。前处理工艺提高了从红法夫酵母中提取虾青素的溶出效率，减少有机溶剂的用量，而水的加入既能优化体系环境、提升破壁和溶出的均匀性，还能辅助后续溶剂去除，实现溶出效率与环保性的双重优化。

综上，本研究通过建立一种检测游离虾青素的高效液相色谱检测方法，缩短了检测时长，提高了游离虾青素检测结果的准确性。开发并优化了红法夫酵母粉中虾青素的绿色提取方法，实现了天然虾青素高效提取，为拓展红法夫酵母在功能食品、生物医药等领域的应用提供技术支撑。

参考文献

[1] KUHN R, SORENSEN NA. Über astaxanthin and ovoverdin [J]. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1938, 71: 1879–1888.

[2] YAMASHITA E. Let astaxanthin be thy medicine [J]. Pharma Nutrition, 2015, 3(4): 115–122.

[3] FRANCESCO V, CHRISTIAN A. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps [J]. Food & Function, 2017, 8(1): 39–63.

[4] BENDICH A. Non-provitamin an activity of carotenoids: Immunoenhancement [J]. Trends in Food Science & Technology, 1991, 2: 127–130.

[5] SHUJUN L, ABUL H, FEREIDOON S. Dietary lipid and astaxanthin contents affect the pigmentation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) [Z]. 2024.

[6] WEI LW, MENG TL, SAMIA F, *et al*. Effects of dietary *Phaffia rhodozyma* astaxanthin on growth performance, carotenoid analysis, biochemical and immune-physiological parameters, intestinal microbiota, and disease resistance in *Penaeus* monodon [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 762689.

[7] YU WJ, ZHANG MJ, WANG BJ, *et al*. Dietary *Haematococcus pluvialis* powder supplementation affect carotenoid content, astaxanthin isomer, antioxidantcapacity and immune-related gene expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture Research, 2021, 52(6): 2403–2414.

[8] MARIA H, BRIAN C, JOHN S, *et al*. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: Chitin and chitosan-Part A: extraction methods [J]. Biotechnology Journal, 2008, 3(7): 871–877.

[9] YANG HY, MU XD, LUO D, *et al*. Sodium taurocholate, a novel effective feed-additive for promoting absorption and pigmentation of astaxanthin in blood parrot [J]. Aquaculture, 2012, 350–353: 42–45.

[10] CHIMSUNG N, LALL S, TANTIKITTI C, *et al*. Effects of dietary cholesterol on astaxanthin transport in plasma of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2013, 165(1): 73–81.

[11] CHOUBERT G, BACCAUNAUD M. Effect of moist or dry heat cooking procedures on carotenoid retention and colour of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed astaxanthin or canthaxanthin [J]. Food Chemistry, 2009, 119(1): 265–269.

[12] BECERRA HAJ, FLORES OAA, VALERIO-ALFARO G, *et al*. Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 832–839.

[13] WADE N, GOULTER CK, WILSON JK, *et al*. Esterified astaxanthin levels in lobster epithelia correlate with shell colour intensity: Potential role in crustacean shell colour formation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2005, 141(3): 307–313.

[14] ŘEZANKA T, NEDBALOVÁ L, KOLOUCHOVÁ I, *et al*. LC-MS/APCI identification of glucoside esters and diesters of astaxanthin from the snow alga *Chlamydomonas nivalis* including their optical stereoisomers [J]. Phytochemistry, 2013, 88: 34–42.

[15] BOB C, SHAWN T, LIXIN D. Astaxanthin sources: Suitability for human health and nutrition [J]. Functional Foods in Health and Disease, 2019, 9(6): 430–430.

[16] 周桂雄, 谭雷涛, 马荣华, 等. 复合诱变选育耐高温红法夫酵母及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2025, 44(8): 256–262.

ZHOU GX, TAN LT, MA RH, *et al*. Breeding of thermotolerant *Phaffia rhodozyma* by compound mutagenesis and optimization of fermentation conditions [J]. China Brewing, 2025, 44(8): 256–262.

[17] 张辰, 徐慧, 朱坤福, 等. 微生物法生产虾青素的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(10): 29–35.
ZHANG C, XU H, ZHU KF, *et al*. Research progress on microbial production of astaxanthin [J]. China Brewing, 2021, 40(10): 29–35.

[18] DEBNATH T, BANDYOPADHYAY TK, VANITHA K, *et al*. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application [J]. Food Research International, 2024, 176: 113841.

[19] NAGAL S, RAJA A, ADIN SN, *et al*. Screening and development of *β*-carotene enriched *Phaffia rhodozyma* cell by culture media engineering [J]. Microbiology, 2023, 92(1): 36–46.

[20] LIBKIND D, MOLINÉ M, COLABELLA F. Isolation and selection of new astaxanthin-producing strains of *Phaffia rhodozyma* [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2018, 1852: 297–310.

[21] 华晓曼, 王心哲, 南博, 等. 红法夫酵母发酵生产虾青素提取工艺优化[J]. 食品工业, 2017, 38(3): 56–58.
HUA XM, WANG XZ, NAN B, *et al*. Optimization of extraction condition for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* fermentation [J]. Food Industry, 2017, 38(3): 56–58.

[22] 曾子丹, 姚朔影. 红法夫酵母酶法提取条件研究[J]. 食品工业科技, 2007(8): 91–93.
ZENG ZD, YAO SY. Study on enzymatic extraction conditions of *Phaffia rhodozyma* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007(8): 91–93.

[23] 黄开森, 廖志赢, 徐春厚, 等. 胶红酵母虾青素纯品提取及分离纯化方法优化[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 1858–1862, 1877.
HUANG KS, LIAO ZY, XU CH, *et al*. Optimization of extraction and purification methods for pure astaxanthin from *Rhodotorula mucilaginosa* [J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(11): 1858–1862, 1877.

[24] 江文涛, 彭立影, 马加军, 等. 产虾青素红法夫酵母的发酵工艺优化[J]. 饲料博览, 2021(12): 13–18.
JIANG WT, PENG LY, MA JJ, *et al*. Optimization of fermentation process of astaxanthin producing *Phaffia rhodozyma* [J]. Feed Review, 2021(12): 13−18.

[25] 李浩, 倪孟祥. 红法夫酵母中虾青素提取研究进展[J]. 生物化工, 2024, 10(3): 236–240.
LI H, NI MX. Research progress on astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma* [J]. Biological Chemical Engineering, 2024, 10(3): 236–240.

[26] 陈涛. 微藻中虾青素的提取及其应用研究[J]. 粮油与饲料科技, 2024(11): 207–209.
CHEN T. Study on extraction and application of astaxanthin from microalgae [J]. Cereals, Oils and Feeds Technology, 2024(11): 207–209.

[27] SILVA PGP, JÚNIOR DP, DEMEDEIROS-BURKERT JF, *et al*. Carotenoid extraction from *Phaffia rhodozyma* biomass: Downstream strategies and economic evaluation of energy [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2023, 40: 93–102.

[28] BATGHARE AH, PATI S, ROY K, *et al*. Mechanistic investigations in ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* MTCC 7536 [J]. Bioresource Technology Reports, 2018, 4: 166–173.

[29] 林嘉祺, 庄岩, 刘骁, 等. 一株海洋红法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* RP-306 产虾青素的发酵条件优化[J]. 海洋科学, 2024, 48(2): 69–78.
LIN JQ, ZHUANG Y, LIU X, *et al*. Optimization of fermentation conditions for astaxanthin production by a marine strain *Phaffia rhodozyma* RP-306 [J]. Marine Sciences, 2024, 48(2): 69–78.

[30] WENZEL JT, DOUGLAS ASG, DONALD MWEST, *et al*. Crouch: Fundamentals of analytical chemistry, 9 th ed, international ed [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(25): 7903–7904.

[31] RIMMER AC, LLOYD AS, JOSEPH J, *et al*. Dolan: Introduction to modern liquid chromatography, 3rd ed [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399(5): 1809–1810.

[32] 邱月, 岳澳冬, 张建友. 基于超声辅助深共晶溶剂法的废弃虾蟹壳中虾青素高效提取[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(23): 277–285.
QIU Y, YUE AOD, ZHANG JY. Efficient extraction of astaxanthin from waste shrimp and crab shells based on ultrasound-assisted deep eutectic solvent method [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(23): 277–285

[33] 牛书操. 酵母细胞的通透化及其谷胱甘肽合成能力研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
NIU SC. Permeabilization of yeast cells and study on their glutathione synthesis ability [D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.

[34] 黄莹, 王凯, 董丛丛, 等. 二甲亚砜法破壁条件对法夫酵母虾青素提取效果的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 212–217.
HUANG Y, WANG K, DONG CC, *et al*. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) wall-breaking conditions on astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozyma* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(15): 212–217.

[35] 李甜甜. 辣椒红素提取、纯化及其纳米乳液稳定性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
LI TT. Extraction, purification of capsanthin and stability of its nanoemulsion [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.

[36] 张甲庆, 周林, 郝孔利, 等. 响应面法优化红法夫酵母中虾青素的提取工艺[J]. 广东饲料, 2025, 34(5): 25–29.
ZHANG JQ, ZHOU L, HAO KL, *et al*. Optimization of astaxanthin extraction process from *Phaffia rhodozyma* by response surface methodology [J]. Guangdong Feed, 2025, 34(5): 25–29.

[37] DU P, JIN M, YANG L, *et al*. Determination of astaxanthin in feeds using high performance liquid chromatography and an efficient extraction method [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2016, 39(1): 35–43.

[38] 赵唯雯, 高梦楠, 黄汉昌, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中的虾青素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(6): 2229–2234.
ZHAO WW, GAO MN, HUANG HC, *et al*. Determination of astaxanthin content in health food by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(6): 2229–2234.

[39] LI C, WANG JL, HUA N, *et al*. Disruption of *Phaffia rhodozyma* cells and preparation of microencapsulated astaxanthin with high water solubility [J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(1): 111–120.

[40] 肖冬光, 李贤宇, 郝玥. 高效液相色谱法检测红发夫酵母胞内虾青素[J]. 天津科技大学学报, 2005(1): 9–12.
XIAO DG, LI XY, HAO Y. Determination of intracellular astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2005(1): 9–12.

(责任编辑: 韩晓红　安香玉)