

红酵母产 β -胡萝卜素体外转化为VA的研究

刘卉琳¹, 刘绍^{1,2}, 谢达平^{3,*}

(1.湖南农业大学生物安全与技术学院, 湖南长沙 410128; 2.湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128;
3.湖南农业大学生命科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要:通过高效液相色谱分析红酵母液态发酵提取液,表明该提取液中含有 β -胡萝卜素,体外转化分析表明该 β -胡萝卜素可转化为VA。通过对转化条件的优化研究,在 β -胡萝卜素质量浓度123mg/L浓缩液中, β -胡萝卜素体外转化VA的最佳转化条件为pH8.0、脱氧胆酸钠3.5mmol/L、 d - α -生育酚0.5mmol/L和Tween-40添加量0.25g/100mL,在该最佳反应条件下,红酵母液态发酵所产 β -胡萝卜素在2.58nmol/(mg·h) β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶作用下37℃水浴振荡反应7h,生成40.1mg/L VA,转化率达到32.6%。

关键词:红酵母; β -胡萝卜素; β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶; VA; 条件优化

in vitro Conversion of β -Carotene Produced by *Rhodotorula* into Vitamin A

LIU Hui-lin¹, LIU Shao^{1,2}, XIE Da-ping^{3,*}

(1. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
3. College of Bio-Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The existence of β -carotene in the fermentation broth of *Rhodotorula* was identified by HPLC, and its *in vitro* cleavage into retinol also known as vitamin A by β -carotene 15,15'-monooxygenase from chicken intestinal mucosa was studied. The optimum reaction conditions for converting 123 mg/L β -carotene concentrate were determined to be: pH 8.0, 3.5 mmol/L deoxycholate, 0.5 mmol/L d - α -tocopherol and 0.25 g/100 mL Tween-40. Under the optimum conditions, 7 h incubation of 2.58 nmol/(mg·h) β -carotene 15,15'-monooxygenase in 37 °C water bath with shaking produced 40.1 mg/L retinol, with a conversion yield of 32.6%.

Key words: *Rhodotorula*; β -carotene; β -carotene-15,15'-monooxygenase; retinol; reaction conditions optimization
中图分类号: R151.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2011)23-0201-05

类胡萝卜素(carotenoids)是一类呈黄色、橙红色或红色的链状或环状含8个异戊二烯单位、四萜烯类头尾连接而成的多异戊二烯化合物,目前已知结构的类胡萝卜素大约600余种,大部分类胡萝卜素具有抗氧化活性,然而,VA原(能够转化为VA的类胡萝卜素)是类胡萝卜素最大的功能所在。VA又称视黄醇(retinol),在维持视觉正常功能、促进正常的生长发育、维持上皮组织细胞的正常分化以及防癌等方面具有重要的生理功能。

人类从食物中获得VA主要有两种途径:一是通过摄入植物性食物中的VA原——类胡萝卜素转化,另一是摄入动物性食物中的能够直接被人体利用的VA。众所周知,动物性制品食用过多,会伴随饱和脂肪、胆

固醇摄入增加,使机体体质呈酸性,免疫力下降,且容易引起机体血脂异常、高血压等多种疾病。于是人们转而求助于植物性食品,以获得VA原——类胡萝卜素,然而众多类胡萝卜素中只有大约50种能够在体内转化为VA,且大部分转化效率很低,同时类胡萝卜素吸收至体内后不会马上转化为VA,对不能满足急需VA的人群的要求。因此,研究类胡萝卜素体外高效转化为直接可食用的VA具有重要意义。

有报道表明,哺乳动物可通过 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶作用使一分子 β -胡萝卜素从中心裂解成两分子视黄醛,然后再被还原为视黄醇^[1]。本实验对从福建酒糟中分离出来的红酵母产生的类胡萝卜素进行体外转化为VA的研究,从动物体内提取的相关酶作用于发酵

收稿日期: 2011-02-09

作者简介: 刘卉琳(1983—),女,博士研究生,研究方向为微生物工程与应用。E-mail: huilin0085@163.com

*通信作者: 谢达平(1945—),男,教授,博士,研究方向为酶学理论与应用。E-mail: xiedaping508@163.com

提取液使之转化为视黄醛,然后再经硼氢化钠还原为视黄醇。为提高其转化率,本实验对转化条件进行优化研究。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与培养基

红酵母 RM-1, 由湖南农业大学生命科学技术学院提供。

β -胡萝卜素、 d - α -生育酚 美国 Sigma 公司; VA(视黄醇) 美国 Fluka 公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其他化学试剂均为分析纯。

斜面培养基: PDA; 种子培养基: 葡萄糖 20g/L、蛋白胨 20g/L、酵母膏 10g/L; 发酵培养基: 葡萄糖 32g/L、 NH_4NO_3 18g/L、酵母膏 2.0g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g/L、 KH_2PO_4 1.0g/L。

1.2 仪器与设备

HP1100 高效液相色谱仪附紫外检测器 美国 Agilent 公司; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 类胡萝卜素发酵提取液的制备

取保藏菌种一环接种至斜面培养基上, 28℃ 恒温培养 24h 后, 接种一环装入 30mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 经 28℃、180r/min 振荡培养 24h 后, 以体积分数 10% 的接种量接种于含 25mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中, 经 28℃、180r/min 振荡培养 72h 后, 取发酵液于 3500r/min 条件下离心 15min, 弃上清液, 称量 0.1g 湿菌体加入 10mL 3mol/L 盐酸, 于 28℃ 振荡浸泡 1h, 然后置入沸水浴中保持 4min, 再迅速冷却, 于 3500r/min 离心 15min, 弃上清液, 沉淀以蒸馏水洗涤 3 次后加入 10mL 丙酮, 28℃ 振荡浸泡 2h, 然后 3500r/min 离心 15min, 上清液即为类胡萝卜素发酵提取液, 浓缩 10 倍, 得其浓缩液。-18℃ 避光保存。

1.3.2 β -胡萝卜素含量的测定

参照文献[2], 采用高效液相色谱(HPLC)法测定。色谱条件: 色谱柱: Spherisob C_{18} 柱(4.6mm $\times$ 150mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈(体积比 90:10); 柱温: 30℃; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 448nm。

标准曲线的绘制: 准确称取一定量的 β -胡萝卜素标准品, 用少量三氯甲烷溶解后, 再用石油醚定容, 配制质量浓度为 0.1mg/mL 的溶液。精密吸取标准溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL 于 6 只 10mL 容量瓶中, 加入石油醚定容, 摇匀, 进样 20 μL , 以保留时间定性, 记录峰面积。以 β -胡萝卜素标准品质量浓度(x /(mg/mL))为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标, 绘制标准曲线为: $y = 6297.1x - 236.66$, $R^2 = 0.9999$ 。

1.3.3 VA 含量的测定

参照文献[2], 采用 HPLC 法测定。色谱条件: 色

谱柱: ODS 柱(4.6mm $\times$ 250mm, 5 μm), 预柱: ODS 柱(4mm $\times$ 450mm, 10 μm); 流动相: 甲醇-水(体积比 98:2)混匀, 临用前脱气; 柱温: 30℃; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 325nm。

精密吸取 VA 标准品溶液 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3mL 于 5 只 1.5mL EP 管中, 加入甲醇定容 1mL, 摇匀。各管 VA 的质量浓度分别为 10、15、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$, 进样 20 μL , 以保留时间定性, 记录峰面积。以 VA 标准品溶液质量浓度(x /($\mu\text{g/mL}$))为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标, 绘制标准曲线: $y = 175756x + 12982$, $R^2 = 0.9997$ 。

1.3.4 酶的提取

参照文献[3]方法, 选用 60 日龄三黄鸡, 屠宰前一天, 禁食 12h, 自由饮水。取空肠, 用冰冷的生理盐水冲洗干净, 用剪刀剖开肠道, 取盖玻片轻轻刮下肠黏膜, 将肠黏膜按 1:5(m/V)的比例加入 pH7.4 的 PBS 缓冲液, 于 0℃ 匀浆, 10000r/min 低温离心 30min, 取上清, 一部分酶液用于蛋白质的测定, 剩下的酶液于液氮中, -85℃ 条件下保存备用。

酶液中的蛋白质浓度参照 Bradford^[4]方法测定。

1.3.5 转化反应

参照 During 等^[5]的方法, 稍加改进。向酶液中加入 0.1mol/L pH8.0 的 PBS 缓冲液、4mmol/L 脱氧胆酸钠、0.1mmol/L d - α -生育酚、置于离心管中 37℃ 预温 5min。取浓缩液 10mL(123mg/L β -胡萝卜素)和 0.25g/100mL Tween-40 装入离心管中, 10000r/min 高速搅拌 10s, 混匀, 用氮气吹干丙酮, 加水溶解后作为底物溶液备用。然后酶液和底物溶液按照体积比 3:1 混合, 酶反应在空气氧中进行, 37℃ 水浴振荡反应 1h, 加入 50mL 37% 甲醛终止反应, 然后加入 50mg NaBH_4 粉末后, 混合物继续 37℃ 水浴振荡反应 10min, 然后加入 10mL 氯仿萃取 3 次, 合并提取液, 吹干氯仿, 加甲醇定容至 1mL。取上清液 20 μL 进行 HPLC 分析。所有实验均重复测定两次。酶提取和反应过程均在暗处进行, 以减少异构体的出现和减弱光辐射。

β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶活性大小以酶比活力表示, 即在 37℃、pH8.0 条件下, 每毫克蛋白质每小时生成视黄醇的微摩尔数表示($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$)。以此计算 β -胡萝卜素转化率。

$$\beta\text{-胡萝卜素转化率}/\% = \frac{m_1}{m} \times 100$$

式中: m_1 为转化后 VA 的质量/mg; m 为转化前 β -胡萝卜素的质量/mg。

1.3.6 转化条件的单因素试验优化

分别配制 0.1mol/L pH7.4~8.0 的 PBS 缓冲液和 0.1mol/L pH8.5~10.0 的硼酸缓冲液; 脱氧胆酸钠浓度为

2、3、4、5、6 mmol/L; d - α -生育酚浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L; Tween-40添加量为0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 g/100 mL; 按照1.3.5节方法进行HPLC分析, 考察pH值、脱氧胆酸钠浓度、 d - α -生育酚浓度及Tween-40添加量对 β -胡萝卜素转化率的影响。

1.3.7 正交试验的条件优化

根据单因素试验结果, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 试验设计见表1, 按照1.3.5节方法进行反相高压液相色谱分析, 测定 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶比活力。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and their actual and coded levels in the $L_9(3^4)$ orthogonal array design

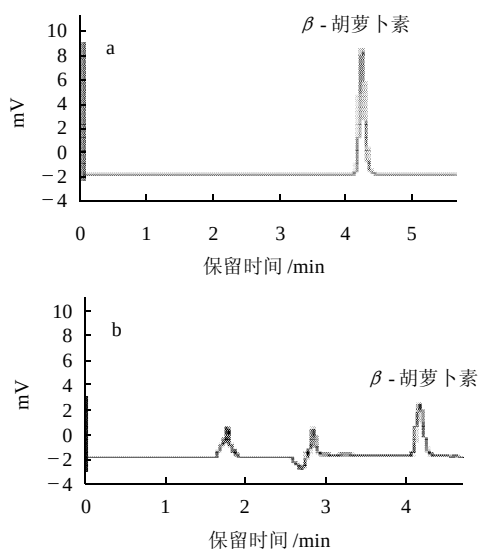
水平	因素			
	A pH	B 脱氧胆酸钠浓度/(mmol/L)	C d - α -生育酚浓度/(mmol/L)	D Tween-40添加量/(g/100mL)
1	7.5	2.5	0.4	0.25
2	8.0	3.0	0.5	0.30
3	8.5	3.5	0.6	0.35

1.3.8 酶反应时间对 β -胡萝卜素转化率的影响

在最佳的优化条件下, 37℃水浴振荡反应1、3、5、7、9、11h后, 加入50 mL 37% 甲醛终止反应, 然后加入50 mg NaBH_4 粉末后, 混合物继续37℃水浴振荡反应10 min, 加入10 mL 氯仿萃取3次, 合并提取液, 吹干氯仿, 加甲醇定容至1 mL。取上清液20 μL 进行HPLC分析, 研究酶反应时间对转化率的影响。

2 结果与分析

2.1 红酵母产类胡萝卜素的分析



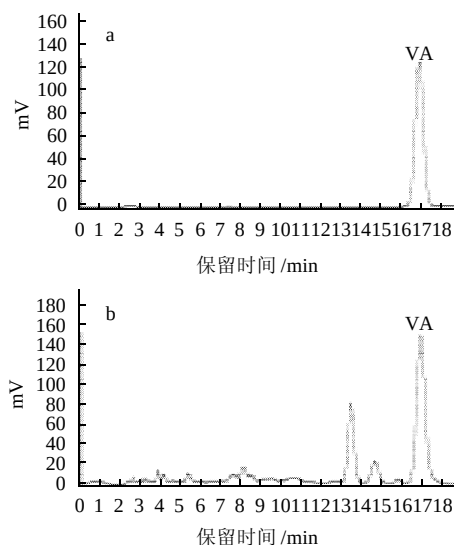
a. β -胡萝卜素标准品; b. 红酵母发酵浸提液。

图1 红酵母发酵浸提液中 β -胡萝卜素的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of β -carotene standard and sample

从图1a可以看出, β -胡萝卜素标准品保留时间为4.197 min。从图1b可以看出, 红酵母发酵提取液在相同实验条件下, HPLC色谱图存在3个色谱峰, 其中保留时间为4.191 min的峰, 这与 β -胡萝卜素标准品所出色谱峰保留时间相近, 可确定红酵母色素中含有 β -胡萝卜素。另外两个色谱峰, 据报道, 可能是其他类胡萝卜素(圆酵母素和红酵母红素)在相同条件下的色谱峰^[6]。

2.2 β -胡萝卜素体外转化分析



a. VA标准品; b. 转化反应后的发酵提取液。

图2 VA测定的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of vitamin A standard and sample

从图2a可以看出, 在实验条件下, VA标准品在16.932 min出峰。从转化后样品HPLC色谱图(图2b)可以看出, 在相同实验条件下, β -胡萝卜素体外转化色谱图中有一色谱峰保留时间为16.928 min, 与VA标准品所出色谱峰保留时间相近, 可确定通过体外转化, 转化产物中有相当含量的视黄醇。同时可以看出, 色谱图中还存在有其他色谱峰, 这可能是 β -阿朴-胡萝卜醛、视黄醇酯、视黄醛和视黄酸等物质所出的峰。

2.3 pH值对 β -胡萝卜素转化率的影响

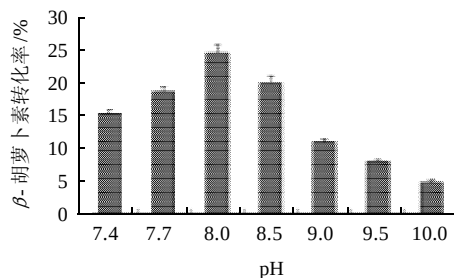


图3 pH值对 β -胡萝卜素转化率的影响

Fig.3 Effects of pH of on conversion rate of β -carotene

β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶的最适 pH 值范围是 7.5~9.0^[7-12]。在本研究中, pH 值对 β -胡萝卜素转化率的影响结果见图 3。pH 值为 8.0 时, β -胡萝卜素的转化率最高, 与上述研究结果相符。

2.4 脱氧胆酸钠浓度对 β -胡萝卜素转化率的影响

Olson 等^[13]的研究表明在无胆汁存在的情况下, β -胡萝卜素既不能被吸收也不能发生断裂, 说明胆汁不仅具有助溶作用, 而且参与 β -胡萝卜素吸收和转化, 并且对胆盐的需求没有特别的专一性。Goodman 等^[14]报道了在将 β -胡萝卜素转化为视黄醛的过程中, 必须要有胆酸盐的作用, 而 6mmol/L 甘氨酸胆酸钠、6mmol/L 胆酸钠、3mmol/L 脱氧胆酸钠对 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶的作用相似。Swenson^[15]报道了肉食动物和牛肠道内的胆盐主要是牛磺胆酸盐, 草食动物(除牛外)主要是甘氨酸胆酸盐, 禽类主要是鹅脱氧胆酸盐。宋建婷等^[16]通过体外实验研究发现在相同的浓度下(4mmol/L), 牛磺胆酸钠、胆酸对 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶的作用相似, 而脱氧胆酸钠对 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶的促进作用高于前两者。本实验条件下, 脱氧胆酸钠对转化反应的影响见图 4。当脱氧胆酸钠含量为 3mmol/L 时, β -胡萝卜素的转化率最高。

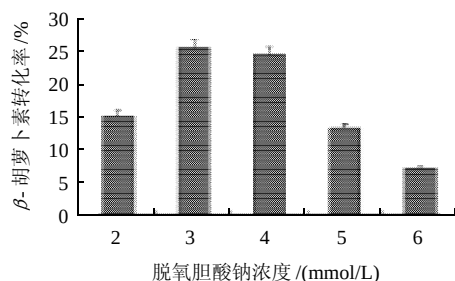


图 4 脱氧胆酸钠浓度对 β -胡萝卜素转化率的影响

Fig.4 Effects of deoxycholate concentration on conversion rate of β -carotene

2.5 d - α -生育酚浓度对 β -胡萝卜素转化率的影响

有报道表明生育酚可能阻止 β -胡萝卜素的偏心裂解^[17], 另有报道称生育酚可促进 β -胡萝卜素的中心裂解产生更多的视黄醇^[18]。Wang 等^[19]通过体内实验研究表明按生理剂量添加生育酚能将 β -胡萝卜素的转化率提高 4 倍, 按药理剂量添加则提高 12~21 倍。本实验条件下, d - α -生育酚对转化反应的影响见图 5。随着 d - α -生育酚的加入, β -胡萝卜素的转化率在增加, 当 d - α -生育酚添加量为 0.5mmol/L 时, β -胡萝卜素的转化率最高。

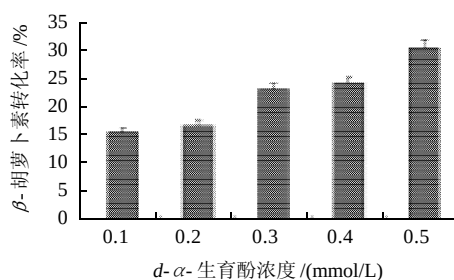


图 5 d - α -生育酚对 β -胡萝卜素转化率的影响

Fig.5 Effects of d - α -tocopherol concentration on conversion rate of β -carotene

2.6 Tween-40 添加量对 β -胡萝卜素转化率的影响

类胡萝卜素具有疏水性, Tween-40 有利于类胡萝卜素的溶解^[20]。周光宏等^[21]研究 Tween-20 对类胡萝卜素吸收的影响, 提出了类胡萝卜素的被动吸收机制, 即肠道内环境控制类胡萝卜素吸收的假说。刘清等^[22]研究发现, Tween-20 对 β -胡萝卜素的吸收有抑制作用, 随 Tween-20 体积分数的增加(除体积分数为 0.3% 外), 细胞对同一浓度 β -胡萝卜素的吸收量、吸收率均呈下降趋势。Yeong 等^[23]发现当 β -胡萝卜素含量为 200mg/L 时, 添加 5g/100mL 的 Tween-40, 有利于视黄醛的生成。本实验条件下, Tween-40 对转化反应的影响见图 6。当加入 0.3g/100mL Tween-40 时, β -胡萝卜素的转化率最高。

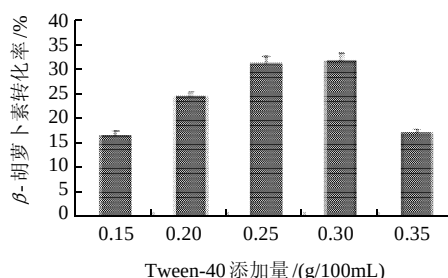


图 6 Tween-40 添加量对 β -胡萝卜素转化率的影响

Fig.6 Effects of Tween-40 concentration in conversion rate of β -carotene

2.7 正交试验优化及其验证实验

β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶的酶比活力越高, β -胡萝卜素的转化率越高。由表 2 的极差分析可知, 对 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶的活性影响最大的是 pH 值, 其次是脱氧胆酸钠浓度和 Tween-40 添加量, d - α -生育酚浓度对酶比活力的影响最小; 最优条件为 pH8.0、3.5mmol/L 脱氧胆酸钠、0.5mmol/L d - α -生育酚和 0.25g/100mL Tween-40。理论酶比活力为 2.59nmol/(mg·h), 按该优化条件进行验证实验, 测得酶比活力为 2.58nmol/(mg·h), 所得实测值与理论值相近。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果及分析
Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal array design matrix and results

试验号	因素				酶比活力/ (nmol/(mg·h))
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.04
2	1	2	2	2	1.56
3	1	3	3	3	2.12
4	2	1	2	3	2.53
5	2	2	3	1	2.23
6	2	3	1	2	2.18
7	3	1	3	2	2.01
8	3	2	1	3	1.95
9	3	3	2	1	2.40
K_1	5.72	6.58	6.17	6.67	
K_2	6.94	5.74	6.49	5.75	
K_3	6.36	6.70	6.36	6.60	$A_2B_3C_2D_1$
R	1.22	0.96	0.32	0.92	$R_A > R_B > R_D > R_C$

2.8 酶反应时间对 β -胡萝卜素转化率的影响

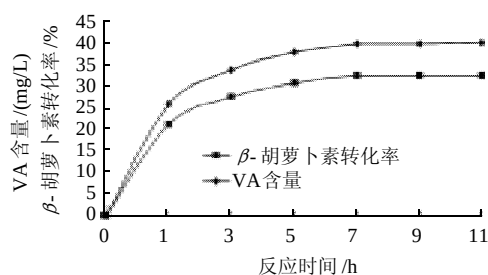


图7 酶反应时间对 β -胡萝卜素转化率的影响

Fig.7 Time course of retinol production by β -carotene 15,15'-monooxygenase

由图7可知,随着酶反应时间增加,生成的VA含量增加,当酶反应时间为7h时,VA的含量可达40.1mg/L, β -胡萝卜素转化率达到32.6%。反应7h后,VA的含量变化趋于稳定。

3 结论

红酵母经液态发酵所产色素中含有 β -胡萝卜素,该色素可体外转化为VA。理论上,一分子 β -胡萝卜素经 β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶催化,可中心裂解成两分子视黄醛,然后再被还原为VA,其最大转化率为106.7%。本实验通过对转化条件中pH值,表面活性剂浓度和酶反应时间等的优化研究,在 β -胡萝卜素质量浓度123mg/L的浓缩液中,最佳转化条件为pH8.0、3.5mmol/L脱氧胆酸钠、0.5mmol/L d - α -生育酚和0.25g/100mL Tween-40,于2.58nmol/(mg·h) β -胡萝卜素-15,15'-单加氧酶作用下37℃水浴振荡反应7h,此时最大转化率可达32.6%,与相关报道相符^[14]。Yeong等^[12]报道含有一个不可替代的 β -紫罗酮环且分子质量大于C₃₀的类胡萝卜素亦可进行裂解产生视黄醛,本研

究中红酵母所产的其他色素,可能是圆酵母素和红酵母红素,应可发生裂解产生视黄醛,并进一步被还原为视黄醇,有待于深入研究确定。

参考文献:

- [1] NAGAO A, OLSON J A. Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-trans retinals from isomers of β -carotene[J]. FASEB J, 1994, 8: 968-973.
- [2] 刘绍. 食品分析与检验[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2011: 206-207; 209-210.
- [3] 宋建婷, 高峰, 周光宏. 日粮VA和油脂对肉鸡 β -胡萝卜素-15及15'-加双氧酶活性的影响[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(2): 25-28.
- [4] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [5] DURING A, NAGAO A, HOSHINO C, et al. Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1996, 241(2): 199-205.
- [6] 张坤生. 利用红酵母发酵生产类胡萝卜素及其功能性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2004.
- [7] FIDGE N, SMITH F, GOODMAN D. Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of beta-carotene into retinal in hog intestinal mucosa [J]. Biochem J, 1969, 114(4): 689-694.
- [8] LAKSHMANAN M, CHANSANG H, OLSON J. Purification and properties of carotene 15,15'-dioxygenase of rabbit intestine[J]. J Lipid Res, 1972, 13(4): 477-482.
- [9] NAGAO A, DURING A, HOSHINO C, et al. Stoichiometric conversion of all *trans*-beta-carotene to retinal by pig intestinal extract[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 328(1): 57-63.
- [10] REDMOND T, GENTLEMAN S, DUNCAN T, et al. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase [J]. J Biol Chem, 2001, 276(9): 6560-6565.
- [11] LINDQVIST A, ANDERSSON S. Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(26): 23942-23948.
- [12] YEONG S K, DEOK K O. Substrate specificity of a recombinant chicken β -carotene 15,15'-monooxygenase that converts β -carotene into retinal [J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(3): 403-408.
- [13] OLSON J, HAYAISHI O. The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1965, 54(5): 1364-1370.
- [14] GOODMAN D S, HUANG H S. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes[J]. Science, 1965, 149: 879-880.
- [15] SWENSON M J. Duke's physiology of domestic animals[M]. 8th ed. New York: Vail-Ballou Press, 1970.
- [16] 宋建婷, 周光宏, 高峰. 胆酸盐、游离脂肪酸、黄体素对 β -胡萝卜素-15,15'-加双氧酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 70-73.
- [17] WANG X D, TANG G, FOX J G, et al. Enzymatic conversion of β -carotene into β -apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues[J]. Arch Biochem Biophys, 1991, 285(1): 8-16.
- [18] OLSON J A. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin A[J]. J Nutr, 1989, 119(1): 105-108.
- [19] WANG X D, MARINI R P, HEBUTERNE X, et al. Vitamin E enhances the lymphatic transport of β -carotene and its conversion to vitamin A in the ferret[J]. Gastroenterology, 1995, 108(3): 719-726.
- [20] WYSS A, WIRTZ G M, WOGGON W D, et al. Expression pattern and localization of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues [J]. Biochem J, 2001, 354(Pt 3): 521-529.
- [21] 周光宏, TUME R K, LARSON T W. 离体牛小肠细胞对 β -胡萝卜素和黄体素吸收的研究[J]. 动物营养学报, 1996, 8(4): 15-18.
- [22] 刘清, 周光宏. 离体小肠黏膜细胞对类胡萝卜素的吸收[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(4): 54-59.
- [23] YEONG S K, NAM H K, HYE J, et al. Effective production of retinal from β -carotene using recombinant mouse β -carotene 15,15'-monooxygenase [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(6): 1339-1345.