

细菌类胡萝卜素裂解酶酶解虾青素工艺优化

朱明明¹, 贺 静¹, 樊明涛^{1,*}, 王树林²

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2.青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘 要:目的: 从巴氏葡萄球菌发酵液中分离纯化可降解类胡萝卜素产香的酶, 优化其降解虾青素的反应, 为后续鉴定产物提供依据。方法: 利用高效液相色谱分析产物产量变化, 应用正交试验设计, 采用DPS软件进行二次多项式逐步回归分析, 优化虾青素酶解反应条件。结果: 类胡萝卜素裂解酶具有催化虾青素降解的活性。反应pH值、反应时间、反应温度及其交互作用对产物产量均有极显著影响($P < 0.01$), 反应pH值和反应时间的交互作用对产物产量影响最大, 其通径系数为12.726 9。利用二次多项式逐步回归得到虾青素酶解的最佳反应条件: 反应pH 4.5、反应时间7 min、反应温度50 ℃, 在此条件下虾青素产物的产量总和可达到定义条件下的1.75倍。结论: 该类胡萝卜素裂解酶对虾青素降解具有很强的催化活性, 得到了产物达到最大产量时的最优条件。

关键词: 类胡萝卜素裂解酶; 虾青素; 产物产量; 二次多项式逐步回归

Optimization of Conditions for Astaxanthin Cleavage by a Bacterial Carotenoid Cleavage Enzyme

ZHU Mingming¹, HE Jing¹, FAN Mingtao^{1,*}, WANG Shulin²

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
2. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: Objective: This work aimed to optimize the conditions for the degradation of astaxanthin by a purified carotenoid cleavage enzyme from *Staphylococcus pasteurii*. Methods: The degradation products were measured by HPLC. Orthogonal arrays design combined with quadratic polynomial stepwise regression analysis was applied to optimize the conditions for astaxanthin degradation. Results: The HPLC analysis showed that this carotenoid cleavage enzyme had the ability to degrade astaxanthin. pH, time, temperature and their interactions had significant effects on the contents of degradation products ($P < 0.01$). The interaction between pH and time showed the most significant contribution to the contents of degradation products under the optimized conditions with a value of direct path coefficient of 12.726 9. The optimal reaction conditions were determined as follows: pH 4.5, and incubation at 50 ℃ for 7 min. Under these conditions, the total yield of degradation products was 1.75 times higher than the defined apocarotenoids yield. Conclusion: This carotenoid cleavage enzyme has a high ability to cleave astaxanthin. The optimal conditions for maximum yield of products have been obtained.

Key words: a carotenoid cleavage enzyme; astaxanthin; yield of apocarotenoids; quadratic polynomial stepwise regression analysis

中图分类号: Q556

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 08-0001-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201508001

类胡萝卜素是一类在自然界中广泛存在的、由8个异戊二烯单元相连、并且分子两端各含有一个不饱和己烯环的一类四萜化合物的总称, 其中包括环化的或无环的胡萝卜素, 以及含有氧原子的胡萝卜醇等^[1-4]。虾青素是一种红色天然类胡萝卜素, 广泛存在于鲑鱼、虾、蟹、观赏鱼和鱼卵中以及植物叶、花和水果中^[5-7]。虾青素不仅具有着色功能^[8-9]和抗氧化性^[10-11], 也可氧化裂解产生香气物质。虾青素的降解方法同类胡萝卜素的降解方法, 有物理降解(包括高温氧化裂解、热降解和光

氧化降解等)、化学氧化降解和生物氧化(主要是酶催化降解)等^[12-14]。经过降解, 可以生成如氧化异佛尔酮、 β -大马酮、 β -紫罗兰酮类等 C_{13} 化合物, 这些化合物因为感官阈值较低而成为评价食品质量的重要指标^[15-18]。由于微生物酶对虾青素(类胡萝卜素)降解有高度选择性^[19-20], 降解产物大多为具有香气的降异戊二烯化合物, 所以, 最近几年在国际上颇受关注, 已逐渐成为替代其理化降解的主要方法。

在改善沙棘酒香气品质的研究中, 首次从沙棘汁

收稿日期: 2014-06-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31171728); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31060225)

作者简介: 朱明明(1989—), 女, 博士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: happyzhumingming@126.com

*通信作者: 樊明涛(1963—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品微生物及食品安全研究。E-mail: fanmt@nwsuaf.edu.cn

分离得到一株具有可降解类胡萝卜素特性的细菌(经鉴定为巴氏葡萄球菌)^[21];对该细菌产生的类胡萝卜素裂解酶^[22-23]进行分离纯化并对其基本酶学性质进行研究。为进一步了解该类胡萝卜素裂解酶的底物特异性,了解其对不同类胡萝卜素底物的作用位点,需对降解中间产物进行研究^[24]。由于酶解的中间产物极不稳定,容易受时间、pH值和温度影响而发生降解产生香气物质,因此为了得到中间产物最大产物量进行后续研究和分析,本实验以虾青素为底物,通过二次多项式逐步回归^[25-26]对该类胡萝卜素裂解酶降解虾青素的产物进行优化,获得最大产物量,并进行高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)分析,以期为研究底物特异性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验室分离保存的巴氏葡萄球菌菌株TS-82。

虾青素标准品(纯度98%) 美国Sigma-Aldrich试剂公司;甲醇(色谱纯) 美国Tedia公司;甲基叔丁基醚(色谱纯) 上海Aladdin试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

HH恒温水浴锅 北京科伟永兴仪器有限公司;HC-3018R高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;LC-20A高效液相色谱 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 类胡萝卜素裂解酶纯酶的制备

在37℃、130 r/min条件下,将TS-82在改良查氏培养基^[22]中培养12 h。将所得发酵液在4℃、10 000 r/min离心10 min,取上清液即为粗酶液。粗酶液经过冷冻干燥浓缩后依次上样于Mono Q10/100柱,高效制备液相色谱和Superdex peptide 10/300多肽分子筛对其进行分离纯化,得到单一的类胡萝卜素裂解酶纯酶。

1.3.2 虾青素标准品储备液的配制

实验中以虾青素标准品为底物。将5 mg虾青素和1 g吐温-80溶于20 mL的二氯甲烷溶液中,避光条件下,在通风橱中不断振荡直至二氯甲烷挥发干净,加入52 mL无菌蒸馏水混匀,得橘黄色、清澈的储备液,放置在4℃冰箱中待用。该储备液浓度为160 μmol/L。

1.3.3 体外虾青素酶解

将15 μg的纯酶与280 μmol的底物混合,用蒸馏水定容至2 mL,在反应温度30℃,pH 5.0条件下反应30 min,加入2倍体积的丙酮溶液终止反应^[19]。接着向反应物中加入2倍体积的正己烷溶液,混合均匀,放置

5 min后,5 000×g离心5 min,取上清液即提取出虾青素及其酶解产物。将上清液在真空离心机中旋转干燥,得到的残余物溶解于2 mL丙酮溶液中,置于4℃条件下保存,用于HPLC分析。

1.3.4 虾青素酶解的单因素试验

体外实验中均采用280 μmol底物和15 μg纯酶进行酶解反应,反应体积2 mL。根据预实验结果和参考文献^[24],选取了反应时间、反应pH值和反应温度为考察因素进行酶解反应。该类胡萝卜素裂解酶的最适反应温度为60℃,最适反应pH值为3.0、由于反应温度过高或反应pH值过低时,中间产物都极其容易降解,故设定如下考察范围:设定反应温度30℃、反应pH 5.0,考察反应时间0、15、30、45、60 min对虾青素中间产物相对含量的影响,以反应15 min时得到的2个产物的总相对含量为100%;设定反应温度30℃、反应时间15 min,考察反应pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0对虾青素中间产物相对含量的影响,以pH 5.0条件下获得的2个产物的总相对含量为100%;设定反应pH 5.0、反应时间30 min,考察反应温度30、40、50、60、70℃对虾青素中间产物相对含量的影响,以反应温度30℃条件下得到的2个产物的总相对含量为100%。按照1.3.3节方法终止反应并提取虾青素和酶解产物。

1.3.5 虾青素酶解的正交试验设计

在单因素试验结果的基础上,采用正交试验设计方法安排虾青素酶解产物条件优化的试验,其因素水平具体见表1,通过考察虾青素酶解产物的相对含量确定最佳的反应条件。

表1 正交试验设计因素与水平表

Table 1 Factors and their coded levels used in orthogonal array design

水平	因素		
	X_1 反应pH	X_2 反应时间/min	X_3 反应温度/℃
1	4.5	7	30
2	5.0	15	40
3	5.5	22	50

1.3.6 虾青素酶解反应的测定

1.3.6.1 色谱条件

采用HPLC法^[19]测定底物的降解和产物的生成。色谱柱: C₁₈反相柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相A: 甲醇-水-甲基叔丁基醚体积比30:10:1, 流动相B: 甲醇和甲基叔丁基醚等体积混合, 采用梯度洗脱, 梯度洗脱程序: 0~30 min, 0%~100%B, 30~35 min, 100%B, 35~36 min, 100%~0%B, 36~51 min, 0%B; 柱温30℃; 流速1.0 mL/min; 进样量20 μL; 检测器: 二极管阵列检测器; 检测波长460 nm。

1.3.6.2 虾青素标准曲线的绘制及含量测定

将虾青素储备液分别稀释至40、80、120 μmol/L和

160 $\mu\text{mol/L}$, 以蒸馏水做空白, 按照1.3.3节提取方法提取虾青素, 根据1.3.6.1节色谱条件得到不同底物浓度的峰面积, 用所得数据作图可得虾青素溶液浓度与峰面积的线性关系。

1.3.6.3 底物转化率

将15 μg 纯酶与280 μmol 底物混合, 用蒸馏水定容至2 mL, 反应30 min, 测定30 min内虾青素的降解量。底物转化率定义为在上述条件下每分钟底物的降解量, 单位 $\mu\text{g/min}$ 。

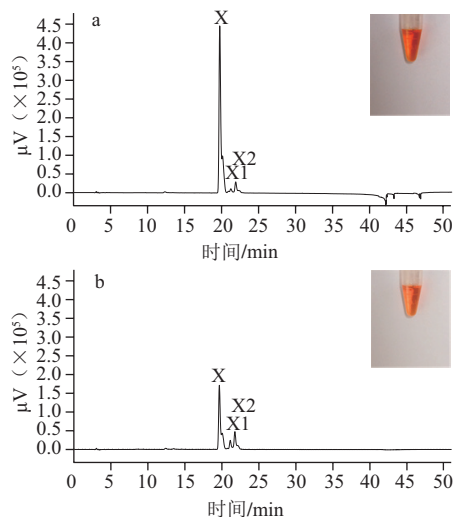
1.3.6.4 产物相对含量

通过检测波长460 nm条件下产物的峰面积可得到产物含量的变化。由于产物还未鉴定, 故采用相对含量表示。实验中选用2个产物的峰面积总和代表产量总和。在单因素试验基础上, 定义最优条件下得到的2个产物峰面积总和为100%, 其余条件获得的产物峰面积总和和换算为相对含量。

以上所有反应均为3次平行, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 虾青素酶解反应



a. 虾青素未酶解的液相色谱图及酶解液图(对照); b. 虾青素酶解反应的液相色谱图和酶解液图(pH 5.0、40 °C、30 min); X. 虾青素; X1、X2分别为生成产物1、2。

图1 虾青素酶解产物的液相色谱图

Fig.1 HPLC analysis of astaxanthin cleavage products by purified carotenoid cleavage enzyme *in vitro* assays

从图1可以看出, 类胡萝卜素裂解酶具有很强的催化活性, 反应30 min可看到颜色明显发生变化。图1a与图1b的结果相比可看出, 虾青素(X)含量明显降低, 表明类胡萝卜素裂解酶可以显著地催化降解虾青素标准品, 而在虾青素保留时间后的2个峰的含量明显增加, 即生成产物1和2(命名为X1和X2)。同时测定了产物

X1和X2在HPLC洗脱液中的最大吸收波长, 其波长分别是472 nm和466 nm。

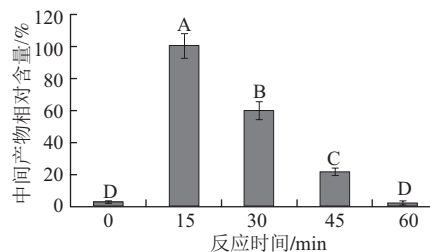
根据图1中虾青素含量的变化计算出30 min的转化率为51.12%。与该酶作用于其他底物的催化效率相比, 作用于虾青素的催化效率与角黄素(52.84%)的效率相当, 高于作用于 β -8'-胡萝卜醛(22.73%)和 β -胡萝卜素(40.4%), 但低于作用于玉米黄质(71.78%)的催化效率^[24], 这与Hoffmann等^[19]发现的类胡萝卜裂解酶对虾青素的催化效率远高于玉米黄质和角黄素的催化效率有一定的差异。对于该酶对玉米黄质具有较好的催化活性的机理有待于进一步研究。

2.2 虾青素标准曲线的建立

以波长460 nm处得到的虾青素标准品峰面积为横坐标, 虾青素标准品的浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行回归分析。得回归方程: $y=0.02x-3.827$ ($R^2=0.985$), 式中: x 为虾青素的峰面积; y 为虾青素浓度/ $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 单因素试验结果

2.3.1 反应时间对中间产物X1和X2相对含量的影响



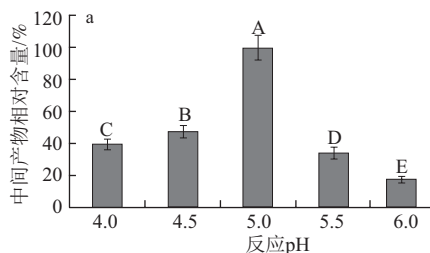
柱形上不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

图2 反应时间对虾青素酶解中间产物相对含量的影响

Fig.2 Effects of incubation time on the relative content of apocarotenoids

由图2可看出, 反应时间对中间产物相对含量有极显著影响($P<0.01$)。反应初期随着反应时间的延长, 虾青素中间产物相对含量增加, 这是因为酶催化虾青素降解产生中间产物。反应15 min时, 中间产物相对含量最高。随着时间的延长, 中间产物相对含量开始下降。这可能因为随着时间的延长, 中间产物自身不稳定, 发生降解, 因此反应时间选择15 min为宜。

2.3.2 反应pH值对中间产物X1和X2相对含量的影响



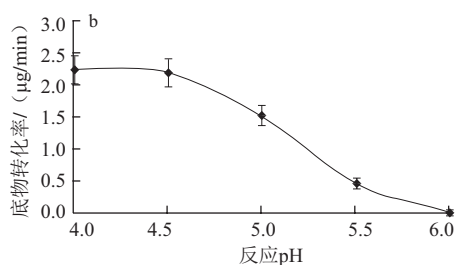


图3 反应pH值对虾青素酶解产物含量(a)、虾青素转化率(b)的影响
Fig.3 Effects of pH on the relative content of apocarotenoids and the conversion efficiency of astaxanthin

如图3a所示,反应pH值对中间产物相对含量的变化有极显著影响($P<0.01$),反应pH值为5.0时,中间产物相对含量最高。pH值大于5.0后中间产物相对含量明显降低,这与pH值过高,酶活性受到抑制导致虾青素转化率降低相关。而pH值小于5.0时中间产物相对含量也出现明显降低,分析其原因可能是由于中间产物易受pH值影响,在酸性条件下不稳定,发生降解。同时考察不同pH值对虾青素酶解转化率的影响,结果见图3b。随着pH值的升高,虾青素转化率逐步降低,这与该酶在酸性环境中的催化作用较强一致。当pH值达到6.0时,虾青素转化率几乎为0,这是因为该类胡萝卜素裂解酶的最适反应pH值为3.0,而在pH值达到6.0时几乎完全失活造成的。

由于底物转化率只与类胡萝卜素裂解酶活性相关,而中间产物不仅受酶活影响,所处环境条件对其稳定性也有显著性影响,在酸性条件下很不稳定,极其容易降解^[24]。虽然催化活性高,底物含量大大减少,但中间产物一方面在酸性条件下不稳定,另一方面酶活性变高,而时间还是15 min时,中间产物已发生降解,两方面导致产量也大大减少,转化为具有香气物质的终产物,因此并不是转化率越高,中间产物相对含量越高,故从得到中间产物的最大相对含量考虑,反应pH值选择5.0。

2.3.3 反应温度对中间产物X1和X2相对含量的影响

由图4a看出,反应温度对中间产物相对含量变化有极显著影响($P<0.01$)。反应温度30℃时,中间产物相对含量最高。随着温度的升高,中间产物相对含量显著降低,这是因为中间产物极其不稳定,温度越高,其自身降解越快。而在温度低于30℃时,由于酶的活性受到抑制,导致催化效率低,致使中间产物相对含量较低。同时考察不同温度对虾青素酶解转化率的影响,结果见图4b。反应温度在30~60℃时虾青素转化率升高较快,而后随着温度上升,转化率几乎不变,在温度高于70℃后虾青素转化率降低,这可能因为虽然随着反应温度的升高,酶的活性增加,催化虾青素快速降解,但温度过高破坏了酶的结构,使酶失活,从而影响虾青素的降解。

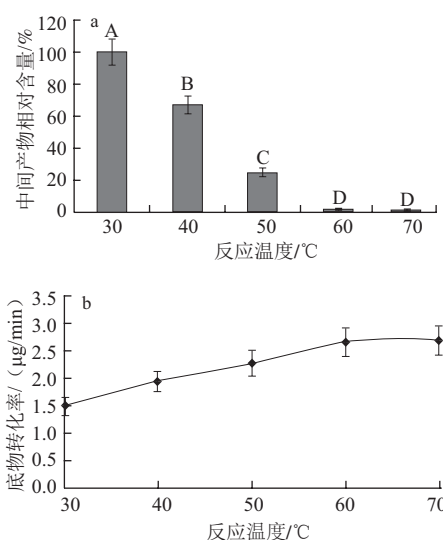


图4 反应温度对虾青素酶解产物含量(a)、虾青素转化率(b)的影响
Fig.4 Effects of temperature on the relative content of apocarotenoids and the conversion efficiency of astaxanthin

由于底物转化率只与类胡萝卜素裂解酶活性相关,而中间产物不仅受酶活影响,所处环境条件对其稳定性也有显著影响,一方面在高温条件下很不稳定,极其容易降解^[24],另一方面酶活性变高,底物转化率升高,但依旧15 min时中间产物已发生降解,因此并不是转化率越高,中间产物相对含量越高,即从酶的活性和中间产物稳定性两方面考虑,选择反应温度为30℃。

2.4 正交试验及二次多项式逐步回归分析

2.4.1 二次多项式回归方程的建立

表2 正交试验设计结果与分析
Table 2 Results and analysis of orthogonal array design

试验号	因素			中间产物相对含量/%		
	X_1 反应pH	X_2 反应时间/min	X_3 反应温度/℃	Y_1	Y_2	Y_3
1	4.5	7	30	123.006 2	120.112	120.007 6
2	4.5	15	40	61.435 07	58.454 42	60.509 70
3	4.5	22	50	24.419 70	23.221 3	25.889 12
4	5.0	22	30	100.000 0	106.224 4	105.334 2
5	5.0	7	40	41.916 85	46.912 35	43.838 40
6	5.0	15	50	161.558 9	146.289 7	157.278 6
7	5.5	15	30	42.633 81	43.223 31	44.200 0
8	5.5	22	40	50.924 57	55.980 0	54.787 90
9	5.5	7	50	41.568 85	45.544 89	48.252 87

通过单因素试验分别考察了反应pH值、反应时间和反应温度对中间产物相对含量的影响后,选用正交试验探讨这3个因素对中间产物相对含量的影响,结果见表2。

对正交试验结果进行二次多项式逐步回归分析,由DPS数据处理系统拟合得出数学模型的回归方程:

$$Y = -1\ 064.22 + 1\ 030.33X_1 - 42.74X_2 - 51.44X_3 - 125.63X_1X_1 - 0.16X_2X_2 + 0.70X_3X_3 + 10.90X_1X_2 - 0.15X_2X_3$$

(式中: Y 是2个中间产物相对含量总和; 此时定义反应时间30 min、pH 5.0、温度30 °C条件下的相对含量为100%)。

同时得到二次多项式逐步回归方程的相关统计学指标: 相关系数 $R=0.997\ 7$ 、 $F=490.501\ 3$ 、 $P=0.000\ 1$, 调整后的相关系数 $R_a=0.996\ 7$, 剩余标准差 $s=3.426\ 1$, Durbin-Watson统计量 $d=1.945\ 206\ 93$ 。由以上回归方程统计学指标可以看出, 回归方程能够正确反映各因素与中间产物相对含量之间的关系, 可靠性较高, 同时因为 $R>R_a$, Y 回归效果显著。

2.4.2 反应pH值、反应时间、反应温度及其交互作用对中间产物相对含量的影响

表3 优化条件下各因素与中间产物相对含量的直接途径系数
Table 3 Direct path coefficients between main factors and the yield of apocarotenoids under optimized reaction conditions

因素	X_1	X_2	X_3	X_1^2	X_2^2	X_3^2	X_1X_2	X_2X_3
直接途径系数**	10.160 8	-9.843 5	-10.145 6	-12.397 4	-1.425 6	11.116 2	12.726 9	-1.550 2

注: 利用 F 检验计算显著性; **.差异极显著 ($P<0.01$)。

从各影响因素的方程回归系数来看, 反应pH值、反应时间和反应温度与中间产物相对含量的相关性与单因素试验结果一致, 而反应pH值和反应时间的交互作用与中间产物相对含量呈正相关关系, 反应时间和反应温度的交互作用与中间产物相对含量呈负相关关系。

在回归方程条件下, 各因素与中间产物相对含量的直接途径系数见表3。各因素对中间产物相对含量的相对重要性按直接途径系数(绝对值)从大到小排序依次是 X_1X_2 、 X_1 、 X_3 、 X_2 、 X_2X_3 (X_1 与 X_1^2 合并, X_3 与 X_3^2 合并, X_2 与 X_2^2 合并), 即反应pH值和反应时间的交互作用 (X_1X_2) 对中间产物相对含量的影响较大, 而反应时间和反应温度的交互作用 (X_2X_3) 对其影响较小。

2.4.3 验证实验结果

回归方程最终得到最高指标时各个因素组合为 $Y=194.844\ 6$ 、 $X_1=4.5$ 、 $X_2=7$ 、 $X_3=50$, 即反应pH值为4.5、反应时间7 min、反应温度50 °C, 在此条件下的中间产物相对含量为定义条件下的2倍。为检验预测结果的可靠性, 采用上述优化酶解反应条件进行虾青素酶解反应, 3次平行实验得到的实际中间产物相对含量为定义条件下的1.75倍, 与最优理论值相近, 比9组试验数据都高, 说明此优化结果对实验指导有一定的价值。

3 结论

巴氏葡萄球菌菌株TS-82分离纯化得到的类胡萝卜素裂解酶具有催化虾青素降解产香的功能, 其中间产物 X_1 和 X_2 可通过HPLC检测到, 最大吸收波长分别是472 nm和466 nm。反应pH值、反应时间、反应温度及其交互作用对中间产物相对含量均有极显著作用 ($P<0.01$), 在优化条件下, 反应pH值和反应时间的交互作用对中间产

物相对含量影响最大, 其途径系数为12.726 9。二次多项式逐步回归优化虾青素酶解的最佳工艺条件为反应pH值4.5、反应时间7 min、反应温度50 °C, 按此条件, 虾青素中间产物相对含量可达到定义条件下的1.75倍。该方法可以提高产物含量, 节省时间, 为进一步研究产物结构和该酶的催化机理提供依据。

参考文献:

- [1] NELIS H J, de LEENHEER A P. Microbial production of carotenoids used in foods and feeds[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1991, 70(3): 181-191.
- [2] 李福枝, 刘飞, 曾晓希, 等. 天然类胡萝卜素的研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, 28(9): 227-232.
- [3] OHMIYA A, KISHIMOTO S, AIDA R, et al. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals[J]. Plant Physiology, 2006, 142(3): 1193-1201.
- [4] WACHE Y, RATULD A B, BELIN J M. Dispersion of β -carotene in processes of production of β -ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive oxygen species[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(11): 2337-2341.
- [5] 魏东, 严小君. 天然虾青素的超级抗氧化活性及其应用[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(4): 45-50.
- [6] NAGUIB Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(4): 1150-1154.
- [7] JOHNSON E A, AN G H. Astaxanthin from microbial sources[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1991, 11(4): 297-326.
- [8] CHOUBERT G, BACCAUNAUD M. Colour changes of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) fed astaxanthin or canthaxanthin during storage under controlled or modified atmosphere[J]. LWT-Food Science and Technology, 2006, 39(10): 1203-1213.
- [9] 陶正国, 邱金媚, 陈小兵. 虾青素对虹鳟着色及其生产性能影响[C]/中国畜牧兽医学会饲料经济专业委员会第六届学术交流会. 北京: 中国饲料工业协会, 2009: 147-149.
- [10] PAN C H, CHIEN Y H, WANG Y J, et al. Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids[J]. Aquaculture Nutrition, 2011, 17(3): 258-266.
- [11] 曹秀明, 高越, 徐德林. 虾青素保护活性氧所致线粒体损伤的作用[J]. 食品与药品, 2011, 12(11): 412-414.
- [12] KANEKO H, HARADA M. 4-Hydroxy- β -damascone and 4-hydroxy-dihydro- β -damascone from cigar tobacco[J]. Agricultural Biology Chemistry, 1972, 36(1): 168-171.
- [13] 杨伟祖, 谢刚, 王宝兴, 等. 烟草中 β -胡萝卜素的热裂解产物的研究[J]. 色谱, 2006, 24(6): 611-614.
- [14] 刘晓庚. 类胡萝卜素的氧化降解及其对面粉品质的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 457-460.
- [15] 王树林, 樊明涛. 青海沙棘干酒与冰酒香气成分的分析及比较[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 120-125.
- [16] 刘维涓. 胡萝卜素降解反应研究进展[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(3): 122-126.
- [17] UENOJO M, PASTORE G M. β -Carotene biotransformation to obtain aroma compounds[J]. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, 30(3): 822-827.
- [18] 詹军, 刘冲, 贺帆, 等. 不同香型烟类胡萝卜素降解香气物质与呼吸质量分析[J]. 西南农业学报, 2011, 24(6): 2137-2142.
- [19] HOFFMANN J, BONA-LOVASZ J, BEUTTLER H, et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the carotenoid cleavage oxygenases from *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 and *Plesiocystis pacifica* SIR-1 revealed their substrate specificities and non-retinal-forming cleavage activities[J]. Febs Journal, 2012, 279(20): 3911-3924.
- [20] MARASCO E K, VAY K, SCHMIDT-DANNERT C. Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with different cleavage activities[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(42): 31583-31593.
- [21] WANG S L, FAN M T. 沙棘源微生物降解类 β -胡萝卜素芳香成分的研究[C]/第五届国际沙棘协会大会. 西宁: 国际沙棘协会, 2011: 70.
- [22] 麻俊侠, 樊明涛, 王树林, 等. β -胡萝卜素降解葡萄球菌化学合成培养基营养的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 137-141.
- [23] 贺静, 朱明明, 王树林, 等. 降解 β -胡萝卜素葡萄球菌的化学合成培养基研究[J]. 天津农业科学, 2014, 20(1): 5-9.
- [24] ZHU M M, HE J, WANG S L, et al. *In vitro* study on the carotenoid cleavage enzyme from *Staphylococcus pasteurii* cleaving different substrates[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2014, 2(7): 411-418.
- [25] 陈林, 杨蕾, 王艺璇, 等. 二次多项式逐步回归在狭叶仙鹤藜生长研究中的应用[J]. 昆明学院学报, 2012, 34(3): 37-40.
- [26] 关海宁. 二次逐步回归优化超声酶法提取大豆多糖工艺[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 53-55.