

雨生红球藻与巴斯德毕赤酵母来源虾青素的鉴别对比研究及安全性评估

赵然^{*} 李梅 仲林强 李玲

云南博欣生物科技股份有限公司, 中国·云南 曲靖 655000

摘要: 目的: 探讨雨生红球藻与巴斯德毕赤酵母来源虾青素的鉴别方法不同来源虾青素的安全性的评估。方法: 将雨生红球藻来源 (HP-AO) 巴斯德毕赤酵母来源 (KP-AO) 及二者混合 (HP-AO:KP-AO=7:3) 虾青素油样品进行成分分析, 做不同来源虾青素含量稳定性试验及根据法规进行安全性评估。其中包括水溶性、光学显微镜 200 倍观察、虾青素含量、叶绿素含量、薄层色谱分析、虾青素含量稳定性试验。结果: 检测结果显示 HP-AO 几乎不溶于水 KP-AO 及二者混合样品部分溶于水。HP-AO、KP-AO 及混合样品初始总虾青素含量分别为 10.28%、10.91%、10.38% 叶绿素含量分别为 0.79%、0.00%、0.49% 薄层色谱斑点 Rf 分别为 0.93、0.90、0.93 及 0.90。结论: HP-AO 与 KP-AO 水溶性具有显著差异。HP-AO 中游离虾青素占比显著低于 KP-AO 及混合样品。KP-AO 中未检出叶绿素。国内外法律法规要求雨生红球藻来源虾青素准用于食品 (婴幼儿除外) 而巴斯德毕赤酵母来源虾青素作为转基因产物仅限饲料及工业使用。

关键词: 雨生红球藻; 巴斯德毕赤酵母; 虾青素鉴别; 安全性

Identification, Comparative Study and Safety Assessment of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and *Pichia pastoris*

Zhao Ran^{*}, Li Mei, Zhong Linqiang, Li Ling

Yunnan Boxin Biotechnology Co., Ltd., China Yunnan Qujing 655000

Abstract: Objective: To investigate the identification methods of astaxanthin derived from *Haematococcus pluvialis* and *Pichia pastoris*, and to assess the safety of astaxanthin from different sources. Methods: Samples of astaxanthin oil from *Haematococcus pluvialis* (HP - AO), *Pichia pastoris* (KP - AO), and a mixture of the two (HP - AO:KP - AO = 7:3) were subjected to component analysis. Experiments on the stability of astaxanthin content from different sources were carried out, and safety evaluations were conducted in accordance with relevant regulations. These evaluations included assessments of water solubility, observation under an optical microscope at 200 - fold magnification, determination of astaxanthin content, chlorophyll content, thin - layer chromatography (TLC) analysis, and stability tests of astaxanthin content. Results: The test results indicated that HP - AO was nearly insoluble in water, while KP - AO and the mixed sample were partially soluble. The initial total astaxanthin contents of HP - AO, KP - AO, and the mixed sample were 10.28%, 10.91%, and 10.38% respectively, and the chlorophyll contents were 0.79%, 0.00%, and 0.49% respectively. The Rf values of the TLC spots were 0.93 for HP - AO, 0.90 for KP - AO, and 0.93 and 0.90 for the mixed sample. Conclusion: There were significant differences in water solubility between HP - AO and KP - AO. The proportion of free astaxanthin in HP - AO was significantly lower than that in KP - AO and the mixed sample. Chlorophyll was not detected in KP - AO. According to domestic and international laws and regulations, astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* is permitted for use in food (excluding infants and young children), while astaxanthin from *Pichia pastoris*, as a genetically modified product, is restricted to feed and industrial applications.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; *Pichia pastoris*; Astaxanthin identification; Safety

0 引言

虾青素是一种酮式类胡萝卜素具有较高的抗氧化活性^[1]。目前虾青素的获得途径主要分为三类包括天然生物

提取、微生物发酵以及化学合成。天然生物提取的天然虾青素主要由雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 培养获得广泛用于食品、保健品、化妆品、水产养殖以及医药研

发领域；微生物发酵途径除红发夫酵母外还包括基因工程改造的巴斯德毕赤酵母（*Komagataella phaffii*）、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）等进行发酵获得主要用于饲料添加。化学合成以 β -胡萝卜素为原料经羟基化和酮基化反应合成其产物为异构体混合物，抗氧化活性低于天然虾青素，主要用于饲料添加剂^[2]。雨生红球藻来源虾青素以高纯度左旋（3S, 3' S）全反式构型及酯化率高于 90% 为特征具有更高的热光稳定性及抗氧化活性但雨生红球藻培养周期约 3-5 个月投入成本较高；基因工程改造微生物发酵来源虾青素依赖基因工程产生的虾青素以游离态为主且稳定性较差但其生产周期仅 5-7 日成本优势明显^[3]。雨生红球藻来源的虾青素作为天然产物其生物特性、安全性等均与基因工程改造微生物发酵来源的转基因产物存在巨大差异^[4]。

当前市场存在部分虾青素产品对虾青素来源进行了模糊化处理，部分产品未明确标注其虾青素源自天然雨生红球藻或基因工程改造微生物（巴斯德毕赤酵母、解脂耶氏酵母等）甚至存在将两者混合销售的现象。尽管外观相似但二者来源存在本质差异直接关联安全与合规性风险。为保障消费者权益与产品真实性本研究通过物理性质、化学成分分析，比较雨生红球藻来源与巴斯德毕赤酵母来源虾青素，以及两者混合虾青素样品在水溶性、游离虾青素含量、稳定性、副产物叶绿素含量和法规认定等方面的差异以期为不同来源虾青素的鉴别提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 虾青素样品

雨生红球藻源虾青素为云南博欣生物科技股份有限公司产品样品代码 HP-AO（*Haematococcus pluvialis*-astaxanthin oil）；巴斯德毕赤酵母源虾青素为某一巴斯德毕赤酵母源虾青素的生产商赠送样品，样品代码 KP-AO（*Komagataella phaffii*-astaxanthin oil）；混合样品为以上两种来源虾青素质量比 7:3 混合所得（HP-AO: KP-AO=7:3）。

1.1.2 试剂

色谱纯甲醇、正己烷、丙酮采购自国药集团化学试剂有限公司。全反式虾青素标准品（CDAA-200031-10mg）采购自上海安谱瑾世标准技术服务有限公司。

1.1.3 仪器

薄层层析硅胶板 G 型（20×20cm，0.2mm）采购自青岛邦凯高新技术材料有限公司。HPLC 系统（Agilent

1260II）采购自浙江省科学器材进出口有限责任公司。光学显微镜（林波舜宇 ex30）采购自深圳市米恩科技有限公司。紫外可见分光光度计（TU-1901）采购自北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 水溶性

取 25ml 纯水滴加 30mg 样品涡旋振摇 30s 目视观察。

显微观察：取 20 μ l 样品滴于载玻片上后覆盖盖玻片显微镜 20 倍物镜 ×10 倍目镜下观察样品。

1.2.2 成分分析及稳定性对比

（1）虾青素含量检测及 HPLC 图谱。样品稀释后依据国家标准《GB/T30893-2024 雨生红球藻粉》附录 A 方法的酶解和色谱条件进行检样。（2）游离虾青素含量检测。样品稀释后依据国家标准《GB/T30893-2024 雨生红球藻粉》附录 A 检测方法的色谱条件进行检样。（3）叶绿素含量检测。依据《SN T 1113-2002 进出口螺旋藻中藻蓝蛋白、叶绿素含量的测定》分光光度法进行检样。（4）薄层色谱.依据《USP Astaxanthin Esters》以石油醚-丙酮（7:3）为展开剂采用薄层层析硅胶板 G 型（10×5cm，0.20-0.25mm）进行检样。（5）稳定性检测。将样品抽真空密封包装后避光储存于 4℃样品柜中初始检测后每隔 60 天进行一次总虾青素含量检测检测方法参见（1）所述。

1.3 统计学分析

计量数据以三次独立重复实验的平均值 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析组间比较采用 t 检验多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 样品外观及水溶性对比

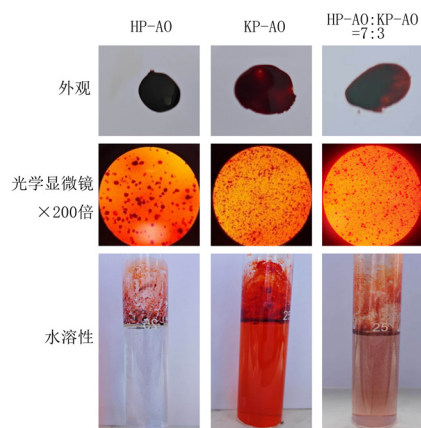


图1 雨生红球藻源虾青素HP-AO、巴斯德毕赤酵母源虾青素KP-AO及其混合样品外观与物理特性对比

如图1所示雨生红球藻源虾青素 HP-AO 呈深红色至红褐色粘稠液态流动性较好具有轻微藻腥味；200 倍显微镜下呈均匀油滴状且不溶于水。而巴斯德毕赤酵母源虾青素 KP-AO 及两者 7:3 混合样品呈橙红色粘稠液态粘稠度低于雨生红球藻源虾青素 HP-AO 流动性强于雨生红球藻源虾青素 HP-AO 无明显气味；200 倍显微镜下油滴直径小于雨生红球藻源虾青素 HP-AO 且部分溶于水。

2.2 样品成分分析

如表1所示实验结果显示经 HPLC 检测总虾青素含量在雨生红球藻源虾青素 HP-AO、巴斯德毕赤酵母源虾青素 KP-AO 及其混合样品间无显著差异 ($P > 0.05$) 的前提下 HP-AO 游离虾青素占比显著低于 KP-AO 及其混合样品 ($P < 0.05$)。巴斯德毕赤酵母源虾青素 KP-AO 未检出叶绿素雨生红球藻源虾青素 HP-AO 叶绿素含量显著高于 KP-AO ($P < 0.01$)。

2.3 样品游离虾青素色谱分析

如图2高效液相色谱结果显示 HP-AO 仅1个游离虾青素峰，峰面积最小；KP-AO 有2个游离虾青素峰且峰面积最大；混合样品的2个游离虾青素峰面积介于 HP-AO 与 HP-AO 之间。基于进样量相同峰面积结果进一步证实 HP-AO 中游离虾青素占比低于 KP-AO 及混合样品。

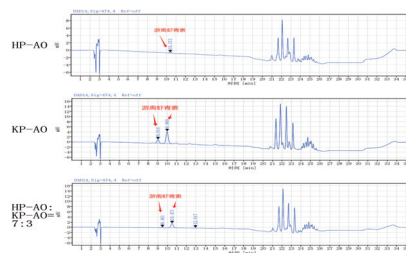


图2 雨生红球藻源虾青素HP-AO、巴斯德毕赤酵母源虾青素KP-AO及其混合样品游离虾青素检测结果

2.4 样品稳定性检测分析

如图3所示雨生红球藻源虾青素 HP-AO 在 240 日观察期内总虾青素含量维持在与第 0 日初始值无显著差异的水平 ($P > 0.05$)；对比第 240 日各组样品总虾青素含量结果显示与雨生红球藻源虾青素 HP-AO 相比混合样品与之存在显著差异 ($P < 0.05$)；巴斯德毕赤酵母源虾青素 KP-AO 总虾青素含量最低与雨生红球藻源虾青素 HP-AO 差异极显著 ($P < 0.01$)。

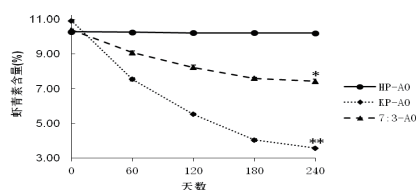


图3 雨生红球藻源虾青素HP-AO、巴斯德毕赤酵母源虾青素KP-AO及其混合样品稳定性对比

*与HP-AO相比, $P < 0.05$; **与HP-AO相比, $P < 0.01$

表1 雨生红球藻源虾青素HP-AO、巴斯德毕赤酵母源虾青素KP-AO及其混合样品成分分析对比

*与HP-AO相比, $P < 0.05$; **与HP-AO相比, $P < 0.01$

项目	HP-AO	KP-AO	HP-AO:KP-AO=7:3
HPLC总虾青素含量 (%)	10.28 ± 0.03	10.91 ± 0.05	10.38 ± 0.04
游离虾青素占比 (%)	0.10 ± 0.03	16.77 ± 0.07**	4.69 ± 0.06*
叶绿素含量 (%)	0.79 ± 0.04	0.00 ± 0.00**	0.49 ± 0.04*
薄层色谱特征	斑点Rf 0.93	斑点Rf 0.90	斑点Rf 0.93; 斑点Rf 0.90

表2雨生红球藻源虾青素与巴斯德毕赤酵母源虾青素核心化学特性及安全性对比

项目	雨生红球藻源虾青素	巴斯德毕赤酵母源虾青素
来源类型	天然来源	转基因来源
立体异构	100%左旋 (3S,3'S)	93.4%-95%左旋 (含右旋杂质)
酯化形式	酯化态占95% (单酯70%+双酯25%), 游离态<5%	酯化态占80%-90%, 游离态>10%
特征伴生物	叶绿素a、藻多糖	有机溶剂残留
稳定性	高	低
人体安全性试验	(6mg/天×4周) 无副作用	无
授权文件及许可范围	中国: 国家卫健委2010年第17号公告批准为新资源食品, 准用于食品 (婴幼儿除外) 欧盟: (EU) 2023/1581、(EU) 2024/1026新型食品许可 美国: (GRN 580) 允许天然虾青素 (禁化学合成)	全球未批准用于食品, 仅限饲料/工业用 欧盟: (EU) 2018/1568饲料添加剂授权
用途	中、欧、美许可作为膳食补充剂即食品; 也可作为化妆品、医药原料	全球均许可作为饲料用水产/禽类着色剂; 或用于工业酶生产; 非食用领域

3 安全性法规准许

大量研究表明,雨生红球藻源虾青素 100% 左旋、酯化态占比高等特性使得其具有较高的抗光热分解性因此也赋予天然来源虾青素更高的稳定性其伴生物藻多糖也具有协同抗氧化作用并经过大鼠实验、人体实验均可有效证实其安全性^[5-8]。而巴斯德毕赤酵母源虾青素中易氧化降解的游离态占比高且其存在转基因成分残留,以及未进行人体实验,以上均使其具有一定的潜在风险^[9-10]。

各国法律法规对不同来源虾青素的使用范围等规定也存在明显差异,如表 2 所示雨生红球藻虾青素在我国依据国家卫健委 2010 年第 17 号公告被批准为新资源食品(婴幼儿食品除外)并通过《GB/T 30893-2024 雨生红球藻粉》规范生产标准;在美国雨生红球藻源虾青素通过 FDA 的 GRAS 认证(GRN 580)作为膳食补充剂合法销售;欧盟则以(EU) 2023/1581 文件明确藻源虾青素获批新型食品。巴斯德毕赤酵母源虾青素需符合各国转基因生物(GMO)相关法规也因其涉及转基因技术在我国未获食品准入许可仅限饲料和化妆品用途;在美国酵母源产品因转基因风险未被批准用于食品或补充剂仅限饲料应用;欧盟则以(EU) 2023/1581 文件明确酵母源仅限饲料使用^[11]。

4 结语

近年雨生红球藻来源的虾青素系列产品在全球市场备受消费者关注市场需求持续增长。但极少生产商或经销商在巴斯德毕赤酵母来源虾青素未经安全性评估确认、未获得相关食品准入资质的情况下,利用巴斯德毕赤酵母来源虾青素与雨生红球藻来源虾青素在物理特性(如酯化形态、深红色泽)及核心功能(抗氧化活性)上的相似性以及非专业消费者难以通过直观手段辨别二者差异的行业现状实施违法市场行为,例如直接以雨生红球藻来源虾青素的名义低价销售巴斯德毕赤酵母来源的虾青素油;或在雨生红球藻来源虾青素油中掺入一定比例的巴斯德毕赤酵母来源虾青素油通过混合手段掩盖酵母源虾青素油无特征气味的属性使其呈现雨生红球藻油的感官特征。上述行为不仅违反食品标签规范及市场交易的诚实信用原则更因基因工程巴斯德毕赤酵母来源虾青素安全性及合法合规性尚存在极大争议而天然雨生红球藻虾青素则具备极高的安全性并在国际国内市场均具有极高的准入性^[12]。基于巴斯德毕赤酵母来源虾青素在安全性方面可能存在的确定性导致消费者面临健康安全隐患及知情权受损的双重风险。因此需从原料监管、检测标准、市场稽查等多维度强化管控审慎对待巴斯德毕赤酵母来源虾青素非获准领域的商业化应用以

保障食品安全,规范市场行为。

本研究结果提示雨生红球藻源虾青素不溶于水游离虾青素占比低且含有叶绿素,薄层色谱特征斑点 Rf 0.93,此外在 240 日内总虾青素含量维持极为稳定具有极高的稳定性;而巴斯德毕赤酵母源虾青素具有部分水溶性游离虾青素占比高且未检出叶绿素,薄层色谱特征斑点 Rf 0.90,而其总虾青素含量与第 0 日相比显著降低约 70% 稳定性极差。两种不同来源虾青素混合后各特性均介于两者之间。法律法规层面则明示巴斯德毕赤酵母源虾青素作为转基因产物仅可作为饲料使用及非食品领域使用仅雨生红球藻来源的天然虾青素可用于食品、保健品等多领域。因此为使消费者规避误用非天然虾青素可能带来的隐患且基于雨生红球藻来源与巴斯德毕赤酵母来源虾青素油理化性质的差异进一步根据检测方法呈现结果的及时性评估水溶性(最便捷鉴定手段)、游离虾青素占比、薄层色谱可作为不同来源虾青素鉴别的三重核心判定手段进行推广。

参考文献:

- [1] Si P, Zhu C. Biological and neurological activities of astaxanthin (Review). *Mol Med Rep.* 2022 Oct; 26(4):300.
- [2] Zhou T, Park YK, Ledesma-Amaro R. Advances in the biosynthesis of β -carotene and its derivatives in yeast. *Bioresour Technol.* 2025 Nov; 435:132936.
- [3] Wan X, Zhou XR, Moncalian G, Su L, Chen WC, Zhu HZ, Chen D, Gong YM, Huang FH, Deng QC. Reprogramming microorganisms for the biosynthesis of astaxanthin via metabolic engineering. *Prog Lipid Res.* 2021 Jan; 81:101083.
- [4] Basiony M, Ouyang L, Wang D, Yu J, Zhou L, Zhu M, Wang X, Feng J, Dai J, Shen Y, Zhang C, Hua Q, Yang X, Zhang L. Optimization of microbial cell factories for astaxanthin production: Biosynthesis and regulations, engineering strategies and fermentation optimization strategies. *Synth Syst Biotechnol.* 2022 Feb 18; 7(2):689-704.
- [5] Mota GCP, Moraes LBS, Oliveira CYB, Oliveira DWS, Abreu JL, Dantas DMM, Gálvez AO. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications and market. *Prep Biochem Biotechnol.* 2022; 52(5):598-609.
- [6] Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*-Multifunctional Applications. *Mar Drugs.* 2020 Sep 7; 18(9):459.
- [7] Kim B, Youn Lee S, Lakshmi Narasimhan A, Kim S, Oh YK. Cell disruption and astaxanthin extraction from

Haematococcus pluvialis: Recent advances. *Bioresour Technol.* 2022 Jan; 343:126124.

[8] Ren Y, Deng J, Huang J, Wu Z, Yi L, Bi Y, Chen F. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook. *Bioresour Technol.* 2021 Nov; 340:125736.

[9] Veiga-Crespo P, Araya-Garay JM, Villa TG. Engineering *Pichia pastoris* for the Production of Carotenoids. *Methods Mol Biol.* 2018; 1852:311-326.

[10] Wang J, Ma W, Ma W, Yao Z, Jiang Y, Jiang W, Xin F, Zhang W, Jiang M. Microbial Astaxanthin Synthesis

by *Komagataella phaffii* through Metabolic and Fermentation Engineering. *J Agric Food Chem.* 2025 Jan 22; 73(3):1952-1964.

[11] Solovchenko AE. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynth Res.* 2015 Sep; 125(3):437-49.

[12] Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *J Med Food.* 2003 Spring; 6(1):51-6.

作者简介: 赵然 (1996.06-), 男, 汉族, 云南曲靖人, 本科, 研究方向: 雨生红球藻粉及其藻油的化学成分。