

利用微藻生产特种天然类胡萝卜素的进展

Advances on the production of special natural carotenoids by microalgae

刘龙军¹, 魏东¹, 梁晓芸¹, 陈峰^{1,2}

(1. 华南理工大学 轻工与食品学院, 广东 广州 510640; 2. 香港大学 植物学系, 香港)

中图分类号: Q58 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)09-0063-07

类胡萝卜素是广泛存在于自然界的一类天然色素^[1]。所有类胡萝卜素形式上都可由有 11 个共轭双键中间碳链的番茄红素(lycopene)基础结构通过氧化、氢化、脱氢、环化以及碳架的重排、降解而衍生^[2]。类胡萝卜素在生物体内具有十分重要的生理功能,它是植物光合作用的辅助色素,在保护细胞免受强光、活性氧和敏化色素的有害影响中起着重要的作用^[1]。同时,类胡萝卜素具有较高的医药价值,通过摄食类胡萝卜素不仅可以预防眼病和心血管疾病的发生,还可以增强人体的免疫功能,具有抗癌、抗氧化、抗衰老等功效^[3]。因此,类胡萝卜素作为营养、保健、着色等多功能天然色素,已广泛应用于食品、医药、保健品、饲料、化妆品等工业领域。

利用微藻已经实现了许多具有商业价值的天然产物的生产,如多不饱和脂肪酸、甘油、天然色素以及生物多聚物(藻胆蛋白和多糖)^[4],用微藻生产天然类胡萝卜素具有明显的优越性。作者综述了近年来国内外利用微藻生产特种天然类胡萝卜素,以及高速逆流色谱法分离纯化新技术的研究进展,以促进国内微藻生物技术的发展。

1 叶黄素

叶黄素(Lutein)又名“植物黄体素”,分子式为 $C_{40}H_{56}O_2$,易溶于氯仿、二氧化碳,微溶于醇、醚。其稳定性受化学、物理及生物因素的影响较大^[5,6]。

1.1 叶黄素的生理活性及其应用

1.1.1 对眼睛的保护作用

叶黄素是存在于眼内的一种主要类胡萝卜素。年龄相关性黄斑退化(AMD)是老年人常患的一种

疾病,是导致 65 岁以上的老人失明的第一原因^[6]。黄斑是视网膜上锥细胞最密集的地方,负责中心视力和产生敏锐的视觉。视网膜黄斑色素由叶黄素和玉米黄素组成,保持黄斑的健康对于维持正常的视力至关重要。视网膜的神经细胞很容易被氧化而产生自由基,叶黄素能捕获自由基从而减少自由基对视网膜的伤害^[7]。若通过增加叶黄素含量高的食品摄入量,可减少发生 AMD 的可能性^[8]。在眼睛的晶状体中也存在叶黄素,通过清除自由基和淬灭单线态氧减少晶状体蛋白的氧胁迫,对于预防白内障和提高视力也有着非常显著的作用^[7,9]。

1.1.2 抗癌作用

叶黄素是人体血液中主要的类胡萝卜素之一,它在抑制肿瘤生长方面有特殊的生物学功能。在膳食中摄入叶黄素不仅能抑制肿瘤,还可起到预防肿瘤发生作用^[5]。最新研究表明,叶黄素对直肠癌、皮肤癌等多种癌症有抑制作用^[5],如叶黄素能保护皮肤不被紫外照射损伤,能减少皮肤癌的发生率^[7]。补充叶黄素可以促进抗原刺激的淋巴细胞增殖反应,并可影响细胞表面分子的功能型表达,能增强人体免疫力^[10]。此外,叶黄素还能预防心血管疾病和延缓早期动脉硬化作用^[7]。

1.1.3 抗氧化和着色作用

收稿日期: 2005-06-20; 修回日期: 2006-10-10

作者简介: 刘龙军(1982-),男,硕士研究生,研究方向: 微生物技术与天然产物研究,电话: 020-85296541, E-mail: liulongjun2000@tom.com; 魏东,通讯作者,电话: 020-87113-849, E-mail: fewd304@scut.edu.cn

体外研究表明,叶黄素能有效抑制细胞膜脂质氧化和氧化诱导的细胞损伤。叶黄素作为一种抗氧化剂,其机理尚没有统一明确的解释,普遍认为叶黄素可通过自由基机理淬灭氧自由基及单线态活性氧,分散所吸收的过多能量而达到抗氧化的目的^[6,7]。叶黄素突出的功能是其卓越的着色能力,将富含叶黄素的原料作为饲料添加剂,广泛用于家禽饲养和水产养殖业^[6,11]。

1.2 利用微藻生产叶黄素

目前工业化生产叶黄素主要是从万寿菊(*Tagetes erecta*)花瓣中提取,存在着原料中叶黄素含量低、分离纯化难度大、产品纯度不高等缺陷^[11]。利用微藻生产叶黄素是国际上近年来的新热点,其产量比目前从万寿菊中提取叶黄素的产量高出许多倍,可以大大节约成本,有很好的发展前景。工业化微藻生产大都采用开放池培养,但存在着容易被生物污染,产量易受外界条件影响,生物量与细胞密度不高等限制。近年来的研究表明,利用工业发酵系统进行的异养化高细胞密度培养技术培养微藻,可以克服光合自养培养的诸多缺陷,是提高微藻产量与产物产率的有效途径^[12,13]。

1.2.1 利用小球藻生产叶黄素

小球藻(*Chlorella*)是一类普生性单细胞绿藻,大多小球藻都能积累叶黄素。目前国际上已有用*Chlorella zofingensis*、*C. vulgaris*和*C. protothecoides*来生产叶黄素的研究报道。陈峰等^[14]研究证明,影响小球藻积累叶黄素的因素主要有碳源、氮源和培养方式等,异养化培养*C. protothecoides*的生物量和叶黄素的产量最大,其中葡萄糖是培养小球藻最好的碳源。克服底物浓度的抑制作用,采用补料分批异养化培养*C. protothecoides*获得了很好的效果。在3.7 L生物反应器中,当培养基中起始葡萄糖质量浓度为10 g/L时,培养128 h细胞内叶黄素质量比达到最高值为4.38 mg/g(干质量),培养92 h时培养液中叶黄素的质量浓度达到最高值为19.39 mg/L;当起始葡萄糖质量浓度为40 g/L时,培养238 h时细胞内叶黄素质量比达到最高值为4.44 mg/g(干质量),培养202 h培养液中叶黄素质量浓度达到最高值为76.56 mg/L^[15]。

研究表明,相对于硝酸盐和铵盐,以尿素为氮源时,其生物量和叶黄素产量都最高,尿素是培养*C. protothecoides*最好的氮源^[16]。以尿素为氮源,质

量浓度为1.7 g/L时,培养至142 h时生物量最大,可达19.6 g/L,此时叶黄素的质量比高达4.58 mg/g(干质量),培养液中叶黄素质量浓度为83.81 mg/L。高温和氮源限制的协同作用能诱导小球藻高效积累叶黄素。在氮源限制的条件下,细胞中蛋白质和叶绿素等氮代谢产物减少,类胡萝卜素和其它非氮源化合物的含量就增大^[17]。因此,在补料分批培养过程中,始终控制氮源浓度,有利于叶黄素的积累,在3.7 L生物反应器中最大细胞干质量浓度可达46.9 g/L,细胞中叶黄素的质量比高达4.92 mg/g。当培养温度从28 °C升高到32 °C时,叶黄素含量提高了约10%。这一过程已成功放大到30 L生物反应器^[17]。由此可见,补料分批异养化培养小球藻*C. protothecoides*能实现高密度细胞繁殖与细胞内叶黄素的高效积累,较传统的生产方式有很大的优越性。

1.2.2 利用 *Muriellopsis* sp. 生产叶黄素

在目前已研究过的所有产叶黄素的微藻中,*Muriellopsis* sp. 在自养条件下有最快的生长速率(可达0.17~0.23 h⁻¹)和最高的细胞密度(8×10¹⁰个/L),培养液中叶黄素的质量浓度也高达35 mg/L^[18]。利用管道式光生物反应器培养*Muriellopsis* sp., 在培养过程中需通入二氧化碳以维持培养基的pH,硝酸盐作为氮源,培养温度为28 °C^[19]。氮源浓度对于该藻种积累叶黄素有很大的影响。氮源不足时,叶黄素的产量有很大的下降;当培养基中的氮源浓度由10 mmol/L增加到20 mmol/L时,叶黄素产量会增加一倍,表明高的氮源浓度有利于*Muriellopsis* sp.积累叶黄素。光照的影响也很明显,当光子通量密度从184 μmol/(m²·s)增加到460 μmol/(m²·s),叶黄素的产量增加了40%;当光强更高时,叶黄素产量也会减少40%;当光子通量密度为460 μmol/(m²·s)时可达最高的叶黄素质量浓度为35.2 mg/L。细胞生长的pH为6.5时叶黄素的质量浓度最高可达35.2 mg/L,pH高于或低于6.5,叶黄素的含量均有较大的减少。在最佳培养条件下,*Muriellopsis* sp.的叶黄素质量浓度可高达35 mg/L^[18]。

某些胁迫条件(如极端pH和高温等),不利于细胞的生长,却能诱导*Muriellopsis* sp.大量积累叶黄素。采用二步法培养,即培养初始阶段使藻有很快的生长速度,当藻的细胞密度达到最大时,改变培养条件,使得有利于叶黄素的积累,这样能大大提高叶黄素的产量^[18]。

2 虾青素

虾青素 (astaxanthin) 化学名称为 3, 3'-二羟基- β,β' -胡萝卜素-4, 4'-二酮, 分子式 $C_{40}H_{52}O_4$, 广泛存在于鲑鱼、虾、蟹、观赏鱼和鱼卵中, 以及植物和水果中^[20]。虾青素是一种天然的红色素, 除具有色素的特性外, 还具有清除自由基的作用, 因而具有强烈的抗氧化活性, 被誉为“超级抗氧化剂”, 还具有抗肿瘤、增加免疫力等功效。因此, 虾青素在食品、饲料及医药等工业领域具有广泛的应用前景^[20,21]。

2.1 利用雨生红球藻生产虾青素

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种淡水的单细胞绿藻, 不动细胞中虾青素的质量分数超过其总胡萝卜素质量分数的 80%, 被公认为自然界中生产天然虾青素最好的生物, 用雨生红球藻已实现了虾青素的商业化生产^[22,23]。

雨生红球藻具有特殊的生物学特性, 即在弱光、氮磷丰富的环境中以游动的绿色营养细胞存在, 而在不利生存的条件下, 则以厚壁的不动细胞存在, 同时在细胞内积累大量的虾青素而呈红色^[23]。高光照、高温、营养盐 (氮、磷) 缺乏、盐胁迫 (NaCl 等) 和氧化压力等许多环境都可诱导细胞内虾青素的积累^[21]。高光量子通量密度 ($90\sim 400\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 是细胞内虾青素合成最重要的诱导条件, 通常光量子通量密度越高, 类胡萝卜素的产量越高, 在一定范围内虾青素的积累量随温度和光量子通量密度的升高而增加^[21,23]。氮缺乏、磷缺乏以及氮缺乏与高光量子通量密度相结合可显著促进细胞内虾青素的合成, 而且可通过培养基配方的优化而保持高积累量^[23,24]。

研究表明, 细胞在积累虾青素的过程中, 氮源浓度起着非常重要的作用。当培养基中氮质量浓度 $0.15\ \text{g/L}$ 时, 很快就被消耗, 且能获得最高的细胞浓度, 有利于虾青素的积累。在盐胁迫条件下, 当培养基中醋酸盐为 0.5% 时, 最有利于虾青素的积累, 高于 0.5% 就会抑制细胞的生长^[25]。溶解氧和多种活性氧分子都有效地诱导细胞内积累虾青素, 说明虾青素在细胞内起着抗氧化剂的重要作用, 如 Fe^{2+} 的存在, 可使细胞成熟期缩短至 6~7 d, 这也是较有效的诱导方法之一^[23]。在只有高光量子通量密度胁迫时, 营养细胞将迅速转变为厚壁孢子, 并在孢子中大量积累虾青素。在只有氮缺乏胁迫时营养细胞可缓慢积累色素。当两种诱导因子同时存在时, 可导致营养细胞在

运动状态下快速积累虾青素^[26]。在优化的诱导条件下, 虾青素的积累量可高达 $65\ \text{pg}/\text{个}$ ^[23]。

陈峰等^[27-29]系统研究了异养化和混合营养培养雨生红球藻生产虾青素。采用补料分批培养雨生红球藻, 细胞质量浓度达 $2.65\ \text{g/L}$, 总的虾青素质量浓度可达 $64.36\ \text{mg/L}$ 。由于雨生红球藻特殊的生物学性质, 其生长繁殖和虾青素的积累明显分为两个截然不同的生理阶段。目前, 国际上成功的商业化生产模式都采用了两阶段生产方式, 先采用封闭式培养繁殖大量绿色细胞, 但细胞不积累虾青素; 当进入第二阶段即采用光合自养培养时, 细胞中开始大量积累虾青素, 虾青素的质量分数占总类胡萝卜素质量分数的 92%^[30]。

2.2 *C. zofingiensis* 积累虾青素

C. zofingiensis 生长速度快, 易于培养, 对环境的适应能力强, 细胞浓度较大, 已成为生产虾青素的另一重要的微藻资源^[31]。*C. zofingiensis* 的培养方式主要有混合营养培养与异养培养。陈峰等^[32]研究结果表明, 碳源以葡萄糖最佳, 质量浓度为 $5\ \text{g/L}$ 时细胞的生长速度最快; 当葡萄糖质量浓度为 $45\ \text{g/L}$ 时, 最有利于虾青素积累, 但生长速率稍有下降。葡萄糖质量浓度为 $40\ \text{g/L}$ 时, 细胞中的类胡萝卜素含量最高。氮源大多使用硝酸盐, 在氮缺乏的条件下, 有利于 *C. zofingiensis* 积累虾青素。研究表明, 培养基中足够的碳源和氮营养限制最有利于细胞中虾青素的积累, 故培养基中高的起始 C/N 有利于细胞生长和虾青素的积累。此外, 葡萄糖起始质量浓度为 $30\ \text{g/L}$, 氮源起始质量浓度为 $0.55\ \text{g/L}$, 光量子通量密度为 $300\sim 350\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时最适宜虾青素的积累, 培养液中虾青素的质量浓度最高达到 $12.5\ \text{mg/L}$ ^[31]。在异养培养条件下, 葡萄糖质量浓度 $50\ \text{g/L}$, 培养基中碳氮质量比 (C/N) 为 180, 细胞中虾青素的产量可达 $10.3\ \text{mg/L}$ ^[33,34]。陈峰等最新研究结果表明, 在异养化培养 *C. zofingiensis* 中, 反应活性基团超氧化氮 (RNS) 和反应活性氮中间体硝酰氯 (RNI) 能提高 *C. zofingiensis* 中虾青素的产量。当培养基中加入 $1\ \text{mmol/L}$ 的超氧化氮, 虾青素的产量从原有的 $9.9\ \text{mg/L}$ 提高到 $11.78\ \text{mg/L}$ 。加入 $0.1\ \text{mmol/L}$ 的亚硝酸钠和 $0.5\ \text{mmol/L}$ 的次氯酸钠产生硝酰氯, 虾青素的产量也提高到 $10.99\ \text{mg/L}$ (另文发表)。反应活性基团 (ROS) 也能提高 *C. zofingiensis* 中虾青素的产量。培养基中加入 $0.1\ \text{mmol/L}$ 的过氧化氢时产生了羟基自由基, 虾青素的产量从 $9.9\ \text{mg/L}$ 提高到 $12.58\ \text{mg/L}$ (另文发

表)。

2.3 衣藻 (*Chlamydomonas nivalis*) 积累虾青素

Chlamydomonas nivalis 是一种生长在极地和高海拔地区的雪地衣藻, 非常适合在营养缺乏、酸性、结冰、高强度的紫外辐射等极度恶劣的环境条件下生长^[35]。*C. nivalis* 最适的生长温度为 0~10 °C, 光合作用不受高光量子通量密度 ($\leq 1\ 600\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) 的抑制, 具有适应高光量子通量密度的超强能力^[36]。在实验室条件下培养 *C. nivalis* 的培养基是含有 VB₁₂ 的 BBM 培养基, 使其具有很好的游动性; 温度保持在 25 °C \pm 2 °C, 培养的过程中也都需要光照^[37]。研究表明, *C. nivalis* 的红色是由于积累了类胡萝卜素, 主要是虾青素, 但目前对于 *C. nivalis* 积累虾青素的研究还很少。*C. nivalis* 在营养丰富和低光强下保持绿色并快速生长, 而在营养贫乏和高光量子通量密度下细胞生长减缓并开始积累虾青素。N、P、S、K 和 Fe 等元素的缺乏能促使 *C. nivalis* 积累类胡萝卜素。当细胞处于休眠期时, 细胞中有很高含量的虾青素, 虾青素和叶绿素 a 的比率高达 34:1, 也是细胞生长过程中的最高比率, 同时虾青素的合成也能对细胞起到光保护作用^[35]。由于 *C. nivalis* 能大量积累虾青素, 但目前对该藻种的研究很少, 故有待进一步研究, 以期获得更大的虾青素产量。

3 玉米黄素

玉米黄素 (zeaxanthin) 在减少心血管疾病发病率、增强免疫功能和视觉保护等方面有独特的生理功能^[38]。叶黄素循环 (Xanthophyll Cycle) 即苜蓿黄素 (violaxanthin)、环氧玉米黄素 (antheraxanthin) 和玉米黄素在相应酶的作用下相互转化, 在植物体的光合作用中起着非常重要的作用^[39]。

目前, 国内外研究较多的是利用微绿球藻 *Nannochloropsis gaditana* 生产玉米黄素。微绿球藻能生产大量的高值天然产物, 如玉米黄素、虾青素和 EPA 等, 是一种重要的海产经济微藻^[40]。在 *Nannochloropsis gaditana* 细胞中, 由于存在着叶黄素循环, 首先合成的是苜蓿黄素, 然后在苜蓿黄素脱环氧化酶 (VDE) 和外界条件的作用下, 由苜蓿黄素转变成玉米黄素。研究表明, 在高光量子通量密度 ($15\ 000\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$), 温度 30 °C 时经过 60 min 有 24% 的苜蓿黄素转变成玉米黄素; 当有碘乙酰胺存在时, 在 30 min 内有 90% 的苜蓿黄素转变成玉米黄素, 极大地提高了玉米黄素的产量和产率^[42]。在光生物反应器中培养 *N. gaditana* 获得较高的细胞密度为 10^9 个/L, 苜蓿黄素的质量浓度为 50 mg/L, 通过叶黄素

循环途径, 在高光量子通量密度和 40 °C 时, 有 70% 的苜蓿黄素转变成玉米黄素, 达到细胞干质量的 0.6%^[42]。在连续培养中, 稀释率为 0.48/d, 温度在 24~26 °C, pH 为 7.1~7.3 时, 细胞生长快, 苜蓿黄素产量高, 光量子通量密度为 $650\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时有 50% 的苜蓿黄素转变成玉米黄素^[41]。

4 其它微藻与特种天然类胡萝卜素的生产

盐藻 (*Dunaliella salina*) 在高盐度、高温、缺氮和强光照的胁迫条件下, 在细胞中能大量积累 β -胡萝卜素, 是目前天然 β -胡萝卜素的主要来源, 目前大规模工业化生产技术已经很成熟^[43]。此外, *Chlorococcum* 和 *Nannochloropsis gaditana* 能积累较多的虾青素^[42,44], 硅藻 (*Nitzschia microcephala*) 在适宜的条件下能积累多种类胡萝卜素^[45]。衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 积累玉米黄素能保护细胞免受光氧化胁迫^[46]; 陈峰等研究利用 *Microcystis aeruginosa* 生产玉米黄素获得成功^[47]。虽然这些藻类含有很多的类胡萝卜素, 但由于对这些藻的生长和色素积累的特性还不是很了解, 尚未实现大规模的生产, 还有待进一步深入研究。

5 高速逆流色谱分离纯化类胡萝卜素新技术

目前分离纯化类胡萝卜素普遍都采用高效液相色谱 (HPLC)。传统的固液色谱分离都需采用固体支持物, 而固定相的使用范围也很有限。此外, 固体支持物还会产生不可逆吸附, 影响分离纯化效果。高速逆流色谱 (HSCCC) 是一种液液色谱, 上相为固定相, 下相为流动相。HSCCC 不需使用固体支持物, 分离效果较好^[48]。陈峰等首次将高速逆流色谱 (HSCCC) 用于分离纯化类胡萝卜素。研究表明, 分离叶黄素最适合的溶剂系统为正己烷、乙醇和水, 体积比为 4:3:1, 转速为 1 600 r/min, 流动相流速为 1.0 mL/min, 样品用紫外检测器在 254 nm 检测。固定相的保持力为 58%, 检测样品 200 mg, 其叶黄素纯度最高可达 98%^[49]。分离纯化虾青素最合适的溶剂系统采用正己烷、乙烷基醋酸盐、乙醇与水, 其体积比为 5:5:6.5:3, 转速 1 000 r/min, 流速为 2.0 mL/min。用紫外可见检测器在 480 nm 处检测, 固定相保持力为 62%, 处理样品 250 mg, 虾青素纯度高达 97%^[50]。分离玉米黄素的溶剂系统采用正己烷、乙酸乙酯、乙醇和水, 体积比为 8:2:7:3, 流动相流速为 1.0 mL/min。用紫外可见检测器在 453 nm 检测, 从 150 mg 发酵液

中一步分离玉米黄素的纯度高达 96.2%，回收率达 91.4%^[51]。研究表明，高速逆流色谱的分离纯化效率较高效液相色谱高出很多，可用于各种藻类生物活性物质的分离纯化。

6 前景展望

某些特殊的微藻，因其独特的生理代谢机制使其能合成许多结构和生理功能独特的天然色素。使用一定的诱导手段，尤其是利用微藻生物技术，可以高效合成许多具有商业化生产价值的天然产物。在自然界中已知的微藻有 30 000 多种，但目前开发利用的微藻还只有 10 余种。因此，利用微藻生产类胡萝卜素和其它生物活性物质，有很大的发展空间，值得深入研究和大力开发。

参考文献：

- [1] Camara B, Bouvier F. Oxidative remodeling of plastid carotenoids[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2004,430:16-21.
- [2] 郑琰晶,李赞.类胡萝卜素合成酶基因及海洋微藻合成类胡萝卜素的研究进展[J].海洋湖沼通报,2004,1:88-95.
- [3] Oliver J, Palou A. Chromatographic determination of carotenoids in foods[J]. **Journal of Chromatography A**, 2000,881:543-555.
- [4] 陈峰,姜悦.微藻生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [5] 许秀兰,赵国花,阙建全,等.叶黄素研究进展[J].粮食与油脂, 2004,10:3-7.
- [6] 张慧,李涛,徐公世.一种前景广阔天然食品着色剂——叶黄素[J].中国食品添加剂, 2004,5:45-49.
- [7] Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein[J]. **Toxicology Letters**, 2004, 150:57-83.
- [8] Olmedilla B, Pharm D, Granado F, et al. Lutein, but not tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study[J]. **Applied Nutritional Investigation**, 2003,1:21-24.
- [9] Olmedilla B, Granado F, Blanco I, et al. Lutein in patients with cataracts and age-related macular degeneration: a long-term supplementation study[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2001,81:904-909.
- [10] 王军波.叶黄素与免疫功能[J].营养保健,2004,10:42-44.
- [11] Piccaglia R, Marotti M, Grandi S. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*[J]. **Industrial Crops and Products**, 1998,8:45-51.
- [12] Zhang X-W, Shi X-M, Chen F. A kinetic model for lutein production by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic culture[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 1999,23: 503-507.
- [13] Chen F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth [J]. **Trends Biotechnology**, 1996, 14: 421-426.
- [14] Shi X-M, Chen F, Yuan J-P, et al. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella strains*[J]. **Journal of Applied Phycology**, 1997,9:445-450.
- [15] Shi X-M, Liu H-J, Zhang X-W, et al. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures[J]. **Process Biochemistry**, 1999, 34: 341-347.
- [16] Shi X-M, Zhang X-W, Chen F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2000,27:312-318.
- [17] Shi X-M. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture[J]. **Biotechnol Prog**, 2002,18: 723-727.
- [18] Del Campo J A, Moreno J, Rodríguez H, et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. [J]. **Journal of Biotechnology**, 2000, 76:51-59.
- [19] Del Campo J A, Rodríguez H, Moreno J, et al. Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor[J]. **Journal of Biotechnology**, 2001, 85:289-295.
- [20] 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[J]. 2001,4:45-50.
- [21] 魏东,吴汪黔生.水生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 在诱导条件下积累虾青素的调控机理研究新进展[J].中国海洋药物, 2002,2:60-64.
- [22] Domínguez-Bocanegra A R, Legarreta I G, Jeronimo F M, et al. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. **Journal of Biotechnology**, 2004, 92:209-214.
- [23] 魏东,臧晓南.大规模培养水生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J].中国海洋药物. 2001, 5:4-8.
- [24] Orosa M, Valero J F, Herrero C, et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light[J]. **Biotechnology Letters**, 2001,23:1079-1085.
- [25] Orosa M, Franqueira D, Cid A, et al. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*[J]. **Bioresource Technology**, 2005, 96:373-378.
- [26] 庄惠如,卢海声,陈必铨,等.水生红球藻营养细胞的虾青素累积[J].水生生物学报, 2001,4:376-370.
- [27] Zhang X W, Gong X D, Chen F. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic

- culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 2003 23 : 691-696.
- [28] Gong X D, Chen F. Rapid detection of heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* using indirect conductimetry[J]. **Biotechnology Techniques**, 1997, 11: 841-844.
- [29] Liu X, Yuan J P, Chen F. Methods for improving *Haematococcus pluvialis* cell density, and astaxanthin biosynthesis and accumulation using photobioreactors[P]. 中国发明专利: CN1392250-A. 2002-07-18.
- [30] Fa' bregas J , Otero A, Maseda A, *et al.* Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2001, 89: 65-71.
- [31] Ip P F, Wong K H, Chen F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture [J]. **Process Biochemistry**, 2004, 39: 1761-1766 .
- [32] Del Campo J A, Rodríguez H J, Moreno M Á. Vargas . Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)[J]. **Microbiol Biotechnol** , 2004, 64 : 848-854.
- [33] Ip P F, Chen F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark[J]. **Process Biochem**, 2005, 40: 733-738.
- [34] Chen F. Methods for production of astaxanthin from the green microalgae *Chlorella* in dark heterotrophic cultures[P]. US Patent. Application Number: 10/809,862, 2004.
- [35] Muller T C, Martin D. Snow algae from northwest Svalbard: their identification, distribution, pigments and nutrient content [J]. **Polar Biol** , 1998, 20: 14-32.
- [36] Mosser J L, Mosser A G, Brock T D. Photosynthesists in the snow: the algae *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae)[J]. **J Phycol**, 1977, 13: 22-27.
- [37]. Bees M A, Hill N A. Wavelengths of bioconvection patterns [J]. **The Journal of Experimental Biology**, 1997, 200 : 1515-1526 .
- [38] Bone R A, Landrum J T, Dixon Z. Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects[J]. **Exp Eye Res**, 2000, 71: 239-245.
- [39] Masojidek J, Kopecky J, Koblizek M, *et al.* The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): its role in the photosynthetic apparatus[J]. **Plant Biol (Stuttg)**, 2004, 3: 342-349.
- [40] Rocha Jorge M S , Garcia Juan E C, Henriques Marta H F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*[J]. **Biomolecular Engineering**, 2003, 20: 237-242.
- [41] Gentile M P, Blanch H W. Physiology and xanthophyll cycle activity of *Nannochloropsis gaditana*[J]. **Biotechnology and bioengineering**, 2001, 5: 1-12
- [42] Lubi'an Luis M, Montero O, Moreno-Garrido I, *et al.* *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments[J]. **Journal of Applied Phycology**, 2000, 12: 249-255.
- [43] Garc'ia-Gonz'alez M, Moreno J, Manzano J C, *et al.* Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor[J]. **Journal of Biotechnology**, 2005, 115: 81-90.
- [44] Yuan J-P, Chen F, Liu X. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*[J]. **Food Chemistry** , 2002, 76: 319-325.
- [45] Pinto E, Nieuwerburgh L V, Barros M P, *et al.* Density-dependent patterns of thiamine and pigment production in the diatom *Nitzschia microcephala*[J]. **Phytochemistry**, 2003, 63: 155-163.
- [46] Baroli I, Tomoko Y. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress[J]. **The Plant Cell**, 2003, 15: 992-1008.
- [47] Chen F, Li H-B, Wong R N S. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 2005, 1064 : 183-186.
- [48] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 2005, 1065: 145-168.
- [49] Li H-B, Chen F , Zhang T-Y . Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography [J]. **Journal of Chromatography**, 2001, 905: 151-155.
- [50] Li H B, Chen F. Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum* sp. by high-speed counter-current[J]. **Journal of Chromatography A**, 2001, 925: 133-137.
- [51] Chen F, Li H B, Ngok-Shun Wong R. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 2005, 1064: 183-186.

(本文编辑: 张培新)