

# 微藻生物合成叶黄素的研究进展

吴正云<sup>1</sup>, 史贤明<sup>2,\*</sup>, 曾娟<sup>1</sup>

(1. 四川大学轻纺与食品学院食品工程系, 四川 成都 610065;

2. 上海交通大学农业与生物学院食品科学与工程系, 陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240)

**摘要:** 叶黄素不仅是天然色素, 而且具有多方面的生理活性功能。目前商业化生产的叶黄素主要是从植物万寿菊中提取, 在原料来源和生产效率等方面受到一定限制。作为一种具有良好前景的替代方式, 利用微藻生物合成叶黄素近年来受到越来越多的关注。本文综述了国内外关于微藻生物合成叶黄素的藻株筛选、代谢途径、培养参数优化、动力学模型以及提取工艺方面的研究进展。

**关键词:** 微藻; 叶黄素; 生物合成

## Research Progress of Lutein Biosynthesis by Microalga

WU Zheng-yun<sup>1</sup>, SHI Xian-ming<sup>2,\*</sup>, ZENG Juan<sup>1</sup>

(1. Department of Food Engineering, College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Bor Luh Food Safety Center, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Lutein is a natural pigment with multiple physiological functions for health protection. Nowadays, commercially available lutein products are mostly extracted from marigold, which suffers from some problems such as limited material resource and low productivity. Due to its promising, lutein biosynthesis by microalga has been attracted increasingly extensive attentions in recent years. Here, research progress of lutein biosynthesis by microalga including strain selection, biosynthetic pathway elucidation, culture parameter optimization, kinetic model establishment and extraction technique development are reviewed.

**Key words:** microalga; lutein; biosynthesis

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)01-0268-06

叶黄素(lutein), 又名黄体素, 是含氧类胡萝卜素——类叶黄素(xanthophyll)中的一种, 广泛存在于花卉、水果蔬菜等植物中。作为一种天然黄色素, 叶黄素可用作食品、医药和化妆品的色素添加剂和家禽畜、动物组织的增色剂等。此外, 科学研究证实, 叶黄素能够有效抵御自由基对人体细胞与器官造成的损伤<sup>[1]</sup>, 防止机体衰老引发的心血管硬化、冠心病和肿瘤等疾病<sup>[2-3]</sup>; 激发免疫反应, 提高机体免疫力<sup>[4]</sup>; 防治年龄相关性视黄斑退化引起的视力下降和失明<sup>[5-6]</sup>等。美国从20世纪70年代起开始从万寿菊中提取叶黄素, 1995年美国FDA批准了叶黄素作为食品补充剂用于食品和饮料。近年来, 美国凯明食品公司、瑞典罗氏公司和德国巴斯夫维生素公司等先后开发了多种叶黄素产品。我国卫生部也于2007年批准叶黄素用于焙烤食品、饮料、果冻、

果酱以及冷冻食品。但目前在国内叶黄素的应用及相关的产品开发尚未引起食品和医药行业的足够重视。

由于工艺复杂, 采用化学方法难以合成单一异构体的叶黄素。目前具有生物功能活性的叶黄素均来自植物。富含叶黄素的植物主要有万寿菊、金盏花、绿藻、羽衣甘蓝和苜蓿等, 其中万寿菊为目前最主要的叶黄素来源。然而大规模的万寿菊栽培, 存在占地面积大、生产效率低等问题, 而且受到季节、气候及地域等条件的限制。由于微藻中有较高含量的叶黄素, 而且具有易于进行规模化培养及藻种改良、可进行生物质综合利用等多方面的优势, 利用微藻生物合成叶黄素近年来得到国内外学者越来越多的关注。

### 1 富含叶黄素的藻株筛选

收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA02Z226)

作者简介: 吴正云(1970—), 男, 工程师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wuzhengyun@sjtu.org

\* 通信作者: 史贤明(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术及食品安全。E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

对微藻作为叶黄素来源的研究始于20世纪60年代。到目前为止所发现的富含叶黄素的微藻主要包括小球藻(*Chlorella*)、*Muriellopsis* sp.和栅藻(*Scenedesmus*)等,基本上均属绿藻门(*Chlorophyta*)的微藻。

Shi等<sup>[7]</sup>比较了来源于3种类型小球藻(*C. protothecoides*、*C. pyrenoidosa*、*C. vulgaris*)的7株藻株在异养培养条件下的细胞生长和叶黄素合成能力,发现其中*C. protothecoides* CS-41的叶黄素含量最高;在30L发酵罐培养条件下,其细胞叶黄素含量及产量分别为4.85mg/g细胞干质量和66.3mg/L,生产效率为0.94mg/L·h。Del Campo等<sup>[8-9]</sup>从15株绿藻中筛选得到一株*Muriellopsis* sp.,在室外管式生物反应器中自养培养,叶黄素产量达到35mg/L,生产效率为0.15mg/L·h。del Campo等<sup>[10]</sup>使用*C. zofingiensis*藻株,经过360h的光照自养培养,得到浓度为21mg/L的叶黄素,生产效率为0.06mg/L·h。Sansawa等<sup>[11]</sup>对小球藻*C. regularis* S-50进行了异养同步培养的研究,得到的类胡萝卜素等细胞内含物是非同步培养的2~3倍;通过进一步对培养条件的优化,达到84g/L的细胞干质量和3.5mg/g的叶黄素细胞含量。Sanchez等<sup>[12]</sup>从自然界中分离筛选得到一株高产叶黄素的栅藻(*S. almeriensis*),其细胞中叶黄素含量达到5.5mg/g,最大叶黄素产率为0.19mg/L·d。从叶黄素生产效率和细胞叶黄素含量上综合考虑,小球藻是最具生产潜力的叶黄素源,其主要原因是小球藻具有生长迅速,可异养培养的优点。

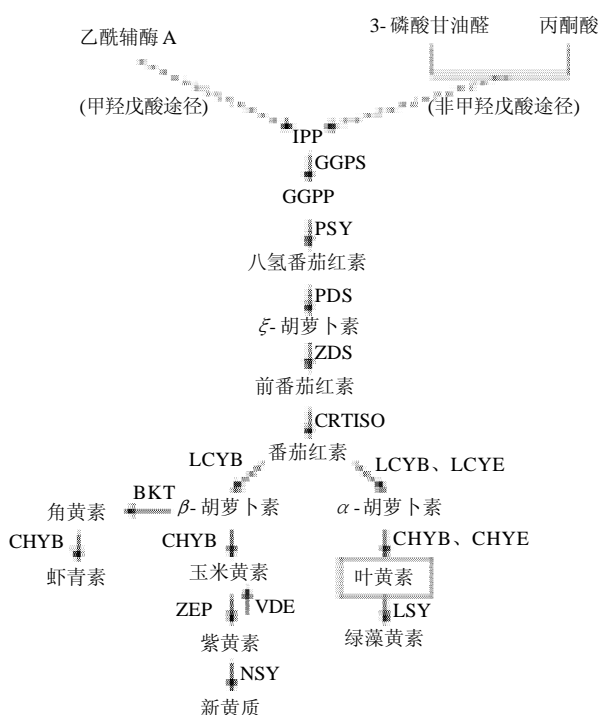
尽管目前微藻的叶黄素生产效率已接近甚至超过了商业化的杜氏藻(*Dunaliella*)和三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)的 $\beta$ -胡萝卜素生产效率,但从细胞中类胡萝卜素含量的角度看,则微藻明显缺乏优势(如三孢布拉霉等细胞中的 $\beta$ -胡萝卜素含量可达到10mg/g左右<sup>[13]</sup>),这是限制微藻生物合成叶黄素商业化生产的一个主要原因,因为细胞中叶黄素含量偏低会带来提取纯化上的困难,从而增加生产成本。因此,实现微藻生物合成叶黄素的商业化,除了开发新的高效提取工艺以及对萃余组分的综合利用之外,提高单位细胞中的叶黄素含量仍是首要任务。

## 2 微藻生物合成叶黄素的代谢途径

根据文献报道<sup>[14-15]</sup>,与叶黄素合成有关的生化代谢大体包括以下步骤:1)由乙酰辅酶A(甲羟戊酸途径)或3-磷酸甘油醛和丙酮酸缩合(非甲羟戊酸途径)经过一系列缩合反应生成异戊烯焦磷酸(IPP);2)IPP经异构、缩合生成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP);3)GGPP在八氢番茄红素合成酶(GGPS)作用下生成八氢番茄红素;4)八氢番茄红素经过连续脱氢反应形成番茄红素;5)番茄红素在环化酶的作用下生成 $\alpha$ -胡萝卜素和 $\beta$ -胡萝卜素;6)在

$\alpha$ -胡萝卜素和 $\beta$ -胡萝卜素分子结构上引入羟基、酮基或环氧基后形成各种类叶黄素(xanthophyl,图1)。

类胡萝卜素生物合成中涉及的绝大多数酶为膜结合或嵌入膜中,而且大都对有机溶剂敏感,因此不易分离和保持酶活性,这造成了其研究上的困难。到目前为止,通过基因克隆、异源表达等方式,对于类胡萝卜素合成途径中的主要酶调控有一些初步了解,包括:1)八氢番茄红素合成酶(PSY):催化GGPP转化为八氢番茄红素的反应,该酶所必需的辅助因子是与 $Mn^{2+}$ 或 $Mg^{2+}$ 结合的ATP,而磷酸根离子则对酶反应起抑制作用<sup>[16]</sup>;2)八氢番茄红素去饱和酶(PDS)和 $\zeta$ -胡萝卜素去饱和酶(ZDS):催化八氢番茄红素转化为番茄红素的反应,所需的辅因子包括NAD、NADP和氧等;3)番茄红素环化酶:催化番茄红素的环化反应,包括催化 $\beta$ -环形成的番茄红素 $\beta$ -环化酶(LCYB)和催化 $\epsilon$ -环形成的番茄红素 $\epsilon$ -环化酶(LCYE),目前已知LCYB的辅因子为NADH或NADPH;4) $\beta$ -胡萝卜素羟化酶(CHYB):在 $\beta$ -胡萝卜素的C3和C3'位加上羟基,其活性可被 $\alpha$ -酮戊二酸、抗坏血酸和 $Fe^{2+}$ 所促进,而且反应可能高度依赖于活性氧<sup>[17]</sup>。



GGPS为牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶;PSY为八氢番茄红素合成酶;PDS为八氢番茄红素去饱和酶;ZDS为 $\zeta$ -胡萝卜素去饱和酶;CRTISO为 $\beta$ -类胡萝卜素异构酶;LCYB为番茄红素 $\beta$ -环化酶;LCYE为番茄红素 $\epsilon$ -环化酶;CHYB为胡萝卜素 $\beta$ -羟化酶;CHYE为胡萝卜素 $\epsilon$ -羟化酶;ZEP为玉米黄素氧化酶;VDE为紫黄素脱环氧化酶;NSY为新黄素合成酶;LSY为绿藻黄素合成酶;BKT为胡萝卜素 $\beta$ -酮化酶。

图1 叶黄素生物合成途径简图<sup>[14-15]</sup>

Fig.1 Simplified metabolic pathway of lutein biosynthesis

对微藻中叶黄素合成的调控研究报道很少。笔者通过代谢通量分析对小球藻异养合成叶黄素的分析结果显示,叶黄素对于葡萄糖的最大理论转化率(0.24g/g)远远高于目前的实际转化率(0.001~0.002g/g),表明在小球藻合成叶黄素优化方面还有巨大的空间。目前面临的主要困难是代谢关键分支点(可能为 AcCoA 节点)的刚性,而造成该节点刚性的原因可能是催化该节点向类胡萝卜素转化的酶活力较低或受到产物反馈抑制<sup>[18]</sup>。这与对其他生物合成类胡萝卜素代谢调控研究的结论相似<sup>[14,19-21]</sup>。未来微藻合成叶黄素的进一步优化,需要解决的主要问题可能是增加类胡萝卜素合成的前体物质的供应,即增加关键酶的表达及活性;但同时也需要考虑细胞内叶黄素的承载能力所造成的反馈抑制效应。

### 3 影响叶黄素合成的营养及环境因子

#### 3.1 碳源、氮源和 C/N 比

在自养培养条件下,微藻一般以溶解在水中的 CO<sub>2</sub> 为碳源,由于 CO<sub>2</sub> 在水中溶解度变化有限,因此主要需要考虑的是氮源浓度的问题;而在异养培养下,除了 C/N 之外,还存在碳源种类及其浓度的影响。

用于微藻异养培养的碳源包括蔗糖、葡萄糖、醋酸钠等,其中葡萄糖应用最为普遍。Shi 等的研究结果表明,在 10~80g/L 范围内,小球藻细胞干重随起始葡萄糖浓度增加而增加,但浓度增加到 100g/L 时细胞干重反而减少。葡萄糖起始浓度为 10~40g/L 时对小球藻生长的抑制不明显,而在 40g/L 以上时对小球藻生长产生明显抑制作用;同时,细胞叶黄素含量在总体上也随着葡萄糖浓度的增加而降低<sup>[22]</sup>。张义明等<sup>[23]</sup>对钝顶螺旋藻的研究显示,在 0~0.5g/100mL 浓度范围内,随葡萄糖浓度增加叶黄素含量降低;而随着醋酸钠浓度增加叶黄素含量增加。这说明同样作为碳源的醋酸钠和葡萄糖的浓度变化对于微藻合成叶黄素的影响是不一致的,推测与类胡萝卜素合成的前体物质(如 IPP 等)有一定关系。Yuan 等<sup>[24]</sup>的研究同样也显示较低的糖浓度有利于叶黄素含量的提高。

用于微藻培养的常用氮源有氯化铵、尿素、硝酸盐等。如果在培养过程中不控制 pH 值,氯化铵作为氮源时会引起培养过程中 pH 值降低而抑制微藻的细胞生长;尿素的优点是不会引起 pH 值较大改变,但灭菌时易分解;硝酸盐由于灭菌方便应用较多,而且王素琴等的研究显示其有利于异养小球藻 USTB01 的叶黄素合成<sup>[25]</sup>。Shi 等<sup>[26]</sup>对以上三种不同氮源的比较研究结果显示,在 40g/L 葡萄糖起始浓度的异养培养下,尿素为细胞生长及叶黄素合成最佳氮源,同时,各种氮源浓度在 0.85~1.7g/L 之间时对生长均无抑制作用。

王素琴等<sup>[25]</sup>对小球藻 USTB01 的异养培养研究表

明,在 C/N 比 15~30 的范围内,小球藻细胞中叶黄素含量随碳氮比升高而降低,即氮饥饿不利于叶黄素的合成,这与笔者前期研究结果<sup>[27]</sup>类似,但与 C/N 比对其他类胡萝卜素的影响规律有所不同。通常认为低 C/N 比(即氮饥饿)有利于  $\beta$ -胡萝卜素、虾青素等类胡萝卜素含量的增加<sup>[28-31]</sup>。del Campo 等<sup>[10]</sup>的研究结果显示,在能够同时合成叶黄素和虾青素的 *C. Zofingiensis* 中,叶黄素和虾青素的积累规律有明显区别,二者对于环境因子及营养因子也有不同的响应,提示二者的代谢调控方式不同。

由于叶黄素是微藻的细胞内成分,而较高的起始糖浓度一般会对微藻生长产生抑制,从而减少叶黄素生产效率;而过低的起始糖浓度又无法保证高的最终叶黄素浓度;此外 C/N 比也对叶黄素积累产生明显影响。因此,叶黄素产率的进一步提高有必要采用优化的培养方式(如流加培养等)。Shi 等<sup>[32]</sup>通过控制底物浓度和在培养后期提高培养温度的方式,流加培养 *C. protothecoides* CS-41,实现了叶黄素的高效生产,经过 240h 的培养,达到 225mg/L 的叶黄素产量,生产效率为 0.94mg/L·h。Wu 等<sup>[33]</sup>通过采用神经网络模型对 *C. pyrenoidosa* 的异养流加培养方式进行优化,使细胞干质量浓度达到 116.2g/L,生产效率达到 1.020g/L·h。通过流加培养方式,叶黄素的产量和生产效率有望进一步提高。

#### 3.2 其他营养及环境因子

异养培养摇瓶实验结果显示,培养基中除 C/N 源之外的主要成分 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub> 在相当大范围内的改变对小球藻细胞生长及叶黄素积累影响均很小<sup>[27]</sup>。

尽管光照是包括叶黄素在内的各种类胡萝卜素合成的重要促进因子<sup>[34]</sup>,一些微藻(如小球藻)在黑暗条件下仍然可以合成相当量的叶黄素。由于在高密度培养条件下光照限制的问题,目前这一促进因子尚未在利用微藻生产叶黄素方面得到充分利用,其进一步发展有待于反应器设计等方面的改进。

培养过程中的 pH 值对微藻生长及叶黄素积累有显著影响。韩春然等<sup>[35]</sup>采用正交试验分析了几种因素对小球藻异养合成叶黄素影响的重要程度,结果表明,培养基初始 pH 值对叶黄素积累影响大于培养基组分及温度的影响。Shi 等<sup>[36]</sup>研究发现,原壳小球藻细胞生长和叶黄素合成的最适 pH 值范围均为 6~7;温度 28℃ 时有利于细胞生长和叶黄素总量的增加。类似的现象在绿藻 *Muriellopsis* sp. 叶黄素合成的研究中也观察到<sup>[8]</sup>。

异养培养摇瓶实验结果表明,培养液装量少或转速快有利于小球藻细胞生长和叶黄素合成,说明充足的通气量是小球藻合成叶黄素的必要条件<sup>[27]</sup>。这与胡萝卜素羟化酶(CHYB)活性可能高度依赖于活性氧的假设相符<sup>[17]</sup>。

以上研究显示,小球藻的细胞生长与叶黄素积累的

优化条件在多数情况下具有一致性,类似现象在异养培养栅藻(*Scenedesmus almeriensis*)研究中有报道,即有利于细胞生长光照、温度等环境参数同样也有利于叶黄素积累<sup>[12]</sup>。其原因可能是由于叶黄素一般被认为是一种初级类胡萝卜素,其合成与细胞生长有密切关系<sup>[37-38]</sup>。

#### 4 微藻生物合成叶黄素的动力学模型

发酵动力学模型的建立是分析发酵过程中各变量之间动态关系的重要手段。由于微藻培养参数及叶黄素合成规律的复杂性,采用模型化方法有助于深入理解这一生物过程,并实现其优化控制。

Zhang 等<sup>[39]</sup>在 *C. protothecoides* CS-41 分批异养培养实验的基础上,构建了如下动力学模型:

$$\text{细胞生长: } \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m SX}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \times \frac{N}{K_N + N} \times \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \quad (1)$$

$$\text{叶黄素合成: } \frac{dP}{dt} = \left(\alpha \frac{dX}{dt} + \beta X\right) \times \frac{S}{K_{PS} + S + \frac{S^2}{K_{PI}}} \times \frac{N}{K_{PN} + N} \quad (2)$$

式中:  $X$  为细胞浓度(g/L);  $\mu_m$  为最大比生长速率( $\text{h}^{-1}$ );  $S$  为葡萄糖浓度(g/L);  $K_s$  为葡萄糖饱和常数(g/L);  $K_i$  为葡萄糖抑制常数(g/L);  $K_N$  为氮源抑制常数(g/L);  $P$  为叶黄素产量(mg/L);  $P_m$  为最大叶黄素产量(mg/L);  $\alpha$  为生长相关的产物合成系数(mg/g);  $\beta$  为非生长相关的产物合成系数(mg/g·L);  $K_{PS}$  为叶黄素合成的葡萄糖饱和常数(mg/L);  $K_{PI}$  为叶黄素合成的葡萄糖抑制常数(mg/L);  $K_{PN}$  为叶黄素合成的氮源抑制常数(mg/L);  $N$  为氮源浓度(g/L);  $t$  为培养时间(h)。

该模型考虑了葡萄糖和氮源浓度对小球藻细胞生长和叶黄素合成的影响,并假设叶黄素的积累对小球藻生长的抑制以及叶黄素浓度上限的存在。该模型能较好地拟合分批培养实验数据,但叶黄素浓度上限的假设使得其不适用于流加培养(在流加培养实验中未观察到这一上限的存在)。

Shi 等<sup>[26]</sup>在研究尿素、硝酸盐及氯化铵三种不同氮源对 *C. protothecoides* CS-41 的细胞生长和叶黄素合成影响的基础上,建立了如下的动力学模型:

$$\text{细胞生长: } \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m N}{K_N + N} \times \frac{SX}{K_s + S} \quad (3)$$

$$\text{叶黄素合成: } \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4)$$

该模型考虑了氮源和葡萄糖浓度对小球藻细胞生长的影响,对于分析不同氮源的效应有一定意义。但模型中未考虑氮源和葡萄糖浓度对叶黄素积累的直接

影响。

笔者采用通过在不同碳、氮源浓度下的 *C. pyrenoidosa* 异养培养实验,构建了如下的动力学模型<sup>[40]</sup>:

$$\text{细胞生长: } \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m SX}{K_s + S} \exp(-S/K_i) \times \frac{1}{k_1 + k_2 N + k_3 N^2} \quad (5)$$

$$\text{when } N > 0 \quad \frac{dX}{dt} = 0 \quad \text{when } N \leq 0$$

$$\text{叶黄素合成: } \frac{dP}{dt} = \left(\alpha \frac{dX}{dt} + \beta X\right) \times \frac{1}{1 + S/K_{PI}} \times \frac{N}{K_{PN} + N} \quad (6)$$

式中  $k_1$ 、 $k_2$  和  $k_3$  均为常数,其他模型参数意义同前。

该模型比较充分地考虑了碳、氮源浓度对小球藻细胞生长和叶黄素合成的影响,具有较好的适用范围,可用于分批及流加培养过程的分析。

#### 5 叶黄素提取工艺研究

有机溶剂提取是到目前为止应用最为广泛的叶黄素提取方式。Li 等<sup>[41]</sup>以 *C. vulgaris* 为材料,采用二氯甲烷提取,然后用低浓度乙醇水溶液洗去杂质,再通过减压蒸发除去溶剂,将固形物用乙醇重新溶解,用正己烷萃取杂质,再将水稀释乙醇使叶黄素结晶,最终得到纯度为 90%~98% 的叶黄素,回收率为 85%~90%。桂林等比较了甲醇、乙醇、乙醚、石油醚、丙酮、正己烷、甲醇/二氯甲烷(1:1, V/V) 7 种有机溶剂系统对蛋白核小球藻中叶黄素的提取效率,结果表明,甲醇/二氯甲烷溶剂系统的提取效率最高,其次为甲醇,最适的提取温度为 45℃;通过正交试验确定的最佳工艺条件为:用细胞破碎机破碎藻细胞,以甲醇/二氯甲烷(2:1, V/V) 为提取剂,温度 30℃,破碎次数 2 次,破碎时间 5min/次,料液比 1:40(m/V),在此条件下提取率达到了 87.1%<sup>[42]</sup>。刘硕等<sup>[43]</sup>对异养培养小球藻 USTB-01 干粉中提取纯化叶黄素进行了研究,得到的优化工艺是:采用正己烷-乙醇混合试剂(617:110, V/V) 从藻细胞中提取叶黄素 1h,固液质量比为 1:50,可以从小球藻粉中高效提取出叶黄素和叶黄素酯类。用质量分数 20% 的 NaOH 溶液,在 50℃ 下皂化 6h,皂化剂用量为 1:40,可以高效地将叶黄素酯转化为叶黄素。藻粉中游离叶黄素的含量由 0.09% 提高到 0.32%,叶黄素纯度达到 80.6%。

由于有机溶剂提取方式操作繁琐且对产品质量及环境产生负面影响,一些研究者对新型工艺在叶黄素提取中的应用进行了探讨。Li 等<sup>[44]</sup>以小球藻叶黄素粗提取物为原料,采用正己烷:甲醇:水(4:3:1)组成的溶剂系统,进行高速逆流色谱分离,达到了 98% 的叶黄素纯度。

Shibata 等<sup>[45]</sup>用乙醚:正己烷(1:1)提取经气流粉碎后的小球藻粉中的类胡萝卜素,然后采用 Flash 柱色谱法,先后用正己烷和正己烷:丙酮:氯仿(7:2:1)进行洗脱,得到 99% 以上纯度的叶黄素,收率为 60%。Cisneros 等<sup>[46]</sup>用小球藻湿重 30% 的乙醇提取小球藻藻泥,然后以此粗提取物为材料,研究了叶黄素在 PEG-磷酸盐双水相系统中的分配行为,研究结果表明,由 22.9%(m/m) 的 PEG 8000 和 10.3%(m/m) 的磷酸盐在 pH 7.0 时形成的双水相系统中,大部分叶黄素分布于上相,而菌渣则分布于下相。叶黄素的收率达到 81.0%。Wu 等<sup>[47]</sup>对小球藻中叶黄素的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取进行了初步研究,研究结果显示,通过对主要操作参数的优化和携带剂乙醇的使用,叶黄素的最高提取效率可达到 87%,与采用传统溶剂提取方式的提取效率相近。由于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取具有绿色环保等多方面的优点,是一种值得继续深入研究及推广的工艺。

## 6 展 望

采用微藻生产叶黄素,取代大规模的万寿菊等植物栽培,是一种具有良好发展前景的方式。目前在高效叶黄素合成藻株筛选、培养参数优化以及提取工艺等方面的研究上都有了很大进展。尽管在生产效率和提取技术方面,微藻合成叶黄素已取得了相当于甚至高于其他已商业化的类胡萝卜素生产水平,但微藻细胞中叶黄素含量的相对偏低仍然是制约其进一步发展的瓶颈。今后努力的方向,应致力于提高微藻的细胞中叶黄素含量,包括继续筛选高产叶黄素的藻株、优化工艺参数以及高效的生物反应器设计等,但更重要的方面可能在于对微藻叶黄素合成代谢网络的优化,而这必然依赖于对微藻叶黄素合成代谢在各个层次上调控机制的深入理解,以及微藻基因操作体系的进一步完善。随着对相关机理认识的不断加深以及技术手段的迅速进步,相信采用微藻商业化生产叶黄素可以在不久的将来得以实现。

## 参考文献:

- [1] WANG M C, TSAO R, ZHANG S F, et al. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44: 1522-1529.
- [2] SATIA J A, LITTMAN A, SLATORE C G, et al. Long-term use of beta-carotene, retinol, lycopene, and lutein supplements and lung cancer risk: results from the vitamins and lifestyle (VITAL) study[J]. American Journal of Epidemiology, 2009, 169: 815-828.
- [3] IZUMI-NAGAI K, NAGAI N, OHGAMI K, et al. Macular pigment lutein is antiinflammatory in preventing choroidal neovascularization[J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2007, 27: 2555-2562.
- [4] MURIACH M, BOSCH-MORELL F, ARNAL E, et al. Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells *in vivo* and *in vitro*[J]. Journal of Physiology and Biochemistry, 2008, 64: 149-157.
- [5] CARPENTIER S, KNAUS M, SUH M Y. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49: 313-326.
- [6] JOHNSON E J, CHUNG H Y, CALDARELLA S M, et al. The influence of supplemental lutein and docosahexaenoic acid on serum, lipoproteins, and macular pigmentation[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87: 1521-1529.
- [7] 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.
- [8] DEL CAMPO J A, MORENO J, RODRIGUEZ H, et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta)[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 76: 51-59.
- [9] DEL CAMPO J A, RODRIGUEZ H, MORENO J, et al. Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 85: 289-295.
- [10] DEL CAMPO J A, RODRIGUEZ H, MORENO J, et al. Accumulation of lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 848-854.
- [11] SANSABA H, ENDO H. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 98: 437-444.
- [12] SANCHEZ J F, FERNANDEZ-SEVILLA J M, ACIEN F G, et al. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79: 719-729.
- [13] MANTZOURIDOU F, ROUKAS T, KOTZEKIDOU P. Production of beta-carotene from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in fed-batch culture[J]. Food Biotechnology, 2004, 18: 343-361.
- [14] LEE P C, SCHMIDT-DANNERT C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60: 1-11.
- [15] 赵文恩, 李艳杰, 崔艳红, 等. 类胡萝卜素生物合成途径及其控制与遗传操作[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 930-942.
- [16] NEUDER T U, MARTNEZ-FEREZ I, FRASER P D, et al. Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1392: 51-58.
- [17] LINDEN H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation[J]. Biochem Biophys Acta, 1999, 1446(3): 203-212.
- [18] 吴正云, 施春雷, 史贤明. 小球藻异养合成叶黄素的代谢流量分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 366-370.
- [19] SANDMANN G, ROMER S, FRASER P D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants[J]. Metabolic Engineering, 2006, 8: 291-302.
- [20] DUCREUX L J M, MORRIS W L, HEDLEY P E, et al. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56: 81-89.
- [21] FARMER W R, LIAO J C. Precursor balancing for the biocatalytic synthesis of lycopene in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Progress, 2001, 17: 57-61.
- [22] 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.
- [23] 张义明, 邱树毅, 袁建平. 钝顶螺旋藻在不同培养条件下的生长及其色素含量[J]. 贵州工业大学学报, 1998, 27(4): 87-90.

- [24] YUAN J P, CHEN F, LIU X, et al. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*[J]. Food Chemistry, 2002, 76: 319-325.
- [25] 王素琴, 李雅雯, 闫海, 等. 小球藻 USTB01 的异养培养和叶黄素的生产[J]. 北京科技大学学报, 2007, 29(8): 766-770.
- [26] 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.
- [27] 吴正云, 曲春波, 史贤明. 小球藻异养生长及叶黄素合成影响因子的优化研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2007, 25(1): 6-11.
- [28] 王培磊, 刘明河, 张学成, 等. 盐生杜氏藻对不同氮源吸收规律的比较研究[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 56-60.
- [29] 陈涛, 向文洲, 何慧, 等. 不同碳源对小球藻 *Chlorella zofingiensis* 异养产虾青素的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34: 856-858.
- [30] 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.
- [31] IP P F, CHEN F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 733-738.
- [32] SHI X M, JIANG Y, CHEN F. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture[J]. Biotechnology Progress, 2002, 18: 723-727.
- [33] WU Z Y, SHI X M. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44: 13-18.
- [34] MORENO J, GARCIA-GONZALEZ M, MANZANO J C. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-  $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor[J]. Journal of Bio-technology, 2005, 115: 81-90.
- [35] 韩春然, 马永强, 孙冰玉. 海水小球藻生产叶黄素的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28: 187-189.
- [36] SHI X M, WU Z Y, CHEN F. Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2006, 50: 763-768.
- [37] ZHANG D H, LEE Y K, NG M L, et al. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp.[J]. Journal of Applied Phycology, 1997, 9: 147-155.
- [38] WILSON K E, KROL M, HUNER N P A. Temperature-induced greening of *Chlorella vulgaris*. The role of the cellular energy balance and zeaxanthin-dependent nonphotochemical quenching[J]. Planta, 2003, 217: 616-627.
- [39] 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 and Biotechnology, 1999, 23: 503-507.
- [40] WU Z Y, SHI C L, SHI X M. Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23: 1233-1238.
- [41] LI H B, JIANG Y, CHENG F. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 1070-1072.
- [42] 桂林, 李琳, 胡松青, 等. 蛋白核小球藻中叶黄素提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26: 71-74.
- [43] 刘硕, 许倩倩, 张宾, 等. 从异养小球藻 USTB-01 中提取纯化叶黄素研究[J]. 现代化工, 2007, 27: 392-396.
- [44] LI H B, CHENG F, ZHANG T Y, et al. Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 905: 151-155.
- [45] SHIBATA S, ISHIHARA C, MATSUMOTO K. Improved separation method for highly purified lutein from *Chlorella* powder using jet mill and flash column chromatography on silica gel[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 6283-6286.
- [46] CISNEROS M, BENAVIDES J, BRENES C H, et al. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 807: 105-110.
- [47] WU Z Y, WU S M, SHI X M. Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Journal of Food Process Engineering, 2007, 30: 174-185.