

异养培养小球藻*Chlorella sp.* 生产叶黄素条件的优化

王淑慧^{1,2}, 林河通¹, 汪 靓^{2,*}, 曹莉莉³

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002;

2. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210;

3. 上海投资咨询公司, 上海 200003)

摘要:研究了异养条件下不同碳源、氮源、pH和温度等因素对一株自分离小球藻的生长及叶黄素产量的影响。结果表明,葡萄糖和硝酸钾分别是支持这株小球藻持续快速生长生产叶黄素的最好碳源和氮源。异养培养小球藻生产叶黄素的最好条件为:葡萄糖浓度 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硝酸钾浓度 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、初始pH6.0,温度 30°C ,叶黄素产量为 $12.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词:异养培养,小球藻,叶黄素,碳源,氮源

Optimization of heterotrophic culture conditions of *Chlorella sp.* for lutein production

WANG Shu-hui^{1,2}, LIN He-tong¹, WANG Liang^{2,*}, CAO Li-li³

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China;

3. Shanghai Investment Consulting Corporation, Shanghai 200003, China)

Abstract: The effect of carbon source, nitrogen source, pH as well as temperature on the growth of a self-isolated *Chlorella sp.* and the production of lutein were investigated. Results showed that glucose was the best carbon source and potassium nitrate was the best nitrogen source to support sustained and rapid growth of this strain of *Chlorella sp.* as well as lutein production. Results of optimization were as follows: the glucose concentration was $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, potassium nitrate concentration was $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, initial pH was 6.0 and temperature was 30°C . In this condition the maximal lutein concentration was $12.27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: *Chlorella sp.*; heterotrophic culture; lutein; carbon source; nitrogen source

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)04-0179-06

小球藻(*Chlorella*)为单细胞藻类,在分类学上属于绿藻门(*Chlorophyta*)、绿藻纲(*Chlorophyceae*)、绿球藻目(*Chlorococcales*)、小球藻科(*Chlorellaceae*)的一属^[1]。小球藻细胞中含有叶绿体等光合作用器官,可以利用光能和二氧化碳进行自养生长,某些藻种可在无光条件下,利用有机碳源进行异养生长^[2-3]。小球藻富含蛋白质、不饱和脂肪酸、叶黄素和多种维生素^[4],营养丰富、全面、均衡,具有极高的营养价值和生理功效。其中叶黄素具有广泛的生物学活性^[5]:它能有效地清除自由基、刺激机体的免疫反应、增强细胞间隙联络通讯、抑制肿瘤细胞的生长等,具有保护视力、防止老年人视黄斑退化、抗氧化、延缓动脉硬化、抗癌、抗衰老,预防溃疡等许多药用保健功效,是

目前国际上食品功能性成分研究中的一个热点。

叶黄素(lutein)广泛存在于花卉、水果、蔬菜等植物中,其中万寿菊为目前最主要的叶黄素来源^[6-8]。然而大规模的栽培,存在占地面积大、易受季节、气候及地域等条件的限制,造成生产效率低、提取成本高^[9]。采用化学方法合成工艺复杂、难以合成单一异构体的叶黄素,而且其生理活性明显低于天然提取的产物^[10]。研究发现微藻类不仅生长速度快,且细胞中的类胡萝卜素特别是叶黄素含量可达0.27%~0.31%^[4, 11-13],因此人们对微藻作为叶黄素的另一来源进行了一系列的研究^[4]。

目前发现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*)^[15]。Shi^[14]比较了来源于3种类型小球藻(*C. vulgaris*、*C. protothecoides*、*C. pyrenoidosa*)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,细胞叶黄素含量及产量分别为 $4.85\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $66.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

收稿日期:2013-07-04 * 通讯联系人

作者简介:王淑慧(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品贮藏保鲜原理与应用。

基金项目:国家自然科学基金(51208305);上海市科委浦江人才计划项目(13PJ1407600)。

Sansawa等^[15]对小球藻*C. regularis* S-50进行异养培养,细胞干重和叶黄素产量分别达到 $84\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3.5\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。Sanchez等^[16]从自然界中分离得到一株高产叶黄素的栅藻(*S. almeriensis*),细胞中叶黄素含量达到 $5.5\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。从细胞生长和细胞叶黄素产量上综合考虑,小球藻是目前最具生产潜力的藻类叶黄素源。本研究通过单因素影响实验探讨了不同培养条件下小球藻细胞生长和叶黄素含量变化,旨在为异养培养小球藻生产叶黄素等天然功能性成分提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

小球藻(*Chlorella sp.*) 用TAP培养基制成琼脂平板保存藻种,用基础Basal培养基异养转化、二级放大用于实验研究;葡萄糖、碳酸氢钠、硝酸钾、氯化铵、尿素、二氯甲烷 均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙腈 HPLC色谱纯,Sigma-Aldrich公司;叶黄素标准品 Sigma-Aldrich公司。

RID-10A/SPD-20A 高效液相色谱仪 日本SHIMADZU;BSA 224S-CW电子天平、PB-10 pH计 德国Sartorius;ZHJH-C1115C超净工作台 上海智城分析仪器制造有限公司;HZ-9310KGB光照冷冻摇床 太仓市华利达实验设备有限公司;MLS-3780高压蒸汽灭菌器 日本三洋;ZHWH-110X50往返式恒温水浴摇床 上海智城分析仪器制造有限公司;Centrifuge5424小型离心机 德国Eppendorf;HACH DR2800分光光度计 美国哈希。

1.2 培养条件

用于小球藻扩培的为基础Basal培养基^[17]。培养器皿为250mL三角瓶,培养量100mL,pH调至6.5,经过 115°C 15min的高温灭菌后在 28°C 摇床中暗培养,转速为200r/min。

1.2.1 碳源的确 定 分别以葡萄糖、乙酸钠、甲醇作为唯一碳源,设定初始的总碳浓度为 $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。硝酸钾为氮源,保持其浓度为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,保持pH为6.5,在 28°C 200r/min摇床暗培养。

1.2.2 葡萄糖浓度的确定 初始葡萄糖浓度分别为:0、5、10、20、30、40、60、 $120\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。硝酸钾为氮源,保持其浓度为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,保持pH为6.5,在 28°C 200r/min摇床暗培养。

1.2.3 氮源的确 定 分别以硝酸钾、氯化铵、尿素作为唯一氮源,初始的总氮浓度为 $173\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。葡萄糖为碳源,其浓度为 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,保持pH为6.5,在 28°C 200r/min摇床暗培养。

1.2.4 硝酸钾浓度的确定 初始硝酸钾浓度分别为:0、0.625、1.25、2.5、5、 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。葡萄糖为碳源,其浓度为 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,保持pH为6.5,在 28°C 200r/min摇床暗培养。

1.2.5 pH的确 定 初始pH分别为:5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。葡萄糖为碳源,其浓度为 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;硝酸钾为氮源,浓度为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,在 28°C 200r/min摇床暗培养。

1.2.6 温度的确定 培养温度分别设置为:20、25、28、30、34、 37°C 。葡萄糖为碳源,其浓度为 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;硝酸钾为氮源,浓度为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,保持pH为6.5,200r/min

摇床暗培养。

1.3 测定方法

1.3.1 生物量的测定 采用浊度比色法^[18]。浊度比色法用HACH DR 2800分光光度计测定培养液在540nm处的光密度(OD_{540}),测定时确保OD在0.2~0.8之间。

1.3.2 葡萄糖的测定 利用3,5-二硝基水杨酸法,具体参照参考文献[19]。

1.3.3 硝酸根的测定 采用水质-硝酸盐氮的测定-紫外分光光度法。

1.3.4 叶黄素的提取 采用桂林等^[20]有机溶剂萃取法。在小球藻培养过程中及结束后,取2mL藻液,离心(10000r/min, 10min),弃上清,将沉降于离心管底部的藻泥进行 -20°C 冷冻48h,加入2mL甲醇/二氯甲烷(体积比2:1)溶液,水浴摇床(35°C , 150r/min) 30min,离心(10000r/min, 2min),取上清液进行HPLC测定。

1.3.5 叶黄素的检测 叶黄素标准品用甲醇溶解,配制成质量浓度分别为5、10、20、30、40、 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的叶黄素标准溶液,在HPLC上进行测定,得到叶黄素峰面积(y)与叶黄素浓度(x)的一元线性回归方程($y=173534x-373008, R^2=0.9991$)。实验中根据测定样品的峰面积带入建立的一元线性回归方程,即可计算出对应的叶黄素浓度。

色谱条件为:高效液相色谱(HPLC)仪(岛津LC-20AD泵,SPD-M20A 二极管阵列检测器)、Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(4.6mm×250mm, 5 μm)色谱柱、流动相为甲醇/乙腈(v/v):90/10,流速为1mL/min,进样量为20 μL ,柱温 28°C ,检测波长447nm。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对小球藻生长状况及叶黄素产量的影响

图1显示葡萄糖作为碳源时,小球藻可持续快速生长,且在第3d生物量达最大(OD_{540} 为17.58);乙酸钠为碳源时,初期生长状况良好,培养至第2d生物量最大(OD_{540} 为6.7),之后出现生长抑制。由图2可以看出,随着 CH_3COO^- 的利用,培养基的pH逐渐升高,达抑制小球藻生长的9.0以上,这与文献[21]得到的结果一致;甲醇为碳源时,小球藻生长停滞,可见小球藻不能利用甲醇做碳源进行异养生长。上述结果表明,葡萄糖是支持小球藻快速稳定生长的最佳碳源。

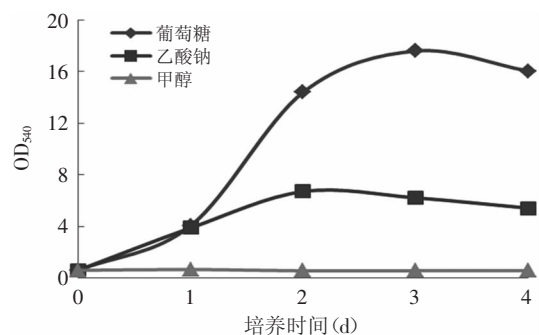


图1 不同碳源条件下OD的变化

Fig.1 The variation of OD under different carbon source

这与文献[21-23]得到的结果一致。

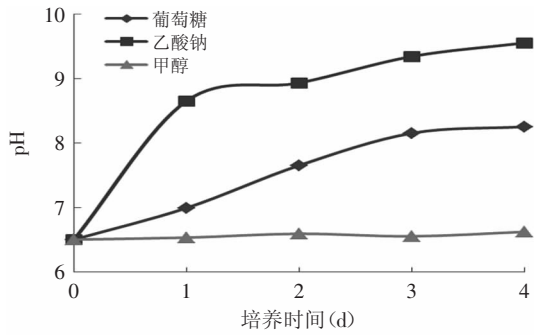


图2 不同碳源条件下pH的变化

Fig.2 The variation of pH under different carbon source

由图3可以看出,以葡萄糖、乙酸钠、甲醇作为唯一碳源时,小球藻均可生产叶黄素。当以葡萄糖为唯一碳源时,叶黄素产量最高达 $9.339\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;以乙酸钠、甲醇作为唯一碳源时,叶黄素的含量仅为葡萄糖作碳源时的76.9%和52%,进一步说明葡萄糖不仅支持小球藻快速生长,而且有利于小球藻细胞叶黄素的积累。

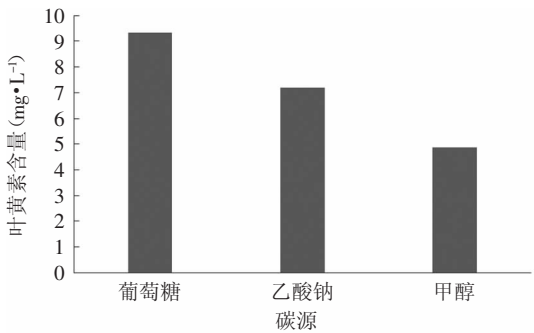


图3 碳源对叶黄素的产量的影响

Fig.3 Effect of carbon source on the lutein yield

2.2 葡萄糖浓度对小球藻生长状况及叶黄素产量的影响

确定葡萄糖为最佳碳源之后,进一步探索其最佳添加浓度。培养基中葡萄糖的初始浓度分别设置为:0、5、10、20、30、40、60、120 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由图4可以看出,异养条件下不添加葡萄糖,小球藻不增殖;当葡萄糖

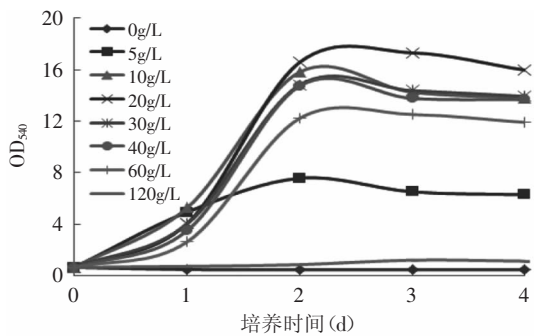


图4 葡萄糖浓度对小球藻生长的影响

Fig.4 The effect of glucose concentration on growth of *Chlorella sp.*

浓度较低($<20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)时,培养后期出现生长停滞,这是由于葡萄糖消耗殆尽,培养基中缺乏碳源所致,说明葡萄糖是小球藻异养生长的限制性基质;高浓度的葡萄糖($>20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)则抑制小球藻生长,并且抑制现象随着糖浓度增加越来越明显。故适宜小球藻异养生长的最佳葡萄糖浓度为 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

由图5可以看出,当葡萄糖浓度 $\leq 60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶黄素的产量随葡萄糖浓度的升高而增大,其中当葡萄糖浓度为0~ $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随葡萄糖浓度的增大,叶黄素产量增长速度明显;葡萄糖初始浓度为 $20\sim 60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养4d后,叶黄素产量逐渐增大,但增长幅度较小;当葡萄糖浓度达到 $120\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小球藻生物量与空白相比几乎无增长,导致叶黄素产量较低,只有 $3.35\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养结束后测定培养基中的残糖。当葡萄糖初始浓度为10、20、30、40、 $60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其剩余浓度分别为0、7.56、17.89、27.94、 $50.6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综合考虑葡萄糖利用及最终叶黄素浓度,葡萄糖的最佳浓度选择 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

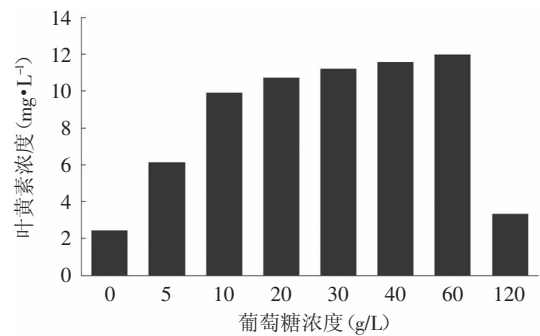


图5 葡萄糖浓度对叶黄素产量的影响

Fig.5 The effect of glucose concentration on the lutein yield

2.3 不同氮源对小球藻生长状况及叶黄素产量的影响

图6、图7结果显示,在硝酸钾、氯化铵、尿素三种氮源下,小球藻均能生长,但因种类不同,生长状况各异。硝酸钾作为唯一氮源时,小球藻持续快速生长,且培养3d后生物量达最大(OD_{540} 为17.55),尿素作为唯一氮源时,初期生长状况良好,培养至第3d生物量达到较高水平, OD_{540} 为15.3,可见小球藻可以利用尿素作为氮源进行生长;氯化铵作为唯一氮源时,培养第1d小球藻生长良好,此后进入生长停滞阶段,这是由于随着 NH_4^+ 被小球藻吸收利用,为保证细胞内电荷平衡释放出对应数量的 H^+ ,使得培养基中的pH迅速降低至4.5以下,抑制了小球藻的进一步生长^[23]。上述结果表明,与氯化铵、尿素相比,硝酸钾是支持小球藻快速稳定生长的最佳氮源。

由图8可以看出,以硝酸钾、氯化铵、尿素作为唯一氮源时,小球藻均可产生叶黄素。当以硝酸钾为唯一氮源时,叶黄素产量最高达 $9.338\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (干重计的产量为: $2.159\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$);以尿素作为唯一氮源时,叶黄素的含量次之为 $7.263\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以氯化铵为唯一氮源时,叶黄素的产量最低,仅为 $5.071\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,进一步说明硝酸钾不仅支持小球藻快速生长,而且有利于小球藻细胞中叶黄素的合成。对比王素琴等^[21]以硝酸钾为

氮源,利用USTB01生产叶黄素,其产量为 $0.69\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

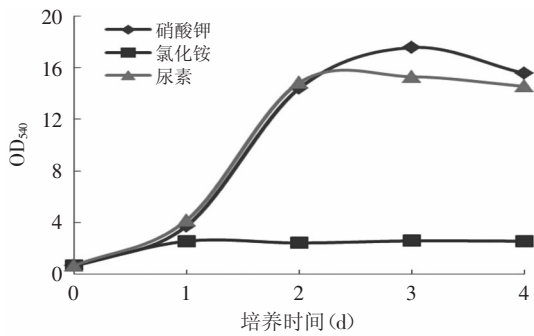


图6 氮源对小球藻生长的影响

Fig.6 Effect of nitrogen source on growth of *Chlorella vulgaris*

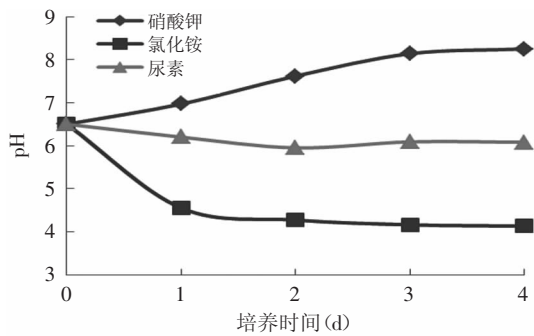


图7 不同氮源条件下pH的变化

Fig.7 The variation of pH under different carbon resource

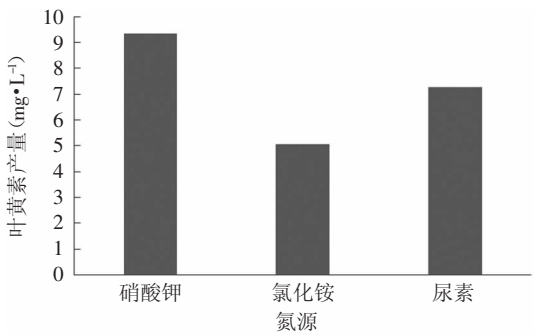


图8 氮源对叶黄素的产量的影响

Fig.8 Effect of nitrogen source on the lutein yield

2.4 氮源浓度对小球藻生长状况及叶黄素产量的影响

确定硝酸钾为最佳氮源之后,进一步探索其最佳添加浓度。设定培养基中硝酸钾的初始浓度为:0、0.625、1.25、2.5、5、 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由图9可以看出,异养条件下不添加硝酸钾,小球藻有微弱的生长迹象,生长极其缓慢;当硝酸钾的浓度 $\leq 1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,OD₅₄₀随硝酸钾浓度的增大而增大;当硝酸钾的浓度为1.25~ $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间时,随着硝酸钾浓度的增大,小球藻的生长略受抑制。说明适宜小球藻异养生长的最佳硝酸钾浓度为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

由图10可以看出,在实验浓度范围内,叶黄素的产量随硝酸钾浓度的升高而增大,说明硝酸钾是影响叶黄素产量的限制性因子。其中当硝酸钾浓度为0~ $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随硝酸钾浓度的增大,叶黄素产量增

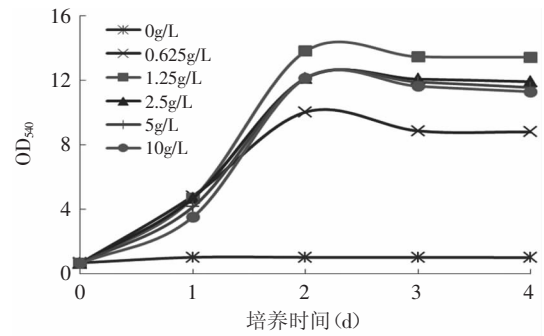


图9 硝酸钾浓度对小球藻异养生长的影响

Fig.9 The effect of potassium nitrate concentration on growth of *Chlorella sp.*

大速度较快,这与此浓度区间微藻生物量的线性增长密切相关;硝酸钾初始浓度为 $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,培养4d后,叶黄素产量为 $10.46\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;当硝酸钾浓度为 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时培养4d后,叶黄素产量达 $12.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养结束后测定培养基中的残氮(NO_3^--N),结果如下:当硝酸钾初始浓度小于 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养4d后,培养基中的 NO_3^--N 消耗殆尽;当培养基中硝酸钾的初始浓度为2.5、5、 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养4d后剩余 NO_3^--N 的浓度分别为0.448、3.024、 $7.771\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综合考虑,硝酸钾的最佳浓度为 $1.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

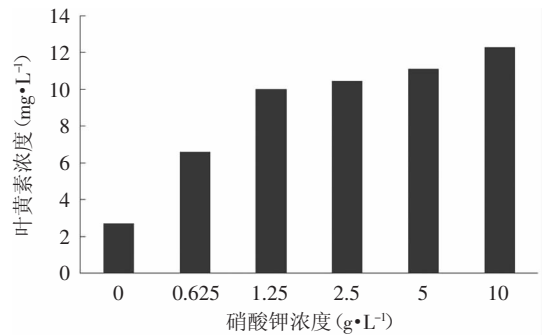


图10 硝酸钾浓度对叶黄素产量的影响

Fig.10 The effect of nitrogen concentration on the lutein yield

2.5 初始pH对小球藻生长状况及叶黄素产量的影响

由图11可以看出,虽然培养基中的初始pH不同,但小球藻可在初始培养阶段,自动调整至相当水平,之后随着培养时间的延长,呈现逐渐增大的趋势;这是由于培养基中的氮源为硝酸钾,小球藻在吸收

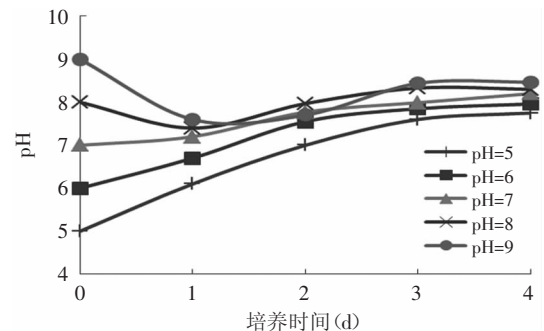


图11 不同初始pH时,pH随培养时间的变化

Fig.11 The variation of pH under different original pHs

NO₃⁻的过程中伴随质子共转运,使培养基中质子浓度降低,导致培养基pH上升^[22]。

由图12可以看出,虽然初始pH不同,但随着培养时间的延长,OD₅₄₀呈现相同的变化趋势,最大值均出现在第3d。培养液的初始pH为5.0、6.0、7.0、8.0时均利于小球藻的生长,并且最终的生物量差别不大。初始pH为6.0时的OD₅₄₀最大,为17.1。当初始pH为8.0时,经过115℃ 15min灭菌后,培养基呈现淡黄色,不利于实验结果的观察。而且不同初始pH时,最后的叶黄素浓度均在7.98~8.3mg·L⁻¹的范围,故初始pH选择6.0为佳。

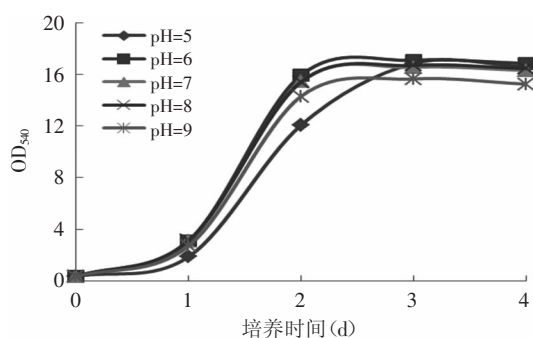


图12 不同初始pH条件下,OD随培养时间的变化
Fig.12 The variation of OD under different original pHs

2.6 不同温度对小球藻生长状况及叶黄素产量的影响

为了研究温度对这株小球藻生长及叶黄素产量的影响,本实验选取20、25、28、30、34、37℃六个温度,培养时间为5d。由图13可以看出,在设置的温度范围内,较高的温度,延迟期短,细胞内酶活性强,代谢旺盛。温度较低时(20、25℃)细胞内酶活性低、代谢迟缓,延滞期长,达到最大生物量所需的之间较长。当培养温度为20℃时,培养5d后OD₅₄₀最大为16.57;当培养温度为25℃和28℃时,4d生物量达最大,OD₅₄₀分别为14.92、14.97;当培养温度为30℃时,2d后生物量达到最大,OD₅₄₀为16.00。当培养温度为34℃和37℃时,三个平行中均有一个在培养初期出现了生长抑制现象,后期生长迅速,并于第3d达到相当水平。当培养温度为20~30℃范围内,藻细胞的生长速率随温度的升高而增大,在30~37℃范围内随着温度的升高而降低,并有生长抑制现象发生。从以上结

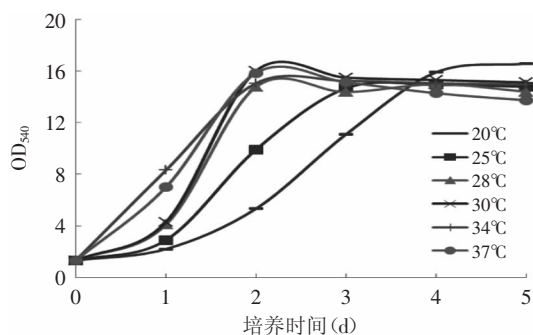


图13 温度对小球藻生长的影响
Fig.13 Effect of temperature on growth of *chlorella sp.*

果看,30℃的培养温度较适宜小球藻*chlorella sp.*生长。

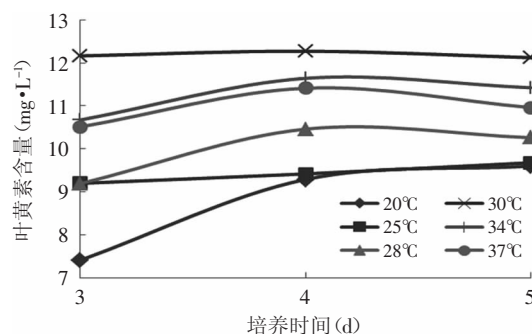


图14 不同温度下,培养后期叶黄素在微藻细胞中的演变规律
Fig.14 Lutein evolution in microalgae in late culture stage under different temperatures

由图14可以看出,在各个培养温度下,叶黄素的浓度均在第4d达最大,其中培养温度为30℃时最大为12.27mg·L⁻¹。所以,小球藻异养培养生产叶黄素的最佳温度为30℃。

3 结论

对影响小球藻*Chlorella sp.*生长和叶黄素产量的几个关键因子进行了单因素影响实验,结果表明:

- 3.1 与乙酸钠、甲醇相比,葡萄糖是支持小球藻异养培养生产叶黄素的最佳碳源,最适浓度为20g·L⁻¹。
- 3.2 与尿素、氯化铵相比,硝酸钾是支持小球藻异养培养生产叶黄素的最佳氮源,最适浓度为1.25g·L⁻¹。
- 3.3 初始pH5.0~9.0范围对叶黄素的产量无明显影响,小球藻*Chlorella sp.*最适生长的初始pH为6.0。
- 3.4 30℃不仅是小球藻快速生长的最佳温度,而且是促进小球藻生物合成叶黄素的最适温度。

在葡萄糖浓度20g·L⁻¹、硝酸钾浓度1.25g·L⁻¹,初始pH6.0,温度30℃的培养条件下叶黄素的产量为12.27mg·L⁻¹。

参考文献

- [1] 胡月薇,邱承光,曲春波,等. 小球藻处理废水研究进展[J]. 环境科学与技术,2003,26(4):48-50.
- [2] Krinsky NI. Carotene and cancer in animal models[J]. The Journal of Nutrition,1989,119(1):123-126.
- [3] Philip. Purification of lutein-fatty acid esters from plant materials:US,4048203A[P]. 1977-09-13.
- [4] 陈峰,姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995:55.
- [5] 吴正云,史贤明,曾娟. 藻生物合成叶黄素的研究进展[J]. 食品科学,2010,31(1):268-273.
- [6] 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(5):71-74.
- [7] Chen F, Shi X M, Jiang Y. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture[J]. Biotechnol Prog,2002,18(4):723-727.
- [8] Rong T, Raymond Y, Christopher Y, et al. Separation of

(下转第188页)

- [3] 沈金玉,黄家音,李晓莉. 果蔬酶促褐变机理及抑制方法研究进展[J]. 食品研究与开发,2005,26(6):150-155.
- [4] 王璋. 食品酶学[M]. 北京:轻工业出版社,1990:254-274.
- [5] Gisela P O, Alicia O M, Lidia D, *et al.* Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey(*Pouteria sapota*)[J]. *Phytochemistry*,2011,72:82-88.
- [6] 刘春丽,杨跃寰,陈欲云. 荔枝果肉多酚氧化酶酶学性质研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(2):646-648,651
- [7] 张勇,建伟,温其标,等. 香蕉多酚氧化酶褐变性质的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(5):53-57.
- [8] Mishra B B, Gautam S, Sharma A. Purification and characterisation of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*)[J]. *Food Chemistry*,2012,134(4):1855-1861.
- [9] Marri C, Frazzoli A, Hochkoeppler A, *et al.* Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers[J]. *Phytochemistry*,2003,63:745-752.
- [10] 钟振声,潘晓琴,方颖通. 菊芋多酚氧化酶的酶学性质[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2010,38(12):135-139.
- [11] 朱继英,王健,王相友. 双孢蘑菇多酚氧化酶的分离、纯化及特性分析[J]. 园艺学报,2012,39(4):763-768.
- [12] 李君兰,李怡华,赵秋玲,等. 鸡腿蘑多酚氧化酶特性研究[J]. 食品科学,2007,28(1):187-191.
- [13] 潘永贵,陈维信. 鲜切莲藕组织中多酚氧化酶的分离纯化[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(2):55-60.
- [14] Guo L, Ma Y, Shi J, *et al.* The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. *Food Chemistry*,2009,117:143-151.
- [15] 黄树苹,谈大明,徐长城,等. 丝瓜多酚氧化酶的酶学特性初步研究[J]. 中国蔬菜,2009(10):17-22.
- [16] 王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [17] Xu J S, Zheng T L, Meguro S, *et al.* Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*)[J]. *The Japan Wood Research Society*,2004,50:260-265.
- [18] 潘道东,李敏. 嗜酸乳杆菌细胞壁蛋白酶的分离纯化及酶学性质的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(4):48-56.
- [19] Aydemir T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads [J]. *Food Chemistry*,2004,87:59-67.
- [20] 赵飞,乔旭光. 大蒜 γ -谷氨酰转肽酶的分离纯化和部分酶学性质研究[J]. 中国食品学报,2009,9(1):41-45.
- [21] Oktay A, Mahmut E, Selma S, *et al.* Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties[J]. *Food Chemistry*,2004,88:479-484.
- [22] Mdluli K M. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*) [J]. *Food Chemistry*,2005,92:311-323.
- [23] 潘道东,韩玲玲. 根霉凝乳酶的分离纯化及其酶学特性研究[J]. 中国食品学报,2011,11(2):53-59.
- [24] Robert C, Cadet F. The Inhibition of studies on polyphenoloxidase by cysteine[J]. *Biochem Educa*,1996,24:157-159.
- [25] Ding C K, Chachin K, Ueda Y, *et al.* Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds[J]. *Food Chemistry*,2002,76:213-218.
- [26] 孔维宝,陆健,赵海锋,等. L-半胱氨酸抑制多酚氧化酶的机制研究[J]. 食品科学,2007,28(11):66-70.

(上接第183页)

- geometric isomer of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Chromatography: A*,2004,1045(1):65-70.
- [9] Oliver J. Chromatographic determination of carotenoids in foods [J]. *Chromatography A*,2000,881(1):543-555.
- [10] 杜桂彩,郭群群,滕大为,等. 高纯度叶黄素的制备及稳定性研究[J]. 精细化工,2004,21(6):447-449.
- [11] 闫海,周洁,何宏胜,等. 小球藻的筛选和异养培养[J]. 北京科技大学学报,2005,27(4):408-412.
- [12] Val J, Monger E, Baker NR, *et al.* An Improved HPLC method for rapid analysis of the xanthophyll cycle pigments[J]. *Chromatographic Science*,1994,32(7):286-289.
- [13] Piccaglia R, Marotti M. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *Terecta*[J]. *Industrial Crops and Products*,1998(8):45-51.
- [14] Shi X M, Chen F, Yuan J P, *et al.* Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella* strains[J]. *Applied Phycology*,1997(9):445-450.
- [15] Sansawa H, Endo H. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions [J].

- Bioscience and Bioengineering*,2004,98(6):437-444.
- [16] 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(5):719-729.
- [17] Borowitzka MA, Borowitzka LJ. *Microalgal Biotechnology*[M]. London: Cambridge University,1988:13.
- [18] Becker E W. Measurement of algal growth In *Microalgal Biotechnology & Microbiology* [M]. Cambridge: Cambridge University,1994,56-62.
- [19] 王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京:中国农业出版社,2005:78-79.
- [20] 桂林. 蛋白核小球藻培养方式的比较及其叶黄素的提取检测[D]. 武汉:华中农业大学,2001.
- [21] 王素琴,李雅雯,闫海,等. 小球藻USTB01的异养培养和叶黄素生产[J]. 北京科技大学学报,2007,29(8):766-770.
- [22] 张丽君,杨汝德,肖恒. 小球藻的异养生长及培养条件优化[J]. 广州植物,2001,21(4):353-357.
- [23] 余若黔,刘学铭,梁世中,等. 小球藻的异养生长特性研究[J]. 海洋通报,2000(6):57-62.