

培养条件对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响

王 婷, 冯 佳, 谢树莲*

(山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

摘要:为了优化杜氏藻的培养条件,对采自山西运城盐湖的杜氏藻(*Dunaliella* sp.)采用单因素和正交实验方法,研究了温度、盐度和氮、磷、铁元素对其细胞增殖和 β -胡萝卜素积累的影响。结果显示杜氏藻的 β -胡萝卜素含量与吸光度 OD_{453nm} 之间存在良好的线性关系,利用吸光值表征杜氏藻 β -胡萝卜素含量步骤简单,数据准确,适于高效快速对样品进行测定。杜氏藻在20~25℃,1.0~2.0mol/L NaCl时,较有利于 β -胡萝卜素积累。杜氏藻生长至对数期后,高浓度的氮源、磷源都不利于 β -胡萝卜素的积累,而铁源在实验期间,对杜氏藻 β -胡萝卜素的积累无影响。进一步优化,培养基中有利于 β -胡萝卜素积累的 $NaNO_3$ 、 KH_2PO_4 和 $FeC_6H_5O_7$ 的浓度最优组合为0.6200、0.0256、0.0010g/L。本实验得到了较适合杜氏藻积累 β -胡萝卜素的培养基,为今后当地开发利用高产 β -胡萝卜素藻株奠定了理论基础。

关键词:杜氏藻,细胞密度, β -胡萝卜素,培养条件优化

Effects on culture conditions for β -carotene contents of *Dunaliella* sp.

WANG Ting, FENG Jia, XIE Shu-lian*

(School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The single factor and orthogonal experiments were performed to optimize the cultivating conditions of *Dunaliella* sp. which was collected from salt lake in Yuncheng, Shanxi, China. Temperature, NaCl, N, P and Fe were studied for effects on β -carotene contents of *Dunaliella* sp. The results showed that there was a good linear relationship between β -carotene contents of *Dunaliella* sp. and OD_{453nm} . The β -carotene contents of *Dunaliella* sp. was measured by the method of optical density which was simple, accurate and efficient. *Dunaliella* sp. was cultured under 20~25℃ and 1.0~2.0mol/L (NaCl) that were conducive to the β -carotene accumulation. When *Dunaliella* sp. cells grow to the logarithmic phase, high concentrations of N and P were not conducive to the accumulation of β -carotene, and the concentration of Fe had no effect on the accumulation of β -carotene. The optimum concentrations of $NaNO_3$, KH_2PO_4 and $FeC_6H_5O_7$ for β -carotene accumulation were 0.6200, 0.0256, 0.0010g/L. The medium for β -carotene accumulation of *Dunaliella* sp. was optimized for lay the theoretical foundation of future development and utilization of local high β -carotene production algae strains.

Key words: *Dunaliella* sp.; cell density; β -carotene; optimization of culture condition

中图分类号: Q945.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)24-0177-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.24.029

杜氏藻(*Dunaliella* sp.)是缺乏严格细胞壁的单细胞绿藻^[1-2]。在人工控制和胁迫条件下,盐生杜氏藻(*D. salina*)和巴氏杜氏藻(*D. bardawil*)可以合成和积累大量的 β -胡萝卜素^[3-4],最高可达干重的14%^[5]。自然界中 β -胡萝卜素分布虽然较为广泛,但含量甚微,很难从天然产物中获取。杜氏藻被认为是生产天然 β -胡萝卜素,也是保健食品的理想资源^[6-7],具有良好的市场前景。

然而,不同种类甚至不同株系的杜氏藻,其细胞

增殖和积累 β -胡萝卜素的最适培养条件存在很大差异^[8]。而且,通过特定的调控,杜氏藻还可改变其代谢途径,在细胞内合成并积累大量的 β -胡萝卜素^[9]。但在 β -胡萝卜素大量积累的同时,往往伴随着其生长和繁殖速率降低,这样就使获得产物的周期变长,成本也提高了。如何解决这一矛盾,平衡两者之间的关系,是实际生产中的一个关键问题。近年来培养杜氏藻生产天然 β -胡萝卜素受到各国的重视。Michael等研究了盐度对澳大利亚西部和南部以及昆士兰州杜氏藻品系的影响^[10], Nguyen等对美国的杜氏藻品系进行过研究^[11]。我国目前所研究报道的杜氏藻中尚未见来自山西运城盐湖的品系^[2, 12-13]。本研究以采自运城盐湖的杜氏藻品系为对象,通过对其细胞增殖和 β -胡萝卜素积累的最适培养条件进行优化,以期今后当地生产应用提供理论依据。

收稿日期: 2014-02-27

作者简介: 王婷(1989-),女,硕士研究生,研究方向:植物资源与利用。

*通讯作者: 谢树莲(1962-),女,博士,教授,研究方向:植物资源与利用。

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(31170193)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验用藻种杜氏藻 (*Dunaliella* sp.) 采自山西省运城盐湖, 并经本实验室纯化选育; *Dunaliella* 培养基成分和微量元素成分 参照文献[13], 不同培养条件优化在此基础上对成分作相应的调整; 丙酮、石油醚等 均为分析纯。

SPX-250B-G光照培养箱 上海博讯; 752PC型紫外可见分光光度计 上海光谱; SK200生物显微镜 麦克奥迪实业集团有限公司; IMS-30全自动雪花制冰机 常熟市雪科电器有限公司; SCIENTZ-II D超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; HC-2518R高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件 实验材料于光照培养箱中培养, 光暗周期L:D为16h:8h, 光强为20000lx, 每日摇瓶2~3次。

1.2.2 全波长扫描 采用紫外可见分光光度计全波长扫描, 确定杜氏藻 β -胡萝卜素的最大吸光值处的波长。

1.2.3 温度对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响 设置5个温度梯度, 分别为10、15、20、25、30℃。将1mL藻液接种到培养基中, 盐度为2.0mol/L, 培养基成分含量参照文献[13], 每个梯度设3个水平。每隔3d测定 β -胡萝卜素含量。

1.2.4 盐度对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响 设置6个盐度梯度, 分别为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mol/L。将1mL藻液接种到培养基中, 温度为20℃, 培养基成分含量参照文献[13], 每个梯度设3个水平。每隔3d测定 β -胡萝卜素含量。

1.2.5 氮源对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响 设置5个氮源浓度梯度, 分别为0.22、0.42、0.62、0.82、1.02g/L。将1mL藻液接种到培养基中, 温度为20℃, 培养基中盐度为1.0mol/L, 其余成分含量参照文献[13], 每个梯度设3个水平。每隔3d测定 β -胡萝卜素含量。

1.2.6 磷源对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响 设置5个磷源浓度梯度, 分别为0.0056、0.0156、0.0256、0.0356、0.0456g/L。将1mL藻液接种到培养基中, 温度为20℃, 培养基中盐度为1.0 mol/L, 其余成分含量参照文献[13], 每个梯度设3个水平。每隔3d测定 β -胡萝卜素含量。

1.2.7 铁源对杜氏藻 β -胡萝卜素含量的影响 设置5个铁源浓度梯度, 分别为0.001、0.005、0.009、0.013、0.017g/L。将1mL藻液接种到培养基中, 温度为20℃, 培养基中盐度为1.0mol/L, 其余成分含量参照文献[13], 每个梯度设3个水平。每隔3d测定 β -胡萝卜素含量。

1.2.8 杜氏藻培养基中氮源(N)、磷源(P)及铁源(Fe)元素的优化 影响杜氏藻生长的主要元素有氮源(N)、磷源(P)及铁源(Fe), 基于单因素实验结果, 采用 $L_{27}(3^{13})$ 正交实验法对培养基中的 NaNO_3 、 KH_2PO_4 和 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 浓度进行了进一步优化^[13-16]。每个梯度设

3个重复, 每瓶培养基取170mL, 接种1mL的藻液, 27d后测定 β -胡萝卜素的吸光度值。培养温度为20℃, NaCl 浓度为1.0mol/L。正交因子水平表见表1。

表1 本实验采用的正交因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment in the study

水平	因素		
	A NaNO_3 (g/L)	B $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	C $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (g/L)
1	0.2200	0.0056	0.0010
2	0.4200	0.0156	0.0050
3	0.6200	0.0256	0.0090

1.2.9 β -胡萝卜素标准曲线的绘制 根据有关文献[17], 准确称取 β -胡萝卜素标准样品20mg, 置于25mL棕色容量瓶中, 用丙酮:石油醚(3:7)定容, 摇匀。取此溶液10mL置于100mL棕色容量瓶中, 以丙酮:石油醚(3:7)定容, 摇匀, 此溶液浓度为8.0mg/mL。分别取溶液0.00、0.25、0.75、1.00mL, 置于10mL棕色容量瓶中, 以丙酮:石油醚(3:7)定容, 摇匀, 使其浓度分别为0.0、2.0、4.0、6.0mg/100mL。在最大吸收波长处测定吸光值, 绘制标准曲线。

1.2.10 杜氏藻 β -胡萝卜素含量的测定 取2mL藻液离心(5000r/min, 5min)后弃上清, 加入5mL的丙酮:石油醚(3:7)溶液, 静置5min后超声波破碎(功率40W, 3min, 破碎8s, 间隔5s), 再次离心(5000r/min, 5min)后将上清液置于含有30mL 5% Na_2SO_4 溶液的分液漏斗中, 振荡分液漏斗, 静置待分层后, 弃去下层, 再用15mL 5% Na_2SO_4 溶液振荡洗涤, 重复3次^[18-19]。在分液漏斗中加入2g无水 Na_2SO_4 , 将提取液投入烧杯中, 然后用石油醚分数次洗涤分液漏斗, 将洗涤液并入烧杯中, 浓缩至100mL, 在最大吸收波长条件下, 测定OD值, 并通过标准曲线法换算相应的 β -胡萝卜素含量。

1.2.11 数据处理与分析 分别采用PASW Statistics 18.0和Oringin8.0软件对数据进行分析 and 图形绘制。

2 结果与分析

2.1 β -胡萝卜素最大吸光值及标准曲线

经紫外可见分光光度计全波长扫描(图1), 实验用杜氏藻 β -胡萝卜素最大吸光值处的波长为453nm。

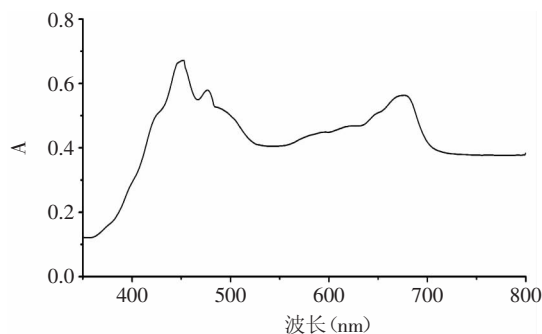


图1 β -胡萝卜素全波长扫描

Fig.1 Full wavelength scan of β -carotene

在453nm条件下, β -胡萝卜素浓度与吸光度值

之间的关系如图2所示。由图2可知,β-胡萝卜素浓度与吸光值之间具有良好的线性关系,其回归主方程为 $y=0.2791x-0.0031$,直线方程的相关系数是0.9913,可以反映β-胡萝卜素浓度。

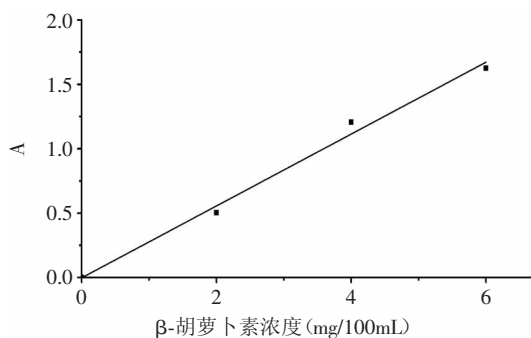


图2 β-胡萝卜素的标准曲线

Fig.2 Standard curve of β-carotene

2.2 温度对杜氏藻β-胡萝卜素含量的影响

从图3可以看出,温度对杜氏藻β-胡萝卜素积累的影响明显。除18d时,可能由于环境因素的变化,导致其积累量有所不同,总体以20℃培养条件下杜氏藻β-胡萝卜素积累最多,25℃培养条件下次之,且与其他温度下有显著性差异,可见20~25℃为杜氏藻β-胡萝卜素积累的最适温度,高温低温都不利于杜氏藻β-胡萝卜素的积累。

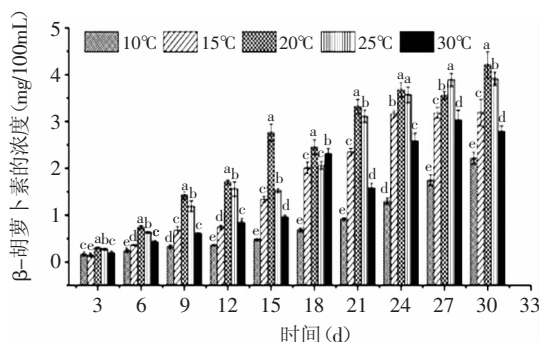


图3 温度对杜氏藻β-胡萝卜素积累的影响

Fig.3 Influence of different temperatures on β-carotene content of *Dunaliella* sp.

注:图中字母代表同一天内,影响因素对杜氏藻细胞密度大小的显著性差异程度。相同字母代表无显著差异,不同字母代表有显著差异;图4~图7同。

2.3 盐度对杜氏藻β-胡萝卜素含量的影响

从图4可以看出,杜氏藻β-胡萝卜素的积累随着盐度的增加而下降。在1.0~2.0mol/L NaCl培养条件下,杜氏藻β-胡萝卜素的积累最快,在3.0mol/L NaCl培养条件下β-胡萝卜素的积累速度明显缓慢,呈显著性差异,当NaCl浓度大于3.0mol/L时,杜氏藻β-胡萝卜素的积累不再增加。可见1.0~2.0mol/L NaCl为杜氏藻β-胡萝卜素积累的最适盐度,与采集地NaCl浓度符合,高盐度反而不利于杜氏藻β-胡萝卜素的积累。这一结果也与有关文献报道相一致^[14]。

2.4 NaNO₃对杜氏藻β-胡萝卜素含量的影响

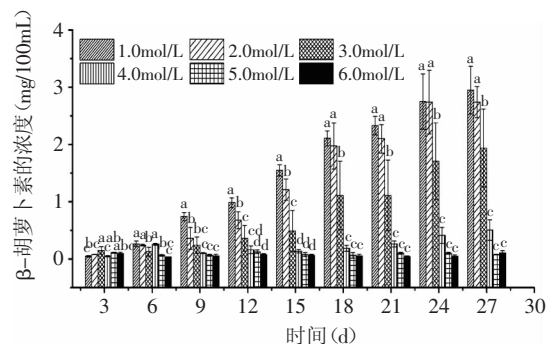


图4 盐度对杜氏藻β-胡萝卜素积累的影响

Fig.4 Influence of different salinities on β-carotene content of *Dunaliella* sp.

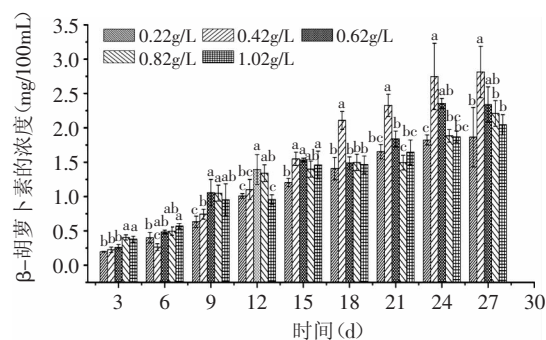


图5 NaNO₃对杜氏藻β-胡萝卜素积累的影响

Fig.5 Influence of different NaNO₃ concentration on β-carotene content of *Dunaliella* sp.

从图5可以看出,氮元素对杜氏藻积累β-胡萝卜素的影响较为明显。杜氏藻在生长前期,高浓度的NaNO₃有利于β-胡萝卜素的积累。当藻体生长至对数期,低浓度的NaNO₃则有利于β-胡萝卜素的积累,其中NaNO₃浓度为0.42g/L时,积累的β-胡萝卜素最多,呈显著性差异,其余浓度都无显著性差异。可见,NaNO₃浓度过高,对β-胡萝卜素的积累没有促进作用。相关文献报道^[13,20],高浓度的氮元素有利于杜氏藻细胞的增殖,对β-胡萝卜素的积累无明显作用。

2.5 NaH₂PO₄·2H₂O对杜氏藻β-胡萝卜素含量的影响

从图6可以看出,在实验范围内磷元素对β-胡萝卜素积累有影响。在藻类生长前期,NaH₂PO₄·2H₂O浓

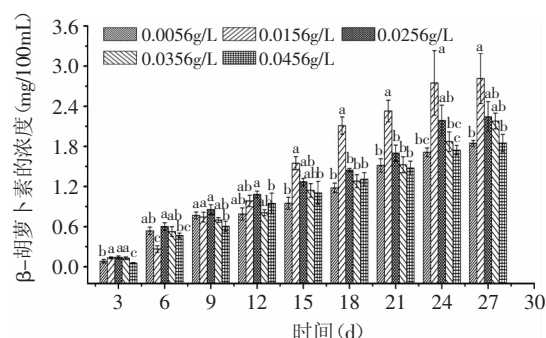


图6 NaH₂PO₄·2H₂O对杜氏藻β-胡萝卜素积累的影响

Fig.6 Influence of different NaH₂PO₄·2H₂O concentration on β-carotene content of *Dunaliella* sp.

度从0.0056g/L升高至0.0456g/L时,β-胡萝卜素的含量变化不大,差异性不显著。当藻细胞生长至对数期后,NaH₂PO₄·2H₂O浓度为0.0156g/L时,β-胡萝卜素积累最多,具有显著性差异,其余浓度均差异不显著。由实验结果表明,在杜氏藻生长至对数期后,除浓度为0.0156g/L外,NaH₂PO₄·2H₂O的浓度对杜氏藻积累β-胡萝卜素的影响不大,且到后期,各浓度的显著差异都不明显。

2.6 FeC₆H₅O₇对杜氏藻β-胡萝卜素含量的影响

从图7可以看出,当FeC₆H₅O₇浓度从0.001g/L升高至0.017g/L时,β-胡萝卜素含量仅有较小的变动,表明FeC₆H₅O₇对杜氏藻β-胡萝卜素积累影响较小,仅在第3、18、21、27d时,FeC₆H₅O₇浓度为0.005g/L时积累的β-胡萝卜素最多,且具显著差异。本实验结果表明,FeC₆H₅O₇的含量对杜氏藻积累β-胡萝卜素无明显的显著性差异。有研究认为,杜氏藻生长的二阶段对光照、温度、盐度、营养盐等环境因子要求显著不同,Fe元素过高(超过0.01mmol/L)对D. salina细胞分裂和生长有抑制作用^[14,16],利于色素的积累。综合考虑,本实验结果中FeC₆H₅O₇的浓度为0.005g/L较为适中。

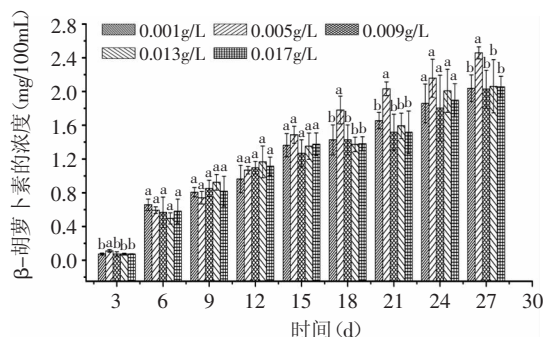


图7 FeC₆H₅O₇对杜氏藻β-胡萝卜素积累的影响

Fig.7 Influence of different FeC₆H₅O₇ concentration on β-carotene content of *Dunaliella* sp.

2.7 氮、磷、铁元素对杜氏藻细胞密度和β-胡萝卜素含量的影响

表2是氮、磷、铁元素对杜氏藻β-胡萝卜素含量影响正交实验的结果。由表2可得,本实验中适于杜氏藻β-胡萝卜素积累,最佳培养条件是A₃B₃C₂,即NaNO₃浓度为0.6200g/L,NaH₂PO₄·2H₂O浓度为0.0256g/L和FeC₆H₅O₇为0.0050g/L。方差分析显示,其中NaH₂PO₄·2H₂O影响极显著,NaNO₃与NaH₂PO₄·2H₂O交互作用影响显著(表3)。从节约成本的角度考虑,FeC₆H₅O₇含量可适当减量,即采用NaNO₃浓度为0.6200g/L,NaH₂PO₄·2H₂O浓度为0.0256g/L和FeC₆H₅O₇浓度为0.0010g/L的培养方案。

由于杜氏藻的细胞增殖和β-胡萝卜素合成是两个独立的生物过程,其控制机理也不相同^[21]。实验结果也提示我们,在实际应用中可以采用两步培养法,本实验前期得到利于杜氏藻生长的氮源、磷源、铁源浓度,即NaNO₃浓度为0.2200g/L,NaH₂PO₄·2H₂O浓度为0.0256g/L和FeC₆H₅O₇浓度为0.0010g/L,所以,先在

表2 正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal test

实验号	A	B	C	β-胡萝卜素(mg/100mL)
1	1	1	1	2.093
2	1	1	2	1.548
3	1	1	3	1.871
4	1	2	1	1.563
5	1	2	2	1.847
6	1	2	3	1.994
7	1	3	1	2.149
8	1	3	2	2.566
9	1	3	3	2.014
10	2	1	3	1.420
11	2	1	2	1.821
12	2	1	3	1.975
13	2	2	1	2.032
14	2	2	2	2.476
15	2	2	3	2.012
16	2	3	1	1.915
17	2	3	2	2.222
18	2	3	3	2.458
19	3	1	1	2.094
20	3	1	2	1.991
21	3	1	3	1.630
22	3	2	1	1.872
23	3	2	2	2.297
24	3	2	3	1.886
25	3	3	1	2.238
26	3	3	2	2.044
27	3	3	3	2.360
K ₁	17.644	16.443	17.375	
K ₂	18.329	17.977	18.811	
K ₃	18.412	19.964	18.199	
R	0.768	1.986	1.436	

表3 N、P、Fe元素含量对杜氏藻β-胡萝卜素积累影响的方差分析
Table 3 The anova of the effect of β-carotene of *Dunaliella* sp. with different N, P and Fe element contents

方差来源	变差平方和	自由度	方差估计值	F值	F _α	显著性
A	0.0395	2	0.0198	0.72	F _{0.01} =8.65 F _{0.05} =4.46	
B	0.6923	2	0.3460	12.55		**
C	0.11535	2	0.0577	2.09		
AB	0.64	4	0.1600	5.80	F _{0.01} =7.01 F _{0.05} =3.84	*
AC	0.203	4	0.0510	1.84		
BC	0.184	4	0.0460	1.67		
误差	0.221	8	0.0280			
总和	2.095					

注:**在0.01水平上极显著;*在0.05水平上显著。

适宜藻细胞生长的培养基中培养,以使杜氏藻细胞增殖至对数期,而后再增加NaNO₃浓度至0.6200g/L,

以使 β -胡萝卜素大量合成。

氮源和磷源是生物生长所必须的元素,它在细胞代谢中与多种化合物的形成密切相关,因而它是杜氏藻生长和相关物质合成的重要营养元素^[22-23]。本实验结果显示,较高浓度的氮元素与磷元素共同作用对促进杜氏藻 β -胡萝卜素积累的影响也显著,与文献报道基本一致^[24]。本实验结果还表明高N高P有利于藻细胞的生长,但对 β -胡萝卜素积累,较高浓度N、P之间有很强的交互作用,同样有利于 β -胡萝卜素的积累,在实际应用中可采用两步培养法,先使杜氏藻细胞大量增殖至对数期,而后改变培养条件,以增加 β -胡萝卜素的合成。

2.8 验证实验

对利于杜氏藻积累 β -胡萝卜素的最好因素组合 $A_3B_3C_1$ 进行了验证实验,根据前期利于杜氏藻生长的条件,采用 $NaNO_3$ 浓度为0.2200g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 浓度为0.0256g/L和 $FeC_6H_5O_7$ 浓度为0.0010g/L的培养基进行培养至对数期,5000r/min离心10min,除去培养基,然后再加入 $NaNO_3$ 浓度为0.6200g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 浓度为0.0256g/L和 $FeC_6H_5O_7$ 浓度为0.0010g/L的同体积培养基进行培养,得到杜氏藻 β -胡萝卜素含量为2.743mg/100mL。可以看出,该实验结果真实可信,达到了优化的目的。

3 结论

采自运城盐湖的杜氏藻在波长453nm时, β -胡萝卜素含量与OD453之间存在良好的线性关系,利用光密度法表征杜氏藻 β -胡萝卜素含量步骤简单,数据准确,适于高通量样品的计数。杜氏藻在温度20~25℃,盐度1.0~2.0mol/L NaCl时,较有利于 β -胡萝卜素积累。当杜氏藻生长至对数期后,高浓度的氮源、磷源都不利于 β -胡萝卜素的积累,而铁源在整个培养间,对杜氏藻 β -胡萝卜素的积累无影响。通过进一步优化,得到了较适合杜氏藻积累 β -胡萝卜素的N、P、Fe浓度组合。关于培养条件还有很多方面可以进行更深入地研究,如外源物质的添加和微量元素作用等,后续实验将针对以上方向进行研究。

参考文献

- [1] Hadi M R, Shariati M, Afsharzadeh S. Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh, Iran[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 13(5): 540-544.
- [2] 武昌俊, 唐欣昀. 光照对杜氏盐藻突变藻株Zea1生长和积累玉米黄素的影响[J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 199-202.
- [3] Ben-Amotz A, Katz A, Avron M. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 1982, 18(4): 529-537.
- [4] Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of β -carotene

and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*[J]. *Plant Physiology*, 1988, 86(4): 1286-1291.

- [5] 刘洪岩, 辛乃宏. β -胡萝卜素的研究进展[J]. *盐业与化工*, 2013, 42(1): 18-21.
- [6] 孔祥瑞. 必须微量元素的营养、生理及临床意义[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1982: 102-105.
- [7] 宋大新, 范长胜. 微生物学实验技术教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993: 66-70.
- [8] 周世水, 姜建国, 姚汝华. 二步法培养盐藻生产天然 β -胡萝卜素的研究[J]. *食品科学*, 1999, 20(5): 11-14.
- [9] 周全. 制盐母液养殖盐藻及气浮采收技术的研究[J]. *海湖盐与化工*, 1995, 24(6): 11-16.
- [10] Borowitzka M A, Borowitzka L J, Kessly D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1990, 2(2): 111-119.
- [11] Nguyen S, Tran D, Portilla S, et al. Medium improvement for higher growth and longer stationary phase of *Dunaliella*[J]. *Journal of Plant Sciences*, 2014, 2(1): 9-13.
- [12] 吴春. 盐生杜氏藻对盐度改变的生理响应[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- [13] 尚常花, 秦磊, 朱顺妮, 等. 培养基成分含量对巴夫杜氏藻生长的影响[J]. *新能源进展*, 2013, 1(2): 170-173.
- [14] 胡蓓娟, 王雪青, 黄丹虹, 等. 盐藻培养基的优化研究[J]. *食品科学*, 2007, 27(12): 384-388.
- [15] 王培磊, 刘明河, 张学成, 等. 柠檬酸铁对盐生杜氏藻生长和色素积累的影响[J]. *水产科学*, 2007, 26(10): 543-546.
- [16] 王培磊, 刘明河, 张学成, 等. Fe对两株盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)生长和 β -胡萝卜素积累的影响[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(5): 39-43.
- [17] 秦宏伟, 杨红花, 史春雨, 等. 甘薯中 β -胡萝卜素提取工艺研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 123-125.
- [18] 王东晖, 田世龙, 朱友春, 等. 纸层析法测定植物样品胡萝卜素含量[J]. *甘肃农业科技*, 2002(4): 45-46.
- [19] 陈悦娇, 马应丹. 薄层层析-分光光度法测定白果中的 β -胡萝卜素[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2002, 15(2): 41-44.
- [20] 王俊, 马玉心, 崔大练, 等. 不同浓度氮、磷对杜氏盐藻生长的影响[J]. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2012, 31(2): 142-146.
- [21] Chen Xing, Rinkevicius Z, Luo Yi, et al. Role of the 3 ($\pi\pi^*$) state in photolysis of lumisantonin: insight from ab initio studies[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2011, 115(26): 7815-7822.
- [22] Tan C K, Lee Y K, Ho K K. Effect of light intensity and ammonium-N on carotenogenesis of *Trentepohlia odorata* and *Dunaliella bardawil*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1993, 5(5): 547-549.
- [23] 周世水, 姚汝华. 利用盐藻(*Dunaliella*)培养生产 β -胡萝卜素[J]. *生物学杂志*, 1997, 14(6): 15-22.
- [24] 孙辉. 盐藻的生长特性及逆环境下 β -胡萝卜素积累规律和机理研究[D]. 成都: 四川大学, 2005.

欢迎订阅《食品工业科技》, 邮发代号2-399