

# 佐夫色绿藻高产虾青素的诱导条件及发酵工艺优化

何健泽, 陈俊辉, 姜雪亚, 魏东

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本研究了不同诱导条件及光发酵罐培养工艺对混养佐夫色绿藻的影响, 通过参数优化提高了藻细胞生物量和虾青素积累量。本研究首先系统地比较了在摇瓶系统中不同混合碳源和过氧化氢浓度对佐夫色绿藻的生长和虾青素积累的影响, 并在光发酵罐中研究了恒定高光强、低光强-高光强以及低光强-高光强-补加过氧化氢三种不同发酵工艺对佐夫色绿藻积累虾青素的影响。结果表明: 采用 20 g/L 葡萄糖和 2.50 g/L 醋酸钠作为混合碳源取代单一碳源, 可以获得最高 6.50 g/L 生物量, 并且添加 107.50 mg/L 过氧化氢可以将虾青素含量提高到 3.23 mg/g, 产量最高为 72.47 mg/L, 是空白组虾青素产量的 1.80 倍, 有效促进了佐夫色绿藻细胞生长和虾青素积累。在 5 L 光发酵罐中, 以 20 g/L 葡萄糖和 2.50 g/L 醋酸钠作为混合碳源培养佐夫色绿藻, 通过低光强-高光强-补加过氧化氢的组合方式, 可获得较优的虾青素含量 (3.82 mg/g) 和产量 (41.41 mg/L), 相较于恒定高光强培养, 分别提高了 36.92% 和 92.96%。本研究通过诱导条件和发酵工艺优化有效提高了混养佐夫色绿藻生物量和虾青素产量, 为利用光发酵罐培养色绿藻生产虾青素提供基础。

**关键词:** 佐夫色绿藻; 虾青素; 诱导条件; 光发酵罐; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2021)05-52-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0512

## Optimization of the Induction Conditions and Fermentation Processes for High-yield Production of Astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis*

HE Jian-ze, CHEN Jun-hui, JIANG Xue-ya, WEI Dong

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, the effects of different induction conditions and tank photo-fermentation processes on mixotrophic *Chromochloris zofingiensis* were investigated, and the algal cell biomass and astaxanthin accumulation were increased through parameter optimization. Different induction conditions including the effects of different mixed carbon sources and hydrogen peroxide concentrations in the shake-flask system on the growth and astaxanthin accumulation of *Chromochloris zofingiensis* were first systematically compared. In the photo-fermentation tanks, the effects of three different fermentation process conditions, i.e., constant high light intensity, lowlight intensity-high light intensity, and lowlight intensity-high light intensity combined with hydrogen peroxide addition, on the accumulation of astaxanthin in *Chromochloris zofingiensis* were examined. The results demonstrated that the highest biomass (6.50 g/L) was obtained in *C. zofingiensis* cultivation using the mixed carbon source (a mixture of glucose (20 g/L) and sodium acetate (2.50 g/L)) instead of the sole carbon source. The supplementation of hydrogen peroxide at 107.50 mg/L further increased the astaxanthin content to 3.23 mg/g with the highest astaxanthin yield as 72.47 mg/L (which was 1.80 times that of the control), resulting in effective promotion of cellular growth of algal biomass and accumulation of astaxanthin. In a 5-L photo-fermenter, 20 g/L glucose and 2.50 g/L sodium acetate were used as a mixed carbon source to cultivate *C. zofingiensis* via the combination of low light intensity-high light intensity-hydrogen peroxide supplementation, leading to a relatively high astaxanthin content (3.82 mg/g) and yield (41.41 mg/L), which were 36.92% and 92.96%, respectively, higher than those obtained under the

引文格式:

何健泽,陈俊辉,姜雪亚,等.佐夫色绿藻高产虾青素的诱导条件及发酵工艺优化[J].现代食品科技,2021,37(5):52-62

HE Jian-ze, CHEN Jun-hui, JIANG Xue-ya, et al. Optimization of the induction conditions and fermentation processes for high-yield production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 52-62

收稿日期: 2020-06-02

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金资助项目 (2019A1515110591; 2019B1515120002); 广东省公益研究与能力建设基金项目 (2016A010105001)

作者简介: 何健泽 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 工业生物技术

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业生物技术

constant high light intensity conditions. This work improved effectively the biomass and astaxanthin production of *Chromochloris zofingiensis* through the optimization of induction conditions and fermentation processes, which provides a basis for astaxanthin production by *C. zofingiensis* in photo-fermenters.

**Key words:** *Chromochloris zofingiensis*; astaxanthin; induction conditions; photo-fermenter; process optimization

虾青素(Astaxanthin),化学名称 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta$ -胡萝卜素,是一种脂溶性紫红色的类胡萝卜素,普遍存在于多种微生物和虾蟹等海洋生物中<sup>[1]</sup>。虾青素独特的结构使其具有超强的抗氧化性,是 $\beta$ -胡萝卜素的 10 倍,维生素 E 的 500 倍,可延缓皮肤衰老、提高机体免疫力,在食品、医药和化妆品行业具有广阔市场前景和应用价值<sup>[2,3]</sup>。微生物发酵法是天然虾青素生产的重要生产方式,常用的微生物有红发夫酵母、雨生红球藻等,但红发夫酵母生产的虾青素为全反构型,主要作为三文鱼类等的饵料着色剂<sup>[4]</sup>。目前天然虾青素工业生产的藻种主要是利用雨生红球藻进行的,但是培养过程中细胞密度低、培养时间长、易污染,并且需要高光照等诱导胁迫条件,这制约了天然虾青素的生产<sup>[5,6]</sup>。

佐夫色绿藻(*Chromochloris zofingiensis*)是一种淡水单细胞圆形绿藻,直径范围为 2~15  $\mu\text{m}$ ,通过产生孢子细胞进行繁殖<sup>[5]</sup>。佐夫色绿藻能够进行自养、异养和混养的多营养方式生长,积累多种高价值代谢产物,并且可以在现有微生物发酵装置中进行高密度培养。因此,目前色绿藻被认为是大规模生产虾青素的潜在替代藻种,相对于雨生红球藻,佐夫色绿藻具有生长速率快、细胞产率高、不易污染、细胞壁易破碎从而易于提取虾青素等优势,有望进一步降低天然虾青素的生产成本<sup>[7]</sup>。

佐夫色绿藻虽然具有诸多优点,但现阶段胞内虾青素含量仍达不到雨生红球藻的积累水平。如何显著提高佐夫色绿藻胞内虾青素的生产水平,就成为当前研究的难点和技术瓶颈。近年来研究表明佐夫色绿藻在特定诱导条件(包括高光诱导、过氧化氢和乙醇等氧化诱导<sup>[5,8]</sup>)的作用下可以显著提高胞内虾青素含量。这主要是由于在这些诱导方式下,藻细胞内氧化压力增强,诱导产生的活性氧(ROS)和自由基与蛋白质、脂质和 DNA 等发生反应,对细胞造成氧化损伤,而藻细胞则会诱导合成虾青素等抗氧化物质来消除 ROS 和自由基,以保护细胞免受损伤以抵抗逆境<sup>[9]</sup>。因此,通过不同诱导胁迫条件来提高细胞 ROS 水平,就可以间接提高佐夫色绿藻生产积累虾青素的水平<sup>[10]</sup>。目前文献中报道的佐夫色绿藻培养的最高生物量可以达到 98.40 g/L,虾青素产量最高为 73.30 mg/L<sup>[11]</sup>,基本达到雨生红球藻的生产效率,但是虾青素含量还

较低。因此,进行多诱导条件和发酵工艺的优化,进一步提高虾青素含量,将有助于推动利用佐夫色绿藻商业化生产制备虾青素的进程,因而具有重要的研究价值和广阔的应用前景。

本研究以佐夫色绿藻为研究对象,采用葡萄糖和醋酸钠为混合碳源进行混合培养,研究了混养条件下混合碳源和过氧化氢诱导剂对佐夫色绿藻生长和虾青素积累的影响,从中获得最佳培养条件,并在 5 L 光发酵罐中进行了放大验证和发酵工艺优化,为佐夫色绿藻商业化生产天然虾青素提供了实验基础。本研究强化了佐夫色绿藻积累虾青素能力并且验证了利用光发酵罐培养色绿藻生产虾青素的可行性,为佐夫色绿藻生产制备天然虾青素提供关键技术和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种与培养基

佐夫色绿藻(*Chromochloris zofingiensis* ATCC 30412)购自美国 American Type Culture Collection (ATCC)菌种保藏中心,采用 Bristol's medium (BM)培养基进行藻种的保藏和培养<sup>[12]</sup>。

### 1.2 实验试剂及仪器

本研究所采用的主要试剂有过氧化氢、乙醇、硫酸亚铁、甲醇、二氯甲烷、葡萄糖、硝酸钠以及培养基所需微量元素等均为分析纯,购自本地试剂公司。本研究主要仪器有高效液相分析仪(P680)购自美国 DIONEX 公司;液相色谱柱 YMC carotenoid column C30 购自美国 Waters 公司;流式细胞仪(Accuri C6)购自美国 BD 公司;pH 计(SevenEasy)购自 Mettler Toledo;生物传感分析仪(SBA-40D)购自山东省科学院;高速冷冻离心机(Alledra 25R)购自美国 Beckman Coulter 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 藻种活化与种子液制备

从斜面培养基上挑取藻种,接种到装有 100 mL BM 培养基(外加 10 g/L 葡萄糖)的 250 mL 三角瓶中,初始 pH 为 6.50,在光照强度为 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ,温度为 26  $^{\circ}\text{C}$ ,转速为 150 r/min 的恒温摇床中培养 4~5 d

进行活化。将培养好的藻液以 10% 的接种量接种到含有上述相同营养成分培养基的 250 mL 三角瓶中培养 4 d, 作为一级种子液。然后, 再按 10% 的接种量转接到装有改良 BM 培养基的 250 mL 的三角瓶中 (装液量 100 mL), 其中改良培养基中初始葡萄糖 30 g/L, 硝酸钠作为氮源, 控制碳氮比为 34, 初始 pH 为 6.50。在相同培养条件下将藻细胞培养到对数末期或稳定期初期, 作为二级种子液用于后续实验。

### 1.3.2 混合碳源优化

采用不同混合碳源的无氮 BM 培养基进行佐夫色绿藻的摇瓶培养, 研究不同混合碳源组合对细胞生长和虾青素积累的影响。基于本实验室前期研究结果, 发现葡萄糖浓度为 20~30 g/L 对于佐夫色绿藻生长性能和虾青素积累具有较好的促进效果, 并且培养结束后, 20 g/L 葡萄糖能够消耗完, 不会造成浪费<sup>[13]</sup>。而且 1.50~3.00 g/L 醋酸钠有助于提高虾青素产量, 其中醋酸钠浓度为 2.50 g/L 时虾青素产量最高<sup>[14]</sup>。本实验为了探究以葡萄糖和醋酸钠为混合碳源取代单一碳源的可行性及其效果, 故选择五种不同的混合碳源条件进行佐夫色绿藻的培养, 具体条件分别为: 只加 20 g/L 的葡萄糖 (Glu); 只加 2.50 g/L 的醋酸钠 (NaAC); 同时加 20 g/L 的 Glu 和 1.50 g/L 的 NaAC; 同时加 20 g/L 的 Glu 和 2.50 g/L 的 NaAC; 同时加 20 g/L 的 Glu 和 3.00 g/L 的 NaAC。醋酸钠通过配置母液过滤除菌后加入。本实验在恒温摇瓶中培养, 温度为 26 °C, 转速为 150 r/min, 光照为 130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , 培养 10 d, 以虾青素产量和产率为最优评价指标。

### 1.3.3 过氧化氢浓度优化

以无氮的 BM 培养基为基本培养基, 初始葡萄糖浓度为 20 g/L, 醋酸钠为 2.50 g/L, 设置不同的过氧化氢浓度梯度 0、77.50、107.50、137.50 mg/L, 并加入 18  $\mu\text{mol}/\text{L}$  硫酸亚铁, 研究过氧化氢诱导胁迫对佐夫色绿藻细胞生长和虾青素积累的影响, 以虾青素产量和产率为最优评价指标。培养过程中监测葡萄糖浓度变化, 降至 0~5 g/L 时进行补料, 补至 20 g/L。其它培养条件同 1.3.2。

### 1.3.4 光发酵罐发酵工艺优化

在 5 L 光发酵罐中, 设置三种不同发酵工艺: 恒定高光强、低光强-高光强、低光强-高光强-补加过氧化氢, 研究不同发酵工艺对佐夫色绿藻细胞生长和虾青素积累的影响, 以虾青素产量和产率为最优评价指标。具体工艺参数如下: (1) 采用外置光源, 通过调节电流控制光照强度, 调节电流至最大从而将光照强度提高为 653  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , 并维持恒定高光强; (2) 光照强度采用逐渐提高光强的方式进行调节, 培养过程中从

169  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  不断增加到 653  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ; (3) 光照强度采用先低光后高光的方式进行调节, 从 312  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  不断增加到 653  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , 培养至 72 h 进行过氧化氢补料, 补料浓度为 107.50 mg/L 过氧化氢和 18  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的硫酸亚铁。培养基采用无氮的 BM 培养基为基本培养基, 并添加 20 g/L 葡萄糖和 2.50 g/L 醋酸钠。培养过程 pH 设置范围 6.50~8.50, 温度设置范围为 26 °C~28 °C, 通气量为 3.33 L/min, 转速为 150 r/min。培养期间采用 0.10 mol/L 盐酸和氢氧化钠调节 pH, 温度通过冷却循环泵控制。

## 1.4 分析测试

### 1.4.1 生物量

生物量浓度采取干重法进行测定。吸取一定体积藻液置于事先烘干称重的 2 mL 离心管中, 并将其置于 8000 r/min 的条件下离心 3 min, 弃上清, 获得藻泥, 并用蒸馏水进行洗涤。重复三次后将离心得到的藻泥置于 60 °C 恒温干燥箱中烘干至恒重, 最后通过计算前后重量的差值获得生物量。

### 1.4.2 比生长速率

通过生物量计算佐夫色绿藻的比生长速率  $\mu$  ( $\text{d}^{-1}$ ), 比生长速率的计算公式为:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

其中  $X_2$ 、 $X_1$  分别为  $t_2$ 、 $t_1$  时间测定的生物量 (g/L)。

### 1.4.3 细胞密度

细胞密度采用美国贝克曼 CytoFLEX 型流式细胞仪进行测定。首先将藻液离心获得藻泥, 然后用超纯水洗涤多次, 稀释到约  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的细胞密度后进行流式细胞仪测定, 控制流式细胞仪的流速为 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 记录时间为 30 s, 记录 10000 个以上的细胞数据, 并使用 CytExpert 1.2 软件分析细胞密度。

### 1.4.4 葡萄糖浓度

利用 SBA-40D 生物传感分析仪测定培养基内葡萄糖浓度。首先将待测样品上清液过滤并稀释至葡萄糖浓度在 0.50~1.00 g/L 的可测范围内进行传感仪测定, 测定前先用 1.00 g/L 的葡萄糖标准品定标, 待定标通过后, 吸取 25  $\mu\text{L}$  稀释后样品进行测定, 将测定获得的读数乘以稀释倍数即得培养基的葡萄糖浓度。

### 1.4.5 细胞内色素含量

佐夫色绿藻细胞内色素提取和成分测定参照相关文献<sup>[15]</sup>。将离心收集的藻泥采用冷冻干燥机冻干成藻粉, 准确称量 10 mg 藻粉, 置于装有陶瓷珠的振荡管中, 采用甲醇/二氯甲烷混合液 (体积比 3:1, 含有 0.10% 的 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚) 作为提取试剂, 采用高频振荡仪进行破碎提取, 反复操作直至藻细胞变成无

色, 合并收集的所有上清液并利用氮气吹干。然后用甲醇/MTBE 混合溶剂 (1:1, V/V) 定容, 过滤并转移至棕色瓶用于高效液相色谱分析。以上操作全程需注意避光。佐夫色绿藻细胞内色素提取和成分测定参照相关文献<sup>[16]</sup>, 依据上述 HPLC 的测定条件进行样品测定。

HPLC 测定具体步骤如下: 采用 YMC C30 类胡萝卜素色谱柱和 PDA 检测器, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL, 流速为 0.8 mL/min, 流动相分别为甲醇 (A) 及 MTBE (B), 进行梯度洗脱, 检测波长为 480 nm、645 nm 和 665 nm, 并在 300~800 nm 下进行全波长扫描以测定光谱。称取色素标准品虾青素、叶黄素、角黄素、叶绿素 *b*、叶绿素 *a* 并分别制成一系列不同浓度梯度的标准溶液, 按照上述同样方法进行测定, 建立相应的色素标准曲线, 最后依据色素标准品的保留时间和标准曲线进行样品中色素的定性和定量分析。

### 1.4.6 得率测定

生物量得率 ( $Y_{g/g \text{ substrate}}$ ) 或虾青素得率 ( $Y_{mg/g \text{ substrate}}$ ) 是指每消耗单位浓度 (g/L) 葡萄糖 (或醋酸钠) 对应生物量的增长量 (g/L) 或虾青素产量的增长量 (mg/L), 计算公式为:

$$Y = (y_2 - y_1) / (c_1 - c_2)$$

其中  $y_1$ 、 $y_2$  为培养起始和结束时测得的生物量 (g/L) 或虾青素产量 (mg/L),  $c_1$ 、 $c_2$  为培养起始和结束时测得的葡萄糖 (或醋酸钠) 的浓度 (g/L)。

### 1.4.7 数据分析

采用 Microcal Origin 9.0 和 SPSS 统计分析软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 混合碳源对佐夫色绿藻积累虾青素的影响

本实验研究不同混合碳源对佐夫色绿藻细胞生长和虾青素积累的影响。由图 1 可知, 在葡萄糖和混合碳源的实验组中, 培养前两天, 葡萄糖消耗速率较快, 生物量增长也最快, 但是培养到第四天时, 葡萄糖消耗和细胞生物量增加值均下降。之后, 虽然葡萄糖浓度不断降低, 但是藻细胞生物量增加缓慢。培养结束后, 采用混合碳源培养的藻细胞生物量高于单一碳源。其中, 采用 20 g/L 葡萄糖与 2.50 g/L 的醋酸钠作为碳源, 获得的生物量浓度最高为 6.50 g/L, 是单一葡萄糖生物量浓度的 1.47 倍, 是单一醋酸钠碳源生物量浓度的 2.00 倍。这说明添加醋酸钠有助于佐夫色绿藻同化葡萄糖, 进而促进藻细胞生长和繁殖。Helder 等人<sup>[17]</sup>研究在 BBM 培养基中同时加入醋酸钠和葡萄

糖各 7.50 g/L 作为混合碳源进行 *Neochloris oleoabundans* 培养, 获得了最高 1.75 g/L 的生物量, 结果优于单一碳源, 与本研究结果类似。这表明适宜浓度的混合碳源有利于微藻生物量的积累。

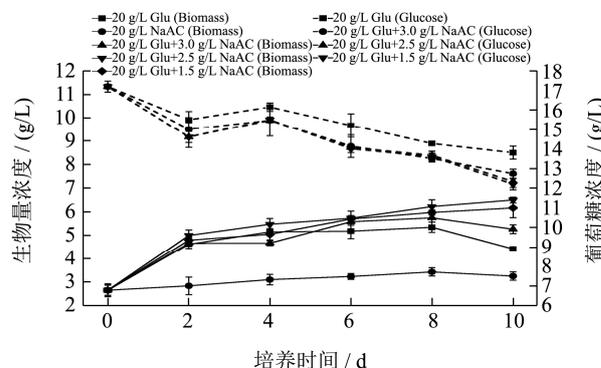


图 1 不同碳源培养条件下佐夫色绿藻生物量 (Biomass) 和葡萄糖 (Glucose) 浓度的变化曲线

Fig.1 Time courses of *C. zofingiensis* biomass and glucose concentration in the cultures with different carbon sources

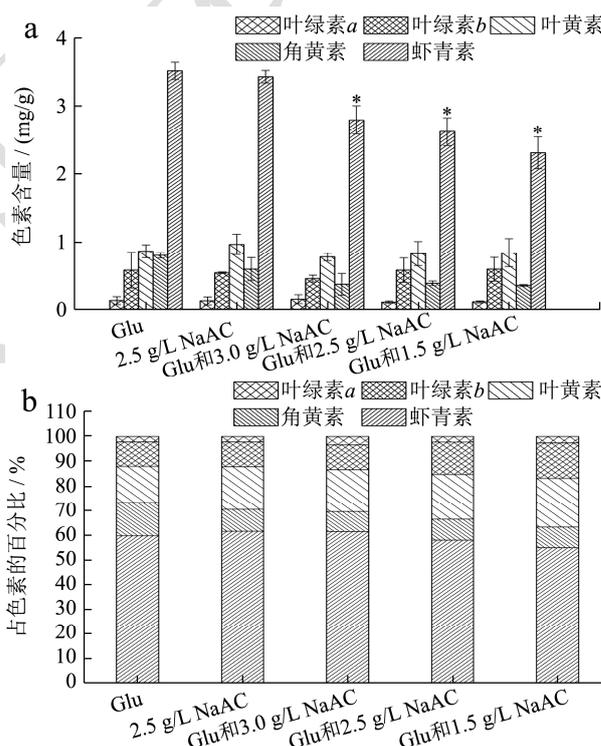


图 2 不同碳源培养条件下佐夫色绿藻的色素含量 (a) 及各色素所占总色素百分比 (b) 的变化情况

Fig.2 Pigment contents (a) and abundances (b) as percentages of the total pigments in *C. zofingiensis* in the cultures with different carbon sources

但是, 当混合碳源中醋酸钠浓度增加到 3.00 g/L 时, 生物量浓度呈现下降趋势, 在培养结束即第十天时, 生物量为 5.27 g/L、葡萄糖消耗速率为 0.72 g/(L·d), 均显著低于醋酸钠为 1.50 g/L 和 2.50 g/L 的实验组。起始醋酸钠浓度为 3.00 g/L 的实验组, 在培养起始第

0~2 d 时,葡萄糖消耗速率就较低,这表明过高浓度的醋酸钠会一定程度上抑制细胞对葡萄糖的消耗能力,进而抑制藻细胞的生长。庄惠如等人<sup>[18]</sup>研究发现雨生红球藻随着醋酸钠浓度的增加,细胞生物量先增加后减少,在 0.50~1.00 g/L 的低浓度的醋酸钠条件下有利于雨生红球藻的生长,使得雨生红球藻迅速进入指数生长期,并延长生长期,在 1.00 g/L 的醋酸钠条件下最高生物量干重约为 0.70 g/L。1.50~2.00 g/L 的高浓度醋酸钠则会抑制其细胞生长,且初始醋酸钠浓度过高导致延滞期增长,并对细胞产生毒害作用。由此得出,在混合碳源条件下,添加醋酸钠有利于藻细胞的生长,但醋酸钠浓度不宜高于 2.50 g/L,否则会抑制藻细胞生长。

混合碳源对佐夫色绿藻积累虾青素的影响如图 2 所示。由图 2a 可知,采用葡萄糖或醋酸钠作为单一碳源时,获得的虾青素含量最高,达到 3.51 mg/g 以上,两者无显著性差异,但均显著高于混合碳源实验组 ( $p<0.05$ )。在混合碳源实验组,随着醋酸钠的浓度的增加,虾青素的含量也随之增加,最高为 2.78 mg/g,虾青素占总类胡萝卜素的含量达到 70%以上。混合碳源培养中虾青素含量较低,推测其原因可能是由于培养过程中,藻细胞内同时存在多种碳源代谢途径,从而合成不同的目标代谢产物,进而影响到虾青素的积

累。在佐夫色绿藻培养中,藻细胞生长和虾青素积累并不是同步的<sup>[19]</sup>,仅提高藻细胞内虾青素含量或藻的生物量,并不会显著提高虾青素生产水平。

在本研究中,采用混合碳源有助于藻细胞同化葡萄糖,如表 1 所示,葡萄糖平均消耗速率均在 0.72 g/(L·d)以上,显著高于单独采用葡萄糖作为碳源的对照组 ( $p<0.05$ )。虽然混合碳源在一定程度上降低了虾青素的含量,但是当醋酸钠浓度为 2.50 g/L 时,藻细胞密度较高,生物量相对于碳源的得率也最高达到 0.51 g/g 葡萄糖,最终获得的虾青素产量和产率也最高,分别达到 16.98 mg/L 和 1.06 mg/(L·d),显著高于其他实验组。但是,虾青素得率为 2.23 mg/g,稍低于单独葡萄糖培养的对照组。由此可知,采用混合碳源有助于提高佐夫色绿藻虾青素产量和产率。Wang 等人<sup>[20]</sup>研究也发现葡萄糖和乙酸钠组合碳源,相对于单独的葡萄糖或单独的乙酸钠而言,具有潜在的培养优势,能够显著提高 *Coccomyxa subellipsoidea* 生物量和脂质合成等生物学指标。

综上,在无氮条件下,以葡萄糖和醋酸钠为混合碳源有助于提高佐夫色绿藻生产积累虾青素的能力,尤其是当葡萄糖浓度为 20 g/L 和醋酸钠浓度为 2.50 g/L 时为最优组合条件,可以显著提高藻细胞生物量和虾青素产量。

表 1 不同碳源条件下佐夫色绿藻对葡萄糖消耗和虾青素积累情况的对比

Table 1 Comparisons of average glucose consumption and astaxanthin accumulation in *C. zofingiensis* cultures with different carbon

实验条件		葡萄糖消耗量/(g/L)	平均葡萄糖消耗速率/[g/(L·d)]	细胞数/ ( $\times 10^7$ CFU/mL)	虾青素产量/(mg/L)	虾青素产率/[mg/(L·d)]	生物量得率/(g/g)	虾青素得率/(mg/g)	虾青素所占 总类胡萝卜素的百分比/%
Glu (g/L)	NaAC (g/L)								
20	-	6.20±0.10	0.62±0.01	3.68±0.10	15.56±0.18	0.97±0.01	0.29±0.01	2.51±0.01	67.91±0.70
-	2.5	-	-	3.13±0.11*	11.13±0.42*	0.70±0.03*	0.24±0.01	4.45±0.03*	70.15±0.66*
20	1.5	7.80±0.20*	0.78±0.02*	3.36±0.11*	14.17±1.43	0.89±0.08	0.34±0.01	1.82±0.01	65.98±2.73
20	2.5	7.60±0.30*	0.76±0.03*	3.71±0.14	16.98±0.22*	1.06±0.02*	0.51±0.01*	2.23±0.01	68.40±2.91
20	3.0	7.20±0.10*	0.72±0.01*	3.78±0.10*	14.68±1.22	0.92±0.04	0.49±0.01*	2.04±0.01	70.95±4.36

注:采用 t 检验分析成对数据的显著性,用\*标注显著性 ( $p<0.05$ )。其中单一碳源醋酸钠组中的生物量得率及虾青素得率是相对醋酸钠的比值,其余实验组中均为相对葡萄糖的比值。

## 2.2 不同过氧化氢浓度对佐夫色绿藻积累虾青素的影响

本实验研究不同过氧化氢浓度对佐夫色绿藻细胞生长和虾青素积累的影响。由图 3 可知,添加过氧化氢不会抑制藻细胞生长及其葡萄糖的消耗利用,反而有助于藻细胞的生长。随着过氧化氢添加量的增加,藻细胞生物量不断增加,当过氧化氢浓度为 137.50

mg/L 时,生物量达到最大值 22.88 g/L,相对于对照组增加了 37.50%,增加较显著 ( $p<0.05$ )。培养到第 6 d 时,培养基中葡萄糖基本消耗完毕,而且添加过氧化氢的实验组中藻细胞对葡萄糖的消耗速率还会加快。Yu 等人<sup>[21]</sup>对雨生红球藻进行了过氧化氢的处理后,发现过氧化氢对细胞密度有聚集效应,与本研究中过氧化氢促进藻细胞生长的结果类似。可能是过氧化氢会诱导藻细胞产生氧化胁迫,但适量过氧化氢不会影响藻细胞的质膜功能及胞内代谢酶的活性,反而

因为提高培养基中饱和氧的水平而促进藻细胞生长。

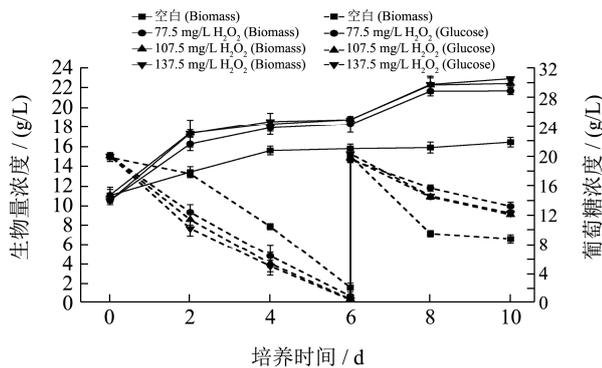


图3 不同过氧化氢浓度下佐夫色绿藻生物量(Biomass)及葡萄糖(Glucose)消耗情况的变化曲线

Fig.3 Time courses of biomass and glucose concentration in *C. zofingiensis* cultures with different concentrations of hydrogen peroxide

不同过氧化氢浓度对佐夫色绿藻积累虾青素的影响如图4所示。由图4a中可知,当过氧化氢浓度在0~107.50 mg/L之间时,随着过氧化氢浓度的升高,虾青素含量逐渐升高,且在过氧化氢浓度为107.50 mg/L,虾青素含量最高为3.23 mg/g,显著高于对照组( $p < 0.05$ )。推测其原因可能是 $Fe^{2+}$ 与过氧化氢发生Haber-Weiss和Fenton反应,进而产生活性氧,对佐夫色绿藻形成一定的氧化胁迫,诱导藻细胞内的虾青素合成以抵抗氧化损伤<sup>[22]</sup>。同时, $Fe^{2+}$ 也是类胡萝卜素合成中的羟化酶和酮化酶的辅因子,从而提高酶活,促进了虾青素的积累<sup>[23]</sup>。随后继续提高过氧化氢浓度至137.50 mg/L,虾青素的含量为3.21 mg/g,与过氧化氢浓度为107.50 mg/L下的虾青素含量(3.23 mg/g)相比并没有显著性增加,反而有所下降,这可能是因为过量的过氧化氢会影响虾青素的合成,导致虾青素积累量降低。当继续增加过氧化氢到137.50 mg/L或更高浓度时,可能会超过藻细胞的承受程度,从而会对虾青素合成起抑制作用,反而导致虾青素含量下降。Ip等人<sup>[24]</sup>发现在不添加过氧化氢条件下,佐夫色绿藻生物量最高约为9.00 g/L,而添加0.10 mM过氧化氢时,生物量降低到约7.50 g/L,但虾青素含量从约1.10 mg/g增加到约1.70 mg/g,之后继续增加其浓度,生物量和虾青素积累量均呈降低趋势。同样,Yu等人<sup>[21]</sup>研究雨生红球藻在(0~1.00 mM)过氧化氢浓度下,随着过氧化氢浓度的增加先增加后减少,在0.70 mM时达到最大,与对照组相比提高了10%,并且在1.00 mM时,虾青素降低到对照组水平,说明适宜浓度活性氧浓度能够促进虾青素积累,达到饱和之后,再继续

增加过氧化氢会导致氧化损伤。由本研究可知,添加适宜浓度的过氧化氢有利于促进藻细胞生长和虾青素积累<sup>[25]</sup>。

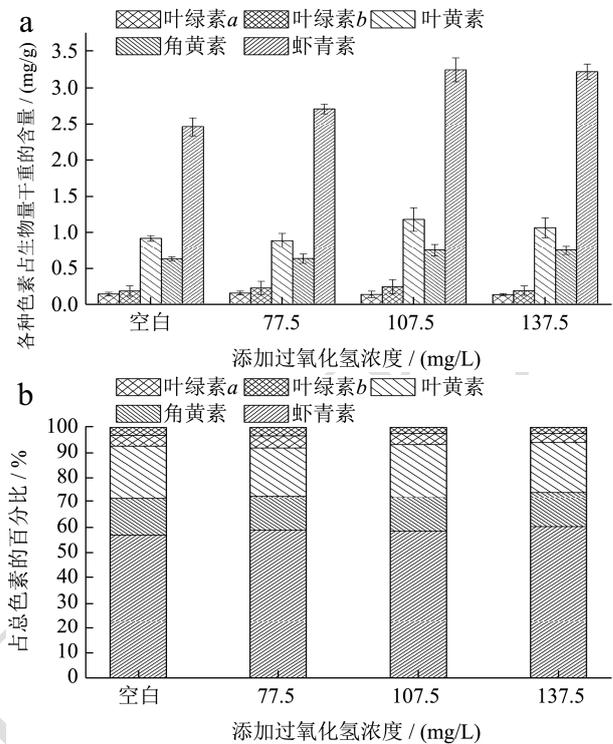


图4 不同过氧化氢浓度下佐夫色绿藻色素含量(a)和各色素所占总色素百分比(b)

Fig.4 Pigment contents (a) and abundances (b) as percentages of the total pigments in *C. zofingiensis* in the cultures with different hydrogen peroxide concentrations

不同过氧化氢浓度对佐夫色绿藻生长和虾青素积累影响的综合对比分析如表2所示。添加过氧化氢不会抑制藻细胞对葡萄糖的消耗,反而可以提高葡萄糖消耗速率,最高为2.80 g/(L·d),显著高于对照组( $p < 0.05$ )。当过氧化氢浓度从77.50 mg/L增加到137.50 mg/L时,虾青素产量和产率也达到最大值,分别为73.45 mg/L和4.59 mg/L/d,相较于空白组,分别提高了82.93%和82.87%,增长非常显著( $p < 0.05$ )。过氧化氢浓度为137.50 mg/L的条件下,生物量得率和虾青素得率也为最大值,分别为0.45 g/g葡萄糖和2.66 mg/g葡萄糖。Ip等人<sup>[8]</sup>研究了异养条件下过氧化氢对佐夫色绿藻的影响,其研究结果表明过氧化氢的添加有利于虾青素的积累,这与实验结果相一致,但其虾青素的产量最高为12.58 mg/L,远低于本实验结果。由此得出:过氧化氢的最适浓度范围为107.50~137.50 mg/L,从虾青素含量和生产成本方面的角度考虑,认为107.50 mg/L过氧化氢最优。

表2 不同乙醇浓度下佐夫色绿藻对葡萄糖消耗和虾青素积累情况的对比

Table 2 Comparisons of average glucose consumption and astaxanthin accumulation in *C. zofingiensis* cultures with different hydrogen peroxide concentration

过氧化氢 (mg/L)	葡萄糖消 耗量/(g/L)	葡萄糖消耗 速率/[g/(L·d)]	细胞数 ( $10^8$ cfu/mL)	虾青素产量 (mg/L)	虾青素产率 /[mg/(L·d)]	生物量得率 (g/g 葡萄糖)	虾青素得率 (mg/g 葡萄糖)	虾青素所占 总类胡萝卜素的 百分比/%
空白	25.60±0.20	2.56±0.02	1.86±0.04	40.17±1.43	2.51±0.08	0.21±0.01	1.57±0.04	61.49±0.09
77.5	27.60±0.40	2.76±0.04*	1.91±0.02	58.49±1.65*	3.66±0.22*	0.40±0.01*	2.12±0.04*	64.22±0.17*
107.5	28.00±0.40	2.80±0.04*	1.90±0.02	72.47±1.07*	4.52±0.70*	0.41±0.01*	2.59±0.03*	66.31±0.93
137.5	27.60±0.20	2.76±0.02*	1.91±0.03	73.45±2.37*	4.59±0.12*	0.45±0.01*	2.66±0.07*	65.48±0.34

注: 采用 t 检验分析成对数据的显著性, 用\*标注显著性 ( $p < 0.05$ )。

### 2.3 发酵工艺优化以强化佐夫色绿藻生产虾青素性能

在前期多诱导条件优化基础上, 本研究在 5 L 光发酵罐中进行佐夫色绿藻放大培养, 进一步分析比较了恒定高光强、低光强-高光强、低光强-高光强-补加过氧化氢三种发酵工艺对佐夫色绿藻生产虾青素的影响, 从而获得最佳发酵工艺以强化佐夫色绿藻生产虾青素的性能。由图 5a~c 可知, 三种不同发酵培养中, 温度和 pH 值均处于藻细胞适宜生长的条件, 但是不同光强及其变化对佐夫色绿藻细胞生长和葡萄糖消耗有直接影响。如图 5a、5d 所示, 在恒定高光强组, 藻细胞生物量增加较慢, 葡萄糖消耗速率也较低, 培养 144 h 结束后, 共消耗葡萄糖浓度 6.30 g/L, 藻细胞密度为  $1.15 \times 10^8$  CFU/mL, 生物量较低, 仅为 8.05 g/L。这说明  $653 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的高光直接抑制了藻细胞生长并减缓其对葡萄糖吸收利用, 这是因为高光会损伤光系统 PSII, 从而影响了细胞的生长及营养物质的吸收, 从而抑制了细胞分裂<sup>[26]</sup>。此外, 需要注意的是高光培养效果还与培养体系有直接关系, 如 Del Campo 等人<sup>[19]</sup>在  $460 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  恒定光强的圆柱状反应器中进行佐夫色绿藻培养 10 d 后, 生物量从约 0.30 g/L 增加到 7.00 g/L, 生物量增加比较显著, 此时高光强并没有抑制藻细胞生长, 推测 5 L 发酵罐和圆柱反应器等不同培养体系因结构差异而对于外界光线具有不同光衰减效果, 从而影响了光照培养效果。

而在先低光后高光实验组 (图 5b、e), 藻细胞消耗葡萄糖的速率较快, 在培养到 36 h 后, 葡萄糖浓度就降低到 6 g/L 以下, 之后补加到 20 g/L 后继续培养, 之后葡萄糖消耗速率略有降低, 培养结束后共消耗葡萄糖 24.70 g/L。藻细胞生长速率也较快, 在 0~24 h 及 48~60 h 的时间段内细胞数有显著增加, 培养到 72 h 时生物量达到最大值 16.15 g/L, 之后略有降低并趋

于平稳, 培养结束后藻细胞生物量为 14.75 g/L, 同恒定高光强组相比增加 83.23%, 有显著的增长 ( $p < 0.05$ )。Chen 等人<sup>[4]</sup>在摇瓶体系中采用两阶段培养策略, 即先在  $35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  弱光培养 4 d, 然后在  $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  强光下培养 8 d, 将藻细胞生物量从 3.65 g/L 提高到 6.75 g/L 以上, 增加非常显著 ( $p < 0.01$ ), 这与本研究结果相似, 但本研究获得的生物量更高。其中图 5b 中温度波动范围大的原因可能是由于外置光源强度的阶段式增大和发酵罐制冷系统响应不及时, 导致培养 24~72 h 时培养体系的温度出现波动, 但是基本都维持在藻细胞适宜生长的温度范围 25~30 °C 之内<sup>[5]</sup>, 此时藻细胞生物量依然不断增加, 这说明低光是影响藻细胞生长的主要因素。当培养到 72 h 时, 光强从  $312.06 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  显著增加到  $539.46 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 此时高光和营养物质缺乏等胁迫条件协同作用从而诱导藻细胞内虾青素的积累, 但会抑制藻细胞生长, 因此藻细胞生长呈现出达到最大值后略有降低并趋于平稳的趋势。

在低光强-高光强-补加过氧化氢的发酵工艺优化实验中, 在培养前 12 h 采用低光培养促进细胞生长并缩短延滞期, 在培养到 72 h 后添加诱导剂过氧化氢从而强化藻细胞内虾青素的积累, 实验结果如图 5c、f 所示。培养前 12 h 细胞生长速率较快, 之后提高高光强后, 细胞生物量和细胞数短暂下降, 继续培养 72 h 后, 生物量才开始逐渐增加, 培养结束后达到 11.08 g/L, 但是还是显著高于恒定高光强组。这说明前 12 h 低光培养还是有助于细胞生长, 但可能时间还是太短, 之后突然提高高光强, 产生了过多的光自由基, 导致部分藻细胞损伤。培养前 24 h 的葡萄糖消耗速率较快, 但之后也受到高光的抑制, 培养结束后葡萄糖消耗量为 16.10 g/L, 显著低于低光强-高光强实验组。综上, 低光强-高光强以及低光强-高光强-补加过氧化氢的生物量浓度分别为 16.15 g/L 和 11.08 g/L 显著高于恒定高光强 (8.15 g/L) ( $p < 0.05$ ), 从积累生物量角度而言, 低光强-高光强的培养方式更有利于佐夫色绿藻生长。

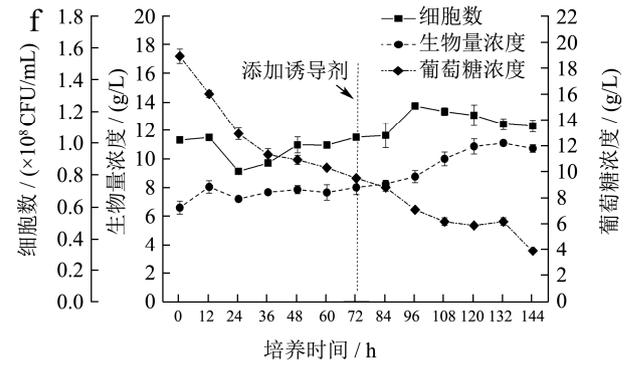
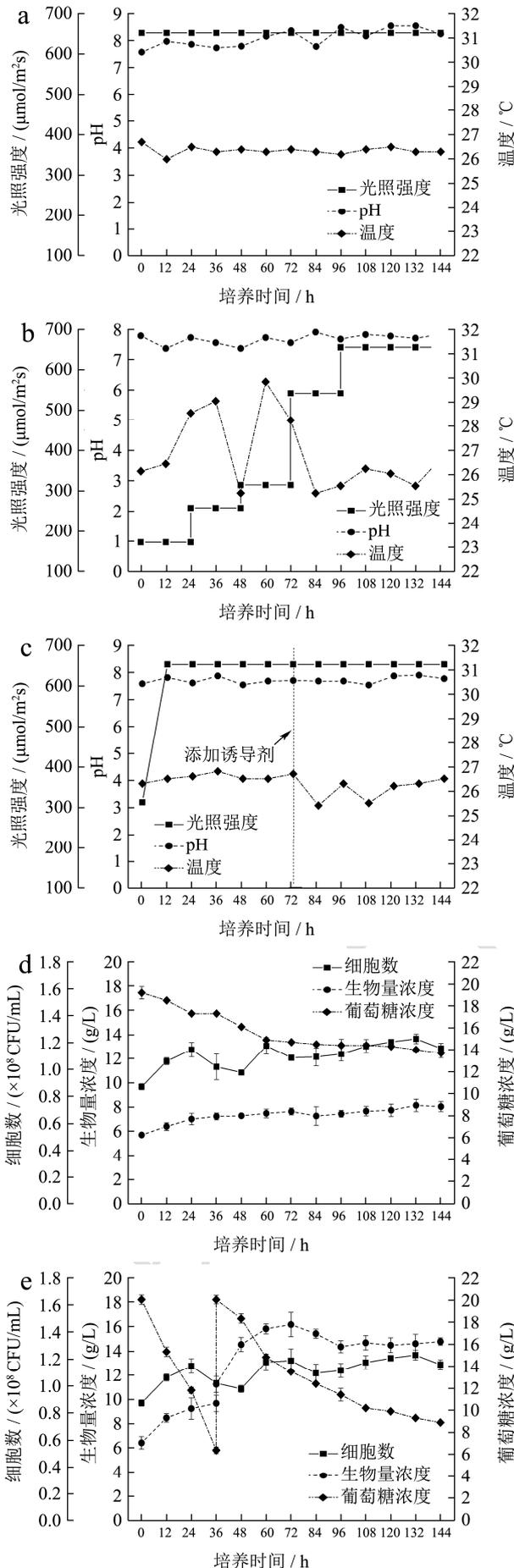


图5 不同光发酵罐培养过程中温度、pH值、光照强度以及佐夫色绿藻生长和葡萄糖消耗情况随培养时间的变化曲线

Fig.5 Time courses of the changes of temperature, pH and light intensity, glucose consumption, and cell growth of *C. zofingiensis* grown in 5 L photo-fermenter with different culture conditions

三种不同发酵工艺对佐夫色绿藻积累虾青素的影响如图6所示。由图6a可知,在恒定高光强组,虾青素含量和产量随着培养时间的增加而呈现稳步上升的趋势,且培养到108 h时达到最大值,分别为2.80 mg/g和21.50 mg/L,分别是初始虾青素含量和产量的3.50倍和4.60倍,增加非常显著。Del Campo等人<sup>[19]</sup>采用圆筒装置对佐夫色绿藻在460 μmol/m<sup>2</sup>·s或者920 μmol/m<sup>2</sup>·s恒定光强下进行培养,其虾青素产量最高为19.00 mg/L,低于本实验结果。在低光强-高光强组(图6b),前期虾青素积累速率较慢,但培养至36 h之后,随着光强的提高,虾青素的含量和产量快速增长,推测其原因可能是葡萄糖的加入和光强增加会使得藻所在的环境处于适合藻生长和虾青素积累的高光及高C/N的条件<sup>[5,12]</sup>。在培养至96 h之后虾青素含量的增长速度降低,并在培养到132 h时虾青素含量达到最大值为2.66 mg/g,之后基本处于稳定状态,可能原因是培养至后期,细胞密度以及体积逐渐增大、细胞之间相互遮挡等因素,从而使得有效的光照强度降低,但低光强有助于细胞生长,故虾青素产量在培养至132 h时达到最大,为38.38 mg/L,相较于高光强条件下,尽管虾青素的含量略有降低,然而虾青素的产量提高了78.84%。Chen等人<sup>[4]</sup>同样采用低光强-高光强的培养策略进行培养288 h后,虾青素含量从1.80 mg/g增加到2.19 mg/g,而产量从6.58 mg/L增加到14.80 mg/L。这说明采用低光强-高光强能够提高佐夫色绿藻积累虾青素的能力,且在这种培养方式下不会显著降低细胞内虾青素含量。

在低光强-高光强-补加过氧化氢实验条件下,在培养前期虾青素含量虽然呈现不断增加趋势,但是增长较缓慢,与恒定高光强组的现象基本一致,结果如图

6c 所示。而在补加过氧化氢后的 72~120 h 内, 虾青素含量的增加非常显著, 从 2.30 mg/g 增加到 3.82 mg/g。这相对于高光强和低光强-高光强实验组, 分别提高了 36.92%和 43.60%, 增加非常显著 ( $p<0.05$ )。这说明补加过氧化氢对虾青素的积累具有显著的效果。此时, 虾青素产量也达到最大值 41.41 mg/L, 产率为 11.50 mg/L/d。之后继续培养, 虾青素含量和产量均呈现下降趋势, 这可能是由于细胞后期耐受高光强的能力下降, 从而受到光氧化损伤, 从而导致细胞数和生物量干重及虾青素含量和产量均呈下降的趋势。此外, 由低光强-高光强-补加过氧化氢实验组的虾青素含量和产量变化可知 (图 6c), 最佳的培养时间为 120 h, 此时采收可以确保获得最大虾青素生产效率并降低培养成本, 相较于前两种培养方式能够获得更高的虾青素含量和产量。这种培养策略结合了低光强-高光强的模式的增加生物量浓度的优点, 又提高了佐夫色绿藻的虾青素含量, 最适宜用于佐夫色绿藻培养生产虾青素。

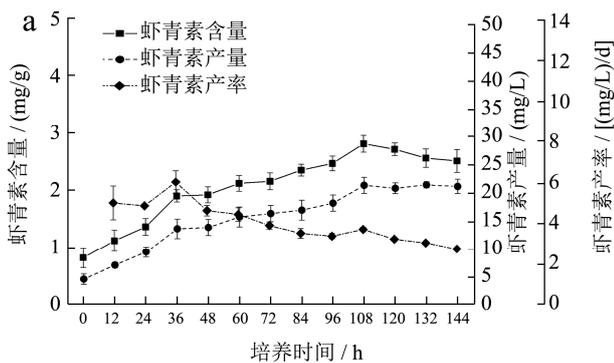


表 3 三种不同发酵培养条件对佐夫色绿藻生产虾青素性能的影响对比分析

Table 3 Comparisons of the effects of three different culture conditions on astaxanthin production by *C. zofingiensis*

实验条件	恒定高光	低光强-高光强	低光强-高光强-补加过氧化氢
葡萄糖消耗量/(g/L)	6.30±0.14	24.70±0.28*	16.10±0.18*
葡萄糖消耗速率/[g/(L·d)]	1.05±0.02	1.85±0.04*	2.68±0.06*
平均比生长速率/d <sup>-1</sup>	0.07±0.01	0.13±0.02*	0.10±0.02
最大生物量浓度/(g/L)	8.15±0.51	16.15±0.99*	11.08±0.20*
生物量产率/[g/(L·d)]	0.39±0.02	1.39±0.03*	0.83±0.02*
生物量得率/(g/g 葡萄糖)	0.37±0.01*	0.34±0.01*	0.27±0.01
虾青素含量/(mg/g)	2.80±0.10	2.66±0.14	3.82±0.12*
虾青素产量/(mg/L)	21.46±0.52	38.38±0.52*	41.41±0.93*
虾青素产率/[mg/(L·d)]	2.76±0.07	6.25±0.15*	6.77±0.11*
虾青素得率/(mg/g 葡萄糖)	2.63±0.02	1.25±0.01	1.60±0.01

注: 采用 t 检验分析成对数据的显著性, 用\*标注显著性 ( $p<0.05$ )。

由表 3 可知, 在低光强-高光强实验组获得的藻细胞平均比生长速率最高为 0.13 d<sup>-1</sup>, 生物量产率达到最大值, 为 1.39 g/(L·d), 显著高于恒定高光实验组。在虾青素积累方面, 采用先低光后高光培养条件, 在虾青素含量方面与恒定高光组无显著差异, 但是由于生

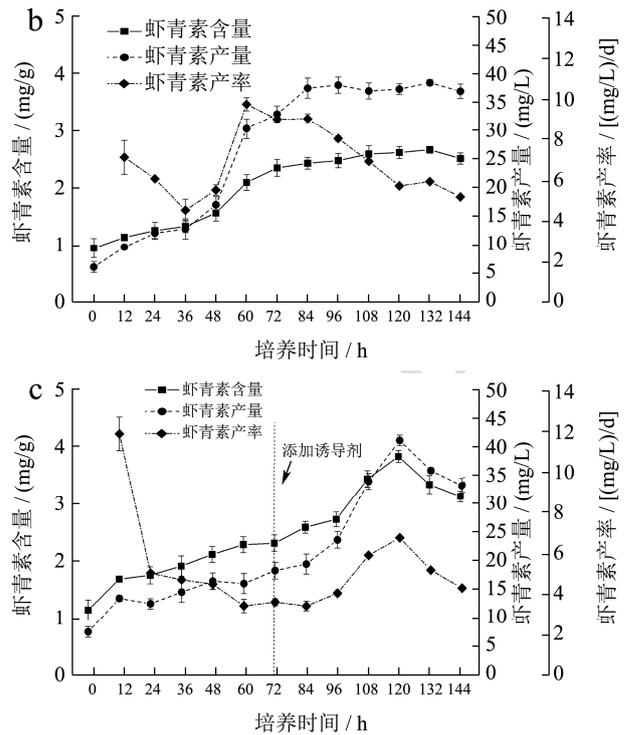


图 6 不同光发酵罐培养条件下佐夫色绿藻胞内虾青素含量和产量随培养时间的变化曲线

Fig.6 Time courses of the content and yield of astaxanthin in *C. zofingiensis* grown in 5 L photo-fermenter with different culture conditions

为了综合分析不同发酵培养条件对佐夫色绿藻生产积累虾青素的影响, 本实验将不同培养条件下的藻细胞生产指标进行对比, 结果如表 3 所示。

物量增长显著的原因, 虾青素产量和产率也有显著提高。Liu 等人<sup>[27]</sup>在 350 μmol/(m<sup>2</sup>·s) 高光下进行 *C. zofingiensis* 的半连续培养, 可以获得的生物量产率为 0.79 g/(L·d), 虾青素含量和产率分别为 3.40 mg/g 和 2.70 mg/(L·d)。相对而言, 本研究采用先低光后高光

的发酵工艺,在不影响虾青素积累的前提下,可以显著提高佐夫色绿藻生产虾青素的能力。更进一步,采用培养中期补加过氧化氢的发酵培养,有助于提高藻细胞吸收利用葡萄糖的能力,最大消耗速率为 2.68 g/(L·d),同时可以在此基础上显著提高虾青素的含量和产率。但培养结束后得到的藻细胞生物量得率和虾青素得率较低,仅为 0.27 g/g 和 1.60 mg/g,这说明过多的葡萄糖消耗并没有被有效转化为生物量和虾青素,其中原因还有待深入研究。总之,采用低光强-高光强-补加过氧化氢的培养工艺最有利于佐夫色绿藻生产积累虾青素。

目前关于佐夫色绿藻的研究报道很多,然而利用发酵罐装置进行佐夫色绿藻培养积累虾青素的大多采用异养发酵。Sun 等人<sup>[28]</sup>采用 3.70 L 的发酵装置在异养条件下对佐夫色绿藻培养了 16 d,其最终获得虾青素产量为 32.40 mg/L,低于本实验中采用低光强-高光强-补加过氧化氢发酵模式的结果。而 Liu 等人<sup>[29]</sup>利用 3.70 L 的发酵装置异养培养积累虾青素,尽管其最终获得虾青素产量为 56.10 mg/L,然而其虾青素含量仅为 1.23 mg/g,虾青素含量低于本研究中的结果。Chen 等人<sup>[4]</sup>实验表明低光强-高光强两步法最有利于提高佐夫色绿藻生物量和虾青素产量,与本实验结果一致,并且本研究在此基础上产生加入了氧化诱导剂过氧化氢,进一步提高了虾青素产量。Zhang 等人<sup>[11]</sup>采用两步法对佐夫色绿藻培养了 16 d,其最高生物量浓度可达 98.40 g/L,虾青素产量为 73.30 mg/L,而其虾青素产率为 5.24 mg/(L·d),低于本研究结果。以上研究结果进一步证明了本实验所采用于发酵罐中进行低光强-高光强-补加过氧化氢的发酵方式的科学性和优越性。

综上所述,采用光发酵罐的发酵模式进行佐夫色绿藻发酵培养具有其独特的优势,同时在培养前期(0~72 h)采用先低光后高光的阶梯式提高光强的培养策略有助于佐夫色绿藻细胞生长,而在培养中后期(72~120 h)通过添加过氧化氢进行诱导培养则有助于藻细胞内虾青素的高效积累。通过这两种培养策略可以使得佐夫色绿藻的虾青素生产性能得到显著提升,这可以为佐夫色绿藻的发酵培养优化以及规模化培养生产虾青素提供理论指导和参考依据,有利于推动佐夫色绿藻在天然虾青素商业化生产中的应用。

### 3 结论

本研究在摇瓶和光发酵罐中初步探索不同诱导条件和发酵工艺对佐夫色绿藻胞内虾青素积累的影响,从中可知采用葡萄糖和醋酸钠作为混合碳源优于单一

碳源,同时添加过氧化氢进行诱导可优化佐夫色绿藻积累虾青素的效果。进一步在 5 L 光发酵罐实验中对上述优化条件进行验证,从而得出低光强-高光强-补加过氧化氢的发酵工艺最利于佐夫色绿藻积累虾青素,同时兼顾生物量和虾青素积累量,从而获得了最优的虾青素产量。本研究结果为高产虾青素的微藻规模化关键培养技术提供了重要研究基础。

### 参考文献

- [1] MBATI Ranga Rao, PHANG Siew Moi, RAVI Sarada, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128-152.
- [2] 肖素荣,李京东. 虾青素的特性及应用前景[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(5): 33-35  
XIAO Su-rong, LI Jing-dong. The characteristics and application prospect of astaxanthin [J]. *Chinese Food and Nutrition*, 2011, 17(5): 33-35
- [3] Ambati Ranga Rao, Gogisetty Deepika, Aswathanarayana Ravishankar Gokare, et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: current trends and future prospects [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(12): 1880-1902
- [4] 陈俊辉. 佐夫色绿藻高效积累虾青素的诱导调控机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018  
CHEN Jun-hui. Regulation mechanism of high effective astaxanthin accumulation in *Chromochloris zofingiensis* by induction [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [5] LIU Jin, SUN Zheng, GERKEN Henri, et al. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(6): 3487-3515
- [6] F Bregas Jaime, Otero Ana, Maseda Ana, et al. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 89(1): 65-71
- [7] Kim Dong-Yeon, Vijayan Durairaj, Praveenkumar Ramasamy, et al. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus* [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 300-310
- [8] Ip P-F, Chen F. Peroxynitrite and nitryl chloride enhance astaxanthin production by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(11): 3595-3599

- [9] Fakhri S, Abbaszadeh F, Dargahi L, et al. Astaxanthin: a mechanistic review on its biological activities and health benefits [J]. *Pharmacological Research*, 2018, 136: 1-20
- [10] Zhang Z, Sun D Z, Mao X M, et al. The crosstalk between astaxanthin, fatty acids and reactive oxygen species in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* [J]. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 2016, 19: 178-183
- [11] Zhang Z, Huang J J, Sun D Z, et al. Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP) [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 515-522
- [12] IP Po-Fung, CHEN Feng. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(2): 733-738
- [13] 姜雪亚,陈俊辉,魏东.营养强化混养条件下提高绿色藻生物量和虾青素产量[J].现代食品科技,2018,34(8):155-164  
JIANG Xue-ya, CHEN Jun-hui, WEI Dong. Increasing yields of biomass and astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* under nutrient-enhanced mixotrophic conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(8): 155-164
- [14] 姜雪亚,陈俊辉,魏东.不同诱导条件强化佐夫色绿藻积累虾青素[J].现代食品科技,2020,36(8):1-11  
JIANG Xue-ya, CHEN Jun-hui, WEI Dong. Enhanced astaxanthin accumulation in *Chromochloris zofingiensis* under different induction conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(8): 1-11
- [15] Mulders K J M, Weesepeel Y, Bodenes P, et al. Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: a carotenoid metabolism study [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 125-140
- [16] Chen J, Wei D, Pohnert. Rapid Estimation of astaxanthin and the carotenoid-to-chlorophyll ratio in the green microalga *Chromochloris zofingiensis* using flow cytometry [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(7): 231
- [17] Silva H R, Prete C E C, Zambrano F, et al. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions [J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 10
- [18] 庄惠如,陈必链,王明兹,等.雨生红球藻混合营养与异养培养研究[J].微生物学通报,2000,27(3):198-201  
ZHUANG Hui-ru, CHEN Bi-lian, WANG Ming-zi, et al. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus phuvialis* [J]. *Microbiology China*, 2000, 27(3): 198-201
- [19] J A Del Campo, H Rodríguez, J Moreno, et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 848-854
- [20] Zhenyao Wang, Fei Luo, Ziting Wang, et al. The potential growth and lipid accumulation in *Coccomyxa subellipsoidea* triggered by glucose combining with sodium acetate [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(7): 1-13
- [21] Yu X, X Niu, X Zhang, et al. Identification and mechanism analysis of chemical modulators enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus phuvialis* [J]. *Algal Research*, 2015, 11: 284-293
- [22] Raymond Yin-Nin Ma, Feng Chen. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36(12): 1175-1179
- [23] Wang Y, Liu Z, Qin S. Effects of iron on fatty acid and astaxanthin accumulation in mixotrophic *Chromochloris zofingiensis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(3): 351-357
- [24] Ip, P-F, F Chen. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(11): 3491-3496
- [25] Mayasari E, Raya I, Natsir H. Effect of Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> addition on growth and  $\beta$ -carotene production of *Dunaliella salina* [J]. *Journal of Physics Conference Series*, 2018, 979(1): 012012
- [26] Luca Scibilia, Laura Girolomoni, Silvia Berteotti, et al. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus phuvialis* [J]. *Algal Research*, 2015, 12: 170-181
- [27] Liu J, X Mao, W Zhou, et al. Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis* [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 273-280
- [28] Sun N, Wang Y, Li Y-T, et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(11): 1288-1292
- [29] Liu J, Sun Z, Zhong Y, et al. Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by a *Chlorella zofingiensis* mutant [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(5): 1447-1456