

葡萄糖亚适量补加胁迫裂殖壶菌胞内 类胡萝卜素积累

程启坤¹, 王儒昕¹, 王攀攀², 李 鑫¹, 刘 军¹

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 武汉 430023; 2. 武汉净宇微藻科技有限公司, 武汉 430075)

摘要:为探究裂殖壶菌积累类胡萝卜素的营养胁迫调控手段, 考察了发酵中期(72 h起), 不同葡萄糖补加质量浓度、酵母提取物补加质量浓度对裂殖壶菌生长、油脂合成和类胡萝卜素合成的影响。结果表明: 仅补加较低质量浓度葡萄糖时, 裂殖壶菌生物量和油脂产量虽较低, 但胞内类胡萝卜素含量较高; 在5 L发酵罐中、发酵中期, 采用溶氧反馈控制葡萄糖流加策略, 人为制造葡萄糖亚适量补加条件, 在发酵98 h时胞内类胡萝卜素含量达到最大, 为151.0 μg/g, 相比葡萄糖充足供应条件下的水平提高了4倍以上。综合发酵实验结果和裂殖壶菌代谢途径分析, 可推测: 油脂合成期葡萄糖亚适量补加可限制细胞生长、弱化裂殖壶菌胞内油脂合成途径, 胁迫碳源流向类胡萝卜素合成途径, 促进类胡萝卜素的大量积累。

关键词:裂殖壶菌; 类胡萝卜素; 碳源; 油脂

中图分类号: TQ920.1; Q935 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)07-0102-07

Insufficient supplement of glucose enforcing a large accumulation of carotenoids by *Schizochytrium* sp. S31

CHENG Qikun¹, WANG Ruxin¹, WANG Panpan², LI Xin¹, LIU Jun¹

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2. Wuhan Jingyu Microalgae Science & Technology Co., Ltd., Wuhan 430075, China)

Abstract: For exploring the nutrient regulation to enforce accumulation of carotenoids by *Schizochytrium* sp. S31, the effects of different amounts of glucose and yeast extract on the biomass, synthesis of lipids and carotenoids in the middle stage of fermentation (beginning at 72 h) were investigated. The results indicated that the carotenoids content in cell was relatively higher when glucose was fed at a lower level, although the biomass and lipids production were low. Furthermore, the fermentations were carried out in a 5 L fermentor, using DO-Stat glucose feeding strategy in the middle stage, in order to create the condition of insufficient glucose supplement on purpose. The highest carotenoids content 151.0 μg/g was achieved when the fermentation time was 98 h, more than four times increment compared with the level of fermentation with glucose sufficient supplement. From analysis of the fermentation performances and metabolic pathway, it could be speculated that insufficient glucose supplement in the lipid synthesis stage could enforce carbon source flowing into the carotenoids synthesis pathway, by restricting cell growth and weakening the lipid in cell synthesis pathway, which improved a large accumulation of carotenoids.

Key words: *Schizochytrium* sp. S31; carotenoids; carbon source; lipid

收稿日期: 2017-10-27; 修回日期: 2018-04-29

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (B2016080)

作者简介: 程启坤(1991), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物代谢 (E-mail) 461185253@qq.com。

通信作者: 李 鑫, 讲师, 博士 (E-mail) lixin084@163.com。

类胡萝卜素, 是广泛分布于自然界中一类脂溶性色素的总称, 已被发现的种类超过了750种, 存在于动物、植物、真菌、藻类等生物体内^[1]。类胡萝卜素的典型结构由8个异戊二烯单位组成, 而共轭双

键数量、成环数量、以及含氧元素量的差异,使得不同类胡萝卜素在颜色上具有一定差异,其中包括黄色、橙红色、红色、红棕色^[2]。类胡萝卜素是体内合成维生素A的主要来源,同时具有抗氧化、保护视网膜、调节免疫力、抑制肿瘤等多种功效,对人体健康十分有益^[3-5]。

相比化学合成法和植物提取法,利用微生物发酵生产类胡萝卜素具有生产周期短、产物种类多、产品质量稳定等优势,已成为研究的热点。目前,合成类胡萝卜素的微生物包括霉菌(三孢布拉霉菌)、酵母类(红发夫酵母、粘性红圆酵母)、藻类(杜氏盐藻、雨生红球藻)和光合细菌。相较于其他微生物和植物,藻类所产的类胡萝卜素种类最多、单位质量细胞中的类胡萝卜素含量更高,是理想的类胡萝卜素生产菌株;但藻类的生长和产物合成必须依赖光照,且细胞干重极低,阻碍了其应用于类胡萝卜素大规模生产。

裂殖壶菌(*Schizochytrium*)是一种类似于藻类的单细胞海洋真菌,主要应用于二十二碳六烯酸(DHA)的工业发酵生产,其在合成大量脂肪酸的同时,会合成多种类胡萝卜素作为脂质伴随物,包括 β -胡萝卜素、角黄素、虾青素、海胆酮等^[6-7]。有研究认为,裂殖壶菌以其生长速度快、发酵细胞密度高、不依赖光照等特点,有潜力成为工业发酵合成类胡萝卜素的生产菌株^[8]。但在目前裂殖壶菌产DHA的发酵条件下,胞内类胡萝卜素含量仅为20~30 $\mu\text{g/g}$ ^[9-11]。关于裂殖壶菌合成类胡萝卜素的发酵条件摸索,仅有甘油相比葡萄糖更有利于裂殖壶菌胞内类胡萝卜素的合成的报道^[12],而鲜有关于营养胁迫促进裂殖壶菌大量积累类胡萝卜素的报道。

本研究通过调整发酵中期碳源和氮源的补加质量浓度,探究处于油脂合成期的裂殖壶菌,在不同碳、氮源补充条件下,胞内油脂和类胡萝卜素含量的变化,试图通过调控营养物质供应水平胁迫裂殖壶菌大量积累类胡萝卜素。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC20888), 武汉净宇微藻科技有限公司馈赠。

1.1.2 试剂与仪器

酵母提取物,购自OXOID公司;脂肪酸组分标准品,购自Sigma公司;其他试剂均为分析纯,购自国药集团。

5424R 冷冻离心机,超净工作台,电子天平,

FYL 低温冰箱(-20℃/4℃),台式离心机,LR-PH-S 25 pH计,Agilent 7890A 气相色谱仪,CRY-2112 摇床,752 紫外可见分光光度计,NDK200-1 氮吹仪,FD-1A-50 真空冷冻干燥机,生化培养箱,涡旋振荡器,高压灭菌锅,电磁炉。

1.1.3 培养基

固体活化培养基:葡萄糖 5 g/L,酵母提取物 1 g/L,胰蛋白胨 1 g/L,海盐 40 g/L,琼脂 15 g/L,初始 pH 6.5,115℃蒸汽灭菌 30 min。

种子培养基:同固体活化培养基。

发酵培养基:葡萄糖 20 g/L(摇瓶)或 80 g/L(发酵罐),酵母菌粉 10 g/L,其他成分参照文献[13]。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养方法

种子活化:将保藏于-80℃冰箱中的裂殖壶菌甘油管菌株划线接种到活化斜面上,于28℃下培养48 h至平板上出现肉眼可见的浅黄色菌落。挑取活化后的单菌落,接种到含有50 mL种子培养基的250 mL摇瓶中,于28℃和200 r/min条件下培养24 h。

摇瓶发酵培养:按10%的接种量将种子培养液接入装有50 mL发酵培养基的250 mL摇瓶中,于28℃和200 r/min条件下培养。初始葡萄糖质量浓度为20 g/L,发酵72 h开始补加一定质量浓度的葡萄糖(或同时补加葡萄糖和酵母提取物),以后每隔24 h补加1次,直至144 h发酵结束。每个实验组设置3个平行。

5 L发酵罐培养:按10%的接种量将种子培养液接入2.5 L发酵液中,维持温度28℃,初始pH为7.0,并使用稀盐酸/氨水调节发酵pH稳定在7.0的水平。初始搅拌转速300 r/min,随着溶氧的下降逐步增加搅拌转速至700 r/min,后不再改变搅拌转速。发酵过程中流加葡萄糖浓缩液(500 g/L),发酵72 h之前,维持发酵液中葡萄糖质量浓度在20 g/L以上;发酵72 h开始,根据设定的流加策略补加葡萄糖浓缩液,直至发酵结束。

1.2.2 分析方法

发酵液还原糖量的测定:采用DNS法,参照文献[14]。

细胞干重的测定:采用真空冷冻干燥法,参照文献[15]。

类胡萝卜素的提取与测定:参照文献[16]。

油脂的提取及各脂肪酸组分测定:油脂提取及甲酯化均参照文献[17],以十九烷酸作为内标。用

气相色谱法与内标法分别测定并计算油脂中各脂肪酸组分的含量。色谱条件:柱子 Agilent HP-88 (60 m × 0.25 mm × 0.2 μL);FID 检测器,进样口温度 250 °C,进样量 1 μL;柱温条件为初始 100 °C,进样后以 25 °C/min 的速率升至 175 °C,保持 10 min,继续以 5 °C/min 的速率升至 230 °C,保持 10 min。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖补加质量浓度对细胞干重、油脂、及类胡萝卜素合成的影响

摇瓶发酵初始葡萄糖质量浓度为 20 g/L,发酵 72 h 起,4 个实验组每隔 24 h 补加葡萄糖的质量浓度分别为 2、5、10、20 g/L。72 h 后每 24 h 葡萄糖补加质量浓度为 2 g/L 和 5 g/L 时,发酵结束裂殖壶菌呈现深橘红色。当每 24 h 葡萄糖补加质量浓度提高到 10 g/L 时,菌体颜色变浅,呈现出较浅的橘色。当每 24 h 葡萄糖补加质量浓度进一步提高到 20 g/L 时,菌体红色完全消失,呈现黄色。从菌体颜色的变化可推测,葡萄糖的补加质量浓度可能会影响裂殖壶菌胞内类胡萝卜素的合成。

进一步对不同实验组发酵液中葡萄糖质量浓度、发酵结束时的细胞干重、胞内油脂含量和胞内类胡萝卜素含量进行测定,结果如图 1、图 2 及图 3 所示。

由图 1~图 3 可知,72 h 后每 24 h 补加葡萄糖质量浓度为 2 g/L 和 5 g/L 时,葡萄糖供应量明显无法满足裂殖壶菌的需求,发酵液中葡萄糖基本处于耗尽状态(低于 1 g/L)。发酵结束时,细胞干重和胞内油脂含量均处于较低水平,但胞内类胡萝卜素含量较高。其中每 24 h 补加 5 g/L 葡萄糖的实验组,胞内类胡萝卜素含量达到 134.5 μg/g,类胡萝卜素总产量达到 1.79 mg/L,类胡萝卜素对于葡萄糖的转化效率为 49.1 μg/g。提高每 24 h 补加葡萄糖质量浓度至 10 g/L 后,细胞干重和胞内油脂含量均有所提高,但胞内类胡萝卜素含量明显下降。继续提高每 24 h 补加葡萄糖质量浓度至 20 g/L,发酵液中葡萄糖逐渐开始积累,表明葡萄糖供应量能够完全满足裂殖壶菌的需求,此时细胞干重和胞内油脂含量均为所有实验组中最高值,分别达到 27.3 g/L 和 0.288 g/g,但胞内类胡萝卜素含量却为所有批次中最低,仅为 36.0 μg/g,相比最高水平降低了 73.2%。上述结果表明,发酵中期、葡萄糖补加质量浓度低于菌体需求量(即亚适量补加)时,裂殖壶菌处于碳饥饿状态,虽然会影响裂殖壶菌的进一步生长和油脂合成,但可以显著促进胞内类胡萝卜素的积累。

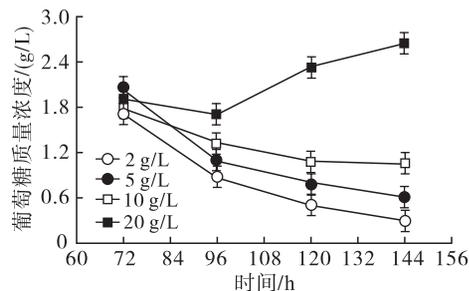


图 1 葡萄糖补加质量浓度对发酵液中葡萄糖质量浓度影响

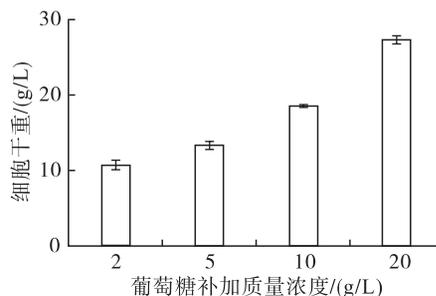


图 2 葡萄糖补加质量浓度对细胞干重的影响

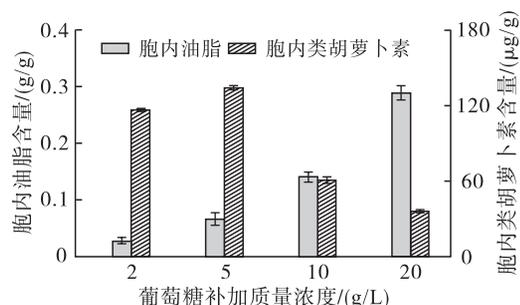


图 3 葡萄糖补加质量浓度对胞内油脂及类胡萝卜素含量的影响

2.2 酵母提取物补加质量浓度对细胞干重、油脂及类胡萝卜素合成的影响

72 h 后固定补加葡萄糖质量浓度为每 24 h 5 g/L,同时,向不同实验组发酵液中每 24 h 补加 0、2、5、10、20 g/L 酵母提取物,考察酵母提取物补加质量浓度对发酵液中葡萄糖质量浓度、细胞干重、油脂及类胡萝卜素合成的影响,结果如图 4、图 5 及图 6 所示。

由图 4~图 6 可知,在葡萄糖补加质量浓度固定、且处于亚适量的状态下,补加了酵母提取物的发酵液中葡萄糖残留量明显高于未补加酵母提取物的批次。而且,随着酵母提取物每 24 h 补加质量浓度从 2 g/L 提高到 20 g/L,最终获得的细胞干重从 13.5 g/L 增加到 26.7 g/L。上述结果表明,酵母提取物的补加可以弥补因葡萄糖供应不足对裂殖壶菌生长造成的影响。同时,酵母提取物的补加质量浓度提高,会使胞内油脂含量下降,这主要是因为较高质量浓度的氮源会减少油脂合成前体——乙酰辅酶

A 的积累^[18]。

由图6可知,葡萄糖亚适量补加的条件下,同时补加酵母提取物,胞内类胡萝卜素含量明显低于未添加酵母提取物实验组的水平,且随着酵母提取物每24 h补加质量浓度的提高,类胡萝卜素在细胞内的含量逐步下降。上述结果表明,发酵中期在葡萄糖亚适量补加的条件下,同时补加酵母提取物,能促进裂殖壶菌的生长,但并不利于油脂和类胡萝卜素在裂殖壶菌细胞内的积累。

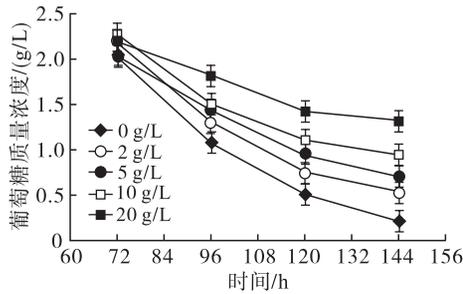


图4 酵母提取物补加质量浓度对发酵液中葡萄糖质量浓度的影响

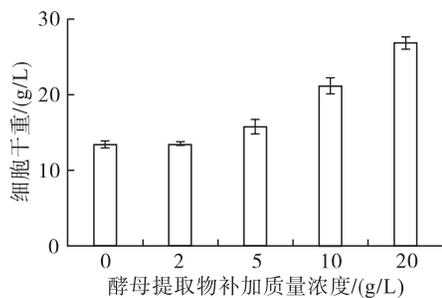


图5 酵母提取物补加质量浓度对细胞干重的影响

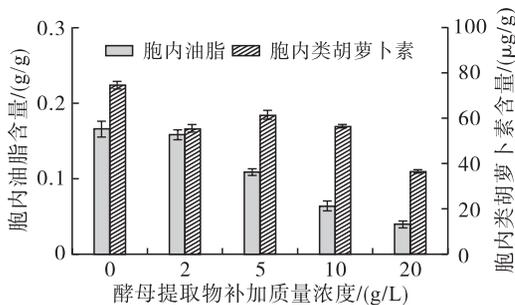


图6 酵母提取物补加质量浓度对胞内油脂及类胡萝卜素含量的影响

2.3 采用葡萄糖恒速流加的分批补料发酵

在5 L发酵罐中进行分批补料发酵,进一步验证油脂合成期葡萄糖亚适量供应条件对裂殖壶菌胞内油脂合成和类胡萝卜素积累的影响。为获得较高的细胞干重,在发酵72 h前,通过间歇流加葡萄糖浓缩液,维持发酵液中葡萄糖质量浓度在20 g/L以上。72 h后,采用葡萄糖恒速流加策略,人为制造葡萄糖亚适量供应条件,使细胞处于碳饥饿状态。

根据48~72 h间葡萄糖的总消耗量,计算出该

段时间葡萄糖的平均消耗速率约为5 g/(L·h)。因此,将72 h开始的葡萄糖恒速流加的速率设定为2 g/(L·h),这一葡萄糖补加速率明显低于菌体的葡萄糖消耗速率,从而人为营造葡萄糖亚适量供应的环境,结果如图7所示。

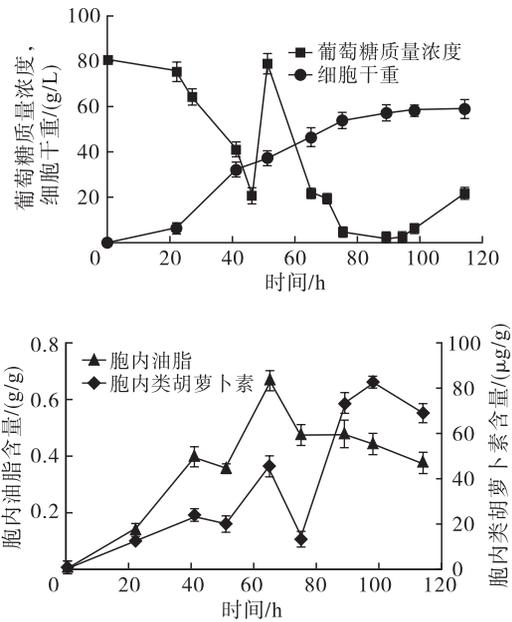


图7 恒速流加葡萄糖策略对裂殖壶菌发酵的影响

由图7可知,在75~98 h间,发酵液中几乎没有葡萄糖积累,菌体消耗葡萄糖质量浓度为44.5 g/L(通过核算该时间段葡萄糖补加的总质量和发酵液中葡萄糖残留的质量浓度而得到)。但98 h后,葡萄糖开始缓慢积累,至114 h发酵结束时,发酵液中葡萄糖质量浓度接近20 g/L。从生长和代谢产物合成的情况来看,由于受到葡萄糖亚适量供应水平的影响,72 h后细胞干重和胞内油脂含量均不再增加,其中胞内油脂含量甚至呈现出缓慢下降的趋势。发酵结束时细胞干重为58.4 g/L,细胞中油脂占比为37.6%。胞内类胡萝卜素含量在葡萄糖亚适量供应条件下,从72 h的13.5 μg/g迅速增加到89 h的73.3 μg/g,并在98 h达到最高值82.5 μg/g。此时,类胡萝卜素总产量达到4.77 mg/L,葡萄糖总消耗量为162.5 g/L,类胡萝卜素对葡萄糖的得率为29.4 μg/g。

采用恒速流加葡萄糖策略,操作简单,可在一段时间内人为制造葡萄糖亚适量供应条件,促进胞内类胡萝卜素含量的提高。但由于流加速度恒定,无法随着菌体对葡萄糖代谢速率逐步降低而变化,导致后期葡萄糖亚适量供应条件被破坏,发酵液中葡萄糖开始积累,胞内类胡萝卜素含量下降。

2.4 采用溶氧反馈控制葡萄糖流加的分批补料发酵

同样,发酵 72 h 前维持发酵液中葡萄糖质量浓度在 20 g/L 以上。发酵 72 h 开始采用溶氧反馈自动控制葡萄糖流加,将葡萄糖流加开启的溶氧条件设置较高(40% 以上),导致葡萄糖补加的延迟,人为制造葡萄糖亚适量供应条件(葡萄糖流加停止的溶氧条件为低于 10%),结果如图 8 所示。

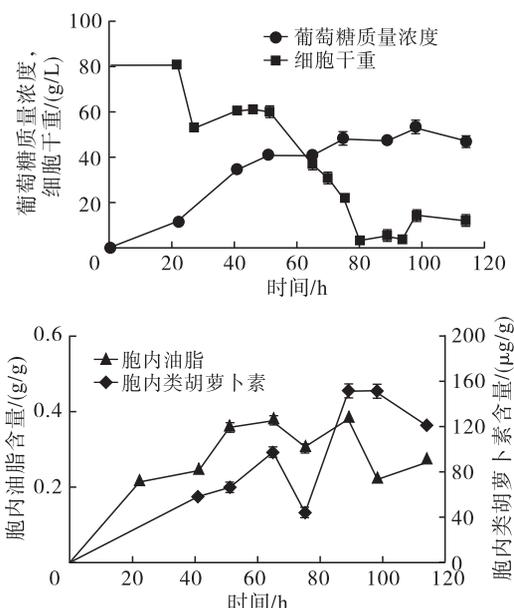


图 8 溶氧反馈调节策略对裂殖壶菌发酵的影响

表 1 采用不同葡萄糖流加策略发酵下裂殖壶菌胞内各脂肪酸组分与胞内类胡萝卜素含量

批次	油脂含量/(g/g)	十四烷酸甲酯含量/(g/g)	十六烷酸甲酯含量/(g/g)	DPA 含量/(g/g)	DHA 含量/(g/g)	类胡萝卜素含量/(μg/g)
1	0.412	0.026	0.159	0.047	0.135	28.8
2	0.444	0.034	0.124	0.029	0.041	82.5
3	0.218	0.011	0.048	0.020	0.030	151.0

注:批次 1 为葡萄糖充足补加(维持质量浓度在 20 g/L 以上),批次 2 为 72 h 后恒速流加葡萄糖,批次 3 为 72 h 后溶氧反馈控制葡萄糖流加。

从表 1 可见,当葡萄糖供应充足时,胞内油脂含量较高,其中不饱和脂肪酸 DHA 含量占油脂总量的 32.77%,而胞内类胡萝卜素含量较低。当采用葡萄糖恒速流加时,胞内油脂总量并没有降低,但胞内不饱和脂肪酸 DHA 含量却大幅下降,相比葡萄糖供应充足条件下的水平降低了近 70%。相比之下,类胡萝卜素含量有明显提高,达到 82.5 μg/g。当采用溶氧反馈控制葡萄糖流加时,胞内油脂含量、饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸含量均明显下降,而类胡萝卜素含量进一步提高。

裂殖壶菌胞内脂肪酸合成途径主要包括脂肪酸合成酶(FAS)途径和聚酮合酶(PKS)途径,其中 FAS 途径负责合成饱和脂肪酸,PKS 途径负责合成不饱和脂肪酸^[19-20]。类胡萝卜素则是通过甲羟戊

由图 8 可知,溶氧反馈控制 80 h 左右自动开启,此时发酵液中葡萄糖已消耗殆尽。在 80~94 h 的范围内,发酵液中几乎没有葡萄糖积累,如图 8 所示。该时间段菌体消耗葡萄糖质量浓度为 26.7 g/L。但 94 h 后,葡萄糖同样出现少量积累的现象。溶氧反馈控制开启后,细胞干重几乎没有增加,但胞内类胡萝卜素含量显著增加。在 98 h 时,胞内类胡萝卜素含量达到 151.0 μg/g。此时,葡萄糖总消耗量为 128.9 g/L,相比恒速流加批次的水平减少了 20.7%;类胡萝卜素总产量达到 7.97 mg/L,类胡萝卜素对葡萄糖的得率为 61.8 μg/g,相比恒速流加批次的水平分别提高了 67.1% 和 110.2%。

采用溶氧反馈控制葡萄糖流加可以实现自动控制,同时,与恒速流加策略相比,该策略可根据菌体代谢的变化而改变流加速度,控制效果更好。因此,采用该策略时类胡萝卜素产量有进一步提高。但发酵后期溶氧变化对葡萄糖流加的响应明显迟缓,造成了葡萄糖少量积累,胞内类胡萝卜素含量下降。

2.5 葡萄糖补加策略对裂殖壶菌胞内脂肪酸和类胡萝卜素合成的影响

采用不同葡萄糖补加策略下,裂殖壶菌胞内脂肪酸和胞内类胡萝卜素含量如表 1 所示。

酸(MAV)途径合成的异戊二烯焦磷酸为前体物质而生成的^[21]。无论是脂肪酸合成途径,还是类胡萝卜素合成途径,都需要乙酰辅酶 A 和还原力 NADPH 的参与。因此,脂肪酸和类胡萝卜素的合成可能存在底物竞争关系。从不同葡萄糖供应水平下脂肪酸和胞内类胡萝卜素含量的变化结果(表 1)可见,当葡萄糖供应充足时,糖代谢产生的乙酰辅酶 A 主要用于合成脂肪酸。而葡萄糖供应不足时,最先受到影响的是 PKS 途径,表现为胞内不饱和脂肪酸下降;若进一步降低葡萄糖供应量,FAS 和 PKS 途径则同时受到抑制,而碳源被胁迫流入 MAV 途径,胞内类胡萝卜素含量大幅提高。

营养物质胁迫是某些微生物大量合成类胡萝卜素的重要条件。Rabbani 等^[22]发现低质量浓度的硝

酸盐与硫酸盐能迫使杜氏藻大量积累 β -胡萝卜素,使菌体呈现橘红色。El-Baky等^[23]证明杜氏藻在低氮高盐的培养环境中,可大量积累类胡萝卜素。雨生红球藻在0.01 g/L(低质量浓度)氮源硝酸钾或者0.2 g/L(高质量浓度)的磷源 K_2HPO_3 胁迫作用下,在第10天菌体完全变红,产类胡萝卜素周期缩短近1/2^[24]。裂殖壶菌可以合成 β -胡萝卜素、叶黄素、角黄素、虾青素等多种类胡萝卜素,一直被认为是用于生产类胡萝卜素的潜在来源。Guo等^[25]用8 g/L丁醇处理裂殖壶菌时,虾青素积累量是空白对照组的245倍。但鲜有关于营养胁迫促进裂殖壶菌合成类胡萝卜素的报道,可能是由于裂殖壶菌一直用于生产油脂,尤其是不饱和脂肪酸(如DHA),其胞内类胡萝卜素含量较低,未受重视。

本研究发现,在发酵中期、氮源消耗殆尽的基础上,限制碳源供应,可胁迫裂殖壶菌胞内类胡萝卜素含量大幅增加。其中在5 L发酵罐内采用溶氧反馈控制葡萄糖流加,人为制造葡萄糖亚适量供应的条件,裂殖壶菌胞内类胡萝卜素含量最高可达151.0 $\mu\text{g/g}$,相比葡萄糖供应充足条件下的水平提高了4倍以上。上述发现对揭示裂殖壶菌胞内类胡萝卜素合成机制有重要作用。

3 结论

在摇瓶发酵下、从发酵72 h起,每隔24 h葡萄糖补加质量浓度较低时,裂殖壶菌生物量和胞内油脂含量较低,但类胡萝卜素含量较高,其中每24 h补加5 g/L葡萄糖时,胞内类胡萝卜素产量达到134.5 $\mu\text{g/g}$ 。当固定葡萄糖补加质量浓度(每24 h 5 g/L)、同时补加一定质量浓度酵母提取物时,细胞生长和油脂合成有所改善,但胞内类胡萝卜素含量明显低于只补加葡萄糖批次的水平。

在5 L发酵罐下、发酵72 h后,采用葡萄糖恒速流加和溶氧反馈控制葡萄糖流加两种策略,人为制造葡萄糖亚适量补加条件。其中采用溶氧反馈控制葡萄糖流策略下,98 h时胞内类胡萝卜素含量达到最高,为151.0 $\mu\text{g/g}$,相比葡萄糖充足供应条件下的水平提高了4倍以上。综合发酵实验结果和裂殖壶菌代谢途径分析,可推测:油脂合成期葡萄糖亚适量补加可限制细胞生长、弱化裂殖壶菌胞内油脂合成途径,胁迫碳源流向类胡萝卜素合成途径,促进类胡萝卜素的大量积累。

参考文献:

[1] SASSO S, POHNERT G, LOHR M, et al. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(4): 761-785.

[2] GROSSMAN A R, LOHR M, IM C S. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments[J]. Annual Rev Genet, 2004, 38: 119-173.

[3] CHUYEN H V, EUN J B. Marine carotenoids: bioactivities and potential benefits to human health[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(12): 2600-2610.

[4] MANAYI A, ABDOLLAHI M, RAMAN T, et al. Lutein and cataract: from bench to bedside[J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36(5): 829-839.

[5] HEO S J, YOON W J, KIM K N, et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(8/9): 2045-2051.

[6] REN L J, SUN G N, JI X J, et al. Compositional shift in lipid fractions during lipid accumulation and turnover in *Schizochytrium* sp. [J]. Bioresour Technol, 2014, 157: 107-113.

[7] QU L, REN L J, LI J, et al. Biomass composition, lipid characterization, and metabolic profile analysis of the fed-batch fermentation process of two different docosahexanoic acid producing *Schizochytrium* sp. strains[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 171(7): 1865-1876.

[8] AKI T, HACHIDA K, YOSHINAGA M, et al. *Thraustochytrid* as a potential source of carotenoids[J]. J Am Oil Chem Soc, 2003, 80(8): 789-794.

[9] GUPTA A, SINGH D, BARROW C J, et al. Exploring potential use of Australian *Thraustochytrids* for the bioconversion of glycerol to ω -3 and carotenoids production[J]. Biochem Eng J, 2013, 78: 11-17.

[10] ARMENTA R E, BURJA A, RADIANTYAS H, et al. Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and co-enzyme Q10 from the *Thraustochytrid* strain ONC-T18[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(26): 9752-9758.

[11] BURJA A M, RADIANTYAS H, WINDUST A, et al. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of ω -3 production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(6): 1161-1169.

[12] 刘源. 碳源和磷源优化裂殖壶菌发酵合成类胡萝卜素和DHA的研究[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2016.

[13] 常桂芳. 氧对裂殖壶菌利用甘油产DHA影响机制及其高密度发酵控制策略的研究[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2013.

[14] 全瑛, 倪士峰, 刘建利, 等. dns法测定菊芋中还原糖含量的研究[J]. 陕西中医, 2009(11): 1535-1537.

[15] 孙俊文, 丁健, 贾禄强, 等. *Schizochytrium* sp. S31生产DHA底物流加策略及呼吸特性分析[J]. 中国油脂, 2018, 43(2): 110-114.

- 38 (3): 206 – 210.
- [24] OTHMEN K R B, CERCY C, AMRI M, et al. Dietary supplement enriched in antioxidants and *omega*-3 protects from progressive light - induced retinal degeneration Isabelle ranchon - col[J]. Plos One, 2015, 10 (6): 1 – 20.
- [25] 姚慧敏. 年龄相关性黄斑变性的发病机制及药物治疗进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 370 – 375.
- [26] 刘志恒. 炎症与年龄相关性黄斑变性[J]. 临床眼科杂志, 2012, 20(3): 281 – 284.
- [27] WÓJCIK - GRYCIUK A, SKUP M, WALESZCZYK W J. Glaucoma - state of the art and perspectives[J]. Restor Neurol Neuros, 2016, 34(1): 107 – 123.
- [28] 欧玉仑, 邝国平. 新生血管性青光眼发病机制现状[J]. 国际眼科杂志, 2012, 12(8): 1504 – 1506.
- [29] 张永梅, 于蒙, 莫日根. 原发性开角型青光眼发病机制的研究[J]. 内蒙古大学学报, 2016, 47(2): 189 – 194.
- [30] WEINREB R N, AUNG T, MEDEIROS F A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review[J]. Jama, 2014, 311(18): 1901 – 1911.
- [31] HUANG W B, FAN Q, ZHANG X L. Cod liver oil: a potential protective supplement for human glaucoma[J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4(6): 648 – 651.
- [32] SCHMIDL D, SCHMETTERER L, GARHOFER G, et al. Pharmacotherapy of glaucoma [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2015, 32(4): 63 – 77.
- [33] OWEN L A, MORRISON M A, HOFFMAN R O, et al. Retinopathy of prematurity: a comprehensive risk analysis for prevention and prediction of disease[J]. Plos One, 2017, 12(2): 1 – 14.
- [34] 李玉, 薛黎萍. 早产儿视网膜病变危险因素研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(7): 1265 – 1267.
- [35] MALAMAS A, CHRANIOTI A, TSAKALIDIS C, et al. The *omega*-3 and retinopathy of prematurity relationship [J]. Inter J Ophthalmol, 2017, 10(2): 300 – 305.
- [36] 梅甜甜, 陈海琴, 郝光飞, 等. 一种新 ω -3 脂肪酸脱饱和酶的克隆表达和活性鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 31 – 37.
- [37] BRENNAN J T. Long - chain polyunsaturated fatty acids and the preterm infant: a case study in developmentally sensitive nutrient needs in the United States [J]. Am J Clin Nutr, 2016, 103(2): 606 – 615.
- [38] FU Z J, LOFQVIST C A, SHAO Z, et al. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids decrease retinal neovascularization by adipose - endoplasmic reticulum stress reduction to increase adiponectin [J]. Am J Clin Nutr, 2015, 101(4): 879 – 888.
- [39] MOLLOY C S, STOKES S, MAKRIDES M, et al. Long - term effect of high - dose supplementation with DHA on visual function at school age in children born at <33 wk gestational age: results from a follow - up of a randomized controlled trial [J]. Am J Clin Nutr, 2016, 103(2): 268 – 275.
- [40] PÉREZ D E, ARCELUS M, TOLEDO E, et al. *Omega* 3:6 ratio intake and incidence of glaucoma: the SUN cohort [J]. Clin Nutr, 2014, 33 (6): 1041 – 1045.
- [41] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [42] 车璐. 二十二碳六烯酸的保健功能 [J]. 山西科技, 2015, 30 (4): 63 – 65.
-
- (上接第 107 页)
- [16] 周鲜娇. 不同培养条件对海洋红酵母类胡萝卜素累积的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (15): 8845 – 8847.
- [17] 周莉君, 刘静, 王艳芹, 等. 12 株油茶种仁含油率及脂肪酸组成分析 [J]. 中国油脂, 2017, 42(5): 132 – 135.
- [18] 黎丽, 窦光鹏, 霍文严, 等. 裂殖壶菌发酵产 DHA 油脂的生产工艺优化 [J]. 中国油脂, 2015, 40(6): 77 – 81.
- [19] QIU X. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003, 68(2): 181 – 186.
- [20] RATLEDGE C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production [J]. Biochimie, 2004, 86(11): 807 – 815.
- [21] VARELA J C, PEREIRA H, VILA M, et al. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges [J]. Photosynth Res, 2015, 125(3): 423 – 436.
- [22] RABBANI S, BEYER P, LINTIG J, et al. Induced *beta* - carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil* [J]. Plant Physiol, 1998, 116(4): 1239 – 1248.
- [23] EL - BAKY H H A, EL - BAZ F K, EL - BAROTY G S. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina* [J]. Int J Agric Biol, 2004, 6(1): 49 – 57.
- [24] BOROWITZKA M A, HUISMAN J M, OSBORN A. Culture of the astaxanthin - producing green alga *Haematococcus pluvialis*. I. Effects of nutrients on growth and cell type [J]. J Appl Phycol, 1991, 3: 295 – 304.
- [25] GUO W, CHEN S L, LI D M. Effects of butanol on high value product production in *Schizochytrium limacinum* B4D1 [J]. Enzyme Microb Technol, 2017, 102: 9 – 15.