

総説

微細藻類由来のカロテノイドとその抗酸化能測定手法の研究動向

江崎世雄¹⁾、関根睦実^{1)*}

1) 創価大学理工学部 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

Research trends in carotenoids from microalgae and measurement of its antioxidant capacity

Seo Esaki¹⁾, Mutsumi Sekine^{1)*}

1) Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

* Corresponding author: mu_sekine@soka.gr.jp

2022 年 5 月 5 日受付, 2021 年 5 月 23 日受理

Abstract In recent years, the demand for phytochemicals has increased due to rising global health awareness. Among phytochemicals, carotenoids such as astaxanthin and β -carotene can detoxify singlet oxygen, one of the reactive oxygen species (ROS), and are effective in preventing human diseases such as cancer, cardiovascular problems, atherosclerosis. Because animals, including humans, are unable to produce carotenoids, they must ingest them from vegetables and fruits to protect their bodies from singlet oxygen oxidation. Some microalgae grow faster than other plants and can accumulate carotenoids in much higher concentrations in vivo. To date, approximately 200 different carotenoids have been identified in microalgae. Therefore, as an important source of natural carotenoids, these microalgae have been mass produced and used in supplements and cosmetics. However, the number of species actually used for commercial applications is still limited mainly to *Hematococcus* and *Dunaliella*.

Conventionally, comparison and evaluation of microalgae accumulating carotenoids have been conducted by measuring the concentration of each of the various carotenoids in biomass by high-performance liquid chromatography (HPLC). However, it was not possible to evaluate the antioxidant capacity of carotenoids in the target microalgae to determine antioxidant intake for comparison with other microalgae biomass. This is because it is not practical to quantify the type, content, and antioxidant capacity of all the various carotenoids in microalgae to obtain a total antioxidant capacity. In addition, it is not possible to analyze all carotenoids by HPLC because only a small number of carotenoids are commercially available as standards and some are unknown. Phenols, which is considered the two major antioxidants together with carotenoids, can be measured for total antioxidant capacity by the DPPH and ORAC methods. However, these methods cannot be applied to carotenoids, which have a different antioxidant mechanism. Although knowledge of the antioxidant capacity of carotenoids in microalgae is desired, techniques

to measure it remain limited.

Based on the above background, the singlet oxygen absorption capacity (SOAC) method was finally developed in 2010. In this method, a singlet oxygen generator (endoperoxide solution) and 2,5-Diphenyl-3,4-benzofuran (DPBF) solution are added to carotenoids samples and the decay rate of DPBF is used to evaluate the antioxidant capacity of the sample. Therefore, if the SOAC method can be applied to microalgae, the antioxidant capacity of all carotenoids in microalgae biomass can be quantified as SOAC values. The SOAC method also allows many samples to be analyzed at once using microplates. This can be useful for screening useful strains that accumulate high amounts of carotenoids. However, the SOAC method has not yet been applied to microalgae. Optimization of analytical processes, including the extraction of carotenoids from algae, is required as an immediate research priority.

Keywords: antioxidant capacity, carotenoids, microalgae, singlet oxygen, SOAC method

1. はじめに

この10年で微細藻類を用いた健康食品や化粧品をよく見かけるようになった。今や微細藻類は、タブレットや粉末の他、ビスケット、パスタ、チーズ、アイスクリーム、そして、植物性パテや代替チキン、百貨店で販売されるブランド化粧品の原料にも使われている (Ferreira et al. 2021)。これはインターネットの普及、平均寿命の延伸、そして新型コロナウイルス (COVID-19) 感染拡大に伴うライフスタイルの変化などによる、世界的な健康意識の高まりによるものと推察される (Lafarga 2019)。さらに微細藻類に含まれるたんぱく質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、食物繊維の他、抗酸化物質の効能が高く評価されていることも大きな理由である。微細藻類は光合成により増殖するが、必要以上の光を受けると活性酸素が生成され、細胞が酸化損傷を受ける。そのため微細藻類は、この活性酸素を除去するための機構として、ポリフェノール、カロテノイド、クロロフィル、トリテルペノイドをはじめとする種々の抗酸化物質を合成・蓄積する能力を持つ (Halliwell & Gutteridge 2015)。これら抗酸化物質は摂取することで抗酸化作用、免疫賦活作用、抗腫瘍作用などを得ることができ、第7栄養素的物質“ファイトケミカル (植物性化学物質)”と呼ばれ、需要

が高まっている (野澤ほか 2015)。

抗酸化物質はフェノール系とカロテノイド系の2つに大別され、それぞれ作用する活性酸素種が異なる。このうちカロテノイド系抗酸化物質は、代表的な活性酸素種の一つである一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に対し高い抗酸化能を示し (Foote 1968)、がん、心血管、眼科疾患などを含む種々の疾患リスクの低減に寄与する。しかし、ヒトを含む動物はカロテノイドを生合成できないため、体外から摂取する必要があり、食品添加物、着色料や水産飼料、家畜餌料としての需要が高い (Del Campo et al. 2007)。微細藻類からは、これまでにおよそ200種類のカロテノイドが検出されている (Egeland 2016)。他の高等植物と比較して増殖速度が速いため、天然のカロテノイド源として注目されている。

微細藻類のカロテノイドの種類・含量は、既知の物質であれば高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析できる (Markovitz et al. 1993, Fernandes et al. 2020)。しかし、微細藻類同士や他のバイオマスとの比較、抗酸化物質摂取量の把握のために、対象の微細藻類のバイオマス当たりの抗酸化能を評価したい場合に、微細藻類中の各種カロテノイドの全てについて種類、含量、抗酸化能を定量し、抗酸化能の総和を出すことは現実的ではない。また、標準物質が市販されているカロテ

ノイドはごく一部であり未知の物質もあるため、全カロテノイドを HPLC で分析することはできない。そこで 2010 年、一重項酸素消去能 (Singlet Oxygen Absorption Capacity, SOAC) 測定法が開発された (Ouchi et al. 2010)。カロテノイド抽出液に一重項酸素発生剤であるエンドペロキシド (EP) 溶液、2,5-ジフェニル-3,4-ベンゾフラン (DPBF) 溶液を加え、DPBF の吸光度を測定するといった簡易な手法である。既に野菜のカロテノイドの抗酸化能測定には使用されており (Mukai et al. 2012, Iwasaki et al. 2015, Bodó et al. 2020, Zacarias et al. 2020)、微細藻類への適用も望まれる。

以上より本稿では天然カロテノイドの生産における微細藻類の有用性と、効能の標準化に向けた抗酸化能評価法の研究動向を整理することを目的とし、活性酸素種とカロテノイドの抗酸化機能、そして微細藻類の産業利用の展望を示したのち、微細藻類の抗酸化能の評価における SOAC 分析法の利用可能性について述べる。

2. 活性酸素種と抗酸化物質

2-1. 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS)

ヒトを含む好気性生物は、空気中に 21% 含まれる酸素を取り込み、主にミトコンドリアの電子伝達系によりエネルギー (ATP) を生産している。この過程で酸素は、4 つの電子を受け取り水に還元され、電子が 2 個で対をなす安定した状態になる ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$)。しかし、実際には全ての酸素が完全に電子還元されるわけではなく、分子中に電子が一つだけ存在する酸素や、電子が対をなしてもその受け取った電子のスピンが

異なる酸素が 1 ~ 3% 程度発生する (0.1 ~ 0.2% である可能性もある) (Halliwell & Gutteridge 2015, Prior 2015) (Fig. 1)。このような化学的に不安定な酸素は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) と総称され、強い酸化力を持つ。代表的なものには、スーパーオキシド (アニオン) ラジカル ($\cdot O_2^-$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2) があり、狭義の ROS と呼ばれる (中村 2013)。スーパーオキシド (アニオン) ラジカル ($\cdot O_2^-$) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) は不対電子を持つため、物質から電子を奪い標的分子を酸化する。過酸化水素 (H_2O_2) は、熱や光、生体内の Fe^{2+} により不対電子を持つヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) に分解されることで同様に電子を奪い、物質を酸化する (中村 2013)。一重項酸素 (1O_2) は正常に電子対を形成するが、電子のスピンによる熱が発生するため、不安定であり高い酸化作用を示す (Halliwell & Gutteridge 2015)。この他にも、広義の ROS としては、一酸化窒素 ($NO\cdot$)、脂質ペルオキシラジカル ($LOO\cdot$) などが含まれる (Prior 2015)。

ROS の酸化力は生体内で様々な利害をもたらす。食細胞であるマクロファージは、生体防御機構として、細胞外に ROS を産生し侵入した細菌や異物を酸化し無力化する (Halliwell & Gutteridge 2015)。また、ROS は細胞内のシグナル伝達分子として機能することも報告されている (D'Auréaux & Toledano 2007)。このように ROS は生体内の防御の機構の一部を担っている。しかし紫外線や外部ストレスなどにより生体内で ROS が過剰に生成されると、細菌や異物だけでなく、自身の生体成分を酸化してしまい、細胞内のタンパク質の変性、脂質の過酸化、遺伝子の損傷、がんや動脈硬化、心

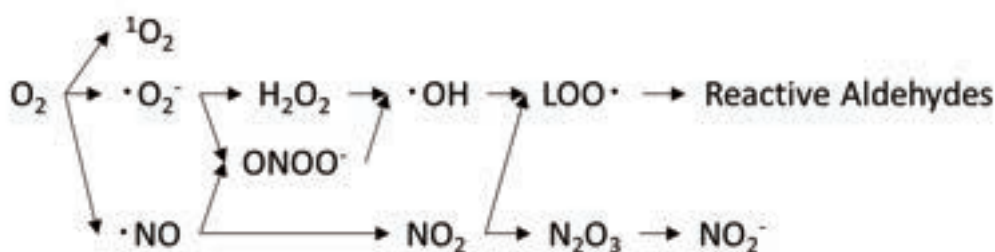


Fig. 1. Generation of reactive oxygen and nitrogen species. Modified from Fig. 1 of Prior (2015).

臓病などの生活習慣病の発症や老化を促進することが知られている (Bandyopadhyay et al 1999)。

2-2. 生体内での抗酸化物質とカロテノイド

抗酸化物質とは、簡潔に表現すれば上述のような標的分子の酸化損傷を遅らせる、防ぐ、または除去することのできる物質である (Hallwell & Gutteridge 2015)。ROS の酸化傷害に対し、生体内にはカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼなどの抗酸化酵素、アスコルビン酸 (ビタミン C)、フェノール、カロテノイド類などの抗酸化物質からなる防御機構が存在する (Krishnamurthy & Wadhwani 2012)。フェノールやアスコルビン酸は ROS の中でもヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ペルオキシナイトライト ($\text{ONOO}\cdot$) に対し抗酸化能を発揮する (Tommos & Babcock 1998)。その抗酸化能は、カロテノイドが持つ共役二重結合が開裂することで生じるヒドロキシ基が、ROS から電子を受けとる事で発揮されるが、ROS を一度無害化した後、これらは酸化物質と化し、抗酸化物質としては機能しない。酸化物質と化したあとはカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素により電子を奪われることで無害化される (Tommos & Babcock 1998)。

一方、カロテノイドは一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) に対し高い抗酸化能を示す (Fig. 2)。1968 年、近赤外分光解析により、カロテノイドのポリエン (共役二重結合) が一重項酸素から励起エネルギーを受け取り、一重項酸素を

安定な基底状態の三重項状態 (通常の酸素) へ戻すという、カロテノイドによる一重項酸素消去機構が明らかにされた (Foote 1968)。カロテノイドは受け取ったエネルギーをポリエン (共役二重結合) の振動により熱として放出し消去するため、繰り返し周辺の一重項酸素を消去できる。また、カロテノイド自身が酸化物質になることもない。そのためカロテノイドは食品添加物、着色料や水産飼料、家畜飼料としての需要が高く (Del Campo et al. 2007)、研究開発も活発に行われている (Hirayama et al. 1994, Stahl & Sies 2003, Singh et al. 2020)。

カロテノイドはすべての光合成生物 (光合成細菌、藻類、陸上植物) や真菌類が生合成することが知られている。一方で、ヒトを含む動物はカロテノイドを生合成できず、動物の生体内に存在するカロテノイドはすべて食物から摂取されたものに由来する (眞岡 2007)。カロテノイドは、その種類によっては化学合成することもでき、現在は商業生産されるカロテノイドの 85% 以上が化学合成品であるものの、安全性の観点から天然由来のカロテノイド生産の需要が高まっている。これまでにマリーゴールド等の高等植物、*Haematococcus* 属および *Dunaliella* 属等の微細藻類の培養による天然由来のカロテノイドの商業生産がされてきた。カロテノイドの市場は、2019 年の 15 億米ドルから 2026 年には 20 億米ドルに達すると予想されており (Meticulous Market Research2021)、今後もニーズに応じて健康食品や、化粧品原料等のさまざまな用途への活用が期待されている。

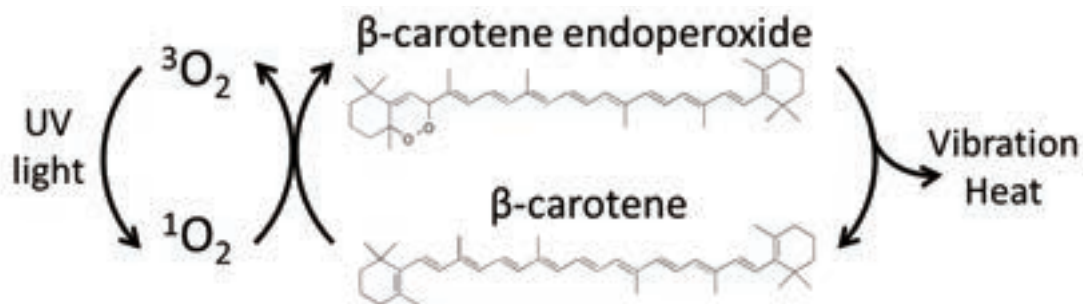


Fig. 2. Singlet Oxygen Scavenging Mechanism of β -carotene. $^3\text{O}_2$: triplet oxygen, $^1\text{O}_2$: singlet oxygen. Modified from Fig. 1 of Sandmann (2019).

3. 微細藻類によるカロテノイド生産

3-1. カロテノイド生産の代表的商業利用種：

Haematococcus lacustris および *Dunaliella salina*

自然界における微細藻類によるカロテノイド生産量は年間約1億tに達すると推定されている (Fraser & Bramley 2004)。特に、海洋で最も広く分布するカロテノイドの1つはフコキサンチンであり、主に珪藻や褐藻により年間約1000万t生産される (Dembitsky & Maoka 2007)。珪藻については、加えてジアキサンチンやジアジノキサンチンの生産が良く知られる (Stauber & Jeffrey 1988)。他にも *Chlorella* 属のルテイン (Del Campo et al. 2004)、渦鞭毛藻のペリジニン (Dembitsky & Maoka 2007) など種々の微細藻類とカロテノイドの組み合わせが報告されているが、現在、商業的な大量生産に成功しているのは、*Haematococcus lacustris* のアスタキサンチンおよび *Dunaliella salina* の β -カロテンの2種である (Rammuni et al. 2019)。

H. lacustris は、淡水産の緑藻類でヨーロッパ、アジア、アフリカ、北アメリカなど世界中の湖に分布しており、しばしば一時的に生じる水たまりなどからも見つかる (Proctor 1957)。窒素欠乏、塩分増加、高照度、低温・高温などの生育に不適な環境条件にいて、ストレス応答として葉緑体膜に蓄積した β -カロテンをアスタキサンチンに変換して脂質小胞に蓄積し、赤色の休眠細胞 (シスト) を形成する (Li 2007)。その蓄積量は細胞の全乾燥重量の7%という高濃度まで達する (Rammuni et al. 2019)。そのため現在天然アスタキサンチンの主要な供給源として利用されている (Del Campo et al. 2004)。商業生産では上述のストレス応答特性を利用して2段階培養によってアスタキサンチンの生産を行う。この2段階培養は緑色の細胞を活発に分裂増殖させて細胞を増やすグリーンステージと、ストレス応答により細胞内にアスタキサンチンを蓄積させるレッドステージからなる (Hagen et al. 2001)。アスタキサンチン合成の誘導には強光ストレスと栄養塩類 (特に窒素源) の欠乏の組み合わせが一般的だが、これに高温や高塩濃度ストレスなどを組み

合わせることもある (Wang et al. 2003, Gao et al. 2015)。1994年に上記の培養方法でスウェーデンの AstaReal Group が初めて *H. lacustris* を用いた世界初のアスタキサンチン生産を成功させた。その他にも、イスラエルの Algaenovation Ltd やアメリカの Cyanotech Ltd 等が同様に閉鎖型培養タンクを用いて *H. lacustris* でのアスタキサンチンを生産しており、現在最大の生産量を誇る Cyanotech Ltd では年間乾燥重量13~15tのバイオマスを生産している (Del Campo et al. 2007)。しかしながら、*H. lacustris* はこれまで大量培養に成功している他の微細藻類に比べて増殖速度が低く、中性pHの淡水条件で増殖するため、後述の *D. salina* のように極端なpHや高塩分での培養ができず、バクテリアや他の藻類といった他種のコンタミネーションに対して脆弱である (Lorenz & Cysewski 2000, Del Campo et al. 2007, Solovchenko & Chekanov 2014)。そのため閉鎖型培養タンクなどを用い繊細に管理する必要があり、大量生産は難しい。アスタキサンチン生産において *H. lacustris* より高い増殖速度を持ち、バクテリアなどのコンタミネーションに強い新規有用株を見つけることが求められている。

D. salina は先端に二本の等長鞭毛を持つ緑藻類である。塩分の高い、塩田、塩湖、海水中でよく確認される (Del Campo et al. 2007)。高い塩分、温度、光強度、および窒素欠乏等のストレス条件で培養されると細胞内に β -カロテンを高濃度に蓄積する (Lamers et al. 2008)。この *D. salina* の商業生産は、1986年にオーストラリアの Western Biotechnology Ltd と Betatene Ltd によって初めて250ヘクタールの面積を持つ大型のオープンポンドにて実施された。天然の塩湖を整備し、機械的攪拌やCO₂供給を行わない最小限の制御であったため、 β -カロテンの面積生産性は低かったものの、オーストラリアの藻類に適した気候と低い土地代により利益が確保された (Del Campo et al. 2007)。その後、他国でも *D. salina* の商業生産が展開されたが、生産性を向上させるため、主にノドル攪拌を備えたレースウェイ式の培養槽が導入された (Del Campo et al. 2007)。初期には2段階の培養方式がとられ、まず、第一段階で *D.*

salina の増殖に最適な培養条件でバイオマスを増やした後に、第二段階にて培養液を希釈し、液中の細胞密度を下げ、高い光強度と窒素欠乏によって細胞内の β -カロテンを蓄積させていた (Ben-Amotz 1995)。しかし、培地に塩化ナトリウムを濃度 15%~25%になるよう添加していたことや、広い土地の確保が必要であったために費用がかかっていた。その後、海水を用いてより高い細胞密度で増殖できる株が発見されたことで、 β -カロテン生産性は最大で年平均約 $200 \text{ mg m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ に達した (Ben-Amotz 2004)。*D. salina* の生産は、オーストラリア、イスラエルから始まり、現在はインド、オランダ、ドイツにも展開している (Ferreira et al. 2021)。

3-2. 今後生産が期待される

新規有用藻類株とカロテノイドの種類

微細藻類のカロテノイド生産性は 1 日当たりの増殖速度とバイオマス中のカロテノイド含有量によって決まる。これまでに、上述の商業利用種 *H. lacustris* および *D. salina* よりも高い増殖速度やカロテノイド含有量を持ち、これにより高いカロテノイド生産性を示す有用微細藻類株が多数発見されている。それらの有用株を増殖速度やカロテノイド含有量とともに Table 1 にまとめた。培養容器や基質供給方法が変化すると攪拌効率、光量、および栄養塩濃度などの種々の環境パラメータが変化し、カロテノイド生産性を決める増殖速度やカロテノイド含有量にも影響するため、この Table 1 では 500 mL の三角フラスコで回分培養され、増殖速度とカロテノイド含有量が測定された微細藻類株のみを整理した。アスタキサンチンを蓄積する微細藻類株としては、商業利用種の *H. pluvialis* FACHB-872 (Cheng et al. 2016) より増殖速度の高い緑藻 *Chlorococcum* sp. MA-1 (Ma & Chen 2001)、*Chlorella zofingiensis* CCAP 211/14 (Del Campo et al. 2004)、*Monoraphidium* sp. GK-12 (Fujii et al. 2006) の 3 株が知られている。マレーシアの岩石の表面から単離された *Chlorococcum* sp. MA-1 は商業利用種と比べ、カロテノイド含有量こそ低いものの、増殖速度は 3 倍高い。一方、 β -カロテンを蓄積する微

細藻類の中には、商業利用種の *D. salina* CCAP19/18 (Wolf et al. 2021) より β -カロテン含有量の高い緑藻 *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 (Singh et al. 2019)、*Chlamydomonas acidophila* A-2 (Cuaresma et al. 2011)、ブラシノ藻 *Tetraselmis* sp. DS3 (Tsai et al. 2016) が発見されている。なかでもインドの淡水河川から単離された *A. quadricellulare* PUMCC 5.1.1 は商業利用種と比べ、9 倍高い β -カロテン含有量を示している。加えて、スペインの酸性河川から単離された *C. acidophila* A-2 は商業利用種と比べ、約 4 倍高い β -カロテン含有量を示す。この株の増殖速度は商業利用種のものより低い、pH 2.5 で最大の増殖速度を示す。商業利用種である *D. salina* CCAP19/18 は、pH 8.0 で大量培養されているが、pH 8.0 は他の微細藻類やバクテリアの増殖にとっても至適 pH であるため、大量培養時に他種のコンタミネーションが生じてしまう。これに対して、*C. acidophila* A-2 が増殖する pH 2.5 では、他の微細藻類種やバクテリアの増殖は抑制されるため、*C. acidophila* A-2 は大量培養時にコンタミネーションを生じ難いという利点を有する。このように、これまで知られている商業利用種よりカロテノイド生産性の高い微細藻類種が世界各地から単離されている。

前述のように、現在、カロテノイドの商業生産を目的とした微細藻類の大量生産は、*H. lacustris* のアスタキサンチンおよび *D. salina* の β -カロテンが主要であるが、カロテノイドの市場規模としては、ルテイン、アスタキサンチン、リコピン、ゼアキサンチンもこれらに続いて大きく、また伸びている (Meticulous Market Research 2021)。また、これまでにおよそ 200 種類のカロテノイドが微細藻類から検出されており (Egeland 2016)、近年でも新たなカロテノイドが発見され続けている。例えば 2013 年に、日本の土壌より単離された緑藻 *Coelastrella* sp. Ki-4 から水溶性アスタキサンチンが発見された (Kawasaki et al. 2013)。Kawasaki et al. (2013) はこの水溶性アスタキサンチンを 100℃ で 1 時間熱処理し、後述する 2,2'-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) 分析法で抗酸化能を測定した。その結果、抗酸化能は熱処理をして

Table 1. Carotenoids in microalgae grown in 500 mL of flasks in batch culture.

Strain	Isolated site	Specific growth rate (d ⁻¹)	Typical pigment (mg g-dry weight ⁻¹)	References
Astaxanthin-accumulating microalgae				
<i>Chlorococcum</i> sp. MA-1	Surface of rock, Malaysia	1.81	Astaxanthin (7.1)	Ma & Chen 2001
<i>Chlorella zofingiensis</i> CCAP 211/14	Soil, United Kingdom	0.96	Astaxanthin (1.5)	Del campo et al. 2004
<i>Monoraphidium</i> sp. GK-12	Fresh river, Japan	0.90	Astaxanthin (2.5)	Fujii et al. 2006
<i>Haematococcus pluvialis</i> FACHB-872* ¹	Fresh water lake, China	0.61	Astaxanthin (29.6)	Cheng et al. 2016
β-carotene-accumulating microalgae				
<i>Chlamydomonas acidophila</i> A-2	Acidic lake, Spain	0.59	β -carotene (11.9)	Cuaresma et al. 2011
<i>Tetraselmis</i> sp. DS3	Coastal area, Taiwan	0.62	β -carotene (5.1)	Tsai et al. 2016
<i>Asterarcys quadricellulare</i> PUMCC 5.1.1	Fresh river, India	0.25	β -carotene (27.0)	Singh et al. 2019
<i>Dunaliella salina</i> CCAP19/18* ¹	Salt lake, Scotland	1.82	β -carotene (3.0)	Wolf et al. 2021
Other carotenoid-accumulating microalgae				
<i>Coelastrella striolata</i> SR-3	Surface of rock, Japan	0.22	Canthaxanthin (47.5)	Abe et al. 2007
<i>Coccomyxa acidophila</i> A-34	Acidic river, Spain	0.34	Lutein (6.1)	Casal et al. 2011
<i>Coelastrella</i> sp. Ki-4	Soil, Japan	0.25	Water-soluble astaxanthin (1.6)* ²	Kawasaki et al. 2013
<i>Chlorella saccharophila</i> M-5	Offshore area, New Zealand	0.31	Zeaxanthin (11.3)	Singh et al. 2013
<i>Mallomonas</i> sp. SBV13	Fresh water lake, Vietnam	0.44	Fucoxanthin (26.6)	Petrushkina et al. 2017
<i>Eustigmatos vischeria</i> S12	Soil, Bulgaria	0.32	Vaucherixanthin (2.4)* ²	Stoyneva-Gärtner et al. 2019

*¹ Strains for industrial use; *² Carotenoids found only in microalgae

いない場合と変わらず、高い熱耐性が示された。この水溶性アスタキサンチンは様々なタンパク質と複雑に結合しており、その詳細な物質構造についてはまだ解明されていない。そのため、どのタンパク質が高い熱耐性に寄与しているのかは明らかになっていないが、高い熱耐性を持つ水溶性アスタキサンチンは従来のアスタキサンチンよりも高温処理による抽出ができ、抽出液も有機溶媒ではなく水を使うことができる。そのため従来のアスタキサンチンよりもヒトを対象とした化粧品や健康食品として利用しやすい可能性が考えられる。2019年には、ブルガリアの雪山の土壌から単離された真正眼点藻 *Eustigmatos vischeria* S12 からバウケリアキサンチンが発見された (Stoyneva-Gärtner et al. 2019)。バウケリア

キサンチンも生体内で高いがん細胞のアポトーシス誘導作用、肥満分化抑制作用を持つことが明らかになっている有用カロテノイドである。加えてバウケリアキサンチンは氷点下の温度条件でも抗酸化能を示すという利点を持つ。以上のように新規カロテノイドの供給源としても微細藻類は注目を集めている (Del Campo et al. 2007)。

4. 微細藻類の抗酸化能評価

4.1. 微細藻類の有用性評価法

カロテノイドを蓄積する微細藻類の有用性評価は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などでバイオマスのカロテノイド含量を測定すること (Markovits et al. 1993,

Fernandes et al. 2020)、あるいは2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) 法 (Brand-Williams et al. 1995)、酸素ラジカル吸収能 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) 法 (Ou et al. 2001, Huang et al. 2002) などによりカロテノイド抽出物に直接フリーラジカルを加え、その減衰時間から抗酸化能を測定することによって行われてきた (Marxen et al. 2007, Banskota et al. 2019)。HPLC 分析では濃度の算出に各種カロテノイドの標準物質が必要だが、微細藻類には200種類以上のカロテノイドが存在し (Egeland 2016)、そのうち標準物質が市販されているカロテノイドはごく一部である (Bijttebier et al. 2014, Londoño-Giraldo et al. 2021)。例えば、アスタキサンチンやルテイン、 β -カロテン等のカロテノイドはそれぞれ *Haematooccus* 属、*Dunaliella* 属の微細藻類、マリーゴールドにカロテノイドを蓄積させ商業利用する生産プロセスが確立されているため、その標準試薬も市販されている。しかし、バウケリアキサンチン等の新規カロテノイドは、近年微細藻類から発見されたばかりで商業利用生産プロセスの確立までは至っておらず、標準試薬も確立されていない。さらにカロテノイドには異性体が存在し、アスタキサンチンではアスタキサンチンモノエステル、 β -カロテンでは9-シス- β -カロテンの標準試薬が入手できるが、その他のカロテノイドの異性体については市販製品が限られている。各カロテノイドの抗酸化能を明らかにするためには、標準試薬を上述のHPLC分析にかける必要があるが、以上の理由によりほとんどのカロテノイドで標準試薬が確立されておらず、その抗酸化能についても明らかにされていない。このことからHPLC分析では微細藻類中の全カロテノイド濃度や抗酸化能を評価することは困難である。

DPPH 法や ORAC 法についても、カロテノイドの抗酸化能を評価する上では大きな課題がある。DPPH は人工的に製造された安定した有機ラジカルである (Brand-Williams et al. 1995)。フェノール等の抗酸化物質が不対電子に電子を供与することで DPPH が還元される。このときの 517 nm の吸光度の減衰から試料の抗酸化活性を測定する。一方で ORAC 法は米国立老化研究所によって確立された抗酸化能評価法

であり、ラジカルを発生させる 2,2-アゾビス (2-アミノジプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) と AAPH により発生したラジカルにより分解される蛍光指示薬フルオレセインを試料に添加し、蛍光強度の減衰速度の変化から試料中の抗酸化能を測定する (Ou et al. 2001, Huang et al. 2002)。溶媒を変えることにより、親水性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) と、親油性酸素ラジカル吸収能 (L-ORAC) の両方を測ることができる。両手法は、フェノール類をはじめとする抗酸化物質のラジカル消去能の評価に適しており、広く食品の評価に使用されている (Prior 2015)。しかしながら、両手法はカロテノイドの一重項酸素の消去活性は評価することができない。一重項酸素は正常に電子対を形成するが、その電子のスピンにより熱が発生、不安定となり高い酸化作用を示す。カロテノイドはこの熱を奪うことで特に一重項酸素に抗酸化能を示し (Fig. 2)、一方でヒドロキシラジカル等の ROS には高い抗酸化能を示さないため (Zorov et al. 2014)、DPPH 法も ORAC 法もカロテノイドの抗酸化能の評価に適していない (Watanabe et al. 2009)。以上のことからこれまでの HPLC 分析による濃度測定や DPPH 法、ORAC 法による抗酸化能測定は、カロテノイドを蓄積する微細藻類の評価には適しておらず、微細藻類が生産するカロテノイドの一重項酸素消去能を特異的に測定できる方法の開発が求められている。

4.2. Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) 測定法

抽出液の活性酸素種 (ROS) に対しての消去能を測定する際は、その抽出液中に直接 ROS を発生させる発生剤を加える (Marxen et al. 2007, Banskota et al. 2019)。カロテノイドの一重項酸素消去能の測定には一重項酸素を産生するエンドペロキシド (EP) 試薬が不可欠である。しかし、この生成にはエーテルと過酸化水素による複雑な酸化処理が必要であり、また急激な重合反応による爆発の危険性が伴うため (de Mello & Wootton 2002)、EP 試薬は安易に生成ができず、カロテノイドの一重項酸素消去能測定に関する研究の妨

げになっていた (Mukai et al. 2012)。しかし、2010 年にこの EP 試薬が市販されたことをきっかけに、カロテノイドの一重項酸素消去能 (Singlet Oxygen Absorption Capacity, SOAC) 測定法が開発された。この方法では、カロテノイド抽出液に一重項酸素発生剤である EP 溶液、一重項酸素により減衰する 2,5-ジフェニル-3,4-ベンゾフラン (DPBF) 溶液を加える。DPBF は 413 nm に吸光度を持つが、一重項酸素により酸化されると、その吸光度が減衰する性質を持つ。そのため、DPBF の減衰速度から、カロテノイド抽出液の一重項酸素消去反応速度、すなわち一重項酸素に対する抗酸化能を求めることができる。なお、DPBF の減衰速度を α -トコフェロールで標準化した値を、抗酸化能を示す SOAC 値とする (Ouchi et al. 2010)。この SOAC 測定法はこれまで野菜などの食品由来カロテノイドの抗酸化能評価に利用されてきた (Mukai et al. 2012, Iwasaki et al. 2015)。微細藻類においても、SOAC 測定法を用いたカロテノイドの抗酸化能評価が望まれるが、未だ測定例は無い。微細藻類にこの SOAC 測定法を適用できれば、これまでの評価方法では実現できなかった、未知既知を問わないカロテノイド全体の抗酸化能を測定することができ、カロテノイド供給源としての微細藻類の新たな有用性を評価できる可能性がある。

4.3. SOAC 測定法の発展性

SOAC 測定法は当初、6 つのセルが収納できる分光光度計を用いて約 2 時間で 1 試料の SOAC 値しか測定できなかったが、24 ウェルプレートを用いた SOAC 測定法が確立され (Takahashi et al. 2016)、一度に 3 つの試料を測定が可能になった。近年では 96 ウェルプレートを用いた SOAC 値の測定が試みられ (Wang et al. 2018)、数時間で 15 の試料を同時に測定できるようになった。これにより、例えば、環境中から単離した多数の微細藻類株を強光、弱光、窒素欠乏などのストレス条件で培養した後、カロテノイドを抽出しウェルプレートにて一気に SOAC 値を測定することもでき、高い抗酸化能を有する微細藻類のスクリーニングに使用できる可能

性がある。SOAC の分析が数時間程度で済むのに対し、HPLC によるカロテノイドの分析では 15 の試料の測定におよそ 1 日を要する。また、SOAC 分析法は大型で高価な機械も必要なく、マイクロプレートリーダーさえあれば抗酸化能を測定できる。そのため、SOAC 分析法による簡便かつ短時間での効率的な有用微細藻類株のスクリーニングが期待される。

さらに、現在は、効率的なカロテノイドの抽出・精製のため、単一のカロテノイドを多量に蓄積する微細藻類の生産が利活用の主流となっているが、本 SOAC 法の導入によりバイオマス当たりの総カロテノイドの抗酸化活性を測定できるようになれば、特定のカロテノイドの含有量だけでなく抗酸化活性を基準として商品の効能を評価できるため、多種のカロテノイドが混在している微細藻類も抗酸化剤として陽の目を見る可能性がある。

SOAC 測定法を微細藻類に適用する際の注意点としては、溶媒の低い抽出効率が挙げられる。これまで微細藻類からのカロテノイド抽出には、ジメチルホルムアミド (DMF) やアセトン、ヘキサン、メタノール、クロロホルム等が用いられてきた (Suzuki & Ishimaru 1990, Furuya et al. 1998, Bocchini et al. 2015)。なかでも DMF やアセトン、ヘキサンは抽出効率が高く、メタノールやクロロホルムと比較して溶液中でカロテノイドが酸化しにくいという性質を持つため (Bocchini et al. 2015)、特に微細藻類からのカロテノイド抽出によく用いられてきた。特に DMF は、アセトン、ヘキサンよりも微細藻類バイオマスからのカロテノイド抽出効率が高い (Suzuki & Ishimaru 1990)。これに対し、SOAC 測定法では、通常、メタノール、クロロホルム、重水 (D_2O) が体積比 50:50:1 で構成された SOAC 溶媒を用いる (Ouchi et al. 2010)。この SOAC 溶媒のカロテノイド抽出効率をこれまで微細藻類に用いられてきた抽出効率の高い DMF、アセトンやヘキサンと、微細藻類 2 種について比較したところ、SOAC 溶媒は他の溶媒と比較して抽出効率が低いことが確認された (江崎 未発表)。野菜を対象とした既往研究においても、SOAC 溶媒の抽出効率がアセトンよりも低いことを報告している (Iwasaki et al. 2015)。

微細藻類に適用されている溶媒のカロテノイド抽出効率を改善する方法には、高温高压処理、超音波処理、ビーズ破碎、乳棒とすり鉢による破碎処理、マイクロ波処理（100℃）、浸透圧ショック（塩化ナトリウム使用）といった物理処理がある（De Ancos et al. 2000, Prabakaran & Ravindran 2011, Goiris et al. 2012）。なかでも高温高压処理は、抽出溶媒に対し高い圧力をかけ真空条件下で高温に晒し細胞を破壊することができるため、マイクロ波や超音波処理よりも熱と酸素によるカロテノイドの酸化が少なく、さらに、ビーズや塩化ナトリウムなどの化学物質を使わない点で利がある（De Ancos et al. 2000）。高温高压処理は従来の SOAC 法でも溶媒の抽出効率の改善に用いられてきた。もう一つの抽出効率の改善方法として、カロテノイドを SOAC 溶媒ではなく抽出効率が高いアセトン等の溶媒で抽出し、その抽出液と SOAC 溶媒の混合液を SOAC 測定にかける方法がある。実際に、カロテノイドの一種ノイロスポラキサンチンを細胞内に蓄積する真菌類 *Fusarium fujikuroi* の SOAC 値を測定した Parra-Rivero et al. (2020) では、アセトンでカロテノイドを抽出し、その抽出液と SOAC 溶媒を 1:8 で混合した混合液を SOAC 法で分析している。今後、分析に適した溶媒の種類や混合条件が結果に与える影響を十分に検討することで、SOAC 法を用いた微細藻類のカロテノイドの抗酸化能測定をより簡略化できると考えられる。

6. 結論

増殖が速く、かつ含有するカロテノイドの量・種類ともに多い微細藻類は、需要が高まっている天然カロテノイドの生産源として有望である。しかし実際に商業利用種として用いられている種は限定されており、新規微細藻類株の積極的導入が望まれる。近年開発された SOAC 測定法は、カロテノイドが特異的に寄与する活性酸素種“一重項酸素”の消去能を測ることができ、微細藻類中カロテノイドの抗酸化能評価に有効であると考えられる。また本評価法の導入は、有用微細藻類の

選定にも役立つ可能性がある。

謝辞

本研究の一部はJICA/JST SATREPS-COSMOSプロジェクト<JPMJSA1509>、JICA/JST SATREPS-EARTHプロジェクト<JPMJSA2005>による助成を受け実施された。

引用文献

- Abe K, Hattori H, Hirano M (2007) Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. Food Chem 100: 656–661.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK (1999) Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. Curr Sci 77: 658–666.
- Banskota AH, Sperker S, Stefanova R, McGinn PJ, O'Leary SJB (2019) Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. J Appl Phycol 31: 309–318.
- Ben-Amotz A (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. J Appl Phycol 7: 65–68.
- Ben-Amotz A (2004) "Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species." Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology (ed Richmond A). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 273–280.
- Bijttebier S, D'Hondt E, Noten B, Hermans N, Apers S, Voorspoels S (2014) Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening. J Chromatogr A 1332: 46–56.
- Bocchini P, Pinelli F, Pozzi R, Ghetti F, Galletti GC (2015) Quantitative determination of dimethyl fumarate in silica gel by solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry and ultrasound-assisted extraction/gas chromatography/mass spectrometry. Environ Monit Assess 187: 65–72.
- Bodó A, Radványi L, Kőszegi T, Csepregi R, Nagy DU, Farkas Á, Kocsis M (2020) Melissopalynology, antioxidant activity and multielement analysis of two types of early spring honeys from Hungary. Food

- Biosci 35: 100587.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci Technol 28: 25–30.
- Casal C, Cuaresma M, Vega JM, Vilchez C (2011) Enhanced productivity of a lutein-enriched novel acidophile microalga grown on urea. Marine Drugs 9: 29–42.
- Cheng J, Li K, Yang Z, Zhou Z, Cen K (2016) Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. Bioresour Technol 204: 49–54.
- Cuaresma M, Casal C, Forján E, Vilchez C (2011) Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. J Ind Microbiol 38: 167–177.
- D'Autréaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol 8: 813–824.
- De Ancos B, Gonzalez E, Cano MP (2000) Effect of high-pressure treatment on the carotenoid composition and the radical scavenging activity of persimmon fruit purees. J Agric Food Chem 48: 3542–3548.
- de Mello A, Wootton R (2002) But what is it good for? Applications of microreactor technology for the fine chemical industry. Lab Chip 2: 7–13.
- Del Campo JA, Rodríguez H, Moreno J, Vargas MA, Rivas J, Guerrero MG (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Appl Microbiol Biotechnol 64: 848–854.
- Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 74: 1163–1174.
- Dembitsky VM, Maoka T (2007) Allenic and cumulenyl lipids. Prog Lipid Res 46: 328–375.
- Egeland ES (2016) “Carotenoids.” The Physiology of Microalgae: Developments in Applied Phycology (eds Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA) Springer, Switzerland, pp. 507–563.
- Fernandes AS, Petry FC, Mercadante AZ, Jacob-Lopes E, Zepka LQ (2020) HPLC-PDA-MS/MS as a strategy to characterize and quantify natural pigments from microalgae. Curr Opin Food Sci 3: 100–112.
- Ferreira A, Guerra I, Costa M, Silva J, Gouveia L (2021) “Future perspectives of microalgae in the food industry.” Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications (eds Lafarga T, Acien G). Academic Press, London, pp. 387–433.
- Foot CS (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation: there are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. Science 162: 963–970.
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Prog Lipid Res 43: 228–265.
- Fujii K, Imazato E, Nakashima H, Ooi O, Saeki A (2006) Isolation of the non-fastidious microalga with astaxanthin-accumulating property and its potential for application to aquaculture. Aquaculture 261: 285–293.
- Furuya K, Hayashi M, Yabushita Y (1998) HPLC determination of phytoplankton pigments using N,N-dimethylformamide. J Oceanogr 54: 199–203.
- Gao Z, Meng C, Chen YC, Ahmed F, Mangott A, Schenk PM, Li Y (2015) Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. J Appl Phycol 27: 1853–1860.
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, De Brabanter J, De Cooman L (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. J Appl Phycol 24: 1477–1486.
- Hagen C, Grünwald K, Xyländer M, Rothe E (2001) Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. J Appl Phycol 13: 79–87.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, New York, 905 pp.
- Hirayama O, Nakamura K, Hamada S, Kobayashi Y (1994) Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. Lipids 29: 149–150.
- Huang, D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer, EK (2002) Development and validation of

- oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem* 50: 1815–1821.
- Iwasaki Y, Takahashi S, Aizawa K, Mukai K (2015) Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 4. Measurements of the SOAC values for vegetable and fruit extracts. *Biosci Biotechnol Biochem* 79: 280–291.
- Kawasaki S, Mizuguchi K, Sato M, Kono T, Shimizu H (2013) A novel astaxanthin-binding photooxidative stress-inducible aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer. *Plant Cell Physiol* 54: 1027–1040.
- Krishnamurthy P, Wadhwani A (2012) Antioxidant enzymes and human health. *Antioxid Enzyme* 3: 1–17.
- Lafarga T (2019) Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. *Algal Res* 41: 101566.
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RCH, Bino RJ, Wijffels RH (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* 26: 631–638.
- Li Y (2007) The role of carotenogenesis in the response of the green alga *Haematococcus pluvialis* to oxidative stress. PhD thesis, The University of Hong Kong, Hong Kong.
- Londoño-Giraldo LM, Bueno M, Corpas-Iguarán E, Taborda-Ocampo G, Cifuentes A (2021) HPLC-DAD-APCI-MS as a tool for carotenoid assessment of wild and cultivated cherry tomatoes. *Sci Hortic* 7: 1–12.
- Lorenz RT, Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 18: 160–167.
- Ma RYN, Chen F (2001) Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. *Process Biochem* 36: 1175–1179.
- 眞岡孝至 (2007) カロテノイドの多様な生理作用 . 食品・臨床栄養 2: 3–14.
- Markovits A, Gianelli MP, Conejeros R, Erazo S (1993) Strain selection for β -carotene production by *Dunaliella*. *World J Microbiol Biotechnol* 9: 534–537.
- Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze R, Russer A, Hansen U (2007) Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression. *Sensors* 7: 2080–2095.
- Meticulous Market Research (2021) Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Lutein, Lycopene, Canthaxanthin, and Zeaxanthin), Application (Feed, Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, and Pharmaceuticals), Source, Formulation, Region - Global Forecast to 2026. Markets and Markets, pp.187.
- Mukai K, Ouchi A, Takahashi S, Aizawa K, Inakuma T, Terao J, Nagaoka SI (2012) Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 3. measurements of the SOAC values for phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem* 60: 7905–7916.
- 中村成夫 (2013) 活性酸素と抗酸化物質の化学 . 日医大医会誌 9:164–169.
- 野澤義則・平光美津子・山澤広之 (2016) 野菜・果物の健康有用性—ファイトケミカルの多様な機能とその仕組み—. 東海学院大学紀要 9: 67-79.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619–4626.
- Ouchi A, Aizawa K, Iwasaki Y, Inakuma T, Terao J, Nagaoka SI, Mukai K (2010) Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J Agric Food Chem* 58: 9967–9978.
- Parra-Rivero O, Barros MP, Del M, Prado M, Gil JV, Hornero-Méndez D, Zacarías L, Rodrigo MJ, Limón MC, Avalos J (2020) Neurosporaxanthin overproduction by *Fusarium fujikuroi* and evaluation of its antioxidant properties. *Antioxidants* 9: 1–18.
- Petrushkina M, Gusev E, Sorokin B, Zotko N, Mamaeva A, Filimonova A, Kulikovskiy M, Maltsev Y, Yampolsky I, Guglya E et al (2017) Fucoxanthin production by heterokont microalgae. *Algal Res* 24: 387–393.
- Prabakaran P, Ravindran AD (2011) A comparative study on effective cell disruption methods for lipid

- extraction from microalgae. *Lett Appl Microbiol* 53: 150–154.
- Prior RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods* 18: 797–810.
- Proctor VW (1957) Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecology* 38: 457–462.
- Rammuni MN, Ariyadasa TU, Nimarshana PHV, Attalage RA (2019) Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chem* 277: 128–134.
- Sandmann G (2019) Antioxidant protection from UV- and light-stress related to carotenoid structures. *Antioxidants* 8: 219.
- Singh D, Puri M, Wilkens S, Mathur AS, Tuli DK, Barrow CJ (2013) Characterization of a new zeaxanthin producing strain of *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Bioresour Technol* 143: 308–314.
- Singh DP, Khattar JS, Rajput A, Chaudhary R, Singh R (2019) High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. *PloS one* 14: e0221930.
- Singh N, Singh S, Ashraf SM, Riaz U (2020) Experimental and theoretical studies of benzoquinone modified poly (ortho-phenylenediamine): singlet oxygen generating oligomers. *Colloid Polym Sci* 298: 1443–1453.
- Solovchenko A, Chekanov K (2014) “Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors” Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology (eds Paek KY, Murthy N, Zhong JJ). Springer, Dordrecht, 63–91 pp.
- Stahl W, Sies H (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 24: 345–351.
- Stauber JL, Jeffrey SW (1988) Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *J Phycol* 24: 158–172.
- Stoyneva-Gärtner M, Stoykova P, Uzunov B, Dincheva I, Atanassov I, Draganova P, Borisova C, Gärtner G (2019) Carotenoids in five aeroterrestrial strains from *Vischeria/Eustigmatos* group: updating the pigment pattern of Eustigmatophyceae. *Biotechnol Biotechnol Equip* 33: 250–267.
- Suzuki R, Ishimaru T (1990) An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-dimethylformamide. *J Oceanogr* 46: 190–194.
- Takahashi S, Iwasaki Y, Aizawa K, Terao J, Mukai K (2016) Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method using a microplate reader. *J AOAC Int* 99: 193–197.
- Tommos C, Babcock GT (1998) Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. *Acc Chem Res* 31: 18–25.
- Tsai HP, Chuang LT, Chen CNN (2016) Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3. *Food Chem* 192: 682–690.
- Wang B, Zarka A, Trebst A, Boussiba S (2003) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J Phycol* 39: 1116–1124.
- Wang Y, Kimura T, Nohara T, Shen J, Hatta H (2018) Proposal of a micro analysis for singlet oxygen absorption capacity using a disposable 96-well microplate. *J Food Sci Technol* 14: 126–130.
- Watanabe A, Kajita M, Kim J, Kanayama A, Takahashi K, Mashino T, Miyamoto Y (2009) In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. *Nanotechnology* 20: 45–53.
- Wolf L, Cummings T, Müller K, Reppke M, Volkmar M, Weuster-Botz D (2021). Production of β -carotene with *Dunaliella salina* CCAP19/18 at physically simulated outdoor conditions. *Eng Life Sci* 21: 115–125.
- Zacarias L, Cronje PJ, Palou L (2020) “Postharvest technology of citrus fruits.” The Genus Citrus (eds Talon M, Caruso M, Gmitter FG). Woodhead Publishing, Sawston, pp. 421–446.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Meas* 94: 909–950.