

类胡萝卜素细胞工厂——杜氏藻养殖 研究进展*

牟春琳, 郝晓华, 刘鑫, 陈喜文, 陈德富*

(南开大学 生命科学学院分子遗传学研究室, 天津 300071)

摘要:杜氏藻是目前生产天然 β 胡萝卜素最好的商品化微藻,其 β 胡萝卜素含量最高达细胞干重的14%(质量分数)。此外,通过紫外线或化学诱变剂处理,也能获得用来生产八氢番茄红素、番茄红素、叶黄素和玉米黄素等其他类胡萝卜素突变株。为使杜氏藻类胡萝卜素商业开发顺利进行,分析光、温度、pH值、营养、天敌等养殖条件对杜氏藻生长和类胡萝卜素积累的影响;比较大型开放池、循环池、回旋池、级联池、大罐、异养发酵罐及封闭式光合反应器等养殖方式的利弊;同时,总结培养液再循环、藻体采集、藻泥干燥、类胡萝卜素提取等藻体采收的有益经验。

关键词:类胡萝卜素;杜氏藻;盐藻; β 胡萝卜素;微藻生物技术

中图分类号:Q949.21

文献标识码:A

文章编号:1671-6647(2010)04-0554-09

杜氏藻(*Dunaliella*)属于绿藻门绿藻纲团藻目杜氏藻科杜氏藻属,人们熟知的*D. salina*(盐藻)、*D. bardawil*(巴氏藻)、*D. tertiolecta*、*D. primolecta*、*D. viridis*、*D. bioculata*、*D. acidophyla*、*D. parva*和*D. media*均属杜氏藻^[1]。杜氏藻细胞由于没有坚硬细胞壁,渗透压的改变对其形状或体积影响巨大^[2]。

杜氏藻是目前已知真核生物中最耐盐的生物,能在5.5 mol/L饱和盐浓度中生存,其耐盐机制被认为是通过调节自身细胞内甘油浓度来实现的^[3]。在高盐环境中生长时,细胞内的甘油含量将超过细胞湿重的50%(质量分数),以此补偿细胞内外的渗透压差,同时为酶提供“合适的溶质”以防止酶的失活或抑制^[4]。除“补偿”机制外,最近有人还提出了其他耐盐机理,即在高盐生境下,杜氏藻可依靠氧化还原作用驱动钠泵移除 Na^+ ^[5],或增强光合过程中的 CO_2 同化率以应对高盐环境^[6]。

杜氏藻细胞中含有一个被淀粉粒包裹成中央淀粉核的、富含叶绿素a和叶绿素b的杯状叶绿体^[7]。在高光、高温、高盐浓度或营养不足的生境条件下,杜氏藻积累大量类胡萝卜素,如 β 胡萝卜素,并以微滴形式储藏在叶绿体中,以防止叶绿素受到损伤^[8]。盐藻细胞中 β 胡萝卜素含量可达细胞干重的14%(质量分数)^[9],因此它已成为商业化生产天然 β 胡萝卜素的最好藻种^[10]。澳大利亚、美国和中国等国家已利用其来大规模生产天然 β 胡萝卜素^[11]。

自1963年发现杜氏藻能积累大量 β 胡萝卜素以来^[7],其规模化研究与商业化开发已达半个多世纪,并开发了其他类胡萝卜素产品(如八氢番茄红素、番茄红素、玉米黄质等)生产工艺。为使这种高耐盐微藻更好地服务于人类,使其开发研究更深入,本文就其品系选择、养殖条件、养殖方式、类胡萝卜素诱导、藻体采收等方面的研究进展进行分析和总结。

1 品系选择

大规模商业养殖前首先应进行品系选择。目前的杜氏藻品系都是从不同咸水生境中分离出来的,如

* 收稿日期:2009-08-10

资助项目:海洋公益性行业科研专项——杜氏盐藻品种改良与番茄红素规模化开发技术研究(200805044)

作者简介:牟春琳(1984-),男,甘肃合作人,博士研究生,主要从事分子遗传学方面研究

* 通讯作者:陈德富(1965-),男,湖南新宁人,教授,博士生导师,主要从事分子遗传学方面研究。E-mail:chendefu@nankai.edu.cn

(高峻 编辑)

内陆盐湖、盐沼或含盐量超过 10% (质量浓度) 的人造盐池。其中仅部分能高效积累 β 胡萝卜素 (达细胞干重质量分数的 10%~14%)^[9]。Ben-Amotz 等^[2] 认为在合适的条件下,杜氏藻均含有大约 0.3% (质量分数) 的 β 胡萝卜素,但只有盐藻和巴氏藻可以产生大于细胞干重 10% (质量分数) 的 β 胡萝卜素。Cifuentes 等^[12] 从智利盐池中分离到 8 个品系的盐藻,其类胡萝卜素总量为 4~42 pg/细胞或 7.2~38.2 mg/L; Garcia-Gonzalez 等^[13] 在开放池中比较了 5 个优良盐藻品系的生长速率和类胡萝卜素含量后发现,生长速率变动在 16%/d~20%/d (质量分数),类胡萝卜素含量变动在 8.1 mg/L~15.1 mg/L,其中品系 UTEX2538 的类胡萝卜素含量最高;Powtongsook 等^[14] 分离的 DS91008 在 5.1 mol/L 盐浓度、连续光照强度为 270 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的培养条件下,每个细胞的类胡萝卜素产量可达 80.3 pg。表 1 为几个重要杜氏藻种的生长速率、类胡萝卜素含量及来源。由于其数据来自不同研究机构,藻种和养殖条件完全不同,因此很难横向比较其品系优劣,但从商业角度来看,优良的 β 胡萝卜素生产品系应既具有最大生长速率,又具有在单位养殖时间内最高的 β 胡萝卜素积累量。

表 1 几个重要杜氏藻种的生长速率、类胡萝卜素含量及来源

Table 1 Growth rates and carotenoid contents of useful *Dunaliella* species, and their literature sources

藻种	NaCl /mol·L ⁻¹	生长速率 /%·d ⁻¹	类胡萝卜素含量		来源及文献
			/mg·L ⁻¹	/pg(每个细胞)	
<i>D. salina</i> UTEX2538	2.0	20±3	15.1±2.6	未检测	Culture Collection of Texas University, USA ^[13]
<i>D. salina</i> CCAP19/30	2.0	16±2	11.0±2.1	未检测	Culture Collection of Algae and Protozoa of the Centre for Hydrology and Ecology, Ambleside, UK ^[13]
<i>D. sp.</i> (R)	2.0	16±2	12.0±1.6	未检测	Saltworks at Roquetas de Mar, Almeria, Spain ^[13]
<i>D. sp.</i> (L4)	2.0	17±3	14.0±1.7	未检测	Saline lake on Lanzarote, Spain ^[13]
<i>D. sp.</i> (L6)	2.0	16±3	8.1±1.2	未检测	Saline lake on Lanzarote, Spain ^[13]
<i>D. tertiolecta</i> DCCBC26	0.5	未检测	11.72	未检测	Salt Lake of Urmia in Western Azarbaijan Province, Northwest of Iran ^[15]
<i>D. salina</i> SAG 42.88	2.0	未检测	未检测	3.45±0.30	German Culture Collection, Sammlung von Algen Kulturen, Universit at Gottingen, Germany ^[16]
<i>D. sp.</i> (D2)	2.0	未检测	未检测	3.99±0.24	Sambhar Salt Lake, Rajasthan, India ^[16]
<i>D. salina</i> DS91001				53.7±2.04	
<i>D. salina</i> DS91002				61.9±5.29	
<i>D. salina</i> DS91007				54.6±3.12	
<i>D. salina</i> DS91008	5.1	8~14	未检测	80.3±4.49	Salt Fields in Samut-Songkhram Province, Thailand ^[14]
<i>D. salina</i> DS91009				47.0±4.36	
<i>D. salina</i> DS91010				47.1±1.39	
<i>D. salina</i> CONC-001			13.7	8.1	
<i>D. salina</i> CONC-003			27.4	21.1	
<i>D. salina</i> CONC-004			31.5	28.7	
<i>D. salina</i> CONC-005	4.3	14~32	31.7	42.2	Salt Ponds at Salar de Atacama and Antofagasta, Chile ^[12]
<i>D. salina</i> CONC-006			12.8	19.1	
<i>D. salina</i> CONC-007			35.6	42.4	
<i>D. salina</i> CONC-008			30.8	22.0	
<i>D. salina</i> CONC-009			31.8	38.3	

通过紫外线或化学诱变剂处理,获取具特殊能力杜氏藻突变株的研究也取得了长足进展。一方面,这些突变株可用来开展基础研究。如,盐耐受盐藻诱变株^[8]可作为其耐盐机理研究模型;短鞭毛杜氏藻突变株^[17]可用来阐明其运动机理。另一方面,突变株中可能还有应用前景巨大的潜在商业品系,如低光高积累 β 胡萝卜素巴氏藻突变株^[18],可延长 β 胡萝卜素生产时间,间接地节约了生产成本;通过乙基磺酸甲酯诱变技术分离到的玉米黄素环氧化反应缺陷突变株^[19],可用来生产玉米黄质。这些突变株是杜氏藻未来商业开发潜在资源。

2 养殖条件

杜氏藻具有高盐环境下存活的优势,因此无论是开放池还是封闭反应器都可大量养殖,但要使其生长良好,类胡萝卜素积累量又高,就必须为其提供最合适的养殖条件。

2.1 光

杜氏藻为光自养生物,光是其唯一能源^[20]。在开放池中,太阳光是唯一光源。在光合反应器中,可选用白色荧光灯或日光灯为其光源。藻的生长及类胡萝卜素合成因光质和光量的不同有所差异。UV-A 射线(320~400 nm)可促使巴氏藻大量累积类胡萝卜素的同时,不影响其生长^[21]。在 250 W/m² 的有效光合辐射(400~700 nm)范围内,加入 8.7 W/m² 的 UV-A 可提高约 2 倍的 β 胡萝卜素积累量,而且 β 胡萝卜素的结构更佳,主要为全反式 β 胡萝卜素^[22]。

2.2 温度

杜氏藻能够在 0 °C 至 45 °C 范围内存活。在室内,其最佳生长温度为 32 °C,生长允许的温度范围为 25 °C~35 °C^[23]。开放池的温度通常无法控制,夜晚低温影响藻体生长,白天高温(40 °C 乃至更高)虽有利于积累类胡萝卜素,但不利于细胞生长,同时体内甘油大量外泻^[20,24]。甘油是细菌及丝状真菌优质碳源,使得这些微生物大量生长而成为开放池优势物种而影响盐藻的养殖^[23]。因此,异常温度控制是盐藻室外养殖的主要难题之一,尤其是在潮湿、炎热夏季。与潮湿地区相比,干燥地区具有高蒸发率而降低开放池的温度,所以干燥地区更适合盐藻的室外养殖。

2.3 pH 值

杜氏藻具有很宽的 pH 耐受范围,0~11 范围内均能存活,但对于生长而言,最适 pH 值是 9~11。在自养型藻类养殖中,由于光合作用固定 CO₂,摄取 NO₃⁻ 离子,释放 OH⁻,使得环境中的 pH 值逐渐升高。在高 pH 条件下,尤其是存在高浓度 Ca²⁺ 时,将可能发生钙析出及藻絮凝而影响藻体发育,因此应避免培养液的 pH 值升至 8 以上^[25]。在集约型管理的开放池中,往往通过 CO₂ 和 HCl 来控制其 pH 值介于 7.5±0.2 之间^[23]。在一些开放池及光合生物反应器中,由于无机碳源主要是 HCO₃⁻ 离子,故 pH 值仅由添加 HCl 来调控。

2.4 营养

由于杜氏藻是光合自养生物,故能利用 CO₂ 和 HCO₃⁻ 为碳源。因此,缺乏无机碳源是限制藻体生长的最主要因素^[20]。众多类型的鼓泡装置都可向培养液中注入 CO₂。气体通过固定于培养池底部的多孔塑料管道传送,数字流量计计量其气体流动速率,使之控制在 0.4 L/min^[13]。当 pH 值介于 7.5~9.5 时,10 mmol/L 的 NaHCO₃ 可很好地使藻体生长;但当 pH 值达 11 时,因可溶 CO₂ 减少,藻体只能在更高初始 HCO₃⁻ 离子浓度环境下才能较好地生长^[25]。

盐藻生长最好的氮源是硝酸盐,在培养液中添加 5 mmol/L 的 NaNO₃ 或 KNO₃ 可使盐藻生长良好,减少

硝酸盐量可减缓藻体生长而促进类胡萝卜素诱导,但培养液中氮源的长期限制将导致细胞大量死亡及单位培养体积类胡萝卜素总量严重减产。铵盐及尿素等氮源被认为会导致盐藻死亡^[26],因而不允许使用。

KH_2PO_4 或 NaH_2PO_4 被认为是杜氏藻最佳磷源。Gibor^[27] 认为, $0.2 \mu\text{g/L}$ 的 KH_2PO_4 是盐藻生长最适浓度。在开放池中,更高浓度的磷酸盐会抑制藻体发育,尤其是 pH 值高于 8 时,磷酸盐与钙离子会形成 Ca_3PO_4 沉淀并导致藻絮凝^[28]。

杜氏藻的生长同样需要高浓度硫酸盐(接近 2 mmol/L),但由于天然水源(如海水或自来水)中的硫酸盐含量很高(接近 30 mmol/L),因此商业养殖池中无需再添加硫酸盐^[25]。

其他元素包括 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 Na^+ 、螯合离子及其他微量元素等也是杜氏藻生长所必需的。 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ 的浓度比对藻体发育及类胡萝卜素合成产生一定影响^[29]。杜氏藻能耐受 $0.8 \sim 20.0$ 的 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 浓度比^[26]。对于盐藻,最佳生长的 $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ 浓度比是 3.2,但对于类胡萝卜素生物合成而言其最佳比例是 8.6^[30]。螯合离子常以 $\text{FeCl}_3\text{-EDTA}$ 或柠檬酸铁-EDTA 形式添加到培养液中。Borowitzka 和 Borowitzka 发现,与柠檬酸铁相比, FeCl_3 更能增加盐藻初始生长率,但柠檬酸铁可最终获得比 FeCl_3 更多的细胞总量。镁、锌、钴和铜等微量元素也是杜氏藻生长所必需的,但工业盐或海水制备的培养液中,无需再添加这些微量元素了^[24]。

2.5 天敌

在杜氏藻生长环境中,由于盐浓度很高通常仅少数生物能存活下来,这些生物主要是耐盐和嗜盐细菌、纤毛虫、变形虫、卤虫及某些真菌等^[31]。变形虫和纤毛虫是杜氏藻的捕食者^[25]。因此,有必要寻找出一种能够杀死天敌而对杜氏藻毒性极弱的化合物。Moreno-Garrido 和 Canavate 发现, 30 mg/L 的硫酸奎宁处理培养液不仅能彻底消灭纤毛虫,同时不影响藻细胞的生长^[32]。

3 养殖方式

人们已经开发了多种养殖方式来大量养殖微藻,这些方式包括大型开放池、循环池、回旋池、级联池、大罐、异养发酵罐及封闭式光合反应器等^[33]。

与绿藻和螺旋藻一样,杜氏藻在选择性培养液中生长良好,因此很容易将它们培养在含盐浓度很高的开放池中。由于开放池一般建在气候炎热干燥且少云的地区,并有合适的卤水来源,远离污染,因此在该养殖系统中的杜氏藻生长良好,没有天敌或其他藻类污染^[34],已成为商业化程度最高、最为普遍的养殖系统^[11]。

超大型培养池(粗放型模式),如澳大利亚大循环池的面积将近 250 ha ,除了风和对流作用外无任何搅拌过程,为保证盐度、增加对流,通常从海水中泵入低盐海水至高盐湖中,同时添加适量营养物质,在 β 胡萝卜素含量达到合适值时,养殖的盐藻被转移至海岸收获,处理完毕的培养液重新返回培养池循环使用^[26]。

小型叶轮搅拌的回旋池在世界各地被广泛运用^[23]。这种池大多由砖、混凝土、泥土或玻璃纤维建造而成,表面积约为 $1\,000 \sim 4\,000 \text{ m}^2$ 。 CO_2 气体不仅是重要的无机碳源,还起到调控培养液 pH 值的作用。叶轮搅拌起到均匀热力、营养及气体的作用,同时可防止藻体絮凝、减少藻体在高强度和高浓度溶解氧中的光损伤(光抑制)^[35]。

杜氏藻的粗放式培养能从 $0.05 \sim 0.1 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 杜氏藻中得到 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/L}$ 的 β 胡萝卜素,最高达 $10 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 的 β 胡萝卜素。回旋池中集约式培养能从 $5 \sim 10 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 的杜氏藻中得到 $10 \sim 20 \text{ mg/L}$ 的 β 胡萝卜素,最高含 $400 \sim 750 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 的 β 胡萝卜素,明显高于粗放式培养,但选择粗放式还是集约式培养还得考虑土地和水的成本以及当地的气候条件。

超级集约型系统是在光合生物反应器基础上发展起来的^[36],由于能控制培养参数,与开放池相比,这样的系统更清洁、更能获得高生物量及高含量的类胡萝卜素,因此是一种很好的养殖系统。目前商业化使用的反应器有 3 种类型——平皿光合生物反应器^[36]、管状光合生物反应器^[11]和超薄固载结构^[33]。两相(水相/

有机相)光合生物反应器也已完成研发,该反应器的下层为水相,主要是帮助藻细胞生长的培养液,藻细胞持续产生的类胡萝卜素被富集到上层的有机相(由癸烷和 CH_2Cl_2 混合组成)中,因此该光合生物反应器能提高 β -胡萝卜素萃取效果^[37],或能有效萃取出合成的八氢番茄红素^[38]。在鼓泡塔光合生物反应器中使用钙藻酸盐固定细胞是一种全新的微藻养殖方式,实现了巴氏藻的高密度养殖^[39]。尽管封闭系统比开放池系统有明显的技术优势,如降低污染、减少 CO_2 损耗、灵活的技术设计、稳定的养殖条件,但需要建造昂贵的生产设备,而且生产容量也不如开放池系统。

4 类胡萝卜素诱导

β 胡萝卜素通过吸收光谱中的蓝光区来保护细胞免受高光损伤^[35]。杜氏藻中的 β 胡萝卜素由一系列顺式和反式异构体混合组成,其中 9-顺式占 41%(质量分数)、全反式占 42%(质量分数)、15-顺式占 10%(质量分数),其他异构体占 6%(质量分数)^[20]。由于 9-顺式异构体较全反式异构体有更好的抗氧化和防癌作用^[40],故提高 β 胡萝卜素总量及 9-顺式异构体比例是类胡萝卜素诱导的关键。

人们可以运用很多方法来提升单位时间、单位体积内的 β 胡萝卜素总量。如,高盐、营养不足、高温、高光照虽使杜氏藻生长减缓,但增加了 β 胡萝卜素的总量^[13]。Ben-Amotz 和 Avron 发现,盐浓度和光强度在巴氏藻类胡萝卜素合成方面有协同作用,但延长营养缺乏时间将导致藻体死亡^[29]。因此,Marin 等^[41]认为同时调节光强度和盐度可能是获取最佳 β 胡萝卜素积累量的最佳对策。提高盐度还可阻抑开放池中的杜氏藻捕食者^[34]。

在巴氏藻中的研究结果显示,2 000 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的高光强有利于 9-顺式异构体的累积^[42]。封闭式管状光合生物反应器对藻细胞的相互遮蔽程度低,以它为光反应器培养盐藻,生产的类胡萝卜素的 9-顺式异构体比例高^[43]。但是,与高光照相比,降低光强度能够在不同品系的盐藻中获得更高含量的 9-顺式异构体^[44]。与巴氏藻不同,生长在更高盐度环境中,盐藻 CONC-007 品系并未增加 9-顺式异构体比例^[45]。而约 10 $^\circ\text{C}$ ~15 $^\circ\text{C}$ 低温可诱导 9-顺式异构体在巴氏藻中的合成^[46]。总之,不同品系的杜氏藻对胡萝卜素诱导有很大差异,也许不存在一个可预测的特定条件使之在单位培养时间、单位培养体积内获取最大的 β 胡萝卜素总量和最高比例的 9-顺式异构体,应根据不同品系分别摸索合适的类胡萝卜素诱导条件。

除盐度、光强和温度外, Fe^{2+} 和有机碳源对盐藻生长及类胡萝卜素生物合成有影响,Mojaat 等发现培养液中提供 67.5 mmol/L 醋酸盐和 450 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FeSO_4 时,单个细胞的 β 胡萝卜素含量显著提高,每个细胞高达 70 pg ^[47]。由于能大幅度提高 β 胡萝卜素含量,该方法也许是利用盐藻生产类胡萝卜素的有效方案之一。

5 藻体采收

5.1 培养液再循环

购买营养盐是商业养殖杜氏藻一笔较大开支,因此藻体分离后培养液的重复使用很有经济必要。但由于细胞裂解使得其含有较高浓度的甘油、氨基酸和其他有机质,而且浑浊度也很高,不可直接重复使用,需处理后才可继续养殖杜氏藻。Ben-Amotz 建议选用细菌来处理废弃培养基使其可重复使用^[23]。Santos 等发现在废培养液中培养特有嗜盐细菌 2 d 后,几乎检测不到甘油等有机物,同时因嗜盐细菌产生的菌红素是重要的抗氧化活性物质,也能额外地增加收益^[48]。

5.2 藻体采集

大规模培养杜氏藻后,从卤水中高效收集藻体是类胡萝卜素商业生产过程中的一个重要但难度较大的步骤。由于杜氏藻细胞缺乏坚硬细胞壁、培养液盐度高、细胞密度低,因此过滤时很容易造成滤孔堵塞。所

以,通过砂滤器、纤维素滤膜等过滤装置来采集藻体的方法都是无效的^[25]。

使用 FeCl_3 、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 和 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 等化学絮凝剂、预聚合金属盐类、聚合电解质类和高分子絮凝剂(如聚核糖)等促进藻体聚集的办法是有效帮助藻体采集的方法^[49],但多数絮凝化合物被认为不安全,建议谨慎使用。

通过 NaOH 改变培养液 pH 值是使 *D. tertiolecta* 悬浮的有效方法^[50]。使用恒流离心及自动排放装置也是简单实用的盐藻采集方法,其处理量和采集量都很高,但需要较高的人力和物力等初始投入及高昂的维护成本^[25]。

其他回收方法,如利用静止和流动梯度中盐度依赖性的浮力性质、藻细胞趋光性和顺序性反应特性、吸收性气泡的分离及细胞向附加的低盐层的迁移属性等原理开发的方法也受到了普遍好评,但这些方法都受到专利限制^[51]。

5.3 藻泥干燥

对采集的藻泥进行脱水或干燥可延长藻体储存时间。微藻的脱水方法包括日光干燥、滚筒干燥、喷雾干燥和冷冻干燥等。日光干燥会快速导致杜氏藻的 β 胡萝卜素降解,不适合于杜氏藻藻泥的干燥。相反,滚筒干燥、喷雾干燥和冷冻干燥在类胡萝卜素稳定方面有好的效果^[25],而且冷冻干燥的类胡萝卜素采收量很高,但其投资很高,仅适用于实验室研究,因此大规模商业化生产唯一合适的方法是喷雾干燥,它比冷冻干燥更经济。

5.4 类胡萝卜素提取

通常从藻泥或干粉中提取类胡萝卜素的方法包括常规有机溶剂如己烷、乙醇、氯仿和乙醚的抽提。这些方法虽简单有效,但产品中残留少量化学物质。因此其他提取方法也被陆续开发出来,如用一种食用油从藻体中直接提取类胡萝卜素^[52],最终食用油中类胡萝卜素含量能达到 0.5%~7.5%(质量分数)。通过 CO_2 超临界萃取 β 胡萝卜素异构体^[53],39%(质量分数)的 β 胡萝卜素总回收率中含有 80%(质量分数)的 9-顺式异构体。利用两相生物反应器,通过生物相容性有机溶剂选择性地提取特殊类胡萝卜素^[54]和高纯度的 9-顺式 β 胡萝卜素^[55],9-顺式 β 胡萝卜素含量达到总胡萝卜素含量的 75%(质量分数)。

参考文献(References):

- [1] BOROWITZKA M A, SIVA C J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (*Chlorophyta*, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species [J]. *J. Appl. Phycol.*, 2007, 19(5): 567-590.
- [2] BEN-AMOTZ A, AVRON M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella* for industrial products [J]. *Trends Biotech.*, 1990, 8(5): 121-126.
- [3] SHARIATI M, LILLEY R McC. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure; subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes [J]. *Plant Cell Environ.*, 1994, 17(12): 1295-1304.
- [4] LEVANDOWSKY M, HUTNER S H. *Biochemistry and Physiology of Protozoa* [M]. New York: Academic Press, 1979: 139-190.
- [5] KATZ A, PICK U. Plasma membrane electron transport coupled to Na^+ extrusion in the halotolerant alga *Dunaliella* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1504(2-3): 423-431.
- [6] OREN A. A hundred years of *Dunaliella* research; 1905 2005 [J]. *Saline System*, 2005, 1: 2.
- [7] SAN PIETRO A. *Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production* [M]. New York: Academic Press, 1980: 91-208.
- [8] BEN-AMOTZ A, SHAISH A. β -carotene biosynthesis [M]// Avron M, Ben-Amotz A. *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. Boca Raton: CRC press, 1992: 205-216.
- [9] AASEN A J, EIMHJELLEN K E, LIAAEN-JENSEN S. An extreme source of β -carotene [J]. *Acta Chem. Scan*, 1969, 23(7): 2544-2545.
- [10] BOROWITZKA M A. Microalgae as a source of pharmaceuticals and other biologically active compounds [J]. *J. Appl. Phycol.*, 1995,

- 7(1): 3-15.
- [11] BOROWITZKA M A. Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermenters [J]. J. Biotechnol., 1999, 70(1-3): 313-321.
- [12] CIFUENTES A S, GONZALEZ M, Conejeros M, et al. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile[J]. J. Appl. Phycol., 1992, 4(2): 111-118.
- [13] GARCIA-GONZALEZ M, MORENO J, CANAVATE J P, et al. Condition for open-air outdoor of *Dunaliella salina* in southern Spain [J]. J. Appl. Phycol., 2003, 15(2): 177-184.
- [14] POWTONGSOOK S, KITTAKOOP P, MENASVETA P, et al. Isolation and characterization of *Dunaliella salina* from Thailand [J]. J. Appl. Phycol., 1995, 7(1): 75-76.
- [15] FAZELI M R, TOFIGHI H, SAMADI N, et al. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran [J]. Bioresour Technol., 2006, 97(18): 2453-2456.
- [16] PHADWAL K, SINGH P K. Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. [J]. Bioresour Technol., 2003, 90(1): 55-58.
- [17] VISMARA R, VERNI F, BARSANTI L, et al. A short flagella mutant of *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae) [J]. Micron., 2004, 35(5): 337-344.
- [18] SHAISH A, BEN-AMOTZ A, AVRON M. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* [J]. J. Phycol., 1991, 27(5): 652-656.
- [19] JIN E S, FETH B, MELIS A. A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions [J]. Biotechnol. Bioeng., 2003, 81(1): 115-124.
- [20] BOROWITZKA L J, BOROWITZKA M A. β -carotene (provitamin A) production with algae[C]//VANDAMME E J. Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors. London: Elsevier Applied Science, 1989: 15-26.
- [21] JAHNKE L S. Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation [J]. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 1999, 48(1): 68-74.
- [22] MOGEDAS B, CASAL C, FORJÁN E, et al. β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors [J]. J Biosci Bioeng, 2009, 108(1): 47-51.
- [23] BEN-AMOTZ A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production [J]. J. Appl. Phycol., 1995, 7(1): 65-68.
- [24] BOROWITZKA M A, BOROWITZKA L J. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoors of *Dunaliella salina*[C]//STADLER T, MOLHAN J, VERDUS M C, et al. Algal Biotechnology. London: Elsevier Applied Science, 1987: 345-402.
- [25] BEN-AMOTZ A, AVRON M. The biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest[C]//CRESSWELL R C, RESS T A V, SHAH N. Algal and Cyanobacterial Biotechnology. London: Longman Scientific and Technical Press, 1989: 90-114.
- [26] BOROWITZKA M A. The mass culture of *Dunaliella salina* [M]. Bangkok, Thailand; FAO Network of Agriculture Centers in Asia, 1990: 63-80.
- [27] GIBOR A. The culture of brine algae [J]. Biological Bulletin, 1956, 111(2): 223-229.
- [28] SUKENIK A, Shelef G. Algal autoflocculation: verification and proposed mechanism [J]. Biotechnol. Bioeng., 1984, 26(2): 142-147.
- [29] BEN-AMOTZ A, AVRON M. On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* [J]. Plant Physiol., 1983, 72(3): 593-597.
- [30] MASSYUK N P. Effect of Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- and SO_4^{2-} ions on growth, reproduction, and carotene production in *D. salina* Teod [J]. Ukr. Bot. Zh., 1956, 22(1): 3-11.
- [31] BUTINAR L, SONJAK S, ZALAR P, et al. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns [J]. Bot. Marina, 2005, 48(1): 73-79.
- [32] MORENO-GARRIDO I, CANAVATE J P. Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina* [J]. Aquac. Eng., 2001, 24(1): 107-114.
- [33] PULZ O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 57(3): 287-293.
- [34] BOROWITZKA L J, BOROWITZKA M A. Commercial production of β -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds [J]. Bull Mar. Sci., 1990, 47(3): 244-252.
- [35] BEN-AMOTZ A. Production of β -carotene and vitamins by the halotolerant algae *Dunaliella*[C]//AHAWAY A, ZABROSHY O. Ma-

- rine Biotechnology. New- York: Plenum Press. 1993: 411-417.
- [36] BOROWITZKA M A. Closed algal photobioreactors; design considerations for large-scale systems [J]. J. Mar. Biotechnol. , 1996, 4 (2): 185-191.
- [37] MOJAAT M, FOUCAULT A, PRUVOST J, et al. Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of β -carotene from *Dunaliella salina* [J]. J Biotechnol. , 2008, 133(4): 433-441.
- [38] LEON R, VILA M, HERNANE D, et al. Production of phytoene by herbicide-treated microalgae *Dunaliella bardawil* in two-phase systems [J]. Biotechnol. Bioeng. , 2005, 92(6): 695-701.
- [39] JOO D S, CHO M G, LEE J S, et al. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation [J]. J. Microencapsul. , 2001, 18(5): 567-576.
- [40] CHIDAMBARA MURTHY K N, VANITHA A, RAJESHA J, et al. *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* a green microalga [J]. Life Sci. , 2005, 76(12): 1381-1390.
- [41] MARIN N, MORALES F, LODERIOS C, et al. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities [J]. J. Appl. Phycol. , 1998, 10(4): 405-411.
- [42] BEN-AMOTZ A, LERS A, AVRON M. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in alga *Dunaliella bardawil* [J]. Plant Physiol. , 1988, 86(4): 1286-1291.
- [43] GARCIA-GONZALEZ M, MORENO J, MANZANO J C, et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor [J]. J. Biotechnol. , 2005, 115(1): 81-90.
- [44] ORSET C, YOUNG A J. Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis β , β -carotene in *Dunaliella salina* (Teod.) [J]. Plant Physiol. , 2000, 122(2): 609-618.
- [45] GOMEZ P I, BARRIGA A, CIFUENTES A S, et al. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta [J]. Biol. Res. , 2003, 36(2): 185-192.
- [46] BEN-AMOTZ A. Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta) [J]. J. Phycol. , 1996, 32(2): 272-275.
- [47] MOJAAT M, PRUVOST J, FOUCAULT A, et al. Effect of organic carbon sources and Fe^{2+} ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina* [J]. Biochem. Eng. J. , 2008, 39(1): 177-184.
- [48] SANTOS C A, VIEIRA A M, FERNANDES H L, et al. Optimization of the biological treatment of hypersaline wastewater from *Dunaliella salina* carotenogenesis [J]. J. Chem. Technol. Biotechnol. , 2001, 76(11): 1147-1153.
- [49] GRIMA E, BELARBI E, FERNANDEZ F G, et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites; process options and economics [J]. Biotechnol. Adv. , 2003, 20(7-8): 491-515.
- [50] HORIUCHI J I, OHBA I, TADA K, et al. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control [J]. J Biosci. Bioeng. , 2003, 95(4): 412-415.
- [51] FERNANDES H L, VELOSO V, GOUVEIA L, et al. Mild method of pre-concentration of *Dunaliella salina* from culture medium [J]. Biotechnol. Tech. , 1997, 11(8): 557-559.
- [52] NONOMURA A M. Process for producing a naturally-derived Carotene Oil composition by direct extraction from Algae; US, 4680314 [P]. 1987-07-14.
- [53] BONSHTEIN I G, KORIN E, COHEN S. Selective separation of cis-trans geometrical isomers of β -carotene via CO_2 supercritical fluid extraction [J]. Biotechnol. Bioeng. , 2002, 80(2): 169-174.
- [54] HEJAZI M A, LAMARLIERE C, ROCHA J M S, et al. Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability [J]. Biotechnol. Bioeng. , 2002, 79(1): 30-36.
- [55] SUZUKI T, OHISHI N, YAGI K. Method of obtaining a composition containing 9-cis β -Carotene in High-Purity; US, 6057484 [P]. 2000-05-02.

Cell Factory of Carotenoids —— Progress in *Dunaliella* Cultivation and Its Research

MOU Chun-lin, HAO Xiao-hua, LIU Xin, CHEN Xi-wen, CHEN De-fu

(Laboratory of Molecular Genetics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: At present the microalga *Dunaliella* is the best commercial sources for production of natural β -carotene since its content can be as high as 14% (mass fraction) of the dried algal weight. Additionally, if the alga go through UV irradiation or chemical mutagen induction, some mutational strains can be obtained to produce other carotenoids such as phytoene, lycopene, lutein, zeaxanthin, and others. In order to improve the commercial development of the carotenoids from *Dunaliella*, the culture conditions effecting on *Dunaliella's* growth and carotenoid accumulation are reviewed. The culture conditions are light, temperature, PH value, nutrient requirements, predators, and others. Also several types of culture systems are compared with each other, including large open ponds, circular ponds, raceway ponds, cascade ponds, large tanks, tanks with heterotrophic fermenters, and closed photobioreactors. Finally some helpful experiences are summarized for better medium recycling, cell harvesting and drying, and extraction of carotenoids.

Key words: carotenoids; *Dunaliella*; *Dunaliella salina*; β -carotene; microalgal biotechnology

Received: August 10, 2009