

红球藻虾青素资源开发历程与趋势展望

刘建国^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋大科学中心 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 红球藻种质培育与虾青素制品开发国家地方联合工程中心, 云南 楚雄 675012)

摘要: 经 30 多年不懈努力与系统创新研发, 我国已成功地实现红球藻虾青素资源的规模化生产, 开发出新资源食品和功能生物制品。期间, 我们结合微藻产业现状与国情, 围绕红球藻资源开发的产业化链条, 针对上中下游重要环节的关键性瓶颈问题, 开展了基础理论探索、新技术开发、产业化推广与新活性功效发掘等系列工作。借建所 70 周年所庆成果专刊出版之际, 全面回顾总结我们在该藻种质资源、基于细胞周期调控的二步串联培养模式、关键参数优化与控制、光反应器培养设施创制、生物污染危害和防控原理与策略、活性物质开发与新功能挖掘、产业标准与体系建设等方面所取得的进展, 同时展望未来趋势, 以期促进红球藻以及整个微藻产业的健康可持续发展。

关键词: 红球藻; 虾青素; 大型光生物反应器; 敌害生物防治; 细胞周期及调控

中图分类号: Q-1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2020)08-0130-17

DOI: 10.11759/hyhx20200314003

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*, 简称红球藻)属单细胞绿藻, 在特定条件下可大量累积虾青素, 为自然界已知含天然虾青素最高的生物资源。虾青素为红色脂溶性物质, 具极高的着色力、抗氧化性和其它功效, 在化妆品、食品、医药保健及水产等多个领域都具有潜在的应用前景, 备受业内关注与世人青睐^[1-4]。

国际上, 规模化培养红球藻始于 20 世纪 80 年代, 美国 Cyanotech 公司在夏威夷采用传统开放池率先开展试养殖论证。当时世界范围内, 只有生长快、抗逆性强和耐污的小球藻、螺旋藻和盐藻借助开放池可规模化生产, 以获取初生代谢产物的生物物质为主。规模化培养不抗逆的微藻、尤其富含次生代谢物质为主的微藻(如含高附加值虾青素的红球藻), 尚缺少关键原理和有效技术与借鉴模式。在瑞典、以色列、日本、中国和澳大利亚的微藻研发团队, 90 年代陆续启动红球藻资源开发工作。到 21 世纪初, 利用开放池和光生物反应器技术规模化培养红球藻初步取得成功, 目前美国(含日本和瑞典在美国的公司)、以色列和中国是国际上最主要的红球藻生产国, 其中我国红球藻产量可占国际市场份额的 3~4 成。

20 世纪 90 年代以来, 我国多家机构(如中国科学院的海洋研究所、水生生物研究所、武汉植物园、

烟台海岸带研究所、青岛生物能源与过程研究所, 高校中的福建师范大学、深圳大学、北京大学、华东理工大学、华南理工大学、暨南大学和山东科技大学等), 数十个微藻研究团队陆续启动红球藻虾青素研究。期间 20 多家微藻企业(如荆州天然虾青素、云南爱尔发生物、绿色金可、绿 A、泽元和国投微藻生物等)也先后开展该藻规模化生产论证并取得成功, 目前更多企业参与到产品研发和市场开拓中。红球藻虾青素已成为国内外微藻甚至藻类领域最为关注的研究热点。

我们团队于 20 世纪 90 年代初启动该项研究, 主要围绕其产业化开发链条, 针对上中下游诸多环节

收稿日期: 2020-03-14; 修回日期: 2020-05-23

基金项目: 国家自然科学基金(39500114, 39970575, 31572639, U1706209, 31872588, 31702366); 国际科学基金(A/2786-1, A/2786-2); 科技部项目(02EFN216601213, 2008AA09Z403, SQ2009AA10XK1485694, 2011CB200904, 2011CB 200901, 2018TFE0107200); 中国科学院创新项目(KGXC2-YW-373-3, Y12510101L, Y12509101L, ZSTH-024)

[Foundation: This research was financial supported successively by National Natural Science Foundation of China, Nos. 39500114, 39970575, 31572639, U1706209, 31872588, 31702366; International Foundation of Sciences, Nos. A/2786-1, A/2786-2, Chinese Ministry of Science and Technology, Nos. 02EFN216601213, 2008AA09Z403, SQ2009AA10XK1485694, 2011CB200904, 2011CB 200901, 2018TFE0107200; Chinese Academy of Sciences, Nos. KGXC2-YW-373-3, Y12510101L, Y12509101L, ZSTH-024]

作者简介: 刘建国, 海洋生物学博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: jgliu@qdio.ac.cn

的限制屏障问题,与时俱进开展一系列基础理论探索、新技术开发、产业化推广应用与示范、新活性功效发掘等工作,完成了从基础科学理论到产业技术应用、由传统农业向工业化生产和商业开发的转变。本文借中国科学院海洋研究所建所 70 周年所庆成果专刊出版之际,围绕该藻资源开发与应用的环节,在种质资源、基于细胞周期构建与调控的串联培养模式与优化应用、大型光生物反应器培养设施创制、敌害生物危害与防治原理及策略、活性物质开发与新功能挖掘、产业体系构建和种子工程等方面,简要回顾我们的研究历程,梳理相关进展,总结经验教训,并对发展趋势予以展望。以期更好地促进红球藻及相关微藻产业的健康发展。

1 种质资源

1.1 物多样性与分布

红球藻种质资源是维持产业可持续发展的基础保障。我们长期关注该藻野生藻株采集、收集和菌株系培育,已获得国际上较齐全的红球藻种质资源。其中,已采集或收集到野生红球藻 40 余株^[1],占世界微藻种质库中保藏该藻野生株的 80%,分别原产于中国、澳大利亚、美国、加拿大、爱尔兰、英格兰、挪威、瑞典、芬兰、德国、瑞士、捷克、以色列、南非和津巴布韦。同时,我们利用紫外和化学诱变方法还获得了红球藻突变株十余个^[1-2,5]。

红球藻属世界性分布的寒温带物种,在自然界大水体中难以长期存在,一般只零星散布于因降雨临时形成的小水体中^[1-4]。如在近海或湖旁建筑屋檐或岩石上面的水洼内存在,偶尔发现在山涧瀑布(如我国四川旺苍县龙潭瀑布)周边地带的潮湿岩石上。仅存于小水体中的红球藻是如何突破地理隔离限制,不断扩散成世界性广布物种的,目前并不清楚。我们推测可能与水鸟栖息和不断迁徙有关,水鸟脚蹼携带红球藻细胞可助其扩散,至于扩散后的存活率取决于环境条件适宜度,是否如此尚待探究。

1.2 种质遗传保守性

我们对多株红球藻主要生产性状对比研究,发现不同藻株在细胞生长、繁殖速率、积累虾青素和对环境的适应能力存在一定差异,从中筛选出适宜的工程菌株系^[1,6-9]。优良工程藻种的筛选,不能仅仅限于实验室分析,还需结合产业化地区具体环境条件、季节与养殖模式等实际,经中试扩大论证等予以确

定^[1,9-11]。相对于其它微藻物种,红球藻藻株几乎都可大量积累虾青素,其虾青素异构体结构与组成也较相似,糖脂与蛋白等代谢变化规律大致一致,细胞类型和特征及繁殖方式并无明显差异。通过 *rbcL* 和 *ITS* 分析,发现不同野生藻株之间的遗传距离非常接近,甚至比某些突变株与其野生株之间的遗传距离还小。这也表明红球藻具有高度的保守性,全世界红球藻属于同一物种^[1-2]。该结果也意味着任何红球藻藻株都可合法地用于规模化培养,开展新资源食品开发与产品销售。

红球藻具有高度遗传稳定性和保守性的原因机制尚不清楚。我们推测至少可包括:该藻缺少有性生殖,主要行无性生殖和营养繁殖^[1,6-7],从而减少了遗传基因交流与多样性变化;同时可能与其大量累积虾青素有密切关系。虾青素具超强抗氧化活性,对紫外辐射的吸收能力和捕获自由基能力都很强。虾青素大量积累在细胞核周围,可有效降低遗传物质的损伤与突变,从而维持了其遗传稳定性^[1-3]。

2 基于细胞周期调控的串联培养模式与应用

2.1 细胞周期与繁殖方式

红球藻为单细胞绿藻,却有不同细胞类型、繁殖方式和复杂的细胞周期。以往国内外对此虽有许多报道,但认识并不详细全面,有些证据不充分,概念模糊甚至错误。

为突破该藻开发过程中存在的上述困局,建立连续培养体系,我们单独分离、培养和连续显微跟踪观察该藻各种类型的细胞,获得其生长发育与繁殖过程的详细信息,构绘出红球藻细胞周期^[1,3,6-7]。明确该藻主要存在游动细胞阶段和不动细胞阶段,具游动孢子、游动细胞、不动孢子和不动细胞 4 种类型,存在 3 类繁殖方式(包括出芽和 2 分裂方式的营养繁殖,及游动孢子与不动孢子的无性生殖)。红球藻主要以无性生殖方式增殖,而营养繁殖量相对较少^[1,3,6-7]。其中,①在游动细胞阶段,游动细胞可不经细胞壁增厚,直接转化成游动孢子囊进行孢子无性生殖,其孢子囊内一般可产生 2 个、有时 4 个、偶尔 8 个游动孢子。②在不动阶段,不动细胞经无性生殖产生不动孢子,由不动细胞转化成的孢子囊内一般含 2 或 4 个不动孢子,有时为 8 个、偶尔更多甚至超过 30 多个。③应对逆境胁迫时,游动细胞失去鞭

毛和运动能力,细胞壁不断增厚并转化为不动细胞,而囊内的游动孢子可直接转化为不动孢子。④在适宜的生长条件下,不动细胞萌动膨大,经过孢子囊产生游动孢子,随后孢子囊膨大,在一端形成凸起并最终破裂,快速释放出游动孢子,该方式产生的游动孢子通常为 8 或 16 个,有时更多,但游动孢子数一般为 2 的偶数倍,偶尔产生的游动孢子也可能为奇数个。不动孢子释放离开孢子囊后即成为新的不动细胞,从而实现不动细胞向游动细胞阶段的转化^[1, 6-7]。进而继续按上述方式①不断增殖。⑤尽管百年前就有红球藻类似衣藻的有性生殖报道,到目前为止还缺乏有效的直接支持证据^[6]。

我们注意到游动阶段和不动阶段的红球藻细胞在繁殖方式、生长速率和虾青素积累能力上存在明显差异。相对而言,游动细胞生长与繁殖速率快,但几乎不累积虾青素;而不动阶段细胞大量积累虾青素,但其生长与繁殖速率较低。在实际生产中,传统简单的培养模式不可能兼顾细胞的快速生长、有效转化与虾青素大量积累,需要创建新的培养模式。

2.2 基于细胞周期的二步串联培养模式

在明确细胞周期基础上,我们依据不同类型的细胞特点,于 20 世纪 90 年代中期倡导二步串联培养红球藻^[1-3, 6-7],分别有针对性地促进细胞生长或诱导其细胞转化,最终提高虾青素产量。具体讲,第一步优化培养参数,让该藻细胞处于游动阶段进行快速繁殖,先获取充足的生物量;第二步改变培养参数,创建逆境胁迫并诱导游动细胞转化为不动细胞,进而调控培养参数使不动细胞大量合成虾青素^[1-3, 6]。目前该二步串联培养模式为红球藻资源开发成功的关键技术,也是国内外普遍采纳的微藻资源开发的经典方法,适用于产油、产氢等微藻能源开发,也适用于以积累次级代谢物质为主的微藻资源开发^[1-2],如利用微藻生产多不饱和脂肪酸、类胡萝卜素等高附加值活性物质。

2.3 细胞周期调控及应用

通过改变内外因子可对红球藻细胞周期予以精准调控。对培养参数的优化与控制程度,常常决定着该藻规模化生产效率高低与成败。

2.3.1 信号物质及其调节机制

我们在 20 世纪末发现:该藻细胞能产生并向藻液中释放某些不明有机物质,这些有机物质对藻细胞产生很强的反馈抑制性调节^[10]。通常培养体系的

细胞密度越高、或培养时间越长(≥ 2 周),藻细胞所释放的反馈抑制物质就越多^[10]。抑制物质一般在游动细胞中产生,当游动细胞转化为不动细胞后,就不再释放抑制物质。我们还证实:该抑制物质对不同类型的藻细胞产生的反馈调节效果也不一样,抑制物质对游动细胞生长产生明显抑制,并诱导游动细胞向不动细胞转化;抑制物质对不动细胞的细胞分裂也产生显著抑制作用,但通常只对其细胞质分裂产生影响,而对 DNA 复制没有抑制作用,因此不动细胞内的 DNA 可不断地复制^[1, 10],在细胞内可储备多套染色体 DNA。当遇降雨或重新接种培养时,抑制物质被稀释,从而有效降低或解除对不动细胞的抑制作用,不动细胞内尚未完成的细胞质分裂可快速启动,短期内形成多个游动孢子,随后孢子囊体积膨胀向外凸起,最后释放出大量新个体并占据小水体生态空间^[1, 10]。

在红球藻培养后期,尤其高密度培养过程中,游动细胞产生抑制物质,反馈调控细胞周期,这本身是该藻对环境变化的适应举措,在资源规模开发中也意味着培养藻后的水体难以直接重复利用,需构建新的废水处理回用方法和装置。否则生物产量和虾青素产率都将大幅降低。

我们研究还证实,不同红球藻藻株细胞周期的不同阶段,细胞生长和虾青素积累还受到各类植物激素的调控^[11]。在综合 4 株藻株实验结果并参考各激素市场价格基础上,我们认为在规模化生产中采用 1.75 mg/L 的萘乙酸和 4 mg/L 的 3-吲哚乙酸可显著提高整体培养效果^[11]。

2.3.2 环境因子调控与优化应用

红球藻细胞周期还明显受营养盐、CO₂、干旱、盐度和光温等多种外因调节。

氮营养:富氮有利于红球藻处于游动细胞阶段,游动细胞具鞭毛、能运动、富含叶绿素、生长与繁殖速率快,但虾青素及类胡萝卜素含量较低;相反,氮亏缺有利于红球藻游动细胞转变为不动细胞,其细胞生长与繁殖速率下降、细胞壁开始增厚、虾青素和胡萝卜素含量逐渐增加,而叶绿素含量却减少^[1, 12-13]。

我们注意到藻液中不同无机氮之间可相互转化,实际总氮量也在不断变化;但无论实验开始的总氮浓度高或低,藻液中实际总氮浓度对红球藻细胞周期发挥着重要的调控作用,其中 50 μmol 总氮是调控红球藻细胞周期的关键氮浓度。当实际总氮浓度高于该值时,藻细胞主要处于游动状态;而当藻液

中实际总氮浓度从下降到 50 μmol 甚至更低时,红球藻从游动细胞转向不动细胞;相反,当藻液中实际总氮提高到 50 μmol 以上时,该藻从不动细胞转向游动细胞^[1, 12]。

磷营养: 磷对红球藻细胞周期也有一定程度的调控作用,其趋势与氮营养的调控大致类似,但却没有氮调控直接和明显^[1, 7, 12-13]。需要必要指出,磷对藻细胞周期的调控有时并非直接作用结果,而是通过影响藻细胞生长和氮吸收而影响藻液总氮量产生变化,间接地对该藻细胞周期产生调控影响。如在高磷富氮情况下,红球藻游动细胞转化为不动细胞并积累虾青素,极易被误认为属于高磷的直接作用结果,实际上高磷富氮使藻细胞快速生长繁殖,氮营养被迅速吸收利用而大幅下降,从而产生代谢性氮亏缺,后者再导致虾青素大量积累^[1, 13]。类似假象也可能出现在其他营养元素对藻细胞周期和虾青素积累的调控中,因此需要特别关注认真甄别。

碳源: CO_2 是红球藻生长和虾青素积累的重要碳源并调节藻液 pH 值。以往受培养条件限制,对 CO_2 调控红球藻细胞周期的认知不足,多采用间歇继代静止培养该藻,培养藻液中 CO_2 严重不足, pH 值随培养天数延长和光暗日变化呈持续波浪式上升,无机碳供给逐渐转向 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} , 到培养后期 pH 值甚至升到 10 以上。在无机碳源(尤其 CO_2)缺乏时,红球藻生长很慢,游动细胞极易转化为不动细胞,生物密度只仅维持 10 万/mL 以下^[14]。

20 世纪 90 年代末,我们尝试通气(尤其加富 CO_2)培养红球藻游动细胞,确定有效供给无机碳的藻液 pH 值相对稳定,游动细胞转为不动细胞的比率大幅降低,细胞连续繁殖的代数明显增加、生长速率显著加快,细胞密度和生物量都大幅提升;在不动细胞阶段,增加 CO_2 也可有效提高生物量和虾青素含量。过多的 CO_2 会导致成本增加和碳源浪费,并造成藻液 pH 值迅速下降,从而影响细胞的正常生长与代谢。目前不断提供 CO_2 避免 pH 值忽上忽下波动已成为红球藻资源开发的重要手段,一般而言以维持藻液 pH 值在 7.0 左右为宜。

除 CO_2 外,近年来添加有机碳(如醋酸根、柠檬酸根、单糖等)有机物质,异养或兼养方法培养红球藻,在严格实验条件下可促进细胞生长并加快虾青素积累^[1, 15-17]。其中,以醋酸钠效果相对较好。在规模化生产中,直接添加有机碳源也极易引发细菌和原生动物等生物的快速繁殖,造成严重生物污染等

问题,从而影响生物产量和产品质量^[1]。结合二步串联培养模式分开进行,在第一步在严格控制污染的反应器内添加有机碳加快细胞生长,待其充分吸收消耗后,再进行第二步虾青素诱导。异养培养的红球藻积累虾青素需光诱导,光线弱虾青素积累不足,光过强则极易发生光损伤。我们通过系列生理生化、转录和代谢组学研究^[1, 18-22],发现有机小分子还参与各类代谢。与水互溶的有机小分子甘油,经细胞快速吸收后可促进藻的生长,并转化进入虾青素合成的中间代谢,加快虾青素积累,并具有抗强光抑制、避免光损伤的作用^[1, 16]。

干出与渗透胁迫: 红球藻细胞周期明显受到干出/复水与渗透胁迫的调节。在自然条件下,随水分的不断蒸发甚至干出,渗透胁迫逐渐增加,其游动细胞也转化为不动细胞,细胞壁不断增厚并大量积累虾青素^[1, 3-4]。相反,降雨使之复水,渗透胁迫迅速解除,红球藻不动细胞再通过无性生殖方式,快速形成并释放游动孢子,实现不动细胞向游动细胞的转化^[1, 3-4]。

在规模化培养中,采用干出或渗透胁迫调控红球藻细胞周期很难达到高产目的。虽然存在高盐胁迫(渗透+盐害胁迫)诱导该藻游动细胞向不动细胞转化、提高虾青素产量之说,甚至有宣称实现海水培养红球藻的报道。但是,我们的研究结果并不能予以支持。推测上述报道可能将 1837 年命名的 *Haematococcus*(实际上应为杜氏盐藻)混淆为红球藻,但也不排除有意误导的可能性。红球藻作为淡水藻本身的抗盐能力差,并不能在海水中生长繁殖。而人工添加盐,也极易引起游动细胞活性下降,甚至导致原生质体破裂死亡,难以达到高产效果。这与诱导游动细胞有效转化为不动细胞,使之大量积累虾青素是完全不同的。

光照与温度: 规模培养红球藻目前主要依赖于自然光温资源,其变化具明显季节性和昼夜节律性,二者常耦合产生协同作用。大量实验已表明光照(光强、光质和光周期)和温度对红球藻细胞生长繁殖速率、虾青素积累量具有重要影响^[1, 8, 25-26]。

仅就温度而言,有利于红球藻游动细胞生长和繁殖的适宜温度在 15~25 $^{\circ}\text{C}$ 。超过 28 $^{\circ}\text{C}$ 时,游动细胞趋向于转化为不动细胞并积累虾青素。温度降到 15 $^{\circ}\text{C}$ 以下,细胞生长与繁殖减缓,生产周期延长,其细胞内积累的虾青素量并不一定减少,相反可能还增加,过低的温度尤其冬季温差较大时,藻细胞体

积一般较小,有时甚至出现大量小的游动细胞,导致采收困难^[1, 3-4, 6]。

光照:光照(包括光强、光质和光周期)对红球藻细胞生长的影响较复杂。一般而言,弱光和短日照条件下,细胞所接受的总光辐射量不足,光合作用下降,只有很少的游动细胞无性繁殖,整体繁殖速率较慢,虾青素累积的少^[1, 3-4, 6]。相反,在其他因素满足情况下,充足光照和长日照更有利于细胞光合、生长繁殖与虾青素积累。光照充足时,细胞分裂产生的游动细胞较多,大量的游动细胞通过无性生殖产生新个体,一般游动细胞每次可产生2个游动细胞,有的还可产生4个、偶尔甚至产生8个游动细胞^[1, 3-4, 8]。但是,光照过高也极易造成强光损伤,甚至导致细胞光漂白死亡。不同类型藻细胞对强光耐受能力存在很大差异,不动细胞尤其大量积累虾青素的不动细胞对强光的耐受能力较强,相反游动细胞耐受强光的能力相对偏弱^[1, 3-4, 8]。红球藻细胞转变与虾青素积累对避免光损伤都有一定的调节作用^[1, 3-4, 6, 15, 20, 26],该过程涉及光合作用的能量吸收与耗散,而且多条呼吸途径、糖代谢和脂类代谢等复杂的代谢调节也积极参与^[20, 27-30],共同应对强光胁迫。

我们注意到以往按到达藻液表面的光辐射量论培养光照强弱是不严谨的,极易导致误判。应综合考虑受光面积、藻液厚度(或光径)、细胞密度、细胞循环穿梭频率等多因素的复杂影响,以每个细胞实际获得的光量子数计算更科学准确^[30]。

细胞对光的协同适应与竞争策略:在高密度培养中,我们发现当细胞平均获得的光照相对不足(弱光)时,细胞会出现2种截然不同的适应策略与调节机制。随着细胞生长和密度增加,每个细胞获得光量子几率逐渐下降而出现光不足,当细胞每秒接受 $3.6 \times 10^9 \sim 4.8 \times 10^9$ 光量子时,群体内细胞更倾向于采取协同适应策略,即通过减少细胞体积和表面积、降低叶绿素含量,使群体内各细胞都能获得维持存活的基本光能,最大程度地保持群体的稳定性。但是,随着细胞进一步生长和密度增加,光遮蔽作用加剧,细胞处于极度缺光状态,当接近维持其生存最低光能(细胞每秒接受的光量子在 $2.4 \times 10^9 \sim 3.6 \times 10^9$)时,体系内细胞放弃协同适应策略,而转向完全相反的竞争策略。表现为细胞体积和比表面积开始增大、叶绿素合成增加,以便于争取获得自身生存所需的光线。因此各细胞间竞争加剧,打破了群体所保持的原有稳定性,造成平衡体系破坏甚至崩溃。我们推测

上述藻细胞之间的协同适应与争夺竞争策略,不仅共存于红球藻群体的光调节,也可能发生在其他微藻高密度培养体系中,值得深入研究。

光温调节的产业化应用:国内外红球藻产业化蜕变期发生于世纪之交。期间,我们在山东寿光通过产业化小试和中试论证,系统地评估各类技术的产业化应用可行性,并结合水温变化和历年气候资料,对该藻规模化培养的认知获得了提升^[31]。依据国内外各地区气候资料,汇总其温度、日辐射、降雨等自然资源信息,推测在我国最适宜开展红球藻资源开发的地区位于云南^[31]。该地区高海拔、光照辐射强、年适温培养季节最长,随后将该藻资源开发转向云南^[31]。最终在楚雄开展产业论证。目前红球藻资源开发在云南已成功实现产业化,形成具有高原特色的民族新品牌,并纳入省级战略性新兴产业予以培育扶持,云南成为我国红球藻资源规模开发企业最聚集和最成功的地区,所生产的红球藻虾青素产量占国际市场份额的3~4成。

同时,我们还对世界范围内开发红球藻资源最有潜力的地区进行了预测,列出具体位置及相关气候信息^[31],其中包括:欧洲的葡萄牙西部沿海、西班牙的西北与东北沿海地区,北美的美国西部加州沿岸,南美的西海岸智利和秘鲁、东海岸的乌拉圭沿海和巴西南部地区,澳洲的新西兰和澳大利亚西南部,非洲的南非中南部。从光温自然条件讲,上述地区都非常适宜于红球藻虾青素资源开发。相对而言,最好地区在南、北美洲和非洲的所列的国家地区,其次为欧洲的上述国家地区^[31]。如有廉价自然冷却条件(如深海低温冷海水),采用热交换控制温度在适宜红球藻生长的范围内,在环赤道附近光线充足、自然温度较高且年温差变化较小的岛屿,开展红球藻资源开发也将是很好的选择^[31]。事实上,目前国际上成功开发红球藻资源的产业基地,几乎全部汇集在上述预测地区之内。

光温控制在产业化应用上,已从最初完全依靠自然光温变化培养红球藻,转到有意识选择光照更充沛、温度更适宜的地域开展规模化培养,进而更主动地实施覆盖温室改变藻液的温度波动规律,并走向人工调节培养温度和增加光照的培养模式。不同培养模式的转变,也是从靠天吃饭的传统农业模式,向更精细可控的工业化模式过渡。建立可全自动化人工控制光/温/气体和营养盐,构建基于大型光生物反应器装置的植物细胞阳光工厂,更高效地规模开

发红球藻等微藻资源已成为业内总体发展趋势。

3 大型光生物反应器的构建与运营

从实验室小体积培养红球藻, 转向大规模商业化生产, 保持培养体系长期稳定面临诸多挑战, 其中包括构建适宜的大型培养装置及其支撑系统。

3.1 改进开放式跑道池

传统开放跑道池光生物反应器以水泥或塑料材质构建, 池壁表面凹凸不平, 存在微小却大量的死角, 加之培养体系整体暴露, 不可避免地存在源自大气尘埃和昆虫等的污染, 而极易导致规模化培养失败; 从开放水泥或塑料池壁渗出的重金属和微塑料, 被藻细胞所吸附, 导致产品质量难以符合国家规定要求。

为此, 我们对传统跑道池进行改进, 构建了全不锈钢质的规模培养池, 避免了重金属和微塑料颗粒等杂质污染, 其光滑表面也更利于搅拌和清洗管理。在此基础上, 将培养池改建到温室大棚内, 实现从全开放到半封闭培养的过渡, 降低了灰尘和敌害生物污染, 一定程度上提高了产品质量。温室大棚对光温参数还产生调控效应, 增加了全年培养期, 在低温冬季和多雨夏季的增产效果尤其明显。

3.2 大封闭式光生物反应器的构建

如同发酵罐在工业微生物产业发展中发挥着重要支撑作用一样, 大型封闭式光生物反应器是微藻产业的关键支撑装备, 决定着微藻资源开发成败。世纪初封闭光生物反应器多为小型实验设备^[1], 体积只有升级规模, 即使放大论证的平板、柱状和管道光生物反应器也在百升之内。缺乏微藻资源产业化所需的吨级、几十吨级规模化大型装置^[1, 32]。

红球藻等微藻属光自养生物, 其细胞生长需要光线, 而虾青素积累还需强光。这也决定了构建培养微藻的封闭式大型光生物反应器必需高透光材料^[1, 32-33]。高透光材料(如玻璃、有机玻璃、塑料等)通常不耐高温也不耐高压, 难以高温高压消毒灭菌, 也不能通过增加高度进行规模扩大。而单纯增粗进行放大, 难免引起其比表面积大幅下降, 限制了光线进入光反应器内, 制约微藻光合生长^[1, 32-33]。

3.2.1 研制大型平行管道光生物反应

延长管道可增加光生物反应器体积并保持其比表面积不降低, 但管道长度超过百米后, 气体交换率却快速下降, 光合释放 O₂ 难以有效解析, CO₂ 补偿

不足。世纪初我们采用平型设计和并联思路, 几乎与以色列同期突破了管道总长度限制, 成功构建出大型封闭式管道光生物反应器, 将体积从升级放大到吨甚至几十吨级。也解决了放大过程中出现的气体交换难的问题, 可有效补偿消耗的 CO₂、解析氧气, 避免了高溶氧引发的氧化损伤^[1, 32-33]。装置主要包括: 透明管道并联组、气体解析装置、附属管道系统、藻液驱动装置、培养参数感受和控制单元等。

透明管道并联组: 将透明管道串联再平行紧密排列, 二端并联为平行管道并联组, 可保障管道总长度和体积均等增加, 并维持其比表面积不变。透明管道适当增粗可增加藻液培养体积, 提升细胞相互遮蔽, 减少光损伤。相反, 选细直径的透明管道可提高光照强度^[1, 33]。

气体外交换: 将 V 型底气体解析装置扩大到千升, 增过滤压缩气体管道、倒“U”型开口的气体解析管道、上料和卸料管道; 卸料管道开口内设于 V 型底, 以便于卸料。将气体解析装置与平行管道并联组相连, 形成整体封闭循环^[33-34]。在气体解析装置底部、及其与透明管道的连接部, 分设过滤压缩空气和 CO₂ 管道入口。压缩空气逆流进入气体解析装置, 与藻液充分混合搅拌, 以解析藻液中的溶解氧, 避免氧化损伤; 而 CO₂ 气体随藻液流入透明管道内, 在管道内流动过程中充分溶入藻液, 补充藻细胞光合所消耗的 CO₂^[33-34]。

机械驱动装置: 在气体解析装置下设驱动泵, 提供动力使藻液在光生物反应器内循环流动, 细胞之间往复穿梭达到相互遮光, 降低强光损伤^[1, 33-34]。

其他硬件: 依据需要增设培养参数检测与控制的温度传感器、pH 传感器、维持温度的加热或降温装置、酸或碱加样装置、CO₂ 控制开关等, 通过传感器将 pH、温度变化信号上传到控制系统, 再通过计算机实现对培养参数的自动检测与控制^[1, 33]。

管道软连接: 管道有效连接是构建大型光生物反应器的重要技术。以往全靠法兰连接, 空间利用度低、体积大、管道间距远、费用高而限制着光生物反应器规模扩大; 温度升降变化引起管道热胀冷缩, 极易导致透明管道相互挤压或拉缩, 导致破裂和发生漏液。我们采用弹性硅胶软连接, 利用卡箍固定和螺丝调节松紧度, 有效克服传统法兰连接的弊端, 整体效率成倍提升^[33]。

在光生物反应器运营中, 因泵压和液压导致硅胶软连接处膨胀, 该膨大空间常成为培养死角区,

藻体易沉积,导致培养效率下降,也形成安全隐患,还增大了光生物反应器的后续清洗难度和利用成本。为此,我们外增刚性固定外壳,罩在软连接硅胶外面,有效减少软连接硅胶的膨胀,提高了密封效果并增大了紧固卡箍的受力面,减少了管道破损率,一举多得^[33]。

管道自动化清洗:管道中央藻液流速快,而离管壁越近流速越慢,紧靠管壁处的流速为接近零的静水死角区,大型管道光生物反应器表面积大,加之管道还存在大量拐角与连接,使藻液不能充分流动和混匀,该处藻细胞颗粒极易沉降积累。另外红球藻作为光自养生物兼具趋光性、避光性、贴壁生长等自然特性,在培养过程中不可避免地发生细胞附着贴壁现象^[34-35]。

细胞贴壁使培养效率下降甚至导致失败,其原因在于:细胞贴壁后造成管道表面粗糙,增加了流体阻力,降低藻液流速,也扩大了死角区,使细胞更易贴壁而形成恶性循环;细胞贴壁后的藻斑或层产生隔光效应,降低管道的透光率,而使内部藻细胞光合效率下降;贴近管道的贴壁细胞始终处于强光照射,极易因光损伤而死亡和藻体腐烂,诱发生物污染并影响产品质量。

为此除适当增加流速外,我们创建了一种基于磁性球体的自动清洗技术^[34-35]。在动力驱动或人工调节下,磁性球体随藻液进入管道,定向移动中不断地与管道内壁发生轻微摩擦,将贴壁的藻细胞蹭入藻液中,实现管道自动清洗而维持其高透光性。磁性球体自动清洗技术不仅有效去除附着的贴壁藻细胞,保障了光生物反应器的通透性,而且也降低生物污染,可大幅提高光生物反应器利用率,也节省了管道清洗、拆分与组装所发生的人工费与时间成本^[34-35]。

上述封闭式大型管道光生物反应器可作为独立单元运行,也可将多个单元通过管道系统并联成并联组进行统一运行管理^[33]。再借助自动检测与计算机控制对光生物反应器并联单元组进行自动化过程控制。实现微藻资源开发从典型农业(水产)过渡到工业化生产模式,为微藻细胞工厂提供了硬件支撑,非常适于生长较慢、积累虾青素等次生活性物质的微藻资源开发。

产业应用数据显示上述大型管道光生物反应器培养的红球藻产率高,可大幅提高虾青素积累量。在云南以开放培养池培养的红球藻年均虾青素含量在

2.0%左右,高时达3.0%~3.5%。相同地区自然环境条件下,以管道光生物反应器培养的产品虾青素含量更高,全年维持在3.0%~4.0%,有时在5.0%左右,某些批次甚至达到6.0%以上。

3.2.2 柱状光生物反应器组的重建

相对于管道光生物反应器构建的高成本投入,以透明塑料制作的柱状光生物反应器则更简单、灵活,能大幅度地减少投资,适宜于红球藻资源开发的第一步培养,也适用于饵料等单纯培养获得总生物量的规模化生产。传统的封闭塑料袋光生物反应器,在底部存在大量皱折死角区,导致藻液不能充分搅拌流动、消毒不完全、营养分布不均、气体交换不畅。死角区的细胞逐渐沉积贴壁甚至死亡,而滋生微生物等生物污染,大幅降低培养效率。传统柱状光生物反应器也不稳定,常发生侧向倾斜或倒伏。另外,藻液卸料也不顺畅,卸料管口连接处易渗漏。上述系列缺陷,降低了柱状光生物反应器的开发应用。

我们对上述简易柱状光生物进行了重构改造,制作“V”型底柱状袋、增加中央“V”型凹陷固定底座、构建多功能管道上卸料系统等。不仅可增加固定支撑和稳定性能,降低死角区,减少了细胞贴壁生长,而且可提高气体交换和搅拌效率,更有效保障体系内部培养液充分彻底的消毒,使营养分布和藻细胞分布均匀一致,能够克服传统柱状光生物反应器的诸多固有缺陷。

我们将4个柱状光生物反应器单元交叉排列,借助开关系统将其并联成单元组,各单元相互独立。同时借助重力和虹吸作用,对卸料采收和补料过程调节控制,实现半连续多批次培养^[36]。以培养红球藻为例,以往每次接种只能培养1~2次,现在提高到4次,某些季节达到5~6次。大幅度减少消毒接种次数和用时,细胞培养效率整体提升300%以上。

上述柱状光生物反应器单元组,进一步并联扩大到数十甚至上百个,形成光生物反应器一体化管理单元组。在标准化温室大棚内,按区域排列、统一检测控制和标准化管理^[36]。可大幅减少日常管理用工和劳动强度,提高整体培养效率,降低生产成本,为该藻规模化开发红球藻虾青素资源提供优良藻种。

3.2.3 其他光生物反应器

平板光生物反应器:我们分别以玻璃和透明塑料薄膜为材质,构建平板光生物反应器并尝试规模放大。发现在实验室和小规模论证中生产效率较高,但受材质性质影响一般高度只能到1米(藻液实际高

度0.9米),继续增加高度则易引起变性甚至破裂,而延长平板光反应器长度也容易导致中部向外凸出变性甚至破裂,因此限制了平板光生物反应器的培养体积扩大^[42]。

玻璃破裂不仅造成平板光生物反应器损坏和藻液流失,对操作人员还潜在一定的安全隐患,加之后续操作管理较繁杂、费时费力,我们认为平板玻璃光生物反应器并不适宜于红球藻及其他微藻规模化资源开发^[42]。塑料材质的平板光生物反应器,也存在类似的上述问题。

生物幕光生物反应器:为最大程度地增加藻细胞受光与虾青素积累,减少轮虫等动物摄食,我们还创建了一种生物幕反应器^[31]。在温室棚内,将藻细胞均匀喷涂到基质上,形成藻细胞薄层,并借助高压雾化技术调节空气湿度,保持红球藻细胞活性,使其快速积累虾青素。同期以管道光生物反应器培养的红球藻虾青素含量0.5%~1.0%,培养周期15~20天,而利用生物幕培养的虾青素含量可增加到5.0%~6.0%,周期仅用10天。但很遗憾受气候变化影响,棚外大风会导致覆盖温室的薄膜随风上下颤动,间接导致棚内的气压不断地出现升降变化,由此造成生物幕也发生摆动。生物幕越长、面积越大,其摆幅也就越大。当生物幕长度超过4~5米时,藻细胞从生物幕上大量脱落,而降低生产效率^[31]。

因此,有必要对生物幕生物反应器进行改造,研制规范化标准模块,探讨自动化管理模式,深入分析应用于微藻资源开发的可行性。我们推测:该技术将特别适宜于潮湿环境中具有较强活力的气生丝状微藻(如积累高附加值活性物质的橘色藻)的资源开发。

此外,在利用生物幕反应器培养红球藻过程中,我们还发现该藻产生抑制霉菌生长的物质,但具体机制和抑制物质尚不清楚,也值得进一步关注^[31]。

3.3 附属支撑系统

附属支撑系统是红球藻细胞工厂的重要组成部分,对整个光生物反应器系统运营发挥至关重要的衔接和支撑作用^[37]。附属支撑系统包括:气体过滤装置与输送管道、CO₂供给管道系统、培养液配制和过滤与供给管道系统、藻种接种和上料管道与藻液卸料管道系统、消毒管道和清洗管道及废液管道系统、热调换与温度控制系统、照明与动力供给系统等。上述各系统都是红球藻资源开发不可或缺的重要组成部分,对维持光生物反应器系统正常运转发

挥重要支撑作用。在实际构建中需总体规划布局,彼此兼顾相互配套,在具体细节上也要相互串通融合,尽可能减少投资成本和操作步骤,实现全程封闭性运营管理^[37]。

综上所述,我们在山东完成小试与中试基础上,到云南继续开展中试放大和产业化应用。经多年反复实践不断摸索和技术改造,逐步形成基于光生物反应器及其支撑系统,利用荒山/丘陵非耕地资源,借助重力作用和虹吸原理^[38],依据山势因地制宜、灵活搭配的开发模式,成功地摸索出适宜于红球藻虾青素资源二步串联培养开发的系列配套技术^[1, 38],率先构建了红球藻虾青素产业化开发基地,实现了从0到1的整体跨越,孕育出具有鲜明高原特色的我国微藻植物细胞工厂,为整个微藻产业全程发展提供了借鉴新模式^[1, 38]。

据目前初步统计,仅在我国红球藻虾青素产业中,已实际应用的改进型半封闭开放跑道池光生物反应器有数十个,研制了大型平行管道光生物反应器数千台,组建了柱状光生物反应器单元上万个,玻璃管道的总长度超过3000公里,支撑着我国红球藻虾青素的全年生产。也使我国与美国(含日本和瑞典在美公司)和以色列一起,并列为世界上最早和最主要的天然虾青素原料生产国,为国际市场提供30%~40%的天然虾青素资源。

4 生物污染与防控原理策略

4.1 生物污染

室内小规模红球藻培养中敌害生物污染并不严重,但在规模化生产过程中,各类敌害生物污染不断发生,且随着培养体积扩大该问题也越来越严重,并成为制约产业发展的瓶颈^[1]。生物污染为红球藻在传统开放跑道池中难以成功培养的主要原因,污染导致产量和质量下降,重则导致培养失败甚至颗粒无收。不仅如此,如不能有效清除污染生物及其休眠卵等,还会成为后续培养的污染源,反复危害微藻培养体系。不仅在红球藻培养中如此,在生长较快的其他微藻(如能源微藻和饵料微藻等)规模化培养中,生物污染同样导致减产甚至失败,是整个微藻产业发展的最主要制约屏障^[1]。近几年,已引起国内外微藻行业高度关注,也是目前研究前沿热点,2016、2017和2019年美国能源部和我国科技部先后立项启动生物污染的防治研究。

在红球藻大规模培养过程中的潜在污染生物种

类很多。包括轮虫、纤毛虫、阿米巴等摄食藻细胞的敌害生物,某些种类甚至还产生信号性化学物质,抑制细胞生长;还有某些繁殖速率快的小球藻、栅藻和硅藻等微藻,它们与红球藻竞争营养和光线等,不仅影响产量与质量,甚至成为优势种类完全替代所培养的红球藻;另外,其他微生物污染使细胞凝聚成团和沉底,甚至导致藻细胞溶解、破裂和死亡^[1]。

在红球藻培养规模放大过程中的污染源及入侵途径多种多样,污染可能来自于气源、水源、肥料、以及光生物反应器和管道支撑系统内部、甚至藻种和人工操作等途径,我们长期受此困扰。为此,围绕污染生物“防与治”开展了系列工作,在失败中不断总结教训积累经验,逐步形成一套以防御为主、治理为辅的生物污染总体防御体系和防控策略^[1, 36]。

4.2 防御体系和防控策略

4.2.1 厂址选择与布局

厂址选择是开展红球藻规模生产的第一步,需综合考量众多人文社会和自然环境因素。就自然环境而言,应选择阳光充沛的适温度地区,以相对干燥、净洁的、空气清新、无粉尘,而偏离人群密集和交通少的地带最佳。若稍有坡度非耕荒山和丘陵土地资源,可依据山势构建培养基地将更好^[1, 38]。从最高向低洼处,依次建储水池、水处理和营养液配制车间、藻种室、扩种室、培养车间、气体处理和供气室、虾青素积累区、收集与加工区,在最低洼处分别建废水回收池、供电室和深水井等。

净洁的地下深井水直接泵到山顶,处理后用于配制培养液和接种,然后借助自然重力和虹吸作用,从上向下在不同车间和光生物反应器内依次流动和扩大培养,可减少交叉污染,可最大程度保障藻种的纯洁,避免下一级培养对上一级藻种造成污染,也最大程度地杜绝了废液和雨水等对培养藻液的污染。利用土壤层的缓慢渗透与自然沉降过滤作用,对废水进行净化处理,并回补地下水消耗^[1, 38]。另外,加强中间培养环节的巡视和抽样检查,在过程管理控制中若发现生物污染,果断处理消除隐患,避免后续交叉污染。

4.2.2 改进全开放跑道池

放弃水泥或塑料材质,利用全不锈钢质结构提升池壁光滑度,降低死角区,也易于消毒和清洗,降低潜在生物、重金属及塑料污染^[1]。同时,将传统跑道池用膜覆盖,使之成为半封闭式室内培养池,减少

来自于降雨、灰尘、飞鸟昆虫等污染。

4.2.3 其他

利用管道系统将各光生物反应器密闭连接,杜绝外源性污染生物入侵^[1]。同时增加相关设施,对水气和肥料及管道超微过滤或理化消毒等预处理,充分降低外源污染。配置各类气液专属管道系统,对其定期消毒、自动清洗等保养管理,杀灭系统内滋生污染生物。在整个培养与管理过程中,严格按照无菌操作要求,进行藻种转种和扩大培养,防止藻种污染^[1]。

4.3 治理措施

在藻细胞培养过程中,易出现的轮虫、棘尾虫、纤毛虫等多种污染生物都有很强的捕食和繁殖能力,大多还产生抑制红球藻细胞生长的化敏性物质^[39]。其抗逆能力比红球藻细胞还强,传统的酸碱度调节、消毒和药物处理大多为广谱性,在杀死或清除污染生物的同时,也对藻细胞生长产生不利影响,甚至有时未抑制污染生物,却杀死了脆弱的藻细胞。

我们从藻类和敌害生物特征差异入手寻找突破,筛选对污染生物有选择性绞杀作用的生态方法,以防患于未然。经实验选出多种对轮虫和棘尾虫具有专一性抑制或杀死作用的植物源有机物^[40-44]。该有机物质用药剂量少,仅为ppm甚至ppb级,对藻生长几乎无负面影响,对人安全且可迅速降解^[40-44]。我们还对功效强的植物源有机物进行配伍搭配,从中寻找到具有协同增益效应的使用方法,进一步降低用药量。经小试规模对比论证,该方法比传统技术的应用效果好和效益高。其抑制污染生物的作用机理,主要通过抑制敌害生物的味觉感受器,引起拒食反应,并作用于中肠膜系统,严重破坏其中肠细胞结构,降低胃蛋白酶等消化酶系的催化活性,影响敌害生物的消化吸收功能,最终导致其生长发育迟滞甚至崩解与死亡^[45]。另外,我们还发现某些植物源有机物质,还可促进藻细胞光合作用与生长^[44]。目前该技术尚处于研发阶段,扩大论证和应用评估及审批将是未来工作方向。

5 后加工处理、新制品开发与新功能挖掘

5.1 细胞破壁处理

相对于红球藻原料生产环节需系列创新突破,虾青素提取加工多采用相对成熟的传统原理技术,更多针对红球藻特点进行参数定向优化和修正。随

着红球藻不动细胞积累虾青素,其细胞壁不断增厚,最终形成有3层结构的坚硬外壁,可对细胞及胞内虾青素本身产生很好的保护作用,但却不利于后续加工和虾青素提取,也影响着动物的消化吸收及利用率。

我们以干物料藻粉和湿物料藻泥,先后尝试了机械粉碎、冻融、超声波、胶体磨等多种方法,发现均存在明显缺陷,或用时长或温度高或粉碎效果不佳或不能有效保护生物活性成分等等。为此,我们从低温快速破壁方向寻求突破^[1, 46],探索高压均质和超高速气体粉碎技术。

高压均质破壁:我们以鲜藻泥为物料,采用高压均质技术,先施以超高压积聚到超高能量,再让其通过限流窄缝后瞬间失压力到常压状态,造成厚壁细胞内部高能释放引起空穴爆炸而强烈膨胀,借助撞击效应、剪切效应和空穴效应联合作用,使其产生强烈粉碎细化,可获得了较好的破壁效果^[1, 46]。藻细胞能在1~2秒内迅速破碎,形成颗粒大小不等的颗粒材料,包括1~2 μm粒径的微米颗粒、100 nm~1.0 μm的亚微米颗粒、以及100 nm以下的纳米级颗粒。

相对于颗粒较大的植物花粉破壁需相对较低的压力,红球藻细胞颗粒更小,其细胞破壁更难,所需的压力也更高。由于红球藻伴随着积累虾青素其细胞壁不断增厚,形成有3层结构的坚硬外壁,只有当压力提升到800大气压甚至更高时才能获得良好的破壁效果。而利用管道光生物反应器二步串联培养的红球藻,可积累更多的虾青素,其细胞破壁也更难,高压均质所需的压力甚至高达1200大气压^[1]。

高压均质的优点在于:破壁为物理过程,很好地保持了原料的天然性,在释压过程中也是大量吸热过程,物料瞬间温度相对较低。尽管如此,加压和物料颗粒相互高速碰撞的产热也会导致物料温度瞬间升高,我们在确保湿物料的流动性前提下,对鲜藻泥适当降温预处理,以保护其生物活性成分虾青素^[1, 46]。

超音速气流超微粉碎:针对干藻粉物料,我们采用超声速气流超微粉碎方法,也获得很好的破壁效果^[1, 46]。藻粉干物料随超声速气流进入圆柱形腔体内,在气体喷射的加速作用下,颗粒环绕腔体螺旋运动,最终达到3倍超音速,不同速度颗粒间发生剧烈碰撞,形成巨大机械作用力,对红球藻厚壁细胞产生粉碎效果。该方法对物料流动性无特殊要求,

可采用冷冻、冰冻、干冰或液氮等方法预处理,将其降温至-50℃之内即可。同样,粉碎后的物料随气体失压喷出,并吸收大量热,保持工作腔体内和颗粒处于较低温度^[46]。

我们还尝试其他措施有效降低活性成分丢失。如选用符合食品卫生标准安全要求的保护剂,使细胞破壁粉碎后的物料形成保护屏障层,阻断氧气与活性成分虾青素接触,减少氧化分解。

上述2种方法可高效破碎红球藻壁,高速气体破壁效率在>85%,高压均质破壁效率几乎100%。整个破壁粉碎过程处于低温状态,可减少虾青素损失。加之破壁过程在几秒钟内瞬间完成,工作非常高效。藻破壁粉碎过程借助物理碰撞,全封闭运行和无异物混入,最大程度地保持了产品的纯天然性。

5.2 红球藻虾青素提取与加工

从破壁后红球藻中工业化提取虾青素属传统技术,我们尝试有机溶剂类萃取、食用油类浸出和超临界CO₂提取。其中,有机溶剂法较方便、成本较低、产品虾青素含量和提取效率都比较高;在提取过程中需把控温度,温度过高导致虾青素严重损失^[47];有机溶剂可回收重复利用,节省生产成本;基于有机溶剂挥发性强、易燃,需严格按照消防安全要求管理操作。食用油法可很好地保持产品天然性,产品稳定性好,虾青素溶于食用油后浓度低,产品市场应用空间受到限制。而超临界CO₂提取主要利用特定温度和压力下,CO₂处于气-液临界状态,兼具气体流动性和液体的溶解性能,借助CO₂夹带作用将藻原料中虾青素等脂溶性物质萃取出来;该方法生产的虾青素含量浓度高,有利于后期不同产品(如水溶性制品)深加工,满足不同市场需求;该方法提取的虾青素制品也很好地保持了其纯天然性,其不足之处在于成本高,规模相对较小。在虾青素产业化提取中,耦合不同方法,先借助有机溶剂浸泡提取,在利用超临界CO₂提纯也是发展趋势。

5.3 红球藻虾青素制品研制

在安全性和功能性予以评价^[48-49]基础上,我们研制出多个系列的红球藻虾青素制品。其中,以红球藻为原料的制品,包括:红球藻鲜藻泥、干燥粉和破壁藻粉;以红球藻虾青素为原料的制品,包括:天然红球藻虾青素油、水溶性红球藻虾青素微囊粉;以及用红球藻或虾青素原料再开发的制品,包括:食品保健系列的营养片、软胶囊和冲剂等,饮料系列的

饮料、泡腾片与保健酒等，化妆品系列的口红和防晒霜等；用于水产与观赏鱼类系列，包括：营养强化和增色与提高免疫力的饲料；用于家禽和鸟类系列的蛋类营养强化制品等。

5.4 红球藻虾青素新功能挖掘

虾青素的传统功能主要是抗氧化和增色，与人工合成或微生物发酵来源的虾青素相比，红球藻虾青素活性更强，产品也更稳定。其具体原因尚不清楚，我们推测前者与其亚分子旋光异构体结构和结合方式有关。红球藻虾青素全部为左旋结构，而微生物发酵生产的虾青素全部为右旋结构，合成虾青素存在着左旋、右旋和内消旋结构，三者组成比例为 1:1:2，上述不同的虾青素结构决定着其功能的差异。至于后者可能与其结合状态有关，合成虾青素全部为游离态，而红球藻虾青素与脂肪酸结合，以单脂类型为主，其次为双酯类型，只有 5% 的虾青素为游离态，这可能是导致产品中稳定性出现差异的原因。除此之外，我们还开展了系列动物实验，挖掘出红球藻虾青素的其他新功能。

5.4.1 水产、家禽养殖应用效果与应激免疫

大量报道表明红球藻虾青素在水产养殖中具有提高类胡萝卜素总含量、增色及抗氧化能力。除此之外，我们还证实的其他功效包括：①在水产饵料轮虫养殖中，可有效增加群体挂卵轮虫的数量和总卵数，进而显著提高轮虫生长与繁殖速率^[50-51]。②在对虾养殖和饲料加工中，红球藻虾青素比合成虾青素在虾饲料中的稳定性更高，可显著提高幼虾活力、显著促进生长、增加抗氧化酶表达，综合经济效益更好。在对虾后期养成中，可明显增加对虾肌肉硬度、虾长度、提高虾产量，诱导肌体抗氧化酶类的酶活提高和免疫酶类的基因表达，也能提高对虾抗低温、低氧和应激能力，有利于活虾的长途低温运输^[52-54]。③在蟹类养殖中，红球藻虾青素异构体在体内的分布存在选择性，可提高中华绒螯蟹性腺粗蛋白、肌肉总多不饱和脂肪酸的含量，其增色效果好于其他来源的虾青素，特别是在肝胰腺和头胸甲中的虾青素增加量尤其明显。养成蟹的整体品质更好，在市场上更受消费者欢迎，养殖综合经济性也更高^[55-61]。④在虹鳟养殖中，我们还利用红球藻提取虾青素后的藻渣开展饲喂实验，发现藻渣不仅提高其色泽，而且可改善鱼肉的品质，其持水性更好^[62-63]。针对蛋禽养殖，探讨了饲喂红球藻虾青素对

禽蛋营养品质的改善效果。

另外，我们通过跟踪观察，发现红球藻虾青素对不同人群营养与健康水平具有提高作用。还多次开展动物实验，挖掘出多项新功效并确定其药食同源功能。

5.4.2 益智健脑

我们于 2003 年利用富含虾青素红球藻藻粉饲喂小鼠，开展水迷宫和跳台等行为学实验，率先发现红球藻虾青素对小鼠记忆力和学习能力都具有明显提高作用。2007 年为排除其它物质的可能干扰和影响，利用红球藻虾青素油制剂重复开展实验，再次验证了上述结论。随后引起国内外学者特别是药学开发领域团队的关注，先后从机理方面入手研究虾青素在维持脑健康和脑疾病预防中的作用。近几年我们分别利用老龄小鼠和双基因突变鼠，再次开展行为学实验，也获得类似的阳性结果，并结合酶学、代谢组学和转录组学等实验数据，深入挖掘出在大脑退行性疾病预防和延缓方面的代谢调控与作用机制。

5.4.3 增加精子数量与活力

受多种因素的复杂影响，很多生物雄性生殖细胞不同程度地出现数量减少、活力减弱。在我国仅 30 年来，青年男性人群的生殖细胞数量及活力以惊人速率持续出现下降。并且随着社会发展，适龄青年忙于事业或生活观念变化，导致婚龄不断推迟等，更加剧了上述现象的发生。

服用红球藻虾青素是否对精子数量与活力有所增加，以往对此并不清楚。尽管有美国专利宣称饲喂红球藻可提高公猪繁殖力和精液质量，但该专利缺少最基础的核心支撑依据，所提供结果数据本身并没有统计学差异，结果与结论也相矛盾，明显不支持专利结论；并且实验动物在遗传、年龄、个体大小都不一致，不能重复；在没有饲喂浓度梯度，给出有效剂量范围明显属主观性臆测；单纯地将产仔率归纳为公猪精子状况漏洞明显，忽视了母猪遗传因素及卵子(排卵数及卵成熟度)对产仔的重要影响，也忽略了授精卵在分裂、胚胎发育过程中和孕期环境的综合影响；另外，专利描述采用人工授精而非自然交配，忽视了公猪激素水平对发情交配的影响，还混淆了精液量与精子数量的概念差异，等等。

为科学准确地回答红球藻虾青素究竟对精子数量、活力和雄性特征的影响。我们于 2012 年利用大鼠开展了严格的动物学实验，获得了可靠的实验数

据和支撑证据^[64]。结果表明:适量的红球藻虾青素可显著提高精子数量和单位重量附睾生殖细胞密度。其中,饲喂中等剂量组比对照组的总精子数增加显著;而高剂量组的总精子数比对照增加差异极显著。就单位重量附睾中的精子密度而言,中等剂量组和高剂量组的精子密度比对照组也分别增加 1/3 和 2/3,差异均极显著。精子活力在高剂量组附睾尾中显著增加,有活性总生殖细胞数比对照高 2.5 成;其中活跃程度高的 II 级精子数具有大幅度增加,而活跃程度较低的 III 级精子数比对照组明显减少。

5.4.4 对急性肾损伤的保护

肾脏作为人体重要器官,在调节水、电解质平衡及维护酸碱平衡,清除体内新陈代谢的产物及某些废物和毒物,保证机体内环境的稳定和正常新陈代谢。受疾病或服用药物等影响,肾脏功能极易发生损伤而危害患者健康。为此,我们通过联系饲喂大鼠虾青素开展动物学实验,再诱导急性肾损伤,测定其肾功能状况,从血清尿素氮、肌肝、肾脏匀浆酸性磷酸酶活性、超氧化物歧化酶、蛋白质含量、膜脂过氧化丙二醛水平,并结合肾脏组织病理学的显微和超微结构等结果。率先证实红球藻虾青素具有营养、安全、无毒性,可对部分(约 1/3)急性肾损伤雄性大鼠近曲小管细胞质膜断裂、内线粒体溶解、内质网膨大水肿都有显著减轻作用,明显减少血清中尿素氮和肌酐水平。研究还发现红球藻虾青素的作用机理并非通过抗氧化途径,而是一条溶酶体和酸性磷酸酶的新途径,实现预防或修复肾功能损伤^[65]。

5.4.5 其他方面的作用

目前新型冠状病毒 COVID-19 肆虐全球 200 多个国家,至少 500 万人确诊受感染,已造成 30 多万人死亡。在 COVID-19 感染患者主要临床症状(如肺部严重感染与炎症风暴和免疫功能紊乱等)刚刚确定颁布之际,我们及时总结国内外近年来相关研究进展并形成 6 篇综合性报告,分别围绕虾青素在降低炎症发生与减少肺部疾病、提高免疫调节能力、避免肾脏功能损伤、调节肠道菌群抑制胃病原菌感染、保护生殖系统、以及维持血压和心血管功能等方面予以概述,先后与抗疫医务人员的社会各界进行了交流。

6 红球藻虾青素产业体系建设

红球藻资源开发是近年来国内外新兴的生物产业,2010 年底被我国列为新资源食品。随后,我们为

构建规范的产业体系,获取入市资质,建立相关标准规范等开展了系列工作^[66-69]。先后成功取得了包括藻粉、油剂、片剂、粉剂在内的系列饲料和食品证书入市资质和产品证书,获得了中国虾青素领导品牌、中国优质名牌产品和生态原产地保护证书,通过了国内外各类有机认证,并取得美国、欧盟、中东地区进出口权,建立了国家认证的 CNAS 实验室,成立红球藻种质培育和虾青素制品开发国家地方联合工程中心。同时也获得政府社会认可,先后授予国家发明专利优秀奖以及省部级科技成果奖等。在完善红球藻虾青素分析技术基础^[66]上,负责起草了 3 项涉及红球藻虾青素的国家标准,其中 2 项国家标准(雨生红球藻藻粉、红球藻虾青素测定液相色谱法)已颁布实施^[67-68];而另 1 项标准虾青素旋光异构体含量的测定液相色谱法也通过前期审查,报批国家质量监督检验检疫总局和国家标准化管理委员会。

如前所述,红球藻具有高度保守性和遗传稳定性,属于同一个物种^[1-2],因此红球藻种质均可合法地用于规模化培养,开展新资源开发与销售。

7 结论

综上所述,在红球藻产业发展过程中,经过仅 30 年工作,我们成功构建了基于红球藻细胞周期调控、与大型光生物反应器的二步串联培养开发模式,以及整体系列配套技术,率先构建了产业化红球藻虾青素开发基地,孕育出具有鲜明高原特色的我国微藻植物细胞工厂,也为整个微藻产业全程发展提供了可复制借鉴新模式。同时,我们还借助产业化基地示范效应,通过现场具体实践活动,多批次对生产管理和技术人员进行培训,并通过传帮带向行业进行技术辐射,将大批缺少相关专业经验的员工,培养为专业技术人员,目前他们已成为我国该产业发展的重要中坚力量。

致谢:在此本文对各位同事,尤其先后参加本研究并针对红球藻虾青素资源开发全链条的不同环节的关键科学原理与技术问题,在各个相关侧面分别做出了重要贡献的团队成员:张立涛、张春辉、殷明焱、何君、孙艳妮、李倩倩、张晓丽、黄园、孙延红、王增福、苏芳、于文杰、栾维迎、李颖逾、李虎、刘伟、徐冉、张展、韩春梅、刘晓慧、林伟、庞通、张振、石琨、张孟洁、王雷、王宝杰、吴旭干、龙晓文、张勇、梁文伟、杨秋林、潘励山、史朋家、刘洋、刘建华、John Van der Meer、张京浦、孟昭才等致以衷心感谢。

参考文献:

- [1] Liu J G, Van der Meer J P, Zhang L T, et al. Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production[C]// Slocombe S P, Benemann J R. Micro-algal Production for Biomass and High-Value Products[M]. USA: Taylor & Francis Books, Ltd, 2016: 267-293.
- [2] Liu J G, Li Q Q, Liu Q, et al. Some studies on screening unicellular microalgae for biofuels and bioactive products in our laboratory and pilot platform[J]. *Algological Studies*, 2014, 145/146: 99-117.
- [3] 殷明焱, 刘建国, 张京浦, 等. 雨生红球藻和虾青素研究述评[J]. *海洋湖沼通报*, 1998, (2): 53-62.
Yin Mingyan, Liu Jianguo, Zhang Jingpu, et al. Review of studies of *Haematococcus pluvialis* and its astaxanthin[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1998, (2): 53-62.
- [4] 刘建国. 微藻生产类胡萝卜素[C]//范晓, 张士瑾, 秦松, 等. 海洋生物技术新进展[M]. 北京: 海洋出版社, 1999, 212-223.
Liu Jianguo. Microalgae produce carotenoids[C]//Fan Xiao, Zhang Shicui, Qin Song, et al. *Advances on Marine Biotechnology*[M]. Beijing: China Ocean Press, 1999, 212-223.
- [5] Sun Y H, Liu J G, Zhang X L, et al. Strain H2-419-4 of *Haematococcus pluvialis* induced by ethyl methane-sulphonate and ultraviolet radiation[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2008, 26(2): 152-156.
- [6] 刘建国, 殷明焱, 张京浦, 等. 雨生红球藻的细胞周期初探[J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(2): 145-150.
Liu Jianguo, Yin Mingyan, Zhang Jingpu, et al. Studies of cell cycle in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(2): 145-150.
- [7] Zhang C H, Zhang L T, Liu J G. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2017, 5: 221-227.
- [8] 李颖逾, 刘建国, 林伟, 等. 雨生红球藻细胞转化、虾青素积累与光照强度的关系及不同品系间的差异性[J]. *海洋科学*, 2006, 30(9): 36-41.
Li Yingyu, Liu Jianguo, Lin Wei, et al. Effects of light intensity on cell transformation, astaxanthin accumulation in three strains of *Haematococcus pluvialis* and their difference[J]. *Marine Sciences*, 2006, 30(9): 36-41.
- [9] 韩春梅, 刘建国, 张勇. 红球藻藻株对光强适应及在工程培养中的应用[J]. *海洋科学*, 2010, 34(5): 21-28.
Han Chunmei, Liu Jianguo, Zhang Yong. Photo-adaptation of three strains of *Haematococcus pluvialis* and their application[J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(5): 21-28.
- [10] 孙艳妮, 殷明焱, 刘建国. 雨生红球藻的信号物质[J]. *海洋湖沼通报*, 2001, 3: 22-28.
Sun Yanni, Yin Mingyan, Liu Jianguo. Auto-signals in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2001, 3: 22-28.
- [11] 韩春梅, 刘建国, 张勇. 不同激素配伍对雨生红球藻细胞生长和虾青素累积的调节作用、藻株差异及应用[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(4): 430-436.
Han Chunmei, Liu Jianguo, Zhang Yong. Cell growth and astaxanthin accumulation of four strains of *Haematococcus pluvialis* exposed to different plant regulators[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(4): 430-436.
- [12] Liu J G, Yin M Y, Liu W, et al. Dynamic changes of inorganic nitrogen and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2002, 20(4): 356-364.
- [13] 殷明焱, 刘建国, 张京浦, 等. 磷在雨生红球藻生长和虾青素累积中的作用[J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37: 249-254.
Yin Mingyan, Liu Jianguo, Zhang Jingpu, et al. The role of phosphorus in the growth of *Haematococcus pluvialis* and accumulation of astaxanthin[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37: 249-254.
- [14] 刘建国, 孙艳妮, 殷明焱, 等. 无机碳与雨生红球藻细胞调节物质[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(5): 459-466.
Liu Jianguo, Sun Yanni, Yin Mingyan, et al. Inorganic carbon and the cell growth regulator in microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(5): 459-466.
- [15] Zhang C H, Zhang L T, Liu J G. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *H. pluvialis* at the non-motile stage[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31: 1001-1008.
- [16] Zhang L T, Zhang C H, Liu J G, et al. A strategy for stimulating astaxanthin and lipid production in *Haematococcus pluvialis* by exogenous glycerol application under low light[J]. *Algal Research*, 2020, 46: 101779.
- [17] 龙元霁, 刘建国, 张立涛. 兼养对雨生红球藻细胞生长的促进作用及藻株差异性[J]. *海洋科学*, 2014, 38(12): 1-7.
Long Yuanru, Liu Jianguo, Zhang Litao. The cell growth enhancement and difference of 4 strains of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic culture mode[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(12): 1-7.
- [18] Zhang C H, Zhang L T, Liu J G. The role of photorespiration during astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2016, 107: 75-81.
- [19] Zhang C H, Liu J G, Zhang L T. The interrelation between photorespiration and astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* using metabolomic analysis[J]. *Algal Research*, 2019, 41: 101520.
- [20] Zhang L T, Su F, Zhang C H, et al. Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haema-*

- Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(1): 33.
- [21] Li Q Q, Zhang L T, Liu J G. Examination of carbohydrate and lipid metabolic changes during *Haematococcus pluvialis* non-motile cell germination using transcriptome analysis[J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31: 145-156.
- [22] Li Q Q, Zhang L T, Liu J G. Comparative transcriptome analysis at seven time points during *H. pluvialis* motile cell growth and astaxanthin accumulation[J]. Aquaculture, 2019, 503: 304-311.
- [23] Gong F Y, Zhang C H, Zhang L T, et al. Changes of carotenoids contents and analysis of astaxanthin geometrical isomerization in *Haematococcus pluvialis* under outdoor high light conditions[J]. Aquaculture Research, 2019, 1-9.
- [24] 刘建国, 张京浦. 雨生红球藻光合和呼吸速率研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(5): 490-495.
Liu Jianguo, Zhang Jingpu. Photosynthetic and respiration rate of *Haematococcus pluvialis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2000, 31(5): 490-495.
- [25] 刘建国, 韩春梅, 张勇. 雨生红球藻细胞生长促进剂及其使用方法[P]. 发明专利号: ZL200910300402.2, 2009.
Liu Jianguo, Han Chunmei, Zhang Yong. Growth promoter of *Haematococcus pluvialis* and its application[P]. ZL200910300402.2, 2009.
- [26] Zhang L T, Zhang C H, Xu Ran, et al. Astaxanthin biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*: metabolic process, function, and biotechnological applications[J]. Nova science publishers, New York, 2019, 1-37.
- [27] Zhang C H, Zhang L T, Liu J G. The interrelation between photorespiration and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using metabolomics analysis[J]. Algal Research, 2019, 41: 101520.
- [28] Zhang C H, Zhang L T, Liu J G. The role of photorespiration during astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 107: 75-81.
- [29] Li Q Q, Zhang, Liu J G. Examination of carbohydrate and lipid metabolic changes during *Haematococcus pluvialis* non-motile cell germination using transcriptome analysis[J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31(1): 145-156.
- [30] Li Q Q, Zhang L T, Liu J G. Comparative transcriptome analysis at seven time points during *Haematococcus pluvialis* motile cell growth and astaxanthin accumulation[J]. Aquaculture, 2019, 503: 304-311.
- [31] 张展, 刘建国. 微藻高密度培养中的生长指标和适应机制[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(4): 36-43.
Zhang Zhan, Liu Jianguo. Applications of growth parameters and adaptive mechanisms of microalgae culture at high cell density[J]. Marine Fisheries Research, 2003, 24(4): 36-43.
- [32] 刘建国, 张京浦, 殷明焱, 等. 光生物反应器的组建[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(1): 109-110.
Liu Jianguo, Zhang Jingpu, Yin Mingyan, et al. Installation of a two-stage air-lift photobioreactor[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1998, 29(1): 109-110.
- [33] 刘建国, 徐冉. 我国微藻资源开发 30 年蜕变之路[J]. 生物学杂志, 2017, 34(2): 9-15.
Liu Jianguo, Xu Ran. 30-year's footprint and process of microalgal development in China[J]. Journal of Biology, 2017, 34(2): 9-15.
- [34] 刘建国, 王增福, 刘伟, 等. 微藻规模培养的管道光生物反应器. ZL 200410020978.0[P]. 2007-05-23.
Liu Jianguo, Wang Zengfu, Liu Wei, et al. Piped photobioreactor for mass cultivation of microalgae. ZL 200410020978.0[P]. 2007-05-23.
- [35] 刘建国, 袁毅, 李凌, 等. 管道光生物反应器管内壁的清理方法[P]. 发明专利号: ZL201010500926.9. 2011-04-06.
Liu Jianguo, Yuan Yi, Li Ling, et al. A method for cleaning the inner wall of pipe photobioreactor. ZL201010500926.9[P]. 2011-04-06.
- [36] 张勇, 梁文伟, 刘建国. 一种在线刷洗的微藻培养装置. ZL201010539991.2[P]. 2012-12-19.
Zhang Yong, Liang Wenwei, Liu Jianguo. A microalgae culture device with online scrubbing. ZL201010539991.2[P]. 2012-12-19.
- [37] 刘建国, 刘伟, 王增福, 等. 微藻培养的光生物反应器装置. ZL 200410020946.0[P]. 2007-09-19.
Liu Jianguo, Liu Wei, Wang Zengfu, et al. Photobioreactor device for microalgae cultivation. ZL200410020946.0[P]. 2007-09-19.
- [38] 刘伟, 刘建国, 林伟, 等. 雨生红球藻规模化培养工艺的构建与应用[J]. 饲料工业, 2006, 27(12): 12-17.
Liu Wei, Liu Jianguo, Lin Wei, et al. Technological assembly and its application in a pilot scale culture of *Haematococcus pluvialis*[J]. Feed Industry, 2006, 27(12): 12-17.
- [39] 刘建国, 张勇, 利用荒山资源培养微藻的模式. ZL200910300543.4[P]. 2013-10-23.
Liu Jianguo, Zhang Yong. Model of cultivating microalgae using barren mountain resources. ZL200910300543.4[P]. 2013-10-23.
- [40] Xu R, Zhang L T, Liu J G. Rotifers release a lipid-soluble agent that inhibits photosynthetic electron transport in *Chlorella* sp.[J]. Journal of Applied Phycology, 2020. DOI: 10.1007/s10811-020-02065-9.
- [41] Huang Y, Liu J G, Li L, et al. Efficacy of binary combinations of botanical pesticides for rotifer elimination

- in microalgal cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 154: 67-73.
- [42] Yuan H, Liu J G, Wang H Y, et al. Treatment potential of a synergistic botanical pesticide combination for rotifer extermination during outdoor mass cultivation of *S. platensis*[J]. *Algal Research*, 2014, 6: 139-144.
- [43] Huang Y, Li L, Liu J G, et al. Botanical pesticides as potential rotifer-control agents in microalgal mass culture[J]. *Algal Research*, 2014, 4: 62-69.
- [44] Yuan H, Liu J G, Tong P, et al. Growth inhibitory and antifeedant effects of sublethal concentrations of toosendanin on the rotifer *Brachionus plicatilis*[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2017, 99: 31-37.
- [45] Xu R, Zhang L T, Liu J G, The natural triterpenoid toosendanin as a potential control agent of the ciliate *Stylonychia mytilus* in microalgal cultures[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31: 41-48.
- [46] 刘建国, 徐冉, 张立涛. 一种川楝素作为制备棘尾虫杀虫剂的应用. 发明专利号: ZL201611003622.5[P]. 2019-01-04.
Liu Jianguo, Xu Ran, Zhang Litao. Application of toosendanin as an insecticide for ciliate *Stylonychia*. ZL201611003622.5[P]. 2019-01-04.
- [47] 刘建国, 刘伟, 林伟, 等. 微藻细胞破壁方法. 发明专利号: ZL 200410082921.3[P]. 2007-12-05.
Liu Jianguo, Liu Wei, Lin wei, et al. Method of microalgae cell wall breaking. ZL 200410082921.3[P]. 2007-12-05.
- [48] 张晓丽, 刘建国. 虾青素的抗氧化性及其在营养和医药应用方面的研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(1): 258-262.
Zhang Xiaoli, Liu Jianguo. Review on antioxidant effects of astaxanthin and its application in nutriology and pharmacology[J]. *Food Science*, 2006, 27(1): 258-262.
- [49] 刘建国, 潘励山, 魏小丽, 等. 富含虾青素的红球藻粉对大鼠的生理影响[J]. *食品与药品*, 2007, 9 (12A): 26-30.
Liu Jianguo, Pan Lishan, Wei Xiaoli, et al. Physiological behaviors of wistar rat supplemented with astaxanthin-enriched *Haematococcus pluvialis* powder[J]. *Food and Drug*, 2007, 9 (12A): 26-30.
- [50] Liu J G, Zhang X L, Sun Y H, et al. Antioxidative capacity and enzyme activity in *Haematococcus pluvialis* cells exposed to superoxide free radicals[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 1-9.
- [51] Li H, Liu J G. Effects of defatted *Haematococcus pluvialis* meal (DHPM) supplementation on the growth performance, and the carotenoid content and composition in the rotifer (*Brachionus plicatilis*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 34-40.
- [52] Li H, Liu J G, Li L. Efficacy and application of the natural astaxanthin[C]//An essential guide to astaxanthin-dietary sources. New York: Nova Science Publishers, 2019, 37-74.
- [53] Liu X H, Wang B J, Li Y F, et al. Effects of dietary botanical and synthetic astaxanthin on E/Z and R/S isomer composition, growth performance, and antioxidant capacity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in the nursery phase[J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2018, 15: 131-140.
- [54] Su F, Huang B, Liu J G. The carotenoids of shrimps (Decapoda, Caridea, Dendrobranchiata) cultured in China[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2018, 38(5): 523-530.
- [55] Su F, Liu J G. The carotenoid characteristics of the important wild shrimp *Trachysalambria curvirostris* (Stimpson, 1860) in China[J]. *Journal of Oceanology Limnology*, 2019, 37(2): 706-712.
- [56] Nan M, Long X W, Liu J G, et al. Defatted *Haematococcus pluvialis* meal can enhance the coloration of adult Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2019, 510: 371-379.
- [57] Wu X G, Zhao L, Long X W, et al. Effects of dietary supplementation of *Haematococcus pluvialis* powder on gonadal development, coloration and antioxidant capacity of adult male Chinese mitten crab[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(10): 5214-5223.
- [58] Long X W, Wu X G, Zhao L, et al. Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* cell powder on coloration, ovarian development and antioxidant capacity of adult female Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 545-553.
- [59] 吴仁福, 龙晓文, 侯文杰, 等. 饲料中添加雨生红球藻粉对三疣梭子蟹雌体卵巢发育、色泽、抗氧化能力和生化组成的影响[J]. *水生生物学报*, 2018, 42: 698-708.
Wu Renfu, Long Xiaowen, Hou Wenjie, et al. Effects of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* powder on ovarian development, coloration, antioxidant capacity and biochemical composition of adult female swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42: 698-708.
- [60] 龙晓文, 赵磊, 麻楠, 等. 饲料中添加雨生红球藻粉对中华绒螯蟹成体雄蟹生化组成的影响[J]. *动物学杂志*, 2018, 53: 278-291.
Long Xiaowen, Zhao Lei, Ma Nan, et al. Effects of Dietary supplementation powder of *Haematococcus pluvialis* on the body biochemical composition of adult male Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2018, 53: 278-291.
- [61] Yu W J, Liu J G. Astaxanthin isomers: Selective distribution and isomerization in aquatic animals[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734915.
- [62] Su F, Yu W J, Liu J G. Comparison of effect of dietary

- supplementation with *Haematococcus pluvialis* powder and synthetic astaxanthin on carotenoid composition, concentration, esterification degree and astaxanthin isomers in ovaries, hepatopancreas, carapace, epithelium of adult female Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 735146.
- [63] 石焜, 苏芳, 郭文, 等. 雨生红球藻藻渣在成年虹鳟饲养中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(6): 153-157.
Shi Kun, Su Fang, Guo Wen, et al. Application of *Haematococcus pluvialis* residues in feeding adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(6): 153-157.
- [64] Zhang X L, Pan L S, Wei X L, et al. Impact of astaxanthin enriched algal powder of *Haematococcus pluvialis* on memory improvement in BALB mice[J]. *Environ Geochem Health*, 2007, 29: 483-489.
- [65] Liu J G, He J, Zhang Y, et al. Effects of Microalgal Astaxanthin and Carotenoids on Acute Renal Injury Prophylaxis in Male Wistar Rats[C]//3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuel and Bioproducts, Torondo, Canada, 2013.
- [66] Fang S, Xu H R, Yang N, et al. Hydrolytic efficiency and isomerization during the process of de-esterifying natural astaxanthin esters using saponification and enzymolysis[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 34: 37-42.
- [67] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会: GB/T31520-2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 5.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China: GB/T31520-2015[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015: 5.
- [68] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会: GB/T30893-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 3.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China: GB/T30893-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015: 3.

Development history and future prospects of culturing *Haematococcus pluvialis* for natural astaxanthin

LIU Jian-guo^{1, 2, 3}

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Center for Ocean Mega-Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 3. National-Local Joint Engineering Research Center for *Haematococcus Pluvialis* and Astaxanthin Products, Chuxiong 675012, China)

Received: Mar. 14, 2020

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; large-scale photobioreactor; contamination control; cell cycle and regulation

Abstract: Mass-scale cultivation of unicellular *Haematococcus pluvialis* for natural astaxanthin as a new source of food and functional byproduct has been successfully realized in China because of research and development in the last 30 years. During this period, our research group in IOCAS studied basic scientific principles, developed theoretical and technological knowledge, and performed industrial application and promotion, as well as discovered new solutions to the bottlenecks at important nodes of upstream, midstream, and downstream processes in the *H. pluvialis* cultivation and astaxanthin production chain, according to the national economic situation, technique conditions, and development status of the microalgal industry. On the occasion of the publication of this special issue to celebrate the 70th anniversary of IOCAS, we provide a brief review of our main achievements on each aspect of *H. pluvialis* cultivation to promote the sustainable development of *H. pluvialis* and the entire microalgal industry. The review summarizes the upstream, midstream, and downstream processes, including germplasm resources, cell-cycle-dependent two-step culture mode, and culture optimization. In addition, other key parameters such as automatic control, establishment of closed facilities and photobioreactor scale-up, biocontamination prevention and progress control, bioactive substance extraction and its biofunctional discovery, industry standards, and system construction have also been summarized. Moreover, new research subjects and development trends are also put forward.

(本文编辑: 杨 悦)