

## 臺灣鹽田分離純化之三株微細藻類鑑定及營養分析

林玠如<sup>1</sup>·吳豐成<sup>1</sup>·李孟洲<sup>2</sup>·徐德華<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所海水繁養殖研究中心

<sup>2</sup>國立屏東科技大學水產養殖系

<sup>3</sup>國立臺灣海洋大學海洋中心

### 摘要

本研究自臺南市北門區的井仔腳鹽田中分離純化出 3 株綠藻 (BT、GD 及 RD)，並以光學顯微鏡觀察細胞型態及分析其 ITS (internal transcribed spacer) region rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) 序列後，初步鑑定 BT 為扁藻 (*Tetraselmis marina*, Cienkowski)、GD 為綠色杜氏藻 (*Dunaliella viridis*, Téodoresco)、RD 為鹽生杜氏藻 (*Dunaliella salina*, Téodoresco)。進一步分析這三種藻類的營養成分，顯示鹽生杜氏藻、綠色杜氏藻及扁藻的粗蛋白含量分別為：38.8%、39.4%、27.5%；粗脂質含量則為：14.4%、15.2%、3.4%，亦即杜氏藻的粗蛋白與粗脂質含量均高於扁藻。除此之外，鹽生杜氏藻經萃取後可得到細胞乾重約 11% 的  $\beta$ -胡蘿蔔素，且其脂肪酸含量中油酸 (oleic acid; 18:1n-9)、 $\alpha$ -次亞麻油酸 ( $\alpha$ -linolenic acid, ALA; 18:3n-3)、亞麻油酸 (linoleic acid, LA; 18:2n-6) 和  $\gamma$ -亞麻酸 ( $\gamma$ -linolenic acid, GLA; 18:3n-6) 分別為 10.1%、10.9%、5.5%、1.1%，具有進一步開發的價值。

關鍵詞：鹽田、杜氏藻屬、扁藻屬、類胡蘿蔔素、耐鹽

### 前言

微藻的種類繁多，生長速度快，加上適應性強，是容易培養的生物資源。由於微藻可以產生某些高附加價值的營養成分，因此被廣泛用於食品工業、水產養殖業、生物醫學、水質處理與生質能源等不同領域，具有重要的經濟與研究價值 (Hemaiswarya *et al.*, 2011; Priyadarshani and Rath, 2012)。目前世界各國皆致力於收集及開發新的微藻種原，尤其是在地純化分離的藻種，可能更能適應原生環境，有利發展大規模養殖，生產高附加價值的產品 (Wikfors and Pattersonb, 1994; Ichimi *et al.*, 2012; Priyadarshani and Rath, 2012)。

單細胞微藻中，扁藻 (*Tetraselmis marina*) 為綠藻門 (Chlorophyta)、球鞭藻綱 (Chlorodendrophyceae)、綠枝藻目 (Chlorodendrales)、綠枝藻科

(Chlorodendraceae)、扁藻屬 (*Tetraselmis*)，富有蛋白質、脂質等營養物質，是魚、蝦、貝類幼苗的理想開口餌料 (Hemaiswarya *et al.*, 2011; Priyadarshani and Rath, 2012)。杜氏藻亦屬於單細胞藻，無細胞壁，容易被動物和人類消化利用，生長快速且產量高，為廣泛生長的高耐鹽性藻種，是綠藻門，綠藻綱 (Chlorophyceae)、團藻目 (Volvocales)、杜氏藻科 (Dunaliellaceae)、杜氏藻屬 (*Dunaliella*) (Oren, 2005; Hu *et al.*, 2008; Hemaiswarya *et al.*, 2011; Priyadarshani and Rath, 2012)。鹽生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 在特定環境條件下，能合成大量的  $\beta$  胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)，藻細胞由綠色轉為橙紅色，可作為飼料和食品添加劑，極具開發應用的潛力 (Oren, 2005; Hu *et al.*, 2008)。與鹽生杜氏藻伴生的綠色杜氏藻 (*D. viridis*) 能生長在極端高鹽的環境，擁有比鹽生杜氏藻更強的耐鹽性，隨生長環境的不同，也會造就其耐鹽性的差異 (Oren, 2005)。

杜氏藻含高量脂肪酸，尤以 C16 和 C18 含量較多，且大多為多元不飽和脂肪酸

\*通訊作者 / 新北市貢寮區福連里香蘭街 34 號, TEL : (02) 2499-1696 ; FAX : (02) 2463-6964 ; E-mail : realgigi@gmail.com

(polyunsaturated fatty acid, PUFA) (Al-Hasan *et al.*, 1987; Mendoza *et al.*, 1999; Lamers *et al.*, 2010), 其中高度不飽和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acid, HUFA) 的二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 及二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 含量多寡在魚、蝦的代謝和生殖方面扮演重要的角色 (Sargent *et al.*, 2002)。因為富含蛋白質, 特別適合作為貝類、海參和海膽幼生等養殖對象的餌料生物 (Chen, 2003; Azad *et al.*, 2010; Hemaiswarya *et al.*, 2011), 也可以當作餌料生物培養或二次滋養的來源, 為魚、蝦苗人工育成帶來相當大的助益 (Nanton and Castell, 1999; Gharibi *et al.*, 2015)。

杜氏藻也含高量的  $\beta$  胡蘿蔔素, 在海膽飼料中添加類胡蘿蔔素會影響卵質; 亦可直接餵食海膽幼生提高活力和生存能力 (Shpigel *et al.*, 2006; Azad *et al.*, 2010)。Supamattaya *et al.* (2005) 研究發現, 杜氏藻萃取物能促進草蝦的生長, 並增強其免疫力。Boonyaratpalin *et al.* (2005) 以 175 ppm 的杜氏藻  $\beta$  胡蘿蔔素餵食草蝦 8 週後, 可從蝦體萃取出較控制組多 3 ~ 4 倍的還原蝦紅素 (astaxanthin), 顯示杜氏藻的  $\beta$  胡蘿蔔素可做為草蝦增色及合成還原蝦紅素的來源。再者, 由於杜氏藻生長在極端高鹽的環境, 因此杜氏藻會在細胞內產生甘油來調控滲透壓, 亦可被當作生產甘油的原料 (Oren, 2005)。

本研究自臺灣鹽田分離出 3 種藻種, 進行形態的觀察及生長培養, 並檢測其營養成分。此外, 透過分子鑑定的方法, 與目前已發表之藻種進行比對, 進一步確定其所屬種別, 以作為後續研究的依據。

## 材料與方法

### 一、樣本採集與藻類培養

試驗用藻種採自臺南市北門區井仔腳鹽田, 並保存於本研究團隊的實驗室, 以利後續研究之用。扁藻 BT 主要分離自低鹽水域 (20 ~ 85‰), 全年皆可發現, 細胞呈淺綠色至墨綠色, 逆境時會轉為黃褐色。鹽生杜氏藻 RD 及綠色杜氏藻 GD 則主要分佈於中鹽 (85 ~ 180‰) 至高鹽水域 (180 ~

350‰), 其中鹽生杜氏藻 RD 為冬季之優勢種, 細胞呈綠色, 逆境時會轉為紅棕色; 綠色杜氏藻 GD 則為夏季之優勢種, 細胞呈綠色。此外使用 Lugol's 染劑和中性紅染劑 (neutral red) 對藻體染色, 然後在光學顯微鏡下進行活體與固定染色觀察。

藻種的分離方法使用平板劃線法, 以 1% 洋菜膠及 f/2 配方 (Guillard, 1975), 進行分離培養。藻種分離後, 利用批次培養 (batch culture) 的方式, 將指數生長期的藻細胞接種到 Ben Amortz 培養液 (2.5 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.3 mM CaCl<sub>2</sub>、0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5.0 mM KNO<sub>3</sub>、1.5 mM NaCl、5.0 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.5 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1.0 mM CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O、7 mM MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O、1.0 mM ZnCl<sub>2</sub>、1.5 mM FeCl<sub>3</sub>、1.0 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O) 中, 於鹽度 35 ~ 50‰ 進行培養 (Ben Amortz *et al.*, 1982)。當藻種長到一定濃度後, 繼續接種到多個 2,000 ml 三角錐瓶, 給予通氣培養, 讓藻類的成長速率加快。培養條件為: 每日 12 h 光照, 強度為 8,000 Lux, 溫度為 28 ± 1°C。培養過程中取其指數生長期進行收穫, 並以 4,000 rpm 離心 4 min 取得藻濃縮物, 再以 80°C 烘乾成藻粉, 冷凍保存。

### 二、DNA 萃取及 ITS region rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) 鑑定

將分離培養的 3 種藻種各取 1 ml 左右, 轉置於 2 ml 離心管中, 再經 3,000 rpm (4°C) 離心 3 分鐘, 將藻細胞離心, 移棄上清液後, 將濃縮之藻細胞以 DNA 純化試劑組 AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific Inc, USA) 萃取基因組 DNA。透過 1% 瓊脂糖凝膠 (Agarose gel) 電泳檢測萃取後基因組 DNA 的完整性。用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) 分光光度計測定 DNA 濃度後, 再使用 TE buffer 把所有個體的 DNA 樣本濃度調整至 50 ng/μl。

本研究使用於擴增 ITS 序列之引子對為正向: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', 和反向: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' (Tran *et al.*, 2013)。反應體系為: 取藻類 DNA 樣本 1 μl (共 5 ng) 5 × PCR buffer 4.0 μl, Mg<sup>2+</sup> (25 mM) 0.8 μl, 引子對 (10 mM) 正反兩股各 1.0 μl, dNTP (each 2

mM) 1.0  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 (Promega) 0.1  $\mu$ l、加純水至總體積為 20  $\mu$ l。PCR 反應條件：先 94°C 2 min, 接著 94°C 30 sec, 黏合溫度 54°C 進行 30 sec, 72°C 30 sec, 重覆 35 個循環。擴增產物以 1.5% 瓊脂糖凝膠電泳檢測品質。將 PCR 產物以 DNA 純化試劑組 AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Scientific, Inc) 進行純化。隨後, 使用與擴增使用的引子對相同, 將純化後的產物以 ABI3100 進行定序 (波仕特生物科技股份有限公司, 臺灣)。

根據 Tran *et al.* (2013) 的報告, 並用 BLAST 軟體搜索 GenBank 中與本研究之 3 種藻種的 ITS 序列相近之資料, 篩選出數個杜氏藻屬、扁藻屬及衣藻屬物種之 ITS 序列進行後續分析。再將上述序列使用 ClustalX 進行序列重排和同源比較, 並進行人工核對校正。用 MEGA4.0 軟體中鄰接法 (neighbor-joining method) 構建演化樹, 而樹中各個枝點的支援率採用 bootstrap 法, 重複 1,000 次, Bootstrap 值大於 70 被認為是可靠的節點。

### 三、營養成分的分析

#### (一) $\beta$ 胡蘿蔔素

$\beta$  胡蘿蔔素的分析參考 Chidambara Murthy *et al.* (2005) 的前處理方法及 Devis (1976) 的 HPLC 法。將正己烷和異丙醇以 1:1 (v/v) 的比例混合, 以液-液萃取法萃取藻萃液經濃縮後, 以  $\beta$ -carotene (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany) 為標準品, 用 HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA.) 波長 450 nm 下測量及定量  $\beta$  胡蘿蔔素。

#### (二) 粗蛋白

藻細胞的粗蛋白質測定參考 AOAC (1995) 的分析方法。秤取藻粉 0.5 g 後, 置入消化管, 加入催化劑及 15 ml 濃硫酸, 然後將凱氏氮管 (Kjeldahl flask) 移至消化分解爐, 加熱至 380°C, 直到分解液由淡黃色轉為透明無色為止, 並將凱氏氮管靜置於室溫下冷卻, 待冷卻到室溫後, 再加入 70 ml 蒸餾水。移入凱氏氮蒸餾器 (Vapodest / 20 s) 中, 加入 75 ml 氫氧化鈉蒸餾出氮氣, 再以 4% 硼酸, 並以 Merck Mischindicator 5 為指示劑,

將收集的蒸餾液以 0.1 N 的鹽酸滴定至淡粉紅色。

$$\text{Crude protein} = \frac{(S-B) \times 0.0014 \times 6.25}{W \times 1000} \times 100\%$$

其中, S: 樣品的滴定量 (ml); B: 空白組的滴定量 (ml); W: 樣品的重量 (g); 0.0014: 1 ml 的 0.1 N 鹽酸溶液約相當於 0.0014 g 的氮量。

#### (三) 粗脂質

參考 AOAC (1995) 方法, 秤取藻粉 0.5 g 混合 10 ml 甲醇, 以組織破碎機攪打 30 sec 後洗下, 繼續加入 10 ml 氯仿混合 5 min, 接著離心取上清液。藻粉再加入 10 ml 甲醇氯仿混合液, 混合 5 min, 離心取上清液並合併。然後加入 0.88% 氫氧化鉀劇烈搖晃, 靜置隔夜將有機層吹乾且秤重。

$$\text{Crude lipid} = \left[ \frac{\text{脂肪總重量 (g)}}{\text{樣品總重量 (g)}} \right] \times 100\%$$

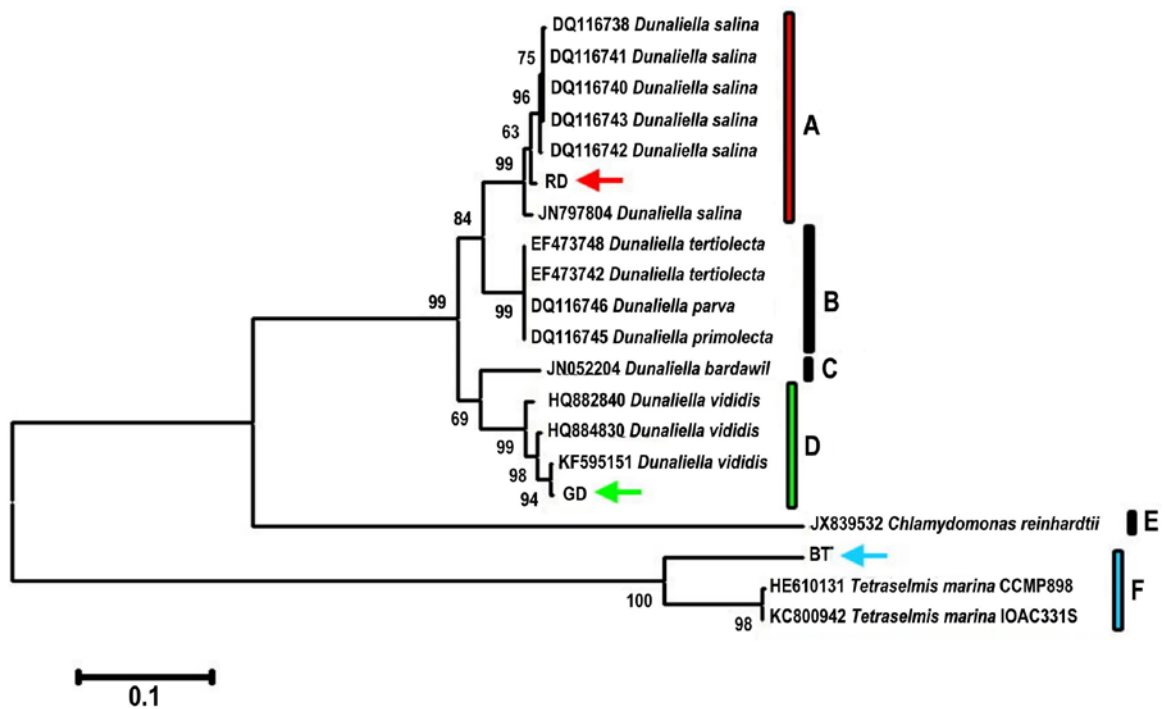
#### (四) 脂肪酸

參考 Mendoza *et al.* (1999) 的方法, 將藻類樣品做前處理, 以鹽酸-甲醇溶液 (v/v) 進行甲基酯化成脂肪酸甲酯 (fatty acid methyl ester)。再以氣相層析儀 (GC-15A, Shimadzu) 做脂肪酸分析, 其中配備火焰式離子偵測器和充填矽氧化物的極性 Supelcowax10 管柱 (30 m  $\times$  0.32 mm i.d.)。偵測器設定溫度為 200°C, 且管柱放置的烘箱設定在 195°C 的條件下進行分析。脂肪酸的定量分析以十七碳脂肪酸 (17:0, Sigma) 作為內部標準。最後使用記錄器藉由各化合物滯留時間的不同比對樣品與標準品的波峰做進一步的分析。

## 結 果

### 一、藻類的物種鑑定

使用本研究的 3 種藻種及從 Gene bank 篩選出的數個杜氏藻屬、扁藻屬及衣藻屬物種之 ITS 序列, 分別為 *Dunaliella salina*: JN797804、JX220893、DQ116742、DQ116743、DQ116738、DQ116740、DQ116741; *D. bardawill*: JN052204; *D. tertiolecta*: EF473748、EF473742; *D. parva*: DQ116746; *D. primolecta*: DQ116745; *D. viridis*: HQ882840、



**Fig. 1** The phylogenetic relationships of the ITS sequences of *Dunaliella salina* (RD), *D. viridis* (GD), and *Tetraselmis marina* (BT) constructed by the neighbor-joining method. Scale bar: nucleotide substitutions per site.

HQ864830、KF595151；*Tetraselmis marina*：HE610131、KC800942；*Chlamydomonas reinhardtii*：JX839532。

建構的親緣關係樹，可大致區分為 6 個類群 (clade A-F) (Fig. 1)。類群 A 包含樣本 RD 及 6 株 *D. salina*，且其支持度 (bootstrap value) 高達 99%。顯示 RD 應該屬於 *D. salina*。類群 B、C、E 分別包含了數個 *Dunaliella* 屬物種。類群 D 包含樣本 GD 及 3 株 *D. viridis*，且其支持度亦高達 99%。顯示 GD 應該屬於 *D. viridis*。最後類群 F 包含樣本 BT 及 2 株扁藻 *T. marina*，但由於 BT 與 *T. marina* 的序列差異較大，因此無法直接斷定 BT 就是 *T. marina*。然而將 BT 的 ITS 序列以 Blast 軟體在 Gene bank 進行比對時，*T. marina* 是序列上最為相近的物種 (Fig. 2)。

## 二、藻體形態觀察

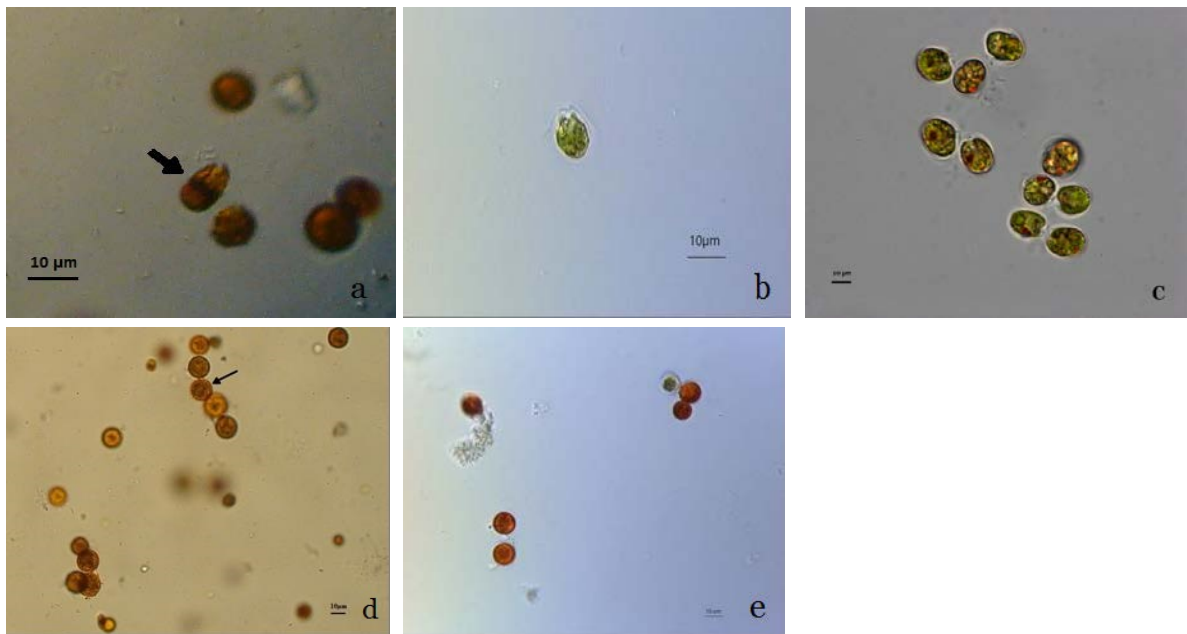
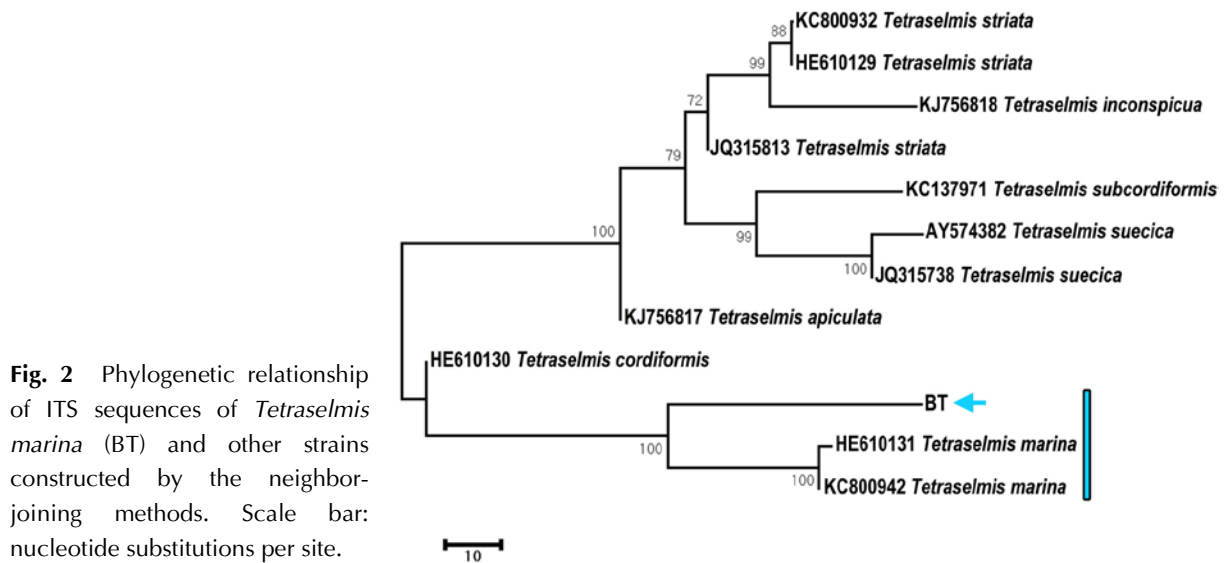
藻種 RD 經鑑定後確認為鹽生杜氏藻，其細胞形狀呈現梨形，大小為 5 ~ 10  $\mu\text{m}$  且具有兩條鞭毛。紅色杜氏藻的紅色膠群體 (reddish palmelloid

cells) 表面覆蓋一層厚實的膠質 (Fig. 3e)；而另一種綠色杜氏藻 (*D. viridis*) 呈綠色，細胞為圓形或橢圓形。橢圓形細胞的長為 7 ~ 11  $\mu\text{m}$ ，寬 3  $\mu\text{m}$ ；而圓形細胞的大小為 4 ~ 7  $\mu\text{m}$ 。細胞的頂端有兩條鞭毛 (Fig. 3b)，細胞內葉綠體佔總體積一半以上。在同一個區域採集到的扁藻 (*T. marina*)，大小較杜氏藻大一些，長 11 ~ 15  $\mu\text{m}$ ，寬 7 ~ 10  $\mu\text{m}$ ，具有四根鞭毛，能夠在水裡快速游動。經實地檢測，發現臺灣在地化的鹽生杜氏藻可以生活在鹽度 215‰ 的環境，且鏡檢得知其可維持良好的游動性。

從 Fig. 3e 可以看到將鹽度調降為 70‰ 時，鹽生杜氏藻失去鞭毛變成圓形，並分泌膠質，在靜止狀態下進行細胞分裂形成群體，進入生活史中的膠群體期。由此可知，杜氏藻在不適於生長的環境下會以膠群體期、孢囊期和配子期的方式度過，等環境適合生長時再轉為營養細胞期，進行分裂生殖 (劉與趙, 2004)。

## 三、 $\beta$ 胡蘿蔔素的檢測

鹽生杜氏藻對於鹽度改變的適應力較強。一



**Fig. 3** The three strains of green microalgae. (a) A pear-shaped cell of *Dunaliella salina* (indicated by the arrow) in Tainan, bar = 10 µm. (b) *Dunaliella viridis* in Tainan, bar = 10 µm. (c) *Tetraselmis marina* in Tainan, bar = 10 µm. (d) A haematocyst of *Dunaliella salina* (indicated by the arrow) under stress, bar = 10 µm. (e) The reddish palmelloid cells of *Dunaliella salina* in Tainan under stress, bar = 10 µm.

般來說，高鹽度有利於鹽生杜氏藻 β-胡蘿蔔素的累積，在小於 300‰ 的鹽度範圍內，鹽度與 β-胡蘿蔔素的含量呈現正相關 (吳與段, 2006)。本研究因想了解逆境下 β-胡蘿蔔素的含量，遂從鹽度達 215‰ 的臺南鹽田，分離培養出鹽生杜氏藻，並測出含細胞乾重 11% 的 β-胡蘿蔔素，與 Lamers *et al.* (2008) 研究指出，鹽生杜氏藻的 β-胡蘿蔔素含量高於細胞乾重的 10% 相似，證實臺灣在地化鹽生

杜氏藻具有開發利用的經濟價值。至於扁藻與綠色杜氏藻的 β-胡蘿蔔素含量則不高，因此不具商業開發價值。

#### 四、營養成分分析

由 Table 1 得知，本研究測得鹽生杜氏藻的蛋白質含量為 38.8%、脂質為 14.4%；綠色杜氏藻的

蛋白質含量為 39.4%、脂質為 15.2%，較取自蒙古吉蘭泰鹽湖的鹽生杜氏藻的蛋白質含量 29.4%、脂質 10.09% 皆來得高 (劉與趙, 2004)。另外，同區域分離出的扁藻則含 27.5% 的蛋白質以及 3.4% 的脂質。

**Table 1** Crude protein and crude lipid compositions of isolated microalgae in Taiwan

	Crude protein (%)	Crude lipid (%)
<i>Dunaliella salina</i>	38.8	14.4
<i>Dunaliella viridis</i>	39.4	15.2
<i>Tetraselmis marina</i>	27.5	3.4

## 五、脂肪酸的比較

由 Table 2 可以得知臺南鹽田分離出的鹽生杜氏藻含 10.9% 的  $\alpha$ -次亞麻油酸 ( $\alpha$ -linolenic acid, ALA; 18:3n-3) 與 5.5% 的亞麻油酸 (linoleic acid, LA; 18:2n-6)。而  $\gamma$ -亞麻酸 ( $\gamma$ -linolenic acid, GLA; 18:3n-6) 的含量為 1.1%，且順式-6, 9, 12, 15- 十八碳四烯酸 (stearidonic acid; 18:4n-3) 含 2.2%、油酸 (oleic acid; 18:1n-9) 則高達 10.1%，其花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA; 20:4n-6) 含量也有 1.1%。另外，與鹽生杜氏藻伴生的扁藻 (*T. marina*) 檢測出油酸含量為 6.7%、亞麻油酸為 3.6%、 $\alpha$ -次亞麻油酸為 2.3%，其餘檢測的脂肪酸含量均落在 0.2%。

## 討 論

### 一、藻類的物種鑑定 (ITS region rDNA)

由於微藻細胞較小，形態簡單缺乏可鑑別的特徵，加上在生活史不同階段或受環境影響導致形態改變等，皆是微藻的物種鑑定較為困難的原因。近年來隨著分子技術的發展，使用 DNA 序列進行微藻的物種鑑定，已變為重要的常規方法 (Moniz and Kaczmarek, 2009)。杜氏藻因其諸多優點，目前仍是世界各國積極開發新藻種或種原鑑定的對象。Wang *et al.* (2014) 自中國山西省運城

鹽湖中分離出一株杜氏藻，經 ITS 及其它 DNA 片段鑑定後，屬於鹽生杜氏藻。Preetha *et al.* (2012) 自印度各地搜集了 10 種形態各異的杜氏藻藻種，經 ITS 及其它 DNA 片段鑑定後，分屬於 5 個不同的類群中，其中亦包括鹽生杜氏藻及綠色杜氏藻。Tran *et al.* (2013) 亦以 ITS 鑑定從鹽田保護區 (Vinh Hao, Binh Thuan province) 純化出的 2 個藻種，分別屬於鹽生杜氏藻及綠色杜氏藻。而本研究亦從同一鹽田於不同季節取得鹽生杜氏藻及綠色杜氏藻，顯示此兩藻類共存於同一棲地的現象十分普遍。

## 二、形態觀察及培養

鹽生杜氏藻與綠色杜氏藻大小約為 5 ~ 11  $\mu\text{m}$ ，扁藻則稍微大一些，為 11 ~ 15  $\mu\text{m}$  長，其大小適合當作輪蟲及豐年蝦的二次滋養，也能直接投餵水產生物幼苗，作為開口餌料。同時，有研究述說鹽生杜氏藻與扁藻混合培養所產出的生物量比單獨培養杜氏藻更能促進藻類生長，能夠大幅提升藻類生物量的累積 (蔡與段, 2008)。因此培養鹽生杜氏藻與綠色杜氏藻混合扁藻培養，除了能夠培養大量藻類生物量作為餌料生物，也能藉此萃取其豐富的  $\beta$ -胡蘿蔔素開發經濟水產商品。

臺灣鹽田分離出的綠色杜氏藻形狀為圓形或橢圓，大小 4 ~ 11  $\mu\text{m}$  不等。形態與中國渤海沿岸發現的種類、大小略有差異，有學者針對渤海沿岸的綠色杜氏藻進行調查，發現綠色杜氏藻的外形隨環境而變，進而分類出四種，其特徵以藻體有無葉綠體散佈或葉綠體成杯狀為分類依據，再者眼點的位置、有無蛋白核、鞭毛的長短也被納入分類的參考指標 (張等, 2005)。而臺灣的綠色杜氏藻由外形及葉綠體散佈的情況看來，與中國渤海沿岸的第一、二型綠色杜氏藻較為相似。但也有一定的差異性存在，因為特有的生長環境會造成形態上的不同。

因中國渤海沿岸和美國大鹽湖的不同生長環境，衍生出兩種在地化的鹽生杜氏藻，且造成它們對鹽度的耐受性產生差異。與臺灣鹽田分離出的杜氏藻耐鹽度相較之下，中國渤海沿岸採集到的鹽生杜氏藻在鹽度 110‰ 下，藻液接種後，藻色由綠轉淺，且鏡檢發現藻細胞破裂，或是鞭毛脫落

**Table 2** Percentage compositions of fatty acids in five algal species

	Green algae		Diatoms*		Prymnesiophytes*
	RD	BT	SKEL	C.CAL	PAV
18:1n-9	10.1	6.7	1.4	2.8	1.7
18:2n-6	5.5	3.6	0.8	2.2	1.5
18:3n-3	10.9	2.3	0.3	TR	1.8
18:3n-6	1.1	0.2	0.3	0.4	0.4
18:4n-3	2.2	0.2	2.2	0.5	6.0
20:4n-6	1.1	0.2	-	5.7	TR
20:5n-3	4.3	0.2	6.0	11.1	19.7
22:6n-3	0.9	0.2	2.0	0.8	9.4

RD: *Dunaliella salina*; BT: *Tetraselmis marina*; SKEL: *Skeletonema costatum*; C.CAL: *Chaetoceros calcitrans*; PAV: *Pavlova lutheri*; TR < 0.2%

\*Refer to Volkman *et al.* (1989)

造成游動性喪失等現象 (吳等, 2006)。臺灣分離出的鹽生杜氏藻可以生長在鹽度高達 215‰ 的環境下, 且能保持藻細胞完整, 並維持高游動性。馬等 (1992) 指出, 鹽生杜氏藻於不同鹽度下培養, 數日後呈色會有所不同。在 19.5‰ (相當波美計 20° Be') 的環境中接種培養時, 初期藻色呈現綠色, 20 天後, 會轉變成桔紅色。根據室內試驗, 鹽生杜氏藻的最適鹽度為 120‰ (2.04 mol NaCl / L), 綠色杜氏藻為 58 ~ 89‰ (1.0 ~ 1.5 mol NaCl / L); 然而事實上, 在自然環境下, 杜氏藻能耐受的鹽度遠比上述鹽度來得高 (劉與趙, 2004)。Brock (1975) 指出, 杜氏藻常在鹽度 200‰ 以上的鹽湖中居優勢的原因, 不是因為這種鹽度最適於其生長, 而是因為它較其他藻類更能忍受高鹽度。

### 三、β 胡蘿蔔素的檢測

吳等 (2006) 研究表示, 鹽生杜氏藻含豐富的 β-胡蘿蔔素, 最高可達到細胞乾重的 14%。β-胡蘿蔔素為維生素 A 前質 (pro-vitamin A), 可以做為提供維生素 A 的來源, 也可以經由酵素的裂解, 轉化成視網酸 (retinoid); 抑或以其他途徑的類胡蘿蔔素轉換, 形成最終產物還原蝦紅素。根據研究顯示, 常被當作餌料生物的雨生球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 富含還原蝦紅素達細胞乾重的 7.7% (Lamers *et al.*, 2008), 遠比鹽生杜氏

藻測得的 β-胡蘿蔔素含量來得低, 故兩種微細藻的類胡蘿蔔素含量以鹽生杜氏藻的 11% 較佔優勢, 且直接投餵富含 β-胡蘿蔔素的鹽生杜氏藻比起在飼料中添加價格昂貴的還原蝦紅素, 更可以減少飼料成本負擔 (Boonyaratpalin *et al.*, 2001)。

自然界中只有細菌、藻類和高等植物具有合成類胡蘿蔔素的能力 (Weedon, 1971)。動物需藉由食物的攝取而獲得不同形式的色素, 再經由消化代謝轉換, 才能儲存於體內並展現色澤。例如: 大部分的高經濟魚類, 鮭魚、鱒魚等; 有些魚類則利用玉米黃質 (zeaxanthin) 轉換成還原蝦紅素儲存, 例如: 部分淡水魚類, 金魚、錦鯉等; 草蝦、斑節蝦等甲殼類動物, 具有將 β-胡蘿蔔素、玉米黃質等色素轉換成還原蝦紅素的能力, 進而達到體色增豔的效果 (Yamada *et al.*, 1990)。雖然許多種胡蘿蔔素皆可以轉變成還原蝦紅素, 但會因為藻類的細胞壁阻礙其消化吸收, 所以還原蝦紅素被利用的程度會產生差異。相較之下, 將不具細胞壁 (Chidambara Murthy *et al.*, 2005) 的鹽生杜氏藻當成餌料生物投餵, 對消化系統尚未發育完全的水產生物幼苗來說, 是非常容易吸收的開口餌料。

根據 Lamers *et al.* (2008) 所述, 鹽度與溫度的改變會影響鹽生杜氏藻在 β-胡蘿蔔素生產過程中絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase) 的表現, 進而影響藻體中 β-胡蘿蔔素的蓄積。此外, β-胡蘿蔔素儲存於鹽生杜氏藻的脂肪球



內，其蓄積過程也與三酸甘油酯 (triacylglycerol, TG) 合成有相互依存的關係。環境變化帶來的緊迫 (stress) 刺激，例如：強烈光照、高鹽、缺氮等改變，會引發藻體一連串的生理與基因調控，所以環境刺激是調節  $\beta$ -胡蘿蔔素蓄積的重要因素。

#### 四、營養成分分析

根據鹽生杜氏藻與扁藻的成分分析結果 (Table1)，顯示其可作為魚類飼料蛋白的來源。Santiago (1982) 指出，尼羅吳郭魚 (*Oreochromis nilotica*) 苗生長所需之蛋白質為 35%，而鹽生杜氏藻蛋白質含量高達 38.8%，故以鹽生杜氏藻投餵尼羅吳郭魚苗，可滿足其幼苗生長所需。另外，Alava and Lim (1988) 以人工飼料餵食虱目魚 (*Chanos chanos*) 幼苗作為馴餌，飼料需含 41% 的蛋白質來源供應生長，其中 21% 粗蛋白為魚粉；16% 為其他海洋動物或植物蛋白；剩下的 4% 來源為小麥。或許在上述虱目魚幼魚飼料中的其他海洋動物或植物蛋白的 16%，可以鹽生杜氏藻或扁藻完全或部份替代資源有限的蝦粉或含有植酸的黃豆粉。雖然鹽生杜氏藻的蛋白質含量為 38.8%，扁藻的蛋白質含量為 27.5%，均無法完全滿足點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 幼苗的蛋白質需求量 (Millamena and Golez, 2001)，但添加此兩種微細藻作為蛋白質來源，可以藉此降低魚粉使用量，達到減少飼料成本的支出。

脂肪可以提供魚蝦生長能量，也能協助魚蝦體內荷爾蒙合成。若將鹽生杜氏藻作為飼料添加物，藻體高達 14.4% 的粗脂肪不但可以節省飼料蛋白質的需求量也能提高飼料蛋白質的利用率，進一步降低飼料成本。點帶石斑幼苗生長需 10 ~ 13% 的粗脂肪 (Millamena and Golez, 2001)，而鹽生杜氏藻含 14.4% 粗脂肪，可以作為石斑魚幼苗的開口餌料的原料，以提高幼苗的生長與活存率。

#### 五、脂肪酸的比較

魚類無法重新合成 18:3n-3 和 18:2n-6 (Henderson and Tocher, 1987)，故須由食物中獲得含有 n-3 及 n-6 的 PUFA 和 HUFA。不同魚種對於

PUFA 經由去飽和並延長為 HUFA 的能力不同，而能夠將 PUFA 去飽和且延長成 HUFA 的魚種大多為淡水魚，所以多數淡水魚需要較高 n-3 或 n-6 的 PUFA 含量以便轉換成 HUFA。如：吳郭魚的必需脂肪酸 18:3n-3 的需求量為 0.5% (Kanazawa *et al.*, 1982)；日本鰻 (*Anguilla japonicas*) 與虱目魚分別需要 0.5% 的 18:3n-3 和 18:2n-6 (Bautista and de la Cruz, 1988; Satoh *et al.*, 1989)；鯰魚 (*Ictalurus punctatus*) 則需要 1~2% 的 18:3n-3 (Satoh *et al.*, 1989)。臺灣鹽生杜氏藻各含有 10.9% 的 18:3n-3 以及 5.5% 的 18:2n-6，有足夠的必需脂肪酸提供淡水魚種進行 PUFA 去飽和並延長成 HUFA。

在海水魚方面，因體內無法將 PUFA 有效轉換成 HUFA，所以 n-3 或 n-6 的 HUFA 為其必需脂肪酸。本研究測得臺灣鹽田分離出的鹽生杜氏藻藻體有 4.3% 的 EPA、0.9% 的 DHA 及 1.1% 的 ARA，可滿足香魚 (*Plecoglossus altivelus*) 生長的 1% EPA 需求量 (Satoh *et al.*, 1989)，同樣也能提供吉利吳郭魚 (*Tilapia zilli*) 1.0% ARA 的含量 (Kanazawa *et al.*, 1980)。雖然鹽生杜氏藻的 EPA 及 DHA 量相較於其他藻種為低，如：骨藻含有 6.0% 的 EPA 和 2.0% 的 DHA；角毛藻與巴夫藻的 EPA 更分別高達 11.1% 和 19.7% (Volkman, 1989)，但近年來許多研究指出，杜氏藻屬的微細藻能透過環境緊迫刺激來提高藻體中 EPA 和 DHA 的產量。陳等 (2007) 認為藉由環境緊迫刺激來對杜氏藻進行育種，可以獲得更高含量的 HUFA，特別是 EPA 和 DHA 的部分，經環境緊迫刺激的杜氏藻，其 EPA 與 DHA 量可以達 9.06 ~ 13.88%，比未經緊迫培養之杜氏藻的 4.24% 含量高出 2 ~ 3 倍。

分析鹽生杜氏藻的脂肪酸組成，結果發現  $\gamma$ -亞麻酸 (18:3n-6) 的含量為 1.1%，高出骨藻、巴夫藻及角毛藻等微細藻類的 2 ~ 3 倍。 $\gamma$ -亞麻酸為月見草油 (evening primrose oil) 中獨特且含量豐富的脂肪酸，於臨床醫學上，常用來減輕經前症候群 (premenstrual syndrome) 的症狀外，也可預防動脈硬化，治療肝硬化等疾病，故被奉為保健聖品。由此可知，鹽生杜氏藻極具有開發成保健食品的商機潛力。此外，臺灣鹽生杜氏藻也含有 18:4n-3 量為 2.2%，在諸多微細藻類中，僅次於巴夫藻的 6.0%。18:3n-6 及 18:4n-3 兩種脂肪酸，一般可分別由 18:2n-6 及 18:3n-3 經  $\Delta$ 6-



desaturase 轉化而成，進而又再藉由 $\Delta 5$ -desaturase 轉化經延長為 HUFA。不同的魚種間，所擁有的酵素種類不同，其酵素功能以及專一性也會有所不同，例如：大西洋鮭魚 (Atlantic salmon) 同時擁有 $\Delta 6$ -desaturase 與 $\Delta 5$ -desaturase 兩種酵素 (Hastings *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005)；虹鱒 (rainbow trout) 只擁有 $\Delta 6$ -desaturase 的去飽和酵素活性 (Zheng *et al.*, 2004)。如魚種本身在 $\Delta 6$ -desaturase 活性缺乏或活性有限時，適時在魚餌料中添加鹽生杜氏藻，藻體中所富含的 18:3n-6 及 18:4n-6 或許可以滿足魚類之需求，進而可利用 18:3n-6 及 18:4n-6 轉化成 HUFA。

鹽生杜氏藻含 10.11% 的油酸 (18:1n-9)，較其他表列藻類油酸含量高出 1.5 ~ 5.9 倍。對鹽生杜氏藻而言，油酸是藻體中大量蓄積的一種重要脂肪酸，與構成細胞膜的磷脂醯乙醇胺 (phosphatidylethanolamine) 合成、三酸甘油酯 (triacylglycerols) 脂化生成、二醯基甘油 (diacylglycerols) 的儲存有密切的關聯性，尤其在杜氏藻屬中更佔有不可或缺的重要地位 (Fried *et al.*, 1982; Al-Hasan *et al.*, 1987)。根據 Mendoza (1999) 的研究指出，油酸是鹽生杜氏藻的  $\beta$ -胡蘿蔔素球 ( $\beta$ -carotene globules) 中的主要脂肪酸，且當鹽生杜氏藻面臨緊迫環境時，其  $\beta$ -胡蘿蔔素含量與油酸含量呈正相關 ( $r = 0.985, p < 0.05$ ) 的趨勢大幅提高。

## 謝 辭

由衷感謝本所海水繁養殖研究中心葉信利主任以及水試所諸位長官在學術研究上的鼓勵，並感謝臺南動物保護處邢湘琳獸醫、檢驗中心李素雲小姐以及元培科技大學莊路德主任的協助與指教，謹在此獻上最誠摯的謝意。

## 參考文獻

- 馬志珍, 武振彬, 陳匯遠, 王素平, 蔡生力 (1992) 杜氏藻對鹽度的生理反應. 海洋水產研究, 13: 103-115.
- 陳昱, 劉廣發, 周韜 (2007) 7種(13株)杜氏藻的總脂含量和脂肪酸組成. 台灣海峽, 26(4): 516-521。
- 吳春, 段舜山 (2006) 鹽生杜氏藻對鹽度改變的生理影響. 生態科學, 25(2): 135-138.
- 劉亞軍, 趙文 (2004) 杜氏藻的生物學和生態學研究進展. 大連水產學院學報, 19(2): 26-131.
- 蔡卓平, 段舜山 (2008) 杜氏鹽藻和亞心型扁藻混合培養生長的初步研究. 水產科學, 27(7): 330-333.
- 張福, 馬若欣, 呂愛玲, 姜潤林 (2005) 極端嗜鹽綠色杜氏藻生物學特性研究(一). 海湖鹽與化工, 34(1): 25-28.
- Alava, V. R. and C. Lim (1988) Artificial diets for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), fry reared in seawater. Aquaculture, 71: 339-346.
- Al-Hasan, R. H., M. A. Ghannoum, A-K. Sallal, K. H. Abu-Elteen and S. S. Radwan (1987) Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. J. Gen. Microbiol., 133: 2607-2617.
- AOAC International (1995) Official methods of analysis of AOAC International. 2 vols. 16th edition. Arlington, VA, USA, Association of Analytical Communities.
- Azad, A. K., S. McKinley and C. M. Pearce (2010) Factors influencing the growth and survival of larval and juvenile echinoids. Rev. Aquacult., 2: 121-137.
- Bautista, M. N. and M. C. de la Cruz (1988) Linoleic (omega 6) and linolenic (omega 3) acids in the diet of fingerling milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). Aquaculture, 71(4): 347-358.
- Ben Amortz, A., A. Kartz and M. Avron (1983) Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene globules from *Dunaliella bardawil*. J. Phycol., 18: 529-537.
- Brock, T. D. (1975) Salinity and the ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. J. Gen. Microbiol., 89: 285-292.
- Boonyaratpalin, M., S. Thongrod, K. Supamattaya, G. Britton and L. E. Schlipalius (2001) Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. Aquaculture Res., 32 (Suppl. 1): 182-190.
- Chen, J. (2003) Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. SPC Beche-de-mer Inf. Bull., 18: 18-23.
- Chidambara Murthy, K. N., A. Vanitha, J. Rajesha, M. Mahadeva Swamy, P. R. Sowmya and G. A. Ravishankar (2005) *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. Life Sci., 76: 1381-1390.

- Devis, B. M. (1976) Carotenoids: Chemistry and biochemistry of plant pigments, 2nd edition, Vol II. Academic press, London, 248-249.
- Fried, A., A. Tietz, A. Ben-Amotz and W. Eichenberger (1982) Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochim. Biophys. Acta*, 713: 419-426.
- Guillard, R. R. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. In: Smith, W. L., Chanley, M. H. (eds.) Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York, p.29-80.
- Hastings, N., M. K. Agaba, D. R. Tocher, X. Zheng, C. A. Dickson, J. R. Dick, and A. J. Teale (2004) Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from  $\alpha$ -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Biotechnol.* (NY), 6(5): 463-474.
- Henderson, R. J. and D. R. Tocher (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish, *Prog Lipid Res.*, 26(4): 281-347.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, R. R. Kumar, V. Ganesan and C. Anbazhagan (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 1737-1746.
- Hu, C. C., J. T. Lin, F. J. Lu, F. P. Chou and D. J. Yang (2008) Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chem.*, 109: 439-446.
- Ichimi, K., T. Kawamura, A. Yamamoto, K. Tada and P. J. Harrison (2012) Extremely high growth rate of the small diatom *Chaetoceros salsugineum* isolated from an estuary in the eastern Seto Inland Sea, Japan. *J. Phycol.*, 48: 1284-1288.
- Kanazawa, A., S. Teshima, M. Sakamoto and Md. A. Awal (1980) Requirements of *Tilapia zillii* for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46: 1353-1356.
- Kanazawa, A., S. Teshima and M. Sakamoto (1982) Requirements of essential fatty acids for the larval ayu. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48: 586-590.
- Lamers, P. P., M. Janssen, R. C. H. de Vos, R. J. Bino and R. H. Wijffels (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol.*, 26: 631-638.
- Lamers, P. P., C. C. W. van de Laak, P. S. Kaasenbrood, J. Lorier, M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino and R. H. Wijffels (2010) Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Bioeng.*, 106: 638-648.
- Leliaert, F., R. S. David, M. Hervé, D. H. Matthew, V. Heroen, F. D. Charles and D. C. Olivier (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Rev. Plant Sci.*, 31:1-46.
- Mendoza, H., A. Martel, M. Jimenez del Rio and G. G. Reina (1999) Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.*, 11: 15-19.
- Millamena, O. M. and N. N. Golez (2001) Evaluation of processed meat solubles as replacement for fish meal in diet for juvenile grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton). *Aquac. Res.*, 32: 281-287.
- Moniz, M. B. J. and I. Kaczmarek (2009) Barcoding diatoms: Is there a good marker? *Mol. Ecol. Resour.*, 9: 65-74.
- Nanton, D. A. and J. D. Castell (1999) The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 175: 167-181.
- Oren, A. (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1:2.
- Priyadarshani, I. and B. Rath (2012) Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utiln.*, 3: 89-100.
- Preetha, K., L. John, C. S. Subin and K. K. Vijayan (2012) Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquat. Biosystems*, 8: 27.
- Santiago, C. B., M. Banes-Aldaba and M. A. London (1982) Dietary crude protein requirement of *Tilapia nilotica* fry. *Kalikasan Philipp. J. Biol.*, 11, 255-265.
- Satoh, S., W. E. Poe and R. P. Wilson (1989) Studies on the essential fatty acid requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 79: 121-128.
- Sargent, J. R., D. R. Tocher and J. G. Bell (2002) The lipids, *In Fish Nutrition*, 3rd edition (Halver, J. E. and R. W. Hardy, eds.), Academic Press, San Diego, 181-257.
- Shpigel, M., S. C. Schlosser, A. Ben-Amotz, A. L. Lawrence and J. M. Lawrence (2006) Effects of dietary carotenoid on the gut and the gonad of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 261: 1269-1280.
- Supamattaya, K., S. Kiriratnikom, M. Boonyaratpalin and L. Borowitzka (2005) Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition,

- immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 248: 207-216.
- Tocher, D. R. (2010) Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Res.*, 41: 717-732.
- Wang, F., J. Feng and S. Xie (2014) Phylogenetic and morphological investigation of a *Dunaliella* strain isolated from Yuncheng Salt Lake, China. *Plant*, 2: 20-26.
- Volkman, J. K., S. W. Jeffrey, P. D. Nichols, G. I. Rogers and C. D. Garland (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 128: 219-240.
- Weedon, B. C. L. (1971) Occurrence. *In* Carotenoids (Isler, O, ed), Birkhauser Verlag, Basel, 29-59.
- Wikfors, G. H. and G. W. Pattersonb (1994) Differences in strains of *kwchryszk* of importance to mariculture. *Aquaculture*, 123: 127-135.
- Yamada, S., Y. Tanaka, M. Sameshima and Y. Ito (1990) Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. 1. Effect of dietary astaxanthin, beta-carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, 87: 323-330.
- Zheng, X., I. Seiliez, N. Hastings, D. R. Tocher, S. Panserat, C. A. Dickson, P. Bergot and A. J. Teale (2004) Characterisation and comparison of fatty acyl  $\Delta 6$  desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 139: 269-279.
- Zheng, X., D. R. Tocher, C. A. Dickson, J. R. Dick, J. G. Bell and A. J. Teale (2005) Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a delta6 desaturase of Atlantic salmon. *Lipids*, 40: 13-24.

## Isolation, Characterization and Nutritional Analysis of Three Microalgae from Salt Pans in Taiwan

Chieh-Ju Lin<sup>1</sup>, Feng-Cheng Wu<sup>1</sup>, Meng-Chou Lee<sup>2</sup> and Te-Hua Hsu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Mariculture Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Department of Aquaculture, National Pingtung University of Science and Technology

<sup>3</sup>Center of Excellence for the Oceans, National Taiwan Ocean University

### ABSTRACT

Three strains of green microalgae from the Jing-Zai-Jiao salt pans situated at Beumen in Tainan, Taiwan, were isolated, purified, and marked as RD, GD, and BT. Investigation through optical microscopy at the cellular level and through phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region rDNA sequences of *Dunaliella* and *Tetraselmis* indicated that the BT strain was *Tetraselmis marina* (Cienkowski), the GD strain was *Dunaliella viridis* (Téodoresco) and the RD strain was *Dunaliella salina* (Téodoresco). Nutritional analysis revealed that the crude protein contents of RD, GD and BT were 38.8%, 39.4% and 27.5%, respectively, while their crude lipid contents were 14.4%, 15.2% and 3.4%, respectively. The results indicated that the RD and GD provided significantly higher amounts of crude protein and crude lipid content to fry for rapid growth than the BT did. By extraction, the dry weight yield of  $\beta$ -carotene in the RD was found to be 11 %, while its fatty acid composition was 10.1 % oleic acid (18:1n-9), 10.9%  $\alpha$ -linolenic acid (18:3n-3), 5.5% linoleic acid (18:2n-6) and 1.1%  $\gamma$ -linolenic acid (18:3n-6).

**Key words:** salt pans, *Dunaliella*, *Tetraselmis*, carotenoids, halotolerance

---

\*Correspondence: Center of Excellence for the Oceans, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan 20224  
TEL: (02) 24991696; E-mail: realgigi@gmail.com