

温度、光照与盐度对雨生红球藻诱变株虾青素累积的调控

蒋霞敏, 柳敏海, 沈芝叶

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:以 MAV 培养基为基本培养基, 以雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 诱变株 1 号为研究材料, 进行物理因子对雨生红球藻虾青素累积的调控实验。温度梯度为 15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃ 和 35 ℃; 光照梯度为黑暗、1 000 lx、2 000 lx、4 000 lx、6 000 lx 和 8 000 lx; 盐度设 0、4、8、12、16 和 20。进行单因子的胁迫实验, 测定各组的虾青素含量和藻密度, 结果显示, 雨生红球藻生长的最适条件为温度 15~20 ℃, 光照 1 000~2 000 lx, 盐度 0。虾青素累积量最高时的温度为 25~30 ℃, 光照为 8 000 lx, 盐度为 4~8。进一步进行盐度、光照的两因素胁迫正交实验, 并检验两者的交互作用。其中盐度设 4、8、12 三个水平, 光照强度设 6 000 lx、8 000 lx、10 000 lx 三个水平。结果光照为 8 000 lx、盐度为 8 时获得最高的虾青素含量, 其交互作用非常显著。

关键词:雨生红球藻; 温度; 光照; 盐度; 虾青素累积

中图分类号:Q949.29 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)06-0714-06

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种单细胞双鞭毛绿藻, 它属于绿藻门 (Chlorophyta)、绿藻纲 (Chlorophyceae)、团藻目 (Volvocales)、红球藻科 (Haematococcaceae)、红球藻属 (*Haematococcus*)。经研究证实该藻细胞中的虾青素含量很高, 可达细胞干重的 4.0%, 是用来获得天然虾青素的理想材料^[1]。

经研究发现, 雨生红球藻累积虾青素是为了保护自身细胞免受氧化作用和高光强的伤害, 维持细胞的生存。因此, 在培养过程中对藻加以胁迫作用 (一般是不利于藻生长的条件) 能诱导其产生虾青素。目前已有报道^[1-7], 环境因子和营养条件可诱导雨生红球藻累积虾青素。但由于所用藻种有所不同, 因此得出的数据也各有不同。本实验的研究材料是经紫外诱变后的雨生红球藻藻种, 它们累积虾青素的能力较未经诱导的藻株更强^[8]。本次实验的主要目的是研究诱变株在温度、光照和盐度的胁迫作用下迅速促使虾青素的累积, 为雨生红球藻的大规模培养提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻种与培养基

雨生红球藻藻种由宁波大学海洋与水产系藻种室提供, 共有 3 组藻。未经诱变的对照藻, 经紫外辐

射诱导的雨生红球藻 1 号和 2 号。雨生红球藻诱变株 1 号的生长速率一直比其他组高, 所以筛选 1 号作为虾青素调控的实验对象。所有实验都使用 MAV 培养基^[8], MAV 母液的配方: KNO₃ 100 g; KH₂PO₄ 10 g; FeSO₄·7H₂O 2.5 g; MnSO₄ 0.25 g; EDTA-Na₂ 10 g; V_{B1} 6 mg; V_{B12} 50 μg; 消毒淡水 1 000 mL。培养液则是由母液与消毒淡水的体积比为 1:1 000 配置而成。

1.2 诱导虾青素累积

1.2.1 接种方法 取指数生长期的藻离心, 加消毒淡水清洗再离心, 重复 2 次。接种到 100 mL 的三角烧瓶中。每个梯度设 3 个平行对照组。

1.2.2 温度对虾青素累积的胁迫作用 设置 5 个温度梯度: 15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃ 和 35 ℃。用 RS408-D 型加热棒进行恒温控制, 日光灯光照, 光照强度为 3 500 lx, 光照周期为 12 L:12 D。每组温差变化为 ±1 ℃。接种时藻密度为 6.923×10^4 mL⁻¹。8 d 后测定藻密度及虾青素含量。

1.2.3 光照强度对虾青素累积的胁迫作用 设置黑暗、1 000 lx、2 000 lx、4 000 lx、6 000 lx 和 8 000 lx 6 个光照梯度, 日光灯光照, 光周期为 12 L:12 D, 温度为 (20 ± 1) ℃。接种时藻密度为 7.303×10^4 mL⁻¹。8 d 后测定藻密度及虾青素含量。

收稿日期: 2004-12-08; 修订日期: 2005-03-18。

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (301208); 玉环县科技计划项目 (200411 号)。

作者简介: 蒋霞敏 (1957-), 女, 教授, 主要从事水产养殖与饲料生物培养。Tel: 0574-87148553。E-mail: jiangxiamin@sina.com.cn

1.2.4 盐度对虾青素累积的胁迫作用 设置6个盐度梯度:0、4、8、12、16和20。培养条件:温度(20±1)℃,日光灯光照,强度为6 000 lx,光周期为12 L:12 D。接种时藻密度为 $5.637 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。8 d后测出藻密度和虾青素含量。

1.2.5 光照强度和盐度的正交实验 设两因素3个水平,即光照强度6 000 lx、8 000 lx、10 000 lx;盐度设4、8、12。将藻培养在(25±1)℃的室温下。6 d后测出藻密度及虾青素含量。接种时藻密度为 $4.917 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。实验用的正交表为 $L_9(3^4)$ 。

1.3 生长速率和虾青素含量测定方法

1.3.1 藻密度的测量 用自制的浮游生物计数框进行藻的计数,每瓶测3次,取其平均值。

1.3.2 生长速率的测定^[9] 用752型紫外光栅分光光度计在波长为674 nm下测定藻活体叶绿素的吸光值 A_{674} ,根据3个平行组的平均值作为该次测得的藻密度。生长速率(μ)用下列公式计算:

$$\mu = (\ln N_{t_2} - \ln N_{t_1}) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

式中, μ 为生长速率, N_{t_2} 为 t_2 时间的 A_{674} 值, N_{t_1} 为 t_1 时间的 A_{674} 值。

1.3.3 虾青素含量测定 取出10 mL藻液进行离心,然后用5% KOH+30%甲醇破坏叶绿素5 min,离心弃去上清液收集到藻体进行研磨。研磨5 min后在30℃加入10 mL的二甲基亚砜(DMSO),一直抽提到藻体变白,用752紫外光栅分光光度计在490 nm

下测定虾青素含量 A_{490} 。单位体积雨生红球藻的虾青素含量^[10]用下列公式计算:

$$C(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 4.5 \times A_{490} \quad (2)$$

1.3.4 虾青素合成K值的换算 虾青素的含量测定以后,用公式(3): $K = (\lg N_t - \lg N_0) / t$ 换算成虾青素的合成速率K值,用K值来进行相关数据分析和制图(其中K表示虾青素合成速率, N_t 表示接种第t天虾青素的含量, N_0 表示接种第1天的虾青素含量)。

2 结果与分析

2.1 光照强度的胁迫作用

由于虾青素呈鲜红色,因此在8 d后各组不同梯度的藻液颜色产生了很大的差别。其中黑暗组的藻呈绿色,且藻体有沉积的现象;光强为1 000 lx和2 000 lx的藻液为黄绿色,从4 000 lx开始出现变红,而8 000 lx组藻液已呈鲜红。在显微镜下检查细胞的形态时发现,颜色越红的藻液中的不动细胞越多。通过对胁迫作用后的藻进行计数测定其藻密度后以及其虾青素含量(图1和图2),分析认为,光强为2 000 lx时,藻密度最大;而当光强为8 000 lx时,雨生红球藻累积的虾青素含量最高($1.451 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。对所得数据进行方差分析得 $F > F_{0.01}$,各水平间差异非常显著。

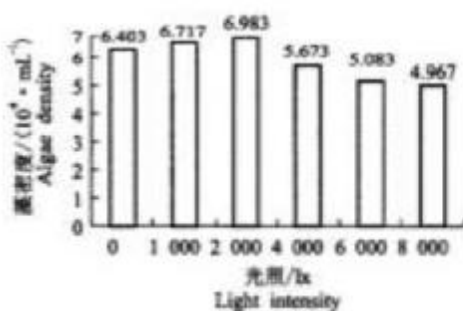


图1 光照对雨生红球藻生长的影响

Fig.1 Effects of illumination on growth in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

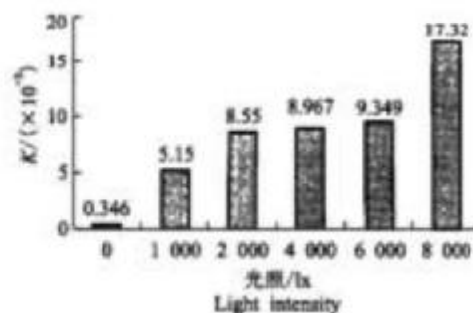


图2 光照对雨生红球藻虾青素累积的影响

Fig.2 Effects of illumination on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

2.2 温度的胁迫作用

在实验过程中发现,实验进行3 d后,35℃组的藻数量明显减少,35℃和30℃温度的藻细胞出现贴壁现象。在实验结束时发现,15℃下的藻液仍为

绿色,20℃和35℃组藻液的颜色仅为黄绿色,而25℃和30℃这两组的藻液颜色变化明显,呈红色。测出的藻密度和虾青素含量见图3和图4。从图3可见,20℃时藻密度最高,高于20℃组随着温度的

升高,藻密度逐渐下降。而 25℃ 虾青素累积量最大为 1.341 L^{-1} 。因此可得,在 25℃ 左右为虾青素累积

的最好温度。对实验所得的虾青素累积 K 值的数据进行方差分析得 $F > F_{0.05}$,各水平间差异非常显著。

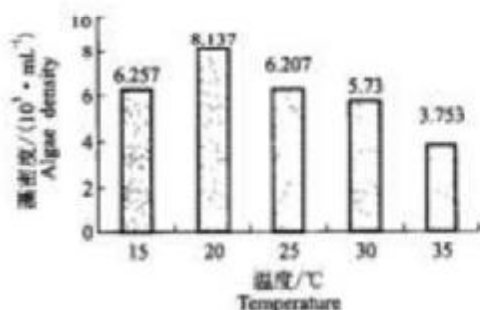


图3 温度对雨生红球藻生长的影响

Fig.3 Effects of temperature on growth in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

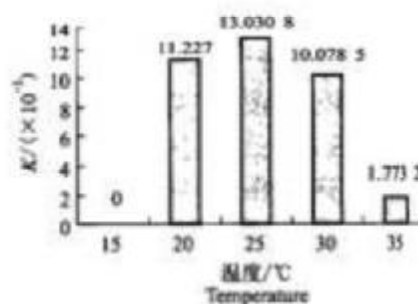


图4 温度对雨生红球藻虾青素累积的影响

Fig.4 Effects of temperature on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

2.3 盐度的胁迫作用

实验发现,除了盐度为0的对照组外,其他盐度梯度下的藻液颜色都明显变红,盐度越高组分的藻液颜色越红,但同时藻密度也随着盐度的增加而明显减少。在显微镜下发现,藻细胞都由游动细胞转化成不动细胞。但相对上两种胁迫条件,盐度的胁迫

速度较快,接种2 d后藻液颜色开始变红;6 d后即出现明显梯度差异。6 d后对实验组进行藻密度及虾青素含量的测定(图5和图6)。盐度为4时,藻所累积的虾青素含量最高,且对数据进行方差分析得 $F > F_{0.05}$ 。不同梯度的盐度对虾青素累积的影响非常显著。

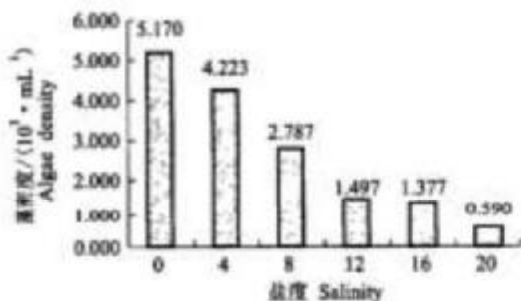


图5 盐度对雨生红球藻生长的影响

Fig.5 Effects of salinity on growth in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

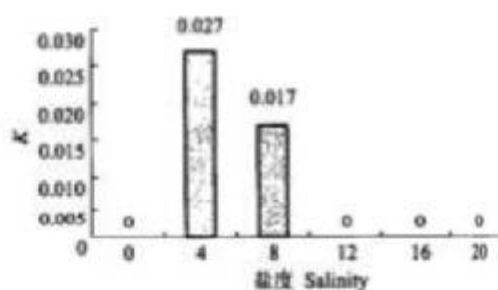


图6 盐度对雨生红球藻虾青素累积的影响

Fig.6 Effects of salinity on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

2.4 盐度和光照的正交实验

盐度和光照两因子作用下诱导速度变得更快。接种第2天藻液就开始变红,到第6天藻液颜色梯度就十分明显。6 d后测出其藻密度(图5)和虾青素含量(表1)。用公式(3)将虾青素含量换算成 K 值(表1),然后对实验数据进行统计分析(表2)。

由表2可得,无论是光照、盐度还是两者的交互作用,对虾青素的累积效果都十分有效,尤其是两者的交互作用非常显著。将虾青素 K 进行比较(表

3),可见光照为 8 000 lx,盐度 8 时,虾青素的累积速率最快。

3 讨论

3.1 强光对雨生红球藻诱变株生长和虾青素累积的影响

从图1可看出,雨生红球藻诱变株在 1 000~2 000 lx 光强下生长最好,在强光的胁迫作用下,虽然从 4 000~8 000 lx 组的藻的个数呈下降趋势,但

表1 盐度和光照正交实验表 $L_9(3^4)$ 、虾青素含量及虾青素合成 K 值Tab.1 Orthogonal experiment table $L_9(3^4)$ of salinity and illumination, astaxanthin content and K value of astaxanthin accumulation velocity

试验号 Trial no.	A	B	A×B	A×B	测得虾青素含量/(mg·L ⁻¹) Astaxanthin content			虾青素合成 K 值($\times 10^{-3}$) K value of astaxanthin accumulation velocity($\times 10^{-3}$)		
1	1	1	1	1	0.670 5	0.706 5	0.769 5	-1.02	2.767	8.95
2	1	2	2	2	0.436 5	0.490 5	0.490 5	-32.09	-23.64	-23.64
3	1	3	3	3	0.490 5	0.472 5	0.414	-23.64	-26.35	-35.94
4	2	1	2	3	0.382 5	0.355 5	0.396	-41.65	46.94	-39.14
5	2	2	3	1	1.215	1.192 5	1.197	42.011	40.658	40.931
6	2	3	1	2	0.607 5	0.63	0.544 5	-8.16	-5.53	-16.09
7	3	1	3	2	1.503	1.044	1.062	57.408	31.032	32.269
8	3	2	1	3	0.670 5	0.697 5	0.738	1.02	1.839	5.925
9	3	3	2	1	0.301 5	0.288	0.342	-58.87	-62.19	-49.75

注:A表示光照强度,B表示盐度,A×B为光照强度和盐度的交互作用。

其中列A为光照强度的3个水平(1:6 000 lx;2:8 000 lx;3:10 000 lx);

列B为盐度的3个水平(1:4;2:8;3:12)

Note: A: Illumination; B: Salinity; A×B: Interaction of illumination and salinity.

Line A delegated three levels of illumination (1:6 000 lx; 2:8 000 lx; 3:10 000 lx).

Line B delegated three levels of salinity(1:4;2:8;3:12).

表2 盐度和光照正交实验方差分析表

Tab.2 Variance analysis of salinity vs light intensity

诱导因素 Factor	平方和($\times 10^{-6}$) Square sum	自由度 Free limit	均方($\times 10^{-6}$) Equal square	F	临界F值 Critical F
光照(A) Illumination	1 003.031	2	501.515	11.00	$F_{0.01(2,18)}=6.01$
盐度(B) Salinity	7 411.186	2	3 705.593	81.30	$F_{0.01(2,18)}=6.01$
光、盐交互作用(A×B) Interaction	19 616.909	4	4 904.227	107.60	$F_{0.01(4,18)}=2.93$
误差(e) Error	820.422	18	45.579		
总T值 T value	28 851.547	26			

表3 光照和盐度交互实验中虾青素合成速率

Tab.3 Astaxanthin accumulation velocity in interaction experiment of salinity and illumination $\times 10^{-3}$

	A1	A2	A3
B1	3.683	42.503	31.652
B2	-26.351	41.202	2.305
B3	-28.449	9.787	-56.741

注:A1、A2和A3分别表示光照强度的3个水平:6 000 lx、8 000 lx和10 000 lx;

B1、B2和B3分别表示盐度的3个水平:4、8和12。

Note: A1, A2 and A3 separately delegated light intensities of 6 000 lx, 8 000 lx and 10 000 lx.

B1, B2 and B3 separately delegated salinities of 4, 8 and 12.

总体虾青素含量却不断上升。这个结果进一步证实了高光强能诱导雨生红球藻产生虾青素的观点。雨生红球藻虾青素累积量在黑暗的条件下最少,在高光强条件下累积量不断增加。由此可以证明,藻细

胞内虾青素的累积是为了保护细胞中的叶绿体免受强光的伤害,是细胞抵抗环境胁迫,维持种群生存的一种自我保护措施^[11]。本实验进一步证明高光强对虾青素合成的胁迫作用非常有效。

3.2 温度对雨生红球藻诱变株生长和虾青素累积的影响

高温(30~35℃)不但有利于藻细胞生长,而且也不利于虾青素的累积,与预期的高温有利于虾青素累积不符。20℃是诱变株藻生长的最佳温度,这个结果与邱保胜等^[3]所得雨生红球藻最佳生长温度为19~22℃的结论相同。在高温下,藻细胞数大量减少,而且其诱导虾青素累积的效果并不是很明显。这可能是因为高温降低了虾青素合成途径中的关键酶(PSY和CRT-B)^[13]的活性,结果反而抑制了虾青素的合成,实验结果显示,累积虾青素的最佳温度为25℃。

3.3 盐度对虾青素累积的影响

从图5发现,盐度的增加伴随着藻浓度的不断下降,由此可见盐度不利于雨生红球藻诱变株的生长。虽然如此,但在盐度4和8这两个梯度下,虾青素累积量比原来增多。在盐度的胁迫下,雨生红球藻累积虾青素的速度较温度和光照要快。这可能是因为盐度相对于温度和强光更不利于藻的生存,因此能诱导雨生红球藻更快的累积虾青素,这就更加证实了虾青素是雨生红球藻合成用来抵抗不良环境的理论。

3.4 盐度和光照的协同作用

盐度和光照两因子同时作用时,发现诱导产生虾青素的速度比这两者任何一个单因子的胁迫速度都快,说明这两因子在诱导产生虾青素时有协同作用。而且数据统计分析的结果证实了两者的交互作用非常显著,由此证明盐度和光照之间具有协同作用,而且作用非常明显。

本实验发现,温、光、盐物理因子对雨生红球藻诱变株虾青素的累积都有着显著的作用,尤其是光照和盐度的诱变作用,两者的交互作用更为明显。这些因子都是不利于藻细胞生长的条件,却能促使细胞转变成静细胞,形成胞囊,累积虾青素,与最近的实验报道相符^[13-14]。

4 结论

温度、光照和盐度对雨生红球藻诱变株虾青素累积的胁迫作用非常明显。当温度为25℃、光照为8000 lx、盐度为4时,这3个因素的单因素实验中,雨生红球藻诱变株累积虾青素的速率分别为最高。不仅如此,当光照与盐度同时作用时,将产生更为显著的诱导效果,当光照8000 lx和盐度8时,藻累积虾青素的速率最快,此时两者的交互作用最为显著。同时,紫外辐射既能增强雨生红球藻诱变株的生长量,又能增强其累积虾青素的能力。

参考文献:

- [1] 魏东, 戚晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J]. 中国海洋药物, 2001(5): 4-8.
- [2] Gouveia L, Renna P, Pereira O, et al. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass[J]. *Aqua Nutr*, 2003, 9(2): 123-129.
- [3] 邱保胜, 刘其芳. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* 68)培养条件研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1999, 33(1): 112-118.
- [4] 叶勇, 应巧兰. 雨生红球藻3个株系的生长及对光盐反应初探[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 33-36.
- [5] 庄惠如, 卢海声, 陈必健, 等. 雨生红球藻培养细胞的虾青素累积[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 376-380.
- [6] Dominguez-Bocanegra A R, Guerrero Laguerre I, Martinez Jeronimo F, et al. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. *Bioresour Technol*, 2004, 92(2): 209-214.
- [7] Bing Wang, Zaria Aliza, Trebst Achim, et al. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) as an active photoprotective process under high irradiance[J]. *J Phycol*, 2003, 39(6): 1116-1124.
- [8] 蒋霞敏, 蔡兴文, 王 蔚, 等. 雨生红球藻对外界辐射的生理适应及超微结构变化[J]. 水产学报, 2003, 27(2): 106-112.
- [9] 庄惠如, 陈必健, 陈 荣, 等. 雨生红球藻的紫外、蓝光复合诱变育种[J]. 微生物学报, 2001, 10(2): 135-139.
- [10] Sammy Boumiba, Avigad Vorebak. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32(7): 1077-1082.
- [11] Margalith P Z. Production of ketocarotenoids by microalgae[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 431.
- [12] Grunewald K, Hirschberg J, Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 6023-6029.
- [13] Tripathi U, Sarda R, Ramachandra R, et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media[J]. *Bioresour Technol*, 1999, 68: 197-199.
- [14] Hagen C, Grunewald K, Xylander M, et al. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in filamentous cells of *Haematococcus pluvialis*[J]. *J Appl Phycol*, 2001, 13: 79-87.

Effects of temperature, illumination and salinity on astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* aberrant species

JIANG Xia-min, LIU Min-hai, SHEN Zhi-ye

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Astaxanthin, a kind of secondary carotenoid, is widely used in health care and feed industry for its hyperploid antioxidative and good colouration. Its enormous market potential wins the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* extensive attention from algologists home and abroad. *H. pluvialis* is the microalga being that claims the highest astaxanthin content. Researches on it have lasted a few decades. However, most of those researches were concentrated on basic cultivation and causation of astaxanthin accumulation. In *H. pluvialis* industry, how cultivation conditions affect the astaxanthin accumulation of *H. pluvialis* takes up a significant place. A great number of algologists have applied themselves to this question but have arrived at no universal answer. So the author of this thesis takes into consideration temperature, illumination and salinity, the effects of which on the astaxanthin accumulation have been studied. *Haematococcus pluvialis* aberrant species No.1 was cultivated in the MAV medium. The influence of the physical factors (temperature, illumination and salinity) on the astaxanthin accumulation was analysed. First, these experiments were carried out separately as three single factor tests when five grades (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C and 35 °C) of the temperature, six grades (0, 1 000 lx, 2 000 lx, 4 000 lx, 6 000 lx and 8 000 lx) of the illumination and six grades (0, 4, 8, 12, 16 and 20) of salinities were set. The results showed that: the best conditions for the growth of the algae was 15–20 °C, 1 000–2 000 lx of the illumination and 0 of the salinity, while the most excellent conditions respectively for the astaxanthin accumulation was that when the temperature ranged from 25 °C to 30 °C, and illumination was 8 000 lx and the salinity ranged from 4 to 8. Then an interaction test between the temperature and the salinity was carried out, and each factor was set with three levels. The illumination was 6 000 lx, 8 000 lx and 10 000 lx while the salinity was 4, 8 and 12. The final results indicated that 8 000 lx of the illumination interacted with 8 of the salinity was the most excellent conditions for the astaxanthin accumulation.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; temperature; illumination; salinity; astaxanthin accumulation