

# 茴香醚对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* LUGU) 虾青素积累的影响

丁巍,尚敏敏,赵鹏,徐军伟,李涛,余旭亚\*  
(昆明理工大学生命科学与技术学院,云南昆明 650500)

**摘要:**利用不同诱导条件促进雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 积累虾青素已成为虾青素生产和研究的热点。实验研究了不同质量浓度的茴香醚(BHA)对胁迫培养条件下雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 生长和虾青素积累的影响。结果表明,2 mg/L 的 BHA 能够显著提高虾青素的含量,最大含量可达 29.03 mg/g,比对照组(14.30 mg/g)提高到 2.03 倍。而在相同的茴香醚诱导条件下,初始藻细胞的不同生长状态对细胞的生长及虾青素的合成也有很大的影响:处于对数生长期后期(14 d)的细胞更有利于虾青素的积累,其最大虾青素含量达到 29.3 mg/g,分别比前期、中期和稳定期提高到 2.9、1.01 和 1.72 倍。实验表明茴香醚是虾青素诱导的有效诱导子,本研究也可作为两阶段法诱导生产虾青素提供依据。

**关键词:**雨生红球藻,虾青素,茴香醚(BHA),不同生长状态

## Butyl hydroxyanisole induced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* LUGU

DING Wei, SHANG Min-min, ZHAO Peng, XU Jun-wei, YU Xu-ya\*

(Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** *Haematococcus pluvialis* is a potential source for astaxanthin accumulation under the unfavorable condition, which has gained more and more attention in recent years. In this paper, different concentration of Butyl hydroxyanisole (BHA) were studied for their affection the production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* LUGU. The results indicated that the 2 mg/L BHA was optimal for astaxanthin production with 29.03 mg/g, which was 2.03 times that of the control (14.30 mg/g). Moreover, the accumulation of astaxanthin in the algae cells, which were in the late-exponential growth phase (14 d), reached the highest production of 29.3 mg/g (2.9, 1.01 and 1.72 times than that of other cells). The result showed the BHA was an effective inductor for astaxanthin accumulation and the different condition of algae cells was important for astaxanthin production with two-stage strategy.

**Key words:** *Haematococcus pluvialis* LUGU; astaxanthin; Butyl hydroxyanisole (BHA); different growth phase

中图分类号:TS202.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)19-0162-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.19.023

虾青素(Astaxanthin)是一种具有较强氧自由基清除能力的类胡萝卜素,其抗氧化性分别是类胡萝卜素以及维生素E抗氧化性的10和550倍<sup>[1-2]</sup>,并在医药和食品等行业具有极高的开发潜力和经济价值<sup>[3-5]</sup>。目前,天然虾青素的来源主要有3种:水产品废弃物、雨生红球藻和红发夫酵母<sup>[6]</sup>。然而水产品废弃物(甲壳类动物壳等)和红发夫酵母提取成本高,虾青素纯度和产量也较低<sup>[7-9]</sup>;相比之下,雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)因其生长周期短、培养条

件易控制且虾青素含量较高,最高占细胞干重的4%<sup>[10]</sup>,被认为是天然虾青素的最佳来源。但如何利用和改善诱导条件以达到更高效的积累虾青素的目的,仍是虾青素生产和研究中的热点<sup>[11]</sup>。

利用不同的植物激素作为诱导子促进雨生红球藻积累虾青素发现,在适当浓度诱导子的诱导下,虾青素积累量可以得到明显的提高<sup>[12-14]</sup>。茴香醚(Butyl Hydroxyanisole, BHA)是一种常见的抗氧化剂, Franz 等人<sup>[15]</sup>将其作为诱导子研究对次级代谢产物

收稿日期:2016-04-21

作者简介:丁巍(1993-),男,硕士研究生,研究方向:微藻资源研究,E-mail:dingweikmust@163.com。

\*通讯作者:余旭亚(1969-),男,博士,教授,主要从事生物炼制研究,E-mail:xuya\_yu@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21266013)。

积累的影响,结果表明,微量的外源 BHA 能够提高产油微藻细胞内油脂的产量。由此推测,BHA 对雨生红球藻中虾青素的积累可能具有一定的影响。

本文以雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* LUGU) 作为研究对象,研究了不同浓度的 BHA 诱导条件以及相同诱导条件下,不同种子液状态对藻细胞生长和虾青素产量的影响,为虾青素的生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

茴香醚 (BHA) TCI(上海)化成工业发展有限公司; DMSO  $\geq 99.5\%$ , KOH  $\geq 99.5\%$ , 甲醇(分析纯) 北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

显微镜 XS-212-202 JNOEC; 超净工作台 VS-840-1 上海博讯; 冷冻干燥机 FD5-12 SIM International Group; 紫外可见分光光度计 (Ultrospec 2100pro) Amersham Biosciences; 灭菌锅 LDZX-50KBS 上海申安; 分析天平 FA2004N 上海菁海; 水浴锅 HHW-D6 金坛双捷; 离心机 5804R Eppendorf; 高速冷冻离心机 1730R LabogeneScanspeed; 超声波微波组合体系 DS-8510DTH 上海生析。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 雨生红球藻的培养** 雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 本实验室筛选、保存。BBM (Bold's Basal Medium)<sup>[16]</sup> 为基础培养基,取保藏于试管中的藻种,接种到 3 L (内置 2 L 培养基) 光生物反应器中,室内恒温 ( $25 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 2800 lx, 通入 0.1 vvm 的无菌空气进行培养,直至培养到指数中期 (12 d, 约  $6.5 \times 10^5$  cells/mL)。

**1.2.2 茴香醚处理** 将培养至指数中期的种子液  $3800 \times g$  离心 5 min,用无菌水洗去营养盐,然后把藻液沉淀重新悬浮到 BBM 缺氮培养基中, (接种量约为  $2 \times 10^5$  Cell/mL,培养基总体积为 400 mL)。用 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 溶解 BHA 作为母液,将不同体积的 BHA 母液添加到缺氮的 BBM 培养基诱导培养,使诱导培养基中添加 BHA 质量浓度分别为  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Control)、2 mg/L、4 mg/L 和 8 mg/L (保持 DMSO 加入量相等),每组设 3 个平行样。持续鼓入 0.4 vvm 的含 1.5% 二氧化碳的无菌空气,24 h 8000 lx 光照,置于  $27 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  室内培养 15 d,以诱导藻细胞积累虾青素。每隔 1 d 取样一次,测定 *H. pluvialis* LUGU 虾青素含量和生物量。

**1.2.3 种子液的不同生长状态对相同诱导条件下细胞生长和虾青素积累的影响** 按照营养细胞积累次级代谢产物的生长曲线<sup>[17]</sup>,分别在对数生长期前期阶段 (4 d)、对数后期 (14 d)、稳定期 (18 d),加入 1.2.2 中最佳浓度 BHA,每组设三个平行样。持续鼓入 0.4 vvm 的含 1.5% 二氧化碳的无菌空气,24 h 8000 lx 光照,置于 ( $27 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  室内培养 15 d,以诱导藻细胞积累虾青素。每隔 1 d 取样一次,测定 *H. pluvialis* LUGU 虾青素含量和生物量。

**1.2.4 虾青素含量和生物量浓度的测定** 为了测定基础培养基中培养的 *H. pluvialis* LUGU 虾青素的产

量,采用 Boussiba 等<sup>[18]</sup> 的方法稍加改进测定其虾青素含量。每隔 1 d 定期取出 5 mL 处于诱导阶段的藻液,5000 r/min 离心 5 min,弃上清液。于收集的藻细胞沉淀中加入 5% KOH 和 30% 甲醇混合液置于 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅内 5 min 以破坏叶绿素,5000 r/min 离心收集沉淀,加入 3 mL 二甲亚砜 (DMSO),利用超声波破壁 (20 s/5 s,输出功率 40 W),反复抽提直至藻体发白后,高速离心机 10000 r/min 离心 10 min,取上清液于 490 nm 下测定 OD 值。

$c(\text{mg/L}) = (4.5 \times A_{490} \times V_a) / V_b$  计算虾青素含量 ( $c$ : 虾青素浓度,  $A_{490}$ : 490 nm 下测定 OD 值,  $V_a$ : DMSO 的体积,  $V_b$ : 藻液体积)。另外,每隔一天定期取出 50 mL 处于诱导阶段的藻液 5000 r/min 离心 10 min,  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  冷冻、干燥、称重,具体计算如下:  $\text{DBW}(\text{g/L}) = \text{WA}(\text{g}) / \text{V}(\text{L})$ , ( $\text{DBW}$ : 藻细胞生物量浓度;  $\text{WA}$ : 藻粉干重 (g);  $\text{V}$ : 藻液体积 (L))。进一步得出虾青素含量:  $\text{P}(\text{mg/g}) = c(\text{mg/L}) / \text{DBW}(\text{g/L})$ 。

### 1.3 数据处理

本文全部实验均设置三组平行,利用 ANOVA (SPSS19.0) 一步法分析实验数据。最小显著性差异进行多重比较检验调查不同实验的组间差异,且当  $p < 0.05$  具有显著性意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 茴香醚对诱导阶段 *H. pluvialis* LUGU 生长的影响

由图 1 可知,对照组中雨生红球藻细胞正常生长,在诱导培养的第 13 天,获得了最高的生物量浓度 (0.71 g/L)。相比之下,实验组内雨生红球藻的生长受到了一定的抑制,生物量浓度明显低于对照组,而且随着 BHA 浓度从 1 mg/L 到 8 mg/L 的增加,藻细胞生长受到了越来越大的抑制作用,生物量出现了一定程度的减少,这种现象与在其他抗氧化剂处理下微藻细胞的生长状态相似<sup>[19]</sup>。在添加 BHA 时,藻细胞生物量降低可能是由于 BHA 是一种强的抗氧化剂,对藻细胞的生长起到抑制作用。特别当 BHA 质量浓度高于 2 mg/L 时,藻细胞的生长受到了很大程度的抑制作用,4、8 mg/L 获得的最高生物量浓度仅为 0.46、0.45 g/L。因此在诱导藻细胞阶段,低质量浓度的 BHA 促进藻细胞的生长并不明显,高

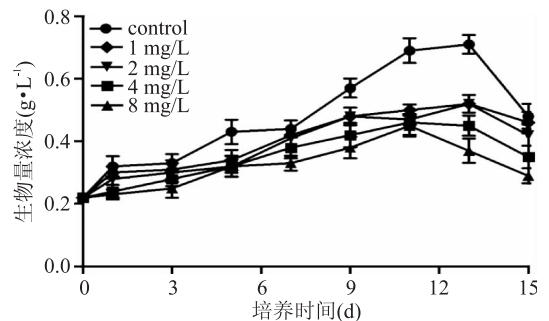


图 1 不同质量浓度茴香醚对雨生红球藻生长的影响

Fig.1 Effect of BHA on biomass of *H. pluvialis* during induction days

注: ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ), 图 2~图 4 同。

质量浓度的 BHA 可能超过藻对其的耐受能力,从而抑制藻细胞的生长。

## 2.2 茴香醚对诱导阶段 *H. pluvialis* LUGU 虾青素产量的影响

由图 2 表明,在不同质量浓度的 BHA 的诱导下,虾青素含量得到了不同程度的增长。诱导到第 3 d 时,4 种质量浓度下的藻细胞虾青素产量略高于对照,2 mg/L BHA 处理下的虾青素产量相对较高;第 7 d 时,1、2 mg/L BHA 质量浓度下虾青素产量显著提高,其中 2 mg/L BHA 的实验组相比第 3 天时虾青素产量增幅更大,而 8 mg/L BHA 质量浓度下的虾青素产量低于对照组;当 2 mg/L BHA 诱导至第 13 天时,虾青素产量明显高于其他实验组产量且达到最大值 29.03 mg/g,是对照组的 2.03 倍;而添加 1、4 和 8 mg/L BHA 虾青素的产量仅略高于对照组产量。虾青素的最大产率也随着 BHA 浓度的增加呈现出下降趋势,浓度达到 8 mg/L 时,产率甚至低于对照组。此结果证明在 BHA 胁迫诱导条件下,一定浓度的 BHA 作为诱导子能够有效的促进虾青素的积累,低浓度 BHA 由于浓度太低,对虾青素积累促进作用不明显,而过高浓度的 BHA 可能会对藻细胞产生毒害作用致使细胞死亡且总虾青素累积较少,此结果与前人的研究结论,过高浓度的盐会降低虾青素的积累是一致<sup>[20]</sup>。可以推测当低于诱导子最适浓度时可能导致不能激活细胞中的活性位点,而诱导子浓度高于最适浓度时可能对细胞有毒害作用。

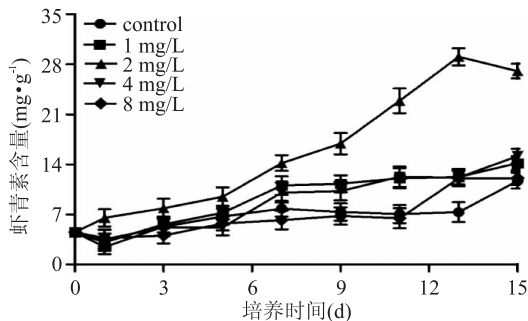


图 2 不同质量浓度茴香醚对雨生红球藻虾青素含量的影响

Fig.2 Effect of BHA on astaxanthin content of *H. pluvialis* during induction days

## 2.3 茴香醚对诱导不同生长状态 *H. pluvialis* LUGU 生长的影响

不同生长阶段的营养细胞的敏感性是不同的,这最终将会影响藻细胞中产物的积累<sup>[21]</sup>。在营养细胞的不同阶段,包括对数生长期前期阶段(4 d)、对数后期(14 d)、稳定期(18 d),分别加入 2 mg/L 的 BHA 后,和在 对数中期(12 d)加入 2 mg/L BHA 实验组对比,考察其对诱导阶段藻细胞生长的影响。

如图 3 所示,所有实验组的生物量浓度随着培养时间的增加呈现上升趋势,这与 2.1(图 1)的结果是一致的。但是,对数生长期前期(4 d)细胞在诱导第一天时,生物量出现了大幅降低然后再逐渐增加的现象。这种变化可能是由于对数生长期前期的藻细胞对外界胁迫极其敏感<sup>[22]</sup>,低抗性的幼嫩细胞在

受到 BHA 的强抗氧化剂等不利的诱导环境时,致使部分细胞快速裂解死亡。对数后期(14 d)细胞的生物量浓度明显高于其他实验组,在第 9 d 获得最高生物量浓度 0.75 g/L,分别是对数生长前期(0.37 g/L)、对数中期(0.42 g/L)、稳定期(0.62 g/L)的 2.03、1.79 和 1.21 倍。这可能是由于对数后期(14 d)的细胞处于即将进入稳定期的临界点,细胞活性高但未受到抑制,一旦进入到适宜的培养环境,就可以不经过活化马上进行繁殖,从而达到一个相对较高的生物量浓度<sup>[23]</sup>。

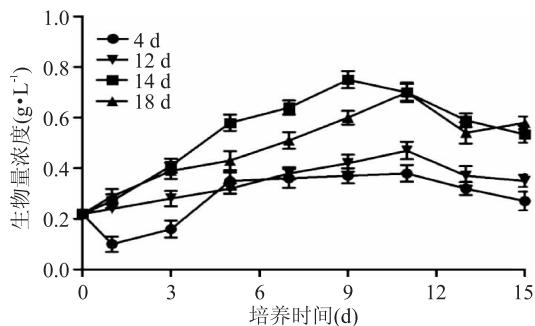


图 3 茴香醚对诱导不同生长状态雨生红球藻生长的影响

Fig.3 Effect of BHA on biomass of

*H. pluvialis* at different growth stages during induction days

## 2.4 茴香醚对诱导不同生长状态 *H. pluvialis* LUGU 虾青素产量的影响

添加 2 mg/L 的 BHA 诱导不同生长状态下的藻细胞,虾青素产量也出现了较明显的差异。如图 4 所示,尽管对数中期(12 d)的细胞在诱导至第 13 天时,虾青素产量有很大幅度的增加,达到了 29.03 mg/g,但相比于对数后期细胞(14 d)诱导得到的虾青素浓度 29.3 mg/g,仍略低,但分别高于对数生长前期(9.99 mg/g)、稳定期(16.86 mg/g)的 2.9 和 1.72 倍。产生这一结果的原因主要是由于,对数后期细胞(14 d)接种后,藻体大量增殖,生物量浓度得到了提高,这一时期微藻细胞的抗性也相对较高,为虾青素的大量积累提供了生物量基础。这一结果与 Wen<sup>[23]</sup>等人使用酒精作为诱导子诱导 *H. pluvialis* 积累虾青素的结果是一致的。和以前的报道不同的是,BHA 的诱导结果高于水杨酸(SA)<sup>[24]</sup>、茉莉酸(JA)<sup>[14]</sup>、茉莉酸甲酯(MJ)<sup>[25]</sup>诱导的结果,但低于黄腐酸(FA)<sup>[26]</sup>诱导的结果。产生这种差异的原因可能是培养基、培养模式、诱导子、藻株的不同导致的,也可能是 BHA 影响了藻细胞中与虾青素生物合成相关的酶基因的表达,进而促使藻细胞大量积累虾青素,而这些结论还需要进一步实验验证。

## 3 结论

研究表明,2 mg/L BHA 对雨生红球藻积累虾青素有明显的促进作用,虾青素最大产率得到大幅提高,且虾青素含量比对照组提高至 2.03 倍,由此可见,一定浓度的 BHA 作为诱导子能够有效的促进藻细胞积累次生代谢产物。但当 BHA 增加至 4 和 8 mg/L 时,虾青素的产量逐渐降低,表明 BHA 也具有植物激素所普遍存在的双重性,即只有适宜浓度

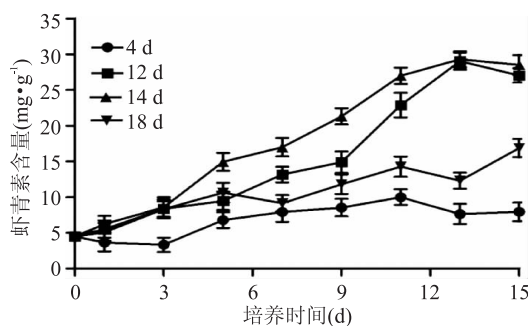


图4 茴香醚对诱导不同生长状态雨生红球藻虾青素产量的影响

Fig.4 Effect of BHA on astaxanthin content of

*H. pluvialis* at different growth stages during induction days

的BHA才能促进生长和代谢,过低对虾青素的促进作用偏低,过高则不利于生物量的积累从而导致单位体积藻液内次生代谢产物积累较低。而对处于对数后期(14 d)的藻细胞进行诱导能进一步增加虾青素的产量,虾青素浓度高达到29.3 mg/g。虽然以BHA作为诱导子和在不同种子液状态诱导都可增加藻细胞中虾青素积累,但BHA促进藻细胞大量积累虾青素的机制有待于进一步的探究。

### 参考文献

[1] Nakagawa K, Kang S, PaA D, et al. Inhibition by betacarotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation [J]. J NutritSci Vitamin, 1997, 43: 345-355.

[2] Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48 (4): 1150-1154.

[3] Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition [J]. TRENDS in Biotechnology, 2003, 21(5): 210-216.

[4] Margalith P Z. Production of ketocarotenoids by microalgae [J]. Applied microbiology and biotechnology, 1999, 51 (4): 431-438.

[5] Johnson E A, Schroeder W A. Microbial carotenoids [M]// Downstream processing biosurfactants carotenoids. Springer Berlin Heidelberg, 1995: 119-178.

[6] 黄文文, 洪碧红, 易瑞灶, 等. 虾青素生产方法及生物活性的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2013(6): 214-218.

[7] Sachindra N M, Bhaskar N, Mahendrakar N S. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India [J]. LWT - food Science and Technology, 2005, 38(3): 221-225.

[8] Bon J A, Leathers T D, Jayaswal R K. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* [J]. Biotechnology letters, 1997, 19(2): 109-112.

[9] Lai J P, Jiang Y, He X W, et al. Separation and determination of astaxanthin from microalgal and yeast samples by molecularly imprinted microspheres [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 804(1): 25-30.

[10] 凌善锋. 雨生红球藻培养基和诱导条件优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 266-267.

[11] 韦韬, 顾文辉, 李健, 等. 不同碳氮浓度对雨生红球藻生长及虾青素累积的影响 [J]. Marine Sciences, 2012, 36 (11): 55.

[12] Lu Y, Jiang P, Liu S, et al. Methyl jasmonate- or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of  $\beta$ -carotene ketolase genes (bkts) in microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource technology, 2010, 101(16): 6468-6474.

[13] 高政权, 孟春晓. 外源乙烯利对雨生红球藻中虾青素积累的影响 [J]. 食品科学, 2007, 28(10): 376-380.

[14] Gao Z, Meng C, Zhang X, et al. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis* [J]. PloS one, 2012, 7(8): 243-252.

[15] Franz A K, Danielewicz M A, Wong D M, et al. Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity [J]. ACS chemical biology, 2013, 8(5): 1053-1062.

[16] Ebrahimian A, Karimnia H R, Vosoughi M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater [J]. Renewable Energy, 2014, 71(4): 502-508.

[17] Wan M, Zhang Z, Wang J, et al. Sequential Heterotrophy-Dilution-Photoinduction Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin [J]. Bioresource technology, 2015, 198(3): 557-563.

[18] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* 1 [J]. Plant and cell Physiology, 1991, 32(7): 1077-1082.

[19] Hunt R W, Chinnasamy S, Bhatnagar A, et al. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana* [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2010, 162(8): 2400-2414.

[20] Liang C X, Li Y B, Xu J W, et al. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 86(5): 1367-1374.

[21] Wen Z, Liu Z, Hou Y, et al. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* [J]. Enzyme and microbial technology, 2015, 78(5): 10-17.

[22] Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, et al. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(6): 1409-1418.

[23] Zhang G, Zhang P, Wang B, et al. Ultrasonic frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa* [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13(5): 446-450.

[24] Gao Z, Meng C, Zhang X, et al. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. Enzyme and microbial technology, 2012, 51(4): 225-230.