

雨生红球藻营养细胞的虾青素累积

庄惠如¹ 卢海声¹ 陈必铤¹ 陈文列² 施巧琴¹

(1. 福建师范大学生物工程学院, 福州 350007; 2. 福建医科大学电子显微镜室, 福州 350004)

摘要: 接种于缺氮培养基的雨生红球藻。当置于光强为 10—12klx, 温度 25℃±1.5℃条件下培养时, 营养细胞迅速由绿色变成红色。接种 4d 时, 运动细胞占细胞总数的 90%, 细胞内的虾青素含量 (33.0pg/cell) 占最终色素累积量的 (60.0pg/cell) 的 55%。接种 6d 时, 虾青素含量已占最终累积量的 75%。电镜观察显示, 红色的运动细胞除细胞质的大部分区域充满色素颗粒外, 细胞的形态结构与绿色细胞基本一致。实验还表明, 当接种物置于低光 (0.5—1.0klx) 下培养时, 营养细胞仍有色素沉积, 但累积缓慢。当只有高光胁迫 (10—12klx, 完全培养基培养) 时, 营养细胞转变成厚壁孢子后 (5d 后), 才大量积累色素。

关键词: 雨生红球藻; 营养细胞; 虾青素; 胁迫条件; 超微结构

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)04-0376-05

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow) 是一种淡水单胞绿藻, 由于能大量积累高价值的虾青素^[1,2], 近年来已成为国际上藻类研究的热点之一。

雨生红球藻细胞主要有两种形态: 营养细胞和厚壁孢子。一般认为环境有利时, 主要以绿色, 能运动的藻体形式存在, 环境不利时, 形成厚壁孢子并大量积累红色的虾青素^[3]。由于孢子具有坚韧的厚壁, 在直接利用其作为饲料色素时, 存在生物有效利用率低的问题。同时, 在利用红球藻获取虾青素的商业化生产中, 破壁过程无疑也增加了色素提取工艺的复杂化。Lee 等^[4]认为红球藻营养细胞与厚壁孢子一样能积累虾青素。笔者曾对营养胁迫对雨生红球藻的生长及色素累积的影响进行初探, 发现在高光强下, 氮饥饿会导致营养细胞快速积累红色的色素^[5], 对此, 做了如下的探究。

1 材料与方法

1.1 材料 雨生红球藻由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库提供。

1.2 培养条件 扩养藻种用 Bold 培养基 (BBM) 培养, 光照培养箱温度控制在 23°±1.5℃, 光强 0.5—1.0klx。将指数生长期培养物经转速为 2000r/min 离心 3min, 细胞团接种于缺氮的 BBM 培养基中。用 250mL 三角瓶为培养容器, 接种后的细胞密度约为 5×10^4 /mL。接种物置反复式摇床上 (90 次/min) 培养, 日光灯提供顶光照, 连续照明, 光强提高到 10—12klx, 温度 25°±1.5℃。连续培养 10d。

收稿日期: 2000-07-24; 修订日期: 2001-01-20

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (C97020); 福建省计委资助项目

作者简介: 庄惠如 (1957—), 女, 福建省福州市人; 硕士, 副教授; 主要从事植物学教学与藻类学研究

- 1.3 细胞计数** 按金传荫等的方法^[6],用浮游生物计数框进行细胞计数。
- 1.4 色素提取及虾青素含量测定** 按 Boussiba^[7]等的方法进行色素提取与测定,具体如下:取 5mL 培养物离心后,藻团先用甲醇与氢氧化钾的混合液(30% 甲醇中含 5% KOH)处理去除叶绿素。重新离心后,藻团用二甲基亚砷抽提其余色素直至藻团变白。用 752 型分光光度仪测定抽提液的吸光值 A_{490} ,用消光系数 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2220$ (Davies, 1976) 计算虾青素含量^[8]。
- 1.5 细胞超微结构观察** 将培养物离心,用 3% 的戊二醛预固定 1—2h,1% 锇酸后固定 2h,经脱水后,环氧树脂 618 包埋,超薄切片,用铀- 铅双染色,日立 HU- 12A 透射电子显微镜观察,摄影。

2 结果与讨论

在适宜条件下培养的雨生红球藻生长快速,藻体保持绿色运动状态。当暴露在高光强及氮缺乏环境时,细胞生长明显受抑,但细胞内的虾青素含量快速增加。在 5d 内,营养细胞因积累虾青素迅速地变成桔红色。图 1A 显示,接种 4d 的培养物中,营养细胞占细胞总数的 90% 以上,细胞内的虾青素含量(33. 0 pg/ cell) 占最终虾青素累积量的(60. 0 pg/ cell) 55%。接种 6d 时,虽有部分细胞停止运动转变为厚壁的静孢子,但游动的营养细胞仍占 65%,而色素含量(45. 0 pg/ cell) 已占最终含量的 75%。这表明,当雨生红球藻突然暴露在极端环境后,能在营养细胞内快速积累虾青素。

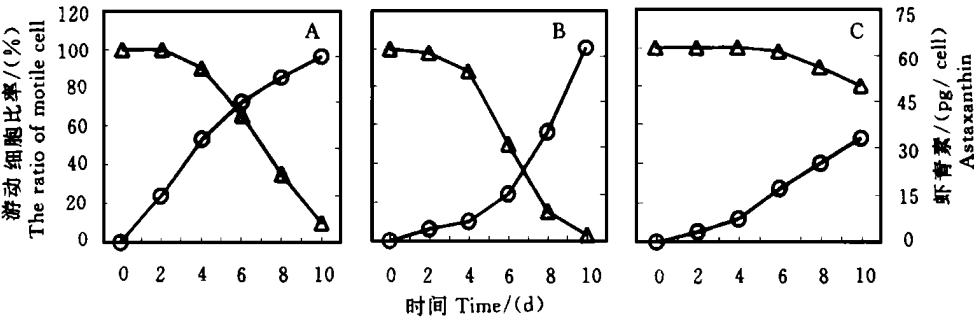


图 1 不同胁迫条件下(A, B, C), 虾青素的累积和营养细胞数量变化

Fig. 1 Astaxanthin accumulation and the change in amount of motile cells in different stress condition
(A. high light and N-starvation; B. high light; C. N-starvation)
—○— Astaxanthin; —△— Motile cells

雨生红球藻的绿色营养细胞,在电镜下显示具有发达的周缘位网状叶绿体,细胞核位于细胞中部,周围具数个大液泡。细胞壁与原生质体分离(图版 I: 1, 2)。此观察结果与前人的工作基本一致^[9]。

暴露在胁迫环境 4—6d 的雨生红球藻细胞,光镜下除细胞中部或大部分呈桔红色外,大小与绿色营养细胞无差异。电镜观察表明,红色的营养细胞基本保持上述绿色营养细胞的特征结构。但暴露 4d 时,细胞质中核周围出现许多大小不一,或不规则形状的中等电子密度色素颗粒(图版 I: 3)。暴露 6d 时,色素颗粒已充满细胞内的大部分区域,此时

液泡变少, 变小, 并与其他细胞器一起被推挤到细胞周边(图版 I: 4)。营养细胞在色素沉积过程, 细胞运动器及叶绿体等细胞器结构仍保持完整(图版 I: 3, 5)。伴随色素沉积而出现的另一现象是, 叶绿体基质内的淀粉粒明显增多(图 I: 3—5)。除营养细胞积累色素外, 接种 4d 时的无性孢子囊内, 尚未释放出来的子细胞也同样出现色素颗粒(图版 I: 6)。电镜观察的结果, 进一步证实了上述色素测定结果的分析。

有关文献报道氮限制是诱导红球藻积累虾青素的外界因素, 对高光诱导作用则存在争议^[10, 11]。为此, 作者还分别做了单因子的诱导实验。在其他培养条件不变的情况下, 将接种于完全 BBM 培养基的雨生红球藻置于高光强(10—12klx)下培养, 结果发现, 接种 4d 内细胞有所增殖, 但虾青素累积缓慢, 培养物呈绿色。4d 后, 生长停滞, 多数细胞转变成厚壁的静孢子, 细胞中的虾青素含量由 4d 时的 15.18 pg/cell 增加到 10d 时的 62.94 pg/cell, 最后 4d 的虾青素累积量占细胞最终色素累积量的 75.8%(图 1B)。另一实验则是将接种于缺氮培养基的雨生红球藻置于低光强(0.5—1.0klx)条件下培养。接种后, 细胞既不增殖也无明显的形态变化, 但培养物逐渐由绿色变成浅桔红色。培养 10d 时细胞中虾青素含量(33.10 pg/cell)虽然只相当于高光强与氮饥饿共同胁迫条件下培养 4d 时的含量, 但 6d 的色素累积量占最终累积量的 51.7%(图 1C)。上述三种胁迫诱导的结果均表明, 当细胞增殖停缓时, 虾青素的累积加速, 所不同的是, 在只有高光胁迫时, 营养细胞将迅速转变为厚壁孢子, 并在孢子中大量积累虾青素。在只有氮饥饿胁迫时营养细胞可缓慢积累色素。当两种诱导因子同时存在时, 可导致营养细胞在运动状态下快速积累虾青素。

值得一提的是, 正常情况下或者只有高光胁迫时, 由于营养细胞有一个增殖与增大体积的过程, 当生长后期营养耗尽时将形成大型的厚壁孢子, 而暴露在高光强及氮缺乏环境的雨生红球藻虽然能快速积累色素, 但最终将形成与营养细胞大小相近的厚壁孢子。随着培养时间的推移, 前者细胞中的虾青素含量将逐渐高于后者。这提示在利用红球藻提取虾青素的商业化生产中, 大型的厚壁孢子仍具优越性。但直接利用红球藻做为饲料色素时, 若能进一步提高营养细胞的生物量与色素含量, 则红色的营养细胞在生产上也是有一定意义。对于红球藻积累虾青素的作用与累积机制目前尚不清楚。电镜观察显示雨生红球藻细胞在色素沉积过程伴随淀粉粒增多的现象, 反映出色素的累积可能与碳同化作用有关。上述结果还反映出诱发红球藻积累虾青素的环境因子很可能是多因素共同作用的。

参考文献:

- [1] Grung M D, Souza F M L, Burowitzka M, et al. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids *Haematococcus pluvialis* aphanospores as a source of (3S, 3' S)-astaxanthin esters [J]. *J. Appl. Phycol.* 1992, 4: 165—171
- [2] 孙伟, 王晓东译, 微藻产品的经济价值及开发潜力[J]. *中国海洋药物*, 1995, 2: 48—52
- [3] Elliott A M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis* Arch [J]. *Mikrobiol.* 1934, 82: 250—71
- [4] Lee Y K, Ding S Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* [J]. *J. phycol.* 1994, 30: 445—449
- [5] 庄惠如, 施巧琴, 卢海声, 等. 营养胁迫对雨生红球藻虾青素累积的影响[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(3): 208—212

- [6] 金传荫, 宋立荣, 刘永定, 等. 红球藻水生 748 株营养需求的研究[J]. 水生生物学报, 1996, **20**(3): 292—296
- [7] Boussiba S, Voushak S. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Plant Cell Physiology*, 1991, **32**(7): 1077—1082
- [8] Davies B H. Carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments [M]. London: Academic Press, 1976, 38—165
- [9] Santos M F, Mesquita J F. Ultrastructural Study of *Haematococcus lacustris* (Girad.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis[J]. *Cytologia*, 1984, **49**: 215—228
- [10] Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, et al. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, **74**(1): 17—20
- [11] Yong Y Y R, Lee Y K. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (chlorophyta) [J]. *Phycologia*, 1991, **30**(3): 257—261

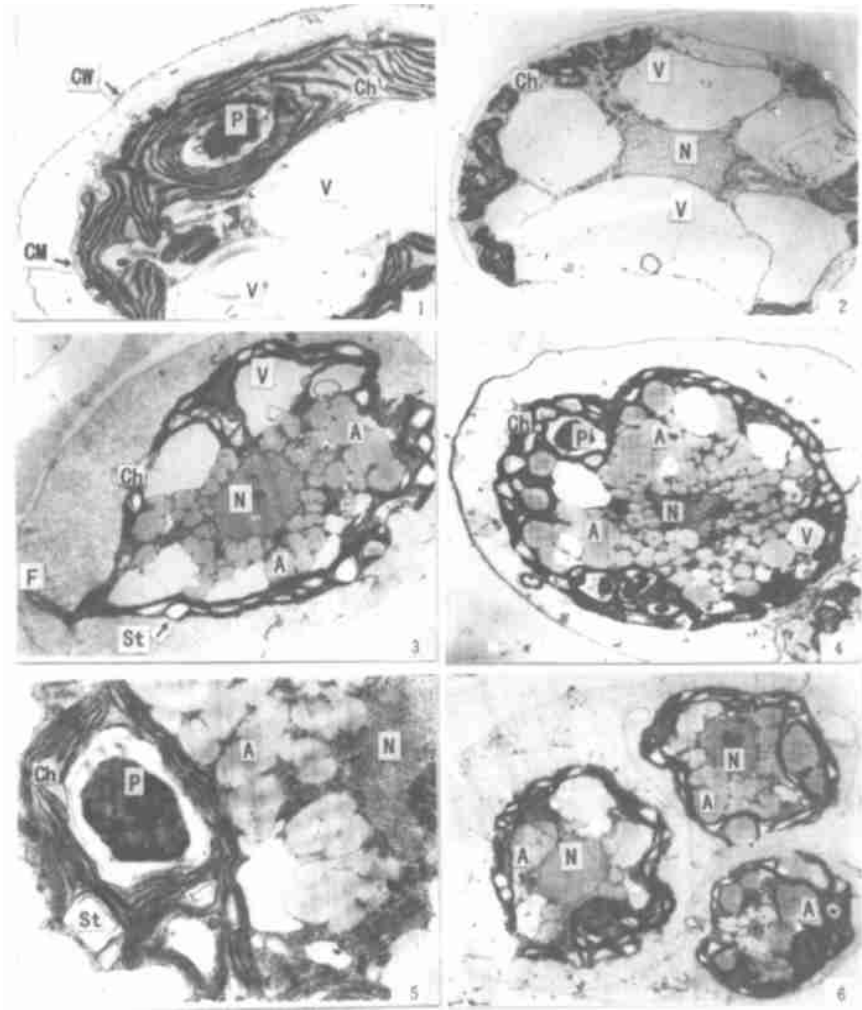
ASTAXANTHIN ACCUMULATION IN VEGETATIVE CELL OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

ZHUANG Huir¹, LU Hairsheng¹, CHEN Brlan¹,
CHEN Werrlie² and SHI Qiaorqin¹

(1. Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007; 2. Department of Electron Microscopy,
Fujian Medical University, Fuzhou 350004)

Abstract: When *H. pluvialis* was inoculated in a nitrogen deficient medium and exposed to high light intensity condition (10—12 klx), the change of green motile cells to red motile cells was observed in four days. After four days of inoculation, the number of vegetative cells was 90% of total number of cells and the astaxanthin content (33.0 pg/ cell) was 55% of the final astaxanthin content (60.0 pg/ cell) which was inoculated ten days. After six days, the astaxanthin content was 75% of final astaxanthin content. It was found by electron microscopic observation that the cytoplasm of red motile cells was almost full of pigment granules, but the morphology and structure of cell was identical with green motile cells. The experiments also showed that the astaxanthin accumulation in motile cells would occur too when *H. pluvialis* was exposed to nitrogen starvation but lower light intensity condition (0.5—1.0 klx). When *H. pluvialis* was only exposed to high light stress condition (inoculated in complete medium), the large amount pigment accumulation was only found during the transformation of vegetative cells to akintes.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; Vegetative cell; Astaxanthin; Stress condition; Ultrastructure



图版 I

1, 2. 绿色营养细胞, 1×6600 , 2×2830 ; 3, 4. 暴露胁迫环境的营养细胞, 3. 胁迫 4d $\times 3750$, 4. 胁迫 6d $\times 3530$; 5. 示色素沉积时细胞结构 $\times 9500$; 6. 示孢子囊内无性孢子 $\times 3000$ 。(Ch 叶绿体; P 蛋白核; CW 细胞壁; CM 细胞膜; N 细胞核; A 虾青素颗粒; F 鞭毛; St 淀粉粒; V 液泡)

1, 2 The green vegetative cells, 1×6600 , 2×2830 ; 3, 4. The vegetative cells exposed to stress condition, 3 After 4ds $\times 3750$, 4 After 6ds $\times 3530$; 5. The structure of cell during astaxanthin accumulation, $\times 9500$; 6. The spores in sporange, $\times 3000$. (Ch Chloroplast; P Pyrenoid; CW-Cell Wall; CM-Cell M embrane; N-Nucleus; A-Astaxanthin granule; F-Flagellum; St Starch; V-Vacuole)