

光照强度对雨生红球藻合成虾青素的影响

董庆霖^{1,2} 邢向英¹ 赵学明²

(1. 河北工业大学化工学院, 天津 300130; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072)

EFFECT OF LIGHT INTENSITY ON ASTAXANTHIN SYNTHESIS IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

DONG Qing-Lin^{1,2}, XING Xiang-Ying¹ and ZHAO Xue-Ming²

(1. School of Chemical Engineering Hebei University of Technology, Tianjin 300130;

2. School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

关键词: 雨生红球藻; 虾青素; 强光; 硝酸还原酶; 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶

Key words: *Haematococcus pluvialis*; Astaxanthin; High Irradiance; Nitrate reductase; Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase

中图分类号: Q142 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)03-0445-03

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种单细胞绿藻, 在强光照射条件下能够合成并大量积累具有强抗氧化性的次生类胡萝卜素-虾青素^[1]。然而, 其合成机理目前还不明确, 导致虾青素诱导合成过程中操作的盲目性, 限制了虾青素产量的提高。

虾青素是一种次生代谢产物, 从系统生物学和代谢工程的角度来看, 其合成应该与细胞内的初生代谢密切相关。因此, 本实验从研究光照对雨生红球藻初生碳代谢(光合作用)和氮代谢的影响着手, 比较强光和低光照射下, 雨生红球藻细胞内 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶(Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase 简称 Rubisco)和硝酸还原酶(Nitrate reductase 简称 NR)的活性, 以及虾青素含量和培养液中硝酸盐浓度的变化, 从而分析确定强光照射诱导虾青素合成的作用机理。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养方法 雨生红球藻购自中科院水生生物研究所。为确定不同光照强度对虾青素合成的影响, 将在低光照下(50 $\mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$)预培养 5d 的藻种离心收集(13,000r/min, 5min)并用去离子水清洗两次后, 重新悬浮于装有改良的 BBM (NaNO_3 85mg/L)培养基的 500mL 锥形瓶中

(装液量为 50mL), 置于光控摇床内, 分别在低光照 60 $\mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$ (LL)和强光照 160 $\mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$ (HL)条件下进行培养, 温度 25°C, 转速 130r/min。所有实验均设两个平行实验。

1.2 分析方法 生物量及虾青素含量的测定与我们以前的实验方法相同, 见文献[2]。Rubisco 和 NR 的活性分别按照 Quick^[3]和 Fischer^[4]的方法进行。 NO_3^- 浓度采用标准的分光光度法^[5]进行测定。

2 结果与讨论

2.1 生物量

雨生红球藻的生长对光照强度极其敏感。在强光照条件下, 藻细胞在第 2 天就进入指数生长期, 生物量迅速上升。6d 后细胞生长基本停止, 生物量相对稳定(图 1)。与此不同, 在低光照条件下, 藻细胞在前期生长缓慢, 5d 后才进入指数生长期。实验结束时, LL 的生物量仅为 HL 的 72%。

2.2 虾青素

在强光照下(HL), 雨生红球藻第 6d 开始合成虾青素(图 2), 并且产量迅速提高, 实验结束时达到 0.86mg/g。相比之下, 低光照条件下(LL), 藻细胞在整个实验过程中没有

收稿日期: 2006-09-01; 修订日期: 2007-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(20536040); 国家基础研究重点基金(2003CB716003)资助

作者简介: 董庆霖(1964—), 男, 汉族, 山东荣成人; 博士, 副教授; 主要从事藻类生理及代谢工程研究 E-mail: qldong@tju.edu.cn

通讯作者: 赵学明, E-mail: xnzhaoh@tju.edu.cn

积累虾青素。

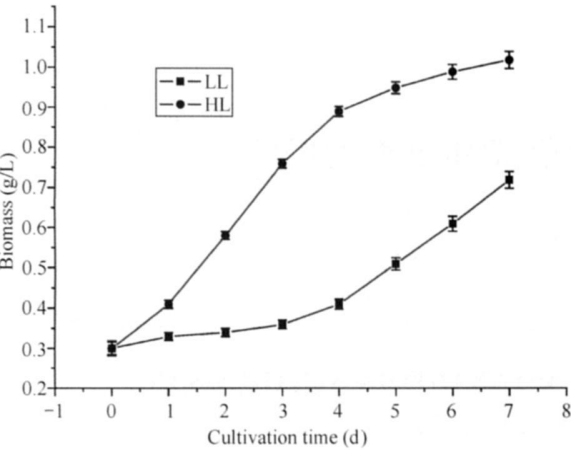


图 1 不同光照强度下雨生红球藻生物量的变化
Fig 1 Biomasses of *H. pluvialis* growing under different light intensity
误差条表示标准偏差 ($n = 3$) Vertical bars represent S. D. ($n = 3$)

2.3 Rubisco 活性

LL 中 Rubisco 活性在第 1 天略有上升, 然后缓慢下降 (图 3)。而 HL 中 Rubisco 活性在第 1 天大幅度上调, 提高了 0.84 倍, 并在前 2 天保持相对稳定, 随后就开始迅速下降。实验结束时 Rubisco 活性降至 $28.14 \mu\text{mol/g}\cdot\text{h}$, 仅为最高值的 16.9%。

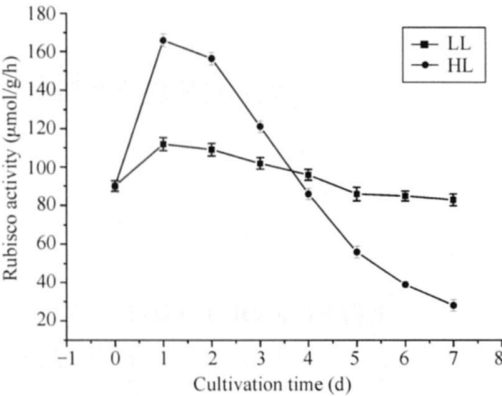


图 3 不同光照强度下 Rubisco 活性的变化
Fig 3 Change of Rubisco activity under different light intensity
误差条表示标准偏差 ($n = 3$) Vertical bars represent S. D. ($n = 3$)

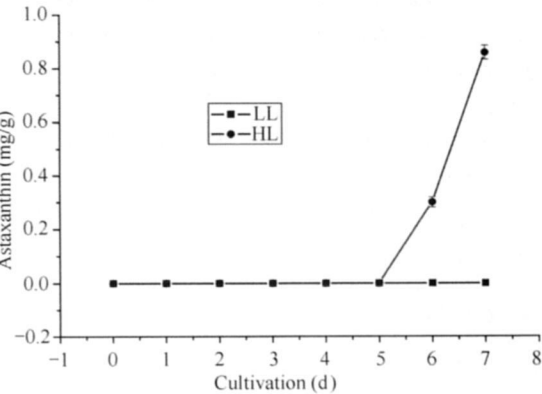


图 2 不同光照强度下雨生红球藻细胞内虾青素含量的变化
Fig.2 Astaxanthin contents in *H. pluvialis* growing under different light intensity
误差条表示标准偏差 ($n = 3$) Vertical bars represent S. D. ($n = 3$)

2.4 NR 活性

NR 活性的变化趋势 (图 3) 基本与 Rubisco 相同, 即在实验的第 1 天 HL 中 NR 活性大幅度提高, 提高了 0.98 倍, 但 3d 后开始迅速下降。第 6 天虾青素开始合成时已降至最高值的 25.3%, 实验结束时又进一步降低到 19.4%。相比之下, LL 中 NR 在整个培养过程中活性变化较小, 实验结束时仅下降了 29.8%。

2.5 硝酸盐浓度

不同光照强度的培养液中硝酸盐浓度均呈下降趋势

(图 4)。HL 中硝酸盐浓度在实验一开始就迅速下降, 第 3d 已降低了 79.9%。与此相比, LL 中硝酸盐的浓度下降缓慢, 实验结束时只降低了 56.8%。

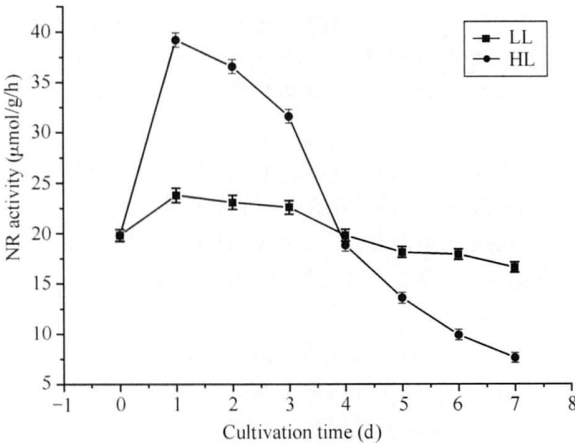


图 4 不同光照强度下 NR 活性的变化
Fig 4 Change of NR activity under different light intensity
误差条表示标准偏差 ($n = 3$) Vertical bars represent S. D. ($n = 3$)

为确定强光照诱导虾青素合成的机理, 将上述实验结果结合起来进行综合分析可以看出: 强光照射下即 HL 中, 只有当 Rubisco 和 NR 的活性以及硝酸盐浓度降低到非常低的水平, 藻细胞的生长几乎停止时, 虾青素才开始合成。相反, LL 中 Rubisco 和 NR 的活性及硝酸盐浓度一直保持在较高的水平, 生物量持续上升, 则细胞内没有虾青素积累。

上述结果表明光照直接或间接地影响 Rubisco 和 NR 的活性, 并最终导致二者活性及硝酸盐浓度的降低: (1) 在 HL 中, 光照强度的上升刺激了 Rubisco 和 NR 活性的提高。这是因为光照不仅可以正向调节 Rubisco 活性^[6], 而且还可以正向调控 NR 编码基因的转录和表达^[7]。(2) Rubisco 和 NR 活性的提高促使雨生红球藻迅速吸收硝酸盐进行快速生长, 培养液中的硝酸盐浓度迅速下降。而硝酸盐浓度的降低又导致 Rubisco 和 NR 活性的下降。其原因主要有两方面: 第一,

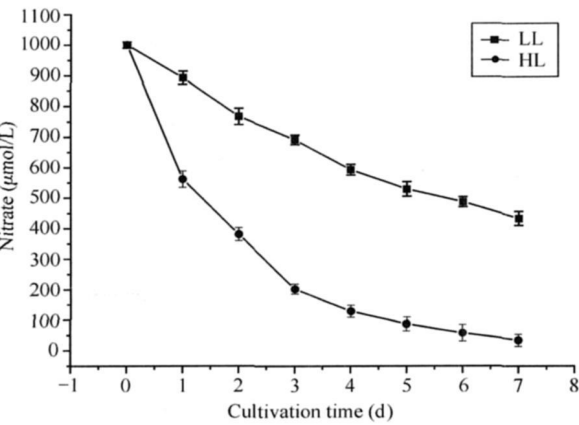


图 5 不同培养液中硝酸盐浓度的变化

Fig. 5 Change of nitrate concentration in different cultures

误差条表示标准偏差 (n= 3)Vertical bars represent S. D. (n= 3)

NR 是一种诱导酶, 其活性与硝酸盐浓度呈正相关, 即硝酸盐浓度越高, NR 活性就越高, 而反之就越低。第二, 与其他蛋白质相同, Rubisco 和 NR 在细胞代谢过程中高速周转 (Turnover), 即不断地被合成和降解。而二者的合成均需要充足的氮源, 因此, HL 中硝酸盐浓度的大幅度下降导致雨生红球藻细胞内氮源供应不足, 抑制了 Rubisco 和 NR 的重新合成 (Re-generation), 进而降低了二者的活性。这一结果与最近在基因组水平上对高等植物 (Arabidopsis) 代谢研究的结论相同^[8]。

基于上述分析我们提出: 强光照射诱导雨生红球藻合成虾青素的机理在于其提高了 Rubisco 和 NR 活性, 导致硝酸盐浓度迅速降低而最终又抑制了这两种酶的活性, 造成雨生红球藻碳代谢 (光合作用) 及氮代谢效率大幅度下降, 即“碳饥饿 (Carbon starvation)”和“氮饥饿 (Nitrogen starvation)”。在此状态下, 为了生存, 细胞内合成虾青素的相关基因被激活,

藻细胞开始并积累合成虾青素以抵御不良的环境条件。

参考文献:

[1] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response [J]. *Physiol. Plantarum*, 2000, **108**: 111—117

[2] Dong Q L, Zhao X M. *In situ* carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma* [J]. *Catal. Today*, 2004, **98**: 537—544

[3] Quick W P, Schurr U, Fichtner K, *et al.* The impact of decreased rubisco on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense Rbcs [J]. *Plant J.*, 1991, **1**: 51—58

[4] Fischer P, Klein U. Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiol.*, 1988, **88**: 947—952

[5] Clesceri L S, Greenberg A E. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. Washington, D. C: American Public Health Association. 1989, 1159

[6] Zhang N, Portis A R. Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Plant Biology)*, 1999, **96**: 9438—9443

[7] Quesada A, Fernandez E. Expression of nitrate assimilation related genes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Mol Biol.*, 1994, **24**: 185—194

[8] Scheible W R, Morcuende R, Czechowski T, *et al.* Genomewide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of arabidopsis in response to nitrogen [J]. *Plant Physiol.*, 2004, **136**: 2483—2499