

生物工程

褪黑素对雨生红球藻虾青素积累和脂肪酸合成的影响

岳陈陈, 丁巍, 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, 昆明 650500)

摘要:以雨生红球藻 *H. pluvialis* LUGU 为对象, 研究了不同浓度的褪黑素 (MLT) 对藻细胞生长、虾青素积累、脂肪酸及脂肪酸合成相关酶活性的影响。结果显示: 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导条件下培养 13 d 藻细胞中虾青素含量可达 26.62 mg/g, 是对照组 (12.3 mg/g) 的 2.16 倍; 培养 5 d 脂肪酸合成量 (15.32%) 最大, 是对照组的 1.24 倍, 同时提高了虾青素酯含量; MLT 诱导条件下, 脂肪酸合成关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCCase) 活性升高, 而磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 活性降低。研究表明, 外源添加适当浓度的 MLT 不仅可以促进雨生红球藻中虾青素的积累, 而且提高了脂肪酸的合成量, 改变了脂肪酸组成。

关键词:褪黑素; 雨生红球藻; 虾青素; 脂肪酸; 酶活

中图分类号: TK6; Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)06-0120-06

Effects of melatonin on accumulation of astaxanthin and synthesis of fatty acid in *H. pluvialis* LUGU

YUE Chenchen, DING Wei, ZHAO Peng, XU Junwei, LI Tao, YU Xuya

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

Abstract: The effects of melatonin (MLT) on the algae cell growth, astaxanthin accumulation, fatty acids, and fatty acid synthesis-related enzyme activities of *H. pluvialis* LUGU were studied. The results showed that the astaxanthin content in algae cells achieved 26.62 mg/g under the induction conditions of MLT concentration 10 $\mu\text{mol/L}$ and cultivation time 13 d, which was 2.16 times as high as that of the control (12.3 mg/g). The content of fatty acids (15.32%) was the highest when cultivating for 5 d, which was 1.24 times as high as that of the control, and the astaxanthin ester content increased. Moreover, the acetyl-CoA carboxylase (ACCCase) activity significantly increased, but the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) activity reduced by MLT induction. The study revealed that the appropriate concentration of MLT not only could improve the astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* LUGU, but also could boost the fatty acid content and change the fatty acid composition.

Key words: melatonin; *H. pluvialis* LUGU; astaxanthin; fatty acid; enzyme activity

虾青素 (3,3'-二羟基- β,β -胡萝卜素-4,4'-二酮) 是一种普遍存在于微藻、水生动物、鸟类和酵母中的红色酮类胡萝卜素^[1-2], 因其具有强抗

氧化性、中和自由基、清除活性氧特性, 在食品、饲料、化妆品以及医药行业广泛应用, 具有较高的商业价值^[3-5]。雨生红球藻 (*H. pluvialis*) 是一种单细胞绿藻^[6], 在胁迫条件下能够积累虾青素, 含量最高可达细胞干重的 4%^[7], 高于其他虾青素来源。因此, 如何提高雨生红球藻中虾青素产量, 已成为虾青素生产和研究的热点。

褪黑素 (MLT) 是一种具有独立受体的自由基清除剂和广谱抗氧化剂, 最初被发现于牛的松果体

收稿日期: 2017-09-29; 修回日期: 2018-03-21

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (21766012, 21666012)

作者简介: 岳陈陈 (1990), 男, 硕士研究生, 研究方向为微藻资源利用 (E-mail) 18468235975@163.com。

通信作者: 余旭亚, 教授, 博士 (E-mail) xuya_yu@163.com。

中,随后在其他动物、植物和微生物中均有发现,能调节生物体的各种生理活动^[8-11]。研究表明 MLT 能大幅提高单针藻中油脂含量^[12],油脂是高级脂肪酸的甘油酯^[13],而雨生红球藻虾青素的积累与脂肪酸合成紧密相关^[14],有超过 90% 的虾青素分子与脂肪酸(主要为油酸)发生酯化反应^[7],储存于富含甘油三酯的脂质体中^[15]。Zhang 等^[16]认为脂肪酸在虾青素合成中有两个作用,一是与虾青素酯化,形成虾青素酯,有利于虾青素的积累;二是形成脂质体用于储存虾青素酯。由于脂肪酸对虾青素积累具有重要作用,所以测定脂肪酸含量和相关合成酶活性的变化就显得尤为重要。

本研究选用 MLT 对雨生红球藻进行诱导,检测其对雨生红球藻生长、虾青素积累、脂肪酸合成以及脂肪酸合成相关酶的影响,进而对 MLT 诱导虾青素积累及脂肪酸生物合成进行分析探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

雨生红球藻(*H. pluvialis* LUGU),由本实验室筛选、保存。MLT,上海生工;乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)测试盒和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)测试盒,苏州科铭;虾青素标准品,美国 Sigma-Aldrich 公司;二甲基亚砜、丙酮、氯仿等,均为分析纯。

1730R 高速冷冻离心机,丹麦 Labogene Scanspeed 公司;DS-8510DTH 超声波微波组合体系;Ultrospec 2100pro 紫外可见分光光度计;VS-840-1 超净工作台;FD5-12 冷冻干燥机,西盟国际集团;Waters 996 高效液相色谱仪。

1.2 试验方法

1.2.1 雨生红球藻的培养

选用 Bold's Basal Medium (BBM)^[17]为基础培养基,将纯化过的雨生红球藻转接到 3 L(内置 2 L 培养基)锥形瓶中,控制培养温度(25±1)℃,光照强度 2 800 lx,持续通入 0.1 vvm 的无菌空气,培养至对数生长期(此时细胞浓度约为 7×10⁵个/mL)。

1.2.2 MLT 诱导

将 MLT 溶于乙醇中配制成浓度为 0.21 mol/L 的 MLT 母液,备用。5 000 g 离心 3 min 收集 1.2.1 对数生长期细胞,用无菌水洗去培养基,重悬浮于缺氮的 BBM 培养基中,加入 MLT 使诱导培养基中的 MLT 浓度分别为 0(对照)、5、10、15 μmol/L(保持加入相同的乙醇),控制培养温度(27±1)℃,12 000 lx 持续光照,连续通入 0.04 vvm 的无菌空气培养 15 d,进行隔天取样,测定藻细胞生物量以及虾青素含

量,同时收集藻体用于脂肪酸和酶活的测定。

1.2.3 藻细胞生物量的测定

隔天定期取 10 mL 诱导培养基中的藻液,离心收集细胞,冷冻,干燥,称重,计算细胞生物量。细胞生物量 = 藻粉干重/藻液体积。

1.2.4 虾青素含量的测定

采用高效液相色谱法测定雨生红球藻虾青素的含量,以虾青素标准品质量浓度(x)为横坐标,经液相色谱测定峰面积(y)为纵坐标制作标准曲线,得到曲线方程为 $y = 237.12x + 14.928$, $R^2 = 0.9999$ 。隔天定期取 5 mL 诱导培养基中的藻液,5 000 r/min 离心 3 min,弃上清收集藻细胞,使用超纯水洗 3 次,加入 5 mL 甲醇-二氯甲烷(体积比 3:1)提取液,冰水浴下用匀浆机 2 800 r/min 匀浆 20 s,匀浆液 10 000 g 低温离心 15 min,转移上清至另一试管中。重复提取 2~3 次,至沉淀物基本呈现无色为止。将收集的所有提取液 10 000 g 再次低温离心 15 min,取上清用高效液相色谱仪测定,色谱柱为 C₁₈柱(25 cm×4.6 mm,5 mm),流动相 A(丙酮)和流动相 B(甲醇-水,体积比 9:1)遵循:25 min B 80%~20%,10 min B 20%,5 min B 20%~80%,流速 1.25 mL/min;检测器为 Waters 996 光电二极管阵列检测器,进样量 30 μL,测定波长 476 nm,积分得到虾青素(游离虾青素和虾青素酯)峰面积,代入虾青素标准曲线方程,计算虾青素质量浓度。按下式计算虾青素酯含量和虾青素含量:

$$\text{虾青素酯含量} = \frac{\text{虾青素酯峰面积}}{\text{虾青素峰面积}} \times 100\%$$

$$\text{虾青素含量} = \frac{\text{虾青素质量浓度}}{\text{细胞生物量}}$$

1.2.5 藻细胞中脂肪酸组成测定

称取 10 mg 冻干的藻粉,加到有垫片的密闭玻璃器皿中,逐步加入 0.2 mL 氯仿-甲醇(体积比 2:1),0.3 mL 的 35% HCl-甲醇(体积比 1:19),旋紧瓶口,85℃水浴加热 1 h,冷却至室温,加入 0.9 mL 正己烷,于 150 r/min、25℃提取 1 h,静置后取上层,转移至 GC-MS 进样瓶中测定脂肪酸组成。

GC 条件:HP-5MS 色谱柱(5% Phenyl Methyl Silox,30 mm×250 μm×0.25 μm);二阶升温程序为 170℃维持 0 min,以 10℃/min 的速度升温至 190℃,维持 1 min;再以 0.8℃/min 的速度升温至 207℃,维持 1 min;分流比 40:1,进样量 1 μL;进样口温度 250℃;载气为高纯氮气,流速 1.0 mL/min。

MS 条件:四级杆温度 150℃,EI 离子源温度 230℃,溶剂延迟 2 min;质谱扫描范围 50~550。

以 NIST08.L 作为数据库,利用峰面积归一化

法计算脂肪酸各组分的相对含量。

1.2.6 脂肪酸生物合成相关酶活的测定

在 12 000 r/min、4℃ 条件下离心 5 min, 收集 10 mL MLT 诱导后藻液中的细胞, 水洗 2 遍, 加入研钵中, 边加液氮, 边用研杵研磨, 随后按照 ACCase 测试盒和 PEPCase 测试盒说明书测定 ACCase 和 PEPCase 活性。

1.2.7 数据处理

试验均设置 3 个平行样, 所有图表中数据为“平均值 ± 标准偏差”, 使用 ANOVA (SPSS 19.0) 一步法分析试验数据。最小显著性差异进行多重比较检验不同试验的组间差异, 当 $P < 0.05$ 时具有显著性。

2 结果与讨论

2.1 MLT 对雨生红球藻细胞生物量的影响

为了探究外源添加 MLT 对雨生红球藻生长的影响, 测定了不同浓度不同培养时间雨生红球藻的生长情况, 结果见图 1。

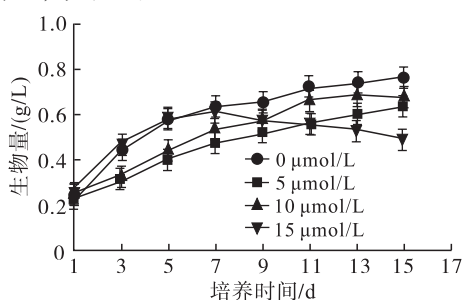


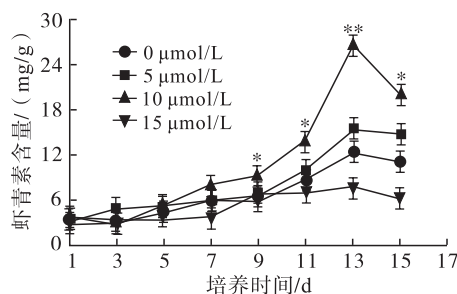
图 1 不同浓度的 MLT 对雨生红球藻生长的影响

由图 1 可知, 所有组在胁迫条件下的生长情况不同, 培养 15 d 的过程中, 对照组生物量达到了 0.77 g/L, 15、10、5 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导的生物量峰值分别达到 0.62、0.69 g/L 和 0.64 g/L, 均低于对照组。由生物量的变化趋势看出, 15 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导时, 雨生红球藻生物量有明显下降的趋势。这一现象表明低浓度的 MLT 处理对 *H. pluvialis* LUGU 生长没有积极影响, 高浓度的 MLT 处理抑制微藻细胞的生长, 使用 2,4-D 诱导雨生红球藻和褪黑素诱导 *Chlamydomonas reinhardtii* 的报道中也发现了这一现象^[18-19]。

2.2 MLT 对雨生红球藻虾青素积累的影响 (见图 2)

由图 2 可知, 在诱导条件下不同浓度的 MLT 对细胞内虾青素积累影响存在差异, 虾青素积累量与 MLT 间存在明显的剂量效应。10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导的效果最好, 在开始诱导 9 d 后虾青素积累开始显著增加, 13 d 时虾青素的含量达到最大 (26.62 mg/g),

是对照组 (12.3 mg/g) 的 2.16 倍, 高于相关报道^[20-21]。在 MLT 浓度为 5、15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 虾青素的最高含量分别为 15.41 mg/g 和 7.86 mg/g。15 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导时, 可能随着 MLT 浓度的提高, 对微藻细胞的生长产生了不利影响, 表现为虾青素积累量降低, 黄腐酸和茉莉酸诱导雨生红球藻时也出现了这一现象^[22-23], 表明适宜浓度的 MLT 有利于虾青素积累。



注: * 表示同一时间与其他组差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示同一时间与其他组差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

图 2 不同浓度 MLT 对雨生红球藻虾青素含量的影响

2.3 MLT 对雨生红球藻虾青素酯积累的影响

虾青素酯是游离虾青素和脂肪酸发生酯化反应的产物, 是雨生红球藻虾青素的主要储存形式, 为了探究 MLT 对虾青素酯的影响, 本研究测定了藻细胞中的虾青素酯占总虾青素的含量, 结果如图 3 所示。

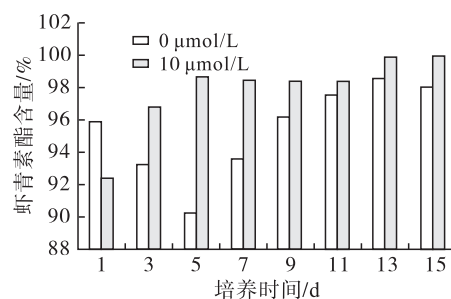


图 3 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 对雨生红球藻虾青素酯积累的影响

由图 3 可知, 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导的虾青素酯的含量逐步上升, 培养 15 d 后几乎达到了 100%, 而对照组虾青素酯含量先下降后上升, 除培养 1 d 外均低于 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 组。可见, MLT 诱导对虾青素酯的形成有一定的促进作用。

2.4 MLT 对雨生红球藻细胞内脂肪酸合成及组成的影响

以 0 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导藻细胞为对照, 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导的藻细胞为考察对象, 探究 MLT 对雨生红球藻中脂肪酸合成及组成的影响, 结果见表 1、表 2。

表1 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导对雨生红球藻内脂肪酸合成及组成的影响

脂肪酸	含量/%							
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d
C10:0	0.103 ± 0.002	0.032 ± 0.01	Nd	0.057 ± 0.03	0.041 ± 0.02	0.059 ± 0.03	0.089 ± 0.04	0.143 ± 0.138**
C11:0	0.109 ± 0.05*	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
C12:0	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.092 ± 0.03	0.097 ± 0.041	0.712 ± 0.24**
C14:0	0.65 ± 0.2*	0.87 ± 0.35*	0.718 ± 0.42	0.731 ± 0.31	0.463 ± 0.24	0.683 ± 0.38	1.303 ± 0.54	1.134 ± 0.51
C15:0	0.273 ± 0.11	0.255 ± 0.14	0.367 ± 0.18*	0.361 ± 0.17*	0.259 ± 0.13	0.29 ± 0.13	0.355 ± 0.16**	0.341 ± 0.132*
C15:1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0.054 ± 0.009
C16:0	33.546 ± 1.5	34.46 ± 2.5	35.491 ± 1.9*	36.897 ± 2.2**	28.163 ± 2.1	30.626 ± 1.1	31.66 ± 2.9	30.631 ± 2.2
C16:1	1.509 ± 0.21	1.054 ± 0.32	0.849 ± 0.21	0.709 ± 0.21	0.725 ± 0.18*	0.687 ± 0.24	0.83 ± 0.42	1.334 ± 0.5*
C17:0	0.568 ± 0.235**	0.416 ± 0.18**	0.636 ± 0.32	0.629 ± 0.24	0.542 ± 0.15	0.523 ± 0.12	0.546 ± 0.07*	0.531 ± 0.05
C17:1	Nd	Nd	Nd	Nd	0.024 ± 0.008	0.045 ± 0.02	Nd	0.059 ± 0.029
C18:0	3.035 ± 0.153	3.09 ± 0.148**	1.721 ± 0.965	2.609 ± 0.129	1.478 ± 0.65	2.722 ± 0.49	3.135 ± 1.23	3.083 ± 1.15
C18:1	5.789 ± 1.35	8.338 ± 1.89**	3.877 ± 1.863	4.318 ± 1.475	8.75 ± 3.286	8.116 ± 3.56	8.09 ± 4.02	6.449 ± 2.48
C18:2	16.67 ± 2.83	19.642 ± 3.52	14.776 ± 2.85	17.724 ± 3.01	26.81 ± 3.65	25.295 ± 3.2*	23.577 ± 1.92	22.375 ± 1.57
C18:3	32.716 ± 2.37	27.299 ± 1.36	36.738 ± 2.67*	31.21 ± 2.21*	27.522 ± 1.92**	26.053 ± 1.2	27.462 ± 2.86*	27.866 ± 2.49*
C20:0	0.147 ± 0.064	0.09 ± 0.0095	Nd	0.086 ± 0.006	0.233 ± 0.056	0.282 ± 0.12	0.282 ± 0.14	0.262 ± 0.13
C20:1	Nd	Nd	Nd	0.041 ± 0.004	0.047 ± 0.013	0.083 ± 0.03	Nd	Nd
C20:2	Nd	0.133 ± 0.023	0.084 ± 0.043	Nd	0.204 ± 0.049	0.112 ± 0.03	0.118 ± 0.012	0.096 ± 0.025
C20:3	0.46 ± 0.198**	0.263 ± 0.056	0.087 ± 0.021	0.111 ± 0.065	0.169 ± 0.075**	0.328 ± 0.15*	0.219 ± 0.089*	0.205 ± 0.103
C20:4	2.858 ± 0.856	2.774 ± 0.973	3.17 ± 1.943	3.011 ± 1.21	2.799 ± 0.478**	2.429 ± 1.02	0.288 ± 0.094	2.751 ± 0.095
C20:5	1.077 ± 0.236**	0.893 ± 0.153	1.313 ± 0.423	1.179 ± 0.056	1.103 ± 0.076*	0.92 ± 0.082	0.931 ± 0.128	1.031 ± 0.283
C21:0	Nd	Nd	Nd	Nd	0.024 ± 0.003	Nd	Nd	0.026 ± 0.012
C22:0	0.356 ± 0.153*	0.203 ± 0.091	0.106 ± 0.05	0.178 ± 0.082	0.373 ± 0.029	0.411 ± 0.18	0.732 ± 0.219**	0.649 ± 0.253
C24:0	0.133 ± 0.083	0.188 ± 0.076	0.067 ± 0.016	0.149 ± 0.075	0.27 ± 0.091	0.244 ± 0.13	0.286 ± 0.163	0.267 ± 0.129
合成量	10.80 ± 0.08*	13.36 ± 0.01*	15.32 ± 0.04*	12.75 ± 0.21	11.96 ± 0.12	10.11 ± 0.17	8.23 ± 0.13	9.94 ± 0.11

注:Nd为低于检测浓度。下同。

表2 无 MLT 处理对雨生红球藻内脂肪酸合成及组成的影响

脂肪酸	含量/%							
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d
C10:0	0.124 ± 0.05	0.066 ± 0.03**	0.045 ± 0.19*	0.07 ± 0.02	0.067 ± 0.03*	0.2 ± 0.07**	0.135 ± 0.37*	0.077 ± 0.02
C11:0	Nd	Nd	Nd	Nd	0.038 ± 0.016	Nd	Nd	0.084 ± 0.03*
C12:0	Nd	Nd	0.015 ± 0.09	0.112 ± 0.06*	0.061 ± 0.015	0.162 ± 0.4**	0.229 ± 0.89**	Nd
C14:0	0.497 ± 0.96	0.50 ± 0.072	0.618 ± 0.95	0.629 ± 0.16	0.712 ± 0.069**	1.07 ± 0.23**	1.048 ± 0.51	1.368 ± 0.42
C14:1	0.142 ± 0.09**	0.039 ± 0.01*	Nd	0.042 ± 0.013*	Nd	Nd	Nd	Nd
C15:0	0.202 ± 0.094	0.254 ± 0.106	0.298 ± 0.116	0.266 ± 0.126	0.219 ± 0.094	0.279 ± 0.097	0.301 ± 0.153	0.279 ± 0.106
C15:1	0.225 ± 0.107**	0.055 ± 0.01	Nd	0.043 ± 0.012	0.041 ± 0.02	Nd	0.124 ± 0.056**	Nd
C16:0	34.218 ± 2.3	33.156 ± 1.8	33.361 ± 1.6	30.099 ± 1.7	27.889 ± 1.2	33.065 ± 2.1	29.793 ± 1.8	29.22 ± 1.3
C16:1	1.03 ± 0.28	0.857 ± 0.24	0.845 ± 0.21	0.574 ± 0.14	0.501 ± 0.12	0.732 ± 0.16	0.76 ± 0.18	0.805 ± 0.21
C17:0	0.207 ± 0.12	0.225 ± 0.11	0.94 ± 0.25*	0.558 ± 0.18	0.462 ± 0.13	0.474 ± 0.17	0.375 ± 0.11	0.496 ± 0.13
C17:1	Nd	Nd	Nd	0.012 ± 0.009	Nd	Nd	Nd	Nd
C18:0	3.677 ± 1.3	1.921 ± 0.93	5.045 ± 0.8**	2.841 ± 0.63	3.439 ± 0.54**	4.862 ± 0.83*	4.976 ± 0.91*	4.222 ± 0.73
C18:1	7.121 ± 1.6*	5.352 ± 1.4	8.171 ± 2.3**	9.683 ± 0.79**	13.313 ± 1.23*	7.06 ± 0.57	10.466 ± 1.1	9.712 ± 1.2
C18:2	15.381 ± 2.1	18.572 ± 1.63	19.559 ± 2.83*	23.499 ± 2.63*	27.496 ± 1.89	21.596 ± 2.15	25.477 ± 2.36	25.931 ± 2.73
C18:3	30.782 ± 0.23	32.493 ± 0.21*	27.618 ± 1.89	27.002 ± 1.76	21.667 ± 1.56	25.396 ± 2.83	21.871 ± 1.57	22.091 ± 1.2
C20:0	0.352 ± 0.15**	Nd	0.065 ± 0.023	0.238 ± 0.089	0.361 ± 0.12	0.208 ± 0.97	0.252 ± 0.102	0.437 ± 0.13*
C20:1	0.191 ± 0.092*	0.05 ± 0.014	0.062 ± 0.015	0.07 ± 0.02	Nd	Nd	Nd	Nd
C20:2	0.37 ± 0.16*	0.277 ± 0.102*	0.041 ± 0.021	0.126 ± 0.098	0.153 ± 0.094	0.084 ± 0.02	Nd	0.073 ± 0.03
C20:3	0.074 ± 0.021	0.201 ± 0.098	0.091 ± 0.029	0.122 ± 0.05	0.079 ± 0.024	Nd	Nd	0.287 ± 0.102

续表 2

脂肪酸	含量/%							
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d
C20:4	2.852 ± 0.18	3.349 ± 0.13	2.232 ± 0.096	2.559 ± 0.12	Nd	2.738 ± 0.14	2.909 ± 0.11**	2.552 ± 0.092
C20:5	0.414 ± 0.17	1.027 ± 0.28	0.795 ± 0.15	0.914 ± 0.18	0.657 ± 0.14	1.325 ± 0.23	0.744 ± 0.19	1.031 ± 0.321
C21:0	0.763 ± 0.27*	1.075 ± 0.37*	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
C22:0	0.192 ± 0.067	0.227 ± 0.094	0.107 ± 0.058	0.329 ± 0.068*	0.418 ± 0.094	0.563 ± 0.18	0.249 ± 0.102	0.754 ± 0.21
C22:1	0.481 ± 0.15	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
C23:0	Nd	Nd	Nd	Nd	2.135 ± 0.16*	Nd	Nd	0.033 ± 0.011
C24:0	0.705 ± 0.249**	0.302 ± 0.122	0.092 ± 0.013	0.212 ± 0.096	0.292 ± 0.093	0.186 ± 0.074	0.291 ± 0.098	0.548 ± 0.18*
合成量	8.39 ± 0.04	11.76 ± 0.06	12.35 ± 0.03	14.81 ± 0.17	14.27 ± 0.23*	13.87 ± 0.21*	12.43 ± 0.13**	11.867 ± 0.11*

由表1、表2可知,10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导的雨生红球藻细胞中脂肪酸合成量逐渐升高,在5 d时达到最高(占干重的15.32% \pm 0.04%),是对照组的1.24倍,随后开始下降,13 d时达到最低(8.32% \pm 0.13%),低于同期的对照组,而对照组在培养7 d时达到最大(14.81% \pm 0.17%),进而逐步下降。雨生红球藻中脂肪酸主要为C16:0、C18:0、C18:1、C18:2和C18:3。随培养时间的延长,C16:0含量先升高,达到36.897%,高于对照组峰值(34.218%),随后呈下降趋势;C18脂肪酸除C18:3峰值(36.738%)高于对照组峰值(32.493%)外,其他均低于对照组。MLT诱导的微藻细胞脂肪酸合成量的最大值高于对照组,这种现象可能是因为:MLT是一种抗氧化剂,能一定程度上防止脂肪酸过氧化,增加脂肪酸的合成量;而脂肪酸在二酰基甘油酰基转移酶系的作用下与游离虾青素反应生成虾青素酯,使游离虾青素储存在富含三酰甘油的脂质体中,避免了游离虾青素对类胡萝卜素合成的反馈抑制,进而促进了虾青素的积累。本研究中,10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导条件下,雨生红球藻中脂肪酸和虾青素酯

含量提高证实了这一观点。Shang等^[24]也发现外源添加抗氧化剂茴香醚能够促进脂肪酸合成,从而提高虾青素的积累。

2.5 MLT对细胞内 ACCase 和 PEPCase 的影响(见图4)

ACCase 和 PEPCase 是脂肪酸生物合成途径中的关键酶。ACCase 能催化乙酰辅酶 A 羧化成丙二酰辅酶 A,丙二酰辅酶 A 用于后续的脂肪酸合成^[25];PEPCase 催化磷酸烯醇式丙酮酸和 HCO_3^- 反应生成草酰乙酸,而脂肪酸合成途径中磷酸烯醇式丙酮酸进一步反应生成丙酮酸。由图4可知,在整个培养阶段10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导组 PEPCase 活性明显低于对照,MLT 诱导组的 ACCase 活性高于对照。结果表明10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 能提高雨生红球藻中 ACCase 活性,降低 PEPCase 活性,可能是10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导提高了 ACCase 酶基因的表达量,降低 PEPCase 酶基因的表达量,进而促进了脂肪酸合成。由于脂肪酸和虾青素合成途径相互协同^[14],从而提高了虾青素的积累量。

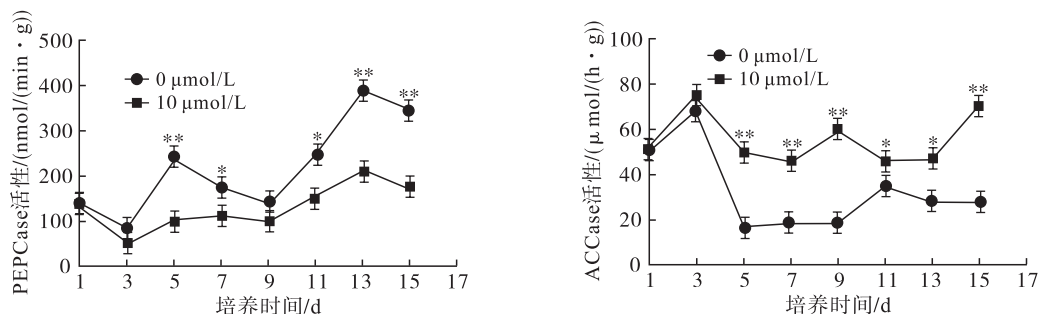


图4 10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 诱导对微藻 PEPCase 和 ACCase 活性的影响

3 结论

适量浓度的 MLT 有利于促进雨生红球藻中虾青素的积累和脂肪酸合成。添加10 $\mu\text{mol/L}$ MLT 时,雨生红球藻中虾青素含量和脂肪酸合成量分别在13 d和5 d达到最大值,是对照组的2.16倍

和1.24倍。此外,通过分析脂肪酸合成量、组成及关键酶活性的变化,表明在 MLT 的诱导下 ACCase 活性升高,而 PEPCase 活性降低,从而促进了雨生红球藻细胞中脂肪酸的合成及虾青素酯的积累。

参考文献:

- [1] LI J, ZHU D, NIU J, et al. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(6): 568–574.
- [2] YU X, NIU X, ZHANG X, et al. Identification and mechanism analysis of chemical modulators enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Algal Res*, 2015, 11: 284–293.
- [3] FASSETT R G, COOMBES J S. Astaxanthin in cardiovascular health and disease [J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 2030–2048.
- [4] HAN D, LI Y, HU Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications [J]. *Algae*, 2013, 28(2): 131–147.
- [5] GUERIN M, HUNTLEY M E, OLAIZOLA M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition [J]. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(5): 210–216.
- [6] 丁巍, 尚敏敏, 赵鹏, 等. 叔丁基对羟基茴香醚对两生红球藻虾青素积累和 *psy* 基因表达量的影响 [J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 62–67.
- [7] BOUSSIBA S, BING W, YUAN J P, et al. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses [J]. *Biotechnol Lett*, 1999, 21(7): 601–604.
- [8] REITER R J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions [J]. *Endocr Rev*, 1991, 12(2): 151–180.
- [9] TAN D X, MANCHESTER L C, TERRON M P, et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species [J]. *J Pineal Res*, 2007, 42(1): 28–42.
- [10] SHI H, JIANG C, YE T, et al. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon*(L). Pers.] by exogenous melatonin [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(3): 681–694.
- [11] TAN D X, HARDELAND R, MANCHESTER L C, et al. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(2): 577–597.
- [12] LI D, ZHAO Y, DING W, et al. A strategy for promoting lipid production in green microalgae *Monoraphis dium* sp. QLY-1 by combined melatonin and photoinduction [J]. *Bioresour Technol*, 2017, 235: 104–112.
- [13] 蔡曼, 柳延涛, 王娟, 等. 植物种子油脂合成代谢及其关键酶的研究进展 [J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(1): 131–139.
- [14] CHEN G, WANG B, HAN D, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *Plant J*, 2015, 81(1): 95–107.
- [15] GRUNEWALD K, HIRSCHBERG J, HAGEN C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(8): 6023–6029.
- [16] ZHANG Z, SUN D, MAO X, et al. The crosstalk between astaxanthin, fatty acids and reactive oxygen species in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* [J]. *Algal Res*, 2016, 19: 178–183.
- [17] EBRAHIMIAN A, KARIMINIA H R, VOSOUGHI M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater [J]. *Renew Energ*, 2014, 71: 502–508.
- [18] DE JESUS RAPOSO M F. Influence of the growth regulators kinetin and 2, 4-D on the growth of two chlorophyte microalgae, *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* [J]. *J Basic Appl Sci*, 2013, 9: 302.
- [19] TAL O, MALKIEL H, SINAM B, et al. Melatonin regulates antioxidative mechanisms in microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* (Volvocales, Chlorophyceae) [J]. *Phycologia*, 2015, 54(3): 292–298.
- [20] WEN Z, LIU Z, HOU Y, et al. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2015, 78: 10–17.
- [21] 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 Microb Tech*, 2012, 51(4): 225–230.
- [22] ZHAO Y, SHANG M, XU J W, et al. Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid [J]. *Process Biochem*, 2015, 50(12): 2072–2077.
- [23] RAMAN V, RAVI S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33(3): 1043–1049.
- [24] SHANG M, DING W, ZHAO Y, et al. Enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* using butylated hydroxyanisole [J]. *J Biotechnol*, 2016, 236: 199–207.
- [25] 王琳, 余旭亚, 赵鹏, 等. 微藻油脂生物合成与 ACCase, PEPC 相关性的研究进展 [J]. *中国油脂*, 2013, 38(2): 56–60.