

黄腐酸对 *Haematococcus pluvialis* LUGU 虾青素积累和 *lcy* 基因表达量的影响

尚敏敏, 赵永腾, 赵鹏, 李涛, 徐军伟, 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: 雨生红球藻是虾青素的主要来源, 为探明黄腐酸 (FA) 对雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 的影响, 将不同质量浓度的 FA 添加至对数生长期的藻液中置于胁迫条件下培养, 并分别对细胞生物量浓度、虾青素积累质量浓度以及番茄红素 β -环化酶 (*lcy*) 基因表达量进行了测定。结果表明, 黄腐酸质量浓度为 10 mg/L, 藻细胞的生物量产率达到最大 80.28 mg/(L·d), 比对照组提高 5.44%; 而虾青素最大质量浓度为 20.82 mg/L, 是在 FA 质量浓度为 5 mg/L 时测得, 比对照组提高了 86.89%。RT-PCR 分析显示, 虾青素合成的关键基因 *lcy* 的表达受 FA 的影响, 当添加 5 mg/L 和 10 mg/L 的黄腐酸时 *lcy* 基因最大的表达量分别为对照的 1.2 倍和 0.7 倍。实验证明 FA 诱导下的雨生红球藻虾青素的积累含量和 *lcy* 基因表达量呈正相关。

关键词: 黄腐酸; 诱导; 虾青素; *lcy* 基因; 雨生红球藻

中图分类号: Q 81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)07-0702-05

Effects of Fulvic Acid on Astaxanthin Accumulation and the Transcript Levels Expression Kinetics of *lcy* Gene of *Haematococcus pluvialis* LUGU

SHANG Minmin, ZHAO Yongteng, ZHAO Peng, LI Tao, XU Junwei, YU Xuya*

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

Abstract: To explore the effect of Fulvic acid (FA) on *Haematococcus pluvialis*, different concentration gradient of Fulvic acid (FA) was added in the culture of *Haematococcus pluvialis* LUGU. Meanwhile, cells growth, astaxanthin accumulation and the transcript levels expression kinetics of *lcy* gene was studied during induced time. The results show that the suitable concentration of FA not only promote the algae growth (when dealt with 10 mg L⁻¹ FA concentration, the algae biomass production reach the maximum 80.28 mg L⁻¹ d⁻¹, increased by 5.44% than that of the control group), but also greatly improve the astaxanthin content (the astaxanthin content reach 20.82 mg L⁻¹ when dealt with 5 mg L⁻¹ FA concentration, is 86.89% higher than the control group). RT-PCR analysis shows that the transcriptional levels of *lcy* induced by 5 mg L⁻¹ and 10 mg L⁻¹ FA is 1.2 and

收稿日期: 2015-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21266013)。

* 通信作者: 余旭亚(1969—), 男, 云南昆明人, 工学博士, 教授, 主要从事生物质能工程研究。E-mail: xuya_yu@163.com

引用本文: 尚敏敏, 赵永腾, 赵鹏, 等. 黄腐酸对 *Haematococcus pluvialis* LUGU 虾青素积累和 *lcy* 基因表达量的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(07): 702-706.

0.7 times than that of control, respectively. The correlation analysis indicate that, the accumulation of astaxanthin content and the transcriptional levels of *lcy* gene induced by FA is positively correlated.

Keywords: fulvic acid, induce, astaxanthin, *lcy* gene, *Haematococcus pluvialis* LUGU

雨生红球藻是自然界中普遍存在的一种单细胞绿藻,属于团藻目,红球藻科,红球藻属^[1],在不利的环境条件下藻细胞逐渐变大并积累虾青素^[2],且其虾青素的产量优于其他已知的虾青素来源^[3-4]。雨生红球藻细胞内积累的虾青素是生物体天然次级代谢产物和强抗氧化物质,已作为添加剂广泛应用于水产养殖和食品领域^[5-7]。但目前虾青素存在需求大、产量低、生产成本高等问题,因此,采取有效措施提高雨生红球藻虾青素的产量是解决这一问题的关键和研究热点。

Steinbrenner 等^[8]将雨生红球藻虾青素合成途径分为两个阶段: β -胡萝卜素的形成为第一阶段,虾青素的合成为第二阶段。番茄红素是类胡萝卜素中的一种,是类胡萝卜素生物合成途径中的重要的中间体,番茄红素 β -环化酶基因是在雨生红球藻中虾青素合成途径中将番茄红素环化生成 β -胡萝卜素的关键酶基因, β -胡萝卜素进而成为第二阶段合成虾青素的重要底物,*lcy* 基因表达量的增加可以提高角黄质转化为虾青素的效率。黄腐酸(Fulvic Acid, FA)是一类成分复杂的天然有机物质^[9]。陈玉玲等^[10]在干旱条件下,冬小麦幼苗施加 FA,发现其超氧化物歧化酶 SOD 与过氧化物酶 POD 活性提高,植物抗干旱的能力增强。而 FA 作为诱导因子,对雨生红球藻中虾青素的积累影响和机理方面的研究还尚未见报道。

作者以雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 为对象,研究 FA 对 *Haematococcus pluvialis* LUGU 生长和虾青素积累的影响及 FA 胁迫对虾青素合成关键酶基因 *lcy* 表达的作用,为优化微藻培养条件、提高虾青素的产量、探索 FA 诱导其合成机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 雨生红球藻的培养

雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 为作者所在实验室筛选、保存。利用 BG-11 为基础培

养基,接种到 3 L(内置 2 L 培养基)光生物反应器中,室内恒温(25 ± 1) °C,光照强度 2 800 lx,通入无菌空气进行高密度培养,直至培养到生长对数期。

1.2 黄腐酸的配制

根据预试验结果,实验共设置 0, 5, 10 mg/L 3 组质量浓度梯度的黄腐酸,每组设 3 个平行样,将对数生长期的藻细胞收集后重新悬浮,以 2×10^5 个/mL 的接种量接入诱导培养基中。每隔一天取样一次,测定 *H. pluvialis* LUGU 虾青素质量浓度。

1.3 虾青素质量浓度的测定

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^[11]的方法稍加改进测定其虾青素含量。每隔一天定期取出 5 mL 处于诱导阶段的藻液,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。于收集的藻细胞沉淀中加入质量分数 5% KOH 和体积分数 30% 甲醇混合液置于 65° 水浴锅内 5 min 以破坏叶绿素,5 000 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 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 490 nm 下测定 A 值。按公式 $c(\text{mg/L}) = (4.5 \times A_{490} \times V_a) / V_b$ 计算虾青素质量浓度(A:吸光值, V_a :DMSO 的体积, V_b :藻液体积)。

1.4 雨生红球藻 *lcy* 基因表达分析

本实验由 Primer 5.0 软件设计,上海生工生物工程技术有限公司合成 *lcy* 酶基因的上下游扩增引物:5'-CTTCTTCTCCGCCTTCTTCA-3' 与 5'-GCATCCTACCGCTCAAAGAA-3',扩增长度为 565 bp。扩增所得序列测序(上海生工)后 BLAST 比对,并以此为模板设计荧光定量引物 *lcyF* (5'-GACTGGAGTGGGAAGAAC-3') 与 *lcyR* (5'-CCTACCGCTCAAAGAAATA-3'),目标产物为 186 bp。

Trizol 法提取不同质量浓度 FA 处理的雨生红球藻 RNA,利用逆转录试剂盒(TaKaRa)将 RNA 逆转录合成 cDNA,以其为模板,以 *lcyF* 与 *lcyR* 分别为上下游引物进行 RT-PCR 扩增,检测不同质量浓

度 FA 对雨生红球藻 *lcy* 基因表达的影响。通过 ABI 7500 荧光定量仪对 *lcy* 基因的表达进行定量, RT-PCR 的数据结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法处理分析^[12]。以 18s(上游引物 18sF:5'-CGGTCTGCCTCTGCTATG-3', 下游引物 18sR:5'-GCTTGCTTTGAACACGCT-3') 基因作为内标以调节 RNA 的用量和循环数, 使内标基因在不同浓度诱导下的表达丰度一致。

进行一元线性回归分析(回归方程中 Y 为虾青素质量浓度, x 为 *lcy* 基因表达水平), 研究不同质量浓度 FA 诱导下雨生红球藻虾青素质量浓度和 *lcy* 基因表达量之间的相关性。

2 结果与讨论

2.1 FA 对诱导培养微藻细胞生长的影响

图 1 表明, 不同质量浓度的 FA 对诱导阶段雨生红球藻细胞生长的影响存在差异, 微藻细胞的生长量随着培养时间的延长而逐渐增加, 培养至第 3 天后, 添加 FA 的微藻细胞量都开始高于对照组。对照组和 10 mg/L FA 实验组在第 7 天生物量达到最大值; 而 FA 质量浓度为 10 mg/L 时, 生物量最大值提前出现在第 5 天。比较不同质量浓度 FA 胁迫下 *H. pluvialis* LUGU 的最大生物量(图 2), 结果显示, 添加 10 mg/L FA, 细胞生物量达到最大值 0.562 g/L。可见在诱导藻细胞阶段, 适当质量浓度的 FA 能促进藻细胞的生长, 且当黄腐酸的质量浓度为 10 mg/L 时, 藻细胞的生物量产率达到最大 80.28 mg/(L·d)。

2.2 FA 对微藻总虾青素产量的影响

图 3 显示, 不同质量浓度的 FA 对诱导阶段 *H. pluvialis* LUGU 内总虾青素质量浓度的影响存在差

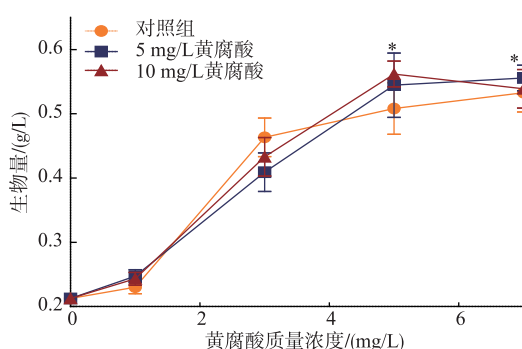


图 1 不同质量浓度黄腐酸对诱导阶段雨生红球藻 LUGU 藻细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of different level of FA on the cell growth of *H. pluvialis* LUGU under induction period

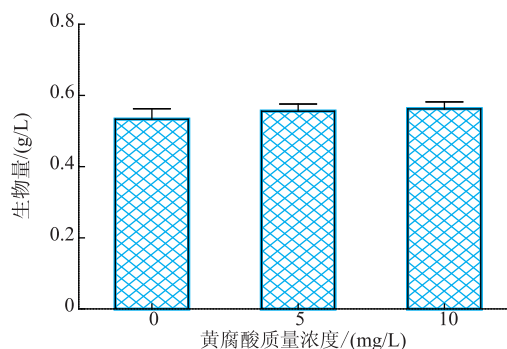


图 2 不同质量浓度黄腐酸对雨生红球藻的最大生物量的影响
Fig. 2 Effect of different level of FA on the maximum cell growth of *H. pluvialis* LUGU under induction period

异, 微藻总虾青素的质量浓度随着培养时间的延长而逐渐增加。当 FA 质量浓度为 0~10 mg/L 时, 总虾青素产量呈对数增长。比较不同质量浓度 FA 胁迫下 *H. pluvialis* LUGU 总虾青素最大产量的变化(图 4), 结果发现, 在不添加 FA 的条件下, 总虾青素的产量为 20.14 mg/g; 当添加 5 mg/L 的 FA 时, 总虾青素的产量提高了 1.86 倍; 当 FA 质量浓度的增加到 10 mg/L 时, 虾青素的产量仅为对照组的 1.09, 可见 10 mg/L 质量浓度的 FA 虽然促进了藻细胞的生长但却不利于虾青素的合成, 不同质量浓度 FA 对虾青素积累的影响存在显著差异。

2.3 FA 诱导下微藻虾青素产量和 *lcy* 基因表达量的关系

用 RT-PCR 的方法测定不同诱导时间内, 不同浓度梯度 FA 诱导的 *H. pluvialis* LUGU 虾青素相关合成基因 *lcy* 的表达水平(图 5), 结合虾青素产量变化趋势, FA 质量浓度为 5 mg/L 时, *lcy* 的表达量至第 7 天达到最大值, 为对照组表达量的 1.2 倍, 虾青素产量至第 7 天达到最大值 20.817 mg/g。FA 质量浓度为 10 mg/L 时, 虾青素产量至第 7 天达到最大值 12.231 mg/g, *lcy* 基因的表达量亦于第 7 天呈现出最大值, 为对照的 0.7 倍。从不同 FA 质量浓度诱导 *H. pluvialis* LUGU 上来看, 质量浓度为 5 mg/L 时, *lcy* 基因表达量最大, 这与该浓度下虾青素产量最大的结果一致。

不同浓度 FA 诱导 *H. pluvialis* LUGU 虾青素产量和 *lcy* 基因表达量之间的相关性表明, 当 *lcy* 表达水平低时, 微藻虾青素产量随其后表现出低产量; 如 *lcy* 表达水平提高, 虾青素的产量随之增加, 两者

呈现线性相关, 回归方程为: $y=0.0585x+0.0047$, $R^2=0.9755$ (式中, y 为 *H. pluvialis* LUGU 虾青素的产量, x 为 *lcy* 基因的表达水平, 直线方程的相关系数为 0.9755)。

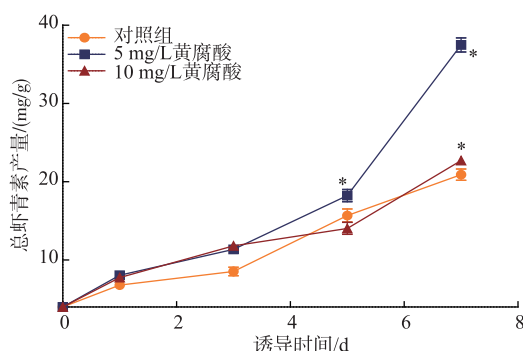


图 3 黄腐酸对雨生红球藻总虾青素产量的影响

Fig. 3 Effect of FA on the total astaxanthin production of *H. pluvialis* LUGU

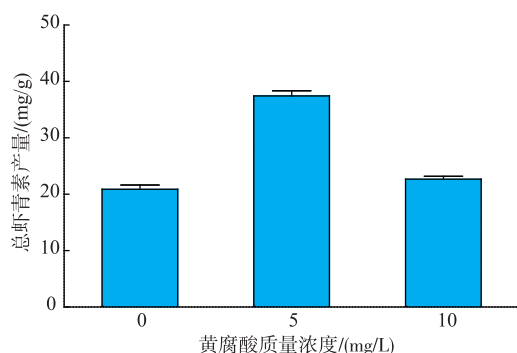


图 4 黄腐酸对雨生红球藻最大总虾青素产量的影响

Fig. 4 Effect of FA on the total concentration of astaxanthin of *H. pluvialis* LUGU

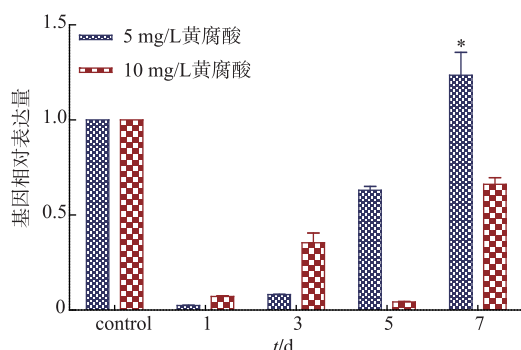


图 5 不同质量浓度的黄腐酸对 *lcy* 基因表达量的影响

Fig. 5 Effects of different level of FA on the transcript levels expression kinetics of *lcy*

3 结 语

Raman 等^[13]利用不同的植物生长调节剂作为诱导子,诱导雨生红球藻大量积累虾青素。如将不同质量浓度的茉莉酸甲酯等加入到处于生长对数期的藻液中,再转入胁迫生长环境下诱导藻细胞积累虾青素,发现 50 mg/L 的茉莉酸甲酯大大缩短了微藻合成虾青素的时间,可有效促进雨生红球藻积累虾青素,但高浓度的诱导剂可能对藻细胞有毒害作用。Gao 和 Lu 等皆利用不同质量浓度赤霉素 A3 诱导藻细胞积累虾青素,结果表明,赤霉素 A3 作为诱导剂可以提高虾青素的积累量,40 mg/L 的赤霉素 A3 诱导藻细胞所积累的虾青素,高于 20 mg/L 和 2 mg/L 的赤霉素 A3 诱导的积累量^[14-15]。因此,探究合适的诱导子和恰当的剂量是克服虾青素产量低的有效途径。Gao^[16]研究了 25 mg/L 和 50 mg/L 的水杨酸分别对藻细胞积累虾青素与相关基因表达量的影响,基因与虾青素的积累正相关主要包括在转录前水平、转录水平及转录水平后;研究发现用 25 mg/L 诱导藻细胞时,*lcy* 基因的表达量在第 3 天达到最高,早与藻细胞开始快速积累虾青素时间,表明这 *lcy* 在转录水平前对虾青素生物合成起到了正调节的作用。因此,研究诱导过程中虾青素代谢途径中相关基因的表达水平,有助于了解在添加黄腐酸条件下虾青素产量提高的原因,为诱导虾青素积累提供理论基础。

黄腐酸是腐殖质中水溶性的一种天然物质,含有很多植物所需要的微量元素和氨基酸等,所含有的大量官能团生理活性比一般的植物生长激素生理能力强,还可以络合金属离子^[9],可作为植物生长因子促进植物的生长发育^[17]。作为植物的一种拮抗剂,已有研究指出黄腐酸对于植物的抗倒伏、抗旱具有一定的作用^[18-19]。添加外源黄腐酸可激发植物防御基因的表达,诱导植物的化学防御,促进相关化合物的合成。虾青素是雨生红球藻在胁迫条件下产生和积累的次生代谢产物,因此研究 FA 对雨生红球藻的生长以及虾青素积累的影响有较好的前景。

适宜质量浓度的 FA 有利于促进雨生红球藻 *H. pluvialis* LUGU 细胞的生长和虾青素的积累。FA 添加质量浓度为 10 mg/L,藻细胞的生物量产率达到最大 80.28 mg/(L·d),比对照组提高 5.44%。5 mg/L

的 FA,可诱导虾青素产量提高了 1.86 倍;且 *lcy* 表达量达到最大值,为对照组的 1.2 倍,微藻虾青素产量与 *lcy* 基因表达量成正相关。随着 FA 诱导虾青素

生物合成的分子机制的进一步研究,FA 有望成为产虾青素微藻的生物诱导子。

参考文献:

- [1] MIKI W, HOSODA K, KONDO K, et al. Astaxanthin-containing Drink[J]. **Japanese Patent**, 1998, 10155459.
- [2] ZHUANG Huiru, CHEN Wenlie. The research of ultrastructure for different morphological cells of *Haematococcus pluvialis* [J]. **Journal of Applied and Environmental Biology**, 2001, 7(5): 428-433. (in Chinese)
- [3] QIAN Fei, LIU Haiying, GUO Shidong. The application of papain in astaxanthin extraction from crayfish shell [J]. **Journal of Food and Biotechnology**, 2010, 29(2): 237-243. (in Chinese)
- [4] HU Jianzhong, GONG Jifan, DONG Qinglin. The mechanism of low nitrogen promoting astaxanthin biosynthesis in *Phaffia rhodozyma* [J]. **Journal of Food and Biotechnology**, 2009, 28(1). (in Chinese)
- [5] PAN C H, CHIEN Y H. Effects of dietary supplementation of alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow), synthetic astaxanthin and β -carotene on survival, growth, and pigment distribution of red devil, *Cichlasoma citrinellum* (Günther) [J]. **Aquaculture Research**, 2009, 40(8): 871-879.
- [6] KOP A, DURMAZ Y. The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840) [J]. **Aquaculture International**, 2008, 16(2): 117-122.
- [7] GUERIN M, HUNTLEY M E, OLAIZOLA M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition [J]. **Trends in Biotechnology**, 2003, 21(5): 210-216.
- [8] STEINBRENNER J, LINDEN H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control [J]. **Plant Molecular Biology**, 2003, 52: 343-356.
- [9] LU Lingang. The yellow humic acid and its application in agriculture [J]. **Modernizing Agriculture**, 2001, 5(9): 10. (in Chinese)
- [10] CHEN Yuling, ZHOU Xie. Effect of fulvic acid on ABA, IAA and activities of superoxide dismutase and peroxidase in winter wheat seedling under drought condition [J]. **Plant Physiology Communication**, 2000, 36(4): 311-314. (in Chinese)
- [11] BOUSSIBA S, VONSHAK A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haetoccus pluvialis* [J]. **Plant Cell Physiol**, 1991(32): 1077-1082.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. **Methods**, 2001, 25: 402-408.
- [13] RAMAN V, RAVI S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* [J]. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2011, 33(3): 1043-1049.
- [14] LU Y, JIANG P, LIU S, et al. Methyl jasmonate- or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of β -carotene ketolase genes (bkt) in microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101(16): 6468-6474.
- [15] GAO Z, MENG C, GAO H, et al. Carotenoid genes transcriptional regulation for astaxanthin accumulation in fresh water unicellular alga *Haematococcus pluvialis* by gibberellin A3 (GA3) [J]. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, 2013, 50(6): 548-553.
- [16] GAO Z, MENG C, ZHANG X, et al. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid X genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012, 51(4): 225-230.
- [17] 何立华. 生物技术黄腐酸的研究和应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [18] ZHOU Lina, SUN Lirong, MAO Hui, et al. Effects of drought-resistant fulvic acid liquid fertilizer on wheat and maize growth [J]. **Agricultural Research in Arid Region**, 2012, 30(1): 154-158. (in Chinese)
- [19] HUI Zhenlong, LI Chaozhou, SHI Wenxuan, et al. A study on the use of fulvic acid to improve growth and resistance in continuous cropping of potato [J]. **Acta Prataculturae Sinica**, 2013, 22(4): 130-13. (in Chinese)