

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180831001

http://www.yykxjz.cn/

岳陈陈, 余旭亚, 赵永腾, 王惠萍. 二丁基羟基甲苯对雨生红球藻虾青素和油脂积累的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 145-153
Yue CC, Yu XY, Zhao YT, Wang HP. Effects of butylated hydroxytoluene on accumulation of astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* LUGU. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 145-153

二丁基羟基甲苯对雨生红球藻虾青素和 油脂积累的影响*

岳陈陈¹ 余旭亚¹ 赵永腾¹ 王惠萍²①

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院 昆明 650500; 2. 昆明市儿童医院 昆明 650228)

摘要 以雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)为对象, 研究高光照、缺氮条件下, 外源添加不同浓度的二丁基羟基甲苯(Butylated hydroxytoluene, BHT)对雨生红球藻生长、虾青素积累、油脂合成、脂肪酸组成、碳水化合物、蛋白含量以及虾青素和脂肪酸合成相关酶基因的影响。结果显示, 添加不同浓度的 BHT 后, 2 mg/L BHT 添加组虾青素积累量为最高, 显著高于其他实验组和对照组 ($P < 0.05$), 达到 31.66 mg/g, 是对照组的 1.87 倍。油脂含量达 45.56%, 高于同期对照组(39.06%), 脂肪酸组成变化不显著。在此条件下, 虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *bkt* 表达水平分别是对照组的 5.19 倍和 2.04 倍; 脂肪酸合成关键酶基因 *kas* 和 *acp* 表达水平较对照组显著提高 ($P < 0.05$), 分别是对照组的 4.56 倍和 3.02 倍。与对照组相比, 2 mg/L BHT 添加组的碳水化合物和蛋白含量均呈下降趋势。研究表明, 在胁迫条件下, 外源添加适量浓度的 BHT 能有效促进雨生红球藻中虾青素的积累, 同时提高了藻细胞内的油脂含量。

关键词 雨生红球藻; 二丁基羟基甲苯; 虾青素; 油脂; 虾青素合成基因; 脂肪酸合成基因

中图分类号 S968.41 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0145-09

虾青素是一种红色脂溶性酮式类胡萝卜素, 在水产养殖、生物医药、化妆品等领域应用广泛(陈超等, 2014; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2016)。研究发现, 胁迫条件, 如高光照、高盐、缺氮等, 能促进微藻积累虾青素(Chen *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Zhekisheva *et al.*, 2002)。雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)(绿藻门、团藻目)是一种分布于世界各地的单细胞淡水微藻, 由于其虾青素含量高而被公认为天然虾青素生产的主要原料(何磊等, 2011; Lorenz, 1999; Rao *et al.*, 2010), 生产中, 一般采用增加生物量和细胞内虾青素积累量的方法来

提高虾青素的产量。

胁迫条件下, 雨生红球藻除了积累虾青素外, 还大量积累脂肪酸和甘油三酯(Saha *et al.*, 2013)。研究发现, 雨生红球藻中约有 95% 的游离虾青素会和脂肪酸发生酯化并储存在富含三酰基甘油的胞质脂质体中(Holtin *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2015)。虾青素合成以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸(GA3P)为起始物, 经 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)催化, 形成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸, 最后经类胡萝卜素酮酶(BKT)合成游离虾青素(Estévez *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2016)。*acp* 编码细胞中酰基载体蛋白(ACP)的合

* 国家自然科学基金地区科学基金项目(21766012; 21666012)和云南省重大科技专项计划(2018ZG003)共同资助 [This work was supported by Regional Science Foundation Project of National Nature Science Foundation of China (21766012; 21666012), Yunnan Province Major Science and Technology Special Program (2018ZG003)]. 岳陈陈, E-mail: 18468235975@163.com

① 通讯作者: 王惠萍, 主任医师, E-mail: 2500016390@qq.com

收稿日期: 2018-08-31, 收修改稿日期: 2018-10-05

成, 脂肪酸合成的第一个循环是乙酰-CoA 与丙二酸单酰-ACP 在 β -酮酰-ACP 合酶(KAS)的催化下生成乙酰乙酰-酰基载体蛋白, 进入下一步脂肪酸的合成(张梅等, 2018)。二丁基羟基甲苯(BHT)是一种人工合成的酚类抗氧化剂, 因其抗氧化性强、挥发性低、稳定性高、耐用性好等优点被广泛应用于化工、食品、医药等领域(赵磊等, 2016)。Nanou 等(2010)研究发现, 外源添加 BHT 能提高真菌 *Blakeslea trispora* 中 β -胡萝卜素的积累。而 β -胡萝卜素是虾青素合成通路中重要的中间代谢产物, 这为本研究将 BHT 用于雨生红球藻诱导虾青素积累提供了理论依据。

本研究通过在培养基中添加不同浓度 BHT, 考察其对雨生红球藻生长、虾青素含量、油脂含量、脂肪酸组分、碳水化合物、蛋白含量等生理生化指标及对虾青素、脂肪酸合成相关酶基因表达的影响, 优化 BHT 添加浓度, 为其改善雨生红球藻中虾青素和油脂积累的工艺提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

雨生红球藻分离、筛选自云南省泸沽湖, 本实验室保存。BHT 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Trizol、逆转录试剂盒、引物(*dxs*、*bkt*、*acp* 和 *kas*)和荧光定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 甲醇、DMSO、KOH、丙酮和葡萄糖等均为分析纯。

1.2 主要仪器

1730R 高速冷冻离心机, 丹麦 Labogene Scanspeed 公司; Ultrospec 2100pro 紫外可见分光光度计, 美国 General Electric 公司; FD5-12 冷冻干燥机, 西盟国际集团; 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 雨生红球藻的培养 以 Bold's Basal Medium (BBM)(Ebrahimian *et al*, 2014)为基础培养基, 将雨生红球藻接种到容积为 3 L 的鼓泡式光生物反应器中, 2800 lx 持续光照, 培养温度为(25±1)°C, 连续通入 0.1 vvm 的无菌空气, 培养 15 d(此时生物量约为 7.0×10^5 cells/ml)。

1.3.2 BHT 诱导 将 BHT 溶于无水乙醇, 制成质量浓度为 3.5 g/L 的 BHT 母液, 备用。3000 r/min 离心 5 min, 收集上述的藻细胞, 用无菌水洗 3 次, 除去培养基, 重悬于不含氮源的 BBM 培养基中, 加入

BHT 母液, 使得培养基中 BHT 的质量浓度分别为 0、1、2 和 3 mg/L(保持各组的乙醇添加量相同)。培养条件为: 12000 lx 持续光照, 培养温度为(28±1)°C, 连续通入 0.04 vvm 的无菌空气, 培养 15 d, 隔天取样, 测定各生理生化指标。

1.3.3 藻细胞生物量和虾青素含量的测定 选用改进过的方法测定诱导培养基中雨生红球藻虾青素的含量(Boussiba *et al*, 1991)。隔天定时取 5 ml 诱导培养基中的藻液, 5000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 收集藻细胞。加入 2 ml 质量分数为 5%的 KOH 和体积分数为 30%的甲醇混合液, 置于 65°C 水浴 15 min 以破坏叶绿素, 3500 r/min 离心弃上清液, 收集沉淀, 水洗 2 次以洗去沉淀中残余的叶绿素, 离心收集沉淀, 加入 5 ml 的 DMSO, 混匀后利用超声破壁, 反复抽提至藻体发白, 5000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 于 490 nm 波长下测定吸光度 $A_{490\text{ nm}}$ 。按以下公式计算虾青素质量浓度:

$$\text{虾青素质量浓度(mg/L)} = (4.5 \times A_{490\text{ nm}} \times V_a) / V_b$$

式中, V_a 为 DMSO 体积(ml); V_b 为藻液体积(ml)。

此外, 每隔 1 d 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, 细胞生物量和虾青素含量按以下公式计算:

$$\text{细胞生物量(g/L)} = \text{藻粉干重} / \text{藻液体积}$$

$$\text{虾青素含量(mg/g)} = \text{虾青素质量浓度} / \text{细胞生物量}$$

1.3.4 藻细胞油脂含量和脂肪酸组分测定 按照 Yu 等(2012)的方法测定藻细胞中的油脂含量和脂肪酸组成。离心收集各组藻细胞, 冷冻干燥, 称取重 ω_1 的藻体充分研磨, 加入 3 ml 氯仿-甲醇混合液(氯仿: 甲醇=2:1, v/v)提取油脂, 置于 150 r/min 的摇床中 20 min, 2000 × g 离心 10 min, 收集上清液, 重复提取 2~3 次至藻体发白, 将上清液置于管重 ω_2 的 50 ml 离心管中, 39°C 烘箱中干燥, 称重 ω_3 , 油脂含量计算公式如下:

$$\text{油脂含量(\%)} = (\omega_3 - \omega_2) / \omega_1 \times 100$$

向上述含有油脂的离心管中加入 2 ml 硫酸甲醇溶液(硫酸: 甲醇=3:97, v/v)混匀, 70°C 水浴 4 h, 加入 2 ml 正己烷, 转移至进样瓶中, 利用 Agilent 7890 进行脂肪酸 GC-MS 分析, 色谱条件: 色谱柱为 HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox, 30 mm×250 μm ×0.25 μm), 二阶升温程序: 170°C 维持 0 min, 以 10°C/min 的速度升至 190°C, 维持 1 min; 再以 0.8°C/min 的速度升温至 207°C, 维持 1 min; 进样分流比 40:1, 分流进样 1 μl ; 进样口温度维持在 250°C; 载体为高纯氮气, 以 1 ml/min 流速流入; 质谱条件: 四级杆温度为

150℃, EI 离子源温度为 230℃, 溶剂延迟 2 min; 质谱扫描范围为 50~550 amu。以 NIST08.L 作为数据库, 利用峰面积归一化法进一步计算脂肪酸各组分之间的相对百分含量。

1.3.5 藻细胞中碳水化合物和蛋白含量的测定

采用 Jia 等(2015)的方法测定藻细胞中的碳水化合物, 取 10 mg 冻干藻粉加入 0.5 ml 乙酸, 80℃水浴 20 min, 加入 10 ml 丙酮, 3500 r/min 离心 10 min, 弃上清液。将沉淀重悬于 2.5 ml 的 4 mol/L 三氟乙酸中, 煮沸 4 h, 10000 r/min 离心 3 min。取 20 μl 上清液, 加入硫酸-苯酚-水溶液 900 μl(硫酸:水:苯酚=15 ml:7.5 ml:0.15 g), 煮沸 20 min, 在 490 nm 测吸光度, 用葡萄糖制作标准曲线, 以测定碳水化合物的总含量。

取 10 mg 冻干藻粉, 加入 100 μl 的 1 mol/L NaOH 溶液, 80℃水浴 10 min, 加入 900 μl 蒸馏水, 12000 × g 离心 30 min, 将上清液转移至新的离心管中。重复上述操作 2 次, 合并上清液, 以牛血清蛋白制作标准曲线, 利用 Berges 等(1993)的方法测定总蛋白含量。

1.3.6 测定雨生红球藻虾青素和脂肪酸合成相关酶基因的表达式 本实验使用 Primer 5.0 设计 *dxs*、*bkt*、*kas* 和 *acp* 酶基因的上下游扩增引物(表 1), 扩增后产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序后 BLAST 比对, 以此为模板设计荧光定量引物(表 2)。收集藻细胞, 无菌水洗 2 次, 保存于 -80℃ 备用。在液氮中充分研磨藻细胞, 使用 Trizol 法提取总 RNA, 利用逆转录试剂盒 TaKaRa 逆转录合成 cDNA, 以此为模板进行 RT-PCR 扩增, 通过 ABI 7500 荧光定量仪对 *dxs*、*bkt*、*kas* 和 *acp* 基因表达式进行测定, 以 18S (引物: 5'-CGGTCTGCCTCTGGTATG-3'与 5'-GCTTGCTTTGAACACGCT-3') 基因作为内标来调节 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。

表 1 酶基因克隆引物
Tab.1 Primers for gene cloning

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature(°C)
<i>dxs</i> F	ACAACCAGCAGGTGTGCGC	58
<i>dxs</i> R	CCGTCTCCGCACTCTTCA	
<i>bkt</i> F	GACCTGCACTGGGAGCACCAC	62
<i>bkt</i> R	GACGTTGGCCACCGCTACTGA	
<i>kas</i> F	AGTGCGGTAATTCAGGTGC	62
<i>kas</i> R	GCTGTAACATTGGTGATGC	
<i>acp</i> F	CAATCCCCACCTACAGCA	59
<i>acp</i> R	CATTACAACGATAGAACACGAA	

表 2 酶基因荧光定量 PCR 引物
Tab.2 Primers for enzyme genes RT-PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature(°C)
<i>dxs</i> F	GTCTCCGCACTCTTACC	57
<i>dxs</i> R	CCCACCCAGTACAACAAC	
<i>bkt</i> F	CAATCTTGTCAGCATTCCGC	61
<i>bkt</i> R	CAGGAAGCTCATCACATCAGA	
<i>kas</i> F	CACCCCACTCTGAACCAGGA	62
<i>kas</i> R	GACCTCAAACCCGAAGGAG	
<i>acp</i> F	CAGCTCGGCACTGACCTTG	59
<i>acp</i> R	CAAGGGTCAGCTCGAACTTCTC	

1.4 数据处理

实验各组均设置 3 个平行样, 数据处理采用 ANOVA(SPSS 19.0)一步法分析和 Duncan 氏多重范围比较进行分析。最小显著性差异进行多重比较来检验调查不同实验的组间差异, $P < 0.05$ 为具有显著性。

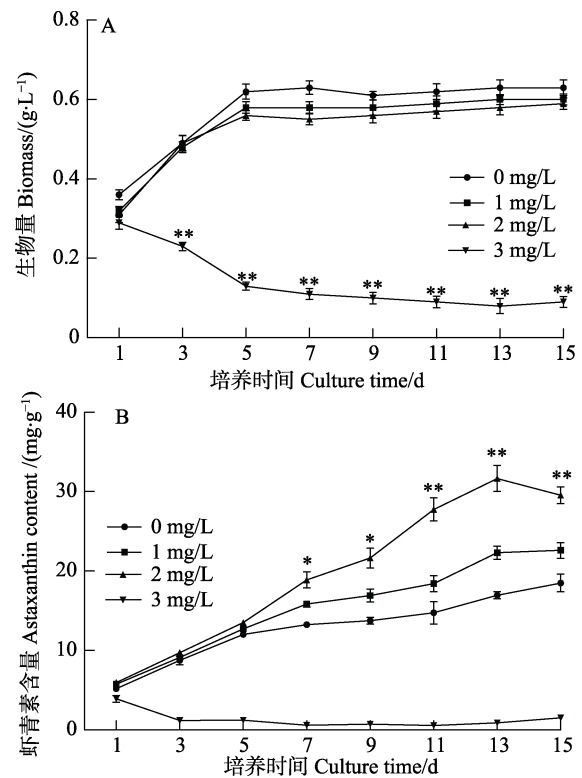


图 1 不同浓度 BHT 处理对雨生红球藻生物量和虾青素积累的影响

Fig.1 Effects of BHT on biomass and astaxanthin content of *H. pluvialis* during induction process

*表示组间有显著性差异($P < 0.05$), **表示组间有极显著性差异($P < 0.01$)。下同

* represents significant difference between groups ($P < 0.05$), ** represents highly significant difference between groups. The same as below

2 结果

2.1 BHT 对雨生红球藻生物量和虾青素积累的影响

如图 1A 所示, 0、1 和 2 mg/L BHT 处理组生物量最大值分别为 0.62、0.58 和 0.56 g/L, 3 mg/L BHT 处理组藻细胞生长明显受到限制。图 1B 显示, 0、1 和 2 mg/L BHT 处理组虾青素含量逐渐升高, 2 mg/L BHT 处理组增加最为显著, 在 13 d 时达到最高 31.66 mg/g, 0 和 1 mg/L BHT 处理组分别为 16.94 和 22.30 mg/g; 3 mg/L BHT 处理组虾青素含量则较低。

2.2 BHT 对雨生红球藻油脂和脂肪酸组分的影响

高光照、缺氮条件下, 0 和 2 mg/L BHT 处理组藻细胞中油脂的变化趋势如图 2 所示。0 和 2 mg/L BHT 处理组油脂含量均逐步上升, 最后趋于稳定; 2 mg/L BHT 处理组在 11 d 时达最高, 占细胞干重的 45.56%, 较对照组(39.06%)提高了 16.6%。

表 3 为第 11 天时 0 和 2 mg/L BHT 处理组脂肪酸组成。培养至 11 d, C16:0、C18:1n9t、C18:2n6c 和 C18:3n6 为脂肪酸的主要组成成分, 占总脂肪酸的 88%以上。2 mg/L BHT 处理组和对照组相比, 脂肪酸各组分含量变化不大, 仅 C18:1n9t 含量略微下降。

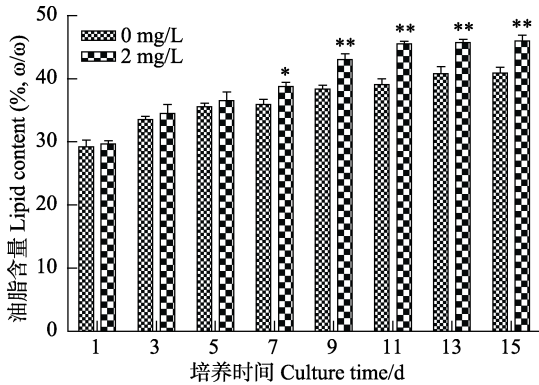


图 2 不同浓度 BHT 处理对雨生红球藻油脂积累的影响
Fig.2 Effects of BHT on lipid content of *H. pluvialis* during induction process

2.3 BHT 对雨生红球藻碳水化合物和蛋白质含量的影响

碳水化合物和蛋白质是藻细胞内重要的生理参数, 本研究检测了在添加 BHT 条件下二者的变化情况。2 mg/L BHT 处理组和对照组的碳水化合物含量均呈现下降趋势, 2 mg/L BHT 处理组从第 9 天开始显著低于对照组, 13 d 时至最低, 为细胞干重的 13.45%, 此时对照组为 16.12%(图 3A); 微藻细胞内蛋白含量总体呈降低趋势, 2 mg/L BHT 在 5 d、7 d

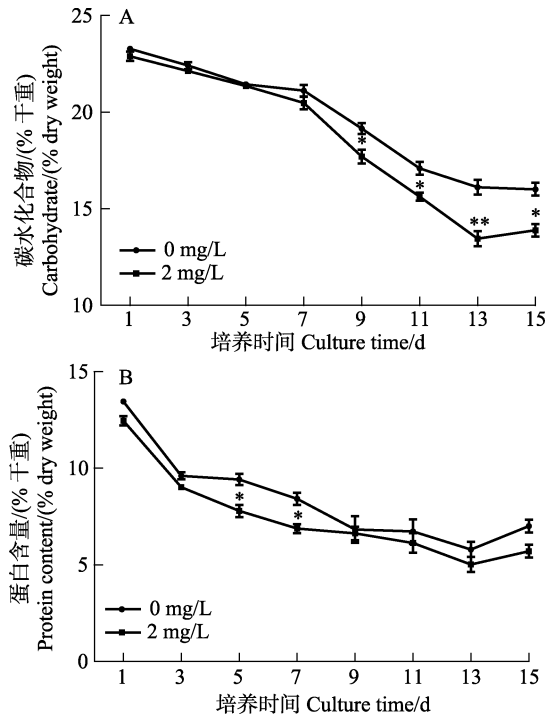


图 3 不同浓度 BHT 处理对雨生红球藻碳水化合物和蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of BHT on carbohydrate and protein content of *H. pluvialis* during induction process

表 3 不同浓度 BHT 对雨生红球藻脂肪酸组成的影响(%)
Tab.3 Effects of BHT on fatty acid profile of *H. pluvialis* during induction process (%)

脂肪酸 Fatty acids	0 mg/L BHT	2 mg/L BHT
C14:0	0.64±0.07	0.85±0.14
C15:0	0.14±0.03	0.17±0.03
C16:0	25.31±0.42	24.94±0.20
C16:1	0.48±0.18	0.53±0.01
C17:0	0.24±0.01	0.27±0.03
C18:0	2.61±0.43	3.31±0.29
C18:1n9t	19.67±0.21	17.49±0.13
C18:2n6c	28.80±0.28	28.96±0.06
C20:0	0.57±0.15	0.46±0.10
C18:3n3	2.67±0.29	2.89±0.61
C20:1n9	0.10±0.01	0.14±0.02
C18:3n6	16.58±0.31	17.41±0.01
C20:2	0.14±0.03	0.13±0.02
C22:0	0.42±0.07	0.34±0.01
C20:3n6	0.14±0.02	0.15±0.01
C20:4n6	0.98±0.04	1.25±0.01
C24:0	0.23±0.03	0.21±0.02
C20:5n3	0.23±0.02	0.32±0.01
单不饱和脂肪酸 Monounsaturated fatty acid	20.25±0.15	18.16±0.12
多不饱和脂肪酸 Polyunsaturated fatty acid	49.54±0.41	51.11±0.33
饱和脂肪酸 Saturated fatty acid	30.16±0.32	30.34±0.28

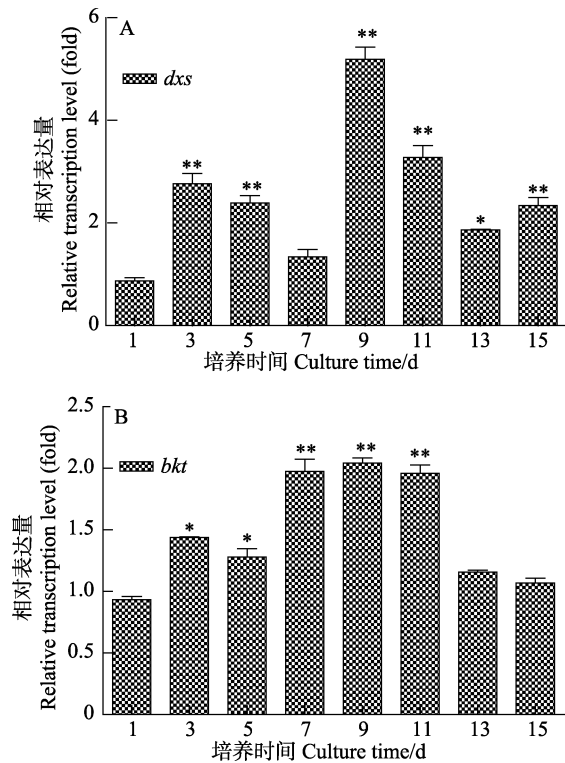


图 4 BHT 对 *dxs* 和 *bkt* 基因表达量的影响
Fig.4 Effects of BHT on the transcriptional expression levels of *dxs* and *bkt* during induction process

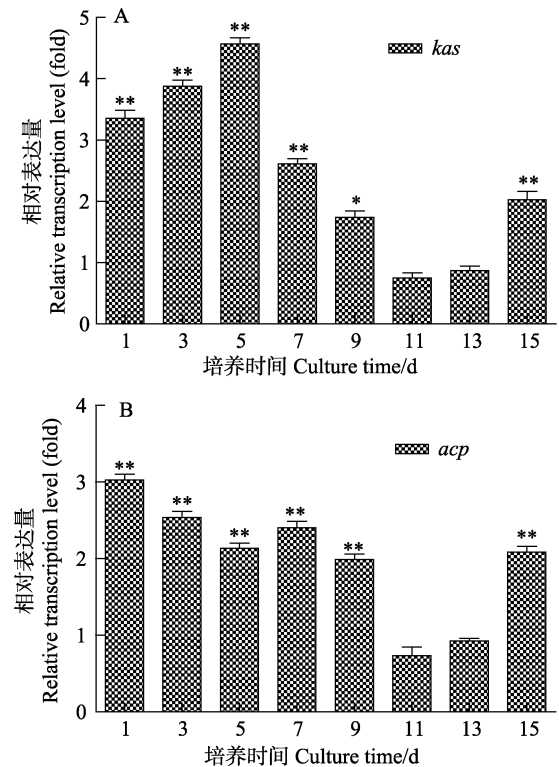


图 5 BHT 对 *kas* 和 *acp* 基因表达量的影响
Fig.5 Effects of BHT on the transcriptional expression levels of *kas* and *acp* during induction process

时显著低于对照组(图 3B)。

2.4 BHT 对雨生红球藻虾青素积累关键酶基因 *dxs* 和 *bkt* 的影响

dxs 和 *bkt* 是虾青素合成途径中的关键酶基因, 图 4 为培养过程中 *dxs* 和 *bkt* 基因的相对表达量变化。2 mg/L BHT 处理组的 *dxs* 基因相对表达量在 3、5、9、11、13 和 15 d 均显著高于对照组, 第 9 天时为对照组的 5.19 倍(图 4A); 与对照组相比, 2 mg/L BHT 处理组 *bkt* 表达量从第 3 天开始显著增加, 第 9 天时达到最高, 为对照组的 2.04 倍, 7 和 11 d 也显著高于对照组, 分别为 1.97 倍和 1.96 倍(图 4B)。

2.5 BHT 对雨生红球藻脂肪酸合成基因 *kas* 和 *acp* 的影响

用 qRT-PCR 方法检测不同诱导时间内, 2 mg/L BHT 诱导组和对照组雨生红球藻脂肪酸合成基因 *kas* 和 *acp* 的表达量(图 5A、图 5B), 2 mg/L BHT 处理组 *kas* 的相对表达量从第 1 天起显著高于对照组, 为对照组的 3.36 倍, 第 5 天达到最高, 为对照组的 4.57 倍; 整个诱导培养期间, 2 mg/L BHT 处理组 *acp* 基因的相对表达量也显著高于对照组。

3 讨论

3.1 培养基中添加 BHT 对雨生红球藻生长、虾青素积累和酶基因表达量的影响

本研究中, 外源添加不同浓度 BHT 的结果显示, 低浓度(1 和 2 mg/L)对雨生红球藻的生物量影响并不显著, 而高浓度(3 mg/L)对生物量影响较大, 对藻细胞有明显的毒害作用。2 mg/L BHT 诱导组的虾青素积累量显著高于其他组; 1 mg/L 的添加剂量组高于对照组, 但效果不如 2 mg/L 的处理组; 3 mg/L 添加量的毒害作用导致虾青素的积累无法进行。BHT 是一种抗氧化剂, 高浓度可能对机体产生促氧化作用(Prooxidant), 从而导致藻细胞死亡。Nanou 等(2010)利用高浓度的 BHT 处理真菌 *Blakeslea trispora* 时发现, BHT 与分子氧相互作用, 产生苯氧自由基和超氧阴离子, 表现出氧化性, 致使细胞死亡; 于威等(2018)研究发现, 利用高浓度抗氧化剂谷胱甘肽处理黄瓜幼苗呈现明显的致毒作用, 这均与本研究结果一致。Wen 等(2015)研究发现, 适宜浓度的乙醇诱导雨生红球藻能促进其虾青素的积累, 达到 25.10 mg/g; 丁巍等(2017)利用胺鲜酯诱导雨生红球藻提高了虾青

素的含量,最高可达 24.94 mg/g,这均低于本研究中虾青素积累量(31.66 mg/g)。

dxs 和 *bkt* 是虾青素合成途径中的关键酶基因,这 2 个基因表达量与虾青素的积累量呈正相关, Gao 等(2012)研究发现,外源添加水杨酸上调了 *bkt* 基因的相对表达量,促进了虾青素的合成。Ding 等(2018)发现,添加褪黑素提高了雨生红球藻细胞 *dxs* 和 *bkt* 基因表达量,同时提高了虾青素的积累量。本研究中,图 4 和图 1 对比可知,基因表达量和虾青素积累之间不具有同步性,虾青素的大量积累滞后于 *dxs* 和 *bkt* 的基因表达量增加。Gao 等(2012)使用水杨酸诱导虾青素积累时发现,虾青素合成关键酶基因分为转录后水平和转录水平基因,即有的基因在转录后上调虾青素生物合成,有的基因在转录时上调虾青素的合成。Zhao 等(2015)也证明了这一结论。

3.2 外源 BHT 对雨生红球藻油脂积累、脂肪酸组成和脂肪酸合成酶基因的影响

利用抗氧化剂作为诱导子来提高生物体内次生代谢产物的含量,逐步成为研究热点。Franz 等(2013)研究发现,添加适宜浓度的没食子酸诱导微藻 *Nannochloropsis salina* 能增加细胞内油脂含量,比对照组提高了 2.17 倍; Li 等(2017)外源添加褪黑素提高了单针藻 *Monoraphidium* sp. QLY-1 中的油脂含量。本研究使用 BHT 作为诱导子,提高了雨生红球藻中油脂的含量,达到细胞干重的 45.56%,高于其他文献报道的微藻油脂含量(Bogen *et al.*, 2013; Holbrook *et al.*, 2014; Shrivastav *et al.*, 2015)。

此外, Che 等(2016)研究发现,外源添加黄腐酸能提高油脂含量,脂肪酸各组分变化不大,这与本研究的结果一致。*acp* 和 *kas* 是脂肪酸合成通路中的关键酶基因,本研究中外源添加 BHT 提高了 *acp* 和 *kas* 的相对表达量,最高为对照组的 3.36 倍和 3.02 倍,促进了脂肪酸的合成。Lei 等(2012)也发现脂肪酸合成的增加往往伴随着 *acp* 和 *kas* 表达量的提高。Shang 等(2016)添加茴香醚诱导雨生红球藻合成虾青素, *acp* 和 *kas* 的相对表达量均升高,提高了脂肪酸含量,与本实验呈现一致结果;油脂积累延迟于基因表达水平的上调,说明 *acp* 和 *kas* 起到了转录后水平的调节作用。

碳水化合物和蛋白质是藻细胞重要的生理指标, Ho 等(2017)发现高盐诱导下, *Chlamydomonas* sp. JSC4 通过降低细胞内淀粉含量增加了脂质积累; Chokshi 等(2017)研究发现,微藻 *Acutodesmus dimorphus* 在缺氮条件下,细胞内的蛋白含量随着培养时间的进行而逐步降低。本研究中, BHT 处理组和对照组的

碳水化合物和蛋白均呈下降趋势, BHT 处理组下降更为显著。因此,在胁迫条件下,雨生红球藻可能通过分解自身的碳水化合物和蛋白来合成油脂和虾青素等代谢产物来提高抗性。

雨生红球藻虾青素的积累与油脂合成紧密相关,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,有利于虾青素的合成;另一个是形成脂质体(Lipid bodies, LBs)以贮存虾青素(Zhang *et al.*, 2016)。雨生红球藻中 95%的虾青素与脂肪酸发生酯化反应,形成虾青素酯,储存于富含甘油三酯的脂质体中,这一反应降低了底物的量,减少末端产物抑制作用,促进了虾青素的积累(Chen *et al.*, 2015)。增加脂肪酸的合成,合成的虾青素进入 LBs 后得以分隔,可作为减少末端产物抑制、增加虾青素积累的策略(Zhekisheva *et al.*, 2005)。

在高光照、缺氮条件下,外源添加适宜浓度抗氧化剂褪黑素能够抑制细胞内的活性氧(ROS),增加细胞内抗氧化酶活性和抗氧化物含量,维持细胞内的氧化还原处于平衡状态,促进虾青素和油脂的积累(Zhao *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018)。同样, BHT 作为抗氧化剂,可提高真菌中抗氧化酶活性,从而清除胞内过量 ROS,进而促进 β -胡萝卜素的合成(Nanou *et al.*, 2010)。另一方面, Ding 等(2018)通过外源添加抗氧化剂褪黑素诱导雨生红球藻发现,上调了细胞内一氧化氮(NO)和水杨酸(SA)水平, NO 和 SA 通过一系列级联反应促进了虾青素和脂肪酸的积累; SA 作为植物激素可促进雨生红球藻中虾青素的积累(Gao *et al.*, 2012);添加 NO 供体, SNP 可通过激活胞内抗氧化酶活性,猝灭过量 ROS,进而调控微藻在胁迫下的抗性(Kováčik *et al.*, 2015)。而适量 ROS 可以促进微藻中次级代谢产物的积累(Shi *et al.*, 2017)。因此,外源添加 BHT 可能是通过调控 ROS 和胞内相关信号分子水平,进而促进虾青素和油脂的积累(Zhao *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018; Nanou *et al.*, 2010)。此外, BHT 上调了虾青素和脂肪酸合成途径中关键酶基因的相对表达量,促进了虾青素和脂肪酸的积累。

4 结论

外源添加适宜浓度的 BHT 能促进诱导条件下雨生红球藻中虾青素和油脂的积累。2 mg/L BHT 处理雨生红球藻的效果最佳,虾青素积累量为 31.66 mg/g,是对照组的 1.87 倍,促进了虾青素合成关键酶基因 *dxs* 和 *bkt* 的表达;同时,提高了脂肪酸合成酶基因 *acp* 和 *kas* 表达量,油脂含量增加到干重的 45.56%,比对照组提高了 16.6%;油脂的积累,有利于虾青素

酯的形成, 从而增加了微藻细胞中虾青素的生物合成。

参 考 文 献

- Berges JA, Fisher AE, Harrison PJ. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Marine Biology*, 1993, 115(2): 187–193
- Bogen C, Klassen V, Wichmann J, *et al.* Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 622–626
- Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology*, 1991, 32(7): 1077–1082
- Che RQ, Ding K, Huang L, *et al.* Enhancing biomass and oil accumulation of *Monoraphidium* sp. FXY-10 by combined fulvic acid and two-step cultivation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 67: 161–165
- Chen C, Wu LM, Li YL, *et al.* Morphology of the early age and the pigment occurrence and the effects of different feed additives on the body color of *Plectropomus leopardus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 83–90 [陈超, 吴雷鸣, 李炎璐, 等. 豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*) 早期形态与色素变化及添加剂对其体色的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 83–90]
- Chen G, Wang B, Han D, *et al.* Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Plant Journal*, 2015, 81(1): 95–107
- Chen J, Liu L, Wei D. Enhanced production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* in a microplate-based culture system under high light irradiation. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 518–529
- Chokshi K, Pancha I, Ghosh A, *et al.* Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 60
- Ding W, Yu XY, Peng J. Effect of diethyl aminoethyl hexanoate on astaxanthin content in *Haematococcus pluvialis* LUGU. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(16): 150–153 [丁巍, 余旭亚, 彭俊. 胺鲜酯提高雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* LUGU)虾青素含量的作用. *食品工业科技*, 2017, 38(16): 150–153]
- Ding W, Zhao P, Peng J, *et al.* Melatonin enhances astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis* by mechanisms possibly related to abiotic stress tolerance. *Algal Research*, 2018, 33: 256–265
- Ebrahimian A, Kariminia HR, Vosoughi M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renewable Energy*, 2014, 71: 502–508
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, *et al.* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(25): 22901–22909
- Franz AK, Danielewicz MA, Wong DM, *et al.* Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(5): 1053–1062
- Gao Z, Meng C, Chen YC, *et al.* Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(5): 1853–1860
- 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*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(4): 225–230
- He L, Liu JZ, Qin SL, *et al.* Identification of an astaxanthin-producing marine yeast strain YS-185 and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 97–101 [何磊, 刘均忠, 秦胜利, 等. 产虾青素海洋酵母菌 YS-185 的鉴定及发酵条件优化. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 97–101]
- Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46(2): 185–196
- Ho SH, Nakanishi A, Kato Y, *et al.* Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4. *Scientific reports*, 2017, 7: 45471
- Holbrook GP, Davidson Z, Tataru RA, *et al.* Use of the microalga *Monoraphidium* sp. grown in wastewater as a feedstock for biodiesel: Cultivation and fuel characteristics. *Applied Energy*, 2014, 131: 386–393
- Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, *et al.* Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(6): 1613
- Huang W, Ye J, Zhang J, *et al.* Transcriptome analysis of *Chlorella zofingiensis* to identify genes and their expressions involved in astaxanthin and triacylglycerol biosynthesis. *Algal Research*, 2016, 17: 236–243
- Kováčik J, Klejdus B, Babula P, *et al.* Nitric oxide donor modulates cadmium-induced physiological and metabolic changes in the green alga *Coccomyxa subellipsoidea*. *Algal Research*, 2015, 8: 45–52
- Lei A, Chen H, Shen G, *et al.* Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for*

- Biofuels, 2012, 5(1): 18
- Li D, Zhao Y, Ding W, *et al.* A strategy for promoting lipid production in green microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 by combined melatonin and photoinduction. *Bioresource Technology*, 2017, 235: 104–112
- Liu J, Mao X, Zhou W, *et al.* Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 319–327
- Lorenz RT. A technical review of *Haematococcus* algae. *NatuRose™ Technical Bulletin*, 1999, 60: 1–12
- Jia J, Han D, Gerken HG, *et al.* Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research*, 2015, 7: 66–77
- Nanou K, Roukas T. Oxidative stress response and morphological changes of *Blakeslea trispora* induced by butylated hydroxytoluene during carotene production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(8): 2415–2423
- Rao AR, Reddy AH, Aradhya SM. Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* micro algal extracts. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2010, 4(3): 809–819
- Saha SK, McHugh E, Hayes J, *et al.* Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 118–124
- Shah M, Mahfuzur R, Liang Y, *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 531
- Shang M, Ding W, Zhao Y, *et al.* Enhanced astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* using butylated hydroxyanisole. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 199–207
- Shi K, Gao Z, Shi TQ, *et al.* Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: the state of the art and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 793
- Shrivastav A, Mishra SK, Suh WI, *et al.* Characterization of newly isolated oleaginous microalga *Monoraphidium* sp. for lipid production under different conditions. *Algal Research*, 2015, 12: 289–294
- Wen Z, Liu Z, Hou Y, *et al.* Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 78: 10–17
- Yu W, Xie JM, Teng HW, *et al.* Effects of exogenous glutathione on antioxidant system in leaves of grafted cucumber, stock and scion seedlings under autotoxicity. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(1): 196–207 [于威, 颀建明, 滕汉玮, 等. 外源谷胱甘肽对自毒作用下嫁接黄瓜及砧穗幼苗叶片抗氧化系统的影响. *核农学报*, 2018, 32(1): 196–207]
- Yu X, Zhao P, He C, *et al.* Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 2012, 121: 256–262
- Yuan JP, Chen F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 2000, 68(4): 443–448
- Zhekisheva M, Boussiba S, Khozin-Goldberg I, *et al.* Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, 2002, 38(2): 325–331
- Zhekisheva M, Zarka A, Khozin-Goldberg I, *et al.* Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 2005, 41(4): 819–826
- Zhang M, Mi TZ, Zhen Y, *et al.* Description of fatty acid synthesis pathway based on *Skeletonema marinoi* transcriptome. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(4): 81–93 [张梅, 米铁柱, 甄毓, 等. 基于玛氏骨条藻转录组的脂肪酸合成途径分析. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2018, 48(4): 81–93]
- Zhang Z, Sun D, Mao X, *et al.* The crosstalk between astaxanthin, fatty acids and reactive oxygen species in heterotrophic *Chlorella zofingiensis*. *Algal Research*, 2016, 19: 178–183
- Zhao L, Xie JY, Huang WC. Study on the synthesis of BHT catalyzed by ionic liquid. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(S2): 272–275 [赵磊, 谢君怡, 黄文才. 咪唑类离子液体催化合成抗氧化剂 BHT. *化工进展*, 2016, 35(S2): 272–275]
- Zhao Y, Li D, Xu JW, *et al.* Melatonin enhances lipid production in *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions via a multi-level mechanism. *Bioresource Technology*, 2018, 259: 46–53
- Zhao Y, Shang M, Xu JW, *et al.* Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process Biochemistry*, 2015, 50(12): 2072–2077

Effects of Butylated Hydroxytoluene on Accumulation of Astaxanthin and Lipids in *Haematococcus pluvialis* LUGU

YUE Chenchen¹, YU Xuya¹, ZHAO Yongteng¹, WANG Huiping²①

(1. Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500;

2. Kunming Children's Hospital, Kunming 650228)

Abstract *Haematococcus pluvialis* is a microalga, and this species is economically important since it is a rich source of natural astaxanthin, which is considered a “super anti-oxidant.” The study was conducted using *H. pluvialis* LUGU filtrated from Lugu Lake in Yunnan Province, China. Studies have shown that under stress, the exogenous addition of appropriate concentration of butylated hydroxytoluene (BHT) can effectively promote the accumulation of astaxanthin and increase the content of lipids in the algal cells. The effects of BHT on several traits were investigated under stress conditions (high illumination and nitrogen deficiency), including the impact on growth of algae; the accumulation of astaxanthin; the synthesis of lipids; the composition of fatty acids, carbohydrates and protein; the expression level of the key enzyme gene of astaxanthin; and fatty acid biosynthesis. In this study, the different concentrations of BHT (0, 1, 2, and 3 mg/L) were achieved through single factor experiments in algal cell culture medium. Results from these experiments showed that BHT treatment does not effectively promote the algae growth, but it does affect the accumulation of astaxanthin in algae cells. There was a significant dose effect depending on the BHT treatment applied to *H. pluvialis*. After examining BHT additions of different concentrations, astaxanthin accumulation was determined to be the highest after the 2 mg/L BHT treatment, and it was significantly higher than that resulting from other treatments or the control group ($P < 0.05$). Moreover, astaxanthin accumulation was 1.87 times higher than that in the control group, reaching 31.66 mg/g. The lipid content of the 2 mg/L BHT treatment was 45.56%, which was also higher than that in the control (39.06%). Under these conditions, the expression levels of the key enzyme genes of astaxanthin synthesis, *dxs* and *bkt*, were 5.19 folds and 2.04 folds, respectively, as those of the control, and the expression levels of the key enzyme genes of fatty acid synthesis, *kas* and *acp*, were significantly higher than those of the control ($P < 0.05$), being 4.56 folds and 3.02 folds, respectively, as those of the control. Contrastingly, the carbohydrate and protein contents decreased compared to those of the control group. Overall, our results also show that BHT can increase accumulation of astaxanthin and increase the content of lipids in the algal cells when administered at an appropriate dose.

Key words *Haematococcus pluvialis*; Butylated hydroxytoluene; Astaxanthin; Lipids; Astaxanthin synthesis genes; Fatty acid synthesis genes

① Corresponding author: WANG Huiping, E-mail: 2500016390@qq.com