

稀土元素 Ce 对雨生红球藻生长及虾青素积累影响的研究

李哲¹, 蔡明刚^{1,2}, 黄水英¹, 石荣贵¹, 陆晓霞¹, 齐安翔¹, 吴锐¹

(1. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建省海洋化学与应用技术重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用反相高效液相色谱分析法(RP-HPLC)研究了稀土元素铈(Ce^{3+})对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)生长及虾青素积累的影响。结果表明, 低质量浓度的 Ce^{3+} 对微藻生长和虾青素积累均具有明显的促进作用, 当 Ce^{3+} 的质量浓度为 0.1 mg/L 时, 对藻生长的促进效果最佳, 细胞密度较对照组提高 34%; 当 Ce^{3+} 的质量浓度为 1 mg/L 时, 虾青素质量分数可达到细胞干质量的 3.2%, 较对照组提高 167%。此外, 高质量浓度 Ce^{3+} 的对雨生红球藻有抑制作用, 当 Ce^{3+} 的质量浓度高于 40 mg/L 时, 红球藻的生长完全被抑制, 虾青素质量分数也明显降低。

关键词: 铈; 虾青素; 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*); 生长; 积累

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2008) 09-0037-05

虾青素 (astaxanthin) 是一种近年来进入国际研发领域的红色类胡萝卜素, 广泛存在于自然界, 尤其是海洋生物体内, 其抗氧化能力比其他类胡萝卜素强 10 倍, 比维生素 E 强 550 倍, 被誉为“超级维生素 E”^[1,2]。虾青素的着色能力显著, 并具有抗癌症、抗衰老、增强免疫力等一系列重要的生理功能, 鉴于此, 它被广泛应用于保健品、医药、水产养殖等领域, 具有广阔的应用前景^[3]。

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种淡水单细胞绿藻, 属绿藻门(Chlorophyta), 团藻目(Volvocales), 红球藻科(Haematococcaceae)^[4]。雨生红球藻具有两种存在形式, 在适宜的生存条件下, 以绿色的游动细胞形式存在, 在不利条件下, 则转变为红色的不动孢子, 并因体内大量积累虾青素而呈现红色^[5,6]。在虾青素的生物来源中, 雨生红球藻中虾青素可占其干质量的 1%~3%, 且体内虾青素及其酯类的结构配比与养殖对象所需一致, 因此被公认为自然界中虾青素的最佳来源^[3,7]。通过雨生红球藻培养法生产天然虾青素具有广阔的发展前景, 并成为近年来国际上虾青素领域研究的热点^[8]。

根据雨生红球藻的不同存在形式, 一般将虾青素的生产分成微藻培育和虾青素积累两阶段进行。第一阶段实现微藻营养细胞的高密度生长, 此阶段

微藻中虾青素含量甚少, 第二阶段中, 往往通过设置高光照、高温或高盐等人为胁迫手段, 促使营养细胞在恶劣的生存环境下转变为厚壁孢子, 以达到积累虾青素的目的^[9,10]。

长期以来, 红球藻培养基配方对其生长的重要性都得到广泛关注。国内外有关雨生红球藻培养条件主要集中于温度、光强、自养异养等生长环境的测定, 各培养基之间的比较和 C, N, P 等常量元素对藻生长及虾青素积累的影响。在目前常用的多个培养基配方中, 常量组分(如钠、钾、磷等)的适宜浓度基本得以确定^[11]。然而, 雨生红球藻生长速度慢可能是因为欠缺某些微量物质导致的, 可以通过添加微量物质来提高它的生长速度。近年来研究表明, 一些微量组分如维生素、铁离子、有机碳源等的添加对微藻生长往往具有较明显的促进作用

收稿日期: 2008-07-07; 修回日期: 2008-07-16

基金项目: 厦门市科技项目(3052Z20031086); 新加坡厦门大学校友基金会项目(2007); 2007 年度大学生创新性实验计划项目(2007); 第十一届“挑战杯”全国大学生课外学术科技作品竞赛项目(2008)

作者简介: 李哲(1987-), 女, 在读本科生; 蔡明刚(1974-), 通讯作者, 副教授, 主要从事微藻天然产物化学等领域的开发与研究, E-mail: mgcai@xmu.edu.cn

用^[12-14]。而国内外也有相关报道表明,添加稀土元素 Ce^{3+} 对微囊藻 (*Microcystis* sp.)、月牙藻 (*Selenastrum carpricornutum*) 等淡水微藻的生长具有一定促进作用^[15]。关于稀土元素对微藻的促进机理尚不明确,但可能与稀土元素生物效应中的 Hormesis 现象,即某些物理、化学因素在低剂量时对生物机体产生有益反应(刺激作用)而高剂量时则产生有害反应(抑制作用)的现象有关^[16]。

本研究拟通过向培养基中添加不同浓度的稀土元素铈 (Ce^{3+}),通过对雨生红球藻生长曲线及虾青素积累含量等指标的考察,以期得到该元素对雨生红球藻生长及虾青素积累的影响的相关研究结果,探索稀土元素在海洋微藻生长过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 藻种及其培养

雨生红球藻原始藻种由中国科学院水生生物研究所藻种库提供,采用 BBM 培养基配方,接种体积比为 1:5,置光照培养箱中静置培养,培养温度为 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,营养细胞培养阶段的光强设为 1300~1500 lx,连续测光照。上述条件下连续培养 10 d 后转至高光强条件下胁迫,光照强度为 10000~12000 lx。每天手摇培养物 3~4 次,防止粘壁。胁迫 14 d 后对培养物进行单位体积藻粉含量和虾青素质量分数等指标的测定。

1.2 生长指标测定

采用血球计数板进行细胞计数。指数生长率为单位时间内单位组织或整体的增长量,按公式 $K = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$ 进行计算,式中, N_1, N_2 分别为 t_1, t_2 时刻的细胞数。孢子比率即指孢子数在总细胞数中所占的百分比,利用细胞计数结果直接进行计算。单位体积藻粉含量取 50 mL 藻液离心去上清液, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下干燥,冷却后称至恒质量计算。

1.3 虾青素质量分数测定

采用齐安翔等^[17]研究改进的高效液相色谱法 (HPLC) 测定雨生红球藻胁迫阶段虾青素质量分数,具体参数如下。

1.3.1 主要仪器和试剂

HP1100 型高效液相色谱仪系统,附 HP ChemStation 色谱工作站,HP G1315A 型单泵;TCL216G 高速冷冻离心机。

虾青素标准溶液:准确称取 10 mg 虾青素标准

品(购自 Sigma 公司),用少量二氯甲烷使之溶解,用乙腈:甲醇 (75:25, V/V) 定容,配成 100 mg/L 的标准溶液,于棕色瓶中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。甲醇和乙腈为色谱纯试剂;二氯甲烷和丙酮为分析纯试剂;水为超纯水。

1.3.2 色素提取

移取 5 mL 胁迫后的雨生红球藻藻液,3000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 5 mL 超纯水清洗,重复两次。加入 2 mL 丙酮,用玛瑙研钵研磨 1 min,10000 r/min 低温离心 15 min,保留上清液,重复以上操作 3~5 次,直至藻团呈白色。将提取液以 10000 r/min 离心 15 min,上清液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下密封保存,或用氮气吹干,再用乙腈:甲醇 (75:25, V/V) 溶液溶解后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下密封保存。

1.3.3 色谱条件

Hyper sil ODS ($5\mu\text{m}$, $4.6\times 250\text{ mm}$, Germany) 色谱柱;流动相为水、乙腈和甲醇 (75:25:10, V/V/V);流速为 1.0 mL/min;用二极管阵列检测器 (DAD) 在 250~700 nm 波长范围内扫描,在 476 nm 处进行检测;进样量为 10 μL 。

1.4 实验设计

本实验以 BBM 配方(表 1)为基础,加入一定量稀土元素 Ce^{3+} 作为培养基,在相同培养条件下同时进行实验。 Ce^{3+} 质量浓度分别为 0.1, 1, 5,

表 1 BBM 培养基配方

Tab.1 Compounds of Bold Basal Medium

成分	浓度 (mmol/L)
NaNO ₃	2.9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
NaCl	0.43
K ₂ HPO ₄	0.43
KH ₂ PO ₄	1.29
CaCl ₂	0.17
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.0307
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0.0073
MoO ₃	0.0049
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.0063
CoNO ₃ ·6 H ₂ O	0.0017
H ₃ BO ₃	0.18
EDTA	0.17
KOH	0.55
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.0179

10, 15, 20, 40 mg/L。为方便比较, 另设一个对照组, 完全采用 BBM 配方, 不添加任何稀土元素。对照组及每个实验组均设 3 个平行样。

2 结果

2.1 铈对雨生红球藻培养阶段生长的影响

图1为添加Ce³⁺对雨生红球藻生长的影响结果比较。由图1可以看出, 低质量浓度的Ce³⁺对微藻生长有较为明显的促进作用, Ce³⁺质量浓度低于10 mg/L时, 雨生红球藻的生长指数较之对照组均有不同水平的增加, 当Ce³⁺质量浓度为0.1 mg/L时, 对红球藻生长的促进效果最好, 培养至第10天, 藻密度达到最大 (7.3×10⁵ 个/mL), 相比于对照组

(5.4×10⁵ 个/mL) 提高了34%。随着Ce³⁺质量浓度的增加, 促进作用有所下降, 当其质量浓度达到10 mg/L时, 红球藻的培养期生长情况与对照组相当。此外, 较高质量浓度的Ce³⁺对雨生红球藻生长具有一定的抑制作用。研究发现, 当Ce³⁺质量浓度为15和20 mg/L时, 藻细胞密度分别为4.4×10⁵和3.1×10⁵ 个/mL。高质量浓度Ce³⁺对雨生红球藻生长的抑制作用随着质量浓度的增大而增强。当Ce³⁺质量浓度高于40 mg/L时, 藻细胞几乎全部致死。有研究表明, 藻类接种至较高浓度的营养盐中, 一般其生长状况不及低浓度营养状态^[18]。稀土元素Ce³⁺作为藻类生长的微量元素, 同样符合这样的作用规律。

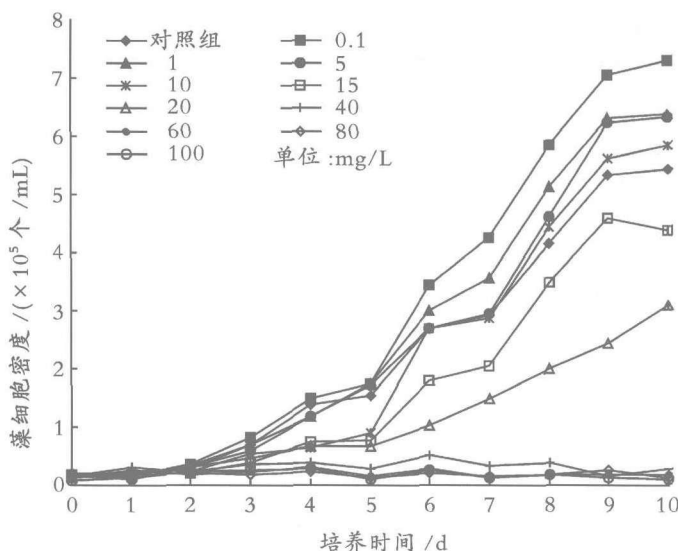


图1 Ce³⁺对雨生红球藻生长的影响

Fig.1 Effects of Ce³⁺ on cell number of *H. pluvialis*

2.2 铈对雨生红球藻胁迫阶段虾青素积累的影响

图2为添加Ce³⁺对雨生红球藻虾青素积累的影响结果比较。由图2可知, 雨生红球藻胁迫阶段中, 在一定浓度范围内, 虾青素的积累程度基本随着Ce³⁺的质量浓度的增加而增加, 当其质量浓度为1 mg/L时, 单位体积内虾青素浓度达到最大(20.3 mg/L), 占雨生红球藻藻粉干质量的3.2%, 较之对照组(10.9 mg/L, 1.2%)提高了167%。这说

明1 mg/L是虾青素积累的最佳浓度。此外, Ce³⁺质量浓度增加时, 促进效果明显减弱, 单位体积虾青素浓度相对减少。当Ce³⁺质量浓度为10 mg/L时, 虾青素质量与对照组相当, 这与藻细胞培养阶段的研究结果相符, Ce³⁺质量浓度高于15 mg/L时, 藻细胞内虾青素积累程度小于对照组。说明高质量浓度的稀土元素Ce³⁺抑制虾青素积累。这与稀土元素生物效应中的Hormesis现象^[16]相吻合。

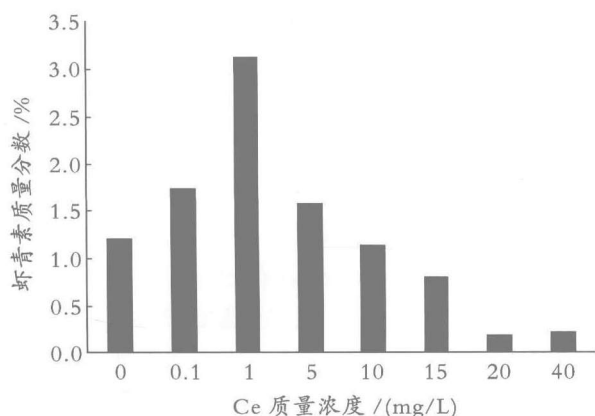


图2 Ce³⁺对雨生红球藻虾青素积累的影响

Fig. 2 Effects of Ce³⁺ on astaxanthin content of *H. pluvialis*

参考文献:

- [1] Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, **48**(4): 1150-1154.
- [2] Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, *et al.* Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**: 351-356.
- [3] Lorenz R T, Cysewski G R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin [J]. *Tibtech*, 2000, **18**: 160-167.
- [4] 殷明炎, 刘建国, 张京浦, 等. 雨生红球藻和虾青素研究评述[J]. *海洋湖沼通报*, 1998, **2**: 53-62.
- [5] Hagen C, Siegmund S, Braune W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation[J]. *European Journal of Phycology*, 2002, **37**: 217-226.
- [6] Margalith P Z. Production of ketocarotenoids by microalgae[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 431-438.
- [7] Boussiba S, Bing W, Zarka A, *et al.* Changes in pigment profiles of *Haematococcus pluvialis* during exposure to environmental stresses[J]. *Biotechnology Letters*, 1999, **21**: 601-604.
- [8] 蔡明刚, 王杉霖. 利用雨生红球藻生产虾青素的研究进展[J]. *台湾海峡*, 2003, **22**(4): 537-544.
- [9] Harker M, Tsavalos A J, Young A J. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor[J]. *Ferm Bioeng*, 1996, **82**: 113-118.
- [10] Sarada R, Tripathi U, Ravishankar G A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2002, **37**: 623-627.
- [11] Gong X D, Chen F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*[J]. *Process Biochemistry*, 1998, **33**: 385-391.
- [12] Domínguez-Bocanegra A R, Torres-Muñoz J A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, **66**(3): 249-252.
- [13] 张英, 蔡明刚, 齐安翔, 等. 维生素 B₁、B₁₂ 在雨生红球藻不同培养阶段的作用研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, **8**(增刊): 142-146.
- [14] 刘伟成, 李明云, 蒋霞敏, 等. Cu²⁺、Zn²⁺、Co²⁺对雨生红球藻生长的影响[J]. *水产科学*, 2006, **25**(6): 1003-1111.
- [15] 葛新华, 储昭生, 金相灿, 等. 外源性稀土 La 和 Ce 对几种淡水微藻生长影响的研究[J]. *环境科学研究*, 2004, **17**(增刊): 66-69.
- [16] 张信连, 杨维东, 刘洁生, 等. 稀土元素生物效应中的 Hormesis 现象[J]. *生物技术*, 2004, **14**(6): 82-84.
- [17] 齐安翔, 蔡明刚, 张英, 等. NaOH 皂化反相高效液相色谱法测定雨生红球藻中虾青素[J]. *分析科学学报*, 2005, **21** (6): 619-622.
- [18] 翟兴文, 蒋霞敏, 陆开形. 雨生红球藻的优化培养研究[J]. *水利渔业*, 2002, **22**(5): 16-18.

Effects of cerium on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*

LI Zhe¹, CAI Ming-gang^{1,2}, HUANG Shui-ying¹, SHI Rong-gui¹, LU Xiao-xia¹,
QI An-xiang¹, WU Rui¹

(1. College of Oceanography and Environment, Xiamen University, Xiamen, 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Chemistry and Applying Technology of Fujian Province, Xiamen, 361005, China)

Received: Jul., 7, 2008

Key words: cerium; astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; growth; accumulation

Abstract: The effects of rare earth element cerium on the cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* were studied. The results showed that lower concentration of Ce³⁺ could improve both the growth rate and astaxanthin production of the microalgae. When the Ce³⁺ of 0.1 mg/L concentration was added, the cell number of *H. pluvialis* was 34% more than the controls. 1 mg/L concentration was the best to accumulate astaxanthin. The astaxanthin content under stress condition could be 3.2% of the cell dry mass, which was 167% higher than the controls. Additionally, higher concentration of Ce³⁺ restrained the growth and astaxanthin production of *H. pluvialis*.

(本文编辑: 刘珊珊)

(上接第 28 页)

Molecular identification and classification of marine hydrocarbon degrading bacteria T₁ and T₂

TIAN Sheng-yan^{1, 2}, WANG Juan¹, NIE Li-hong¹

(1.College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2.Tianjin Key Laboratory of Marine Resources & Chemistry, Tianjin 300457, China)

Received: May, 9, 2008

Key words: hydrocarbon degrading bacteria; 16S rDNA; molecular identification; *Pseudomonas stutzeri*; *Rhodospirillum rubrum*

Abstract: Hydrocarbon degrading bacteria were obtained from oil-polluted sediments in the intertidal zone of Tianjin seashore by a soil enrichment procedure using diesel fuel as carbon source. The 16S rDNA amplified from 2 strains of these isolations, T₁ and T₂, which have a high biomass and a hydrocarbon degrading capability, was cloned. According to molecular criteria, nucleotides sequence of 16S rDNA was determined and analyzed. The results indicate that strain T₁ is similar to *Rhodospirillum rubrum* (89%) and strain T₂ is similar to *Pseudomonas stutzeri* (99%).

(本文编辑: 刘珊珊)