

# 光照胁迫对雨生红球藻虾青素积累和抗氧化活性的影响

江红霞<sup>1</sup>, 雷梦云<sup>2</sup>, 林雄平<sup>3</sup>, 孔祥会<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007) (2. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

(3. 宁德师范学院生物系, 福建宁德 352100)

**摘要:** 本文研究了不同光强(120~270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ )和光周期(光/暗: 0/24~24/0 h)的光照胁迫对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)虾青素积累、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性、总抗氧化能力(T-AOC)和超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除能力的影响。结果表明, 在绿色、褐色和红色细胞期, 光强越高, 藻细胞虾青素的含量、T-AOC和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力也越高; 抗氧化酶(SOD和CAT)活性在绿色细胞期随光强的增加而增加, 在红色细胞期则随光强的增加而下降; 藻细胞虾青素的含量、T-AOC和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力在红色细胞期最高, 而抗氧化酶活性在褐色细胞期最高; 藻细胞在不同光周期的270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ 的光照下生长10 d时, 虾青素的含量、T-AOC和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力随每日光照时间的延长而增高, 抗氧化酶活性则先升高后下降。总之, 雨生红球藻在270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ 的光强下连续光照10 d时虾青素的含量和抗氧化能力最高, 这为虾青素作为天然的抗氧化功能食品添加剂的生产和应用提供了新的参考条件。

**关键词:** 雨生红球藻; 虾青素; 抗氧化酶; 酶活性; 总抗氧化能力; 自由基; 食品添加剂

文章篇号: 1673-9078(2015)10-215-221

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.036

## Effects of Light Stress on Astaxanthin Accumulation and Antioxidant Activities in *Haematococcus pluvialis*

JIANG Hong-xia<sup>1</sup>, LEI Meng-yun<sup>2</sup>, LIN Xiong-ping<sup>3</sup>, KONG Xiang-hui<sup>1</sup>

(1.College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China) (2.College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China) (3.Department of Biology, Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

**Abstract:** The effects of light stress with different light intensities (120~270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) and photoperiods (light/dark: 0/24~24/0 h) on the astaxanthin accumulation, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, total antioxidant capacity (T-AOC), and superoxide anion free radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) scavenging ability of *Haematococcus pluvialis* were examined. The results showed that at green, brown, and red cell stages, a higher light intensity led to higher astaxanthin content and greater T-AOC and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging ability. The activities of the antioxidant enzymes (SOD and CAT) increased at the green cell stage and decreased at the red cell stage, with increasing light intensity. The highest astaxanthin content and greatest T-AOC and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging ability were obtained at the red cell stage, whereas the highest antioxidant enzyme activities were obtained at the brown cell stage. when *H. pluvialis* grew for ten days under different photoperiods and a light intensity of 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ , the astaxanthin content and T-AOC and  $\text{O}_2^{\cdot-}$  scavenging ability increased with the extensions of the daily illumination period, whereas the activities of the antioxidant enzymes decreased after the initial increase. In summary, *H. pluvialis* showed the highest astaxanthin content and antioxidant capacity after continuous illumination at a light intensity of 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  for ten days. This finding provides a new reference for the production and application of astaxanthin as a natural antioxidant food additive.

**Key words:** *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; antioxidant enzymes; enzyme activity; total antioxidant capacity; free radicals; food additives

收稿日期: 2014-12-10

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(102102210181); 河南省水产养殖省级重点学科资助项目。

作者简介: 江红霞(1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为水生生物资源与利用

虾青素(Astaxanthin)又名虾黄质、龙虾壳色素, 化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- $\beta,\beta'$ -胡萝卜素, 分子式为  $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{O}_4$ , 是生物界中分布广泛的一类  $\beta$ -胡萝卜素。据报道, 虾青素具有极强的抗氧化活性, 其抗氧化性比维生素 E 高 500 倍以上, 被称为“超级维生

素 E”，又由于虾青素是唯一能通过血脑屏障的类胡萝卜素，并具有增强机体免疫活性、抗肿瘤活性、对由糖尿病引起的眼病也有较好的防治作用等特殊生理功能，被广泛应用于医药、化妆品和营养保健品等领域<sup>[1]</sup>。另外虾青素还具有极强的着色功能，因而在食品工业中还能以新型功能性食品添加剂的身份用作食品的着色剂和抗氧化剂，是一种具有高附加值和开发潜力的生物活性物质<sup>[2]</sup>。自 20 世纪 80 年代中期以来，随着高档水产养殖产业的迅猛发展，出现了虾青素的巨大市场需求，并于近年有急剧增加的趋势。

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 是一种淡水绿藻，其生活史呈现出多样性，当环境条件适宜时，以游动的绿色细胞存在，处于营养生长期；而在不利条件下，游动细胞失去鞭毛形成不动细胞，同时细胞内大量积累虾青素，细胞呈红色<sup>[3]</sup>。雨生红球藻是已知的自然界中虾青素含量最高的生物(约 2~6%细胞干重)，其积累虾青素是细胞对环境条件胁迫的一种防御响应，研究表明，雨生红球藻在逆境条件下，叶绿素及初生类胡萝卜素不足以保护细胞免受损伤时会大量产生次生类胡萝卜素—虾青素<sup>[4]</sup>。而各种环境胁迫会增加机体细胞内活性氧的含量，雨生红球藻细胞内可能存在两套清除活性氧的防御体系：一类为包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等的酶促系统；另一类为包括虾青素、维生素、氨基酸、金属蛋白质等抗氧化物质为主的非酶促系统<sup>[5-6]</sup>。目前，逆境胁迫下雨生红球藻内的这两套抗氧化防御体系之间，以及它们与总抗氧化能力之间的关系尚不甚明了。本文研究不同光强和光周期的光照胁迫对雨生红球藻虾青素积累、抗氧化酶活性、总抗氧化能力和超氧阴离子自由基清除能力的影响，旨在为进一步探讨雨生红球藻高效合成虾青素的条件和藻细胞在逆境条件下的各种抗氧化体系之间的关系提供理论依据，并为利用雨生红球藻高效生产虾青素的规模化生产和虾青素在抗氧化功能食品中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种和培养条件

雨生红球藻原藻种由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。将处于对数生长期的藻种以适当的浓度转入含有 MAV 培养基<sup>[7]</sup>的三角烧瓶中，MAV 母液的配方为：KNO<sub>3</sub> 100 g；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10g；FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 g；MnSO<sub>4</sub>·0.25 g；EDTA-Na<sub>2</sub> 10g；VB<sub>1</sub> 6 mg；VB<sub>12</sub> 50 μg；消毒淡水 1000 mL。培养液是由母液与消毒淡

水的体积比为 1:1000 配置而成。接种有雨生红球藻的三角烧瓶置于光照培养箱中静置培养，每天摇瓶 3~4 次。培养温度为(22±1) °C，培养基 pH 值为 7.2。

### 1.2 光强和光周期的设定

研究表明<sup>[8-9]</sup>雨生红球藻生长的最适光强为 30~90 μmol/m<sup>2</sup> s，而强光诱导雨生红球藻合成虾青素的适合光照度为 140~280 μmol/m<sup>2</sup> s。本实验在 90~280 μmol/m<sup>2</sup> s 的光照范围内设定了 6 个不同的光照强度对雨生红球藻进行光胁迫处理，光强分别为 120、150、180、210、240 和 270 μmol/m<sup>2</sup> s，光暗比均为 12/12 (h)。同时 270 μmol/m<sup>2</sup> s 光胁迫组又设置了不同的光周期，光暗比分别为 0/24、4/20、8/16、12/12、16/8、20/4、24/0 (h)。每个处理均设置 3 个重复。

### 1.3 藻细胞生长期的鉴定

不同光强胁迫组的藻细胞在培养过程中，每天观察藻液颜色的变化。在培养的第 3 d，各处理组的藻液均呈绿色，镜检观察到藻细胞为绿色带鞭毛的游动细胞，定为绿色细胞期。在培养的第 6 d，各处理组的藻液变为深浅不一的黄褐色，镜检观察到藻细胞中央有红色色素积累，色素面积约占整个细胞的 1/3~2/3，定为褐色细胞期。在培养的第 10 d，各处理组的藻液均变为鲜红色，镜检观察到藻细胞壁明显加厚，鞭毛脱落，红色色素几乎覆盖了整个细胞，大部分细胞已进入不动的红色孢子时期，定为红色细胞期。本实验分别在藻生长的第 3 d (绿色细胞期)、第 6 d (褐色细胞期) 和第 10 d (红色细胞期) 对不同光强胁迫组的藻细胞进行虾青素含量、抗氧化酶活性、总抗氧化能力和超氧阴离子自由基清除能力的测定。不同光周期对 270 μmol/m<sup>2</sup> s 光强胁迫组虾青素含量、抗氧化酶活性、总抗氧化能力和超氧阴离子自由基清除能力的影响均在藻细胞生长的第 10 d 进行测定，由于光暗比相差比较大，在第 10 d 时，270 μmol/m<sup>2</sup> s 光照下的不同光周期处理组的藻液颜色不均一，不进行藻细胞生长期的鉴定。

### 1.4 虾青素含量测定

虾青素含量测定参照 Imamoglu 等的方法<sup>[10]</sup>。具体步骤为取 20 mL 藻液离心，弃上清液。藻细胞沉淀中

加入 5% KOH 和 30%(V/V) 甲醇破坏叶绿素，离心收集沉淀。向离心管中加入约 3 mL 含有少量醋酸的 DMSO，摇匀，70 °C 保温 5 min，保温过程不断摇匀离心管，离心并将上清液移入 10 mL 容量瓶中。反

复抽提多次至藻体发白,然后高速离心,将一次或者几次收集的上清液用 DMSO 精确定容到 10 mL,取 1 mL 移入另一个 10 mL 容量瓶中,用 DMSO 精确定容到 10 mL。将待测溶液放入 1 cm 光径比色皿中,在 492 nm 波长下测定吸光度值  $A_{492}$ , DMSO 做空白对照。用下列公式计算所测溶液虾青素的浓度:

$$C=(A_{492}\times 1000)/(A^{1\%}_{1\text{cm}}\times 100)$$

式中, C 表示单位体积内的虾青素含量(mg/mL); 消光系数  $A^{1\%}_{1\text{cm}}=2220$ ;  $A_{492}$  为 492 nm 处 1 cm 液层混合物的吸光值。

另取 20 mL 藻液,离心,弃上清,藻细胞于 80 °C 烘干至恒重,称重后计算每 mL 藻液中藻细胞的干重。最后换算成每 g 干重藻细胞所含虾青素的 mg 数(mg/g 干重)。

### 1.5 抗氧化酶活性、总抗氧化能力(T-AOC)和超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 清除能力的测定

将藻液以 3000 r/min 离心 10 min,弃上清,藻细胞沉淀中加入预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.8),冰浴条件下超声波破碎细胞,1200 r/min 离心 10 min,上清液为粗酶提取液,4 °C 保存待用。超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照 Bewley 等<sup>[11]</sup>改进的氮蓝四唑光化学还原反应法,以每 mg 蛋白能引起反应初速度半抑制时的酶用量为 1 个 SOD 活力单位(U/mg 蛋白)。过氧化氢酶(CAT)活性的测定参照 Chance 和 Maehly<sup>[12]</sup>的方法,以每 mg 蛋白每 min 使  $A_{240}$  下降 0.01 为 1 个 CAT 活力单位 (U/mg 蛋白)。总抗氧化能力(T-AOC)和超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 清除能力均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行测定,方法参照产品说明书,以在 37 °C 时,每 min 每 mg 蛋白使反应体系的吸光度(OD)值,每增加 0.01 时为一个 T-AOC 单位 (U/mg 蛋白),以每 mg 蛋白在 37 °C 下反应 40 min 所抑制的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的变化值为一个  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除能力单位 (U/mg 蛋白)。可溶性蛋白含量测定根据考马斯亮蓝 G-250 法进行<sup>[13]</sup>,标准蛋白为牛血清白蛋白(BAS,购于 BBI 公司)。

### 1.6 数据处理

试验数据以平均值±标准差表示,采用单因素方差分析的 LSD 方法,利用 SPSS20.0 软件提供的统计分析工具进行分析,统计显著性水平设定:  $p<0.05$  为显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同光强和光周期的光照胁迫对雨生红球藻虾青素含量的影响

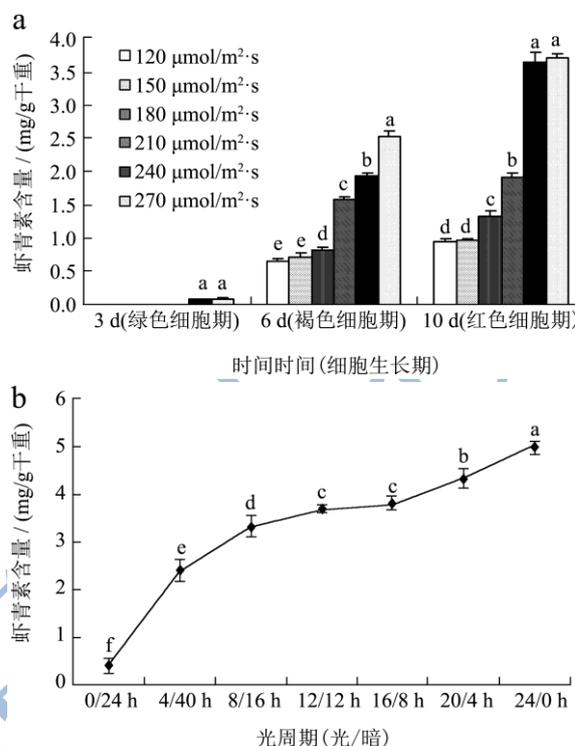


图1 光照胁迫对雨生红球藻虾青素含量的影响

Fig.1 Effects of light stress on astaxanthin content in *Haematococcus pluvialis*

注:不同小写字母代表样品之间具有显著性差异( $p<0.05$ ),有相同字母表示差异不显著( $p>0.05$ )。

不同光强的光照胁迫对雨生红球藻虾青素含量的影响见图 1a,在雨生红球藻培养的第 3 d (绿色细胞期),低光强胁迫组(120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  与 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )和中等光强胁迫组(180  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  与 210  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )的藻细胞中均未检测到虾青素,高光强胁迫组(240  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  与 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )的藻细胞中检测到少量的虾青素,两种高光强胁迫组中虾青素含量无显著差异( $p>0.05$ )。在培养的第 6 d (褐色细胞期)和第 10 d (红色细胞期),藻细胞中的虾青素的含量都随着光强的增加而逐渐增加,且高光强胁迫组虾青素的含量显著高于中等光强和低光强胁迫组( $p<0.05$ )。藻细胞中虾青素含量的平均值在绿色、褐色和红色细胞期分别是 0.027、1.372 和 2.087 mg/g 干重,因此雨生红球藻在红色细胞期虾青素含量最高,绿色细胞期虾青素含量最低。光周期对雨生红球藻在 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  的光胁迫下生长 10 d 时虾青素含量的影响见图 1b,随着每日光照时间的延长,藻细胞虾青素的含量也不断的增加。在完全黑暗条件下(光/暗: 0/24

h), 藻细胞中只有少量的虾青素产生。在连续光照条件下(光/暗: 24/0 h)藻细胞中积累的虾青素最多, 且显著高于其它光周期条件下的虾青素的含量 ( $p < 0.05$ )。

光是决定雨生红球藻生长和虾青素合成的最重要因子之一<sup>[14]</sup>。尽管有研究证明雨生红球藻中虾青素的合成可不依赖光照在黑暗中胁迫条件下合成, 但其合成速度比较慢<sup>[15]</sup>, 不利于规模化生产。Lee 和 Soh<sup>[16]</sup>得出雨生红球藻中虾青素的积累速率与光照强度呈正相关。韦韬等<sup>[17]</sup>的研究结果也显示高光强及连续光照有利于虾青素的积累。另外很多研究<sup>[3,18]</sup>都表明雨生红球藻在红色不动细胞期才会大量产生和积累虾青素, 藻细胞内虾青素的积累是为了保护细胞中的叶绿体免受强光的伤害, 是细胞抵抗环境胁迫、维持种群生存的一种自我保护措施。本实验结果与以上研究结论基本一致, 进一步证实了高光强胁迫和连续光照能诱导雨生红球藻大量产生虾青素, 雨生红球藻的红色孢子时期是虾青素合成和积累的主要时期, 而绿色细胞期则主要是藻细胞的生长期, 虾青素的合成量很低甚至没有。

## 2.2 不同光强和光周期的光照胁迫对藻细胞抗氧化酶活性的影响

研究表明强光照胁迫时, 由于更多的能量输入电子传递链而使藻细胞产生了更多的活性氧(ROS), 这些过多的 ROS 会破坏细胞膜、叶绿体等细胞器, 形成了氧化胁迫, 但 ROS 的增加可以上调抗氧化酶基因的表达, 抗氧化酶可以清除细胞内多余的 ROS, 从而对藻细胞起抗氧化保护功能<sup>[19]</sup>。SOD 和 CAT 是生物体抗氧化防御体系中最主要的两种抗氧化酶。从图 2a 和图 3a 可以看出, 在绿色细胞期, 藻细胞中的 SOD 和 CAT 活性均随着光强的增加而逐渐上升, 说明光照胁迫增加了藻细胞中的 ROS, 为了避免 ROS 对细胞的伤害, 这两种抗氧化酶基因的表达上调, 从而使细胞内这两种酶的活性增加。而在红色细胞期, 藻细胞中 SOD 和 CAT 活性均随着光强的增加而下降, 这是因为红色细胞期是虾青素合成和积累的主要时期, 而虾青素本身就具有强大的抗氧化防御功能, 足以代替抗氧化酶来清除光照胁迫所产生的多余的 ROS。Yantao 等<sup>[20]</sup>的研究表明在强光照下, 雨生红球藻虾青素的合成能明显降低细胞内分子氧的浓度。所以在红色细胞期随着光强的增加, 虾青素的含量逐渐增加(图 1a) 而抗氧化酶的活性则逐渐下降(图 2a 和图 3a)。在绿色、褐色和红色细胞期藻细胞中 SOD 活性的平

均值分别是 1.279、1.584 和 0.439 U/mg 蛋白, CAT 活性的平均值分别是 1.659、2.394 和 0.699 U/mg 蛋白, 因此雨生红球藻的 SOD 和 CAT 活性均在褐色细胞期最高, 红色细胞期最低。这是因为褐色细胞是绿色游动细胞转变成红色不动孢子的过渡阶段, 此时细胞由于长期的生长和光氧化胁迫的积累, 过氧化程度最高, 此时细胞中虽有一定量的虾青素的积累, 但不足以对抗细胞中大量产生的 ROS, 因此褐色细胞期的抗氧化防御功能主要由抗氧化酶来承担, 所以抗氧化酶活性最高, 这一研究结果与杨瑾等<sup>[18]</sup>的氮胁迫下雨生红球藻的虾青素积累和抗氧化酶活性的变化的研究结果一致。

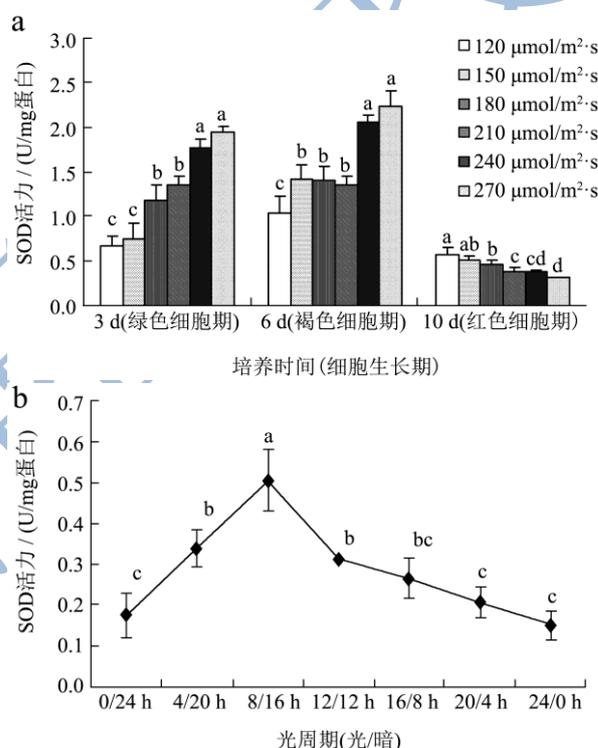


图 2 光照胁迫对雨生红球藻 SOD 活性的影响

Fig.2 Effects of light stress on SOD activity in *Haematococcus pluvialis*

注: 不同小写字母代表样品之间具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 有相同字母表示差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

光周期对雨生红球藻在 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  的光胁迫下生长 10 d 时抗氧化酶活性的影响见图 2b 和图 3b, 随着每日光照时间的延长, 藻细胞 SOD 和 CAT 活性均呈现出先升高后下降的趋势, 光周期为光/暗=8/16 h 时抗氧化酶活性最高, 且显著高于其它光周期处理组 ( $p < 0.05$ )。藻细胞中两种抗氧化酶活性在完全黑暗(光/暗: 0/24 h)与连续光照(光/暗: 24/0 h)条件下无显著差异 ( $p > 0.05$ )。这可能是由于当每日光照时间小于 8 h 时, 虽然随着每日光照时间的延长虾青素的含量在增加(图 1b), 但虾青素的增加的量不足以

抵抗快速增加的 ROS 的量,因此抗氧化酶的活性急速上升,并在光周期为光/暗=8/16 h 时达到最高值。但当每日光照时间大于 8 小时时,由于虾青素的含量随着每日光照时间的延长继续增加(图 1b),细胞的抗氧化防御功能逐渐由大量产生的虾青素代替抗氧化酶来承担,因此抗氧化酶的活性逐渐下降。

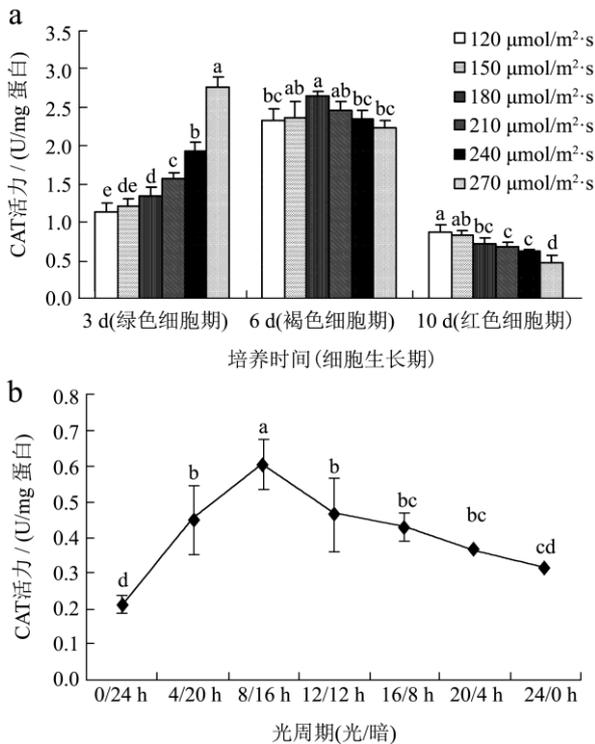


图3 光照胁迫对雨生红球藻 CAT 活性的影响

Fig.3 Effects of light stress on CAT activity in *Haematococcus pluvialis*

注:不同小写字母代表样品之间具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),有相同字母表示差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

### 2.3 不同光强和光周期的光照胁迫对藻细胞总抗氧化能力的影响

生物体内存在着有效的抗氧化防御系统,可以清除环境胁迫下机体内产生的 ROS 及其代谢产物。总抗氧化能力(T-AOC)是反映机体抗氧化作用的综合性指标。机体防御体系中 T-AOC 的作用主要是维持内环境活性氧的动态平衡,清除过高的 ROS,使机体处于氧化还原相对稳定的状态<sup>[21]</sup>。不同光强的光照胁迫对雨生红球藻 T-AOC 的影响见图 4a,在 3 个不同的细胞生长期,藻细胞的 T-AOC 均随着光强的增加而不断上升,高光强胁迫组的 T-AOC 均显著高于低光强胁迫组 ( $p < 0.05$ )。在绿色、褐色和红色细胞期藻细胞中 T-AOC 的平均值分别是 0.830、1.251 和 1.496 U/mg 蛋白,因此雨生红球藻在红色细胞期 T-AOC 最高,在

绿色细胞期最低。光周期对雨生红球藻在 270 μmol/m² s 的光胁迫下生长 10 d 时 T-AOC 的影响见图 4b,藻细胞 T-AOC 随着每日光照时间的延长而逐渐增加,连续光照(光/暗:24/0 h)条件下的 T-AOC 显著高于其它光周期条件下的 T-AOC ( $p < 0.05$ )。这说明光强越高,每天光胁迫的时间越长,藻细胞内产生的 ROS 也越多,细胞的总抗氧化能力也越高。王潮岗等<sup>[22]</sup>的研究表明雨生红球藻在 125 μE/(m² s)的连续光照下培养 60 h 后,藻细胞内的 T-AOC 显著高于 20 μE/(m² s)的连续光照处理组。这些研究都表明高光强和长时间的光照胁迫会迫使雨生红球提高自身总抗氧化能力。

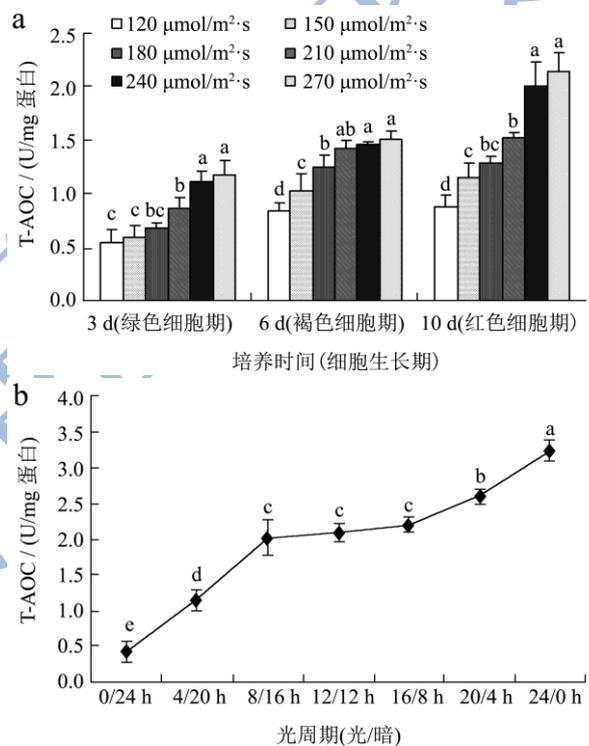


图4 光照胁迫对雨生红球藻总抗氧化能力的影响

Fig.4 Effects of light stress on T-AOC of *Haematococcus pluvialis*

注:不同小写字母代表样品之间具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),有相同字母表示差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

生物体内的 T-AOC 代表机体内抗氧化酶类和非酶类抗氧化物质的总体水平<sup>[21]</sup>,而雨生红球藻细胞中的抗氧化物质主要是虾青素,因而雨生红球藻的 T-AOC 是其体内抗氧化酶和虾青素这两种抗氧化防御机制的总和。从图 4b 可以看出,在 270 μmol/m².s 光照下,藻细胞 T-AOC 随着每日光照时间的延长而增长的速率明显的分为三个阶段:0/24 h~8/16 h 光周期下的快速增长阶段、8/16 h~16/8 h 光周期下的缓慢增长阶段和 16/8 h~24/0 h 光周期下的再次快速增长阶段。在 0/24 h~8/16 h 光周期下,藻细胞的虾青素含量(图 1b)和 SOD 与 CAT 活性(图 2b 和图 2b)均快

速增长,因而这两种抗氧化机制的总和 T-AOC 也快速增长;在 8/16 h~16/8 h 光周期下,虽然藻细胞的虾青素含量还在增长(图 1b),但 SOD 与 CAT 活性均下降(图 2b 和图 3b),因而 T-AOC 虽然也在增长,但增长速率缓慢;在 16/8 h~24/0 h 光周期下,长时间的光照使藻细胞的虾青素含量快速增长(图 1b),虽然 SOD 与 CAT 活性依然在下降(图 2b 和图 3b),但虾青素的高抗氧化活性足以弥补抗氧化酶活性的下降从而使 T-AOC 再次快速增长。

### 2.4 不同光强和光周期的光照胁迫对藻细胞超氧阴离子自由基清除能力的影响

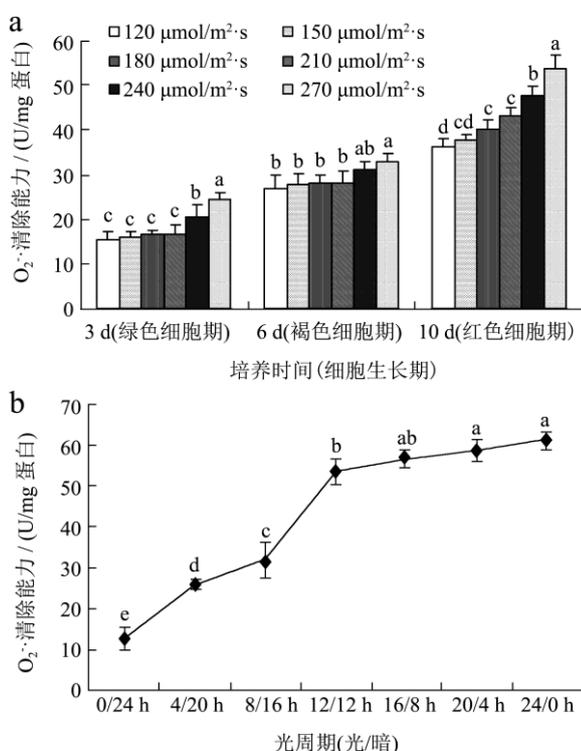


图 5 光照胁迫对雨生红球藻超氧阴离子自由基清除能力的影响

Fig.5 Effects of light stress on O<sub>2</sub><sup>·-</sup> scavenging ability of *Haematococcus pluvialis*

注:不同小写字母代表样品之间具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),有相同字母表示差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 是基态氧接受一个电子后形成的第一个氧自由基,能通过一系列反应生成其它的氧自由基,引起机体的生理变化<sup>[23]</sup>。但生物体能通过抗氧化防御系统清除掉过量产生的  $O_2^{\cdot-}$ ,从而保护机体免受过氧化损伤。不同强度的光照胁迫对雨生红球藻  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力的影响见图 5a,在 3 个不同的细胞生长期,藻细胞的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力均随着光强的增加而不断上升,且高光强胁迫组的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力均显

著高于低光强胁迫组 ( $p < 0.05$ ),但在绿色和褐色细胞期低光强胁迫组和中等光强胁迫组的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力无显著差异 ( $p > 0.05$ )。在绿色、褐色和红色细胞期,藻细胞中  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力的平均值分别是 18.30、29.09 和 43.03 U/mg 蛋白,因此雨生红球藻在红色细胞期  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力最高,在绿色细胞期最低。光周期对雨生红球藻在 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  的光胁迫下生长 10 d 时  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力的影响见图 5b,藻细胞  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力随着每日光照时间的延长而逐渐增加,连续光照(光/暗: 24/0 h)条件下的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力最高,但与每日光照 20 h (光/暗: 20/4 h) 和 16 h (光/暗: 16/8 h) 条件下的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力无显著差异 ( $p > 0.05$ ),但显著高于每日光照时间小于 16 小时的其它光周期条件下的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力 ( $p < 0.05$ )。这说明光强越高,每日光胁迫的时间越长,藻细胞内产生的  $O_2^{\cdot-}$ 也越多,细胞的  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力也随之增高。这种变化与藻细胞的总抗氧化能力随光强和每日光胁迫时间的增长而升高的现象(图 4a 和图 4b)相似,这是因为在生物体的抗氧化防御系统中,抗氧化酶和抗氧化物质都能够参与  $O_2^{\cdot-}$ 清除反应,抗氧化酶通过一系列酶促反应,而抗氧化物质通过其酚羟基、巯基等电子基团与  $O_2^{\cdot-}$ 的氧化还原反应,最终使  $O_2^{\cdot-}$ 被彻底清除,因此机体  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力是其总抗氧化能力的一个体现。

### 3 结论

3.1 实验结果表明,无论在绿色、褐色还是在红色细胞期,光强越高,雨生红球藻细胞中虾青素的含量、T-AOC 和  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力也越高,藻细胞在不同光周期的 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  的光照下生长 10 d 时,虾青素的含量、T-AOC 和  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力随每日光照时间的延长而增高,进一步证实了高光强和长时间的光照胁迫有利于雨生红球藻积累虾青素,并迫使雨生红球藻提高自身的抗氧化能力。

3.2 雨生红球藻细胞中抗氧化酶 (SOD 和 CAT) 活性在绿色细胞期随光强的增加而增加,在红色细胞期则随光强的增加而下降,藻细胞虾青素的含量、T-AOC 和  $O_2^{\cdot-}$ 清除能力在红色细胞期最高,而抗氧化酶活性在褐色细胞期最高。雨生红球藻细胞内的抗氧化酶和虾青素两种抗氧化保护机制协同作用,共同维持光照胁迫下活性氧在藻细胞内的动态平衡,从而保护细胞免受光氧化损伤。

3.3 本研究表明雨生红球藻在 270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  的光强下连续光照 10 d 后的虾青素的含量、总抗氧化能力和超氧阴离子自由基清除能力最高,本研究结果将为利用雨生红球藻大规模工业化高效生产虾青素作为天然

的抗氧化功能食品添加剂在食品工业上的应用提供良好的理论依据与数据支撑。

### 参考文献

- [1] Chen Y, Li D, Lu W, et al. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 527-529
- [2] 陶姝颖,明建.虾青素的功能特性及其在功能食品中的应用研究进展[J].*食品工业*,2012,33(8):110-115  
TAO Shu-ying, MING Jian. Research advance on the functional characteristics of astaxanthin and its application in functional food [J]. *Food Industry*, 2012, 33(8): 110-115
- [3] Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition [J]. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21(5): 210-216
- [4] Hagen C, Grunewald K, Xylander M, et al. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13(1): 79-87
- [5] Tewari R K, Kumar P, Sharma P N. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants [J]. *Planta*, 2006, 223: 1145-1153
- [6] Jorge L P, Maria E G The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress [J]. *Mutation Research*, 2009, 674(1-2): 137-147
- [7] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1991, 3(4): 295-304
- [8] Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin:applications for human health and nutrition [J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(5): 210-216
- [9] Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, et al. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus Pluvialis* [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74(1): 61-63
- [10] Imamoglu E, Dalay M C, Sukan F V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *New Biotechnology*, 2009, 26: 199-204
- [11] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1979, 30: 195-238
- [12] Chance B, Maehly A C. Assay of catalase and peroxidase [J]. *Methods in Enzymology*, 1955, 2:764-775
- [13] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006  
WANG Xue-kui. The experiment principle and technique on plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006
- [14] 顾洪玲,管斌,孔青,等. LED 灯的光照对雨生红球藻细胞生长及虾青素积累的影响[J]. *海洋湖沼通报*,2014,2:45-50  
GU Hong-ling, GUAN Bin, KONG Qing, et al. Influence of Leds on cell growth and astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2014, 2: 45-50
- [15] 金传荫,宋立荣,刘永定,等. 红球藻水生 748 株营养需求的研究[J]. *水生生物学报*,1996,20(3):293-296  
JIN Chuan-yin, SONG Li-rong, LIU Yong-ding, et al. The nutrient requirement of a green alga *Haematococcus* SP. HB748 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(3): 293-296
- [16] Lee Y K, Soh C W. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 1991, 27: 575- 577
- [17] 韦韬, 顾文辉, 李健, 等. 雨生红球藻的光周期效应[J]. *植物学报*, 2013,48 (2):168-173  
WEI Tao, GU Wen-hui, LI Jian, et al. Effect of photoperiod on microalgae *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bulletin of Botany*, 2013, 48(2): 168-173
- [18] 杨瑾,王铭,李涛,等. 氮胁迫对雨生红球藻色素积累与抗氧化系统的影响[J].*植物生理学报*,2011,47(2):147-152  
YANG Jin, WANG Ming, Li Tao, et al. Effects of nitrate-nitrogen stress on pigment content and antioxidant systems in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47 (2): 147-152
- [19] 苏忠亮,程江峰,梁成伟,等.雨生红球藻对环境胁迫的分子防御机制[J].*生物技术通报*,2009,3:42-45  
SU Zhong-liang, CHENG Jiang-feng, LIANG Cheng-wei, et al. Molecular defense mechanism of *Haematococcus pluvialis* against environment stress [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 3: 42-45
- [20] Yantao L, Milton S, Feng C, et al. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165: 1783-1797
- [21] 黄凤华,郑新民,张元珍,等.诊断超声波照射对大鼠睾丸总抗氧化能力、丙二醛及脂质过氧化物酶水平和生殖细胞调

- 亡的影响[J].武汉大学学报(医学版),2007,28(1):85-88  
HUANG Feng-hua, ZHENG Xin-min, ZHANG Yuan-zhen, et al. Changes of apoptosis rate, total antioxidant capacity, malondialdehyde and lipidperoxide levels in testis after diagnostic ultrasound radiation [J]. Medical Journal of Wuhan University, 2007, 28(1): 85-88
- [22] 王潮岗,韩桑,陈甄倩,等.雨生红球藻抗氧化系统对活性氧的清除机制[J].水生生物学报,2012,36(4): 804-808  
WANG Chao-gang, HAN Sang, CHENG Zhen-qian, et al. The scavenging of reactive oxygen species with antioxidant systems in *Haematococcus pluvialis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 804-808
- [23] 刘晓风,刘琳,王永刚,等.啤特果多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2014,30(7):179-186  
LIU Xiao-feng, LIU Lin, WANG Yong-gang, et al. Purification, identification and the antioxidant activity of polysaccharides from *Pyrus sinkiangensis*[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 179-186