

斜生栅藻中虾青素的积累过程及其光合活性变化

秦 山^{1,2} 刘国祥¹ 胡征宇¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 分析了斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 在光温 (30°C , $180\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 胁迫条件下积累虾青素的过程, 观察了该过程中细胞形态及细胞光合生理的变化。胁迫条件下, 细胞在 48h 内生成并积累了包括海胆酮、角黄素、金盏花黄素和金盏花红素在内的多种次生类胡萝卜素, 并合成了虾青素及其酯。该过程中, 细胞形态由两端尖细变得不规则、膨大, 原来由 4~8 个细胞组成的定形群体变为游离的单个细胞或 2 个细胞组成的群体。藻细胞光合速率在 24h 内先下降后上升, 而后又呈现下降趋势, 从 $34.29\ \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl } a/\text{h}$ 迅速下降为 $5.21\ \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl } a/\text{h}$ 。呼吸速率在前 24h 内升高至 $60.37\ \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl } a/\text{h}$ 而后缓慢下降到 $38.40\ \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl } a/\text{h}$ 。光合系统 II 的活性随着胁迫时间的延续而逐步下降, 较初始值降低了 63.9%。结果表明, 斜生栅藻细胞在高光照条件下可以合成虾青素, 并通过调节光合速率、呼吸速率以及光合系统 II 的效率来应对胁迫。

关键词: 斜生栅藻; 胁迫; 虾青素; 光合活性

中图分类号: Q945.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0509-07

虾青素 (Astaxanthin) 是一种天然的酮基类胡萝卜素, 目前已被作为重要的着色剂添加于鲑鱼、大马哈鱼和虾的饲料中^[1]。同时, 虾青素具有较强的抗氧化作用和对某些癌细胞的抑制作用^[2,3]。因此, 虾青素一直受到研究者们的关注, 也是应用藻类学研究的热点之一。雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis*^[4]、绿球藻 *Chlorococum wineri*^[5]、葡萄藻 *Botryococcus braunii*^[6]、小球藻 *Chlorella zofingiensis*^[7] 和绿球藻 *Chlorococum* sp.^[8] 等多种藻类细胞中都能够合成与积累虾青素。通过对藻类培养温度和光照的调控可以诱导细胞中虾青素的合成以及其他次生类胡萝卜素的生成^[9,10]。由于受到环境因子的胁迫, 细胞开始积累次生类胡萝卜素, 光合活性剧烈下降, 形态和分裂速度都受到一定影响^[11]。

斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 是一种常见的淡水微藻, 常用作环境污染对水生生物致毒机理的研究^[12]。本文以该藻为研究对象, 分析了藻细胞在胁迫条件下类胡萝卜素的累积和虾青素的合成, 并观察了在这一过程中细胞形态和光合生理指标的变化, 以揭示细胞中次生类胡萝卜素积累与细胞光合活性变化之间的联系, 也为利用其他藻类培养生产

虾青素或其他色素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 斜生栅藻采自武汉东湖, 分离和鉴定由本实验室完成。使用改良 BG-11 培养基^[13] 保存藻种并用于实验接种。

1.2 培养条件 320mL 大试管中添加 250mL 培养液, 取对数生长期的藻样接种, 充气培养。实验组初期光照强度为 $80\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 温度为 25°C ; 藻细胞进入对数生长期后, 光照强度调整为 $180\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 温度提高到 30°C 以诱导虾青素的合成。对照组实验条件不变。每组实验设置 3 次重复。

1.3 色素的分析

1.3.1 叶绿素和类胡萝卜素含量的测定 藻细胞收集后经过离心、洗涤、研磨, 使用 80% 丙酮反复提取, 然后合并提取液, 用岛津 UV-1601 紫外可见分光光度计分别测定 665 nm、646 nm 和 470 nm 处的吸光度并计算叶绿素 *a*、*b* 和类胡萝卜素的含量^[14]。

1.3.2 类胡萝卜素成分的分离和鉴定

类胡萝卜素的提取 藻细胞经洗涤、冷冻干燥, 使用 Mini-Bead beater 破碎和提取细胞色素, 提取溶

收稿日期: 2007-08-24 修订日期: 2008-12-13

基金项目: 武汉晨光计划 (20035002016-31) 资助

作者简介: 秦山 (1977-), 男, 湖北武汉人; 博士研究生; 主要从事藻类资源利用方面的研究。E-mail: qinshan@live.cn

通讯作者: 胡征宇, E-mail: huz@ihb.ac.cn

剂为甲醇/二氯甲烷(3:1)。提取至细胞残渣无色,合并所有提取液,使用0.22 μm微孔滤膜过滤,置于-20℃保存。

LC-MS分析 分析仪器采用Agilent 1100型LC-MS(配置PDA检测器)对色素进行分离和鉴定。色谱柱使用Supelco Discovery反相C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5 μm)。色谱条件设定为:流动相分为A、B两相,由色谱纯二氯甲烷、甲醇、乙腈和水组成,配制比例参数、梯度洗脱时间和流动相流速均参照文献[15, 16]的方法设定。质谱分析使用的离子源为APCI源,离子源温度为450℃,质量范围为100—1500 amu。

1.4 细胞形态的观察 整个实验过程中每隔一定时间进行取样,使用Leica DM 5000B光学显微镜进行观察和拍照。

1.5 光合作用的测定

1.5.1 光合速率与呼吸速率的测定 采用薄膜氧电极法^[17], Clark II型氧电极(Hansatech U.K.)进行测定。测定时将藻样加入氧电极玻璃反应槽内,循环水浴(Polystar refrigerated bath, Cole Parmer Inc.)保持在恒温25℃(对照组)或30℃(实验组);光源为卤素汞灯(LS2, Hansatech Instrument Ltd.);光照强度用照度计(QRT1, Hansatech Instrument Ltd.)按照实际培养条件进行标定。

1.5.2 叶绿素荧光的测定

待测藻样置于暗处适应15min,完全暗适应以后用植物效率分析仪(PEA MK2, Hansatech U.K.)测定叶绿素荧光强度^[18, 19]。

1.6 数据分析 使用SPSS for Windows 11.0的ONE WAY ANOVA过程对实验数据进行方差分析。

2 结果

2.1 胁迫条件下藻细胞色素的组成变化

对细胞中叶绿素(a+b)含量进行连续48h的观察(图1a)。在胁迫条件下,前3h内叶绿素含量出现小幅上升,而后则持续下降,至36h和48h均显著低于对照组($p < 0.05$),且最终含量比初始值下降了24.8%。而在正常培养条件下的对照组,前12h内与实验组变化趋势相同(先升高再下降),而后又出现波动,由最初的5.6258mg/L下降为5.1191mg/L,下降幅度并不显著($p > 0.05$)。

细胞中类胡萝卜素的含量也随着时间的延续而发生变化(图1b)。在36h内,对照组和实验组的类胡萝卜素含量均不断增加,表现出相同的变化趋势。在之后的12h内,对照组变化趋缓,进入一个平稳阶段;而实验组的类胡萝卜素含量则继续升高,且最终值比初始值提高了116.9%,并显著高于对照组最终值($p < 0.05$)。实验组叶绿素和类胡萝卜素的含量变化说明了环境胁迫可以显著改变细胞内色素组成,促进类胡萝卜素的生成;同时类胡萝卜素的产生可能也是细胞应对胁迫的一种反应。

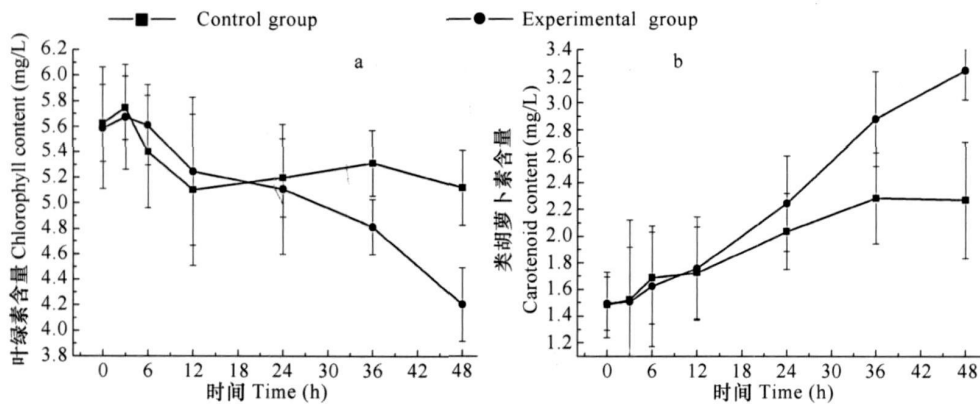


图1 斜生栅藻细胞中叶绿素(a)和类胡萝卜素(b)含量的变化

Fig. 1 The change of content for chlorophyll (a) and carotenoids (b) in *S. obliquus*

2.2 类胡萝卜素成分的分析

对斜生栅藻的类胡萝卜素提取物进行LC/MS分析,通过各组分的质谱碎片解离规律、质谱数据,并参照文献[20]报道,确定了其中的7种次生类胡萝卜素

(表1)。从表中可以看出,斜生栅藻与雨生红球藻类似,亦可以合成虾青素这一重要的色素,同时发现细胞中还积累了角黄素、海胆酮、金盏花黄素和金盏花红素等一类重要的合成虾青素的前体物质。

表 1 斜生栅藻中类胡萝卜素成分及其质谱数据
Tab. 1 The composition of secondary carotenoids in *S. obliquus* and their MS data for the identification

类胡萝卜素成分	Composition of Carotenoids	MS (m/z)
金盏花黄素	Adonixanthin	582 (M ⁺)
虾青素	Astaxanthin	596 (M ⁺)
3'-羟基海胆酮	3'-Hydroxyechinenone	566 (M ⁺)
金盏花红素	Adonirubin	580 (M ⁺)
角黄素	Canthaxanthin	564 (M ⁺)
海胆酮	Echinenone	550 (M ⁺)
β-胡萝卜素	β-Carotene	536 (M ⁺)

根据液相色谱分析的结果,在胁迫条件下,斜生栅藻细胞内的色素组成成分随着时间的延长而发生明显的变化(图 2)。从图中可以看出,实验初始(图 2 A)细胞内仅形成一些初生类胡萝卜素诸如花药黄素、叶黄素和新黄素等以及叶绿素和 β-胡萝卜素,而且叶绿素占主体。12h 之后(图 2B),已经能够检测到虾青素和海胆酮等次生类胡萝卜素,而 24h 的色谱图与 12h 的结果相比没有显著差异(图 2C)。至 48h(图 2D),藻细胞已经完全由绿色变成褐色,细胞内产生大量的次生类胡萝卜素且成为占优势地位的色素,包括金盏花黄素、金盏花红素、角黄素、海胆酮和 3'-羟基海胆酮,以及虾青素及其酯。

2.3 斜生栅藻细胞形态的观察结果

正常条件下生长的斜生栅藻细胞定形群体呈扁平状(图 3-1,图 3-2),由 4 个或者 8 个细胞组成,排列成直线或者交互排列;细胞为纺锤形,两端尖细。在胁迫 12h 后细胞中部开始膨大(图 3-3),由 2 个细胞组成的群体开始大量出现(图 3-4)。24h 后(图 3-5 图 3-6),细胞进一步膨大,形状开始变得不规则。至 48h(图 3-7 图 3-8),4 个或者 8 个细胞的定形群体已很少观察到,而单个或者 2 个细胞的群体成为主体;细胞呈不规则状或者圆形,部分细胞尖细的两端消失。细胞形态在整个胁迫期内发生了剧烈变化。

2.4 胁迫条件下斜生栅藻细胞光合作用的变化

2.4.1 细胞光合速率和呼吸速率的变化

随着胁迫时间的延长,栅藻细胞的光合速率亦发生变化(图 4a)。在前 3h 光合速率显著下降,由最初的 38.99 μmol O₂/mg Chl/h 降低为 19.54 μmol O₂/mg Chl/h。在随后的 9h 内,光合速率又出现上升趋势,恢复到 31 μmol O₂/mg Chl/h 以上的水平,这可能是由于细胞对外界条件改变而出现短暂的适应。之后,光合速率又迅速下降,

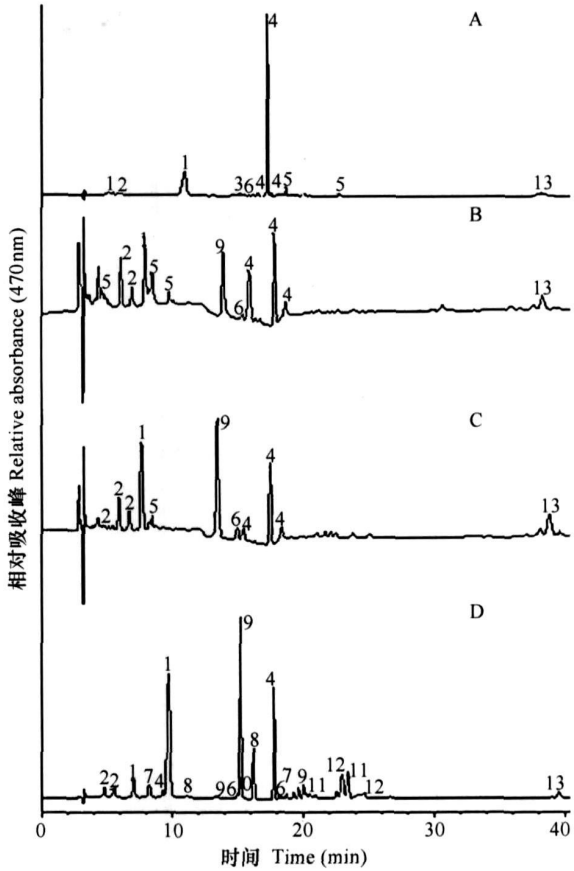


图 2 胁迫条件下培养的斜生栅藻总色素的 HPLC 色谱图
Fig. 2 Total pigments profile analyzed by HPLC in *S. obliquus* under stress conditions for 0h (A), 12h (B), 24h (C) and 48h (D). Peaks were identified by typical retention time and absorption spectra compared with their respective standards compounds or previous reports. 1. lutein; 2. neoxanthin; 3. antheraxanthin; 4. chlorophyll b; 5. chlorophyll a; 6. echinenone; 7. adonixanthin; 8. canthaxanthin; 9. astaxanthin; 10. 3'-hydroxyechinenone; 11. adonirubin; 12. astaxanthin esters; 13. β-carotene.

至 48h 达到最低值,较最初值下降了 86.6%。与胁迫条件下的细胞相比,对照组光合速率在 48h 内未发生显著的变化,保持在 37.6 μmol O₂/mg Chl/h 以上。在最初的 3h 内该速率小幅上升(与实验组相反),而后一直下降,但最终仅下降了 4.43%,显著高于实验组同时的速率。

栅藻细胞的呼吸速率在胁迫条件下也随着时间延长而变化(图 4b)。在开始的 6h 内,呼吸速率先急速升高,而后增速减缓,达到 41.59 μmol O₂/mg Chl/h。之后的 18h 内先小幅下降,而后再次显著升高,达到最高值 60.37 μmol O₂/mg Chl/h,比初

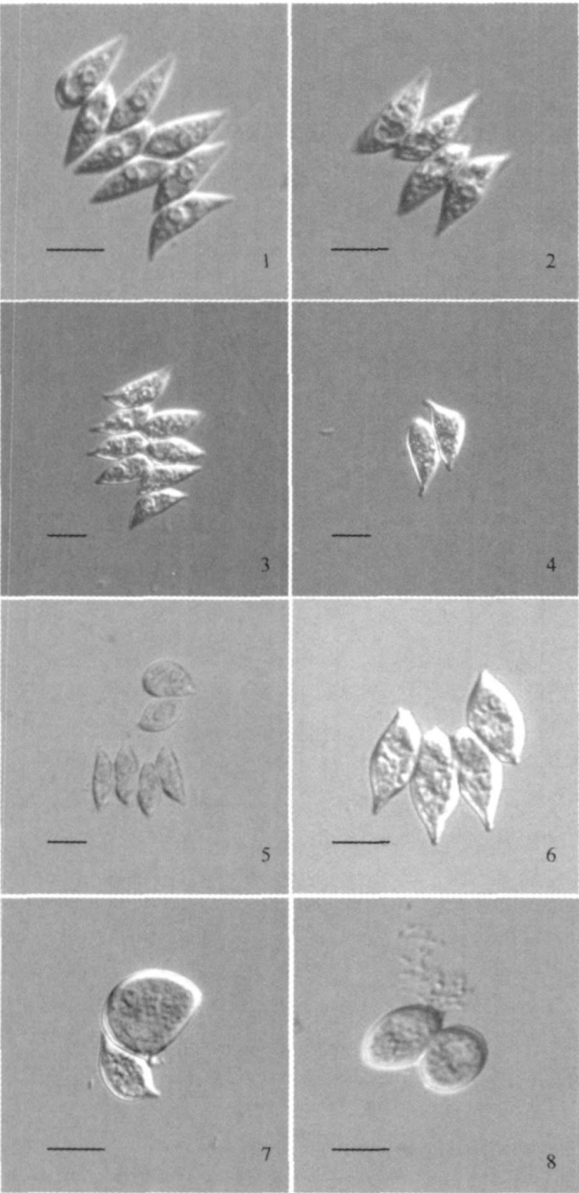


图 3 斜生栅藻在胁迫条件下细胞形态的变化
Fig 3 Themorphobgical change of *S. obliquus* cells cultured under stress conditions
1, 2 0h 3, 4 12h 5 6 24h 7, 8 48h (Bar 10 μm)

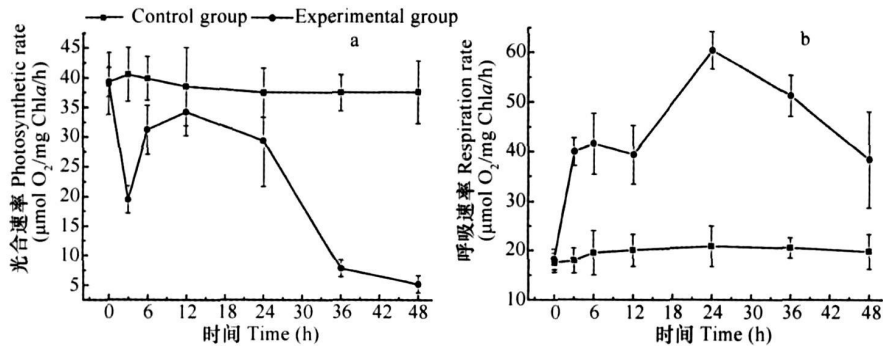


图 4 斜生栅藻细胞光合速率 (a)和呼吸速率 (b)的变化
Fig. 4 The change of photosynthetic rate (a) and respiration rate (b) of *S. obliquus* cell

始值提高了 230.98%。之后则呈现出下降趋势。与光合速率类似,对照组呼吸速率变化并不显著,维持在 21 μmolO₂ /mg Chl/h 以内。该速率先缓慢升高,而后出现下降,但总体表现为升高趋势 (提高了 12.9%)。

比较实验组的呼吸速率和光合速率可以发现,在胁迫 12h 之后 (含 12h),呼吸速率均高于光合速率,说明细胞在这种条件下呼吸耗氧量已经大于其光合放氧量,也是一种对抗外界胁迫的反应。

2.4.2 细胞叶绿素荧光强度的变化

图 5 显示,从总体上看,实验组和对照组的叶绿素荧光强度均随着时间的延长而呈现下降趋势。实验组下降非常显著 ($p < 0.05$), F_v / F_m (光合系统 II 的光化学效率) 最终值较初始值下降了 63.9%,且快速下降期出现在前 12h,仅在 36 至 48h 间出现微小的升高。与实验组相比,对照组 F_v / F_m 值在前 24h 内出现了 3 次波动,均为先升高后降低; 24h 之后则变化不显著 ($p > 0.05$),保持在 0.528—0.532 之间,最终值显著低于实验组 ($p < 0.05$)。这一结果说明环境胁迫对细胞的光合系统造成了一定损害,且超过了细胞的耐受能力,导致 F_v / F_m 急剧下降,表现出与光合速率相同的变化趋势。

3 讨 论

3.1 微藻作为虾青素的生产来源

由于虾青素的重要生物学功能及其在人类保健品、药品和饲料添加剂中应用的巨大前景而越来越受到青睐^[21]。单细胞藻类,特别是雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* 绿球藻 *Chlorococcum* sp. 成为虾青素的良好生物来源^[4 8]。研究发现,通过调节培养条件可以促进藻细胞积累虾青素,提高其产量。如较高的培养温度^[9]、盐胁迫^[22]、较强的光照^[23]等环境条件的改变实际上对藻细胞产生了胁迫

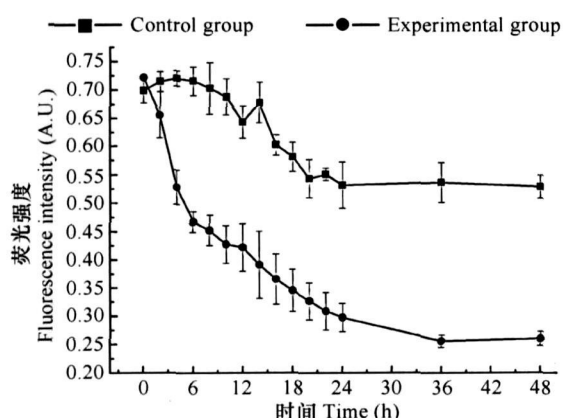


图 5 斜生栅藻叶绿素荧光强度的变化

Fig 5 The change of chlorophyll fluorescence intensities of *S. obliquus* cells

迫, 诱导其生成和积累类胡萝卜素 (包括虾青素)。光照强度的变化影响细胞光合系统正常的运转及相关光合色素的合成, 盐胁迫与温度促进类胡萝卜素生成相关酶的基因表达等则可能是环境诱导细胞产生虾青素的机理^[23-24]。在本实验中, 通过提高培养温度和光照强度, 即可以诱导斜生栅藻细胞合成虾青素, 证明斜生栅藻与雨生红球藻和绿球藻等相似, 且非常容易大规模生产, 是一种有潜力的虾青素生物来源。

3.2 斜生栅藻应对环境胁迫的生理响应

斜生栅藻细胞内色素组成的变化也反映了其应对环境胁迫的适应过程。从总体趋势来看, 细胞内叶绿素和类胡萝卜素含量随着胁迫时间的延长呈现刚好相反的趋势: 前者含量下降而后者含量上升。根据液相色谱的分析结果, 次生类胡萝卜素的合成与积累是胁迫条件下细胞类胡萝卜素含量升高的主要原因。Rise M, *et al.* 认为, 藻细胞只有在叶绿素和初生类胡萝卜素不足以保护细胞应对环境胁迫时才会合成次生类胡萝卜素^[25], 而次生类胡萝卜素也可以起到一种被动的保护作用, 即减少抵达 PSII 的光捕获色素复合体的光量子^[26]。另一方面, 类胡萝卜素还充当抗氧化剂, 清除细胞内由于氧化压力带来的自由基以及保护细胞膜避免膜脂过氧化^[27]。对照组中叶绿素含量虽然出现一些波动, 但是总体上仍在下降, 而类胡萝卜素则持续上升, 这可能是细胞逐步衰老的一种体现。实验组的叶绿素和类胡萝卜素含量比对照组变化的更为显著和剧烈也进一步说明了胁迫加速了细胞内类胡萝卜素特别是次生类胡萝卜素的合成。

细胞受到环境条件的影响, 胞内色素的积累可能是造成其形态改变的重要原因。由于色素及其脂

化物大部分积累在游离于叶绿体之外的脂肪体或脂小球中, 其体积的迅速膨大会造成细胞的变形和体积增大, 而正常细胞的分裂和繁殖阻止了类胡萝卜素的产生^[28]。同时, 某些促进类胡萝卜素积累的诱导条件如除草剂、盐和氮饥饿等又可以抑制细胞分裂^[29], 使细胞膨大变形。这与本实验中观察到的斜生栅藻在胁迫条件下细胞形态变化的结果是一致的。

细胞的光合作用与其色素的积累也有着紧密的联系。胁迫条件下的光抑制和呼吸作用显著增强均可导致细胞内氧自由基的大量积累, 进而诱导次生类胡萝卜素的合成以及其他的生理响应^[26-27]。实验组在胁迫条件下, 光合速率显著下降而呼吸速率显著升高, 总光合作用速率为负值, 说明这段时间内光合作用受到抑制, 细胞代谢所需能量增加以应对胁迫。该过程中出现的波动可能是细胞对胁迫的一种短暂适应, 但是随着时间的延长, 环境压力超出了细胞的适应能力, 表现出光合活性下降, 细胞合成大量的次生类胡萝卜素, 这与之前 Hagen *et al.*、Zb+nk *et al.* 的报道一致^[30-31]。PSII 与环境胁迫有着密切的关系, 但与光合速率、呼吸速率不同的是, 在整个过程中一直呈现下降的趋势, 表明了胁迫对光系统 II 的损害及抑制作用^[11]。光合放氧速率的下降、 F_v/F_m 值的下降、呼吸速率的升高都是 PSII 复合体受到损害的体现^[28]。雨生红球藻在虾青素积累过程中细胞光合活性也出现下降, 可能是由于光合色素 f (存在于叶绿体的类囊体膜上) 受到破坏, 影响了从 PSII 到 PSI 电子流的传递, 以及 PSII 和 PSI 复合体中某些组分的缺失^[32]。由此推断, 光合活性是虾青素积累过程中非常重要的生理指标, 可以衡量细胞对胁迫的耐受和适应。

3.3 结论

斜生栅藻细胞在胁迫条件下积累次生类胡萝卜素并合成虾青素是其对环境改变的一种适应过程; 培养条件的改变或者胁迫是诱导细胞内产生大量类胡萝卜素的一种有效手段; 细胞光合活性的变化可以作为其适应胁迫、抵抗环境压力的一种信号, 对诱导和调控类胡萝卜素的生物合成提供理论依据。

参考文献:

- [1] Johnson E A, An G H. Astaxanthin from microbial sources [J]. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 1991, 11: 297-326
- [2] Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1991, 63: 141-146

- [3] Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, *et al* Chemoprevention of natural carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls: astaxanthin and canthaxanthin [J]. *Cancer Research*, 1995, **55**: 4059—4064
- [4] Grunig M, D' Souza F M L, Burrows M, *et al* A legal carotenoids 51 Secondary carotenoids 2 *Haematococcus pluvialis* aphanospores as a source of (3S, 3'S) - astaxanthin esters [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1992, **4**: 165—171
- [5] Brown T E, Richardson F L, Vaughn M L. Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales) [J]. *Phycologia*, 1967, **6**: 167—184
- [6] Grunig M, Metzger P, Llaen-jensen S. A legal carotenoids 42 Secondary carotenoids of algae 1 Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Bryococcus braunii* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1989, **17**: 263—269
- [7] Rise M, Cohen E, Vishkautsan M, *et al* Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella Zofingiensis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, **144**: 287—292
- [8] Yuan J P, Chen F, Liu X, *et al* Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum* [J]. *Food Chemistry*, 2002, **76**: 319—325
- [9] Tajiho A E, Hayano Y, Kakizono T, *et al* Hyperaccumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures [J]. *Biotechnology Letters*, 1994, **16**: 133—138
- [10] 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 Bioscience and Bioengineering*, 1992, **74**: 61—63
- [11] Masojd J, Torzillo G, Kopecky J, *et al* Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, **12**: 417—426
- [12] Kuang Q J, Zhao W Y, Deng P. Studies on the toxic efficiency of dibutylphthalate to *Scenedesmus obliquus* and natural algae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(1): 103—105 [况琪军, 赵文玉, 邓萍. DBP对斜生栅藻及天然混合藻类致毒效应研究. 水生生物学报, 2003, **27**(1): 103—105]
- [13] Rippka R, Danelles J, Waterbury J B, *et al* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, **111**: 1—61
- [14] Lichtenhaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 351—382
- [15] Yuan J P, Chen F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*-assay on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin [J]. *Food Chemistry*, 2000, **68**: 443—448
- [16] Yuan J P, Chen F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* during saponification [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, **47**: 31—35
- [17] Zhao X M, Bi Y H, Qin S, *et al* The response of cultivated *Nostoc flagelliforme* to salt stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2005, **25**: 2234—2239 [赵学敏, 毕永红, 秦山, 等. 发菜细胞培养物对盐胁迫的响应. 西北植物学报, 2005, **25**: 2234—2239]
- [18] Stibet A, Govindjee, Strasser B J, *et al* Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modeling and numerical simulation [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1998, **193**: 131—151
- [19] Chen L Z, Xie Z M, Li D H, *et al* Recovery of photosynthetic activity of *Micrococcus vaginatus* after water loss and rehydration [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(4): 404—407 [陈兰洲, 谢作明, 李敦海, 等. 失水-吸水过程中微鞘藻光合活性的特性. 水生生物学报, 2006, **30**(4): 404—407]
- [20] Liu B H, Lee Y K. Composition and biosynthetic pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. [J]. *Biotechnology Letters*, 1999, **21**: 1007—1010
- [21] Lu K X, Jiang X M, Zhai X W. Biological Function and application of astaxanthin [J]. *Journal of Ningbo University (NSEE)*, 2003, **16**: 95—98 [陆开形, 蒋霞敏, 翟兴文. 虾青素的生物学功能及应用. 宁波大学学报, 2003, **16**: 95—98]
- [22] Condero R, Otero A, Patiño M, *et al* Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions [J]. *Biotechnology Letters*, 1996, **18**: 213—218
- [23] 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 General Microbiology*, 1992, **74**: 61—63
- [24] Huang J C, Chen F, Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, **122**: 176—185
- [25] Rise M, Cohen E, Vishkautsan M, *et al* Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella Zofingiensis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, **144**: 287—292
- [26] Hagen G, Braune W, Böhm LO. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus laevis* (volvocales). III. Action as a "sunshade" [J]. *Journal of Phycology*, 1994, **30**: 241—248
- [27] Katsuya A, Hiroaki H, Morio H. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Cochlostrela striolata* var *multistriata* [J]. *Food Chemistry*, 2007, **100**: 656—661
- [28] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, **108**: 111—117
- [29] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Cell Physiology*, 1991, **32**: 1077—1082
- [30] Hagen G, Bonmann G, Braune W. Reversible lowering of modulated chlorophyll fluorescence after saturating flashes in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1994, **144**: 287—292

- coccus lacustris* (Volvocales) at room temperature [J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, **86**: 593—599
- [31] Zlonik IS, Sukenik A, Dubinsky Z. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red apkanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Phycology*, 1993, **29**: 463—469
- [32] Tan S, Cunningham Jr FX, Youmans M, *et al* Cytochrome loss in astaxanthin accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): Comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells [J]. *Journal of Phycology*, 1995, **31**: 897—905

THE ACCUMULATION OF ASTAXANTHIN AND THE RESPONSE OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY IN *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

QIN Shan^{1,2}, LIU Guo-Xiang¹ and HU Zheng-Yu¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract The accumulation of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* under stress conditions was analyzed, and the responses of photosynthetic activity and morphological change of algal cells were observed in the study. Under the temperature of 30°C and illumination of 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, the content of chlorophyll fell to 4.20 mg/L from initial 5.59 mg/L while the content of carotenoid rose up from 0.25 mg/L to 0.44 mg/L in 48 hours. The composition of individual carotenoid was isolated and identified by HPLC/MS analysis. The results showed cells accumulated secondary carotenoids such as echinenone, adonixanthin, canthaxanthin, adonirubin and 3'-hydroxyechinenone and so on, the ketocarotenoid astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) was found as a final product for the synthesis of secondary carotenoid. With the accumulation of secondary carotenoids, the algal coenobium composed of 4 or 8 cells was split up into single or two cells, and the shape of cells changed into swollen and irregular contrast to their initial state. The photosynthetic activity was also influenced by the stress conditions. The photosynthetic rate decreased about 50% in the first 3 hours, and then went up from 19.54 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ to 34.29 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ in the next 9 hours. From 12 hours to 48 hours, the photosynthetic rate experienced a dramatically drop and reduced to nearly 5.21 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$. The respiration rate of algal cells showed an inverse trend, which increased from 18.24 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ to 60.37 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ in the first 24 hours although there was a fluctuation in this course; then it decreased to 38.40 $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}/\text{h}$ in the next 24 hours which was still more higher than that of the control group. The change of chlorophyll fluorescence tended to be similar to that of photosynthetic rate and decreased by 63.9%. These results indicated that the *S. obliquus* cells could biosynthesize astaxanthin by induced conditions. The accumulation of secondary carotenoids led the changes of contents ratio for chlorophyll to carotenoid. The light inhibition enhanced respiration rate and the damage to PS II were all responses to the stress, which also yielded more metabolism products and reactive oxygen species which further engendered the biosynthesis of secondary carotenoids. Simultaneously, stress conditions inhibited the cell division and led the changes of cell morphology. The regulating of photosynthetic activity and carotenoids accumulation were both the physiological mechanism for algal cells to resist the inclement environmental conditions.

Key words *Scenedesmus obliquus*; Stress conditions; Astaxanthin; Photosynthetic activity