

雨生红球藻虾青素积累条件优化研究

李文学,白慧颖,赵宏晶,周润,葛禾敏,陈润梅,崔青曼*,袁春莹
(天津科技大学 海洋与环境学院,天津 300457)

摘要: 虾青素具有很强的抗氧化能力,雨生红球藻在目前已知生物中虾青素含量最高。该文采用响应面法研究温度、pH值、NaCl浓度、钨酸钠浓度对雨生红球藻虾青素积累的影响。结果表明,雨生红球藻虾青素积累的最佳工艺条件为温度 27 ℃、pH 9.6、NaCl 浓度 1.7 g/L、钨酸钠浓度 5.2 mmol/L。各因素对雨生红球藻虾青素积累影响的顺序为 pH 值>温度>钨酸钠浓度>NaCl 浓度。

关键词: 雨生红球藻;虾青素;条件优化;响应面法;钨酸钠

Study on the Conditions Optimization for Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis*

LI Wen-xue, BAI Hui-ying, ZHAO Hong-jing, ZHOU Run, GE He-min,
CHEN Run-mei, CUI Qing-man*, YUAN Chun-ying

(College of Marine & Environment, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Astaxanthin has strong antioxidant capacity. *Haematococcus pluvialis* is the living organism with the highest known astaxanthin content. In this study, the effects of temperature, pH value, NaCl concentration, and sodium tungstate concentration on astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* were studied by response surface methodology. The results showed that the optimum conditions for astaxanthin accumulation in *H. pluvialis* were a temperature of 27 ℃, pH 9.6, NaCl concentration of 1.7 g/L, and sodium tungstate concentration of 5.2 mmol/L. The order of influence on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis* was pH value>temperature> sodium tungstate concentration>NaCl concentration.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; conditional optimization; response surface method; sodium tungstate

引文格式:

李文学,白慧颖,赵宏晶,等. 雨生红球藻虾青素积累条件优化研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(16): 152-156.

LI Wenxue, BAI Huiying, ZHAO Hongjing, et al. Study on the Conditions Optimization for Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis*[J]. Food Research and Development, 2021, 42(16): 152-156.

虾青素具有很强的抗氧化能力,对紫外线引起的皮肤病有较好的治疗效果,对糖尿病引起的眼病也有防治作用,在医药、保健、水产养殖、食品、化妆品等行业得到广泛应用^[1-2]。目前,市场上有合成虾青素和天然虾青素,天然虾青素已被证实对人体健康有益,广泛用于保健食品和生物医学研究领域,合成虾青素通常用作饲料的添加剂和色素^[3-5]。

虾青素广泛存在于细菌、真菌、藻类中^[6]。雨生红球藻是公认的虾青素含量最高的生物,高达 4%,在胁迫条件下积累虾青素^[7-8]。研究发现温度、盐度、光照、氮磷元素等影响雨生红球藻虾青素的积累^[9-10]。沈雄等^[11]发现钨酸钠可以使硝酸还原酶的活性降低,使生物减少对硝态氮的吸收,从而达到氮胁迫的效果。本文采用响应面法探讨温度、pH 值、NaCl 浓度、钨酸钠

基金项目:天津科技大学大学生实验室创新基金(1905A202);大学生创新创业训练项目(202010057149)

作者简介:李文学(1996—),女(汉),硕士研究生,研究方向:海洋生物资源利用。

* 通信作者:崔青曼(1964—),女(汉),教授,博士,研究方向:水产养殖动物营养与饲料。

浓度对雨生红球藻虾青素积累的影响,以期为雨生红球藻的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雨生红球藻:中国科学院水生生物研究所。
改良 MC 培养基(modified chalmers agar):
MgSO₄·7H₂O 100 mg/L、K₂HPO₄ 20 mg/L、CaCl₂·2H₂O 54 mg/L、ZnSO₄·7H₂O 0.008 2 mg/L、MnCl₂·4H₂O 0.004 1 mg/L、Na₂MoO₄·2H₂O 0.038 mg/L、CuSO₄·5H₂O 0.006 mg/L、CoCl₂·6H₂O 0.005 1 mg/L、H₃BO₃ 0.061 mg/L、乙二胺四乙酸二钠 0.019 8 mg/L、KNO₃ 200 mg/L、FeCl₃·6H₂O 0.024 4 mg/L,pH 7.2。

1.2 仪器与设备

YXQ-LS-50SII 立式蒸汽灭菌器、BSG-250 光照培养箱:上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;MIKRO 200R 台式冷冻离心机:德国 Hettich 公司;PHS-25 酸度计:上海仪电科学仪器股份有限公司;LGJ-10 冷冻干燥机:北京华兴科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计

在前期预试验结果的基础上,采用 Design Expert 10.0 软件,进行四因素三水平的响应面设计,4 个因素分别为温度(A)、pH 值(B)、NaCl 浓度(C)和钨酸钠浓度(D),以虾青素含量(Y)为响应值,试验因素及水平见表 1。

表 1 响应面试验因素及水平

Table 1 Experimental factors and levels of response surface methodology

水平	A 温度/℃	B pH 值	C NaCl 浓度/(g/L)	D 钨酸钠浓度/(mmol/L)
-1	25	8	0	0
0	28	10	2.5	4
1	31	12	5.0	8

1.3.2 虾青素提取与含量的测定

取处于对数生长期的雨生红球藻,进行雨生红球藻虾青素积累条件优化试验,7 d 后,按照文献[12]方法测定虾青素含量。取 20 mL 藻液离心,沉淀洗涤 2 次,用 5%KOH 和 30%甲醇去除叶绿素,研磨,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)萃取(65 ℃水浴),离心,上清液重复提取,直至沉淀呈白色。上清液在 492 nm 处测定吸光值,根据标准曲线方程计算虾青素含量: $Y=219.43X-0.001$, $R^2=0.999\ 6$ (Y 为 492 nm 处吸光值;X 为虾青素含量,mg/L)。

1.4 数据处理

采用 Design-Expert10.0 软件进行响应面设计和绘图。

2 结果与分析

2.1 响应面试验结果与方差分析

采用四因素三水平的响应面设计,共 29 个处理组,以虾青素含量(Y)为响应值,方案及结果见表 2。

表 2 试验方案及结果

Table 2 Experimental scheme and results

试验组	A 温度	B pH 值	C NaCl 浓度	D 钨酸钠浓度	虾青素含量/(mg/L)
1	0	0	-1	-1	5.05
2	0	0	1	1	5.4
3	0	0	1	-1	5.25
4	0	0	0	0	6.73
5	1	0	1	0	5.77
6	0	0	-1	1	6.44
7	0	-1	1	0	5.78
8	0	1	0	1	5.02
9	0	0	0	0	6.86
10	-1	-1	0	0	5.61
11	1	-1	0	0	5.17
12	0	0	0	0	6.83
13	-1	0	-1	0	6.18
14	1	0	0	1	5.7
15	-1	0	0	-1	6
16	0	-1	0	1	5.79
17	0	1	1	0	5.17
18	-1	1	0	0	5.23
19	0	-1	0	-1	5.31
20	-1	0	1	0	5.78
21	0	0	0	0	6.37
22	1	0	-1	0	5.28
23	1	1	0	0	5.05
24	0	-1	-1	0	6.15
25	0	1	-1	0	5.12
26	1	0	0	-1	5.03
27	0	1	0	-1	5
28	-1	0	0	1	6.21
29	0	0	0	0	6.38

根据表 2 数据结果,选用 Design-Expert 10.0 软件拟合,得到拟合方程: $Y=6.63-0.25A-0.27B-0.089C+0.24D+0.065AB+0.224C+0.12AD+0.10BC-0.12BD-0.31CD-0.46A^2-0.79B^2-0.42C^2-0.56D^2$ 。对回归方程 Y 进行方差分析,分析结果见表 3。

根据方差分析结果可知,该拟合方程具有极显著性($P<0.01$),方差失拟项不显著($P>0.05$),模型中 $R^2=0.901\ 6$, $R^2_{adj}=0.803\ 1$,测量精度为 $9.186\times 4^{[13]}$,说明结果中有 90.16%符合该模型,该方程拟合度良好^[14]。由显著性检验结果可知,温度($P<0.01$)、pH 值($P<0.01$)和

表3 拟合曲线模型方差分析结果

Table 3 ANOVA results of the fitted curve model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	8.96	14	0.64	9.16	<0.000 1
A 温度	0.76	1	0.76	10.80	0.005 4
B pH值	0.86	1	0.86	12.36	0.003 4
C NaCl 浓度	0.095	1	0.095	1.37	0.262 2
D 钨酸钠浓度	0.71	1	0.71	10.17	0.006 6
AB	0.017	1	0.017	0.24	0.630 5
AC	0.20	1	0.20	2.83	0.114 5
AD	0.053	1	0.053	0.76	0.399 0
BC	0.044	1	0.044	0.63	0.440 3
BD	0.053	1	0.053	0.76	0.399 0
CD	0.38	1	0.38	5.50	0.343 0
A ²	1.38	1	1.38	19.74	0.000 6
B ²	4.02	1	4.02	57.54	<0.000 1
C ²	1.12	1	1.12	16.07	0.001 3
D ²	2.05	1	2.05	29.36	<0.000 1
残差	0.98	14	0.070		
失拟项	0.75	10	0.075	1.28	0.437 5
纯误差	0.23	4	0.058		
校正总和	9.94	28			

注: $P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著。

钨酸钠浓度($P < 0.01$)对雨生红球藻虾青素积累线性效应极显著,而 NaCl 浓度对雨生红球藻虾青素积累影响不显著($P > 0.05$)。二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 有极显著影响($P < 0.01$)。模型中交互项 CD 、 AB 、 AC 、 AD 、 BC 、 BD 影响均不显著($P > 0.05$)。根据 F 值大小,确定对雨生红球藻虾青素积累影响的顺序为 $B > A > D > C$ 。

2.2 响应面图和等高线图分析

方差分析显示回归方程拟合度良好,以回归方程为基础,采用 Design-Expert 10.0 软件绘制各交互作用对雨生红球藻虾青素积累影响的响应面与等高线图,结果见图 1~图 6。

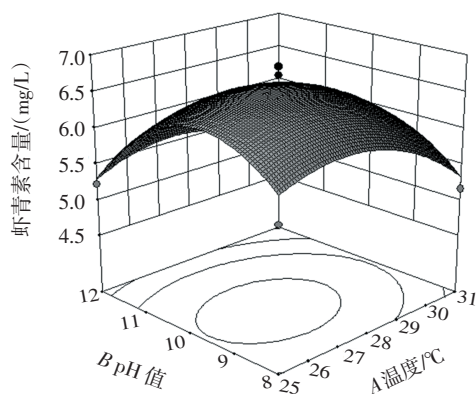


图1 温度和 pH 值交互作用对雨生红球藻虾青素积累的影响
Fig.1 The effect of the interaction of temperature and pH value on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*

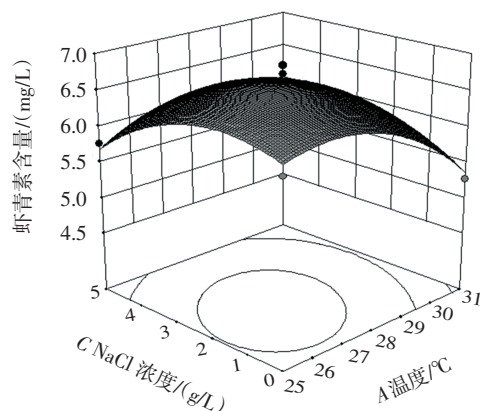


图2 温度和 NaCl 浓度交互作用对雨生红球藻虾青素积累的影响
Fig.2 The interaction of temperature and NaCl concentration on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*

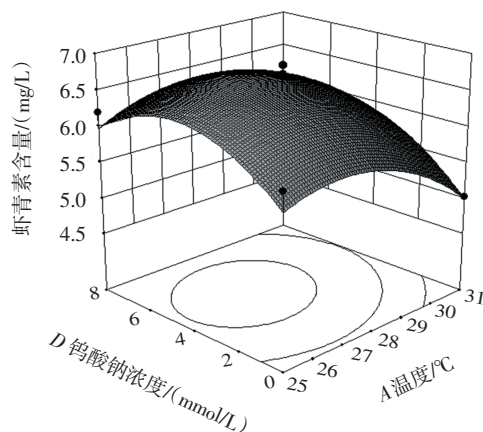


图3 温度和钨酸钠浓度交互作用对雨生红球藻虾青素积累的影响
Fig.3 The interaction of temperature and sodium tungstate concentrations on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*

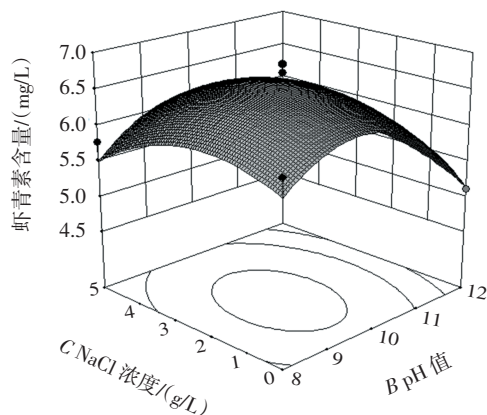


图4 pH 值和 NaCl 浓度交互作用对雨生红球藻虾青素积累的影响

Fig.4 The interaction of pH value and NaCl concentration on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*

从图 1 可以看出,随着温度和 pH 值的升高,虾青素含量也随之增加,当温度和 pH 值升高到一定程度时,虾青素含量达到最大值,温度和 pH 值继续升高时,虾青素含量又会降低,这说明当温度和 pH 值取得

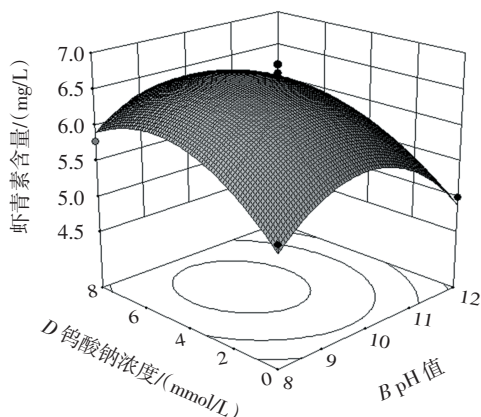


图5 pH值和钨酸钠浓度交互作用对雨生红球藻虾青素积累的影响

Fig.5 The effect of interaction between pH value and sodium tungstate concentration on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*

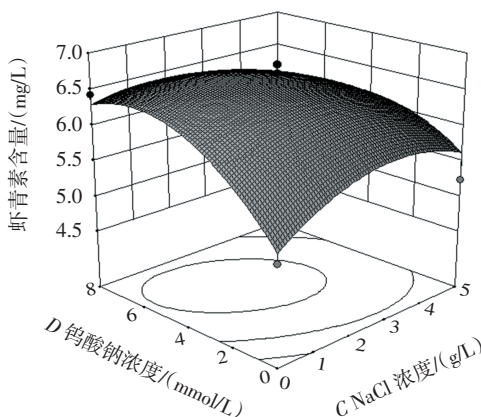


图6 NaCl浓度和钨酸钠浓度交互作用对雨生红球藻虾青素积累的影响

Fig.6 The effect of the interaction of NaCl concentration and sodium tungstate concentration on the accumulation of astaxanthin in *H. pluvialis*

某个适中值时,虾青素含量达到最大值。同理,图2~图6的因素和响应值之间也存在类似的规律。

通过 Design-Expert 10.0 分析优化,并结合实际进行调整,确定雨生红球藻虾青素积累的最佳工艺条件:温度 27℃、pH 9.6、NaCl 浓度 1.7 g/L、钨酸钠浓度 5.2 mmol/L,此时虾青素含量预测值为 6.8 mg/L。经3次验证试验,雨生红球藻积累虾青素(6.82±0.118) mg/L,与预测值相符,说明该拟合方程能较好地预测雨生红球藻虾青素的积累情况。

3 讨论

雨生红球藻受到生物或环境因素等胁迫后,鞭毛退化,由游动细胞转变为不动细胞,细胞壁变厚,体内色素发生变化,诱导类胡萝卜素合成^[15]。陶云莹等^[16]研究指出,温度对雨生红球藻积累虾青素有显著影响,

27℃下虾青素积累效果最好,31℃条件下虾青素积累效果下降,本研究得到相似的结果,雨生红球藻虾青素积累的最佳温度为 27℃。pH 值对雨生红球藻的生长和虾青素的积累有较大影响,pH 值过高会使雨生红球藻细胞贴壁或沉底,生长速率降低,积累虾青素^[17-18],本试验得到最优 pH 值为 9.6。李艳国等^[19]通过单因素试验,指出 NaCl 可以促进虾青素的积累,0.4%浓度的 NaCl 对虾青素积累效果最佳,虾青素含量平均值为 3.1 mg/L。本研究发现,雨生红球藻虾青素积累的最佳 NaCl 浓度为 1.7 g/L,虾青素含量平均值为 6.82 mg/L,推测可能是多因素交互作用引起的。有研究表明,营养匮乏会激发雨生红球藻的防御机制,开始积累虾青素,氮胁迫会促进虾青素的合成^[20]。硝酸还原酶是硝酸盐还原过程中的关键酶和限速酶,影响植物对硝态氮还原及转化能力^[21]。钨酸钠作为硝酸还原酶抑制剂,能够使植物细胞实现氮限制^[22]。本研究中,钨酸钠浓度对雨生红球藻虾青素的积累具有极显著影响,最适浓度为 5.2 mmol/L。

4 结论

采用响应面法对雨生红球藻虾青素积累的条件进行优化,得到虾青素积累的最佳工艺条件为温度 27℃、pH 9.6、NaCl 浓度 1.7 g/L、钨酸钠浓度 5.2 mmol/L,4 个因素对雨生红球藻虾青素积累影响的顺序为 pH 值>温度>钨酸钠浓度>NaCl 浓度。本研究为雨生红球藻的进一步开发利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] SHAH M M R, LIANG Y M, CHENG J J, et al. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 531.
- [2] LI H, LIU J G. Effects of defatted *Haematococcus pluvialis* meal (DHPM) supplementation on the growth performance, and the carotenoid content and composition in the rotifer (*Brachionus plicatilis*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 34-40.
- [3] WAN M X, ZHANG J K, HOU D M, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 276-283.
- [4] NIU T T, ZHOU J W, WANG F, et al. Safety assessment of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Acute toxicity, genotoxicity, distribution and repeat-dose toxicity studies in gestation mice[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2020, 115: 104695.
- [5] ZHANG L T, ZHANG C H, LIU J G, et al. A strategy for stimulating astaxanthin and lipid production in *Haematococcus pluvialis* by ex-

- ogenous glycerol application under low light[J]. Algal Research, 2020, 46: 101779.
- [6] FANG N, WANG C K, LIU X F, et al. De novo synthesis of astaxanthin: From organisms to genes[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 92: 162–171.
- [7] CHOI Y Y, HONG M E, SIM S J. Enhanced astaxanthin extraction efficiency from *Haematococcus pluvialis* via the cyst germination in outdoor culture systems[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 2275–2280.
- [8] 崔静, 李涛, 丁巍, 等. 胁迫条件下褪黑素诱导雨生红球藻虾青素合成[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(6): 15–21.
- CUI Jing, LI Tao, DING Wei, et al. Induced synthesis of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by melatonin under stress[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(6): 15–21.
- [9] 张广伦, 肖正春, 张锋伦, 等. 雨生红球藻中虾青素的研究与应用[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(2): 72–77.
- ZHANG Guanglun, XIAO Zhengchun, ZHANG Fenglun, et al. Study and application of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2019, 38(2): 72–77.
- [10] 陈家宇, 李嘉仪, 窦勇, 等. 光照、氮素和高盐胁迫对雨生红球藻积累虾青素的影响研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(12): 75–83.
- CHEN Jiayu, LI Jiayi, DOU Yong, et al. Research on effects of light, nitrogen and high salt stress on accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*[J]. Food Research and Development, 2020, 41(12): 75–83.
- [11] 沈雄, 焦媛媛, 朱葆华, 等. 培养基限氮和添加钨酸钠对微拟球藻脂肪酸组成的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2011(4): 78–82.
- SHEN Xiong, JIAO Yuanyuan, ZHU Baohua, et al. Effect of nitrogen deficiency and sodium tungstate in medium on the fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2011(4): 78–82.
- [12] 陈俊琳. 碳源对雨生红球藻生长和虾青素积累的影响及培养条件的优化[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- CHEN Junlin. The impact of carbon source on *Haematococcus pluvialis* growth, astaxanthin accumulation and optimization of culture conditions[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [13] 崔帅, 何博, 黄定强. 响应曲面法优化火龙果中花青素的提取研究[J]. 化学世界, 2020, 61(11): 767–771.
- CUI Shuai, HE Bo, HUANG Dingqiang. Surfactant optimization of extraction of procyanidins from dragon fruit by response surface methodology[J]. Chemical World, 2020, 61(11): 767–771.
- [14] 霍达, 李琳, 张霞, 等. 玉竹多糖的提取工艺优化、结构表征及抗氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 200–208.
- HUO Da, LI Lin, ZHANG Xia, et al. Optimization of extraction, structure characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Polygonatum odoratum*(mill.) druce[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 200–208.
- [15] 晋慧. 严紧反应在藻类应对环境胁迫中的调控作用[D]. 北京: 清华大学, 2017.
- JIN Hui. Regulatory role of stringent response in algal responses against environmental stresses[D]. Beijing: Tsinghua University, 2017.
- [16] 陶云莹, 王巧哈, 赫勇, 等. 光照强度和温度对雨生红球藻生长、虾青素及内源脱落酸积累的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2016, 46(8): 28–36.
- TAO Yunying, WANG Qiaohan, HE Yong, et al. Effects of light intensity and temperature on the growth and accumulation of astaxanthin and endogenous abscisic acid(ABA) of *Haematococcus pluvialis* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(8): 28–36.
- [17] 张春辉. 雨生红球藻生长及虾青素积累的优化与调控[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2016.
- ZHANG Chunhui. Optimization and regulation of growth and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [D]. Qingdao: University of the Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences), 2016.
- [18] 王旋, 管斌, 孔青, 等. 利用控 pH 流加培养法提高雨生红球藻的生物量及虾青素产量[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(2): 120–124.
- WANG Ni, GUAN Bin, KONG Qing, et al. Enhancing biomass of *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production by pH-controlled fed-batch culture[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2): 120–124.
- [19] 李艳国, 杨柳, 徐年军, 等. 雨生红球藻 ZL-1 生长和虾青素积累条件优化[J]. 生态科学, 2018, 37(1): 20–26.
- LI Yanguo, YANG Liu, XU Nianjun, et al. Optimization of growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* ZL-1[J]. Ecological Science, 2018, 37(1): 20–26.
- [20] OROSA M, FRANQUEIRA D, CID A, et al. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(3): 373–378.
- [21] 王芬, 岳玉金, 李敏, 等. 钨酸钠对苹果幼苗 ^{15}N 吸收利用、 ^{13}C 积累及果实品质的影响[J]. 应用生态学报, 2020, 31(1): 182–188.
- WANG Fen, YUE Yujin, LI Min, et al. Effects of Na_2WO_4 on ^{15}N absorption and utilization, ^{13}C accumulation of apple seedling, and fruit quality[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(1): 182–188.
- [22] 杨荣, 邱炜红, 王朝辉, 等. 硝酸还原酶抑制剂钨酸钠对油菜硝酸盐氮积累的影响[J]. 植物生理学报, 2012, 48(1): 51–56.
- YANG Rong, QIU Weihong, WANG Zhaohui, et al. Effects of nitrate reductase inhibitor Na_2WO_4 on nitrate accumulation in oilseed rape [J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(1): 51–56.

加工编辑:王艳

收稿日期:2020-11-12