

# 雨生红球藻合成虾青素过程中 分泌铵离子的研究

董庆霖<sup>1</sup>, 邢向英<sup>1</sup>, 赵学明<sup>2</sup>

(1. 河北工业大学化工学院, 天津 300130; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要:**雨生红球藻在缺氮(NF)的条件下,随着虾青素的合成,肽链内切酶(EP)的活性上升而蛋白质含量下降,天冬酰胺含量在前 4 天增加然后又减少,铵离子浓度则持续上升。相比之下,在氮充足(NR)的培养液中,藻细胞不合成虾青素,蛋白质和天冬酰胺的含量以及 EP 的活性基本稳定,培养液中也检测不到铵离子。上述结果表明:①降解的蛋白质为虾青素的合成提供了碳源,②EP 参与了蛋白质的降解反应,③为避免铵离子的毒害作用,蛋白质降解所产生的部分氨临时贮存在天冬酰胺中,而其余的则分泌到细胞外。

**关键词:**铵离子; 虾青素; 肽链内切酶; 雨生红球藻

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)12-0041-03

## Study on concomitant $\text{NH}_4^+$ secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis*

DONG Qing-lin<sup>1</sup>, XING Xiang-ying<sup>1</sup>, ZHAO Xue-ming<sup>2</sup>

(1. School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** With the onset of astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under the nitrogen-free condition (NF), Endopeptidase (EP) activities increased along with the decreasing of protein. Asparagine rose significantly during the first 4 days, but decreased after that time. While, ammonium concentration in the broth increased continuously through out the cultivation period. By contrast, in nitrogen-repletion culture (NR), the contents of protein and asparagine as well as EP activity maintained relatively constant, no astaxanthin and extracellular ammonium were detected. These results strongly suggest that: ① the degraded protein served as carbon source, to some extent, for the biosynthesis of astaxanthin; ② endopeptidase was involved in the degradative process; ③ for detoxification, part of the ammonium generated by the protein degradation was transiently stored in asparagine, while the rest of which was expelled into the culture broth.

**Key words:** ammonium; astaxanthin; endopeptidase; *Haematococcus pluvialis*

雨生红球藻在缺氮和强光照条件下能够大量合成并积累高附加值的虾青素(2 500 美元/kg)<sup>[1]</sup>。已有研究结果表明雨生红球藻在合成虾青素的过程中伴随着生理或生化状态的变化,如蛋白质和叶绿素含量下降<sup>[2]</sup>、脂类和碳水化合物含量增加<sup>[3]</sup>、光合作用效率下降和细胞色素 *f* 缺失<sup>[4]</sup>等。其中蛋白质含量的下降具有重要的意义,因为它在细胞的代谢活动中发挥着关键性的作用。然而目前的研究对此关注的很少,许多问题尚不明确:第一,蛋白质是如何降解的;第二,蛋白质降解过程中是否产生氨,如果产生,那么藻细胞如何避免其毒害作用。为找到这 2 个问题的答案,笔者比较研究了在缺氮和氮充足条件下雨生红球藻细胞内蛋白质、天冬酰胺和虾青素的含量、肽链内切酶(EP)的活性以及培养液

中铵离子浓度的变化。

## 1 实验部分

### 1.1 藻种和培养条件

雨生红球藻购自中科院水生生物研究所。预培养:将 10 mL 藻种接种于装有 50 mL BBM(Bold's Basic Medium)培养基<sup>[5]</sup>的 500 mL 锥形瓶中,置于光控摇床内培养(23.8℃),光照强度(以光子计)60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,转速 110 r/min。

研究实验:将预培养 6 天的藻种离心收集(10 000 g, 5 min)并用去离子水清洗两次后,重新接种于无氮 BBM 培养基(NF)和完全 BBM 培养基(NR)中,置于光照培养箱内(25℃)进行培养,光照强度分别为 360  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

收稿日期:2006-09-11

基金项目:国家自然科学基金(20536040);国家基础研究重点基金(2003CB716003)

作者简介:董庆霖(1964-),男,博士,副教授,主要研究方向为藻类生理及代谢工程, qldong@tju.edu.cn;赵学明(1946-),硕士,教授,博士生导师,从事代谢工程研究,通讯联系人, 022-27406770。

## 1.2 分析方法

生物量和虾青素的分析方法与笔者以前的实验相同,见文献[6]。蛋白质和天冬酰氨酸的分析分别按 Bradford<sup>[7]</sup>和 Genix<sup>[8]</sup>的方法进行。EP活性根据 James<sup>[9]</sup>的方法确定。铵离子采用分光光度法<sup>[10]</sup>检测。

## 2 实验结果

### 2.1 生物量

NR 中的生物量在前3天小幅度上升(图1),第4天进入指数生长,生物量迅速提高。实验结束时(细胞干质量)达到 1.98 g/L,几乎是 NF 的2倍。相比之下,NF 中的生物量只在前4天略有上升(3.2%),然后就开始缓慢下降。

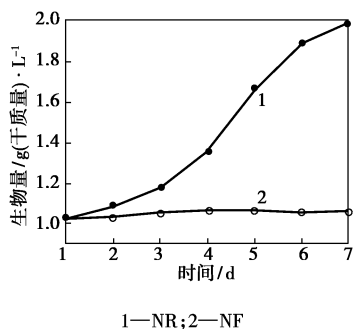


图1 缺氮和氮充足条件下的生物量变化曲线

### 2.2 虾青素

与生物量的变化不同,在整个培养过程中 NR 中没有虾青素积累(图2)。与此相比,NF 中虾青素含量持续增加,实验结束时达到 31.2 mg/g(细胞干质量)。

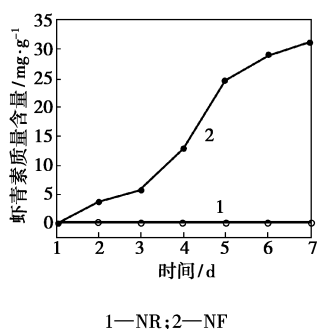


图2 缺氮和氮充足条件下虾青素的变化曲线

### 2.3 蛋白质

如图3所示,在缺氮的条件下(NF),雨生红球藻细胞内中蛋白质含量自实验一开始就快速下降,实验结束时降至 202.2 mg/g(细胞干质量),仅为初始值的 68.2%。而在氮充足(NR)的条件下中蛋白质含量变化很小,整个培养过程中基本保持稳定。

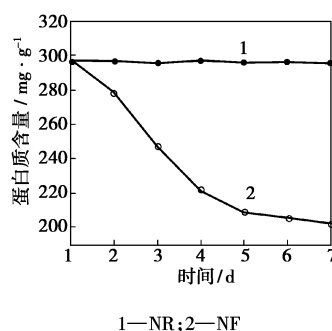


图3 缺氮和氮充足条件下蛋白质的变化曲线

### 2.4 肽链内切酶活性

NF 中肽链内切酶(EP)的活性在实验一开始就迅速提高(图4),第5天达到最高值 3.66  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$ (针对鲜质量),然后开始缓慢下降。与此相比,NR 中 EP 活性非常低,整个实验过程中几乎检测不到。

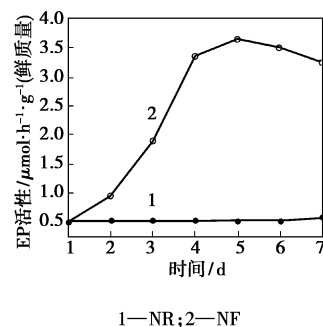


图4 缺氮和氮充足条件下肽链内切酶活性的变化曲线

### 2.5 天冬酰氨酸

如图5所示,NF 中的天冬酰氨酸含量在前4天急剧上升,提高了31倍,达到 88.9  $\mu\text{mol}/\text{g}$ (干质量)。然而有趣的是此后其含量又迅速下降,实验结束时几乎消失。与此不同,NR 中天冬酰氨酸含量变化很小,基本稳定在 1.36  $\mu\text{mol}/\text{g}$ (干质量)左右。

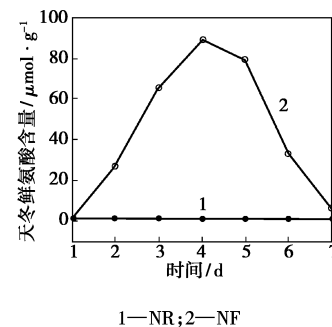


图5 缺氮和氮充足条件下天冬酰氨酸的变化曲线

### 2.6 铵离子浓度

NR 在整个培养过程中没有检测到铵离子

(图6)。而NF中铵离子浓度在前3天缓慢上升,然后迅速提高。5天后,其浓度基本上达到稳定状态。

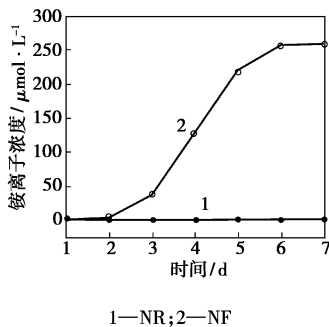


图6 缺氮和氮充足条件下铵离子的变化曲线

### 3 讨论

结合图1、图2和图3,在缺氮的条件下雨生红球藻的生长被抑制,其细胞内的虾青素含量随着蛋白质含量的下降而上升。相比之下在NR中,藻细胞没有合成虾青素,生物量持续增加,蛋白质含量也相对稳定。这些数据表明氮缺乏和强光照是诱导虾青素合成的原因。众所周知,高等植物和藻类细胞内的蛋白质的周转(turn over)速率非常高,即不断地合成和降解,而蛋白质的合成需要充足的氮。在NF中强光照射促进了蛋白质的降解,然而其合成因缺氮而被抑制,因此导致蛋白质含量迅速下降。另一方面,由于缺氮还降低了雨生红球藻光合作用效率<sup>[4]</sup>,造成细胞内的“碳饥饿”,即二氧化碳固定量减少,因此降解的蛋白质可能作为替代碳源(至少一部分)参与虾青素的合成。

由图2和图3可以看出,NR中EP活性很低,而蛋白质含量相对稳定。NF中EP活性极高,相应蛋白质含量迅速下降。因此可以推断雨生红球藻合成虾青素过程中蛋白质含量的下降主要是由肽链内切酶催化的选择性降解反应造成的,这与虾青素合成过程中藻细胞保持完整(未解体)的事实相符。

蛋白质降解过程中会产生大量的氨,而氨是一种光合作用电子传递链的解耦联剂,会对雨生红球藻细胞造成伤害,这就产生了一个问题,即雨生红球藻如何避免其毒害作用。由图3和图5中的数据可以看出,NF中天冬酰氨酸的含量在前4天随着蛋白质含量的下降而上升,而NR中蛋白质和天冬酰氨酸的含量都保持相对稳定。在高等植物的研究中发现细胞代谢过程中产生的氨可以将储存于天冬酰氨酸中<sup>[11]</sup>。与此相似,图3和图5中数据表明雨生红球藻同样可以将蛋白质降解过程中产生的氨贮存于天冬酰氨酸中。另一方面与天冬酰氨酸在前4天的

积累不同,NF中的天冬酰氨酸在4天后开始迅速下降。由于培养液中没有检测到天冬酰氨酸(数据未列出),因此原来积累的天冬酰氨酸已被氧化。造成这一现象的原因可能是由缺氮和强光照导致的“碳饥饿”在4天后已非常严重,为了生存,天冬酰氨酸也作为替代碳源被氧化和利用以维持藻细胞基本的代谢功能。

NR中没有检测到铵离子,而NF中的铵离子显然是雨生红球藻细胞代谢活动的结果,因为在初始培养基中未添加任何氮源。Aflalo<sup>[12]</sup>曾报道除草剂可以诱导雨生红球藻合成虾青素并分泌铵离子。然而在本实验中没有添加除草剂或其他的生长抑制剂,雨生红球藻细胞在合成虾青素的过程中同样向胞外分泌铵离子。这一结果表明雨生红球藻细胞贮存铵离子的能力有限,蛋白质降解所产生的氨除部分可临时储存于天冬酰氨酸中外,其余部分被分泌到细胞外。

总体来讲,基于上述实验结果可得到如下结论:雨生红球藻在虾青素合成过程中蛋白质的降解是在肽链内切酶催化作用下进行的。降解过程中产生的碳骨架被用作碳源参与虾青素的合成或其他的代谢活动,而产生的氨在一定的程度上以天冬酰氨酸的形式贮存,其余的氨则被直接分泌到细胞外以避免其毒害作用。

### 参考文献

- [1] Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition[J]. Trends in Biotechnol, 2003, 21: 210 - 216.
- [2] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Plant Cell Physiol, 1991, 32: 1077 - 1082.
- [3] Schoefs B, Rmiki N E, Rachadi J, et al. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids[J]. FEBS Lett, 2001, 500: 125 - 128.
- [4] Tan S, Cunningham F X, Youmans J M, et al. Cytochrome floss 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]. J Phycol, 1995, 31: 897 - 905.
- [5] Bischoff H W, Bold H C. *Phycological Studies*[M]. Austin: University of Texas Publication, 1963.
- [6] Dong Q L, Zhao X M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*[J]. Catalysis Today, 2004, 98: 537 - 544.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248 - 254.

即  $I_m = \pi I_0 = 3.14 I_0$  为该电源正向导通时的最大瞬时电流。

### 1.3 电解液配制

用天平分别称取 20 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、15 g KCl 加入到烧杯中,加蒸馏水 400 mL。用小烧杯配置 0.1 mol/L 的硫酸和 0.1 mol/L 的硼酸混合液,用滴定管将混合酸溶液滴少量入  $\text{CuSO}_4$  溶液中,直到 pH 计测得溶液 pH 在 4.5 ~ 5.5 为止。

### 1.4 电解过程

以非对称交流电为电解电源(交、直流电流比为 3),分别以直径为 2.5、3.5 mm 的铜棒及宽为 6 mm 的铜片作为阴阳极(阴阳极材料选择一样),阴阳极间距 8 cm,电极电压 40 V,室温下电解。

在电解通电 1 ~ 2 s 后可以发现阳极不断溶解、黑色铜粉迅速在阴极沉积并伴随有大量气泡,反应十分迅速。大约反应 15 min 后,在阴极上生成厚厚的一层铜粉,反应减慢。将铜粉刮落后,继续通电,反应又将迅速进行。为了加快反应速度,一般每 10 min 刮板一次。获得的铜粉经洗涤、干燥后得到粉末产物。

用 DMAX-3CX 型 X 射线衍射仪检测纳米粉体的相组成和晶粒大小,用 H-900 型透射扫描电镜观测纳米粉体的大小和形貌。

## 2 结果与讨论

应用 XRD 对样品进行了表征,用宽为 6 mm 的铜片及直径 2.5、3.5 mm 的铜棒为电极制得的试样分别记为试样  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 。图 1 显示了试样  $A_2$  的 XRD 衍射谱。

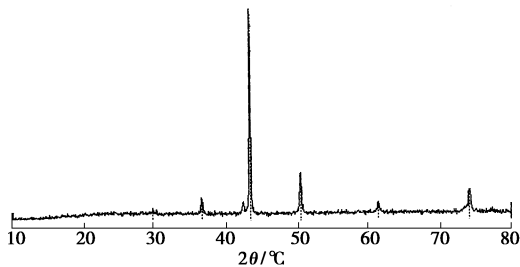


图 1 纳米铜棒的 X 射线衍射图  
对照标准图,确定产物为 Cu 及微量  $\text{Cu}_2\text{O}$ 。从

图可以看到铜的特征峰明显,且表征出很好的结晶性。铜的特征衍射峰在  $2\theta = 43.4^\circ$ 、 $50.6^\circ$  和  $74.2^\circ$ ,分别对应立方晶系铜的(111)、(200)及(220)晶面。

运用 TEM 对样品进行进一步的表征。图 2(a) 为试样  $A_1$  的照片,可以看出铜粉为粘连的球形,粒径在 150 ~ 200 nm,结晶度好,粉体之间团聚较严重。图 2(b) 为试样  $A_3$  的 TEM 照片,可以看出纳米铜粉体有多种形态,粒径在 50 nm 左右,有成棒状趋势,团聚趋势不如  $A_1$  严重。图 2(c)、(d) 为试样  $A_3$  的 TEM 照片,可以采用大直径铜棒作电极,制得的纳米铜呈棒状,棒长在 0.5 ~ 0.7  $\mu\text{m}$ ,长径比大,结晶很好且分散性也很好。

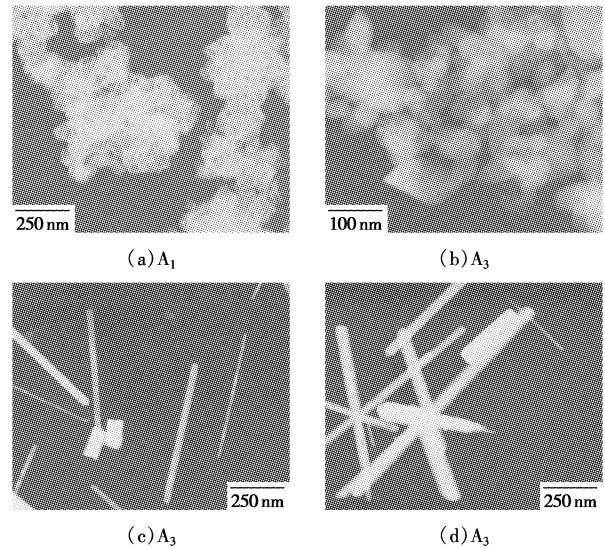


图 2 纳米铜的 TEM 照片

### 参考文献

- [1] Panigrahi S, Kundu S, Ghosh S K, *et al.* Selective one-pot synthesis of copper nanorods under surfactantless condition[J]. *Polyhedron*, 2006, 25: 1263 - 1269.
- [2] Heino P, Ristolainen E. Dislocation initiation in copper A molecular dynamics study[J]. *Nanostructured Materials*, 1999, 11(5): 587 - 594.
- [3] 朱协彬,段学臣. 超声电解法制备纳米铜粉的研究[J]. *上海有色金属*, 2004, 25: 97 - 99.
- [4] Hibbert D B, Melrose J R. Copper electrodeposits in paper support[J]. *Phys Rev A*, 1998, 38(2): 1036 - 1048.
- [5] 付国民. 非对称交流电源在金电解生产中的应用[J]. *黄金*, 2005 (5): 37 - 39. ■
- [6] King G A, Woollard D C, Irving D E, *et al.* Physiological changes in asparagus spear tips after harvest[J]. *Physiol Plant*, 1990, 80: 393 - 400.
- [7] Brouquisse R, James F, Pradet A, *et al.* Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips[J]. *Planta*, 1992, 188: 384 - 395.
- [8] Aflalo C, Bing W, Zarka A, *et al.* Effect of the herbicide glufosinate (BASTA) on astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Z Naturforsch*[J]. 1999, 54: 49 - 54. ■

(上接第 43 页)

- [8] Genix P, Bligny R, Martin J B, *et al.* Transient accumulation of asparagine in sycamore cells after a long period of sucrose starvation[J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 717 - 722.
- [9] James F, Brouquisse R, Pradet A, *et al.* Changes in proteolytic activities in glucose-starved maize root tips: Regulation by sugars[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1993, 31: 845 - 856.