

叔丁基对羟基茴香醚对雨生红球藻虾青素积累和 *psy* 基因表达量的影响

丁 巍, 尚敏敏, 赵 鹏, 徐军伟, 李 涛, 余旭亚*
(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘 要: 研究胁迫培养条件下, 在对数生长期的雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis* LUGU 藻液中添加不同质量浓度叔丁基对羟基茴香醚 (butyl hydroxyanisole, BHA) 对其影响, 并分别对细胞生物量、虾青素积累量以及八番茄红素合成酶 *psy* 基因表达量进行了测定。结果表明, BHA 质量浓度为 2 mg/L 时, 虾青素积累量显著提高, 最大含量可达 29.03 mg/g, 是对照组 (14.30 mg/g) 的 2.03 倍。而在相同的 BHA 诱导条件下, 初始藻细胞的不同生长状态对细胞生长及虾青素合成也有很大影响: 处于对数后期 (14 d) 的细胞其最大虾青素含量可达 29.3 mg/g, 分别是对数前期、中期和稳定期的 2.93、1.01 倍和 1.73 倍。实时荧光定量聚合酶链式反应分析显示, 虾青素合成关键基因 *psy* 的表达受 BHA 的影响, 当对数后期 (14 d) 添加 2 mg/L BHA 时, *psy* 基因相对表达水平为对照 9.2 倍。结果表明, 适当质量浓度 BHA 不仅能够显著提高虾青素合成关键酶基因 *psy* 的表达水平, 并且明显促进了微藻细胞内虾青素积累量, 为虾青素产业化提供了一种有效的策略。

关键词: 叔丁基对羟基茴香醚; 雨生红球藻; 虾青素; 不同生长状态; *psy* 基因

Effects of Butyl Hydroxyanisole on Astaxanthin Accumulation and the Transcriptional Expression Levels of Phytoene Synthase (*psy*) Gene of *Haematococcus pluvialis* LUGU

DING Wei, SHANG Minmin, ZHAO Peng, XU Junwei, LI Tao, YU Xuya*

(Faculty of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Owing to its role as an important source for astaxanthin accumulation, *Haematococcus pluvialis* has gained more and more attention in recent years. In this research, we examined the effects of butyl hydroxyanisole (BHA) at different concentrations on the astaxanthin production under unfavorable conditions during the logarithmic growth phase of *H. pluvialis* LUGU. The results demonstrated that 2 mg/L BHA was optimal for maximum astaxanthin production, which reached 29.03 mg/g, 2.03 times higher than that of the control (14.30 mg/g). Moreover, under the same condition of BHA induction, initial algal cells with different growth status also had a great influence on astaxanthin synthesis. The accumulation of astaxanthin in the algal cells in the late exponential growth phase (14 d) reached the highest level of 29.3 mg/g, which was 2.93, 1.01 and 1.73 times higher those in the early and middle exponential, and stationary growth phases, respectively. qRT-PCR analysis shows that the transcriptional levels of phytoene synthase (*psy*) gene induced by 2 mg/L BHA was 9.2 times higher than that of control. These findings showed that appropriate concentration of BHA could not only increase the transcription of *psy* gene, but also could obviously promote intracellular astaxanthin accumulation in microalgae, providing an effective strategy for the industrialization of astaxanthin.

Key words: butyl hydroxyanisole (BHA); *Haematococcus pluvialis* LUGU; astaxanthin; different growth phases; *psy* gene
DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706010

中图分类号: Q946.889

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 06-0062-06

引文格式:

丁巍, 尚敏敏, 赵鹏, 等. 叔丁基对羟基茴香醚对雨生红球藻虾青素积累和 *psy* 基因表达量的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 62-67. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706010. <http://www.spkx.net.cn>

DING Wei, SHANG Minmin, ZHAO Peng, et al. Effects of butyl hydroxyanisole on astaxanthin accumulation and the transcriptional expression levels of phytoene synthase (*psy*) gene of *Haematococcus pluvialis* LUGU[J]. Food Science, 2017, 38(6): 62-67. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706010. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-04-21

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (21266013)

作者简介: 丁巍 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微藻资源开发。E-mail: dingweikmust@163.com

*通信作者: 余旭亚 (1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物炼制。E-mail: xuya_yu@163.com

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是绿藻门、绿藻纲、团藻目、红球藻科、红球藻属的一种淡水单细胞绿藻^[1], 在胁迫条件下藻细胞逐渐变大并积累虾青素^[2], 含量最高可达其细胞干质量的4%以上^[3-4], 产量明显优于其他已知的虾青素来源^[5-7]。雨生红球藻内积累的虾青素是一种类胡萝卜素, 具有较强的氧自由基清除能力, 其抗氧化性高于其他类胡萝卜素10倍、VE 550倍, 被誉为“超级氧化剂”^[8-10], 在医药、食品和化妆品等行业具有极高的开发潜力和经济价值^[11-13]。近年来由于医药、化妆品等行业的飞速发展, 使得虾青素的市场需求量急剧增加, 这与目前虾青素生产中存在产量低、生产成本低等问题相矛盾, 因此, 采取有效措施提高雨生红球藻虾青素的产量是解决这一问题的关键和研究热点。

有研究表明, 雨生红球藻细胞形态主要有两种: 营养细胞(生长阶段)和包囊细胞(虾青素积累阶段)^[14], 而营养细胞的不同状态对形态和抗性方面有重要的影响^[15], 一般, 营养细胞生长分为对数前期、对数中期、对数后期和稳定期4个时期。因此, 在不同时期添加诱导子也可能影响虾青素的积累。Steinbrenner等^[16]将雨生红球藻虾青素合成途径分为两个阶段: β -胡萝卜素的形成第1阶段, 虾青素的合成第2阶段。番茄红素是类胡萝卜素中的一种, 而八番茄红素是番茄红素生物合成途径中的重要中间体, 八番茄红素合成酶基因是雨生红球藻中虾青素合成途径中将牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)合成 β -八番茄红素的关键酶基因, 进而合成 β -胡萝卜素, 成为第2阶段合成虾青素的重要底物^[17], *psy*基因表达量的增加可以提高GGPP转化, 从而提高虾青素合成效率。叔丁基对羟基茴香醚(butyl hydroxyanisole, BHA)是一种强抗氧化剂, 能够清除氧自由基, 从而对植物的代谢路径进行调控, 改变次级代谢产物积累, 因此被使用来促进次级代谢产物生产。Franz等^[18]观察到加入微量的外源BHA能够增加产油微藻的油脂产量。而BHA作为诱导因子, 对雨生红球藻中虾青素的积累影响和机理方面的研究还鲜见报道。

本实验以雨生红球藻为对象, 研究BHA对其生长和虾青素积累的影响及BHA胁迫对虾青素合成关键酶基因*psy*表达的作用, 为优化微藻培养条件、提高虾青素的产量、探索BHA诱导其合成机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雨生红球藻*Haematococcus pluvialis* LUGU为本实验室筛选、保存^[19]。

BHA TCI(上海)化成工业发展有限公司; 二

甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、KOH、甲醇(均为分析纯) 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; Trizol、逆转录试剂盒及荧光定量试剂盒 大连TaKaRa公司。

1.2 仪器与设备

XS-212-202显微镜 江南光电(集团)股份有限公司; VS-840-1超净工作台 上海博讯实业有限公司; FD5-12冷冻干燥机 西盟国际集团; Ultrospec 2100pro紫外-可见分光光度计 安玛西亚(中国)有限公司; LDZX-50KBS灭菌锅 上海申安医疗器械厂; FA2004N分析天平 上海菁海仪器有限公司; HHW-D6水浴锅 金坛双捷实验仪器厂; 5804R离心机 德国Eppendorf公司; 1730R高速冷冻离心机 丹麦Labogene Scanspeed公司; DS-8510DTH超声波微波组合体系 上海生析超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 雨生红球藻的培养

利用BBM(Bold's basal medium)^[20]为基础培养基, 将雨生红球藻接种到3 L(内置2 L培养基)光生物反应器中, 室内恒温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度2 800 lx, 通入0.1 vvm的无菌空气进行培养, 直至培养到指数中期(约 6.5×10^5 cells/mL)。

1.3.2 BHA处理

将培养至指数中期(12 d)的种子液 $3\ 800 \times g$ 离心5 min, 用无菌水洗去营养盐, 然后把藻液沉淀重新悬浮到BBM缺氮培养基中(接种量约为 2×10^5 CFU/mL, 培养基总体积为350 mL)。用DMSO溶解BHA作为母液, 将不同体积的BHA母液添加到缺氮的BBM培养基诱导培养, 使诱导培养基中添加BHA质量浓度分别为0(对照)、1、2、4 mg/L和8 mg/L(保持加入DMSO量相同), 每组设3个平行样。持续鼓入0.4 vvm含1.5%二氧化碳的无菌空气, 8 000 lx光照24 h, 置于(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 室内培养15 d, 以诱导藻细胞积累虾青素。每隔1 d取样1次, 测定雨生红球藻虾青素含量和细胞生物量。

1.3.3 种子液生长状态对相同诱导条件下细胞生长和虾青素积累的影响

按照营养细胞积累次级代谢产物的生长曲线, 分别在对数前期(4 d)、对数后期(14 d)、稳定期(18 d)加入1.3.2节得到的最佳质量浓度BHA, 每组设3个平行样。持续鼓入0.4 vvm的含1.5%二氧化碳的无菌空气, 24 h 8 000 lx光照, 置于(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 室内培养15 d, 以诱导藻细胞积累虾青素。每隔1 d取样1次, 测定雨生红球藻虾青素含量和细胞生物量。

1.3.4 虾青素含量和细胞生物量的测定

为测定基础培养基中雨生红球藻虾青素的积累量, 采用Boussiba等^[21]的方法稍加改进。每隔1 d定期取出

5 mL处于诱导阶段的藻液, 5 000 r/min离心5 min, 弃上清液。于收集的藻细胞沉淀中加入5% KOH和30%甲醇溶液混合液置于65 ℃水浴锅内5 min以破坏叶绿素, 5 000 r/min离心收集沉淀, 加入3 mL DMSO, 利用超声波破壁(20 s/5 s, 输出功率40 W), 反复抽提直至藻体发白后, 高速离心机10 000 r/min离心10 min, 取上清液于490 nm波长条件下测定吸光度 $A_{490\text{ nm}}$ 。按公式(1)计算虾青素质量浓度:

$$\text{虾青素质量浓度}/(\text{mg/L}) = \frac{4.5 \times A_{490\text{ nm}} \times V_a}{V_b} \quad (1)$$

式中: V_a 为DMSO体积/mL; V_b 为藻液体积/mL; 4.5为换算系数。

另外, 每隔1 d定期取出5 mL处于诱导阶段的藻液, 5 000 r/min离心10 min, -20 ℃冷冻, 干燥, 称质量, 按公式(2)、(3)计算细胞生物量和虾青素含量:

$$\text{细胞生物量}/(\text{g/L}) = \frac{\text{藻粉干质量}}{\text{藻液体积}} \quad (2)$$

$$\text{虾青素含量}/(\text{mg/g}) = \frac{\text{虾青素质量浓度}}{\text{细胞生物量}} \quad (3)$$

1.3.5 雨生红球藻 psy 基因表达分析

本实验由Primer 5.0软件设计, 上海生工生物工程技术服务有限公司合成 psy 酶基因的上下游扩增引物: 5'-ATGTACCATCCCAAGGCAAG-3'与5'-CTGGACCAGGCCTACGAC-3', 扩增长度为402 bp。扩增所得序列测序(上海生工)后BLAST比对, 并以此为模板设计荧光定量引物 $psyF$ (5'-CCTGGATGCCATTGAGAA-3')与 $psyR$ (5'-GTCGGGCTGACATTGTTG-3'), 目标产物为203 bp。

Trizol法提取不同质量浓度BHA处理的雨生红球藻RNA, 利用逆转录试剂盒(TaKaRa)将RNA逆转录合成cDNA, 以其为模板, 以 $psyF$ 与 $psyR$ 分别为上下游引物进行实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)扩增, 检测不同质量浓度BHA对雨生红球藻 psy 基因表达的影响。通过ABI 7500荧光定量仪对 psy 基因的表达进行定量, qRT-PCR的数据结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法处理分析^[22]。以18s(上游引物18sF: 5'-CGGTCTGCCTCTGGTATG-3', 下游引物18sR: 5'-GCTTGCTTTGAACACGCT-3')基因作为内标以调节RNA的用量和循环数, 使内标基因在诱导条件下的表达丰度一致。

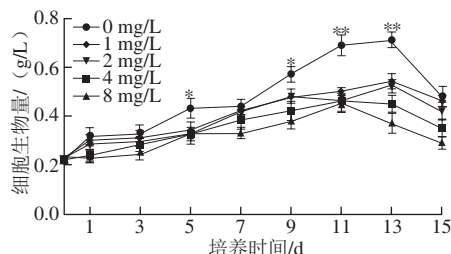
进行一元线性回归分析(回归方程中 y 为虾青素含量, x 为 psy 基因表达水平), 研究BHA诱导下雨生红球藻虾青素含量和 psy 基因表达量之间的相关性。

1.4 数据处理

实验均设置3组平行, 利用ANOVA(SPSS 19.0)一步法分析实验数据。最小显著性差异进行多重比较检验调查不同试验的组间差异, 且当 $P < 0.05$ 具有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 BHA对诱导培养微藻细胞生长的影响



*.同一时间与其他组差异显著($P < 0.05$); **.同一时间与其他组差异极显著($P < 0.01$).下同。

图1 不同质量浓度BHA对雨生红球藻生长的影响

Fig. 1 Effect of BHA on the biomass of *H. pluvialis* during

雨生红球藻受到环境胁迫时细胞生物量会发生明显的变化。图1表明, 不同质量浓度的BHA对诱导阶段雨生红球藻细胞生长的影响存在差异, 对照组微藻细胞生长量随着培养时间的延长而逐渐增加, 培养至第3天后, 藻细胞生物量开始急剧增加, 在第13天达到最大值(0.71 g/L)。实验组虽然生物量也增加, 但生物量最大值1 mg/L(0.54 g/L)、2 mg/L(0.52 g/L)、4 mg/L(0.46 g/L)、8 mg/L(0.45 g/L)相比对照组(0.71 g/L)仍然较低。比较不同质量浓度BHA胁迫下雨生红球藻的最大生物量, 结果显示, 随着添加BHA质量浓度的增加生物量最大值逐渐递减。可见在诱导藻细胞阶段, 诱导剂BHA质量浓度增加抑制了藻细胞的生长, 使细胞生长量降低。

2.2 BHA对微藻总虾青素积累的影响

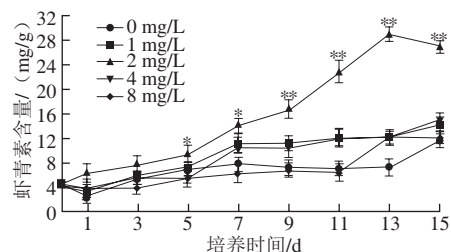


图2 不同质量浓度BHA对雨生红球藻虾青素含量的影响

Fig. 2 Effect of BHA on astaxanthin content of *H. pluvialis* during induction

图2显示, 在诱导阶段不同质量浓度的BHA对雨生红球藻内总虾青素积累的影响存在差异, BHA和虾青素积累量表现出良好的剂量效应, 实验组中微藻总虾青素积累量最大值随BHA质量浓度的增加而逐渐降低。2 mg/L BHA处理实验组在第13天, 虾青素积累量大幅度提高, 最高含量为29.03 mg/g, 明显高于其他实验组。虽然1、4、8 mg/L BHA处理实验组相对于对照虾青素积累量增加较低, 但都高于对照组。由此可见, BHA虽然抑

制了微藻细胞的生长却有利于虾青素的积累, 适宜质量浓度BHA很大程度上促进了雨生红球藻对虾青素的积累。

2.3 BHA诱导对不同生长状态微藻细胞生长的影响

不同生长阶段的营养细胞的敏感性是不同的, 这最终将会影响藻细胞中产物的积累^[23]。在营养细胞的不同阶段, 包括对数前期(4 d)、对数后期(14 d)、稳定期(18 d), 分别加入2 mg/L的BHA后, 和在数中期(12 d)加入2 mg/L BHA实验组对比, 观察其对诱导阶段藻细胞生长的影响。

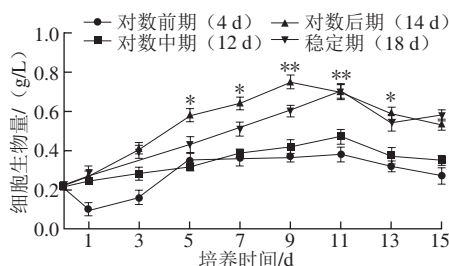


图3 BHA诱导对不同生长状态雨生红球藻生长的影响

Fig. 3 Effect of BHA on the biomass of *H. pluvialis* at different growth stages during induction

在诱导阶段细胞生物量随时间延长逐渐增加(图3), 对数后期(14 d)和稳定期(18 d)的细胞在第13天生物量显著高于对照组, 但对数前期(4 d)生物量却先降低后增加, 对数中期(12 d)一直呈现出平缓的增加趋势。说明诱导培养阶段, 不同状态细胞对生物量的提高具有较大的影响。

2.4 BHA诱导对不同生长状态微藻细胞总虾青素积累的影响

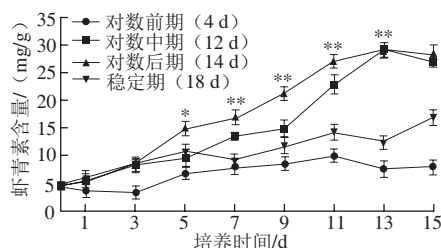


图4 BHA诱导对不同生长状态雨生红球藻虾青素含量的影响

Fig. 4 Effect of BHA on astaxanthin content of *H. pluvialis* at different growth stages during induction

用2 mg/L的BHA在相同条件下诱导不同生长状态微藻细胞, 虾青素积累量差异显著(图4)。在培养的第5天, 对数后期(14 d)微藻细胞虾青素积累量急剧增加, 相对于对数生长期前期(4 d)、对数中期(12 d)、稳定期(18 d)虾青素积累量增加显著, 在培养的第13天达到了最大值29.3 mg/g。对数中期(12 d)细胞虽然在第9天增幅较大, 但最大值(29.03 mg/g)并

未超过对数后期(14 d)微藻细胞。对数前期(4 d)和稳定期(18 d)细胞虾青素积累增加缓慢, 最大积累量分别为9.99、16.86 mg/g, 并未表现出明显的增加, 可见微藻细胞对BHA的抗性很大程度上影响了微藻细胞对虾青素的积累。

2.5 BHA诱导对微藻虾青素积累和psy基因表达量的关系

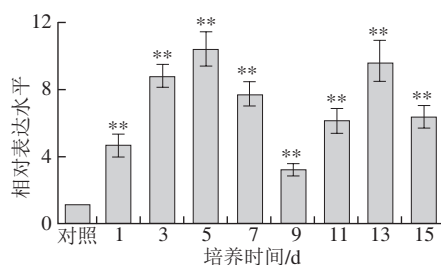


图5 BHA对psy基因表达量的影响

Fig. 5 Effect of BHA on the transcriptal expression level of *psy*

用qRT-PCR的方法测定对数后期(14 d) 2 mg/L BHA诱导的雨生红球藻虾青素相关合成基因 psy 的相对表达水平(图5), 对应虾青素积累量变化趋势, BHA质量浓度为2 mg/L时, psy 的表达量至第5天达到最大值, 为对照组表达量的9.2倍, 虾青素积累量也从第5天开始大幅增加。培养到第13天时, 虾青素含量达到最大值29.3 mg/g, psy 基因的表达量也显著高于对照组, 为对照的8.9倍。从BHA诱导雨生红球藻基因水平上分析, psy 基因的表达量一直处于高表达, 表达量显著高于对照组, 这与在该浓度下虾青素含量最大的结果一致。说明, 基因的表达量与虾青素积累量相关性明显。

BHA诱导雨生红球藻虾青素含量和 psy 基因表达量之间的相关性表明, 当 psy 表达水平低时, 微藻虾青素含量随其后表现出低含量; 如 psy 表达水平提高, 虾青素含量随之增加, 两者呈现线性相关, 回归方程为: $y=4.3779x+1.9687$, $R^2=0.9617$ (式中: y 为雨生红球藻虾青素含量, x 为 psy 基因相对表达水平)。

3 讨论

Lu Yandu等^[24]利用不同的植物激素作为诱导子来促进雨生红球藻积累虾青素发现, 将不同质量浓度的茉莉酸甲酯、赤霉素 A_3 作为诱导子分别加入处于生长对数期的藻液中, 置于高光照、缺氮等诱导条件下诱导后测虾青素积累量和相关基因的表达量, 结果表明, 相对与对照组, 20 mg/L茉莉酸甲酯和赤霉素 A_3 大大提高了微藻虾青素积累量, 有效促进雨生红球藻虾青素的合成, 但低质量浓度的诱导剂对微藻细胞虾青素积累促进作用较弱。bkt6基因在诱导培养的第16天表达量达最大值。可

见只有在适当质量浓度诱导子的诱导下, 虾青素积累量才能得到明显的提高, 这与基因表达量呈正相关。高政权等^[25]利用乙烯利作为诱导子, 在用量为0.05 mL/L处理组虾青素积累量最高, 而高用量(不少于0.15 mL/L)乙烯利对雨生红球藻细胞有强烈的致死作用。这说明植物激素对于微藻细胞也具有双重性, 即只有合适的用量才能发挥其生物学作用, 过低时不起作用, 过高时产生抑制甚至毒害作用。Gao Zhengquan等^[26]研究了25 mg/L和50 mg/L的茉莉酸分别对藻细胞积累虾青素与相关基因表达量的影响, 基因与虾青素的积累正相关主要包括在转录前水平、转录水平及转录后水平; 研究发现用50 mg/L茉莉酸诱导藻细胞时, *psy*基因的表达量在第3天达到最高, 早于藻细胞开始快速积累虾青素时间, 表明*psy*在转录前水平对虾青素生物合成起到了正调节的作用。因此, 研究诱导过程中虾青素代谢途径中相关基因的表达水平, 有助于在分子水平了解在添加BHA条件下虾青素产量提高的原因, 为诱导虾青素积累提供理论依据。

BHA是一种化学合成的抗氧化剂^[27], 能够螯合金属离子、清除自由基、淬灭单线态氧、清除氧、抑制氧化酶活性等。有研究表明BHA质量浓度达到16 mg/L时斜生栅藻几乎完全受到抑制^[28], 随着暴露时间的延长, 细胞生长受抑制越来越明显, 生长越来越缓慢。但在BHA质量浓度小于8 mg/L时, 斜生栅藻48 h细胞的抑制率反而比24 h降低, 这说明较低质量浓度的BHA暴露在短时间内不会对斜生栅藻的生长产生严重影响, 甚至藻类可产生一定的适应性, 受抑制程度减弱。在用1、2、4、8 mg/L BHA诱导雨生红球藻积累虾青素过程中, 也得到相似的结论。BHA也是一种氧化传导信号分子, 能刺激雨生红球藻光保护系统的启动, 减少光氧化胁迫^[15]。添加外源BHA可刺激植物防御基因的表达, 诱导植物的生理防御, 促使防御相关化合物的合成。另一方面, 虾青素在微藻细胞内主要和脂肪酸发生酯化, 以虾青素酯的形式贮存在藻细胞中^[29-30], 而抗氧化剂可以降低脂肪酸的氧化, 提高虾青素的贮存量, 因此可能是减少了虾青素的消耗。因此研究BHA对雨生红球藻的生长以及虾青素积累的影响具有一定的应用价值。

适宜质量浓度的BHA有利于促进雨生红球藻雨生红球藻细胞的生长和虾青素的积累。对数后期(14 d)添加质量浓度为2 mg/L BHA, 微藻细胞虾青素积累量达到最大29.3 mg/g, 比对照组提高2.05倍; 且*psy*相对表达水平达到最大值, 为对照组的9.2倍, 微藻虾青素含量与*psy*基因表达量呈正相关。随着BHA诱导虾青素生物合成的分子机制的进一步研究, BHA有望成为诱导微藻细胞积累虾青素广泛使用的生物诱导子。

参考文献:

- [1] 陶云莹, 王巧晗, 宫庆礼. 雨生红球藻生长和虾青素积累条件的研究进展[J]. 河北渔业, 2015, 7(1): 49-52. DOI:10.3969/j.issn.1004-6755.2015.07.020.
- [2] 庄惠如, 陈文列. 雨生红球藻不同形态细胞的超微结构研究[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(5): 428-433. DOI:10.3321/j.issn:1006-687X.2001.05.005.
- [3] 凌善锋. 雨生红球藻培养基和诱导条件优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 266-267. DOI:10.3969/j.issn.1002-1302.2013.11.104.
- [4] BOUSSIBA S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response[J]. Physiologia Plantarum, 2000, 108(2): 111-117.
- [5] 钱飞, 刘海英, 过世东. 木瓜蛋白酶水解克氏原螯虾虾壳提取虾青素的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(2): 237-243.
- [6] 胡建中, 巩继贤, 董庆霖, 等. 低氮促进红发夫酵母合成虾青素机理的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 91-96. DOI:10.3321/j.issn:1673-1689.2009.01.019.
- [7] 黄文文, 洪碧红, 易瑞灶, 等. 虾青素生产方法及生物活性的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2013(6): 214-218.
- [8] NAKAGAWA K, KANG S D, PARK D K, et al. Inhibition by β -carotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1997, 43(3): 345-355. DOI:10.3177/jnsv.43.345.
- [9] NAGUIB Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(4): 1150-1154. DOI:10.1021/jf991106k.
- [10] SHEIKHZADEH N, PANCHAH I K, ASADPOUR R, et al. Effects of *Haematococcus pluvialis* in maternal diet on reproductive performance and egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Animal Reproduction Science, 2012, 130(1): 119-123.
- [11] GUERIN M, HUNTLEY M E, OLAIZOLA M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(5): 210-216. DOI:10.1016/S0167-7799(03)00078-7.
- [12] MARGALITH P Z. Production of ketocarotenoids by microalgae[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(4): 431-438. DOI:10.1007/s002530051413.
- [13] JOHNSON E A, SCHROEDER W A. Microbial carotenoids[M]// Downstream processing biosurfactants carotenoids. Springer Berlin Heidelberg, 1995: 119-178.
- [14] WAN M X, ZHANG Z, WANG J, et al. Sequential heterotrophy-dilution-photoinduction cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin[J]. Bioresource Technology, 2015, 198(5): 557-563. DOI:10.1016/j.biortech.2015.09.031.
- [15] ZHANG G M, ZHANG P Y, WANG B, et al. Ultrasonic frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa*[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13(5): 446-450. DOI:10.1016/j.ulsonch.2005.09.012.
- [16] STEINBRENNER J, LINDEN H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52(3): 343-356. DOI:10.1023/A:1023948929665.
- [17] GAO Z Q, MENG C X, CHEN Y C, et al. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress[J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(5): 1853-1860. DOI:10.1007/s10811-014-0491-3.

- [18] FRANZ A K, DANIELEWICZ M A, WONG D M, et al. Phenotypic screening with oleaginous microalgae reveals modulators of lipid productivity[J]. ACS Chemical Biology, 2013, 8(5): 1053-1062. DOI:10.1021/cb300573r.
- [19] ZHAO Y, SHANG M, XU J W, et al. Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 2072-2077. DOI:10.1016/j.procbio.2015.09.004.
- [20] EBRAHIMIAN A, KARIMINIA H R, VOSOUGHI M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater[J]. Renewable Energy, 2014, 71: 502-508. DOI:10.1016/j.renene.2014.05.031.
- [21] BOUSSIBA S, VONSHAK A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Plant and Cell Physiology, 1991, 32(7): 1077-1082.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(7): 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.
- [23] VIDHYAVATHI R, VENKATACHALAM L, SARADA R, et al. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(6): 1409-1418. DOI:10.1093/jxb/ern048.
- [24] LU Y D, JIANG P, LIU S F, et al. Methyl jasmonate-or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of β -carotene ketolase genes (*bkts*) in microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(16): 6468-6474. DOI:10.1016/j.biortech.2010.03.072.
- [25] 高政权, 孟春晓. 外源乙烯利对雨生红球藻中虾青素积累的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 376-380. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2007.10.091.
- [26] GAO Z Q, MENG C X, ZHANG X W, et al. Differential expression of carotenogenic genes, associated changes on astaxanthin production and photosynthesis features induced by JA in *H. pluvialis*[J]. PloS One, 2012, 7(8): 243-251. DOI:10.1371/journal.pone.0042243.
- [27] 张怀玉. 高效液相色谱法同时测定植物油中的BHA, BHT和游离棉酚[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 343-344. DOI:10.3969/j.issn.1004-8685.2004.03.049.
- [28] 鹿金雁, 李潇, 聂湘平, 等. 叔丁基对羟基茴香醚和诺氟沙星对水生生物的影响[J]. 生态科学, 2007, 26(1): 55-58. DOI:10.3969/j.issn.1008-8873.2007.01.013.
- [29] GRÜNEWALD K, HIRSCHBERG J, HAGEN C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(8): 6023-6029. DOI:10.1074/jbc.M006400200.
- [30] HOLTIN K, KUEHNLE M, REHBEIN J, et al. Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(6): 1613-1622. DOI:10.1007/s00216-009-2837-2.