

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220510107

雨生红球藻醋酸盐利用条件优化与适应性进化研究

Utilization Condition Optimization And Adaptive Evolutionary Analysis of Acetate In *Haematococcus pluvialis*

学 生 姓 名: _____ 韩维召

校 内 导 师: 李艳宾（教授）；何帮翔（讲师）

专 业: _____ 生物工程

研 究 方 向: _____ 生物技术与工程

论文答辩日期: _____ 2025 年 7 月 7 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：韩维召

日期：2025 年 7 月 7 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：韩维召

日期：2025 年 7 月 7 日

指导教师签名：李艳兵 何帮翔

日期：2025 年 7 月 7 日

雨生红球藻醋酸盐利用条件优化与适应性进化研究

摘 要

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 天然虾青素含量丰富, 应用前景广阔。醋酸钠 (NaAc) 能有效促进雨生红球藻生物量及虾青素积累, 但利用率与耐受性较低。本研究对雨生红球藻两阶段培养 (绿色生长与红色诱导) 的 NaAc 添加浓度进行了优化, 探究了培养及诱导过程中多次补加不同浓度 NaAc 对细胞生长和虾青素诱导的影响, 分析了一系列醋酸盐代谢、虾青素合成、碳固定、油脂合成等关键基因的变化, 并通过长时间驯化培养, 逐步提高雨生红球藻 NaAc 耐受度, 分析了驯化藻株的生理特性。本研究的主要结论如下:

(1) 雨生红球藻 NaAc 利用条件优化: 浓度优化结果表明绿色阶段 NaAc 最佳添加量为 1 g/L (细胞密度 $5.58 \pm 1.37 \times 10^5$ cells/mL, 干重 0.73 ± 0.03 g/L), 且不造成叶绿素含量的降低; 红色诱导阶段最佳添加量也为 1 g/L, 干重与虾青素分别达到 0.82 ± 0.04 g/L 和 4.37 ± 0.23 mg/L。绿色阶段 NaAc 被快速吸收, 而红色阶段吸收量更低且吸收速度更慢。在初始 1 g/L 基础上, 绿色阶段第 6 天补加 1 g/L NaAc 效果最优, 干重、细胞密度、叶绿素和碳水化合物分别提高 10.59%、14.58%、9.75% 和 30.76%, 红色阶段第 3 天补加 1 g/L 效果最优, 干重与油脂分别提高 26.47% 和 17.65%。

(2) NaAc 对雨生红球藻两阶段的作用机制探究：从雨生红球藻基因组中鉴定出 12 个醋酸盐吸收关键基因—乙酰辅酶 A 合成酶(*acs*)，进化树分析将其分为 5 个类型，即 *acs1-5*。绿色阶段初始添加 1 g/L NaAc，*acs2* 和 *acs3* 快速上调（最高倍数分别为 9.43 和 110.42 倍）。红色诱导阶段初始添加 1 g/L NaAc，*acs4a* 和 *acs4b* 快速上调（最高倍数分别为 17.88 和 77.79 倍），绿色阶段 NaAc 的补加能够进一步促进 *acs2* 与 *acs3* 的表达量（上调 8.68 倍与 107.2 倍），表明绿色阶段醋酸盐的吸收与 *acs2* 和 *acs3* 密切相关。在最佳 NaAc 补加模式下，TCA 循环基因苹果酸合酶与柠檬酸合酶在绿色阶段分别上调 9.88 和 12.15 倍，红色阶段分别上调 2.5 和 1.9 倍；碳固定基因磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶在绿色阶段上调 14.78 倍；脂质合成基因 ACP-S-丙二酸转移酶、3-酮脂酰辅酶 A 合成酶和长链脂酰辅酶 A 合成酶在红色阶段分别上调 20.96、11.68 和 9.57 倍；虾青素合成基因番茄红素 β -环化酶在红色阶段分别上调 3.22 和 3.51 倍。

(3) 适应性进化定向提高雨生红球藻 NaAc 耐受性：通过长时间驯化培养，依次分别获得 HpAC25（2.5 g/L 驯化 12 个月）、HpAC50（5 g/L 驯化 6 个月以上）和 HpAC75（7.5 g/L 驯化 3 个月以上）三个驯化藻株。活死细胞染色表明 HpAC50 在 5 g/L NaAc 下存活率为 81.22%，比野生型提高了 4.23 倍，HpAC75 在 7.5 g/L NaAc 下存活率为 43.51%，比野生型提高了 5.6 倍。生理特性分析表明 HpAC75 在 1-7.5 g/L 范围内，生长及虾青素积累随 NaAc 浓度升高而降低，且均低于 1 g/L NaAc 培养的野生型。添加 1 g/L NaAc，驯化株中的 HpAC50

绿色阶段的生长速率和总糖含量显著高于野生型,红色阶段的虾青素产量与油脂含量比野生型提高了 27.2%和 45.49%。

本研究优化了雨生红球藻醋酸盐添加浓度和添加模式,分析了 NaAc 对雨生红球藻两阶段影响的分子机制,并通过适应性进化获得高耐受醋酸盐的驯化藻株,为提高雨生红球藻养殖中醋酸盐的利用效率进而提高天然虾青素产量提供了理论支持和实践指导。

关键词: 雨生红球藻, 虾青素, 醋酸钠, 乙酸代谢, 培养条件优化, 适应性进化

UTILIZATION CONDITION OPTIMIZATION AND ADAPTIVE EVOLUTIONARY ANALYSIS OF ACETATE IN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS

ABSTRACT

The microalga *Haematococcus pluvialis*, characterized by its high natural astaxanthin content, demonstrates broad application prospects. Although sodium acetate (NaAc) effectively promotes biomass accumulation and astaxanthin biosynthesis in *H. pluvialis*, its utilization efficiency and algal tolerance remain suboptimal. This study systematically optimized NaAc supplementation concentrations during two-stage cultivation (green growth and red induction phases) and investigated the effects of multiple NaAc additions at varying concentrations on cellular growth and astaxanthin induction. Key genes involved in acetate metabolism, astaxanthin synthesis, carbon fixation, and lipid biosynthesis were analyzed. Through long-term adaptive evolution, NaAc-tolerant algal strains were developed, with their physiological characteristics thoroughly characterized. The principal conclusions are summarized as follows:

(1) Optimization of NaAc utilization conditions: Concentration screening revealed optimal NaAc supplementation at 1 g/L for both stages. In the green phase, this concentration achieved cell density

($5.58 \pm 1.37 \times 10^5$ cells/mL) and dry weight (0.73 ± 0.03 g/L) without chlorophyll reduction. During red induction, dry weight and astaxanthin content reached 0.82 ± 0.04 g/L and 4.37 ± 0.23 mg/L, respectively. Rapid NaAc assimilation was observed in the green phase, whereas absorption decreased significantly in the red phase. Supplementation with 1 g/L NaAc on day 6 of the green phase enhanced dry weight, cell density, chlorophyll, and carbohydrate content by 10.59%, 14.58%, 9.75%, and 30.76%, respectively. In the red phase, 1 g/L supplementation on day 3 increased dry weight and lipid content by 26.47% and 17.65%.

(2) Mechanistic insights into NaAc effects: Twelve acetyl-CoA synthetase (ACS) genes (*acs1-5*) critical for acetate assimilation were identified through genomic analysis and classified into five phylogenetic clusters. In the green phase, *acs2* and *acs3* exhibited rapid upregulation (9.43- and 110.42-fold, respectively) upon initial NaAc addition. During red induction, *acs4a* and *acs4b* were predominantly upregulated (17.88- and 77.79-fold). Subsequent NaAc supplementation in the green phase further enhanced *acs2* and *acs3* expression (8.68- and 107.2-fold). Under optimal supplementation, TCA cycle genes (malate synthase and citrate synthase) were upregulated 9.88- and 12.15-fold in the green phase, and 2.5- and 1.9-fold in the red phase. The carbon fixation gene phosphoenolpyruvate carboxykinase increased 14.78-fold in the green phase. Lipid biosynthesis genes (ACP-S-malonyltransferase, 3-ketoacyl-

CoA synthase, and long-chain acyl-CoA synthase) showed 20.96-, 11.68-, and 9.57-fold upregulation during red induction. Astaxanthin synthesis gene lycopene β -cyclase was upregulated 3.22-3.51-fold.

(3) Adaptive evolution for enhanced NaAc tolerance: Three acclimated strains (HpAC25, HpAC50, HpAC75) were developed through prolonged cultivation at progressively elevated NaAc concentrations (2.5, 5, and 7.5 g/L over 12, 6+, and 3+ months, respectively). Viability assays demonstrated 81.22% survival for HpAC50 at 5 g/L NaAc (4.23-fold higher than wild-type), and 43.51% survival for HpAC75 at 7.5 g/L (5.6-fold improvement). Physiological analyses revealed concentration-dependent growth and astaxanthin reduction in HpAC75 (1-7.5 g/L), with performance inferior to wild-type at 1 g/L. Notably, HpAC50 exhibited 27.2% and 45.49% higher astaxanthin yield and lipid content than wild-type during red induction at 1 g/L NaAc.

This study establishes optimized NaAc supplementation strategies, elucidates molecular mechanisms underlying acetate metabolism in *H. pluvialis*, and develops high-tolerance strains through adaptive evolution. These findings provide theoretical foundations and practical guidance for improving acetate utilization efficiency in *H. pluvialis* cultivation, ultimately enhancing natural astaxanthin production.

KEY WORDS: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, sodium acetate,

acetate metabolism, culture condition optimization, adaptive evolution

目 录

摘 要	3
ABSTRACT	VI
第 1 章 绪论	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 虾青素特性	1
1.1.2 虾青素的应用	2
1.1.3 雨生红球藻简介	3
1.1.4 雨生红球藻生活史	4
1.1.5 雨生红球藻虾青素代谢机制	4
1.2 雨生红球藻生长及虾青素诱导影响因素	5
1.2.1 光照的影响	5
1.2.2 碳源的影响	6
1.2.3 氮磷元素的影响	6
1.2.4 盐度的影响	7
1.2.5 温度和 pH 的影响	7
1.3 醋酸盐对雨生红球藻的影响	7
1.3.1 醋酸盐对雨生红球藻生长的影响	8
1.3.2 醋酸盐对雨生红球藻虾青素积累的影响	8
1.3.3 雨生红球藻醋酸盐代谢机制	8
1.4 微藻适应性进化	9
1.5 研究内容、意义和技术路线	10
1.5.1 研究内容	10
1.5.2 研究意义	10
1.5.3 技术路线	11
第 2 章 雨生红球藻两阶段醋酸盐利用条件优化	12
2.1 引言	12
2.2 材料与方法	13
2.2.1 雨生红球藻培养基	13

2.2.2 实验样品和培养条件.....	13
2.2.3 实验试剂及设备.....	13
2.2.4 实验设计.....	13
2.2.5 细胞密度和细胞干重的测量.....	14
2.2.6 叶绿素和虾青素的测量.....	15
2.2.7 培养基中醋酸钠浓度的测量.....	15
2.2.8 蛋白、碳水化合物及脂质含量测定.....	15
2.2.9 生物重复和统计分析.....	15
2.3 结果与讨论.....	16
2.3.1 醋酸钠初始添加量对绿色阶段的影响.....	16
2.3.2 醋酸钠初始添加量对红色阶段的影响.....	17
2.3.3 醋酸钠补加策略对雨生红球藻两阶段培养的影响.....	18
2.4 本章小结.....	20
第 3 章 雨生红球藻两阶段添加和多批次补加醋酸盐代谢机制分析	22
3.1 引言.....	22
3.2 材料与方法.....	22
3.2.1 雨生红球藻培养基.....	22
3.2.2 实验样品.....	22
3.2.3 实验试剂及设备.....	23
3.2.4 荧光定量样品培养.....	23
3.2.5 总 RNA 提取、检测及反转录	23
3.2.6 引物设计和特异性检测.....	23
3.2.7 RT-qPCR 检测	25
3.2.8 生物重复和统计分析.....	26
3.3 结果与讨论.....	26
3.3.1 各样品 RNA 提取的凝胶电泳检测	26
3.3.2 引物设计和引物特异性检测.....	27
3.3.3 关键酶基因的相对表达变化分析.....	29
3.4 本章小结.....	36
第 4 章 雨生红球藻耐醋酸盐适应性进化	37

4.1 引言.....	37
4.2 材料与方法.....	37
4.2.1 雨生红球藻培养基.....	37
4.2.2 实验样品.....	37
4.2.3 实验试剂及设备.....	37
4.2.4 雨生红球藻耐醋酸钠适应性进化.....	37
4.2.5 细胞密度、比生长速率和细胞干重的测量.....	38
4.2.6 细胞活死率的测量.....	38
4.2.7 叶绿素、类胡萝卜素和虾青素的测量.....	39
4.2.8 蛋白、碳水化合物及脂质含量测定.....	39
4.2.9 生物重复和统计分析.....	39
4.3 结果与讨论.....	39
4.3.1 雨生红球藻耐醋酸钠适应性进化.....	39
4.3.2 驯化藻对醋酸钠浓度耐受度检测.....	41
4.3.3 驯化藻与野生型的生理对比.....	44
4.4 本章小结.....	56
第 5 章 结论与展望	57
5.1 结论.....	57
5.2 展望.....	58
参考文献	59
附录	72
攻读硕士期间学术论文发表情况	74
致谢	75

第1章 绪 论

1.1 研究背景

虾青素凭借卓越的抗氧化能力和生物安全性，在医药、保健、美容等领域展现出重要的应用价值。雨生红球藻作为天然虾青素的最佳生物来源而备受关注，据报道其虾青素含量可达干重的 5%以上^[1-3]，远超其他生物来源。然而雨生红球藻生长缓慢以及虾青素诱导效率低下，制约了其产业化发展。醋酸钠（NaAc）对雨生红球藻生长及虾青素诱导均具有促进作用，是该藻养殖广泛使用的一种经济高效有机碳源^[4,5]。进一步探究醋酸盐作用机制和定向提高雨生红球藻对醋酸盐的耐受性，对提高雨生红球藻源天然虾青素的产量具有重要意义。

1.1.1 虾青素特性

（1）虾青素结构与来源

虾青素（Astaxanthin）是一种酮式类胡萝卜素，分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$ ，属于萜烯类不饱和化合物，其分子结构由两个末端 β -紫罗兰酮环组成，这些环由四个异戊二烯单元连接，并与共轭双键相连产生三种不同的旋光异构体，包括一对对映异构体（3S, 3'S 和 3R, 3'R）和内消旋形式（3R, 3'S）^[6,7]（图 1.1），其中只有左旋虾青素具备超强的抗癌、抗氧化等生物活性，雨生红球藻合成的虾青素异构体形式主要是左旋形式 3S, 3'S。由于羟基，虾青素可以以游离或酯化形式（单酯或二酯）存在。目前为止现在市场上主要有化学合成的虾青素和天然提取的虾青素^[8]，虽然化学合成的虾青素因低廉的价格占据大部分市场，但由于其存在合成残留和安全问题，人们对天然虾青素更有需求^[9]。天然虾青素可以从虾、蟹甲壳类动物等废壳中提取，然而其低含量和高提取成本限制了大规模生产^[10]，目前雨生红球藻（*Haematococcus pluvialis*）是天然虾青素主要的主要来源^[11]。

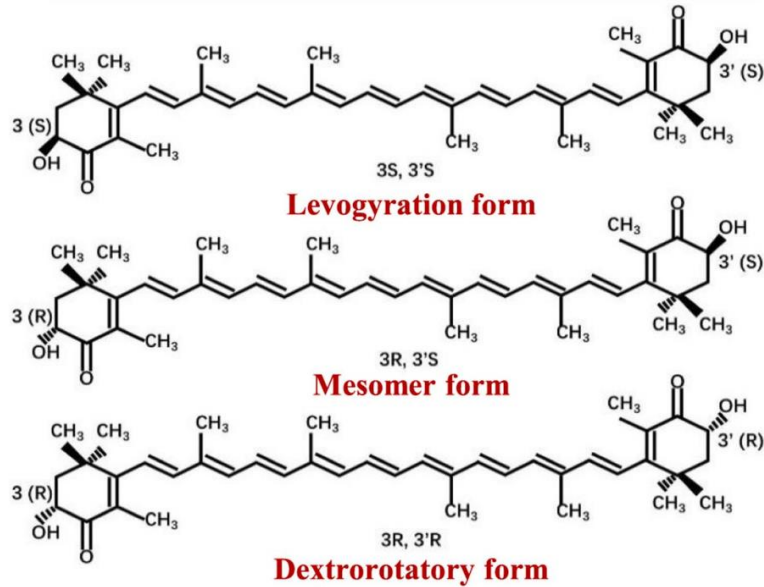
图 1.1 虾青素的三种旋光异构体^[12]

Fig 1.1 Three different optical isomers of astaxanthin

(2) 虾青素抗氧化活性

天然虾青素因其独特的分子结构展现出显著的抗氧化特性。其分子核心由共轭双键体系构成，两端连接着不饱和酯基基团，同时结构中还含有羟基和酮基共同形成的 α -羟基酮单元^[13]。这些特征性结构赋予分子活跃的电子传递能力：羟基基团可作为电子供体向自由基转移电子，而共轭双键系统则通过电子离域作用捕获自由基的未配对电子。这种双模作用机制能有效中和高活性的单线态氧自由基及其他环境自由基，通过电子稳定化过程使其恢复为稳定态物质，从而阻断自由基链式反应对生物体细胞造成的氧化损伤。特别值得注意的是， α -羟基酮结构域与共轭体系的协同效应显著增强了该分子清除活性氧物种的效率^[14]，正因为这些特点虾青素是目前最强的抗氧化剂，其抗氧化活性是维生素 E 和其他多数天然类胡萝卜素的 100 倍^[15]。

1.1.2 虾青素的应用

(1) 虾青素免疫调节作用

虾青素展现出显著的免疫调节特性，其作用机制与抗氧化活性形成协同效应^[16]。研究表明，该物质通过刺激免疫球蛋白的合成与分泌，双向增强机体特异性免疫应答^[17]：在体液免疫层面，可显著提升抗体生成效率并维持免疫效价；在

细胞免疫方面, 则通过激活 T 淋巴细胞功能、促进中性粒细胞增殖, 优化免疫监视与防御体系。动物实验证实, 膳食补充虾青素不仅能延缓免疫衰老进程, 还可降低炎症因子水平, 有效保护 DNA 免受氧化损伤^[18]。这种免疫增强效应可能是虾青素分子对免疫细胞信号通路的调控及其自由基清除能力的协同作用。

(2) 虾青素抗肿瘤作用

虾青素凭借其抗氧化与免疫调节功能, 在抗肿瘤领域展现出多维度作用机制。研究发现, 虾青素可通过调控基因表达抑制恶性肿瘤转移, 同时阻断应激诱导的免疫抑制, 恢复自然杀伤细胞的抗肿瘤活性^[19]。其独特分子结构不仅能诱导肿瘤细胞周期停滞、增强化疗敏感性, 还可通过分泌肿瘤坏死因子使癌细胞程序性死亡。研究数据显示, 虾青素对白血病、结肠癌、胃癌及膀胱癌细胞均表现出显著抑制作用, 其抗肿瘤效力远超角黄素和 β -胡萝卜素等类胡萝卜素^[20]。值得注意的是, 其抗炎特性通过抑制促癌炎症因子表达, 有效阻断癌变进程, 同时可清除光辐射引发的自由基, 降低紫外线诱导的皮肤损伤及癌变风险。这种多靶点作用模式使其在癌症预防与辅助治疗中具有独特优势^[21]。

(3) 虾青素的其他应用

虾青素还可应用于食品方面, 天然虾青素的安全被国际公认, 已获多个国批准应用于食品领域。为适应健康消费趋势, 虾青素被开发为软凝胶、片剂、胶囊等多种剂型的膳食补充剂^[22], 同时也在烘焙食品创新中展现独特价值。此外, 虾青素能够促进动物生长与繁殖的生理功能。虾青素在畜牧养殖和水产养殖领域中也具有很高的应用价值, 虾青素的抗氧化能力、增强免疫力和抗病力在动物身上都可发挥着作用, 比如对哺乳期羔羊的代乳粉中添加含 2.5% 喷雾干燥雨生红球藻虾青素的代乳粉, 能够改善羊肉色泽与氧化稳定性, 同时降低羊肉内代乳粉残留^[23]。在水产养殖方面, 虾青素作为饲料能够促进水产动物的生长, 增强抗应激能力以及改善繁殖提高幼体存活等。

1.1.3 雨生红球藻简介

雨生红球藻分布在全球很多栖息地^[24], 是一种单细胞淡水绿藻, 属于绿藻门 (*Chlorophyta*) 团藻目 (*Volvocales*) 红球藻科 (*Haematococcaceae*)^[25]。其最显著的特征是在胁迫条件 (如高光照、氮磷饥饿和盐胁迫) 下能够积累高含量的虾青素, 占细胞干重的 3%-5% 以上, 使其成为目前已知天然虾青素的最优生

物来源 [26]。

1.1.4 雨生红球藻生活史

雨生红球藻的形态随环境条件显著变化，主要分为绿色游动细胞、绿色不动细胞以及红色孢囊细胞 [27,28]。如图 1-2 所示，在营养充足、光照适宜的水体中，雨生红球藻以绿色游动细胞的形式存在，其椭圆形或梨形细胞依赖两根鞭毛游动，通过光合作用快速增殖并进行无性分裂；当存在环境压力（如营养限制、盐度变化或光照增强）时，游动细胞逐渐失去鞭毛，细胞壁增厚，转化为绿色不动细胞，生长减缓并开始储存脂质和淀粉以应对逆境。若环境进一步恶化（如高光、高温等），细胞进入红色厚壁孢子阶段，细胞壁显著增厚并大量合成虾青素 [29,30]，使细胞由绿转红，形成能够长期休眠的厚壁孢子以抵御氧化损伤，此阶段可持续数月甚至数年直至环境恢复 [31]。当水分与营养条件改善时，孢子吸水萌发，释放出游动细胞或直接分裂产生新个体，部分情况下可能通过有性生殖（配子结合形成合子）增加遗传多样性。这种灵活的生活史不仅使其适应临时性水体的干湿交替环境，还因其在红色阶段高效积累的虾青素而被广泛应用，成为工业化生产天然虾青素的关键生物来源。

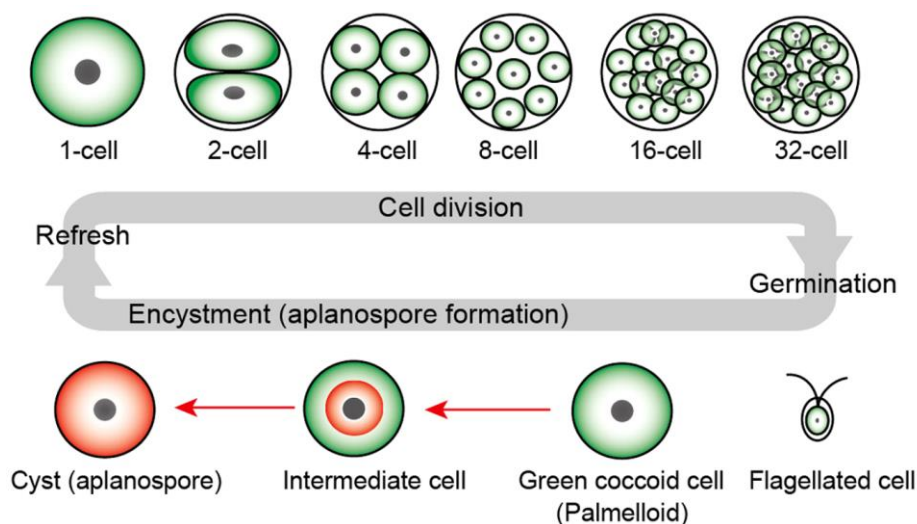


图 1.2 雨生红球藻生命周期 [32]

Fig 1.2 Life Cycle of *Haematococcus pluvialis*

1.1.5 雨生红球藻虾青素代谢机制

虾青素的生物合成以类胡萝卜素为前体的生成，先合成 β -胡萝卜素然后经过多步反应最终合成虾青素 [33]。叶绿体中的脱氧木酮糖磷酸途径（MEP）和细胞质中的甲羟戊酸途径（MVA）可以合成异戊烯基焦磷酸（IPP）。MEP 途径是

通过甘油醛-3-磷酸和丙酮酸经 DXR 酶催化生成脱氧木酮糖磷酸 (DOXP)，最终转化为异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP)，在雨生红球藻中 MEP 途径供应了 80% 以上的类胡萝卜素前体^[34]；而 MVA 途径则是乙酰辅酶 A 通过 HMG-CoA 合成酶 (HMGS) 和 HMG-CoA 还原酶 (HMGR) 催化生成生成，随后转化为异戊烯基焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP)^[35]，接着 IPP 和 DMAPP 在法呢基二磷酸合酶 (FDPPS) 和香叶基香叶基二磷酸合酶 (GGPS) 催化下生成香叶基香叶基焦磷酸酯 (GGPP)^[36]，再经八氢番茄红素合成酶 (PSY) 转化为八氢番茄红素，在此阶段中，PSY 的活性受光强调控，高光条件下其表达量可提升 3 倍以上^[34]。在 β -胡萝卜素转化阶段，八氢番茄红素经八氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 和 ζ -胡萝卜素脱氢酶 (ZDS) 连续脱氢生成番茄红素 (Lycopene)，再由番茄红素 β -环化酶 (LCYB) 环化形成 β -胡萝卜素，其中 PDS 和 ZDS 的活性受光强和氮源调控^[34, 37]。最终， β -胡萝卜素通过 β -胡萝卜素酮化酶 (BKT) 和羟基化酶 (CRTR-B) 的作用下生成虾青素，并在酰基转移酶 (AST) 介导下与脂肪酸酯化后储存在脂滴中，酯化过程在氮饥饿条件下效率提升 4.5 倍，形成深红色胞内颗粒^[28]。

1.2 雨生红球藻生长及虾青素诱导影响因素

1.2.1 光照的影响

光照条件是微藻生长和代谢的关键环境因子之一，是微藻的主要能量来源^[38]，光照对雨生红球藻生长以及虾青素的积累的影响主要表现光质、光强、光周期方面的影响。

(1) 光质的影响

白光、红光和蓝光都能够影响雨生红球藻的生长和虾青素的积累。据研究，红光和蓝光在小球藻中是最有效的光合光源^[39]，在雨生红球藻中也同样有效，能够分别影响雨生红球藻的两个不同的生理阶段。红光能够促进雨生红球藻在绿色生长阶段细胞分裂，提高生长速率，而蓝光可以刺激细胞成熟，因此蓝光在雨生红球藻红色诱导虾青素阶段能够促进虾青素的积累^[40]。不同光色的组合也可以促进雨生红球藻生长和虾青素的积累，李可^[41]等人发现红蓝光波比为 2 比 1 混合光时对雨生红球藻的光合作用最有效，此时的生物量比在红光下提高 19%。

(2) 光照强度的影响

雨生红球藻绿色生长阶段和红色诱导阶段两阶段的光照需求是不同的,在绿色阶段,适宜的光照强度范围为 50–120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。研究发现,低光强 ($<30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 下藻细胞分裂速度较快,但生物量积累效率较低;中等光强 (50–90 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 可平衡光合作用与细胞增殖,促进生物量增长 [42]。在红色诱导阶段,高光强 ($>150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 是诱导虾青素合成的关键因素,然而,过高的光强 (如 291 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 会导致光合系统II (PSII) 受损,醌受体 (QA) 氧化还原失衡,抑制电子传递链,最终降低虾青素产量 [43]。高光胁迫是通过产生活性氧 (ROS) 激活虾青素合成基因 (如 β -胡萝卜素酮化酶)。

(3) 光周期的影响

不同的光周期对雨生红球藻的生长及虾青素的积累也有一定的影响 [44]。研究表明,雨生红球藻的生物量 (如细胞密度和细胞干重) 随光照时间延长呈先升后降趋势。在光周期为 16L:8D (光照 16 小时/黑暗 8 小时) 时,生物量达到最高,显著高于连续光照 (24L:0D) 或连续黑暗 (0L:24D) 条件下的生物量 [45],这可能与藻细胞在适度光周期下的光合作用和呼吸作用的平衡有关。与生物量不同,虾青素含量随光照时间延长持续增加,江红霞等人对在不同光强 (120~270 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) 和光周期 (光/暗:0/24~24/0h) 的光照对雨生红球藻胁迫下虾青素积累和抗氧化活性的影响进行研究,研究表明雨生红球藻在 270 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 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 [46]。

1.2.2 碳源的影响

雨生红球藻具有混合营养模式 [47, 48], 无机碳是雨生红球藻光合自养阶段的主要碳源,在无机碳 (如 CO_2) 利用方面,适当浓度可增强光合作用并提升生物量,但高浓度可能抑制虾青素合成,如低浓度 CO_2 结合高光或氮饥饿条件能通过胁迫响应 (如氧化应激) 促进虾青素积累 [49]。有机碳 (如葡萄糖) 在混合营养模式下可促进雨生红球藻细胞生长,低浓度通过调节碳氮比 (C/N) 能够促进脂质和虾青素合成,但过量会导致光合系统被抑制 [50]。研究发现,两阶段培养策略 (生长阶段高有机碳+胁迫阶段低氮高光) 结合红光诱导的固碳增强机制 [31], 从而提高虾青素的产量。

1.2.3 氮磷元素的影响

氮是雨生红球藻生长和代谢的关键营养元素,氮饥饿会显著抑制细胞分裂,

但是能够诱导虾青素的积累,在氮饥饿条件下(如培养基中 NaNO_3 浓度降至 0),细胞中叶绿素浓度会降低,从而降低了光的吸收,使藻细胞增殖速率显著下降,但细胞内虾青素含量会快速升高^[51],氮饥饿和强光的组合是雨生红球藻快速积累虾青素的最佳策略^[52, 53],被广泛用于雨生红球藻虾青素的生产。磷饥饿对虾青素积累的促进作用较弱,但与氮饥饿协同可增强效果,磷饥饿会减缓细胞生长速率,但虾青素积累量仅提高约 1.5 倍,这可能与磷在能量代谢(ATP 合成)中的核心作用相关^[54],因此同时缺氮和缺磷是提高雨生红球藻产虾青素的方法之一。

1.2.4 盐度的影响

盐度是影响雨生红球藻生长及虾青素积累的环境因素之一,雨生红球藻属于淡水藻种,因此对盐的耐受度低,低浓度盐不会影响藻细胞的生长速率,而高浓度的盐会对雨生红球藻产生胁迫^[55],研究表明,盐度(如 NaCl)超过 0.5%时,细胞分裂速率逐渐下降,在 1.5% NaCl 条件下,生物量比对照组减少约 30%,而 3% NaCl 时几乎完全抑制生长,极端高盐度(>5% NaCl)会导致细胞膜损伤和光合系统失活,引发细胞死亡^[56]。尽管盐度胁迫抑制生长,但可显著诱导虾青素合成,盐胁迫主要通过以下途径促进虾青素的积累:活性氧(ROS)的积累、关键酶激活以及渗透调节响应^[57]。盐胁迫还可以通过与其他的胁迫因子进行协同作用诱导雨生红球藻积累虾青素。

1.2.5 温度和 pH 的影响

温度和 pH 值是影响雨生红球藻生长和虾青素积累的两个关键环境因素。在温和的温度范围内(20-25°C)下对雨生红球藻的生长有促进作用,在较低温度(<15°C)下,生长变得缓慢,而在高温(>30°C)下,则会抑制细胞生长甚至死亡,在 25-30°C 的高温下会促进雨生红球藻虾青素的积累^[58]。雨生红球藻的生长最适 pH 范围为 6.5-8.0,在过酸(<6.0)或过碱(>9.0)的环境中,都会降低细胞活力,抑制细胞的生长。pH 对虾青素积累的影响较为间接,一般是通过影响藻细胞的生理代谢和胁迫反应来实现,适度的 pH 偏离(如弱酸性或者弱碱性)都可能对虾青素的合成有一定促进作用^[59]。因此选择合适温度和 pH 能够促进雨生红球藻的生长和虾青素的积累。

1.3 醋酸盐对雨生红球藻的影响

1.3.1 醋酸盐对雨生红球藻生长的影响

醋酸盐作为有机碳源,能够被雨生红球藻利用,从而影响其生长和代谢活动。研究表明添加醋酸盐可显著改变其碳代谢模式,在混合营养条件下,藻细胞既能利用光能固定 CO_2 ,又能吸收醋酸盐作为额外碳源,从而进一步促进生物量的积累^[60, 61]。添加醋酸盐会显著抑制叶绿素合成。在氮饥饿条件下,添加醋酸钠会降低叶绿素的含量,同时 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性也会大幅降低,这表明醋酸盐通过干扰光合作用关键酶的活性,将代谢重心从光合自养模式转向异养或混合营养模式。在氮代谢调控方面,醋酸盐能够激活硝酸还原酶(NR)活性,从而促进硝酸盐的快速消耗。研究表明,添加醋酸钠后, NR 活性提高 1.6 倍,培养基中硝酸盐浓度迅速降低,造成氮缺乏的状态,从而限制藻细胞的营养生长阶段,使雨生红球藻进入胁迫阶段^[60]。

1.3.2 醋酸盐对雨生红球藻虾青素积累的影响

醋酸盐对虾青素的积累具有促进作用,雨生红球藻积累虾青素的关键因素是环境因素胁迫。醋酸盐通过抑制光合作用和加速氮消耗,与高光、高温等胁迫条件共同作用,从而显著提高虾青素的产量^[62]。研究表明,在醋酸钠诱导下,雨生红球藻能够快速进行虾青素的合成,在培养前期便能积累虾青素^[63]。在营养盐缺乏的胁迫条件下,添加醋酸盐可显著缩短虾青素的积累周期。高政权等人^[64]发现 45 mM 醋酸盐与 450 μM 亚铁离子(Fe^{2+})联合处理时,雨生红球藻在 25°C、6000 lx 连续光照下仅需 24 小时即可完成虾青素的大量积累,相比空白对照组提前一个月实现藻细胞完全红色化。然而,这种快速诱导过程可能导致部分藻细胞白化或死亡,使虾青素总产量可能下降,因此醋酸盐的使用需优化浓度与胁迫条件。醋酸钠的添加还会显著提高硝酸还原酶(NR)活性,加速硝酸盐的消耗,导致培养液中氮源迅速缺乏,从而促进虾青素合成^[65]。

1.3.3 雨生红球藻醋酸盐代谢机制

在微藻中醋酸盐代谢机制是一个复杂的过程,涉及多个层面的吸收、代谢和调控。微藻通过细胞膜上的转运蛋白吸收醋酸盐,可能依赖质子梯度或钠离子耦合转运系统。对于环境的影响,培养基的 pH 影响醋酸盐的存在形式(解离的乙酸根或未解离的乙酸),后者更易穿透细胞膜,酸性环境可能促进吸收^[66]。此外,醋酸盐能作为碳骨架来源,可能通过甲羟戊酸(MVA)途径,促进异戊烯焦磷酸

(IPP) 的生成, 从而加速虾青素合成, 促进虾青素的积累^[67]。雨生红球藻通过乙酰辅酶 A 合成酶 (*acs*) 将醋酸盐转化为乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA), 随后通过多条代谢途径实现碳源分配与功能整合: 在氮充足时, 乙酰辅酶 A 进入 TCA 循环氧化供能, 支持细胞生长; 而在胁迫条件 (如高光、缺氮) 下, 碳流转向脂质合成途径 (通过脂肪酸合酶生成三酰甘油) 和虾青素生物合成 (经甲羟戊酸途径生成异戊烯焦磷酸, 最终由 β -胡萝卜素酮化酶催化形成虾青素)。此过程中, 醋酸盐代谢不仅提供前体物质, 其衍生的活性氧 (ROS) 还可激活胁迫信号, 协同调控脂质储存与虾青素积累, 形成独特的代谢-抗氧化耦合机制。研究表明, 虾青素合成的关键基因 (如 *PSY*、*BKT*、*CHY* 等) 在醋酸盐的胁迫条件下表达上调, 其启动子区域可能含有 ROS 响应元件, 从而被醋酸盐间接调控^[68]。

1.4 微藻适应性进化

适应性进化 (Adaptive Evolution, ALE) 是指在微生物自然选择或人工选择压力下, 通过基因变异和选择积累, 表现出对环境变化或特定条件的适应过程。在微藻中, 适应性进化是通过长期暴露于特定胁迫条件下筛选高耐受性菌株的有效策略, 已被用于提高微藻对高温、高盐或污染物等胁迫的耐受性^[69]。微藻作为单细胞光合生物, 具有快速生长、高光合效率及遗传可塑性强的特点, 其基因组对环境压力 (如光照、温度、营养限制等) 的响应机制复杂且灵活。适应性进化通过模拟自然选择过程, 在实验室中持续施加特定环境压力 (如高盐、高污染、极端 pH 等), 加速微藻的适应性突变, 从而筛选出具有目标性状 (如污染物耐受性、高油脂积累) 的优良菌株。环境压力的适应性进化一般通过梯度加压的方法逐步增加环境压力强度 (如污染物浓度、盐度), 促使微藻逐步适应极端条件, 而定向筛选则是结合基因编辑技术 (如 CRISPR) 或诱变手段 (如辐照、化学诱变), 加速特定功能基因的突变与筛选。研究表明, 微藻在 ALE 过程中常通过光合系统优化、营养代谢重构、抗氧化能力增强等途径实现适应性进化^[70]。近年来, 适应性进化技术成功应用于小球藻 (*Chlorella*) 和莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 等藻种的胁迫耐受性改良, 例如 Z.-Hun Kim 等人通过适应性进化培育出耐受 40 g/L 氯化钠小球藻^[71], Wladimir A. Fae Neto 等人通过适应性进化培育出耐高光的莱茵衣藻藻种^[72]等, 但其在雨生红球藻中的研究较少, 尤其是针对有机碳源的适应代谢机制尚未明晰。通过适应性进化技术提升雨生红球藻对

醋酸钠的耐受性，可为优化其培养工艺和代谢调控提供新思路。

1.5 研究内容、意义和技术路线

1.5.1 研究内容

（1）雨生红球藻两阶段醋酸盐利用条件优化

在雨生红球藻两阶段添加不同浓度醋酸钠，通过生物量、叶绿素、虾青素、蛋白、油脂、糖分、乙酸盐浓度等参数变化，确定雨生红球藻两阶段醋酸钠最佳初始添加浓度。醋酸钠设置两阶段培养过程不同时间补加不同浓度醋酸钠，进一步优化醋酸钠醋酸盐利用条件，提高绿色阶段的生物量和红色阶段的虾青素含量。

（2）醋酸盐影响雨生红球藻代谢机制分析

基于报道的雨生红球藻基因组及转录组数据，收集并分析醋酸盐吸收利用关键基因 *acs* 序列，探究各 *acs* 基因在两阶段随时间的表达量变化。此外，进一步分析 *acs*、TCA 循环、碳固定、脂质合成以及虾青素合成相关关键基因在醋酸钠添加及补加条件下的变化，探讨雨生红球藻醋酸盐作用的代谢机制。

（3）雨生红球藻耐醋酸盐适应性进化

为提高雨生红球藻耐醋酸盐的能力，通过短周期-多循环的驯化方式，定向获得耐高浓度醋酸盐的雨生红球藻藻种，并对驯化藻种与野生型藻种进行对比实验，探究驯化藻种在醋酸盐利用、生长、油脂积累、虾青素积累等方面的特性。

1.5.2 研究意义

天然虾青素凭借超强的抗氧化能力在多个领域展现出重要的应用价值，雨生红球藻是天然虾青素的最佳来源，大规模雨生红球藻培养高效生产天然虾青素能面临着很多挑战。醋酸盐作为一种经济高效的有机碳源，能够通过混合营养模式显著提升雨生红球藻生物量的积累和虾青素的积累，然而，目前雨生红球藻对醋酸盐利用率低、耐受度低且耐醋酸盐的机制尚不清晰，因此提高雨生红球藻对醋酸盐的利用率和耐受度，并探究其耐醋酸盐机制具有重要意义。

基于此，本研究主要对雨生红球藻在绿色生长期和红色诱导期的醋酸盐利用条件优化，设计了多次补加醋酸盐的实验促进绿色生长期藻的生长以及提高红色诱导期雨生红球藻生产虾青素的产量，并通过 RT-qPCR 对关键基因表达变化分析醋酸盐利用机制。此外，通过适应性进化培育出耐醋酸盐藻种提高雨生红球藻对醋酸盐的耐受度。本研究提出了一个提高雨生红球藻对醋酸盐利用的优化方案，

阐明其耐醋酸盐机制，并通过适应性进化定向培育出耐醋酸盐的雨生红球藻藻种，为未来醋酸盐在雨生红球藻中的改进应用提供了实践见解和理论基础。

1.5.3 技术路线

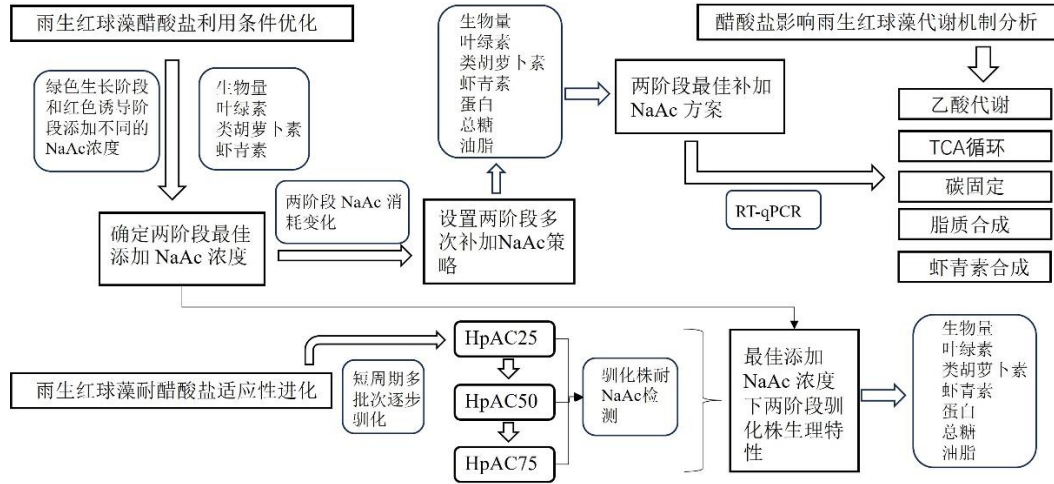


图 1.3 本研究技术路线图

Fig 1.3 Technical Roadmap of This Study

第2章 雨生红球藻两阶段醋酸盐利用条件优化

2.1 引言

单细胞藻类雨生红球藻被认为是天然虾青素生产最多的来源，约占干重的 4% 以上^[73]。雨生红球藻生产虾青素的另一个优点是，它仅由雨生红球藻中 3S-3'S 组成，这在三种虾青素的构造中显示出最好的生物活性和安全性^[74]。此外，根据细胞干重（DCW），雨生红球藻的工业产品不仅是虾青素，还含有其他活性丰富的物质，例如 17-45% 的蛋白质、15-40% 的碳水化合物和 20-37% 的脂质含量^[75]。雨生红球藻的培养通常采用两阶段培养的策略^[76]，同时利用有利的生长条件在绿色营养阶段快速促进细胞密度积累生物量，并设置各种胁迫条件，例如高光^[77]、盐胁迫^[77]，氮饥饿^[78]、化学诱导剂^[79]等，刺激虾青素的积累，并伴随着红色诱导期丰富脂质的积累。

雨生红球藻可以利用有机碳，如乙酸盐、葡萄糖和甘油^[80, 81]，其中醋酸钠是一种廉价且有效的有机碳源，适用于雨生红球藻的两个阶段^[4, 5]。基于自养条件添加醋酸钠的混合营养培养可以收获高生物量、虾青素和脂质^[82]，尽管污染的风险也会增加^[5]。然而，与其他可以混合营养培养的经济微藻相比，如小球藻、小球藻、三角褐指藻，雨生红球藻的生长速率和生物量水平要低得多^[83]，这已成为制约这种藻类养殖业发展的关键因素。雨生红球藻在绿色营养的运动细胞对培养条件非常敏感^[84]，这些条件容易转化为非运动细胞，从而停止细胞分裂并减慢生长速度。在开始时添加相对高浓度的醋酸钠可以引起上述转化和抑制雨生红球藻中的光合碳固定^[85, 86]。此外，在初始红色阶段，醋酸钠的添加会导致雨生红球藻的细胞损伤和死亡^[5]，导致虾青素的生产急剧下降。在小球藻中，用于细胞生长的醋酸钠的最佳浓度可达 10 g/L^[87]，远高于雨生小球藻中使用的浓度。在 *Micractinium reisseri* 的培养过程中，分批次补加醋酸钠显著提高生物量和脂质含量^[82]。因此，分批次补加醋酸钠可能是减少醋酸钠对雨生红球藻两个阶段的负面影响的有效方法。

本章对 0-10 g/L 醋酸钠范围内研究了雨生红球藻两个阶段的最佳醋酸钠的添加浓度，基于最初的最佳醋酸钠浓度，进一步研究了添加醋酸钠培养过程中提

供的模式，本研究为未来醋酸钠在雨生红球藻中应用的改进提供了实践见解。

2.2 材料与方法

2.2.1 雨生红球藻培养基

改良的 BG-11 培养基(1 L 液体所含物质质量): NaNO_3 0.25 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.045 g, KH_2PO_4 0.175 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1257g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0266 g, 柠檬酸铁 0.0076 g, $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ 0.001 g, 维生素 B_1 0.001 g, 维生素 biotin 0.25 μg , 维生素 B_{12} 50 μg , H_3BO_3 2.86 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.86 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08 mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.5 ~ 7.6, 在 121 $^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 20 min, 固体培养基则在液体培养基中加入 15 g/L 的琼脂。

2.2.2 实验样品和培养条件

本研究使用的雨生红球藻原始菌株 *H. pluvialis* 797 购买自中国科学院水生生物研究所。培养温度为 23 ± 1 $^\circ\text{C}$ 。绿色阶段的光强度为 $1,500 \pm 300$ lux, 红色阶段的光强度为 $8,000 \pm 500$ lux, 光周期为 12 小时: 12 小时(亮: 暗)。改良 BG-11 培养基在绿色阶段用于雨生红球藻的培养, 在红色阶段使用缺氮和缺磷的 BG-11 培养基用于虾青素诱导。在两个阶段中, 均使用 250 mL 锥形瓶, 工作液体积为 200 mL。每个样品中加入 100 mg/L 氨苄青霉素进行培养。

2.2.3 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

2.2.4 实验设计

(1) 雨生红球藻两个阶段最佳醋酸钠浓度的测定

本实验旨在评价不同浓度的醋酸钠分别在绿色和红色阶段对雨生红球藻的影响。在绿色阶段, 醋酸钠浓度设置为 0、0.5、1、1.5、2.5 和 5 g/L。在红色阶段, NaAc 浓度设置为 0、1、2.5、5、7.5 和 10 g/L。0 g/L 醋酸钠为自养对照。在绿色阶段对细胞密度、细胞干重(DCW)、叶绿素含量和培养基中醋酸钠浓度变化进行检测, 在红色阶段检测细胞干重(DCW)、叶绿素含量、虾青素含量和培养基醋酸钠的浓度变化。

(2) 雨生红球藻两个阶段最佳醋酸钠补加模式的确定

在初始添加 1 g/L 醋酸钠的基础上, 针对雨生红球藻两个培养阶段(绿色阶

段与红色阶段) 设置了 5 种培养过程中额外补加醋酸钠的模式 (如表 2-1): 分别单次补加 1 g/L、2 g/L、3 g/L, 分两天每天补加 1 g/L (共 2 次), 以及分 3 天每天补加 1 g/L (共 3 次)。其中绿色阶段的额外补加起始于第 6 天, 而红色阶段起始于第 3 天。对照组设置包含自养对照组 (0 g/L 醋酸钠) 和仅初始添加 1 g/L 醋酸钠 (不进行额外补加) 的对照组。除检测上述中提到的指标外, 还检测了脂质、可溶性蛋白和碳水化合物的含量。

表 2-1 补加醋酸钠的培养模式

Table 2-1 Culture Mode with Supplemental Sodium Acetate

分组	绿色阶段	红色阶段
自养对照	不添加 NaAc (Control)	不添加 NaAc (Control)
异养对照	添加 1 g/L NaAc (1 ^{0d})	添加 1 g/L NaAc (1 ^{0d})
模式 1	添加 1 g/L NaAc 第 6 天补加 1 g/L NaAc (1 ^{0d} +1 ^{6d})	添加 1 g/L NaAc 第 3 天补加 1 g/L NaAc (1 ^{0d} +1 ^{3d})
模式 2	添加 1 g/L NaAc 第 6 天和第 7 天补 1 g/L NaAc (1 ^{0d} +1 ^{6d} +1 ^{7d})	添加 1 g/L NaAc 第 3 天和第 4 天补 1 g/L NaAc (1 ^{0d} +1 ^{3d} +1 ^{4d})
模式 3	添加 1 g/L NaAc 第 6 天、第 7 天和第 8 天补加 1 g/L NaAc (1 ^{0d} +1 ^{6d} +1 ^{7d} +1 ^{8d})	添加 1 g/L NaAc 第 3 天、第 4 天和第 5 天补加 1 g/L NaAc (1 ^{0d} +1 ^{3d} +1 ^{4d} +1 ^{5d})
模式 4	添加 1 g/L NaAc 第 6 天补加 2 g/L NaAc (1 ^{0d} +2 ^{6d})	添加 1 g/L NaAc 第 3 天补加 2 g/L NaAc (1 ^{0d} +2 ^{3d})
模式 5	添加 1 g/L NaAc 第 6 天补加 3 g/L NaAc (1 ^{0d} +3 ^{6d})	添加 1 g/L NaAc 第 3 天补加 3 g/L NaAc (1 ^{0d} +3 ^{3d})

2.2.5 细胞密度和细胞干重的测量

在绿色生长阶段, 细胞密度通过 1 mL 藻液 OD680 值与血球计数板计数的对应关系进行计算, 计算公式如下:

$$\text{细胞密度} (\times 10^4 \text{ cell/mL}) = 16.72 \times \text{OD680} - 9.16 \quad (R^2=0.9996) \quad (1)$$

干重 (DCW) 检测方法: 取 10 mL 藻液, 4500 rpm 离心 10 分钟, 弃去上清

液后使用灭菌去离子水洗涤藻细胞三次。收集细胞沉淀后放入真空冷冻干燥机中（南京金斯，中国）干燥后，通过称重并减去管重获得 DCW 值。

2.2.6 叶绿素和虾青素的测量

取 10 mL 藻液经 4500 rpm 离心 10 分钟后，使用冷冻研磨仪（上海净信，中国）破碎藻细胞，甲醇完全浸提。叶绿素与虾青素含量计算参照文献方法^{[88][89]}，计算公式如下：

$$\text{叶绿素 a (mg/L)} = 15.65 \times A_{666} - 7.34 \times A_{653} \quad (2)$$

$$\text{叶绿素 b (mg/L)} = 27.05 \times A_{653} - 11.21 \times A_{666} \quad (3)$$

$$\text{总叶绿素 (mg/L)} = \text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b} \quad (4)$$

$$\text{虾青素 (mg/L)} = 0.8 \times (1000 \times A_{470} - 2.86 \times \text{叶绿素 a} - 129.2 \times \text{叶绿素 b}) / 221 \quad (5)$$

2.2.7 培养基中醋酸钠浓度的测量

取 1 mL 培养基经 8000 rpm 离心 5 分钟，上清液过 0.22 μm 滤膜后，采用高效液相色谱系统（HPLC，岛津，日本）搭配 Aminex HPX-87H 色谱柱（伯乐生命医学，美国）检测。参考 Joun 等人方法^[81]：柱温为 50°C，流动相为 5 mM 硫酸，流速 0.6 mL/min。

2.2.8 蛋白、碳水化合物及脂质含量测定

可溶性蛋白与碳水化合物含量分别使用 BCA 蛋白检测试剂盒和总糖检测试剂盒（苏州科铭，中国）按说明书测定。

雨生红球藻油脂定量分析采用改良酸热萃取法^[90]：精确称取 10 mg 冻干藻粉与 10 mL 4 mol/L 盐酸溶液混合，经涡旋震荡仪充分混匀后，置于常温条件下静置反应指定时长。随后将样品置于沸水环境中进行 5 分钟热激处理，立即转移至 -20°C 低温环境急冷 20 分钟。冷却体系依次注入等体积甲醇和氯仿进行相分离，分别震荡处理 2 分钟使充分乳化。经 6000 rpm 高速离心 10 分钟后，精准收集下层有机相。为纯化提取物，向有机相中加入等体积 0.15% NaCl 溶液进行液液萃取，4500 rpm 二次离心后获取精制氯仿层。最终通过旋转蒸发去除有机溶剂，80°C 恒温干燥箱中持续脱水至质量恒定，精确称量获得脂质提取物质量。

$$\text{油脂含量按以下公式计算：油脂含量(\%)} = \text{油脂质量} / \text{藻体干重} \times 100\% \quad (6)$$

2.2.9 生物重复和统计分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，所有数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。每组实验设置三个生物学重复（ $n=3$ ）。显著性差异通过单因素方差分析（ANOVA）结合 Waller-Duncan 多重比较检验进行判定，不同字母标注的组间差异达到显著性水平（ $p<0.05$ ）。使用 Origin 2023 进行绘图。

2.3 结果与讨论

2.3.1 醋酸钠初始添加量对绿色阶段的影响

在绿色阶段，1 g/L 醋酸钠处理组表现出最高细胞密度（ 5.58×10^5 cell/mL，图 2-1 a）和叶绿素含量（15.18 mg/L，图 1-c），同时维持较高细胞干重（0.73 g/L，图 2-1 b）。2.5 g/L 处理组虽获得最高干重（0.75 g/L，图 2-1 b），但在后期叶绿素的合成受到了抑制（图 2-1 c）。5 g/L 处理组则显著的抑制了细胞密度、干重及叶绿素含量，其各项指标均低于自养对照组（未添加醋酸钠）（图 2-1 a-c）。培养基中醋酸钠浓度变化显示，0.5-1.5 g/L 处理组的醋酸钠可在 6 天内完全消耗，而 2.5 g/L 组需延长至 9 天（图 2-1 d）。5 g/L 组在 15 天培养期间仅吸收约 4 g/L 醋酸钠（图 2-1 d）。结果表明，在绿色阶段的混养培养中，低浓度醋酸钠（0.5-1.5 g/L）在前 6 天内可以被雨生红球藻快速吸收，所吸收的乙酸能够有效的促进细胞生长同时不降低叶绿素含量；而高浓度醋酸钠（5 g/L）虽然可以吸收 4 g/L 醋酸钠，但过量供给反而不利于雨生红球藻细胞的生长。相较于普通小球藻（*Chlorella vulgaris*）的最适生长浓度 10 g/L 醋酸钠^[87]，雨生红球藻对醋酸钠的利用能力显著偏低。

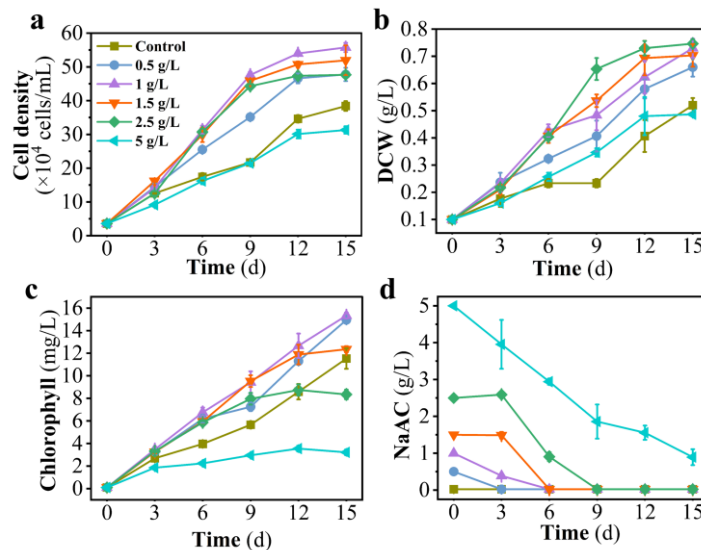


图 2-1 绿色阶段不同醋酸钠初始添加浓度对细胞密度（a）、干重（b）、叶绿素（c）及培

培养基醋酸钠浓度（d）的影响。所有处理组均在光照强度 1500 ± 300 lux、氮磷充足的条件下培养。"Control"为未添加醋酸钠的自养培养组。图 b-d 的图例说明与图 a 一致。

Fig.2-1 Changes in cell density (a), DCW (b), chlorophyll (c) and NaAc concentration in medium (d) under initially addition of different concentrations of NaAc during the green. All the groups were cultured under $1,500 \pm 300$ lux with sufficient nitrogen and phosphorus. "Control" was autotrophic cultured without NaAc addition. The legends for "b-d" were same as for "a".

2.3.2 醋酸钠初始添加量对红色阶段的影响

在高光且氮磷缺乏的红色阶段培养条件下，雨生红球藻的乙酸吸收能力较绿色阶段显著下降（图 2-2 d）。1-10 g/L 醋酸钠添加范围内，吸收量仅为 0.54-1.72 g/L，其中最大吸收量出现在 7.5 g/L 组（1.72 g/L），且所有处理组在 15 天内均未完全消耗醋酸钠（图 2-2 d）。与绿色阶段类似，2.5 g/L 组获得最高生物量（0.84 g/L，图 2-2 b）；但虾青素含量最高的峰值（4.37 mg/L，图 2-2 a）出现在 1 g/L 组，该组生物量位列第二（0.82 g/L，图 2-2 b）。自养对照组生物量最低（0.65 g/L，图 2-2 b），但其虾青素含量仍高于 5-10 g/L 处理组（图 2-2 a）。结果表明，红色阶段条件下低浓度醋酸钠（1-2.5 g/L）可协同促进生物量与虾青素积累。之前的研究虽然已经报道了醋酸钠在红色阶段的促进作用，但最佳添加浓度存在 1-6 g/L 的差异 [86, 91, 92]。本研究建议红色阶段初始醋酸钠的最适添加浓度为 1 g/L，可在获得较高生物量的同时实现虾青素高效积累。

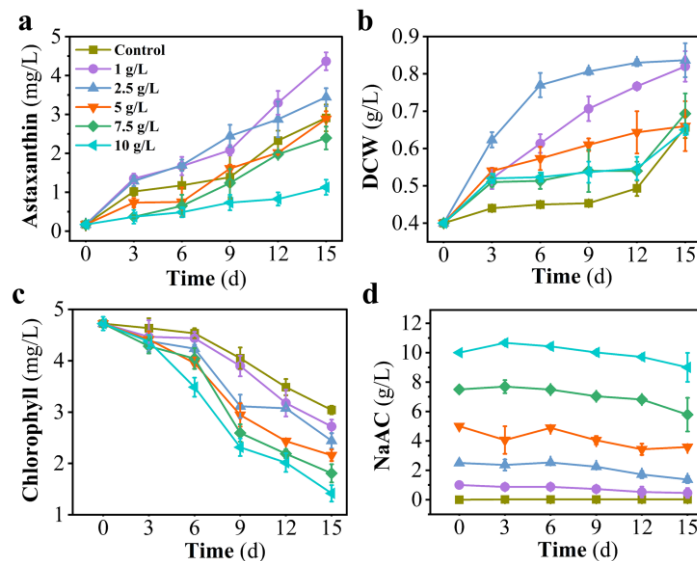


图 2-2 红色阶段不同醋酸钠初始添加浓度对虾青素 (a)、干重 (b)、叶绿素 (c) 及培养基醋酸钠浓度 (d) 的影响, 所有处理组均在光照强度 8000 ± 500 lux、缺氮缺磷的条件下培养。"Control"为未添加醋酸钠的自养培养组。图 b-d 的图例说明与图 a 一致。

Fig.2-2 Changes in astaxanthin (a), DCW (b), chlorophyll (c) and NaAc concentration in medium (d) under initially addition of different concentrations of NaAc during the red stage. All the groups were cultured under $8,000 \pm 500$ lux with nitrogen and phosphorus deficiency. Control was autotrophic cultured without NaAc addition. The legends for "b-d" were same as for "a"

2.3.3 醋酸钠补加策略对雨生红球藻两阶段培养的影响

基于醋酸钠对生物量与虾青素积累的促进作用及其浓度敏感性 (图 2-1, 2-2), 本研究在初始 1 g/L 醋酸钠基础上, 进一步探索了两阶段培养中的 5 种补加策略。

(1) 醋酸钠补加对绿色阶段的影响

在绿色阶段, 从第 6 天至第 8 天分 1-3 次补加 1-3 g/L 醋酸钠 (图 2-3)。醋酸钠浓度检测结果显示, 从第 6 天到第 15 天, 所有补加的醋酸钠 (≤ 2 g/L) 均可被完全吸收 (图 2-3 c)。与自养对照组相比, 添加及补加醋酸钠的培养组细胞密度 (图 2-3 a)、干重 (图 2-3 b)、叶绿素 (图 2-3 d) 和碳水化合物含量 (图 2-3 e) 均显著提高。相较于绿色阶段最优初始添加量 1 g/L 组 (图 2-1), 第 6 天补加 1 g/L 可使细胞密度、干重、叶绿素和碳水化合物分别增加 14.58%、10.59%、9.75% 和 30.76%。此外, 补加醋酸钠未显著改变脂质含量 (图 2-3 e), 但补加 2-3 g/L 组可溶性蛋白显著降低 (图 2-3 e)。结果表明, 在初始 1 g/L 醋酸钠基础上补加醋酸钠可显著促进绿色阶段藻体生长, 其中第 6 天补加 1 g/L 效果最佳。此现象与微绿藻 FM1 (*Micractinium reisseri* FM1) 的分批补料研究结果一致 [82]。值得注意的是, 即使采用补加模式, 当补加量 ≥ 2 g/L 时仍会抑制蛋白合成 (图 2-3 e)。

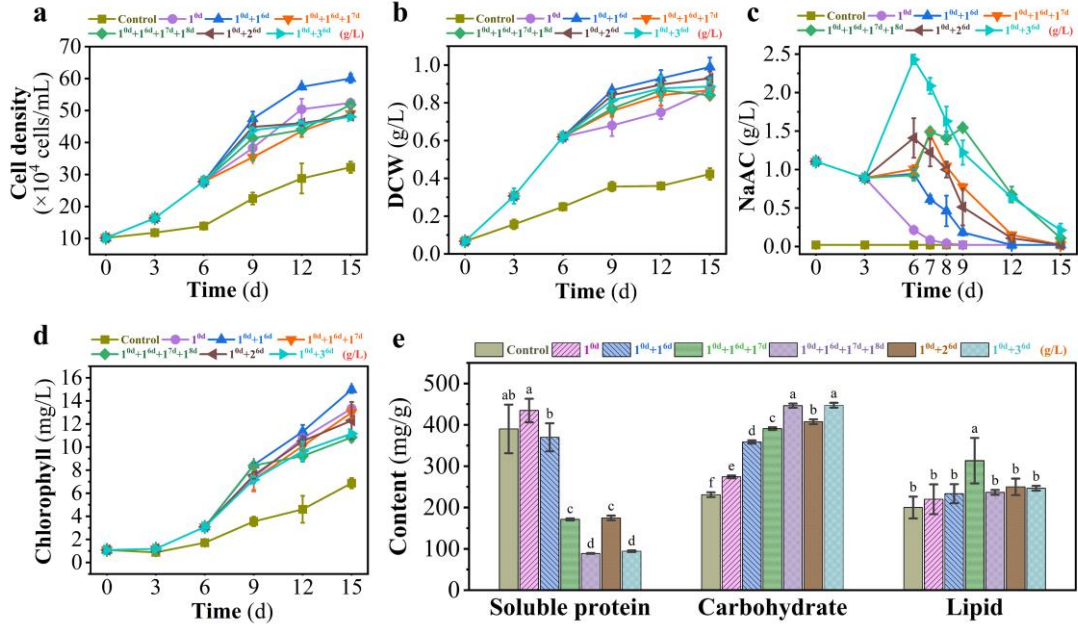


图 2-3 绿色阶段不同醋酸钠补加模式下细胞密度 (a)、干重 (b)、培养基醋酸钠浓度 (c)、叶绿素含量 (d) 及蛋白/碳水/脂质含量 (e) 的变化。图例中数字表示醋酸钠添加浓度 (g/L)，上标数字表示补加次数。数据以均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=3$)。不同字母标注的柱形表示组间存在显著性差异 ($p<0.05$)，通过单因素方差分析 (Waller-Duncan 检验) 确定。

Fig. 2-3 Changes in cell density (a), DCW (b), NaAc concentration in medium (c), chlorophyll content (d), and contents of protein, carbohydrate, and lipid (e) under different NaAc supplied modes in the green stage. The number in the legends represents the added concentration of NaAc, and the superscript on the number represents the supplied time of NaAc. Data were presented as means $\pm$ SD ($n = 3$). Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), determined by one-way ANOVA based on the Waller-Duncan test.

(2) 醋酸钠补加对红色阶段的影响

在红色阶段，基于初始 1 g/L 醋酸钠，从第 3 天至第 5 天分 1-3 次补加 1-3 g/L 醋酸钠 (图 2-4)。结果显示，所有培养组的乙酸吸收率均较低 (图 2-4 d)，与图 1h 趋势一致。相较于自养对照组，醋酸钠添加及补加组的生物量 (0.61-0.86 g/L vs 0.45 g/L)、脂质含量 (360-466.67 mg/g vs 326.67 mg/g) 和虾青素含量 (5.06-5.90 mg/L vs 3.54 mg/L) 显著提高，但可溶性蛋白含量大幅下降 (25.20-31.40 mg/g vs 109.42 mg/g)。与初始 1 g/L 组相比，第 3 天补加 1 g/L 组的生物量 (0.86 g/L vs 0.68 g/L) 和脂质含量 (466.67 mg/g vs 396.67 mg/g) 显著增加，而虾青素含量

(5.66 mg/L vs 5.90 mg/L) 无显著差异 (图 2-4 a, e)。结果表明, 红色阶段在初始 1 g/L 基础上, 第 3 天补加 1 g/L 醋酸钠可同时提高生物量与脂质积累, 是最佳补加模式。

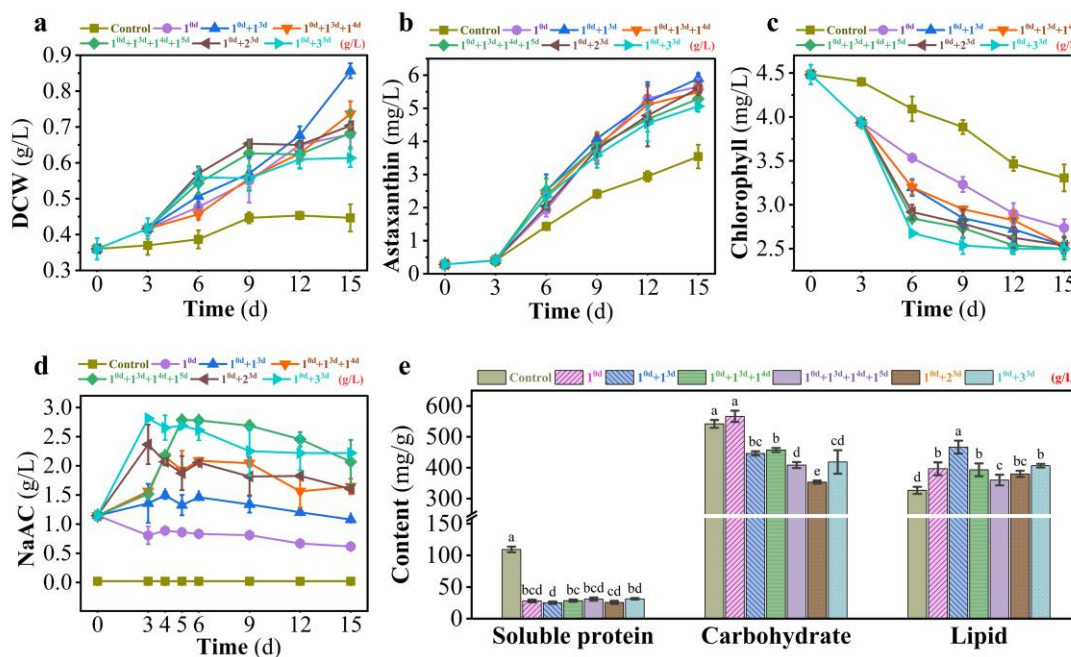


图 2-4 红色阶段不同醋酸钠补加模式下干重 (a)、虾青素 (b)、叶绿素含量 (c)、培养基醋酸钠浓度 (d) 及蛋白/碳水/脂质含量 (e) 的变化。图例中数字表示醋酸钠添加浓度 (g/L), 上标数字表示补加次数。数据以均值±标准差表示 (n=3)。不同字母标注的柱形表示组间存在显著性差异 ($p < 0.05$), 通过单因素方差分析 (Waller-Duncan 检验) 确定。

Fig. 2-4 Changes in DCW (a), astaxanthin (b), chlorophyll content (c), NaAc concentration in medium (d), and contents of protein, carbohydrate, and lipid (f) under different NaAc supply modes in the red stage. The number in the legends represents the added concentration of NaAc, and the superscript on the number represents the supplied time of NaAc. Data were presented as means $\pm$ SD ($n = 3$). Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), determined by one-way ANOVA based on the Waller-Duncan test.

2.4 本章小结

本章通过系统探究在雨生红球藻绿色阶段与红色阶段两阶段中初始添加及补加醋酸钠 (NaAc) 的策略, 在绿色生长期添加 1 - 5 g/L 醋酸钠, 红色诱导期

添加 1 – 10 g/L 醋酸钠, 结果表明添加 1 g/L 醋酸钠时绿色阶段的生物量及红色阶段虾青素和油脂产量最高, 因此添加 1 g/L 醋酸钠为雨生红球藻利用醋酸盐的最优浓度。根据醋酸钠消耗情况, 对雨生红球藻醋酸盐利用条件优化, 设计一种多批次补充醋酸钠实验, 结果表明在添加 1 g/L 醋酸钠 的基础上, 绿色阶段第 6 天补加 1 g/L 醋酸钠和红色阶段第 3 天补加 1 g/L 醋酸钠为最优补加条件, 该添加模式下与初始添加 1 g/L 醋酸钠相比, 绿色阶段雨生红球藻生物量提高了 14.58%, 红色阶段细胞干重提高了 26.47%、油脂含量提高了 17.65%。实验结果表明初添加 1 g/L 醋酸钠显著促进了雨生红球藻的生长和虾青素积累, 在培养过程中, 额外提供 1 g/L NaAc (绿色阶段第 6 天或红色阶段第 3 天) 可以进一步促进雨生红球藻的生物量和脂质含量。本章揭示了醋酸钠浓度与补加模式对雨生红球藻生长、虾青素的积累及醋酸钠利用效率的影响, 为优化两阶段培养工艺提供了重要理论依据。

第3章 雨生红球藻两阶段添加和多批次补加醋酸盐代谢机制分析

3.1 引言

近期组学研究表明,添加乙酸盐可促进雨生红球藻的三羧酸循环(TCA)、碳水化合物代谢、脂质合成及虾青素合成,但会抑制光合作用^[62, 91]。在模式物种莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中,乙酸盐通过乙酰辅酶A合成酶(*acs*)转化为关键中间代谢物乙酰辅酶A(acetyl-CoA),进而与TCA循环、乙醛酸循环和脂代谢等途径耦联^[83]。在莱茵衣藻中已鉴定出三类*acs*(*acs1-3*),其中*acs2*和*acs3*与乙酸盐吸收及其向脂质合成的转化密切相关^[93, 94]。然而,雨生红球藻中*acs*的类型及功能尚未明确。在上一章的研究中,表示添加1 g/L醋酸钠显著促进了雨生红球藻生长和虾青素积累,额外补充1 g/L醋酸钠(绿色阶段第6天和红色阶段第3天)可以进一步促进雨生红球藻的生物量和脂质含量。为了进一步探究雨生红球藻添加和补加对醋酸钠的利用机制,本章将通过基因层面进行研究。

实时荧光定量PCR(RT-qPCR)是一种结合PCR扩增与荧光检测的技术,具有高灵敏度和特异性、实时定量与动态监测以及快速高效的结果分析等特点,适用于基因表达的研究。本章采用RT-qPCR研究雨生红球藻添加和补加醋酸钠的利用中5种*acss*的表达变化,以及与乙酸盐、TCA循环、碳固定、脂质和虾青素生物合成相关的一系列关键基因的表达变化。希望通过关键酶基因的表达变化来揭示了其代谢调控机制,为未来优化雨生红球藻中醋酸钠的应用提供理论依据。

3.2 材料与方法

3.2.1 雨生红球藻培养基

实验所用雨生红球藻原始菌株 *H. pluvialis* 797 培养基同 2.2.1 中改良的 BG11 培养基。

3.2.2 实验样品

本实验所用藻种同 2.2.1。

3.2.3 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

3.2.4 荧光定量样品培养

在绿色阶段和红色阶段，分别在培养第 0、0.5、1、2、4、8、12 天收集添加 1 g/L 醋酸钠培养的雨生红球藻样品，提取 RNA，检测 *acs 1-5* 表达量的动态变化。此外，以 0 g/L 醋酸钠培养组作为自养对照，添加 1 g/L 醋酸钠作为混合异养组，在添加 1 g/L 基础上绿色阶段第 6 天补加 1 g/L 醋酸钠，红色阶段第 3 天补加 1 g/L 醋酸钠为两阶段最优醋酸钠补加模式组，分别在绿色阶段第 7 天和红色阶段第 4 天收集样本，提取 RNA，检测乙酸代谢、脂质合成及虾青素合成通路中一系列关键基因的表达水平。培养条件同 2.2.2。

3.2.5 总 RNA 提取、检测及反转录

分别在对照组和实验组取 50 mL 藻液 8000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 10 mL 无菌水反复清理两次洗去残留培养基后得到湿藻体，立即用液氮冷冻并放入 -80 °C 冰箱备用。在向灭菌并冷冻过的研钵中加入冷冻的湿藻体，再加入适量液氮后快速充分研磨，得到粉末状藻体，然后使用 EasyPure® Plant RNA Kit（全式金生物，中国）试剂盒进行 RNA 提取，提取的 RNA 进行凝胶电泳检测。剩余 RNA 采用 RTQ-204 反转录试剂盒（Torovid，中国）反转录成单链 cDNA，具体操作按试剂说明书进行。

3.2.6 引物设计和特异性检测

雨生红球藻 *acs* 的系统发育序列分析进化分析使用 MEGA7 软件完成^[95]，基因序列基于雨生红球藻（*Haematococcus pluvialis*）已发表的基因组^[96]和转录组数据^[62]进行鉴定。实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）所用引物中，除 5 对虾青素合成相关引物参照^[92]研究设计外，其余均通过 Primer 5.0 软件设计。所有引物详细信息见表 3-1。

表 3-1 目的基因引物序列

Table 3-1 Primer sequence of target gene

Genes (目的基因)	Primers (引物序列)
<i>act</i> (Reference)(内参)	f: 5'-agcgggagatagtcgggaca-3'; r: 5'-atgccaccgcctccatgc-3'
<i>18s</i> (Reference) (内参)	f: 5'-ccgtcgtagtctcaaccat-3'; r: 5'-ccttcggtcaattccttta-3'
<i>acs1</i> (乙酰辅酶 A 合成酶 1)	f: 5'-gggcttcctcatgatccg-3'; r: 5'-cctcagaggtcccgatgc-3'
<i>acs2</i> (乙酰辅酶 A 合成酶 2)	f: 5'-ggaccaccacagcttcaact-3'; r: 5'-tcttcacgcccacggact-3'
<i>acs3</i> (乙酰辅酶 A 合成酶 3)	f: 5'-gctgactgcggctggatt-3'; r: 5'-gctgcggtcgtgcttctt-3'
<i>acs4a</i> (乙酰辅酶 A 合成酶 4a)	f: 5'-actgctgtgcccacaaggtc-3'; r: 5'-gcgggttgctggtcatct-3'
<i>acs4b</i> (乙酰辅酶 A 合成酶 4b)	f: 5'-gcaaccgtaagcatggagc-3'; r: 5'-gcgtgagtcagggaaca-3'
<i>acs5</i> (乙酰辅酶 A 合成酶 5)	f: 5'-cgtagcagcagcaggagtga-3'; r: 5'-agggcgggtgcatgtgaag-3'
<i>aceB</i> (苹果酸合酶)	f: 5'-ggcatcactgagaagggttg-3'; r: 5'-ggcgtcctcataaggttgt-3'
<i>cs</i> (柠檬酸合酶)	f: 5'-ctgggcgtgaccctttgat-3'; r: 5'-cactgcgaacagcactgtgaa-3'
<i>mdh2</i> (苹果酸脱氢酶)	f: 5'-ctgcggaggttttgaagc-3'; r: 5'-cagcaaggggaggtggtg-3'
<i>pdhC</i> (丙酮酸脱氢酶 E2 组分)	f: 5'-atccatcattgccatcgg-3'; r: 5'-actgccttgagcgtctgc-3'
<i>pckA</i> (磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶)	f: 5'-gacggctatgcgaactggg-3'; r: 5'-tagcgggttgctgggaagg-3'
<i>rbcS</i> (核酮糖二磷酸羧化酶小亚基)	f: 5'-cagcccatcaacaacaagca-3'; r: 5'-ctccaggcagggaatccag-3'
<i>rbcL</i> (核酮糖二磷酸羧化酶大亚基)	f: 5'-acgaatgtttacgcggtgtct-3'; r: 5'-ggtacaccaactccttagca-3'
<i>glgA1</i> (编码糖原合酶)	f: 5'-ccttgggctgcctgacgat-3'; r: 5'-gcacagatgatgctgctttc-3'
<i>glgA2</i> (编码糖原合酶)	f: 5'-caacaaccgcaacagcaaag-3'; r: 5'-tgaggcttggtggtgaggag-3'
<i>accC</i> (乙酰辅酶 A 羧化酶)	f: 5'-actgcggagttaagaaggtga-3'; r: 5'-tgaggtaggagtcgctggagg-3'
<i>accDb</i> (乙酰辅酶 A 羧化酶)	f: 5'-ctgacgcggctgattgagt-3'; r: 5'-gggctggtgaggtggaga-3'
<i>fabD</i> (ACP-S-丙二酸转移酶)	f: 5'-gtggagccagtcagtgaggga-3';

<i>kcs</i> (3-酮脂酰辅酶 A 合成酶)	r: 5'-ccaagcgtcgccgtaagt-3' f: 5'-gagcatggcaaagactggc-3'; r: 5'-cgttggtgggttctgaggt-3'
<i>acsL</i> (长链脂酰辅酶 A 合成酶)	f: 5'-tccctgagatgggctacgatg-3'; r: 5'-ggctccaccacctccactatg-3'
<i>psy</i> (八氢番茄红素合成酶)	f: 5'-gtcgacgggtccaaacgccaataa-3'; r: 5'-gtctggtatcgagtcttatgcaaatcc-3'
<i>pds</i> (八氢番茄红素脱氢酶)	f: 5'-tttctcgctttgacttcct-3'; r: 5'-acacttctcattgactcgg-3'
<i>lcyb</i> (番茄红素 β -环化酶)	f: 5'-aacaacgcctgcctacctt-3'; r: 5'-tcctccactgccttgacctt-3'
<i>bkt</i> (β -胡萝卜素酮化酶)	f: 5'-ggagcaccacaaccatactg-3'; r: 5'-cgaagtagaagaggcggaatg-3'
<i>bhy</i> (β -胡萝卜素羟化酶)	f: 5'-atcttcgccacctacgtgag-3'; r: 5'-cgggcagtcattgatgatt-3'

以 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，通过凝胶电泳验证扩增产物，验证引物特异性。PCR 反应条件为 95°C 预变性 1 min，(94°C 变性 30 s，58°C 退火 60 s，72°C 延伸 60 s) $\times$ 30 个循环，72°C 反应 10 min，产物保存在 4°C 冰箱。

3.2.7 RT-qPCR 检测

所有的 cDNA 通过微量检测仪检测浓度，然后将 cDNA 稀释合适倍数。RT-qPCR 的反应液配制如表 3-2，使用目的基因和内参定量引物，RT-qPCR 实验步骤参照所述方法执行，如表 3-3 所示，实验分析方法参照 He 等人 [62] 所述 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。

表 3-2 RT-qPCR 反应液的配制

Table 3-2 Preparation of RT-qPCR reaction solution

组分	20 μ L 反应体积 $\times$ n	操作方式
TOROGreen®qPCR Master Mix	10 μ L $\times$ n	混合及分装
cDNA 稀释液	2 μ L $\times$ n	
2 μ M 上游引物	4 μ L $\times$ n	混合及分装
2 μ M 下游引物	4 μ L $\times$ n	
Total	20 μ L	

表 3-3 RT-qPCR 反应程序的设置

Table 5-3 Setting of RT-qPCR reaction program

两步法循环条件				
1	预变性	95℃	3min	1 循环
2	变性	95℃	10sec	40 循环
	退火/延伸	60℃	30sec	
荧光信号采集应该在延伸步骤进行，收集时间不低于 10sec。				

3.2.8 生物重复和统计分析

生物重复和统计分析同 2.2.9。

3.3 结果与讨论

3.3.1 各样品 RNA 提取的凝胶电泳检测

对在绿色阶段和红色阶段不同时间段的检测乙酰辅酶 A 合成酶（*acs*）基因表达量的动态变化和自养组、异养以及混合异养补加组乙酸代谢、TCA 循环、脂质合成及虾青素合成途径中关键基因利用 RNA 提取试剂提取总 RNA，通过凝胶电泳的结果显示，总 RNA 凝胶电泳检测结果如图 3-1 所示，所有对照组和实验组都提出了完整的 RNA。

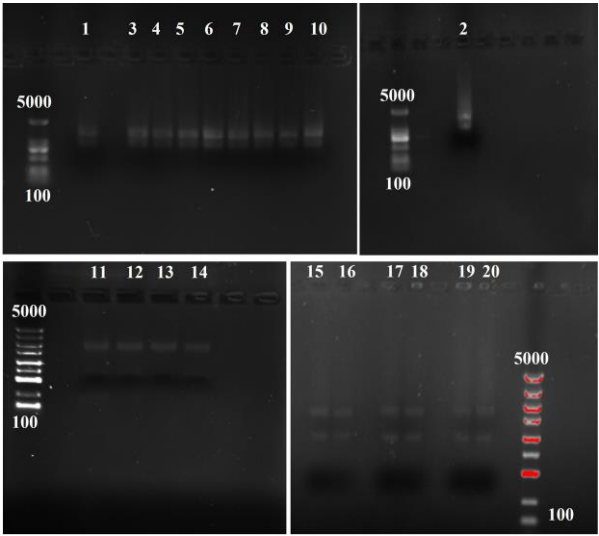


图 3-1 总 RNA 凝胶电泳图。泳道 1-5,11-12 分别为绿色阶段添加醋酸钠处理 0、0.5、1、

2、4、8、12 天的样品，泳道 6-10,13-14 为红色阶段添加醋酸钠处理 0、0.5、1、2、4、8、12 天的样品。泳道 15，17-18 为绿色阶段自养组、异养组和补加异养组，泳道 16,19-20 为红色阶段自养组、异养组和补加异养组。

Fig.3-1 Gel electrophoresis of total RNA. Lanes 1-5,11-12 were the samples of the green stage treated with sodium acetate for 0, 0.5,1, 2, 4, 8, 12 days, respectively, and lanes 6-10,13-14 were the samples of the red stage treated with sodium acetate for 0, 0.5,1, 2, 4, 8, 12 days. Lane 15, 17-18 is the green stage autotrophic group, heterotrophic group and supplemented heterotrophic group, lane 16,19-20 is the red stage autotrophic group, heterotrophic group and supplemented heterotrophic group.

3.3.2 引物设计和引物特异性检测

(1) 雨生红球藻乙酰辅酶 A 合成酶 (*acs*) 的系统发育序列分析

雨生红球藻 *acs* 的系统发育序列通过邻接法 (*Neighbor-Joining method*) 推断进化关系^[97]，分支长度总和为 7.74130283 的最优进化树如图 3-2 所示。自举检验 (1000 次重复) 中相关分类群聚类的支持率标注于分支旁^[98]。进化距离采用最大复合似然法 (*Maximum Composite Likelihood method*) 计算^[99]，单位为每个位点的碱基替换数。分析共包含 28 条核苷酸序列，剔除位点覆盖度低于 50% 的所有位置 (即允许每个位点的比对缺口、缺失数据及模糊碱基不超过 50%)。最终数据集中共有 1916 个有效位点，同源序列标注为相同颜色。基于进化树分析，收集的 12 个 *Hpacs* 序列可分为 5 个类型，即 *acs1-5*。分别针对 *HpACS1* (a-e)、*HpACS2*、*HpACS3* (a, b)、*HpACS5* (a, b) 的保守同源区设计荧光定量引物，检测表达量变化。此外，由于 *HpACS4a* 和 *HpACS4b* 的 DNA 序列相似性较低，分别设计引物检测其表达量变化 (表 3-1)。

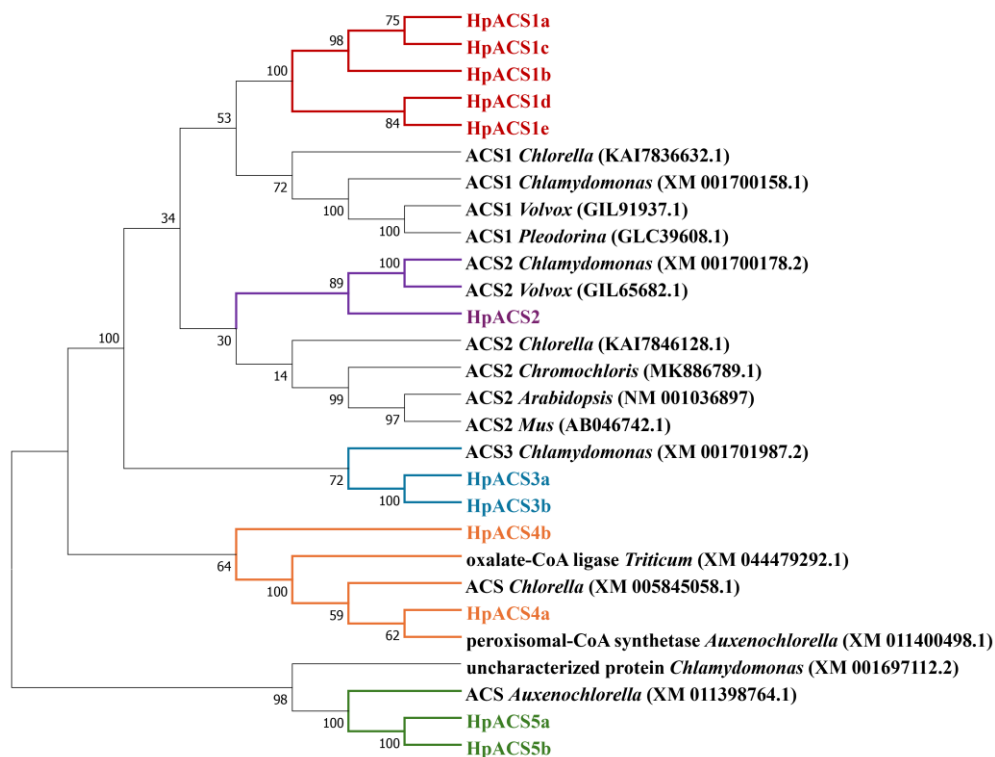


图 3-2 雨生红球藻乙酰辅酶 A 合成酶 (*acss*) 的系统发育序列分析进化树

Fig.3-2 Phylogenetic Analysis of Acetyl-CoA Synthetase (*acss*) Sequences in *Haematococcus pluvialis*

(2) 引物特异性检测

以 cDNA 作为扩增引物的模版, 对 *acs*、TCA 循环、碳固定和脂质合成及虾青素合成通路中系列关键基因进行扩增, 如图 3-2 所示, 所有基因均扩增出目的条带, 并且无拖带杂带等现象, 说明所有合成的引物特异性较好, 可以用于 q-PCR 实验。

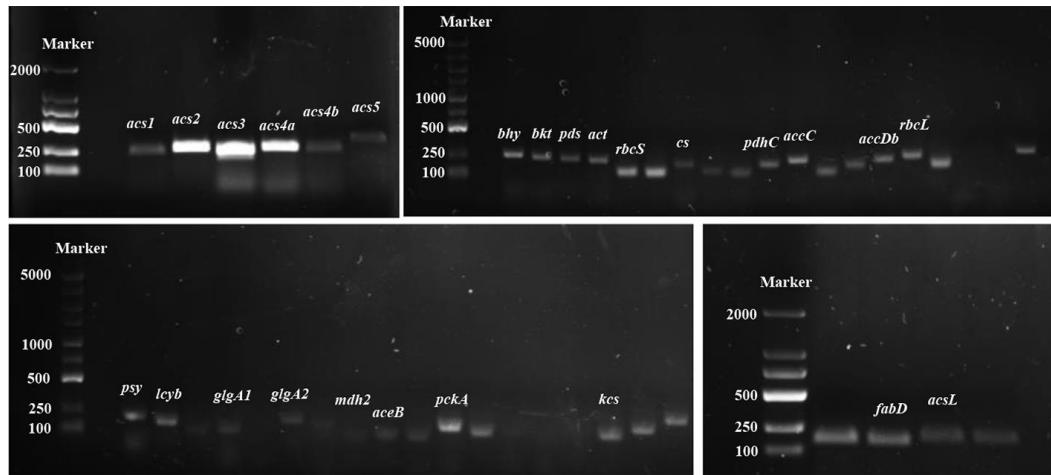


图 3-3 乙酰辅酶 A 合成酶 (*acs1-5*)、TCA 循环、脂质合成及虾青素合成途径中关键基因 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig.3-3 Key genes PCR amplification gel electrophoresis images in acetyl-CoA synthetase (*acs1-5*), TCA cycle, lipid synthesis, and astaxanthin synthesis pathways.

3.3.3 关键酶基因的相对表达变化分析

(1) 乙酰辅酶 A 合成酶 (*acs*) 的分析和表达变化

乙酰辅酶 A 合成酶 (*acs*) 能够将乙酸转化为活化形式的乙酰辅酶 A (图 3-6), 是乙酸吸收利用的关键基因 [100]。基于已报道的雨生红球藻基因组 [96] 和转录组数据 [62], 通过序列系统发育分析共鉴定出 12 条 *acs* 序列, 并将其分类为 *acs1* (5 条序列)、*acs2* (1 条序列)、*acs3* (2 条序列) 以及两种新类型 *acs4* (2 条序列) 和 *acs5* (2 条序列) (图 3-2)。

雨生红球藻 *acs1-5* 基因在绿色阶段和红色阶段呈现差异化的时序表达模式。在 12 天的绿色阶段中, 除 *acs4b* 外, *acs1-5* 表达量均显著上调。其中 *acs3* 在 6 个取样时间点中的 5 个时段 (0.5-12 天) 表现出最显著的上调幅度, 表达量维持在 60 至 150 倍之间 (图 3-4 c)。*acs2* 在第 4 天和第 8 天分别呈现 9.43 倍和 9.89 倍上调, 而在早期阶段 (0.5-1 天) 仅出现 2.91 倍和 2.5 倍的适度上调 (图 3-4 b)。*acs5* 呈现明显的时间依赖性递增趋势, 至第 12 天达到 19.22 倍上调 (图 3-4 f)。相比之下, *acs1* 的上调幅度相对较小, 在 0.5-12 天期间上调倍数介于 1.88 至 2.79 倍之间 (图 3-4 a)。在 12 天的红色阶段中, 除 *acs3* 外其他 *acs* 基因表达量同样显著上调。其中 *acs4b* 和 *acs4a* 变化最为显著, 上调幅度分别达到 13.88

至 77.79 倍和 1.18 至 17.88 倍（图 3-4 d-e）。*acs1*、*acs2* 和 *acs5* 的最大上调倍数分别为 7.13 倍（第 8 天）、5.17 倍（第 8 天）和 12.39 倍（第 2 天）（图 3-4a-b, f）。

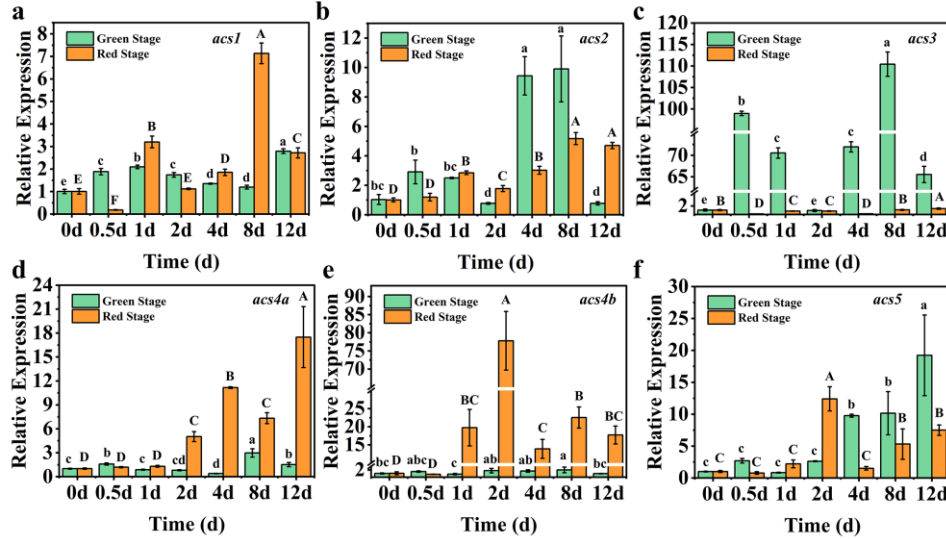


图 3-4 醋酸钠培养不同时间雨生红球藻 *acs1-5* 基因表达的变化。数据以均数±标准差表示 ($n = 3$)。不同字母的柱表示差异显著 ($p < 0.05$)，采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.3-4 Changes of gene expression of *acs1-5* in *H. pluvialis* under NaAc culture at different times. Data were presented as means $\pm$ SD ($n = 3$). Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), determined by one-way ANOVA based on the Waller-Duncan test.

补加实验显示，在绿色阶段第 6 天额外添加 1 g/L 醋酸钠后，相较于自养对照组，*acs2* 和 *acs3* 在第 7 天分别快速上调 8.68 倍和 107.20 倍。而仅在初始阶段添加醋酸钠的处理组中，这两个基因在第 7 天的上调幅度显著降低（分别为 2.06 倍和 6.01 倍）（图 3-5 a）。其他 *acs* 基因在这些处理条件下未发生显著变化或呈现轻微下调。在红色阶段，醋酸钠的添加和补充仅引起 *acs1* 的轻微上调（1.24-1.61 倍），而 *acs2-5* 则呈现下调趋势（图 3-5 b）。

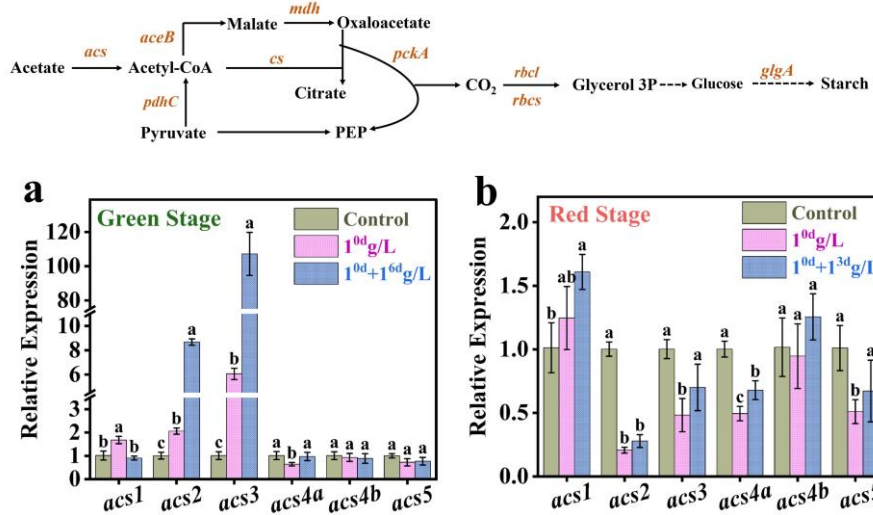


图 3-5 乙酰辅酶 A 合成酶 (*acs1-5*) 在绿色阶段 (a) 和红色阶段 (b) 相关关键基因的相对表达变化, 图例中的数字代表醋酸钠的增加浓度, 数字上的上标代表醋酸钠的添加时间, 数据以均数±标准差表示 ($n=3$)。不同字母的柱表示差异显著 ($p<0.05$), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.3-5 Relative expression changes of key genes related to acetyl-CoA synthetase (*acs1-5*) in green stage (a) and red stage (b), the number in the legend represents the increased concentration of sodium acetate, the superscript on the number represents the addition time of sodium acetate, and the data is expressed as mean ± standard deviation ($n=3$). Columns with different letters indicated significant differences ($p<0.05$), which were determined by one-way ANOVA based on Waller-Duncan test.

尽管醋酸钠 (NaAc) 在雨生红球藻培养中广泛应用, 但其吸收代谢机制尚未完全阐明。在模式微藻莱茵衣藻 (*C. reinhardtii*) 中已鉴定出三类 *acs* 基因 (*acs1*、*acs2*、*acs3*), 其中 *acs2* 和 *acs3* 被报道在乙酸吸收中起关键作用^[101]。本研究发现雨生红球藻中存在五类 *acs* 基因 (*acs1-5*) (图 3-2)。基因表达模式分析显示, 在绿色阶段 *acs2*、*acs3* 和 *acs5* 显著上调 (分别达 9.90 倍、110.41 倍和 19.22 倍, 图 3-4), 且 *acs2* 和 *acs3* 对分批补加醋酸钠处理表现出快速响应 (图 3-5 a)。结合绿色阶段乙酸快速吸收 (图 1 d、3 c) 与红色阶段吸收缓慢 (图 2d、4 d) 的实验现象, 表明 *acs2-3* 和 *acs5* (尤其是 *acs2-3*) 在雨生红球藻乙酸吸收中具有重要作用。这与模式物种莱茵衣藻中 *acs2* 是响应醋酸钠处理的关键基因^[102]的结论一致。在红色阶段, *acs4a* 和 *acs4b* 呈现显著上调 (17.88-77.79 倍, 图 5 d-e),

但分批补加醋酸钠处理并未引起大多数 *acs* 基因显著上调（图 3-5 b）。这可能是红色阶段乙酸吸收速率较低（图 3-4 d）的主要原因。综合表明，新鉴定出的 *acs4* 在雨生红球藻红色阶段对初始添加醋酸钠的吸收利用中起关键作用。

（2）TCA 循环相关基因变化

当乙酸转化为乙酰-CoA 后，可进入多种代谢途径。首先检测了 3 个 TCA 循环相关基因——苹果酸合酶（*aceB*）、柠檬酸合酶（*cs*）和苹果酸脱氢酶（*mdh*）的表达变化（图 3-5）。结果显示，在绿色阶段（第 7 天）与自养对照组相比，添加 1 g/L 醋酸钠处理组仅 *cs* 基因轻微上调 1.59 倍（图 3-6 a）；而额外补充 1 g/L 醋酸钠处理组的 *aceB* 和 *cs* 基因分别显著上调 9.88 倍和 12.15 倍（图 3-6 a）。在红色阶段，额外补充 1 g/L 醋酸钠处理组的 *aceB* 和 *cs* 基因仍分别上调 2.5 倍和 1.9 倍（图 3-6 b），而 1 g/L 醋酸钠处理组的 *aceB* 基因上调 1.62 倍（图 3-6 b）。丙酮酸脱氢酶 E2 组分基因（*pdhC*）在绿色阶段 1 g/L 醋酸钠处理组中上调 1.69 倍，红色阶段上调 2.84 倍。值得注意的是，两个阶段额外补充 1 g/L 醋酸钠均进一步增强了 *pdhC* 的表达（图 3-6 a, b）。

之前的研究表明，添加醋酸钠能够增强三羧酸循环的活性，同时抑制光合作用相关的活动^[91]。本研究中，*aceB* 和 *cs* 基因的上调（图 3-6 a, b）表明，醋酸钠在雨生红球藻中的两个阶段均促进了 TCA 循环的活性。值得注意的是，额外补充 1 g/L 醋酸钠显著刺激了两个阶段的 TCA 循环（图 3-6 a, b），从而促进了生物量的积累。此外，催化糖酵解产生的丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 的 *pdhC* 基因表达在绿色阶段略有上调（1.69 倍，图 3-6 a），而在红色阶段显著上调（2.84 倍，图 3-6 b）。这一上调的结果在额外补充 1 g/L 醋酸钠时尤为明显（见图 3-6 a, b）。我们推测，红色阶段中醋酸的吸收减少，需要通过丙酮酸降解增强乙酰辅酶 A 的产生，而这一过程可能在醋酸钠的补充下得到进一步促进。

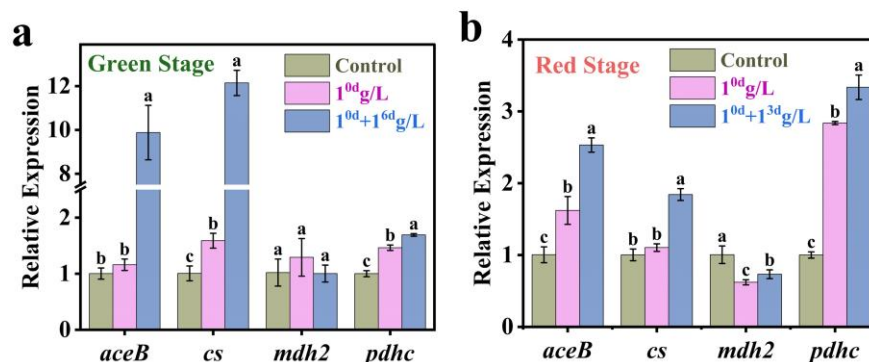


图 3-6 TCA 循环相关关键基因 (*aceB*, *cs*, *mdh2*, *pdhc*) 在绿色阶段 (a) 和红色阶段 (b) 表达变化。图例中的数字代表醋酸钠的增加浓度, 数字上的上标代表醋酸钠的添加时间, 数据以均数±标准差表示 (n = 3)。不同字母的柱表示差异显著 (p < 0.05), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.3-6 The expression of key genes related to the TCA cycle (*aceB*, *cs*, *mdh2*, *pdhc*) changed in the green phase (a) and the red phase (b). The numbers in the legend represent the increased concentration of sodium acetate, the superscript on the number represents the time of sodium acetate addition, and the data is expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). Columns with different letters indicated significant differences (p < 0.05), which were determined by one-way ANOVA based on Waller-Duncan test.

(3) 碳固定相关基因变化

在上一章中, 生理实验检测表明醋酸钠添加可促进碳水化合物积累, 且补充醋酸钠后效果更显著 (图 2-4)。因此, 本章中检测了 5 个碳固定与淀粉合成相关基因 (图 3-6): 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (*pckA*)、核酮糖二磷酸羧化酶小亚基 (*rbcS*) 和大亚基 (*rbcL*), 以及淀粉合酶 (*glgA1*、*glgA2*) (图 3-7 a, b)。结果显示, 在绿色阶段, 与自养对照组相比, 1 g/L 醋酸钠处理组的 *pckA* 上调 1.42 倍, 而额外补加 1 g/L 醋酸钠处理组 *pckA* 显著上调 14.78 倍 (图 3-7 a); 但在红色阶段, 两个处理组的 *pckA* 均轻微下调 (图 3-7 b)。后续 CO₂ 固定关键基因中, 绿色阶段 1 g/L 醋酸钠处理组的 *rbcS* 上调而 *rbcL* 无显著变化, 而额外补充组 *rbcS* 无显著变化且 *rbcL* 下调 (图 3-7 a)。有趣的是, 红色阶段两个处理组的 *rbcS* 和 *rbcL* 均上调 (图 3-7 b)。下游基因 *glgA2* 在绿色阶段轻微上调, *glgA1* 则在红色阶段两个处理组中均轻微上调 (图 3-7 b)。*pckA* 催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇丙

酮酸的过程，并释放 CO_2 ，随后通过卡尔文循环固定 CO_2 ^[103]（图 3-5）。实验结果表明，在绿色阶段，醋酸钠的添加和补加显著上调了 *pckA* 的表达（图 3-7a），促进了草酰乙酸的分解，并提供了足够的 CO_2 用于碳固定。此前的研究提到，过量添加有机碳通常会导致光合碳固定的下降^[104]。本研究表明，1 g/L 醋酸钠的最佳浓度可以促进碳固定，而额外 1 g/L 醋酸钠的补充对碳固定的抑制作用有限。此外，这也可以更好地解释为何在上一章中提到的两个实验组具有较高的叶绿素和碳水化合物含量（图 2-3）。

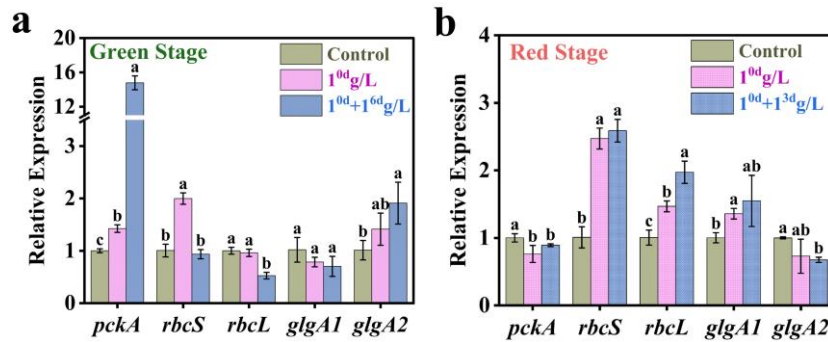


图 3-7 碳固定相关关键基因 (*pckA*, *rbcS*, *rbcL*, *glgA1*, *glgA2*) 在绿色阶段 (a) 和红色阶段 (b) 表达变化。图例中的数字代表醋酸钠的增加浓度，数字上的上标代表醋酸钠的添加时间，数据以均数±标准差表示 (n = 3)。不同字母的柱表示差异显著 (p < 0.05)，采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.3-7 The expression of key genes related to carbon fixation (*pckA*, *rbcS*, *rbcL*, *glgA1*, *glgA2*) changed in green phase (a) and red phase (b). The numbers in the legend represent the increased concentration of sodium acetate, the superscript on the number represents the time of sodium acetate addition, and the data is expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). Columns with different letters indicated significant differences (p < 0.05), which were determined by one-way ANOVA based on Waller-Duncan test.

(4) 脂质与虾青素合成关键基因变化

在脂质合成方面，催化乙酰-CoA 转化为丙二酰-CoA 的上游关键基因乙酰-CoA 羧化酶 (*accC*, *accD*) 在绿色阶段上调 1.41-2.49 倍，但在红色阶段均下调 (0.71-0.89 倍) (图 3-8 a, b)。下游基因 ACP-S-丙二酰转移酶 (*fabD*)、3-酮脂酰-CoA 合酶 (*kcs*) 和长链酰基-CoA 连接酶 (*acsL*) 在绿色阶段下调，但在红色

阶段显著上调 8.21-9.57 倍 (图 3-8 a, b)。在虾青素合成相关的五个关键基因中, 绿色阶段均未出现上调 (图 3-8 c)。红色阶段, 八氢番茄红素合酶 (*psy*) 和番茄红素 β -环化酶 (*lcyB*) 在醋酸钠添加组和补充组的表达水平相似, 较对照组上调 1.68-3.51 倍 (图 3-8 d)。而 β -胡萝卜素酮化酶 (*bkt*) 和 β -胡萝卜素羟化酶 (*bhy*) 在两个处理组中均下调 (图 3-8 d)。

在雨生红球藻中, 虾青素的积累通常伴随着脂质的积累, 因为虾青素常以酯化的形式储存在油脂中 [105]。之前的研究表明, 醋酸钠可以显著增加虾青素和脂质的含量 [81, 91]。本研究表明, 在绿色阶段的良好生长条件下, 来自醋酸或丙酮酸的丰富乙酰辅酶 A 并未主要参与脂质的合成和储存, 尽管醋酸钠的添加和补充可以促进涉及脂质合成上游的 *accC* 和 *accD* 基因的表达 (图 3-8 a)。相应地, 在红色阶段的强烈应激条件下, 醋酸钠的添加和补充显著促进了脂质合成下游基因 (*fabD*、*kcs* 和 *acsL*) 的表达 (图 3-8 d), 导致最终脂质含量从绿色阶段的 200-313.33 mg/g (图 2-3 e) 增加到红色阶段的 326.67-466.67 mg/g (图 2-4 e)。

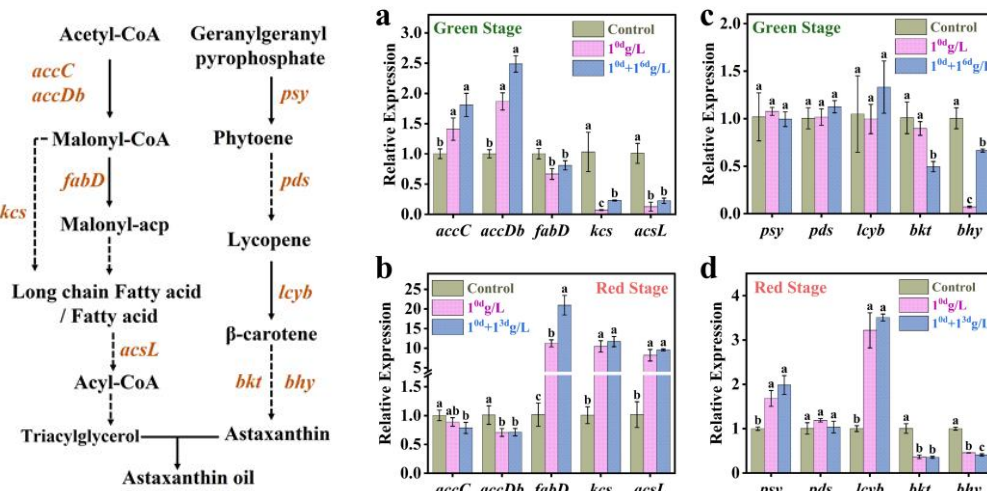


图 3-8 油脂合成相关关键基因 (*accC*, *accDb*, *fabD*, *kcs*, *acsL*) 在绿色阶段 (a) 和红色阶段 (b) 以及虾青素合成相关基因 (*psy*, *pds*, *lcyb*, *bkt*, *bhy*) 绿色阶段 (c) 和红色阶段 (d) 表达变化。图例中的数字代表醋酸钠的增加浓度, 数字上的上标代表醋酸钠的添加时间, 数据以均数±标准差表示 ($n=3$)。不同字母的柱表示差异显著 ($p<0.05$), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.3-8 The expression of key genes related to lipid synthesis (*accC*, *accDb*, *fabD*, *kcs*, *acsL*) changed in green phase (a) and red phase (b), and astaxanthin synthesis-related genes (*psy*, *pds*, *lcyb*, *bkt*, *bhy*) in green phase (c) and red phase (d). The numbers in the legend represent the

increased concentration of sodium acetate, the superscript on the number represents the time of sodium acetate addition, and the data is expressed as the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Columns with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$), which were determined by one-way ANOVA based on Waller-Duncan test.

对于检测到的虾青素合成基因, 在绿色阶段没有上调 (图 3-8 c)。这可能与绿色阶段的良好生长条件有关, 这些条件通常不会引发显著的虾青素积累。相比之下, 在红色阶段, 与对照组相比, 醋酸钠添加和补充组的 *psy* 和 *lcyB* 基因均表现出上调 (图 3-8 d)。令人惊讶的是, *bkt* 和 *bhy* 的表达在两个醋酸钠处理组中均下调 (图 3-8 c, d)。这一发现与先前的研究不同, 后者报道 2 g/L 醋酸钠能够促进 *bhy* 的表达^[62]。这种差异可能与采样时间和醋酸钠浓度的不同有关。总体而言, 在红色阶段, 醋酸钠添加和补充组中虾青素合成相关基因的相似表达水平 (图 3-8 c, d) 可能解释了在上一章中两组间虾青素产量相似的现象 (图 2-4 b)。

3.4 本章小结

本章节通过 RT-qPCR 分析, 确定了雨生红球藻中 5 种类型的 *acs*, 其中 *acs2*、*acs3* 和 *acs5* 主要负责绿色生长阶段醋酸钠的吸收利用, 而 *acs4* 在红色诱导阶段利用醋酸钠的作用中起关键作用。此外, TCA 循环和碳固定相关基因的上调表明醋酸钠添加和补充促进了 TCA 循环和碳固定, 尤其是在绿色阶段。在红色阶段, 醋酸钠添加加强了脂质和虾青素的合成, 而醋酸钠补加进一步促进了脂质合成。此部分研究结果, 加深了醋酸盐对雨生红球藻作用机制的理解。

第4章 雨生红球藻耐醋酸盐适应性进化

4.1 引言

在雨生红球藻的绿色生长期，绿色游动细胞对高盐胁迫十分敏感，高盐胁迫过程往往会伴随大量藻细胞损伤死亡，极大地影响了虾青素产能。添加高浓度醋酸钠也同样如此，雨生红球藻对醋酸钠的利用率低和耐受度低，通过前两章的研究表明醋酸钠作为有机碳源，能促进雨生红球藻的碳水化合物、氮代谢、能量利用和脂质合成，不仅能促进绿色营养期藻的生长，还能促进红囊期虾青素的积累，并且通过多批次补加醋酸钠的方式，减缓了添加高浓度的醋酸钠对雨生红球藻的伤害，提高了对醋酸钠的利用。然而由于醋酸钠补加量有限，添加补加最佳醋酸钠浓度为 2 g/L，过高浓度仍然会造成藻细胞大量损伤。为提高雨生红球藻对醋酸盐的耐受度，适应性进化是一种稳定有效的方法，Z.-Hun Kim 等人通过适应性进化培育出耐受 40 g/L 氯化钠小球藻^[71]，Wladimir A. Fae Neto 等人通过适应性进化培育出耐高光的莱茵衣藻藻种^[72]等，因此本研究拟通过耐醋酸钠适应性进化的方法培育耐醋酸盐雨生红球藻藻种。

本章通过短周期多循环批次的耐醋酸盐驯化方式定向选育出具备耐高醋酸盐能力的雨生红球藻藻种，提升驯化藻种对高醋酸盐胁迫环境的适应能力、生长速度、存活率，并初步分析了其在绿色和红色两阶段下生物量、蛋白、总糖、油脂和虾青素产量等方面的变化，为雨生红球藻高耐醋酸盐藻种选育提供了经验。

4.2 材料与方法

4.2.1 雨生红球藻培养基

实验所用雨生红球藻原始菌株 *H. pluvialis* 797 培养基同 2.2.1 中改良的 BG11 培养基。

4.2.2 实验样品

本实验所用藻种同 2.2.2。

4.2.3 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

4.2.4 雨生红球藻耐醋酸钠适应性进化

野生型雨生红球藻藻种 *H. pluvialis* 797 培养至对数生长期, 3500 rpm 离心 10 min 去上清, 然后将藻泥接种到添加适应性进化浓度的醋酸钠的改良 BG11 培养基中, 初始密度为 7.97×10^5 cell/mL, 在光照强度 2500 lux, 温度 23°C 培养条件下, 培养 3 天后 3500 rpm 离心 10 min 去上清, 再将藻泥接种到新鲜的添加适应性进化浓度的醋酸钠的改良 BG11 培养基中, 如此循环操作, 3 天一次循环。适应性进化的醋酸钠浓度分为 3 个阶段, 首先是在 2.5 g/L 进行 16 批次循环, 每 10 天接种到添加 2.5 g/L 醋酸钠培养基中培养 (12 个月以上)。在下一阶段将耐受 2.5 g/L 的驯化藻接入到 5 g/L 醋酸钠的培养基中进行 13 批次循环后, 每 10 天接种到添加 5 g/L 醋酸钠培养基中培养 (6 个月以上), 最后一阶段将耐受 5 g/L 的驯化藻接入 7.5 g/L 的浓度中进行 10 批次驯化后, 每 10 天接种到添加 7.5 g/L 醋酸钠培养基中培养 (3 个月以上)。分别将每阶段驯化得到的藻种命名并进行固体和液体培养体系的保存。

4.2.5 细胞密度、比生长速率和细胞干重的测量

细胞密度使用血细胞计数板在倒置荧光显微镜下进行计数。每一批次比生长速率 (μ) 计算公式如下:

$$\text{比生长速率 } (\mu) (d^{-1}) = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{t}$$

N_0 —初始细胞浓度, N_t —培养后 t 天后细胞密度, t —培养时间。

细胞干重的测量同 2.2.5。

4.2.6 细胞活死率的测量

对驯化的耐醋酸盐藻种与野生型藻种进行活死检测, 使用双乙酸钠荧光素 (FDA) 对活细胞进行染色, 碘化丙啶 (PI) 对死细胞进行荧光染色。首先用二甲基亚砜 (DMSO) 制备 5 mg/mL FDA 主储备液, 之后将主储备液稀释 100 倍来制备 FDA 的工作储备液, 黑暗中在冰上储存。将 40 μ L FDA 工作储备液加入 1 mL 反应样品中, 使反应混合物中 FDA 的最终浓度为 2 μ g/mL。用超纯水制备 3 mg/mL PI 的主要储备液并放在 4 °C 下保存。将主储备液用超纯水稀释 10 倍, 制备新鲜的工作储备液以备每次使用。将 10 μ L PI 工作储备液添加到 1 mL 反应样品中, 使反应样品中的 PI 最终浓度为 3 μ g/mL。将反应混合物在冰上避光孵育 30 分钟^[106]。最后通过倒置荧光显微镜对藻细胞进行活死的检测, 使用 image j 软件对随机视角下活细胞和死细胞数进行计数, 并计算出细胞存活率:

细胞存活率(%) = 活细胞数 / (活细胞数 + 死细胞数) × 100%。

4.2.7 叶绿素、类胡萝卜素和虾青素的测量

叶绿素和虾青素的测量方法同 2.2.6。类胡萝卜素的计算公式如下：

类胡萝卜素含量 (mg/L) = $1000 \times A_{470} - 2.86 \times \text{叶绿素 a} - 129.2 \times \text{叶绿素 b}$

4.2.8 蛋白、碳水化合物及脂质含量测定

蛋白、碳水化合物及脂质含量测定方法同 2.2.8。

4.2.9 生物重复和统计分析

生物重复和统计分析同 2.2.9。

4.3 结果与讨论

4.3.1 雨生红球藻耐醋酸钠适应性进化

雨生红球藻对醋酸钠的利用和耐受度有限,在本研究前面章节的实验表明添加 1 g/L 醋酸钠为绿色阶段最佳添加浓度,能够促进雨生红球藻的生长,而添加 2.5 g/L 醋酸钠相较于 1 g/L 浓度,细胞密度和叶绿素含量降低,但细胞干重提高(图 2-1),结果表明添加 2.5 g/L 醋酸钠对雨生红球藻在绿色阶段的生长产生胁迫作用,因此本研究对雨生红球藻的第一阶段适应性进化使用 2.5 g/L 醋酸钠的浓度。如图 4-1 所示,从野生型经过 22 批次循环驯化,2-8 批次比生长率逐渐下降,在 8-10 次显著提高,在第 10 天的生物量达到最高为 7.61×10^5 cell/mL,之后开始稳定,表明野生型藻种经过适应性进化适应了 2.5 g/L 醋酸钠的浓度,能够在 2.5 g/L 的浓度下稳定生长,本研究将适应 2.5 g/L 醋酸钠浓度的藻种编号 HpAC25,并在添加 2.5 g/L 醋酸钠 BG-11 培养基中培养,每 10 天接种一次(12 个月以上)。

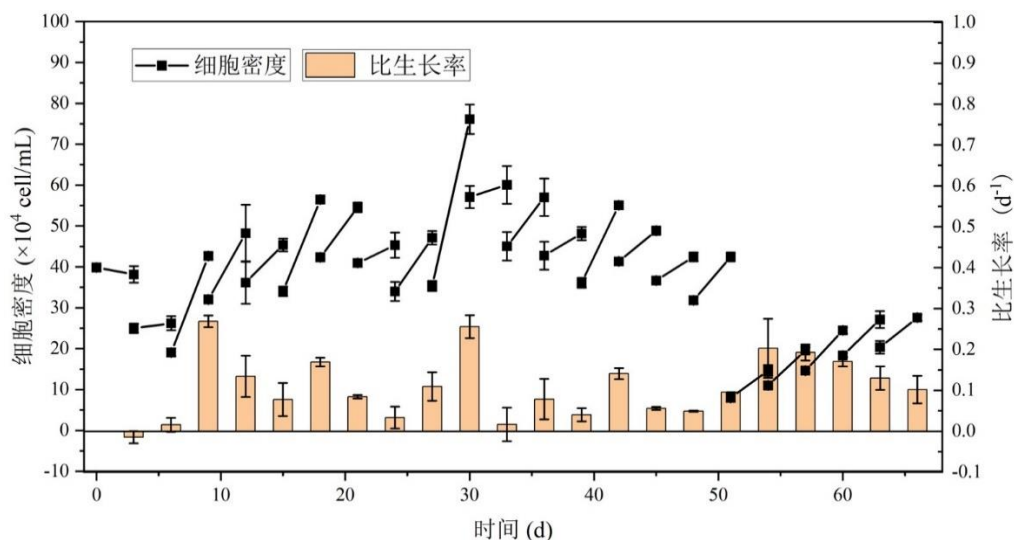


图 4-1 雨生红球藻驯化 2.5 g/L 醋酸钠浓度循环培养细胞密度和比生长率

Fig.4-1 Cell Density and Specific Growth Rate of *H. pluvialis* Acclimated to 2.5 g/L Sodium Acetate Concentration in Cyclic Cultivation.

针对保存的 HpAC25，将其接入到添加 5 g/L 醋酸钠的培养基中，如图 4-2 所示，进行 14 次的循环驯化，HpAC25 在 5 g/L 醋酸钠培养基浓度中比生长率都很低，在 8-9 次下降且负增长，而在第 10 次比生长率提高到 $0.23 d^{-1}$ ，达到最高生长率，表明此时在 HpAC25 在 5 g/L 醋酸钠浓度下细胞开始分裂生长，将该藻种编号为 HpAC50，并在添加 5 g/L 醋酸钠 BG-11 培养基中培养，每 10 天接种一次（6 个月以上）。

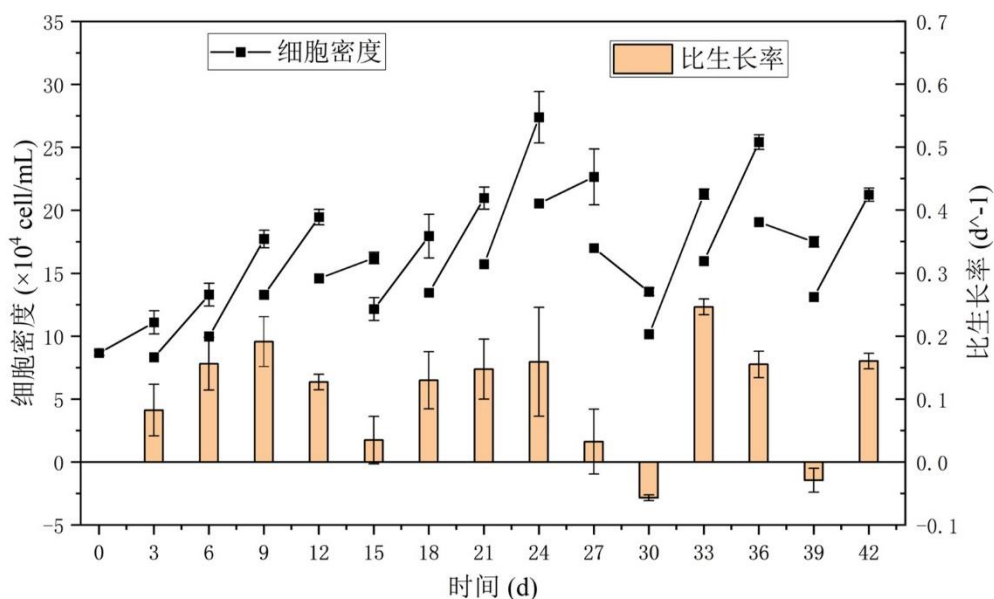


图 4-2 雨生红球藻驯化 5 g/L 醋酸钠浓度循环培养细胞密度和比生长率

Fig.4-2 Cell Density and Specific Growth Rate of *Haematococcus pluvialis* Acclimated to 5 g/L Sodium Acetate Concentration in Cyclic Cultivation

为进一步提高耐受性，将 HPAC50 接到添加 7.5 g/L 醋酸钠的培养基中经过 18 次循环驯化，如图 4-3 所示，比生长率在 5-8 次驯化连续降低，在第 9 次时开始增长，并在第 18 次达到最高，表明此时 HpAC50 能够适应 7.5 g/L 醋酸钠浓度，并将该藻种编号为 HpAC75。并在添加 7.5 g/L 醋酸钠 BG-11 培养基中培养，每 10 天接种一次（3 个月以上）。驯化藻种 HpAC25、HpAC50、HpAC75 通过平板划线纯化并斜面保藏。

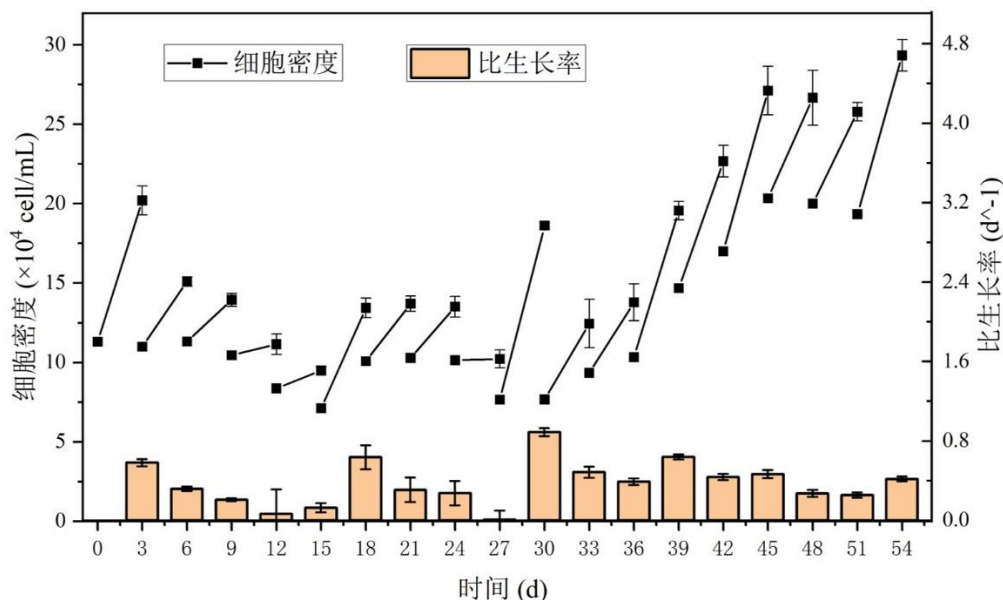


图 4-3 雨生红球藻驯化 7.5 g/L 醋酸钠浓度循环培养细胞密度和比生长率

Fig.4-3 Cell Density and Specific Growth Rate of *H. pluvialis* Acclimated to 7.5 g/L Sodium Acetate Concentration in Cyclic Cultivation

4.3.2 驯化藻对醋酸钠浓度耐受度检测

为验证适应进化得到的耐醋酸盐雨生红球藻藻种（HpAC25、HpAC50、HpAC75）在高浓度醋酸盐下的活性，将 HpAC25、HpAC50、HpAC75 分别接入到添加 2.5、5、7.5 g/L 的培养基中，野生型在同样浓度下作为对照进行培养。如

图 4-4 所示，在培养第 10 天时，野生型和 HpAC25 并无显著变化，而 5 g/L 和 7.5 g/L 醋酸钠浓度下野生型和驯化藻种之间的变化显著，野生型藻种在 5 g/L 醋酸钠培养下第 10 天多数沉入底部，在 7.5 g/L 浓度下呈现出更少的生物量。HpAC50 和 HpAC75 相较于 HpAC25 可以看出生物量及叶绿素降低，但明显高于野生型对照组。

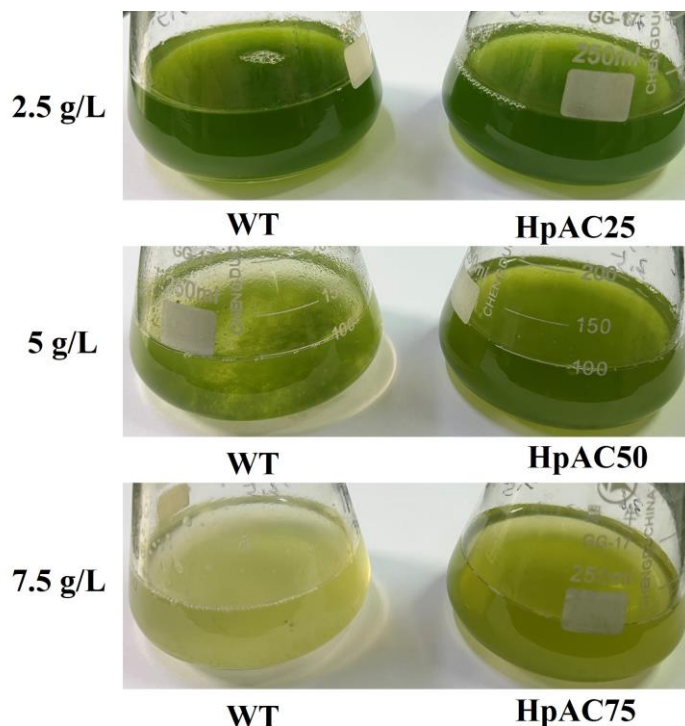


图 4-4 雨生红球藻野生型与驯化藻种在对应醋酸钠浓度下第 10 天生长变化

Fig.4-4 The growth changes of wild type and domesticated species of *Haematococcus pluvialis* under the corresponding sodium acetate concentration

二乙酸荧光素 (FDA) 因为其具有良好的渗透性、高灵敏度和对原核和真核藻类细胞的良好染色能力，可以用来研究藻类细胞的活力，碘化丙啶 (PI) 无法穿过完整细胞膜，当细胞死亡时，此时细胞膜的完整性失效，PI 能够进入并染色核酸，因此 PI 可用于区分死细胞和活细胞^[106]。本研究使用 FDA 和 PI 对野生型和驯化藻种进行双染色，通过倒置荧光显微镜观察驯化藻与野生型藻种在高浓度下的活性，如图 4-5 a 所示，野生型和 HpAC25 在 2.5 g/L 醋酸钠浓度下藻细胞都展现出较高的活性，野生型藻的死亡率略高于驯化藻种。在 5 g/L 的醋酸钠浓度下 (图 4-5 b)，野生型的藻生物量明显低于 HpAC50 的生物量，且有更高的死亡

率，而 HpAC50 展现出较好的活性，但是相较于 HpAC25，总生物量和死亡率都低于 HpAC25。在 7.5 g/L 醋酸钠浓度下（图 4-5 c），野生型和驯化藻种的生物量都很低，而 HpAC75 的活细胞更多。

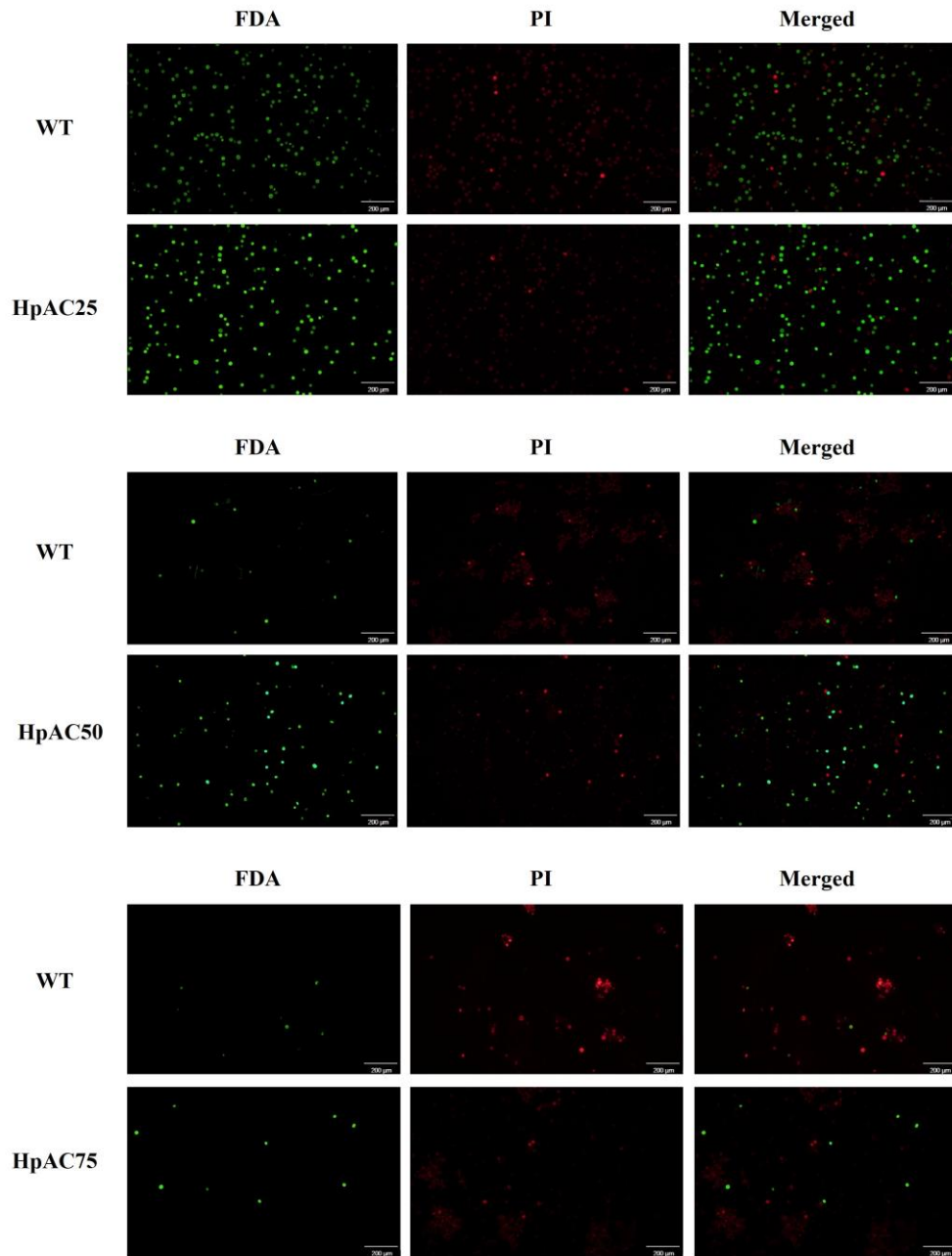


图 4-5 野生型与驯化藻种 FDA 和 PI 染色在荧光显微镜下的图像

Fig.4-5 Image of wild type and domesticated algae species stained by FDA and PI under fluorescence microscope

对不同驯化藻种的活死细胞进行计数，如图 4-6 所示，野生型在 2.5 g/L 醋酸钠下第 15 天的存活率为 55.20%，而 HpAC25 的存活率为 67.68%，说明在 2.5

g/L 醋酸钠浓度下野生型和 HpAC25 的存活率无显著差异, 对于 HpAC25 的耐醋酸盐提升较小。在 5 g/L 醋酸钠浓度下, HpAC50 的存活率高达 49.15%, 野生型存活率只有 19.27%, HpAC50 相较于野生型存活率提高了 2.55 倍。在 7.5 g/L 的醋酸钠浓度下, HpAC75 的存活率达到 46.30%, 野生型存活率为 16.29%。

结果表明, 通过耐醋酸钠适应性进化得到的藻种在相应的醋酸钠浓度下可以生长, 耐受最高可达 7.5g/L 的醋酸钠浓度, 在 5 g/L 醋酸钠浓度下能够展现出较好的活性。但是虽然驯化藻种能够在高浓度醋酸钠下存活, 但随着醋酸钠浓度的增加, 驯化藻细胞的生长速度也较为缓慢。这可能是乙酸代谢效能变低^[107]、细胞膜功能重构导致营养物质吸收受限^[108]、渗透压应激^[109]和以及基因表达的调整等因素造成的, 因此后续对驯化藻种进行培养优化以及其代谢调控机制的研究。

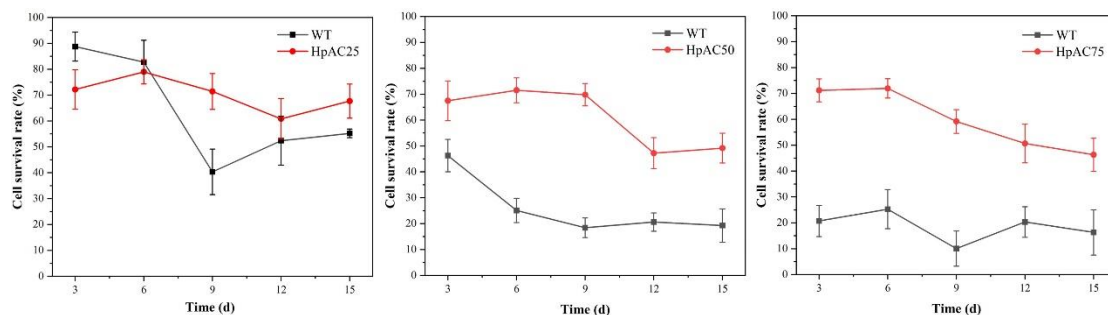


图 4-6 野生型与三种驯化藻种绿色阶段培养 15 天细胞存活率

Fig.4-6 Cell survival rate of wild type and three domesticated algal strains after 15 days of cultivation in the green stage.

4.3.3 驯化藻与野生型的生理对比

(1) 驯化藻与野生型在相同醋酸钠浓度下生理分析

为分析三种驯化藻种的生理特性, 本研究对驯化藻种与野生型在相同醋酸钠浓度下测定了 10 天的细胞密度和叶绿素含量进行了对比研究。如图 4-7 所示, 在 2.5 g/L 醋酸钠浓度下, 野生型和 HpAC25 的细胞密度在 10 天的培养过程中均呈现逐渐上升的趋势。有趣的是, 尽管在这一浓度下两者的存活率相近(图 4-6), 但野生型的细胞密度显著高于 HpAC25, 第 10 天时野生型的细胞密度达到 $42.89 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 而 HpAC25 仅为 $20.22 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 。这表明, 虽然 HpAC25 在 2.5 g/L 的醋酸钠驯化过程中存活率略高, 但其生长能力低于野生型。在 5 g/L 醋酸

钠浓度下,细胞生长表现出显著差异。HpAC50 的细胞密度显著提高,在第 10 天时达到 49.56×10^4 cell/mL,而野生型在该浓度下生长缓慢,第 10 天的细胞密度仅为 6.33×10^4 cell/mL。这一显著差异表明, HpAC50 通过驯化获得了对中等浓度醋酸钠更强的适应性,其生长能力远超野生型,可能反映了其在生理上的调节优势。在 7.5 g/L 醋酸钠浓度下, HpAC75 的细胞密度呈现出稳定的增长趋势,第 10 天达到最大值 12.44×10^4 cell/mL。而野生型在这一高浓度条件下生长受限,细胞密度最高仅为 2.56×10^4 cell/mL。这表明,与野生型相比, HpAC75 在高浓度醋酸钠胁迫下表现出更强的耐受性和生长潜力,进一步凸显了不同驯化藻种在不同醋酸钠浓度下的生理适应性差异。

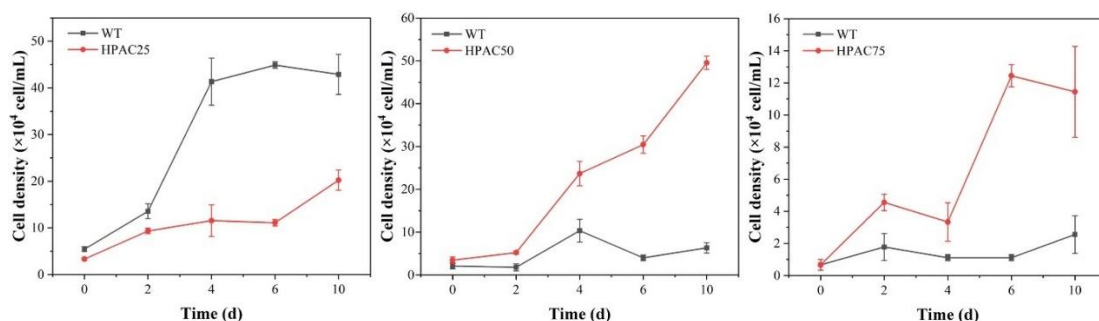


图 4-7 野生型与三种驯化藻种分别在 2.5、5、7.5 g/L 醋酸钠浓度下 10 天培养的细胞密度

Fig.4-7 Cell density of the wild type and three domesticated algal strains cultured for 10 days

under sodium acetate concentrations of 2.5, 5, and 7.5 g/L

如图 4-8 所示,驯化藻与野生型在相同醋酸钠浓度下的叶绿素含量表现出显著差异。在培养第 10 天时,野生型在 2.5 g/L 醋酸钠浓度下的叶绿素含量为 5.67 mg/L,而 HpAC25 仅为 2.45 mg/L,明显低于野生型。这一结果表明,在较低醋酸钠浓度下, HpAC25 的叶绿素合成能力显著降低,导致其光合作用效率受限,从而抑制了细胞生长并导致其细胞密度低于野生型。这一现象与 HpAC25 在 2.5 g/L 醋酸钠条件下的较低细胞密度相一致,反映出其在低浓度环境中的适应性仍有不足。在 5 g/L 醋酸钠浓度下, HpAC50 的叶绿素含量显著提升,达到 4.31 mg/L,而野生型仅为 1.71 mg/L。叶绿素的显著增加表明 HpAC50 通过驯化显著增强了在较高浓度醋酸钠下的光合作用能力,从而促进了细胞生长,提高了生物量和存活率。这与 HpAC50 在 5 g/L 醋酸钠条件下较高的细胞密度 (49.56×10^4 cell/mL) 高度一致,进一步证实了其对该浓度的环境压力具有明显的生理优势。在 7.5 g/L 的醋酸钠浓度下, HpAC75 的叶绿素含量为 2.34 mg/L,略高于野生型的 1.82 mg/L。

尽管叶绿素水平的提升幅度不如在 5 g/L 条件下显著, 但 HpAC75 在高浓度醋酸钠条件下仍表现出一定的光合作用适应能力。这一结果与 HpAC75 在 7.5 g/L 条件下逐步上升的细胞密度 (最高 $12.44 \times 10^4 \text{ cell/mL}$) 相符, 表明其对高浓度醋酸钠的适应性较强。综合分析可见, 驯化过程显著影响了藻种在不同醋酸钠浓度下的光合作用能力及生长表现。HpAC25 在低浓度条件下由于叶绿素合成的抑制, 生长受限; 而 HpAC50 在中等浓度下显著提升了叶绿素合成, 从而获得较高的生长优势; HpAC75 则在高浓度条件下展现了适度的光合作用能力和生长潜力。这些结果表明, 驯化藻种在不同浓度环境下对光合作用机制的调整是其适应性差异的重要驱动因素。

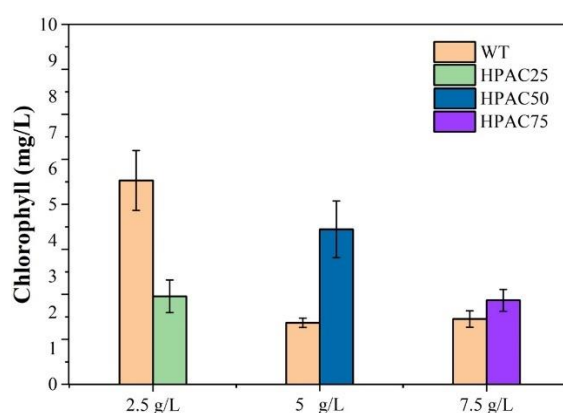


图 4-8 野生型与三种驯化藻种分别在 2.5、5、7.5 g/L 醋酸钠浓度下培养第 10 天叶绿素含量

Fig.4-8 Chlorophyll content of the wild type and three domesticated algal strains on the 10th day of cultivation under sodium acetate concentrations of 2.5, 5, and 7.5 g/L

(2) HpAC75 在不同醋酸钠浓度两阶段的影响

通过适应性进化最终得到最高耐受 7.5 g/L 醋酸钠的藻种 HpAC75, 经过 FDA 和 PI 活死率的监测, 结果表明驯化得到藻种提高了对醋酸钠的耐受度, 然而在越高的醋酸钠浓度下会降低其生物量的积累, 不利于藻细胞的生长。推测可能在最高耐受浓度区间存在一个最适 HpAC75 绿色生长和红色虾青素积累的浓度。因此本研究对 HpAC75 分别在 1、2.5、5 和 7.5 g/L 的醋酸钠浓度在两阶段的影响的进行了研究。如图 4-9 所示, 在绿色阶段 HpAC75 细胞密度 (4-9 a) 与叶绿素含量 (4-9 b) 随醋酸钠浓度升高而递减, 且最终都低于野生型在 1 g/L 醋酸钠浓度组。在绿色阶段, 尽管 HpAC75 能够耐受高浓度醋酸钠, 但可能由于高浓度醋酸钠对细胞造成了损伤, 当回到低浓度的培养环境中, 藻细胞没有快速修复而

导致最终生长表现低于野生型。

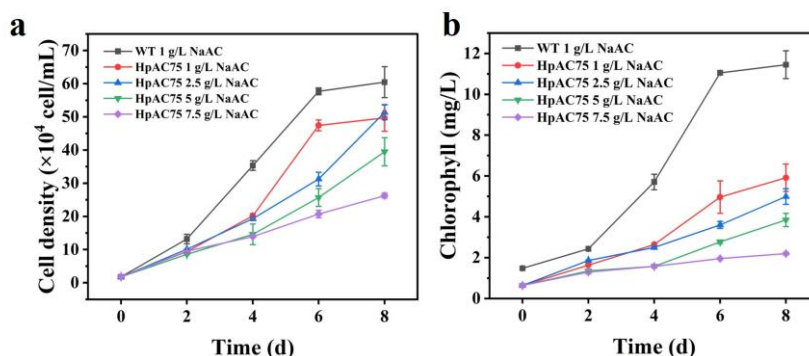


图 4-9 绿色阶段 HpAC75 在 1-7.5 g/L 醋酸钠浓度和野生型在 1 g/L 醋酸钠浓度下细胞密度 (a) 和总叶绿素含量 (b)

Fig.4-9 Cell density (a) and total chlorophyll content (b) of the green-stage HpAC75 at 1-7.5 g/L NaAc concentrations and the wild type at 1 g/L NaAc concentration.

在红色阶段对 HpAC75 在 1-7.5 g/L 醋酸钠浓度下细胞干重、叶绿素、类胡萝卜素和虾青素含量进行了监测。如图 4-10 所示，在诱导第 8 天时，对照组细胞干重最高达到 0.49 g/L (图 4-10 a)，而 HpAC75 在不同醋酸钠浓度下细胞干重都低于野生型。叶绿素含量各组随着诱导时间的增加而降低，与细胞干重呈现的结果相似，HpAC75 在不同醋酸钠浓度下叶绿素都低于野生型 (图 4-10 b)。对于类胡萝卜素含量和虾青素含量 (图 4-10 c, d)，野生型在 1 g/L 醋酸钠均为最高，同样高于 HpAC75。结果表明，尽管 HpAC75 对醋酸钠的耐受度提升，但在绿色阶段细胞生长以及在红色阶段虾青素合成能力仍低于野生型。这种代谢能力的下降可能与多重胁迫响应消耗有关。两阶段培养中 HpAC75 均未展现出预期的结果，暗示其碳代谢在进化过程中可能发生改变，导致醋酸钠代谢途径与光合作用、类胡萝卜素合成途径的协同效率降低。

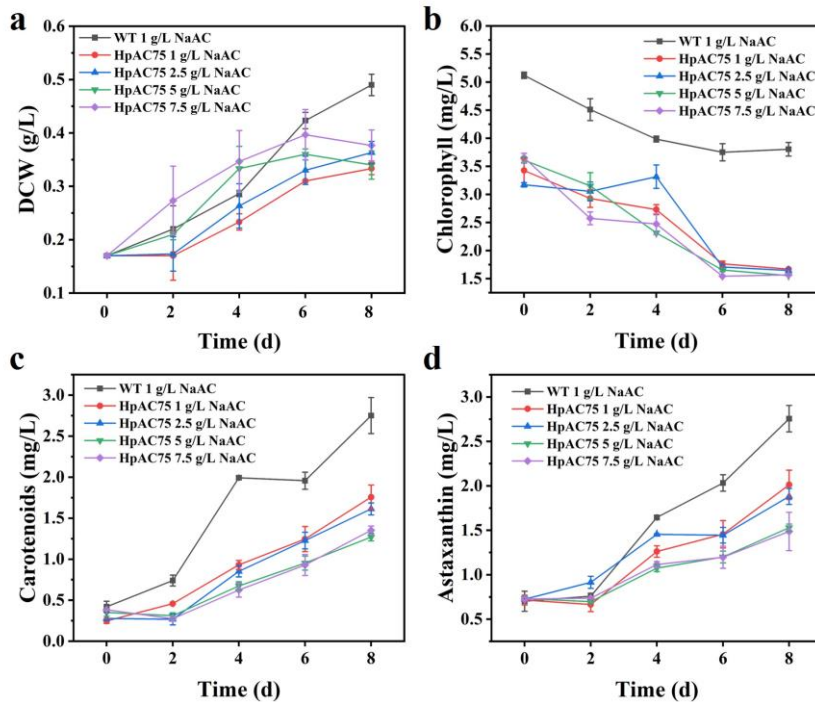


图 4-10 红色阶段 HpAC75 在 1-7.5 g/L 醋酸钠浓度和野生型在 1 g/L 醋酸钠浓度下细胞干重 (a)、总叶绿素 (b)、类胡萝卜素 (c) 和虾青素含量 (d)

Fig.4-10 Cell dry weight (a), total chlorophyll (b), carotenoids (c), and astaxanthin content (d) of red-stage HpAC75 at 1-7.5 g/L NaAc concentrations and the wild type at 1 g/L NaAc concentration

4.3.4 驯化藻生理特性分析

通过适应性进化的得到的最高耐受醋酸钠藻种 HpAC75 在细胞生长和虾青素积累中并未展现出更好的表现, 因此本研究聚焦于对适应性进化的 3 个阶段藻种的研究。在第二章中探究了添加醋酸钠对雨生红球两阶段的影响, 研究表明添加 1 g/L 醋酸钠能够促进雨生红球藻绿色阶段的生长和红色阶段虾青素的积累。因此本研究对 3 种驯化藻种 HpAC25、HpAC50 和 HpAC75 在添加 1 g/L 醋酸钠下绿色阶段和红色阶段的影响。

(1) 绿色阶段驯化藻特性分析

在绿色阶段不同醋酸钠驯化浓度的雨生红球藻 (HpAC25、HpAC50、HpAC75) 在最佳添加浓度 1 g/L 醋酸钠条件下的生长表现存在显著差异。实验结果如图 4-11 所示, 在第 10 天时, HpAC75 的细胞密度达到最高, 为 3.1×10^5 cell/mL, 其次为野生型, 结果与 HpAC50 无显著差异, 而 HpAC25 在 6 天和第 10 天的生物

量都表现为最低（图 4-11 a）。前 6 天和后 4 天的比生长率的变化进一步揭示了驯化藻种与野生型在 1 g/L 醋酸钠浓度下生长动态的影响，如图 4-11 b 所示，在前 6 天野生型的比生长速率为最高，达到 0.36 d^{-1} ，其次是 HpAC50 为 0.33 d^{-1} ，而最低为 HpAC25 和 HpAC75。在 6-10 天驯化组和野生型的比生长率都有所降低，而 HpAC50 在后 4 天的比生长率为最高，相比野生型生长速率提高了 18.29%，最低为 HpAC75，生长速率只有 0.15 d^{-1} 。实验结果表明野生型在培养前期(0-6 天)具有最高比生长率，这可能由于野生型没有经过驯化，在初期代谢活性较高，因此有利于前期的生长。过高驯化浓度（如 7.5 g/L）可能造成细胞损伤或代谢负担，导致其在后续低浓度（1 g/L）应用中的生长优势不显著，而 HpAC50 组在后期（6-10 天）的比生长率显著高于野生型，说明其通过 5 g/L 醋酸钠的驯化获得了更强的环境适应性与代谢的稳定性，提升了雨生红球藻在低浓度醋酸钠环境中生长能力，能够在长期培养中维持较高效率的生长，其机制可能与细胞内醋酸钠代谢通路的适应性增强或抗氧化能力提升有关^[110]。

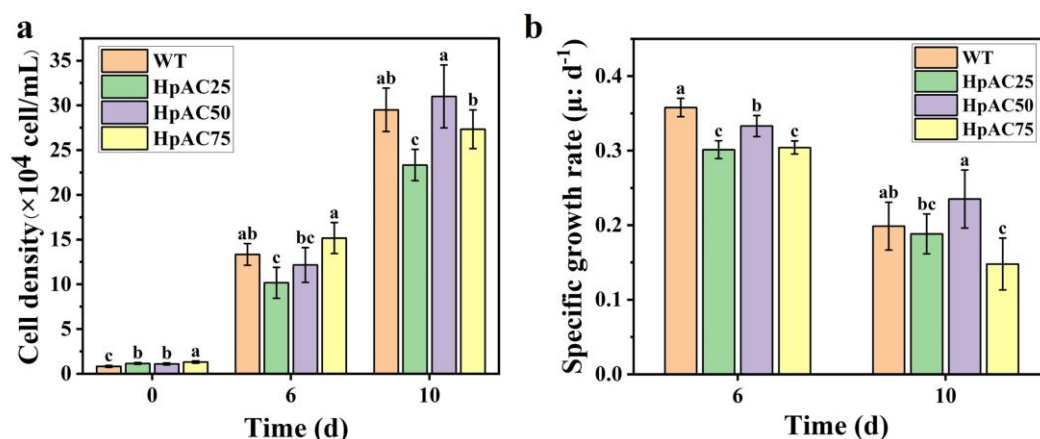


图 4-11 a、b 图分别为野生型与驯化藻种在添加 1g/L 醋酸钠浓度下第 6 天和第 10 天的细胞密度和比生长率，不同字母的柱表示差异显著（ $p < 0.05$ ），采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.4-11 Figures a and b show the cell density and specific growth rate of wild-type and domesticated algal strains under 1 g/L sodium acetate supplementation on day 6 and day 10, respectively. Bars labeled with different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA with Waller-Duncan post hoc test.

如图 4-12 a 所示，野生型与不同醋酸钠驯化藻种的细胞干重在第 10 天无显

著差异,但叶绿素含量呈现显著变化(图 4-12 b),野生型叶绿素含量最高为 65.19 mg/g,其次是 HpAC25 为 43.57 mg/g,而 HpAC50 和 HpAC75 的叶绿素含量均低于 30 mg/g 且无显著差异。结合前期发现的生物量与比生长率差异(HpAC50 最终生物量最高且后期比生长率超过野生型),研究揭示了醋酸钠驯化对雨生红球藻代谢模式的深度调控。野生型的高叶绿素含量表明其保留了完整的光合功能,可能在添加醋酸钠条件下通过光合作用与乙酸代谢的共同作用维持生长,而生长后期比生长率低于 HpAC50,可能因为野生型藻种在后期对乙酸代谢存在适应性不足(如氧化应激反应或碳分配失衡)^[111]。相比之下, HpAC50 虽因 5 g/L 驯化导致叶绿素含量显著降低(<30 mg/g),可能是强化了乙酸异养利用途径,实现高效碳通量,从而在后期生持续生长的优势,因此表现出低光合高生长现象^[112]。HpAC25 叶绿素含量低于野生型且生物量最低,如图 4-9 所示, HpAC25 的藻相较于其他藻种体型较大且稀疏,反映了在 2.5 g/L 驯化的浓度抑制了部分光合作用,且没有充分进行异养代谢,导致细胞速率小生物量变低。HpAC75 的叶绿素含量与 HpAC50 无显著差异,但其生物量略低,这可能是因为 7.5 g/L 的驯化浓度使藻细胞线粒体功能或者抗氧化系统受损^[113],如图 4-13 所示,即使在 1 g/L 的醋酸钠浓度下,仍出现部分细胞损伤和死亡。

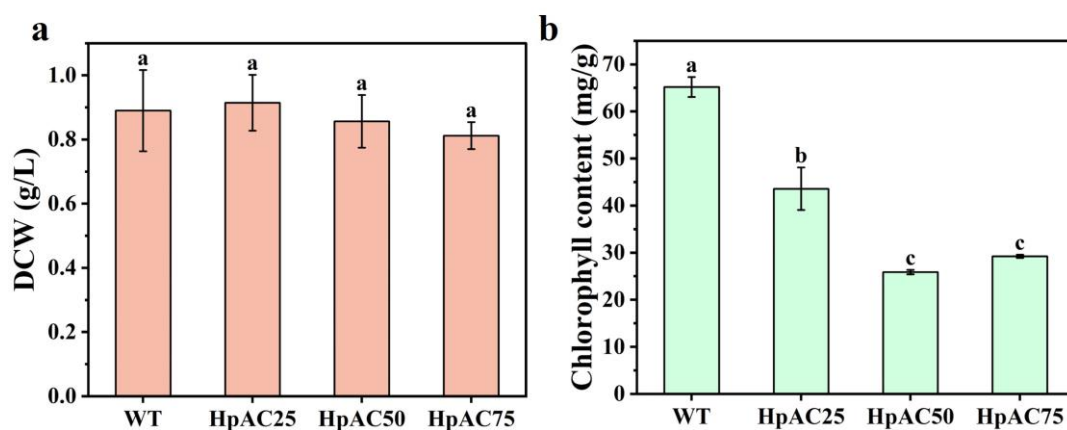


图 4-12 a、b 图分别为驯化藻种与野生型第 10 天时干重和叶绿素含量。不同字母的柱表示差异显著 ($p < 0.05$), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.4-12 Figures a and b represent the dry weight and chlorophyll content of the domesticated algal strain and wild-type strain on day 10, respectively. Bars labeled with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Waller-Duncan

test.

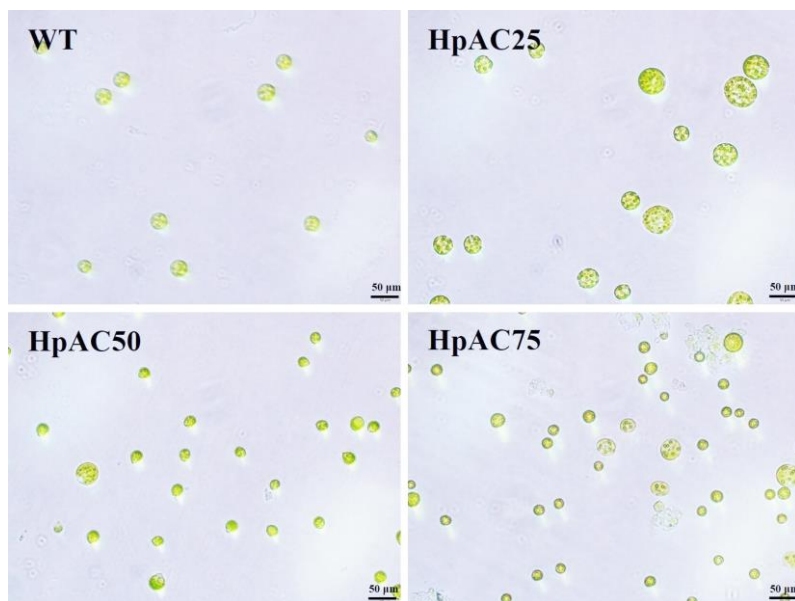


图 4-13 绿色阶段驯化藻种与野生型第 10 天时形态照片

Fig.4-13 Morphological images of the domesticated algal strain and wild-type strain on day 10 in green stage.

在绿色生长阶段，添加 1g/L 醋酸钠对野生型和驯化藻种的蛋白、总糖和油脂的合成如图 4-14 所示，培养至第 10 天时野生型与驯化藻种的蛋白质和油脂含量无显著差异，但 HpAC50 的总糖含量显著高于其他藻种，达到 266.16 mg/g。结合前期的发现，HpAC50 生物量最高、后期比生长率高于野生型以及叶绿素含量最低的特征，本研究进一步揭示了耐醋酸钠适应性进化对雨生红球藻碳代谢调控机制。总糖的显著积累表明，HpAC50 可能通过代谢适应性调整（如增强乙酸合成途径或抑制糖代谢）将更多碳源导向糖类储存^[114]，这可能与驯化过程中异养代谢相关。尽管光合能力降低（叶绿素含量降低），但 HpAC50 通过醋酸钠的高效利用和总糖合成，既为细胞生长提供了充足的能量，又可通过糖类（如海藻糖或淀粉）的渗透保护作用缓解乙酸代谢的压力^[115]，从而维持细胞稳定生长。相比之下，野生型藻种虽然有较高的叶绿素含量，但其糖合成能力较弱，说明其碳分配更倾向于提供能量而非储存，这可能限制了其在长期培养中的持续生长潜力。HpAC25 与 HpAC75 的总糖含量与野生型无显著差异，进一步印证了 2.5 g/L

和 7.5 g/L 驯化浓度不足或者更高，没有有效调整代谢途径，导致总糖积累不明显。值得注意的是，蛋白质和油脂含量的无差异性表明，驯化过程主要调控了碳流向储存性多糖的分配，而未显著影响氮代谢（蛋白质合成）或脂质合成途径^[116]，这可能与藻细胞在混合营养模式下维持基础生命活动有关。HpAC50 的“高糖-高生长”表型为规模化培养提供了新思路，其积累的总糖既可作为绿色阶段的碳储备，也可在后续红色阶段中通过糖降解为虾青素合成提供前体。

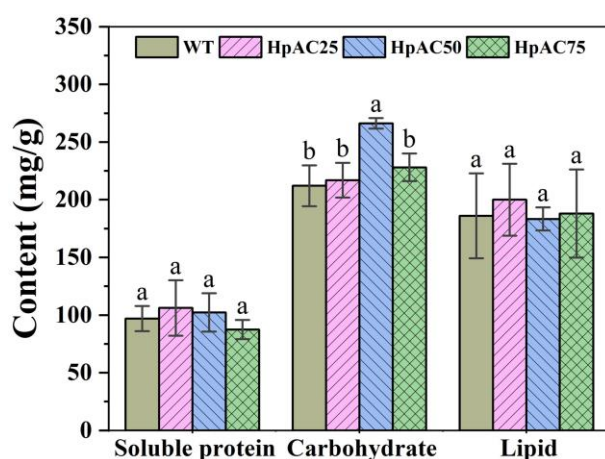


图 4-14 绿色阶段驯化藻种与野生型第 10 天时蛋白、总糖和油脂含量。不同字母的柱表示差异显著 ($p < 0.05$)，采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.4-14 Green stage protein, total sugar, and lipid contents of the domesticated algal strain and wild-type strain on day 10. Bars labeled with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Waller-Duncan test.

(2) 红色阶段驯化藻特性分析

在红色诱导阶段，如图 4-15 所示，第 10 天时 HPAC25 细胞干重显著高于其他藻种，最高为 0.61 g/L，而 HpAC50、HpAC75 及野生型之间无显著差异。HpAC25，在绿色阶段虽生物量最低，但保留了部分叶绿素含量 (43.57 mg/g)，表明其更好的协调光合与异养代谢。在红色诱导阶段，适度保留的光合能力可能通过碳固定供应能量，同时 2.5 g/L 驯化对藻细胞未造成严重代谢损伤，如图 4-16 所示，在第 10 天时，HpAC25 仍有部分绿色藻细胞，说明在红色阶段 HpAC75 细胞在持续生长增殖，使细胞干重增加。

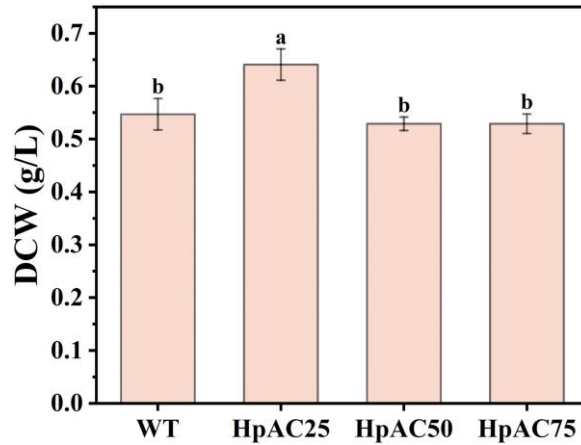


图 4-15 红色阶段驯化藻种与野生型第 10 天细胞干重。不同字母的柱表示差异显著 ($p < 0.05$), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.4-15 Cell dry weight of the domesticated and wild-type algal strains in the red phase on day 10. Bars labeled with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Waller-Duncan test.

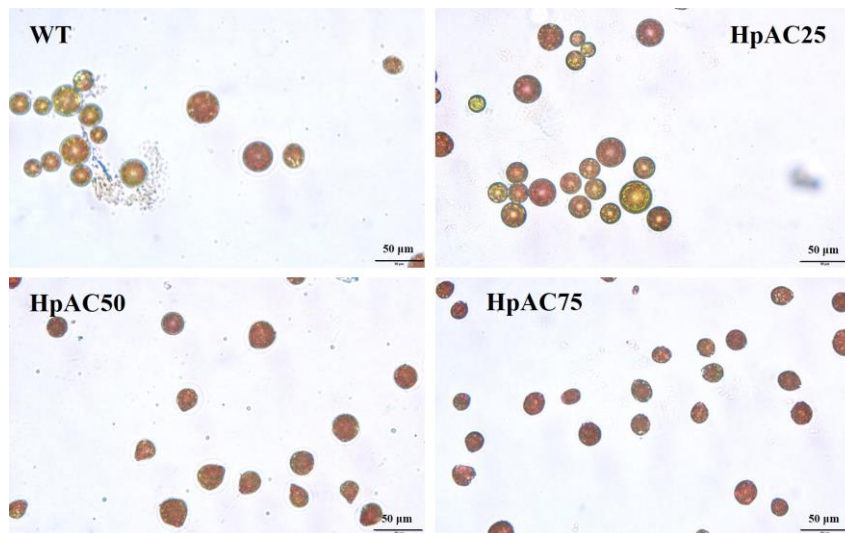


图 4-16 红色阶段野生型和驯化藻种第 10 天显微镜形态照片

Fig.4-16 Microscopic morphological images of the wild-type and domesticated algal strains during the red phase on day 10.

红色诱导阶段第 10 天的虾青素合成分析显示, 不同驯化藻种间存在显著差异, 如图 4-17 所示, HpAC50 的虾青素产量 (3.32 mg/L) 和含量 (6.28 mg/g) 均最高, 较野生型 (产量 2.91 mg/L, 含量 5.33 mg/g) 分别提高 27.2%和 17.8%。HpAC75 的虾青素含量 (5.67 mg/g) 与 HpAC50 无显著差异 ($p > 0.05$), 但其产

量 (2.99 mg/L) 略低; 野生型与 HpAC75 的产量及含量均显著差异, 而 HpAC25 (2.5 g/L 驯化) 表现最差 (产量 2.61 mg/L, 含量 3.99 mg/g)。值得注意的是, 尽管 HpAC25 在红色阶段的细胞干重最高 (0.64 g/L, 图 4-15), 但生物量的虾青素合成效率最低, 可能因为光合作用但缺乏足够的胁迫响应, 或者碳分配而偏向与生物量积累^[117]。HpAC50 虾青素合成能力可能与其绿色阶段的代谢特性相关, 一方面, 5 g/L 驯化诱导的异养代谢优势 (高生物量、总糖积累) 为类胡萝卜素合成提供了前体 (如糖类通过糖酵解生成乙酰辅酶 A)^[118], 另一方面, 其叶绿素含量最低 (<30 mg/g) 可能增强光胁迫敏感性, 从而激活抗氧化机制 (如 β -胡萝卜素酮化酶基因的表达上调), 促进虾青素的合成^[119]。HpAC75 的虾青素含量与 HpAC50 无显著差异, 因此 HpAC75 仍有较高的虾青素合成潜力, 但产量受到生物量影响, 可能因为高浓度醋酸钠驯化导致代谢损伤 (如线粒体功能部分抑制)^[113]。

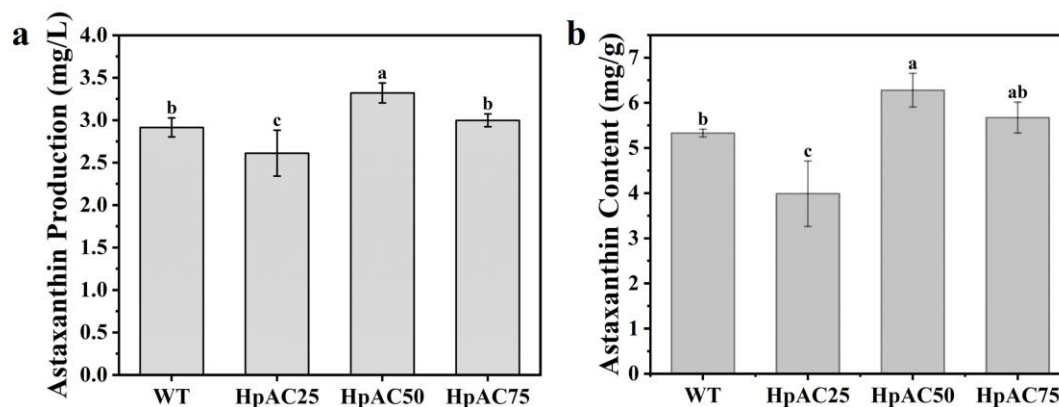


图 4-17 a、b 分别为红色阶段驯化藻种与野生型第 10 天虾青素产量和含量。不同字母的柱表示差异显著 ($p < 0.05$), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.4-17 a represents astaxanthin production, and b represents astaxanthin content in the domesticated and wild-type algal strains during the red phase on day 10. Bars labeled with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Waller-Duncan test.

红色诱导阶段第 10 天的生化组分分析表明, 不同驯化藻种的碳氮代谢流向呈现显著分化(图 4-18)。HpAC25 (2.5 g/L 驯化) 的蛋白质含量最高 (79.12 mg/g), 显著高于 HpAC75 (62.6 mg/g)、野生型及 HpAC50, 总糖含量在各组间无显著差异, 而油脂含量 HpAC50 最高 (209.5 mg/g), 其次是 HpAC75 (170.5 mg/g),

野生型与 HpAC25 的油脂含量最低且无显著差异。HpAC25 的高蛋白含量 (79.12 mg/g) 与其红色阶段生物量较高 (0.64 g/L) 相呼应, 可能通过蛋白质合成促进细胞增长, 但过度分配碳氮源合成蛋白可能导致虾青素前体 (如乙酰辅酶 A) 供应不足^[120], 致使其虾青素含量最低 (3.99 mg/g)。相比之下, HpAC50 虽蛋白质含量最低, 但其油脂含量 (209.5 mg/g) 显著高于其他实验组, 表明 5 g/L 驯化可能通过上调脂质合成关键酶 (如乙酰辅酶 A 羧化酶), 而脂质代谢与虾青素合成都以乙酰辅酶 A 前体^[121], 因此促进了虾青素合成。此外, HpAC50 在绿色阶段积累的高总糖 (266.16 mg/g) 可能通过糖酵解持续供应丙酮酸, 进一步强化乙酰辅酶 A 合成, 从而促进红色阶段脂质与虾青素合成^[122]。值得注意的是, 四组总糖含量无差异, 表明糖类可能作为基础碳固定作用合成, 而 HpAC50 优先将糖类转化为脂质与虾青素, HpAC25 则倾向用于蛋白质合成与生物量积累。研究表明, 通过耐醋酸钠适应性进化, 在红色阶段, HpAC50 在最佳添加浓度 1g/L 醋酸钠红色诱导下能够进一步促进脂质和虾青素的合成。

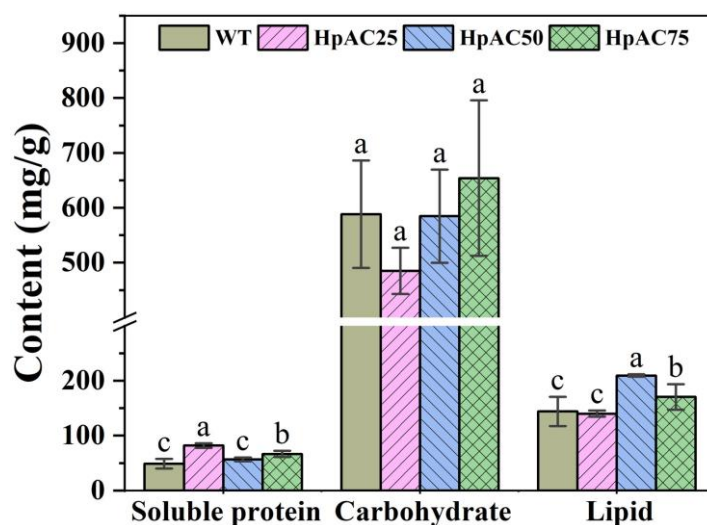


图 4-18 红色阶段驯化藻种与野生型第 10 天时蛋白、总糖和油脂含量。不同字母的柱表示差异显著 ($p < 0.05$), 采用基于 Waller-Duncan 检验的单因素方差分析确定。

Fig.4-18 Red stage protein, total sugar, and lipid contents of the domesticated algal strain and wild-type strain on day 10. Bars labeled with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by one-way ANOVA followed by Waller-Duncan test.

4.4 本章小结

本章通过短周期多批次的方式对雨生红球藻进行耐醋酸钠适应性进化,从野生型藻种在 2.5 g/L 到 5 g/L 最后到 7.5 g/L 的醋酸钠浓度下进行长达 4 个月的进化,成功驯化出适应每个阶段醋酸钠浓度的耐醋酸钠藻种 HpAC25 (2.5 g/L)、HpAC50 (5 g/L) 和 HpAC75 (7.5 g/L)。通过 FDA 和 PI 对活死细胞进行荧光染色证明了驯化藻种在高浓度的醋酸钠环境中能够存活并生长。

通过将驯化藻种和野生型藻种在添加 1 g/L 最佳醋酸钠浓度的两阶段对比实验可以发现,在绿色生长期,通过细胞密度、比生长率和生化组分的测定 HpAC50 在绿色阶段能够促进藻细胞的生长,尤其在后期,其生长速率高于野生型,同时促进了总糖的合成,相较于野生型提高了 25.5%。在红色阶段,对各组生物量、虾青素产量和含量以及生化组分的测定,发现 HpAC50 相较于野生型,虾青素产量提高了 27.2%,虾青素含量提高了 17.8%,油脂含量提高了 45.49%。表明通过耐醋酸盐适应性进化能够进一步促进绿色阶段细胞生长和红色阶段虾青素的积累。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

为提高雨生红球藻对醋酸盐的利用从而提高生物量和虾青素积累,本研究通过两阶段最佳盐浓度探索提出多批次补加醋酸钠的策略对提高雨生红球藻对醋酸钠的充分利用,并通过 RT-qPCR 探究了雨生红球藻醋酸盐利用代谢调控机制。此外,通过短周期-多循环耐醋酸钠适应性进化定向培育出耐受高浓度醋酸钠的雨生红球藻藻种,实验证明驯化藻种可以进一步促进虾青素的积累。本研究的主要结论如下:

(1) 添加 1 g/L 醋酸钠时绿色阶段的生物量及红色阶段虾青素产量最高,因此添加 1 g/L 醋酸钠为雨生红球藻利用醋酸盐的最优浓度。在醋酸钠梯度优化实验中,结果明确了两阶段多次补加策略的显著优势:绿色生长期第 6 天和红色诱导期第 3 天分别补加 1 g/L 醋酸钠,使绿色阶段生物量达到 6.39×10^5 cell/mL (较初次添加 1 g/L 醋酸钠提高 14.58%),红色诱导期细胞干重提升 26.47%,油脂含量提高 17.65%,虾青素产量稳定维持在 4.37 mg/L 以上。这一结果表明,补加醋酸钠能够促进雨生红球藻对醋酸钠的利用,并有效缓解高浓度乙酸盐对藻细胞的抑制,同时加强了碳源的持续供应能力。

(2) 通过 RT-qPCR 对添加和补加醋酸钠对雨生红球藻两阶段藻的生长、虾青素和油脂的积累的机制分析,在绿色生长期, *acs2* 和 *acs3* 基因快速响应并显著上调,在补加后分别上调 8.68 倍和 107.2 倍,结果表明 *acs2* 和 *acs3* 在 5 种乙酰辅酶 A 合成酶中更为关键。而醋酸盐利用 *acs* 不同时间的基因表达动力学研究中红色阶段, *acs4a* 和 *acs4b* 基因的显著上调(分别达 17.88 倍和 77.79 倍),结果表明红色阶段 *acs4* 乙酸钠的吸收利用中起关键作用,揭示了该阶段乙酸代谢机制。进一步代谢分析显示,补加策略显著增强了 TCA 循环(*aceB* 和 *cs* 基因在绿色阶段上调 9.88 倍和 12.15 倍)与碳固定途径(*pckA* 基因上调 14.78 倍),表明醋酸钠不仅作为碳源参与能量代谢,还可通过增强 TCA 循环的碳通量,实现光合作用与外源碳源的协同利用。此外,醋酸钠的添加和补充显著促进了脂质合成下游基因(*fabD*、*kcs* 和 *acsL*)的表达。

(3) 本研究短周期多批次循环的适应性进化策略, 成功驯化出耐受 7.5 g/L 醋酸钠的 HpAC75 藻株。荧光染色实验显示, 驯化株在 5 g/L 和 7.5 g/L 醋酸钠胁迫下的存活率分别达 81.22%和 43.51%, 较野生型提高 4.23 倍和 5.6 倍, 表明适应性进化可以定向提高雨生红球藻耐醋酸盐的能力。生理分析表明, HpAC50 驯化株在优化培养体系中展现出生长与虾青素积累的优势: 绿色阶段比生长速率提升 23%, 细胞总糖含量提高 19%; 红色诱导期虾青素产量达 5.56 mg/L (较野生型提升 27.2%), 油脂含量提高 45.49%, 表明通过耐醋酸盐适应性进化能够进一步促进绿色阶段细胞生长和红色阶段虾青素的积累。

5.2 展望

本研究对雨生红球藻利用醋酸盐作为碳源在绿色生长期和红色诱导期藻的生长以及虾青素的积累做出充分的研究。提出一种有效的醋酸盐利用策略, 并揭示了其利用机制, 通过适应性进化培育出耐高浓度醋酸盐藻种, 并能进一步提高虾青素产量。未来可以继续以下几个方面进行深入探究:

(1) 依托获得的雨生红球藻耐醋酸盐驯化藻种, 通过转录组、代谢组等分析手段, 进一步深入探究其有机盐耐受适应性进化机制。

(2) 研究雨生红球藻与产醋酸盐菌的共生体系实现维持碳源供给, 应用于废水处理, 生产高附加值产物。

参考文献

- [1] Gherabli A , Grimi N , Lemaire J , et al. Extraction of valuable biomolecules from the microalga *Haematococcus pluvialis* assisted by electrotechnologies [J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2089.
- [2] Ashokkumar V, Chen W-H, Kumar G, et al. A biorefinery approach for high value-added bioproduct (astaxanthin) from alga *Haematococcus* sp. and residue pyrolysis for biochar synthesis and metallic iron production from hematite (Fe_2O_3) [J]. *Fuel*, 2021, 304: 121150.
- [3] Liyanaarachchi V C, Nishshanka G, Premaratne R, et al. Astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: Effect of initial phosphate concentration and stepwise/continuous light stress [J]. *Biotechnology reports*, 2020, 28: e00538.
- [4] Jeon Y-C, Cho C-W, Yun Y-S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Enzyme and microbial technology*, 2006, 39(3): 490-495.
- [5] Lv R, Liu K, Chen F, et al. Buffering culture solution significantly improves astaxanthin production efficiency of mixotrophic *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 354: 127175.
- [6] Debnath T, Bandyopadhyay T K, Vanitha K, et al. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application [J]. *Food research international*, 2024, 176: 113841.
- [7] Yu W, Liu J. Astaxanthin isomers: Selective distribution and isomerization in aquatic animals [J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 734915.
- [8] Patel A K, Tambat V S, Chen C-W, et al. Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128030.
- [9] Panis G, Carreon J R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis* : A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line [J]. *Algal Research*, 2016, 18: 175-190.

- [10] Zhou D, Yang X, Wang H, et al. Biosynthesis of astaxanthin by using industrial yeast [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2023, 17(3): 602-615.
- [11] Kang C D, Lee J S, Park T H, et al. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2005, 68(2): 237-241.
- [12] Cui H, Zhu X, Yu X, et al. Advancements of astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Update insight and way forward [J]. *Biotechnology advances*, 2025, 79: 108519.
- [13] Xu J, Gu J, Li X, et al. Influence of molecular structure of astaxanthin esters on their stability and bioavailability [J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128497.
- [14] 陈涛, 沼泽彻, 杨福梅, 等. 雨生红球藻中天然虾青素的应用研究 [J]. *农业工程技术*, 2023, 43(15): 76-77.
- [15] Park S Y, Binkley R M, Kim W J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity [J]. *Metabolic engineering*, 2018, 49: 105-115.
- [16] Singh K N, Patil S, Barkate H. Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19(1): 22-27.
- [17] Harumi J, Sining S, Yoshifumi T, et al. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen [J]. *Journal of Nutrition*, 1995, (10): 2483-2492.
- [18] 张晓燕, 刘楠, 周德庆. 天然虾青素来源及分离的研究进展 [J]. *食品与机械*, 2012, 28(01): 264-267.
- [19] 韩吉平, 江宁, 诸永志, 等. 天然虾青素的制备和功能研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(08): 56-60.
- [20] Palozza P, Torelli C, Boninsegna A, et al. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells [J]. *Cancer Letters*, 2009, 283(1): 108-117.
- [21] Xiaoming G, Joshua S, Haley S, et al. Carotenoid lutein selectively inhibits breast

- cancer cell growth and potentiates the effect of chemotherapeutic agents through ROS-Mediated mechanisms [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 905.
- [22] 王雨, 孙宏元, 张文丽, 等. 虾青素微胶囊的工艺流程 [J]. *内江科技*, 2021, 42(12): 110-111.
- [23] Carballo D E, Javier Giraldez F, Andres S, et al. Effects of dietary astaxanthin supplementation on the oxidative stability of meat from suckling lambs fed a commercial milk-replacer containing butylated hydroxytoluene [J]. *Meat Science*, 2019, 156(OCT.): 68-74.
- [24] Shah M M R, Yuanmei L, 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.
- [25] 李冬玲. 极具经济价值的微藻——雨生红球藻 [J]. *特种经济动植物*, 2014, 17(3): 1.
- [26] Yan H, Ma H, Li Y, et al. Oxidative stress facilitates infection of the unicellular alga *Haematococcus pluvialis* by the fungus *Paraphysoderma sedebokerense* [J]. *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, 2022, 15(1): 56.
- [27] 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, 038(2): 72-77.
- [28] Wayama M, Ota S, Matsuura H, et al. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(1):e53618.
- [29] Acheampong A, Wang R, Elsherbiny S M, et al. Exogenous arginine promotes the coproduction of biomass and astaxanthin under high-light conditions in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 393: 130001.
- [30] Teng Z, Zheng L, Yang Z, et al. Biomass production and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* in large-scale outdoor culture based on year-round survey: Influencing factors and physiological response [J]. *Algal Research*, 2023, 71: 103070.
- [31] Singh P, Kumari S, Guldhe A, et al. Trends and novel strategies for enhancing lipid

- accumulation and quality in microalgae [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 55: 1-16.
- [32] Kobayashi M, Katsuragi T, Tani Y. Enlarged and astaxanthin-accumulating cyst cells of the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2001, 92(6): 565-568.
- [33] Jose B, Carlos G-E, Katarina K, et al. Biosynthesis of astaxanthin as a main carotenoid in the *Heterobasidiomycetous Yeast Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *Journal of Fungi*, 2017, 3(3):44.
- [34] 徐年军, 陈锋, 胡朝阳, 等. microRNA 介导雨生红球藻在高光胁迫下次级细胞壁形成和虾青素积累的分子机制 [J]. *海洋与湖沼*, 2023, 54(3): 763-772.
- [35] 魏炜. 雨生红球藻中虾青素合成相关酶基因的转录调控序列分析 [D]; 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2006.
- [36] Athanasakoglou A, Grypioti E, Michailidou S, et al. Isoprenoid biosynthesis in the diatom *Haslea ostrearia* [J]. *New Phytologist*, 2019, 222(1): 230-243.
- [37] 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.
- [38] Maltsev Y, Maltseva K, Kulikovskiy M, et al. Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition [J]. *Biology*, 2021, 10(10): 1060.
- [39] Li D, Yuan Y, Cheng D, et al. Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of *Chlorella* sp. AE10 [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291: 121783.
- [40] Xi T, Kim D G, Roh S W, et al. Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2016, 100: 6231-6238.
- [41] Li K, Ye Q, Li Q, et al. Effects of the spatial and spectral distribution of red and blue light on *Haematococcus pluvialis* growth [J]. *Algal Research*, 2020, 51: 102045.
- [42] 廖兴辉, 王明兹, 陈必链. 雨生红球藻生产虾青素的研究进展 [J]. *安徽农*

- 业科学, 2013, 000(026): 10579-10583.
- [43] 陈书秀, 梁英. 光照强度对雨生红球藻叶绿素荧光特性及虾青素含量的影响 [J]. 南方水产, 2009, 5(1): 1-8.
- [44] Pereira N M D O, Silva D C D, Viana W K R, et al. Effect of carrot juice on *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production [J]. Algal Research, 81: 103590.
- [45] 江红霞, 林雄平, 雷梦云, 等. 光周期对雨生红球藻生物量、虾青素累积和抗氧化能力的影响 [J]. 水产科学, 2015, 34(9): 5.
- [46] 江红霞, 雷梦云, 林雄平, 等. 光照胁迫对雨生红球藻虾青素积累和抗氧化活性的影响 [J]. 现代食品科技, 2015, 031(010): 215-221,233.
- [47] Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, et al. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions [J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1992, 74(1): 17-20.
- [48] Kang C D, Lee J S, Park T H, et al. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2005, 68(2): 237-241.
- [49] 叶鑫, 虞新磊, 胡朝阳, 等. CO₂ 和乙酸钠对雨生红球藻生长及其虾青素积累的影响 [J]. 核农学报, 2021. 3: 613-622.
- [50] Letícia.Biscaia W, Miyawaki B, Mello T C D, et al. Biofixation of air emissions and biomass valorization-evaluation of microalgal biotechnology [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2022, 194(9): 4033-4048.
- [51] Solovchenko A, Chivkunova O, Maslova I. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2011, 58: 9-17.
- [52] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response [J]. Physiologia Plantarum, 2000, 108(2): 111-117.
- [53] Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, et al. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis* [J]. Algal research, 2015, 12:

- 170-181.
- [54] 庄惠如, 施巧琴, 卢海声, 等. 营养胁迫对雨生红球藻虾青素累积的影响 [J]. 水生生物学报, 2000, 24(3): 5.
- [55] Liu W, Guo C, Huang D, et al. The papain-like cysteine protease HpXBCP3 from *Haematococcus pluvialis* Involved in the regulation of growth, salt stress tolerance and chlorophyll synthesis in microalgae [J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(21):11539.
- [56] 殷明焱, 刘建国. 雨生红球藻和虾青素的研究 [J]. 海洋湖沼通报, 1998, 38(2): 53-62.
- [57] 曹黎. 雨生红球藻虾青素酰基转移酶基因的鉴定 [D]; 中国科学院大学.
- [58] Tjahjono A E, Hayama Y, Kakizono T, et al. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures [J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(2): 133-138.
- [59] Huang A, Sun L, Wu S, et al. Utilization of glucose and acetate by *Chlorella* and the effect of multiple factors on cell composition [J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29: 23-33.
- [60] Lin D Q, University T, Tanjin. Inducing mechanism of acetate on astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* [J]. Microbiology, 2007, 34(2): 256-260.
- [61] Li Y, Tao Y, Wang Q, et al. Effects of organic carbon source and pH on growth, astaxanthin accumulation and endogenous phytohormone secretion of *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2023, 35(6): 2815-2828.
- [62] He B, Hou L, Dong M, et al. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by high light with acetate and Fe^{2+} [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1): 175.
- [63] Hu Q, Song M, Huang D, et al. *Haematococcus pluvialis* accumulated lipid and astaxanthin in a moderate and sustainable way by the self-protection mechanism of salicylic acid under sodium acetate stress [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 763742.
- [64] 王栋, 高政权, 孟春晓. Fe^{2+} , 醋酸盐和双氧水对雨生红球藻积累虾青素的影响

- 响 [J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 334-340.
- [65] 董庆霖, 赵学明, 邢向英. 乙酸钠诱导雨生红球藻合成虾青素的机理 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 256-260.
- [66] Orr J S, Christensen D G, Wolfe A J, et al. Extracellular acidic pH inhibits acetate consumption by decreasing gene transcription of the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt [J]. American Society for Microbiology, 2019, 201(2): e00410-18.
- [67] 黄水英, 齐安翔, 李哲, 等. 几种胁迫方式对雨生红球藻积累虾青素影响的初步研究 [J]. 海洋科学集刊, 2008, 000(001): 144-151.
- [68] Cray R, Levine I. Oxidative stress modulates astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2022, 34(5): 2327-2338.
- [69] Hu X, Tang X, Bi Z, et al. Adaptive evolution of microalgae *Schizochytrium* sp. under high temperature for efficient production of docosahexaenoic acid [J]. Algal Research, 2021, 54: 102212.
- [70] Song K, Zhou Z, Huang Y, et al. Multi-omics insights into the mechanism of the high-temperature tolerance in a thermotolerant *Chlorella sorokiniana* [J]. Bioresource Technology, 2023, 390: 129859.
- [71] Kim Z H, Kim K, Park H, et al. Enhanced fatty acid productivity by *Parachlorella* sp., a *Freshwater Microalga*, via adaptive laboratory evolution under salt stress [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2021, 26(2): 223-231.
- [72] Fae N W A, Tomkins J L, Jason K W. Improved biomass production of a microalga through adaptative laboratory evolution to a high light environment [J]. Journal of Applied Phycology, 2023, (3): 35.
- [73] Wan M, Zhang Z, Wang J, et al. Sequential heterotrophy–dilution–photoinduction cultivation of *Haematococcus pluvialis* for efficient production of astaxanthin [J]. Bioresource Technology, 2015, 198: 557-563.
- [74] Jannel S, Caro Y, Bermudes M, et al. Novel insights into the biotechnological production of *Haematococcus pluvialis*-derived Astaxanthin: Advances and key

- challenges to allow its industrial use as novel food ingredient [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2020, 8(10): 789.
- [75] Mota G C P, Moraes L B S D, Oliveira C Y B, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022, 52(5): 598-609.
- [76] Oslan S N H, Shoparwe N F, Yusoff A H, et al. A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 256.
- [77] Li X, Wang X, Duan C, et al. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnology advances*, 2020, 43: 107602.
- [78] Zhao Y, Hou Y, Chai W, et al. Transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* of multiple defensive systems against nitrogen starvation [J]. *Enzyme and microbial technology*, 2020, 134: 109487.
- [79] Li Q, Li L, Zhang Y, et al. Chemical inducers regulate ROS signalling to stimulate astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* under environmental stresses: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, 136: 181-193.
- [80] Marella H K, Kothadia J P, Saleem N, et al. A patient with eosinophilic esophagitis and herpes simplex esophagitis: A case report and literature review [J]. *Case reports in gastrointestinal medicine*, 2021, 2021: 5519635.
- [81] Joun J, Sirohi R, Sim S J. The effects of acetate and glucose on carbon fixation and carbon utilization in mixotrophy of *Haematococcus pluvialis* [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 367: 128218.
- [82] Cao Y, Xu J, Tong Y, et al. Sodium acetate promotes the production of biomass and intracellular biochemical components by *Micractinium reisseri* FMI under batch and fed-batch cultivation [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, 34(6): 2857-2868.
- [83] Proietti Tocca G, Agostino V, Menin B, et al. Mixotrophic and heterotrophic growth of microalgae using acetate from different production processes [J].

- Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2024, 23(1): 93-132.
- [84] Han D, Wang J, Sommerfeld M, et al. Susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) to photooxidative stress 1 [J]. Journal of Phycology, 2012, 48(3): 693-705.
- [85] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991, 71(5): 335-339.
- [86] Zhang C, Zhang L, Liu J. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage [J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31: 1001-1008.
- [87] Peng S, Cao Y, Xie Z, et al. Effects of sodium acetate and ammonium acetate on the growth and production of cellular components of *Chlorella vulgaris* 31 [J]. Journal of Applied Phycology, 2024, 36(1): 1-14.
- [88] Wellburn A R. The Spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution [J]. Journal of Plant Physiology, 1994, 144(3): 307-313.
- [89] 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.
- [90] Wang S, Zhu J, Dai L, et al. A novel process on lipid extraction from microalgae for biodiesel production [J]. Energy, 2016, 115: 963-968.
- [91] Yu X, Ye X, Hu C, et al. Sodium acetate can promote the growth and astaxanthin accumulation in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* as revealed by a proteomics approach [J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2022, 40(5): 2052-2067.
- [92] Cong X, Zang X, Dong M, et al. Accumulation of phytoene and astaxanthin and related genes expression in *Haematococcus pluvialis* under sodium acetate stress [J]. Aquatic Biology, 2020, 29: 155-164.
- [93] Goodenough U, Blaby I, Casero D, et al. The path to triacylglyceride obesity in

- the sta6 strain of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Eukaryotic cell, 2014, 13(5): 591-613.
- [94] Rengel R, Smith R T, Haslam R P, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Algal Research, 2018, 31: 183-193.
- [95] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology & Evolution, 2016, (7): 1870.
- [96] Bian C, Liu C, Zhang G, et al. A chromosome-level genome assembly for the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Scientific Data, 2023, 10(1): 511.
- [97] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology & Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [98] Felsenstein, Joseph. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [99] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [100] Kim Y, Lama S, Agrawal D, et al. Acetate as a potential feedstock for the production of value-added chemicals: Metabolism and applications [J]. Biotechnology advances, 2021, 49: 107736.
- [101] Lauersen K J, Willamme R, Coosemans N, et al. Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Algal Research, 2016, 16: 266-274.
- [102] Rengel R, Smith R T, Haslam R P, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Algal Research, 2018, 31: 183-193.
- [103] Yang J, Pan Y, Bowler C, et al. Knockdown of phosphoenolpyruvate carboxykinase increases carbon flux to lipid synthesis in *Phaeodactylum*

- tricornutum* [J]. Algal research, 2016, 15: 50-58.
- [104] Zhang C, Zhang L, Liu J. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 31(2): 1001-1008.
- [105] Wayama M, Ota S, Matsuura H, et al. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. Public Library of Science ONE, 2013, 8(1): e53618.
- [106] Yewalkar S, Wu T, Kuan D, et al. Applicability of differential fluorescein diacetate and propidium iodide fluorescence staining for monitoring algal growth and viability [J]. Waste Disposal & Sustainable Energy, 2019, 1(3): 8.
- [107] Bogaert, Perez, Rumin, et al. Metabolic, physiological, and transcriptomics analysis of batch cultures of the green microalga *Chlamydomonas* grown on different acetate concentrations [J]. Cells, 2019, 8(11): 1367.
- [108] Zhao X, Jarboe L, Wen Z. Utilization of pyrolytic substrate by microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: cell membrane property change as a response of the substrate toxicity [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100(9): 4241-4251.
- [109] Almeida A C, Gomes T, Langford K, et al. Oxidative stress potential of the herbicides bifenox and metribuzin in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Aquatic Toxicology, 2019, 210: 117-128.
- [110] Guo Y, Cao Y, Yang R, et al. Effects of three exogenous phytohormones on the growth, selenium absorption, and metabolism of the microalga *Parachlorella kessleri* under sodium selenite stress [J]. Algal Research, 2024, 79: 103477.
- [111] Mondal S, Kumar V, Singh S P. Oxidative stress measurement in different morphological forms of wild-type and mutant *cyanobacterial strains*: Overcoming the limitation of fluorescence microscope-based method [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 200: 110730.
- [112] Nair A, Chakraborty S. Synergistic effects between autotrophy and heterotrophy in optimization of mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* in bubble-

- column photobioreactors [J]. *Algal Research*, 2020, 46(440): 101799.
- [113] Li Z, Zheng Y, Ma H, et al. Microcystin-LR (MC-LR) inhibits green algae growth by regulating antioxidant and photosynthetic systems [J]. *Harmful algae*, 2024, 134: 102623.
- [114] De Bhowmick G, Koduru L, Sen R. Metabolic pathway engineering towards enhancing microalgal lipid biosynthesis for biofuel application—A review [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2015, 50(oct.): 1239-1253.
- [115] Rathod J P, Prakash G, Vira C, et al. Trehalose phosphate synthase overexpression in *Parachlorella kessleri* improves growth and photosynthetic performance under high light conditions [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2016, 46(8): 803-809.
- [116] Karthikaichamy A, Beardall J, Coppel R, et al. Data-independent-acquisition-based proteomic approach towards understanding the acclimation strategy of oleaginous microalga *Microchloropsis gaditana* CCMP526 in hypersaline conditions [J]. *ACS omega*, 2021, 6(34): 22151-22164.
- [117] Ji C, Mao X, Hao J, et al. Analysis of bZIP transcription factor family and their expressions under salt Stress in [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2800.
- [118] Zhao Y, Hou Y, Chai W, et al. Transcriptome analysis of *Haematococcus pluvialis* of multiple defensive systems against nitrogen starvation [J]. *Enzyme and microbial technology*, 2020, 134: 109487.
- [119] Huang L, Du X, Jin Z, et al. Accumulation of astaxanthin in *Microcystis aeruginosa* under NaCl and KCl stresses [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 403: 130898.
- [120] Qiu W, Chen R, Wang X, et al. Quantitative proteomics of *Chromochloris zofingiensis* reveals the key proteins involved in cell growth and bioactive compound biosynthesis [J]. *Plants*, 2022, 11(14): 1851.
- [121] Zhekisheva M, Zarka A, Khozin oldberg I, et al. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in

the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*)¹ [J]. Journal of Phycology, 2010, 41(4): 819-826.

- [122] Song X, Diao J, Yao J, et al. Engineering a central carbon metabolism pathway to increase the intracellular acetyl-coA pool in *Synechocystis sp.* PCC 6803 grown under photomixotrophic conditions [J] ACS Synthetic Biology, 2021, 10(4): 836-846.

附录

表 1 实验试剂表

试剂名称	规格	生产厂家
柠檬酸铁	AR	生工
醋酸钠	AR	麦克林
硝酸钠	AR	沪试
氯化铵	AR	沪试
三水磷酸氢二钾	AR	生工
EDTA·2Na	AR	生工
七水硫酸锌	AR	生工
二水氯化钙	AR	沪试
四水氯化锰	AR	生工
七水硫酸亚铁	AR	沪试
钼酸铵	AR	麦克林
钼酸钠	AR	沪试
五水硫酸铜	AR	沪试
六水氯化钴	AR	麦克林
硫酸钴	AR	麦克林
氯化钠	AR	生工
磷酸二氢钾	AR	生工
硫酸镁	AR	沪试
碳酸氢钠	AR	生工
过硫酸钾	AR	麦克林
琼脂粉	AR	生工
琼脂糖	AR	生工
盐酸	AR	沪试
硫酸	AR	沪试
维生素 B ₁	AR	麦克林
维生素 biotin	AR	麦克林
维生素 B ₁₂	AR	麦克林
氢氧化钠	AR	麦克林
植物基因组提取试剂盒	/	全式金
BCA 法蛋白含量测试盒	/	科铭生物
总糖含量测试盒	/	科铭生物
总 RNA 提取试剂盒	/	全式金
反转录试剂盒	/	Toroivd
荧光定量试剂盒	/	Toroivd
10×TBE	/	生工
6×Loading Buffer	/	生工
氯仿	AR	沪试

表 2 实验仪器设备表

实验设备	生产厂家
立式高压蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
超净工作台	浙江孚夏医疗科技有限公司
电热鼓风干燥箱	上海力辰科技有限公司
光照培养箱	合肥右科仪器设备有限公司
摇床	上海力辰科技有限公司
CFX96 荧光定量 PCR 检测仪	伯乐生命医学产品有限公司
紫外可见分光光度计	上海美普达仪器有限公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品(上海)有限公司
电泳仪	伯乐生命医学产品(上海)有限公司
电磁炉	九阳股份有限公司
微波炉	九阳股份有限公司
凝胶成像仪	伯乐生命医学产品(上海)有限公司
电子天平	上海力辰科技有限公司
冰箱	海尔集团公司
高速离心机	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
冷冻高速离心机	大龙兴创实验仪器股份公司
倒置荧光显微镜	日本奥林巴斯有限公司
酶联免疫检测仪	瑞士帝肯有限公司
高效液相色谱仪	日本岛津有限公司
荧光分光光度计	日立有限公司
紫外可见吸收光谱仪	日本岛津有限公司

攻读硕士期间学术论文发表情况

- [1] Physiological and molecular responses to sodium acetate addition and supplementation in the two stages of *Haematococcus pluvialis*. 期刊: *Journal of Oceanology and Limnology*. 2 作（导师 1 作）（毕业论文第二、三章内容）

致 谢

行文至此，感慨万千。时光飞逝，转眼三年的硕士生涯即将落幕，心中充满感激。

首先，我要向我的导师李艳宾教授致以最诚挚的谢意。感谢您在论文选题、研究框架确立和关键思路把握上给予的宏观指导与宝贵建议。您的学术视野和洞察力为我的研究指明了方向。衷心感谢我的第二导师何帮翔老师，感谢您在论文研究的具体实施、实验过程中给予的细致指导与持续帮助，以及在论文撰写与修改阶段付出的辛勤时间和耐心解惑。您的专业素养和严谨态度让我受益匪浅。

同时也感谢我们课题组的所有老师和同学，感谢你们的讨论启发、互助协作和一路陪伴。这段共同成长的经历十分珍贵。

最后，深深感谢我的家人。是你们无条件的爱与默默付出，成为我求学路上最坚实的后盾和前进的动力。

谨以此文，向所有关心、帮助过我的人表达最真挚的谢意。未来之路，我将心怀感恩，砥砺前行。

韩维召

2025 年 5 月 7 日