



## 坛紫菜叶状体和丝状体中的类胡萝卜素组成差异

潘海斌<sup>1</sup>, 唐欣怡<sup>1</sup>, 陈海敏<sup>1</sup>, 杨锐<sup>1</sup>,  
张鹏<sup>2</sup>, 骆其君<sup>1</sup>, 陈娟娟<sup>1\*</sup>

(1. 宁波大学, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

**摘要:** 类胡萝卜素是重要的光合色素和抗氧化剂, 具有调节植物生长、发育和环境适应等功能。为了深入了解坛紫菜中类胡萝卜素在不同生长阶段中的合成代谢过程, 实验采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术分析坛紫菜丝状体和不同采收期叶状体中类胡萝卜素组成差异。结果显示, 甲醇-二氯甲烷(1:1, 体积比)为提取溶剂, 液料比1:10, 超声时间30 min是坛紫菜类胡萝卜素的最佳提取条件; 优化色谱条件, 16种类胡萝卜素的分离度达到1.5, 最低检测限为1.57~4.96 ng/mL。在坛紫菜两种世代体中共检测到8种类胡萝卜素, 分别属于 $\alpha$ -胡萝卜素合成途径( $\alpha$ -胡萝卜素、 $\epsilon$ -胡萝卜素、 $\alpha$ -隐黄质和叶黄质)和 $\beta$ -胡萝卜素合成途径( $\beta$ -胡萝卜素、 $\beta$ -隐黄质、玉米黄质和环氧玉米黄质)。叶状体中的总类胡萝卜素含量和最大光化学效率( $F_v/F_m$ )分别是丝状体1.4和1.5倍。其中, 丝状体中仅 $\beta$ -隐黄质的含量显著高于叶状体(3.7倍), 而 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\epsilon$ -胡萝卜素、玉米黄质、叶黄质和 $\alpha$ -隐黄质的含量却是一水叶状体的22.7%~67.0%。在叶状体阶段中, 玉米黄质和叶黄质是其主要的类胡萝卜素, 除 $\beta$ -胡萝卜素外, 其余7种类胡萝卜素的含量随着采收期的延长而整体呈现下降趋势。研究表明, 类胡萝卜素的含量与坛紫菜生长阶段和生存环境息息相关, 强光、高温等复杂环境因素促进叶状体中类胡萝卜素大量合成, 参与胁迫防御, 维持藻体快速生长, 而耐高温的丝状体和低温弱光环境下叶状体因氧化损伤减弱, 降低了类胡萝卜素的合成。本研究为坛紫菜品种选育和健康养殖提供了重要的实验数据。

**关键词:** 坛紫菜; 丝状体; 叶状体; 类胡萝卜素; 液相色谱-质谱技术

**中图分类号:** S 917.3

**文献标志码:** A

类胡萝卜素是地球上第二丰富的天然色素, 存在于植物、藻类、真菌和细菌中, 对植物光合作用中的捕光天线复合物形成、光保护系统运作、膜结构稳定以及生长和发育等生物学过程的调节至关重要<sup>[1-4]</sup>。一方面, 类胡萝卜素作为辅助捕光色素能够吸收叶绿素无法吸收的450~500 nm可见

光, 并将这种激发能转移到叶绿素上, 从而为光合作用提供动力, 促进植物生长发育; 另一方面, 类胡萝卜素还对光损伤具有防护功能, 对维持光合作用的正常进行起到重要辅助作用。类胡萝卜素的光保护包括直接淬灭机制和间接淬灭机制<sup>[5]</sup>。玉米黄质是公认的激发能直接淬灭剂, 它能够与

收稿日期: 2022-06-27 修回日期: 2022-10-11

资助项目: 宁波市重点研发计划暨“揭榜挂帅”项目(2023Z121); 宁波市公益科技项目(2021S063); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-50)

第一作者: 潘海斌(照片), 从事水产养殖研究, E-mail: 1402201543@qq.com

通信作者: 陈娟娟, 从事藻类化学研究, E-mail: chenjuanjuan@nbu.edu.cn



光系统 II 的 V1 位点结合, 与叶绿素 *a* 形成自由基对, 从单线态激发态叶绿素 *a* 中接受激发能, 将其转换为基态后, 以热能的形式散发<sup>[6-7]</sup>。目前已建立一种用于评估类胡萝卜素对单线态氧总淬灭活性的测量方法, 即单线态氧吸收能力法 (singlet oxygen absorption capacity, SOAC)。研究结果表明, 各类胡萝卜素的淬灭能力从强到弱依次为番茄红素>虾青素> $\beta$ -胡萝卜素~辣椒黄素~玉米黄质~ $\alpha$ -胡萝卜素>叶黄素> $\beta$ -隐黄素>> $\alpha$ -生育酚<sup>[8]</sup>。间接淬灭机制则是基于环氧和脱环氧类胡萝卜素之间的结构转换实现的, 即脱环氧类胡萝卜素诱导外围捕光复合物聚集, 将光系统 II 的天线系统可逆地转换为有效消散多余激发能的状态, 而环氧类胡萝卜素则表现为抑制补光聚合物的聚集<sup>[9]</sup>。此外, 类胡萝卜素作为信号分子, 可调节下游产物如植物激素脱落酸、独角金内酯等的水平, 从而帮助植物在胁迫环境中发挥应激的生理功能<sup>[3]</sup>。由此可知, 类胡萝卜素是反映藻类生长速率和环境适应性的重要物质。

坛紫菜 (*Neoporphyra haitanensis*) 是我国东南沿海具有重要经济价值的大型海藻之一, 年产量占紫菜总产量的 75% 以上, 具有很高的食用和药用价值<sup>[10-11]</sup>。作为一年生潮间带红藻, 坛紫菜具有异形生活史, 即配子体时期 (叶状体) 和孢子体时期 (丝状体)<sup>[12-14]</sup>。丝状体时期的藻体处于营养生长阶段, 生长于夏季高温环境, 生化参数和生长状态均相对稳定, 具有较强的环境耐受性。叶状体生长于 9—12 月的潮间带海区, 自 10 月起每隔半月采收 1 茬, 共采收 5 茬; 随着潮汐的涨落, 叶状体经历周期性的干出与浸没交替环境, 受到温度、光照、盐度及水分等多种环境因子的胁迫<sup>[15]</sup>。这些胁迫条件会诱导大量活性氧的产生, 导致藻体损伤, 延缓其生长和发育, 并降低产量。在极端情况下, 这些损伤可能直接导致藻体死亡, 严重影响坛紫菜养殖业的健康发展。综上可知, 坛紫菜叶状体和丝状体的生存环境差异显著, 这必然导致其对环境适应能力不同。类胡萝卜素作为重要的光合色素和抗氧化剂, 可能积极参与环境适应活动, 如条斑紫菜在严重脱水条件下, 类胡萝卜素作为抗氧化剂被大量合成, 参与与自由基清除<sup>[16]</sup>。但目前关于坛紫菜中类胡萝卜素的组成及其对环境胁迫响应的研究鲜少报道。因而, 本研究通过超高效液相色谱-质谱联用技术 (ultra-performance liquid chromatography - mass spectrometry, UPLC-MS) 建立类胡萝卜素的定性定量分析方法,

分析坛紫菜丝状体和不同采收期叶状体中的类胡萝卜素组成差异, 为深入研究坛紫菜两种世代体的环境适应能力提供实验数据, 为坛紫菜选育和健康养殖工作的展开提供一定的指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器

Xevo TQ-S micro 超高效液相色谱-三重串联四极杆质谱联用分析系统 (Waters Corporation, 美国); Cascada II 超纯水系统 (Pall Corporation, 美国); GXZ-380 智能光照培养箱 (中国宁波江南仪器厂); 5430R 冷冻离心机 (Eppendorf, 德国); ME104E 分析天平 (Mettler Toledo, 德国); KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); WONBIO-P 高通量组织研磨仪 (上海万柏生物科技有限公司); FreeZone 冷冻干燥机 (Lab-conco, 美国)。

### 1.2 实验试剂

硝酸钾、氢氧化钠、磷酸氢二钾、硫酸锰晶体、硫酸亚铁晶体、乙二胺四乙酸二钠、乙醇和丙酮均为分析纯 (国药集团化学试剂上海有限公司); 异丙醇、乙腈、乙酸铵和 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 均为分析纯 (Sigma-Aldrich, 美国); 0.22  $\mu\text{m}$  有机相针式滤膜 (中国上海安谱实验科技股份有限公司); 类胡萝卜素标准品 (叶黄素、玉米黄质、 $\alpha$ -隐黄素、 $\beta$ -隐黄素、 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\gamma$ -胡萝卜素、 $\delta$ -胡萝卜素、 $\epsilon$ -胡萝卜素、 $\zeta$ -胡萝卜素、八氢番茄红素、番茄红素、环氧玉米黄质、新黄质、紫黄质、链孢红素, 纯度>95%) (Sigma-Aldrich, 美国)。

### 1.3 样品预处理

坛紫菜“浙东 1 号”叶状体于 2021 年 10—12 月采集于浙江象山。坛紫菜具有“分茬”采收的特点, 采割过的紫菜可以再次生长, 一般每隔半个月采收 1 次, 首次采收的坛紫菜被称作“一水紫菜”, 之后采收的坛紫菜依次被称作二水~五水紫菜。将采收到的一水~五水坛紫菜阴干, 并置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存。待使用时, 取冷冻坛紫菜, 用灭菌海水复苏 24 h, 然后冲洗去除泥沙, 挑选出健康、完整的叶片。将叶片用液氮速冻, 并放置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存过夜, 最后使用冻干机冷冻干燥 48 h。准确称取 10 mg 冻干坛紫菜叶状

体放入 2 mL 研磨管中, 并放置于液氮研磨仪中研磨成干粉。

“浙东 1 号”丝状体来自浙江省海洋生物技术重点实验室。将丝状体放置于锥形瓶中, 并倒入细滤过的灭菌海水。按照体积比 1 : 1 000 加入适量宁波大学 3 号营养母液 (990 nmol/L KNO<sub>3</sub>、54 nmol/L Na<sub>2</sub>EDTA、57 nmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、9 nmol/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1 nmol/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 作为丝状体的培养液。海水盐度为 25, 并设置在温度 20 °C, 光照强度 20 μmol/(m<sup>2</sup>·s), 光暗周期 L : D=12 : 12 的条件下培养 3 个月。收集丝状体, 用液氮速冻并置于 -80 °C 冰箱保存过夜。然后用冻干机冷冻干燥 48 h, 于 2 mL 研磨管中准确称取 10 mg 冻干丝状体, 使用液氮研磨仪研磨。

#### 1.4 坛紫菜类胡萝卜素提取

分别称取 10 mg 坛紫菜叶状体和丝状体干粉置于离心管中, 并添加 1 mL 含 0.1% BHT 的丙酮溶液, 振荡摇匀。在 4 °C 条件下超声 30 min, 然后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 待测。每个处理组平行 3 次。以上操作皆避光、低温进行。

#### 1.5 超高效液相色谱-三重四极杆质谱条件

色谱条件 I 和 II BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1

mm×100 mm, 1.7 μm) (I) 或 Synchronis C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) (II); 流动相 A: 水-乙腈 (1 : 9, 体积比, 10 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B: 乙腈-异丙醇 (7 : 3, 体积比), 梯度洗脱程序 : 0~10 min, 95%~50% A; 10~20 min, 50%~0% A; 20~35 min, 100% B; 35~35.1 min, 0%~95% A; 35.1~40 min, 95% A; 柱温 30 °C, 流速 0.3 mL/min, 进样量 5 μL。

色谱条件 III Synchronis C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 A: 水-乙腈 (2 : 8, 体积比, 10 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B: 乙腈-异丙醇 (85 : 15, 体积比); 其余条件同上。

色谱条件 IV Synchronis C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 A: 水 (10 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B: 乙腈-甲醇 (7 : 3, 体积比), 梯度洗脱程序 : 0~10 min, 50%~100% B; 10~40 min, 100% B; 40~40.1 min, 100%~50% B; 40.1~45 min, 50% B; 其余条件同上。

质谱条件 喷雾电离源正离子电离模式 (ESI<sup>+</sup>), 毛细管电压 4.0 kV, 锥孔电压 30 V, 脱溶剂气体温度 550 °C, 脱溶剂气体 (N<sub>2</sub>) 流量为 1 000 L/h, 碰撞气为氩气, 碰撞气压力 6×10<sup>-6</sup> mbar, Q1 分辨率设定为 9.7~14.9, Q2 分辨率设定为 8.7~14.9。扫描采用多反应监测 (MRM) 模式 (表 1)。

表 1 16 种类胡萝卜素在多反应监测模式下定量离子通道

Tab. 1 Transitions monitored of the 17 carotenoids in MRM mode

化合物 compounds	分子离子峰 precursor ion	母离子/(m/z) parent ion	子离子/(m/z) product ions	碰撞能量/eV collision energy
α-胡萝卜素 α-carotene	[M] <sup>+</sup>	536.47	444.33, 144.92	20
β-胡萝卜素 β-carotene	[M] <sup>+</sup>	536.46	444.34, 177.05	20
ε-胡萝卜素 ε-carotene	[M] <sup>+</sup>	536.43	122.91, 388.24	20
γ-胡萝卜素 γ-carotene	[M] <sup>+</sup>	536.42	280.91, 146.92	20
δ-胡萝卜素 δ-carotene	[M] <sup>+</sup>	536.42	444.30, 146.93	20
ζ-胡萝卜素 ζ-carotene	[M] <sup>+</sup>	540.48	256.21, 311.23	18
α-隐黄质 α-cryptoxanthin	[M] <sup>+</sup>	552.44	118.87, 460.31	20
β-隐黄质 β-cryptoxanthin	[M] <sup>+</sup>	552.41	118.87, 460.31	20
八氢番茄红素 phytoene	[M] <sup>+</sup>	542.67	125.75, 199.09	25
番茄红素 lycopene	[M] <sup>+</sup>	536.30	280.91, 146.94	18
环氧玉米黄质 antherxanthin	[M] <sup>+</sup>	584.41	492.37, 209.05	20
链孢红素 neurosporene	[M] <sup>+</sup>	538.47	401.27, 211.06	18
新黄质 neoxanthin	[M] <sup>+</sup>	600.36	220.98, 255.01	18
叶黄质 lutein	[M] <sup>+</sup>	568.49	338.23, 145.01	20
玉米黄质 zeaxanthin	[M] <sup>+</sup>	568.54	476.41, 175.12	20
紫黄质 violaxanthin	[M+H] <sup>+</sup>	601.47	220.97, 197.06	20

## 1.6 叶绿素荧光参数测定

将坛紫菜不同采收期的叶状体和丝状体分别置于黑暗环境下适应 15 min, 然后利用叶绿素荧光仪 WATER PAM 测定藻体的最大光化学效率  $F_v/F_m$ , 实验重复 6 次。

## 1.7 数据分析

所有的液质联用数据操作、获取和分析均由 Masslynx (Waters, 美国) 软件处理, 数据均以平均值±标准差表示。使用 SPSS (版本 11.5) 软件进行单因素方差分析, 组间差异  $P < 0.05$  时定义为差异显著, 组间差异  $P < 0.01$  时定义为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 类胡萝卜素的色谱-质谱条件优化

16 个类胡萝卜素中共有 4 对异构体, 分别为  $\alpha$ -隐黄质和  $\beta$ -隐黄质, 叶黄质和玉米黄质, 紫黄质和新黄质,  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -、 $\epsilon$ -胡萝卜素和番茄红素。由于异构体结构相近, 分子质量相同, 碎片离子相似, 导致质谱无法通过提取离子的方式进行定性和定量分析, 因此必须实现四对异构体的有效分离。首先比较 Waters BEH  $C_{18}$  和 Thermo Synchronis  $C_{18}$  两种色谱柱对类胡萝卜素分离效果的影响 (图 1-a, b), 结果显示, 类胡萝卜素在 Synchronis  $C_{18}$  柱上的保留能力增强,  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\epsilon$ -胡萝卜素的分离度从约 1.20 提高至约 1.40, 分离效果得到一定的提高, 而其余异构体的分离效果仍然较差, 仅为 1.08~1.17。其次, 选择 Synchronis  $C_{18}$  柱为固定相, 优化流动相组成。通过提高流动相中水相比比例, 降低强洗脱剂异丙醇的占比, 结果显示,  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\epsilon$ -胡萝卜素得到了良好的分离, 分离度达到了 1.5 以上, 但是  $\alpha$ -隐黄质和  $\beta$ -隐黄质、紫黄质和新黄质、叶黄质和玉米黄质, 这三组异构体的分离度分别为 1.24、1.27 和 1.36, 分离效果仍不够理想, 且部分峰形较宽 (图 1-c)。因此, 进一步加大水相的比例, 使用含 10 mmol/L 乙酸铵的水溶液作为流动相组成, 同时以洗脱能力弱的甲醇替换异丙醇, 结果显示,  $\alpha$ -隐黄质和  $\beta$ -隐黄质、叶黄质和玉米黄质、紫黄质和新黄质、 $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\epsilon$ -胡萝卜素四组异构体的分离度均达到了 1.5 以上, 实现基线分离, 峰形良好 (图 1-d)。

选择色谱-质谱条件 (IV) 进行类胡萝卜素定量方法验证, 16 个类胡萝卜素线性良好 ( $R^2 > 0.998$ ),

最低检出限 (LLOD) 为 1.57~4.96 ng/mL, 最低定量限 (LLOQ) 为 5.42~10.32 ng/mL, 日内精密度和日间精密度分别为 1.6%~6.8% 和 3.6%~8.9%。此外, 通过加标回收率和离子抑制率实验, 发现 16 种类胡萝卜素的回收率均为 87.6%~98.9%, 离子抑制率约为 8.7%~11.8%, 由此表明该方法灵敏度较高, 精密度良好, 基质对类胡萝卜素的离子抑制影响可以忽略, 该分析方法较全面地满足了坛紫菜样品中类胡萝卜素含量的测定要求。

### 2.2 类胡萝卜素提取条件优化

为了进一步提高坛紫菜中类胡萝卜素提取效率, 对提取溶剂、料液比和超声时间进行条件优化。比较丙酮、甲醇和甲醇-二氯甲烷 (1:1, 体积比) 三种提取溶剂对叶状体类胡萝卜素的提取率的影响, 结果显示, 坛紫菜叶状体中共检测到 8 种类胡萝卜素: 叶黄质、玉米黄质、 $\alpha$ -隐黄质、 $\beta$ -隐黄质、 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、环氧玉米黄质和  $\epsilon$ -胡萝卜素。甲醇作为提取液时, 类胡萝卜素的提取率最低, 且未检测到叶黄质 (图 2-a)。 $\alpha$ -隐黄质在甲醇-二氯甲烷溶液中的提取率是丙酮提取液的 1.30 倍, 而其他类胡萝卜素提取率无显著差异。因此, 选择甲醇-二氯甲烷作为坛紫菜类胡萝卜素的提取溶剂。

将坛紫菜干粉与甲醇-二氯甲烷提取溶剂分别按照料液比为 1:10、1:25、1:40 和 1:55 进行提取。叶黄质在这四种料液比条件下无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 而玉米黄质在料液比 1:55 中的提取率最低 (图 2-b)。 $\alpha$ -隐黄质、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\alpha$ -胡萝卜素、环氧玉米黄质和  $\epsilon$ -胡萝卜素的含量随着提取溶剂体积的增加而减少, 即液料比为 1:10 时, 类胡萝卜素的含量最高, 分别是料液比 1:55 的 1.76、2.51、2.76、2.89 和 3.01 倍。不同的是,  $\beta$ -隐黄质的提取量却在料液比为 1:25 的条件下最佳, 达到 71.94  $\mu\text{g/g}$ , 是料液比为 1:10 条件下的 1.75 倍。综合考虑, 选择料液比为 1:10 作为坛紫菜类胡萝卜素提取条件。

随着超声时间的增加, 8 种类胡萝卜素的提取率均显著升高 (图 2-c)。其中,  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -隐黄质、叶黄质和环氧玉米黄质的提取率逐渐升高, 在超声 60 min 后的提取量分别是超声 15 min 的 1.20、1.33、1.33 和 2.56 倍, 而玉米黄质、 $\alpha$ -隐黄质、 $\beta$ -胡萝卜素和  $\epsilon$ -胡萝卜素的提取率在超声 30、45 和 60 min 下无显著差异, 分别是超声

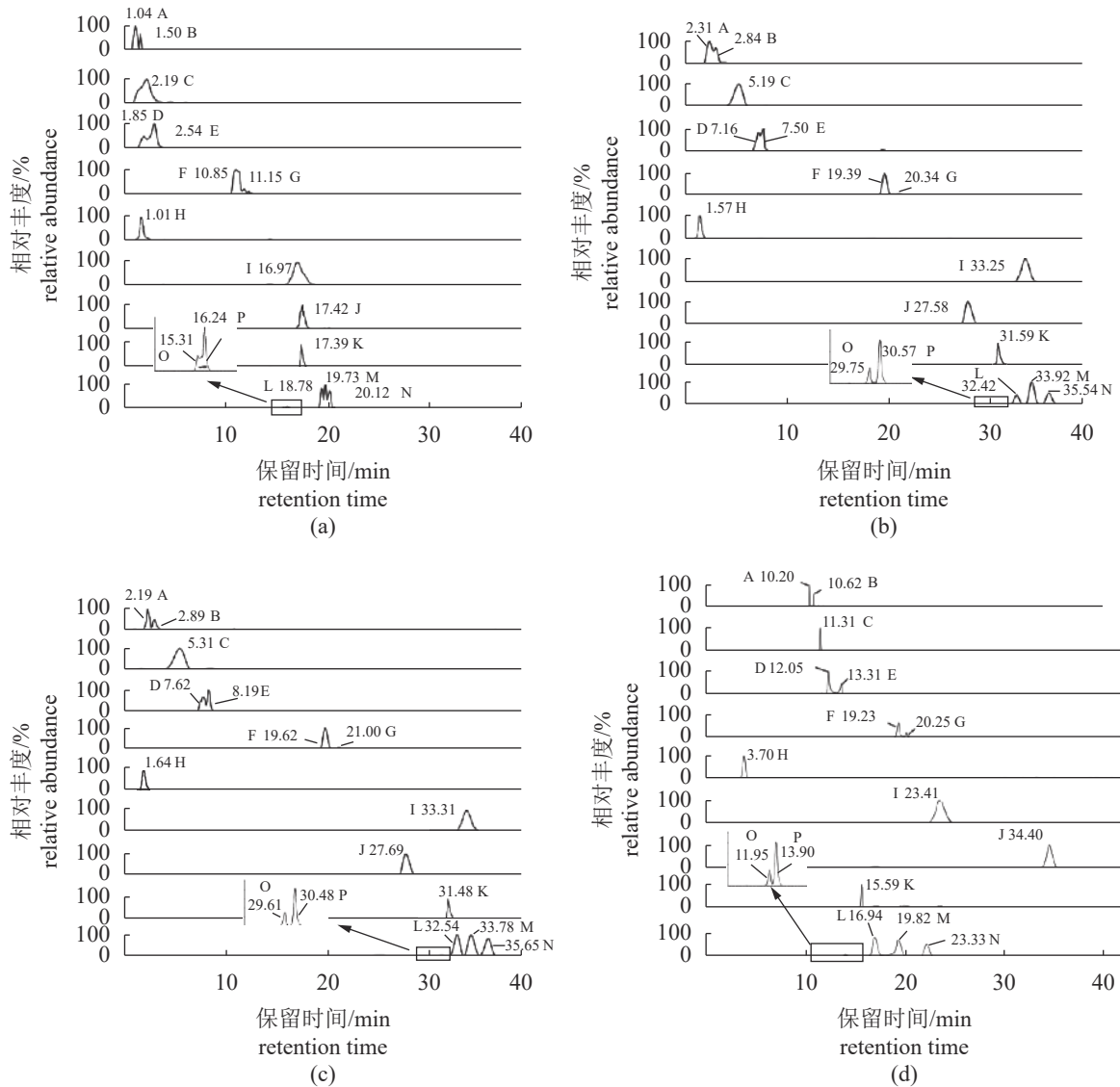


图 1 16 种类胡萝卜素的选离子流图

(a) 色谱条件 I, (b) 色谱条件 II, (c) 色谱条件 III, (d) 色谱条件 IV. A. 新黄质, B. 紫黄质, C. 环氧玉米黄质, D. 叶黄质, E. 玉米黄质, F.  $\alpha$ -隐黄质, G.  $\beta$ -隐黄质, H. 八氢番茄红素, I.  $\zeta$ -胡萝卜素, J. 链孢红素, K. 番茄红素, L.  $\epsilon$ -胡萝卜素, M.  $\alpha$ -胡萝卜素, N.  $\beta$ -胡萝卜素, O.  $\delta$ -胡萝卜素, P.  $\gamma$ -胡萝卜素。

Fig. 1 Selective ionization chromatograms of 16 carotenoids

(a) chromatographic condition I, (b) chromatographic condition II, (c) chromatographic condition III, (d) chromatographic condition IV. A. neoxanthin, B. violaxanthin, C. antherxanthin, D. lutein, E. zeaxanthin, F.  $\alpha$ -cryptoxanthin, G.  $\beta$ -cryptoxanthin, H. phytoene, I.  $\zeta$ -carotene, J. neurosporene, K. lycopen, L.  $\epsilon$ -carotene, M.  $\alpha$ -carotene, N.  $\beta$ -carotene, O.  $\delta$ -carotene, P.  $\gamma$ -carotene.

15 min 的 1.27、1.21、1.12 和 1.38 倍。因此, 选择超声时间 30 min 作为坛紫菜类胡萝卜素提取条件。综上所述, 通过提取条件优化, 最终选择甲醇-二氯甲烷 (1 : 1, 体积比) 作为提取溶剂, 液料比为 1 : 10, 超声时间 30 min 作为坛紫菜类胡萝卜素的提取条件。

### 2.3 坛紫菜中叶绿素荧光参数测定

最大光化学效率  $F_v/F_m$  反映坛紫菜的光合效

率, 该数值受到坛紫菜不同的生长阶段和复苏时间的影响。在复苏培养 0~24 h 内  $F_v/F_m$  值呈上升趋势, 而在复苏培养 1~7 d 内  $F_v/F_m$  值保持稳定。一水到五水叶状体之间的  $F_v/F_m$  无显著差异, 其值约在 0.68(图 3)。而比较叶状体和丝状体的最大光化学效率参数时,  $F_v/F_m$  由叶状体 0.68 降到丝状体 0.45, 即叶状体的  $F_v/F_m$  是丝状体的 1.53 倍, 表明坛紫菜不同世代体之间的潜在最大光合效率具有明显差异。

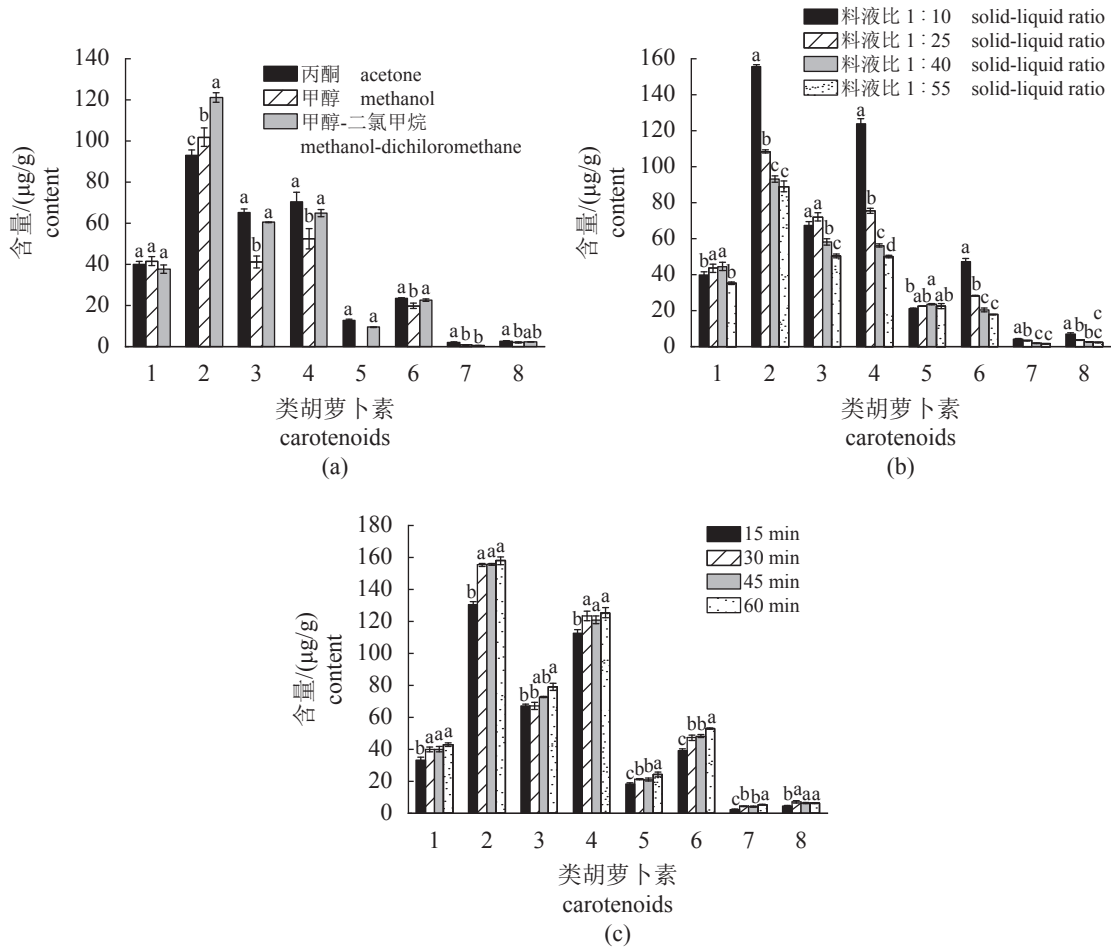


图 2 不同提取条件下的坛紫菜中类胡萝卜素含量

(a) 提取溶剂, (b) 料液比, (c) 超声时间。1. 玉米黄质, 2.  $\alpha$ -隐黄质, 3.  $\beta$ -隐黄质, 4.  $\beta$ -胡萝卜素, 5. 叶黄质, 6.  $\alpha$ -胡萝卜素, 7. 环氧玉米黄质, 8.  $\epsilon$ -胡萝卜素。同一种化合物柱上方不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 The contents of carotenoids in *N. haitanensis* under different extraction conditions

(a) extraction solvents, (b) solid-to-liquid ratio, (c) ultrasonic time. 1. zeaxanthin, 2.  $\alpha$ -cryptoxanthin, 3.  $\beta$ -cryptoxanthin, 4.  $\beta$ -cryptoxanthin, 5. lutein, 6.  $\alpha$ -caroten, 7. antherxanthin, 8.  $\epsilon$ -carotene. Different superscripted letters above the bars in the same compound mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

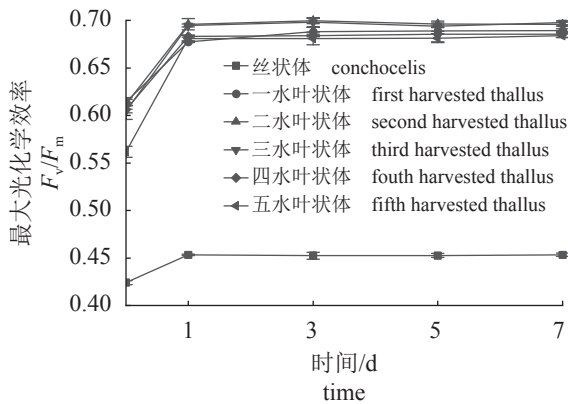


图 3 不同生长阶段的坛紫菜中最大光化学效率  $F_v/F_m$  变化曲线

Fig. 3 Photochemical efficiency ( $F_v/F_m$ ) curves of *N. haitanensis* in different growth stage

## 2.4 坛紫菜丝状体和叶状体中类胡萝卜素分析

坛紫菜两种世代体丝状体和叶状体中检测到的 8 种类胡萝卜素。其中  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\epsilon$ -胡萝卜素、 $\alpha$ -隐黄质和叶黄质属于  $\alpha$ -胡萝卜素合成途径, 而  $\beta$ -胡萝卜素、 $\beta$ -隐黄质、玉米黄质和环氧玉米黄质属于  $\beta$ -胡萝卜素合成途径 (图 4)。在丝状体  $\rightarrow$  叶状体 (一水  $\rightarrow$  五水) 的生长周期中, 总类胡萝卜素含量呈现先增加后下降的趋势 (图 5-i)。其中, 一水叶状体中的总类胡萝卜素的含量是丝状体的 1.4 倍, 而到了三水阶段, 其含量下降到丝状体的水平, 最后在四水和五水阶段中保持稳定, 约为丝状体的 75%。

这 8 种类胡萝卜素的含量在坛紫菜生长周期中呈现不同的变化趋势 (图 5)。在丝状体阶段,

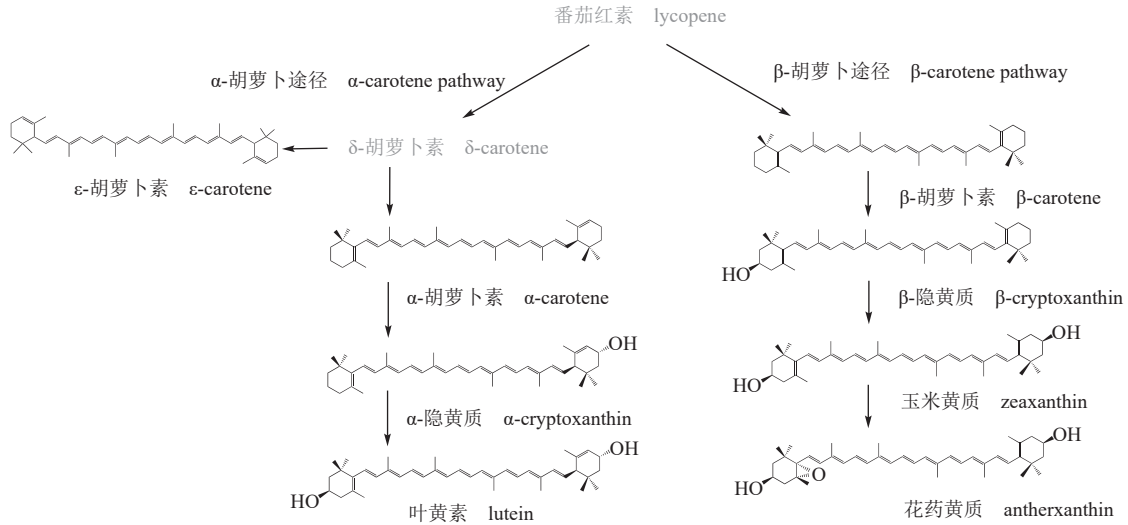


图 4 坛紫菜中存在的类胡萝卜素

淡色文字代表在坛紫菜中未检出。

Fig. 4 The types of carotenoids in *N. haitanensis*

The light color words indicated undetected carotenoids in *N. haitanensis*.

仅 β-隐黄质的含量显著高于叶状体，是一水叶状体的 3.7 倍，环氧玉米黄质的含量与一水叶状体无显著差异，但仍高于二水-四水叶状体。而 α-胡萝卜素、β-胡萝卜素、ε-胡萝卜素、玉米黄质、叶黄质和 α-隐黄质的含量仅是一水叶状体的 35.2%，57.7%、26.4%、22.7%、29.0% 和 67.0%。在叶状体阶段，玉米黄质、环氧玉米黄质和叶黄质呈现相同的变化趋势。随着采收期的延长，这 3 种类胡萝卜素的含量在四水叶状体中最低，分别是一水的 47.6%、17.6% 和 41.8%，而在五水中升高，但仍是一水的 69.5%、34.3% 和 69.2%。β-胡萝卜素在不同采收期叶状体中变化较小，仅在五水中略有下降；除了四水叶状体，α-胡萝卜素的含量整体与采收时间成反比，在五水中降至最低，仅为一水的 54.2%。随着采收期的延长，ε-胡萝卜素、α-隐黄质和 β-隐黄质的含量逐渐下降，五水中的含量分别是一水的 16.7%、23.7% 和 29.7%。

### 3 讨论

藻类中类胡萝卜素合成的初始步骤与陆地植物一致<sup>[7]</sup>，番茄红素是形成各种类胡萝卜素衍生物的关键分支点，在番茄红素 ε-环化酶 (LCYε) 和番茄红素 β-环化酶 (LCYβ) 作用下，出现 α-和 β-胡萝卜素两条合成途径<sup>[7]</sup>。在 α-胡萝卜素途径中产生含量丰富的叶黄质，而在 β-胡萝卜素途径中合成了玉米黄质、环氧玉米黄质、紫黄质以及新

黄质等<sup>[17]</sup>。不同藻类之间的类胡萝卜素合成途径差异在于是否存在 α-胡萝卜素合成途径，以及 β-胡萝卜素合成途径中的叶黄质循环。目前，对于紫菜类胡萝卜素合成途径的研究主要集中在脐形紫菜和条斑紫菜，并报道了 α-胡萝卜素、β-胡萝卜素、叶黄质、玉米黄质、α-隐黄质、β-隐黄质、zeinoxanthin、5,6-环氧叶黄质和环氧玉米黄质的存在<sup>[18-19]</sup>。坛紫菜中的类胡萝卜素组成与脐形紫菜和条斑紫菜的相似，鉴定到了玉米黄质、叶黄质、β-胡萝卜素、α-胡萝卜素、α-隐黄质、β-隐黄质、环氧玉米黄质，表明坛紫菜存在 α-胡萝卜素和 β-胡萝卜素合成途径。此外，坛紫菜中未检测到紫黄质和新黄质，验证了坛紫菜由于缺失紫黄质脱环氧化酶基因 (*vde*) 无法合成紫黄质，从而使其无法通过叶黄质循环进行光保护作用<sup>[20]</sup>。脱落酸是坛紫菜中主要的植物激素，而新黄质是公认的脱落酸合成前体物，所以坛紫菜中的脱落酸可能是由其他合成途径产生的，如脱落酸直接合成途径等。此外，ε-胡萝卜素作为 α-胡萝卜素的前体物，也在坛紫菜中被鉴定出，从而进一步完善了坛紫菜的 α-胡萝卜素合成途径。

虽然坛紫菜两种世代体——丝状体和叶状体的类胡萝卜素种类一致，但是其含量存在较大的差异，如叶状体中类胡萝卜素含量显著高于丝状体，且含有大量的玉米黄质和叶黄质，而丝状体中 β-隐黄质的含量最为丰富，高达 546.42 μg/g，极显著高于叶状体。这或许是源于不同的生存环

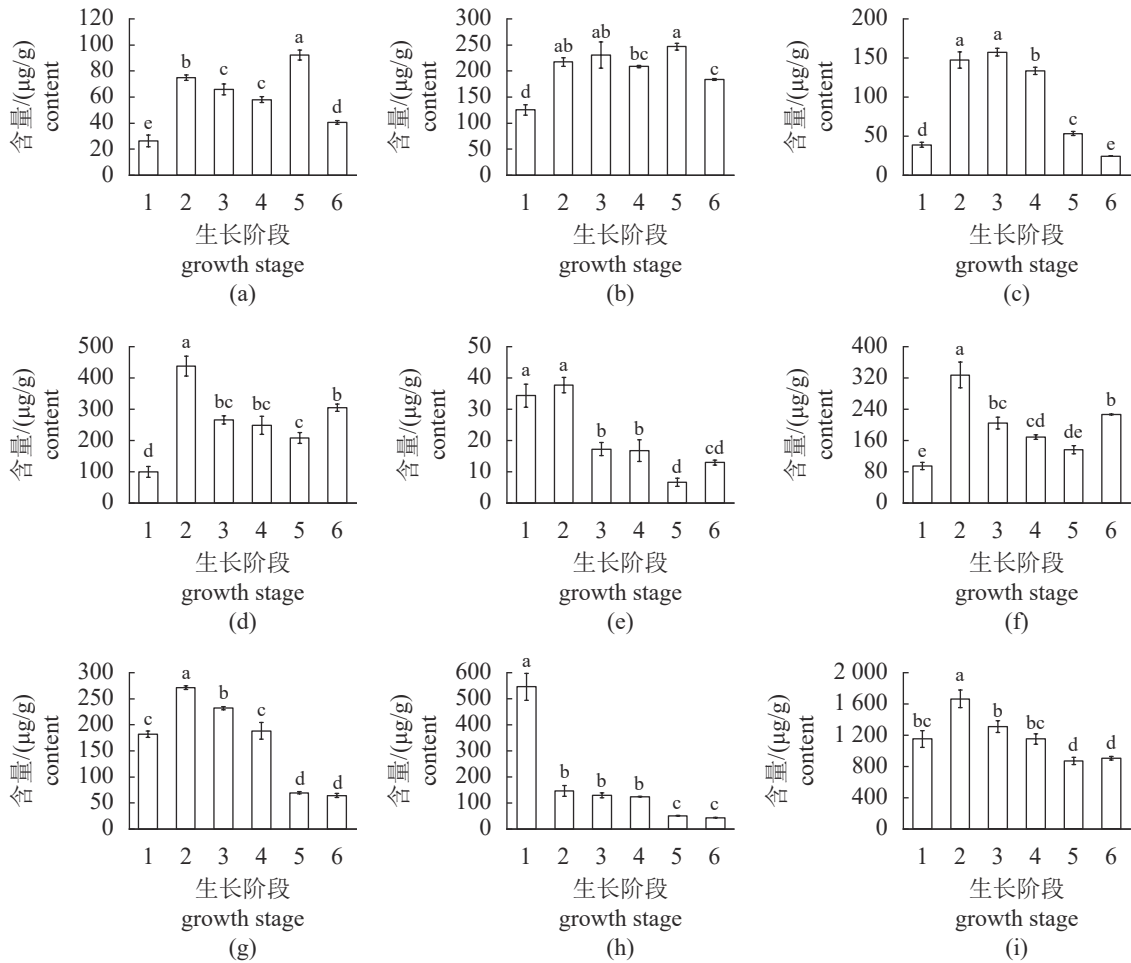


图 5 不同生长阶段的坛紫菜中类胡萝卜素含量

(a) α-胡萝卜素, (b) β-胡萝卜素, (c) ε-胡萝卜素, (d) 玉米黄质, (e) 环氧玉米黄质, (f) 叶黄质, (g) α-隐黄质, (h) β-隐黄质, (i) 总类胡萝卜素。1. 丝状体, 2. 一水叶状体, 3. 二水叶状体, 4. 三水叶状体, 5. 四水叶状体, 6. 五水叶状体。不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 Contents of carotenoids in different growth stage of *N. haitanensis*

(a) α-carotene, (b) β-carotene, (c) ε-carotene, (d) zeaxanthin, (e) zeaxanthin epoxide, (f) flavanthin, (g) α-cryptoxanthin, (h) β-cryptoxanthin, (i) Total carotenoids. 1. conchocelis, 2. the first harvest stage of thallus, 3. the second harvest stage of thallus, 4. the third harvest stage of thallus, 5. the fourth harvest stage of thallus, 6. the fifth harvest stage of thallus. Different superscripted letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

境造成的, 叶状体的生长过程历经秋冬两季, 温度、干出和光照等环境因素剧烈变化, 导致叶状体中活性氧 (ROS) 过度产生。叶黄质、玉米黄质和 β-隐黄质都具有很强的抗氧化能力和自由基清除活性, 能够应对各种氧化应激, 保护细胞和组织免受氧化损伤, 但叶黄质和玉米黄质对 ROS 的清除能力显著高于 β-隐黄质<sup>[21-22]</sup>。此外, 随着潮汐变化, 叶状体每天历经周期性的干出与浸没过程, 暴露在剧烈的光强变化中, 去环氧化色素 (玉米黄质和叶黄质) 承担了在强光下以内能形式耗散过多光强的作用。在拟南芥和烟草中也证实了这一观点, 即过度表达 β-胡萝卜素羟化酶基因, 致使植物体内大量积累玉米黄质, 增强了其对紫外线的耐受力<sup>[23-24]</sup>, 而叶黄质位于光系统 II 中的光

捕获天线复合物, 与叶绿素非常接近, 常与三线态叶绿素之间进行电子转换, 释放多余内能达到光保护<sup>[1]</sup>。因此, 推测坛紫菜叶状体为了适应外界环境的变化, 藻体内产生了大量的玉米黄质和叶黄质, 发挥着光保护和减少氧化损伤等作用。丝状体常年生长在夏季连续高温环境, 适应于较高水温, 生长状态和生化指标相对稳定, 对抗氧化的需求相对较弱<sup>[25]</sup>。此外, 丝状体的最大光化学效率参数  $F_v/F_m$  仅是叶状体的 66.2%, 表明其光合效率和光能转换效率要比叶状体弱, 这可能是丝状体类胡萝卜素含量低, 而抗氧化能力相对较弱的 β-隐黄质是主要类胡萝卜素的原因。

坛紫菜叶状体生长在每年 9—12 月潮间带的岩石上, 具有“分茬”采收的特点, 采割时间一般



自 10 月起, 每隔半月进行收割, 采收的第 1 批称为一水紫菜, 以此类推, 通常收至五水为止<sup>[26]</sup>, 且随着采收期的延长, 坛紫菜的营养和市场价格急剧下降<sup>[27]</sup>。类胡萝卜素是藻类重要的营养功效物质, 随着采收期(一水→五水)的延长, 其含量整体呈现下降趋势, 这可能与海水温度、太阳辐射强度和时长, 以及海水蒸发量变化导致海水表层盐度改变等环境因素有关。目前, 已证实温度、盐度和光照为限制紫菜生长的主要非生物季节性因素<sup>[28]</sup>。其中, 光在类胡萝卜素的生物合成过程中起关键作用, 影响着类胡萝卜素合成基因表达的诱导和关键酶的活性, 如八氢番茄红素合成酶(PSY)和八氢番茄红素脱氢酶(PDS)<sup>[29-30]</sup>, 从而引起类胡萝卜素含量波动。在采收前期, 太阳光照强度高、光照时间长且海水温度高, 过量的光能和自由基易造成叶状体损伤。而类胡萝卜素作为辅助捕光色素参与光合作用, 以及作为重要的抗氧化剂参与自由基清除工作, 由此表明坛紫菜一水~二水阶段生长速率快、光合效率高、抗逆能力强等特点<sup>[31]</sup>与其典型类胡萝卜素——玉米黄质、叶黄质和环氧玉米黄质等大量合成有一定关系。而当采收期延长至五水时, 光强度减弱、水温降低等因素导致坛紫菜的光合效率降低、活性氧数量减少, 类胡萝卜素含量也相应减少, 影响坛藻体生长, 造成了采收后期的坛紫菜生长和代谢速率减缓。这与 Rmikil 等<sup>[32]</sup>报道在 2 种红藻江蓠(*Gracilaria gracilis*)和(*G. multiaurita*)中观察到强光促使玉米黄质含量高表达的现象一致, 完成多余光能的释放。

综上所述, 实验探讨了一种适用于坛紫菜中类胡萝卜素的提取和分析方法, 比较坛紫菜的两种世代体——丝状体和叶状体的类胡萝卜素组成和叶绿素荧光参数, 发现叶状体中的总类胡萝卜素和  $F_v/F_m$  显著高于丝状体。玉米黄质和叶黄质作为重要的辅助捕光色素和抗氧化剂, 是叶状体适应强光、高温环境下的主要类胡萝卜素, 且随着采收期的延长, 类胡萝卜素含量总体呈下降趋势。而对于生长状态稳定、抗氧化需求低的丝状体而言, 主要色素  $\beta$ -隐黄质却高于叶状体。类胡萝卜素的含量在两种世代体和不同采收期的差异分布与其生长阶段和生存环境息息相关, 为进一步坛紫菜品种选育和养殖提供实验数据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Cazzonelli C I, Pogson B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 266-274.
- [2] Ruiz-Sola M Á, Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway[J]. *The Arabidopsis Book*, 2012, 2012(10): e0158.
- [3] Havaux M. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants[J]. *The Plant Journal*, 2014, 79(4): 597-606.
- [4] Rodríguez-Concepción M, Avalos J, Bonet M L, et al. A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health[J]. *Progress in Lipid Research*, 2018, 70: 62-93.
- [5] Goss R, Jakob T. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae[J]. *Photosynthesis Research*, 2010, 106(1): 103-122.
- [6] Demmig-Adams B, Adams III W W. The carotenoid zeaxanthin and 'high-energy-state quenching' of chlorophyll fluorescence[J]. *Photosynthesis Research*, 1990, 25(3): 187-197.
- [7] Tracewell C A, Vrettos J S, Bautista J A, et al. Carotenoid photooxidation in photosystem II[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 385(1): 61-69.
- [8] Aizawa K, Iwasaki Y, Ouchi A, et al. Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(8): 3717-3729.
- [9] Sacharz J, Giovagnetti V, Ungerer P, et al. The xanthophyll cycle affects reversible interactions between PsbS and light-harvesting complex II to control non-photochemical quenching[J]. *Nature Plants*, 2017, 3(2): 16225.
- [10] Jin C, Wang J P, Wang S C, et al. *Porphyra* species: a mini-review of its pharmacological and nutritional properties[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(2): 111-119.
- [11] 丁洪昌, 严兴洪. 紫菜遗传育种研究进展[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 592-603.  
Ding H C, Yan X H. Advances in *Pyropia* (formerly *Porphyra*) genetics and breeding[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 592-603 (in Chinese).
- [12] Drew K M. Conchocelis-phase in the life-history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz[J]. *Nature*, 1949, 164(4174): 748-749.

- [13] Zeng C K, Zhang D R. Studies on *Porphyra* I. Life history of *Porphyra tenera* Kjellm[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1954, 3(3): 287-302.
- [14] 黄冰心, 刘金梅, 马元元, 等. 坛紫菜生活史的研究现状及存在的问题[J]. *海洋科学*, 2020, 44(9): 166-175.  
Huang B X, Liu J M, Ma Y Y, *et al.* Current situation and problems in the study of the life history of *Porphyra haitanensis*[J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(9): 166-175 (in Chinese).
- [15] Wu H L, Gao G, Zhong Z H, *et al.* Physiological acclimation of the green tidal alga *Ulva prolifera* to a fast-changing environment[J]. *Marine Environmental Research*, 2018, 137: 1-7.
- [16] Zhao W, Hu C M, Zhou W, *et al.* Carotenoids participate in adaptation/resistance of daily desiccation in the intertidal red alga *Neopyropia yezeensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Algal Research*, 2022, 61: 102606.
- [17] Deng Y Y, Cheng L, Wang Q, *et al.* Functional characterization of lycopene cyclases illustrates the metabolic pathway toward lutein in red algal seaweeds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(5): 1354-1363.
- [18] Yang L E, Huang X Q, Hang Y, *et al.* The P450-type carotene hydroxylase PuCHY1 from *Porphyra* suggests the evolution of carotenoid metabolism in red algae[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(9): 902-915.
- [19] Koizumi J, Takatani N, Kobayashi N, *et al.* Carotenoid profiling of a red seaweed *Pyropia yezeensis*: insights into biosynthetic pathways in the order Bangiales[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(11): 426.
- [20] Phillip D, Hobe S, Paulsen H, *et al.* The binding of xanthophylls to the bulk light-harvesting complex of photosystem II of higher plants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(28): 25160-25169.
- [21] Fraser P D, Bramley P M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(3): 228-265.
- [22] Pereira A G, Otero P, Echave J, *et al.* Xanthophylls from the sea: algae as source of bioactive carotenoids[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(4): 188.
- [23] Davison P A, Hunter C N, Horton P. Overexpression of  $\beta$ -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Ara-bidopsis*[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 203-206.
- [24] Götz T, Sandmann G, Römer S. Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (*crtZ*) enhances UV tolerance in tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(1): 127-140.
- [25] Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 57(5): 779-795.
- [26] 宣仕芬, 朱煜康, 孙楠, 等. 不同采收期坛紫菜感官品质及蛋白组成分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 291-296.  
Xuan S F, Zhu Y K, Sun N, *et al.* Sensory quality and protein composition analysis of *Porphyra haitanensis* in different harvest periods[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(14): 291-296 (in Chinese).
- [27] 陈胜军, 于娇, 胡晓, 等. 汕头地区不同采收期坛紫菜营养成分分析与评价[J]. *核农学报*, 2020, 34(3): 539-546.  
Chen S J, Yu J, Hu X, *et al.* Nutritional analysis and evaluation of *Porphyra haitanensis* in Shantou area at different harvesting stages[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(3): 539-546 (in Chinese).
- [28] Piña F, Contreras-Porcia L. Enhancement of xanthophyll synthesis in *Porphyra/Pyropia* species (Rhodophyta, Bangiales) by controlled abiotic factors: a systematic review and meta-analysis[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(4): 221.
- [29] Howitt C A, Pogson B J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(3): 435-445.
- [30] Llorente B. Regulation of carotenoid biosynthesis in photosynthetic organs[M]//Stange C. Carotenoids in nature. Cham: Springer, 2016: 141-160.
- [31] 赵佳丽, 杨怡, 赵倩, 等. 高温胁迫下坛紫菜中红藻糖苷及其异构体的含量变化[J]. *核农学报*, 2019, 33(1): 103-111.  
Zhao J L, Yang Y, Zhao Q, *et al.* Different variations of floridoside and isofloridoside in *Pyropia haitanensis* under heat resistance[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(1): 103-111 (in Chinese).
- [32] Rmikel N E, Brunet C, Cabioch J, *et al.* Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro-and microalgae[J]. *Hydrobiologia*, 1996(326): 407-413.

## Differences of carotenoid composition in thallus and conchocelis of *Neoporphyra haitanensis*

PAN Haibin<sup>1</sup>, TANG Xinyi<sup>1</sup>, CHEN Haimin<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1</sup>,  
ZHANG Peng<sup>2</sup>, LUO Qijun<sup>1</sup>, CHEN Juanjuan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

**Abstract:** Carotenoids, essential photosynthetic pigments and antioxidants, regulate plant growth, development and environmental adaptation. This study aimed to elucidate the carotenoid responses in *Neoporphyra haitanensis* at different growth stages by analyzing carotenoid compositions in conchocelis and thallus across various generations and harvest stages using ultra-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Optimal extraction conditions were determined as methanol-dichloromethane (1 : 1, V/V) as the solvent, a solid-to-liquid ratio 1 : 10, and a 30 min ultrasonic time. Liquid chromatography parameters were optimized to achieve a resolution of 1.5 for 16 carotenoids, with a detection limit of 1.57-4.96 ng/mL. Eight carotenoids were detected in two generations of *N. haitanensis*, associated with the  $\alpha$ -carotene synthesis pathway ( $\alpha$ -carotene,  $\epsilon$ -carotene,  $\alpha$ -cryptoxanthin and lutein) and the  $\beta$ -carotene synthesis pathway ( $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, zeaxanthin and antherxanthin). The total carotenoid content and the photochemical efficiency ( $F_v/F_m$ ) in the thallus were 1.4- and 1.5-fold higher, respectively, than in the conchocelis. Notably,  $\beta$ -cryptoxanthin content in conchocelis, which has a stable growth state and low antioxidant requirements, was 3.7 times higher than thallus, while the contents of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\epsilon$ -carotene, zeaxanthin, lutein and  $\alpha$ -cryptoxanthin were 22.7%-67.0% of those in the thallus. Zeaxanthin and lutein were the predominant carotenoids in the thallus. Except for  $\beta$ -carotene, the contents of the other seven carotenoids decreased with the extension of the harvest period. The study indicates that carotenoid content is closely related to the growth stage and survival environment of *N. haitanensis*. Rapid carotenoid synthesis in the early thallus period is likely a response to strong light and high temperature stresses, facilitating stress defense and growth. Conversely, a decreased synthesis rate in conchocelis and the late thallus period suggests a reduced antioxidant requirement. These findings provide valuable experimental data for further development of cultivars and seaweed farming practices.

**Key words:** *Neoporphyra haitanensis*; conchocelis; thallus; carotenoids; liquid chromatography-mass spectrometry

**Corresponding author:** CHEN Juanjuan. E-mail: [chenjuanjuan@nbu.edu.cn](mailto:chenjuanjuan@nbu.edu.cn)

**Funding projects:** Key Program of Science and Technology Innovation in Ningbo (2023Z121); Scientific and Technological Project of Ningbo (2021S063); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-50)