

• 工业生物技术 •

光发酵强化三角褐指藻生产岩藻黄素

诸德斐, 杨润青, 魏东*

华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640

诸德斐, 杨润青, 魏东. 光发酵强化三角褐指藻生产岩藻黄素[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1070-1082.

ZHU Defei, YANG Runqing, WEI Dong. Enhancing fucoxanthin production in *Phaeodactylum tricornutum* by photo-fermentation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1070-1082.

摘要: 本研究旨在建立光发酵培养三角褐指藻高效生产岩藻黄素的技术体系。在 5 L 光发酵罐中, 系统研究了兼养条件下初始光强、氮源种类和浓度以及光质对于三角褐指藻生物量浓度和岩藻黄素积累的效果。结果表明, 在初始光强为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 红蓝(R:B=6:1)混合光、含氮量为 0.02 mol/L 的胰蛋白胨和尿素混合氮源(1:1, N mol/N mol)优化条件下, 三角褐指藻生物量浓度、岩藻黄素含量和产率分别达到了最大值 3.80 g/L 、 13.44 mg/g 和 $4.70 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$, 比优化前分别提高了 1.41、1.33 和 2.05 倍。本研究开发了强化三角褐指藻光发酵生产岩藻黄素的关键技术, 促进了海洋天然产物开发。

关键词: 岩藻黄素; 三角褐指藻; 光发酵; 红蓝光; 混合氮源

Enhancing fucoxanthin production in *Phaeodactylum tricornutum* by photo-fermentation

ZHU Defei, YANG Runqing, WEI Dong*

School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: The aim of this study was to develop a technical system for high-efficient production of fucoxanthin by photo-fermentation of *Phaeodactylum tricornutum*. In a 5 L photo-fermentation tank, the effects of initial light intensity, nitrogen source and concentration as well as light quality on biomass concentration and fucoxanthin accumulation in *P. tricornutum* were investigated systematically under mixotrophic condition. The results showed that the biomass concentration, fucoxanthin content and productivity reached the highest level of 3.80 g/L , 13.44 mg/g and $4.70 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$ under the optimal conditions of initial light intensity of

资助项目: 广东基础与应用基础研究基金重点项目(2019B1515120002)

This work was supported by the Key Project of Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019B1515120002).

*Corresponding author. E-mail: fewd304@scut.edu.cn

Received: 2022-07-13; Accepted: 2022-09-14

100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 0.02 mol TN/L of tryptone: urea (1:1, N mol/N mol) as mixed nitrogen source, and a mixed red/blue (R:B=6:1) light, 1.41, 1.33 and 2.05-fold higher than that before optimization, respectively. This study developed a key technology for enhancing the production of fucoxanthin by photo-fermentation of *P. tricornutum*, facilitating the development of marine natural products.

Keywords: fucoxanthin; *Phaeodactylum tricornutum*; photo-fermentation; red/blue light; mixed nitrogen source

硅藻作为海洋中最丰富的单细胞浮游生物类群之一, 提供了海洋中 50%的有机物和地球上 20%的氧气^[1-3]。其胞内含有岩藻黄素、金藻昆布多糖和二十碳五烯酸等多种生物活性物质^[4], 可作为活体饵料、海洋生物活性物质的重要来源。其中, 岩藻黄素(fucoxanthin)是一种类胡萝卜素^[5], 具有抗炎、抗肥胖、预防癌症、抗糖尿病、脂肪肝和预防阿尔兹海默症等功效^[6-8], 在国际市场供不应求。

目前岩藻黄素的工业化生产主要从海带(*Laminaria*)等大型褐藻中提取, 但其岩藻黄素含量较低(0.02–1.01 mg/g)^[9]、养殖周期长、提取和纯化困难, 导致生产成本高^[10], 难以满足市场需求。2017 年, 硅藻来源的岩藻黄素已被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准为新型膳食添加成分^[11]。海洋硅藻中的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)具有岩藻黄素含量高(8.8–59.2 mg/g)、生长快、适应性较强等优点^[12-13], 但生产技术难度大, 目前仅在以色列实现了规模化光自养培养和岩藻黄素生产。

光生物反应器是实现三角褐指藻规模化生产岩藻黄素的关键系统, 目前已有管道反应器、平板反应器和罐式反应器等用于三角褐指藻的培养^[14]。但主要以光合自养模式进行培养, 生物量产率较低^[4,15-16]。在兼养培养下, 三角褐指藻生物量和岩藻黄素产率可显著提升^[17-18]。为了避免兼养过程中的生物污染, 采用添加内置或者外置光源的发酵罐系统不仅可降低环境对细胞培养的干扰, 同时易于实现培养过程的全

自动监控与培养规模的放大^[19]。因此光发酵(兼养)技术对推动三角褐指藻规模化生产岩藻黄素具有重要研究和实践意义。

本研究在 5 L 外光照发酵罐中系统探究初始光照强度、氮源种类和浓度以及光质对三角褐指藻细胞生长和岩藻黄素积累的影响, 为后续三角褐指藻光发酵生产岩藻黄素提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

岩藻黄素标品, 购自 Sigma Aldrich 公司; 海盐, 购自 Aquarium Systems 公司; 胰蛋白胨, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 叔丁基甲醚、甲醇为色谱纯, 丙酮、甘油、尿素等为分析纯, 购自广州卯林仪器有限公司; CytoFLEX 流式细胞仪, 购自 Beckman Coulter 公司; M-100 生物传感分析仪, 购自深圳市西尔曼科技有限公司; DRB200 消解器、DR2700 分光光度计, 购自 HACH 公司; HI83200 多参数水质分析仪, 购自 HANNA 公司; GXZ 型智能光照培养箱, 购自宁波东南仪器有限公司; YMC carotenoid column C30 色谱柱, 购自 Phenomenon 公司; ATC 盐度计, 购自上海淋誉贸易有限公司; AL104 型电子天平、Inpro6800 型溶氧电极和 HA405-DPA-SC-S8 型 pH 计, 购自 Mettler Toledo 公司; AMA240 型高压灭菌锅, 购自 Astell 公司; Modulyod 冷冻干燥机, 购自热电公司; LED 灯条, 购自广东海洋量子科技有限公司; SKBS 5 L 发酵罐及 LED 外光照系统, 购自江苏尚昆生物设备有限公司。

1.2 藻种保存、活化和种子液制备

三角褐指藻(*P. tricornutum*) CCMP 1327 系中国科学院水生生物研究所胡晗华研究员惠赠, 采用改良兼养 f/2 固体斜面培养基^[20]进行保种, 保存温度为 4 °C。藻种活化时, 用接种环从三角褐指藻固体平板兼养培养基上挑取一个单藻落, 接种到 100 mL 灭菌的 f/2 兼养培养基中。在温度为 20 °C、光照强度为 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、转速为 160 r/min 的恒温光照摇床中培养 10 d, 作为实验种子液。

1.3 实验方法

1.3.1 光发酵罐系统

实验所用光发酵罐系统如图 1 所示。光发酵罐系统由玻璃罐体、搅拌桨、检测监控系统、外置 LED 光源等组成。发酵罐总体积为 5 L, 工作体积为 3.5 L (内径 8 cm, 内高 32 cm, 玻璃罐体高 22 cm, 共 3 台)。罐体四面串联放置 LED 灯板提供光照。发酵罐中的 pH、溶氧、温度以及通气量均与控制系统相连, 对培养的全过程进行监测与调控。

1.3.2 初始光照强度

将培养 10 d 的种子液接种到装有 3.5 L 兼养 f/2 培养基的 5 L 发酵罐中, 初始细胞密度为 1.0×10^7 cells/mL。在 3 台发酵罐中设置初始光照强度分别为 20、60、100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光源为自然白 LED 灯。其中, 20 和 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 组在 4.5 d 后提高光强至 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。发酵过程中控制 pH 为 8.0 ± 0.1 , 培养温度为 (20 ± 1) °C, 搅拌转速为 150 r/min, 通气量为 1 L/min。培养周期为 10 d, 每 24 h 取样测定细胞密度、生物量浓度和甘油浓度, 记录培养过程中的 pH、溶氧、温度。培养结束后, 收集藻液、离心洗涤、真空冷冻干燥后藻粉用于岩藻黄素含量测定。

1.3.3 氮源种类和浓度

接种操作同 1.3.2, 在 2 台发酵罐中设置实验组和对照组, 实验组氮源采用王珊等^[21]的摇

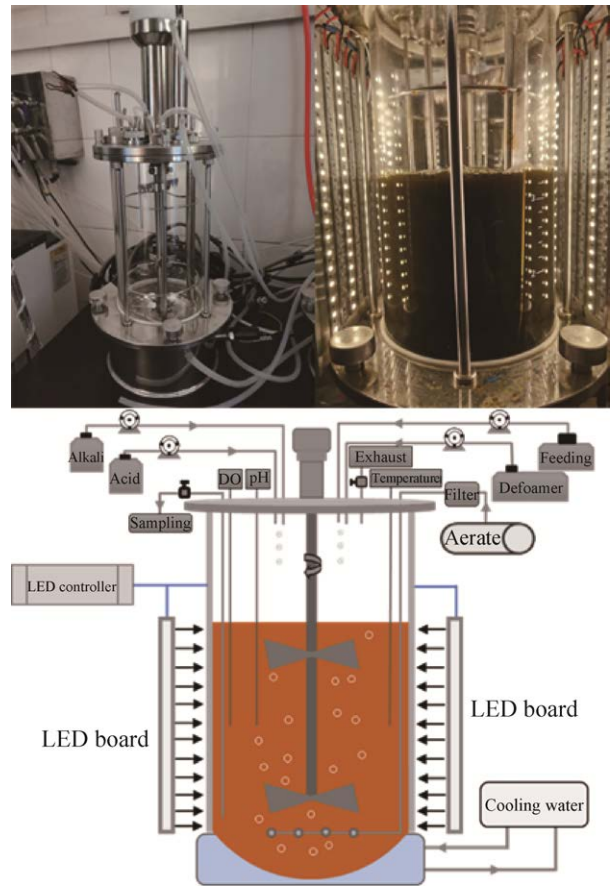


图 1 光发酵罐实物图和示意图^[22]

Figure 1 Physical photo and schematic diagram of 5 L photo-fermenter^[22].

瓶体系优化所得, 为含氮量 0.02 mol/L 的混合氮源(胰蛋白胨:尿素=1:1, N mol/N mol); 对照组氮源为 0.005 mol/L 氯化铵。混合氮源组采用盐酸和氢氧化钠溶液控制 pH, 对照组采用稀释氨水控制 pH。此外, 在 7.5 d 后对照组补加 2.5 mmol/L 尿素使含氮量达到 0.01 mol/L 后, 改用盐酸和氢氧化钠溶液调控 pH。两组初始光强均为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 4.5 d 后调高光强至 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。初始搅拌转速为 150 r/min, 6 d 后调至 200 r/min。培养周期为 9 d, 其余培养条件和操作同 1.3.2。

1.3.4 光质

接种操作同 1.3.2, 在 2 台发酵罐中设置实

验组 and 对照组, 实验组光质采用 Yang 等^[18]的摇瓶体系优化所得, 为红蓝混合光(R:B=6:1), 对照组为自然白光, 光谱如图 2 所示。氮源为 1.3.2 中含氮量为 0.02 mol/L 的混合氮源。培养周期为 10 d, 其余培养条件和操作同 1.3.3。

1.4 分析与测试

1.4.1 生物量浓度、细胞密度和比生长速率^[22]

生物量浓度(g/L)和细胞密度(cells/mL)分别采用干重法和流式细胞仪测定^[20]。

比生长速率 μ 计算公式为:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

其中 N_2 和 N_1 是时间点 t_2 和 t_1 测定的细胞密度(cells/mL)。

1.4.2 甘油浓度

使用 M-100 生物传感分析仪测定^[18]。在检测电极上安装 G1008 型甘油酶膜, 选择检测通道为甘油, 用 1.0 g/L 的 B2004 甘油标准液进行定标, 仪器定标通过后, 将装有 1 mL 样品的 2 mL 离心管置于仪器测试盘中进行测试(待测上清液用超纯水自动稀释甘油浓度到 0-1 g/L)。每个样品设 3 个平行, 取平均值并计算标准差。

1.4.3 总氮浓度和氨氮浓度^[18,22]

总氮浓度(mg/L)使用 DR2700 分光光度计

测定, 总氮专用试剂编号为 2714100^[18]。取待测上清液稀释总氮浓度到 0-150 mg/L, 先加入过硫酸盐试剂在消解器 DRB200 上进行消解(105 °C、30 min)。消解完成后取出冷却至室温, 再先后加入 2714100A、2714100B 粉剂包, 置于分光光度计 DR2700 中, 选择总氮程序进行测定。每个样品设 3 个平行, 取平均值并计算标准差。

$\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度(mg/L)采用意大利 HANNA HI 83200 多参数水质分析仪按照参考文献[20]测定, 每个样品设 3 个平行, 取平均值并计算标准差。

1.4.4 岩藻黄素含量

通过有机溶剂提取胞内岩藻黄素, 采用配有 2996 二极管阵列检测器和 YMC carotenoid C30 柱(4.6 mm×150 mm, 3 μm)的高效液相色谱测定, 利用内标法对岩藻黄素进行定性和定量分析^[20]。

岩藻黄素产量(mg/L, Y)计算公式为:

$$Y = C \times B - C_0 \times B_0$$

其中, C 和 B 是 t 时刻的岩藻黄素含量(mg/g)和生物量(g/L); C_0 和 B_0 是 t_0 时刻的岩藻黄素含量(mg/g)和生物量(g/L)。

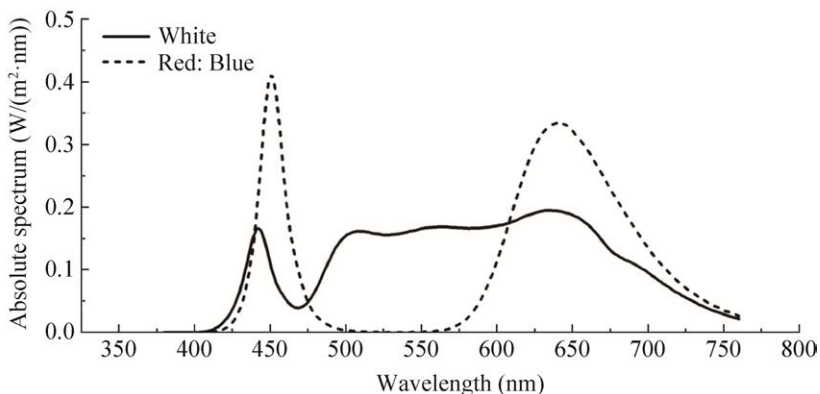


图 2 自然白光和红蓝光(R:B=6:1)光谱

Figure 2 Spectrum of natural white light and mixed red/blue (R:B=6:1) light.

岩藻黄素产率 $[P, \text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})]$ 计算公式为:

$$P = (C \times B - C_0 \times B_0) / (t - t_0)$$

其中, C 和 B 是 t 时刻的岩藻黄素含量(mg/g)和生物量(g/L); C_0 和 B_0 是 t_0 时刻的岩藻黄素含量(mg/g)和生物量(g/L)。

1.4.5 数据分析

采用 Origin 2015 软件对数据进行处理和统计学分析; 采用单因素方差分析确定各试验组之间差异, 其中*: $P < 0.05$ 为显著差异; **: $P < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 初始光照强度对细胞生长和岩藻黄素产量的影响

不同初始光强条件下, 光发酵罐中三角褐指藻生长和岩藻黄素积累情况如图 3 所示。由图 3A 和 3B 可知, 细胞密度和生物量随着初始光照强度的增加而增加。培养结束时, 在高初始光强 $[100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$ 条件下, 细胞密度和生物量分别达到最大值为 $1.12 \times 10^8 \text{ cells}/\text{mL}$ 和 $3.50 \text{ g}/\text{L}$, 此时平均比生长速率和生物量产率分别为 0.23 d^{-1} 和 $0.29 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。其中, 生物量浓度和产率均显著高于中光强 $[60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$ 和低光强组 $[20 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$ ($P < 0.05$); 但细胞密度和比生长速率仅显著高于低光强组($P < 0.05$), 与中光强组无显著性差异。此外, 高光强组的甘油和总氮平均消耗速率分别达到了 $0.29 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 和 $10.20 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 分别高出另 2 组 16%–38% 和 21%–38% ($P < 0.05$) (表 1), 与细胞生长情况呈现正相关关系。由于发酵罐液面较厚, 光衰减成为限制细胞生长的主要因素。因此, 与在摇瓶体系中高光强显著抑制细胞生长不同^[18], 发酵罐体系中较高光强有利于缓解光衰减与光遮蔽作用, 促进三角褐指藻细胞生长和生物量积累^[23-24]。

如图 3C 所示, 在 0–4 d, 各组岩藻黄素含量均呈现不断升高的趋势, 但岩藻黄素含量与初始光照强度呈负相关关系, 这是因为初始细胞密度较低, 弱光缓解了单个细胞受到较高光强的抑制作用, 有利于诱导胞内岩藻黄素积累^[25]。同时随着细胞密度增加, 细胞间的相互遮蔽导致单个细胞接受的实际光强减弱^[26], 这解释了岩藻黄素含量在前 4 d 不断增加的原因。在 4.5 d 时, 低光强和中光强组调高光强至 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 后, 2 组的岩藻黄素含量急剧下降, 与高光强组的岩藻黄素含量基本趋于一致。前人研究同样表明, 高光强会显著抑制胞内岩藻黄素积累^[23]。同时, 细胞在第 4 天后进入对数生长期, 细胞的快速分裂导致岩藻黄素合成速率减慢^[20]。培养结束时, 高光强组细胞进入平台期, 此时岩藻黄素含量为 $11.38 \text{ mg}/\text{g}$, 与对数期(第 6 天)岩藻黄素含量相比无显著性差异, 同时与调光后的 2 组相比无显著性差异。由于高光强组获得了更高的生物量浓度($3.50 \text{ g}/\text{L}$), 此时岩藻黄素产率达到了 $3.54 \text{ mg}/\text{L}$, 分别是 20 和 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 组的 1.54 倍和 1.20 倍($P < 0.05$)。

因此, 选用高初始光强 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 用于后续优化实验, 以期在获取高生物量浓度的同时促进岩藻黄素积累。

2.2 氮源种类和浓度对细胞生长和岩藻黄素产率的影响

不同氮源条件下, 发酵罐中三角褐指藻生长和岩藻黄素积累情况如图 4 所示。由图 4A 和 4B 可知, 培养过程中, 混合氮源条件下的细胞密度和生物量浓度均显著高于氯化铵条件下。第 2 天时, 混合氮源条件下细胞比生长速率达到最大值为 0.48 d^{-1} ; 第 4 天时, 比生长速率下降为 0.27 d^{-1} , 可能是因为细胞快速分裂, 导致细胞之间出现了光遮蔽影响了生长^[27],

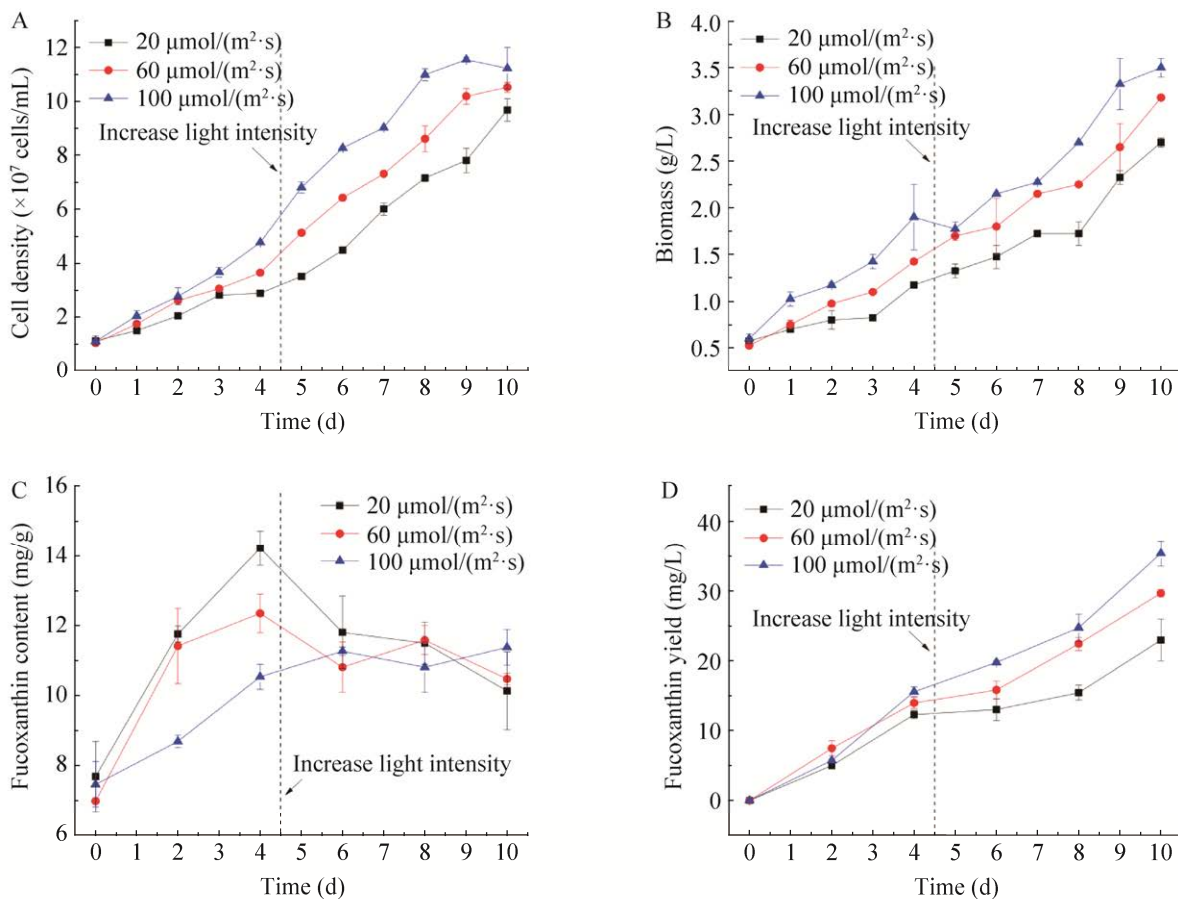


图 3 光发酵罐中不同初始光强下细胞密度(A)、生物量浓度(B)、岩藻黄素含量(C)和产量(D)
Figure 3 Cell density (A), biomass concentration (B), content (C) and yield (D) of fucoxanthin in photo-fermentation under different initial light intensities.

表 1 不同初始光强条件下三角褐指藻的生产性能

Table 1 Production capacity of *Phaeodactylum tricornutum* under different initial light intensities

| Items | Initial light intensity ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) | | |
|--|---|------------------|--------------------|
| | 20 | 60 | 100 |
| Average specific growth rate (d^{-1}) | 0.21 \pm 0.09 | 0.23 \pm 0.09* | 0.23 \pm 0.13* |
| Biomass productivity (g/(L·d)) | 0.21 \pm 0.02 | 0.27 \pm 0.00* | 0.29 \pm 0.02* |
| Average glycerol consumption rate (g/(L·d)) | 0.21 \pm 0.05 | 0.25 \pm 0.01* | 0.29 \pm 0.00* |
| Average nitrogen consumption rate (mg/(L·d)) | 7.40 \pm 0.20 | 8.40 \pm 0.10* | 10.20 \pm 0.60** |
| Fucoxanthin productivity (mg/(L·d)) | 2.29 \pm 0.30 | 2.96 \pm 0.05* | 3.54 \pm 0.18** |

A significant analysis was performed with 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ as the control, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

因此在 4.5 d 提高光强至 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 以促进细胞生长。提升光强后比生长速率呈现短暂提升(5 d), 第 6 天时下降为 0.07 d^{-1} 。有研究表明, 在细胞发酵中提高转速可以显著促进细胞增

长^[28], 因此在第 6 天后提升转速至 200 r/min, 比生长速率上升至 0.11 d^{-1} (7 d)。不同的是, 对照组在第 5 天后进入稳定期, 细胞密度和生物量浓度增长缓慢。研究同样表明, 与氮氮条件

下相比,三角褐指藻在尿素条件下可获得更高的生物量浓度^[29]。在 7.5 d 时,在对照组中添加 0.002 5 mol/L 尿素,随后比生长速率和生物量浓度出现明显提升,但培养结束时仅为 2.32 g/L,极显著低于混合氮源下 33% ($P<0.01$)。如表 2 所示,混合氮源条件下的甘油和总氮平均消耗速率分别为 0.29 g/(L·d)和 14.00 mg/(L·d),极显著高出对照条件下的 53%和 152% ($P<0.01$),为细胞增长和生物量积累提供了物质和能量基础。这可能是由于胰蛋白胨中富含氨基酸、维生素和促生长因子,其生物利用度更高^[30],可促进三角褐指藻生长。

由图 4C 可知,在培养过程中,对照条件下的岩藻黄素含量呈现先上升后下降的变化趋势。第 0-4 天,随着细胞密度的增加,每个藻细胞的实际光强下降,岩藻黄素含量不断上升。第 4-6 天,提高光强后岩藻黄素含量下降。第 6-10 天,岩藻黄素持续下降至 6.31 mg/g。与对照条件相比,在培养过程中,混合氮源下的岩藻黄素含量呈现波动式变化。由图 4D 可知,在混合氮源条件下,岩藻黄素产量逐渐增加;而在对照条件下,呈现出先增加后减少的趋势。培养结束时,混合氮源下的岩藻黄素含量和产量分别达到 10.50 mg/g 和 36.50 mg/L,均

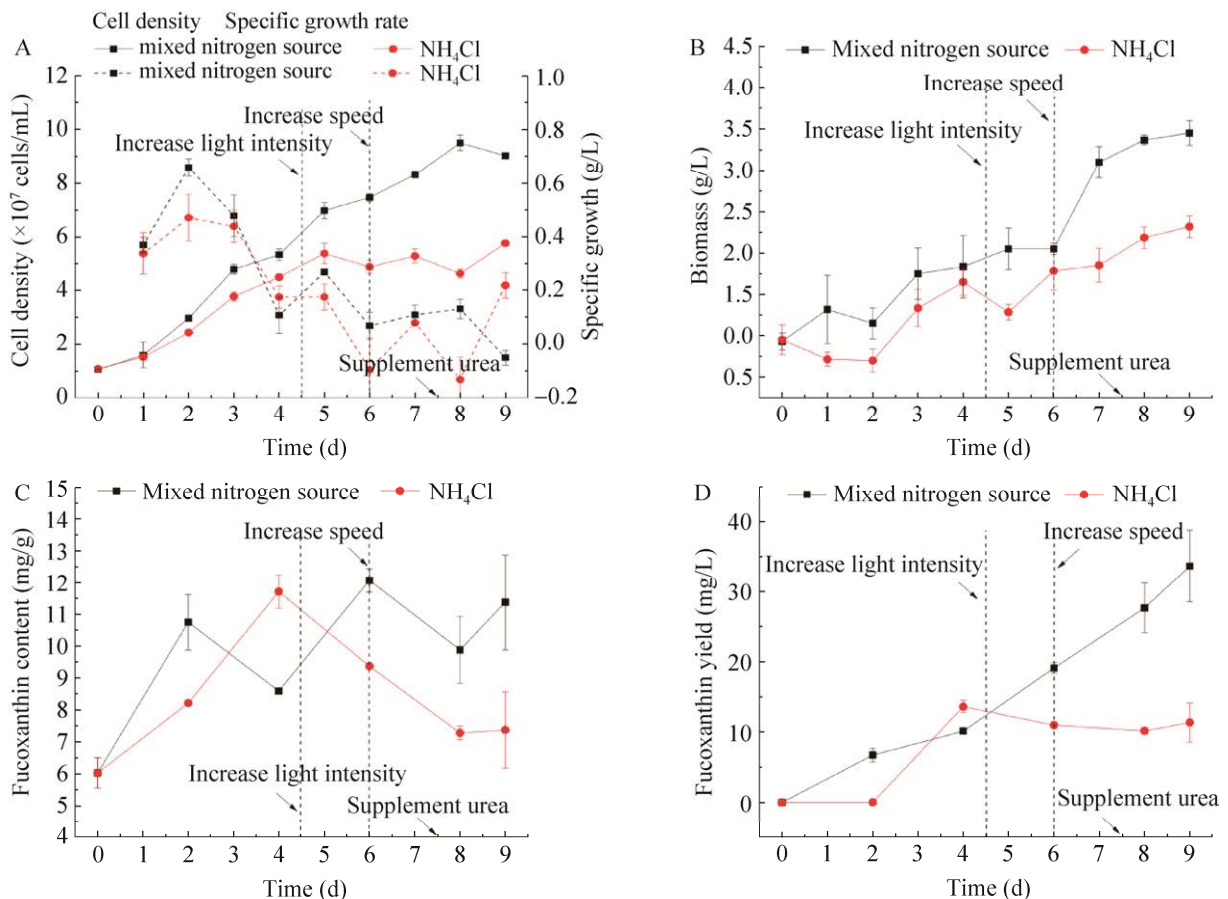


图 4 光发酵罐中不同氮源条件下细胞密度和比生长速率(A)、生物量浓度(B)、岩藻黄素含量(C)和产量(D)

Figure 4 Cell density and specific growth rate (A), biomass concentration (B), content (C) and yield (D) of fucoxanthin in photo-fermenter under different nitrogen sources.

表 2 不同氮源种类条件下三角褐指藻的生长性能

Table 2 Production capacity of *Phaeodactylum tricornutum* under different nitrogen sources

| Items | Mixed nitrogen source | NH ₄ Cl |
|---|-----------------------|--------------------|
| Average specific growth rate (d ⁻¹) | 0.24±0.01 | 0.18±0.00* |
| Biomass productivity (g/(L·d)) | 0.28±0.02 | 0.19±0.02** |
| Average glycerol consumption rate (g/(L·d)) | 0.29±0.04 | 0.19±0.01** |
| Average nitrogen consumption rate (mg/(L·d)) | 14.00±2.00 | 5.56±0.24** |
| Fucoxanthin productivity (mg/(L·d)) | 3.74±0.06 | 1.26±0.10** |

A significant analysis was performed with mixed nitrogen sources as the control, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

极显著高于对照条件下的结果($P < 0.01$)。有研究表明,相比于 NH₄⁺, 尿素更有利于三角褐指藻积累岩藻黄素^[31], 所以到第 6 天时, 相同操作下混合氮源的岩藻黄素含量和产量均高于氯化铵。同时 Smith 等^[32]发现三角褐指藻可以直接吸收利用精氨酸等氨基酸, 参与 GS/GOGAT (谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶) 循环合成蛋白质, 从而促进岩藻黄素-叶绿素-蛋白复合体(FCP)的形成^[4], 而较低光强下 FCP 捕光作用的提高可促进硅藻中岩藻黄素的积累^[33]。因此, 混合氮源比补加尿素的氯化铵实验组更有利于三角褐指藻积累岩藻黄素。

综上所述, 在光发酵罐中, 采用胰蛋白胨和尿素的混合氮源, 辅以阶段性提高光强和加强搅拌的操作, 可显著促进三角褐指藻细胞生长和岩藻黄素积累。

2.3 光质对细胞生长和岩藻黄素积累的影响

光发酵罐中三角褐指藻生长和岩藻黄素积累情况如图 5 所示。由图 5A 和 5B 可知, 不同光质条件下的细胞密度和生物量浓度均呈现不断增加的趋势。第 5 天之后细胞生长进入稳定期, 可能是因为在较高细胞密度下, 原有搅拌速度混合效率降低无法满足生长需求。在第 6 天提高搅拌至 200 r/min 后, 细胞密度急剧增长。第 10 天培养结束时, 红蓝混

合光条件下细胞密度和生物量分别达到了 1.38×10^8 cells/mL 和 3.80 g/L, 但与自然白组相比无显著性差异($P > 0.05$)。Sirisuk 等^[34]的研究表明, 红光占比更高的光源可以促进三角褐指藻生物量的积累, 徐润洁等^[35]也证明单色红光可以显著促进三角褐指藻的生长。本研究的结果与之不符, 可能是因为在光发酵罐中, 液面较厚(直径 ≥ 14 cm), 红蓝混合光中的红光相比绿光衰减更为严重^[36], 导致实际每个藻细胞获得的光强不如自然白, 从而限制了三角褐指藻的生长。

如图 5C 所示, 在自然白和红蓝混合光条件下的岩藻黄素含量均呈现先上升后下降的趋势, 均在第 6 天达到最高岩藻黄素含量, 分别为 14.51 mg/g 和 12.86 mg/g。前期(0-6 d)随着细胞密度不断增加, 细胞间相互遮蔽, 岩藻黄素不断积累; 培养后期(6-10 d), 阶段性调光和提高转速后细胞分裂加剧, 导致岩藻黄素含量下降^[20]。从第 4 天开始, 红蓝混合光下的岩藻黄素含量高于自然白的含量。培养结束时, 在红蓝混合光下, 岩藻黄素含量(13.44 mg/g)和产量(47.02 mg/L)比自然白条件下分别提高了 27.51%和 20.64% ($P < 0.05$)。如表 3 所示, 红蓝混合光下的总氮平均消耗速率为 14.60 mg/(L·d), 是自然白条件下的 1.09 倍, 说明在红蓝混合光下三角褐指藻对于氮源的利用效率更高。由图 2 可知, 红蓝混合光中的蓝光占比是自然白的 2.73 倍,

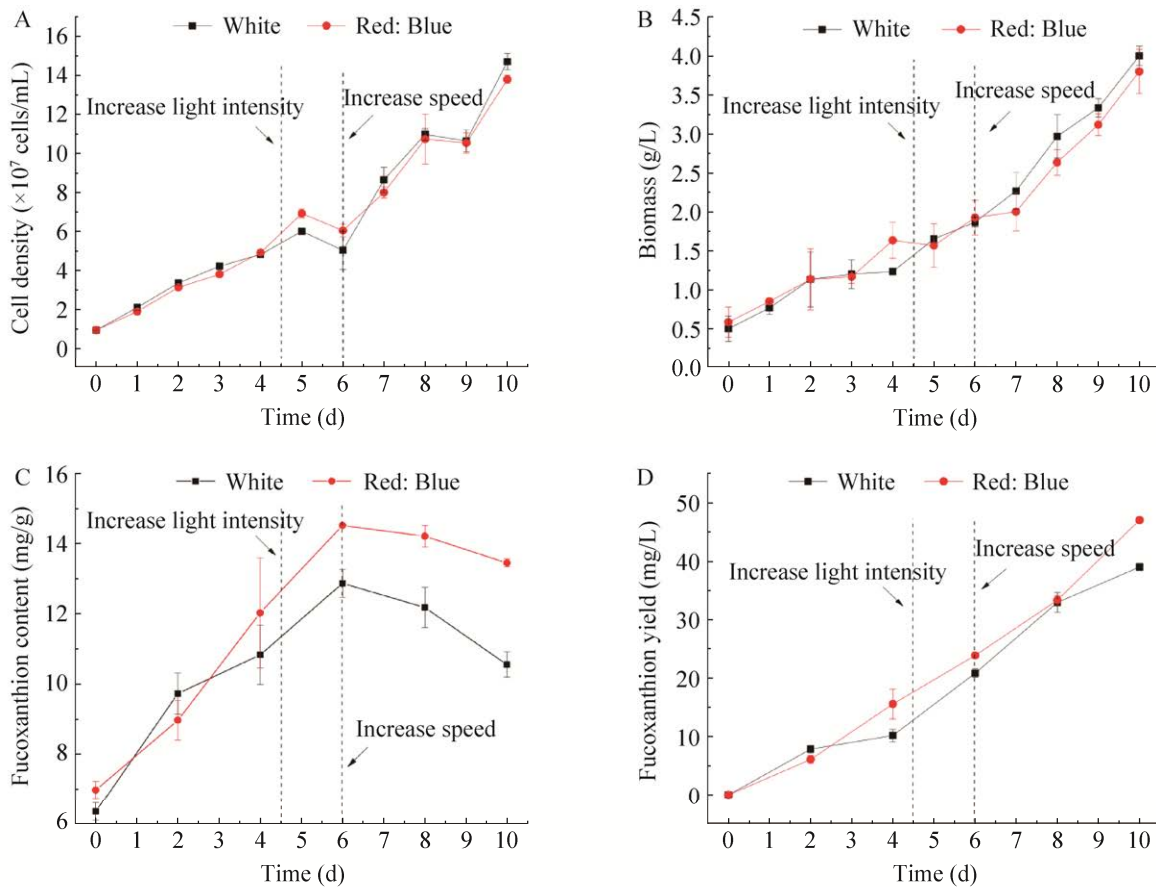


图5 光发酵罐中不同光质条件下细胞密度(A)、生物量浓度(B)、岩藻黄素含量(C)和产量(D)

Figure 5 Cell density (A), biomass concentration (B), content (C) and yield (D) of fucoxanthin in photo-fermenter under different light qualities.

表3 不同光质条件下三角褐指藻的生产性能

Table 3 Production capacity of *Phaeodactylum tricornutum* under different light qualities

| Items | White light | Red: Blue light |
|--|-----------------|------------------|
| Average specific growth rate (d^{-1}) | 0.28 \pm 0.00 | 0.27 \pm 0.00 |
| Biomass productivity(g/(L·d)) | 0.34 \pm 0.02 | 0.32 \pm 0.01 |
| Average glycerol consumption rate (g/(L·d)) | 0.30 \pm 0.02 | 0.29 \pm 0.01 |
| Average nitrogen consumption rate (mg/(L·d)) | 13.4 \pm 0.25 | 14.60 \pm 0.05 |
| Fucoxanthin productivity (mg/(L·d)) | 3.90 \pm 0.06 | 4.70 \pm 0.04* |

A significant analysis was performed with white light as the control, *: $P < 0.05$.

有研究表明蓝光最有利于三角褐指藻积累岩藻黄素^[35], 且红光相比绿光衰减更为严重^[36], 因此在红蓝混合光下每个藻细胞获得的光强较低, 而弱光有利于诱导岩藻黄素积累^[25]。

目前, 三角褐指藻的规模化培养大多集中在管道和平板光生物反应器中, 并以光合自养

模式为主, 难以实现生物量和岩藻黄素的同步积累, 而兼养培养多数集中在摇瓶系统中(表4)。本研究的前期工作表明, 在摇瓶中采用低光强[20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]和红蓝光兼养培养三角褐指藻, 细胞生物量浓度和岩藻黄素含量分别可达5.53 g/L和11.67 mg/g^[18]。尽管在光发酵系统中

表 4 三角褐指藻在不同光生物反应器中岩藻黄素产量的比较

Table 4 Comparison of fucoxanthin production by *Phaeodactylum tricornutum* in various photobioreactors

| Strain | Cultivation system | Condition | Biomass (g/L) | Biomass productivity (g/(L·d)) | Fx content (mg/g) | Fx productivity (mg/(L·d)) | Reference |
|-----------------------|------------------------|---|---------------|--------------------------------|-------------------|----------------------------|------------|
| <i>P. tricornutum</i> | Photo-fermenter | 0.1 mol/L glycerol, 0.02 mol/L T+U, R:B=6:1, 100–150 μmol/(m ² ·s) | 3.80 | 0.32 | 13.44 | 4.70 | This study |
| <i>P. tricornutum</i> | Flask | 0.1 mol/L glycerol, 0.02 mol/L T+U, R:B=6:1, 20 μmol/(m ² ·s) | 5.53 | 0.35 | 11.67 | <5.32 | [18] |
| <i>P. tricornutum</i> | Flask | 1.5 mL/L <i>Laminaria japonica</i> hydrolysate, 0.34 g/L NaNO ₃ , WL, 2 000 lx | 1.59 | <159 | 17.60 | <2.79 | [37] |
| <i>P. tricornutum</i> | Flask | 1.29 g/L Spruce hydrolysates, Yeast extract, 100 μmol/(m ² ·s) | 3.31 | 0.25 (max.) | 5.10 (carotenoid) | ND | [38] |
| <i>P. tricornutum</i> | Flat panel PBR | 1% CO ₂ , 0.75 g/L NaNO ₃ , WL, 150 μmol/(m ² ·s) | 0.37 | – | 59.20 | 2.30 | [12] |
| <i>P. tricornutum</i> | Bubble column PBR | Semi-continuous 0.1 mol/L glycerol, 0.85 g/L NaNO ₃ , WL, 465 μmol/(m ² ·s) | 12.08 | 1.00 | 7.00 (carotenoid) | ND | [39] |
| <i>P. tricornutum</i> | Cylindrical column PBR | 1% CO ₂ , 1.45 g/L KNO ₃ , WL, 300 μmol/(m ² ·s) | 4.05 (max.) | – | 10.30 (max.) | 4.73 (max.) | [16] |

T+U: Tryptone:urea=1:1 (N mol:N mol); R: Red light; B: Blue light; WL: White light; PBR: Photobioreactor; ND: No data.

细胞生物量产率低于摇瓶中 9%，但岩藻黄素含量提升了 15%，同时比生长速率(0.27 d⁻¹)比摇瓶(0.17 d⁻¹)显著提升了 59%^[18]，说明摇瓶中的培养参数可同步到光发酵罐系统中。同时，由于培养结束时细胞密度和生物量浓度仍未达到稳定期(图 5A 和 5B)，意味着三角褐指藻细胞分裂在光发酵系统中受到显著增强，为岩藻黄素生产提供了更多的细胞工厂，但仍需进一步优化操作工艺以增强单个细胞的生物量和岩藻黄素积累，获得更高的岩藻黄素产率。

3 结论

本文在 5 L 光发酵罐体系中，主要研究了兼养条件下，不同初始光照强度、氮源种类和浓度以及光质对三角褐指藻生长和岩藻黄素积累的影响。结果表明，较高光强的红蓝混合光以及有机混合氮源可以显著提高生物量浓度和

促进岩藻黄素积累，显著高于优化前的结果。上述优化工艺为后续放大培养提供了技术基础。后续将通过进一步优化光发酵罐中分批补料培养以及不同光质下两阶段培养工艺以提高三角褐指藻生长和岩藻黄素积累，为三角褐指藻规模化生产岩藻黄素提供技术支撑。

REFERENCES

- [1] FALKOWSKI PG, BARBER RT, SMETACEK V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production[J]. Science, 1998, 281(5374): 200-206.
- [2] FIELD CB, BEHRENFELD MJ, RANDERSON JT, FALKOWSKI P. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components[J]. Science, 1998, 281(5374): 237-240.
- [3] SCALA S, BOWLER C. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2001, 58(11): 1666-1673.
- [4] YANG RQ, WEI D, XIE J. Diatoms as cell factories for

- high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(7): 993-1009.
- [5] WU HL, LI T, WANG GH, DAI SK, HE H, XIANG WZ. A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricorutum* strains from different origins[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(2): 391-398.
- [6] XIANG SY, LIU FF, LIN JJ, CHEN HX, HUANG CH, CHEN LP, ZHOU YY, YE LY, ZHANG K, JIN JK, ZHEN JC, WANG C, HE S, WANG QW, CUI W, ZHANG JR. Fucoxanthin inhibits β -amyloid assembly and attenuates β -amyloid oligomer-induced cognitive impairments[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(20): 4092-4102.
- [7] SETH K, KUMAR A, RASTOGI RP, MEENA M, VINAYAK V, HARISH. Bioprospecting of fucoxanthin from diatoms—challenges and perspectives[J]. *Algal Research*, 2021, 60: 102475.
- [8] LOURENÇO-LOPES C, FRAGA-CORRAL M, JIMENEZ-LOPEZ C, CARPENA M, PEREIRA AG, GARCIA-OLIVEIRA P, PRIETO MA, SIMAL-GANDARA J. Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 117: 163-181.
- [9] MOHAMADNIA S, TAVAKOLI O, FARAMARZI MA, SHAMSOLLAHI Z. Production of fucoxanthin by the microalga *Tisochrysis lutea*: a review of recent developments[J]. *Aquaculture*, 2020, 516: 734637.
- [10] XIA S, WANG K, WAN LL, LI AF, HU Q, ZHANG CW. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(7): 2667-2681.
- [11] YANG RQ, WEI D, POHNERT G. Nitrogen utilization analysis reveals the synergetic effect of arginine and urea in promoting fucoxanthin biosynthesis in the mixotrophic marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 947726.
- [12] MCCLURE DD, LUIZ A, GERBER B, BARTON GW, KAVANAGH JM. An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Algal Research*, 2018, 29: 41-48.
- [13] KIM SM, KANG SW, KWON ON, CHUNG D, PAN CH. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: characterization of extraction for commercial application[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2012, 55(4): 477-483.
- [14] BUTLER T, KAPOORE RV, VAIDYANATHAN S. *Phaeodactylum tricorutum*: a diatom cell factory[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(6): 606-622.
- [15] DELBRUT A, ALBINA P, LAPIERRE T, PRADELLES R, DUBREUCQ E. Fucoxanthin and polyunsaturated fatty acids co-extraction by a green process[J]. *Molecules*: Basel, Switzerland, 2018, 23(4): 874.
- [16] GAO BY, CHEN AL, ZHANG WY, LI AF, ZHANG CW. Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricorutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(5): 916-924.
- [17] FERNÁNDEZ SEVILLA JM, CERÓN GARCÍA MC, SÁNCHEZ MIRÓN A, BELARBI EH, GARCÍA CAMACHO F, MOLINA GRIMA E. Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricorutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch mode[J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(3): 728-736.
- [18] YANG RQ, WEI D. Improving fucoxanthin production in mixotrophic culture of marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* by LED light shift and nitrogen supplementation[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 820.
- [19] 骆小英, 陈俊辉, 魏东. 蛋白核小球藻高效同化硝态氮联产微藻蛋白[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1150-1161.
- LUO XY, CHEN JH, WEI D. High efficient assimilation of NO_3^- -N with coproduction of microalgal proteins by *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1150-1161 (in Chinese).
- [20] 诸德斐, 杨润青, 宋培钦, 魏东. 光及补料条件对室内管道光反应器中三角褐指藻生长和岩藻黄素积累的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(2): 18-26.
- ZHU DF, YANG RQ, SONG PQ, WEI D. Effect of light and fed-batch operation on growth of *Phaeodactylum*

- tricornutum* and its fucoxanthin accumulation in indoor tubular photobioreactor[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(2): 18-26 (in Chinese).
- [21] 王珊, 杨润青, 宋培钦, 魏东. 碳氮源优化提高兼养三角褐指藻生物量和岩藻黄素产量[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(10): 82-90.
WANG S, YANG RQ, SONG PQ, WEI D. Improving production of biomass and fucoxanthin in mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum* by optimization of carbon and nitrogen sources[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(10): 82-90 (in Chinese).
- [22] WANG QK, YU ZY, WEI D. High-yield production of biomass, protein and pigments by mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* through the bioconversion of high ammonium in wastewater[J]. Bioresource Technology, 2020, 313: 123499.
- [23] CONCEIÇÃO D, LOPES RG, DERNER RB, CELLA H, CARMO APBD, MONTES D'OCA MG, PETERSEN R, PASSOS MF, VARGAS JVC, GALLI-TERASAWA LV, KAVA V. The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 32(2): 1017-1025.
- [24] WANG H, ZHANG Y, CHEN L, CHENG WT, LIU TZ. Combined production of fucoxanthin and EPA from two diatom strains *Phaeodactylum tricornutum* and *Cylindrotheca fusiformis* cultures[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(7): 1061-1071.
- [25] ZHENG YT, QUINN AH, SRIRAM G. Experimental evidence and isotopomer analysis of mixotrophic glucose metabolism in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 109.
- [26] CHRISMADHA T, BOROWITZKA MA. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor[J]. Journal of Applied Phycology, 1994, 6(1): 67-74.
- [27] 张会贞. 小球藻—酵母混合培养处理糖蜜酵母废水研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2017.
ZHANG HZ. Mixed culture of *Chlorella* and yeast for the treatment of yeast wastewater from molasses[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [28] 郑雅莉. 嗜硫原始红藻混养处理高氨氮工业废水联产藻胆蛋白[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2020.
ZHENG YL. Treatment of ammonium-rich industrial wastewater by the mixotrophic culture of *Galdieria sulphuraria* with phycobiliprotein co-production[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [29] 张文源, 高保燕, 李爱芬, 张成武. 不同培养条件对三角褐指藻生长及其生物活性成分积累的影响[J]. 海洋科学, 2016, 40(5): 57-65.
ZHANG WY, GAO BY, LI AF, ZHANG CW. Effects of different culture conditions on growth and accumulation of bioactive compounds by *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Marine Sciences, 2016, 40(5): 57-65 (in Chinese).
- [30] FAN L, BRETT MT, LI B, SONG MM. The bioavailability of different dissolved organic nitrogen compounds for the freshwater algae *Raphidocelis subcapitata*[J]. Science of the Total Environment, 2018, 618: 479-486.
- [31] WU ZS, QIU S, ABBEW AW, CHEN ZP, LIU YL, ZUO JY, GE SJ. Evaluation of nitrogen source, concentration and feeding mode for co-production of fucoxanthin and fatty acids in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Algal Research, 2022, 63: 102655.
- [32] SMITH SR, DUPONT CL, MCCARTHY JK, BRODDRICK JT, OBORNÍK M, HORÁK A, FÜSSY Z, CIHLÁŘ J, KLEESSEN S, ZHENG H, MCCROW JP, HIXSON KK, ARAÚJO WL, NUNES-NESI A, FERNIE A, NIKOLOSKI Z, PALSSON BO, ALLEN AE. Evolution and regulation of nitrogen flux through compartmentalized metabolic networks in a marine diatom[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4552.
- [33] 隋吉楛, 汪辉, 刘天中. 硅藻岩藻黄素特性与其生物合成的研究进展[J]. 海洋科学, 2019, 43(12): 130-138.
SUI JK, WANG H, LIU TZ. Research progress of the characteristics and biosynthesis of diatom fucoxanthin[J]. Marine Sciences, 2019, 43(12): 130-138 (in Chinese).
- [34] SIRISUK P, RA CH, JEONG GT, KIM SK. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination[J]. Bioresource

- Technology, 2018, 253: 175-181.
- [35] 徐润洁, 龚一富, 陈文婷, 李申睿, 陈若莹, 郑小辉, 陈璇木子, 王何瑜. 不同发光二极管单色光质对三角褐指藻中岩藻黄素含量及相关基因表达的影响[J]. 光学学报, 2019, 39(9): 299-307.
- XU RJ, GONG YF, CHEN WT, LI SR, CHEN RY, ZHENG XY, CHEN X, WANG HY. Effects of LED monochromatic light quality of different colors on fucoxanthin content and expression levels of related genes in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(9): 299-307 (in Chinese).
- [36] 张延青, 秦菲, 费凡, 李笑天, 黄滨, 赵奎峰, 刘宝良. LED 光源在海水养殖水体中传播特征解析[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 153-161.
- ZHANG YQ, QIN F, FEI F, LI XT, HUANG B, ZHAO KF, LIU BL. Analysis of propagation characteristics of LED light source in aquaculture water[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 153-161 (in Chinese).
- [37] WANG ZP, WANG PK, MA Y, LIN JX, WANG CL, ZHAO YX, ZHANG XY, HUANG BC, ZHAO SG, GAO L, JIANG J, WANG HY, CHEN W. *Laminaria japonica* hydrolysate promotes fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Bioresource Technology, 2022, 344: 126117.
- [38] PATEL A, MATSAKAS L, HRŮZOVÁ K, ROVA U, CHRISTAKOPOULOS P. Biosynthesis of nutraceutical fatty acids by the oleaginous marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* utilizing hydrolysates from organosolv-pretreated birch and spruce biomass[J]. Marine Drugs, 2019, 17(2): 119.
- [39] CERÓN-GARCÍA MC, FERNÁNDEZ-SEVILLA JM, SÁNCHEZ-MIRÓN A, GARCÍA-CAMACHO F, CONTRERAS-GÓMEZ A, MOLINA-GRIMA E. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes[J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 569-576.

(本文责编 郝丽芳)