

木钙添加量对三角褐指藻高值产物产率的影响

杨泽雄, 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)

摘要: 在摇瓶中兼养培养三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)的过程中,作者系统比较了高质量浓度(10~5 000 mg/L)和低质量浓度(2.5~50.0 mg/L)木钙对三角褐指藻生物量和3种高值产物产率的影响,旨在确定木钙的最佳剂量。结果表明,木钙的最适添加质量浓度为10 mg/L,此时生物产率为281.32 mg/(L·d);岩藻黄素(fucoxanthin, Fx)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和金藻昆布多糖(chrysolaminarin, Chrl)的产率分别为4.41、10.60、57.24 mg/(L·d),比对照组分别提高了9.98%、1.92%、7.27%,其中Fx和Chrl产率显著提高($P<0.05$)。作者采用添加木钙的新型兼养培养方式,实现了三角褐指藻中3种高值产物产率的同步提高,为提高三角褐指藻规模化培养效率及应用价值提供了技术支持。

关键词: 三角褐指藻;木钙;海洋资源;高值化利用

中图分类号:TS 254.1 文章编号:1673-1689(2024)06-0128-07 DOI:10.12441/spyswjs.20220831001

Simultaneously Enhanced Production of High-Value Products from *Phaeodactylum tricornutum* by Calcium Lignosulfonate Addition

YANG Zexiong, YANG Runqing, WEI Dong*

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

Abstract: This study systematically compared the effect of high concentration (10~5 000 mg/L) and low concentration (2.5~50.0 mg/L) of calcium lignosulfonate on the yield of biomass and three high-value products by using mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum* growth in shake flasks with an aim to determine the optimal dose and effect. The results showed that at the optimal concentration of calcium lignosulfonate (10 mg/L), the biomass yield reached to 281.32 mg/(L·d). Additionally, the yields of fucoxanthin (Fx), eicosapentaenoic acid (EPA) and chrysolaminarin (Chrl) were 4.41, 10.60 and 57.24 mg/(L·d), respectively, which were 9.98%, 1.92%, and 7.27% higher than that in the control group. Notably, the yields of Fx and Chrl significantly increased ($P<0.05$). The author developed a novel mixotrophic culture model with the addition of calcium lignosulfonate, which was able to achieve a simultaneous yield enhancement of the three high-value products in mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum*, providing a new technical support for improving the large-scale cultivation efficiency and application value of *Phaeodactylum tricornutum*.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, calcium lignosulphonate, marine resources, high-value utilization

收稿日期: 2022-08-31 修回日期: 2022-12-03

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金重点项目(2019B1515120002)。

* 通信作者: 魏东(1966—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业生物技术研究。E-mail: fewd304@scut.edu.cn

硅藻是海洋中光合效率最高的生物类群^[1]。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是海洋硅藻的模式生物,具有生长快、适应性强和高值产物含量高特点。细胞内含有多种生物活性物质,主要包括 Fx、EPA 和 Chrl 等。其中 Fx 具有抗氧化、抗肿瘤、减肥、调节血糖和血脂等多种生物活性^[2];EPA 能够有效改善心血管功能,有利于神经元和免疫功能的发育^[3];Chrl 具有抗氧化、抗肿瘤、降低血糖、血脂以及提升机体免疫力等功能^[4]。因此,三角褐指藻及其高值产物可用作水产生物饵料^[5]、食品补充剂、保健食品和药物原料^[6]等,在功能食品、药品和化妆品等领域都具有重要应用前景和商业价值。据报道,三角褐指藻中 Fx、EPA 和 Chrl 的最高质量分数分别可达 5.90%、11.58%和 25.60%,被认为是生产藻基 Fx、EPA 和 Chrl 的最好来源之一^[7]。目前三角褐指藻规模化自养培养存在藻细胞密度低、生物量低、培养周期长且易受到生物污染的技术瓶颈。与自养培养相比,兼养培养可显著促进细胞生长并提高生物量^[8-9],同时促进 Fx^[8-9]、EPA^[7]和 Chrl^[10]的积累。但由于 Fx 和 EPA 的合成与 Chrl 合成存在竞争碳前体的关系^[7],导致这 3 种高值产物难以同时积累。因此,急需开发有效技术手段,在兼养培养中同时提高 3 种高值产物的产率,以满足快速增长的市场需求。

多种植物激素如茉莉酸甲酯、脱落酸和水杨酸,能够有效促进三角褐指藻生长和脂质积累^[11]。在培养基中添加 2,4-表油菜素内酯(2,4-epibrassinolide, EBR)后,三角褐指藻的细胞密度、生物量、多糖、蛋白质和岩藻黄素均得到提升^[12]。但植物激素价格高,应用在规模化培养中可能导致高成本。木质素是高等植物细胞壁中一种交叉链接的酚聚合物,常以木质纤维素的形式存在。在纤维素实际生产中,木质素常以木质素磺酸盐的形式被去除^[13]。研究表明,木质素磺酸盐可作为类植物激素促进高等植物组织和细胞的生长、结果和根系发育^[14]。在自养的淡水纤裸藻(*Euglena gracilis*)培养基中添加 5 000 mg/L 木钙能显著促进细胞生长、扩大细胞横纵比和大小、提升高值天然产物的含量^[15]。然而,木钙对海洋硅藻的细胞生长和高值产物积累的作用效果鲜有报道。

以三角褐指藻为对象,系统研究兼养培养方式下木钙质量浓度对细胞密度、生物量和 3 种高值产物(Fx、EPA 和 Chrl)质量分数及产率的影响规律,

为实现三角褐指藻中生物量及 3 种高值产物的同步提高,以及木质素磺酸盐废物再利用提供了一种有效途径。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养基

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* CCMP 1327)由中国科学院水生生物研究所提供。藻种培养采用改良 f/2 培养基^[16],添加 0.1 mol/L 甘油和 0.02 mol/L 氮源(胰蛋白胍与尿素物质的量比为1:1)。培养温度 20 ℃,培养光强 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,在恒温光照培养箱的斜面上进行兼养培养,于 4 ℃ 冰箱中保存藻种。

1.2 试剂与仪器

岩藻黄素、十九烷酸标准品:美国 Sigma Aldrich 公司;酵母 β -1,3 葡聚糖标准品:北京百灵威科技有限公司;胰蛋白胍:广东环凯微生物科技有限公司;色谱纯试剂乙腈、叔丁基甲醚、甲醇,分析纯试剂甘油、尿素、木钙、丙酮:广州卯林仪器有限公司;DHZ-DA 型恒温光照摇床:太仓实验设备厂;GLZ-B 型光量子计:浙江托普仪器有限公司;AW442P4 流式细胞仪:美国贝克曼-库尔特公司;Modulyod 冷冻干燥机:美国热电公司;1260 型高效液相色谱仪、6890-5975 型气相色谱-质谱联用仪:美国安捷伦科技有限公司;Cytation5 型酶标仪:美国 Biotek 公司;Allegra 25R 型高速冷冻离心机:美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 种子液制备 从斜面上挑取三角褐指藻藻苔,接种至 100 mL 灭菌的改良 f/2 培养基中^[16],置于持续光照(暖白光)的恒温摇床中培养,在(20 \pm 1) ℃、光强(20 \pm 2) $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、160 r/min 下培养 10~12 d。

1.3.2 三角褐指藻的兼养培养 在 250 mL 三角瓶中加入种子液及 100 mL 无菌改良 f/2 培养基^[16],初始细胞密度为 1×10^7 个/mL。配制 500 mg/mL 的木钙母液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌后添加至三角瓶中,使木钙终质量浓度分别为 10、100、500、1 000、5 000 mg/L,以不添加木钙作为对照组。用 5 mol/L NaOH 调节 pH 为 8.0。培养条件同 1.3.1,每组设置 3 个平行。培养 12 d,隔 1 d 取样 2 mL,测定细胞密度、培养基中甘油质量浓度和生物量。培养结束后收集剩余藻液,以 8 000 r/min 离心 3 min,弃

上清液,洗涤沉淀,再离心得到藻泥,真空冷冻干燥后储存于-20℃冰箱用于后续分析。

在250 mL三角瓶中加入种子液及100 mL无菌改良*f/2*培养基。配制5 mg/mL木钙母液,经0.45 μm微孔滤膜过滤除菌后添加至三角瓶中,使木钙终质量浓度分别为2.5、5.0、10.0、20.0、50.0 mg/L,以不添加木钙作为对照组。其余检测步骤同上。

1.3.3 细胞密度测定 采用流式细胞仪测定细胞密度^[17]。平均比生长速率按公式(1)计算^[18]:

$$v = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

式中: v 为平均比生长速率, d^{-1} ; N_1 、 N_2 分别为 t_1 、 t_2 时的细胞密度,个/mL; t_1 、 t_2 分别为不同取样时间,d。

1.3.4 生物量和生物产率测定 采用烘干差重法^[19]测定并计算生物量。生物产率按公式(2)计算:

$$f = \frac{B_2 - B_1}{t_2 - t_1} \times 1000 \quad (2)$$

式中: f 为生物产率,mg/(L·d); B_1 、 B_2 分别为 t_1 、 t_2 时的生物量,g/L; t_1 、 t_2 分别为不同取样时间,d。

1.3.5 Fx 质量分数和产率测定 三角褐指藻中Fx的提取方法参考文献[20]。Fx采用高效液相色谱仪进行测定。采用YMC色谱柱(carotenoid column C₃₀柱,4.6 mm×150 mm,3 μm),柱温为25℃,进样量为10 μL,检测波长为440 nm,流动相的流量为0.80 mL/min。流动相采用甲醇(A)和叔丁基甲醚(B)进行梯度洗脱,洗脱条件为:0~6 min,A的体积分数为95%~80%,B的体积分数为5%~20%;6~12 min,A的体积分数为80%~60%,B的体积分数为20%~40%;12~19 min,A的体积分数60%~55%,B的体积分数为40%~45%;19~20 min,A的体积分数为55%~95%,B的体积分数为45%~5%;20~23 min,A的体积分数为95%,B的体积分数为5%。采用外标法,绘制Fx标准品的标准曲线,得到标准曲线回归方程: $y=0.0337x+23.405$, $R^2=0.9984$,式中 y 为Fx质量浓度,mg/L; x 为Fx对应的峰面积。对样品中的Fx进行定性和定量分析^[21]。Fx产率按公式(3)计算:

$$P_{Fx} = \frac{C_{Fx2} \times B_2 - C_{Fx1} \times B_1}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

式中: P_{Fx} 为Fx产率,mg/(L·d); C_{Fx1} 、 C_{Fx2} 分别为 t_1 、 t_2 时Fx的质量分数,mg/g; B_1 、 B_2 分别为 t_1 、 t_2 时的生物量,g/L; t_1 、 t_2 分别为不同取样时间,d。

1.3.6 EPA 质量分数和产率测定 EPA采用GC-MS测定^[22]。采用高效毛细管柱(DB-23,30 mm×0.25 mm,0.25 μm)。载气为高纯氦气,流量为1 mL/min,进样量为0.2 μL,分流比为5:1。程序升温条件为:初始柱温130℃保持3 min,以5℃/min升高到200℃,质荷比扫描范围为33~400。分别采用NIST05a谱库和内标法(C_{19:0})对EPA进行定性和定量分析。EPA产率按公式(4)计算:

$$P_{EPA} = \frac{C_{EPA2} \times B_2 - C_{EPA1} \times B_1}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

式中: P_{EPA} 为EPA产率,mg/(L·d); C_{EPA1} 、 C_{EPA2} 分别为 t_1 、 t_2 时EPA的质量分数,mg/g; B_1 、 B_2 分别为 t_1 、 t_2 时的生物量,g/L; t_1 、 t_2 分别为不同取样时间,d。

1.3.7 Chrl 质量分数和产率测定 Chrl的提取方法参考文献[23]。准确量取200 μL反应液于96孔板中,设置酶标仪的激发波长为398 nm,发射波长为502 nm,测定反应液荧光强度。采用β-1,3葡聚糖标准品制作标准曲线,得到标准曲线回归方程: $y=89.565x+4264.5$, $R^2=0.9895$,式中 y 为荧光强度; x 为酵母β-1,3-葡聚糖的质量浓度,mg/L。按公式(5)计算样品中金藻昆布多糖的质量分数和产率:

$$P_{Chrl} = \frac{C_{Chrl2} \times B_2 - C_{Chrl1} \times B_1}{t_2 - t_1} \quad (5)$$

式中: P_{Chrl} 为金藻昆布多糖的产率,mg/(L·d); C_{Chrl1} 、 C_{Chrl2} 分别为 t_1 、 t_2 时Chrl的质量分数,mg/g; B_1 、 B_2 分别为 t_1 、 t_2 时的生物量,g/L; t_1 、 t_2 分别为不同取样时间,d。

1.3.8 数据分析 采用Prism 9.0和SPSS软件对数据进行处理和统计学分析。实验数据均采用平均值±标准差表示。采用单因素方差分析和成对数据*t*检验进行显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

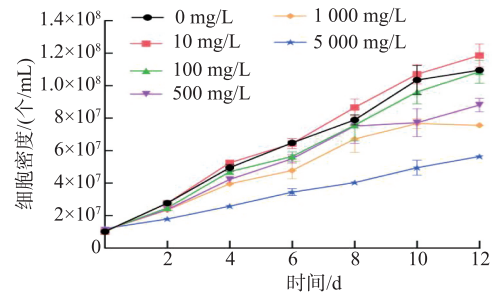
2 结果与分析

2.1 高质量浓度木钙对兼养三角褐指藻生长与3种高值产物的影响

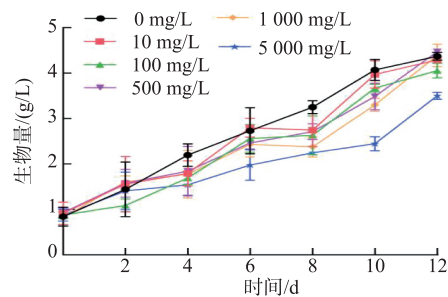
高质量浓度(10~5 000 mg/L)木钙对兼养三角褐指藻生长的影响见图1和表1。在培养第12天,随着木钙质量浓度升高,细胞密度呈现先升高后下降的趋势。木钙质量浓度为10 mg/L的处理组中,培养结束时细胞密度和平均比生长速率最大,分别为 1.19×10^8 个/mL和0.21 d^{-1} ,比对照组显著提升了11.36%和5.00% ($P<0.05$)。当木钙质量浓度超过

500 mg/L 时,细胞密度和平均比生长速率均显著下降 ($P<0.05$),在 500 mg/L 时生物量达到最大值,为 4.47 g/L,此时生物产率为 295.21 mg/(L·d),均与对照组无显著差异 ($P>0.05$)。另外,木钙质量浓度为 10 mg/L 时,甘油平均消耗速率达到最大值,为 0.21 g/(L·d),更高质量浓度的木钙没有使甘油平均消耗速率得到显著提高,说明木钙不能提高兼养三角褐指藻对于碳源的利用。研究表明,木钙能够短暂提高植物体内的生长激素,刺激细胞分裂与生长^[14]。该研究中使用 $(20\pm 2) \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的弱光。随着木钙质量浓度提高,培养液的棕褐色加深,具有较强的光遮蔽效应^[24],导致细胞难以在较高质量浓度木钙 ($>100 \text{ mg/L}$) 下获取足够光能,因此适当提高光强有利于降低遮蔽效应,促进兼养细胞正常生长。此外,高浓度的植物激素也会对细胞生长产生胁迫作用,如高浓度 EBR 会抑制藻细胞生长和天然高值产物(多糖、蛋白质和 Fx)积累^[12]。该研究中,当木钙质量浓度高于 500 mg/L 时,三角褐指藻的生长受到显著抑制,10 mg/L 木钙是促进三角褐指藻生长的最适质量浓度。

高质量浓度木钙对兼养三角褐指藻中 3 种高值产物质量分数和产率的影响见图 2 和表 2。随着木钙质量浓度提高, Fx 质量分数呈先下降后上升趋势,木钙质量浓度为 5 000 mg/L 时, Fx 质量分数达到最大值 (16.03 mg/g),比对照组显著提高了 46.52% ($P<0.05$)。此时 Fx 产率为 4.66 mg/(L·d),是对照组的 1.16 倍,但与 10 mg/L 处理组无显著差异。在微藻的自养生长中,生长激素的前体和类似物可以有效促进叶绿素和类胡萝卜素合成^[25]。而木钙可作为类植物激素^[15],有效提高胞内生长激素水平^[14]。值得注意的是, EPA 和 Fx 整体呈正相关,木钙质量浓度 5 000 mg/L 时, EPA 质量分数达到最大值,为 32.14 mg/g,是对照组的 1.13 倍。研究表明, Fx 和 EPA 尽管竞争碳前体,但在特定条件下(如高氮条件)仍可同步积累^[26]。由于高质量浓度木钙不利于生物量积累,在木钙质量浓度为 5 000 mg/L 时, EPA 产率仅为 9.35 mg/(L·d),显著低于对照组 10.10% ($P<0.05$)。尽管生物量受到显著抑制,但 Fx 产率仍能达到最大值。添加 10 mg/L 木钙时,生物量并未受到显著抑制,同时 Fx 质量分数仍显著提高 ($P<0.05$),并且与最大值无显著差异。 Chrl 质量分数和产率随木钙质量浓度增加呈现先上升后下降的趋势,在木钙质量浓度为 500 mg/L 时



(a) 高质量浓度木钙对兼养三角褐指藻细胞密度的影响



(b) 高质量浓度木钙对兼养三角褐指藻生物量的影响

图 1 高质量浓度木钙对兼养三角褐指藻细胞密度和生物量的影响

Fig. 1 Cell density and biomass concentration of mixotrophic *P. tricornutum* under high-dose concentration of calcium lignosulfonate

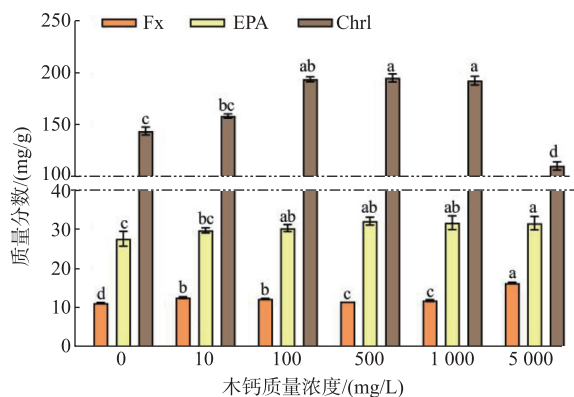
表 1 高质量浓度木钙对兼养三角褐指藻生长的影响

Table 1 Cell growth and glycerol consumption of mixotrophic *P. tricornutum* under high-dose concentration of calcium lignosulfonate

木钙质量浓度/(mg/L)	平均比生长速率/d ⁻¹	生物产率/(mg/(L·d))	甘油平均消耗速率/(g/(L·d))
0	0.20±0.00 ^b	283.91±08.13 ^{ab}	0.19±0.01 ^{ab}
10	0.21±0.00 ^a	281.32±18.86 ^{ab}	0.21±0.02 ^a
100	0.19±0.01 ^b	264.70±13.84 ^b	0.20±0.01 ^{ab}
500	0.17±0.00 ^c	295.21±10.78 ^a	0.18±0.00 ^b
1 000	0.16±0.00 ^d	297.00±12.76 ^a	0.16±0.01 ^c
5 000	0.13±0.00 ^e	218.64±12.71 ^c	0.16±0.02 ^c

注:同列中不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

达到最大值,分别为 196.31 mg/g 和 73.57 mg/(L·d),是对照组的 1.35 倍和 1.38 倍。由于 Fx、EPA 和 Chrl 相互竞争碳前体,在 5 000 mg/L 木钙质量浓度下, Fx 质量分数和产率的提高可能造成了 Chrl 质量分数和产率较低。研究表明,植物激素脱落酸可显著促进三角褐指藻胞内脂质积累,但是碳水化合物和蛋白质显著降低^[27],说明碳水化合物和脂质难以同步积累^[7,16]。该研究结果也进一步证实了木钙具有类似植物激素的功能。



不同字母表示同一产物对应的处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图2 高质量浓度木钙对三角褐指藻中高值产物质量分数的影响

Fig. 2 Contents of three high-value products in mixotrophic *P. tricornutum* under high-dose concentration of calcium lignosulfonate

表2 高质量浓度木钙对三角褐指藻中高值产物产率的影响
Table 2 Productivities of three high-value products in mixotrophic *P. tricornutum* under high dosage range of calcium lignosulfonate

木钙质量浓度/(mg/L)	产率/(mg/(L·d))		
	Fx	EPA	Chrl
0	4.01±0.12 ^c	10.40±0.04 ^b	53.36±1.90 ^c
10	4.41±0.04 ^{ab}	10.60±0.12 ^b	57.24±0.86 ^{bc}
100	4.04±0.13 ^c	10.20±0.24 ^b	65.37±3.01 ^{ab}
500	4.26±0.02 ^{bc}	11.64±0.11 ^a	73.57±0.62 ^a
1 000	4.30±0.16 ^{bc}	11.34±0.29 ^a	71.87±4.74 ^a
5 000	4.66±0.06 ^a	9.35±0.02 ^c	32.49±1.27 ^d

注: 同列中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

当木钙质量浓度超过 100 mg/L 时, 细胞密度和平均比生长速率的增长受到抑制。综合考虑生物量及 3 种高值产物的产率, 在高质量浓度范围内, 10 mg/L 木钙能够显著促进细胞生长及生物量积累, 同时获得较高的 3 种高值产物产率。因此需要进一步缩小小质量浓度范围以确定木钙最适质量浓度。

2.2 低质量浓度木钙对兼养三角褐指藻生长与 3 种高值产物的影响

由图 3 和表 3 可知, 低质量浓度木钙 (2.5~50.0 mg/L) 能显著提升细胞密度。在培养第 12 天, 木钙质量浓度为 20.0 mg/L 时, 细胞密度达到最大值 (1.04×10^8 个/mL), 平均比生长速率 (0.20 d^{-1}) 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。木钙质量浓度为 5.0 mg/L 时, 生物量和生物产率均达到最大值 (4.19 g/L 和

297.80 mg/(L·d)), 比对照组显著提高了 8.22% 和 10.48% ($P < 0.05$), 但此时甘油平均消耗速率并无显著差异。与高质量浓度范围相比, 低质量浓度范围内, 随着木钙质量浓度提高, 细胞密度和生物量均有提升, 这可能是由于低质量浓度木钙减弱了颜色导致的遮蔽效果^[24], 细胞能够获得充足的光能进行生长。同时, 研究表明低质量浓度的植物激素更有利于藻细胞生长^[12], 这与本研究中观察到的现象一致。与 20 mg/L 木钙相比, 10 mg/L 木钙处理时, 细胞密度、平均比生长速率和生物量并无显著差异。

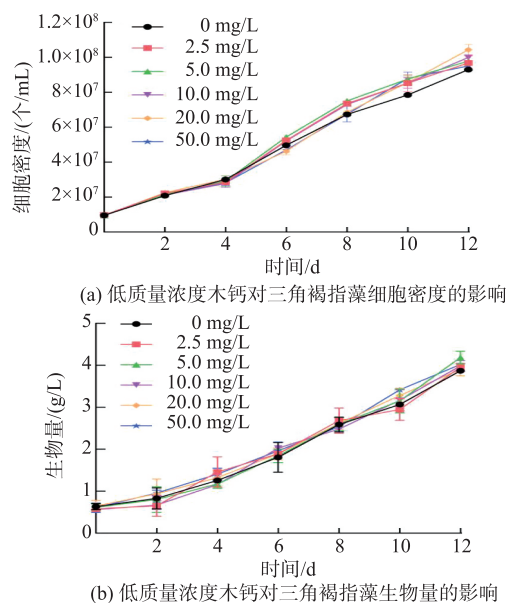


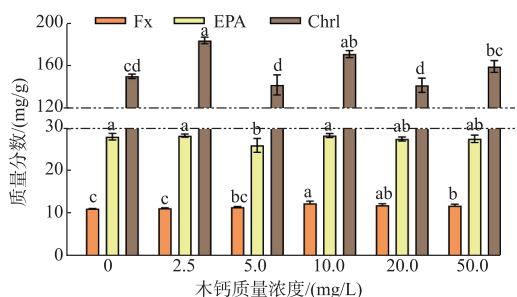
图3 低质量浓度木钙对三角褐指藻细胞密度和生物量的影响
Fig. 3 Cell density and biomass concentration of mixotrophic *P. tricornutum* under low-dose concentration of calcium lignosulfonate

表3 低质量浓度木钙对三角褐指藻生长的影响
Table 3 Mixotrophic *P. tricornutum* growth and glycerol consumption under low-dose concentration of calcium lignosulfonate

木钙质量浓度/(mg/L)	平均比生长速率/ d^{-1}	生物产率/(mg/(L·d))	甘油平均消耗速率/(g/(L·d))
0	0.19±0.00 ^d	269.54±07.01 ^b	0.22±0.00 ^{ab}
2.5	0.19±0.00 ^{cd}	281.18±07.27 ^b	0.21±0.02 ^b
5.0	0.20±0.00 ^{bc}	297.80±14.01 ^a	0.24±0.00 ^a
10.0	0.20±0.01 ^{ab}	285.43±05.08 ^b	0.22±0.01 ^{ab}
20.0	0.20±0.01 ^a	271.14±12.23 ^b	0.23±0.01 ^{ab}
50.0	0.19±0.00 ^{bcd}	284.71±08.79 ^{ab}	0.23±0.01 ^{ab}

注: 同列中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

低质量浓度木钙对兼养三角褐指藻中3种高值产物质量分数和产率的影响见图4和表4。



不同字母表示同一产物对应的处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。
图4 低质量浓度木钙对三角褐指藻中高值产物质量分数的影响

Fig. 4 Contents of three high-value products in mixotrophic *P. tricornutum* under low dosage range of calcium lignosulfonate

表4 低质量浓度木钙对三角褐指藻中高值产物产率的影响
Table 4 Productivities of high-value products in mixotrophic *P. tricornutum* under low dosage range of calcium lignosulfonate

木钙质量浓度/(mg/L)	产率/(mg/(L·d))		
	Fx	EPA	Chrl
0	3.59±0.06 ^c	9.06±0.28 ^a	47.53±0.17 ^{cd}
2.5	3.95±0.04 ^c	9.33±0.18 ^a	59.48±0.71 ^a
5.0	4.01±0.09 ^{ab}	9.08±0.25 ^a	48.21±3.47 ^{cd}
10.0	4.12±0.04 ^a	9.42±0.12 ^a	55.28±0.07 ^{ab}
20.0	3.88±0.13 ^b	8.95±0.19 ^a	44.50±0.91 ^d
50.0	4.05±0.03 ^{ab}	9.13±0.42 ^a	52.80±1.97 ^{bc}

同列中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

随着木钙质量浓度升高,Fx质量分数基本呈先上升后下降趋势。添加10 mg/L木钙时,Fx质量分数达到最大值(12.40 mg/g),比对照组显著提高了

11.51% ($P < 0.05$);此时Fx产率是对照组的1.15倍。有报道指出,海带提取物中的植物激素吲哚乙酸、吲哚甲醛和水杨酸可显著促进三角褐指藻中Fx积累^[28],与该研究结果类似。添加低质量浓度木钙有利于提高Fx质量分数,且EPA与Fx变化呈正相关。10 mg/L木钙处理时,EPA质量分数和产率达到最大值,分别为28.36 mg/g和9.42 mg/(L·d),但与对照组相比并无显著差异。添加低质量浓度木钙后,Chrl质量分数和产率呈现波动。2.5 mg/L时Chrl质量分数达到最大值(182.09 mg/g),比对照组显著提高22.72%;此时Chrl产率是对照组的1.25倍。研究表明,Fx、EPA和Chrl可以通过代谢流的调节进行相互转化。如EBR能够提高3-磷酸甘油醛脱氢酶的活性,从而加速卡尔文循环,提高光合作用,协同生长素、细胞分裂素等其他植物激素,在低质量浓度条件下有效提高三角褐指藻生物量、多糖、蛋白质和Fx水平^[12]。说明在特定植物激素作用下,多糖和Fx可同步积累,这与本研究的结果基本一致。

综合考虑添加成本、细胞生长及3种高值产物的同步积累情况,10 mg/L木钙是培养的最适质量浓度,能够显著提高细胞密度及生物量,同时获得较高的Fx、EPA和Chrl产率。

3 结语

通过系统比较高质量浓度范围(10~5 000 mg/L)和低质量浓度范围(2.5~50.0 mg/L)内木钙对兼养三角褐指藻生长和3种高值产物同步积累的影响规律,确定木钙最优质量浓度为10 mg/L,开发了兼养三角褐指藻的生物量及3种高值产物同步提高的创新方法,为木钙在海洋硅藻生产天然生物活性物质的应用提供技术支撑。

参考文献:

[1] THOMAS B, RAHUL V K, SEETJARAMAN V. *Phaeodactylum tricornutum*: a diatom cell factory[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(6): 606-622.

[2] DELBRUT A, ALBINA P, LAPIERRE T, et al. Fucoxanthin and polyunsaturated fatty acids co-extraction by a green process[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 874.

[3] SWANSON D, BLOCK R, MOUSA S A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life[J]. *Advances in Nutrition*, 2012, 3(1): 1-7.

[4] YANG Y F, LI D W, CHEN T T, et al. Overproduction of bioactive algal chrysolaminarin by the critical carbon flux regulator phosphoglucomutase[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(3): e1800220.

[5] SHI C, DONG S L, LI J W, et al. The concentrating method of benthic diatom affects the growth of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and water quality[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(8): 4503-4511.

[6] REMMERS I M, MARTENS D E, WIJFFELS R H, et al. Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum*

- tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities[J]. **PLoS One**, 2017, 12(4): e0175630.
- [7] YANG R Q, 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.
- [8] CERÓN G M C, CAMACHO F G, MIRÓN A S, et al. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2006, 16(5): 689-694.
- [9] 张文源, 高保燕, 李爱芬, 等. 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 W Y, GAO B Y, LI A F, et al. 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)
- [10] VILLANOVA V, FORTUNATO A E, SINGH D, et al. Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2017, 372(1728): 20160404.
- [11] CHU J L, LI Y, CUI Y L, et al. The influences of phytohormones on triacylglycerol accumulation in an oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Journal of Applied Phycology**, 2019, 31(2): 1009-1019.
- [12] 王小飞, 张问, 王何瑜, 等. 2,4-表油菜素内酯对三角褐指藻生长及有机质积累的影响[J]. **植物生理学报**, 2015, 51(9): 1482-1488.
- WANG X F, ZHANG W, WANG H Y, et al. Effects of 2,4-epibrassinolide on *Phaeodactylum tricornutum* growth and organics accumulation[J]. **Plant Physiology Journal**, 2015, 51(9): 1482-1488. (in Chinese)
- [13] YAO D F, DONG S, WANG P X, et al. Robustness of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* for acetone-butanol-ethanol production; effects of lignocellulosic sugars and inhibitors[J]. **Fuel**, 2017, 208: 549-557.
- [14] KEVERS C, SOTERAS G, BACCOU J C, et al. Lignosulfonates: novel promoting additives for plant tissue cultures[J]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 1999, 35(5): 413-416.
- [15] ZHU J Y, WAKISAKA M. Application of lignosulfonate as the growth promotor for freshwater microalga *Euglena gracilis* to increase productivity of biomass and lipids[J]. **Fuel**, 2021, 283: 118920.
- [16] YANG R Q, WEI D. Improving fucoxanthin production in mixotrophic culture of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* by LED light shift and nitrogen supplementation[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, 8: 820.
- [17] FRADA M J, BURROWS E H, WYMAN K D, et al. Quantum requirements for growth and fatty acid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) in nitrogen replete and limited conditions[J]. **Journal of Phycology**, 2013, 49(2): 381-388.
- [18] XIA S, WAN L L, LI A F, et al. Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*[J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 2013, 31(6): 1163-1173.
- [19] WANG H, ZHANG Y, CHEN L, et al. 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.
- [20] WOO M N, JEON S M, KIM H J, et al. Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice[J]. **Chemico-Biological Interactions**, 2010, 186(3): 316-322.
- [21] 宋培钦, 刘鹭, 魏东. 三角褐指藻跑道池规模化培养及岩藻黄素积累条件的优化[J]. **现代食品科技**, 2018, 34(4): 150-158.
- SONG P Q, LIU L, WEI D. Scaling-up cultivation of *Phaeodactylum tricornutum* in open raceway pond and optimization of the culture conditions for fucoxanthin accumulation[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2018, 34(4): 150-158. (in Chinese)
- [22] 刘鹭. 微藻-酵母相互作用机制的多组学分析及强化单细胞油脂生产研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [23] 王珊. 三角褐指藻金藻昆布多糖快速检测和光发酵生产关键技术研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [24] SCHWAB F, BUCHELI T D, LUKHELE L P, et al. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration?[J]. **Environmental Science & Technology**, 2011, 45(14): 6136-6144.
- [25] CZERPAK R, BAJGUZ A, BIALECKA B, et al. Effect of auxin precursors and chemical analogues on the growth and chemical composition in *Chlorella pyrenoidosa* Chick[J]. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 2014, 63(3): 279-286.
- [26] GAO B Y, CHEN A L, ZHANG W Y, et al. Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions[J]. **Journal of Ocean University of China**, 2017, 16(5): 916-924.
- [27] ZHANG H Y, YIN W H, MA D, et al. Phytohormone supplementation significantly increases fatty acid content of *Phaeodactylum tricornutum* in two-phase culture[J]. **Journal of Applied Phycology**, 2021, 33(1): 13-23.
- [28] WANG Z P, WANG P K, MA Y, et al. *Laminaria japonica* hydrolysate promotes fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Bioresource Technology**, 2022, 344(Pt A): 126117.

(责任编辑: 史润东东)