

碳氮源优化提高兼养三角褐指藻生物量和岩藻黄素产量

王 珊, 杨润青, 宋培钦, 魏 东*

(华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 岩藻黄素(Fucoxanthin)是一种参与海洋藻类光合作用的类胡萝卜素,具有抗氧化、抗癌、抗肥胖和抗糖尿病等多种功效,作为生物医药和功能性食品具有重要应用价值。海洋硅藻三角褐指藻含有高含量岩藻黄素,被认为是褐藻之外的藻基岩藻黄素的新来源。为提高岩藻黄素产量,作者以三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerum* CCMP2561)为研究对象,系统评价了兼养(光发酵)条件下有机碳源、氮源种类和浓度对其生物量和岩藻黄素产量的影响,筛选出最优碳氮源组合为0.10 mol/L甘油和含氮量为0.02 mol/L的胰蛋白胍与尿素(浓度比1:1)混合氮源。采用此优化组合,在光照强度2 000 lx、培养温度20 ℃、摇床转速150 r/min条件下,可获得三角褐指藻生物量、岩藻黄素质量分数和产量最大值,分别为3.94 g/L、20.83 mg/g和81.97 mg/L,是优化前的3.15倍、11.64倍和36.59倍。本研究开发的优化兼养培养基和培养策略,为显著提高三角褐指藻岩藻黄素产量提供了实用新技术。

关键词: 三角褐指藻;兼养;甘油;氮源;岩藻黄素

中图分类号:Q 920.1 文章编号:1673-1689(2021)10-0082-09 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2021.10.011

Improving Production of Biomass and Fucoxanthin in Mixotrophic *Phaeodactylum tricornerum* by Optimization of Carbon and Nitrogen Sources

WANG Shan, YANG Runqing, SONG Peiqin, WEI Dong*

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

Abstract: Fucoxanthin is a kind of carotenoids that participates in the photosynthesis of marine algae and has multiple functions such as anti-oxidation, anti-cancer, anti-obesity and anti-diabetes, showing important applications value as the biological medicine and functional food. Marine diatom *Phaeodactylum tricornerum* has high content of fucoxanthin, which is considered as a new source of algae-based fucoxanthin besides brown seaweed. Aiming to improve the fucoxanthin production, *P. tricornerum* CCMP2561 was applied in this study to systematically evaluate the effects of organic carbon, nitrogen sources and their concentrations on the cell growth and fucoxanthin production under mixotrophic (photo fermentation) conditions. The optimal combination of carbon and nitrogen source was 0.10 mol/L of glycerol, 0.02 mol/L of total nitrogen mixed by tryptone and urea (1:1). Under this optimal combination, the maximum biomass concentration, fucoxanthin content and yield

收稿日期:2020-07-29

基金项目:广东省公益研究与能力建设项目(2015A020216003)。

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

were achieved at 3.94 g/L, 20.83 mg/g and 81.97 mg/L in *P. tricornutum* respectively, which were 3.15, 11.64, and 36.59 times to those before optimization under 2 000 lx of light intensity, 20 °C of culture temperature and 150 r/min of shaking speed. The optimal medium and approach for mixotrophic cultivation developed in this study could provide a newly practical technology for significant enhancement of fucoxanthin production in *P. tricornutum*.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, mixotrophic culture, glycerol, nitrogen source, fucoxanthin

岩藻黄素(fucoxanthin)是一种广泛存在于大型褐藻、硅藻和金藻等海洋藻类中的类胡萝卜素,具有抗氧化、抗肿瘤、减肥、预防阿兹海默症、调节血糖和血脂等多种生物活性^[1],在生物医药、功能性食品等领域具有重要应用价值。目前,岩藻黄素的主要商业来源是从海带等大型褐藻中提取,提取物中岩藻黄素含量低、生产成本低、藻油稳定性差、生产受季节性局限等固有缺陷,无法满足快速增长的国际市场需求。

海洋硅藻作为海洋生态系统中重要的初级生产者,其胞内岩藻黄素的含量是大型褐藻的上百倍^[2],被认为是藻基岩藻黄素的新来源。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种生长快、适应性强的海洋硅藻,可进行利用 CO₂ 的光合自养生长,也可利用外源有机碳氮源(甘油、醋酸钠、蛋白胨、尿素等)进行兼养(光发酵)生长^[3]。研究发现,与其它有机碳源(如葡萄糖、果糖、甘露糖等)相比,以甘油为有机碳源兼养培养三角褐指藻可以获得最大生物量和色素含量^[4]。在半连续补料模式下,以 0.14 mol/L 甘油为碳源对三角褐指藻进行兼养培养,生物量产率最高可达 1.50 g/(L·d);在分批补料模式下,添加 0.10 mol/L 甘油时胞内类胡萝卜素含量达到最高,约占干质量的 0.45%^[4]。与自养相比,以甘油为有机碳源的兼养培养可显著提高三角褐指藻的生物量,但胞内类胡萝卜素含量普遍偏低,其中岩藻黄素的含量更低^[5],亟须开发有效手段在兼养培养中提高岩藻黄素的含量。

岩藻黄素是海洋硅藻的重要捕光色素,它与蛋白质和叶绿素组成 FCP 复合物,共同存在于光合膜系统^[6]。氮素是海洋硅藻中参与蛋白质和叶绿素合成的重要营养元素,尿素循环在硅藻氮代谢途径中至关重要^[7]。三角褐指藻可利用多种氮源进行快速生长并积累岩藻黄素。有研究发现,尿素可显著促进三角褐指藻生物量积累,但对岩藻黄素积累无显

著促进作用^[8]。以云杉水解物(葡萄糖质量浓度达 2.00 g/L)为碳源、酵母提取物(总氮质量分数为 11.60%)为氮源培养三角褐指藻,可获得最大生物量和岩藻黄素产量分别为 3.31 g/L 和 0.52 mg/L^[9]。另有研究^[10]发现,在 f/2 培养基中添加 10 倍的硝酸钠培养三角褐指藻,可获得最高岩藻黄素质量分数为 59.20 mg/g。转录组学分析发现,在氮充足条件下多数编码岩藻黄素合成的基因会被上调,从而促进岩藻黄素的积累^[11]。因此,充足的氮源浓度与合适的氮源种类是促进三角褐指藻中岩藻黄素积累的必要条件。

目前对于三角褐指藻兼养培养的研究大多集中在油脂生产方面,关于兼养条件下岩藻黄素的高效生产的报道极少。作者以三角褐指藻为研究对象,系统研究兼养条件下有机碳源(甘油)浓度、氮源种类及浓度对细胞生长、生物量和岩藻黄素积累的影响,筛选获得优化兼养培养基和培养策略,为利用三角褐指藻高效生产岩藻黄素提供新技术支撑。

1 材料与方法

1.1 藻种与培养基

三角褐指藻藻株 CCMP 2561 由中国科学院水生生物研究所胡哈华研究员惠赠。藻种用 f/2 人工海水培养基^[12],在恒温光照培养箱(温度:20 °C,光照强度:2 000 lx)中进行斜面培养,于 4 °C 冰箱中保存。

1.2 试剂与仪器

岩藻黄素标准品:购于美国 Sigma 公司;胰蛋白胨:购于广东环凯微生物科技有限公司;总氮试剂:购于美国 HACH 公司;乙腈、叔丁基甲醚、甲醇:色谱纯,购于广州卯林仪器有限公司;甘油、尿素、硝酸钠、丙酮等:均为分析纯,购于广州卯林仪器有限公司;1339R 型光照强度测定仪:购于台湾泰仕电子工业股份有限公司;DRB200 型消解器:购于美国

HACH 公司;BD Accuri C6 型流式细胞仪:购于美国 Beckman Coulter 公司;Modulyod 冷冻干燥机:购于美国热电公司;6890-5975 型气相质谱联用仪:购于美国安捷伦科技有限公司;TDL-4013 型高速离心机:购于上海安享科学仪器厂。

1.3 研究方法

表 1 改良的 f/2 培养基组成

Table 1 Composition of modified f/2 medium

成分	质量 (1 L)	成分	质量 (1 L)
海盐	20.00 g	NaNO ₃	75.00 mg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	10.00 mg	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30.00 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15 mg	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.80 μg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.30 μg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.00 μg	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.00 μg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.00 μg	Thiamine HCl (VB ₁)	200.00 μg
Biotin (VH)	1.00 μg	Cyanocobalamin (VB ₁₂)	1.00 μg

1.3.2 甘油浓度对三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数及产量的影响 将培养好的三角褐指藻种子液转接至新的 f/2 培养基,以硝酸钠为氮源(含氮量 0.01 mol/L),加入不同浓度甘油为有机碳源,浓度分别设置为 0、0.05、0.10、0.15 mol/L。控制初始细胞密度为 1×10^6 个/mL,调节 pH 8.0,每组 3 个平行样,在恒温光照摇床中培养,培养温度为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,冷白日光灯光照强度为 $(2\ 000 \pm 500)$ lx,转速 150 r/min,培养 10 d。每两天取样,测定三角褐指藻细胞密度。培养结束时测定其生物量和岩藻黄素质量分数与产量。所有实验结束后收集剩余藻液,并于 5 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,将藻泥进行真空冷冻干燥以获得藻粉,藻粉于 -20°C 冰箱中储存作后续分析检测使用。

1.3.3 氮源种类对兼养三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数及产量的影响 将培养好的三角褐指藻种子液转接至新的无氮 f/2 培养基,以 0.10 mol/L 甘油为碳源,分别加入不同种类的氮源(硝酸钠 0.85 g/L、尿素 0.30 g/L、胰蛋白胨 1.17 g/L),使总氮浓度均为 0.01 mol/L。其余培养条件和分析测试同 1.3.2。

1.3.4 胰蛋白胨浓度对兼养三角褐指藻生长及岩藻黄素质量分数及产量的影响 将培养好的三角褐指藻种子液转接至新的无氮 f/2 培养基,以 0.10 mol/L 甘油为碳源,分别加入不同质量浓度胰

1.3.1 种子液制备 从改良的 f/2 培养基(表 1)^[13]斜面上挑取三角褐指藻藻苔,接种至含有已灭菌改良的 f/2 培养基的 250 mL 三角瓶中,装液量为 100 mL,置于持续光照的恒温摇床中培养,培养温度为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,冷白日光灯光照强度为 $(2\ 000 \pm 500)$ lx,摇床转速为 150 r/min,培养 10 d。

蛋白胨(0.58、1.17、1.75、2.33 g/L)为氮源,使含氮量分别达到 0.005、0.010、0.015、0.020 mol/L,其余培养条件和分析测试同 1.3.2。

1.3.5 混合氮源对兼养三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数及产量的影响 将培养好的三角褐指藻种子液转接至新的无氮 f/2 培养基,以 0.10 mol/L 甘油为碳源,加入不同种类氮源,分别设置纯胰蛋白胨(2.33 g/L)、胰蛋白胨:尿素(1.17 g/L 和 0.30 g/L,含氮量 1:1)、胰蛋白胨:硝酸钠(1.17 g/L 和 0.85 g/L,含氮量 1:1)。混合氮源按等摩尔含氮量 1:1 进行混合,总氮浓度为 0.02 mol/L,其余培养条件和分析测试同 1.3.2。

1.4 分析测试

1.4.1 细胞密度 采用流式细胞仪进行细胞密度测定。吸取 2 mL 三角褐指藻培养液于 2 mL 离心管中离心,去除上清液,用超纯水洗涤、重悬至上机浓度(约 1×10^6 个/mL~ 5×10^6 个/mL),经 300 目尼龙筛绢过滤后上流式细胞仪进行细胞密度绝对计数^[14]。

1.4.2 生物量 采用烘干差重法测定生物量。测量已烘至恒质量的离心管质量,记为空管质量 M_1 。吸取 2 mL 藻液于该离心管中,8 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,蒸馏水洗涤离心两次后将藻泥置于烘箱中,80 $^\circ\text{C}$ 烘干至恒质量,测定并记录总质量 M_2 。每个样品设置 3 个平行,取平均值并计算标准差^[15]。

1.4.3 比生长速率 以生物量计算比生长速率 μ (d^{-1})^[6],比生长速率计算公式如下:

$$\mu = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

式中: W_2 、 W_1 分别是在 t_2 、 t_1 时测定的生物量, g/L。

1.4.4 培养基总氮质量浓度 培养基总氮质量浓度采用哈希 DR2700 分光光度计测定^[7], 配套试剂为 No. 2714100。取待测培养基上清液, 稀释质量浓度至总氮为 2~150 mg/L, 加入配套试剂后在消解器 DRB200 上 105 °C 消解 30 min。消解完成后冷却至室温, 加入粉剂包 (TNA、TNB) 反应 5 min 后, 用分光光度计 DR2700 进行测定, 直接读出总氮质量浓度。

1.4.5 岩藻黄素质量分数 将准确称量的藻粉 10 mg 装入有陶瓷珠的冻存管中, 加入事先预冷的提取溶剂 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{丙酮}}=1:1$), 用量为 1 mL/次, 冻存管在细胞破碎振荡器上振荡 30 s, 用液氮浸提 5 min, 离心收集上清液于 15 mL 离心管中, 多次反复提取直至藻粉变成白色^[8]。合并所有上清液, 在通风橱内用氮气流将离心管内有机溶剂吹干, 用甲醇和叔丁基甲醚 (MTBE) 混合液 (体积比 1:1, 含质量分数 0.1% BHT) 准确定容至 1 mL, 用于岩藻黄素的 HPLC 分析, 全程在无光或弱光条件下进行。

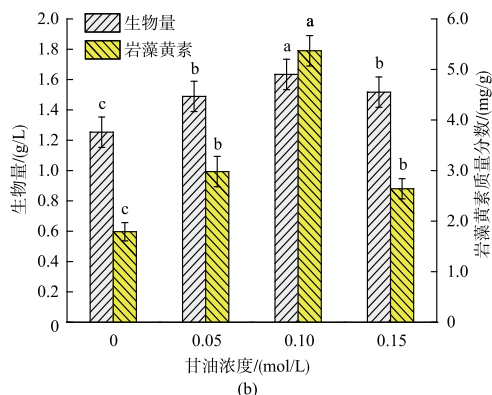
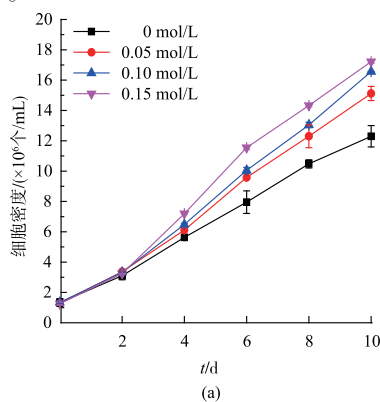
岩藻黄素采用 HPLC 测定 (HPLC 系统采用 Waters 双 1525 泵和 2996 二极管阵列检测器); 采用 YMC 色谱柱 (Carotenoid column C 30 柱, 4.6 mm×150 mm, 3 μ m); 流动相流速为 0.80 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μ L。PDA 检测器上设置检测波长为 440 nm, 测定岩藻黄素质量分数。流动相由甲醇 (A) 和叔丁基甲醚 MTBE (B) 进行梯度洗脱, 洗脱条件为: 0~6 min, 95%→80% A, 5%→20% B; 6~12 min, 80%→60% A, 20%→40% B; 12~19 min, 60%→55% A, 40%→45% B; 19~20 min, 55%→95% A, 45%→5% B; 20~23 min, 95% A, 5% B。以岩藻黄素标准品的保留时间和可见光特征吸收光谱进行定性, 外标法标准曲线对色谱图中岩藻黄素峰进行定量分析^[3], 计算藻粉中的岩藻黄素质量分数 (mg/g)。

1.4.6 数据分析 采用 Origin 9.0 和 SPSS 软件对数据进行处理和统计学分析, 所有实验数据均采用平均值±标准误差 (mean±SD) 表示。采用单因素方差分析法和成对数据 t -检验进行显著性检验分析, 不同字母之间表示显著性差异 ($P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 甘油浓度对三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数与产量的影响

甘油浓度对三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数的影响见图 1。由图 1 可知, 与自养培养 (甘油为 0 mol/L) 相比, 添加甘油浓度为 0.05、0.10、0.15 mol/L, 可显著提高三角褐指藻的细胞密度 ($P<0.05$)。培养结束时, 0.15 mol/L 甘油条件下细胞密度及比生长速率达到最大值, 分别为 1.72×10^8 个/mL 和 $0.26 d^{-1}$, 是自养的 1.35 倍和 1.18 倍 ($P<0.05$), 见表 2。如图 1 所示, 随着甘油浓度的增加, 藻细胞的生物量和岩藻黄素质量分数均呈现出先升高、后下降的变化趋势。在 0.10 mol/L 甘油浓度下, 生物量和产率、岩藻黄素质量分数和产量分别达到最高值, 比自养分别提高了 30.40%、43.49%、200.00% 和 291.52%。



不同字母 a、b、c 之间表示显著性差异 $P<0.05$ 。

图 1 甘油浓度对三角褐指藻细胞密度、生物量和岩藻黄素质量分数的影响

Fig. 1 Effects of glycerol concentrations on the cell density, biomass concentration and fucoxanthin content in *P. tricornutum*

表 2 甘油浓度对三角褐指藻生产性能的影响

Table 2 Production capability of *P. tricornutum* under different glycerol concentrations

甘油浓度/ (mol/L)	平均比生长速 率/d ⁻¹	生物量产率/ (mg/(L·d))	岩藻黄素产量/ (mg/L)
0	0.22±0.01 ^b	85.30±1.06 ^c	2.24±0.01 ^c
0.05	0.24±0.01 ^a	109.90±2.61 ^b	4.44±0.03 ^b
0.10	0.25±0.01 ^a	122.40±2.96 ^a	8.77±0.15 ^a
0.15	0.26±0.01 ^a	113.70±2.55 ^b	4.00±0.02 ^b

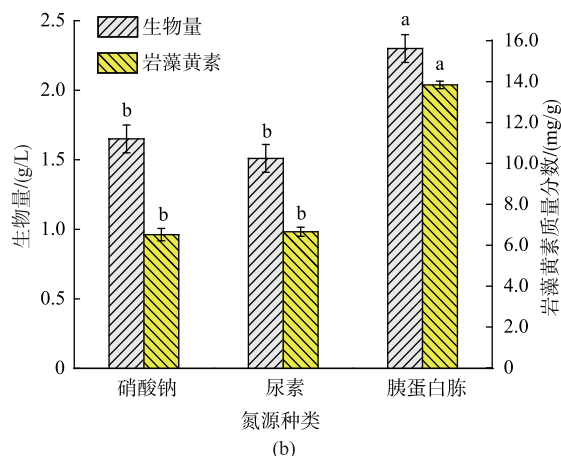
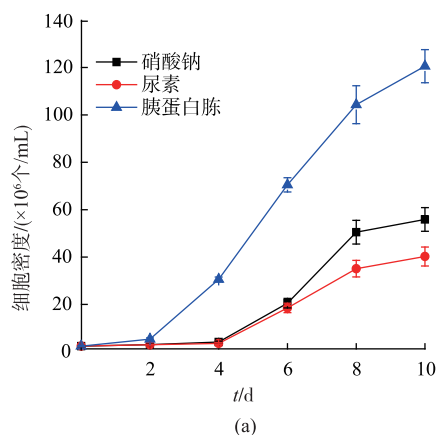
注:不同字母 a、b、c 之间表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

Ceron Garcia 等人利用 0.10 mol/L 甘油培养三角褐指藻,可以获得最大的生物量产率为 168.96 mg/(L·d),是自养条件下的 7 倍^[5]。Liu 等人发现三角褐指藻在 0.10 mol/L 甘油的平均比生长速率和生物量分别是光自养条件下的 1.64 倍和 1.60 倍^[3],均与本实验结果类似。通过同位素标记法,利用¹³C-甘油研究三角褐指藻中甘油的代谢途径,发现甘油通过消耗光合磷酸化产生的 ATP 代谢为磷酸二羟丙酮(DHAP)和 3-磷酸甘油醛(GAP),并进入卡尔文循环参与中心碳代谢^[9]。这表明在兼养条件下,三角褐指藻可以通过质体和线粒体之间广泛的能量交换将呼吸作用和光合作用耦合在一起,从而驱动三角褐指藻中 CO₂ 和有机碳的同化^[19-20]。研究还发现,在混养条件下,胞内 50% 氨基酸合成的碳骨架来源于甘油代谢^[9],这可能导致了蛋白质的高效积累,从而促进岩藻黄素合成。本研究结果表明,选取甘油浓度为 0.10 mol/L 为最适甘油浓度,可促进三角褐指藻的生长和提高岩藻黄素的产量。

2.2 氮源种类对兼养三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数与产量的影响

不同种类氮源对兼养三角褐指藻的细胞生长和岩藻黄素质量分数与产量的影响见图 2。由图 2 (a)可知,相对于等摩尔氮素的硝酸钠和尿素,细胞利用胰蛋白胨进行生长的延滞期缩短了 2 d。培养结束时细胞密度达到最大值,为 1.21×10^8 个/mL,分别是硝酸钠和尿素为氮源时的 2.16 倍 3.00 倍 ($P < 0.05$)。同时,平均比生长速率为 0.39 d^{-1} ,显著高于硝酸钠和尿素为氮源时 ($P < 0.05$),见表 3。梁英等人发现,在自养条件下以尿素为氮源培养三角褐指藻,其平均比生长速率显著高于硝酸钠和氯化铵 ($P < 0.05$),这表明有机氮源可以显著促进三角褐指藻的生长^[21]。如图 2(b)和表 3 所示,胰蛋白胨为氮

源时,生物量和产率、岩藻黄素质量分数和产量都达到最高值,显著高于硝酸钠和尿素为氮源时 ($P < 0.05$)。



不同字母 a、b 之间表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

图 2 氮源种类对兼养三角褐指藻细胞密度、生物量和岩藻黄素质量分数的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on cell density, biomass concentration and fucoxanthin content in mixotrophic *P. tricornutum*

表 3 氮源种类对兼养三角褐指藻的生产性能的影响

Table 3 Production capability of mixotrophic *P. tricornutum* under different nitrogen sources

氮源种类	平均比生长速 率/d ⁻¹	生物量产率/ (mg/(L·d))	岩藻黄素产量/ (mg/L)
硝酸钠	0.31±0.01 ^b	160.70±1.56 ^b	9.14±0.34 ^b
尿素	0.28±0.01 ^b	146.60±2.12 ^c	8.57±0.45 ^b
胰蛋白胨	0.39±0.01 ^a	224.40±2.26 ^a	29.58±0.78 ^a

注:不同字母 a、b、c 之间表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

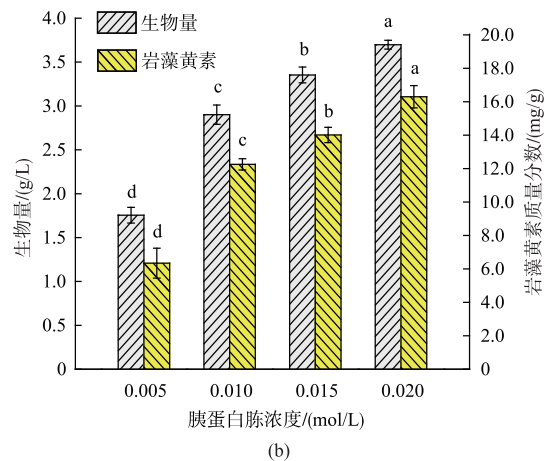
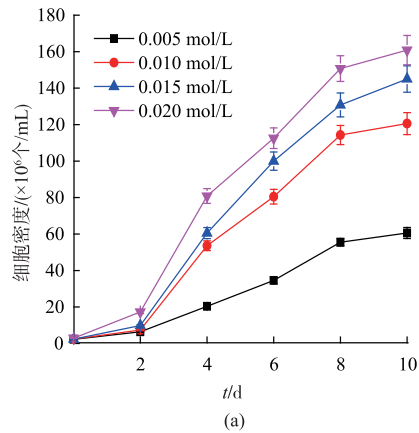
张文源等人发现在自养条件下以尿素为氮源时,三角褐指藻的生物量显著高于硝酸钠条件下,但岩藻黄素质量分数无显著性差异^[8]。有研究表明,微藻细胞在相同条件下吸收利用尿素所需的能量消耗比硝酸盐更少,因此尿素可显著促进三角褐指藻的生物量积累^[7]。三角褐指藻在尿素条件下的生物量与硝酸钠无显著性差异,见图 2(b)。这可能是因为在兼养条件下以甘油为碳源时,三角褐指藻细胞通过甘油代谢产生大量的 ATP 和 NADPH,为硝酸盐的转化提供能量与还原力,从而促进了三角褐指藻对硝酸根的吸收,导致尿素作为有机氮源的优势并不明显。同时,岩藻黄素质量分数在硝酸钠和尿素条件下无显著性差异,与文献报道一致。研究中还发现,三角褐指藻更倾向于利用胰蛋白胨中的游离氨基酸,可以促进细胞快速生长和岩藻黄素积累。因此,确定胰蛋白胨为最适宜三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的氮源种类。

2.3 胰蛋白胨浓度对兼养三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数和产量的影响

胰蛋白胨浓度对兼养三角褐指藻的生长和岩藻黄素质量分数与产量的影响见图 3。由图 3(a)可知,细胞密度随着胰蛋白胨浓度升高而提高。培养结束时,在 0.02 mol/L 胰蛋白胨浓度下细胞密度达到最大值,为 1.61×10^8 个/mL,显著高于其他浓度 ($P < 0.05$)。如图 3(b)所示,随着胰蛋白胨浓度的提高,生物量和岩藻黄素质量分数也随之增加。在 0.02 mol/L 胰蛋白胨条件下,生物量和产率、岩藻黄素质量分数和产量均达到最大值,见图 3(b)和表 4。与低浓度胰蛋白胨 (0.005 mol/L) 相比,分别提高了 110.71%、112.50%、156.89% 和 441.11%。因此,提高胰蛋白胨浓度能够显著促进三角褐指藻的生物量和岩藻黄素产量。

与本研究结果类似,以高质量浓度硝酸钠 (64.29 mg/L) 为氮源培养三角褐指藻获得的生物量产率是低质量浓度硝酸钠 (32.09 mg/L) 的 1.44 倍^[22];在高氮 (300 mg/L 硝酸钠) 时三角褐指藻的生物量和岩藻黄素质量分数是低氮 (75 mg/L 硝酸钠) 下的 1.75 倍和 1.30 倍^[15]。转录组学研究发现,在缺氮条件下,大多数氨基酸的合成途径及编码色素合成的基因均受到抑制,导致胞内叶绿素 a 和岩藻黄素质量分数降低^[11],这说明充足的氮是三角褐指藻生物量及岩藻黄素快速积累的必要条件。因此,确定

0.020 mol/L 胰蛋白胨是最适宜三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的氮源浓度。



不同字母 a、b、c、d 之间表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

图 3 胰蛋白胨浓度对兼养三角褐指藻细胞密度、生物量和岩藻黄素质量分数影响

Fig. 3 Effects of tryptone concentrations on the cell density, biomass concentration and fucoxanthin content in mixotrophic *P. tricornutum*

表 4 不同胰蛋白胨浓度对兼养三角褐指藻生产性能的影响
Table 4 Production capability of mixotrophic *P. tricornutum* under different tryptone concentrations

胰蛋白胨浓度/(mol/L)	平均比生长速率/ d^{-1}	生物量产率/($mg/(L \cdot d)$)	岩藻黄素产量/(mg/L)
0.005	0.37 ± 0.01^c	171.20 ± 1.98^d	11.14 ± 1.36^d
0.010	0.39 ± 0.01^b	284.40 ± 2.55^c	35.54 ± 0.95^c
0.015	0.42 ± 0.01^a	330.50 ± 2.26^b	46.99 ± 1.05^b
0.020	0.42 ± 0.01^a	363.80 ± 2.12^a	60.28 ± 2.21^a

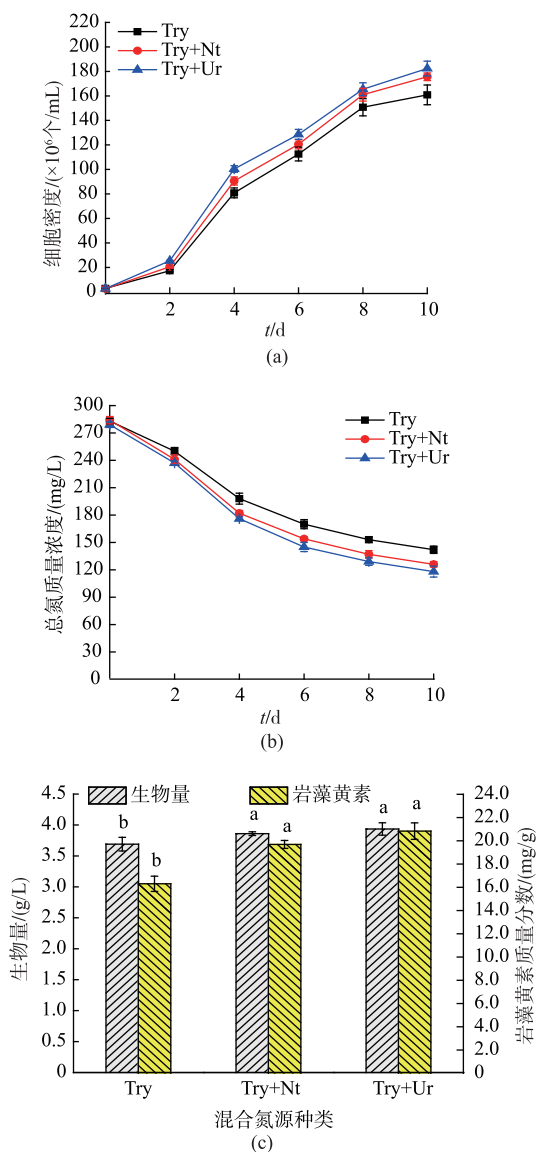
注:不同字母 a、b、c、d 之间表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.4 混合氮源对兼养三角褐指藻生长和岩藻黄素质量分数与产量的影响

混合氮源对兼养三角褐指藻的生长和岩藻黄素质量分数与产量的影响见图4。由图4(a)可知,在使用胰蛋白胨与尿素为混合氮源下,细胞密度在培养第10天时达到最大值,为 1.82×10^8 个/mL,是纯胰蛋白胨条件下细胞密度的1.13倍($P < 0.05$)。平均比生长速率在不同氮源下无显著性差异,见表4。以胰蛋白胨和尿素为混合氮源时,三角褐指藻的总氮消耗速率为 $16.10 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$,是以纯胰蛋白胨为氮源时的1.14倍($P < 0.05$),但与胰蛋白胨和硝酸钠为混合氮源条件下无显著性差异,见表5。三角褐指藻的生物量和岩藻黄素质量分数在两组混合氮源条件下无显著差异,但均显著高于纯胰蛋白胨($P < 0.05$)。在胰蛋白胨与硝酸钠和尿素为混合氮源条件下,三角褐指藻的生物量、生物量产率、岩藻黄素质量分数和产量分别达到 3.94 g/L 、 $389.52 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{d})$ 、 20.83 mg/g 和 81.97 mg/L ,分别是使用纯胰蛋白胨时的1.07倍、1.36倍、1.28倍和1.08倍,见表5。结果表明,三角褐指藻细胞在混合氮源下的生长状况优于单一氮源组,可能是在纯胰蛋白胨条件下培养过程中产生的胞外分泌物抑制了细胞的生长积累。已有研究报道,使用混合氮源培养微藻较单一氮源培养微藻,对微藻的生长和生物量的积累有更好的效果^[23]。王菊芳等人^[24]的研究表明,与单一氮源相比,以蛋白胨和硝酸钾为混合氮源培养隐甲藻可以获得最大的生物量,这与本研究结果类似。因此,以胰蛋白胨和尿素为混合氮源获得的三角褐指藻生物量和岩藻黄素产量最高,可作为三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的最适混合氮源。

目前,三角褐指藻在混养培养方式下,以 0.10 mol/L 甘油、 0.01 mol/L 尿素为初始碳氮源进行分批补料培养,可获得最高的生物量为 15.40 g/L ,是目前报道中最高的生物量,但该条件下获得的类胡萝卜素只占干质量的 0.49% ^[25]。本研究通过对三角褐指藻混养体系中的碳氮源进行优化,可显著提高三角褐指藻的生物量、岩藻黄素的质量分数和产量。结果表明,以 0.10 mol/L 的甘油为碳源、以含氮量 0.02 mol/L 的胰蛋白胨和尿素混合氮源(1:1)为氮源进行混养培养时,三角褐指藻获得的最终细胞密度、生物量、岩藻黄素质量分数和产量分别是 1.82×10^8 个/mL、 3.94 g/L 、 20.83 mg/g 和 81.97 mg/L ,分别

是优化前的14.80倍、3.15倍、11.64倍和36.59倍。同时,本实验中最优条件下三角褐指藻获得的岩藻黄素产量(81.97 mg/L)已经达到目前已报道的最高水平。



Try:胰蛋白胨;Nt:硝酸钠;Ur:尿素;Try+Nt:胰蛋白胨和硝酸钠按等摩尔含氮量1:1进行混合;Try+Ur:胰蛋白胨和尿素按等摩尔含氮量1:1进行混合。

图4 混合氮源对兼养三角褐指藻细胞密度、总氮浓度、生物量和岩藻黄素质量分数的影响

Fig. 4 Effects of mixed nitrogen sources on the cell density, total nitrogen concentration, biomass concentration and fucoxanthin content in mixotrophic *P. tricornutum*

表 5 不同氮源种类对兼养三角褐指藻生产性能的影响

Table 5 Production capability of mixotrophic *P.tricornutum* under different nitrogen sources

混合氮源	平均比生长速率/d ⁻¹	总氮消耗速率/(mg/(L·d))	生物量产率/(mg/(L·d))	岩藻黄素产量/(mg/L)
Try	0.40±0.01 ^a	14.10±0.28 ^b	363.20±3.39 ^b	60.15±0.61 ^c
Try+Nt	0.42±0.01 ^a	15.80±0.57 ^a	381.70±2.38 ^a	76.01±1.71 ^b
Try+Ur	0.43±0.01 ^a	16.10±0.28 ^a	389.52±3.28 ^a	81.97±1.91 ^a

注:不同字母 a、b、c 之间表示显著性差异, P<0.05。

3 结 语

通过系统比较和优化甘油浓度、氮源种类与浓度及其组合,确定了三角褐指藻生长的最佳兼养培养基配方和培养策略,极大提高了细胞生长速率、

生物量和岩藻黄素产量。采用建立的兼养条件(0.10 mol/L 甘油为碳源,含氮量 0.02 mol/L 的胰蛋白胍和尿素混合氮源(1:1)为氮源),获得的岩藻黄素产量(81.97 mg/L)是目前已知报道的最高水平,为后续规模化培养生产藻基岩藻黄素提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] DELBRUT A,ALBINA P,LAPIERRE T,et al. Fucoxanthin and polyunsaturated fatty acids co-extraction by a green process[J]. **Molecules**,2018,23(4):1-15.
- [2] GUO B,LIU B,YANG B,et al. Screening of diatom strains and characterization of cyclotella cryptica as a potential fucoxanthin producer[J]. **Marine Drugs**,2016,14(7):1-14.
- [3] LIU X,DUAN S,LI A,et al. Effects of organic carbon sources on growth,photosynthesis,and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Journal of Applied Phycology**,2009,21(2):239-246.
- [4] CERON-GARCIA M C,FERNANDEZ-SEVILLA J M,SANCHEZ-MIRON A,et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes[J]. **Bioresource Technology**,2013,147:569-576.
- [5] CERON GARCIA M C,CAMACHO F G,MIRON A S,et al. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources[J]. **Microbiology and Biotechnology**,2006,16(5):689-694.
- [6] GIOVAGNETTI V,RUBAN A V. Detachment of the fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein (FCP) antenna is not involved in the acclimative regulation of photoprotection in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2017,1858(3):218-230.
- [7] SMITH S R,DUPONT C L,MCCARTHY J K,et al. Evolution and regulation of nitrogen flux through compartmentalized metabolic networks in a marine diatom[J]. **Nature Communications**,2019,10(1):1-14.
- [8] 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.
- [9] PATEL A,MATSAKAS L,HRUZOVA K,et al. 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):1-17.
- [10] DALE D MCCLUREA,AUDREY LUIZA,BLANDINE GERBERB,et al. An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Algal Research**,2018,29:41-48.
- [11] ALIPANAH L,ROHLOFF J,WINGE P,et al. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Journal of Experimental Botany**,2015,66(20):6281-6296.
- [12] GUILLARD R R L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates[M]. Berlin:Springer,1975.
- [13] 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):150-158,241.
- [14] 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 Phycological**,2013,49

- (2):381-388.
- [15] WANG HUI,ZHANG YAN,CHEN LIN,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.
- [16] XIA S,WAN L,LI A,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.
- [17] AZIMATUN NUR M,MUIZELAAR W,BOELEN P,et al. Environmental and nutrient conditions influence fucoxanthin productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown on palm oil mill effluent[J]. **Journal of Applied Phycology**, 2019,31(1):111-122.
- [18] MYOUNG-NAM WOOA,SEON-MIN JEONA,HYE-JIN KIMB,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.
- [19] HUANG A,LIU L,YANG C,et al. *Phaeodactylum tricornutum* photorespiration takes part in glycerol metabolism and is important for nitrogen-limited response[J]. **Biotechnology Biofuels**,2015,8(73):1-16.
- [20] BAILLEUL B,BERNE N,MURIK O,et al. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms[J]. **Nature**,2015,524(7565):366-369.
- [21] 梁英,孙明辉,刘春强,等. 氮源对三角褐指藻、盐藻和米氏凯伦藻生长和种间竞争的影响[J]. *海洋环境科学*,2015,34(1): 29-35.
- [22] YODSUWAN N,SAWAYAMA S,S S. Effect of nitrogen concentration on growth,lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. **Agriculture and Natural Resources**,2017,51(3):190-197.
- [23] 夏令,胡春香. 用混合氮源在室外培养产油链带藻的可行性研究[J]. *水生生物学报*,2016,40(6):1241-1248.
- [24] 王菊芳,吴海珍,梁世中,等. 氮源对隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)生长和DHA产量的影响[J]. *海洋通报*,2001,20(5): 18-23.
- [25] CERÓN GARCÍA M C,SÁNCHEZ MIRÓN A,FERNÁNDEZ SEVILLA J M,et al. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*:influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition [J]. **Process Biochemistry**,2005,40(1):297-305.

科 技 信 息

欧盟批准低风险活性物质解淀粉芽孢杆菌菌株 AH2

2021年9月6日,欧盟发布条例(EU)2021/1455,批准低风险活性物质解淀粉芽孢杆菌菌株AH2(*Bacillus amyloliquefaciens* strain AH2)。本条例自发布之日起第二十天生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准低风险活性物质解淀粉芽孢杆菌菌株 AH2 [EB/OL]. (2021-9-9). <http://news.foodmate.net/2021/09/605723.html>