

· 工业生物技术 ·

多次补氮和增强蓝光促进三角褐指藻积累岩藻黄素

杨泽雄, 杨润青, 诸德斐, 魏东*

华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640

杨泽雄, 杨润青, 诸德斐, 魏东. 多次补氮和增强蓝光促进三角褐指藻积累岩藻黄素[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4580-4592.
YANG Zexiong, YANG Runqing, ZHU Defei, WEI Dong. Promoting fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornutum* by multiple nitrogen supplementation and blue light enhancement[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4580-4592.

摘要: 本研究旨在优化多次补氮和增强蓝光模式, 以促进光发酵三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)积累岩藻黄素。结果表明, 在摇瓶中将含有胰蛋白胍和尿素的混合氮源(1:1, N mol/N mol; 总氮浓度为 0.02 mol/L)分 6 次加入培养系统是最佳的多次补氮模式; 在 5 L 发酵罐中实施两阶段调光模式培养, 在第二阶段增强蓝光(R:G:B=67.1:16.7:16.3)后, 细胞密度、生物量生产率以及岩藻黄素的含量、产量和生产率分别达到 1.12×10^8 cells/mL、330 mg/(d·L)、19.62 mg/g、69.71 mg/L 和 6.97 mg/(d·L)。与红蓝光(R:G:B=70.9:18.3:10.9)下分 6 次补氮的一阶段培养相比, 岩藻黄素含量显著提高了 7.68% ($P < 0.05$), 但生产率无显著差异($P > 0.05$); 与红蓝光(R:G:B=70.9:18.3:10.9)下一次性加入氮源的一阶段培养相比, 岩藻黄素含量和生产率显著提高了 45.98%和 48.30% ($P < 0.05$)。因此, 本研究开发的多次补氮和增强蓝光的两阶段培养模式, 有效促进了岩藻黄素积累、提高了氮源利用效率, 为三角褐指藻光发酵生产岩藻黄素提供了新技术支撑。

关键词: 三角褐指藻; 岩藻黄素; 补氮; 蓝光; 两阶段培养

Promoting fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornutum* by multiple nitrogen supplementation and blue light enhancement

YANG Zexiong, YANG Runqing, ZHU Defei, 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 promote fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum*

资助项目: 广东省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: 2023-03-15; Accepted: 2023-06-08; Published online: 2023-06-15

tricornutum by photo-fermentation through optimizing the mode of multiple nitrogen supplementation and blue light enhancement. The results showed that the mixed nitrogen source (tryptone:urea=1:1, N mol/N mol; total nitrogen concentration at 0.02 mol/L) added to the culture system by six times was the best mode in shake flasks. Two-phase culture with light adjustment was then carried out in 5 L photo-fermenter with an enhanced blue light (R:G:B=67.1:16.7:16.3) in the second phase, leading to improved cell density (1.12×10^8 cells/mL), biomass productivity (330 mg/(d·L)), fucoxanthin content (19.62 mg/g), titer (69.71 mg/L) and productivity (6.97 mg/(d·L)). Compared with one-phase culture under red/blue (R:G:B=70.9:18.3:10.9) light and six-times nitrogen supplementation, the fucoxanthin content was significantly increased by 7.68% ($P < 0.05$) but the productivity did not change significantly ($P > 0.05$). Compared with one-phase culture under red/blue (R:G:B=70.9:18.3:10.9) light and one-time nitrogen supplementation, the content and productivity of fucoxanthin were significantly increased by 45.98% and 48.30% ($P < 0.05$), respectively. This study developed a two-phase culture mode with multiple nitrogen supplementation and blue light enhancement, which effectively promoted the accumulation of fucoxanthin and improved the efficiency of nitrogen source utilization, thus providing a new approach for fucoxanthin accumulation in *P. tricornutum* by photo-fermentation.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*; fucoxanthin; nitrogen supplementation; blue light; two phases culture

岩藻黄素(fucoxanthin)是自然界中一类重要的类胡萝卜素,广泛存在于大型褐藻、单细胞硅藻等藻类中^[1],具有抗肥胖、抗糖尿病、抗氧化、抗炎、抗癌、肝保护、皮肤保护和抗老年痴呆等功效^[1-4]。目前商业化生产主要从大型褐藻中提取,但存在原料中含量极低(0.02–1.01 mg/g)^[5]、提取困难、操作复杂和生产成本高等难题^[6],难以满足国际市场需求。海洋单细胞硅藻光合效率高^[7],胞内岩藻黄素含量远远高于大型褐藻^[8-12],其中三角褐指藻可利用有机物进行兼养生长(光发酵),有利于细胞快速繁殖和生物量积累^[13-14],最高含量可达 59.2 mg/g^[8-9,11],被认为是岩藻黄素的最佳生产者,还能联产二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、金藻昆布多糖(chrysolaminarin, Chrl)等高值产物^[11]。然而,兼养细胞内岩藻黄素含量普遍低于光自养细胞^[8,13],亟需开发有效技术手段以提高岩藻黄素的含量和生物量产率,实现岩藻黄素的高产率,以满足快速增长

的国际市场需求。

岩藻黄素作为三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)的重要捕光色素,主要是与叶绿素和蛋白质组成复合体^[15-16],而氮元素是胞内合成蛋白质和叶绿素的大量元素,直接关系到岩藻黄素的合成和积累^[11,17]。有研究表明,富氮条件下更有利于三角褐指藻积累岩藻黄素^[8,18-19],然而过高氮源浓度会导致培养结束时仍有大量氮源残留,造成原料浪费和成本提高。光质对三角褐指藻的生长和岩藻黄素积累有重要影响。由于复合体存在的特殊结构使得三角褐指藻能够捕获蓝光和绿光,在蓝光下与岩藻黄素合成相关的八氢番茄红素脱氢酶、 ζ -胡萝卜素异构酶和玉米黄素环化酶的基因表达均呈现显著上调,有利于岩藻黄素的积累^[20],而红光则更有利于细胞生长和生物量浓度的积累^[21];与红光相比,红蓝混合光(R:B=1:1)更有利于三角褐指藻生长和积累岩藻黄素^[22-23]。Yang 等^[17]采用两阶段培养策略,在第二阶段通过增强蓝

光和补充氮源实现了目前报道最高的岩藻黄素产率 8.22 mg/(d·L)，这表明光质调节与氮源补充协同作用能够促进岩藻黄素生产；但补氮频次和相应水平研究报道很少，作用规律尚不明确，值得系统研究和放大验证与优化。

本研究以三角褐指藻为对象，分别在摇瓶、5 L 光发酵罐中优化并验证多次补氮和增强蓝光对促进兼养细胞生长、提高岩藻黄素含量和产率的效应规律，获得优化兼养培养技术，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 材料和设备

1.1.1 藻种和培养基

三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) CCMP 1327 由中国科学院水生生物研究所胡晗华研究员惠赠。采用改良 f/2 培养基^[17]，添加 0.1 mol/L 甘油和 0.02 mol N/L 混合有机氮源(胰蛋白胨:尿素=1:1, N mol/N mol)，在 (20±1) °C、光强(20±2) μmol/(m·s)的恒温光照培养箱中进行斜面培养，于 4 °C冰箱中保种。

1.1.2 主要试剂

乙腈、叔丁基甲醚、甲醇、岩藻黄素和十九烷酸等均为色谱纯试剂，甘油、胰蛋白胨、尿素等均为分析纯试剂。

1.1.3 主要仪器

DHZ-DA 型恒温光照摇床购于太仓实验设备厂；CytoFLEX 购于 Beckman Coulter 公司；Allegra 25R 型高速冷冻离心机购于 Beckman Coulter 公司；Modulyod 冷冻干燥机购于热电公司；GLZ-B 型光量子计购于浙江托普仪器有限公司；AL104 型电子天平、Inpro6800 型溶氧电极和 HA405-DPA-SC-S8 型 pH 计均购自 Mettler Toledo 公司；M-100 生物传感分析仪购

于深圳西尔曼科技有限公司；1260 型高效液相色谱仪购于安捷伦科技有限公司；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 5L 发酵罐及 LED 外光照系统购自江苏尚昆生物设备有限公司。

5 L 发酵罐实物和结构以及具体参数见文献[24]。发酵罐四面可并联放置不同光质的 LED 灯板提供外光源，其中不同光质采用本团队在摇瓶体系^[17]和光发酵罐体系^[25]下优化后的结果，分别为白光(white light, W, R:G:B=19.7:76.3:4.0)、红蓝混合光(red and blue mixed light, R/B, R:G:B=70.9:18.3:10.9)、红蓝光-增强蓝光(R/B+B, R:G:B=67.1:16.7:16.3)。

1.2 研究方法

1.2.1 种子液制备

从斜面上挑取三角褐指藻藻苔，接种至含有 100 mL 无菌兼养 f/2 培养基的 250 mL 三角瓶中^[17]，根据前期研究结果调整磷酸二氢钠浓度为 80 mg/L，氯化铁浓度为 6.30 mg/L，其余成分不变。置于连续光照的恒温光照摇床中，在 (20±1) °C、LED 白光(W)的光强(20±2) μmol/(m·s)、160 r/min 条件下培养 10–12 d。

1.2.2 摇瓶中批次补氮模式优化

制备高压灭菌的胰蛋白胨母液(总氮浓度 1 mol/L)和过滤除菌的尿素母液(30 g/L)，设置氮源添加策略为：将氮源分一次性加入(1 次，0 d)、2 次加入(0 d 和 6 d，各 1/2 总量)、3 次加入(0、4 d 和 8 d，各 1/3 总量)、6 次加入(0、2、4、6、8 d 和 10 d，各 1/6 总量)。两种母液加入的体积均为 1 mL，每次添加体积量 1:1 (体积比)，使胰蛋白胨:尿素含氮比为 1:1 (N mol/N mol)，添加后总含氮量 0.02 mol/L。将培养好的种子液在 8 000 r/min 条件下离心，用无菌且无氮的兼养 f/2 培养基^[17]重悬并再次

离心洗涤,重悬后转接至含有 100 mL 无菌且无氮的兼养 f/2 培养基的 250 mL 三角瓶中,初始接种密度为 1.0×10^7 cells/mL,其余培养条件同 1.2.1。培养周期为 12 d,每 2 d 取样 2 mL,测定细胞密度、甘油浓度和生物量浓度。培养结束后收集剩余藻液,8 000 r/min 离心 3 min,弃上清、洗涤、再离心,藻泥真空冷冻干燥后储存于 -20 °C 冰箱中,用于后续分析测试,以确定优化批次补氮模式。

1.2.3 5 L 发酵罐中优化批次补氮模式的放大验证

将种子液转接至装有 3.5 L 无菌且无氮的兼养 f/2 培养基的 5 L 光发酵中,放大验证上述优化的批次补氮模式。在 2 台发酵罐中分别设置:初始光强均为 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$;光质分别为:罐 1 为白光(W),罐 2 为红蓝光(R/B)。两罐均在第 4.5 天提高光强至 $150 \mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ 。光发酵过程中控制 pH 为 (8 ± 0.5) 、温度为 (20 ± 1) °C、通气量为 1 L/min。设置初始搅拌转速为 150 r/min,两罐均在第 6 天调高至 200 r/min。培养周期为 10 d,每 24 h 进行取样,其余培养条件和分析测试同 1.2.2,以确定优化批次补氮模式在 5 L 光发酵罐中的放大效果。

1.2.4 5 L 光发酵罐中优化批次补氮模式下增强蓝光的效果评价

基于前期摇瓶中建立的两阶段培养模式^[17],在上述优化批次补氮模式下,于 5 L 光发酵过程中设置两阶段的光质调节:第一阶段(0–7.5 d)为红蓝光(R/B),第二阶段(7.5–10 d)为增强 25%蓝光的红蓝光[R/B+B,光强提高至 $185 \mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$]。其余培养条件和分析测试同 1.2.3,以确定优化批次补氮和增强蓝光促进三角褐指藻积累岩藻黄素的协同效果。

1.3 分析和测试

1.3.1 细胞密度和平均比生长速率

采用流式细胞仪测定细胞密度^[26]。平均比

生长速率(1/d)按照公式(1)计算^[27]:

$$\text{平均比生长速率} = [\ln(N_2) - \ln(N_1)] / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

式(1)中: N_2 、 N_1 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d)时的细胞密度(cells/mL)。

1.3.2 生物量浓度和生产率

采用烘干差重法^[18]测定生物量浓度。生物量生产率[mg/(d·L)]按照公式(2)计算:

$$\text{生物量生产率} = (B_2 - B_1) / (t_2 - t_1) \quad (2)$$

式(2)中: B_2 、 B_1 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d)时的生物量浓度(g/L)。

1.3.3 甘油浓度

使用 M-100 型生物传感分析仪测定^[17],用 1.0 g/L 甘油标准液定标,再将待测样品上清液的甘油浓度稀释到 0–1 g/L,取 1 mL 样品装至 2 mL 离心管中,放置于测试盘中进行测试。每个样品设置 3 个平行,测试完成后取平均值并计算标准差。

1.3.4 总氮浓度

采用分光光度法测定。将待测上清液的总氮浓度稀释到 0–150 mg/L,加入过硫酸盐试剂后在消解器 DRB200 上进行消解,设置消解温度为 105 °C、时间为 30 min。消解完成后取出样品,待样品冷却至室温后,先后加入专用试剂 2714100A、2714100B 粉剂包,置于分光光度计 DR2700 中进行总氮测定。每个样品设置 3 个平行,取平均值并计算标准差。

1.3.5 岩藻黄素含量、产量和生产率

三角褐指藻藻粉中岩藻黄素的提取方法见文献[28]。采用配备安捷伦 1260 四元泵、光电二级阵列管检测器(diode array detector, DAD)、示差折光检测器(refractive index detector, RID)、色谱柱(carotenoid column C 30 柱, 4.6 mm×150 mm, 3 μm)的高效液相色谱仪进行岩藻黄素定性分析,利用岩藻黄素标品制作外标法标准曲线进行含量的定量分析^[17]:

岩藻黄素产量 Y (mg/L)计按公式(3)计算:

$$Y=C \times B-C_0 \times B_0 \quad (3)$$

式(3)中: C 和 B 是 t 时刻的岩藻黄素含量(mg/g)和生物量浓度(g/L); C_0 和 B_0 是 t_0 时刻的岩藻黄素含量(mg/g)和生物量浓度(g/L)。

岩藻黄素生产率 P_{Fx} [mg/(d·L)]按公式(4)计算:

$$P_{Fx}=(C_{Fx2} \times B_2-C_{Fx1} \times B_1)/(t_2-t_1) \quad (4)$$

式(4)中: C_{Fx1} 、 C_{Fx2} 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的岩藻黄素含量(mg/g), B_1 、 B_2 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的生物量浓度(g/L)。

1.3.6 二十碳五烯酸含量和生产率

采用气相色谱质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)测定^[29], 配置有 5975 内置型质量探测器和高效毛细管柱(DB-23, 30 mm×0.25 mm, 0.25 μm), 利用 NIST05a 谱库对二十碳五烯酸(EPA)进行定性分析, C19:0 内标法进行含量的定量分析。EPA 产率 P_{EPA} [mg/(d·L)]按公式(5)计算:

$$P_{EPA}=(C_{EPA2} \times B_2-C_{EPA1} \times B_1)/(t_2-t_1) \quad (5)$$

式(5)中: C_{EPA1} 、 C_{EPA2} 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的 EPA 含量(mg/g), B_1 、 B_2 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的生物量浓度(g/L)。

1.3.7 金藻昆布多糖含量和生产率

金藻昆布多糖(Chrl)的提取和分析方法见文献[30]。采用苯胺蓝荧光检测法, 在 CYTATION-5 型酶标仪上测定反应液的荧光强度(激发波长为 398 nm、发射波长为 502 nm), 利用 β-1,3 葡聚糖标品制作外标法标准曲线, 对金藻昆布多糖进行定性和含量的定量分析。

金藻昆布多糖产率 P_{Chrl} [mg/(d·L)]按照公式(6)计算:

$$P_{Chrl}=(C_{Chrl2} \times B_2-C_{Chrl1} \times B_1)/(t_2-t_1) \quad (6)$$

式(6)中: C_{Chrl1} 、 C_{Chrl2} 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的 Chrl 含量(mg/g), B_1 、 B_2 分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的生物量干重浓度(g/L)。

1.4 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($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析法和成对数据 t -检验进行显著性分析, 表和图上不同字母标注表示存在显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 摇瓶中批次补氮模式优化

在摇瓶中进行不同批次的补氮操作, 三角褐指藻的细胞密度、生物量浓度、甘油浓度和总氮浓度变化如图 1 所示, 生产性能如表 1 所示。由图 1A 可知, 在培养结束时, 随着补加氮源批次数的增加, 细胞密度整体呈现上升趋势, 其中分 3 次和分 6 次加入的模式可显著提高细胞密度($P < 0.05$), 后者的细胞密度和平均比生长速率均达到最大值(1.27×10^8 cells/mL 和 0.21/d), 比一次性加入(对照组)显著提高了 36.11%和 16.67% ($P < 0.05$); 而后者的生物量浓度和生产率达到最大值[3.26 g/L 和 223.89 mg/(d·L)], 比对照组显著提高了 13.99%和 22.68% ($P < 0.05$)。有报道指出, 限制氮源或氮缺乏会抑制三角褐指藻细胞的生长^[31], 而上述分 6 次加入氮源模式有利于细胞生长和生物量的积累, 它可能使培养基中氮元素浓度维持在兼养细胞生长的适宜水平。同时, 甘油消耗量和消耗速率均达到最大值为 2.7 g/L 和 0.23 g/(d·L), 比对照组显著提高了 30.43%和 21.05% ($P < 0.05$)。有研究表明, 兼养三角褐指藻胞内超过 50%的碳来自甘油^[32], 甘油消耗量很大程度上决定了生物量浓度的积累^[33]。同样, 总氮(total nitrogen, TN)消耗速率也在此时达到最大值[10.23 mg/(d·L)], 比对照组显著提高了 11.56% ($P < 0.05$), 说明分 6 次补氮有利于细胞提高碳源和氮源利用效率, 减少资源浪费、降低成本。

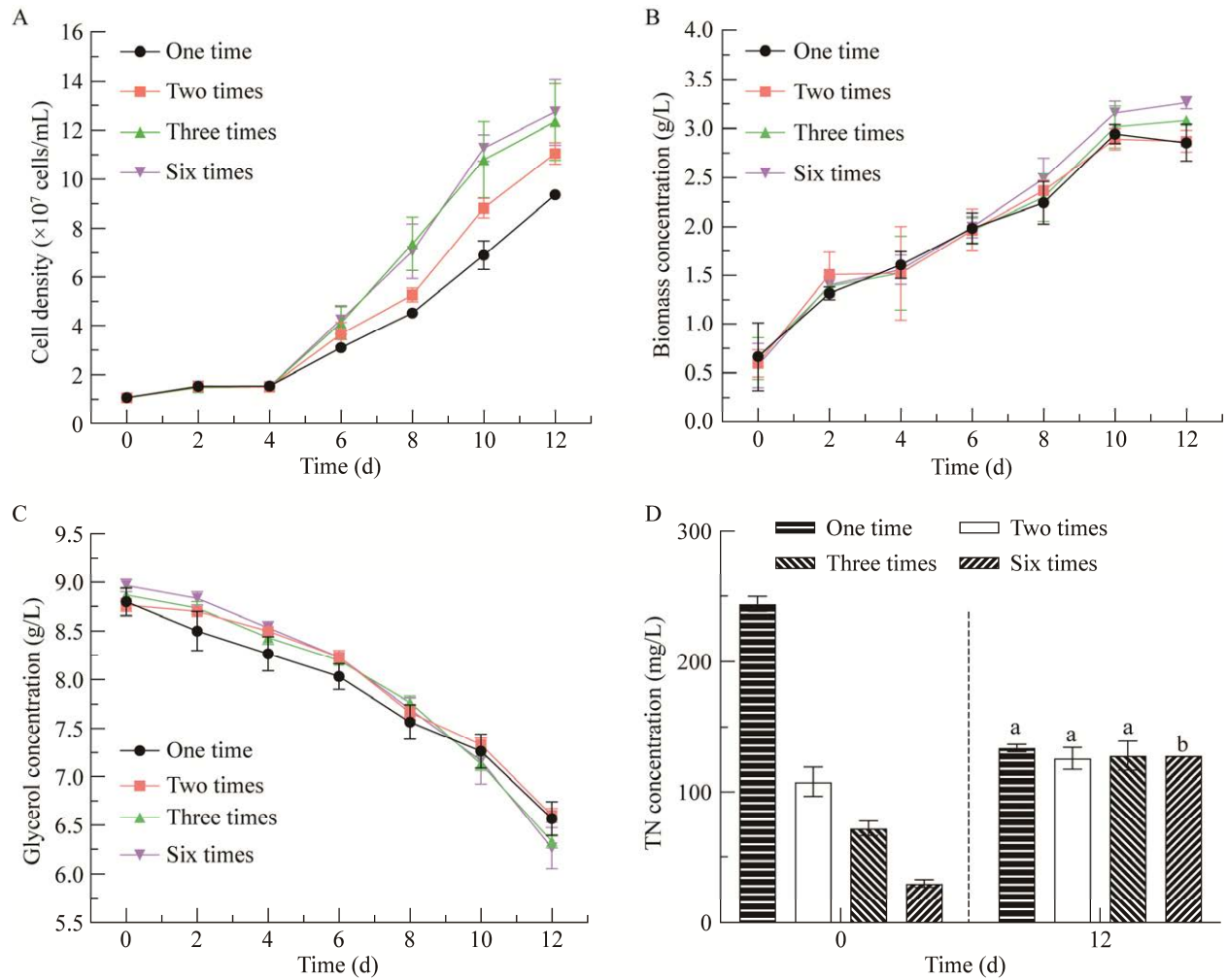


图 1 摇瓶中补氮模式下细胞密度(A)、生物量(B)、甘油(C)和总氮浓度(D)变化规律

Figure 1 Cell density (A), and biomass (B), glycerol (C) with total nitrogen (D) concentration under nitrogen supplementary mode by time(s) during the cultures in shake flasks. Different letters indicate significant differences.

表 1 摇瓶中批次补氮模式下三角褐指藻的生产性能

Table 1 Production capacity of *Phaeodactylum tricornutum* grown in shake flasks under supplementary nitrogen mode by time(s)

	Time (s) of nitrogen supplementary mode			
	One time	Two times	Three times	Six times
Average specific growth rate (1/d)	0.18±0.00	0.19±0.00	0.20±0.01**	0.21±0.00**
Biomass productivity (mg/(d·L))	182.50±9.32	189.17±1.57	202.78±10.13	223.89±9.56**
Average glycerol consumption rate (g/(d·L))	0.19±0.00	0.18±0.00	0.21±0.00*	0.23±0.01*
Average nitrogen consumption rate (mg/(d·L))	9.17±0.17	9.54±0.17	10.05±0.33	10.23±0.17*
Fucoxanthin productivity (mg/(d·L))	2.05±0.13	2.26±0.04	2.97±0.06*	4.03±0.10**

A statistic analysis was performed with one batch as the control, * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

在批次补氮模式下, 兼养细胞中岩藻黄素含量、产量和生产率如图 2 和表 1 所示。在培养结束时, 岩藻黄素含量和产量随着批次补氮次数的增加呈现上升趋势。在分 6 次补氮模式下三者均达到最大值, 分别为 17.06 mg/g、48.39 mg/L 和 4.03 mg/(d·L) (表 1), 比一次性加入(对照组)分别显著提高了 44.33%、96.39% 和 96.59% ($P < 0.05$), 同时也显著高于其他批次加入组 ($P < 0.05$)。有研究表明, 自养培养金色奥杜藻(*Odontella aurita*)在采用初始高氮水平并在后续培养中添加氮源模式下使得胞内岩藻黄素含量显著提高 92.56% ($P < 0.05$), 这与本研究的规律基本一致, 说明充足的碳源和氮源更有利于兼养细胞积累岩藻黄素^[11-12,34]。研究表明通过补充富氮的灭活废酵母使得三角褐指藻中岩藻黄素产量显著提高 ($P < 0.05$)^[35], 而本研究并未添加额外的氮源, 仅通过少量多次补加氮源就能实现岩藻黄素生产效率和营养物利用效率的提高, 符合降本增效目的。因此, 综合细胞生长、甘油和总氮消耗以及岩藻黄素的积累效果, 分 6 次补氮为优化模式。

2.2 5 L 发酵罐中优化批次补氮模式的放大验证

为进一步提高红蓝光下光发酵体系的生产效率^[17], 将上述优化的分 6 次补氮模式应用于白光(W)和红蓝光(R/B)条件下的放大验证。氮源分 6 次(0、1.5、3、4.5、6、7.5 d)加入 2 个 5 L 光发酵罐, 第 4.5 天将光强均提高至 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$, 在第 6 天时将转速均提高到 200 r/min。两种光质下兼养细胞密度、生物量和甘油以及总氮浓度的变化规律如图 3 和表 2 所示。培养结束时, 白光(W)下细胞密度、生物量浓度分别达到 1.16×10^8 cells/mL 和 3.68 g/L, 与摇瓶中分 6 次补氮模式的结果相比, 细胞密度显著降低了 13.19% ($P < 0.05$), 可能是因为 5 L 发酵罐的透光液面比摇瓶更厚, 光照面积与体积比(P/V)远低于摇瓶, 使得光发酵罐中细胞受到的实际光强远低于摇瓶, 导致光传导效率下降^[36], 造成兼养细胞生长受一定限制^[18,37]。但光发酵罐中细胞平均比生长速率、生物量生产率、甘油和总氮消耗速率均显著高于摇瓶 ($P < 0.05$), 说明光发酵罐中该条件下更有利于提高三角褐

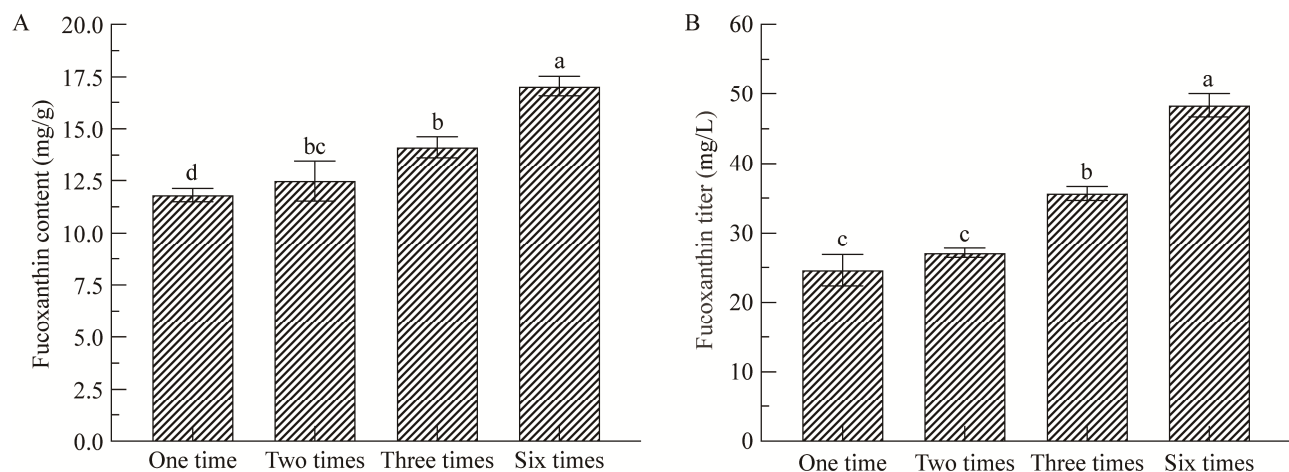


图 2 摇瓶中批次补氮模式下三角褐指藻的岩藻黄素含量(A)和产量(B)

Figure 2 The content (A) and titer (B) of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornerutum* under nitrogen supplementary mode by time(s). Different letters indicate significant differences.

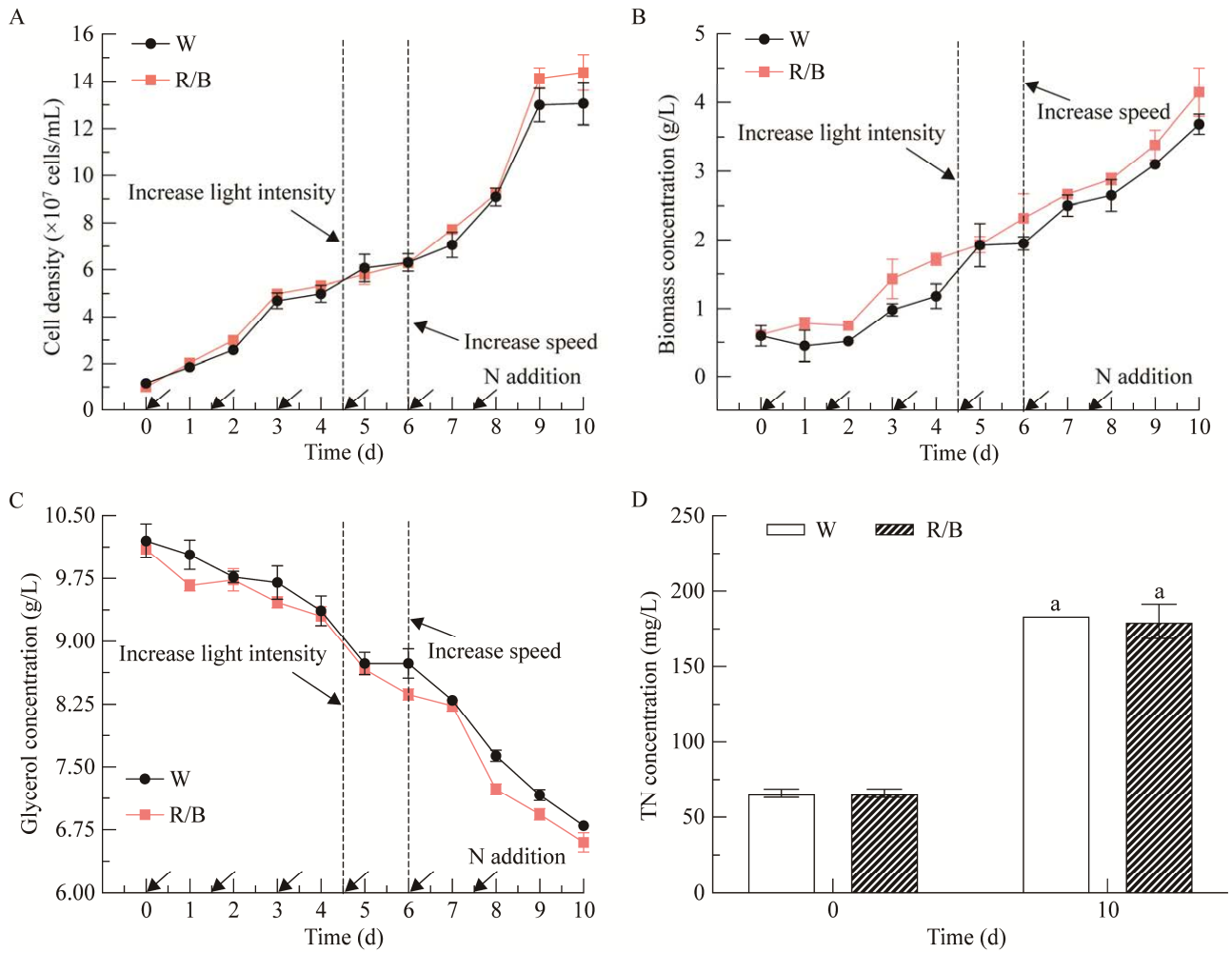


图 3 5 L 光发酵罐中白光(W)和红蓝光(R/B)下分 6 次补氮对细胞密度(A)、生物量(B)、甘油(C)和总氮浓度(D)的影响

Figure 3 Cell density (A), and biomass (B), glycerol (C) with total nitrogen (D) concentration under white (W), red and blue light (R/B) by six-times of nitrogen supplement in 5 L photo-fermenter. Different letters indicate significant differences.

表 2 5 L 光发酵罐中不同光质下分 6 次补氮对三角褐指藻生产性能的影响

Table 2 Production capacity of *Phaeodactylum tricornutum* grown in 5 L photo-fermenter under different light qualities and six times of nitrogen supplement

	Light qualities with six times of nitrogen supplement		
	W	R/B	R/B+B
Average specific growth rate (1/d)	0.24±0.00	0.27±0.01*	0.24±0.01
Biomass productivity (mg/(d·L))	308.33±0.53	353.33±20.12	330.00±3.70
Average glycerol consumption rate (g/(d·L))	0.34±0.01	0.35±0.08	0.32±0.02*
Average nitrogen consumption rate (mg/(d·L))	13.60±0.01	14.40±0.80	14.60±0.01
Fucoxanthin productivity (mg/(d·L))	6.37±0.14	7.14±0.01*	6.97±0.06*

A significant analysis was performed with W as the control, * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

指藻的生长性能^[38], 证明了分 6 次补氮模式在 5 L 光发酵罐中的应用可行性。

红蓝光(R/B)下细胞密度和生物量浓度均达到最大值(1.44×10^8 cells/mL 和 4.15 g/L), 与白光(W)下相比均显著提高了 30.01%和 12.77% ($P < 0.05$)。有研究表明, 红光占比高更有利于三角褐指藻生长, 能够有效提高细胞密度^[38], 与本研究结果基本一致。红蓝光(R/B)下生物量生产率、甘油和总氮消耗速率均有提升, 但与自然白光(W)相比并不显著($P > 0.05$), 而比摇瓶中分 6 次补氮模式的结果均显著提高($P < 0.05$), 说明 5 L 光发酵罐中采用分 6 次补氮和红蓝光(R/B), 能够更好地促进三角褐指藻的生长和营养物质的消耗。

由图 4 和表 2 可知, 培养过程中岩藻黄素含量整体呈现先上升后下降再上升的趋势, 在 7.5 d 最后一次加入氮源后, 岩藻黄素含量快速提高。培养结束时, 在白光(W)下岩藻黄素含量、产量和生产率分别达到 15.93 mg/g、54.90 mg/L 和 6.37 mg/(d·L), 比摇瓶中分 6 次补氮的结果显著提高了 34.77%、13.48%和

58.06% ($P < 0.05$)。在红蓝光(R/B)下岩藻黄素含量、产量和生产率均达到最大值[18.22 mg/g、71.40 mg/L 和 7.14 mg/(d·L)], 与白光(W)相比显著提高了 14.37%、30.05%和 12.09% ($P < 0.05$), 这可能由于光发酵罐中具有更短的光程、更高的光合效率^[39], 更有利于岩藻黄素的积累。但在培养结束时, 红蓝光下光发酵罐中总氮含量仍处于较高水平(高于 180 mg/L), 与富氮条件有利于岩藻黄素积累的规律一致^[8,18]。综合以上结果, 分 6 次补氮模式适用于光发酵罐且放大效果良好, 辅以红蓝光(R/B)能显著促进三角褐指藻兼养细胞生长和岩藻黄素积累。

2.3 5 L 光发酵罐中六次补氮模式下增强蓝光的效果评价

由图 5 和表 2 可知, 红蓝光(R/B)下分 6 次补氮, 在第二阶段强化蓝光(即红蓝光后期补蓝光, R/B+B), 最终细胞密度和生物量浓度达到 1.12×10^8 cells/mL 和 3.68 g/L, 与红蓝光(R/B)下分 6 次补氮的一阶段培养结果相比均显著降低($P < 0.05$), 但仍高于白光(W)下分 6 次补氮的结果($P > 0.05$)。在第二阶段强化蓝光后细胞

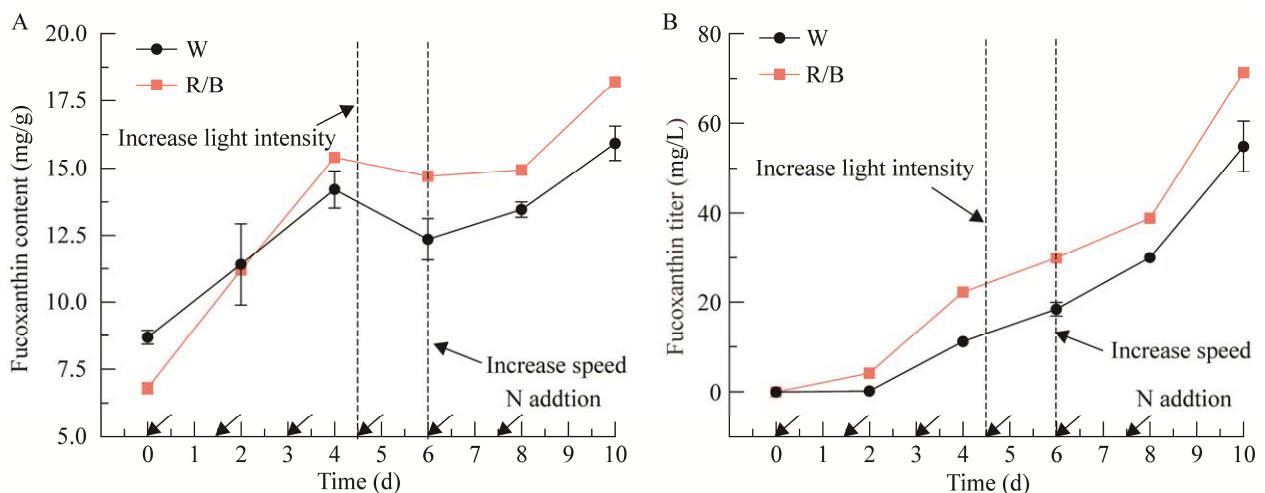


图 4 5 L 光发酵罐中白光(W)和红蓝光(R/B)下分 6 次补氮对岩藻黄素含量(A)和产量(B)的影响

Figure 4 The content (A) and titer (B) of fucoxanthin in *Phaeodactylum tricornerum* by six-times of nitrogen supplement in 5 L photo-fermenter under white (W), red and blue light (R/B).

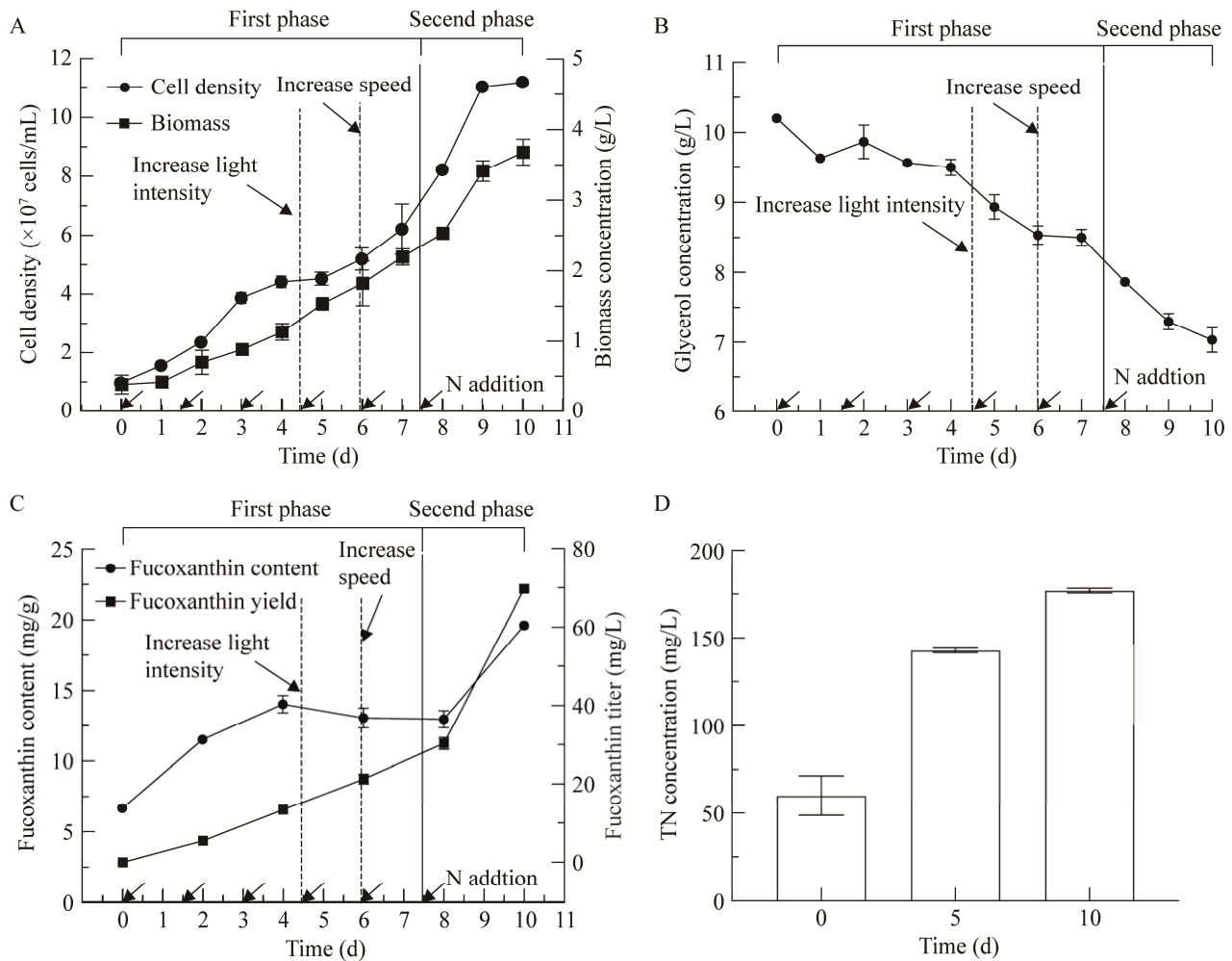


图5 5 L光发酵罐中分6次补氮和第二阶段增强蓝光下细胞密度与生物量浓度(A)、甘油浓度(B)、岩藻黄素含量与产量(C)和总氮浓度(D)的变化规律

Figure 5 Time courses of cell density and biomass concentration (A), glycerol concentration (B), the content and titer of fucoxanthin (C) and total nitrogen concentration (D) by six times of nitrogen supplement under R/B+B in two phases culture.

生长受到一定抑制，这与前期摇瓶中研究结果不符^[17]，可能是由于在发酵罐中相同照度的蓝光具有高于其他单色光的辐射能，能使细胞放氧活性和光合效率下降，从而造成光抑制^[40]。

由图 5C 和表 2 可知，在分 6 次补氮和第二阶段增强蓝光(R/B+B)模式下，岩藻黄素含量达到最大值为 19.62 mg/g，与分 6 次补氮下白光(W)和红蓝光(R/B)一阶段培养相比，分别显著提高了 23.16%和 7.68% ($P < 0.05$)，此时总氮

消耗速率也达到最大值 14.60 mg/(d·L)，与岩藻黄素积累规律一致。但由于生物量积累受到抑制，造成岩藻黄素生产率仅为 6.97 mg/(d·L)，略低于分 6 次补氮模式下红蓝光一阶段培养的生产率[7.14 mg/(d·L)]，但两者并无显著差异 ($P > 0.05$)。有研究表明，在蓝、紫光的照射下，胞内叶绿素 *a* 的含量会出现极显著上升 ($P < 0.01$)^[21]，而复合体^[15-16]中叶绿素与岩藻黄素含量几乎同步变化，且两者比例接近 1:1。

Valle 等^[20]发现在蓝光下岩藻黄素合成相关基因表达均呈现上调趋势,因此第二阶段增强蓝光更有利于三角褐指藻积累岩藻黄素,从而提高岩藻黄素含量。诸德斐等^[25]在光发酵罐体系中采用一次性补氮和红蓝光(R/B)获得的岩藻黄素含量和生产率为 13.44 mg/g 和 4.70 mg/(d·L),仅为本研究分 6 次补氮和第二阶段增强蓝光(R/B+B)结果的 68.47%和 67.43%。同时,本研究还发现,通过增强蓝光,细胞在积累岩藻黄素的同时,还含有高含量的二十碳五烯酸(37.54 mg/g)和金藻昆布多糖(136.82 mg/g),具有很好的综合开发价值。因此,采用分 6 次补氮和第二阶段增强蓝光,可显著提高胞内岩藻黄素含量,同时实现了 3 种高值产物的共同积累,有利于实现三角褐指藻的提质增效生产和综合开发利用。

3 结论

本研究通过摇瓶中的批次补氮模式优化,确定了分 6 次加入氮源效果最佳,于 5 L 光发酵罐中在两种光质下放大培养验证了分 6 次补氮的可行性,进而与两阶段培养中第二阶段增强蓝光(R/B+B)模式相结合,实现了岩藻黄素高含量(19.62 mg/g)和高生产率[6.97 mg/(d·L)],比采用一次性补氮和红蓝光(R/B)^[25]的结果显著提高了 45.98%和 48.30% ($P<0.05$)。因此,本研究通过多次补氮和增强蓝光,在不改变培养基中氮源总量的前提下,显著提高了三角褐指藻对氮源的利用效率、强化了岩藻黄素生产,为三角褐指藻高效生产岩藻黄素提供了新技术支撑。

REFERENCES

- [1] OLIYAEI N, MOOSAVI-NASAB M, TANIDEH N, IRAJI A. Multiple roles of fucoxanthin and astaxanthin against Alzheimer's disease: their pharmacological potential and therapeutic insights[J]. *Brain Research Bulletin*, 2023, 193: 11-21.
- [2] OLIYAEI N, MOOSAVI-NASAB M, TAMADDON AM, FAZAELI M. Encapsulation of fucoxanthin in binary matrices of porous starch and halloysite[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105458.
- [3] STIEFVATTER L, NEUMANN U, RINGS A, FRICK K, SCHMID-STAIGER U, BISCHOFF SC. The microalgae *Phaeodactylum tricorutum* is well suited as a food with positive effects on the intestinal microbiota and the generation of SCFA: results from a pre-clinical study[J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 2504.
- [4] VÍLCHEZ C, FORJÁN E, CUARESMA M, BÉDMAR F, GARBAYO I, VEGA JM. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(3): 319-333.
- [5] MOHAMADNIA S, TAVAKOLI O, ALI FARAMARZI M, SHAMSOLLAHI Z. Production of fucoxanthin by the microalga *Tisochrysis lutea*: a review of recent developments[J]. *Aquaculture*, 2020, 516: 734637.
- [6] 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.
- [7] BUTLER T, KAPOORE RV, VAIDYANATHAN S. *Phaeodactylum tricorutum*: a diatom cell factory[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(6): 606-622.
- [8] MCCIURE DD, LUIZ A, GERBER B, BARTON GW. An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Algal Research*, 2018, 29: 41-48.
- [9] 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.
- [10] GUO BB, LIU B, YANG B, SUN PP, LU X, LIU J, CHEN F. Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(7): 125.
- [11] 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.
- [12] XIA S, GAO BY, FU JQ, XIONG JH, ZHANG CW. Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different nitrogen supply regimes[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 126(6): 723-729.
- [13] CERON GARCIA MC, FGARCIA C, ASANCHEZ M, JMFERNANDEZ S, CHISTI Y, EMOLINA G. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* on various carbon sources[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(5): 689-694.
- [14] 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 tricorutum*[J]. Marine Sciences, 2016, 40(5): 57-65 (in Chinese).
- [15] GIOVAGNETTI V, RUBAN AV. 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 tricorutum*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2017, 1858(3): 218-230.
- [16] HEYDARIZADEH P, BOUREBA W, ZAHEDI M, HUANG B, MOREAU B, LUKOMSKA E, COUZINET-MOSSION A, WIELGOSZ-COLLIN G, MARTIN-JÉZÉQUEL V, BOUGARAN G, MARCHAND J, SCHOEFS B. Response of CO₂-starved diatom *Phaeodactylum tricorutum* to light intensity transition[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2017, 372(1728): 20160396.
- [17] 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.
- [18] WANG H, ZHANG Y, CHEN L, CHENG WT, LIU TZ. Combined production of fucoxanthin and EPA from two diatom strains *Phaeodactylum tricorutum* and *Cylindrotheca fusiformis* cultures[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(7): 1061-1071.
- [19] 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.
- [20] VALLE KC, NYMARK M, AAMOT I, HANCKE K, WINGE P, ANDRESEN K, JOHNSEN G, BREMBU T, BONES AM. System responses to equal doses of photosynthetically usable radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114211.
- [21] 徐润洁, 龚一富, 陈文婷, 李申睿, 陈若莹, 郑小恽, 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): 0917001.
XU RJ, GONG YF, CHEN WT, LI SR, CHEN RY, ZHENG XY, CHEN XMZ, WANG HY. Effects of LED monochromatic light quality of different colors on fucoxanthin content and expression levels of related genes in *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(9): 0917001 (in Chinese).
- [22] YI ZQ, SU YX, CHEREK P, NELSON D, LIN JP, ROLFSSON Ó, WU H, SALEHI-ASHTIANI K, BRYNJÓLFSSON S, FU W. Combined artificial high-silicate medium and LED illumination promote carotenoid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-11.
- [23] SIRISUK P, RA CH, LEONG 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.
- [24] 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.
- [25] 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 DF, YANG RQ, WEI D. Enhanced production of fucoxanthin by *Phaeodactylum tricorutum* by photofermentation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1070-1082 (in Chinese).
- [26] FRADA MJ, BURROWS EH, WYMAN KD, FALKOWSKI PG. Quantum requirements for growth and fatty acid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) in nitrogen replete and limited conditions[J]. Journal of Phycology, 2013, 49(2): 381-388.

- [27] XIA S, WAN LL, LI AF, SANG M, ZHANG CW. 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.
- [28] WOO MN, JEON SM, KIM HJ, LEE MK, SHIN SK, SHIN YC, PARK YB, CHOI MS. 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.
- [29] 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: 华南理工大学博士学位论文, 2019.
- LIU L. Enhancement of single cell oil production underlying the microalgae-yeast interactions and multi-omics analysis of the molecular mechanisms[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [30] 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: 华南理工大学硕士学位论文, 2021.
- WANG S. Study on rapid detection of polysaccharide from *Phaeodactylum tricornerutum* and key technologies of photofermentation production[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [31] ALIPANAH L, ROHLOFF J, WINGE P, BONES AM, BREMBU T. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(20): 6281-6296.
- [32] HUANG AY, LIU LX, YANG C, WANG GC. *Phaeodactylum tricornerutum* photorespiration takes part in glycerol metabolism and is important for nitrogen-limited response[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 73.
- [33] 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 tricornerutum* by optimization of carbon and nitrogen sources[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(10): 82-90 (in Chinese).
- [34] 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 tricornerutum*[J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 947726.
- [35] YUAN X, LIANG LM, LIU K, XIE LJ, HUANG LQ, HE WJ, CHEN YQ, XUE T. Spent yeast as an efficient medium supplement for fucoxanthin and eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Phaeodactylum tricornerutum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 32: 59-69.
- [36] 陈智杰, 姜泽毅, 张欣欣, 张欣茹. 微藻培养光生物反应器内传递现象的研究进展[J]. 化工进展, 2012, 31(7): 1407-1413, 1418.
- CHEN ZJ, JIANG ZY, ZHANG XX, ZHANG XR. Research progress of transport phenomena within photobioreactor for microalgae culturing[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2012, 31(7): 1407-1413, 1418 (in Chinese).
- [37] CONCEIÇÃO D, LOPES RG, DERNER RB, CELLA H, DO CARMO APB, MONTES D'OCA MG, PETERSEN R, PASSOS MF, VARGAS JVC, GALLITERASAWA LV, KAVA V. The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricornerutum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2020, 32(2): 1017-1025.
- [38] LU X, SUN H, ZHAO WY, CHENG KW, CHEN F, LIU B. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process for production of fucoxanthin by the marine diatom *Nitzschia laevis*[J]. Marine Drugs, 2018, 16(7): 219.
- [39] 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 tricornerutum* and its fucoxanthin accumulation in indoor tubular photobioreactor[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(2): 18-26 (in Chinese).
- [40] RYO N, YOSHIFUMI U, MAKIO Y, SHEN JR, SEIJI A. Effects of excess light energy on excitation-energy dynamics in a pennate diatom *Phaeodactylum tricornerutum*[J]. Photosynthesis Research, 2019, 141(3): 355-365.

(本文责编 郝丽芳)