

# 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

宋培钦, 刘鹭, 魏东

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 岩藻黄素是一种广泛存在于海洋藻类的类胡萝卜素, 具有清除自由基、抗癌和抗肥胖等生理活性, 尤其在抗肿瘤和减肥方面功效突出。三角褐指藻中的岩藻黄素含量丰富, 而环境因子及营养因素对微藻生长及岩藻黄素含量有着显著影响。本文以 OD 值、细胞密度、干重和岩藻黄素含量等为评价指标, 研究了不同盐度 (20、25、30)、pH 值 (7.5、8.0、8.5)、氮源种类 (尿素、碳酸氢铵) 等因素对三角褐指藻户外生长、岩藻黄素积累的影响。研究表明: 盐度为 20 条件下, 三角褐指藻获得最大细胞密度  $6.01 \times 10^6$  /mL, 不同盐度对岩藻黄素含量的增长无明显效果; pH 值 8.0 条件下, 三角褐指藻细胞密度及岩藻黄素含量均达到最大值 ( $5.8 \times 10^6$  /mL 和 17.79 mg/g); 与碳铵相比尿素作为氮源更有利于三角褐指藻的生长, 最终细胞密度为  $4.1 \times 10^6$  /mL, 但以碳铵为氮源条件下, 更利于岩藻黄素的积累, 岩藻黄素含量达到 9.96 mg/g。因此, 户外跑道池中的最适培养条件为盐度 20、pH 值 8.0、碳铵为氮源。

**关键词:** 三角褐指藻; 环境因子; 氮源; 岩藻黄素

文章编号: 1673-9078(2018)04-150-158

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.024

## Scaling-up Cultivation of *Phaeodactylum tricornutum* in Open Raceway Pond and Optimization of the Culture Conditions for Fucoxanthin Accumulation

SONG Pei-qin, LIU Lu, WEI Dong

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

**Abstract:** As a kind of carotenoid which existed in various marine microalgae, fucoxanthin had many biological activities including scavenging free radicals, anti-cancer, anti-obesity and other physiological activities, especially in anti-tumor and slimming effect. *Phaeodactylum tricornutum* (*P. tricornutum*) had the capability to accumulate plenty of fucoxanthin, while the environment and nutritional factors have a significant effect on the growth of microalgae and the content of fucoxanthin. In this study, effects of different salinity (20, 25, 30), pH values (7.5, 8.0, 8.5) and nitrogen source types (urea, ammonium bicarbonate) on the OD value, cell concentration, dry cell weight, fucoxanthin content of *P. tricornutum* were investigated in outdoor mass culture. The results showed that maximum cell concentration was  $6.01 \times 10^6$  /mL, which was obtained in the culture medium with salinity of 20. There was no significant effect of different salinity on the increase of fucoxanthin content of *P. tricornutum*. Optimal pH value of the culture medium for *P. tricornutum* was 8.0. Maximum cell concentration and fucoxanthin content were  $5.8 \times 10^6$  /mL and 17.79 mg/g, respectively. Compared with ammonium bicarbonate, urea as a nitrogen source was more suitable for the growth of *P. tricornutum* and the final cell concentration reached  $4.1 \times 10^6$  /mL. However, in terms of fucoxanthin accumulation, ammonium bicarbonate as nitrogen source was more advantageous since the maximum fucoxanthin content reached 9.96 mg/g. Therefore, the optimum culture conditions in open raceway pond for *P. tricornutum* were summed up to be salinity of 20, pH 8.0 and ammonium bicarbonate as the nitrogen source.

**Key words:** *Phaeodactylum tricornutum*; environmental factor; nitrogen source; fucoxanthin

收稿日期: 2017-07-25

基金项目: 广东省公益研究与能力建设项目 (2015A020216003、2016A010105001); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201401G01); 广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项 (201704030084); 国家自然科学基金项目 (31370383) 资助

作者简介: 宋培钦 (1991-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 微藻生物技术

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 教授、博士生导师, 研究方向: 工业生物技术

岩藻黄素(fucoxanthin)是一种参与光合作用的类胡萝卜素, 占自然界总类胡萝卜素的 10%以上, 广泛存在于褐藻、硅藻和金藻等藻类中<sup>[1]</sup>。岩藻黄素在藻类细胞中与叶绿素和蛋白组合成一个 FCP 复合体, 在光合作用的光捕获、光能传递和光保护等生理作用中扮演重要的角色<sup>[2]</sup>。岩藻黄素具有一个区别于其他常见类胡萝卜素(如  $\beta$ -胡萝卜素、番茄红素和虾青素等)的丙二烯结构和 5,6-环氧结构(如图 1)。

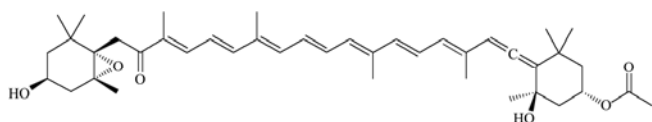


图 1 岩藻黄素的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of fucoxanthin

岩藻黄素具有很好的研究意义及很高的应用价值。Peng J 等<sup>[3]</sup>研究发现岩藻黄素在抗癌、抗内毒素炎症、抗氧化、抗疟疾以及保护肝脏、血管等有显著的功效。另外, Kuipers R S 等<sup>[4,5]</sup>研究证实了岩藻黄素能显著改善胰岛素抵抗特性, 降低血液中葡萄糖含量, 在减肥方面功效显著。

目前用于提取岩藻黄素的原料主要为海带、裙带菜等大型海藻。然而由于大型海藻中岩藻黄素含量低、养殖成本高、提取纯化困难且有季节性生长的特点, 严重限制了岩藻黄素的开发利用<sup>[6,7]</sup>。Kim S M 等<sup>[8]</sup>研究发现海洋硅藻中的岩藻黄素含量丰富, 含量高达 15.42~16.51 mg/g, 是大型海藻的 10 倍以上。同时单细胞微藻具有生长速度快、易于培养和在生物反应器中可人工调控的优点, 从而解决了工业化生产的原料

问题。

三角褐指藻是一种海洋真核单细胞藻, 其岩藻黄素含量是大型藻的数倍, 且相对于大型藻类来说更易于提取分离<sup>[1,8]</sup>。同时三角褐指藻的生长速率较快, 易于室内或户外规模化培养。目前微藻养殖的方法和反应器很多如: 跑道池、光生物反应器和发酵罐等。跑道池易于排氧及规模化, 迄今为止 90% 的微藻商业化养殖, 均采用跑道池<sup>[9,10]</sup>。本文选取三角褐指藻为实验材料, 探讨在户外跑道池条件下盐度、pH 值和氮源种类对三角褐指藻生长情况及岩藻黄素含量的影响, 以为三角褐指藻的户外大规模生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

三角褐指藻(*P. tricornutum*)由中国科学院水生生物研究所胡晗华研究员惠赠; 岩藻黄素标准品购于美国 Sigma 公司; 乙腈、乙酸乙酯、甲醇为色谱纯试剂; 丙酮、磷酸二氢钠和硅酸钠等均为分析纯试剂; Instant Ocean 海盐购自 Marineland; 盐度计(ATC)购自上海淋誉贸易有限公司; 笔式 pH 计(MT-8062)购自 Exact Instrument; 可见分光光度计(721)购自上海佑科仪器仪表有限公司; 冷冻干燥机(Modulyod)购自 Thermor Eletron Corporation。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 种子液制备

表 1 f/2 培养基

Table 1 f/2 medium

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	8.82×10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3.62×10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	30 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	1.06×10 <sup>-4</sup> M
trace metal solution	(see recipe below)	1 mL	

表 2 f/2 微量元素溶液

Table 2 f/2 trace metal solution

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	3.15 g	1.17×10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	-	4.36 g	1.17×10 <sup>-5</sup> M
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	9.8 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3.93×10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6.3 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	2.60×10 <sup>-8</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	7.65×10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	4.20×10 <sup>-8</sup> M
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	9.10×10 <sup>-7</sup> M

三角褐指藻种子液的制备分三步进行,首先在 250 mL 的锥形瓶中(装液量 100 mL)培养至指数期,然后转移到 3 L 的锥形瓶(装液量 1.5 L),最后扩种到 18 L 的 PVC 透明培养装置中培养。第一、二步培养在恒温摇床上进行,培养温度  $20 \pm 1$  °C,光照强度  $4000 \pm 500$  Lux;第三步培养时,需用空气泵经无菌滤膜泵入空气,保证  $\text{CO}_2$  的溶解量,并增加光强至  $8000 \pm 500$  Lux。接种前要对培养基和培养器皿进行高温高压灭菌(121 °C、20 min)和其他消毒处理。三角褐指藻的培养采用 f/2 人工海水培养基<sup>[11]</sup>(表 1、2)。海水利用人工海盐(Reef Crystals®, Instant Ocean Corp., VA, USA)进行配置。

### 1.2.2 户外培养及采收



图 2 开放池和超滤采收装置

Fig.2 Open pool and ultrafiltration recovery unit

三角褐指藻户外培养阶段主要包括由一级池到三级池的户外培养以及采收工作。各级跑道池的底面积为:一级跑道  $2.5 \text{ m}^2$ ;二级跑道池  $10 \text{ m}^2$ ,三级跑道池  $40 \text{ m}^2$ ,各级跑道池的培养水深均为 20 cm。在户外培养过程中每级跑道池的起始接种密度要达到  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  在 0.2~0.3 之间,接种时间一般选在早上光照不强的时间,接种以及培养过程中添加的培养基均采用 f/2 人工海水培养基。户外培养基用水为自来水,配置培养基之前经过  $0.5 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤系统进行过滤,并用  $10^{-5}$  的二氧化氯消毒。在每次使用培养池之前,使用  $5 \times 10^{-5}$  的二氧化氯对培养池进行消毒,每次消毒时间 12 h。

采收过程采用二级过滤采收模式,首先藻液通过  $20 \mu\text{m}$  的预过滤装置除去藻液中较大的杂质,再经过

$0.5 \mu\text{m}$  的微滤膜组件来浓缩藻液,连续循环浓缩后达到预期浓度的藻液灌装后冷藏备用。一级培养池及采收装置见图 2。

### 1.2.3 三角褐指藻户外生长过程的监控

采用 OD 值法、血球计数法和干重法对三角褐指藻的户外生长过程进行监控。

OD 值法:吸取 3 mL 藻液置于石英比色皿中,在紫外分光光度计下测定 450 nm 条件下的光密度值。

血球计数法:在显微镜下,通过计数获得。干重法:吸取 40 mL 藻液置于已准确称量的 50 mL 康宁离心管中,6000 r/min 离心 10 min,所得藻泥用超纯水进行清洗后继续进行离心,重复两次,得到的藻泥进行冷冻干燥,然后用分析天平准确称量干燥后藻粉的最终质量并计算差值。

通过细胞密度计算出不同培养条件下三角褐指藻的比生长速率  $\mu/d$ 。比生长速率计算公式:

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

## 1.3 实验设计及处理

实验室之前的研究成果表明:三角褐指藻在盐度 25、pH 值 8.0、尿素为氮源(含氮量  $1.76 \text{ mmol/L}$ )的条件下其生长状况最佳。本次户外跑道池研究实验中选用盐度、pH 值、氮源种类为主要影响因子(考虑到生产成本,氮源选用较为廉价的尿素和碳铵),探究其对三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的影响。影响因子的浓度设计及氮源种类见表 3。

表 3 影响因子实验设计

Table 3 Experiment design of influence factors

	1	2	3
盐度	20	25	30
pH	7.5	8.0	8.5
氮源种类	尿素	碳酸氢铵	-

实验过程中,通过跑道池、 $\text{CO}_2$  储气罐、pH 检测器和通气管道来维持 pH 值的恒定。通气管道的一端与储气罐相连,另一端伸入跑道池内的藻液中,检测器具有一根浸没于藻液中的 pH 电极,通过电极检测跑道池内的藻液 pH 值,然后将测得的 pH 与检测器所设定的阈值相比较,并形成阈值比较信号;通气管道上具有电子通气控制器能够控制通气管道的气路通断,电子通气控制器与检测器连接并可接收检测器的阈值比较信号,并根据所接收的阈值比较信号控制电子通气控制器,从而实现 pH 值的稳定。实验结束后,通过对细胞密度、OD 值以及岩藻黄素的积累情况进行分析对比,以确定户外高密度培养三角褐指藻的最适宜条件。

### 1.3.1 盐度对三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的影响

盐度优化实验在一级跑道池中进行。培养基采用 f/2 人工海水培养基；碳铵为氮源（含氮量 1.76 mmol/L）；pH 值 8.0（通过通入 CO<sub>2</sub> 控制 pH 恒定）；设置 A、B、C 三池，盐度分别为 20、25 和 30；使用电机搅拌，搅拌速率 80 r/min。保持接种密度相同。实验时间在 4 月上旬。

### 1.3.2 pH 值对三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的影响

pH 优化实验在一级跑道池中进行。设置 A、B、C 三池，在接种密度相同的条件下，通过通入 CO<sub>2</sub> 分别控制培养基 pH 在 7.5、8.0 和 8.5；培养基采用 f/2 人工海水培养基；碳铵为氮源（含氮量 1.76 mmol/L）；选取最优盐度 20；使用电机搅拌，搅拌速率 80 r/min。实验时间在 4 月中旬。

### 1.3.3 氮源对三角褐指藻生长及岩藻黄素积累的影响

氮源优化实验在一级跑道池中进行。设置 A、B 两池，采用去除氮源的 f/2 培养基，分别以尿素和碳铵为氮源（含氮量 1.76 mmol/L）；选取最优盐度 20，最优 pH 值 8.0，使用电机搅拌，搅拌速率 80 r/min。实验时间在 4 月下旬。

### 1.3.4 一个光暗周期中岩藻黄素含量的变化

在一级跑道池中，采用 f/2 人工海水培养基；盐度 20；pH 值 8.0；碳铵为氮源（含氮量 1.76 mmol/L）培养三角褐指藻。培养至稳定期时，从第一天晚上 7 点开始每三个小时取样一次，一直持续到次日晚上 7 时测定一天中三角褐指藻岩藻黄素含量的变化。实验时间在 4 月下旬。

### 1.3.5 光照强度和温度的测定

分别使用 TES 132A 光照强度测量计和酒精温度计进行光照强度和水温的测定，每隔一个小时测定一次，记录数据。

## 1.4 岩藻黄素的提取分析

准确称取 10 mg 藻粉，装入 2 mL 冻存管中，添加适量陶瓷珠。加入 4 °C 丙酮提取液，每次添加量 1 mL，用振荡器在 3800 r/min 下，震荡 30 s。用液氮浸提 5 min，离心收集上清液至 15 mL 离心管中，反复进行多次，直至藻泥变成白色。合并所有上清液，用氮气吹干离心管中有机溶剂。用色谱级丙酮定容至 1 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤后，置于棕色进样瓶中。全过程保持色素溶液处于无光或短暂弱光中。

HPLC 系统采用 Waters 双 1525 泵和 2996 二极管

阵列检测器(Waters, MA, USA), Waters Spherisorb® ODS2 C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)。流动相由 A 液(乙腈/甲醇/0.1 M Tris-HCl, 体积比为 84:2:14, pH 8.0) 和 B 液(甲醇/乙酸乙酯, 体积比为 68:32) 组成。梯度洗脱: 从 100% A 线性变化到 100% B, 1~15 min; 100% B, 15~22 min; 从 100% B 线性变化到 100% A, 22~25 min; 100% A, 25~30 min。流速为 1.2 mL/min。进样量为 20 μL。色素的吸收光谱从 250 nm 到 700 nm, 在其峰位置 450 nm 处测定岩藻黄素的含量<sup>[12]</sup>。

## 1.5 数据统计

采用 Microcal Origin 8.5 Software 对数据进行处理和统计学分析, 实验数据均采用平均值±标准误差 (mean±SD) 给出 (n=3)。采用 t 检验来确定各试验组之间差异,  $p < 0.05$  为显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 三角褐指藻色素的定性定量分析

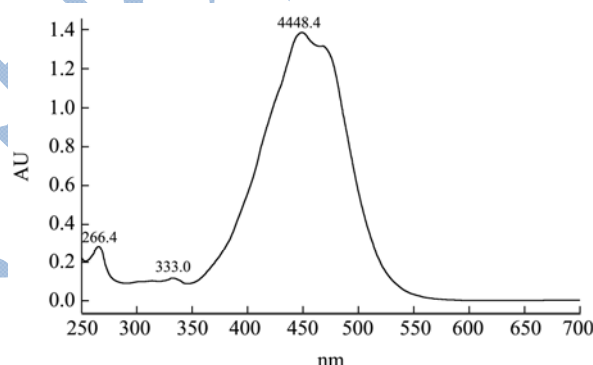


图 3 250~700 nm 波长扫描下岩藻黄素标准品的光谱图

Fig.3 Spectrogram of the fucoxanthin standard at wavelength range of 250~700 nm

本研究检测了三角褐指藻在不同条件下, 不同生长阶段的岩藻黄素含量。首先通过 HPLC 法, 以岩藻黄素浓度 (μg/mL) 为纵坐标, 以峰面积为横坐标建立不同浓度的标准品与其峰面积的回归曲线 (线性回归方程如表 4)。

表 4 岩藻黄素浓度 (μg/mL) 与峰面积的关系

Table 4 The relationship between the fucoxanthin concentration (μg/mL) and the peak area

色素标准品	回归方程	相关系数 R <sup>2</sup>	线性范围
岩藻黄素	y=9.9E-6x-34.501	0.9806	2.5~40 μg/mL

岩藻黄素标准品在 250~700 nm 波长下扫描的光谱图见图 3。如图 3 所示, 三角褐指藻在 450 nm 处有最大吸收峰。

岩藻黄素标准品在 450 nm 条件下的 HPLC 光谱

图见图 4。如图 4 所示, 岩藻黄素的定性出峰时间在第 8 min。

450 nm 条件下三角褐指藻色素提取液的 HPLC 光谱图如图 5 所示。

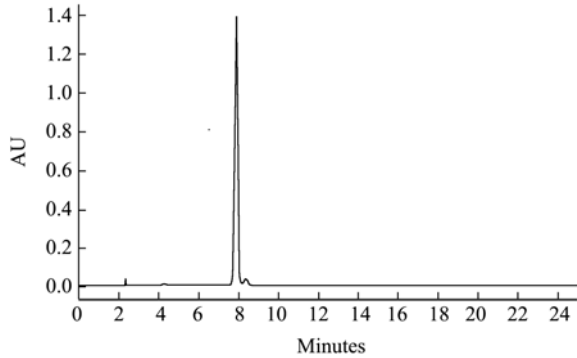


图 4 450 nm 下岩藻黄素标准品的 HPLC 谱图

Fig.4 HPLC spectrum of fucoxanthin standard at 450 nm

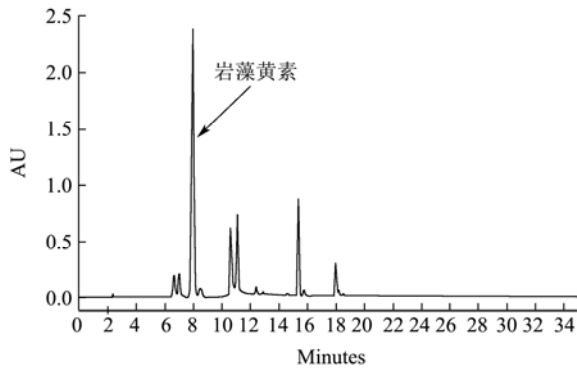


图 5 450 nm 下三角褐指藻色素提取液的 HPLC 谱图

Fig.5 HPLC spectrum of *P. tricornutum* pigment extract at 450 nm

通过 HPLC 光谱图的出峰时间可以对三角褐指藻提取液中的岩藻黄素进行定性的分析, 通过峰面积及回归曲线可以对三角褐指藻中岩藻黄素含量进行一个定量的分析。

## 2.2 光照强度和温度的变化情况

盐度、pH 和氮源优化过程中的最高光照强度和最高温度以及一个光照周期中的光照强度和温度随时间的变化如图 6 所示。

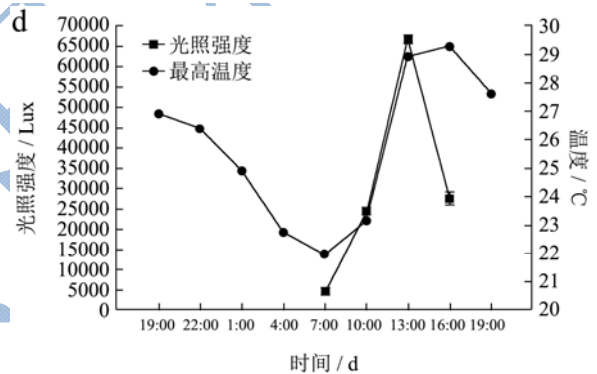
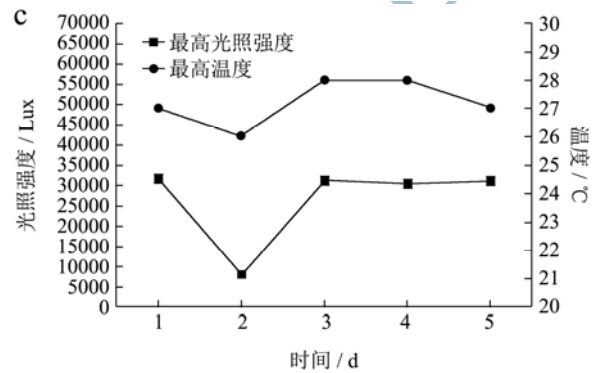
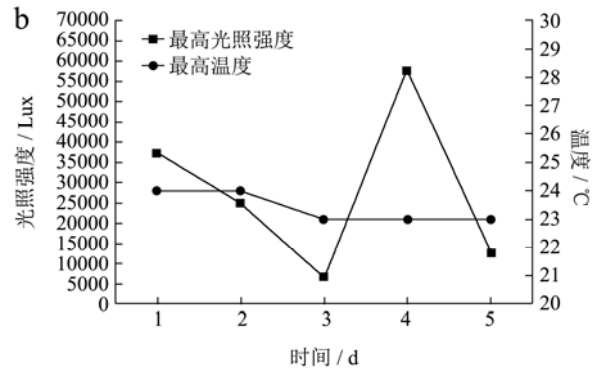
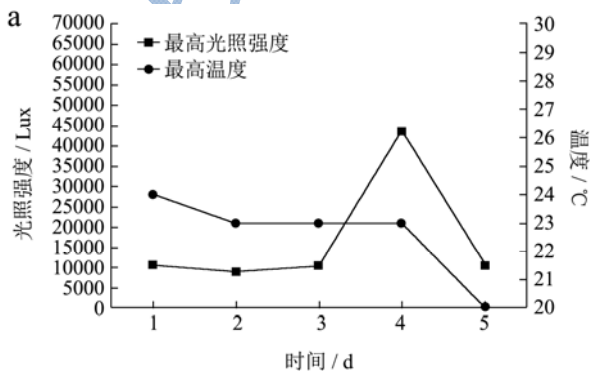


图 6 光照强度和温度随时间的变化

Fig.6 Light intensity and temperature change over time

注: 图 6a 表示盐度优化期间最高光强和最高温度变化情况; 图 6b 表示 pH 优化期间最高光强和最高温度变化情况; 图 6c 变化氮源优化期间最高光强和最高温度变化情况; 图 6d 表示一个光暗周期内光照强度和温度变化情况。

由于三组优化实验分时段进行, 从图 6 中可以看出, 不同时间光照强度和温度的变化存在较大差异。

由图 6a 可以看出, 盐度优化过程中的最大光照强度和最高温度无显著的波动性变化, 最大光照强度基本维持在 10000 Lux, 最高温度基本维持在 20~25 °C。由图 6b 可以看出, pH 优化过程中的最高温度无显著的波动变化, 基本维持在 23~24 °C; 最大光照强度呈现出波动式的变化, 在培养的第 1 d、第 4 d 光照强度普遍偏高, 在培养的第 3 d 最大光强仅为 5000 Lux。由图 6c 可以看出, 氮源优化过程中水温及光照强度普遍偏高, 最高水温基本维持在 26~28 °C, 最大光强基本维持在 30000 Lux。由图 6d 可以看出, 在 13 时光

照最强,并且在13时~19时,培养池的水温普遍偏高,基本维持在27℃以上。

### 2.3 不同培养条件下三角褐指藻的比生长速率

率

户外不同条件下三角褐指藻的比生长速率如表5所示。

表5 不同条件下三角褐指藻的比生长速率

Table 5 The specific growth rate of *P. tricornutum* under different conditions

盐度	比生长速率/(μ/d)	pH 值	比生长速率/(μ/d)	氮源	比生长速率/(μ/d)
20	0.157	7.5	-	尿素	0.138
25	0.136	8.0	0.191	碳酸氢铵	0.133
30	0.132	8.5	0.107		

注: pH 7.5 条件下,三角褐指藻的生长受到抑制,其比生长速率不做表示。

### 2.4 培养基盐度对三角褐指藻生长情况及岩藻黄素含量的影响

藻黄素含量的影响

不同盐度对三角褐指藻生长情况的影响如图7a、7b、7c。如图所示,随着培养时间的变化,三角褐指藻的OD值、细胞密度、干重呈现出不断增长的趋势。

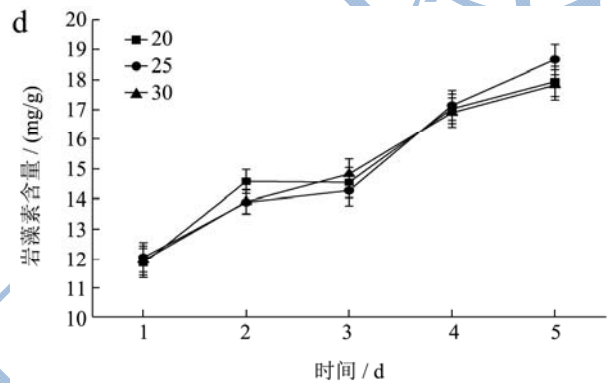
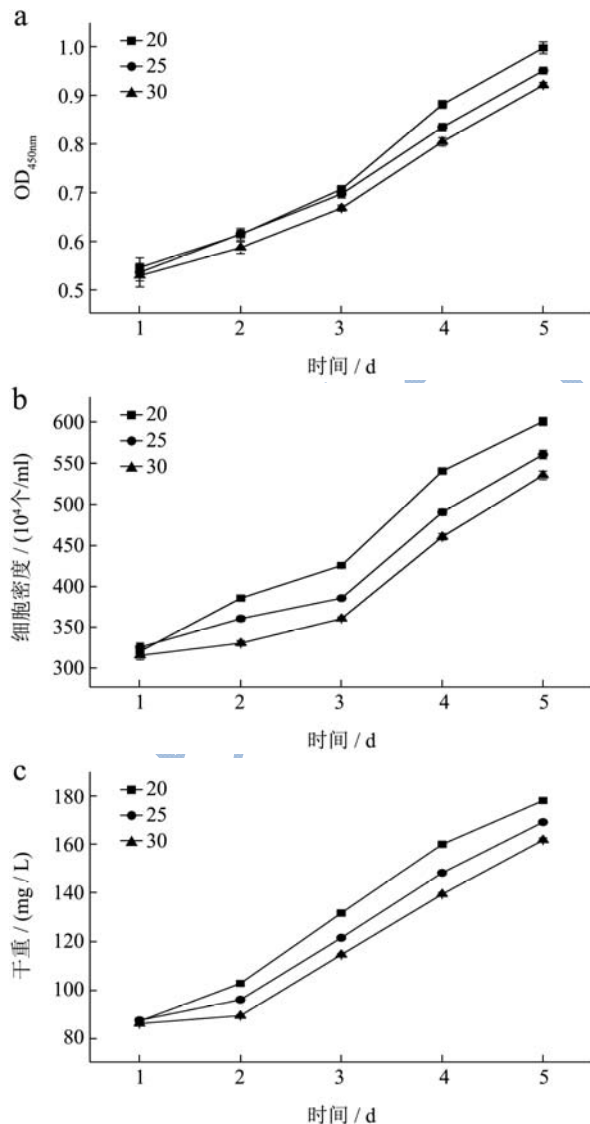


图7 不同盐浓度下OD值(a)、细胞数(b)、干重(c)和岩藻黄素含量(d)的变化

Fig.7 Effects of different salinity on the OD value (a), cell counts (b), dry biomass concentration (c) and the fucoxanthin content (d) of *P. tricornutum*

随着培养液盐度的增加,OD值、细胞密度、干重的增长有显著性差异( $p < 0.05$ )。实验进行到第3d时,细胞进入到指数增长期,细胞增长较快。在第5d时,盐度为20条件下的OD值、细胞密度、干重最大,分别为0.998、 $6.01 \times 10^6$  mL、177.78 mg/L;盐度为25条件下次之,OD值为0.951、细胞密度为 $5.67 \times 10^6$  mL、干重为165.93 mg/L;盐度为30条件下的细胞密度、OD值及干重最低,分别为0.921、 $5.36 \times 10^6$  mL、158.52 mg/L。如表5所示,在盐度为20的条件下,三角褐指藻的比生长速率最高为0.157。

三角褐指藻对盐度的适应范围较广,在盐度为9~92的范围内都能生存<sup>[13]</sup>。然而较高和较低的盐度,都不利于三角褐指藻的生长,随着盐度的升高,其生物量呈现出先增加后下降的趋势这可能是由于盐度对细胞渗透压、细胞膜的通透性等产生了影响。

不同盐度对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响如图7d所示。由图7d可知,随着培养时间的增加,岩藻黄素含量呈现出不断增长的趋势。稳定期时不同盐度条件下,岩藻黄素含量无显著性差异( $p > 0.05$ )。在盐

度为 20 条件下, 岩藻黄素含量最高为 18.65 mg/g。

从图 6a 可以看出培养过程中的最高光强基本维持在 10000 Lux 左右; 最高温度基本维持在 20~24 °C 之间, 光照强度和温度都较适宜于三角褐指藻的生长和岩藻黄素的积累。因此三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量呈现出不断增长的趋势。

因此, 盐度为 20 的条件下, 不仅适合三角褐指藻的生长, 更有利于岩藻黄素的积累。

### 2.5 培养基 pH 值对三角褐指藻户外生长情况及岩藻黄素含量的影响

从图 8a、8b、8c 中可以看出, 在起始两天内, 不同 pH 条件下 OD 值、细胞密度及干重均呈现增长的趋势。从实验第 3 d 开始, 三种 pH 值下的 OD 值、细胞密度及干重的增长速率发生了明显的变化, pH 值 8.0 下的 OD 值、细胞密度和干重增长迅速, 最终 OD 值高达 1.045、细胞密度为  $5.8 \times 10^6$ /mL、166.39 mg/L; pH 值 8.5 条件下的 OD 值、细胞密度及干重相对增长缓慢, 最终 OD 值达到 0.635、细胞密度为  $4.15 \times 10^6$ /mL、干重为 114.72 mg/L; 而 pH 值为 7.5 条件下的 OD 值、细胞密度及干重则开始下降, 最终 OD 值为 0.352、细胞密度为  $1.75 \times 10^6$ /mL、干重为 66.11 mg/L。培养结束后, pH 8.0 条件下的生物量明显高于 pH 7.5 和 pH 8.5 条件下的生物量 ( $p < 0.05$ )。如表 5 所示, pH 值在 8.0 条件下, 比生长速率最高, 达到 0.191。

海洋微藻的最适生长 pH 值与海水相接近约为 8.0, 但不同藻种之间也具有差异性。陈峰等<sup>[14]</sup>研究指出 pH 值的变化会影响微藻细胞内外离子平衡、相关膜的结构组成、渗透压及藻细胞内相关酶的活性, 一旦偏离最适 pH 值, 微藻的生长及体内相关代谢活动会受抑制。吴伟伟等<sup>[15]</sup>研究发现三角褐指藻的最适生长 pH 值是 8.0, 且与 pH 值 7.5 和 8.5 的差异性显著。本实验中三角褐指藻的最适生长 pH 值为 8.0, 这与之前的研究呈现出相同的变化规律。

如图 8d 所示, 在培养周期内, 不同 pH 值条件下, 岩藻黄素的含量呈现出一种波动式的变化。这可能是光照和温度等其他因素共同作用得到的结果。从图 6b 可以看出, 培养过程中最高水温维持在 23~24 °C, 比较有利于三角褐指藻的生长; 在光照较强的第 4 d, 岩藻黄素明显的下降, 而在光照强度较低的第 2 d、第 3 d、第 5 d 岩藻黄素含量都相对较高。和初始接种时相比, 整体呈现出一个下降的趋势。pH 值为 8.0 的培养基下降的较少, 岩藻黄素含量相对较高。

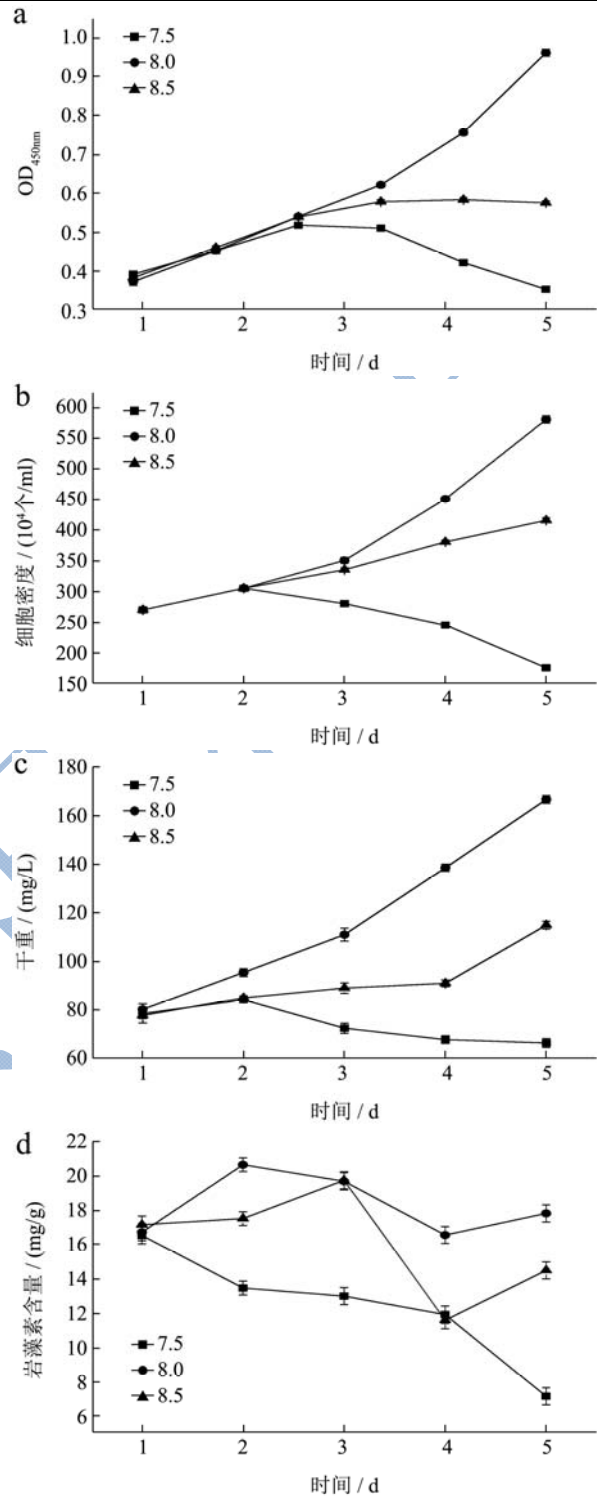


图 8 不同 pH 条件下 OD 值 (a)、细胞数 (b)、干重 (c) 和岩藻黄素含量 (d) 的变化

Fig.8 Effects of different pH on the OD value (a), cell counts (b), dry biomass concentration (c) and the fucoxanthin content (d) of *P. tricornutum*

Huang C C 等<sup>[16]</sup>研究发现在光照强度较低时, 叶绿素 a 和其他捕光色素 (叶绿素 b、叶绿素 c 和岩藻黄素等) 含量增加; 在光照强度较高时, 一些次级类胡萝卜素 (如  $\beta$ -胡萝卜素、虾青素和叶黄素) 等起光

保护作用的色素的含量会增加。本次实验中, 由于户外光照强度的不断变化, 岩藻黄素含量呈现出波动式的变化, 并且与之前的研究规律相同。研究表明在 pH 8.0 的条件下, 岩藻黄素的含量相对较高, 这可能由于偏离最适 pH 后, 三角褐指藻胞内相关代谢活动受抑制所造成的。

由此可以看出 pH 8.0 的条件下, 不仅适合三角褐指藻的生长, 更有利于岩藻黄素的积累。

## 2.6 培养基氮源的种类对三角褐指藻户外生长情况及岩藻黄素含量的影响

如图 9a、8b 和 9c 所示, 与碳酸氢铵相比尿素对三角褐指藻生长的促进效果更加显著 ( $p < 0.05$ ), 最终 OD 值为 0.667、细胞密度为  $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ 、干重为 150.83 mg/L。从表 5 可以看出, 以尿素为氮源三角褐指藻的比生长速率略高, 为 0.138。不同氮源对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响如图 9d 所示。

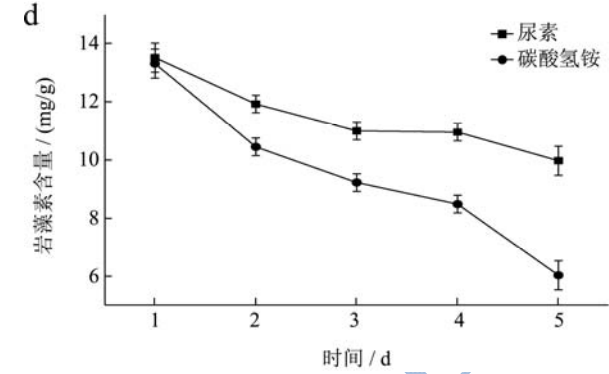
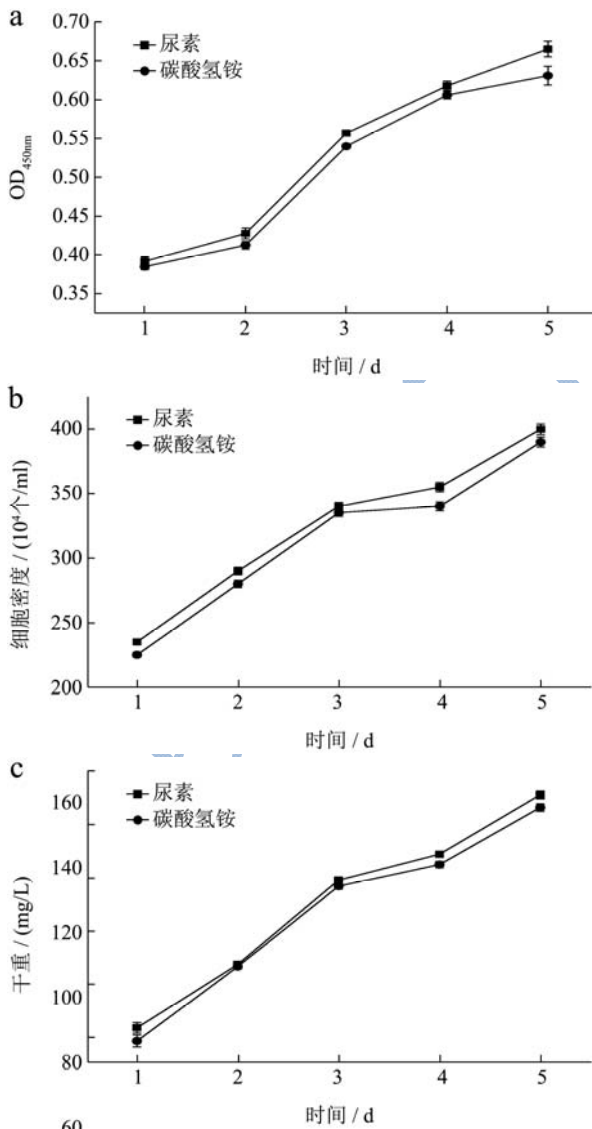


图 9 不同氮源条件下 OD 值 (a)、细胞数 (b)、干重 (c) 和岩藻黄素含量 (d) 的变化

Fig.9 Effects of different nitrogen sources on the OD value (a), cell counts (b), dry biomass concentration (c) and the fucoxanthin content (d) of *P. tricornutum*

从图中可以看出, 随着培养时间的变化, 岩藻黄素含量呈现出不断下降的趋势。培养至第 5 d 时, 碳酸氢铵中岩藻黄素含量明显高于尿素中岩藻黄素含量, 达到 9.96 mg/g。从图 6c 可以看出, 氮源优化过程中的光照强度相对较高, 最高光强普遍达到 30000 Lux 以上, 并且温度也相对较高, 最高温度基本维持在 26~28 °C。

氮是微藻生长所必需的, 同时也是藻体内蛋白质、核酸及色素合成的重要元素, 对微藻的生长发育有着非常重要的作用。光照、温度和氮源类型等对微藻的生长、油脂和色素的积累及多糖含量与脂肪酸组成也有着较为显著的影响<sup>[17]</sup>。培养过程中岩藻黄素含量的下降可能与培养过程中较高的光照强度、温度及氮源浓度等环境因素紧密相关。

三角褐指藻能利用铵态氮、硝态氮、尿素态氮及其他无机氮源。氮源的种类、浓度都会对三角褐指藻的生长、岩藻黄素的积累产生影响。考虑到生产成本, 本实验选用经济实用的尿素和碳铵为氮源, 得出尿素更有利于三角褐指藻的生长, 碳酸氢铵更有利于岩藻黄素的积累。因此, 以碳铵为氮源更有利于岩藻黄素的积累及生产。

## 2.7 一个光暗周期内岩藻黄素含量变化

如图 10 所示, 一天中不同时刻岩藻黄素含量呈现出波动式的变化趋势, 岩藻黄素含量分别在晚上 10 时, 上午 4 时及下午 4 时, 取得最大峰值。

在起始的 19 时~22 时, 岩藻黄素含量有一个明显的上升。从图 6d 可以看出, 此时温度明显下降, 较利于三角褐指藻的生长及岩藻黄素的积累。从 22 时以后, 由于氮源的缺乏, 岩藻黄素含量整体呈现出下降的趋势, 并且在光照强度及温度都相对较高的 13 时,



达到最低值。

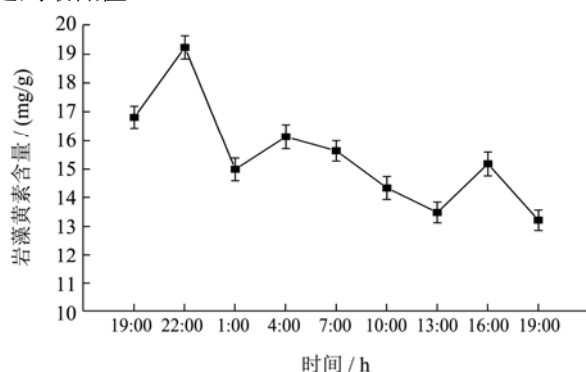


图 10 一个光照周期内岩藻黄素含量变化

Fig.10 Changes in the fucoxanthin content of *P. tricornutum* in a light cycle

### 3 结论

本研究表明,三角褐指藻在户外开放式跑道池中,在盐度为 20、pH 值为 8.0、碳铵为氮源的环境中生长较快,岩藻黄素的含量较高,适合大规模生产。此外,藻种采集可以选择在晚上 10 时左右进行,以获得最大生物量和岩藻黄素含量。在今后的研究中,多个因素之间的交互作用,及交互作用下的最优水平,以及户外条件下对光强、温度等的控制仍需要更深入的探究。

### 参考文献

- [1] Wu H, Li T, Wang G, et al. A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricornutum* strains from different origins [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(2): 391-398
- [2] Takaichi S. Distributions, biosyntheses and functions of carotenoids in algae [J]. Marine Drugs, 2013, 9(6): 1101-1018
- [3] Peng J, Yuan J-P, Wu C-F, et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health [J]. Marine Drugs, 2011, 9(10): 1806-1828
- [4] Gammone M A, D'Orazio N. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin [J]. Marine Drugs, 2015, 13(4): 2196-214
- [5] 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
- [6] 臧正蓉,解修俊,赵佩佩,等.温度和光照对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响[J].海洋科学,2015,39(7):1-6
- [7] ZANG Zheng-rong, XIE Xiu-jun, ZHAO Pei-pei, et al. Effects of temperature and light on growth and fucoxanthin content of *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Marine Sciences, 2015, 39(7): 1-6
- [7] Xia S, Wang K, Wan L, et al. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita* [J]. Marine Drugs, 2013, 11(7): 2667-2681
- [8] Kim S M, Jung Y-J, Kwon O N, et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(7): 1843-1855
- [9] Carvalho A P, Meireles L A, Malcata F X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances [J]. Biotechnology Progress, 2006, 22(6): 1490-1506
- [10] Norsker N-H, Barbosa M J, Vermu M H, et al. Microalgal production-a close look at the economics [J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 24-27
- [11] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [M]. Culture of marine invertebrate animals. Springer, 1975
- [12] Sugawara T, Matsubara K, Akagi R, et al. Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 9805-9810
- [13] 赵萍,邹宁,孙东红,等.盐度对三角褐指藻生长及有机质积累的影响[J].中国油料作物学报,2013,35(2):217-220
- [14] ZHAO Ping, ZOU Ning, SUN Dong-hong, et al. Effects of salinity on growth and organic matter accumulation of *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(2): 217-220
- [14] 陈峰,姜悦.微藻生物技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999
- [15] CHEN Feng, JIANG Yue. Thematic technology of microalgae [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999
- [15] 吴伟伟.环境因子和抑制剂对三角褐指藻脂肪酸合成的影响[D].南京:南京农业大学,2012
- [15] WU Wei-wei. Effects of environmental factors and inhibitors on fatty acid synthesis of *Phaeodactylum tricornutum* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [16] Huang C C, Hung J J, Peng S H, et al. Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: influences of CO<sub>2</sub> and nitrogen sources on the accelerated growth [J]. Bioresource Technology, 2012, 112(112): 228

- [17] Gómez-Loredo A, Benavides J, Rito-Palomares M. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum*, and *Isochrysis galbana*, cultures at different light and agitation conditions [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 849-860

现代食品科技