

植物激素组合促进兼养三角褐指藻高产岩藻黄素

邓敬文, 杨泽雄, 魏东*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究旨在优化多种植物激素浓度及其组合, 以促进兼养三角褐指藻高产岩藻黄素。结果表明: 以岩藻黄素产率为指标, 吲哚乙酸、吲哚甲醛和水杨酸单独添加的最适终质量浓度分别为 0.37、0.042 和 0.4 mg/L。进一步优化确定了 0.37 mg/L 吲哚乙酸和 0.4 mg/L 水杨酸为最佳组合, 此时岩藻黄素产率提高到 4.53 mg/(L·d)。将该组合与类植物激素—木质素磺酸钙 (10 mg/L) 进行再组合, 并在 5 L 光发酵罐中验证生产性能。结果表明, 在光发酵结束时细胞密度 (1.20×10^8 cells/mL)、比生长速率 (0.25 d)、生物量浓度 (4.17 g/L)、生物量产率 [367.09 mg/(L·d)] 以及岩藻黄素含量 (16.61 mg/g) 和产率 [6.93 mg/(L·d)] 均达到该研究的最高值, 与不添加相比, 生物量产率、岩藻黄素含量和产率分别显著提高了 28.42%、40.05% 和 65.00% ($P<0.05$)。该研究开发了一种多植物激素组合协同技术, 显著提高了生物量产量和岩藻黄素产率, 为兼养三角褐指藻高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; 兼养培养; 植物激素; 木质素磺酸钙

文章编号: 1673-9078(2025)05-184-193

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0223

The Combination of Phytohormones Promotes High-yield Fucoxanthin Production by Mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum*

DENG Jingwen, YANG Zexiong, WEI Dong*

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

Abstract: In order to promote the high-yield production of fucoxanthin in mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum*, the concentration and combination of multiple phytohormones were optimized in this study. The results showed that with the fucoxanthin yield as the index, the optimal final mass concentrations of 3-indoleacetic acid, indole-3-carboxaldehyde and salicylic acid (0.4 mg/L) were determined to be 0.37, 0.042 and 0.4 mg/L, respectively. Further optimization revealed that 0.37 mg/L indoleacetic acid and 0.4 mg/L salicylic acid were the optimal combination, resulting in the increase of fucoxanthin yield to 4.53 mg/(L·d). The combination was further recombined with phytohormone-like calcium lignosulfonate (10 mg/L), and the production capacity was evaluated in a 5-L photo-fermenter. The results showed that at the end of photo-fermentation, the cell density (1.20×10^8 cells/mL), specific growth rate (0.25 d), biomass concentration (4.17 g/L), biomass production rate (367.09 mg/(L·d)) as well as fucoxanthin content (16.61 mg/g) and yield (6.93 mg/(L·d)) reached the highest value. Biomass production rate, fucoxanthin content and yield increased significantly increased (by 28.42%, 40.05%, and 65.00%, respectively) ($P<0.05$) compared with those in the absence of added phytohormone. A technology based on

引文格式:

邓敬文,杨泽雄,魏东.植物激素组合促进兼养三角褐指藻高产岩藻黄素[J].现代食品科技,2025,41(5):184-193.

DENG Jingwen, YANG Zexiong, WEI Dong. The combination of phytohormones promotes high-yield fucoxanthin production by mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 184-193.

收稿日期: 2024-02-27

基金项目: 国家食品营养与安全重点研发计划专项 (2023YFF1104100)

作者简介: 邓敬文 (2000-), 男, 硕士, 研究方向: 工业生物技术, E-mail: 826353722@qq.com

通讯作者: 魏东 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业生物技术, E-mail: fewd304@scut.edu.cn

synergistic phytohormone combination was developed in this study, which significantly increased the biomass yield and fucoxanthin production rate, thereby providing a new technical support for the high-yield production of fucoxanthin in mixotrophic *Phaeodactylum tricornutum*.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; fucoxanthin; mixotrophic cultivation; phytohormones; calcium lignosulfonate

岩藻黄素 (Fucoxanthin, Fx) 是海洋藻类的重要类胡萝卜素, 主要存在于大型褐藻和单细胞硅藻、金藻中^[1,2]。因自身特殊的分子结构 (如丙二稀键等), 具有多种生物活性和潜在辅助治疗功能, 包括抗炎症、抗氧化、抗肥胖、抗糖尿病、保护皮肤和肝脏以及预防老年痴呆等^[2-5], 可作为食品色素、膳食补充剂和潜在药物^[6,7]。当前, 岩藻黄素商业化产品主要来自于大型褐藻提取物, 存在原料中含量极低 (0.02~1.01 mg/g)^[8,9]、提取工艺复杂且纯度低、提取物生产成本极高等难题^[10], 难以满足市场需求。海洋硅藻模式种—三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 被认为是生产岩藻黄素的最佳生产者, 具有高光合效率和高岩藻黄素含量 (8.8~59.2 mg/g)^[11,12]。兼养是指在光照条件下, 既可以利用无机物进行光合作用, 又能同时利用有机物作为碳源和能源进行生长的一种营养方式, 通过兼养培养能够快速增殖细胞并积累生物量^[13], 生产岩藻黄素的同时还可联产二十碳五烯酸、金藻昆布多糖等高值产物^[11]。然而, 目前兼养培养仍存在岩藻黄素含量不高、尚未实现高密度发酵等技术难题, 亟需进一步优化兼养三角褐指藻高产岩藻黄素的关键影响因子, 为商业化生产岩藻黄素提供技术支撑。

植物激素作为微藻细胞代谢中重要的信号调节分子, 仅需微量便可促进细胞繁殖和生物量积累, 或者定向诱导高值产物合成基因的表达, 实现高值产物的高效生产^[14]。当前, 植物激素在促进三角褐指藻积累岩藻黄素方面已有众多研究, 如植物激素脱落酸 (Abscissic Acid, ABA)、赤霉素 (Gibberellin, GA3)、吲哚乙酸 (3-Indoleacetic Acid, IAA)、吲哚甲酯 (Indole-3-carboxaldehyde, ICA)、水杨酸 (Salicylic Acid, SA) 均能促进三角褐指藻细胞生长, 并且在 IAA、ICA 和 SA 作用下, 岩藻黄素合成相关基因 (*PSY*、*ZEP1*、*ZEP2* 等) 的表达水平均显著上调, 有效促进了积累岩藻黄素^[15]。此外茉莉酸甲酯 (Methyl Jasmonate, MeJA)、乙酰水杨酸 (Aspirin, ASA)、花生四烯酸 (Arachidonic Acid, AA) 也能显著定向诱导三角褐指藻积累岩藻黄素^[16]; 0.05 mol/L 2,4-表油菜素内酯 (2,4-Epibrassinolide, EBR) 能显著提高三角褐指

藻的生物量、多糖、蛋白质和岩藻黄素含量^[17]。此外, 类植物激素—木质素磺酸钙能够有效促进淡水微藻 *Euglena gracilis* 细胞生长、提高生物量和脂质产率^[18]; 10 mg/L 木质素磺酸钙可同时促进三角褐指藻积累岩藻黄素、二十碳五烯酸、金藻昆布多糖等高值产物^[19]。然而, 当前研究主要集中在单一植物激素的作用机制上, 缺乏多种植物激素及其组合对于三角褐指藻的作用规律探究。本研究以三角褐指藻为研究对象, 在摇瓶和 5 L 光发酵罐中优化和验证多种植物激素及其组合对促进兼养细胞生长和提高岩藻黄素含量和产率的效应规律, 为利用兼养三角褐指藻高效生产岩藻黄素提供新的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 藻种、培养基与培养条件

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。培养基为改良 f/2 培养基^[20], 采用 0.1 mol/L 甘油和 0.02 mol N/L 混合有机氮源 (胰蛋白胍: 尿素 = 1:1, mol N: mol N), 在 20 °C、光强 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 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 试剂与仪器

吲哚乙酸, 购自上海源叶生物科技有限公司; 吲哚甲酯、木质素磺酸钙, 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 水杨酸, 购自福晨 (天津) 化学试剂有限公司; 岩藻黄素标准品, 购自美国 Sigma Aldrich 公司, 均为色谱纯试剂, 甘油, 购自天津市富宇精细化工有限公司; 胰蛋白胍, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 尿素, 购自天津市大茂试剂厂, 均为分析纯试剂。

DHZ-DA 型恒温光照摇床, 太仓实验设备厂; AL104 型电子天平、Inpro6800 型溶氧电极和 HA405-DPA-SC-S8 型 pH 计, Mettler Toledo 公司; CytoFLEX, 美国 Beckman Coulter 公司; Allegra 25R 型高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; Modulyod 冷冻干燥机, 美国热电公司; GLZ-B 型光

量子计, 浙江托普仪器有限公司; M-100 型生物传感分析仪, 深圳西尔曼科技有限公司; 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; AMA240 型高压灭菌锅, Astell 公司。LED 灯条 (自然白), 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。5 L 发酵罐及其结构参数见文献^[21]。发酵罐四面环绕并联放置白光 (R:G:B=19.7:76.3:4.0) LED 灯板以提供外光源。

1.2 实验方法

1.2.1 种子液制备

从斜面上挑取适量藻苔, 接种至含有 100 mL 无菌兼养 f/2 培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于连续光照的恒温光照摇床中, 在 20 °C、20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ LED 白光 (W)、160 r/min 条件下培养 10~12 d。

1.2.2 单种植物激素浓度优化

采用二甲基亚砷分别配置 0.5 g/L 吲哚乙酸 (IAA) 母液、0.06 g/L 吲哚甲醛 (ICA) 母液和 1.6 g/L 水杨酸 (SA) 母液, 经过 0.22 μm 微滤孔膜过滤除菌后备用。分别进行单种植物激素浓度优化, 具体操作为: 将种子液在 4 500 $\times$ g 条件下离心 3 min, 洗涤后重悬于无菌改良 f/2 液体培养基中, 将细胞悬液转接至含有 100 mL 无菌改良 f/2 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 吸取三种植物激素母液分别加入培养基中, 添加量控制在 0.1% (体积分数), 分别设置: IAA 终质量浓度为 0 (对照组)、0.1、0.25、0.37、0.5 mg/L; ICA 终质量浓度为 0 (对照组)、0.01、0.025、0.042、0.06 mg/L; SA 终质量浓度为 0 (对照组)、0.4、0.8、1.26、1.6 mg/L, 每个浓度组设置三个平行样。初始接种密度为每毫升 1.0×10^7 个细胞, 其余培养条件同 1.2.1。培养周期为 12 d, 每两天取样 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。

1.2.3 多种植物激素组合优化

根据上述单因素试验优化得出的最适质量浓度, 设置不添加植物激素为对照组; 添加 IAA+ICA、ICA+SA 和 IAA+SA 组合以及 IAA+ICA+SA 组合为实验组, 每个组别设置三个平行样, 其余操作同 1.2.2。

1.2.4 5 L 光发酵罐中最佳植物激素组合与类激素再组合的效果验证

将上述优化所得最佳植物激素组合与类植物激素—木质素磺酸钙 (最适质量浓度 10 mg/L^[19]) 进行再组合, 在 5 L 光发酵罐中进行 3.5 L 工作体积下的放大培养验证。在 2 台发酵罐中分别设置: 初始光强为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光质均为白光 (R:G:B=19.7:76.3:4.0), 初始通气量和转速为 1 500 mL/min 和 100 r/min。两罐均在第 4 天将通气量调高至 2 000 mL/min; 在第 7 天提高光强至 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 提高转速至 150 r/min, 降低通气量至 1 200 mL/min。光发酵过程中控制 pH 值为 8.0、温度为 20 °C。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。

1.3 分析与测试

1.3.1 细胞密度与比生长速率

采用流式细胞仪测定细胞密度^[22], 并计算比生长速率, 计算公式如下:

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

式中:

μ ——比生长速率;

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 生物量浓度和产率

采用烘干后差重法测定生物量质量浓度^[23], 并计算生物量产率, 计算公式如下:

$$Y = \frac{B_2 - B_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

式中:

Y ——生物量产率;

B_2 、 B_1 ——分别是在 t_2 (d)、 t_1 (d) 时的生物量质量浓度, g/L。

1.3.3 甘油浓度

使用 M-100 型生物传感分析仪测定甘油质量浓度, 具体方法见文献^[20]。

1.3.4 岩藻黄素含量和产率

三角褐指藻藻粉中岩藻黄素的提取方法见文献^[24]。采用配备安捷伦 1260 四元泵、DAD 和 RID 双检测器、YMC 色谱柱 (Carotenoid column C 30 柱, 4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm) 的高效液相色谱仪进行分析, 其中流动相为甲醇 (A) 和叔丁基甲醚 (B), 梯度洗脱条件为: 0~6 min, A: 95% 至 80%, B: 5% 至 20%; 6~12 min, A: 80% 至 60%, B: 20%

至 40% ; 12~19 min, A : 60% 至 55%, B : 40% 至 45% ; 19~20 min, A : 55% 至 95%, B : 45% 至 5% ; 20~23 min : A : 95%, B : 5%。用岩藻黄素标品制作外标法标准曲线并进行含量的定量分析:

岩藻黄素产率 P_{Fx} 计算公式如下:

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

式中:

P_{Fx} ——岩藻黄素产率, mg/(L·d);

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) 时的生物量质量浓度, g/L。

1.4 数据分析

数据采用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。采用 Prism 9.0 和 SPSS 软件进行数据处理和统计学分析, 包括单因素方差分析法和成对数据 t -检验进行显著性分析。数据图表中不同字母标注均表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 单种植物激素浓度的优化

不同 IAA 质量浓度下兼养细胞密度、甘油质量浓度、生物量质量浓度和岩藻黄素含量如图 1 所示, 生

产性能见表 1。由图 1 可知, 添加 IAA 能够提高细胞密度和生物量质量浓度, 在 0.37 mg/L 下二者均达到最大值为每毫升 1.13×10^8 个细胞和 4.17 g/L, 比对照组分别显著提高 11.43% 和 11.39% ($P < 0.05$), 但并未显著促进甘油消耗 ($P > 0.05$)。有研究表明, Wang 等^[15]在自养下添加 0.37 mg/L 的 IAA, 能提高三角褐指藻生物量质量浓度和岩藻黄素产量, 分别为 0.63 g/L 和 20 mg/L, 比对照组提高了 50% 以上。可能是由于 IAA 能促进胞内蛋白质^[25]、油脂^[26]合成, 表现为生物量质量浓度的提高。

由图 1d 可知, 0.1 mg/L IAA 下岩藻黄素含量达到最大值 11.81 mg/g, 但与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。这与自养下的结果报道不一致^[15], 可能是由于本研究采用兼养培养, 能提供细胞充足的营养物质供细胞生长, 但削弱了植物激素对胞内类胡萝卜素积累的效果^[27]。0.37 mg/L IAA 时生物量质量浓度和岩藻黄素含量均有提高, 岩藻黄素产率也达到最大值 4.03 mg/(L·d), 显著高于对照组 10.71% ($P < 0.05$)。有研究表明, IAA 能显著促进微藻积累类胡萝卜素和脂质, 而色素和脂质合成之间存在协调关系^[28]。IAA 也能提高胞内蛋白质和叶绿素^[29]含量, 而在三角褐指藻中岩藻黄素和这两类物质以 FCP 复合体形式存在^[30], 因此对岩藻黄素的积累有一定的促进作用。因此, 0.37 mg/L 为 IAA 的最适质量浓度。

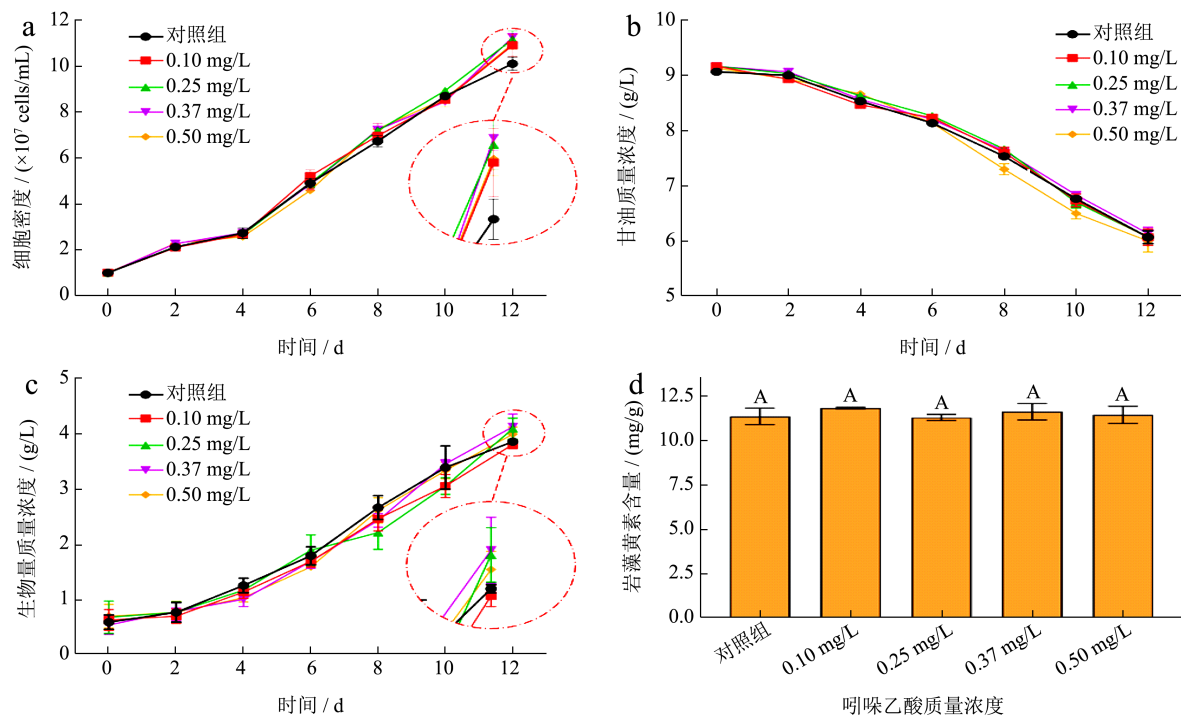


图 1 不同 IAA 质量浓度下细胞密度 (a)、甘油质量浓度 (b)、生物量质量浓度 (c) 和岩藻黄素含量 (d)

Fig.1 Cell density (a), glycerol concentration (b), biomass concentration (c) and fucoxanthin content (d) under different concentrations of IAA

表 1 不同IAA质量浓度下兼养三角褐指藻的生产性能

Table 1 Production capacity of *P. tricornutum* under different concentrations of IAA

生产性能	IAA/(mg/L)				
	对照组 (0)	0.1	0.25	0.37	0.5
比生长速率/d	0.19±0.00 ^b	0.20±0.00 ^{ab}	0.21±0.01 ^a	0.21±0.00 ^a	0.20±0.00 ^a
生物量产率/[mg/(L·d)]	271.34±10.85 ^{ab}	264.23±17.19 ^b	283.57±10.59 ^{ab}	302.25±21.28 ^a	273.14±21.99 ^{ab}
甘油消耗速率/[mg/(L·d)]	250±11.79	258.33±11.79	258.33±6.80	252.78±10.39	261.11±17.12
岩藻黄素产率/[mg/(L·d)]	3.64±0.10 ^b	3.74±0.07 ^{ab}	3.84±0.10 ^{ab}	4.03±0.03 ^a	3.80±0.23 ^{ab}

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异（*P*<0.05）。下同。

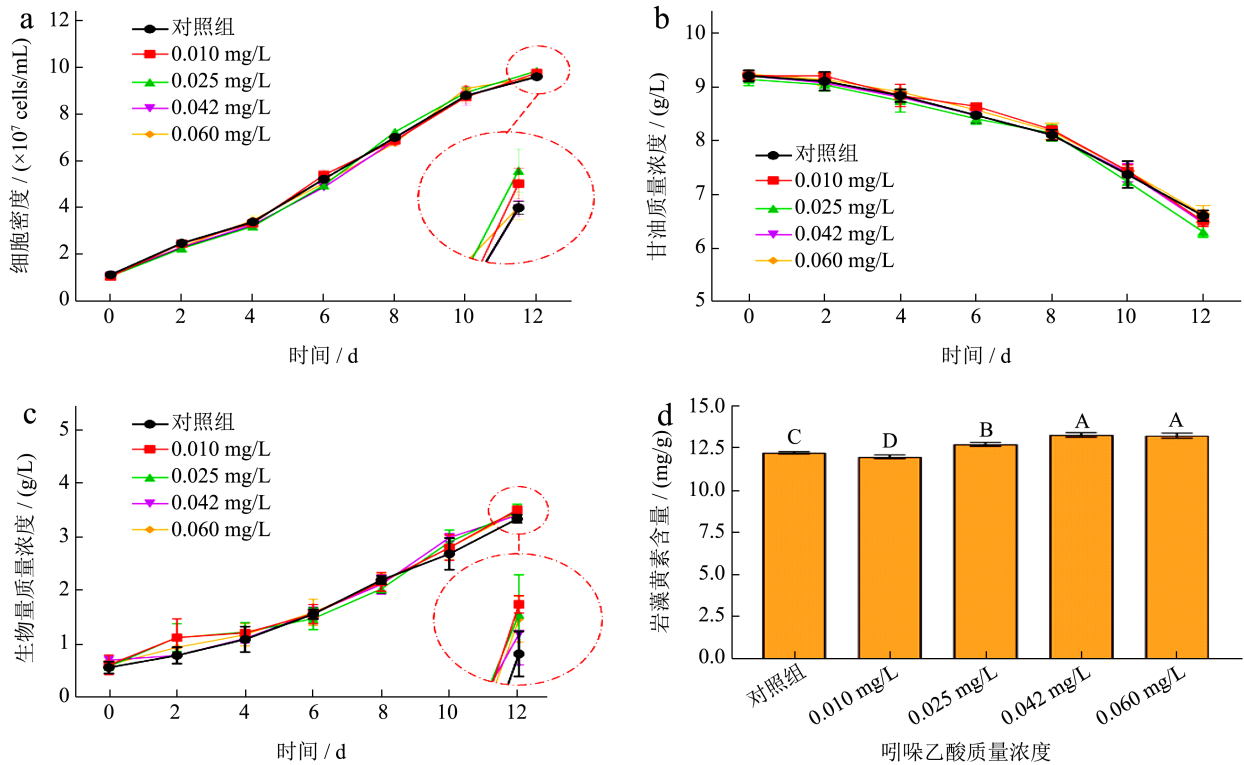


图 2 不同 ICA 质量浓度下细胞密度 (a)、甘油质量浓度 (b)、生物量质量浓度 (c) 和岩藻黄素含量 (d)

Fig.2 Cell density (a), glycerol concentration (b), biomass concentration (c) and fucoxanthin content (d) under different concentrations of ICA

表 2 不同ICA质量浓度下兼养三角褐指藻的生产性能

Table 2 Production capacity of *P. tricornutum* under different concentrations of ICA

生产性能	ICA/(mg/L)				
	对照组 (0)	0.01	0.025	0.042	0.06
比生长速率/d	0.18±0.00 ^c	0.19±0.00 ^a	0.19±0.01 ^a	0.19±0.00 ^b	0.18±0.00 ^b
生物量产率/[mg/(L·d)]	230.99±10.75	240.57±10.82	240.70±9.08	224.88±8.68	236.88±10.50
甘油消耗速率/[mg/(L·d)]	216.67±11.79	225±6.80	236.11±10.39	227.78±3.93	216.67±11.79
岩藻黄素产率/[mg/(L·d)]	3.36±0.02 ^c	3.49±0.04 ^{bc}	3.67±0.11 ^{ab}	3.76±0.12 ^a	3.80±0.08 ^a

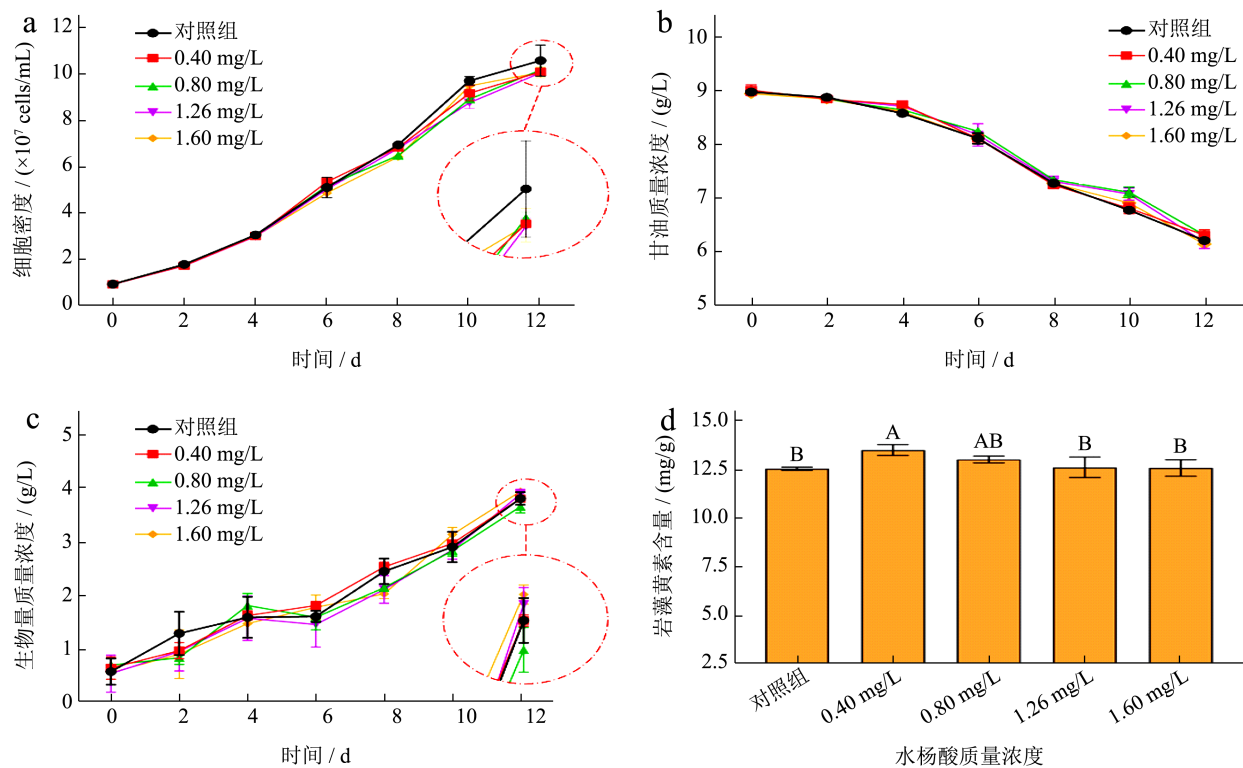


图 3 不同 SA 质量浓度下细胞密度 (a)、甘油质量浓度 (b)、生物量质量浓度 (c) 和岩藻黄素含量 (d)

Fig.3 Cell density (a), glycerol concentration (b), biomass concentration (c) and fucoxanthin content (d) under different concentrations of SA

表 3 不同SA质量浓度下兼养三角褐指藻的生产性能

生产性能	SA/(mg/L)				
	对照组 (0)	0.4	0.8	1.26	1.6
比生长速率/d	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01
生物量产率/[mg/(L·d)]	268.68±22.99 ^{ab}	262.83±14.46 ^{ab}	245.89±5.12 ^b	278.59±19.13 ^a	281.31±8.95 ^a
甘油消耗速率/[mg/(L·d)]	230.56±3.93	225±13.61	225±6.80	236.11±3.93	233.33±6.80
岩藻黄素产率/[mg/(L·d)]	3.91±0.05 ^b	4.26±0.05 ^a	3.95±0.13 ^b	4.07±0.18 ^{ab}	4.11±0.10 ^{ab}

不同 ICA 质量浓度下兼养细胞密度、甘油质量浓度、生物量质量浓度和岩藻黄素含量如图 2 所示，生产性能见表 2。由图 2a 和表 2 可知，在 0.025 mg/L 下细胞密度和生物量产率均达到最大值，分别为每毫升 0.98×10^8 个细胞和 240.70 mg/(L·d)，但与对照差异不显著 ($P>0.05$)，也未能显著提高甘油利用效率 ($P>0.05$)。有研究表明，10 mg/L 的 ICA 可作为生长素类似物，能促进球型鱼腥藻的生长和生物量积累，使其生物量产率达到 20.6 mg/(L·d)，为对照组的 2.21 倍，可能是 ICA 增强了磷酸戊糖途径，为细胞生长提供更多 ATP^[31]。

由图 2d 可知，0.042 mg/L 更有利于三角褐指藻胞内积累岩藻黄素，达到最高含量 13.27 mg/g，比

对照组显著提高了 8.68% ($P<0.05$)，岩藻黄素产率也达到 3.76 mg/(L·d)，与最大值 [0.06 mg/L, 3.80 mg/(L·d)] 无显著差异 ($P>0.05$)，但比对照显著提高了 11.90% ($P<0.05$)。有研究表明，ICA 能有效促进岩藻黄素合成相关基因 ZEP1、ZEP2 和 ZEP3 转录水平的上调，其中 ZEP3 基因的表达量是对照组的 3.22 倍，可以诱导胞内更多的碳前体物质定向流向色素合成^[15]。ICA 还能有效提高胞内脂质合成^[31]，而脂质与色素可以通过代谢流向的调节进行相互转化，促进胞内岩藻黄素的积累。

不同 SA 质量浓度下兼养细胞密度、甘油质量浓度、生物量质量浓度和岩藻黄素含量如图 3 所示，生

产性能见表3。由图3可知,添加SA导致细胞密度整体呈现下降趋势,但与对照差异不显著($P>0.05$)。1.6 mg/L下生物量质量浓度达到最大值3.92 g/L,与对照也无显著差异($P>0.05$),未能显著促进甘油消耗($P>0.05$)。有研究发现,当SA质量浓度低于2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,三角褐指藻细胞密度略微下降^[32],但差异不显著($P>0.05$)。

由图3d可知,在0.4 mg/L SA质量浓度下能够有效提高岩藻黄素含量和产率,含量达到最大值13.50 mg/g,比对照显著提高了7.66% ($P<0.05$);产率也达到最大值4.26 mg/(L·d),比对照显著提高了8.95% ($P<0.05$)。David等^[29]研究表明,1 mg/L SA可以促进菱形藻中岩藻黄素和类胡萝卜素的积累,与对照相比,岩藻黄素含量提高了1.7倍。可能是SA诱导了微藻提高类胡萝卜素相关基因的表达,进而实现类胡萝卜素的积累^[33]。此外,SA可以通过促进脂质的合成来提高生物量^[34],这使得在岩藻黄素含量提高的同时增加生物量质量浓度,进而实现岩藻黄素产率的进一步提高。因此,0.4 mg/L为SA的最佳质量浓度。

2.2 多种植物激素组合的优化

将上述0.37 mg/L IAA、0.042 mg/L ICA、0.4 mg/L SA的最适质量浓度进行组合后做细胞兼养培养,细胞密度、甘油质量浓度、生物量质量浓度和岩藻黄素含量如图4所示,生产性能见表4。由图4a、4c可知,设置的最适质量浓度组合均能显著促进兼养细胞生长和生物量积累($P<0.05$)。其中,IAA+SA组合下细胞密度达到最大值为每毫升 1.05×10^8 个细胞,比对照显著提高了6.35% ($P<0.05$),但与单独添加IAA相比提升幅度略有下降,与IAA+ICA+SA组合相比并无显著差异($P>0.05$)。这可能是由于IAA虽然能够有效促进兼养细胞的生长与分裂^[25],但SA会使得细胞密度略微下降^[32]。由图4c可知,IAA+SA组合下生物量浓度达到最大值3.94 mg/L;生物量产率为275.40 mg/(L·d),比对照显著提高了13.92% ($P<0.05$),但未能显著提高甘油消耗速率($P>0.05$)。有研究表明,多种植物激素之间存在信号转导途径相互作用,这种相互作用更有利于微藻细胞生长,如赤霉素和萘乙酸的激素组合可以将小球藻的生物量提高138%^[35]。

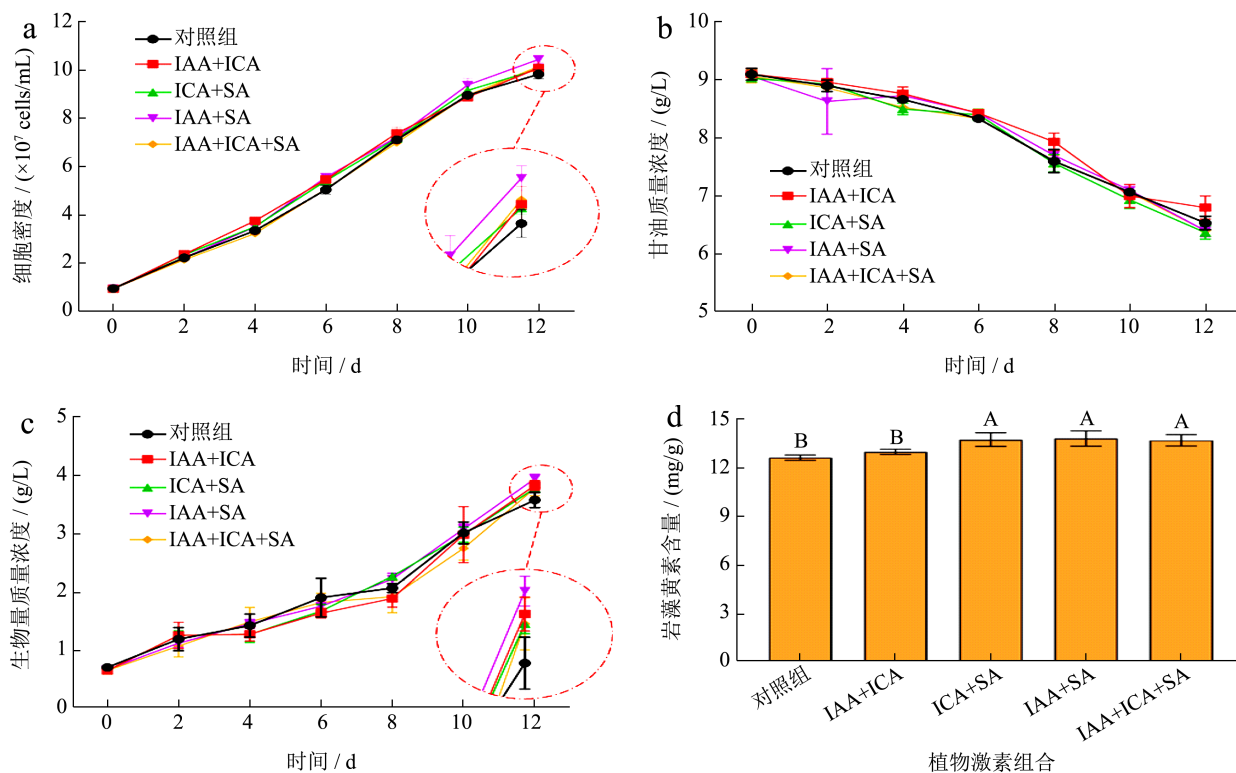


图4 不同植物激素组合下细胞密度(a)、甘油质量浓度(b)、生物量质量浓度(c)和岩藻黄素含量(d)

Fig.4 Cell density (a), glycerol concentration (b), biomass concentration (c) and fucoxanthin content (d) under different combinations of phytohormones

表 4 植物激素组合下兼养三角褐指藻的生产性能

生产性能	不同植物激素组合				
	对照组	IAA+ICA	ICA+SA	IAA+SA	IAA+ICA+SA
比生长速率/d	0.19±0.00 ^c	0.20±0.00 ^{ab}	0.20±0.00 ^{bc}	0.20±0.00 ^a	0.20±0.00 ^{ab}
生物量产率/[mg/(L·d)]	241.76±7.07 ^b	267.09±8.76 ^a	262.90±5.37 ^a	275.40±5.22 ^a	262.90±7.03 ^a
甘油消耗速率/[mg/(L·d)]	213.89±3.93	191.67±6.80	222.22±10.39	222.22±7.86	222.22±10.39
岩藻黄素产率/[mg/(L·d)]	3.81±0.08 ^d	4.13±0.11 ^c	4.31±0.06 ^b	4.53±0.09 ^a	4.30±0.04 ^b

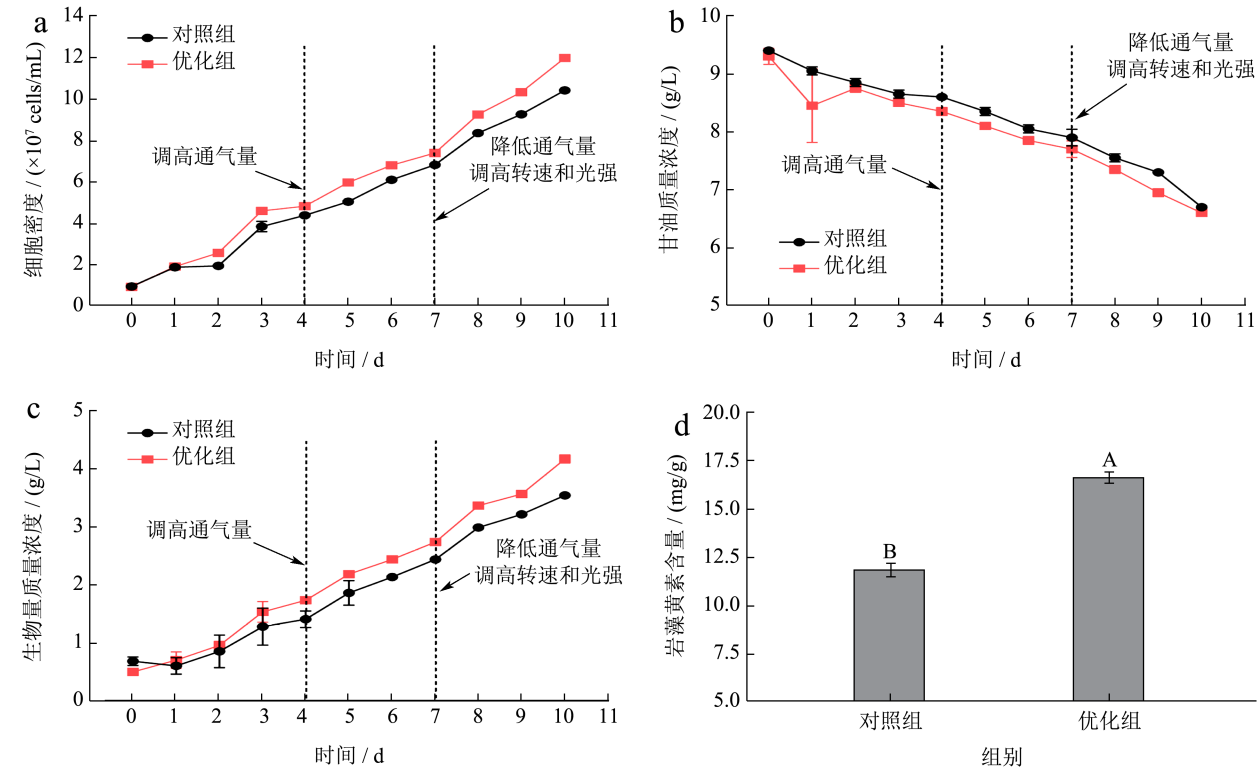


图 5 5 L 光发酵罐中木质素磺酸钙和 IAA+SA 组合的再组合下细胞密度 (a)、甘油质量浓度 (b)、生物量质量浓度 (c) 和岩藻黄素含量 (d)

Fig.5 Cell density (a), glycerol concentration (b), biomass concentration (c) and fucoxanthin content (d) under the recombination of calcium lignosulfonate and IAA+SA group in 5 L photo-fermenter

由图 4d 可知，在 ICA+SA、IAA+SA 以及 IAA+ICA+SA 组合下，岩藻黄素含量均具有显著提高 ($P<0.05$)，其中在 IAA+SA 组合下达到最大值 13.81 mg/g，比对照显著提高了 9.43% ($P<0.05$)，比单独添加三种植物激素提升效果更好。三者均能显著提高岩藻黄素合成基因的表达水平，而 IAA 和 SA 的促进效果明显高于 ICA^[15]。例如，采用 50 μmol/L 茉莉酸甲酯、10 mg/L 乙酰水杨酸、0.1 mg/L 花生四烯酸和 0.4 mg/L 硫酸铈铵，可有效提高三角褐指藻 *lcyb* 基因的表达量，从而提高岩藻黄素含量^[16]，这说明植物激素组合使用更有利于岩藻黄素的积累。

由表 4 可知，添加组合植物激素有利于兼养细

胞生长、积累生物量和岩藻黄素，均有利于提高岩藻黄素的产率。本研究筛选出最佳组合为 0.37 mg/L 和 0.4mg/L 的 IAA+SA 组合，可达到最大值 4.53 mg/(L·d)，比对照显著提高了 18.90% ($P<0.05$)。

2.3 5 L光发酵罐中上述最佳组合与木质素磺酸钙再组合的效果验证

上述 IAA+SA 最佳组合与木质素磺酸钙再组合的结果见图 5 和表 5。再组合条件（优化组）下可知（图 5a、5c 和表 5）可知，细胞密度、比生长速率、生物量质量浓度和产率均显著提高 ($P<0.05$)，分别达到每毫升 1.20×10^8 个细胞、0.25 d、4.17 g/L 和 367.09 mg/(L·d)，比对照分别显著提高了 15.00%、

25.00%、17.80% 和 28.42% ($P<0.05$)，这说明发酵罐系统更有利于兼养细胞生长^[36]，同时优化组能够有效促进兼养细胞生长，但甘油消耗速率并无显著提高 ($P>0.05$)。

表 5 5 L 发酵罐中木质素磺酸钙和 IAA+SA 组合的再组合下兼养三角褐指藻的生产性能

生产性能	两个实验组	
	对照组	木质素磺酸钙+IAA+SA 组
比生长速率/d	0.20±0.01 ^b	0.25±0.01 ^a
生物量产率/[mg/(L·d)]	285.85±7.78 ^b	367.09±2.39 ^a
甘油消耗速率/[mg/(L·d)]	225±0.00	225±8.33
岩藻黄素产率/[mg/(L·d)]	4.20±0.12 ^b	6.93±0.01 ^a

由图 5d 和表 5 可知，优化组的岩藻黄素含量和产率均达到最大值，分别为 16.61 mg/g 和 6.93 mg/(L·d)，比对照组分别显著提高了 40.05% 和 65.00% ($P<0.05$)。Yang 等^[20]通过两阶段调光以及补充胰蛋白胍的策略，在摇瓶中得到目前报道最高的三角褐指藻岩藻黄素产率，达到了 8.22 mg/(L·d)。木质素磺酸钙对微藻细胞的生长刺激机制主要与内源性植物激素浓度的调节有关，能够引起内源性植物激素（如吲哚乙酸）的短暂性增加^[37]，这可能使得在优化组效果更好。由于木质素磺酸钙具有酚类结构，是生长素氧化酶的底物，可通过竞争机制防止生长素的降解，作为生长激素的保护剂^[18]，更有利于植物激素促进三角褐指藻积累岩藻黄素。可见，在 5 L 发酵罐中采用优化组进行放大培养的效果良好，该优化组可显著促进兼养细胞生长，同时提高生物量浓度和岩藻黄素含量，实现岩藻黄素的高产率。

3 结论

本研究在摇瓶培养中优化确定了单一植物激素（IAA、ICA 和 SA）的最适添加质量浓度分别为 0.37、0.042 和 0.4 mg/L，进而证实了最佳植物激素组合为 IAA+SA 组合，质量浓度分别为 0.37 mg/L 和 0.4 mg/L。将 IAA+SA 最佳组合和木质素磺酸钙（10 mg/L）再组合，在 5 L 光发酵罐中实现了岩藻黄素高含量（16.61 mg/g）和高产率（6.93 mg/(L·d)），比对照显著提高了 40.05% 和 65.00% ($P<0.05$)。因此，采用 0.37 mg/L IAA、0.4 mg/L SA 和 10 mg/L 木质素磺酸钙组合，显著提高了三角褐指藻兼养生物量、岩藻黄素含量和产率，为利用三角褐指藻高

效生产岩藻黄素提供了新技术支撑。

参考文献

[1] ANNE P, GIA H H, LAURENT P, et al. Fucoxanthin from algae to human, an extraordinary bioresource: insights and advances in up and downstream processes [J]. Marine Drugs, 2022, 20(4): 222.

[2] NAJMEH O, MARZIEH M, NADER T, et al. Multiple roles of fucoxanthin and astaxanthin against Alzheimer's disease: their pharmacological potential and therapeutic insights [J]. Brain Research Bulletin, 2022, 193: 11-21.

[3] OLIYAEI N, MOOSAVI-NASAB M, TAMADDON A M, et al. Encapsulation of fucoxanthin in binary matrices of porous starch and halloysite [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105458.

[4] LENA S, ULRIKE N, ANDREAS R, et al. The microalgae *Phaeodactylum tricornutum* 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.

[5] VÍLCHEZ C, FORJÁN E, CUARESMA M, et al. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications [J]. Marine Drugs, 2011, 9(3): 319-333.

[6] BAE M, KIM M B, PARK Y K, et al. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases [J]. BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2020, 1865(11): 158618.

[7] 隋吉楦,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.

[8] MOHAMADNIA S, TAVAKOLI O, FARAMARZI M A, et al. Production of fucoxanthin by the microalga *Tisochrysis lutea* : a review of recent developments [J]. Aquaculture, 2020, 516: 734637.

[9] RAJAURIA G, FOLEY B, ABU-GHANNAM N. Characterization of dietary fucoxanthin from *Himanthalia elongata* brown seaweed [J]. Food Research International, 2016, 99(Part 3): 995-1001.

[10] 周小叶,蔡路昀.岩藻黄素产业化技术研究进展[J].现代食品科技,2024,40(3):361-372.

[11] RUNQING Y, DONG W, JUN X. Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(7): 993-1009.

[12] MCCLURE D D, LUIZ A, GERBER B, 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.

[13] 王珊,杨润青,宋培钦,等.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.
- [14] ZHAO Y, WANG H P, HAN B, et al. Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: a review [J]. Bioresource Technology, 2019, 274: 549-556.
- [15] ZHIPENG W, PEIKANG W, YAN M, et al. Laminaria japonica hydrolysate promotes fucoxanthin accumulation in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Bioresource Technology, 2021, 344(Part A): 136117.
- [16] 俞凯,龚一富,朱帅旗,等.不同外源诱导子对三角褐指藻 *Icyb* 基因转录及其岩藻黄素含量的影响[J].农业生物技术学报,2017,25(12):2009-2017.
- [17] 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.
- [18] ZHU J, 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(1): 118290.
- [19] 魏东,杨泽雄,杨润青.一种同时提高硅藻中高价值天然产物含量和/或产率的方法及其应用:CN114621906A[P]. 2022-06-14.
- [20] RUNQING Y, DONG W. 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.
- [21] QINGKE W, ZONGYI Y, DONG W. 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.
- [22] J F M, H B E, D W K, 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.
- [23] HUI W, YAN Z, LIN C, 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.
- [24] 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.
- [25] 李铁松,王长海.海带中3-吡啶乙酸对海洋微藻生长代谢的影响[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2010,33(1): 102-107.
- [26] KOZLOVA T A, HARDY B P, KRISHNA P, et al. Effect of phytohormones on growth and accumulation of pigments and fatty acids in the microalgae *Scenedesmus quadricauda* [J]. Algal Research, 2017, 27: 325-334.
- [27] NA P, XIANGYU G, SHULIN C, et al. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2019, 112: 450-460.
- [28] CHEN J H, WEI D, LIM P E. Enhanced coproduction of astaxanthin and lipids by the green microalga *Chromochloris zofingiensis*: Selected phytohormones as positive stimulators [J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122242.
- [29] DAVID F, ANITA A, ELENA B M, et al. Influence of exogenous phytohormone supplementation on the pigment and fatty acid content of three marine diatoms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(18): 6195-6207.
- [30] 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]. BBA-Bioenergetics, 2017, 1858(3): 218-230.
- [31] ANAHAS A M P, MURALITHARAN G. Central composite design (CCD) optimization of phytohormones supplementation for enhanced cyanobacterial biodiesel production [J]. Renewable Energy, 2019, 130: 749-761.
- [32] 张诚鹏,朱尧,张仁璇,等.水杨酸对两种海洋微藻生长及油脂积累的影响[J].生物加工过程,2018,16(6):42-46.
- [33] RAMAN V, RAVI S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(3): 1043-1049.
- [34] CHU J, LI Y, CUI Y, 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.
- [35] HAN X, ZENG H, BARTOCCI P, et al. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review [J]. Fermentation, 2018, 4(2): 25.
- [36] LU X, SUN H, ZHAO W, et al. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process for production of fucoxanthin by the marine diatom *Nitzschia laevis* [J]. Marine Drugs, 2018, 16(7): 219.
- [37] GASPAR T, KEVERS C, PENEL C, et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1996, 32(4): 272-289.