

温度和光照对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响

臧正蓉^{1,2}, 解修俊^{3,1}, 赵佩佩^{1,2}, 郇 丽^{1,2}, 黄爱优¹, 张宝玉¹, 潘光华³, 王广策¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 天津科技大学, 天津 300457)

摘要: 岩藻黄素(fucoxanthin)是一种特殊的类胡萝卜素, 具有许多显著的功效和很高的应用价值。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种海洋硅藻, 是一种可用于提取岩藻黄素的合适材料。作者以三角褐指藻的生物量、光合活性和岩藻黄素含量为指标, 研究了不同的温度 (20℃、25℃、30℃)、不同的光照强度(12800 lx、7200 lx、4000 lx)和不同光质 (红光、蓝光、绿光)对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响。实验结果表明, 25℃对三角褐指藻的生长没有影响, 但提高了岩藻黄素的含量, 30℃对三角褐指藻的生长及岩藻黄素积累均有抑制现象; 12800 lx、7200 lx 的光照强度都可促进三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的升高, 其中, 7200 lx 的光照强度对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的提高更加显著; 红光条件可促进三角褐指藻的生长和提高三角褐指藻的岩藻黄素含量, 而绿光和蓝光抑制三角褐指藻的生长, 并导致三角褐指藻的岩藻黄素含量降低。因此, 25℃、7200 lx 和红光的培养条件是三角褐指藻生长和岩藻黄素积累的最适宜条件。

关键词: 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*); 温度; 光照; 岩藻黄素

中图分类号: Q949.28 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)07-0001-06

doi: 10.11759/hyxx20140403002

岩藻黄素(fucoxanthin)是一种类胡萝卜素, 在自然界中含量丰富, 尤其是在海洋环境中广泛存在^[1]。在细胞中, 岩藻黄素与叶绿素 a 和叶绿素 c 组成捕光复合物, 作为捕光复合体^[2]。有些藻类如甲藻和硅藻^[3-4], 由于其岩藻黄素的存在而呈特征性棕黄色。因此, 岩藻黄素具有重要的研究意义。

研究发现, 岩藻黄素有许多显著的功效, 如抗氧化作用^[5-6]、抗肿瘤作用^[7-9]、抗癌作用^[10-11]、皮肤保护作用^[12]、抗血管生成作用^[13]、脑血管保护作用^[14]和预防骨质疏松作用^[15]等。因此, 岩藻黄素应用广泛。尤其是近年来, 研究发现, 岩藻黄素有减肥作用^[16-17]、降糖作用^[17-18]和降脂作用^[19-20]。进一步表明, 岩藻黄素有很高的应用价值。

目前, 可用于提取岩藻黄素的原料有很多, 如褐藻、硅藻等藻类。最早的原料主要是大型海藻, 包括海带 (*Laminaria japonica*)、羊栖菜 (*Sargassum fusiforme*)和裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)等^[21]。然而, 采用大型海藻提取岩藻黄素, 存在许多问题。一方面, 大型海藻养殖成本高且有季节性生长的特点。另一方面, 大型海藻的岩藻黄素仅存在于表面的皮层细胞, 因而含量低, 并且大型海藻在新鲜和干燥条件下岩藻黄素含量不同。这些问题限制了岩藻黄素的

开发利用。除大型海藻外, 海洋微藻中的岩藻黄素含量也很多。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。

在培养单细胞微藻中, 为了解决生物量和岩藻黄素含量的问题, 作者以三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)为研究对象进行研究。三角褐指藻是一种海洋硅藻, 由 Allen 等于 1910 年分离得到^[22], 其具有易于培养、可常年生长、生长速度快和易于调控的特点, 以三角褐指藻为研究对象具有很多优势。作者研究了温度和光照对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响, 包括不同的温度条件、不同的光照强度和光质条件, 为三角褐指藻用于岩藻黄素的提取提供有价值的参考。

收稿日期: 2014-11-18; 修回日期: 2015-03-15

基金项目: 科技部国家科技基础性工作专项(2012FY112900-01); 天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC22200); 中国科学院先导项目(XDA05030401)

作者简介: 臧正蓉(1988-), 女, 山东莱阳人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学, 电话: 0532-82898575, E-mail: zzr_1988@126.com; 王广策, 通信作者, 研究员, 主要从事藻类分子生理学与发育调控研究, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)由本实验室提供。三角褐指藻采用 f/2 培养基^[23], 在三角瓶中培养。温度条件为(20±2)℃, 光照强度为 4000 lx, 光周期为 12L:12D。

1.2 实验方法

分别进行温度、光照强度和光质的影响实验, 每种条件做 3 个平行。以正常培养三角褐指藻作对照, 分别设置不同的温度条件(20、25、30℃)、不同的光照强度(12800 lx、7200 lx、4000lx)和光质条件[红光(647~700 nm)、蓝光(470~475 nm)、绿光(491~574 nm)], 进行实验。每天摇藻并更换三角瓶位置, 避免光照不均。

1.3 生长曲线的测定

从实验处理开始, 每日取藻液测定 730 nm 处的光密度。根据标准曲线回归公式 $y=10^7x+16315$ ($R^2=0.9995$)换算成细胞数, 其中, y 为细胞密度(个/mL), x 为光密度。

1.4 光系统 II 活性的测定

使用 IMAGING-PAM 调制脉冲荧光仪(Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany), 利用调制叶绿素荧光技术(Pulse-Amplitude-Modulation, PAM), 按照林阿鹏等^[24]的测定方法进行样品叶绿素荧光参数的测量, 从而反映细胞的光合活性。对于不同实验条件处理的样品, 每个三角瓶各取藻液 200 μL, 分别加到 96 孔板的孔内, 然后使用 IMAGING-PAM 调制脉冲荧光仪(Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany), 测量 PSII 实际光合效率 $Y(II)$ 。每个样品在测定之前, 先暗适应 10 min。设定 PAR 为 36 μmol/(m²·s), 开始测定。

$Y(II)$: PSII 实际光合效率, 即 PSII 实际量子产量, 由公式 $Y(II)=(F'_m-F)/F'_m$ 计算得到。

所有操作都在黑暗环境中进行。

1.5 岩藻黄素的提取^[25]

采用离心法收集微藻细胞, 培养液在 4000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 藻细胞沉淀用新鲜培养液洗涤 2 次再离心, 收集的藻细胞用液氮速冻后保存在-80℃冰箱中。

按照 5 mL/g 的比例向收集的藻细胞中加入预冷(0~10℃)的甲醇与丙酮混合液作为提取液(甲醇:丙

酮=1:1(V/V)), 充分震荡, 使藻细胞与提取液充分接触, 之后放在冰水浴中黑暗浸提 5 min。以 3000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 分别用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤, 然后直接进液相色谱系统分析。洗脱条件为: 初始流动相为水(15%): 甲醇(30%): 乙腈(55%), 进行线性梯度至第 15 分钟; 然后转为流动相为水(0%): 甲醇(15%): 乙腈(85%)继续洗脱至第 17 分钟; 线性梯度转为流动相为甲醇(15%): 乙腈(35%): 乙酸乙酯(50%)继续洗脱至第 30 分钟, 再进行线性梯度转为流动相为甲醇(22%): 乙腈(20%): 乙酸乙酯(58%)洗脱直到洗脱结束。设置柱温为 50℃, 流速为 0.75 mL/min。

1.6 数据处理

采用单因素方差分析(ANOVA)进行数据差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 温度对三角褐指藻生长及岩藻黄素含量的影响

不同温度对三角褐指藻生长的影响如图 1 所示。由图 1 可知, 与正常培养温度 20℃相比, 25℃对三角褐指藻无明显影响($P>0.05$), 而在 30℃条件下三角褐指藻的生长受到明显抑制($P<0.05$)。

不同温度对三角褐指藻光合活性的影响如图 2 所示。三角褐指藻在 25℃条件下的光合活性稍高于对照, 而 30℃条件下三角褐指藻的光合活性显著降低($P<0.05$)。

不同温度对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响如图 3 所示。从图中可看到在温度为 25℃条件下, 三角褐指藻的岩藻黄素含量明显高于 20℃的对照($P<0.05$)。30℃条件下岩藻黄素含量则显著降低($P<0.05$)。

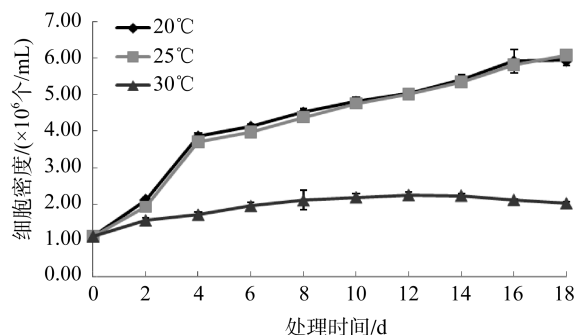


图 1 温度对三角褐指藻生长的影响

Fig. 1 Effect of different temperatures on the growth of *P. tricornutum*

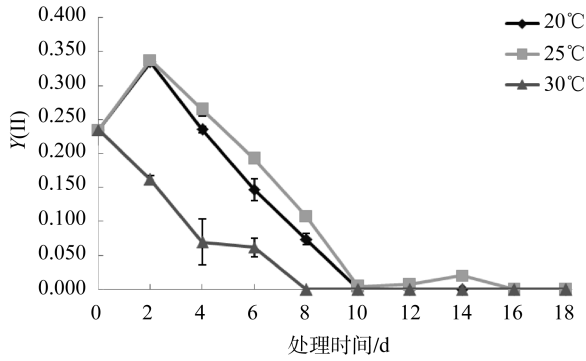


图 2 温度对三角褐指藻光合活性的影响

Fig. 2 Effect of different temperatures on the PSII activity of *P. tricornutum*

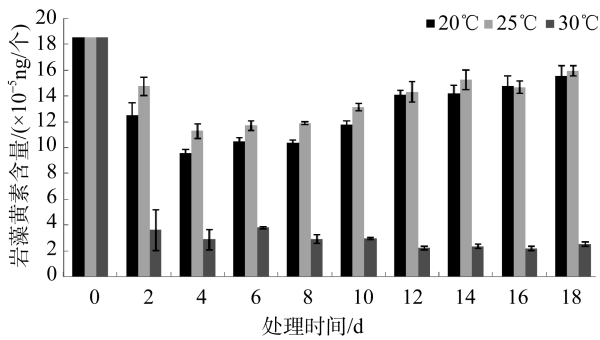


图 3 温度对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响

Fig. 3 Effect of different temperatures on the fucoxanthin content of *P. tricornutum*

2.2 光照强度对三角褐指藻生长及岩藻黄素含量的影响

不同光照强度对三角褐指藻生长的影响如图 4 所示。由图 4 可知, 与正常培养光照强度为 4000 lx 相比, 12800 lx 和 7200 lx 的光照强度明显促进三角褐指藻的生长($P<0.05$), 而 7200 lx 条件下三角褐指藻的细胞数高于 12800 lx 条件下的三角褐指藻。

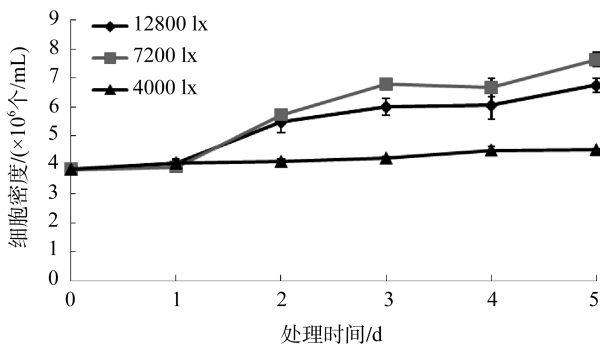


图 4 光照强度对三角褐指藻生长的影响

Fig. 4 Effect of different intensities of illumination on the growth of *P. tricornutum*

不同光照强度对三角褐指藻光合活性的影响如图 5 所示。与对照相比, 光照强度为 12800 lx 和 7200 lx 条件下, 三角褐指藻的光合活性均降低, 且 12800 lx 光照强度下光合活性降低更明显($P<0.05$)。

不同光照强度对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响如图 6 所示。与对照在 4000 lx 条件下相比, 12800 lx 光照强度下, 三角褐指藻的岩藻黄素含量稍微提高, 而 7200 lx 光照强度下岩藻黄素含量明显提高($P<0.05$)。

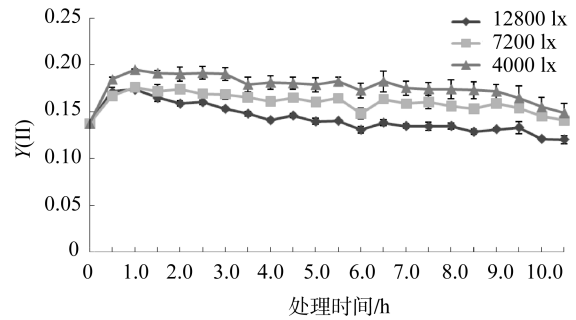


图 5 不同光照强度对三角褐指藻光合活性的影响

Fig. 5 Effect of different intensities of illumination on the PSII activity of *P. tricornutum*

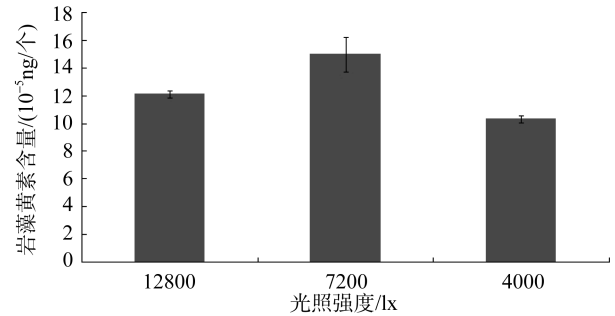


图 6 不同光照强度对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响

Fig. 6 Effect of different intensities of illumination on the fucoxanthin content of *P. tricornutum*

2.3 光质对三角褐指藻生长及岩藻黄素含量的影响

不同光质对三角褐指藻生长的影响如图 7 所示。由图 7 可知, 三种光质, 红光条件下三角褐指藻生长良好, 而绿光和蓝光条件下则显著抑制三角褐指藻的生长($P<0.05$)。

不同光质对三角褐指藻光合活性的影响如图 8 所示。蓝光抑制三角褐指藻的光合活性, 处理 1 h 后, 其 $Y(II)$ 值即降为 0。绿光对三角褐指藻的光合活性也有抑制作用, 处理 6 h 后 $Y(II)$ 开始显著降低($P<0.05$), 到第 48 小时降为 0。红光较另外两种光而言, 并未抑制三角褐指藻的光合活性。

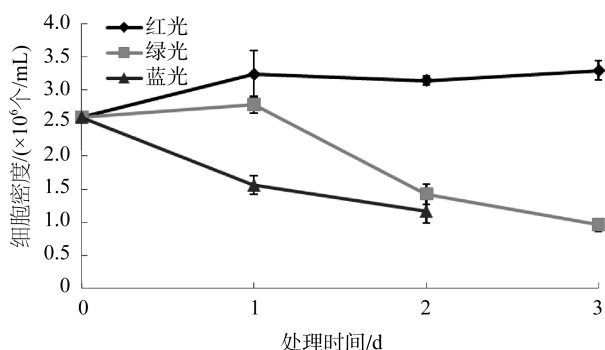


图7 不同光质对三角褐指藻生长的影响

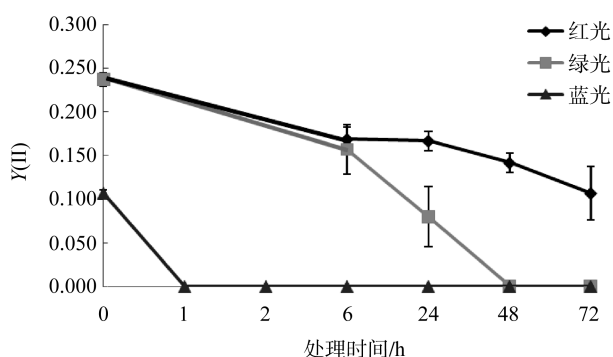
Fig.7 Effect of different light qualities on the growth of *P. tricornutum*

图8 不同光质对三角褐指藻光合活性的影响

Fig.8 Effect of different light qualities on the PSII activity of *P. tricornutum*

不同光质对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响如图9所示。与正常光的三角褐指藻相比,蓝光条件下三角褐指藻的岩藻黄素含量显著降低($P<0.05$),绿光条件下处理1 d的三角褐指藻的岩藻黄素含量升高,而处理2 d和3 d后明显降低($P<0.05$),红光条件下处理3 d后的三角褐指藻的岩藻黄素含量则显著升高($P<0.05$)。

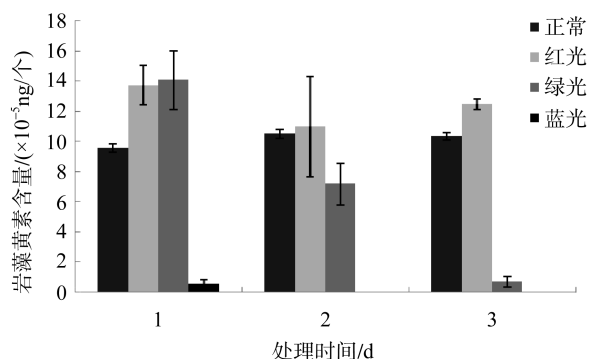


图9 不同光质对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响

Fig.9 Effect of different light qualities on the fucoxanthin content of *P. tricornutum*

3 讨论

岩藻黄素是一种重要的类胡萝卜素,因其具有丰富的生理功能,近年来受到广泛关注。Carreto 和 Catoggio 研究发现^[25],三角褐指藻的岩藻黄素含量随着三角褐指藻的生长而逐渐降低。此外,Kosakowska 等^[26]的研究表明,三角褐指藻在缺铁条件下岩藻黄素含量降低。

本研究考察了温度条件对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响。结果表明,25℃既适于三角褐指藻的生长,又提高单位细胞内岩藻黄素的含量,这一现象表明,由于三角褐指藻在25℃时生长速度快,因而捕获的光量子多,又因为岩藻黄素在光系统的捕光复合物中起重要作用^[2],故岩藻黄素含量随捕获光量子的增加而增加。

另外,光照强度(12800、7200和4000 lx)对三角褐指藻生长及岩藻黄素含量的影响实验结果表明,光照强度的升高促进了三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的升高,可能由于光照强度的增大,使得三角褐指藻可以捕获更多的光量子,从而使岩藻黄素含量升高。

三种光质(红光、绿光、蓝光)对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响实验结果表明,绿光和蓝光处理3 d的三角褐指藻均死亡,而红光处理的三角褐指藻生长状况良好。然而岩藻黄素的吸收峰在450 nm附近^[27],接近绿光和蓝光波长附近,而红光波长为647~700 nm,结果并不是三角褐指藻在绿光和蓝光下生长良好,却是三角褐指藻在绿光和蓝光的波长范围内死亡,在红光的波长范围内生长良好。这一现象产生的原因尚需进一步研究。

综上所述,25℃、7200 lx和红光的培养条件是三角褐指藻生长和岩藻黄素积累的最适宜条件。

参考文献:

- [1] Dembitsky V M, Maoka T. Allenic and cumulenilipids[J]. Progress in Lipid Research, 2007, 46(6): 328-375.
- [2] Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms[J]. Photosynthesis Research, 2010, 106(1-2): 89-102.
- [3] Beppu F, Niwano Y, Tsukui T, et al. Single and repeated oral does toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice[J]. Journal of Toxicological Sciences, 2009, 34(5): 501-510.

- [4] Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A, et al. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH)[J]. *IUBMB Life*, 1997, 42(2): 361-370.
- [5] Yan X, Chuda Y, Suzuki M, et al. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63(3): 605-607.
- [6] Iwasaki S, Widjaja-Adhi M A K, Koide A, et al. In vivo antioxidant activity of fucoxanthin on obese/diabetes KK-A^y mice[J]. *Food and Nutrition*, 2012, 3: 1491-1499.
- [7] Zaragoza M, López D, Sáiz M P, et al. Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(17): 7773-7780.
- [8] Kim K N, Heo S J, Yoon W J, et al. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 649(1): 369-375.
- [9] Khan M N A, Lee M C, Kang J Y, et al. Effects of the brown seaweed *Undaria pinnatifida* on erythematous inflammation assessed using digital photo analysis[J]. *Phytotherapy Research*, 2008, 22(5): 634-639.
- [10] Nishino H, Tsushima M, Matsuno T, et al. Anti-neoplastic effect of halocynthiaxanthin, a metabolite of fucoxanthin[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 1992, 3(5): 493-498.
- [11] Yu R X, Hu X M, Xu S Q, et al. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 657(1): 10-19.
- [12] Heo S J, Jeon Y J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 95(2): 101-107.
- [13] 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.
- [14] Ikeda K, Kitamura A, Machida H, et al. Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2003, 30(1-2): 44-48.
- [15] Das S K, Ren R, Hashimoto T, et al. Fucoxanthin induces apoptosis in osteoclast-like cells differentiated from RAW264.7 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(10): 6090-6095.
- [16] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2009, 2(6): 897-902.
- [17] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, et al. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-A^y mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(19): 7701-7706.
- [18] Hosokawa M, Miyashita T, Nishikawa S, et al. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-A^y mice[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 504(1): 17-25.
- [19] 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.
- [20] Park H, Lee M, Park Y, et al. Beneficial effects of *Undaria pinnatifida* ethanol extract on diet-induced-insulin resistance in C57BL/6J mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(4): 727-733.
- [21] Haugan J A, Aakermann T, Liaaen J S. Isolation of fucoxanthin and peridinin[J]. *Methods in Enzymology*, 1992, 213: 231-245.
- [22] Allen E, Nelson E. On the artificial culture of marine plankton organisms[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)*, 1910, 8(5): 421-474.
- [23] Guillard R R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates[M]. In *Culture of Marine*

- Invertebrate Animals, Springer US, 1975: 29-60.
- [24] Lin A, Wang C, Qiao H, et al. Study on the photosynthetic performances of *Enteromorpha prolifera* collected from the surface and bottom of the sea of Qingdao sea area[J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(3): 399-404.
- [25] Carreto J I, Catoggio J A. Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth [J]. Marine Biology, 1976, 36(2): 105-112.
- [26] Kosakowska A, Lewandowska J, Stoń J, et al. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) stressed by iron[J]. BioMetals, 2004, 17(1): 45-52.
- [27] 王广策, 汪文俊, 王发左, 等. 一种从海藻中分离岩藻黄素的方法: 中国, CN200410020727[P]. 2005-12-14.

Effect of different temperatures and light conditions on the growth and fucoxanthin content of *Phaeodactylum tricornutum*

ZANG Zheng-rong^{1, 2}, XIE Xiu-jun^{3, 1}, ZHAO Pei-pei^{1, 2}, HUAN Li^{1, 2}, HUANG Ai-you¹, ZHANG Bao-yu¹, PAN Guang-hua³, WANG Guang-ce¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Received: Nov., 18, 2014

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; temperature; light; fucoxanthin

Abstract: Fucoxanthin is a special carotenoid that has many significant biological effects and high practical application values. *Phaeodactylum tricornutum* is a marine diatom rich in fucoxanthin. In the present study, we compared the effects of different culture conditions, including different temperatures (20°C, 25°C and 30°C), different light intensities (12800 lx, 7200 lx and 4000 lx) and different light qualities (red light, green light and blue light), on the growth, PSII activity and fucoxanthin content of *P. tricornutum*. The results indicated that the fucoxanthin content was increased at 25°C while the growth of *P. tricornutum* was not influenced. And the growth and accumulation of fucoxanthin of *P. tricornutum* were inhibited at 30°C. The growth and accumulation of fucoxanthin of *P. tricornutum* were promoted under 12800 lx and 7200 lx, and were increased much more under 7200 lx. In addition, the growth and accumulation of fucoxanthin of *P. tricornutum* were promoted under red light, while green light and blue light inhibited the growth of *P. tricornutum* and resulted in the reduction of the fucoxanthin content. Therefore, the optimal culture condition for *P. tricornutum* is 25°C, 7200 lx and red light, which could promote its growth and fucoxanthin content.

(本文编辑: 梁德海)