

甲基磺酸乙酯对小新月菱形藻的生物学效应

杨茂纯, 赵耕毛, 王长海

(南京农业大学 资源与环境科学学院, 江苏省海洋生物学重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 为提高小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)的产油脂能力、获得油脂含量高的突变株, 利用甲基磺酸乙酯(EMS)对该藻株进行了化学诱变处理, 并对其生物学作用进行了考察。结果显示, EMS 对小新月菱形藻具有较好的诱变作用, 经 0.1 mol/L 和 0.05 mol/L EMS 处理后分别得到油脂生产能力较强的突变藻株 YA 和 YB, 在同等培养条件下两株突变藻单位体积细胞的内叶绿素 a、类胡萝卜素、蛋白质、可溶性糖和油脂相对含量分别比对照组提高了 30.05%和 25.77%、22.15%和 19.26%、9.06%和 8.27%、48.25%和 45.48%、44.06%和 12.86%。

关键词: 微藻; 小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*); 诱变; 甲基磺酸乙酯; 油脂

中图分类号: S963 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)01-0008-05

doi: 10.11759/hyxx20140109001

随着地球上化石能源资源的不可逆性减少和石化燃料燃烧带来的环境问题日趋严重, 新型生物能源的开发备受关注。许多微藻细胞内富含脂肪酸, 与其他生物柴油原料相比具有生长周期短、生产能力高、不与农业竞争用地、繁殖快与油脂提取容易实现工业化等优点^[1-2], 是开发生物能源的良好生产原料。但到目前为止, 微藻尚很难被用于生产生物柴油, 其最主要限制性的原因之一就是缺乏含油量高、生长快的优良藻株^[3-4]。

小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)是一种海洋真核单细胞藻类, 属硅藻门、羽纹纲、双菱形目、菱形藻科、菱形藻属, 是海洋生态系统中最常见的微藻之一, 其繁殖速度快而且对环境有很好的适应能力, 细胞内含丰富的蛋白质、碳水化合物和脂肪酸, 可以作为甲壳类、双壳类和仔鱼的饵料, 在海水养殖业中占有重要地位^[5-8]; 同时, 小新月菱形藻细胞在生长过程中可以积累较高含量的脂肪酸, 是开发生物物质能源的潜在材料。

甲基磺酸乙酯(Ethyl Methanesulphonate, EMS)是一种烷化剂类化学诱变剂, 其诱变机理是引起碱基置换和移码突变^[9], 与其他诱变剂相比, EMS 诱变后产生的突变频率高, 且多为显性突变体, 易于突变体的筛选^[10], 是作物诱变育种中应用最广泛、诱变效果最好的一种化学诱变剂^[11]。目前有关微藻诱变育种方面的报道多集中在螺旋藻, 如 Riccardi 等^[12]利用 EMS 诱变螺旋藻获得了抗氨基酸类似物的突变株; 张学成等^[13]利用 EMS 处理螺旋藻筛选

出了 2 株耐低温的突变株; 崔海瑞等^[14]研究发现, 经过 EMS 处理的钝顶螺旋藻在生长和形态等方面受到了很大影响; 汪志平等^[15]采用 0.6%的 EMS 和 2.4 kGy 的 60 Co γ 射线处理钝顶螺旋藻, 得到了 4 株多糖含量高的突变株。但是, 利用 EMS 处理小新月菱形藻筛选优质突变株, 尚未见报道。本研究的目的是探索 EMS 对于小新月菱形藻细胞内各种生化成分的影响, 特别是对油脂含量的影响, 探索获得生长速度快、油脂含量高、适于生物能源开发的优良藻株新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种

小新月菱形藻为江苏省海洋重点实验室保存藻种, 经本实验室分离纯化后, 在低温光照培养箱中保存备用。

1.1.2 培养基

采用 f/2 营养盐配方^[16]配制海水培养液, 经高温灭菌并冷却后备用。固体培养基为 f/2 液体培养基中加入 1%的琼脂。

收稿日期: 2014-01-09; 修回日期: 2014-05-23

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA021706)

作者简介: 杨茂纯(1989-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事微藻生物技术研究, E-mail: hysfymch@126.com; 王长海, 通信作者, 博士生导师、教授, 主要从事海洋生化工程、微藻生物技术研究, E-mail: chwang@njau.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 EMS 处理及培养条件

取对数生长期藻液 2 mL 于 5 mL 离心管内, 5000 r/min 下离心 10 min 收集藻细胞。利用不同浓度(0.05、0.1、0.2 mol/L)的 EMS 溶液分别悬浮藻细胞, 处理 20 min, 期间, 轻轻晃动离心管使藻细胞均匀接触 EMS。诱变后的细胞用 $f/2$ 培养基清洗 3 次, 涂于固体培养基上, 暗适应 12 h, 待其长出藻落, 挑选生长快, 颜色深的藻落转移到液体培养基中培养 15 天。调整各组藻细胞密度使其一样, 然后放入恒温培养箱中培养, 温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度为 3000 lx, 光暗周期为 12: 12, 每天摇瓶 3 次。每隔 3 天测一次细胞数, 22 d 后收集藻细胞, 测量其各代谢物质含量, 挑选出油脂含量高的优质突变株。整个过程设置空白对照组, 各处理组均设 3 个平行样。

1.2.2 生长速率测定

每隔 3 天定时取藻液, 用“血球计数板”统计细胞数目。

1.2.3 色素含量测定

准确吸取藻液 5 mL, 5000 r/min 转速下离心 15 min, 将藻泥用 5 mL 90% (v/v) 丙酮在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 下避光抽提 24 h, 将抽提液 4000 r/min 离心 15 min, 取上清液测量 665、645、630 nm 下的吸光度。按照 Parsons^[17] 所建立的方程计算叶绿素 a 的含量, 公式为: 叶绿素 a(mg/L) = $11.6A_{665\text{ nm}} - 0.14A_{630\text{ nm}} - 1.31A_{645\text{ nm}}$

取上清液测量 663.5、646.6、440.5 nm 条件下的吸光度。类胡萝卜素含量按照 Porra^[18] 所建立的公式来计算: 类胡萝卜素(mg/L) = $4.69A_{440.5\text{ nm}} - 4.74A_{646.6\text{ nm}} - 1.96A_{663.6\text{ nm}}$

1.2.4 可溶性糖含量测定

采用蒽酮比色法, 以烘干至恒质量的葡萄糖作标准物。取一定体积的藻液, 5000 r/min 下离心 10 min, 弃上清液, 加入同样体积的蒸馏水, 沸水中提取 30 min, 后于 5000 r/min 下离心 10 min, 吸取上清液 0.5 mL 于 20 mL 刻度试管中, 加 1.5 mL 蒸馏水、0.5 mL 蒽酮乙酸乙酯试剂和 5 mL 浓硫酸, 充分振荡, 立即将试管放入沸水浴中, 逐管准确保 1 min, 取出后自然冷却至室温, 以空白作对照, 在 630 nm 下测吸光值, 由标准线性方程 $y = 0.0206x + 0.0005$, $R^2 = 0.9977$, 可查出可溶性糖的含量, 再计算 1 mL 藻液中可溶性糖含量^[19]。

1.2.5 蛋白质含量测定

蛋白含量试剂盒(BCA 法)购自南京建成生物工

程研究所, 蛋白质含量测定步骤按照其说明书进行。

1.2.6 油脂相对含量测定

采用尼罗红荧光标记法, 取 1 mL 藻液, 加入 250 μL DMSO(二甲基亚砜), 使其体积分数为 20%, 将混合液于超声波细胞粉碎机中破碎 20 s。向破碎混合液中加入 15 μL 尼罗红染料, 然后于 40°C 水浴中孵化 10 min。取 200 μL 混合液用于酶标仪检测, 激发光为 475 nm, 检测光为 570 nm^[20]。

1.2.7 数据处理

结果分析取各相应数据的平均值, 用 SPSS 统计软件进行数据分析, 采用 Excel 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 突变藻株的筛选与培养

分别利用 3 种不同浓度(0.05、0.1、0.2 mol/L)的 EMS 对小新月菱形藻进行处理, 结果发现在 EMS 为 0.2 mol/L 时小新月菱形藻细胞被 100% 致死; 在 0.1 mol/L 和 0.05 mol/L 条件下, EMS 对小新月菱形藻细胞的致死率分别为 76% 和 53%。分别利用平板培养与小瓶培养的方法对获得的 72 株突变株(0.05 mol/L 诱变后得到 43 株; 0.1 mol/L 诱变后得到 29 株)进行了培养, 以油脂含量为筛选目标, 从 43 株突变株中筛选得到了产油脂能力较强的 YB 突变株, 从 29 株突变株中筛选得到了产油脂能力较强的 YA 突变株。为了进一步探讨这两个突变藻株的生长情况, 以出发藻株为对照, 在培养条件一致的情况下对 YA 和 YB 突变株进行了培养, 结果如图 1 所示。

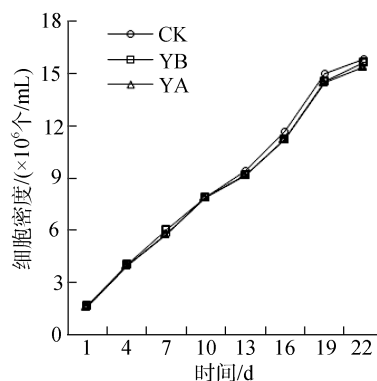


图 1 突变藻株的培养

Fig.1 The culture of mutant YA and YB

从图 1 可见, 经过 22 d 的培养, 突变藻株的生长速度和培养密度均与对照组无明显差异。赵爱娟^[21]和张学成^[13]分别利用浓度为 0.1 mol/L 的 EMS 对海

水小球藻和螺旋藻进行诱变处理,获得的突变藻株中,部分藻株生长速度加快,而本研究中获得的小新月菱形藻突变藻株的生长速度并没有显著提高,这可能是由于诱变的不定向引起的。可见,当 EMS 浓度小于 0.1 mol/L 时,适用于小新月菱形藻的诱变育种。

2.2 突变藻株细胞中叶绿素 a 与类胡萝卜素含量

为探讨两个突变株细胞内色素含量情况,以出发藻株为对照,在培养条件一致的情况下对突变株 YA 和 YB 细胞内叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量进行了测定,结果如图 2 所示。

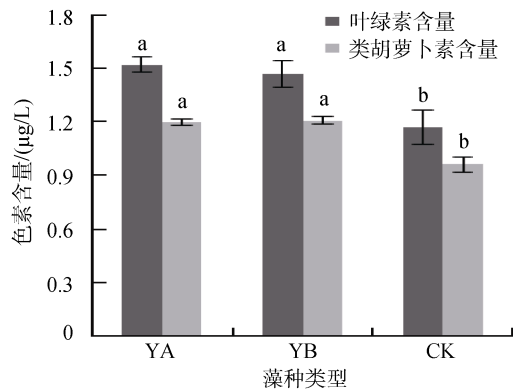


图 2 突变藻株细胞中叶绿素 a 含量与类胡萝卜素含量
Fig.2 The contents of chlorophyll a and carotenoids in mutant cells

从图 2 可见,经过 22 天的培养,突变藻株 YA 和 YB 细胞中的叶绿素 a 含量分别比对照组提高了 30.05% 和 25.77%, YA 与 YB 之间没有显著性差异 ($P>0.05$); 突变藻株 YA 和 YB 细胞中的类胡萝卜素含量分别比对照组提高了 22.15% 和 19.26%, YA 与 YB 之间没有显著性差异 ($P>0.05$)。上述结果与相关研究结果类似,如刘晓娟等^[22]用半导体激光辐照拟微绿球藻,其叶绿素积累量比对照组提高了 86.59%; 孙延红^[23]使用浓度为 0.4% 和 0.8% 的 EMS 处理雨生红球藻,使单细胞内类胡萝卜素含量比对照组细胞分别提高了 76% 和 90%。上述研究结果显示,当微藻在受到外来条件刺激时,其体内色素含量会大幅度提高,这很可能与微藻自身保护机制有关,研究表明类胡萝卜素可以保护植物组织因强光导致的细胞光氧化破坏,当微藻处于不利条件时,类胡萝卜素会增加从而保护光合作用系统正常工作^[18, 24]。

2.3 突变藻株细胞中蛋白质含量

为了探讨两个突变株细胞内蛋白质含量情况,以出发藻株为对照,在培养条件一致的情况下对突变株 YA 和 YB 细胞内总蛋白含量进行了测定,结果如图 3 所示。

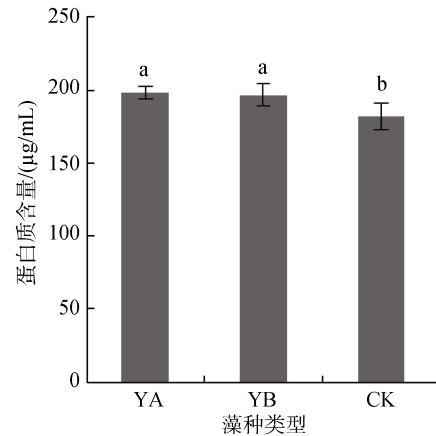


图 3 突变藻株细胞中蛋白质含量
Fig.3 The content of proteins in mutant cells

从图 3 可见,突变株 YA 和 YB 细胞中的蛋白质含量分别比对照组提高了 9.06% 和 8.27%, 但 YA 与 YB 细胞中的蛋白质含量没有显著差异 ($P>0.05$)。刘晓娟等^[22]用半导体激光辐照拟微绿球藻,结果蛋白质含量比对照提高了 19.16%, 该结果与本研究类似,但与我们研究结果相反,俞泓伶^[25]用 UV-B 辐射杜氏盐藻和小角毛藻后,两种微藻细胞内蛋白质含量均下降; 作者认为,这种差异很大程度上与选择的诱变方法和藻种生理状态的不同有关。

2.4 突变藻株细胞中可溶性糖含量

为了探讨两个突变株细胞内可溶性糖含量情况,以出发藻株为对照,在培养条件一致的情况下对突变株 YA 和 YB 细胞内可溶性糖含量进行了测定,结果如图 4 所示。

与色素和蛋白含量变化相似,突变株 YA 和 YB 细胞中的可溶性糖含量分别比对照组提高了 48.25% 和 45.48%, 但突变株 YA 和 YB 之间没有显著性差异 ($P>0.05$)。赵萌萌^[26]利用 He-Ne 激光(波长 632.8 nm, 功率 10 mW)诱变钝顶螺旋藻,处理后其蛋白质和多糖含量均有较大增加,该结果与本研究结果类似。关于突变株细胞内多糖含量增加的机理王明兹等^[27]认为细胞可能通过多糖含量的增加来防止或降低自身所受到伤害,这很可能是一种细胞自我保护的途径。

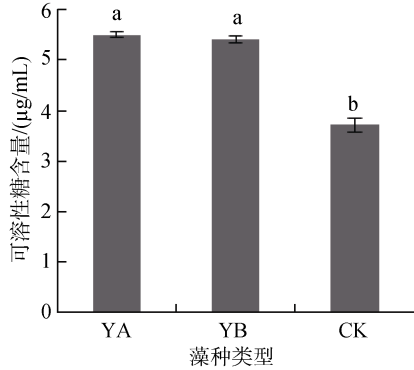


图4 突变藻株细胞中可溶性糖含量
Fig.4 The content of soluble sugars in mutant cells

2.5 突变藻株细胞中油脂相对含量

为筛选油脂含量比较高的突变藻株,以出发藻株为对照,在培养条件一致的情况下对突变株 YA 和 YB 细胞内油脂相对含量进行了测定(图 5)。从图 5 可见,突变藻株 YA 和 YB 细胞中油脂相对含量分别比对照组提高了 44.06%和 12.86%,突变藻株 YA 和 YB 之间存在显著性差异($P>0.05$)。在许多研究中,利用物理方法提高油脂含量都得到了不错的效果, Ma 等^[28]通过离子束诱变方法使微拟球藻细胞中脂肪含量提高了 29%, 卢丽娜^[29]使用半导体激光对聚球藻进行诱变,得到一株突变株 LD5, 其油脂含量比出发藻增加了 12.91%, 但利用化学方法诱变手段提高油脂含量的研究尚不多见。参与脂肪酸合成的酶主要是乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACCase)和脂肪酸合酶, 脂肪酸生物合成途径中限制速率的关键调节步骤是 Acetyl-CoA 经 ACCase 催化形成丙二酰辅酶 A 的这一酶促反应, 因此 ACCase 是脂肪酸生物合成途径的关键限速酶。本研究中突变藻株油脂含量

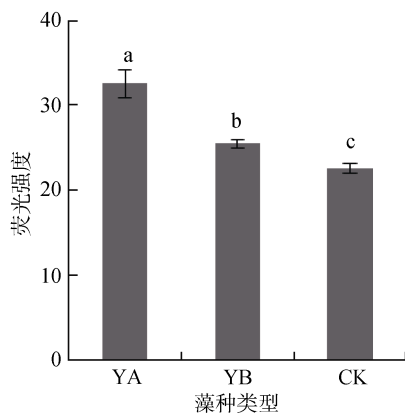


图5 突变藻株中油脂相对含量
Fig.5 The content of lipids in mutant

增加可能是由于突变后的藻细胞中 ACCase 活性增强, 从而使得脂肪酸合成速度加快, 积累量增多^[30]。

小新月菱形藻细胞主要以纵分裂繁殖为主^[4], 由于对小新月菱形藻的生物学背景尚不清楚, 从本实验获得的结果还很难判断突变性状及其生化途径是受细胞核还是细胞质基因控制, 尤其是有关该藻的生物学, 如细胞核倍性等方面的问题有待于做进一步的分析和讨论。

3 结论

利用 EMS 诱变获得两株优质藻株 YA 与 YB, 其代谢产物含量包括色素含量、可溶性糖含量、蛋白含量、油脂相对含量均比对照组多, 其中, 突变藻株 YA 细胞中油脂相对含量比出发藻提高了 44.06%, 突变藻株 YB 细胞中油脂相对含量比出发藻提高了 12.86%, 突变藻株内代谢物质含量增多特别是油脂含量的增加有利于其作为潜在生物柴油资源的开发和利用。

参考文献:

- [1] Ahmad A L, Yasin N H M, Derek C J C. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review[J]. *Renew Sust Energ*, 2011, 15: 584-593.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25 (3): 294-306.
- [3] Hu Q, Zhang C W, Sommerfeld M. Biodiesel from algae: lessons learned over the past 60 years and future perspectives[J]. *J Phycol*, 2006, 42: 12.
- [4] 陈明耀. 生物饵料培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [5] Zhang X Z, Hu Q, Sommerfeld M. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 5297-5304.
- [6] Robert R, Parisi G, Liliana R. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae[J]. *Aquaculture*, 2001, 192: 333-346.
- [7] Leonardos N, Lucas I. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larva[J]. *Aquaculture*, 2000, 182: 301-315.
- [8] Peach E A, Drummond J C. On the culture of the marine diatom *Nitzschia closterium* (F.) minutissima, in Artificial Sea-water[J]. *The Biochemical Journal*, 1924, 18 (3-4): 464-468.
- [9] Auerba C. Mutation research[M]. London: Chabman and Hall Ltd., 1976, 281-282.
- [10] 祝丽英, 池书敏, 刘志增, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)在创造玉米新种质中的应用[J]. *玉米科学*, 2001, 9(3):

- 014-017.
- [11] 朱保葛, 路子显. 烷化剂 EMS 诱发花生性状变异的效果及高产突变系的选育[J]. 中国农业科学, 1997, 30(6): 87-89.
- [12] Riccardi G, Sora S, Ciferri O. Production of amino acids by analog-resistant mutants of the cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. Journal of Bacteriology, 1981, 147(3): 1002-1007.
- [13] 张学成, 谭桂英, 何丽容, 等. 甲基磺酸乙酯对螺旋藻的诱变作用[J]. 海洋学报, 1990, 12(4): 517-522.
- [14] 崔海瑞, 汪志平. EMS 对钝顶螺旋藻生长和形态的影响[J]. 浙江大学学报, 1997, 23(6): 645-648.
- [15] 汪志平, 刘艳辉. 高产多糖钝顶螺旋藻新品系的选育及蛋白质 SDS-PAGE 鉴定[J]. 核农学报, 2004, 18(5): 349-352.
- [16] Guillard R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates[J]. Culture of Marine Invertebrate Animals. 1975, 29-60.
- [17] 姚南瑜. 藻类生理学[M]. 大连: 大连工学院出版社, 1987: 120-121.
- [18] Jim J H, Peter C K. +UVA treatment increases the degree of unsaturation in microalgal fatty acids and total carotenoid content in *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyceae)[J]. Food Chemistry, 2011, 129: 783-791
- [19] 李合生. 植物生理生化试验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184-196.
- [20] 刘志媛. 铁对几种不同代谢类型微藻的生长和油脂积累的影响[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008, Q945.
- [21] 赵爱娟. 海洋微藻的诱变育种及其脂肪酸的测定[D]. 南京: 南京理工大学, 2005, S968.4.
- [22] 刘晓娟, 姜宝楠, 庄惠如, 等. 半导体激光辐照对拟微绿球藻的生物学效应[J]. 生物技术, 2011, 21(4): 85-89.
- [23] 孙延红. 雨生红球藻诱变育种及突变株的筛选[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006, S968.41.
- [24] Davison P, Hunter C N, Horton P. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Nature, 2002, 418: 203-206.
- [25] 俞泓伶, 陈彬彬, 谢志浩. UV-B 辐射对 2 种海洋微藻生长和生理生化特征的影响[J]. 宁波大学学报(理工版), 2011, 24(3): 15-19.
- [26] 赵萌萌, 王卫卫. He-Ne 激光对钝顶螺旋藻的诱变效应[J]. 光子学报, 2005, 34(3): 400-403.
- [27] 王明兹. 倍频 Nd: YAG 激光对紫球藻生长与胞外多糖产量的影响[J]. 激光生物学报, 2002, 11(1): 6-9.
- [28] Ma Y, Wang Z, Zhu M. Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis[J]. Bioresource Technology, 2013, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.020>.
- [29] 卢丽娜. 高油脂藻株的筛选、诱变及培养[D]. 烟台: 烟台大学, 2010, Q949.2.
- [30] Wichlen Y, Ward O P. ω -3 fatty acids: alternative sources of production[J]. Process Biochem, 1989, 8(24): 117-118.

The biological effect of the Ethyl Methanesulphonate on *Nitzschia closterium*

YANG Mao-chun, ZHAO Geng-mao, WANG Chang-hai

(College of Resources And Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biology, Nanjing 210095, China)

Received: Jan., 9, 2014

Key words: Microalgae; *Nitzschia closterium*; Mutagenesis; Ethyl Methanesulphonate; lipid

Abstract: In order to obtain the high-lipid producing strains of *Nitzschia closterium*, the method of chemical mutation with Ethyl Methanesulphonate (EMS) was used, and the biological effects of EMS on the cells of *N. closterium* were studied. The results showed that the EMS has good mutagenesis effect on the cells of *N. closterium*, and two different mutant strains of *N. closterium* YA and YB were obtained after treatment with 0.1 mol/L and 0.05 mol/L dosages of EMS, respectively, which both had stronger oil production capacity. Under the same cultivation condition, the chlorophyll a, carotenoids, protein, soluble sugar contents and lipid relative contents of YA and YB have increased by 30.05% and 25.77%, 22.15% and 19.26%, 9.06% and 8.27%, 48.25% and 45.48%, and 44.06% and 12.86% compared with the CK, respectively.

(本文编辑: 梁德海)