

## 重离子诱变创制高产油微拟球藻新品种

王芝瑶<sup>1,2</sup>, 马玉彬<sup>2</sup>, 牟润芝<sup>3</sup>, 孙长江<sup>4</sup>, 张东远<sup>2</sup>, 王永飞<sup>1</sup>

1 暨南大学生命科学技术学院生物工程学系, 广东 广州 510632

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101

3 青岛首创瑞海水务有限公司, 山东 青岛 266042

4 北京旭阳化工技术研究院有限公司, 北京 100070

王芝瑶, 马玉彬, 牟润芝, 等. 重离子诱变创制高产油微拟球藻新品种. 生物工程学报, 2013, 29(1): 119-122.

Wang ZY, Ma YB, Mu RZ, et al. Improved lipid productivity of *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 119-122.

**摘 要:** 以具有产业化前景的微拟球藻 *Nannochloropsis oceanica* OZ-1 为实验材料, 利用碳重离子进行诱变育种, 采用 Imaging-PAM 和酶标仪进行大规模筛选, 最终获得两株高生长速率微拟球藻突变藻株 (HP-1 和 HP-2), 进一步分析显示两株突变藻株 (HP-1 和 HP-2) 生物量积累较野生型藻株大幅提高, 在 18 d 培养末期生物量分别提高了 18% 和 26%, 两株突变藻株油脂产率分别为 295 mg/(L·d) 和 275 mg/(L·d), 而野生型藻株为 247 mg/(L·d)。所获两株突变藻株生长速度快、油脂产率高, 较野生型藻株优势明显。

**关键词:** 微拟球藻, 重离子诱变, 微藻生物柴油

## Improved lipid productivity of *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis

Zhiyao Wang<sup>1,2</sup>, Yubin Ma<sup>2</sup>, Runzhi Mu<sup>3</sup>, Changjiang Sun<sup>4</sup>, Dongyuan Zhang<sup>2</sup>,  
and Yongfei Wang<sup>1</sup>

1 Department of Biotechnology, School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2 Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

3 Qingdao Capital Group Water Technology Co., Ltd, Qingdao 266042, Shandong, China

4 Beijing Risun Chemical Industry Technology Research Institute Co. Ltd, Beijing 100070, China

**Abstract:** *Nannochloropsis* has been considered as a promising feedstock for biodiesel production in recent years. To improve its lipid productivity, heavy-ion irradiation mutagenesis, an effectively breeding method used in plants and microorganisms was applied in *Nannochloropsis oceanica* OZ-1. After large-scale screening using Imaging-PAM and microplate-reader, two mutants (HP-1 and HP-2) with higher growth rate were isolated from the wild type *N. oceanica*. Subsequently analysis showed that after 18 days of cultivation biomass accumulation of the HP-1 and HP-2 mutant was increased by 18% and 26% respectively compare to the wild type. Total lipid productivity of the HP-1 and HP-2 mutant was

**Received:** November 8, 2012; **Accepted:** December 21, 2012

**Supported by:** Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2011DQ007), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-Q-22).

**Corresponding author:** Yongfei Wang. Tel: +86-20-32742408; E-mail: wyfmsm@163.com

山东省自然科学基金 (No. ZR2011DQ007), 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-EW-Q-22) 资助。

295 mg/(L·d) and 275 mg/(L·d), respectively, whereas that of the wild type was 247 mg/(L·d). Both mutants showed significantly advantage over their wild type concerning biomass accumulation and lipid productivity.

**Keywords:** *Nannochloropsis oceanica* OZ-1, heavy-ion irradiation mutagenesis, microalgal biodiesel

微藻由于生物质积累速度快, 环境适应性强, 含油量高, 综合利用价值高, 被认为是最有潜力的生物质能源原料之一<sup>[1]</sup>。微藻用于生产生物燃料的优势明显, 但目前进行产业化生产还面临着巨大挑战, 微藻生物燃料生产成本依然较高。生物燃料生产成本中的 75% 是原料成本<sup>[2]</sup>。从降低生物原料成本入手成为解决微藻生物燃料生产成本的重中之重。培育生物量积累速率快、油脂产率高的藻种, 提供优质生物燃料原料, 是降低微藻生物燃料生产成本的有效手段。

目前培育微藻新品种方法主要包括选择育种、诱变育种及基因工程育种。相对而言, 诱变育种可以在短时间内获得大量优良突变体, 较周期较长的选择育种优势明显, 诱变会导致基因组水平突变, 这种突变不容易丢失, 较基因工程育种也具有一定的优势。近年来, 重离子束特别是低能碳、氮离子束作为一种新兴的辐射源, 由于其对微生物与植物种子有很强的致突变作用, 已经在微生物及植物诱变育种研究中取得了巨大的经济与社会效益<sup>[3-4]</sup>。目前为止, 这种高效的诱变方式尚未应用于产油微藻育种。

微拟球藻 *Nannochloropsis oceanica* OZ-1 是真核单细胞绿色微藻, 直径为 2~3  $\mu\text{m}$ , 属于大眼藻纲, 单珠藻科, 其细胞内总脂含量可达干重的 68%, 是公认的最有希望用于工业化的高产油海水藻之一<sup>[5-9]</sup>。针对其产油特性育种的研究, 目前仅有 1 例使用甲基磺酸甲酯 (EMS) 诱变提高其产油特性的报道<sup>[10]</sup>。本研究以微拟球藻为研究对象, 采用重离子诱变方式进行育种, 通过大规模筛选获得了两株高生长速率微拟球藻, 随后对其生物量积累和产油特性进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与培养

本实验藻种为美国马里兰大学 Chen Feng 教授

惠赠的微拟球藻 *N. oceanica*。培养液为 BG-11 海水培养基。培养条件为温度  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ , 光强为  $100\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

### 1.2 分析方法

#### 1.2.1 重离子诱变与筛选方法

取生长至对数生长初期的野生型微拟球藻, 测定细胞数目, 稀释至  $1.5\times 10^7$  个/mL。分别取藻液 1.5 mL, 置于无菌平皿中。后在中国科学院近代物理研究所重离子加速器垂直辐照终端装置下, 用  $8\times 10^7\ \text{eV}/\mu$  的碳离子束进行辐照, 离子束传能线密度为  $31\ \text{keV}/\mu\text{m}$ 。将剂量范围设定为 20 Gy、40 Gy、60 Gy、80 Gy、100 Gy、120 Gy、140 Gy 和 160 Gy。通过平板培养与对照进行比较计算致死率。选取致死率在 50% 以上辐照条件下的 2 000 个藻株进行重点筛选。利用 Imaging-PAM 和酶标仪进行大规模筛选, 在 24 孔细胞培养板中培养, 挑取最大光化学效率和  $OD_{750}$  值提高 10% 以上菌株, 最后经过 50 mL、250 mL 锥形瓶和 400 mL 鼓泡柱式光生物反应器反复验证最终确定诱变株系中生长迅速的两株突变藻株 HP-1 和 HP-2。

#### 1.2.2 细胞生长与干重测定

以处于对数生长期的突变株和野生株为种子液, 接种于 400 mL 鼓泡柱式光生物反应器中, 通入 2%  $\text{CO}_2$  进行培养。于培养的第 0、2、4、6、8、10、12、16、18 天取 10 mL 藻液, 使用清洗好的醋酸纤维素膜 (孔径  $0.45\ \mu\text{m}$ ) 抽滤,  $105^\circ\text{C}$  烘至恒重后称重, 测定干重, 绘制生长曲线。

#### 1.2.3 产油期生长曲线和总脂含量测定

采用两步法诱导产油, 将处于对数生长后期野生型藻株和突变藻株 HP-1、HP-2 藻液, 低速离心后, 培养基更换为无氮海水 BG11 培养基, 光照强度提高到  $300\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 高光缺氮诱导产油。于产油期第 0、3、5、7、9 天取样测定产油期生长曲

线,同时取 50 mg 野生型和突变株冻干藻粉,以氯仿-甲醇共溶剂提取,采用重量法测定总脂含量<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 微拟球藻重离子诱变和筛选方法建立

本研究选取产业化前景较好的微拟球藻为研究对象,进行重离子诱变育种。不同诱变剂量细胞致死率结果(图 1)显示诱变剂量越高其细胞致死率越高。根据诱变经验,致死率大于 50%时,产生突变的几率大。致死率为 50%的辐照剂量为 80 Gy,因此剂量在 80 Gy 以上辐照条件下的 2 000 个藻株作为重点筛选对象。随后利用叶绿素荧光仪和酶标仪进行大规模筛选,进一步反复验证获得两株高生长速率微拟球藻突变株(HP-1 和 HP-2)。

### 2.2 突变株生长特性和油脂积累特性

随后对筛选获得的两株高生长速率突变藻株进行生长曲线测定,结果显示两株突变藻株生物量累积较野生型藻株高(图 2),培养至第 18 天时较野生藻株分别提高 18%(HP-1)和 26%(HP-2)。

进一步对突变株产油期特性进行分析,结果显示突变株 HP-1 和 HP-2 产油期生物量积累较野生型藻株大幅提高,在培养末期突变株 HP-1 和 HP-2 生物量可以分别达到 6.5 g/L 和 6.6 g/L,野生型藻株为 5.6 g/L(图 3A)。总脂含量突变株和野生藻株基本一致(图 3A)。根据生物量积累和总脂含量计算得到各藻株油脂产率,结果显示 HP-1 和 HP-2 突变株油脂产率较野生型大幅提高,突变株 HP-1 和

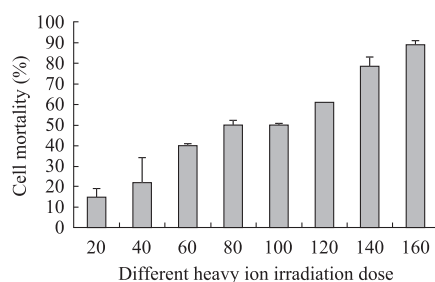


图 1 微拟球藻重离子诱变各辐照剂量细胞致死率  
Fig. 1 Mortality of *N. oceanica* treated with different dose of heavy-ion irradiation.

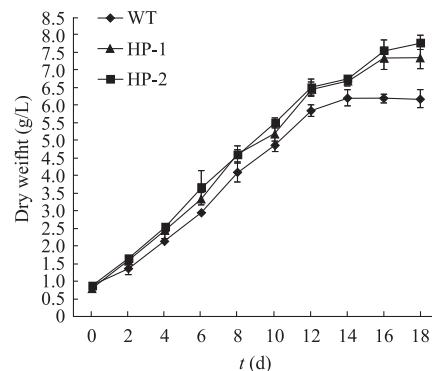


图 2 微拟球藻野生型、突变株 HP-1 和 HP-2 生长曲线  
Fig. 2 Growth curve of *N. oceanica* wild type (WT), HP-1 and HP-2 mutant.

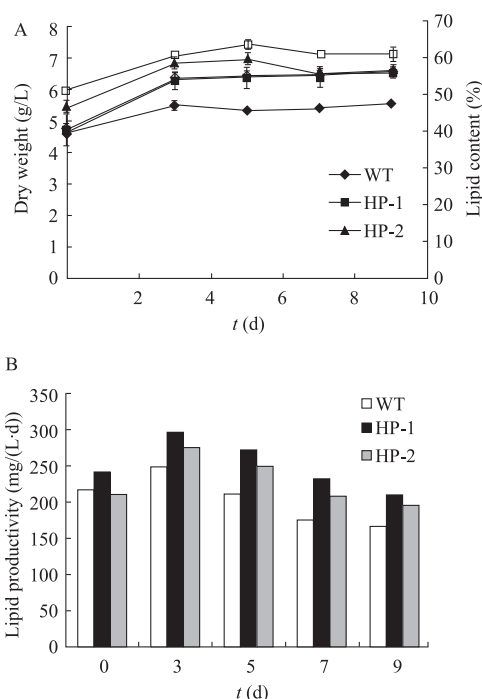


图 3 微拟球藻野生型、突变株 HP-1 和 HP-2 产油期生长曲线(实心标记)、总脂含量(空心标记)(A)和油脂产率(B)

Fig. 3 Growth curve (filled marker), lipid content (empty marker) (A) and lipid productivity (B) of *N. oceanica* wild type (WT), HP-1 and HP-2 mutant during lipid accumulation phase.

HP-2 可以分别达到 295 mg/(L·d)和 275 mg/(L·d),而野生型为 247 mg/(L·d)(图 3B)。与已经报道的其他产油微藻油脂产率相比(表 1),本研究所获得的两株微拟球藻突变株优势明显。

高光缺氮诱导产油时, 油脂大量积累, 同时其生物量也相应提高, 原因在于细胞内仍残存已经固定的氮源, 细胞仍然可以生长, 表现为细胞数量增多, 细胞体积增大, 最终导致生物量增加<sup>[12]</sup>。另外发现未高光缺氮诱导时细胞内也存在大量油脂, 但此时油脂以极性脂为主, 高光缺氮诱导后极性脂大量减少, 中性脂大幅增加, 最终油脂含量提高。

生物量积累和油脂产率是微藻产业化生产的重要评价指标, 本研究所获得的两株微拟球藻突变株在生物量积累和油脂产率方面较野生型藻株具有明显优势, 并且在获得突变株 1 年后优良性状仍未丢失, 但是否可以作为未来产业化生产的优质藻种, 还有待于室外大规模培养实验验证。

表 1 微拟球藻突变藻株 HP-1、HP-2 和其他已经报道产油微藻油脂产率

Table 1 Lipid productivity of *N. oceanica* HP-1, HP-2 and other microalgae species reported in the literature

Microalgae species	Lipid productivity (mg/(L·d))	Reference
<i>Chlorella vulgaris</i>	40	[13]
<i>Neochloris oleoabundans</i>	133	[14]
<i>Scenedesmus</i> sp.	39	[15]
<i>Botryococcus braunii</i>	21	[15]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	204	[7]
<i>Nannochloropsis oceanica</i> OZ-1 HP-1	295	This study
<i>Nannochloropsis oceanica</i> OZ-1 HP-2	275	This study

### 3 结论

本研究以微拟球藻为研究对象, 采用重离子诱变结合 Imaging-PAM 和酶标仪大规模筛选获得两株高产油突变株 (HP-1 和 HP-2), 其主要优势在于生物量积累和油脂产率较野生型藻株高, 是否产业化优势明显有待于室外大规模培养验证。

### REFERENCES

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 294–306.
- [2] Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC, et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renew Sust Energy Rev*, 2011, 15: 584–593.
- [3] Wang JF, Li WJ, Zhang Y. Biology breeding new technology heavy-ion irradiation mutagenesis. *Bull Biol*, 2007, 42(6): 23–24 (in Chinese).  
王菊芳, 李文建, 张莹. 生物育种新技术—重离子束辐照. *生物学通报*, 2007, 42(6): 23–24.
- [4] Zhou LB, Li WJ, Qu Y, et al. Progress and tendency in heavy ion irradiation mutation breeding. *Nucl Phys Rev*, 2008, 25(2): 165–170 (in Chinese).  
周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 重离子束辐照育种研究进展及发展趋势. *原子核物理评论*, 2008, 25(2): 165–170.
- [5] Chen L, Liu T, Zhang W, et al. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresour Technol*, 2012, 111: 208–214.
- [6] Koberg M, Cohen M, Ben-Amotz A, et al. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 4265–4269.
- [7] Li YS, Lian S, Tong DM, et al. One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis* sp. on solid base Mg-Zr catalyst. *Appl Energ*, 2011, 88(10): 3313–3317.
- [8] Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(1): 100–112.
- [9] Umdu ES, Tuncer M, Seker E. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported CaO and MgO catalysts. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 2828–2831.
- [10] Anandarajah K, Mahendrapurumal G, Sommerfeld M, et al. Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Appl Energ*, 2012, 96: 371–377.
- [11] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911–917.
- [12] Dean AP, Sigeo DC, Estrada B, et al. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 4499–4507.
- [13] Lv JM, Cheng LH, Xu XH, et al. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 6797–6804.
- [14] Li YQ, Horsman M, Wang B. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81: 629–636.
- [15] Yoo C, Jun SY, Lee JY, et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour Technol*, 2010, 101: S71–S74.

(本文责编 郝丽芳)