

三角褐指藻紫外线诱变及高产 EPA 藻株选育

刘红全, 潘艺华, 林小园, 李洁琼, 袁 莎, 卢恩秋

(广西民族大学 海洋与生物技术学院, 化学与生物转化过程新技术广西高校重点实验室, 广西 南宁 530006)

摘要: 利用紫外诱变法对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)进行诱变育种。实验得到三角褐指藻的最佳紫外辐射剂量为 18 W 的紫外灯距离藻液 35 cm 照射 15 min。通过单细胞分离技术获得 1 株突变株 UP1, 与出发藻株相比, 突变株 UP1 的 EPA 产量提高 10.2%。研究了诱变株的最适生长及产 EPA 的条件, 结果表明 UP1 在 NaNO₃ 75 mg/L, pH 7.5, 昼夜温度 17~15℃, 接种量为 10% 时培养 7 天, 具有最大的生长速率和 EPA 产量。探讨了诱变株的遗传稳定性, 结果表明诱变株可稳定遗传。

关键词: 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*); 紫外诱变; EPA; 培养条件; 遗传稳定性

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)09-0087-07

DOI: 10.11759/hyxx20140423005

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)是一种真核海洋单细胞硅藻, 光合作用极强, 是重要的光能转换器, 在海洋生态系统中处于重要的营养级别^[1]。由于海洋微藻富含各种营养物质及代谢产物被作为潜在的巨大资源, 应用于工业各个领域。三角褐指藻能够大量合成并积累 PUFAs, 特别是 EPA, 有望作为工业化生产 EPA 的来源^[2]。微藻 PUFAs 的积累量不仅与培养条件有关, 还受藻种自身遗传决定。目前对三角褐指藻产脂肪酸培养条件的研究见诸多报道^[3-4], 但在藻种的诱变改良方面的研究相对较少^[5]。目前, 生产采用的藻种多直接从自然界分离获得, 性状单一, 藻种易退化, 微藻的产量及生物活性物质无法满足人们日益增长的需求^[6]。因此利用海洋微藻的育种技术, 改良微藻品质, 培养出生长快速, EPA 产量高的新品种迫在眉睫。

紫外辐射是一种最常用有效的物理诱变方法, 其诱变效应是引起物种的 DNA 结构改变而形成突变型^[7]。研究表明中波长的紫外辐射对微藻的光合作用、细胞分裂及不饱和脂肪酸的产量具有促进作用^[8]。Liang 等^[5]研究结果表明, 三角褐指藻通过紫外辐射能显著提高不饱和脂肪酸的含量, 尤其是 EPA 的含量。本实验用紫外线照射对三角褐指藻进行诱变, 以期筛选出生长速度快, EPA 含量高的株系。

1 材料与方法

1.1 藻种

试验所用的三角褐指藻购买于武汉中国科学院

水生生物研究所。

1.2 培养条件

250 mL 的三角瓶内装 100 mL 的培养液, 于 121℃ 高压灭菌 20 min。培养温度(24±1)℃, 光照强度(4×40 W 日光灯照射), 光暗周期为 12 h/12 h。培养液采用 F/2 配方配制, 人工海水的配方参考陈百灵^[9]的稍作改进。每天振摇 2~3 次, 藻悬液长到指数生长期后期时, 用于试验。

0.5 mg/mL 尼罗红溶液配置^[10]: 称取 0.01 g 尼罗红粉末溶于 20 mL 丙酮, 配置得到 0.5mg/mL 的尼罗红溶液, 在 1mL 的藻液中(细胞密度为 10⁶ 个/mL)加入染色液 20 μL。

1.3 紫外线的诱导突变

1.3.1 紫外线诱变预实验

取对数生长期的藻液 6 mL 置于 9 cm 培养皿底部铺一薄层, 距离 18 W 的紫外灯 35 cm 进行不同时间的照射, 时间梯度为 : 0、5、10、15、20 和 30 min, 设置 3 个平行样。诱变后, 置于暗环境中培养 12 h, (避免光修复), 再转至光照环境中培养。第 3 天待藻细胞死亡率稳定后, 统计其死亡率。将恢复生长后的

收稿日期: 2016-11-29; 修回日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960215); 广西自然科学基金项目(桂科青 0728019)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 30960215; Guangxi Natural Science Foundation Program, No. 0728019]

作者简介: 刘红全(1975-), 男, 黑龙江肇东人, 副教授, 博士, 主要从事生物技术研究, 电话: 13977113695, E-mail: lhongquan@163.com

藻液进行扩大培养,测定比生长速率,及粗脂肪含量,确定合适的诱变剂量。

1.3.2 紫外线诱变及突变株的筛选

以预试验中确定的诱变剂量对出发株诱变。诱变后将全部藻液转移到 50 mL 三角瓶中,遮光 12 h,3 d 后将藻液涂布在固体培养基上,12 d 后挑取体积较大、颜色较纯的藻落 200 株于 50 mL 的培养液中。比较藻液颜色、是否贴壁筛选 30 株,接种到 150 mL 培养液中培养,2 个平行样。以未经诱变的藻液为对照,每隔一天计算细胞密度,10 d 后离心,干燥,测定脂肪酸。以 C₀ 为对照组,根据终细胞密度及脂肪酸含量选育一株优良藻株,进行后续工作。

1.4 致死率的计算

待藻液死亡细胞稳定后用血球计数板记录各组存活细胞数量,按下面公式进行计算:

$$\text{致死率(\%)} = (1 - \frac{\text{处理组存活细胞数}}{\text{对照组细胞数}}) \times 100$$

1.5 脂肪酸含量的初步测定——尼罗红染色法

尼罗红是一种脂溶性荧光染色剂,通过染色选择合适的而激发波长和自发波长可测定细胞内的油脂含量,细胞经染色后的荧光强度与细胞内油脂含量显著相关^[11]。取 1 mL 细胞密度为 10⁶ 个/mL 的藻液,加入尼罗红染料(0.5 mg/mL)20 μL 于 40℃ 孵育 10 min,将染好颜色的藻细胞滴入载玻片中,于荧光显微镜下进行观察细胞中脂滴的大小和数量^[12]。

1.6 培养条件的优化

1.6.1 NaNO₃ 对诱变株生长及产 EPA 的影响

NaNO₃ 设置 6 个梯度: 0、37.5、75、102.5 和 150 mg/L,其余培养条件不变。每个梯度设置 3 个平行样,隔天测细胞密度,求平均值,实验重复 2 次。

1.6.2 pH 对诱变藻株生长及产 EPA 的影响

pH 设置 5 个梯度: 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,其余培养条件不变。每个梯度设置 3 个平行样,隔天测细胞密度,求平均值,实验重复 2 次。

1.6.3 温度对诱变藻株生长及产 EPA 的影响

温度设置 5 个梯度: 17、20、23、25、27 和 30℃,pH 为 7.5,其余培养条件不变。每个梯度设置 3 个平行样,隔天测细胞密度,求平均值,实验重复 2 次。

1.6.4 环境条件的正交试验对诱变藻株生长及产 EPA 的影响

根据微藻生长及产 EPA 的条件差异,选择合适

的培养条件,通过正交试验筛选出培养条件的优化组合,正交试验表如下。

表 1 试验因子及其水平

Tab. 1 The experimental factors and their levels

因子	水平 1	水平 2	水平 3
昼夜温差(°C)	17~15	20~18	23~21
接种量(%)	8	10	12
培养天数(d)	7	10	13

pH 为 7.5,其余培养条件不变。每个试验重复 3 次,隔天测细胞密度,求平均值。

1.7 遗传稳定性分析

将筛选得到的诱变株连续转接 6 代,测定第一代和第六代的 EPA 含量,看是否能稳定遗传。

1.8 不饱和脂肪酸的提取及气相色谱测定

1.8.1 采用甲醇—氯仿提取法

参考姚领等^[13]采用氯仿—甲醇混溶液(2:1, v/v)超声提取粗脂肪酸,将粗提液加入 3 mL 1 mol/L 的 KOH-CH₃OH 混溶液于 75℃ 水浴中皂化,最后用正己烷萃取上机气相色谱测定。

1.8.2 脂肪酸的色谱测定法

采用日本岛津的气相色谱仪,60 m×0.32 mm×0.25 μm 石英毛细管柱,汽化室和检测器的温度均为 250℃,色谱柱的升温程序:初始 70℃,以 30℃/min 的速率升温至 150℃,然后以 5℃/min 升温到 250℃,保持到所测样品的峰值都出现。载气为高纯 N₂,流速 30 mL/min, H₂ 流速为 40 mL/min,空气流速为 450 mL/min,分流比为 1:60,进样量 1 μL。通过与标准脂肪酸保留时间的对比鉴别各脂肪酸组分,面积归一化法计算出各脂肪酸的相对含量。

2 实验结果与分析

2.1 紫外线对三角褐指藻诱变的实验结果

在紫外线的照射下,随照射时间的延长藻液颜色逐渐变浅,活细胞数也随照射时间的延长而降低。当照射 15~20 min 时藻液变为浅色且有混浊白色,而照射 30 min 后的藻液出现白色糝状固体。待藻细胞死亡率稳定下来,统计其死亡率(图 1)。

由图 1 可看出,辐射时间从 15 min 增至 20 min 时,藻细胞死亡率倍增,说明此时的辐射量是处于多数细胞的敏感区域与耐受极限。经紫外诱变处理后的三角褐指藻生长受到抑制,恢复生长的速度缓

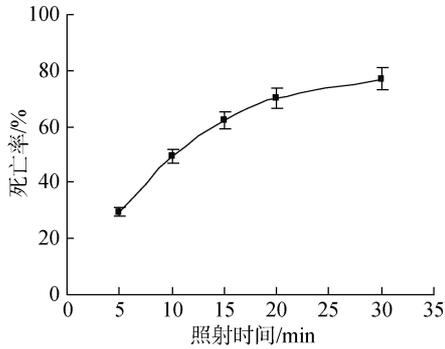


图 1 紫外照射下三角褐指藻的致死率

Fig. 1 The lethality rate of UV in *Phaeodactylum tricornerutum*

慢,当照射 30 min 后几乎不生长。为了获得较多的突变型,又不因辐射剂量过大造成大部分细胞死亡而残留一些不活跃的细胞,同时根据恢复生长后测得的比生长速率及 EPA 含量,本实验认为三角褐指藻的最佳辐射条件为在 18 W 紫外灯的照射下,距离 35 cm 照射 15 min。

2.2 诱变后优良藻株的选育

2.2.1 尼罗红染色进行初筛

尼罗红是一种亲脂性的恶嗪类荧光染料,能与脂类物质结合,在一定的激发波长下能发射脂特异性荧光,通过检测脂荧光强度可以对细胞中的油脂进行定量分析。利用荧光显微镜观察比较细胞内油珠的大小、数量,荧光强度可以判断微藻油脂含量高低。尼罗红染色法可以作为富油微藻初筛的指标,简便快速。对分离得到的微藻进行尼罗红染色,观察荧光强度。

由图 2 可看出筛选得到的诱变藻株细胞和脂肪粒都比出发藻株大,尤其细胞内脂肪粒明显增多,根据激发出的荧光强度可以初步判定诱变株的总脂肪酸含量要高于对照组。这与气象色谱测定的脂肪酸含量提高相一致。

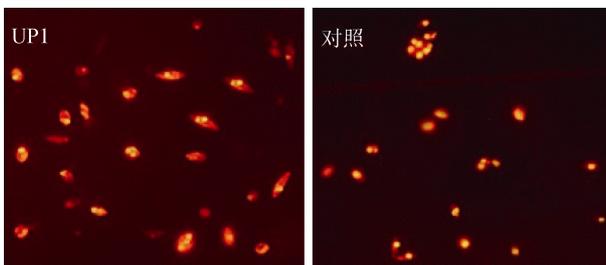


图 2 诱变藻株油脂的荧光定性分析(10×20 倍)

Fig. 2 Oil fluorescence qualitative analysis of mutagenesis in the algal strains

2.2.2 通过比生长速率及 EPA 含量进行筛选

经过预实验的最佳诱变剂量诱变后,利用单细胞分离技术筛选得到 1 株生长较快,脂肪酸含量较高的藻株,以诱变剂名称及微藻名称的首字母命名为 UPI。其 EPA 质量比及比生长速率分别见图 3 和图 4。

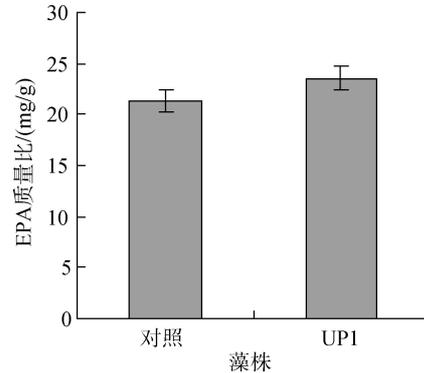


图 3 诱变后选育藻株的 EPA 质量比

Fig. 3 The EPA contents and the accumulation rates of UPI

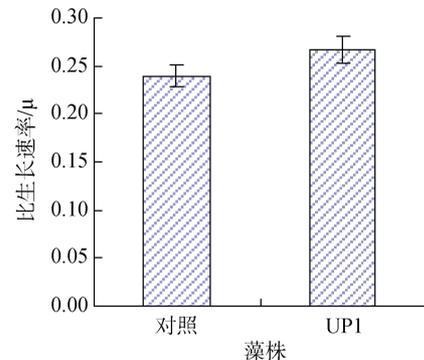


图 4 诱变后选育藻株的比生长速率

Fig. 4 The cell growth rate of breeding algal strains

由图 3 中可看出选育出的藻株 EPA 质量比明显高于对照组,为 23.53 mg/g,比对照组提高了 10.2%。由图 4 可看出 EMS 诱变后的微藻生长受到轻微抑制,比生长速率略低于对照组。

2.3 对选育出的藻株进行培养条件的优化

2.3.1 氮源对诱变藻株产 EPA 的影响

氮源是海洋微藻生存的必需营养盐,不仅影响细胞的生长速度,而且严重影响细胞内活性物质的合成积累。本实验考察了氮源浓度对诱变藻株产 EPA 的影响,结果见图 5。

由图 5 可知在一定质量浓度范围内随氮源含量的增加脂肪酸积累量增大,在 NaNO_3 质量浓度为 75 mg/L 时, EPA 的积累量达到最大,此后随 NaNO_3 质量浓度

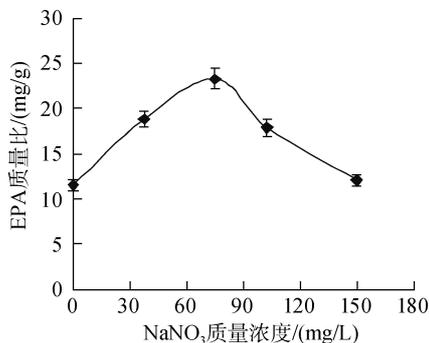


图 5 NaNO₃ 对三角褐指藻诱变株产 EPA 的影响

Fig. 5 The influence of NaNO₃ on EPA production of UP1

增加, EPA 含量降低。这与 Mujtaab^[14]研究的相一致较低的氮源浓度有利于脂肪酸的积累。通过方差分析 ($P=0.096$)发现氮源对 UP1 产 EPA 的影响不是很显著。

2.3.2 pH 对诱变藻株产 EPA 的影响

pH 对海洋微藻的生长及生化组分的有着重要的影响作用。有些研究者认为 pH 会影响藻细胞在光合作用中对 CO₂ 及有机碳源的利用效率,并在培养基中影响微藻细胞对离子的吸收和利用^[15]。本实验的 pH 值试验结果见图 6。

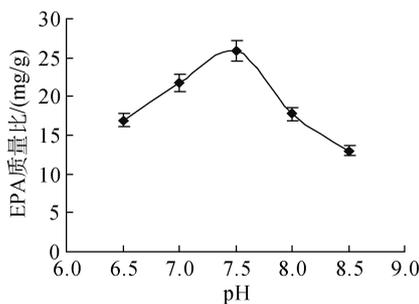


图 6 pH 对 UP1 产 EPA 的影响

Fig. 6 The influence of pH on EPA production of UP1

由图 6 可看出诱变株产 EPA 的最适 pH 值为 7.5。在此 pH 条件下 UP1 EPA 产量为 25.87 mg/g, 通过方差分析得到 P 值小于 0.05, 说明 pH 对微藻 EPA 的产量影响呈显著性差异。

2.3.3 温度对诱变藻株产 EPA 的影响

海洋微藻的较适生长温度一般在 20~30℃, 但低温有利于提高不饱和脂肪酸含量, 以增加膜的流动性^[16]。结果见图 7。

由图 7 可看出低温更有利于三角褐指藻 EPA 的积累, 在 30℃ 条件下三角褐指藻几乎不生长, EPA 产量低。筛选获得的诱变藻在 20℃ 条件下 EPA 质量比最高, 为 22.59 mg/g。通过方差分析发现温度对 EPA

的产量影响差异性不显著 ($P=0.89$)。

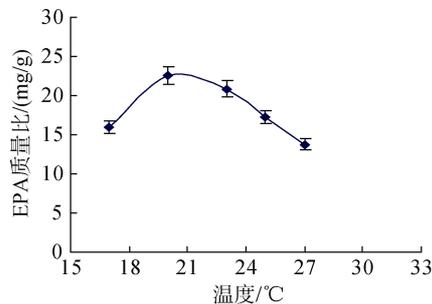


图 7 温度对 UP1 产 EPA 的影响

Fig. 7 The influence of temperature on EPA production of UP1

2.3.4 环境条件的正交组合对诱变藻株产 EPA 的影响

不同的培养条件对微藻中 EPA 含量的影响见直观分析表 2。根据表 2 中 R 值得到, 影响 UP1 产 EPA 的因素主次顺序: 接种量 > 培养天数 > 昼夜温度, 其最优化组合为: 17~15℃、接种量 10%、培养 7 d。由此可看出较低温及短时间培养更有利于三角褐指藻积累 EPA。

2.4 遗传稳定性分析

鉴于诱变藻株的性状常常不稳定, 尤其是在连续继代培养时, 为了检测所得藻株的性状是否稳定, 在同样的培养条件下连续转接 6 代, 测定第一代和第六代的 EPA 含量, 结果见图 8。

由图 8 可看出诱变株第一代和第 6 代的 EPA 产量变化不显著 ($P=0.16$), 说明选育的变异藻种具有良好的遗传稳定性。

3 讨论

近年来随着生物技术的发展, 微藻的商业化开发不再局限于只作为海产养殖的食物饵料, 还广泛应用于食品, 医药保健, 化妆品等领域。但微藻的应用价值需依赖于藻种的生理遗传稳定性及生产活性物质的高效性。目前已从自然界中分离得到几种较好的生产藻种^[17-18], 但在长期培养下, 易退化, 活性物质的产量降低。因此需做大量工作, 在现有的藻种资源中选育出更多的优良藻种。紫外线辐照作为最常用, 成本最低的遗传育种方法, 已广泛应用微藻的诱变育种中。周玉娇等^[19]采用紫外线对小球藻 Y019 进行诱变, 筛选获得 M37 和 M67 两个高含油量株系, 油脂含量分别提高了 24.58%、17.88%。张学成等^[20]采用紫外线诱变小球藻, 筛选得到突变株 M51、M59、M73, 其生长速率比出发藻株分别提

表 2 培养条件对 UP1 产 EPA 的影响正交试验结果及直观分析

Tab. 2 Results of orthogonal experiments of cultivation conditions for UP1-producing EPA

实验号	水平			EPA 产量(mg/g)
	No	昼夜温度(°C)	接种量(%)	培养时间(d)
1	17~15	8	7	20.77
2	17~15	10	10	14.66
3	17~15	12	13	7.80
4	20~18	8	10	10.65
5	20~18	10	13	20.90
6	20~18	12	7	11.06
7	23~21	8	13	16.71
8	23~21	10	7	15.54
9	23~21	12	10	7.60
U k ₁	14.410	16.043	15.790	
P k ₂	14.203	17.033	10.970	
I k ₃	14.283	8.820	15.137	
R	1.127	8.213	4.820	

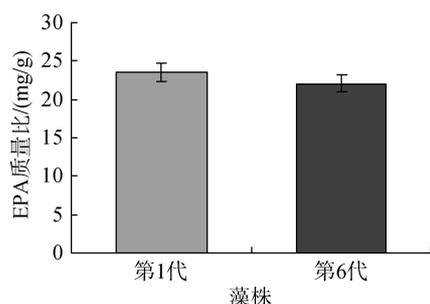


图 8 诱变藻株第 1 代与第 6 代的 EPA 含量比较

Fig. 8 The EPA content of the algal strains of first-generation mutagenesis compared with that of the sixth-generation mutagenesis

高了 6.23%、3.8%、5.92%，蛋白含量提高约 2.5%。本文采用 18 w 的紫外辐射对三角褐指藻进行诱变，筛选得到 1 株油脂产量较高的藻株命名为 UP1，其 EPA 产量为 23.53 mg/g，比对照组提高了 10.2%。

海洋微藻的脂肪酸组分及产量不仅与藻种自身有关，还受生长的环境条件影响，如培养基组分，CO₂ 的通气量，光照辐射量及温度等密切相关，其中氮源及磷酸盐作为基础元素，对微藻的生长及脂肪酸的积累有直接的影响。大量研究表明，氮源缺乏会减少微藻细胞的蛋白质含量，而增加脂肪酸和碳水化合物的含量 [21-22]。因为在氮源不足时，细胞的蛋白合成和增殖分裂活动均受到抑制，而不断吸收的多余碳源就转化为脂肪酸贮存在细胞中。Piorreck 等 [23] 报道三角褐指藻和杜氏藻在缺氮的情况下，有利于

脂肪酸的积累。在本试验中诱变株 UP1 在不同氮浓度的培养基中，随着氮浓度的升高，油脂积累量逐渐下降，在 NaNO₃ 为 75 mg/L 时 EPA 产量最大，与前人的实验结果基本一致 [24]。微藻的生长及油脂积累也随 pH 不同呈现差异。pH 通过影响细胞内代谢酶活性和对离子的吸收作用从而影响微藻的生长代谢。本实验得到三角褐指藻的产 EPA 的较适 pH 为 7.5，这与 Pahl 等的研究一致，硅藻的最适生长 pH 为 7.2~8.1 [25]。在实验中发现三角褐指藻生长和产 EPA 的温度比小球藻的要低，在高于 27°C 以上，三角褐指藻几乎不生长。这可能与藻种有关，三角褐指藻属于底栖硅藻，在较低温，低光密度下也能自养生长 [26]。钱振明等 [27] 考察了温度对 8 种底栖硅藻生长及其理化成分的影响。结果表明：在 15~25°C 时细胞的比生长速率及主要理化成分(蛋白、多糖、脂肪酸)含量均可达到最大，而低于 15°C 或高于 30°C 均不利于细胞生长及理化成分的积累。在实际实验中发现三角褐指藻的较适生长温度要比产脂肪酸的温度稍高，因此本实验采用昼夜温差的培养方式。

在单因素实验的基础上，对筛选得到的诱变藻株 UP1 进行培养条件优化，得到较适培养条件为：NaNO₃ 75 mg/L，pH 7.5，昼夜温度 17~15°C、接种量 10%、培养 7 d，在此条件下培养，藻株的 EPA 产量为 26.38 mg/g。通过遗传稳定性试验分析可知 UP1 的第一代和第 6 代 EPA 产量变化不显著 ($P=0.16$)，说明选育的变异藻种具有良好的遗传稳定性。

参考文献:

- [1] Thelen J J, Ohlrogge J B. Metabolic engineering of fatty Acid biosynthesis in Plants[J]. *Metabolic Engineering*, 2002, 4(1): 12-21.
- [2] Domergue F, Abbadi A, Ott C, et al. Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(37): 35115-35126.
- [3] Kadar E, Rooks P, Lakey C, et al. The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 439C(22): 8-17.
- [4] Huerlimann R, Nys R D, Heimann K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 107(2): 245-257.
- [5] Liang Y, Beardall J, Heraud P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae)[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, 82(3): 161-172.
- [6] 杨世杰, 王希善, 李继芬, 等. 螺旋藻培养初探[J]. *中国农业大学学报*, 1988, 7(1): 71-76.
Yang Shijie, Wang Xishan, Li Jifen, et al. Preliminary study on spirulina culture[J]. *Journal of China Agricultural University*, 1988, 7(1): 71-76.
- [7] Beardall J, Raven J A. The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology[J]. *Phycologia*, 2004, 43(1): 26-40.
- [8] Odmark S, Wulff A, Wångberg S Å, et al. Effects of UVB radiation in a microbenthic community, of a marine shallow-water sandy sediment[J]. *Marine Biology*, 1998, 132(2): 335-345.
- [9] 陈百灵. 磷硅对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
Chen B. Effect of Phosphorus and silicon on the growth and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [10] Moazami N, Ranjbar R, Ashori A, et al. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2011, 35(5): 1935-1939.
- [11] Elsey D, Jameson D, Raleigh B, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(3): 639-642.
- [12] Chen W, Zhang C, Song L, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 77(1): 41-47.
- [13] 姚领, 胡萍, 胡蓓娟, 等. 两种溶剂提取法提取三角褐指藻中不饱和脂肪酸的比较[J]. *食品工业科技*, 2006(12): 114-116.
Yao Ling, Hu Ping, Hu Beijuan, et al. The differences in unsaturated fatty acids extracted by different two solvent systems from *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *The Food Industry Science and Technology*, 2006(12): 114-116.
- [14] Mujtaba G, Choi W, Lee C G, et al. Lipid production by *Chlorella vulgaris*, after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123(4): 279-283.
- [15] Borowitzka M A, Borowitzka L J. *Micro-algal Biotechnology*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [16] Pahl S L, Lewis D M, Chen F, et al. Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): Effect of some environmental factors(microbial physiology and biotechnology)[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2010, 109: 235-239.
- [17] Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 57-70.
- [18] Chan Y, Jun S Y, Lee J Y, et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101 Suppl 1(1): S71-S74.
- [19] 周玉娇, 李亚军, 费小雯, 等. 小球藻紫外线诱变及高含油藻株筛选[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(12): 2124-2129.
Zhou Yujiao, Li Yajun, Fei Xiaowen, et al. UV-Irradiation of *Chlorella vulgaris* and screening of petroliferous strains[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(12): 2124-2129.
- [20] 张学成, 时艳侠, 孟振. 小球藻紫外线诱变及高产藻株筛选[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2007, 37(5): 749-753.
Zhang Xuecheng, Shi Yanxia, Meng Zhen. The UV-Irradiation of *Chlorella vulgaris* beijerinck and screening of productive strain[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(5): 749-753.
- [21] Widjaja A, Chien C C, Ju Y H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, 40(1): 13-20.
- [22] Courchesne N M D, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches[J].

- Journal of Biotechnology, 2009, 141(1): 31-41.
- [23] Piorreck M, Baasch K H, Pohl P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(2): 207-216.
- [24] Yeesang C, Cheirsilp B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3034-3040.
- [25] 杨官品, 张继民. 温度逆境处理提高拟微球藻 (*Nannochloropsis oculata*) EPA 含量的研究[J]. *海洋学报*, 2002, 24(4): 132-135.
- Yang Guanpin, Zhang Jimin, et al. Obvious increase of EPA content of *Nannochloropsis oculata* achieved in temperature stresses[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2002, 24(4): 132-135.
- [26] Yamamoto T, Jin O S, Goto I. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of microphyto-benthos *Nitzschia* sp.[J]. *Japanese Journal of Phycology*, 2004, 52: 5-11.
- [27] 钱振明, 邢荣莲, 吴春雪, 等. 温度对 8 种底栖硅藻生长及其理化成分的影响[J]. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2009, 22(1): 30-34.
- Qian Zhenming, Xing Ronglian, Wu Chunxue, et al. Effects of temperature on growth and physiological biochemical compositions of eight benthic diatoms[J]. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2009, 22(1): 30-34.

UV irradiation to *Phaeodactylum tricornutum* and screening of EPA strains

LIU Hong-quan, PAN Yi-hua, LIN Xiao-yuan, LI Jie-qiong, YUAN Sha, LU En-qiu
(College of Marine Science and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Guangxi Key Laboratory Cultivation Base for Polysaccharide Materials and their Modification, Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, Nanning 530006, China)

Received: Nov. 29, 2016

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; UV mutagenesis; EPA; culture condition; genetic stability

Abstract: This study investigated the mutagenesis of *Phaeodactylum tricornutum* induced by UV irradiation and its capacity of EPA accumulation influenced by various cultivation factors. The appropriate ultraviolet irradiation dose that can be applied to *P. tricornutum* was found to be below 35 cm for 15 min. A special clone UP1 was isolated from more than 200 mutant clones. Compared with the wild species, the EPA content of mutant UP1 was increased by about 10.2%. The effects of NaNO₃ concentration, pH of the medium, and temperature on EPA production were investigated, which showed that the optimal cultivation conditions were NaNO₃ 75 mg/L, pH 7.5, natural day/night temperature about 17–15°C, and 10% of inoculation density for 7 days of cultivation. The mutant species demonstrated inherited stable.

(本文编辑: 梁德海)