

文章编号:1005-8737(2001)02-0063-04

细胞融合法构建 EPA 和 DHA 高产异养藻株的研究

沈继红, 林学政, 刘发义, 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘 要:利用细胞融合技术,将富含EPA和DHA的自养微藻绿色巴夫藻和生长迅速的异养微藻四鞭藻相融合,并筛选出兼养的融合藻株。融合藻株的总脂、EPA、DHA和EPA/DHA等各指标均比异养亲本四鞭藻有较大提高;在兼养条件下生长速率高于亲本微藻,脂肪酸组成以多不饱和脂肪酸为主;而在异养条件下以饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸为主。

关键词:细胞融合;绿色巴夫藻;四鞭藻;EPA;DHA;微藻培养

中图分类号:S968.4

文献标识码:A

海洋中的微藻,大部分是自养型,其生长过程中,离不开光合作用。这样,光照就成了自养型微藻培养中的重要制约因子^[1]。目前自养微藻培养主要是在开放的水池中进行,光能利用率低,易受污染,微藻生长缓慢,细胞密度低^[2]。海洋中还有些微藻具有异养或兼养生长繁殖的特性,即可以直接从糖类、脂类、蛋白质水解物、有机酸或其他形式的有机化合物中获得它们所需的能量和碳源,而不需要通过光合作用。由于异养微藻排除了自养中最大的制约因子光能的影响,可以用酵母和细菌发酵一样的方法来培养,能大大提高微藻的生长速度和细胞密度,生产成本大为降低。另外通过选择合适的培养基及培养条件,可以提高藻体中有效成分的浓度并保持稳定,并且由于发酵罐中培养条件容易控制,能有效地防止杂藻或其他生物污染^[3]。

获得富含EPA和DHA微藻,传统的研究方式是直接从自然界中筛选能合成EPA和DHA的自养藻株,利用优化培养技术,进行定向培养来提高微藻中的EPA和DHA含量。如果能突破自养微藻培养的局限,获得既异养又能大量合成EPA和DHA的

藻株必将具有深远的意义。本研究是利用细胞融合技术,将高产EPA和DHA的自养微藻和生长快速的异养微藻相融合,以期获得富含EPA和DHA的异养微藻,为大规模培养提供优良藻种。

1 材料与方法

1.1 实验与材料

自养微藻:绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*),属金藻门,普林藻纲,巴夫藻目;异(兼)养微藻:四鞭藻(*Tetraselmis* sp.),属绿藻门,绿藻纲,团藻目。藻种均来自本所微藻室。

1.2 微藻的培养

2种藻的自养培养均采用Provasoli培养基^[4],25℃,2 000 lx光照下静置培养;四鞭藻的兼养和异养培养采用SK(IA)改良培养基^[5],兼养在25℃,2 000 lx光照下静置培养,异养在25℃暗培养。

1.3 实验方法

1.3.1 总脂含量的测定 按改进的Bligh-Dyer法^[6]测定微藻的总脂含量。即向每克微藻干粉中加入10 ml混合溶剂(氯仿:甲醇:蒸馏水=1:2:0.8,体积比),摇动,离心,收集提取液。下层沉淀重复上述操作。共提取5次,合并所有的提取液,与氯仿和蒸馏水(1:1)混合,使氯仿:甲醇:蒸馏水为1:1:0.9,混匀静置。上层为水相,含盐类和水溶性物

收稿日期:2000-09-11

基金项目:国家“八六三”高新技术资助项目(863-819-Q-17)

作者简介:沈继红(1972-),男,助理研究员,在职博士生,从事海洋生物活性物质方面研究。

质;下层为氯仿层,含脂类。氯仿层旋转蒸发至恒重,称量得到总脂的重量。

1.3.2 脂肪酸组成分析 准确称取15 mg藻粉,置螺口试管中,加80 μ l内标(100 mg饱和脂肪酸19:0标准样品溶于正己烷并定容至100 ml)和1 ml 1 mol/L的KOH-CH₃OH溶液,充N₂保护,轻轻摇动,于75℃水浴皂化10 min,冷却后加2 ml 1 mol/L的HCl-CH₃OH溶液,振荡1 min,75℃水浴甲酯化10 min,冷却,加0.5 ml石油醚(60~90℃),振荡,分离提取脂肪酸甲酯,加入少许蒸馏水促进分层。振荡后离心,取上层石油醚相进行气相色谱分析。定量分析通过对各组分峰面积积分,再用归一法计算出各脂肪酸组分的质量分数^[7]。

1.3.3 原生质体的制备 取指数生长长期的绿色巴夫藻和四鞭藻细胞(细胞浓度约为10⁶ ml⁻¹),分别在室温下以4 000 r/min离心5 min,弃上清液;用无菌海水洗涤沉淀的藻细胞1次,重复上述操作;将洗好的藻细胞悬浮于5 ml复合酶溶液(酶溶液组成为2%纤维素酶、0.5%半纤维素酶和1.5%离析酶,pH 6.0,并含0.6 mol/L的渗透压调节剂)中;在恒温(30℃)水浴中保温,不时轻轻晃动。其中绿色巴夫藻反应30 min,四鞭藻反应60 min,离心弃去酶液,并用含0.6 mol/L甘露醇的无菌海水洗涤3次,离心即获得所需微藻的原生质体。

1.3.4 细胞融合实验 取2种藻的原生质体按1:1比例混合,离心去除上清液,加入1 ml细胞融合液(40%聚乙二醇6 000,0.55 mol/L山梨醇,50 mmol/L CaCl₂·2H₂O),摇动均匀,30℃静置30 min,边缓慢摇动边加入1 ml清洗液(0.6 mol/L山梨醇,50 mmol/L CaCl₂·2H₂O,pH 9.0的50 mmol/L甘氨酸缓冲液),10 min后,再加入2 ml清洗液,10 min后,加2 ml原生质培养液(Provasoli培养基加0.6 mol/L山梨醇),洗涤离心,重复洗涤5次;然后加16 ml软琼脂培养液(原生质培养液加1%琼脂)将原生质体悬浮后,每2 ml倒一个平板,在25℃,1 000 lx光照下进行平板培养。

1.3.5 融合藻株的筛选 平板培养5 d后,挑取单藻落,移至含3 ml的兼养培养液中,光照培养,并逐步扩大,测定其脂肪酸组成,比较其与两亲本藻株的差异。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的融合

对四鞭藻和绿色巴夫藻原生质体融合过程的镜检结果表明,2种藻株原生质体在PEG的作用下随机靠近,此时的细胞内容物并没有发生混合。当加入清洗液后,互相靠近的原生质体逐渐发生融合,细胞之间的隔膜(细胞膜)消失,二者的细胞内容物互相混合,此为融合子。但是由于PEG介导的原生质体融合是随机行为,镜检表明,既有2种原始藻株原生质体之间的异种融合,也有同种原生质体间的同种融合(四鞭藻和绿色巴夫藻的细胞大小差异很大,在显微镜下很容易区分是异种融合还是同种融合),还有多个原生质体融合在一起。尚有没有融合的细胞,因为有的藻细胞的细胞壁酶解不完全,它们之间只是在PEG的作用下相互靠近。

2.2 融合子的筛选

由于不清楚两亲本藻的遗传背景,并且两亲本藻没有明显的遗传标记。在融合子的筛选方面,只好利用两亲本藻在固体培养基平板上长出的单藻落的明显差异,去除绿色巴夫藻。四鞭藻在平板上长出单藻落的时间较短(5 d左右),且藻落较大,呈绿色至深绿色;而绿色巴夫藻在平板上长出单藻落较晚(10 d左右),且藻落较小(藻落半径为四鞭藻的1/2~1/3),呈黄绿色,这样可以去除绿色巴夫藻及其自身融合形成的融合体。四鞭藻和融合子的分选则通过扩大培养,比较与亲本藻株脂肪酸组成的差异,来初步筛选融合子。

将挑选的上百个单藻落经放大培养,分析比较发现1株兼养藻的脂肪酸组成与亲本的脂肪酸组成差别较大,不仅EPA含量有所升高,而且出现DHA峰,DHA质量分数较高(0.045 2),暂命名为*Tetraselmis* sp-1融合藻株,结果见表1。

在自养培养条件下,融合藻株、四鞭藻和绿色巴夫藻的生长速率及总脂、EPA和DHA含量如表2。可以看出,融合藻株的总脂含量,EPA与DHA含量比亲本藻株绿色巴夫藻低,但生长速率是绿色巴夫藻的2倍多;融合藻株同亲本藻株四鞭藻相比,各个指标均高于四鞭藻。

2.3 融合藻株融合是自养、兼养和异养

融合藻株在3种培养条件下培养其培养液的颜色有所不同,自养培养和兼养培养的藻细胞呈绿色,但兼养培养的藻细胞颜色更深一些,二者均具有明显的杯状色素体,而异养培养的藻细胞呈淡黄色,色素体不明显,这可能是在异养条件下,光合作用系统的酶系由于没有光激活,没有合成叶绿素。融合藻

株在 3 种培养条件下的生长速率、总脂含量和 EPA/DHA 的差异见表 3。

表 1 融合藻株与亲本藻脂肪酸组成及其含量(质量分数)

Table 1 Comparison of fatty acid compositions and contents of fused strain with its parent algae

脂肪酸组成 Fatty acid composition	四鞭藻(兼养) <i>T. sp</i> (mixotrophic)	绿色巴夫藻 <i>P. viridis</i>	融合藻株(兼养) Fused strain (mixotrophic)
14:0	0.007 0	0.111 6	0.010 8
14:1	0.035 9	0.034 4	0.033 7
16:0	0.260 5	0.197 3	0.211 4
16:1	0.024 0	0.128 0	0.034 1
16:4	0.112 1		0.110 8
18:0	0.009 0	0.027 7	0.011 7
18:1n-9	0.106 0	0.035 2	0.058 8
18:1n-7	0.060 7	0.037 8	0.027 1
18:2n-6	0.050 2	0.014 5	0.035 3
18:2n-3	0.152 5	0.011 6	0.232 5
18:3n-6	0.041 8	0.008 4	0.031 5
18:3n-3	0.047 6	0.012 5	0.017 4
20:1	0.012 9	0.011 0	0.048 0
20:5n-3	0.054 8	0.211 2	0.081 7
20:5n-6(EPA)	0.013 7	0.081 0	
22:6n-3(DHA)		0.073 8	0.054 2
Total sats	0.276 5	0.336 6	0.233 4
Total monos	0.239 5	0.246 4	0.201 7
Total PUFAs	0.472 7	0.413 0	0.554 4

表 2 融合藻株与亲本藻生长速率及总脂、EPA/DHA 质量分数

Table 2 Comparison of growth rates, total lipids, EPA and DHA contents of fused strain with its parent algae

藻株 Microalgae strain	生长速率/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) Growth rate	总脂 Total lipids	EPA	DHA
绿色巴夫藻 <i>P. viridis</i>	0.058	0.094	0.212	0.073
四鞭藻 <i>T. sp.</i>	0.140	0.058	0.058	无
融合藻株 Fused strain	0.141	0.061 9	0.067	0.054

由表 3 可以看出,在兼养条件下,融合藻株的生长速率明显高于自养和异养。培养 6 d 后,兼养的生长速率约等于自养和异养的生长速率之和。与 Endo 和 Sansawa^[8]的结论一致。这可能是在兼养条件下,光能自养和化能异养两套系统同时起作用的结果。但对于同一种藻,营养盐不同时,自养、异养与兼养培养的生长速率也不同。如以葡萄糖为碳源培养小球藻(*Chlorella regularis*)时,兼养培养生长的速率大于自养与异养的生长速率之和;但改用

乙酸钠为碳源时,兼养培养的生长速率则小于自养与异养的生长速率之和^[9]。

表 3 不同培养条件下的融合藻株生长速率及总脂、EPA 与 DHA 的质量分数

Table 3 Comparison of growth rates, total lipids, EPA and DHA contents of fused strain cultured under different conditions

培养条件 Culture condition	生长速率/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) Growth rate	总脂 Total lipids	EPA	DHA
自养 Phototrophic	1.141	0.061 9	0.067	0.054
兼养 Mixotrophic	0.222	0.101 3	0.081 7	0.045 2
异养 Heterotrophic	0.070	0.172 6	0.020 5	0.023 6

表 4 不同培养条件下融合藻株脂肪酸组成质量分数

Table 4 Comparison of fatty acid compositions and contents of fused strain cultured under different conditions

脂肪酸组成 Fatty acid compositions	自养培养 Phototrophic	兼养培养 Mixotrophic	异养培养 Heterotrophic
14:0	0.029 0	0.010 3	0.039 3
14:1	0.033 7	0.069 9	
16:0	0.265 0	0.211 4	0.270 1
16:1	0.046 0	0.034 1	0.045 3
16:4	0.102 0	0.110 8	
18:0	0.040 0	0.011 7	0.096 1
18:1n-9	0.065 0	0.058 8	0.176 8
18:1n-7	0.026 0	0.027 1	0.120 4
18:2n-6	0.047 5	0.035 3	0.051 4
18:2n-3	0.108 5	0.232 5	
18:3n-6	0.073 0	0.031 5	
18:3n-3	0.041 0	0.017 4	
20:1		0.048	0.024 6
20:5n-3	0.067 0	0.081 7	0.025 3
20:5n-6(EPA)	0.020 0		0.046 8
22:6n-3(DHA)	0.054 0	0.045 2	0.029 1
Total sats	0.334 0	0.233 4	0.405 5
Total monos	0.137 0	0.211 7	0.437 0
Total PUFAs	0.523 0	0.554 4	0.152 6

融合藻株在 3 种不同培养条件下脂肪酸组成和含量见表 4。可以看出,融合藻株在自养和兼养条件下培养,藻细胞中脂肪酸以多不饱和脂肪酸为主,在总脂肪酸中的质量分数分别为 0.523 0 和 0.554 4;而在异养条件下培养,脂肪酸以饱和和单不饱和脂肪酸为主,质量分数分别达到 0.405 5 和 0.437 0,而其中的多不饱和脂肪酸较低,只有 0.152 6。融合藻株在不同培养条件下的脂肪酸组成和含量变化

与 Day^[10] 的实验结果相似。

3 小结

利用化学融合法进行微藻细胞融合实验,虽然融合率低,但从经济角度考虑还是比较合理的^[11]。由于微藻杂种细胞的选择系统未见报道,同时也由于对亲本藻株四鞭藻和绿色巴夫藻的遗传背景及理化性质知之甚少,融合藻株的筛选方面,是本实验所遇到的主要障碍之一。我们实验了双荧光标记结合流式细胞仪分选法,但由于微藻本身存在自发荧光,结果没有成功。今后这方面的工作需要进一步进行。

在融合子的鉴定方面,应该从形态学、细胞学、生化水平和分子水平进行鉴定,仅仅从形态学、细胞学和生化水平进行鉴定还不够完善,现在正在进行随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析,从分子水平对融合藻株进行鉴定。

实验所得到的融合藻株,虽然较亲本异养藻株各方面的指标均有大的提高,但比亲本自养藻株,总脂和 EPA/DHA 含量还不够理想,需要进行优化培养方面的工作,进一步提高融合藻株的 EPA/DHA 含量,为工业化生产打下基础。

参考文献:

[1] 陈峰,姜悦.微藻生物技术[M].北京:轻工业出版社,

1999.44-46.

- [2] Chen F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth[J]. Trends in Biotechnol, 1996, 14:421-426.
- [3] Chen F, Johns M R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrats[J]. J Appl Phycol, 1996, 7:43-46.
- [4] Provasoli L. Media and prospects of the cultivation of marine algae [A]. Culture and Collect of Algae. US-Japan Conference[C]. Hokone: Jpn Soc Plant Physiol, 1968. 63-67.
- [5] Gladue R. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds[A]. Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of an US Asia Workshop[C]. Hawaii: The Oceanic Institute, 1991. 279-281.
- [6] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37:911-917.
- [7] Cohen Z, Norman H A. Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae[J]. Phytochemistry, 1993, 32(2):259-264.
- [8] Endo H, Sansawa H. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fastgrowing strain. II Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration[J]. Plant Cell Physiol, 1977, 18: 199-205.
- [9] Lalucat J, Imerial J. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. VJ179[J]. Biotech Bioeng, 1984, 26:677-681.
- [10] Day J G, Tsavalos A J. An investigation of the heterotrophic culture of the green algae *Tetraselmis*[J]. J Appl Phycol, 1996, 8: 73-77.
- [11] 张士瑞,马军英,范晓.海洋生物技术原理和应用[M].北京:海洋出版社,1997.80-82.

Study on the construction of high-EPA and DHA-containing heterotrophic microalga strain by cell fusion

SHEN Ji-hong, LIN Xue-zheng, LIU Fa-yi, LI Guang-you

(First Institute of Oceanography, State Ocean Administration of China, Qingdao 266061, China)

Abstract: The photoplasts of rapid-growing heterotrophic microalgae *Tetraselmis* sp. and phototrophic microalgae *Pavlova viridis* with high level of EPA and DHA were fused by chemical cell fusion technique, and a fused strain of mixotrophic microalgae with high level of EPA and DHA and fast growing rate was selected. The fused strain has higher contents in total lipids, EPA, DHA and EPA/DHA than their parent heterotrophic *Tetraselmis* sp. Under mixotrophic conditions, the fused strain grows faster than its parents microalgae and the unsaturated lipid acids dominate the total lipid acids in it while under phototrophic conditions the saturated lipid acids dominate.

Key words: *Pavlova viridis*; *Tetraselmis* sp.; cell fusion; EPA; DHA; microalgae cultivation