

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620131151491

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

高山被孢霉 LU166 发酵生产 ARA 的培
养条件优化及代谢调控探究

Study on the Fermentation Strategies and Metabolic
Regulation of Arachidonic Acid by *M. alpina* LU166

刘晓婷

指导教师姓名: 凌雪萍 助理教授

企业导师姓名: 钟慧昌 高级工程师

专 业 名 称: 化学工程

论文提交日期: 2016 年 05 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(卢英华)课题(组)的研究成果,获得(卢英华)课题(组)经费或实验室的资助,在(桂华山楼)实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA) 为 ω -6 高级多不饱和脂肪酸, 具有促进婴幼儿脑部发育、调节神经传导、降低胆固醇等多种重要的生理功能, 在膳食营养、医药、化妆品等多领域有广泛应用。传统的 ARA 主要来源于动物油等, 难以满足市场需求, 利用微生物发酵法生产 ARA 具有周期短、不受地域限制等优点, 成为当前研究的热点之一, 而高山被孢霉被认为是 ARA 的优良生产菌株。

本文以实验室自主分离并鉴定的一株 ARA 生产菌株—*M. alpina* LU166 为研究对象, 从油脂代谢和 ARA 合成途径着手, 考察了以下几个因素对发酵的影响。首先发现凹槽摇瓶培养可以稳定地控制菌体形态为刺突状小球, 这一形态比絮状和大球状更有利于油脂和 ARA 的积累。其次, 在优化了 VB₁、VB₁₂、生物素和泛酸钙等 B 族维生素的基础上, 复合添加使菌体生物量、油脂和 ARA 产量分别比对照组提高了 10%、30% 和 16%。接着, 外源添加油脂的研究发现 0.2% 油酸的添加最利于 *M. alpina* LU166 中 ARA 的合成, 油脂产量和 ARA 产量分别比对照组提高了 26% 和 12%, 而添加饱和度较高的大豆油对脂肪酸合成有抑制作用。最后, 在苹果酸和氮源添加的研究中发现, 实验初期添加苹果酸主要促进细胞生长, 稳定期添加苹果酸主要促进 ARA 的合成, 稳定期添加谷氨酸钠主要促进油脂的积累, 在此基础上的苹果酸和氮源的复合添加既有利于 *M. alpina* LU166 生长代谢, 也有利于油脂和 ARA 的合成, 生物量、油脂和 ARA 产量分别比对照组分别提高了 21%、51% 和 43%。

本论文的研究策略主要是结合产油微生物体内不饱和脂肪酸的合成途径, 从提高细胞溶氧 (凹槽培养)、增强代谢通量 (添加 B 族维生素)、提供脂肪酸合成前体 (添加外源油脂) 和提高还原力 (添加苹果酸和谷氨酸钠) 几方面对 *M. alpina* LU166 的发酵进行了探讨。结果表明, *M. alpina* LU166 的发酵效果在这些策略的研究下均得到了提高, 这为 ARA 合成途径的解析提供了一定的理论基础, 也为大规模发酵工艺的优化提供了借鉴。

关键词: 高山被孢霉; 花生四烯酸; 发酵策略; 代谢调控

Abstract

Arachidonic acid is a kind of ω -6 polyunsaturated fatty acid (PUFA), it has many physiological functions, like improving brain development in infants and young children, regulating nerve conduction, and reducing cholesterol levels, so it is widely applied in dietary nutrition, medicine, and cosmetics fields. Traditional ARA mainly comes from animal oils, which is difficult to meet the market demand. Therefore, the production of ARA by microbial fermentation, which is thought to be the most prominent ARA source, has been widely reported and industrialized with the advantages of not being dependent to their origin, and also this technique proves to have a high rate of production. The *Mortierella* strain is considered to give an excellent production of ARA.

This research is based on an ARA generating strain—*M. alpina* LU166, which is isolated independently by our lab. From the point of the fatty acids metabolism and ARA synthesis ways, effects of several factors on the fermentation were investigated. Firstly, it's found that the mycelial morphology can be steadily kept as fluffy small pellets when cultured in baffled flask which is more favorable to the accumulation of total lipids and ARA than that by filaments and big pellets. Secondly, when adding the combination of the optimized concentration of B vitamins (VB₁, VB₁₂, biotin, and calcium pantothenate) into the culture, the biomass, total lipids and ARA yield increased by 10%, 30% and 16%, respectively, compared to the control group. Then, the results of adding exogenous oils into the culture showed that the addition of 0.2% oleic acid was the most conducive to the ARA synthesis of *M. alpina* LU166, and total lipids and ARA yield increased by 26% and 12%, respectively, compared with the control group. While the addition of high desaturation soybean oil has inhibitory effect on fatty acids synthesis. Finally, the results showed that it mainly promoted cell growth when the malic acid was added in the initial stage of the fermentation, , it

accelerated ARA biosynthesis markedly when it was added in the stable phase. The addition of monosodium glutamate (MSG) on the stable stage was mainly favorable for the accumulation of total lipids. When using the combined addition of malic acid and MSG during the initial and stable stage, it was beneficial for both cell growth, and ARA synthesis of *M. alpina* LU166. The biomass, total lipids and ARA yield increased by 21%, 51% and 21%, respectively, compared with the control group.

Considering the biosynthesis pathway of PUFA in the oleaginous microorganisms, the research strategies investigated in the present work was as the following: to improve dissolved oxygen by using baffled flasks, to enhance the metabolic flux by adding B group vitamins, to provide the precursors of fatty acids by adding exogenous fatty acids and to produce more NADPH by adding malic acid and MSG. The results exhibited that all the yields were increase to some degree under the application of those strategies. It provides a theoretical basis for the analysis of ARA synthetic pathway, and the references for the optimization of large-scale fermentation process.

Key words: *M. alpina* LU166; ARA; Fermentation Strategies; Metabolic regulation

目 录

摘 要	I
Abstract.....	II
第一章 绪论	1
1.1 花生四烯酸概述	1
1.1.1 ARA 的结构和性质	1
1.1.2 ARA 的功能及应用	2
1.1.3 ARA 的生物合成代谢过程	3
1.2 ARA 生产菌株的选育	5
1.2.1 ARA 的生产菌株	5
1.2.2 高山被孢霉的选育.....	7
1.3 高山被孢霉产 ARA 的发酵工艺.....	9
1.3.1 菌体形态.....	9
1.3.2 培养基组成.....	10
1.3.3 培养条件.....	12
1.4 本论文的研究目的及研究内容	14
第二章 材料与方法	16
2.1 实验材料	16
2.1.1 菌种.....	16
2.1.2 培养基.....	16
2.1.3 实验药品及仪器.....	17
2.1.4 与菌种鉴定相关试剂的制备.....	17
2.2 菌种保藏与培养方法	17
2.2.1 菌种保藏.....	17
2.2.2 培养方法.....	17
2.3 高山被孢霉的身份鉴定	18
2.3.1 高山被孢霉总 DNA 的提取.....	18
2.3.2 18S rRNA 基因聚合酶链式反应 (PCR)	18

2.3.3 琼脂糖凝胶电泳.....	19
2.3.4 PCR 产物的纯化.....	19
2.3.5 PCR 产物载体 T Simple Vector 的连接.....	19
2.3.6 DH5 α 感受态细胞的制备.....	19
2.3.7 大肠杆菌的转化.....	20
2.3.8 菌落 PCR 验证.....	20
2.3.9 菌种认定.....	20
2.4 发酵参数的检测	21
2.4.1 细胞干重的测定.....	21
2.4.2 总油脂产量的测定.....	21
2.4.3 脂肪酸含量的测定.....	21
2.4.4 葡萄糖浓度的测定.....	23
第三章 结果与讨论	25
3.1 <i>M. alpina</i> LU166 的菌株身份鉴定.....	25
3.1.1 <i>M. alpina</i> LU166 的 18S rRNA 分析.....	25
3.1.2 <i>M. alpina</i> LU166 的系统演化树分析.....	26
3.2 凹槽培养对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵产 ARA 的影响.....	29
3.3 B 族维生素对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵产 ARA 的影响	35
3.3.1 VB ₁ 对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响	35
3.3.2 VB ₁₂ 对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	36
3.3.3 生物素对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	37
3.3.4 泛酸钙对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	38
3.4 外源添加油脂对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵产 ARA 的影响.....	40
3.4.1 外源添加油脂组成成分分析.....	40
3.4.2 外源添加油脂对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	42
3.4.3 外源添加油脂和低温对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	46
3.4.4 外源添加不同浓度的油酸对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵产 ARA 的影响 ..	48
3.5 苹果酸和氮源添加对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	49
3.5.1 实验初期添加苹果酸对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响.....	49
3.5.2 实验初期和稳定期复合添加苹果酸对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响..	51
3.5.3 实验初期添加苹果酸和稳定期添加氮源对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影	

响.....	52
3.5.4 实验初期添加苹果酸和稳定期复合添加苹果酸及氮源对 <i>M. alpina</i> LU166 发酵的影响	53
3.6 ARA 代谢途径的关联分析	55
第四章 总结与展望	58
4.1 结论	58
4.2 展望	59
参 考 文 献	60
附 录	69
硕士阶段发表论文	72
致谢语	73

厦门大学博硕士学位论文摘要

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Arachidonic acid (ARA)	1
1.1.1 Structure and properties of ARA.....	1
1.1.2 Function and applications of ARA.....	2
1.1.3 Biosynthetic pathway of ARA	3
1.2 Methods for screening of strain	5
1.2.1 Production strains of ARA	5
1.2.2 Screening of <i>M. alpina</i> strains	7
1.3 Introduction of the <i>M. alpina</i> fermentation	9
1.3.1 Mycelial morphology of <i>M. alpina</i>	9
1.3.2 Effect of basic nutritional components in the medium	10
1.3.3 Effect of the culture conditions	12
1.4 Purpose and contents of this study	14
Chapter 2 Materials and methods	16
2.1 Materials	16
2.1.1 Strain	16
2.1.2 Medium	16
2.1.3 Reagents and instruments	17
2.1.4 Reagents of strain's indentification.....	17
2.2 Strain preservation and cultivation	17
2.2.1 Strain preservation	17
2.2.2 Cultivation method.....	17
2.3 Indentification of <i>M. alpina</i> LU166	18
2.3.1 Extraction of total DNA.....	18
2.3.2 18S rRNA PCR	18
2.3.3 Agarose gel electrophoresis	19

2.3.4 Purification of PCR products	19
2.3.5 Ligation of DNA fragment and T vector.....	19
2.3.6 Preparation of competent E. coli DH5 α	19
2.3.7 Transformation of recombinant plasmid into E. coli	20
2.3.8 Colony PCR application	20
2.3.9 Phylogenetic tree analyzed by 18S rRNA sequences	20
2.4 Determination of fermentation parameters.....	21
2.4.1 Determination of DCW.....	21
2.4.2 Determination of total lipid.....	21
2.4.3 Determination of fatty acid content	21
2.4.4 Determination of glucose.....	23
Chapter 3 Results and discussion	25
3.1 The identification of <i>M.alpina</i> LU166	25
3.1.1 18S rRNA of <i>M.alpina</i> LU166.....	25
3.1.2 Phylogenetic tree of <i>M.alpina</i> LU166	26
3.2 Effects of baffled flasks on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	29
3.3 Effect of B-group vitamins on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166	35
3.3.1 Effects of VB1 on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	35
3.3.2 Effects of VB12 on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	36
3.3.3 Effects of biotin on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	37
3.3.4 Effects of calcium pantothenate on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166	38
3.4 Effect of different exogenous fatty acids on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	40
3.4.1 Fatty acid composition of different exogenous fatty acids	40
3.4.2 Effect of different exogenous fatty acids on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166	42
3.4.3 Effect of adding different oils combined with shifting temperature on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	46
3.4.4 Effect of different concentration of exogenous oleic on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	48
3.5 Effect of adding malic acid and different nitrogen sources on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166	49
3.5.1 Effect of adding malic acid on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166	49

3.5.2 Effect of fed-batch malic acid on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166 ...	51
3.5.3 Effect of adding malic acid combined with different nitrogen sources on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166	52
3.5.4 Effect of fed-batch malic acid combined with MSG on the fermentation of <i>M. alpina</i> LU166.....	53
3.6 Relationship analysis among the tested factors with ARA biosynthetic pathway.....	55
Chapter 4 Conclusions and prospects	58
4.1 Conclusions.....	58
4.2 Problems and prospects.....	59
References	60
Appendix.....	69
Publication during author's master period	72
Acknowledgment.....	73

第一章 绪论

1.1 花生四烯酸概述

长链多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是指含有不少于两个双键且碳链长度为 18-22 个碳原子的直链脂肪酸。通常按距甲基端第一个双键碳原子位置的不同, 将 PUFAs 分为 ω -3、 ω -6 和 ω -9 等系列, 其中 ω -3 和 ω -6 是具有重要生物学意义的 PUFAs。常见的 ω -3 PUFAs 有 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA)、二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA)^[1, 2]; ω -6 PUFAs 主要包括亚油酸 (Linolenic acid, LA)、 γ -亚麻酸 (Gamma linolenic acid, GLA) 和花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA)^[3, 4]。

多不饱和脂肪酸的缺乏会引起生长停滞, 生殖衰退和肾、肝功能紊乱^[5, 6]。由于人体及哺乳动物不能向脂肪酸引入超过 $\Delta 9$ 的双键, 因此不能合成亚油酸和亚麻酸, 是为必需脂肪酸。亚油酸分别通过 $\Delta 15$ 和 $\Delta 6$ 脂肪酸脱氢酶的作用转变为 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸。 α -亚麻酸作为 ω -3 家族的原初成员, 在人体内代谢合成 EPA、DHA 等重要的 ω -3 PUFAs; γ -亚麻酸则是 ω -6 PUFAs 的前体物, 进一步转化为 ARA。ARA 是维持细胞膜结构和功能的必需脂肪酸, 也是合成一类生理活性脂质——类二十烷化合物的前体^[7]。若发生亚油酸缺乏症, 则必须从膳食中获得 γ -亚麻酸或 ARA, 因此在某种意义上 ARA 也是必需脂肪酸^[8]。

1.1.1 ARA 的结构和性质

ARA 即全顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸, 分子式为 $C_{20}H_{32}O_2$, 化学结构式如图 1.1 所示, 包括一个碳-氧双键和四个碳-碳双键, 是一种 ω -6 高级不饱和脂肪酸, 相对分子质量为 304.46, 熔点 -49°C , 沸点 $169-171^{\circ}\text{C}$ (0.1 mmHg), 常温下为淡黄色油状液体, 流动性良好。其化学性质较为稳定, 但应避免与强氧化剂接触, 需于阴凉、干燥处密封保存^[9]。

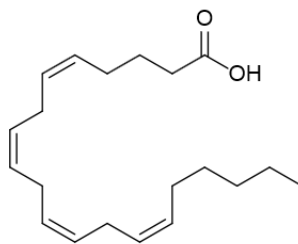


图 1.1 ARA 的化学结构式

Fig. 1.1 The chemical structural ARA

1.1.2 ARA 的功能及应用

ARA 在血液、肝脏、肌肉和其他器官系统中作为磷脂结合的结构脂类起重要作用，是人体中含量最高、分布最广的长链多不饱和脂肪酸。其在肝磷脂及脑磷脂中含量约为 1%，在肾上腺磷脂中含量约为 15%，而在神经末梢中 ARA 占总不饱和脂肪酸的含量高达 70%。此外，ARA 是许多循环二十烷酸衍生物的生物活性物质，如前列腺素 E2 (PGE2)、前列腺环素(PGI2)、血栓烷素 A2(TXA2) 和白细胞三烯和 C4 (LTC4) 的直接前体^[10]。这些生物活性物质对脂质蛋白的代谢、血液流变学、血管弹性、白细胞功能和血小板激活等具有重要的调节作用^[11]。ARA 及其衍生物在促进大脑发育、调节神经传导、抗炎症、预防与治疗冠心病及糖尿病、降低胆固醇、保护皮肤等方面发挥重要的功效^[12]。由于诸多独特的生理功能，ARA 在膳食营养、医药、化妆品等多种领域得到广泛应用。

(1) ARA 在食品中的应用

1994 年卫生部正式批准可在婴幼儿配方食品中添加 ARA，1999 年正式批准 ARA 作为新型营养强化剂。在保健品中，ARA 多作为一种降低血脂及血清胆固醇的功能因子被使用，在一些健脑益智营养品中，ARA 和 DHA 作为促进智力提高、大脑发育的功能性因子使用^[13]。现售婴幼儿奶粉如惠氏、雀巢、雅培、贝因美等都有添加 ARA^[14]。有报道^{[15][15][15][15][15][15]}称 ARA 及其他 PUFAs 成为 21 世纪功能性食品的主角。

(2) ARA 在医药中的应用

长久以来，一直存在一个现象——相比北欧其他人群，爱斯基摩人患心血管疾病概率极低。直到 1970 年，有学者研究发现以海洋捕猎为生的爱斯基摩人

日常膳食中多食用富含 DHA、ARA 的海产品，这意味着 ARA 有医疗领域的应用潜能。当前，ARA 大多是和其它 PUFAs 一起研制出胶囊药剂，用于预防高血压、动脉硬化、脑血栓、冠心病、湿疹等部分疾病^[16]。由于 ARA 的降低血清能力和降低肝脏中胆固醇的水平都较强，被广泛应用于抑制癌细胞生长及扩散，因此可以作为一种治疗癌症及肿瘤的靶子；同时 ARA 作为前列腺素的合成前体物质，也可用于血栓性脉管炎、保护急性心肌缺血、视网膜中央静脉血栓^[17]等疾病的治疗。

(3) ARA 在化妆品中的应用

ARA 可以维持细胞膜的通透性，调节细胞膜上各离子通道，因而具有营养发囊、促进发质生长，使皮肤有弹性，抗皱纹延缓衰老等多种生理功效。除此之外，由于 ARA 有治疗湿疹及预防脱发的作用而被广泛应用于各大药妆中^[18, 19]。到目前为止，国内外多家化妆品公司将 ARA 添加到化妆品配方中，如佰康 (NIOXIN) 的护发素、拉贝尔 (LABELLE) 的 Vitamin F (包括亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸) 护肤霜和资生堂的护发防皱用品等。

1.1.3 ARA 的生物合成代谢过程

通常，脂肪酸合酶的作用终止于软脂酸，更长链的饱和或不饱和脂肪酸都是把软脂酸作为前体，需要另外的酶参与反应形成。由于哺乳动物由于不能向脂肪酸引入超过 Δ^9 的双键，无法从油酸进一步合成亚油酸，其体内的 ARA 只能由摄入的亚油酸进一步合成得到。而在真核细胞和部分细菌中，饱和脂肪酸在有氧条件下容易引入 Δ^9 位置的双键，因此产油微生物可利用环境中的碳源，从头合成油酸、亚油酸，继而通过进一步碳链延长和脱饱和作用合成一系列多不饱和脂肪酸。目前，已有诸多研究对不饱和脂肪酸合成过程进行解析，大致如图 1.2 所示^[20]。其中，ARA 的代谢合成途径是从油酸 (OA) 经 Δ^{12} 脂肪酸脱饱和酶催化生成亚油酸 (LA) 开始，亚油酸 (LA) 作为合成亚麻酸 (GLA) 的前体物质，在 Δ^6 脂肪酸脱饱和酶的催化作用下形成 γ -亚麻酸 (γ -GLA)，再经碳链延长酶的作用催化合成二高- γ -亚麻酸 (DGLA)，最后经 Δ^5 脂肪酸脱饱和酶脱氢合成 ARA。

软脂酸的合成是在脂肪酸合酶复合体的酶促作用下，经过启动(乙酰基转移)、装载(丙二酸单酰基转移)、缩合、还原、脱水、再还原生成丁酰-ACP，历经七

次循环，每次循环在乙酰-CoA 上延长两个碳原子（以丙二酸单酰-CoA 丢掉 CO_2 形式添加，丙二酸单酰-CoA 由乙酰-CoA 羧化形成），最终生成软脂酰-ACP，软脂酰-ACP 从脂肪酸合酶复合体中释放出来形成软脂酰。该途径中用于还原的 NADPH 和 H^+ 来自苹果酸酶反应及戊糖磷酸途径。整个合成链的初始反应物乙酰-CoA 是通过三羧酸转运体系，由柠檬酸跨过线粒体内膜，在细胞溶胶中，受柠檬酸裂解酶作用断裂形成乙酰-CoA 和草酰乙酸。并且穿梭机制产生出来的 NADPH 可用于脂肪酸合成中的还原反应。其中，催化乙酰-CoA 形成丙二酸单酰-CoA 的乙酰-CoA 羧化酶的活性受自身磷酸化型/去磷酸化型两种状态的平衡调控，柠檬酸把平衡引向聚合，促进脂肪酸合成，而软脂酰-CoA 则把平衡引向单体一侧，形成反馈抑制^[21]。

长期以来，在软脂酸进一步碳链延长和脱饱和过程中，脱饱和作用被认为是长链多不饱和脂肪酸合成的限速步骤。从 20 世纪 90 年代初开始，日本的 Shimizu 教授的实验室便开始针对脱饱和酶的酶学性质进行研究。随后， $\Delta 5$ 脂肪酸脱饱和酶、 $\Delta 12$ 脂肪酸脱饱和酶、 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和等脱饱和酶的功能逐渐被了解^[22-24]。随着各国研究的深入，开始有人提出碳链延长才是 ARA 合成的限速步骤。2000 年，Wynn 等^[25]分别以吐温 20、吐温 40、吐温 80 代替葡萄糖作为高山被孢霉发酵生产 ARA 的唯一碳源，结果发现，相较于葡萄糖体系，吐温体系积累的油脂中 OA、LA、 γ -GLA 的含量明显较高，但 ARA 的产量几乎一样。作者推断是由于 $\Delta 12$ 脱饱和酶、 $\Delta 6$ 脱饱和酶作用较快，而催化 γ -GLA 合成 DGLA 的碳链延长反应被限制了。因此认为碳链延长而非脱饱和才是 ARA 合成过程中的限速步骤。2005 年，Takeno S 等^[26]利用增强绿色荧光蛋白基因标记评估外源基因的表达，从分子水平验证了这一观点。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库