

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 20620141151486

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# 裂殖壶菌 LU310 的遗传改造及苹果酸对 DHA 合成的影响机制研究

Genetic Modification of *Schizochytrium* sp. LU310 and The Effect Mechanism of Malic Acid on DHA Biosynthesis

郑楚强

指导教师姓名: 卢英华 教授

吴意珣 副教授

凌雪萍 助理教授

企业导师姓名: 钟慧昌 高级工程师

企业导师单位: 厦门汇盛生物有限公司

专 业 名 称: 化学工程

论文提交日期: 2017 年 05 月

论文答辩时间: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2017 年 05 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第一章 文献综述.....	1
1.1 DHA 概述.....	1
1.1.1 DHA 的结构和性质.....	1
1.1.2 DHA 的来源.....	1
1.2 微生物 DHA 的合成途径.....	4
1.2.1 脂肪酸合成酶 (FAS) 途径.....	4
1.2.2 聚酮合成酶 (PKS) 途径.....	6
1.3 利用基因工程技术改造裂殖壶菌.....	8
1.4 外源添加物提高裂殖壶菌 DHA 发酵产量.....	9
1.4.1 添加关键酶的前体物质.....	9
1.4.2 添加关键酶的辅因子.....	10
1.4.3 添加阻遏竞争代谢的物质.....	10
1.4.4 添加植物激素.....	11
1.5 本论文研究的意义及内容.....	12
1.5.1 研究的意义及目的.....	12
1.5.2 研究内容.....	13
第二章 材料与amp;方法.....	14
2.1 实验材料.....	14
2.1.1 菌种和载体.....	14
2.1.2 培养基.....	14
2.1.3 其它溶液的配置.....	15
2.1.4 实验药品及仪器.....	15
2.1.5 引物.....	16

<b>2.2 菌种的保藏与培养</b> .....	<b>16</b>
2.2.1 菌种保藏 .....	16
2.2.2 菌种培养 .....	16
<b>2.3 基因工程菌的构建</b> .....	<b>17</b>
2.3.1 大肠杆菌感受态细胞的制备 .....	17
2.3.2 大肠杆菌的热激转化 .....	18
2.3.3 质粒的提取 .....	18
2.3.4 聚合酶链式反应 (PCR) .....	19
2.3.5 琼脂糖凝胶电泳 .....	19
2.3.6 基因片段的回收 .....	19
2.3.7 双酶切反应 .....	20
2.3.8 裂殖壶菌基因组的提取 .....	20
2.3.9 裂殖壶菌感受态细胞的制备 .....	21
2.3.10 裂殖壶菌的电转化 .....	21
<b>2.4 蛋白质的提取</b> .....	<b>22</b>
2.4.1 高压匀浆破碎 .....	22
2.4.2 冷激法沉淀蛋白 .....	22
2.4.3 蛋白质浓度测定 .....	22
<b>2.5 分析方法</b> .....	<b>23</b>
2.5.1 生物量测定 .....	23
2.5.2 总油脂测定 .....	23
2.5.3 脂肪酸含量测定 .....	24
2.5.4 丙二酸单酰转移酶 (MAT) 活性测定 .....	27
2.5.5 苹果酸酶 (ME) 活性测定 .....	28
2.5.6 NADPH 含量测定 .....	29
<b>第三章 裂殖壶菌基因敲除体系的构建及应用</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 前言</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2 结果与讨论</b> .....	<b>32</b>
3.2.1 裂殖壶菌基因敲除体系的构建 .....	32



3.2.2 裂殖壶菌基因敲除体系的电转化及筛选 .....	38
3.3 本章小结 .....	40
<b>第四章 裂殖壶菌基因过表达体系的构建及应用 .....</b>	<b>41</b>
4.1 前言 .....	41
4.2 结果与讨论 .....	41
4.2.1 裂殖壶菌基因过表达体系的构建 .....	41
4.2.2 裂殖壶菌基因过表达体系的电转化及筛选 .....	50
4.2.3 基因过表达菌株的发酵性能参数测定 .....	51
4.2.4 基因过表达菌株的发酵罐放大培养 .....	55
4.3 本章小结 .....	56
<b>第五章 苹果酸对裂殖壶菌发酵生产 DHA 的影响 .....</b>	<b>57</b>
5.1 前言 .....	57
5.2 结果与讨论 .....	57
5.3 本章小结 .....	63
<b>第六章 总结与展望 .....</b>	<b>64</b>
6.1 总结 .....	64
6.2 展望 .....	65
<b>参考文献 .....</b>	<b>67</b>
<b>附 录 .....</b>	<b>75</b>
<b>在读期间发表论文 .....</b>	<b>81</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>82</b>

## CONTENTS

<b>Chinese abstract .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 What's Docosahexaenoic Acid (DHA) .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Structure and properties of DHA.....	1
1.1.2 Sources of DHA .....	1
<b>1.2 Biosynthetic pathway of DHA .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Aerobic desaturase and elongase pathway.....	4
1.2.2 Anaerobic polyketide synthase pathway .....	6
<b>1.3 Researchs on genetic engineering of <i>Schizochytrium</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Researchs on exogenous additives of <i>Schizochytrium</i>.....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Adding precursors of key enzyme .....	9
1.4.2 Adding cofactor of key enzyme.....	10
1.4.3 Adding inhibitors of competing pathway .....	10
1.4.4 Adding plant hormone .....	11
<b>1.5 Purpose and contents of this study.....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Motivation .....	12
1.5.2 Contents of this study .....	13
<b>Chapter 2 Materials and methods .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Experimental materials.....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Strains and plasmid.....	14
2.1.2 Culture media .....	14
2.1.3 Experiment reagents .....	15
2.1.4 Experimental medicine and equipments.....	15
2.1.5 Primers.....	16

---

<b>2.2 Strain preservation and cultivation .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Strain preservation .....	16
2.2.2 Strain cultivation .....	16
<b>2.3 Construction of genetically engineered strain.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> competent cells preparation .....	17
2.3.2 <i>Escherichia coli</i> transformation.....	18
2.3.3 Extraction of plasmid DNA .....	18
2.3.4 Polymerase Chain Reaction ( PCR).....	19
2.3.5 Agarose gel electrophoresis .....	19
2.3.6 Purification of genes .....	19
2.3.7 Double enzymes digestion reaction .....	20
2.3.8 Extraction of <i>Schizochytrium</i> genomic DNA .....	20
2.3.9 <i>Schizochytrium</i> competent cells preparation .....	21
2.3.10 Electroporation transformation of <i>Schizochytrium</i> .....	21
<b>2.4 Extraction of protein .....</b>	<b>22</b>
2.4.1 High pressure homogenization .....	22
2.4.2 Cold shock .....	22
2.4.3 Determination of protein concentration.....	22
<b>2.5 Analytical methods .....</b>	<b>23</b>
2.5.1 Measurement of dry cell weight .....	23
2.5.2 Measurement of total lipid.....	23
2.5.3 Measurement of fatty acid content .....	24
2.5.4 Enzyme activity determination of MAT .....	27
2.5.5 Enzyme activity determination of ME.....	28
2.5.6 Determination of NADPH content .....	29
<b>Chapter 3 Construction and application of <i>Schizochytrium</i> gene knock-out system .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Results and discussion .....</b>	<b>32</b>

---

3.2.1 Construction of <i>Schizochytrium</i> gene knock-out system.....	32
3.2.2 Electroporation transformation and screening.....	38
<b>3.3 Summary .....</b>	<b>40</b>
<b>Chapter 4 Construction and application of <i>Schizochytrium</i> gene over-expression system.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Results and discussion .....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Construction of <i>Schizochytrium</i> gene over-expression system .....	41
4.2.2 Electroporation transformation and screening.....	50
4.2.3 Fermentation performance analysis of recombinant transformant .....	51
4.2.4 Batch cultivation of recombinant transformant in a 5 L bioreactor.....	55
<b>4.3 Summary .....</b>	<b>56</b>
<b>Chapter 5 Effect mechanism of malic acid on DHA biosynthesis in <i>Schizochytrium</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Introduction .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Results and discussion .....</b>	<b>57</b>
<b>5.3 Summary .....</b>	<b>63</b>
<b>Chapter 6 Conclusions and prospects .....</b>	<b>64</b>
6.1 Conclusions .....	64
6.2 Prospects.....	65
<b>References .....</b>	<b>67</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>75</b>
<b>Publications.....</b>	<b>81</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>82</b>

## 摘要

对提高裂殖壶菌二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 发酵产量的传统研究大多集中于菌种筛选、培养基优化和发酵策略的调控上。随着基因工程技术的发展,从基因水平上调控 DHA 合成途径的代谢流,已受到越来越多的关注。利用基因工程技术改造裂殖壶菌的 DHA 合成途径,相比于传统手段,主要优势在于能够从根本上提高裂殖壶菌的 DHA 产量,而无需增加额外的发酵成本。然而,目前 DHA 的合成机制仍处于探索阶段,因此要从基因水平上调控 DHA 合成途径的代谢流还面临不少的挑战。

本文以裂殖壶菌 LU310 为研究对象,构建了裂殖壶菌基因敲除体系,并成功实现了目的基因的敲除,该体系可用于敲除 DHA 合成途径竞争代谢支路的限速酶,促使相关代谢流向 DHA 合成途径,从而提高裂殖壶菌的 DHA 发酵产量。基于此,本文又构建了裂殖壶菌的基因过表达体系,并成功实现了丙二酸单酰转移酶 (MAT) 的过表达。摇瓶发酵显示, MAT 过表达菌株的生物量、总油脂产量、DHA 产量、丙二酸单酰转移酶活性分别比野生型提高了 3%、5.5%、6.6%、10.2%,结果说明 MAT 的过表达对裂殖壶菌的 DHA 合成具有一定的促进作用。

苹果酸酶能够催化苹果酸生成丙酮酸和 NADPH,后者能为裂殖壶菌 DHA 合成提供大量的还原能力。基于此,本文通过在发酵培养基中添加 1.5 g/L 的苹果酸,考察苹果酸对裂殖壶菌 DHA 合成的作用机制。摇瓶发酵显示,添加苹果酸后裂殖壶菌的生物量、总油脂产量、DHA 产量、苹果酸酶活性和胞内 NADPH 含量相比对照组分别提高了 2.8%、9.4%、16.5%、21.1%、13%,结果说明苹果酸作为苹果酸酶的前体物质,能够激活苹果酸酶活性,提高 NADPH 的生成量,为 DHA 合成途径提供充足的还原能力,进而提高裂殖壶菌的 DHA 发酵产量。此外,在添加 1.5 g/L 苹果酸条件下, MAT 过表达菌株与野生型菌株的发酵性能差异更为明显。

**关键词:** 裂殖壶菌; DHA; 基因工程; 敲除; 过表达; 苹果酸

## Abstract

Traditional methods for increasing the DHA production of *Schizochytrium* concentrate more on strain screening, medium optimization and control strategy of Fermentation. With the development of genetic engineering technology, regulating metabolic flux of DHA biosynthesis in genetic level has received more and more attention. Compared with the traditional methods, using genetic engineering technology to change DHA biosynthesis metabolic network rationally can increase the DHA production essentially without increasing the additional fermentation cost. However, DHA biosynthesis mechanism is still at the exploratory stage, as a result that it faces some challenges to regulate and control DHA biosynthesis in genetic level.

In this research, a high DHA production strain, *Schizochytrium* sp. LU310, was studied by constructing gene knock-out and gene over-expression system. A target gene was successfully knockout by the gene knock-out system has reminded us that DHA production can be increased by using the system to disrupt the rate-limiting enzyme in some metabolic pathway which are in competition with DHA biosynthesis. On the other hand, MAT gene was over expression by the gene over-expression system with biomass, total lipid, DHA yield and MAT activity increased by 3%, 5.5%, 6.6% and 10.2%, respectively. The result illustrates that MAT over-expression can promote the DHA biosynthesis.

Malic enzyme can catalyze malic acid to pyruvic acid and NADPH, the latter is for the supply of reducing power in DHA biosynthesis. 1.5 g/L malic acid was added to fermentation medium for exploring the effect mechanism of malic acid on DHA biosynthesis in *Schizochytrium*. In comparison to normal condition, after adding 1.5 g/L malic acid, biomass, total lipid, DHA yield, malic enzyme activity and NADPH content was increased by 2.8%, 9.4%, 16.5%, 21.1%, 13%, respectively. This result illustrates that malic acid, as the precursors of malic enzyme, can activate the activity of malic enzyme. As a result, there is more NADPH for the supply of reducing power in DHA

biosynthesis with achieving of higher yield of DHA. In addition, fermentation performance is more difference between the MAT over-expression recombinant and wild type under the circumstance of adding 1.5 g/L malic acid.

**Key words:** *Schizochytrium*; DHA; Genetic engineering; Knock-out; Over-expression; Malic acid

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 文献综述

### 1.1 DHA 概述

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenic Acid, DHA), 俗称“脑黄金”, 是人体细胞膜中含量最丰富的 Omega-3 (也称  $\omega$ -3 或 n-3) 多不饱和脂肪酸, 在大脑和视网膜中大量存在, 具有多种重要的生理功能, 被广泛应用于婴幼儿食品和保健品中, 市场前景十分巨大。

#### 1.1.1 DHA 的结构和性质

多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 依不饱和双键的位置可分为  $\omega$ -3 系列、 $\omega$ -6 系列和  $\omega$ -9 系列多不饱和脂肪酸。DHA 因第一个双键位于甲基端起第三个碳的位置, 故属于  $\omega$ -3 系列, 化学结构式如下图 1.1 所示, 简记为 22:6 ( $\omega$ -3)。DHA 在常温下为淡黄色油状物, 熔点为  $-44^{\circ}\text{C}$ , 沸点为  $447^{\circ}\text{C}$ , 因其具备多个“戊烯双键”结构, 因此极易发生化学反应, 故需于阴凉干燥处避光保存。

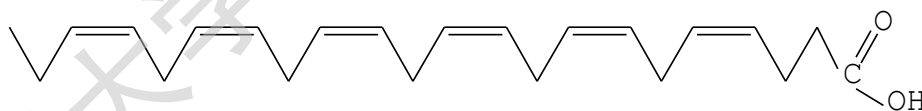


图 1.1 DHA 化学结构式

Fig. 1.1 The chemical structural formula of DHA

#### 1.1.2 DHA 的来源

##### 1.1.2.1 鱼油

由于深海鱼类体内含有较多的脂肪组织, 因此一直是 DHA 的传统及主要来源。但由于鱼油受到捕捞季节、捕捞地点和鱼的品种等诸多因素影响, 造成产量不稳定、分离纯化工艺复杂且成本高昂、鱼腥味重和不利于生态保护等缺点, 因此有



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库