

学校编码: 10384 分类号\_\_密级\_\_  
学号: 200215001 UDC\_\_

厦 门 大 学

学 位 论 文

斯达氏油脂酵母苹果酸酶基因的克隆与分析

Cloning and Analysis of Malic Enzyme Gene from

*Lipomyces Starkeyi*

作者姓名 李夏

指导教师姓名: 姚传义 副教授  
卢英华 教授

专 业 名 称: 生物化工

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_

评阅人: \_\_

2010 年 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（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）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

微生物油脂又叫单细胞油脂,是产油微生物在限氮条件下以甘油三酯的形式积累在细胞中的一类油脂。微生物油脂的组成以 C<sub>16</sub> 和 C<sub>18</sub> 系脂肪酸为主,可代替植物油作为食用油。同时,微生物油脂富含功能性多不饱和脂肪酸,是婴儿的视力及脑力发育必不可少的成分,由于其安全无毒,可代替鱼油添加到婴幼儿食品中。此外,微生物油脂品质优良,是生物柴油的绿色替代品。在油源紧缺的今天,发展微生物油脂具有重大的意义。

斯达氏油脂酵母是一种优良的产脂微生物,它能积累占细胞干重 60%以上的油脂,并且它易于培养,可利用工农业废弃物为培养基生产油脂。目前关于斯达氏油脂酵母的研究主要集中在限氮条件发酵的优化培养方面。苹果酸酶是微生物油脂代谢途径中的关键酶之一,其催化产生的 NADPH 是油脂合成的唯一还原力,对产油微生物的油脂积累代谢起到重要的调控作用。在产油微生物中超量表达苹果酸酶,不仅会提高微生物的产油量,还能改善所产油脂的品质。本研究运用简并 PCR 法和 RACE 克隆法从斯达氏油脂酵母(*Lipomyces starkeyi* CICC 1809)中分离得到 2093 bp 苹果酸酶基因全长 cDNA 序列,其中开放阅读框从 291-2006 bp,长 1719 bp,5'端非翻译区长 290 bp,3'端非翻译区长 84 bp。生物信息学分析表明,该苹果酸酶属于 NAD<sup>+</sup>依赖型苹果酸酶,与耶氏解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*)来源的 ME 的比对分值最高,一致性达到 57%。该苹果酸酶含有 L-苹果酸和 NAD(P)<sup>+</sup>结合位点等典型保守结构域。细胞亚定位分析显示,该酶定位于细胞溶胶中,且不含信号肽序列。本研究为运用基因调控手段改良斯达氏油脂酵母产油特性的研究奠定了基础。

**关键词:** 斯达氏油脂酵母; 微生物油脂; 苹果酸酶; cDNA 末端快速扩增法

## Abstract

Microbial oil, which is also called single cell oil(SCO), is accumulated by oleaginous microorganisms in cells as the form of triacylglycerol(TAG) under the N-limited conditions. With a fatty acid profile rich in C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub>, SCO can take place of vegetable oil. It is non-toxic and now used extensively as dietary supplement in infant formula instead of fish oil for it is rich in polyunsaturated fatty acids(PUFAs), which is necessary for visual acuity and mental development. SCO is also an alternative renewable source of conventional oil in biodiesel production because of its good quality. Due to the increasing press of oil supply in recent years, microbial oil is becoming a developing area of high concern.

*Lipomyces starkeyi* is a good strain to produce lipid, and the lipid content can exceed 60% of its biomass. It is easy to cultivate and can converse agricultural and industrial residues into lipid. Now the researches about *Lipomyces starkeyi* are basically focused on the optimization of culture conditions. Malic enzyme is one of the key enzymes that contribute to fatty acid synthesis and accumulation. Over expression of this enzyme in oleaginous microorganisms should lead to the increase of lipid levels and/or the content of the major PUFAs within the lipid. In this paper, methods of degenerate primers and rapid amplification of cDNA ends were used to identify the malic enzyme-encoding cDNA from the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* CICC 1809. The full-length of the cDNA was 1719-bp, with an open reading frame flanked by a 290-bp 5' untranslated sequence and a 84-bp 3' untranslated sequence. Bioinformatic analysis showed that this malic enzyme was NAD<sup>+</sup>-dependent and presented 57% sequence identity with the malic enzyme from *Yarrowia lipolytica*. The typical conserved domains for combination of L-malate and NAD(P)<sup>+</sup> were also found. Subcellular localization analysis indicated that the malic enzyme was located in cytoplasm. The results obtained in this research would benefit for the improvement of *Lipomyces starkeyi* for better quality of microbial oil by means of genetic and metabolic engineering.

**Keywords:** *Lipomyces starkeyi*; microbial oil; malic enzyme; RACE.

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目 录

<b>第一章 文献综述</b> .....	1
<b>1.1 微生物油脂的研究历史</b> .....	1
<b>1.2 微生物油脂的研究价值</b> .....	3
<b>1.3 产油微生物分类</b> .....	5
1.3.1 产油霉菌.....	5
1.3.2 产油酵母.....	5
1.3.3 产油藻类.....	7
1.3.4 产油细菌.....	7
<b>1.4 产油微生物油脂积累代谢调控途径</b> .....	7
<b>1.5 与油脂代谢相关的苹果酸酶异构体</b> .....	10
<b>1.6 获取新基因全长序列的方法</b> .....	11
1.6.1 克隆已有蛋白的基因 .....	11
1.6.2 克隆已知序列基因家族新成员 .....	11
1.6.3 克隆已知在染色体上的位置的基因.....	15
1.6.4 基于基因文库的新基因克隆 .....	15
1.6.5 利用基因芯片技术发现新基因.....	16
<b>1.7 本课题研究背景及目的</b> .....	17
<b>第二章 实验材料与方法</b> .....	19
<b>2.1 实验材料及仪器</b> .....	19
2.1.1 菌株和质粒 .....	19
2.1.2 工具酶及试剂盒 .....	19
2.1.3 主要试剂.....	19
2.1.4 主要仪器.....	19
2.1.5 培养基与相关试剂的配制.....	20
2.1.6 菌种保藏技术 .....	20
<b>2.2 简并 PCR 法扩增油脂酵母苹果酸酶保守序列</b> .....	21

2.2.1 已知苹果酸酶氨基酸序列的搜索.....	21
2.2.2 简并引物的设计.....	21
2.2.3 油脂酵母 <i>L. starkeyi</i> 总 DNA 的提取.....	21
2.2.4 油脂酵母 ME 基因保守区的获得.....	21
2.2.5 油脂酵母 ME 基因保守区的测序.....	22
2.2.6 测序结果分析.....	24
<b>2.3 RACE 克隆法扩增油脂酵母苹果酸酶侧翼序列.....</b>	<b>24</b>
2.3.1 预准备.....	24
2.3.2 油脂酵母 <i>L. starkeyi</i> 总 RNA 的提取.....	25
2.3.3 3'-RACE 法扩增油脂酵母 ME 基因 3'端侧翼序列.....	25
2.3.4 5'-RACE 法扩增油脂酵母 ME 基因 5'端侧翼序列.....	28
<b>2.4 油脂酵母苹果酸酶全长 cDNA 序列的扩增.....</b>	<b>33</b>
2.4.1 引物设计.....	33
2.4.2 一步法扩增油脂酵母苹果酸酶全长 cDNA 序列.....	33
<b>2.5 油脂酵母苹果酸酶全长 DNA 序列的克隆.....</b>	<b>33</b>
2.5.1 引物设计.....	33
2.5.2 PCR 法扩增油脂酵母苹果酸酶全长 DNA 序列.....	33
2.5.3 测序分析.....	34
<b>2.6 生物信息学分析.....</b>	<b>34</b>
<b>第三章 结果与讨论.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 简并 PCR 法扩增油脂酵母苹果酸酶保守序列.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 苹果酸酶 AA 序列搜索结果.....	35
3.1.2 简并引物设计结果.....	35
3.1.3 ME 基因保守序列的克隆.....	36
3.1.4 ME 基因保守序列的分析.....	36
<b>3.2 3'-RACE 克隆法扩增油脂酵母苹果酸酶 3' 侧翼序列.....</b>	<b>39</b>
3.2.1 引物设计.....	39
3.2.2 油脂酵母 ME 基因 3'侧翼序列的克隆与分析.....	40
<b>3.3 5'-RACE 克隆法扩增油脂酵母苹果酸酶 5' 侧翼序列.....</b>	<b>41</b>



3.3.1 引物设计.....	41
3.3.2 油脂酵母 ME 基因 5'侧翼序列的克隆与分析 .....	41
<b>3.4 一步法扩增油脂酵母苹果酸酶全长 cDNA 序列.....</b>	<b>43</b>
3.4.1 引物设计.....	43
3.4.2 油脂酵母苹果酸酶全长 cDNA 序列的克隆及 ORF 分析 .....	43
3.4.3 油脂酵母苹果酸酶全长氨基酸序列的推导及分析 .....	44
<b>3.5 油脂酵母苹果酸酶 DNA 序列的扩增 .....</b>	<b>45</b>
3.5.1 引物设计.....	45
3.5.2 油脂酵母苹果酸酶 DNA 序列的克隆及分析 .....	46
<b>3.6 油脂酵母苹果酸酶基因的生物信息学分析 .....</b>	<b>46</b>
3.6.1 油脂酵母苹果酸酶基因的进化关系分析.....	46
3.6.2 油脂酵母苹果酸酶基因的保守序列分析 .....	48
3.6.3 油脂酵母苹果酸酶基因的细胞亚定位分析 .....	51
<b>第四章 结论与展望.....</b>	<b>52</b>
<b>附录 .....</b>	<b>53</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>55</b>
<b>致谢.....</b>	<b>62</b>

## Content

<b>Chapter1 Literature review</b> .....	1
<b>1.1 Research history of microbial oils</b> .....	1
<b>1.2 Research value of microbial oils</b> .....	3
<b>1.3 Species of oleaginous microorganisms</b> .....	5
1.3.1 Oleaginous filamentous fungi .....	5
1.3.2 Oleaginous yeasts.....	5
1.3.3 Oleaginous microalgae.....	7
1.3.4 Oleaginous bacteria.....	7
<b>1.4 Metabolic regulation of lipid accumulation</b> .....	7
<b>1.5 The isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation</b> .....	10
<b>1.6 The methods for isolation of new genes</b> .....	11
1.6.1 Cloning of genes encoding known proteins .....	11
1.6.2 Cloning of new members of a known gene family .....	11
1.6.3 Cloning of genes with the known chromosome location .....	15
1.6.4 Gene cloning based on cDNA library .....	15
1.6.5 Detection of new genes with gene chip .....	16
<b>1.7 Background and purpose of recent research</b> .....	17
<b>Chapter2 Materials and methods</b> .....	19
<b>2.1 Materials and instruments</b> .....	19
2.1.1 Strains and plasmids .....	19
2.1.2 Enzymes and kits .....	19
2.1.3 Main reagents .....	19
2.1.4 Main instruments .....	19
2.1.5 Preparation of media and reagents.....	20
2.1.6 Culture collection.....	20

<b>2.2 Amplification of malic enzyme fragment</b> .....	21
2.2.1 Search of malic enzymes .....	21
2.2.2 Design of degenerate primers .....	21
2.2.3 Purification of DNA from <i>L. starkeyi</i> .....	21
2.2.4 Acquirement of the conserved sequence of the malic enzyme gene from <i>L. starkeyi</i> .....	21
2.2.5 Sequencing of of the conserved sequence of the malic enzyme gene from <i>L. starkeyi</i> .....	22
2.2.6 Analysis of the sequencing result .....	24
<b>2.3 Rapid amplification of cDNA ends of malic enzyme</b> .....	
.....	24
2.3.1 Startup preparation .....	24
2.3.2 Purification of total RNA of <i>L. starkeyi</i> .....	25
2.3.3 3'-RACE .....	25
2.3.4 5'-RACE .....	28
<b>2.4 Amplification of full-length cDNA of malic enzyme from <i>L. starkeyi</i></b> .....	
.....	33
2.4.1 Design of primers .....	33
2.4.2 Amplification of full-length cDNA by one-step RT-PCR .....	
.....	33
<b>2.5 Cloning of DNA sequence of malic enzyme from <i>L. starkeyi</i></b> .....	
.....	33
2.5.1 Design of primers .....	33
2.5.2 Cloning of DNA sequence of malic enzyme from <i>L. starkeyi</i> by PCR .....	33
2.5.3 Sequencing and analysis .....	34
<b>2.6 Bioinformatic analysis</b> .....	34
<b>Chapter3 Results and discussion</b> .....	35
<b>3.1 Amplification of the conserved sequence of the malic enzyme gene from <i>L. starkeyi</i> with degenerate primers</b> .....	35

---

3. 1.1 Search of malic enzyme .....	35
3.1.2 Design of degenerate primers .....	35
3.1.3 Cloning of ME conserved sequence .....	36
3. 1.4 Analysis of ME conserved sequence .....	36
<b>3.2 3'-RACE .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Design of primers .....	39
3.2.2 Cloning and analysis of 3'-end of ME gene .....	40
<b>3.3 5'-RACE .....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Design of primers .....	41
3.3.2 Cloning and analysis of 5'-end of ME gene .....	41
<b>3.4 Cloning of full-length cDNA of ME .....</b>	<b>43</b>
3. 4.1 Design of primers .....	43
3.4.2 Cloning and analysis of full-length cDNA of ME .....	43
3.4.3 Analysis of total encoded AA sequence of ME .....	44
<b>3.5 Amplification of the DNA sequence of ME .....</b>	<b>45</b>
3. 5.1 Design of primers .....	45
3.5.2 Analysis of the DNA sequence .....	46
<b>3.6 Bioinformatic analysis of ME .....</b>	<b>46</b>
3. 6.1 Evolutionary analysis of ME .....	46
3.6.2 Conserved domain of ME .....	48
3.6.3 Subcellular analysis of ME .....	51
<b>Chapter4 Conclusions and prospect .....</b>	<b>52</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>53</b>
<b>References .....</b>	<b>55</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>62</b>

## 第一章 文献综述

油脂是构成和维持生命活动的基本物质,也是重要的工业原料。随着社会和科学技术的发展,油脂的需求量也大幅度增长。其中,微生物油脂作为一类新兴的油脂资源,越来越受到人们的关注。通常把油脂积累超过细胞总量 20%的微生物称为产油微生物(Oleaginous microorganisms)<sup>[1]</sup>,相应地,产油微生物利用以碳水化合物为主的培养基,通过复杂的油脂代谢途径所得到的油脂被称为微生物油脂(microbial oils),又叫单细胞油脂(single cell oil, SCO)。微生物油脂性能优越,可作为优质的石化柴油代用品。同时,微生物油脂富含长链多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)<sup>[2]</sup>,对人体健康具有重要意义。因此,如何利用产油微生物生产数量更多,质量更好的油脂成为时下研究的热点。

### 1.1 微生物油脂的研究历史

微生物油脂的研究始于第一次世界大战期间,德国曾准备利用产脂内孢霉属(*Endomyces*)和单细胞藻类镰刀属(*Fusarium*)的某些菌种生产油脂以解决当时的油源匮乏。随后,美国对微生物生产油脂也进行了研究工作,但因为经济、技术等各种原因,研究曾一度中止,直到第二次世界大战前夕,德国科学家才筛选出适合深层培养的菌株,开始在德国工业化生产食用油<sup>[4]</sup>。但是,利用微生物发酵生产油脂在成本上根本无法与从大豆、葵花籽以及近今年来常用的油菜籽中获取油脂相竞争。随后的研究探索一度集中在获取附加值较高的功能性油脂上,如某些微生物可以生产具有极高药用价值的  $\gamma$ -亚麻酸(GLA)<sup>[5-8]</sup>、花生四烯酸(ARA)<sup>[9-10]</sup>、二十碳五烯酸(EPA)<sup>[11]</sup>、二十二碳六烯酸(DHA)等稀有脂肪酸<sup>[12-14]</sup>。我国在微生物油脂领域的研究始于 60 年代,到 90 年代达到繁盛时期,研究多集中在菌种筛选、廉价原料的选择和发酵工艺条件优化等方面<sup>[15]</sup>。

目前利用产油微生物发酵生产微生物油脂的研究主要包括以下几个方面。首先是筛选高产油脂的菌种,即以自然突变为基础,从中筛选出具有优良性状的产油菌株。自然条件下,发生正向突变的几率极低,所以菌种筛选往往工作量较大,耗时较长,且收效甚微。但要想获得特定不饱和脂肪酸含量高的菌株,菌株

筛选是最有效的途径之一。赵玉巧等<sup>[16]</sup>采集海水样品 280 余份, 从中筛得一株菌株油脂含量百分数为 15.9% 的酒香酵母(*Brettanomyces* sp.), 油脂中 DHA 的含量高达 45.2%。Patnayak 等<sup>[17]</sup>从海绵中分离得到一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 其发酵产生的油脂量及油脂含量百分数分别为 16.9 g/L 和 31.7%, 油脂中含有较高比例的  $\gamma$ -亚麻酸。

其次是对菌株培养条件如培养基组成, 温度, 通气量, 培养时间, 补料方式等进行优化, 这是目前研究最多的方向, 尤其是对碳、氮源种类及碳氮比的优化。培养基中的碳源既为微生物生长提供能量, 又为油脂合成提供原料; 而氮源则对产油微生物的油脂积累起到开关调控作用, 此外氮源还具有促进细胞生长的作用<sup>[2]</sup>。最常用的碳源是葡萄糖, 因为以葡萄糖为碳源可获得更高的菌体生物量<sup>[18]</sup>, 且其价格相对其他碳源更便宜。部分产油微生物可以葡萄糖和木糖的混合糖为碳源积累油脂, 将农业废弃物中的木质纤维素简单降解后用作碳源供产油微生物发酵可达到变废为宝的目的, 一举两得, 因此也成为时下研究的热点之一。沈璐璐<sup>[19]</sup>采用皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*)直接发酵经过简单脱毒处理的大米草水解液生产微生物油脂, 得到的最高产油量为 6.0 g/L, 产油率为 46.3%。不同的氮源对油脂合成和菌体生长也有影响。黄建忠等<sup>[20]</sup>在利用深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)产脂变异株 M018 合成  $\gamma$ -亚麻酸的研究中发现,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  等无机氮源适合细胞生长, 但不利于油脂合成; 蛋白胨、牛肉膏等有机氮源则反之。而酵母膏不仅是菌体生长的适宜氮源, 也是细胞油脂合成的最佳氮源。以酵母膏为氮源, 生物量可达 32.8 g/L, 油脂含量为 67.8%。碳氮比(C/N)也是一个研究重点。高 C/N 有利油脂积累, 而低 C/N 有利于菌体生长。摸索出适宜的 C/N, 使之兼顾前期细胞生长和后期油脂积累对微生物油脂的高产至关重要。曲威等<sup>[21]</sup>经单因素优化得到一种高产油脂培养基, 其中碳源为葡萄糖 110 g/L, 氮源为硫酸铵 0.6 g/L。以该培养基对一株经紫外诱变过的高产油脂优良酵母菌株 *L. starkeyi* M36 培养 144 h 后可得生物量 24.2 g/L, 油脂量 14.6 g/L。发酵温度也是一个值得关注的因素, 研究表明, 降低生长温度可增加某些微生物体内不饱和脂肪酸的比例<sup>[22]</sup>, 还会改变微生物体内的油脂成分, Loffhagen 等<sup>[23]</sup>对一株睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)进行研究发现, 当生长温度降低至 20 °C 时, 该菌体内的棕榈酸的比例降低, 而棕榈油酸和异油酸的比例

增加。

第三是对菌种的基因进行改造。目前使用较多的手段是诱变,包括物理诱变和化学诱变。物理诱变主要通过紫外线、X—射线、激光等来实现,其中紫外线是一种使用最早、沿用最久的方法,且诱变效率高,不易回复突变。化学诱变常用的诱变剂主要有碱基类似物、5—氟尿嘧啶、烷化剂等,该方法经济、简单易行,诱变效果也较好。解生权等<sup>[24]</sup>对啤酒酵母进行诱变处理,结果表明物理和化学因素复合诱变效果最好,在紫外线照射 15 秒后再用硫酸二乙酯和亚硝基胍进行复合诱变,得到的突变株的生物产量和产油脂率最高,在普通发酵条件下,油脂含量可达 28.38%。诱变育种法虽然简单高效,但属于不定点突变,需要经过长期的筛选才能获得有益突变菌株。相比之下,运用基因工程手段可以定向改造菌种,更加安全可靠,是时下最有前景的菌种改良方法。目前对产油微生物 TAG 生物合成和代谢调控机制的研究已较为成熟,但通过基因调控手段增加细胞内油脂贮存量,改变油脂组成的研究尚处于起步阶段。近期,Zhang 等<sup>[25]</sup>研究表明,在卷枝毛霉中过量表达苹果酸酶,可使其油脂积累量提高至原来的 2.5 倍,同时还可提高油脂的不饱和度。这为基因调控法改良产油微生物的有效性提供了有力证明。

## 1.2 微生物油脂的研究价值

油脂是微生物生命活动的重要代谢产物,主要有两类,一类是磷脂,约占细胞合成油脂量的 10%以上,包括磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰丝氨酸的脂肪酸酯等。这部分油脂以体质脂形式,即细胞的结构组成成分而存在,在微生物中的含量非常恒定,很难通过常规萃取手段收集。另一类是甘油三酯(Triacylglycerol, TAG),包括多种饱和及不饱和脂肪酸,约占细胞合成油脂量的 80%以上。TAG 以贮存脂的形式存在,即以脂滴或脂肪粒形式贮存于细胞质中<sup>[3-4]</sup>。甘油三酯的主要功能普遍认为是作为碳源和能源的储备化合物,因它具有比碳水化合物和蛋白质高的热值,一经氧化将产生很高的能量。此外,TAG 还具有维持膜结构完整和正常功能的作用。这部分油脂可方便地运用萃取手段从菌体中收集,是微生物油脂的主要组成部分<sup>[2]</sup>。

与传统的油脂生产工艺相比,利用微生物生产油脂具有许多优点,这主要是

由产油微生物易培养，易改造和代谢产生的油脂品质高决定的。微生物的培养，不像动植物那样易受气候，季节变化及场地等因素的影响，并且微生物具有生长周期短，繁殖能力强，代谢旺盛等优点，可在相对较小的空间内进行连续培养。微生物可利用廉价原料，甚至工农业废弃物如糖蜜<sup>[26]</sup>，废糖液<sup>[27]</sup>，纤维素水解液<sup>[19]</sup>，工业污泥<sup>[28]</sup>等为培养基进行生产，有望据此开发出低成本，高收益的绿色环保油脂生产路线。

与动植物相比，微生物由单细胞组成，结构简单。目前，人们对于微生物油脂代谢途径已有比较深入的认识，可方便地运用诱变，基因工程等手段来调控其代谢路径，使其高产油脂，产高质量的油脂。

微生物油脂最大的优点在于它的油脂组成。微生物油脂中含有多种长链多不饱和脂肪酸，具有很高的经济价值，尤其是其中的 DHA，ARA 等，是婴儿成长发育不可或缺的成分。早在上世纪 80 年代，日本研究人员就发现，ARA 是高山被孢霉(*Mortierella alpina*)油脂的主要组成成分<sup>[2]</sup>。而在自然界的其他生物中，只有海洋动物的油脂中含有较高比例的多不饱和脂肪酸。目前已有许多研究对微生物油脂的安全性进行了评估，结果表明微生物油脂没有毒副作用，可作为婴儿食品的添加剂<sup>[29-31]</sup>。在欧洲、中东、南亚和澳洲等地已允许将某些微生物油脂添加到婴儿食品中<sup>[2]</sup>。目前已有不少微生物油脂产品作为保健食品上市，如英国 Selby Factory of Sturge Biochemicals 及日本出光化学公司的 GLA 产品，Martek Biosciences Corporation 生产的海藻 DHA 等，我国的嘉吉烯王生物工程（武汉）有限公司在该领域也较为突出，其产品主要是用高山被孢霉菌发酵生产的花生四烯酸<sup>[32]</sup>。微生物油脂的组成以 C<sub>16</sub> 和 C<sub>18</sub> 系脂肪酸为主，与植物油的成分相似，是植物油的优良替代品<sup>[33]</sup>。微生物油脂不仅在食品保健领域前景广阔，作为生物柴油也有很大的潜力。微生物油脂作为燃料具有以下优点：(1)十六烷值高，燃烧性能好于柴油；(2)闪点高，运输、储存、使用方面具有较好的安全性能；(3)润滑性能好。此外，微生物油脂还具有优良的环保特性，其含硫量低，无毒，燃烧产生的二氧化硫和硫化物量很小，同时可高度生物降解，降解速率是普通柴油的两倍，可大大减轻意外泄漏时对环境的污染。微生物油脂的成分与柴油类似，如果用它替代柴油，可以直接添加使用而不需要改动柴油机，也无需另添设加油设备、储存设备等。因此，微生物油脂是石化柴油的绿色替代品<sup>[34-35]</sup>。



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.

厦门大学博硕士论文摘要库