

学校编码：10384

分类号_____密级__

学号：21720091152062

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

裂壶藻异养生长和 DHA 积累的发酵条件优化及转基因裂壶藻的生理生化特性研究

Optimization of fermentation parameters for heterotrophic growth and DHA accumulation of *Schizochytrium* sp. TIO1101 and physiology-biochemistry characteristics of transgenic *Schizochytrium*

作者姓名：李科

指导教师姓名：徐洵 院士；林祥志 研究员

专业名称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2012 年 5 月

论文答辩时间：2012 年 5 月

学位授予日期：2012 年 6 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2012 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()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

摘要

二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA) 是一种具有重要生理意义和经济价值的高不饱和脂肪酸,其传统的制备方法是从深海鱼油中提取。但是,深海鱼油有鱼类资源供应限制,DHA 含量低,提取得到的 DHA 有鱼腥味等缺点,难以满足市场需求。因此,开发新的 DHA 来源已成为相关研究的重点。裂壶藻是一种异养海洋微藻,具有不饱和脂肪酸组成简单、DHA 含量高、易于培养、对人畜无毒害等优点,成为近年来 DHA 工业化生产领域研究的热点。

本论文利用本实验室分离自红树林的一株裂壶藻藻株 *Schizochytrium* sp. TIO1101,研究了培养基组分、培养时间和环境因子对其生长和 DHA 含量的影响;在选择的最佳培养条件下,对实验室已经构建的过表达乙酰辅酶 A 合成酶 (Acetyl-CoA synthetase, ACS) 裂壶藻进行筛选,并对转入基因 ACS 的功能及作用机制进行了初步研究。本研究主要取得了以下成果:

1. 利用正交设计对培养基组分葡萄糖、酵母膏、蛋白胨浓度对裂壶藻生长的影响进行了研究,确定裂壶藻的最佳培养基组合为:葡萄糖 40 g/L,酵母膏 15 g/L,蛋白胨 5 g/L。在此培养基条件下,25℃ 培养 96 h 获得的裂壶藻的生物量为 15.5 g/L。
2. 在获得的最佳培养基条件下,对裂壶藻的发酵条件盐度、温度和起始 pH 值进行了优化,结果表明:最适摇瓶生长和油脂积累的最佳条件为:盐度为 15,温度为 30℃,起始 pH 为 7。在此条件下,裂壶藻培养 72 h 后获得的生物量、油脂含量和 DHA 含量分别为 15.9 g/L, 8.16 g/L, 4.03 g/L。
3. 在上述研究的基础上,根据裂壶藻的最佳培养基和培养条件,对本实验室获得的过表达乙酰辅酶 A 合成酶转基因裂壶藻 A2、A3 的生理生化特性进行了系统研究,结果表明 A2、A3 转化子的生物量较野生型明显提高,和野生型相比分别提高了 23% 和 29%;油脂含量结果表明 A2、A3 转化子的油脂含量比野生型裂壶藻分别提高了 6.6%, 11.3%;GC 分析结果表明转化子与野生型裂壶藻的脂肪酸组分相同,DHA 含量都在 43% 左右。

关键词: 裂壶藻; DHA; 发酵优化; 转基因裂壶藻; 乙酰辅酶 A 合成酶

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

DHA (Docosahexaenoic acid) is a kind of polyunsaturated fatty acids with vital physiological functions and high economic values. More and more attention has been paid on production and preparation process of DHA, However, conventional fish oils may not be suitable to meet the increasing demand for DHA owing to their limited supply, lower content of DHA and peculiar taste and odor. *Schizochytrium* sp. are heterotrophic microalga that includes 35%-50% of their total fatty acid, and the composition of PUFAs in *Schizochytrium* sp. is simple. Currently, the production of DHA by *Schizochytrium* sp. is the subject of intensive research and increasing commercial attention.

Schizochytrium sp. TIO1101, a strain isolated from mangrove by using pine pollen as bait, was used as experiment material in this study. The effect of culture medium, culture time, and environmental factors on the growth and DHA content was systematically investigated. We also studied the effect of exogenous E. coli ACS gene on the growth and fatty acid of *Schizochytrium* sp. TIO1101. In summary, we have achieved the following results in this study:

1. Fermentation medium components for biomass of *Schizochytrium* sp. TIO1101 in shake-flask were optimized using orthogonal experiment. The optimized medium for biomass production was as following: glucose 40 g/L, yeast extract 15 g/L, peptone 5 g/L. The highest biomass production reached 15.5 g/L after 96 h of cultivation at the optimize medium, under 25 °C.

2. In the above optimize medium, we optimum fermentation parameters as salinity, temperature and pH for growth and lipids accumulation of *Schizochytrium* sp. TIO1101. The optimized shake-flask cultivation conditions were salinity 15‰, temperature 30 °C, pH 7. At the optimized conditions, dry cell mass of 15.9 g/L, total fatty acid of 8.16 g/L, and DHA accumulation of 4.03 g/L could be achieved after 72 h of cultivation.

3. Our team successfully transferring the acetyl-CoA synthetase (ACS) gene into *Schizochytrium* sp. TIO1101 by utility of electroporation, this paper compared the biomass and total lipid of change with that of the wild type strain. The result suggested that the biomass of the majority of the transformants higher than that of wild type strain, and the biomass of the transformants A2 and A3 improved 23% and 29% respectively, the fatty acid of A2 and A3 improved 6.6% and 11.3% respectively than that of wide type strain. The GC results revealed that A2 and A3 accumulated similar fatty acid compositions with wild type strain. Our results proved that applications of ACS gene in metabolic engineering of *Schizochytrium* sp. TIO1101 improved the production of biomass and fatty acids significantly.

Keywords: *Schizochytrium*; DHA; Fermentation optimization; Transgenic *Schizochytrium* ; Acetyl-COA synthetase

目 录

摘 要	I
Abstract	II
第一章 绪论	1
1.1 DHA 简介	1
1.2 DHA 的生理功能	2
1.2.1 DHA 与婴幼儿发育	2
1.2.2 心血管疾病的预防和治疗	3
1.2.3 抗癌作用	4
1.2.4 抗炎作用	4
1.2.5 对精神类疾病的作用	4
1.2.6 其它作用	5
1.3 DHA 的应用	5
1.3.1 保健食品和药品	5
1.3.2 营养强化剂和食品添加剂	6
1.3.3 饲料添加剂	6
1.4 DHA 的来源	6
1.4.1 鱼类资源	6
1.4.2 微生物资源	7
1.5 裂壶藻概述	8
1.5.1 裂壶藻简介	8
1.5.2 裂壶藻 DHA 合成途径	9
1.5.3 裂壶藻生产 DHA 的影响因素	11
1.6 研究的意义和内容	13
第二章 裂壶藻异养生长和 DHA 积累的发酵条件优化	15
2.1 材料	15
2.1.1 藻种	15

2.1.2 培养基.....	15
2.1.3 主要试剂.....	16
2.1.4 主要仪器.....	16
2.2 实验方法.....	17
2.2.1 裂壶藻生物量的测定.....	17
2.2.2 气相色谱测定 DHA 含量.....	17
2.2.3 裂壶藻高密度培养的培养基优化.....	18
2.2.4 生长曲线的测定.....	18
2.2.5 盐度对裂壶藻生长和 DHA 含量的影响.....	18
2.2.6 起始 pH 和温度对裂壶藻生长和 DHA 含量的影响.....	18
2.3 结果与讨论.....	18
2.3.1 裂壶藻高密度培养的培养基优化.....	18
2.3.2 裂壶藻细胞的生长曲线.....	21
2.3.3 盐度对裂壶藻生长和油脂含量的影响.....	21
2.3.4 温度和起始 pH 对裂壶藻生长和 DHA 含量的影响.....	23
2.4 本章小结.....	27
第三章 过表达外源乙酰辅酶 A 合成酶基因(ACS)的裂壶藻	
的生理生化特性研究.....	29
3.1 材料与方法.....	30
3.1.1 藻种.....	30
3.1.2 藻株筛选.....	30
3.1.3 裂壶藻生长曲线的测定.....	30
3.1.4 裂壶藻油脂含量测定.....	30
3.1.5 葡萄糖浓度测定.....	30
3.1.6 乙酸浓度的测定.....	31
3.1.7 ACS 基因在裂壶藻中表达稳定性的研究.....	32
3.2 结果与讨论.....	33
3.2.1 藻株筛选.....	33
3.2.2 转化子 A2、A3 生长曲线的测定.....	33
3.2.3 转化子 A2、A3 油脂含量和成分的测定.....	34
3.2.4 转化子 A2、A3 的葡萄糖利用率及发酵液乙酸浓度.....	35

3.2.5 ACS 基因在裂壶藻中表达稳定性的研究.....	37
3.3 本章小结.....	37
第四章 结论与展望	39
4.1 结论.....	39
4.2 展望.....	39
参考文献：	41
硕士阶段发表的论文：	51
致 谢	52

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of contents

Abstract	
Chapter 1. Introduce	1
1.1 DHA introduction	1
1.2 Physiological function of DHA	2
1.2.1 DHA and the development of infants.....	2
1.2.2 The prevention and treatment of cardiovascular diseases	3
1.2.3 Anti-cancer effect	4
1.2.4 Anti-inflammatory effect	4
1.2.5 DHA and Mental illness.....	4
1.2.6 Other benefits	5
1.3 Utilization of DHA	5
1.3.1 Health food and drug	5
1.3.2 Nutrition fortifier and food additive.....	6
1.3.3 Feed additive	6
1.4 Resource of DHA	6
1.4.1 DHA from fish species	6
1.4.2 DHA from microorganism	7
1.5 Research development of <i>Schizochytrium</i>	8
1.5.1 <i>Schizochytrium</i> introduction	8
1.5.2 DHA biosynthesis in <i>Schizochytrium</i>	9
1.5.3 Influence factors on the Growth and DHA accumulation of <i>Schizochytrium</i>	11
1.6 Purpose and Content of essay	13
Charpter 2. Optimization of fermentation parameters for	

heterotrophic growth and DHA accumulation of	
<i>Schizochytrium</i>	15
2.1 Material	15
2.1.1 Organism.....	15
2.1.2 Medium	15
2.1.3 Main reagents	16
2.1.4 Main experimental equipments.....	16
2.2 Methods	17
2.2.1 Analysis of biomass.....	17
2.2.2 Analysis of DHA by GC	17
2.2.3 Optimization of the cultivation medium for <i>Schizochytrium</i>	18
2.2.4 Growth curve of <i>Schizochytrium</i>	18
2.2.5 Effect of salinity on <i>Schizochytrium</i> growth and DHA accumulation ..	18
2.2.6 Effect of initial pH and temperature on <i>Schizochytrium</i> growth and DHA accumulation.....	18
2.3 Results and Discussion	18
2.3.1 Optimization of the cultivation medium for <i>Schizochytrium</i>	18
2.3.2 Growth curve of <i>Schizochytrium</i>	21
2.3.3 Effect of salinity on <i>Schizochytrium</i> growth and DHA accumulation	21
2.3.4 Effect of initial pH and temperature on <i>Schizochytrium</i> growth and DHA accumulation.....	23
2.4 Summary	27
Chapter 3. The physiology-biochemistry characteristics of	
transgenic <i>Schizochytrium</i> with acetyl-COA synthetase	
gene	29
3.1 Material and Methods	30
3.1.1 Organism.....	30
3.1.2 Organism screening	30

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