

摘要

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic Acid, DHA) 具有促进大脑发育、预防心血管疾病等重要生理功能, 裂殖壶菌 (*Schizochytrium*) 因其含有丰富的油脂和 DHA 而成为产业化产 DHA 的重要菌种之一。目前, 裂殖壶菌中油脂产量和 DHA 产量主要通过发酵优化策略提高, 但关于外源添加物诱导产生活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS), 提高裂殖壶菌 DHA 产量的研究较少。本文通过筛选外源添加物, 并优化其添加物浓度与添加时间提高裂殖壶菌中的 DHA 产量, 通过建立分批发酵动力学模型, 为提高裂殖壶菌工业生产提供一种新的研究思路。主要研究如下:

(1) 筛选外源添加物, 并探究添加浓度及添加时间对裂殖壶菌 DHA 产量的影响。在裂殖壶菌发酵过程中分别添加过氧化氢 (H_2O_2)、氯化锌 (ZnCl_2)、硫酸铜 (CuSO_4)、氯化铬 (CrCl_2) 和硝酸银 (AgNO_3) 五种外源添加物, 添加 H_2O_2 和 ZnCl_2 时裂殖壶菌 DHA 产量最高, 分别为 $2.87 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, DHA 产量分别提高 11.26% 和 5.45%。经优化, H_2O_2 和 ZnCl_2 最适添加浓度分别为 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 裂殖壶菌中 DHA 产量分别为 $3.17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别提高 23.34% 和 5.45%。结果显示, 添加 H_2O_2 时 DHA 产量有明显提高, 并且生物量、油脂产量和 DHA 产量远高于添加 ZnCl_2 时, 选取 H_2O_2 进行发酵时间优化。经优化, H_2O_2 最佳添加时间为 48 h, 生物量提高 29.29%, 油脂产量及 DHA 产量分别为 $13.37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别提高 29.18% 和 67.87%。经过外源添加物筛选, 添加浓度及添加时间优化, DHA 产量有明显提升, 最佳外源添加物为 H_2O_2 , 添加浓度及添加时间分别为 $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 48 h。

(2) 通过裂殖壶菌胞内化合物变化的分析, 探究 H_2O_2 对裂殖壶菌油脂及 DHA 产量的影响。添加 H_2O_2 时 ROS 含量提高 7.94%, 活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 有利于裂殖壶菌油脂积累, 少量 ROS 有利于诱导天然抗氧化物类胡萝卜素的产生, 胞内类胡萝卜素提高 12.89%, 有利于维持菌体中 DHA 稳定性; 外源添加 H_2O_2 后裂殖壶菌油脂积累期间胞内蛋白质及多糖含量分别降低 30% 和 20% 以上, 有利于碳源流向油脂积累, 间接证明 H_2O_2 诱导的 ROS 有利于提高裂殖壶菌油脂产量。

(3) 在经验模型的基础上, 推导裂殖壶菌发酵动力学模型, 利用软件拟合发酵动力学数据并建立发酵动力学模型。经检验裂殖壶菌发酵曲线拟合相关系数 (R^2) 均在 0.98 以上, 反应发酵过程中的参数变化, 发酵参数 Y_X 和 Y_P 变化验证了 ROS 能够诱导碳源更多流向油脂积累。外源添加 H_2O_2 后裂殖壶菌的油脂产量和 DHA 产量分别达到 $36.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $12.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 相较于未添加时油脂产量和 DHA 产量分别提高 8.77% 和 33.59%, 为裂殖壶菌工业化发酵提供理论依据。

关键词: 裂殖壶菌; H_2O_2 ; 活性氧; DHA

Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 fatty acid, plays an important physiological role in promoting brain development and preventing cardiovascular diseases. *Schizochytrium* is one of the important strains for producing DHA commercially due to its rich oil and DHA content. Currently, the oil and DHA yields of *Schizochytrium* are mainly improved by optimizing fermentation strategies, but there is limited research on the use of exogenous additives to induce the production of reactive oxygen species (ROS) and increase the DHA yield. This study screened exogenous additives, optimized their concentrations and addition times to increase the DHA yield of *Schizochytrium*, and established a batch fermentation kinetic model to provide a new research approach for the industrial production of *Schizochytrium*. The main findings are as follows:

(1) Five exogenous additives, hydrogen peroxide (H_2O_2), zinc chloride (ZnCl_2), copper sulfate (CuSO_4), chromium chloride (CrCl_2), and silver nitrate (AgNO_3), were added to *Schizochytrium* fermentation to investigate their effects on DHA production. The addition of H_2O_2 and ZnCl_2 resulted in the highest DHA yields of $2.87 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and the DHA yields increased by 11.26% and 5.45%, respectively. After optimization, the optimal concentrations of H_2O_2 and ZnCl_2 were $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and the DHA yields of *Schizochytrium* were $3.17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, which increased by 23.34% and 5.45%, respectively. The results showed that the addition of H_2O_2 significantly increased DHA production, and the biomass, oil yield, and DHA yield were much higher than those of ZnCl_2 . Therefore, H_2O_2 was selected for fermentation time optimization. After optimization, the optimal fermentation time for H_2O_2 was found to be 48 h, resulting in a 29.29% increase in biomass and a $4.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA yield, which increased by 67.87%. Through screening of exogenous inducers and optimizing their concentrations and addition time, the DHA yield was significantly increased, and H_2O_2 was identified as the optimal exogenous inducer, with an optimal concentration of $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and an optimal addition time of 48 h.

(2) The changes in intracellular compounds of *Schizochytrium* were analyzed to investigate the effects of H_2O_2 on oil and DHA production. The addition of H_2O_2 increased the ROS content by 7.94%, which was conducive to the accumulation of oil in *Schizochytrium*. A small amount of ROS was beneficial for inducing the production of natural antioxidants such as carotenoids, which increased the intracellular carotenoid content by 12.89%, thus maintaining the stability of DHA in the cells. During the oil accumulation period induced by H_2O_2 , the protein and polysaccharide contents in the cells decreased by more than 30% and 20%, respectively, which was conducive to the flow of carbon sources towards oil accumulation, indirectly demonstrating that ROS induced by H_2O_2 was beneficial for increasing the oil yield of *Schizochytrium*.

(3) Based on the empirical model, a batch fermentation kinetic model of *Schizochytrium* was derived, and the fermentation kinetic data were fitted using software to establish the fermentation kinetic model. The correlation coefficients (R^2) of the fermentation curves of *Schizochytrium* were all above 0.98, and the changes in the fermentation parameters Y_X and Y_P

during the fermentation process verified that ROS could induce more carbon flow towards oil accumulation. After the addition of H₂O₂, the oil yield and DHA yield of *Schizochytrium* reached 36.71 g·L⁻¹ and 12.01 g·L⁻¹, respectively, which were 8.77% and 33.59% higher than those without H₂O₂ addition, providing a theoretical basis for the industrial fermentation of *Schizochytrium*.

Keywords: *Schizochytrium*; H₂O₂; Active oxygen; DHA

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 多不饱和脂肪酸 DHA 简介.....	1
1.1.1 多不饱和脂肪酸简介.....	1
1.1.2 DHA 的结构性质及来源.....	1
1.1.3 DHA 的生理功能.....	2
1.1.4 DHA 应用市场.....	3
1.2 裂殖壶菌产 DHA 的研究进展概述.....	4
1.2.1 裂殖壶菌简介.....	4
1.2.2 裂殖壶菌产 DHA 的合成途径.....	4
1.2.3 裂殖壶菌产 DHA 的影响因素.....	5
1.2.4 外源添加物在裂殖壶菌中的应用.....	7
1.3 氧化应激诱导产油微藻积累 DHA 的研究进展.....	8
1.3.1 活性氧与氧化应激.....	8
1.3.2 调控氧化应激诱导微藻脂质积累的策略.....	10
1.4 立题依据及研究内容.....	10
1.4.2 研究目的及意义.....	10
1.4.3 研究内容.....	11
第二章 材料与方法.....	12
2.1 实验材料.....	12
2.1.1 菌种.....	12
2.1.2 培养基.....	12
2.1.3 培养条件.....	12
2.2 主要仪器与试剂.....	13
2.2.1 主要仪器.....	13
2.2.2 主要试剂.....	13
2.3 实验方法.....	14
2.3.1 生物量测定与生化检测方法.....	14
2.3.2 激光共聚焦显微镜结构观察.....	14
2.3.3 油脂提取与含油量测定.....	14
2.3.4 脂肪酸甲酯化.....	14
2.3.5 气相色谱条件与 DHA 分析.....	15
2.3.6 细胞内 ROS 的测定.....	15
2.3.7 类胡萝卜素含量测定.....	15
2.3.8 蛋白质与多糖测定.....	15

第三章 结果与讨论	17
3.1 不同外源添加物对裂殖壶菌生长及 DHA 积累的影响.....	17
3.1.1 外源添加物对裂殖壶菌 DHA 产量的影响.....	17
3.1.2 不同浓度 ZnCl ₂ 对裂殖壶菌生长水平影响.....	18
3.1.3 不同浓度 H ₂ O ₂ 对裂殖壶菌 DHA 产量的影响.....	20
3.1.4 H ₂ O ₂ 添加时间对裂殖壶菌 DHA 产量的影响.....	22
3.1.5 H ₂ O ₂ 对裂殖壶菌菌体及 DHA 产量积累影响.....	23
3.2 H ₂ O ₂ 促进裂殖壶菌油脂及 DHA 积累的原因初探.....	25
3.2.1 H ₂ O ₂ 对裂殖壶菌中 ROS 含量的影响.....	25
3.2.2 H ₂ O ₂ 对类胡萝卜素含量的影响.....	26
3.2.3 H ₂ O ₂ 对蛋白质含量的影响.....	27
3.2.4 H ₂ O ₂ 对多糖含量的影响.....	28
3.3 添加 H ₂ O ₂ 对裂殖壶菌发酵动力学模型的影响.....	28
3.3.1 裂殖壶菌发酵过程代谢曲线分析.....	28
3.3.2 裂殖壶菌菌体生长动力学模型的确定.....	31
3.3.3 裂殖壶菌产物生成模型的确定.....	31
3.3.4 裂殖壶菌底物消耗模型的确定.....	32
3.3.5 动力学模型参数求取.....	32
3.3.6 动力学模型的验证.....	33
主要结论与展望	37
主要结论.....	37
展望.....	37
参考文献.....	39

第一章 绪论

1.1 多不饱和脂肪酸 DHA 简介

1.1.1 多不饱和脂肪酸简介

脂肪酸分为饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) 和单不饱和脂肪酸 (Monounsaturated Fatty Acid, MUFA)。由于单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸能够由人体合成, 所以被认为是“非必需的”; 而多不饱和脂肪酸由于其对人类健康的重要性, 及其不可由人体合成, 只能通过饮食摄入, 所以被认为是“必需的” [1-3]。

多不饱和脂肪酸是一种碳链长度为 18-22, 并且含有多个碳碳双键的直链脂肪酸。通常根据脂肪酸甲基端的第一个碳碳双键所在的位置不同, 可以分为 Omega-3 (ω -3) 脂肪酸、Omega-6 (ω -6) 脂肪酸和 Omega-9 (ω -9) 脂肪酸^[4], 其中以 ω -3 和 ω -6 脂肪酸最重要。 ω -3 多不饱和脂肪酸包含 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) ^[5], 主要来源于一些富含脂肪的鱼类和一些植物中 (如奇亚籽、亚麻籽、菜籽和多叶蔬菜等) ^[6]。 ω -6 多不饱和脂肪酸代表为亚油酸, 他们存在于植物油, 坚果和种子中^[7]。

1.1.2 DHA 的结构性质及来源

二十二碳六烯酸的系统命名为全顺式 Δ -4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸^[8]。DHA 结构式与分子模型如图 1-1 所示。DHA 在常温下无色无味, 是一种油状液体并且不溶于水, 但是能与有机溶剂混溶。二十二碳六烯酸的分子式为 $C_{22}H_{32}O_2$, 相对分子质量为 328.49。

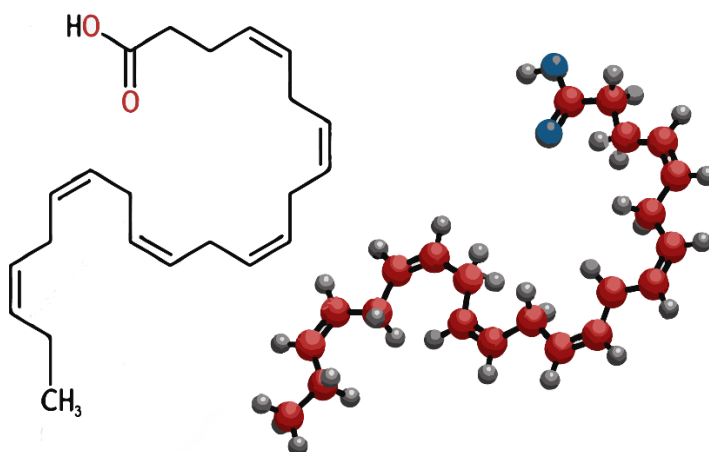


图 1-1 DHA 的化学结构式 (左) 和分子模型 (右)

Fig.1-1 Chemical structural formula (left) and molecular model (right) of DHA

DHA 两端分别为一个羟基基团 ($-COOH$) 和一个甲基 ($-CH_3$), 其单双键交替组成的碳链, 使其具有高不饱和度, 含有六个不饱和双键和五个亚甲基。这种结构使得 DHA 很容易被氧化, 进而发生酸败等化学反应, 但也正是这种结构赋予 DHA 的流动性与柔韧性, 使其在各种生理结构中能发挥作用^[9, 10]。

(1) 传统来源

一直以来,深海鱼类一直是 ω -3 多不饱和脂肪酸(特别是 DHA 和 EPA)的主要来源^[11],然而由于现在深海鱼类被过度捕捞,导致 DHA 的产量不可避免地大量减少;其次,由于现在海洋污染问题的愈发严重,海洋鱼类体内会富集大量如汞、二恶英和多氯联苯等有机物污染物(Persistent Organic Pollutants, POPs),POPs 会在鱼类脂肪组织富集^[12],导致部分提出的鱼油含有 POPs,影响人身体健康;最后,鱼油容易被氧化,导致鱼油变质产生难闻的气味,变质的鱼油也会引起人体肠道问题。基于以上原因,传统的鱼油 DHA 已经难以满足人们日渐提高的对于健康的需求,需要寻找一条新的高产、可规模化、安全、健康的 DHA 来源。

(2) 微生物来源

有研究发现深海鱼类中的 DHA 最初来源于初级生产者,如海洋微藻、真菌类和浮游生物^[13],海洋微藻主要包括硅藻(*Diatom*)、甲藻(*Dinoflagellates*)、金藻(*Chrysophyta*)、绿藻(*Chlorophyta*)、红藻(*Rhodophyta*)等^[14],真菌类主要为裂殖壶菌(*Schizochytrium*)和破囊壶菌(*Thraustochytriidae*)^[15],海洋中的诸多微藻渐渐成为 DHA 的重要来源。

与深海鱼类相比,海洋微藻和真菌生产 DHA 优点如下:首先,微藻可以在受到调控的发酵罐中生产 DHA,在产量和生产速度上比鱼油 DHA 更加可靠与稳定,同时也减少对海洋生态环境的破坏和压力;其次,微藻中脂肪酸成分更加少且集中,易于后期分离提取;最后,藻油 DHA 还不含有汞和多氯联苯等污染物,这对于人们服用藻油补充 DHA 更加安全、可靠^[16]。

1.1.3 DHA 的生理功能

大量研究表明,膳食 DHA 对人类健康有着诸多益处,包括促进婴儿的大脑和眼睛的发育^[17,18],预防心血管疾病^[19-22],保护视力^[23-25],抗炎及改善老人的认知能力^[23,26]等,最近还有研究发现,膳食 DHA 还可能有利于改善肠道中微生物菌群结构^[27,28]。

(1) 促进婴儿大脑的发育

人类大脑和视网膜组织脂肪酸中分别含有 40%和 60%的 DHA,是大脑的重要结构膜成分,因此 DHA 是婴儿大脑和眼睛发育与成熟的关键营养之一^[29]。由研究发现,DHA 对婴儿有多种益处,包括手眼协调能力^[18],解决问题能力^[18],改善记忆与运动能力^[30]。通过对小鼠胚胎神经干细胞和大脑研究,发现 DHA 是大脑中类视黄醇 X 受体(Retinoid X Receptor, RXR)的关键配体之一^[31],早期大脑发育的关键调节因子 PP 激活受体 γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ , PPAR- γ)与 RXR 异二聚体并调节靶基因的转录^[32]。DHA 作为自由基清除剂,能够保护发育中的大脑免受过氧化损伤^[33],以确保婴儿大脑的快速发育。

(2) 抗炎和免疫能力

DHA 的免疫与抗炎功能与其能够减弱与炎症相关的类花生酸有关,包括改变白三烯的形成、抗氧化应激及内皮细胞的活化等功能^[34,35]。有研究发现,DHA 在刺激单核细胞或淋巴细胞后会降低炎症症状,减少白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF α)的产生^[36];

通过 DHA 衍生的 D 系列溶解素、神经保护素和抗炎脂质介质家族 (Maresins), 这些介质会通过 G 偶联蛋白受体作用, 起到抗炎和促消退的作用。

(3) 预防心血管疾病

心血管疾病 (Cardiovascular Disease, CVD) 全球死亡人数和疾病负担的主要病因, 占全部死亡人数的三分之一^[37]。而心血管疾病的主要诱因是血栓和动脉硬化, 近年来研究表明, -DHA 具有抗血栓和抗动脉硬化的作用, 发现 DHA 对于血压、内皮功能、血小板抗凝、血脂等诸多方面有好处。

Kelley 等人发现通过服用 DHA 使得小而密的血浆低密度脂蛋白 (Low Density Lipoprotein, LDL) 减少 21%^[38], 降低了动脉粥样硬化的可能^[39]; Croset 等人发现 DHA 的羟基衍生物能够诱导血栓素抑制血小板的聚集率^[40]; Russell 等人发现 DHA 和 EPA 联合作用能够改善内皮功能, 调节患者氧化应激和发炎的信号通路^[41], DHA 通过激活钙门控制的钾通道, 泵出细胞内的 K^+ , 有利于扩张受阻的血管, 从而降低内皮压力负荷和血液流通阻力, 以此保护心血管^[42]; Davidson 等人发现 DHA 可以通过激活脂肪酸氧化基因, 同时抑制脂质合成蛋白基因, 从而降低了血浆中甘油三酯 (Triglyceride, TG) 的浓度^[43], 以此降低血压来保护血管。

(4) 预防和治疗精神疾病

DHA 可以显著减少因压力刺激产生的 TNF- α 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 与脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激的 IL-6^[44], 能够有效缓解生活中焦躁与压力。DHA 在治疗各种精神疾病上均有有益效果, 例如精神分裂症、感情障碍、抑郁症和焦虑症等精神疾病^[45]。

(5) 改善与预防阿尔兹海默症

阿尔兹海默症 (Alzheimer's Disease, AD) 作为最常见的老年痴呆症, 病程长, 不可逆而且致残率高。研究证明, 富含 ω -3 多不饱和脂肪酸的饮食可以降低痴呆症和阿尔兹海默症的风险^[46, 47]。目前有许多研究关于 DHA 对阿尔兹海默症的作用机制。

例如, DHA 的衍生物抗炎类花生酸与神经保护素, 可以抑制神经炎症来预防阿尔兹海默症^[48-50]; DHA 通过调节载脂蛋白 E (Apolipoprotein E, ApoE) 和胆固醇及脂筏表达和细胞信号传导, 来调节阿尔兹海默症发病过程^[51]; DHA 通过激活抗氧化酶 (谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶), 抑制氮氧化物的产生, 保护神经元免受细胞毒性, 以此来减少细胞凋亡保护大脑^[52]; DHA 作为大脑细胞膜结构中的重要组成成分, 较高的 DHA 水平有助于维持大脑细胞膜结构的稳定性, 来保护神经元功能^[47]。尽管 DHA 无法治愈阿尔兹海默症等老年痴呆症, 但是补充 DHA 却是能预防及延缓初期老年痴呆症状^[53], 这对老人饮食健康调整有着十分重要的意义。

1.1.4 DHA 应用市场

(1) DHA 在食品行业的应用现状

世界卫生组织呼吁每个成人每日摄入 500mg DHA 和 EPA^[54]。随着近期人们对 DHA 优越功能的认识, DHA 越来越广泛的应用于健康食品和婴幼儿配方食品中。2000 年前后国外各大婴幼儿奶粉生产厂家纷纷开始进军添加 DHA 的婴儿配方奶粉, 例如, 美国

惠氏、美赞臣、以色列的 Maabarot 等公司，至今已经形成了完整的生产销售系统。

一项全球调查显示，全球有 67% 的人每日摄入的 ω -3 多不饱和脂肪酸小于 100 mg，而在中国，每日的摄入量低于 50mg^[55]。中国作为第二大婴幼儿奶粉消费国，奶粉中添加 DHA 的研究备受关注，2021 年 3 月，国家卫健委和国家市场监督管理总局制定国家标准分别对应 1 段奶粉（0-6 月龄）、2 段奶粉（6-12 月龄）、3 段奶粉（12-36 月龄），以此来确保中国婴幼儿的食品健康问题。根据统计显示，中国 DHA（藻油）市场在 2021 年达到 8.1 亿元，其中，应用于婴幼儿配方奶粉的 DHA 藻油占到全行业的 40%。随着人们对于健康的需求，DHA 除了在食品方面得到大力应用，在保健品和功能性食品中也得到广泛的应用。

（2）DHA 在饲料方面的应用现状

在水产养殖方面，研究表明，在水产饲料中添加以裂殖壶菌为代表的 DHA 产生菌，能够有效的提高水产幼苗的生长速度、存活率、摄食率及免疫能力^[56]。在动物养殖方面，DHA 对动物幼崽大脑和神经发育特别重要，在饲料中添加 DHA 会预防牛羊猪等家禽幼崽出现发育不良、易死亡的问题。另一方面，除了对于动物的本身作用外，DHA 还可以提高鸡蛋、肉类和牛奶等动物产品的质量。例如，给母鸡补充含有 DHA 的饮食可以增加鸡蛋中不饱和脂肪酸特别是 DHA 的含量，为人类饮食提供更健康的产品。

1.2 裂殖壶菌产 DHA 的研究进展概述

1.2.1 裂殖壶菌简介

裂殖壶菌（*Schizochytrium*），是一种单细胞球形的海洋真菌，属于真菌生物域（*Eumycota*）^[57]。目前已经从海洋环境中分离出许多不同种的裂殖壶菌，目前常见研究菌种包括 *Schizochytrium aggregatum*、*Schizochytrium limacinum*、*Schizochytrium octosporum* 和 *Schizochytrium mangrovei* 四个种。

裂殖壶菌作为一种高产油脂（特别是多不饱和脂肪酸）的海洋真菌，含油量最高可达干重的 50%，其中重要的多不饱和脂肪酸 DHA 含量可达总脂肪酸的 35% 以上^[58]。裂殖壶菌生长工艺简单，对发酵条件要求低，同时多不饱和脂肪酸含量高而且组成成分种类较少，有利于分离出纯净的 DHA 藻油，因此裂殖壶菌是一种十分适合工业化生产 DHA 的菌种^[59]。因此，目前有大量研究在寻找提高裂殖壶菌生产 DHA 效率和降低成本的方法。

1.2.2 裂殖壶菌产 DHA 的合成途径

裂殖壶菌 DHA 的合成途径如图 1-2 所示，脂肪酸合成需要还原型辅酶 II（Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH）提供必要的还原力和丙二酰辅酶 A（Malonyl-CoA）用于脂肪酸合成的前体物质^[60]。其中，糖酵解途径产生的乙酰辅酶 A 通过乙酰辅酶 A 羧化酶合成丙二酰辅酶 A；NADPH 主要通过糖酵解和磷酸戊糖途径产生。

裂殖壶菌中油脂和 DHA 的合成途径有两条，分别为需氧脂肪酸合酶途径（Fatty Acid

Synthase, FAS) 及厌氧聚酮合酶途径 (Polyketone Synthase, PKS)。在有氧途径中, 合成的饱和脂肪酸通过一系列的伸长和去饱和步骤产生了一系列不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸, 双键利用氧气和 NADH 通过特异性去饱和酶插入, 最终产物为 DHA 和 EPA 等多不饱和脂肪酸。

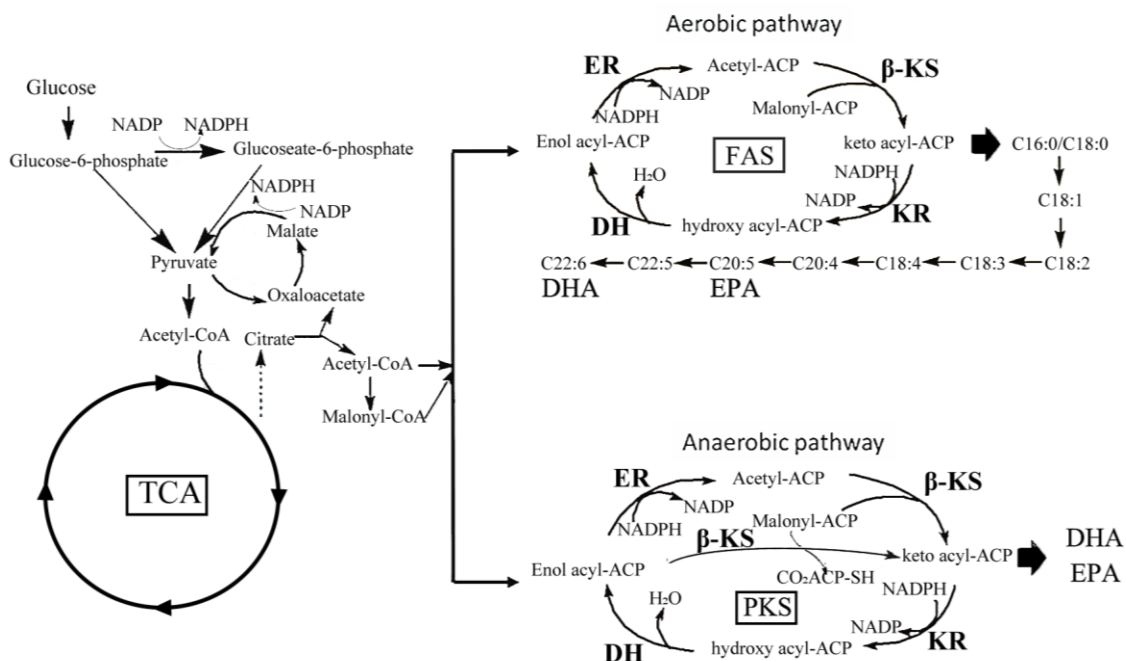


图 1-2 裂殖壶菌中油脂与 DHA 产生途径

Fig.1-2 Production pathway of oil and DHA in *Schizochytrium* sp.

注: ER: 烯酰还原酶; β -KS: 酮基合成酶; KR: 酮基还原酶; DH: 脱氢酶

通过有氧条件下产生的饱和脂肪酸也可以通过厌氧聚酮合酶途径产生多不饱和脂肪酸, 厌氧聚酮合酶途径在有氧和无氧的情况下都能发挥作用。厌氧途径中的长链多不饱和脂肪酸合成从酰基载体蛋白 (Acyl Carrier protein, ACP) 开始, 通过四个重复的反应: 酮基合成酶 (β -Ketosynthase, β -KS) 缩合, 酮基还原酶 (Ketoreductase, KR) 还原酮, 脱氢酶 (De-Hydratase, DH) 脱水和烯酰还原酶 (Enoylreductase, ER) 还原。其中烯酰还原酶催化的步骤可以被绕过, 导致双键保留在酰基链中。

1.2.3 裂殖壶菌产 DHA 的影响因素

裂殖壶菌生产 DHA 的过程主要为菌种筛选、发酵调控, 菌体收集, 油脂提取及 DHA 的纯化。为了提高裂殖壶菌的 DHA 发酵水平, 结合 DHA 的合成途径, 目前主要研究重点在菌株性能提高、发酵过程调控^[61]。

1.2.3.1 裂殖壶菌的筛选与改良

近三十年, 世界各地学者从不同海水中筛选了各种裂殖壶菌。其中, 保藏于美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC) 模式菌株 *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC 20888) 分离于加利福尼亚河中, 其 DHA 产量高达 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[62]; 及分离于日本雅浦群岛珊瑚礁附近的海水的 *Schizochytrium* sp. SR21, DHA 产量和生物量在发酵 56 h 后达到 $21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[63]。*Schizochytrium* sp. S31 和 *Schizochytrium* sp. SR21

至今被广泛应用于裂殖壶菌的优化与改造中。

诱变育种是微生物育种一种重要方式，主要分为化学和物理诱变。例如，李丹等人利用阴性选择策略（化学诱变），获得一株 *S. limacinum* F6 突变株可以耐受丁醇，提高 11.22% DHA 含量^[64]。赵犇等人利用等离子体诱变（Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP）结合丙二酸筛选策略，得到一株突变株命名为 MZ-17，其 DHA 产量相对于野生菌株增加 1.8 倍^[59]。诱变育种相对来说更加快捷有效。

利用基因工程技术直接修饰特定的生化反应基因，以此改变细胞特性和增强生产能力，也是目前改善裂殖壶菌产 DHA 的方法之一。目前，应用于产油微生物的技术主要包括同源重组^[65]，异源重组^[66]，质粒插入^[67]等。

1.2.3.2 裂殖壶菌发酵工艺优化

（1）底物优化

裂殖壶菌的发酵底物分为碳源、氮源、无机盐和微量元素。裂殖壶菌可以使用多种碳源，其中最常用的是葡萄糖，因为裂殖壶菌的产油经过糖酵解途径，葡萄糖相对利用率更高，理论脂质最大利用葡萄糖效率为 31%^[68]；第二常用的碳源为甘油，理论利用率为 30%^[68]，但实际上，现在科技论文中利用率很少能够超过 20%。Sahin 等人通过对比葡萄糖，甘油和果糖作为碳源时对裂殖壶菌产 DHA 的影响，最终发现，裂殖壶菌在消耗甘油作为碳源时 DHA 含量最高^[69]。裂殖壶菌的常见氮源为有机氮源，如酵母提取物、味精、蛋白胨等。同时，有研究表明，某些裂殖壶菌也可以利用无机氮作为氮源生长^[70]。无机氮相对于有机氮成本较低，同时也让裂殖壶菌利用工业废水和发酵废物等低价代替氮源。目前，碳源的替代物主要有粗甘油、甘蔗渣水^[71]、菊粉^[72]、发酵废水和藻渣^[71]等；氮源的替代物主要为无机氮和发酵废液，例如丙氨酸母液^[73]、奶酪乳清脱盐废水^[74]、脱脂桑籽蛋白水解物^[75]、玉米浸泡液^[76]、酒糟处理液^[77]、甘蔗糖蜜、藻渣等。目前这些替代物有一些不足，一是预处理工作复杂，综合下降成本并不明显，二是裂殖壶菌的发酵水平并不高，难以达到使用原始培养基时 DHA 的产量。

（2）发酵条件优化

发酵条件优化主要通过溶氧（Dissolved Oxygen, DO）、温度、pH 值和盐度影响裂殖壶菌的生长和 DHA 的产生。在菌体对数增长期，裂殖壶菌对氧气的需求较高，当培养基中基质氮耗尽，裂殖壶菌进入油脂积累期，对氧气需求量下降^[78]。有研究通过探究优化供氧方式及两阶段供氧策略来提高裂殖壶菌 DHA 的产量。

温度对裂殖壶菌生长及产油有十分大的影响，有文献发现温度较高时有利于菌体生长，温度较低时有利于油脂积累，以此制定了两阶段温度控制策略来培养裂殖壶菌，来提高 DHA 的产量。然而现在大多数研究在培养裂殖壶菌时保持同样的温度。

裂殖壶菌的最适酸碱度范围为 5-8，偏酸的 pH 有利于 DHA 的积累，但在摇瓶发酵过程中控制 pH 较为困难，局部过酸条件下十分影响菌体的生长。因此少数文献利用弱酸和弱碱控制 pH 变化，例如尹凤伟等人利用氨和柠檬酸作为 pH 调节剂使得 DHA 产量提高 7.88%^[79]。

裂殖壶菌由于分离地点不同（海洋及红树林中），对盐度的耐受范围非常宽。胡雪超

等人通过添加六种盐导致裂殖壶菌渗透压变化对菌体及 DHA 产量的影响,发现在较高渗透压下有利于菌体生长,在较低渗透压下有利于裂殖壶菌产 DHA^[80]。虽然高盐浓度有利于菌体生长及抑制杂菌生长,但是高盐浓度下容易造成发酵罐腐蚀,因此,可以通过低盐浓度或者其他盐代替天然海水进行发酵。

(3) 发酵过程优化

在发酵过程中随着氮耗尽,裂殖壶菌从快速生长期过渡到产油期,有着明显的两阶段发酵过程,因此大多数文章中针对裂殖壶菌生长与产油时期对发酵底物与条件不同,进行两阶段控制发酵进程,例如上文提到的两阶段温度控制,两阶段 pH 控制^[79],两阶段盐度(渗透压)控制^[80],两阶段溶氧控制、碳源两阶段控制及一些外源添加物添加时间控制^[81],以此来提高菌体生长和 DHA 的产生。曲亮等人研究了不同发酵过程中不同的补料方式(分批发酵、补料分批发酵和重复分批补料发酵),采用了 72 种不同的补糖及发酵策略,发现补料分批发酵远高于分批发酵效果,其中依照糖浓度进行补料策略相对脉冲补料方式得到菌体浓度、油脂及 DHA 产量分别提高 69.02%,36.35%和 12.86%^[82],同时能够减少过高的糖浓度对裂殖壶菌发酵过程中的抑制作用。王康等人通过在裂殖壶菌中添加七种化学调节剂,发现添加茉莉酸或萘氧基乙酸能够增加 *Schizochytrium sp. S31* 的脂质积累,而且添加时间也会影响油脂的产生^[81]。

1.2.4 外源添加物在裂殖壶菌中的应用

在裂殖壶菌的发酵中,碳源主要作为菌体生长和和油脂产生的底物,氮源主要作为菌体生长的底物,而裂殖壶菌合成 DHA 的代谢途径需要三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)、NADPH、乙酰辅酶 A 等辅助因子。因此小分子化合物和金属离子越来越多地用于促进或破坏细胞内代谢过程,从而引发特定的表型,诱导油脂积累^[83]。外源添加物通过调节脂质合成途径、调节细胞通透性和诱导氧化应激等方法改善微藻细胞生长和脂质积累。部分化合物对微藻脂质产生的影响如表 1.1 所示。

表 1.1 添加化学物质对微藻脂质产生的影响

Table 1.1 Effects of added chemicals on lipid production in microalgae

化合物	菌体	作用	影响	文献
乙醇胺	<i>S. obliquus</i>	增加乙酰辅酶 A 的供应	脂质产量提高 22%	[84]
EDTA	<i>A. obliquus</i>	促进营养物质的吸收	脂质产量提高 2.18 倍	[85]
芝麻酚	<i>C. cohnii</i>	抑制苹果酸酶活性	DHA 生产率提高 20%	[86]
氨基乙基己酸二乙酯	<i>S. obliquus</i>	调节细胞分裂和扩增	生物量产量增加 2.5 倍	[87]
三乙胺	<i>D. tertiolecta</i>	诱导氧化应激	脂质含量增加 80%	[88]

(1) 调节脂质生物合成途径

改善微藻脂质生物合成前驱体乙酰辅酶 A 和 NADPH 的供应有利于脂质的积累,因此,增强 ATP-柠檬酸裂解酶的活性和降低异柠檬酸脱氢酶的活性,导致柠檬酸裂解更多的乙酰辅酶 A 参与脂质生物合成途径,有利于脂质积累。赵犇等人利用琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂丙二酸添加到培养基中, *Schizochytrium sp.* 脂质产量提高 1.8 倍^[59]; 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCCase) 将乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A, 这是脂肪酸生物合成的第一步和限速步骤, 通过 ACCCase 抑制剂 2,2-二乙氧基苯乙酮胁迫的适应性进化改善 *C. cohnii* 的脂质生物合成^[89]。此外, 通过将碳通量推向脂质合成的策略提高底物的可用性。李志鹏等人通过在裂殖壶菌发酵过程分别添加 21 种苯甲酸衍生物, 探究外源添加物对油脂积累的影响, 其中添加对氨基苯甲酸 (4-Aminobenzoic Acid, PABA) 使得脂质提高了两倍, 通过代谢组学分析发现, PABA 通过增强磷酸戊糖途径促进 NADPH 的产生, 同时减弱三羧酸循环 (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA cycle), 使得最终的代谢途径流向油脂合成^[90]。

(2) 调节细胞通透性

乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA) 通过调节细胞膜的孔隙率来增加细胞通透性, 促进营养物质的吸收^[91]。孙晓明等人通过添加 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄腐酸 (FA) 和 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 使得裂殖壶菌干重达到 $130.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 脂质产生速度达到 $1.16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 干重比未添加组分别提高 36.4%, 油脂产生速度提高三倍^[92]。任鸿宇等人在 *Scenedesmus sp.* R-16 中添加金属离子和 EDTA 使脂质含量和脂质生产率分别提高 28.2% 和 29.7%^[93]。由于 EDTA 的添加量相对较小且有效性高, 这种化学品可以经济地大规模使用。

(3) 诱导氧化应激

越来越多的实验证据表明, 细胞内 ROS 是含油微生物脂质积累的信号^[94], 发现各种压力源会诱导微藻产生脂质。例如 Zalogin 等人发现与氮剥夺相比, 叠氮化物仅导致 *Chlorelladesiccata* 轻微的生长迟缓, 导致油脂产量增加 60-80%^[95]。叠氮化物在 *Chlorella desiccata* 中的作用可能由抑制氮同化和高 ROS 水平诱导的脂质积累。

1.3 氧化应激诱导产油微藻积累 DHA 的研究进展

1.3.1 活性氧与氧化应激

裂殖壶菌产 DHA 的主要途径之一 FAS 途径需要消耗氧气进行, 尽管大部分氧气消耗用于菌体生长及油脂积累, 但是因氧气而产生的活性氧 (ROS) 不可避免。微藻中 ROS 的消除方式主要由酶催化进行, 主要有过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate Peroxidase, APX)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT)。ROS 一直以来被认为会造成蛋白质、脂质及其他生长代谢物损伤, 造成菌体损伤, 然而有研究发现 ROS 除了破坏作用外, 还在细胞信号传导中起到“第二信使”的作用, 特别是对微藻来说, 可以作为油脂积累的重要影响因素^[96, 97]。细胞内 ROS 主要包括超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和过氧自由基 ($\text{LOO}\cdot$), 其中 H_2O_2 是一种非自由基 ROS, 相对稳定, 但可以自由穿过细胞膜^[98], 有证据表明, H_2O_2 是一种基本信号分子, 能够介导各种生理过程^[99]。

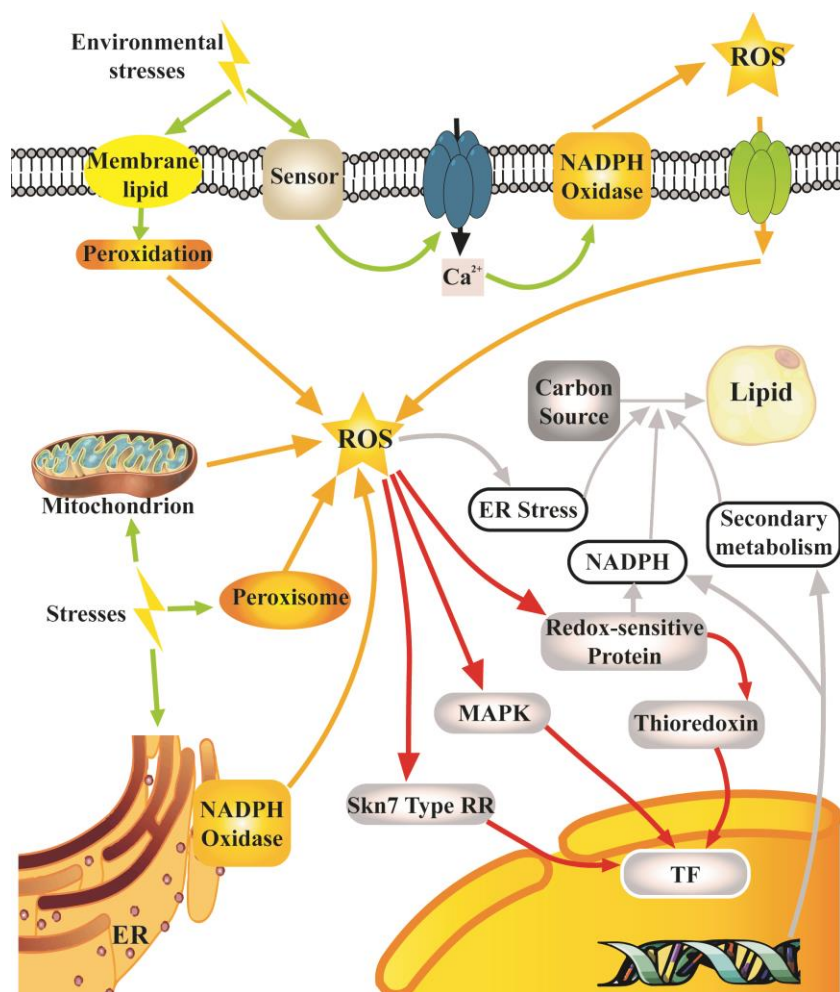


图 1-3 微藻中氧化应激与 ROS 诱导的脂质合成之间的可能联系^[94]

Fig.1-3 Possible relationship between oxidative stress and lipid synthesis induced by reactive oxygen species in microalgae

注：绿色箭头：压力诱导传递；橙色箭头：ROS 生成因素；红色箭头：ROS 信号的传导；灰色箭头：脂质积累；NADPH Oxidase：NADPH 氧化酶；Peroxidation：脂质过氧化；Peroxisome：过氧化物酶；ER：内质网；RR：响应调节器；MAPK：有丝分裂原激活的蛋白激酶；Redox-sensitive Protein：氧化还原敏感蛋白；Thioredoxin：硫氧化蛋白；TF：转录因子

目前针对 ROS 介导脂质积累的机制提出一些假设，首先针对油脂合成中前体的限速步骤，如图 1-2 所示，油脂合成的前体丙二酰辅酶 A 合成需要由乙酰辅酶 A 羧化酶催化乙酰辅酶 A 合成，而乙酰辅酶 A 羧化酶的催化活性和靠近催化活性位点的碳酸氢盐去质子化有关，ROS 中的羟基自由基恰恰可以和碳酸氢盐反应，形成碳酸氢根自由基，因此，羟基自由基有可能影响乙酰辅酶 A 羧化酶活性位点所需的关键步骤，以此来提高乙酰辅酶 A 羧化酶催化活性。这就可能导致在一定的 ROS 水平下提高油脂产量^[100]。

其次，氧化应激引起的脂质积累可能与复杂的 ROS 信号通路有关，如图 1-3 所示，可能在基因表达水平上影响脂质生物合成，例如 ROS 通过诱导 Skn7 响应调节器相关信号调节 AP-1 转录因子；ROS 中 H₂O₂ 诱导的信号传导主要在含硫基团（半胱氨酸残基和硫氧化蛋白），也和丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK）途径中的关键的半胱氨酸硫醇基团有关^[101]。有研究发现，氧化应激能够调节细胞自噬，

并且自噬释放可能有助于脂质合成的碳部分^[102]。

最后,如图 1-3 所示。ROS 是内质网应激的触发因素^[103], 而且有证据发现内质网应激有可能是微藻中脂滴形成的激活剂, 因此, 这有可能是 ROS 诱导脂滴形成的一种可能的机制^[104]。

1.3.2 调控氧化应激诱导微藻脂质积累的策略

虽然过量的氧化应激会导致微藻受到氧化损伤, 但是一定量的氧化应激对微藻内油脂积累有积极意义。有研究通过盐度、光照、温度、氮限制、氧气等不同压力诱导下, 氧化应激导致的产油微藻或真菌中 ROS 生成及油脂积累的关联和影响, 相关研究如下表 1.2 所示。

也有研究关于通过外源添加 H₂O₂ 或者催化 ROS 产生的金属离子来提高微藻中油脂产量, 例如 Kaan Yilancioglu 等人发现通过外源添加 H₂O₂ 使得一种新发现的杜氏盐藻油脂含量提高 44%^[105]; Nam Kyu Kang 等人发现利用二氧化钛纳米分子诱导的氧化应激能够提高小球藻的油脂生产能力^[106]。

表 1.2 不同产油微生物在应激诱导下油脂积累和 ROS 生成

Table 1.3 Oil accumulation and ROS generation of different oil-producing microorganisms under stress induction

产油微生物	油脂积累的压力限制及作用	ROS 生成	文献
<i>Scenedesmus</i> sp.	在盐度胁迫 (400 mmol·L ⁻¹ NaCl) 下积累 33% 的脂质。	随 NaCl 浓度的增加 H ₂ O ₂ , MDA 和脯氨酸含量而增加。	[107]
<i>Chlorella</i> sp. and <i>Monoraphidium</i> sp.	在高光照下, 碳消耗从蛋白质和碳水化合物转化为脂质。中性脂质生产力显著提高。	随着脂质积累的增加, ROS 清除酶也增加。	[107]
<i>Scenedesmus</i> sp.	低温下微藻中脂质含量增加。	低温下 ROS 水平更高。	[108]
<i>Dunaliella salina</i>	氮限制下脂质含量增加 35%。	MDA、CAT、APX 和 SOD 增高	[105]
<i>Nitzschia closterium</i> f. <i>minutissima</i>	氮浓度在 712、491、270 和 159 μmol·L ⁻¹ 时, 中性脂质增加 48、111、171 和 216%。	细胞间 ROS 在低氮胁迫下增强。	[109]
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	氮限制条件下产生的脂质含量为 30%	氮限制导致 ROS 的积累。	[110]
<i>Mucor circinelloides</i>	氮耗尽后, 脂质的产生速度加快。	一些参与信号转导和氧化还原稳态的蛋白质在氮耗竭时上调。	[111]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	总脂质和中性脂质含量在缺氮条件下表现出最显著的增加。	氮限制导致 ROS 和脂质积累的同时出现。	[112]

1.4 立题依据及研究内容

1.4.2 研究目的及意义

裂殖壶菌是一种富含 DHA 的海洋微藻，具有生长速度快、发酵周期短、菌种性状稳定等优点。如今人们越来越关注健康的多不饱和脂肪酸，藻油 DHA 相对于鱼油 DHA 产量和质量更加稳定，更有利于人体使用。裂殖壶菌也成为生产 DHA 藻油的重要菌株。氧化应激已经被证明是产油微藻提高油脂产量及油脂含量的有效途径^[96,97]。目前调控氧化应激方式主要通过改变发酵条件及添加外源诱导物，通过改变环境条件对裂殖壶菌生物量影响较大，因此通过 H_2O_2 及部分金属离子外源添加，诱导裂殖壶菌氧化应激，以此来提高 DHA 产量。在 GB2760-2014《食品添加剂使用标准》中，在附录 C 食品工业用加工助剂中规定了食品级 H_2O_2 使用标准，可在各类食品加工过程中使用，残留量不需限定。各类金属离子添加剂参照 GB2762-2012《食品中污染物限量》规定。裂殖壶菌产油属于胞内产物，食品级 H_2O_2 可以作为食品添加助剂应用于发酵过程中。目前，关于在裂殖壶菌中添加外源添加物来诱导氧化应激提高 DHA 产量的方法鲜有报道，本文通过裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量综合选择外源添加物添加种类、添加量及添加时间，探究外源添加物对裂殖壶菌油脂和 DHA 积累的可能性，为提高裂殖壶菌 DHA 产量提供一种新思路。

1.4.3 研究内容

本文的研究内容主要包括：

1.探究五种外源添加物过氧化氢 (H_2O_2)、氯化锌 ($ZnCl_2$)、硫酸铜 ($CuSO_4$)、氯化铬 ($CrCl_2$)、硝酸银 ($AgNO_3$) 对裂殖壶菌生长、油脂产量及 DHA 产量的影响。并对提高裂殖壶菌 DHA 含量及产量的外源添加物进行下一步添加量及添加时间的研究，进一步提高裂殖壶菌 DHA 产量。

2.结合裂殖壶菌发酵进程分析；发酵过程中抗氧化能力：ROS、类胡萝卜素分析；发酵过程中碳流向：蛋白质、多糖含量分析。探究 H_2O_2 诱导产生的 ROS 对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量的不同影响。

3.根据现有裂殖壶菌发酵策略，进行裂殖壶菌培养过程的动力学模型构建，包含菌体生长、油脂产出、葡萄糖消耗动力学模型。研究通过添加 H_2O_2 对裂殖壶菌分批发酵产 DHA 的影响，并为进一步的规模放大提供依据。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种

模式菌株：裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp.S31，保藏号为 ATCC20888（美国模式培养物集存库）。

2.1.2 培养基

固体培养基：1 g·L⁻¹ 酵母粉，5 g·L⁻¹ 葡萄糖，1 g·L⁻¹ 胰蛋白胨，17.5 g·L⁻¹ 海水晶，20 g·L⁻¹ 琼脂。121°C 灭菌 20 min。

种子培养基：5 g·L⁻¹ 酵母粉，30 g·L⁻¹ 葡萄糖，15 g·L⁻¹ 海水晶，10 g·L⁻¹ 胰蛋白胨，0.05 g·L⁻¹ VB₆，0.0005 g·L⁻¹ VB₁₂，0.05 g·L⁻¹ VB₁。115°C 灭菌 20 min。

发酵培养基：20 g·L⁻¹ 谷氨酸钠，5.6 g·L⁻¹ 胰蛋白胨，100 g·L⁻¹ 葡萄糖，2.5 g·L⁻¹ 磷酸二氢钾，7.2 g·L⁻¹ 硫酸镁，12.8 g·L⁻¹ 硫酸钠，0.4 g·L⁻¹ 氯化钙，17.5 g·L⁻¹ 海水晶，0.1 g·L⁻¹ VB₆，0.001 g·L⁻¹ VB₁₂，0.1 g·L⁻¹ VB₁。115°C 灭菌 20 min。

培养基中的维生素（VB₁、VB₆、VB₁₂）分别配制成溶液后，通过 0.22 μm 水膜过滤方可使用，使用时根据添加量添加

发酵培养基中的葡萄糖配成母液，浓度为 1000 g·L⁻¹，单独灭菌，在接种发酵培养基时根据浓度添加。

2.1.3 培养条件

菌种保藏：将需要转接的裂殖壶菌在固体培养基上进行培养，一般需要在 30°C 条件下培养 4 天，直到长出单菌落。然后，用接种环将单菌落刮下，并将其混合在 20% 甘油溶液中，分装至甘油管中，然后置于 -80°C 冰箱中保存。

菌体活化：从 -80°C 冰箱中取出保存的甘油管裂殖壶菌，在超净工作台中按照 1% 的接种量接种于种子培养基中，将种子培养基在 28°C，200 r·min⁻¹ 条件下培养，2 天后，根据种子液的吸光度将种子液稀释，稀释至 OD₅₉₅ 为 0.6-0.7，取稀释液 100 μL 均匀涂布在固体培养基中，在细胞培养箱中 30°C 培养 4 天，待长出单菌落后，挑取其中完好的单菌落转接至固体培养基中，用上述条件培养至长出单菌落，置于 4°C 冰箱备用。

种子培养：用接种环将活化好的固体培养基上的单菌落挑取，接种到 50 mL 的种子培养基中，在摇床中 200 r·min⁻¹，28°C 的条件下培养 2 天。将前一代种子液按照 10% 的接种量转接，并相同方法培养，直至 3 代，第 3 代种子液用于发酵培养。

发酵罐分批发酵：在 7.5 L 发酵罐中加入 3 L 的发酵培养基，经过实消后，按照体积浓度 10% 的接种量，将无杂菌的二级种子液接入到 7.5 L 发酵罐中，同时加入 210 mL 1 g·L⁻¹ 的葡萄糖溶液。接入菌体后转速为 400 rpm，通气量调为 3 V·V⁻¹·min⁻¹，温度恒定 28°C。每隔 12 h 取样测生物量与葡萄糖浓度。样品冻干后测油脂含量与 DHA 含量。

2.2 主要仪器与试剂

2.2.1 主要仪器

实验所需要用的主要仪器如表 2.1 所示。

表 2.1 主要仪器及其来源
Table 2.1 Main equipments and their sources

主要仪器	生产厂家	型号
台式高速冷冻离心机	德国 Sigma 公司	3K-15
高效液相色谱仪	美国安捷伦公司	Agilent 1100
真空干燥烘箱	嘉兴市龙祥实验设备有限公司	DNP-9052
分析电子天平	上海精宏实验设备有限公司	FA1004
pH 计	瑞士梅特勒托利多公司	FE28
循环水真空泵	巩义市予华仪器有限责任公司	SHZ-DIII
生物传感分析仪	山东省科学院生物研究所	SBA-40E
数显恒温水浴锅	天津科诺仪器设备有限公司	HH-WO
光吸收全波长酶标仪	上海闪谱生物科技有限公司	ReadMax 1500
全温摇瓶柜	太仓强乐实验设备有限公司	HYL-A
7.5 L 发酵罐	美国 NBS 公司	NBS110
气相色谱仪	日本岛津公司	Shimadzu GC-2010
超净工作台	南京百思禾生物科技有限公司	SW-CJ-2D
激光共聚焦显微镜	德国徕卡微系统有限公司	TCS SP8

2.2.2 主要试剂

实验所需要用的主要试剂如表 2.2 所示。

表 2.2 主要试剂及来源
Table 2.2 Main reagents and their sources

主要试剂	生产厂家
14% 三氟化硼-甲醇	安谱实验科技股份有限公司
甲醇	国药集团化学试剂有限公司
二甲亚砜	国药集团化学试剂有限公司
正己烷	国药集团化学试剂有限公司
脂肪酸标品	安谱实验科技股份有限公司
活性氧检测试剂盒	碧云天生物技术有限公司
葱酮	国药集团化学试剂有限公司
尼罗红	生物工程股份有限公司
考马斯亮蓝 G-250	国药集团化学试剂有限公司
酵母粉	赛默飞世尔科技公司
胰蛋白胨	赛默飞世尔科技公司
海水晶	浙江蓝海星盐制品有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 生物量测定与生化检测方法

取10 mL裂殖壶菌发酵液于15 mL离心管中，使用高速冷冻离心机在8000 r·min⁻¹离心15 min，弃上清并用双蒸水洗涤沉淀两次，并同样条件离心，将残余培养基除尽。冷冻干燥至衡中，称取干燥菌体的干重，生物量（DCW）的计算公式如式2.1所示：

$$DCW (g \cdot L^{-1}) = \frac{\text{菌体干重} (m) \times 1000}{\text{发酵液体积} (V)} \quad (2.1)$$

检测发酵液中残留的氮和葡萄糖：将发酵液稀释合适倍数后通过生物传感分析仪检测。

2.3.2 激光共聚焦显微镜结构观察

取2 mL裂殖壶菌发酵液于离心管中，3000 r·min⁻¹离心后使用0.1 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液（pH 7.2）慢洗涤菌体两次，使用0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液重悬菌体并稀释一定倍数。取1.5 mL重悬液于2 mL离心管中，添加15 μL尼罗红染色液（0.75 g·L⁻¹）和250 μL二甲亚砜，在避光条件下37°C水浴锅中染色30 min。取2 μL染色液制片后，利用CLSM，在480 nm激发波长，检测580 nm发射光波长，观察裂殖壶菌细胞形态与细胞内油脂状态。

2.3.3 油脂提取与含油量测定

油脂的提取采用酸热破壁与正己烷提取法，具体方法如下：精确称量0.2 g（m₁）之前冷冻干燥的裂殖壶菌藻粉于15 mL离心管中，在离心管中加入1 mL去离子水和2 mL浓盐酸，在水浴锅中以70-80°C水浴热反应1 h，每10 min震荡离心管一次。冷却后加2 mL正己烷与0.8 mL无水乙醇，充分混匀离心管，萃取反应液中的油脂，然后将离心管在3000 r·min⁻¹条件下离心2 min，收集正己烷层（上层）于已知重量的旋转瓶（m₂）中，在65°C条件下水浴加热中，使用真空旋转蒸发仪旋蒸15 min，至观察到溶液中正己烷完全蒸发，取出旋蒸瓶擦干后准确称重（m₃）。油脂含量V_L、含油量（c）及油脂产量（P_L）计算公式分别如式2.2、式2.3、式2.4所示：

$$c = \frac{m_3(g) - m_2(g)}{m_1(g)} \times 100\% \quad (2.2)$$

$$P_L (g \cdot L^{-1}) = DCW (g \cdot L^{-1}) \times c \quad (2.3)$$

$$V_L (g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}) = P_L (g \cdot L^{-1}) \div \text{时间} t (h) \quad (2.4)$$

2.3.4 脂肪酸甲酯化

脂肪酸含量测定用内标法，使用气相色谱（Gas chromatography, GC）测定，具体方法如下：在具塞试管中，分别加入15 μL称重好的油脂样品和15 μL十九烷酸（C19:0）内标物5 mg·mL⁻¹，其中加入2 mL 0.5 mol·L⁻¹的NaOH-甲醇溶液，震荡均匀，65°C恒温水浴，反应1 h，油脂完全溶解，拿出后冷却5 min，至室温后加入2 mL 25%的BF₃-CH₃OH溶液，混合均匀，将试管置入65°C恒温水浴锅中酯化20 min，待冷却至室温后。再在其

中加入正己烷2 mL，震荡混匀后静置3 min，再加入试管中2 mL饱和NaCl溶液，再次震荡2 min，静置3 min后溶液两相分层明显，甲酯化结束。取1.5 mL上层有机相溶液于2 mL离心管中，加入无水硫酸钠少量以去除有机相中微量的水，混匀后静置10 min，用1 mL注射器吸取，用有机滤膜过滤后注入进样瓶中保存，使用气相色谱测定DHA含量。

2.3.5 气相色谱条件与 DHA 分析

用气相色谱仪（Shimadzu GC-2010，岛津，日本）进行气相色谱分析，使用极性气相柱，具体气相条件及方法参考秦宇等人气相方法^[77]。

具体GC条件：进样口温度为250°C，进样量为1 μL，不分流进样；检测器温度为250°C，以N₂为载气，维持初始柱温2 min后，以10°C·min⁻¹的速度升温至180°C，再以4°C·min⁻¹的速度升温至240°C，并维持8 min。

2.3.6 细胞内 ROS 的测定

使用 DCFH-DA 的氧化敏感指示剂的方法测定细胞内 ROS 水平。该探针不是原始形式的荧光，可以自由穿过细胞膜。进入活细胞，从形成 DCFH 的指示剂中去除两个乙酸基团（DA），DCFH 仍然没有荧光。在 ROS 存在下，DCFH 被氧化成荧光 2',7'-二氯荧光素（DCF），可通过荧光法测量。

将 1 mL 菌体离心后弃上清液，并用 1 mL PBS 缓冲液清洗菌体两次，重悬于 1 mL PBS 缓冲液中，加入 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA，在 30°C 下孵育 37 min，孵育结束后用 PBS 洗涤培养基中过量的指示剂。使用荧光分光光度计在 485 nm 的激发波长和 530 nm 的发射波长下测量荧光强度^[108]。

2.3.7 类胡萝卜素含量测定

准确称取 0.1 g 干燥的裂殖壶菌藻粉于 15 mL 离心管中，加入 4 mL 3 mol·L⁻¹ 的 HCl，室温震荡 30 min 充分混匀，沸水浴水浴加热 4 min，在冰中迅速冷却，在 4000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min 去除 HCl，并使用蒸馏水洗涤菌体两次并离心，在沉淀中加入 4 mL 丙酮溶液，常温下震荡溶液 30 min 充分萃取类胡萝卜素，在 4000 r·min⁻¹ 条件下离心，直至菌体没有颜色。所得上清液为类胡萝卜素提取液，类胡萝卜素含量计算公式如式 2.5 所示^[113]：

$$\text{类胡萝卜素含量} (\mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{biomass}^{-1}) = \frac{A_{475} \times D \times V}{0.16 \times W} \quad (2.5)$$

其中，A₄₇₅ 为类胡萝卜素提取液在 475 nm 处的吸光度；D 是稀释倍数；V 是类胡萝卜素提取液的体积；0.16 为消光系数；W 为裂殖壶菌藻粉重量

2.3.8 蛋白质与多糖测定

(1) 样品处理

准确称取 0.05 g 裂殖壶菌藻粉于 15 mL 离心管中，加入 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 5 mL，在沸水浴中水浴 5 mL。冷却后在 10000 r·min⁻¹ 条件下离心 6 min，收集上清液；再向沉淀中加入 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 5 mL，重复之前操作，制作被测样品：将两次

的上清液混合。

(2) 蛋白质测定

蛋白质的测定采用考马斯亮蓝比色法^[114]进行检测,将待测样品稀释至合适浓度,在96孔板中分别加入20 μ L样品与200 μ L,震荡30s,在室温中反应5min,在595nm处测定吸光度。

(3) 多糖测定

多糖的测定使用蒽酮-硫酸比色法^[115]进行检测,取上述被测样品2mL,加入浓度为1g \cdot L⁻¹的蒽酮溶液6mL,混合均匀后在沸水浴中加热15min,冷却后在625nm处测定吸光度。

第三章 结果与讨论

3.1 不同外源添加物对裂殖壶菌生长及 DHA 积累的影响

3.1.1 外源添加物对裂殖壶菌 DHA 产量的影响

铁、铜、铬、锌、银等微量元素参与微藻中细胞分裂、呼吸、运输、蛋白质和脂质生物合成等生理过程。 H_2O_2 与微量元素离子都会诱导裂殖壶菌产生活性氧 (ROS), ROS 能够促进裂殖壶菌油脂和 DHA 的产生, 但 ROS 会产生细胞毒性, 延缓裂殖壶菌生长 [105, 116, 117], 因此探究外源添加物的条件至关重要。

在裂殖壶菌发酵过程中分别添加 H_2O_2 、 $ZnCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $CrCl_2$ 、 $AgNO_3$, 添加浓度分别为 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。如图 3-1 所示, 裂殖壶菌在未添加外源添加物时生物量达到 $27.13\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 油脂产量为 $10.76\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, DHA 产量为 $2.57\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当外源添加 $CuSO_4$ 、 $CrCl_2$ 、 $AgNO_3$ 时, 裂殖壶菌的生物量、油脂产量和 DHA 产量明显降低; 外源添加 H_2O_2 、 $ZnCl_2$ 时裂殖壶菌生物量及油脂产量下降, 但是 DHA 产量有所提高。外源添加 H_2O_2 时 DHA 产量达到 $2.87\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 与对照组相比 DHA 产量提高 11.67%; 当外源添加 $ZnCl_2$ 时 DHA 产量为 $2.66\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 提高 3.45%, 表明添加适量浓度的 H_2O_2 和 $ZnCl_2$ 有利于裂殖壶菌积累 DHA。添加外源添加物后裂殖壶菌生物量明显降低, 可能由于添加浓度过高而诱导产生过量的 ROS 所导致。

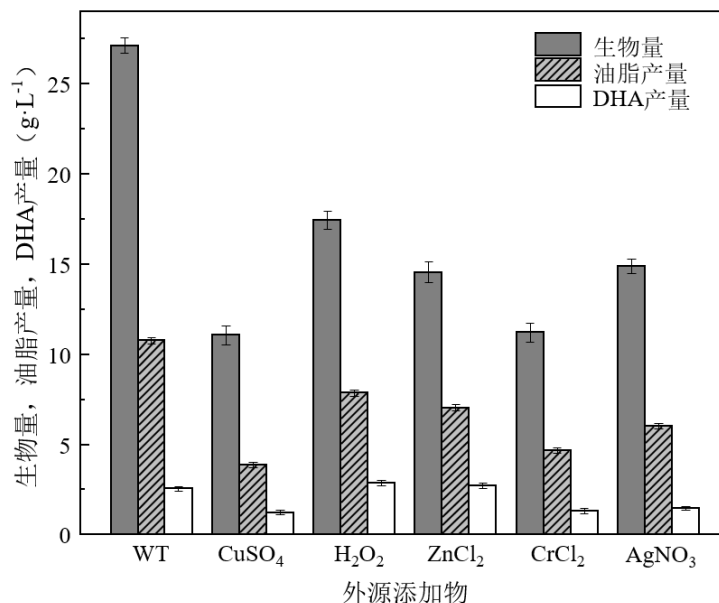


图 3-1 不同外源添加物对裂殖壶菌生物量、油脂产量及 DHA 产量影响

Fig.3-1 Effect of different exogenous additions on biomass, oil and oil production and DHA production of *Schizochytrium* sp

如图 3-2 所示, 在外源添加金属离子与 H_2O_2 时, 裂殖壶菌中油脂含量及油脂中 DHA 含量得到显著提升, 其中添加 H_2O_2 和 $ZnCl_2$ 后提升最显著, 外源添加 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $ZnCl_2$ 时裂殖壶菌中油脂含量及 DHA 含量分别为 48.43%和 38.42%, 相较于对照组分别提高 22.14%和 60.48%; 外源添加 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 时裂殖壶菌中油脂含量及 DHA 含量分别

为 45.11% 和 36.53%，相较于对照组分别提高 13.77% 和 52.59%。结果表明，外源添加物可以优化裂殖壶菌中油脂分布，为高效提取纯化 DHA 藻油提供参考。

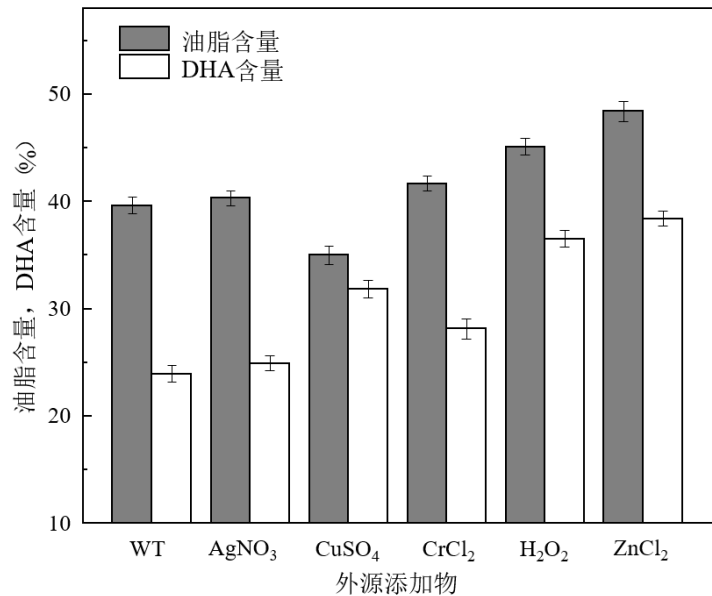


图 3-2 不同外源添加物对裂殖壶菌中油脂含量及油脂中 DHA 含量影响

Fig.3-2 Effect of different exogenous additions on oil content and DHA content in the oil of *Schizochytrium* sp.

综上，尽管 CuSO₄、CrCl₂、AgNO₃ 能提高裂殖壶菌油脂含量以及油脂中 DHA 含量，但这三种外源添加物抑制裂殖壶菌生长，导致最终油脂产量和 DHA 产量降低。外源添加 H₂O₂ 和 ZnCl₂ 对裂殖壶菌菌体生长影响较小（图 3-1），DHA 产量分别达到 2.87 g·L⁻¹ 和 2.66 g·L⁻¹，分别提高 11.67% 和 3.45%。通过优化 H₂O₂ 和 ZnCl₂ 添加浓度进一步降低外源添加物对裂殖壶菌生长的影响，提高 DHA 产量。

3.1.2 不同浓度 ZnCl₂ 对裂殖壶菌生长水平影响

裂殖壶菌 DHA 产量受菌体量，油脂含量以及油脂中 DHA 含量的影响。利用金属离子与 H₂O₂ 产生的 ROS 诱导油脂及 DHA 的形成，以提高油脂含量和 DHA 含量，然而随着 H₂O₂ 添加浓度的增加，ROS 导致的细胞毒性会严重影响裂殖壶菌的生长，因此应在尽可能减少 ROS 导致菌体生物量下降的前提下提高 DHA 产量。锌离子是藻类中代谢相关酶类的组成成分，如碳酸酐酶是一种含锌金属酶，与吸收和利用碳源有关^[118]。不同浓度 ZnCl₂ (0 μmol·L⁻¹, 5 μmol·L⁻¹, 10 μmol·L⁻¹, 15 μmol·L⁻¹, 20 μmol·L⁻¹, 25 μmol·L⁻¹) 对裂殖壶菌生长及 DHA 产量的影响如图 3-3 所示。

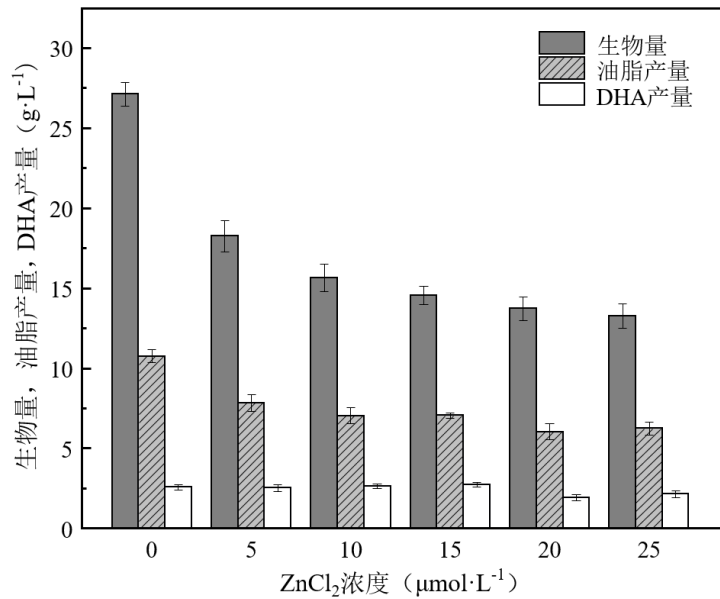


图 3-3 ZnCl₂ 浓度对裂殖壶菌生长，油脂产量与 DHA 产量影响

Fig.3-3 Effect of ZnCl₂ concentration on growth, oil yield and DHA yield of *Schizochytrium* sp.

裂殖壶菌生物量和油脂产量随 ZnCl₂ 添加浓度的升高而减少。添加 5 μmol·L⁻¹ ZnCl₂ 时菌体生物量和油脂产量达到最大，分别为 18.26 g·L⁻¹ 和 7.85 g·L⁻¹；ZnCl₂ 浓度为 0-15 μmol·L⁻¹ 时，DHA 产量呈上升趋势，ZnCl₂ 浓度为 15-25 μmol·L⁻¹ 时，DHA 产量呈下降趋势，当添加 15 μmol·L⁻¹ ZnCl₂ 时 DHA 产量达到最大，达到 2.71 g·L⁻¹，相较于对照组裂殖壶菌 DHA 产量提高 5.45%。

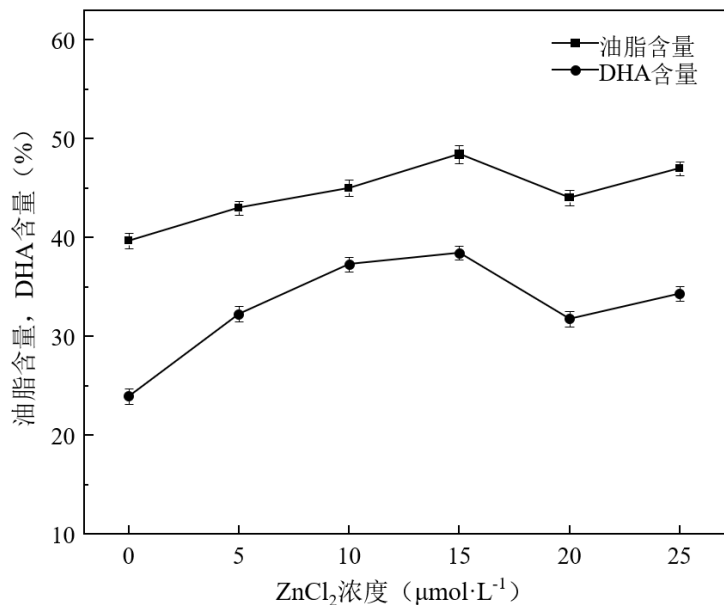


图 3-4 ZnCl₂ 浓度对裂殖壶菌中油脂含量及油脂中 DHA 含量影响

Fig.3-4 Effect of ZnCl₂ concentration on oil content and DHA content in the oil of *Schizochytrium* sp.

如图 3-4 所示，与未添加 ZnCl₂ 相比，ZnCl₂ 浓度从 0 μmol·L⁻¹ 增加至 15 μmol·L⁻¹ 时，DHA 含量和油脂含量呈上升趋势，随着添加浓度的增高，DHA 含量和油脂含量出现下降趋势。添加 15 μmol·L⁻¹ ZnCl₂ 时，油脂含量及 DHA 含量达到最高，分别为 48.43% 和 38.42%，相较于对照组分别提高 22.14% 和 60.48%，显著提高。因此 ZnCl₂ 最佳添加浓度为 15 μmol·L⁻¹。

3.1.3 不同浓度 H_2O_2 对裂殖壶菌 DHA 产量的影响

H_2O_2 诱导的 ROS 在细胞信号传导中起到“第二信使”的作用，特别是对于微藻来说，可以作为油脂积累的重要影响因素^[96,97]。不同浓度 H_2O_2 ($0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $4.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对裂殖壶菌生长及 DHA 产量的影响如图 3-5 所示。随着 H_2O_2 浓度增加，裂殖壶菌生物量及油脂产量随之下降，当 H_2O_2 浓度大于 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，生物量及油脂产量快速下降。当 H_2O_2 添加浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，裂殖壶菌的生物量及油脂产量最高，分别为 $22.14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，相较于未添加 H_2O_2 时，分别下降 18.40% 和 5.67% 。 H_2O_2 浓度由 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加至 $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，裂殖壶菌 DHA 产量呈现上升趋势， H_2O_2 浓度高于 $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，裂殖壶菌 DHA 产量随之下降，当 H_2O_2 添加浓度为 $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，裂殖壶菌的 DHA 产量达到最高，为 $3.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，相较于未添加 H_2O_2 时提高 23.34% 。这表明添加 H_2O_2 对提升裂殖壶菌 DHA 产量有较为积极的作用。

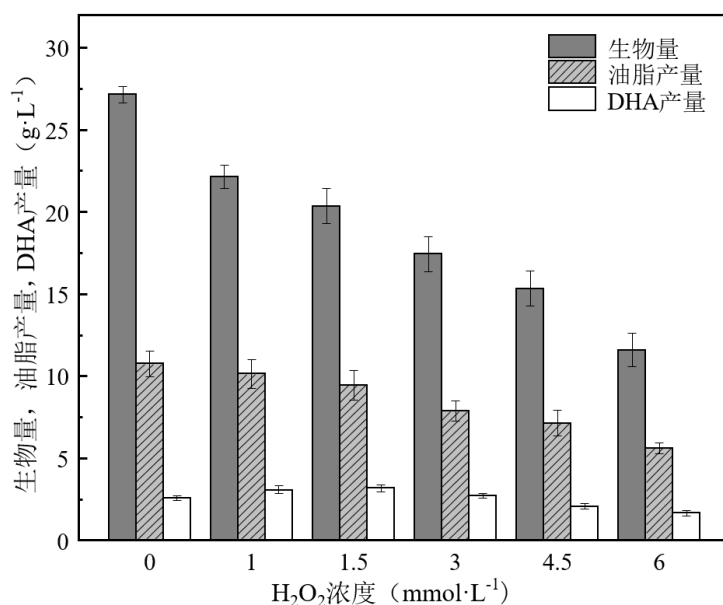


图 3-5 H_2O_2 浓度对裂殖壶菌生长，油脂产量及 DHA 产量的影响

Fig.3-5 Effect of H_2O_2 concentration on growth, oil yield and DHA yield of *Schizochytrium* sp.

H_2O_2 浓度对裂殖壶菌形态及油脂形态影响如图 3-6 所示。未添加 H_2O_2 的对照组中，油脂含量相对较少，细胞碎片数量极少，当 H_2O_2 添加浓度为 $1-1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，菌体中油脂饱满，但有少量细胞碎片，随着 H_2O_2 添加浓度的增加，裂殖壶菌中油脂更加饱满，但裂殖壶菌中细胞碎片的数量显著增加，这是导致裂殖壶菌生物量下降的原因。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/926005141003010054>