

EMS-ARTP 复合诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌

Enhancement of docosahexaenoic acid production in *Schizochytrium* sp. 31 combining Ethylmethanethiosulfone and Atmospheric and Room Temperature Plasma treatment

赵 犇¹ 王 武¹ 李昌灵² 杨海麟¹

ZHAO Ben¹ WANG Wu¹ LI Chang-ling² YANG Hai-lin¹

(1. 江南大学生物工程学院教育部工业微生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 怀化学院生物与食品工程学院, 湖南 怀化 418000)

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. College of Biological and Food Engineering, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418000, China)

摘要:为确定一种高效、稳定的选育高产 DHA 裂殖壶菌菌株的方法,将出发菌株 *Schizochytrium* sp. 31 进行甲基磺酸乙酯(EMS)诱变和常压室温等离子体(ARTP)复合诱变,并将复合诱变方法与 2 种单因子诱变方法进行诱变效率、诱变后高产株发酵特性及遗传稳定性比较。结果显示,该复合诱变正突变率达到 32.2%,远高于 2 种单因子诱变方法;复合诱变选育得到高产 DHA 裂殖壶菌菌株,其 DHA 生产能力和 DHA 含量分别达到 7.2 g/L 和 43.2%,比出发菌株分别高 35.6% 和 19.2%;经过 5 代培养,其发酵指标稳定,遗传稳定性优于单因子诱变获得的菌株。该复合诱变方法是选育高产 DHA 裂殖壶菌菌株的有效手段,也为其它产多不饱和脂肪酸菌株的选育提供了参考。

关键词:裂殖壶菌;DHA;诱变;常压室温等离子体(ARTP);甲基磺酸乙酯(EMS);复合诱变

Abstract: For establishing an efficient and stable mutagenesis method on breeding *Schizochytrium* DHA higher producers, the wild-type strain named *Schizochytrium* sp. 31 was mutated combining Ethylmethanethiosulfone (EMS) and Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) treatment. Mutagenic efficiency, fermentation inde-

xes of the mutants were compared and analyzed. Under this compound mutagenesis method, the positive mutation rate reached 32.2%, which was much higher than that under other two single-factor mutagenesis methods. Besides, DHA production and DHA percentage in total fatty acids reached to 7.2 g/L and 43.2%, which were 35.6% and 19.2% higher than that of the wild-type strain, respectively. After five rounds of cell culture passages, mutants induced from compound mutagenesis method showed up with better genetic stability. This mutagenesis method was proved to be an efficient strategy of breeding *Schizochytrium* DHA higher producers. It also provided references to the breeding practices on the algal higher producers for synthesizing other types of polyunsaturated fatty acids.
Keywords: *Schizochytrium*; docosahexaenoic acid; mutagenesis; atmospheric and room temperature plasma; ethyl methanesulfonate; compound mutagenesis

随着世界范围内能源和资源的日益紧张,可再生能源与资源的研究与开发已成为关注热点。近几年,各国纷纷开始在微藻生物燃料和营养化学品领域谋求突破与发展:美国能源部宣布将投资 1 800 万美元用于藻类生物燃料与生物基产品研究;欧盟也积极投资藻类研究,旨在示范从藻种选育、培养条件优化、油脂提取、生物燃料生产等过程^[1]。微藻在食品资源方面的利用涉及到裂殖壶菌,又称裂壶藻,是属于破囊壶菌科的单细胞海洋微藻,在一定的培养条件下,裂殖壶菌胞内油脂中二十二碳六烯酸(DHA, C_{22:6})含量较高,是值得研究和深度开发的生物合成 DHA 的优质种源^[2]。

DHA 为 ω -3 多不饱和脂肪酸,是一种重要的食品添加剂。它是大脑和视网膜的重要组成成分,还具有抗癌、消炎、

基金项目:国家“863”计划(编号:2014AA021702);江苏省 2014 年度普通高校研究生科研创新计划项目(编号:KYLX_1148);工业生物技术教育部重点实验室 2016 年度开放课题(编号:KLIB-KF201601);“111”计划(编号:111-2-06)

作者简介:赵犇,男,江南大学在读博士研究生。

通信作者:王武(1952—),女,江南大学教授,硕士。

E-mail: wangwu@jiangnan.edu.cn

杨海麟(1971—),男,江南大学教授,博士。

E-mail: 19891996@sina.com

收稿日期:2017-12-10

预防心血管疾病等诸多功能^[3-4],其保健和医疗功效越来越受到重视。与传统的深海鱼油生产 DHA 的方式相比,裂殖壶菌发酵生产 DHA 具有培养简单、无季节波动、目的产物含量比高、无污染、无鱼腥味、成本低、不影响海洋生态等优点^[5],裂殖壶菌发酵生产 DHA 开始进入了工业化阶段^[6]。

近些年,不断见到优化裂殖壶菌发酵,提高 DHA 产量的研究报道,如发酵培养基优化^[7-9]、pH 调控^[10-11]、溶氧调控^[12-14]、补料策略优化^[15]等,靠传统发酵策略提高 DHA 的发酵生产强度的余地越来越小。而借助遗传育种手段,培育高产 DHA 的裂殖壶菌变异株仍有一定的发展空间,这也是发酵法提高 DHA 生产强度的上游基础。

裂殖壶菌基因组约 39 Mb^[16],且裂殖壶菌代谢体系中脂肪酸合成途径复杂,既存在短链饱和脂肪酸的脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)合成途径,又存在长链不饱和脂肪酸的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)的合成通路^[17]。尽管基因工程已普遍应用于微生物育种,并且在裂殖壶菌上也有所研究^[18-19],但考虑到裂殖壶菌复杂的遗传背景和尚不十分明晰的 DHA 合成途径,物理和化学诱变仍旧是可以考虑的选择。

甲基磺酸乙酯(EMS)诱变为化学诱变,其作用机制是对 DNA 上高密度的碱基进行烷化作用,形成转换型或置换型突变^[20]。目前 EMS 诱变在微生物育种以及农作物的优良品种选育上广泛应用,并获得了不错的效果^[21-22]。常压室等离子体(ARTP)是一种新型的诱变技术,它利用大气辉光放电,产生多种活性粒子,作用于 DNA 上,引发基因突变^[23],它具有操作简单、可控性强、诱变效果好的特点,已逐步开始在科研与工业领域发挥重要作用^[24]。由于单种诱变方法往往会使菌种产生抗性,或得到的诱变菌株性能不够稳定,在实际应用中往往采用 2 种或多种诱变方式相结合的方法进行诱变,即复合诱变^[25]。

裂殖壶菌具有多层的细胞壁结构保护着胞内物质^[26],DHA 的合成途径与代谢机制又十分复杂。以往针对裂殖壶菌的育种手段往往采用单一的诱变方法,这会产生诱变效果差、诱变效率低或诱变菌株性能不稳定、易退化等问题,如吕晓义等^[27]仅仅利用⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变裂殖壶菌,获得的诱变菌产量只有 5.65 g/L;梁园梅等^[28]采用单一 UV 诱变育种,获得的诱变菌株性能也没有突出的提升。欲获得性状良好、遗传稳定的裂殖壶菌高产 DHA 变异株,本研究将 EMS-ARTP 复合诱变方法应用于裂殖壶菌诱变育种,以期获得裂殖壶菌高产 DHA 诱变菌。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

菌株:裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp. S31, ATCC 20888),美国菌种保藏中心;

脂肪酸:标准品,美国 Sigma 公司;

正己烷:HPLC 级,美国 Fisher 公司;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

离心机:3K15 型,德国 Sigma 公司;

分光光度计:T6 新世纪型,北京普禧通用仪器有限公司;

ARTP 诱变仪:ARTP-III 型,北京思清源生物科技有限公司;

气相色谱仪:GC-2010 型,日本岛津公司。

1.1.3 培养基

790 By+固体培养基:葡萄糖 5 g/L、胰蛋白胨 1 g/L、酵母粉 1 g/L、琼脂 20 g/L、海水晶 17.5 g/L,121 °C 灭菌 20 min;

种子培养基:葡萄糖 30 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、海水晶 15 g/L、V_{B1} 0.05 g/L、V_{B6} 0.05 g/L、V_{B12} 0.000 5 g/L,115 °C 灭菌 20 min;

发酵培养基:葡萄糖 100 g/L、胰蛋白胨 5.6 g/L、谷氨酸钠 20 g/L、磷酸二氢钾 2.5 g/L、硫酸镁 7.2 g/L、硫酸钠 12.8 g/L、氯化钙 0.4 g/L、海水晶 17.5 g/L、V_{B1} 0.1 g/L、V_{B6} 0.1 g/L、V_{B12} 0.001 g/L,115 °C 灭菌 20 min;

0.2 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2):用双蒸水分别溶解 24.00 g 磷酸二氢钠和 28.39 g 磷酸氢二钠至 1 000 mL,然后混合 280 mL 磷酸二氢钠溶液和 720 mL 磷酸氢二钠溶液,121 °C 灭菌 20 min,备用;

EMS 溶液:取 5 mL EMS 原液,加入到 15 mL 预冷的乙醇溶液中,加盖并轻轻转动试管混合均匀。

1.2 方法

1.2.1 裂殖壶菌诱变菌株制备

(1) 菌悬液制备:将裂殖壶菌接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中,28 °C、200 r/min 培养 2 d。取 1 mL 培养液 3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后稀释至 OD₅₄₀ 为 0.6~0.7(以 PBS 缓冲液为参比管)。

(2) EMS 诱变株制备:在 10 mL 菌悬液中加入 400 μ L EMS 溶液,轻轻摇匀后置于摇床,28 °C、200 r/min 条件下分别处理 0,10,20,30,40,50,60 min(0 min 为对照组),取出后用 5% 硫代硫酸钠溶液洗涤 2~3 次终止反应,细胞用 PBS 缓冲液悬浮后吸取 100 μ L 均匀涂布于固体培养基平皿上,置于 30 °C 避光培养 4 d。

(3) ARTP 诱变株制备:吸取 20 μ L 菌悬液,均匀涂抹在灭过菌的载体铁片上,将铁片置于 ARTP 诱变仪载体物台上,用高纯氦气等离子体诱变分别处理 0(对照组),5,10,15,20,25 s,诱变参数为:电源功率 100 W,氦气流量 10 L/min,照射距离 2 mm。ARTP 诱变处理后,将铁片转移至装有 1 mL PBS 缓冲液的 EP 管中,震荡洗脱菌体。吸取 100 μ L 菌体悬浮液均匀涂布于固体培养基平皿上,置于 30 °C 避光培养 4 d。

(4) EMS-ARTP 复合诱变菌制备:将 EMS 诱变处理 40 min 后制备的诱变菌悬液吸取 100 μ L 均匀涂布于固体培养基平皿上,置于 30 °C 避光培养 4 d。混合平皿上长出的单菌落,并挑取一环,接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中,按 1.2.1(1)制备菌悬液,然后按 1.2.1(3)经 ARTP 照

射诱变 15 s, 获得 EMS-ARTP 复合诱变菌。其中对照组 EMS 处理时间 0 min, ARTP 照射时间 0 s。

1.2.2 致死率、突变率计算

(1) 致死率计算: 各诱变试验中, 对对照组和诱变组固体培养基平皿上长出的菌落进行计数。按式(1)计算致死率。

$$r_L = \frac{N_0 - N_m}{N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

r_L ——致死率, %;

N_0 ——对照组菌落数;

N_m ——诱变组菌落数。

(2) 突变率计算: 各诱变试验中, 选取致死率为 80%~90% 的处理时间作为最终诱变时间。在该诱变时间下对裂殖壶菌进行诱变处理, 平板培养 4 d 后各组随机挑选 50 株菌, 摇瓶培养 120 h 后测 DHA 产量, 记产量高于原始菌株 10% 的诱变株为正突变株, 产量低于原始菌株 10% 的诱变株为负突变株, 并按式(2)计算突变率。

$$r_m = r_P + r_N = \frac{N_P + N_N}{50} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

r_m ——突变率, %;

r_P ——正突变率, %;

r_N ——负突变率, %;

N_P ——正突变株菌株数;

N_N ——负突变株菌株数。

1.2.3 分析方法

(1) 生物量测定: 各诱变株摇瓶培养 120 h 后, 取 5 mL 发酵液于离心管中, 8 000 r/min 离心 15 min, 用双蒸水洗涤离心 2 次, 冷冻干燥后称重计算生物量。

(2) 含油量测定: 采用磷酸香草醛法^[29]。

(3) 脂肪酸含量测定: 采用气相色谱法^[11]。

各诱变组选取 5 株 DHA 产量最高的菌株, 其发酵平均水平作为该诱变方法下得到的高产菌的发酵水平。

2 结果与分析

2.1 诱变剂量的确定

2 种诱变方法对裂殖壶菌的致死效应见图 1。裂殖壶菌菌体的致死率与 EMS 处理时间存在明显的正相关效应, 当 EMS 处理时间为 40 min 时, 致死率达到 87%。因此, 选取 40 min 作为 EMS 处理的诱变剂量。

裂殖壶菌菌体的致死率随着 ARTP 照射时间的延长而显著增加。当照射时间在 15 s 以上时, 致死率曲线趋于平缓, 可能是细胞 SOS 修复机制的激活, 突变率开始增加^[30]。此时, 裂殖壶菌的致死率达到 80% 以上。因此, 选取 15 s 作为 ARTP 照射的诱变剂量。

从图 1 可以看出, 对裂殖壶菌诱变的化学处理中, 致死率对应于处理时间, 形成较为平缓的上升曲线, 而物理诱变中, 致死率对应于照射时间则显得陡峭, 说明准确掌控照射时间点非常重要。

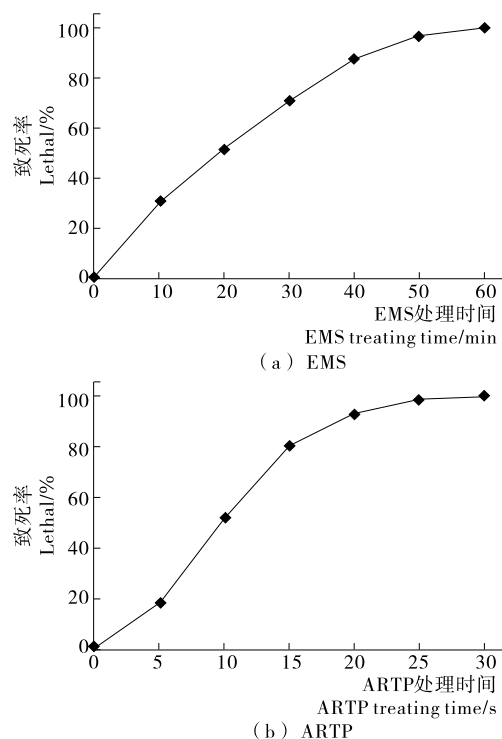


图 1 2 种诱变方法对裂殖壶菌的致死效应

Figure 1 Lethal effects of 2 mutagenesis factors to *Schizochytrium* sp. 31 ($n=3$)

2.2 EMS、ARTP 和 EMS-ARTP 处理突变率的对比

分别使用 EMS、ARTP 和 EMS-ARTP 复合诱变 3 种诱变方法对裂殖壶菌进行诱变处理, 并对诱变株进行摇瓶培养后测 DHA 产量, 统计正、负突变率, 结果见图 2。3 种诱变方法对裂殖壶菌的诱变效果呈现出一定的差异性。比较 2 种单因子诱变方法, 裂殖壶菌突变率相差不大, 介于 40% 与 45% 之间, 但是在 ARTP 突变株中, 正突变株的数量占到约 60%, 远高于负突变株; 而在 EMS 突变株中, 正、负突变株数量相当。EMS-ARTP 复合诱变后, 突变率达到 55.7%, 明显高于 2 种单因子诱变。其中正突变率达到了 32.2%, 远远高于负突变率。

对裂殖壶菌而言, 3 种突变方法形成的突变率截然不同。表观上分析, 推测 EMS-ARTP 复合诱变造成了更丰富的突变位点, 因此回复突变的频率远远低于单因子诱变。

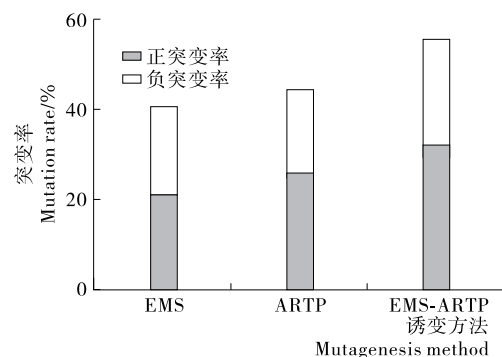


图 2 3 种诱变方法对裂殖壶菌诱变处理的突变率

Figure 2 Mutation rate of 3 mutagenesis factors to *Schizochytrium* sp. 31 ($n=3$)

2.3 高产诱变株的关键发酵指标类比

从 3 种诱变方法获得的诱变株当中各挑选 5 株 DHA 产量最高的菌株,其发酵平均水平作为该诱变方法下得到的 DHA 高产菌株的发酵水平,结果见表 1、2。从表 1 可知,与出发菌株相比,3 种 DHA 高产菌株的生物量无明显的变化,而在含油量上,均有不同程度的提高,其中 EMS 诱变高产株含油量提升略高于 ARTP 诱变的,而复合诱变高产株含油量最高,达到 51%。如表 2 所示,EMS 诱变高产株的 DHA 较出发菌株无明显变化,而 ARTP 诱变高产株和复合诱变高产株 DHA 含量均得到了提升,分别约为 40%和 43%。基于上述变化,最终 3 种诱变菌的 DHA 产量均得到了一定程度的提升,其中 EMS-ARTP 复合诱变高产株的产量达到了 7.2 g/L,提升了近 36%,效果最明显。

3 种 DHA 高产菌株的脂肪酸组成与出发菌株具有明显的差异,见表 2。EMS 诱变高产株的主要 FAS 产物,如 C_{14:0} 和 C_{16:0} 略有增加,主要 PKS 产物二十二碳五烯酸

(DPA)出现下降现象;而 ARTP 和复合诱变高产株的 FAS 产物和 PKS 产物变化与 EMS 诱变高产株正好相反,如复合诱变高产株的 FAS 产物由原始菌株的 42.3%下降到 38.6%,而 PKS 产物由原始菌株的 44.9%上升到 55.2%。

表 1 不同高产 DHA 裂殖壶菌诱变株发酵性能分析[†]
Table 1 Analysis of fermentation performances on different high DHA yield *Schizochytrium* mutants (n=3)

菌株	生物量/ (g · L ⁻¹)	含油量/ %	DHA 产量/ (g · L ⁻¹)
w	36.41±1.36	45.51±2.08	5.28±0.35
m _{EMS}	37.01±1.28	48.45±2.58	5.74±0.33
m _{ARTP}	36.82±1.55	47.94±2.67	6.28±0.28
m _{EA}	36.88±1.27	51.15±2.07	7.16±0.30

[†] w:原始菌株;m_{EMS}:EMS 诱变菌株;m_{ARTP}:ARTP 诱变菌株;m_{EA}:EMS-ARTP 复合诱变菌株。

表 2 不同高产 DHA 裂殖壶菌诱变株脂肪酸组成[†]
Table 2 Fatty acids composition of different high DHA yield *Schizochytrium* mutants (n=3) %

菌株	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	DPA	DHA	其它脂肪酸	FAS 产物	PKS 产物
w	15.53±0.49	25.24±0.70	0.55±0.19	0.34±0.16	0.65±0.07	8.73±0.54	36.20±1.09	12.76±0.65	42.31±2.55	44.93±1.80
m _{EMS}	17.77±0.64	26.88±0.81	1.37±0.29	1.08±0.30	0.75±0.08	7.79±0.47	36.40±1.09	7.96±0.28	47.85±3.02	42.19±1.66
m _{ARTP}	15.13±0.38	24.00±0.60	0.49±0.23	0.53±0.22	0.43±0.04	13.77±0.88	40.43±1.25	5.22±0.23	40.58±2.37	54.20±2.25
m _{EA}	13.15±0.41	23.96±0.70	0.36±0.15	0.74±0.21	0.34±0.03	12.03±0.78	43.15±1.14	6.27±0.35	38.55±2.35	55.18±2.20

[†] w:原始菌株;m_{EMS}:EMS 诱变菌株;m_{ARTP}:ARTP 诱变菌株;m_{EA}:EMS-ARTP 复合诱变菌株。

2.4 高产诱变株遗传稳定性

将 3 种诱变方法获得的高产 DHA 诱变株进行连续传代培养,考察其遗传的稳定性,结果见图 3。经过 5 代的传代培养,EMS 诱变高产株和 ARTP 诱变高产株的发酵指标都出现了一定程度的退化,而复合诱变高产株的发酵指标保持相对稳定,其 DHA 含量为 42.2%~43.3%,DHA 产量为 7.0~7.2 g/L,与一代菌无明显差异,遗传稳定性良好。

2.5 诱变方法对裂殖壶菌诱变机理

由 3 种诱变方法对裂殖壶菌的诱变结果分析可知,EMS 产生的诱变效果弱于 ARTP,而复合诱变的效果最好。EMS 具有烷化 DNA 碱基的机理,可引发嘌呤和嘧啶转换^[22]。在本试验中,EMS 诱变高产株的含油量高于出发菌株,但 DHA 占总脂肪酸的相对含量与出发菌相比相差不大,说明其脂肪酸合成能力得到了提升,但 DHA 合成的特定代谢途径并未增强。

ARTP 诱变为新型的诱变育种方法,它集合了质量、能量和电荷等损伤因素,产生不同的 DNA 损伤机制,遗传多样性更丰富^[31]。Umu-test 显示 ARTP 对基因的损伤能力远高于 UV 和常规化学诱变方法^[32]。ARTP 辐射的高活性粒子温度接近室温,不会对菌体产生热致死效应。在本试验中,将 ARTP 诱变技术应用于裂殖壶菌选育高产 DHA 菌

株,取得了良好的效果,正突变率远远高于负突变率。通过发酵数据和脂肪酸组成的分析可以发现,ARTP 高产株的含油量和 DHA 产量明显提升,而且脂肪酸组成中 PKS 产物也有了相应的提升,说明诱变株在合成脂肪酸前体物质的相关合成基因和 PKS 途径的特定基因都有可能发生了变异。

考虑到裂殖壶菌复杂的脂肪酸合成途径,单点或少数几个点的诱变往往不能对 DHA 的产量产生显著、稳定的改变。将化学诱变和物理诱变相结合,对裂殖壶菌进行 EMS-ARTP 复合诱变,诱变机制更多样,突变位点更丰富,获得 DHA 高产菌的概率也更大。通过 EMS-ARTP 复合诱变得到的高产菌株,DHA 产量达到 7.2 g/L。李慧玲等^[33]采用 DES-UV 复合诱变结合丙二酸、碘乙酸联合筛选,得到诱变菌株 XN001,其 DHA 产量为 5.5 g/L;许永等^[34]采用紫外诱变和喹禾灵筛选的方法,筛得的菌株 OUC007,其 DHA 产量为 1.2 g/L;袁军等^[35]通过 ARTP 诱变与强氧化剂施压筛选得到的菌种 D32,其 DHA 产量达到 7.3 g/L。通过本试验的诱变方法筛选得到的高产诱变菌株,在未使用任何筛选试剂的情况下,已获得较高 DHA 产量。该产量与近期报道的相同菌种、相同发酵规模的数据相比,已十分具有竞争力(表 3)。后期经过合适的筛选方法和发酵培养优化后,有望进一步提高 DHA 生产能力。

表 3 不同破囊壶菌 DHA 产量和 DHA 含量比较

Table 3 Comparative results of DHA production and percentage among different studies by thraustochytrids

菌种	发酵规模	发酵时间/h	DHA 含量/%	DHA 产量/(g · L ⁻¹)	参考文献
<i>Aurantiochytrium limacinum</i> SR21	500 mL/5 L	168/165	49.5/72.6	1.4/20.3	[15]
<i>Schizochytrium</i> sp. S056	250 mL	144	44.4	7.95	[36]
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	250 mL/50 L	61/96	23.5/41.8	6.5/28.9	[37]
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	500 mL	168	46.2	6.5	[30]
<i>Schizochytrium</i> sp. D32	500 mL	120	50.0	7.3	[35]
<i>Schizochytrium</i> sp. mEA	250 mL	120	43.2	7.2	本研究

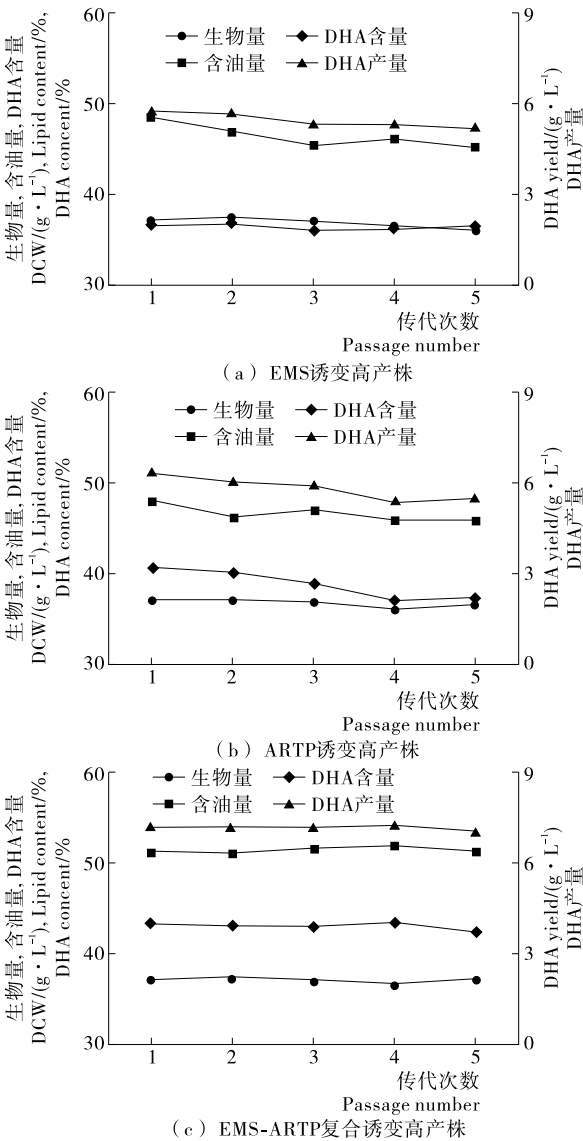


图 3 高产诱变株传代次数对发酵指标的影响

Figure 3 Effects of culture passages on fermentation performance of high DHA yield *Schizochytrium* mutants

3 结论

将 EMS-ARTP 复合诱变的方法应用于裂殖壶菌诱变选育高产 DHA 菌株,并对复合诱变获得的 DHA 高产菌株与单因子诱变高产菌株进行比较分析得出,EMS-ARTP 复合

诱变高产菌株无论在 DHA 产量还是在遗传稳定性上,都优于单因子诱变。再加上后期的理性筛选技术及定向施压培养的应用,有望进一步提高裂殖壶菌合成 DHA 的产率,继而提高工业化生产 DHA 的效能。

参考文献

[1] 中国科学院. 能源科技领域发展观察[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 303-315.

[2] REN Lu-jing, SUN Xiao-man, JI Xiao-jun, et al. Enhancement of docosahexaenoic acid synthesis by manipulation of antioxidant capacity and prevention of oxidative damage in *Schizochytrium* sp[J]. Bioresource Technology, 2017, 223: 141-148.

[3] DELISEO D, VELOTTI F. Omega-3 fatty acids and cancer cell cytotoxicity: implications for multi-targeted cancer therapy[J]. J Clin Med, 2016, 5(2): 15-43.

[4] HADLEY K B, BAUER J, MILGRAM N W. The oil-rich alga *Schizochytrium* sp. as a dietary source of docosahexaenoic acid improves shape discrimination learning associated with visual processing in a canine model of senescence[J]. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 2017, 118: 10-18.

[5] JIANG Yue, FAN King-wai, WONG Rsz-yeung, et al. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(5): 1 196-1 200.

[6] HAUVERMALE A, KUNER J, ROSENZWEIG B, et al. Fatty acid production in *Schizochytrium* sp.: Involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase[J]. Lipids, 2006, 41(8): 739-747.

[7] GAUNT L F, BEGGS C B, GEORGHIOU G E. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A review[J]. Ieee Transactions on Plasma Science, 2006, 34(4): 1 257-1 269.

[8] REN Lu-jing, SUN Li-na, ZHUANG Xiao-yan, et al. Regulation of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.: effect of nitrogen addition[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(5): 865-872.

[9] SINGH D, BARROW C J, PURI M, et al. Combination of calcium and magnesium ions prevents substrate inhibition and promotes biomass and lipid production in thraustochytrids under higher glycerol concentration [J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2016, 15: 202-209.

- [10] GANUZA E, ANDERSON A J, RATLEDGE C. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(9): 1 559-1 564.
- [11] ZHAO Ben, LI Ya-fei, MBIFILE M D, et al. Improvement of docosahexaenoic acid fermentation from *Schizochytrium* sp. AB-610 by staged pH control based on cell morphological changes[J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(9): 981-988.
- [12] CHANG Gui-fang, WU Juan, JIANG Cui-hong, et al. The relationship of oxygen uptake rate and $k(L)a$ with rheological properties in high cell density cultivation of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. S31[J]. Bioresource Technology, 2014, 152: 234-240.
- [13] LEWIS K D, HUANG Wei-feng, ZHENG Xiao-hui, et al. Toxicological evaluation of arachidonic acid (ARA)-rich oil and docosahexaenoic acid (DHA)-rich oil[J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 96: 133-144.
- [14] QU Liang, JI Xiao-jun, REN Lu-jing, et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. using a two-stage oxygen supply control strategy based on oxygen transfer coefficient[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(1): 22-27.
- [15] HUANG Ting-yen, LU Wen-chang, CHU I-ming. A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid[J]. Bioresource Technology, 2012, 123: 8-14.
- [16] JI Xiao-jun, MO Kai-qiang, REN Lu-jing, et al. Genome sequence of *Schizochytrium* sp. CCTCC M209059, an effective producer of docosahexaenoic acid-rich lipids[J]. Genome Announcement, DOI: 10.1128/genomeA.00819-15.
- [17] METZ J G, ROESSLER P, FACCIOTTI D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes[J]. Science, 2001, 293(5 528): 290-293.
- [18] REN Lu-jing, ZHUANG Xiao-yan, CHEN Sheng-lan, et al. Introduction of omega-3 desaturase obviously changed the fatty acid profile and sterol content of *Schizochytrium* sp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9 770-9 776.
- [19] YAN Jin-fei, CHENG Ru-bin, LIN Xiang-zhi, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase increased the biomass and fatty acid proportion in microalga *Schizochytrium*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 1 933-1 939.
- [20] 崔清志, 刘晓虹, 陈惠明. EMS 诱变技术研究进展[J]. 湖南农业科学, 2013(5): 7-9, 13.
- [21] 敬樊, 王亮明, 武军, 等. 利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱导小麦-华山新麦草染色体易位的研究[J]. 农业生物技术学报, 2015(5): 561-570.
- [22] 降云峰, 刘永忠, 李万星, 等. 甲基磺酸乙酯诱变技术在大豆育种上的应用[J]. 园艺与种苗, 2012(6): 12-15.
- [23] ZHANG Xue, ZHANG Xiao-fei, LI He-ping, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5 387-5 396.
- [24] 张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014(7): 2 676-2 684.
- [25] 任少雄, 王丹. 植物理化复合诱变育种技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009(20): 9 345-9 349.
- [26] DARLEY W M, PORTER D, FULLER M S. Cell wall composition and synthesis via Golgi-directed scale formation in the marine eucaryote, *Schizochytrium aggregatum*, with a note on *Thraustochytrium* sp[J]. Archiv Für Mikrobiologie, 1973, 90(2): 89-106.
- [27] 吕小义, 付杰, 尹佳, 等. 高产 DHA 裂壶藻突变株的选育[J]. 中国酿造, 2015(4): 106-109.
- [28] 梁园梅, 刘瑛, 李晶晶, 等. 高产 DHA 破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW7 诱变株的筛选[J]. 微生物学通报, 2016(2): 457-464.
- [29] 罗玮, 顾秋亚, 钟湘南, 等. 1 种快速检测微藻油脂的新方法[J]. 食品与发酵工业, 2014(12): 165-168.
- [30] FU Jie, CHEN Tao, LU Hao, et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by low-energy ion implantation coupled with screening method based on Sudan black B staining in *Schizochytrium* sp[J]. Bioresource Technology, 2016, 221: 405-411.
- [31] LI He-ping, WANG Zhi-bin, GE Nan, et al. Studies on the physical characteristics of the radio-frequency atmospheric-pressure glow discharge plasmas for the genome mutation of *Methylosinus trichosporium* [J]. Ieee Transactions on Plasma Science, 2012, 40(11): 2 853-2 860.
- [32] ODA Y, NAKAMURA S, OKI I, et al. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens [J]. Mutation Research, 1985, 147(5): 219-229.
- [33] 李慧玲, 刘永梅. 诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌突变株[J]. 食品科技, 2015(9): 12-16.
- [34] 许永, 臧晓南, 徐涤, 等. 裂殖壶菌诱变筛选的研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2012(12): 54-58.
- [35] 袁军, 赵彝, 孙梦玉, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变快速选育高产 DHA 的裂殖壶菌突变株[J]. 生物技术通报, 2015(10): 199-204.
- [36] CHEN Wei, ZHOU Peng-peng, ZHU Yuan-min, et al. Improvement in the docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium* sp. S056 by replacement of sea salt[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, 39(2): 315-321.
- [37] CHANG Gui-fang, GAO Ni-si, TIAN Gui-wei, et al. Improvement of docosahexaenoic acid production on glycerol by *Schizochytrium* sp S31 with constantly high oxygen transfer coefficient[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 400-406.