

破囊壶菌属微生物中超长链多不饱和脂肪酸的生物合成及其代谢工程应用

谢曦¹, 陈碧翰¹, 罗俊锴¹, 郭梓蔚¹, 王琴¹, 肖更生¹, 刘东杰¹, 林鑫², 刘祎帆^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510631)

(2. 仲恺农业工程学院动物科学学院, 广东广州 510631)

摘要: 超长链多不饱和脂肪酸 (VLCPUFAs) 包括 ARA、EPA、DHA 等不但能营养机体, 又具有独特生理功能而受到广泛的关注。破囊壶菌属微生物作为 VLCPUFAs 主要生产者, 是鱼类、贝类等海洋生物富集积累 VLCPUFAs 的重要来源。许多研究指出, 破囊壶菌具有大规模工业化生产 VLCPUFAs 的潜力。但是, 目前对其的生物合成途径和组装机理仍未清楚。该综述从破囊壶菌属微生物的生物合成途径、储藏性脂质的组装机理和提高 VLCPUFAs 产量的基因工程策略三个方面进行介绍, 着重对其 VLCPUFAs 的生物合成途径, 及其油脂组装机理开展详细的介绍, 并整理、结合一些较为前沿的研究发现对这些途径研究的潜在应用进行探讨, 提高人们对破囊壶菌的生物合成及甘油酯组装机理的认识。研究表明, 通过异源表达参与 VLCPUFAs 合成的基因, 能在微生物工程菌和油料作物中产生 EPA、DPA 和 DHA 等功能油脂, 含量能达到总脂的 5%~40%, 而通过基因工程敲除或改造破囊壶菌微生物的脂质合成途径基因, 能提高破囊壶菌 DHA 产量约 3%~55%。这些实例为指导 VLCPUFAs 的工业化生产, 提供理论依据。

关键词: 超长链多不饱和脂肪酸; 生物合成; 组装机理; 破囊壶菌

文章编号: 1673-9078(2022)06-327-342

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.1038

Biosynthesis of Very-long-chain Polyunsaturated Fatty Acids in *Thraustochytrids* and Their Applications in Metabolic Engineering

XIE Xi¹, CHEN Bihan¹, LUO Junkai¹, GUO Ziwei¹, WANG Qin¹, XIAO Gengsheng¹, LIU Dongjie¹, LIN Li², LIU Huifan^{1*}

(1. College of Light Industry and Food, Guangdong Provincial Key Laboratory of Specialty Food Science and Technology in Lingnan, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510631, China) (2. College of Animal Science Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Very-long-chain polyunsaturated fatty acids (VLCPUFAs), including ARA, EPA, and DHA, are essential for human growth and well-being. They are produced mainly by the *Thraustochytrids*, a group of marine microorganisms that are the most important sources of these fatty acids for marine animals such as fish and shellfish. Although many studies have suggested the great potential of *Thraustochytrids* for the large-scale massive production of VLCPUFAs, the mechanisms of VLCPUFA biosynthesis in these microorganisms remain unclear. In this review, the VLCPUFA biosynthetic pathways of *Thraustochytrids*, the mechanisms of storage lipid assembly, and genetic engineering strategies for increasing VLCPUFA yields are introduced. Specifically, emphasis is placed on the aerobic and anaerobic biosynthetic pathways and the mechanisms of VLCPUFA assembly as well as the metabolic engineering applications of the pathway-related genes. This review presents a summary of findings from cutting-edge research studies to

引文格式:

谢曦, 陈碧翰, 罗俊锴, 等. 破囊壶菌属微生物中超长链多不饱和脂肪酸的生物合成及其代谢工程应用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6):327-342

XIE Xi, CHEN Bihan, LUO Junkai, et al. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrids* and their applications in metabolic engineering [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 327-342

收稿日期: 2021-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (42106130); 广东省教育厅青年创新人才项目 (KA21031F5); 广东省基础与应用基础研究基金资助项目 (B12100206)

作者简介: 谢曦 (1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 油脂生物化学, E-mail: xixie31@hotmail.com

通讯作者: 刘祎帆 (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养, E-mail: lm_zkng@163.com

provide a better understanding of these biosynthetic pathways and their applications for VLCPUFA production. In conclusion, through the heterologous expression of genes involved in VLCPUFA biosynthesis, microorganisms and plants can accumulate functional lipids such as EPA, DPA, and DHA, which account for up to 5%~40% of the total lipids. However, through genetic engineering, the DHA yields of *Thraustochytrids* can be enhanced by approximately 3%~55%. These findings provide a theoretical basis and guidance for the industrial production of VLCPUFAs.

Key words: very-long-chain polyunsaturated fatty acids; biosynthesis; lipid assembly; *Thraustochytrids*

超长链多不饱和脂肪酸 (very long chain polyunsaturated fatty acids, VLCPUFAs), 是指含有超过 18 个碳原子, 2 个以上双键的一类脂肪酸。目前 VLCPUFAs 根据其双键位置有两种命名系统, 第一种是“ ω ”命名法, 该系统根据甲基端第一个双键碳原子的位置命名, 这种命名系统多用于划分结构相似的一类脂肪酸。如二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA), 因其甲基端第一个双键落在第三个碳原子上, 因此这类脂肪酸统称为“ $\omega 3$ ”脂肪酸。而花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA), 因其第一个碳-碳双键落在第六个碳原子上, 因此称其为“ $\omega 6$ ”脂肪酸。第二种为“ Δ ”命名法, 多用于描述双键合成的过程, 它是从羧基端开始计算, 以“ Δ ”引导符号用数字标注每一个双键的位置。以 ARA (C20:4 $\omega 6 \Delta 5, 8, 11, 14$) 为例, “20”表示主链由 20 个碳原子组成; “4”表示主链中含 4 个双键; “ Δ ”右上角的数字表示从主链羧基端开始计数, 第 5、8、11、14 个碳原子位置各连着一个双键^[1]。大量研究表明, VLCPUFAs (包括 EPA 和 DHA) 在维护生物膜结构和功能、提高机体免疫能力、促进生

长发育、调节脂类代谢以及相关基因表达等方面作用非凡^[2]。VLCPUFAs 还对降低血栓形成、减少心血管疾病发病率、抵抗癌症等有积极的预防和辅助治疗作用^[3]。同时, 多项临床研究表明 EPA 和 DHA 是构成调节机体机能的最高中枢-大脑皮层灰质的主要脂肪酸之一, 它可参与信号转导、视紫红质激活等, 它对于运动能力、注意力和记忆功能有正面效应^[4]。DHA 是神经保护素 D1 (Neuroprotectin D1, NPD1) 的前体, 可响应氧化应激和激活神经营养素, 以维持神经稳态。也可通过调节抗炎信号级联来保护神经元和感光细胞, 从而防止大脑和视网膜损伤^[5]。另外一些研究发现二十碳类 VLCPUFAs 可在哺乳动物组织和细胞内经过不同的途径合成几类重要的信号分子, 如通过花生四烯酸在环加氧酶作用下先转化为环内过氧化物, 之后在不同异构酶的作用下转化为前列腺素、血栓素、前列环素等; 花生四烯酸也可在脂加氧酶作用下合成白三烯及其他羟二十四碳四烯酸^[6]。因此, 适当地摄入 VLCPUFAs 对维持人体健康、保持人类正常机体功能上起到重要的作用 (图 1)。

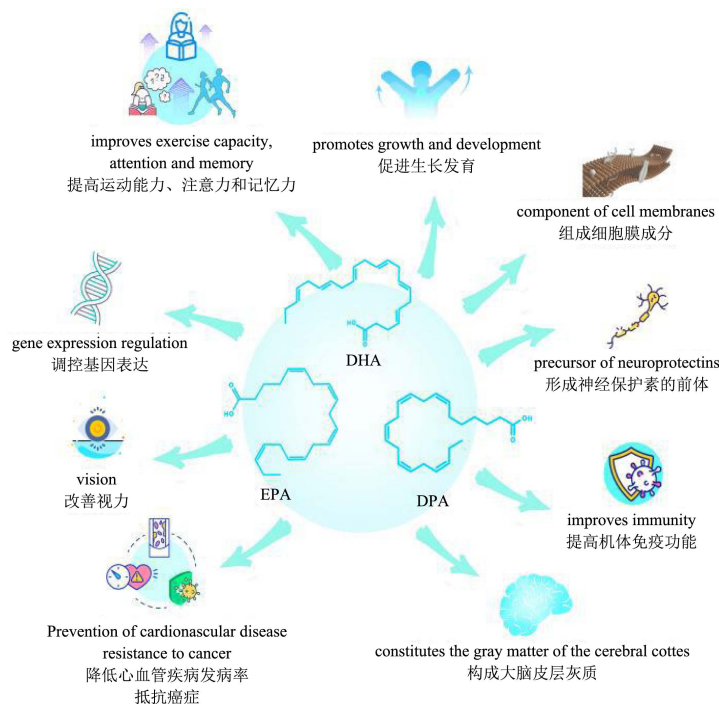


图 1 多不饱和脂肪酸的生物功能

Fig.1 The effect of VLCPUFAs on maintaining human health

目前, EPA、DHA 等常见 VLCPUFAs 产品主要是通过捕捞深海鱼类提取所得, 深海鱼类是人类获得 VLCPUFAs 的重要天然来源, 随着全球气候变暖、过度捕捞、环境污染等因素, 使得海洋鱼类资源日趋减少, 制约了利用海洋鱼类提取 VLCPUFAs 产业的发展。同时鱼油中 VLCPUFAs 的构成和含量随着深海鱼类的种类、季节、地理环境的不同而变化, 使得提取的鱼油中 VLCPUFAs 的含量和组成会产生较大的差别, 生产出的鱼油产品质量不稳定, 难以满足市场对鱼油产品高质量的要求^[7]。如何研究开发出新的稳定、可控、高产、可持续、低成本的 VLCPUFAs 来源从而摆脱 VLCPUFAs 产业对海洋鱼类的高度依赖, 已经摆在从事 VLCPUFAs 类产品加工、销售者的面前。

研究表明, 海洋微藻、原始真菌和原生生物等能在细胞膜或储存性脂质中积累 ARA、EPA、二十二碳五烯酸 (docosapentaenoic acid, DPA) 和 DHA 等多种具有营养价值的 VLCPUFAs^[8,9]。相比于深海鱼油等常规的 VLCPUFAs 来源, 微生物源的 VLCPUFAs 具有无鱼腥味、低胆固醇、低杂质、受环境影响少、产量质量稳定、脂肪酸组分简单和提取容易等诸多优势, 极具开发价值。如澳大利亚等一些国家的生物技术公

司已开始尝试培养海洋微藻或破囊壶菌等海洋微生物以替代深海鱼类作为 VLCPUFAs 原料进行 EPA 和 DHA 的生产, 取得一定的进展, 已经有成批量的产品投放市场。

1 破囊壶菌属微生物

破囊壶菌 (Thraustochytrids)、属于 Stramenopila 界、Heterokonta 门、Labyrinthulomycetes 纲、Thraustochytriales 目、Thraustochytriaceae 科的异养型原生生物。破囊壶菌广泛分布于海洋、盐水湖以及红树林地区, 因其外观形态像“破囊菌”, 而释放孢子的形式像“壶菌”, 因此命名为破囊壶菌^[10]。科学家前期对这些微生物的脂质代谢产物进行分析后发现 Thraustochytriaceae 科中的一部分微生物, 包括 *Thraustochytrium* sp. (又称破囊壶菌)、*Schizochytrium* sp. (又称裂殖壶菌)、*Ulkenia* sp.、*Aurantiochytrium* sp. (又称橙黄壶菌) 和 *Hondaia* sp. 能积累大量 EPA、DPA 和 DHA 等多不饱和脂肪酸^[11] (图 2)。更有研究指出这些破囊壶菌属微生物能够广泛地利用碳源和氮源作为营养来源, 生长快速、培养简单、能积累大量 VLCPUFAs, 具有大规模工业化生产的潜力^[12] (表 1)。

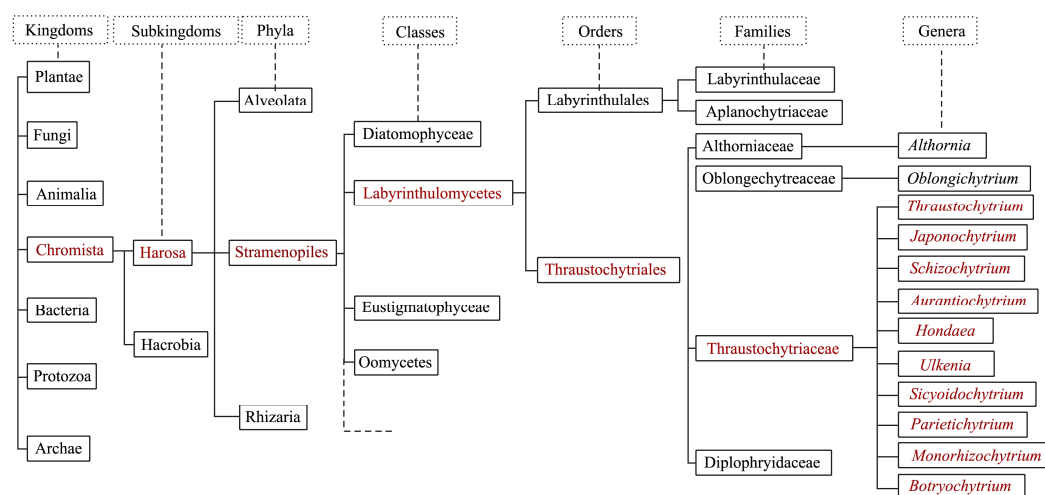


图 2 破囊壶菌属微生物进化树分析

Fig.2 Evolutionary tree of Thraustochytrids

表 1 破囊壶菌属微生物中多不饱和脂肪酸的组成及含量

Table 1 Composition and content of polyunsaturated fatty acids from Thraustochytrids

物种	脂肪酸组成 (占总脂肪的百分比) %					产脂主要温度/°C	文献
	SFA (饱和脂肪酸)	UFA (不饱和脂肪酸)	EPA (20:5)	DPA (22:5)	DHA (22:6)		
<i>Thraustochytrium</i> sp. 26185	31.8	64.5	2.2	8	53	20	[13]、[14]
<i>Schizochytrium</i> sp. HX308	21.2	72.3	1	20	50	22	[15]、[16]
<i>Ulkenia</i> TC 010	31.1	58.9	11.2	5.9	37.5	>20	[17]、[18]
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	37.8	61.25	0.25	6.5	54	22	[19]、[20]
<i>Hondaia fermentlagiana</i>	47.6	48.95	0.4	7	41	-	[19]

表2 已鉴别出的不同破囊壶菌属微生物的延长酶汇总表

Table 2 Summary of elongases from different *Thraustochytrids*

种名	延长酶种类	参考文献
<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC 26185	$\Delta 5$ -ELO、 $\Delta 6$ -ELO、 $\Delta 9$ -ELO	[38]
<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC 34304	$\Delta 5$ -ELO、 $\Delta 6$ -ELO、 $\Delta 9$ -ELO	[39]
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	$\Delta 5$ -ELO、 $\Delta 6$ -ELO、 $\Delta 9$ -ELO	[40]
<i>Aurantiochytrium</i> sp. strain T66	$\Delta 6$ -ELO	[41]

注: ELO: elongase, 延长酶。

2 破囊壶菌属微生物的 VLCPUFAs 的生物合成

途径

自 1989 年澳大利亚科学家首次发现破囊壶菌能积累 DHA 以来, 科学家们对破囊壶菌中多不饱和脂肪酸的生物合成途径开展了研究^[21]。目前基本探明了在自然界中, 破囊壶菌属微生物能通过有氧合成途径和无氧合成途径来合成 VLCPUFAs。

2.1 有氧合成途径及其关键酶

有氧合成途径普遍存在于动物、植物和真核微生物体内, 这些生物体内的 VLCPUFAs 主要是以长链脂肪酸为前体, 通过一系列的延长酶(添加两个碳原子)和去饱和酶(导入一个双键)的交替作用合成的。

2.1.1 脂肪酸延长酶

脂肪酸的延长过程发生在真核细胞的内质网中, 其经由脂肪酸延长酶催化, 向酯酰链添加两个碳原子来延长多不饱和脂肪酸的链长。脂肪酸延长酶是一个复合酶, 由四个复合体共同催化完成一次延伸反应: 由 β 酮酰基辅酶 A 合成酶(β -ketoacyl-CoA synthase, KCS)催化两个碳链的延伸; 由酮酰基辅酶 A 还原酶催化酮酰基辅酶 A 的酮基还原为羟基; 由 β -羟酰辅酶 A 脱水酶催化脱除一个水分子; 由酮酰基辅酶 A 还原酶催化还原烯酰辅酶 A。在脂肪酸延长酶复合体的四种单体酶中, KCS 主要参与脂肪酸延伸过程的缩合反应, 与其他三种酶相比, 它具有很强的底物特异性, 被认为是超长链脂肪酸合成的限速酶^[22,23]。根据序列相似性和底物特异性, 真核生物 KCS 可分为两类。一类是 FAE 型 KCS, 它最早是通过转座子标记在拟南芥中被发现^[24]。这种延长酶主要存在于植物和藻类中, 以饱和及单不饱和脂酰链为底物进行延长。另一类是 ELO 型 KCS, 最先是在酿酒酵母中被发现的^[25]。该类型的 KCS 主要存在于酵母、真菌和动物中, 主要以多不饱和脂酰链为底物, 每次向酰基链添加两个碳原子进行延伸^[26,27]。例如, 在酿酒酵母中, 三种具有不同底物偏好性的 ELO 型 KCS 能催化长链、超长链不饱

和脂酰链延伸^[28]。在微藻 *Nannochloropsis* sp. 中, 细胞质 ELO 型 KCS 能将 16:3 延长到 18:3, 然后进入 EPA 的生物合成阶段^[29]。在高等植物中, 除了在 *Eranthis hyemalis* 等少量植物中存在 ELO 型 KCS 外, 大部分植物中只含有 FAE 型 KCS^[30]。但在海洋微藻、真核生物中 ELO 型 KCS 的存在较为广泛^[31-37](表 2)。

2.1.2 脂肪酸去饱和酶

脂肪酸去饱和酶是 VLCPUFA 上双键形成的关键酶, 它能利用氧分子作为辅助因子, 催化脱除脂酰链上两个氢原子从而引入碳-碳双键^[42]。去饱和酶的氨基酸序列上通常含有 3 个组氨酸保守区, 常以 H-X_[3,4]H、H-X_[2,3]H-H 和 H/Q-X_[2,3]H-H 的形式存在。脂肪酸去饱和酶能依据其在酰基链上的作用位置, 分为前端去饱和酶(front-end desaturase)和甲基末端去饱和酶(methyl-end desaturase)。甲基末端去饱和酶主要作用于已存在的双键和甲基端之间, 如 $\omega 3$ 和 $\omega 6$ 去饱和酶能分别催化从甲基端开始第三个碳和第六个碳上的双键合成。前端去饱和酶主要作用于已存在的双键和多不饱和脂肪酸的羧基端之间的碳原子上, 如 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 去饱和酶^[43-47]。脂肪酸去饱和酶亦能根据底物酰基载体的不同, 分为酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)去饱和酶、酰基辅酶 A (coenzyme A, CoA)去饱和酶与酰基脂类去饱和酶。酰基 ACP 去饱和酶是以脂酰基 ACP 作为底物; 酰基 CoA 去饱和酶主要催化酰基 CoA 的去饱和和反应; 而酰基脂类去饱和酶将双键引入由各种复杂脂质分子(如糖脂磷脂和鞘脂等)组成的酰基链中^[48]。虽然最近研究揭示了两种膜结合的酰基 CoA 去饱和酶的晶体结构, 为深入了解酰基辅酶 A 去饱和酶在内质网中的催化机制提供了新思路^[47,49], 但是, 微生物中大多数去饱和酶的底物特异性仍需要进行一系列的研究去验证明确^[50]。

目前, 来自于不同破囊壶菌属微生物的去饱和酶($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ 和 ω -3)和延长酶等都先后被分离出来并进行了功能鉴定, 因此, VLCPUFAs 的有氧合成途径已经研究得较为清晰(表 3)。其中最典型的 EPA 和 DHA 的有氧合成途径可分为 $\Delta 6$ 和 $\Delta 4$ 两个途径^[13,27,34,38,45,51-55]。 $\Delta 6$ 途径的研究最为详细,

该途径以 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA) 和亚油酸 (linoleic acid, LA) 为底物, 当以 LA 为底物时在 $\Delta 6$ -饱和酶的去饱和作用下生成 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA), 随后在 $\Delta 6$ -延长酶的延长作用下合成二高 γ -亚麻酸 (dohomo- γ -linolenic acid, DGLA), 最后经 $\Delta 5$ -饱和酶的作用生成 ARA。而以 ALA 为底物时, 在 $\Delta 6$ -饱和酶的去饱和作用下生成十

八碳四烯酸 (stearidonic acid, SDA), 再经 $\Delta 6$ -延长酶的延长作用合成二十碳四烯酸 (eicosatetraenoic acid, ETA), 最后在 $\Delta 5$ -饱和酶的作用下生成二十碳五烯酸 (EPA)。另一种是 $\Delta 4$ 途径, 主要是以 EPA 作为底物, 在 $\Delta 5$ -延长酶的作用下合成 DPA, 随后在 $\Delta 4$ 去饱和酶的作用下合成 DHA, 如破囊壶菌、裂殖壶菌便能以该途径合成 DHA (图 3)。

表 3 已鉴别出的不同破囊壶菌属微生物的去饱和酶汇总表

Table 3 Summary of desaturases from different *Thraustochytrids*

种名	已鉴别出的延长酶种类	文献
<i>Thraustochytrium</i> sp. 26185	$\Delta 4$ -DES、 $\Delta 5$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\Delta 8$ -DES、 $\Delta 9$ -DES、 $\Delta 12$ -DES、 $\Delta 15$ -DES	[38]
<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC34304	$\Delta 4$ -DES、 $\Delta 5$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\Delta 8$ -DES、 $\Delta 9$ -DES、 $\Delta 15$ -DES	[45]
<i>Schizochytrium</i> sp. A0231	$\Delta 4$ -DES、 $\Delta 5$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\Delta 9$ -DES、 $\Delta 12$ -DES、 $\Delta 15$ -DES	[56]
<i>Schizochytrium</i> sp. HX-308	$\Delta 6$ -DES、 $\Delta 8$ -DES、 $\Delta 12$ -DES	[57]
<i>Aurantiochytrium</i> sp. PKU#SW7	$\Delta 4$ -DES、 $\Delta 5$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\Delta 12$ -DES、 $\Delta 15$ -DES	[58]
<i>Aurantiochytrium</i> sp. SK4	$\Delta 4$ -DES、 $\Delta 5$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\Delta 9$ -DES、 $\Delta 12$ -DES、 $\Delta 15$ -DES	[59]

注: DES: desaturase, 去饱和酶。

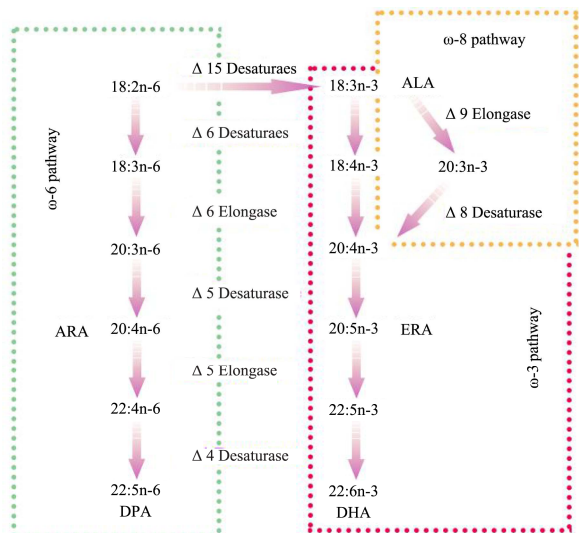


图 3 破囊壶菌属微生物中 VLCPUFAs 的有氧合成途径

Fig.3 The biosynthetic pathway of VLCPUFAs in microorganisms of the genus *Thraustochytrium*

注: ARA: arachidonic acid, 花生四烯酸; EPA: eicosapentaenoic acid, 二十碳五烯酸; DPA: docosapentaenoic acid, 二十二碳五烯酸; DHA: docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸; pathway: 通路; Elongase: 延长酶; Desaturase: 去饱和酶。

2.2 VLCPUFAs 的无氧合成途径及其关键酶

无氧合成途径是 VLCPUFAs 的另一种合成途径, 它不存在于任何高等植物和动物中, 只存在于微生物中。之所以被称为无氧合成途径, 是因为该途径不需要去饱和酶和氧气参与反应, 而是在酰基链延伸过程中导入双键。该途径由一个聚酮合成酶 (polyketide

synthase, PKS) 结构相似的多不饱和脂肪酸合成酶 (polyunsaturated fatty acid synthase, PUFA 合成酶) 催化, 以丙酮酸为前体经过多个迭代循环反应从头合成 VLCPUFAs^[60]。破囊壶菌属微生物的 PUFA 合成酶与 *Shewanella* sp.、*Moriteolla* sp. 和裂殖壶菌属 (*Schizochytrium* sp.) 等微生物的类似, 由多个亚单位组成, 每个亚基可能含有一个以上的催化结构域, 如酮酰基载体蛋白合成酶 (ketoacyl carrier protein synthetase, KS)、酮酰基载体蛋白还原酶 (ketoacyl carrier protein reductase, KR)、去饱和酶 (desaturase, DH)、烯酰基载体蛋白还原酶 (enoyl carrier protein reductase, ER)、丙酰辅酶 A: 载体蛋白转酰基酶 (propionyl-CoA: carrier protein transacylase, MAT) 和酰基载体蛋白 (ACP)。这些结构域协同工作, 通过四个重复的循环反应来合成 VLCPUFAs。然而, 与通过脂肪酸合成酶合成长链脂肪酸过程不同, 在 PUFA 合成酶催化的无氧途径中, PUFA 合成酶可以周期性的跳过脂酰链的烯酰还原步骤, 保留上面的顺式双键, 依次合成 VLCPUFA 上的顺式双键 (图 4)。

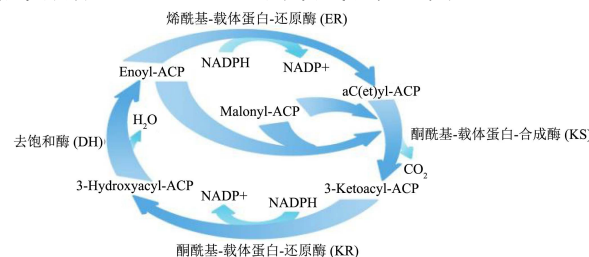


图 4 无氧合成途径合成超长链多不饱和脂肪酸的催化步骤

Fig.4 The biosynthesis of VLCPUFA through anaerobic pathway

注：3-Ketoacyl-ACP：酮酰基-载体蛋白；3-Hydroxyacyl-ACP：3-羟酰基-载体蛋白；Enoyl-ACP：烯酰基-载体蛋白；Ac(et)yl-ACP：(乙)酰基-载体蛋白；Malonyl-ACP：丙酰基-载体蛋白；NADP⁺：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(氧化态)；NADPH：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。

2.2.1 PUFA 合酶

PUFA 合成酶的发现可以追溯到 1996 年，当时 Yazawa^[61]从鱼肠中分离得到约 40 kb *Shewanella pneumatophori* SCRC-2738 的基因组 DNA 大片段，在大肠杆菌中表达，能催化 EPA 的合成。1997 年，Takeyama^[62]将 8 个开放阅读框（open reading frames, ORFs）组成的 DNA 片段亚克隆到一个广泛宿主范围的质粒载体中，并在 *Synechococcus* sp. 中表达，发现重组菌也能合成 EPA。随后的序列分析表明，该 DNA 序列编码的蛋白质与聚酮合成酶（polyketide, PKS）和脂肪酸合成酶有较高相似性，这使得 Metz 等人^[63]认为该基因簇序列参与 EPA 的生物合成可能遵循类似于 PKS 的催化机制，称该类能催化 VLCPUFAs 合成的大型合成酶为 PUFA 合成酶。基于此，科学家们进一步尝试将破囊壶菌和裂殖壶菌的 PKS 相似基因

进行体内和体外的功能验证，研究表明这种与 PKS 相类似的基因能催化 VLCPUFAs 合成。随后，科学家在包括细菌、真菌、藻类和破囊壶菌微生物在内的大量海洋微生物中均发现 PUFA 合成酶^[64-72]。由 PUFA 合成酶催化的合成过程可以有效地生产多种 VLCPUFAs，包括 ARA、EPA、DPA 和 DHA 等，由于其催化合成过程较简单，因此被认为是比有氧合成途径更有效的 VLCPUFA 生产系统^[73-75]，是天然生产 DHA 等 VLCPUFA 的重要途径。

虽然，PUFA 合成酶广泛存在于海洋微生物中，但这些合成酶的结构却是多种多样的。如除陆地分枝杆菌外的原核生物物的 PUFA 合成酶大多包含超过四个亚单位 PfaA^[76]、PfaB^[77]、PfaC^[78]和 PfaD^[79]，且每一个亚单位中催化结构域的数量和种类亦有所不同。而真核生物物的 PUFA 合成酶结构相对保守，如破囊壶菌属微生物的 PUFA 合成酶只含有 3 个亚单位称为 Subunit A、Subunit B 和 Subunit C，其中每个亚单位的结构域种类相似，除了 ACP 数量略有差异以外其他结构域排列顺序和种类都一样（图 5），因此，这些微生物的产物 VLCPUFA 是相同的，分别是 DPA 和 DHA。

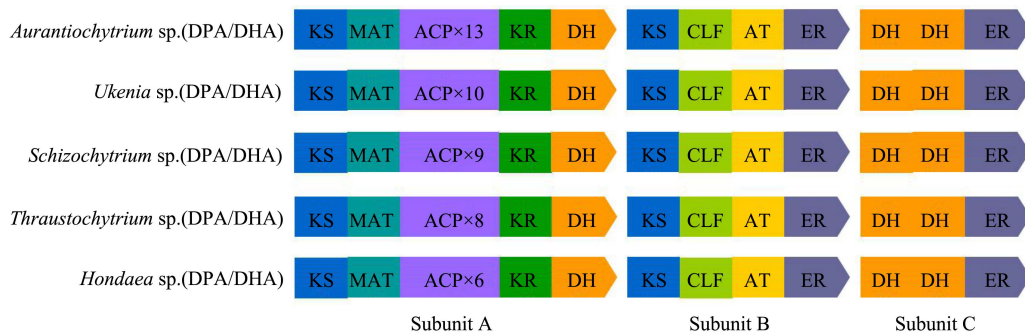


图 5 破囊壶菌属微生物多不饱和脂肪酸合酶结构

Fig.5 Structure of polyunsaturated fatty acid synthase in *Thraustochytrium*

注：*Thraustochytrium* sp.: 破囊壶菌属；*Schizochytrium* sp.: 裂殖壶菌属；*Aurantiocytrium* sp.: 橙黄壶菌属；DPA: docosapentaenoic acid, 二十二碳五烯酸；DHA: docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸；KS: ketoacyl carrier protein synthetase, 酮酰基载体蛋白合成酶；MAT: propionyl-CoA: carrier protein transacylase, 丙酰辅酶 A 载体蛋白转酰基酶；ACP: acyl carrier protein, 酰基载体蛋白；KR: ketoacyl carrier protein reductase, 酮酰基载体蛋白还原酶；DH: desaturase, 去饱和酶；CLF: chain length factor, 链长因子；AT: acyltransferase, 酰基转移酶；ER: enoyl carrier protein reductase, 烯酰基载体蛋白还原酶。

2.2.2 PUFA 合酶的重要催化结构

尽管 VLCPUFAs 是由 PUFA 合酶的多个催化结构域协同作用合成，但 VLCPUFAs 上多个不饱和双键的合成和酰基链上的顺序排布与 PUFA 合酶的两个特殊区域-KS 结构域和 DH 结构域息息相关。

KS 结构域是 PUFA 合成酶的关键催化区域，能催化酰基-S-KS 与延伸单元丙乙酸-S-ACP 之间的缩合，形成酰基-ACP，起到向酰基链添加 2 个碳原子的作用。与脂肪酸合成酶不同，PUFA 合成酶上含有 1~3 个 KS 区域，这些区域具有底物偏好性，决定这

最终产物的链长^[80]，部分 KS 区域还能与缺失活性位点但结构与 KS 相似的链长因子（chain length factor, CLF）区域形成二聚体结构，催化不饱和酰基链的延伸。如破囊壶菌 PUFA 合成酶中的两个 KS 区域皆能互补大肠杆菌酮酰基-ACP 合成酶突变体（fabB）的表型，使突变体恢复不饱和脂肪酸的合成。而在大肠杆菌中表达两个 KS 区域发现，在 Subunit A 上的 KS 区域能提高长链脂肪酸的合成，而 Subunit B 上的 KS 区域能提高大肠杆菌脂肪酸的不饱和度，该结果指出 PUFA 合成酶的 KS 区域底物具有特异性。随后，日

本课题组将 *Photobacterium profundum* (产 EPA 菌) PUFA 合成酶的 KS 区域与 *Moritella marina* (产 DHA 菌) 的 KS 结构域进行互换, 发现替换了 *Moritella marina* KS 结构域的 *Photobacterium profundum* PUFA 合成酶也能合成 DHA, 进一步说明 KS 对 PUFA 合成酶的最终产物的碳链长度起决定性作用。

DH 结构域是合成 VLCPUFAs 上顺式双键的关键区域。根据序列分析, DH 区域分为两类, 一种是 PKS 型 DH 结构域, 另一种是 FabA 型 DH 结构域^[81,82]。大肠杆菌互补实验表明, 前者类似于 PKS 的 DH 区域, 催化羟酰基进行脱水反应, 从而在 α 和 β -碳之间引入反式双键; 后者类似于大肠杆菌羟酰基-ACP 脱水酶 (FabA), 催化底物脱水形成反式双键后, 还可以将构型从反式转换为顺式, 形成 VLCPUFA 的双键结构^[83]。体外实验更指出, PKS 型 DH 结构域对短链酰基链具有选择性, 从而决定最终脂肪酸的类型。如, 产 ω -6 脂肪酸的 *Aureispira marina* PKS 型 DH 结构域与 FabA 型 DH 结构域竞争 C6-Enoyl-ACP 结合, 而 *Moritella marina* PKS 型 DH 结构域优先与 C3-Enoyl-ACP 反应, 从而合成 ω -3 脂肪酸。两类 DH 结构域轮流作用于碳链的延伸和双键的导入合成, 之后 ER 将 Enoyl-ACP 上的反式双键还原为饱和 ACP, 完成一次碳链的延长, 如此循环往复多个反应使得多个顺式双键能形成在延伸的酰基链上。

除了这些关键域外, PUFA 合成酶中还要其他一些区域, 包括 MAT 域和 AT 域。MAT 结构域催化丙二酰 CoA 向丙二酰 ACP 转移, 并作为缩合反应的扩展单元^[84]。通过切割最终的酰基 ACP 的硫酯键, 释放游离脂肪酸。AT 结构域可以参与脂肪酸产生的最后步骤^[85]。

3 破囊壶菌属微生物中 TAG 的生物合成途径

VLCPUFAs 在破囊壶菌属微生物中的生物合成不仅涉及脂肪酸的催化合成, 而且还涉及这些脂肪酸如何整合组装到存储性脂质三酰基甘油 (triacylglycerol, TAG) 中。由 PUFA 合成酶合成的超长链多不饱和脂肪酸是以游离脂肪酸的形式从酶中释放出来^[60], 然后通过酰基 CoA 合成酶将新合成的脂肪酸活化为相应的硫酯, 才能进行细胞代谢和脂质储存装配^[86]。

现有的研究表明, 大量结合了 VLCPUFAs 的甘油脂积累在破囊壶菌属微生物 (如 *Thraustochytrium* sp.) 体内。这类甘油脂主要有: 磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰丝氨酸

(phosphatidylserine, PS)、磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol, PG) 和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 等极性脂类以及二酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 和三酰甘油等非极性脂类。极性脂是构成各种细胞器膜及细胞质膜的主要成分, 而非极性脂类是以 VLCPUFAs 为最终储存形式储存在生物体内。

3.1 破囊壶菌属微生物的甘油脂生物合成途径

3.1.1 酰基 CoA 依赖途径 (Kennedy 途径)

目前, 动植物合成甘油酯的途径可根据其是否利用酰基 CoA 分为酰基 CoA 依赖途径和非依赖酰基 CoA 途径。利用酰基 CoA 作为反应底物的途径, 又称为依赖酰基 CoA 途径 (即 Kennedy 途径)。Kennedy 途径主要存在于酵母和植物中, 是以 3-磷酸甘油 (glycerol-3-phosphate, G3P) 为底物, 在甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) 和溶血磷酸酯酰转移酶 (hemolyticacyltransferase, LPAT) 的催化下, 以酰基 CoA 为酰基供体, 将 G3P 酰基化成磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 在磷脂酸磷酸酯酶 (phosphatidic acid phosphatase, PAP) 的催化作用下, 将 PA 去磷酸化得到 DAG, 然后通过二酰基甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 在 sn-3 位与另一个酰基 CoA 酰基化得到 TAG^[87-89]。

3.1.2 非依赖酰基 CoA 途径

除了 Kennedy 途径外, 还有一个不依赖酰基 CoA 的独立途径, 通常以 DAG 作为底物, PC 作为酰基供体, 在磷脂: 二酰基甘油酰基转移酶 (phospholipid: diacylglycerol acyltransferase, PDAT) 的作用下将磷脂 (主要是 PC) sn-2 位上的酰基链转移到 DAG 的 sn-3 位置, 从而合成 TAG^[90,91]。

3.1.3 破囊壶菌属微生物的甘油脂生物合成机理研究进展

到目前为止, 在破囊壶菌中几乎所有参与磷脂和 TAG 生物合成的基因都通过基因组测序被鉴定出来^[92,93]。但大部分参与合成的基因仍未被功能验证, 只有 *Aurantiochytrium limacinum* F26-b 中参与 PC 合成的 PC 酰基转移酶 (LPCAT) 的功能得到了验证。最近的一些同位素标记实验表明^[87,88], 真核生物 TAG 中 VLCPUFAs 积累主要是由 PC 的合成水平决定的。加拿大萨省大学 Xiao Qiu 课题组^[92]首次通过 C¹⁴ 同位素示踪实验对 VLCPUFAs 在破囊壶菌 *Thraustochytrium*

sp. 26185 的甘油酯合成机理进行探索。研究发现, 该菌产生的 VLCPUFAs 首先积累到 PC 上, 随后以 DAG 作为媒介合成作为储存性脂质的 TAG。脂质的组分和结构分析表明, PC 上的脂肪酸组成与 PC 衍生而成的 DAG (即 PC-DAG) 和 TAG 上的组成和结构非常相似, VLCPUFAs 大多结合在甘油骨架 sn-2 的位置上。同时, 实验指出 PC 和 DAG 上的多不饱和脂肪酸含量随着时间推移逐步减少, 而 TAG 上的多不饱和脂肪酸含量却逐渐上升。随后, 武汉油料所万霞等^[93], 对裂殖壶菌不同生长阶段各类脂质含量、成分和结构进行组学分析, 其结果亦印证了这个观点。由此可以推断, 在破囊壶菌属微生物中 VLCPUFAs 可能是由 PC 通过 DAG 作为媒介转移到 TAG 上, 或直接从 PC 作为前体直接合成 TAG, 积累在体内。PC 上的多不饱和脂肪酸水平直接决定了储存性脂质 TAG 上的不饱和脂肪酸含量。但是, 至今为止, 仍没有具体的实验能够解释破囊壶菌属微生物上的 VLCPUFAs 是如何组装

到 TAG 上的, 需要对一系列参与该途径的基因进行克隆、表达和功能验证才能阐明这些 VLCPUFAs 脂质的合成机理。(图 6)

4 破囊壶菌属微生物开发与利用的探讨

破囊壶菌属微生物作为 VLCPUFAs 的主要生产者, 油脂含量相对较高, 可以作为 EPA、DHA 等功能油脂的潜在来源。但由于这些海洋微生物长期生活于海洋环境, 对培养条件要求较高。因此, 通过培养破囊壶菌属微生物提取 VLCPUFAs 方法来进行大批量功能油脂的生产, 不仅比用鱼油提取的成本更高而且产量也难以满足市场需求。如何利用破囊壶菌属微生物富含 VLCPUFAs 的特性来大量获取 EPA、DHA 等功能油脂为人类健康服务, 是值得我们深入研究探索的一个课题。随着现代生物科技的高速发展, 通过基因工程、酶工程、代谢工程和发酵技术等现代科技手段实现利用破囊壶菌属微生物高效获取 VLCPUFAs 指日可待。

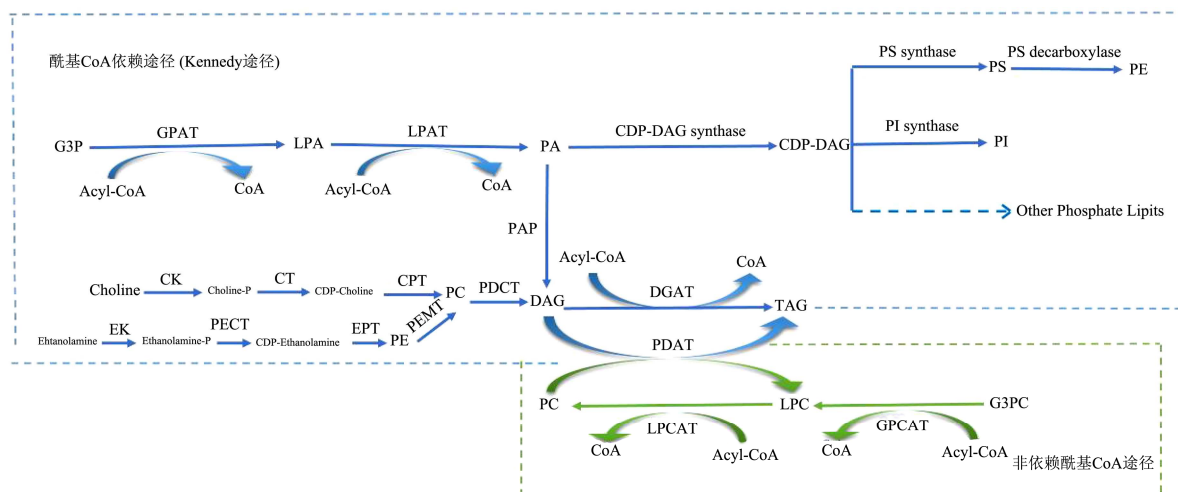


图 6 破囊壶菌属微生物甘油酯生物合成组装途径

Fig.6 Biosynthetic pathway of Thraustochytrids glycerolipid biosynthesis

注: ①酰基 CoA 依赖途径 (Kennedy 途径): acyl: 酰基; CoA: 辅酶 A; G3P: glycerol-3-phosphate, 甘油-3-磷酸; GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase, 甘油-3-磷酸酰基转移酶; LPA: lysophosphatidic acid, 溶血磷脂酸; LPAT: lysophosphatidic acid acyltransferase, 溶血磷脂酸酰基转移酶; PA: phosphatidic acid, 磷脂酸; synthase: 合成酶; DAG: diacylglycerol, 二酰甘油; PS: phosphatidyl serine, 磷脂酰丝氨酸; decarboxylase: 脱羧酶; PI: phosphatidyl inositol, 磷脂酰肌醇; Other Phosphate Lipids: 其他磷酸酯; PAP: phosphatidic acid phosphatase, 磷脂酸磷酸酶; Choline, 胆碱; CK: choline kinase, 胆碱激酶; Choline-P: 磷酸胆碱; CT: choline transferase, 胆碱转移酶; CDP-Choline: CDP-胆碱; CPT: choline phospho transferase, 二酰基甘油胆碱磷酸转移酶; PC: phosphatidylglycerol, 磷脂酰甘油; PDCT: phosphatidylcholine:diacylglycerol choline transferase, 磷脂酰胆碱:二酰甘油胆碱转移酶; DAG: diacylglycerol, 二酰甘油; DGAT: acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase, 二酰甘油酰基转移酶; TAG: triacylglycerols, 三酰甘油; Ethanolamine: 乙醇胺; EK: ethanolamine kinase, 乙醇胺激酶; Ethanolamine-P: 磷酸乙醇胺; P: 磷酸; PECT: phosphatidyl ethanolamine choline transferase, 磷脂酰乙醇胺胆碱转移酶; CDP-Ethanolamine: CDP-乙醇胺; EPT: ethanolamine phospho transferase, 乙醇胺磷酸转移酶; PE: phosphatidyl ethanolamine, 磷脂酰乙醇胺; PEMT: phosphatidyl ethanolamine methyltransferase, 磷脂酰乙醇胺甲基转移酶; PDAT: phospholipid diacylglycerol acyltransferase, 磷脂二酰甘油酰基转移酶; ②非依赖酰基 CoA 途径: G3PC: glycerol-3-phosphocholine, 甘油-3-磷酸胆碱; GPCAT: glycerol-3-phosphocholine acyltransferase, 甘油磷酸胆碱转移酶; LPC: Lysolecithin, 溶血卵磷脂; LPCAT: acyl-CoA:lysophosphatidyl choline acyltransferase, 溶血卵磷脂转移酶。

4.1 通过转基因工程菌生产 DHA

目前来说,利用破囊壶菌进行商业化生产还需要克服一系列的挑战。首先,破囊壶菌属微生物需要成本较高的培养基。此外,海洋微生物的繁殖会受到其他物种和病原体的污染,从而影响生长。其三,环境温度对破囊壶菌属微生物中 DHA 的生产也有很大的影响,如裂殖壶菌在较低温度下 DHA 产量明显高于正常生长温度,因为裂殖壶菌中涉及糖代谢和中长链脂肪酸代谢的关键基因受到低温抑制,而合成 DHA 的关键酶却没有受到温度调控,低温更适合 DHA 在裂殖壶菌中积累,因此,培养破囊壶菌属微生物需要特定控温设施^[94]。利用天然海洋微生物生产 DHA 的效率和商业价值都不高。如今,利用工程菌结合代谢工程生产 DHA 具有常规微生物培养不可比拟的优势:包括能高密度发酵生产、培养基成本低和不需要特定的控温设施。因此,通过代谢工程将破囊壶菌中参与 VLCPUFAs 合成的关键酶基因转入能高密度、低能耗发酵的工程菌中将会是生产 VLCPUFA 新的来源^[95]。

除此以外,向工程菌转入 PUFA 合成酶,构建无氧合成途径,也能使工程菌合成功能油脂。Orikasa 等^[74]将 *Moritella marina* MP-1 中 DHA 生物合成基因簇 (pDHA3) 包括基因: *pfaA*、*pfaB*、*pfaC*、*pfaD* 和 *pfaE* 在大肠杆菌中共表达,在 15 °C 下培养能生产占总脂肪酸产量 5% 的 DHA^[97]。四年后,另一项研究指出^[95],将 *Shewanella baltica* MAC1 的 PUFA 合成酶在大肠杆菌中异源表达能够在体内产生 EPA 和 DHA。尽管可以通过将编码 PUFA 合成酶的基因在大肠杆菌中表达,合成 EPA 和 DHA,但大肠杆菌作为未被确定为食品级 (Food grade, FG) 微生物,不能直接用于食品工业中。乳酸菌属于 FG 微生物并且能表达 PUFA 合成酶基因,因此,通过 PUFA 合成酶在乳酸菌表达

而合成 EPA 和 DHA 的方法,将有可能成为获得 VLCPUFAs 新的规模化生产途径。为此,Amiri-Jami^[96]将来自 *Shewanella baltica* MAC1 的基因簇引入乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 中,该重组菌能产生 1.35±0.5 mg/g 的 DHA 和 0.12±0.04 mg/g 的 EPA^[98]。该实验为后期开发产 EPA/DHA 的乳酸菌作为乳品发酵剂、青贮饲料添加剂和动物饲料添加剂提供了前期研究基础。

4.2 转基因油料作物生产 VLCPUFAs

油料作物,如油菜、大豆具有包括油酸、亚油酸等的多不饱和脂肪酸。近年来,将微生物基因应用到植物中,经代谢工程合成 VLCPUFAs 在作物的改良生产方面具有一定的突破。Wu 等^[99]尝试通过在油菜中异源表达 9 个来源于破囊壶菌 *Thraustochytrium* sp. 26185 等微生物的基因 (包括: $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 和 $\omega 3$ 去饱和酶、延长酶和酰基转移酶) 构建 DHA 生物合成途径。实验结果表明,转基因油菜籽油中含有 2% 的 DHA,证明在植物中表达有氧合成途径的关键基因具有实现 DHA 等功能油脂在油料作物中的大规模生产的可能性^[99]。随后,科学家对转基因植物中的关键基因进行优化、尝试在 *Brassica napus* 和 *Camelina sativa* 等油料作物中合成 EPA、DHA,获得了一系列能生产功能油脂的转基因油料作物,并不断提高其产量^[99-103]。虽然现在利用有氧合成途径在转基因油菜籽作物中合成的 DHA 水平能达到总脂的 12%,但由于去饱和酶和延长酶对脂酰基底物的特异性,造成转基因油料作物还会产生一些中间体脂肪酸,如硬脂酸、GLA 和 ETA 等^[101,102],需要后期通过纯化等方法去除,造成生产成本增加。除外,可能由于两种类型酶的蛋白不相容性或者表达水平不一致,导致最终产物产量降低,不能最大限度地生产目的功能油脂。

表 4 利用破囊壶菌基因在工程菌中合成 VLCPUFAs

Table 4 Production of VLCPUFAs in microbes through introducing genes from Thraustochytrids

工程菌	插入基因	产物	产量	文献
<i>Pichia pastoris</i>	<i>TaA9-ELO</i>	ARA	38.57%	[39]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>TaC18/20-ELO</i>	EPA	40%	[96]
<i>Escherichia coli</i>	<i>TcPPTase</i> and <i>TcSubunit-A</i> 、 <i>TcSubunit-B</i> 、 <i>TcSubunit-C</i>	DHA、DPA	18%	[13]
<i>Escherichia coli</i>	<i>MmpfaA</i> 、 <i>MmpfaB</i> 、 <i>MmpfaC</i> 、 <i>MmpfaD</i> 、 <i>MmpfaE</i>	DHA	5%	[97]
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	<i>SbpfaA</i> 、 <i>SbpfaB</i> 、 <i>SbpfaC</i> 、 <i>SbpfaD</i> 、 <i>SbpfaE</i>	EPA	1.35±0.5 mg/g (DHA); 0.12±0.04 mg/g (EPA)	[98]

注: ELO: elongase, 延长酶; DES: desaturase, 去饱和酶; *Ta*: *Thraustochytrium aureum*, 破囊壶菌; *Tc*: *Thraustochytrium* sp., 破囊壶菌属; *PPTase*: phosphopantetheinyl transferase, 磷酸酯基转移酶; Subunit: 亚单元; *Mm*: *Moritella marina*; *Sb*: *Shewanella baltica*; EPA: eicosapentaenoic acid, 二十碳五烯酸; DPA: docosapentaenoic acid, 二十二碳五烯酸; DHA: docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸; ARA: arachidonic acid, 花生四烯酸。

表 5 转基因植物合成 VLCPUFAs

Table 5 VLCPUFAs produced in plants

物种	基因	产物	产量	文献
<i>Brassica juncea</i>	$\Delta 5$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\Delta 4$ -ELO、 $\Delta 5$ -ELO、 $\Delta 6$ -ELO	ARA	9.7%	[99]
<i>Camelina sativa</i>	$\Delta 6$ -DES	DHA	12%	[100,101]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$\Delta 6$ -DES、 $\Delta 6$ -ELO、 $\Delta 5$ -ELO	DHA	15%	[102]
<i>Brassica napus</i>	Subunit A、Subunit B、Subunit C	DHA	3.7%	[103]

注: ELO: elongase, 延长酶; DES: desaturase, 去饱和酶; Subunit: 亚单元; ARA: arachidonic acid, 花生四烯酸; DHA: docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸。

表 6 基因改造破囊壶菌属微生物基因改造汇总表

Table 6 Summary table of genetic modification of *Thraustochytrids* microorganisms

物种	基因	产物	产量	文献
<i>Schizochytrium</i> sp.	CAA、 $\Delta 4$ -ELO	DHA	增加了 1.39 倍	[104]
<i>Schizochytrium limacinum</i>	Subunit C-ER (基因敲除)	EPA	提高了 53.38%	[105]
<i>Aurantiochytrium</i>	PPTase	DHA	提高了 53.9%	[106]
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	G6PDH	DHA	提高了 20%	[107]
<i>Schizochytrium</i> sp.	$\omega 3$ -DES	DHA	提高了 3%	[108]

注: CAA: acetyl-CoA carboxylase, 乙酰辅酶 A 羧化酶; ELO: elongase, 延长酶; Subunit: 亚单元; ER: enoyl carrier protein reductase, 烯酰基载体蛋白还原酶; PPTase: Phosphopantetheinyl transferase, 磷酸酯基转移酶; G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶; DES: desaturase, 去饱和酶; DHA: docosahexaenoic acid, 二十二碳六烯酸; EPA: eicosapentaenoic acid, 二十碳五烯酸。

近年来, 科学家尝试在植物中构建无氧合成途径, 以期获得较为纯净的功能油脂产物。Walsh 等^[103]将裂殖壶菌 *Schizochytrium* ATCC PTA 9695 中编码 PUFA 合酶的三个开放阅读框基因通过农杆菌转入甘蓝型油菜 *Brassica napus* (Canola) 中, 构建无氧合成途径, 在转基因油菜中成功生产占总脂 0.7% 的 EPA 和 3.7% 的 DHA。虽然 PUFA 合酶能成功在油料作物中合成 EPA 和 DHA, 但是其产量远远不足以用于功能油脂的大规模生产, DHA 产量低可能是由于转基因植物中异源 PUFA 合酶的活性低。因此, 后续可能需要通过提高油料种子中 PUFA 合酶的活性来进一步优化 DHA 的催化途径 (表 4)。

4.3 利用基因工程技术改造破囊壶菌属微生物提高 VLCPUFAs 的产量

遗传修饰策略常用于发酵领域, 旨在通过代谢工程方法提高天然菌株中目标产物的产量。该策略已广泛应用于转基因微生物和植物中, 通过生物合成途径相关基因的过表达或诱变, 以及敲除参与竞争途径的基因来增强某些特定产物。

近年来, 科学家也陆续尝试通过遗传修饰策略改造破囊壶菌属微生物, 提高其 VLCPUFAs 的产量。如, Wang 等^[104]将微藻 *Cryptocodinium cohnii* 的苹果酸酶

在裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S31 中进行超表达, 提高 NADPH 的供应, 同时超表达土壤真菌 *Mortierella alpina* 延长酶 ($\Delta 3$ -DES) 来抑制脂肪酸合成酶中乙酰 CoA 羧化酶的活性, 进而提升 DHA 的产量。结果表明, 转基因裂殖壶菌中 DHA 的产量相对于野生菌株提升了 1.39 倍, 达到了 3.54 g/L, 大大提高了 DHA 的生产效率。Ling 等^[105]尝试把裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. SR21 中 PUFA 合成酶 Subunit C 上的 ER 敲除, 发现裂殖壶菌突变体的总不饱和脂肪酸, 尤其是 EPA 和 DHA 的产量提高了 50% 以上, 明显高于野生菌, 证明改造 PUFA 合成酶的催化结构域能改变 VLCPUFAs 的产量。Wang 等^[106]在破囊壶菌 *Aurantiochytrium* sp. 中超表达 PUFA 合成酶型磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (phosphopantetheinyl transferase, PPTase), 成功提高 53.9% 的 DHA 产量。此外, 还有很多成功超表达 VLCPUFA 相关合成途径提高关键脂肪酸的产量的案例^[107,108] (表 5)。

5 总结与展望

5.1 随着对 VLCPUFAs (特别是 ARA、EPA 和 DHA) 等在维护生物膜结构和功能、提高机体免疫力、促进生长发育、调节脂类代谢、减少心血管疾病发病率等作用的逐渐深入了解, 全球市场对这些脂肪酸的需求量也日益增加, 因此, 开发富含 ARA、EPA 和 DHA

的油脂来源迫在眉睫。海洋鱼类如鲑鱼、鳕鱼、鲱鱼等是 VLCPUFAs 的传统来源,然而,由于全球气候变暖、海洋环境污染和过度捕捞等因素的影响,海洋鱼类资源日渐减少,通过捕捞海洋鱼类获得 VLCPUFAs 的传统生产方式不仅大量消耗海洋鱼类资源,影响海洋生态,而且也难以满足日益增长的市场需求。因此,筛选富含 ARA、EPA 和 DHA 的海洋微生物资源并挖掘其合成这些脂质的关键基因,并利用现代生物科技,构建转基因微生物和油料作物,通过定向表达特定基因,实现 EPA 和 DHA 等制品的高效合成,具有一定的应用前景。

5.2 破囊壶菌是一种广泛分布于全球海域的海洋原生生物,其具有生长周期较短、培养简单且能合成 EPA、DPA 和 DHA 的特点。自 1989 年澳大利亚科学家首次发现破囊壶菌能积累 DHA 以来,科学家们对破囊壶菌中 VLCPUFAs 的生物合成途径开展了研究,对该壶菌 EPA、DPA 和 DHA 的生物合成及其甘油酯的组装途径已有一定了解,部分参与 VLCPUFAs 合成和组装途径的关键基因已被分析、克隆和功能鉴定,为后续利用现代生物科技,定向表达该类基因,实现 EPA 和 DHA 等制品的高效合成奠定了基础。

5.3 尽管破囊壶菌以及其他海洋微生物具有生产 VLCPUFAs 的能力,但它们的生长速度和产量相对较低,且需要昂贵的培养条件,难以应用于工业大规模生产。因此,近年来,通过在工程微生物或油料作物中重构异源 VLCPUFA 有氧/无氧生物合成途径或对天然微生物进行基因改造,已取得一定进展。然而,在应用天然或异源宿主来生产 VLCPUFAs 时,其产量可能会受到一些代谢瓶颈的限制。第一,酰基-PC 库与酰基-CoA 库之间的酰基转换效率是影响 EPA、DHA 最终产量的关键。在有氧合成途径中,饱和酶和延长酶的底物并不兼容,延长酶需要利用酰基-CoA 作为底物而去饱和酶则是利用酰基-PC,因此,在 VLCPUFAs 合成过程中 PC 和 CoA 库之间的酰基转换非常频繁。但很多工程菌和油料作物中的多不饱和酰基转移酶工作效率远低于海洋微生物,导致多不饱和酰基无法高效地在两种底物之间转换,从而影响最终产物的合成效率。一些研究也指出,VLCPUFAs 的有氧合成途径和储存脂质合成途径与 VLCPUFA-CoA 存在竞争关系,也会导致最终产物的合成水平。同时,一些利用 PUFA 合成酶在植物中构建无氧合成途径的研究指出,由于 PUFA 合成酶与脂肪酸合成酶竞争丙酮酸、NADPH 等底物,导致 PUFA 合成酶底物不足,影响 DHA 的产量。有些研究也指出由于 PUFA 合成酶是一个巨型合成酶,编码其表达的基因超过 20 万个碱基,

导致其编码基因在异源微生物和植物中表达水平低,从而影响其对 DHA 的合成效率。

5.4 因此,针对当下 VLCPUFAs 代谢工程合成过程中的瓶颈问题,一些潜在的策略可能适用于 VLCPUFA 的合成工程:(1)增加合成前体的生成;(2)抑制 VLCPUFA 合成的竞争途径;(3)通过更换启动子或增加目的基因的拷贝数增加相关合成酶的表达水平;(4)减少编码 PUFA 合成酶基因的长度,只保留关键功能区域,增加合成酶的表达水平;(5)选择适合 VLCPUFAs 合成和组装的关键基因进行表达。通过不断挖掘、优化 VLCPUFAs 的替代来源,符合国家对“大健康”产业的发展方向,对摆脱该产业对海洋鱼类的高度依赖,推动产业向生态、环保、优质方向发展,促进海洋生物资源的保护和利用,具有重要意义(图 7)。

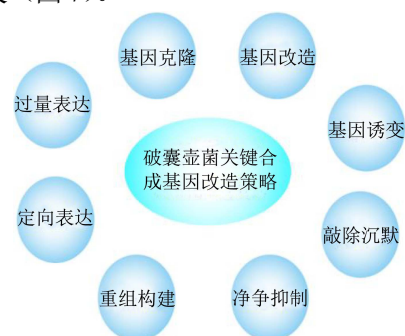


图 7 破囊壶菌属微生物关键合成基因的改造策略

Fig.7 Strategies for genetical modification of *Thraustochytrids*

参考文献

- [1] Drevon C A. Fatty acids: structures and properties [J]. Encyclopedia of Life Sciences, DOI:10.1038/npg.els.0003894
- [2] 李飙,马海明. MicroRNA 调控多不饱和脂肪酸合成关键酶研究进展[J]. 猪业科学, 2020, 37(6): 106-111
LI Biao, MA Haiming. Advances in MicroRNA regulating polyunsaturated fatty acid synthase [J]. Swine Industry Science, 2020, 37(6): 106-111
- [3] 杨晓辉,贾晓强. 寇氏隐甲藻生产 DHA 的研究进展[J]. 应用化工, 2020, 49(12): 3126-3131
YANG Xiaohui, JIA Xiaoqiang. Progress in production of docosahexaenoic acid by *Cryptothecodinium cohnii* [J]. Applied Chemical Industry, 2020, 49(12): 3126-3131
- [4] Qiu X, Xie X, Meesapyodsuk D. Molecular mechanisms for biosynthesis and assembly of nutritionally important very long chain polyunsaturated fatty acids in microorganisms [J]. Progress in Lipid Research, 2020, 79: 101047
- [5] Bazan N G. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived

- mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress [J]. *Brain Pathology*, 2005, 15(2): 159-166
- [6] 牛艳.绿色巴夫藻多不饱和脂肪酸合成关键酶基因的克隆表达及功能研究[D].青岛:山东大学,2008
- NIU Yan. Identification, characterization and expression of the key enzyme genes in biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in *Pavlova viridis* [D]. Qingdao: Shandong University, 2008
- [7] 孙美莉,刘虎虎,邬文嘉,等.代谢工程改造酵母生产多不饱和脂肪酸的研究进展[J].化工进展,2016,35(3):872-878
- SUN Meili, LIU Huhu, WU Wenjia, et al. Metabolic engineering of yeast to produce polyunsaturated fatty acids [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(3): 872-878
- [8] Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(4): 905-915
- [9] Gemperlein K, Rachid S, Garcia R O, et al. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in myxobacteria: different PUFA synthases and their product diversity [J]. *Chemical Science*, 2014, 5(5): 1733
- [10] Fossier M L, Lee C K, Nichols P D, et al. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: a review [J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 26-46
- [11] Gupta A, Barrow C J, Puri M. Omega-3 biotechnology: thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1733-1745
- [12] Morabito C, Bournaud C, Maës C, et al. The lipid metabolism in thraustochytrids [J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 76: 101007
- [13] Meesapyodsuk D, Qiu X. Biosynthetic mechanism of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. 26185 [J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(10): 1854-1864
- [14] 叶会科,王秋珍,何耀东,等.破囊壶菌发酵生产DHA的研究进展[J].化工进展,2020,39(8):3235-3245
- YE Huike, WANG Qiuzhen, HE Yaodong, et al. Research progress in DHA production by thraustochytrids [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2020, 39(8): 3235-3245
- [15] Ren L, Chen S, Geng L, et al. Exploring the function of acyltransferase and domain replacement in order to change the polyunsaturated fatty acid profile of *Schizochytrium* sp [J]. *Algal Research*, 2018, 29: 193-201
- [16] 杨浩,金小琬,唐嘉淇,等.裂殖壶菌合成二十二碳六烯酸机理研究进展[J].中国油脂,2019,44(8):109-115
- YANG Hao, JIN Xiaowan, TANG Jiaqi, et al. Progress in mechanism of docosahexaenoic acid synthesis by *Schizomyces* [J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(8): 109-115
- [17] Lee Chang K J, Dunstan G A, Abell G C J, et al. Biodiscovery of new *Australian thraustochytrids* for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 2215-2231
- [18] Lee Chang K J, Nichols C M, Blackburn S I, et al. Comparison of *Thraustochytrids aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel, long-chain omega-3 oils, and exopolysaccharide [J]. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(4): 396-411
- [19] Dellero Y, Cagnac O, Rose S, et al. Proposal of a new *thraustochytrid* genus *Hondaea* gen. nov. and comparison of its lipid dynamics with the closely related pseudo-cryptic genus *Aurantiochytrium* [J]. *Algal Research*, 2018, 35: 125-141
- [20] Leong H Y, Su C, Lee B, et al. Development of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 cultivation using salt-rich waste feedstock for docosahexaenoic acid production and application of natural colourant in food product [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 30-36
- [21] Volkman J K, Jeffrey S W, Nichols P D, et al. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture [J]. *Elsevier*, 1989, 128(3): 219-240
- [22] Blacklock B J, Jaworski J G. Studies into factors contributing to substrate specificity of membrane-bound 3-ketoacyl-CoA synthases [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(19): 4789-4798
- [23] Vrinten P L, Hoffman T, Bauer J, et al. Specific protein regions influence substrate specificity and product length in polyunsaturated fatty acid condensing enzymes [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(18): 3879-3886
- [24] James D J, Lim E, Keller J, et al. Directed tagging of the *Arabidopsis* fatty acid elongation1 (FAE1) gene with the maize transposon activator [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(3): 309-319
- [25] Kajikawa M, Yamato K T, Kohzu Y, et al. Isolation and characterization of delta(6)-desaturase, an ELO-like enzyme and delta(5)-desaturase from the liverwort *Marchantia polymorpha* and production of arachidonic and

- eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54(3): 335-352
- [26] Jakobsson A, Westerberg R, Jakobsson A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism [J]. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(3): 237-249
- [27] Zhang J Y, Kothapalli K S D, Brenna J T. Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2016, 19(2): 103-110
- [28] Oh C S, Toke D A, Mandala S, et al. ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(28): 17376-17384
- [29] Dolch L, Rak C, Perin G, et al. A palmitic acid elongase affects eicosapentaenoic acid and plastidial monogalactosyl diacylglycerol levels in *Nannochloropsis* [J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(1): 742-759
- [30] Meesapyodsuk D, Ye S, Chen Y, et al. An engineered oilseed crop produces oil enriched in two very long chain polyunsaturated fatty acids with potential health-promoting properties [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 192-200
- [31] Uttaro A. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes [J]. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life*, 2006, 58(10): 563-571
- [32] Chen R, Matsui K, Ogawa M, et al. Expression of $\Delta 6$, $\Delta 5$ desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds [J]. *Plant Science*, 2006, 170(2): 399-406
- [33] Domergue F, Abbadi A, Zahringer U, et al. *In vivo* characterization of the first acyl-CoA $\Delta 6$ -desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri* [J]. *Biochemical Journal*, 2005, 389(Pt 2): 483-490
- [34] Lippmeier J C, Crawford K S, Owen C B, et al. Characterization of both polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathways in *Schizochytrium* sp [J]. *Lipids*, 2009, 44(7): 621-630
- [35] Sakuradani E, Nojiri M, Suzuki H, et al. Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(4): 709-716
- [36] Zhang J Y, Kothapalli K S D, Brenna J T. Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2016, 19(2): 103-110
- [37] Ohara J, Sakaguchi K, Okita Y, et al. Two fatty acid elongases possessing C18-Delta6/C18-Delta9/C20-Delta5 or C16-Delta9 elongase activity in *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185 [J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(4): 476-486
- [38] Ohara J, Sakaguchi K, Okita Y, et al. Two fatty acid elongases possessing C18-Delta6/C18-Delta9/C20-Delta5 or C16-Delta9 elongase activity in *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185 [J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(4): 476-486
- [39] Lee J, Anbu P, Kim W, et al. Identification of $\Delta 9$ -elongation activity from *Thraustochytrium aureum* by heterologous expression in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13(5): 524-532
- [40] Liang L, Zheng X, Fan W, et al. Genome and transcriptome analyses provide insight into the omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis of *Schizochytrium limacinum* SR21 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 687
- [41] Jakobsen A N, Aasen I M, Josefsen K D, et al. Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain T66: effects of N and P starvation and O₂ limitation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(2): 297-306
- [42] Sperling P, Ternes P, Zank T K, et al. The evolution of desaturases [J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003, 68(2): 73-95
- [43] Sakuradani E, Abe T, Matsumura K, et al. Identification of mutation sites on $\Delta 12$ desaturase genes from *Mortierella alpina* 1S-4 mutants [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(2): 99-101
- [44] Shi Y, Yue X, An L. Integrated regulation triggered by a cryophyte omega-3 desaturase gene confers multiple-stress tolerance in tobacco [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2018, 69(8): 2131-2148
- [45] Matsuda T, Sakaguchi K, Hamaguchi R, et al. Analysis of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of PUFAs in *T. aureum* ATCC 34304 [J]. *Journal of Lipid Research*, 2012, 53(6): 1210-1222
- [46] Chen G, Qu S, Wang Q, et al. Transgenic expression of $\Delta 6$ and $\Delta 15$ fatty acid desaturases enhances omega-3 polyunsaturated fatty acid accumulation in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Biotechnology of Biofuels*, 2014, 7(1): 32
- [47] Bai Y, McCoy J G, Levin E J, et al. X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase [J]. *Nature*, 2015,

- 524(7564): 252-256
- [48] Los D A, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases [J]. Netherlands: Elsevier Besloten Vennootschap, 1998, 1394: 3-15
- [49] Wang H, Klein M G, Zou H, et al. Crystal structure of human stearoyl-coenzyme a desaturase in complex with substrate [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, 22(7): 581-585
- [50] Frédéric D, Amine A, Ulrich Z, et al. *In vivo* characterization of the first acyl-CoA 6 -desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri* [J]. Biochemical Journal, 2005, 2(389): 483-490
- [51] Nagano N, Sakaguchi K, Taoka Y, et al. Detection of genes involved in fatty acid elongation and desaturation in thraustochytrid marine eukaryotes [J]. Journal of Oleo Science, 2011, 60(9): 475-481
- [52] Kobayashi T, Sakaguchi K, Matsuda T, et al. Increase of eicosapentaenoic acid in thraustochytrids through thraustochytrid ubiquitin promoter-driven expression of a fatty acid $\Delta 5$ desaturase gene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3870-3876
- [53] Ren L, Zhuang X, Chen S, et al. Introduction of ω -3 desaturase obviously changed the fatty acid profile and sterol content of *Schizochytrium* sp [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9770-9776
- [54] Zhao X, Dauenpen M, Qu C, et al. Genomic analysis of genes involved in the biosynthesis of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. 26185 [J]. Lipids, 2016, 51(9): 1065-1075
- [55] Liang Y, Liu Y, Tang J, et al. Transcriptomic profiling and gene disruption revealed that two genes related to PUFAs/DHA biosynthesis may be essential for cell growth of *Aurantiochytrium* sp [J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 310
- [56] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production [J]. Biochimie, 2004, 86(11): 807-815
- [57] Ren L, Hu X, Zhao X, et al. Transcriptomic analysis of the regulation of lipid fraction migration and fatty acid biosynthesis in *Schizochytrium* sp [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 3562
- [58] Liang Y, Liu Y, Tang J, et al. Transcriptomic profiling and gene disruption revealed that two genes related to PUFAs/DHA biosynthesis may be essential for cell growth of *Aurantiochytrium* sp [J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 310
- [59] Ye J, Liu M, He M, et al. Illustrating and enhancing the biosynthesis of astaxanthin and docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium* sp. SK4 [J]. Marine Drugs, 2019, 17(1): 45
- [60] Metz J G, Kuner J, Rosenzweig B, et al. Biochemical characterization of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Schizochytrium*: release of the products as free fatty acids [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47(6): 472-478
- [61] Kazunaga Y. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria [J]. Lipids, 1996, 31(1)
- [62] Takeyama H, Takeda D, Yazawa K, et al. Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp [J]. Microbiology, 1997, 143(8): 2725-2731
- [63] Zhou X, Robert S S, Petrie J R, et al. Isolation and characterization of genes from the marine microalga pavlova salina encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis [J]. Phytochemistry, 2007, 68(6): 785-796
- [64] Okuyama H, Orikasa Y, Nishida T, et al. Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(3): 665-670
- [65] Orikasa Y, Nishida T, Yamada A, et al. Recombinant production of docosahexaenoic acid in a polyketide biosynthesis mode in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(22): 1841-1847
- [66] Ujihara T, Nagano M, Wada H, et al. Identification of a novel type of polyunsaturated fatty acid synthase involved in arachidonic acid biosynthesis [J]. FEBS letters, 2014, 588(21): 4032-4036
- [67] Shulze C N, Allen E E, Gilbert J A. Widespread occurrence of secondary lipid biosynthesis potential in microbial lineages [J]. PloS One, 2011, 6(5): e20146
- [68] Tanaka M, Ueno A, Kawasaki K, et al. Isolation of clustered genes that are notably homologous to the eicosapentaenoic acid biosynthesis gene cluster from the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Vibrio marinus* strain MP-1 [J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(11): 939-945
- [69] Liu Z, Zang X, Cao X, et al. Cloning of the pks3 gene of *Aurantiochytrium limacinum* and functional study of the 3-ketoacyl-ACP reductase and dehydratase enzyme domains [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e208853
- [70] Gemperlein K, Dietrich D, Kohlstedt M, et al. Polyunsaturated fatty acid production by *Yarrowia lipolytica* employing designed myxobacterial PUFA synthases [J]. Nat Commun, 2019, 10: 4055

- [71] Lippmeier J C, Crawford K S, Owen C B, et al. Characterization of both polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathways in *Schizochytrium* sp [J]. *Lipids*, 2009, 44(7): 621-630
- [72] Allen E E, Bartlett D H. Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9 [J]. *Microbiology*, 2002, 148(6): 1903-1913
- [73] Amiri-Jami M, LaPointe G, Griffiths M W. Engineering of EPA/DHA omega-3 fatty acid production by *Lactococcus lactis* sub sp. cremoris MG1363 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3071-3080
- [74] Orikasa Y, Nishida T, Hase A, et al. A phosphopantetheinyl transferase gene essential for biosynthesis of n-3 polyunsaturated fatty acids from *Moritella marina* strain MP-1 [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(18): 4423-4429
- [75] Katja G, Gregor Z, Hubert S B, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for production of docosahexaenoic acid based on a myxobacterial PUFA synthase [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 33: 98-108
- [76] Allemann M N, Allen E E. Genetic regulation of the bacterial omega-3 polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway [J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(16)
- [77] Chen X, He Y, Ye H, et al. Different carbon and nitrogen sources regulated docosahexaenoic acid (DHA) production of *Thraustochytriidae* sp. PKU#SW8 through a fully functional polyunsaturated fatty acid (PUFA) synthase gene (pfaB) [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124273
- [78] Gentile G, Bonasera V, Amico C, et al. *Shewanella* sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic antarctic bacterium producing polyunsaturated fatty acids [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(5): 1124-1133
- [79] Allen E E, Bartlett D H. Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9 [J]. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 6): 1903-1913
- [80] Xie X, Meesapyodsuk D, Qiu X. Ketoacyl synthase domains of a polyunsaturated fatty acid synthase in *Thraustochytrium* sp. strain ATCC 26185 can effectively function as stand-alone enzymes in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(9): e03113-16
- [81] Leesong M, Henderson B S, Gillig J R, et al. Structure of a dehydratase-isomerase from the bacterial pathway for biosynthesis of unsaturated fatty acids: two catalytic activities in one active site [J]. *Structure*, 1996, 4(3): 253-264
- [82] Li Y, Dodge G J, Fiers W D, et al. Functional characterization of a dehydratase domain from the pikromycin polyketide synthase [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(22): 7003-7006
- [83] Xie X, Meesapyodsuk D, Qiu X. Functional analysis of the dehydratase domains of a PUFA synthase from *Thraustochytrium* in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 847-856
- [84] Maier T. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution [J]. *Science*, 2006, 311(5765): 1258-1262
- [85] Lomakin I B, Xiong Y, Steitz T A. The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 319-332
- [86] Ellis J E, Parker L, Cho J, et al. Activin signaling functions upstream of Gbb to regulate synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction [J]. *Developmental Biology*, 2010, 342(2): 121-133
- [87] Bates P D, Browse J. The pathway of triacylglycerol synthesis through phosphatidylcholine in *Arabidopsis* produces a bottleneck for the accumulation of unusual fatty acids in transgenic seeds [J]. *The Plant Journal*, 2011, 68(3): 387-399
- [88] Bates P D, Durrett T P, Ohlrogge J B, et al. Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(1): 55-72
- [89] McMaster C R. From yeast to humans-roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(8): 1256-1272
- [90] Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(12): 6487-6492
- [91] Yoon K, Han D, Li Y, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3708-3724
- [92] Zhao X, Qiu X. Very long chain polyunsaturated fatty acids accumulated in triacylglycerol are channeled from phosphatidylcholine in *Thraustochytrium* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 645
- [93] Yue XH, Chen WC, Wang ZM, et al. Lipid distribution

- pattern and transcriptomic insights revealed the potential mechanism of docosahexaenoic acid traffics in *Schizochytrium* sp. A-2 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(34): 9683-9693
- [94] Hu F, Clevenger A L, Zheng P, et al. Low-temperature effects on docosahexaenoic acid biosynthesis in *Schizochytrium* sp. TIO01 and its proposed underlying mechanism [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1):172
- [95] Moss C W, Shinoda T, Samuels J W. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1982, 16(6): 1073-1079
- [96] Xue Z, Sharpe P L, Hong S, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 734-740
- [97] Amiri-Jami M, Griffiths M W. Recombinant production of omega-3 fatty acids in *Escherichia coli* using a gene cluster isolated from *Shewanella baltica* MAC1 [J]. Journal of Applied Biomechanics, 2010, 109(6): 1897-1905
- [98] Amiri-Jami M, Lapointe G, Griffiths M W. Engineering of EPA/DHA omega-3 fatty acid production by *Lactococcus lactis* sub sp. *cremoris* MG1363 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(7): 3071-3080
- [99] Wu G, Truksa M, Datla N, et al. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants [J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(8): 1013-1017
- [100] Petrie J R, Shrestha P, Zhou X R, et al. Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49165
- [101] Pouvreau B, Vanhercke T, Singh S. From plant metabolic engineering to plant synthetic biology: the evolution of the design/build/test/learn cycle [J]. Plant Science, 2018, 273: 3-12
- [102] Shrestha P, Hussain D, Mulder R J, et al. Increased DHA production in seed oil using a selective lysophosphatidic acid acyltransferase [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1234
- [103] Walsh T A, Bevan S A, Gachotte D J, et al. Canola engineered with a microalgal polyketide synthase-like system produces oil enriched in docosahexaenoic acid [J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 881-887
- [104] Wang F, Bi Y, Diao J, et al. Metabolic engineering to enhance biosynthesis of both docosahexaenoic acid and odd-chain fatty acids in *Schizochytrium* sp. S31 [J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 141
- [105] Ling X, Zhou H, Yang Q, et al. Functions of enolreductase (ER) domains of PKS cluster in lipid synthesis and enhancement of PUFAs accumulation in *Schizochytrium limacinum* SR21 using triclosan as a regulator of ER [J]. Microorganisms, 2020, 8(2):300
- [106] Wang S, Lan C, Wang Z, et al. PUFA-synthase-specific PPTase enhanced the polyunsaturated fatty acid biosynthesis via the polyketide synthase pathway in *Aurantiochytrium* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1):152
- [107] Cui G, Ma Z, Liu Y, et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhanced the polyunsaturated fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. SD116 [J]. Algal Research, 2016, 19: 138-145
- [108] Sun X M, Ren L J, Zhao Q Y, et al. Enhancement of lipid accumulation in microalgae by metabolic engineering [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019, 1864(4): 552-566

(上接第 95 页)

- [26] 刘彬.不同温度和湿度下赭曲霉菌在葡萄干表面的生长和赭曲霉毒素A的积累[J].食品研究与开发,2010,31(10):174-177
- LIU Bin. Growth of ochratoxin A on raisins surface at different temperatures and humidity [J]. Food Research and Development, 2010, 31(10): 174-177
- [27] 陈存坤,高芙蓉,冯叙桥,等.杏贮藏过程中主要致病菌的分离与鉴定[J].保鲜与加工,2014,14(6):30-33
- CHEN Cunkun, GAO Furong, FENG Xuqiao, et al. Isolation and identification of main pathogenic bacteria in apricot during storage [J]. Preservation and Processing, 2014, 14(6): 30-33
- [28] 吴思雅,阿衣木古丽·艾赛提,郑灿龙,等.新疆赛买提杏采后主要病原真菌的分离及鉴定[J].食品工业科技,2016,37(1): 149-152
- WU Siya, AYIMUGULI Aisaiti, ZHENG Canlong, et al. Isolation and identification of main pathogenic fungi from postharvest Saimaiti apricot in Xinjiang [J]. Food Industry Technology, 2016, 37(1): 149-152
- [29] 袁乙平.青梅致腐霉菌的分离纯化及臭氧抑菌机理研究[D].成都:西华大学,2020
- YUAN Yiping. Isolation and purification of *Pythium* from *Prunus mume* and study on the mechanism of ozone inhibition [D]. Chengdu: Xihua University, 2020