

促进微生物生产多不饱和脂肪酸的研究

张 琦, 李凌彦, 赵汝丽, 魏云林, 林连兵, 季秀玲

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 作为功能性油脂已被广泛应用于食品工业领域。随着对纯 PUFAs 脂质的需求量越来越多, 来自于动植物和深海洋鱼的 PUFAs 远远不能满足市场需求, 且动植物含油量及不饱和脂肪酸类型、比例均受到一定的限制。一系列的研究表明, 微生物特别是藻类、真菌能合成几乎所有的 PUFAs, 并能在工业规模上培育有开发价值的可替代生物资源。作者在近年来国内外有关研究的基础上, 从培养条件、菌种选育、基因工程、代谢调控等方面对促进微生物产 PUFAs 的研究进行了综述, 为相关的研究提供参考。

关键词: 微生物; 多不饱和脂肪酸; 生物合成

中图分类号: Q547 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)08—0785—05

Research Progress on the Enhancement of the Production of Polyunsaturated Fatty Acids in Microorganisms

ZHANG Qi, LI Lingyan, ZHAO Ruli, WEI Yunlin, LIN Lianbing, JI Xiuling

(College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), as functional oil components, have been widely used in food industry. The PUFAs produced from plants, mammals and deep-sea fish is inadequate for supplying the expanding market demands, and the content of vegetable and animal oils, types and proportion of unsaturated fatty acids in these oils also show limitations for further application. Microorganisms, especially algae and fungi, have been recognized as promising sources that can synthesize the entire range of PUFAs, and can be used as valuable alternative sources for PUFAs production on an industrial scale. This paper reviews the progress in the research of enhancement of polyunsaturated fatty acid production, based on the related research in culture condition, strain screening, gene engineering and metabolic regulation, providing theoretical and applicable references for relative domestic and international research.

Keywords: microorganisms, polyunsaturated fatty acids, biosynthesis

收稿日期: 2014-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160016; 31260034); 云南省应用基础研究基金项目(KKSA201126005); 教育部回国人员科研启动基金项目(KKQA201226003)。

作者简介: 张 琦(1975—), 男, 云南大理人, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物分子生物学与生物化学方面的研究。

E-mail: qzhang37@hotmail.com

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是指含有两个或两个以上双键且碳链长 18~22 个碳原子的直链脂肪酸。PUFAs 根据结构分为两大类:一类是 $n-3$ PUFAs, 主要包括 α -亚麻酸 (α -Linolenic acid, ALA, C18:3 $n-3$)、二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5 $n-3$) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA, C22:6 $n-3$); 另一类是 $n-6$ PUFAs, 主要包括亚油酸 (Linoleic acid, LA, C18:2 $n-6$)、 γ -亚麻酸 (γ -Linolenic acid, GLA, C18:3 $n-6$) 和花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA, C20:4 $n-3$) 等^[1]。PUFAs 的合成是以饱和脂肪酸(如硬脂酸)作为底物,通过一系列脱氢酶(desaturase)和延长酶(elongase)的催化作用形成。因 PUFAs 独特的生物活性,其在生物制药和营养保健品及化妆品领域中广泛受到关注和应用^[2-3]。研究表明,PUFAs 对机体的激素代谢和酶活起着调控功能,是维持正常生命活动所必需的,而且对人类很多疾病具有明显预防和治疗作用,一旦缺乏会引起机体生理失调而导致多种疾病,临床已将 PUFAs 应用于心血管疾病、免疫调节、癌症、神经发育及糖尿病等多种疾病的治疗^[3-4]。

过去人们以植物、一些哺乳动物及海洋鱼油为资源,采取压榨法和化学溶剂法生产 PUFAs 的产品纯度低、产量少、污染环境、有害物残留多以及易变质^[2]。由于 PUFAs 独特的功效,其需求量越来越多,现有的资源和生产方式远不能满足市场需求。为此,寻求替代的生物资源以及规模化、合理化的生产途径已成为研发人员的热门课题。PUFAs 存在于动物和植物中,但在微生物特别在一些藻类、真菌和细菌中含量丰富,多以贮存油和膜脂的形式存在。近年来,随着现代生物技术的发展,已获得更多具有产油能力高或其油脂组成中富含稀有脂肪酸的产油微生物资源,提高了微生物的产油率。近来美国国家可再生能源实验室(NREL)的报告特别指出,微生物油脂发酵可能是生物柴油生产和生物经济的重要研究方向^[5],而且在德国、美国和日本等国均有商品菌油面市。开发微生物 PUFAs 可以部分或完全取代动植物中的 PUFAs,有广阔的市场前景。迄今,国内外有关微生物生产 PUFAs 方面已有大量的研究报道,作者就促进微生物产 PUFAs 的优化方法进行总结。

1 优化培养条件提高微生物产 PUFAs

微生物合成 PUFAs 和培养条件相关。培养条件变化,微生物的生理形态及细胞的生化等发生改变,从而影响菌体的产量及 PUFAs 的组成和产率。许多研究表明,营养源、温度、通气量、光照、金属离子、pH、盐度及 NaCl 等培养条件的变化可以明显影响微生物体内 PUFAs 的合成和积累^[3,6-7]。Peng 等^[8]通过在高山被孢霉(*Mortierella alpina*)ME-1 发酵培养基中添加正十六烷,使 AA 含量提高 28.9%。De Oliveira Carvalho 等^[9]研究发现,低温促进 PUFAs 的累积,将毛霉菌(*Mucor* sp.)LB-54 的培养温度从 28 °C 降为 12 °C 时,GLA 的含量从 15% 增加到 24%,作者所在实验室通过对部分产油真菌的研究也获得类似结果。温少红等^[10]研究表明,高光强培养的紫球藻细胞中类脂的含量是低光强培养下的 2.1 倍,在弱光下有利于 AA 的合成,中等光强则对 EPA 的积累有利。Muhid 等^[11]研究发现, Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 对小克银汉霉(*Cunninghamella* sp.)2A1 油脂的积累影响较大,其中 Zn^{2+} 较对照组 GLA 的含量增加了 74%。利用环境条件变化对细胞内能荷、还原力和对油脂积累的影响指导发酵,优化发酵工艺,从而使代谢流向所需产物,进一步提高 PUFAs 产量。

2 诱变技术在微生物高产 PUFAs 上的应用

近年来国内外研究人员一直在探索利用诱变育种等技术对野生产 PUFAs 菌株进行改造,进一步提高 PUFAs 的含量。吕飒音等^[12]用紫外线诱变,以甘草酸进行筛选,获得了高产菌被孢霉 A20,其生物量较出发菌株提高了 25.5%,GLA 产量较出发菌株提高了 81%。冯云等^[13]利用亚硝基胍(NTG) 和紫外照射对裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.)CCTCC M209059 进行复合诱变,突变株 *Schizochytrium* sp. HX-308M 中产乙酰辅酶 A 和 NADPH 的酶活力提高,细胞内乙酰辅酶 A 和 NADPH 含量显著增加,DHA 含量比野生型菌株提高了 38.88%。李忠玲等^[14]利用紫外线诱变结合失苹果酸酐筛选的方法,获得一株少根根霉突变株,其 GLA 含量最高提高了

276.5%。李丽娜等^[15]采用微波诱变并结合乙酰水杨酸进行诱变筛选,获得一株深黄被孢霉突变株,其AA产量比原始对照菌株提高3.18倍。利用诱变育种技术可以得到多种优良突变体和新的有益基因类型,但是诱变育种也存在一定的盲目性和随机性,是一个相当繁琐的过程,在实际应用中,根据出发菌株及实验室条件等具体情况来选择合适的诱变方法,发展一种简单易行的筛选方法。

3 PUFAs 合成相关酶的基因工程应用

微生物发酵生产 PUFAs 的缺点是对高产菌株的选育困难,而且菌种发酵周期长、产率低。通过基因工程手段增加编码 PUFAs 合成相关酶基因的拷贝数来提高微生物生产酶的数量,以提高微生物合成 PUFAs 的能力。目前,研究人员已成功构建多种过表达的转化系统,为日后基因工程育种方面的研究奠定了坚实的基础。Sakuradani 等^[16]将 *alpine* 高山被孢霉 IS-4 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因在高山被孢霉 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶缺陷型突变株 JT-180 中过表达,AA 产量比原始菌株提高 66.7%。Takeno 等^[17]将高山被孢霉 IS-4 中 *GLELO* 基因(编码脂肪酸延长酶 EL2)连接在 pDura5 载体上导入菌株高山被孢霉 IS-4 中过表达,转基因菌株中 AA 产量比原始菌株提高了近一倍。

除了过表达 PUFAs 合成相关基因外,也可通过基因工程手段将 PUFAs 合成相关基因转化微生物,改良后者的油脂组成,产生特殊的 PUFAs。李明春等^[18]将高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转化毕赤酵母进行表达,基因工程菌酵母中 GLA 含量占总脂肪酸的 16.26%。Chuang 等^[19]通过将高山被孢霉的 Δ^6 -和 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因转化解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)中表达,转基因菌株中产生了新的 PUFAs-GLA,占总脂肪酸的 20%。刘建民等^[20]将高山被孢霉 W15 菌株的 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因转化毕赤酵母 GS115,分析表明, Δ^5 -脂肪酸脱氢酶可催化底物脱氢生成 AA。最近,作者所在研究室也将高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转化产油酵母——红冬孢酵母中进行表达,也获得产 GLA 的红冬孢酵母基因工程菌株^[21]。脱氢酶基因的过表达对微生物合成 PUFAs 有重要的影响。基于微生物基因水平上的深入研究,推动了研究人员对于 PUFAs 合成的代谢机理方面的认识。

4 脂肪酸合成途径中关键酶对微生物产生 PUFAs 的影响

细胞中 PUFAs 的合成不仅与脂肪酸脱氢酶系有关,还与脂肪酸合成代谢过程的关键酶密切相关。对 PUFAs 生物合成代谢途径及关键酶的研究是开展基因工程育种研究的必要前提。脂肪酸合成起始于乙酰-CoA,柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACL)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)和苹果酸酶(malic enzyme, ME)是启动脂肪酸合成的 3 个关键酶,为脂肪酸合成前体物质乙酰-CoA 和还原力 NADPH,促进油脂累积^[2,22]。许多研究表明,调节这三个酶的活性和表达水平有助于 PUFAs 的合成^[23]。Ren 等^[24]在发酵培养基中添加苹果酸使 *Schizochytrium* sp. HX-308 产油量提高了 15%,而且总脂肪酸中 DHA 含量从 35% 提高到 60%。魏萍等^[25]通过向培养基中添加柠檬酸使裂殖壶菌 HX-308 (CCTCC M209059) DHA 产量高达 12.2 g/L,比对照提高了 35.41%。Zhang 等^[26]将卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*) CBS108.16 和高山被孢霉菌株 Peyron CBS696.70 的苹果酸酶基因分别导入亮氨酸缺陷型卷枝毛霉 R7B 中过表达,结果显示 GLA 的含量从 23.2% 分别提高到了 26.1% 和 30.1%。Ruenwai 等^[27]从鲁氏毛霉(*Mucor rouxii*)中克隆获得 ACC1 基因,导入到非油脂酵母 *Hansenula polymorpha* 中过表达,脂肪酸含量提高了 40%。有研究者通过过表达苹果酸酶基因发现,宿主菌内 PUFAs 含量并无变化,这可能与不同的生物环境中苹果酸酶基因存在不同的酶活性质有关,类似的报道还有待进一步深入研究。

5 展望

近年来许多研究表明,细菌、真菌等微生物通过细胞内或细胞间的信息交流来协调群体,影响一系列生理生化特征。赵宗保等^[28]分析了真菌群体感应分子色醇对 *L. starkeyi* 产油能力的影响。结果表明,在培养基添加色醇, *L. starkeyi* 的生物量、产油脂量和油脂得率系数都明显增加,还缩短发酵时间。日本学者 Kimura 等^[29]通过对多种香料成分对 *L. starkeyi* 产油能力的影响研究表明,茴香脑、松油醇、乙酰苯等能使产油微生物油脂积累提高 10%~46%。虽然已发现群体感应分子有助于提高产油率,

但目前没有特异性提高某种 PUFA 含量的研究报道,不过这些工作仍为进一步研究群体感应促进微生物产 PUFA 提供了依据。

随着对 PUFA 生理及药用价值的深入研究,其需求量大增加,因此提高 PUFA 产量也逐步成为研究热点。目前的研究主要集中于培养条件的优化,这在一定程度上能提高 PUFA 的产量,但总体上并不明显,这主要是由于微生物产 PUFA 的生物合成过程极为复杂,从葡萄糖至 PUFA 的合成涉及

20 多步酶促反应,难以确定合成 PUFA 的关键步骤,也不清楚微生物群体感应的相互调节机制,还存在着葡萄糖转化率低、生长周期长和发酵过程难以控制等问题。随着现代生物学研究的发展,利用基因组学、转录组学和蛋白组学等研究来了解 PUFA 合成的调节机制,同时结合基因工程和代谢调控技术来提高微生物 PUFA 产量,将成为今后的主要研究方向之一。

参考文献:

- [1] Holmgren L. Influence of the metabolic inhibitor sesamin on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*[J]. **Epsilon Archive for Student Projects**, 2014, 5: 1-23.
- [2] Laoteng K, Certi k M, Cheevadhanark S. Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi[J]. **Chemical Papers**, 2011, 65(2): 97-103.
- [3] Zhang Q, Wang Z, He SW, et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on the cold adaptation of Microorganisms [J]. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, 2012, 24(1): 58-63.
- [4] Bureau D P, Hua K, Harris A M, et al. The effect of dietary lipid and long-chain n-3 PUFA levels on growth, energy utilization, carcass quality, and immune function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. **J World Aquacult Soc**, 2008, 39(1): 1-21.
- [5] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Inhibition of lipid accumulation and lipid body formation in oleaginous yeast by effective components in spices, carvacrol, eugenol, thymol, and piperine[J]. **J Agri Food Chem**, 2006, 54(10): 3528-3534.
- [6] Ogawa J, Sakuradani E, Kishino S, et al. Microbial Production[M]. Toyko: Springer, 2014: 207-218.
- [7] Courchesne N M D, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches[J]. **Journal of Biotechnology**, 2009, 141: 31-41.
- [8] Peng C, Huang H, Ji X J, et al. Effects of n-hexadecane concentration and a two-stage oxygen supply control strategy on arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1[J]. **Chem Eng Technol**, 2010, 33(4): 692-697.
- [9] De Oliveira Carvalho P, De Oliveira J G, Maria P G. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor sp* LB-54 by growth temperature[J]. **Revista de Microbiologia**, 1999, 30(2): 170-175.
- [10] 温少红, 王长海. 光照和培养时间对紫球藻细胞脂肪酸含量的影响[J]. 中国海洋药物, 2000, 73(1): 47-50.
WEN Shaohong, WANG Changhai. Effect of light and culture time on the fatty acids composition of *Porphyridium cruentum* pufa [J]. **Chinese Journal of Marine Drugs**, 2000, 73(1): 47-50. (in Chinese)
- [11] Muhid F, Nawi W N N W, Kader A J A, et al. Effects of metal ion concentrations on lipid and gamma linolenic acid production by *Cunninghamella* sp. 2A1[J]. **Journal of Biological Sciences**, 2008, 8(3): 62-67.
- [12] 吕飒音, 潘播. 被孢霉高产 γ -亚麻酸菌株的选育[J]. 中国生化药物杂志. 2000, 21(2): 79-80.
LÜ Sayin, PAN Fan. Breeding of *Mortierella* sp. producing high-yield GLA[J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 2000, 21(2): 79-80. (in Chinese)
- [13] 冯云, 任路静, 魏萍, 等. 微生物发酵产二十二碳六烯酸代谢机理的研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1225-1231.
FENG Yun, REN Lujing, WEI Ping, et al. Progress in metabolic mechanism of docosahexenoic acid production by fermentation [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2010, 26(9): 1225-1231. (in Chinese)
- [14] 李忠玲, 徐霞美, 王卫卫, 等. 少根根霉 γ -亚麻酸高产菌株选育[J]. 食品科技, 2008, 33(1): 19-21.
LI Zhongling, XU Xiamei, WANG Weiwei, et al. Breeding of high-yielding strains of *Rhizopus arrhizus* producing gamma-linolenic acid[J]. **Food Science and Technology**, 2008, 33(1): 19-21. (in Chinese)
- [15] 李丽娜, 汤华成, 于长青. 深黄被孢霉高产花生四烯酸菌株的微波诱变育种[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 117-121.
LI Lina, TANG Huacheng, YU Changqing. Breeding of arachidonic acid producing strain with *Mortierella sabellina* by

- microwave mutation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(1):117-121.(in Chinese)
- [16] Sakuradani E, Ando A, Ogawa J, et al. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpine* breeding[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2009, 84(1):1-10.
- [17] Takeno S, Sakuradani E, Murata S, et al. Molecular evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpine* is at the level of an elongase[J]. **Lipids**, 2005, 40(1):25-30.
- [18] 李明春, 孙颖, 张琦, 等. 高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的胞内表达 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(1):34-38.
- LI Mingchun, SUN Yin, ZHANG Qi, et al. Expression of Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpine* in *Pichia pastoris* [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2004, 20(1):34-38.(in Chinese)
- [19] Chuang L T, Chen D C, Nicaud J M, et al. Co-expression of heterologous desaturase genes in *Yarrowia lipolytica* [J]. **New Biotechnology**, 2010, 27(4):277-282.
- [20] 刘建民, 栗茂腾. 高山被孢霉 Δ^5 -去饱和酶基因的克隆及异源表达研究[J]. 食品科学, 2013, 34(15):166-170.
- LIU Jianmin, LI Maoteng. Cloning and heterologous expression of Δ^5 -desaturase gene from *Mortierella alpine* [J]. **Food Science**, 2013, 34(15):166-170.(in Chinese)
- [21] 李凌彦, 胡彬彬. 高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在红冬孢酵母中的表达[J]. 生命科学研究, 2014, 18(4):304-309.
- LI Lingyan, HU Binbin. Expression of *Mortierella alpine* Δ^6 -desaturase gene in *Rhodospiridium kratochvilovae* [J]. **Life Science Research**, 2014, 18(4):304-309.(in Chinese)
- [22] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms [J]. **Biochemical Society Transactions**, 2002, 30(6):1047-1049.
- [23] Ratledge C, Wynn J P. The biochemistry and molecularbiology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. **Adv Appl Microbiol**, 2002, 51:1-51.
- [24] Ren L J, Huang H, Xiao A H, et al. Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp.HX-308[J]. **Bioproc Biosyst Eng**, 2009, 32(6):837-843.
- [25] 魏萍, 任路静, 纪晓俊, 等. 强化乙酰辅酶 A 供应对裂殖壶菌合成二十二碳六烯酸的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(4):87-91.
- WEI Ping, REN Lujing, JI Xiaojun, et al. Effect of reinforcing acetyl-CoA supply in docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.[J]. **China Biotechnology**, 2011, 31(4):87-91.(in Chinese)
- [26] Zhang Y, Adams I P, Ratledge C. Malic enzyme:the controlling activity for lipid production, overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5 fold increase in lipid accumulation[J]. **Microbiology**, 2007, 153(7):2013-2025.
- [27] Ruenwai R, Cheevadhanarak S, Laoteng K. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase gene of *Mucor rouxii* enhanced fatty acid content in *Hansenula polymorpha*[J]. **Mol Biotechnol**, 2009, 42(3):327-332.
- [28] 赵宗保, 胡翠敏. 能源微生物油脂技术进展[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3):427-435.
- ZHAO Zongbao, HU Cuimin. Progress in bioenergy-oriented microbial lipid technology[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2011, 27(3):427-435.(in Chinese)