DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.06.009

卷枝毛霉 Δ6-脂肪酸脱饱和酶基因的敲除及功能研究

何文胜[1]， 陈清霞[2]， 邹丽梅[2]， 曹 晓[1]， 祁 峰[2]

(1. 福建生物工程职业技术学院,福建 福州 350002;2. 福建师范大学 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心,福建 福州 350117)

摘要：γ-亚麻酸(γ-Linolenic acid,GLA)是人体所必需且具有多种生理功能的一种重要多不饱和脂肪酸。研究表明，卷枝毛霉等 GLA 生产菌株中 Δ6-脂肪酸脱饱和酶 (Δ6-Fatty acid desaturase,FAD6)是合成 γ-亚麻酸的关键和限速酶,然而 GLA 是否惟一通过 Δ6-脂肪酸脱饱和酶途径合成则目前还没有报道。作者以卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* EIM10 sp.为研究对象,以其 FAD6 基因的 5′端启动子和 3′端终止子为同源臂，潮霉素 B 抗性基因为筛选标记，构建了 *M. circinelloides* EIM10 sp.Δ6-脂肪酸脱饱和酶 FAD6 的敲除载体 pUMCD6-HmB，转化进入制备好的原生质体中成功地敲除了 FAD6 基因,发现 FAD6 基因缺陷菌株 GLA 质量浓度比野生型对照菌株降低了 50%以上,但 GLA 并没有完全消失,说明卷枝毛霉生物体内还有其他代谢途径可以将碳源转化为 GLA。

关键词：γ-亚麻酸;卷枝毛霉;Δ6-脂肪酸脱饱和酶;基因敲除

中图分类号:Q 819　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2017)06—0617—08

Studies on the Function of Delta 6-Fatty Acid Desaturase for γ-Linolenic Acid Synthesis from *Mucor circinelloides*

HE Wensheng[1]， *CHEN Qingxia*[2]， *ZOU Limei*[2]， *CAO Xiao*[1]， *QI Feng*[2]

(1. Fujian Vocational College of Bio-engineering,Fuzhou 350002,China;2. National and Local Joint Engineering Research Center of Industrial Microbial Fermentation Technology,Fujian Normal University,Fuzhou 350117,China)

Abstract: γ-linolenic acid(GLA) that is an essential polyunsaturated fatty acid(PUFA) plays a vital role in many metabolic processes. Most related studies showed that delta 6-fatty acid desaturase (FAD6) was an important rate-limiting enzyme for the synthesis of γ-linolenic acid from *Mucor circinelloides*. However,it has not been reported whether the delta 6- fatty acid desaturase is the only pathway to produce γ-linolenic. In this work,we constructed *M. circinelloides* EIM10 sp.FAD6 knockout vector pUMCD6-HmB on the basis of pUC18 to study the function of FAD6. The homologous sequences of 5' promoter and 3' terminator of FAD combined with hygromycin B

收稿日期：2015-04-29

基金项目：福建省自然科学基金重大项目 (2011H6007)；福建省自然科学基金面上项目 (2016J01148)；福建省科技计划项目 (2014Y2008);福建省中青年教师教育科研项目(JAT160768)。

作者简介：何文胜(1968—),男,福建福州人,理学硕士,副教授,主要从事微生物分子生物学方面的研究。E-mail:hwsql@126.com

引用本文：何文胜,陈清霞,邹丽梅,等. 卷枝毛霉 Δ6-脂肪酸脱饱和酶基因的敲除及功能研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(06):617-624.

resistant gene used as the selective marker were connected as the knockout fragment. Then the vector pUMCD6-HmB was transformed into the prepared protoplast of *M. circinelloides* EIM10 sp. The results showed that FAD6 gene was successfully disrupted and GLA accumulation of the mutant disrupted in FAD6 decrease about 50% compared to the wild type. It can be concluded that FAD6 was essential for GLA production in *M. circinelloides* but there is probably other ways to accumulate GLA in *M. Circinelloides*.

Keywords: γ-Linolenic acid, *Mucor circinelloides*, delta 6-fatty acid desaturase, gene knockout

高度不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是指碳链长度为16~22个碳原子,并含有两个以上不饱和键(双键)的直链脂肪酸。PUFAs在调节人体的脂质代谢、治疗和预防心脑血管疾病、抗癌、对抗肥胖,促进生长发育等方面具有重要的生理作用,成为国内外研究的热点之一[1]。与人类健康密切相关主要是ω-3和ω-6系列,这两个系列的PUFA s在功能上相互协调制约、共同调节着生物体的生命活动[2]。ω-3高度不饱和脂肪酸主要有α-亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)等;ω-6高度不饱和脂肪酸主要包括亚油酸(LA)、γ-亚麻酸(GLA)和花生四烯酸(AA)等[3],这些PUFAs人类不能自身合成,只能从食物中获取。ω-6不饱和脂肪酸中的γ-亚麻酸(γ-linoleic acid,GLA),是人体所必需的脂肪酸之一,具有显著的降血脂和降低血清胆固醇的作用,目前被广泛应用于医药、保健食品化妆品等行业[4]。GLA的分子结构式见图1。

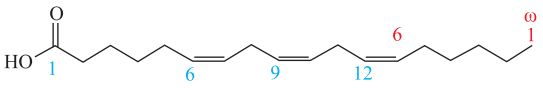


图1 GLA的分子结构式

Fig. 1 Structural formula of GLA molecule

GLA首次从柳叶菜科植物月见草中发现,目前已知有80多种高等植物可以产GLA[3]。然而从月见草等植物油中提取的GLA,其产量和品质都无法满足市场的要求,自然界中最丰富的资源是藻类和一些真菌[4],所以人们转向寻用微生物资源来合成GLA,藻类的培养受外界条件的影响较大,含油量低,用它进行工业化生产GLA有很大的难度。真菌在自然界分布广且易培养,发酵生产周期短、菌丝体容易收集,所以目前利用真菌发酵生产GLA已经成为国内外研究热点[5]。其中真菌研究较多的有被孢霉属(*Mortierella*)[6]、毛霉属(*Mucor*)、枝霉属(*Thamnidium*)[7]等。高山被孢霉*Mucor circinelloides*因其GLA产量高、遗传背景明确等优势成为GLA生产的主要菌种[3,6]。

微生物合成PUFAs过程中,Δ6-脂肪酸脱饱和酶(FAD6)被认为与GLA合成途径紧密相关,并且可能是GLA合成过程的限速酶[8],然而延长-脱饱和-延长这种公认的PUFAs合成途径并不一定是惟一的,聚酮合成酶(PKS)途径也可能参与了部分PUFAs的合成[9],见图2。FAD6基因已经从多种微生物中被克隆和鉴定,并且进行了异源表达。李明春等利用转基因技术,成功地实现了高山被孢霉FAD6的克隆和在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的表达[10]。Laoteng等从毛霉*Mucor rouxii*中成功克隆到FAD6基因,实现了在酿酒酵母胞内的外源表达并且对蛋白质结构进行了初步研究[11]。目前针对FAD6的研究大多集中在不同来源基因的克隆表达,极少有针对其功能的研究。而对于高山被孢霉FAD6在GLA合成途径中真正扮演的角色,其是否为GLA惟一的合成途径,并没有相关的报道。作者所在实验室前期筛选到一株高产GLA的卷枝毛霉*Mucor circinelloides* EIM10 sp.,并从其基因组中克隆得到了Δ6-脂肪酸脱饱和酶基因。本研究的目的在于构建FAD6的敲除载体,转化卷枝毛霉*Mucor circinelloides* EIM10 sp.的原生质体进行FAD6基因的敲除,研究FAD6基因缺失菌株合成GLA的情况,进而阐明FAD6在卷枝毛霉GLA合成途径中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 卷枝毛霉*Mucor circinelloides* EIM-10:保存于教育部工业微生物工程研究中心;

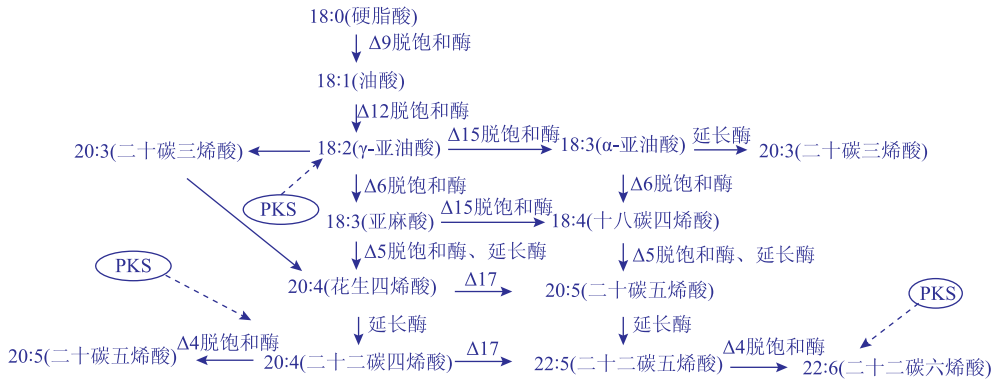


图 2　多不饱和脂肪酸的生物合成途径

Fig. 2　Biosynthesis pathway of long-chain PUFAs

DH5α 感受态细胞：由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心提供；含有Δ6-脂肪酸脱饱和酶基因启动子片段的质粒 pYMD6PMCD6，含有潮霉素 B 抗性基因的质粒 pRLM30 和质粒 pUC18：由作者所在实验室提供。

1.1.2　主要培养基和试剂　卷枝毛霉种子培养基(g/L)：葡萄糖 20，蛋白胨 10，酵母提取物 3；LB 液体培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10，氨苄青霉素 Amp^r 终质量浓度为 100 μg/mL，pH 自然；固体培养基含琼脂粉 15 g/L；SOC 培养基参考《分子克隆》第三版；潮霉素 B：美国 Sigma 公司；二硝基苯胺、玫瑰红等：上海阿拉丁公司。

1.1.3　主要仪器　QYC-200 全温空气摇床：上海福玛实验设备有限公司；PCR 仪：Applied Biosystems 2700 型；高速冷冻离心机：BEKAMN 公司；稳压稳流电泳仪：Amersham JS-380A；自动凝胶图像分析仪：上海培清科技有限公司；恒温水槽：Thermo Electron Corporation；气相色谱质谱联用仪：美国 Agilent 公司 7890A。

1.2　方法

1.2.1　FAD6 基因 5′端启动子同源片段的克隆　-80 ℃将保藏的含质粒 pYMD6PMCD6 的 DH5α 菌株接种于含 Amp^r 的 LB 培养基，37 ℃、200 r/min 培养 24 h。取过夜培养好的菌液 1 mL 于 1.5 mL EP 管中，6 000 r/min 离心后提取基因组，基因组试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。以质粒 pYMD6PMCD6 为模板，Δ6-5′ F /Δ6-5′ R 为引物进行 PCR 扩增，PCR 反应体系为 15 μL，DNA 高保真聚合酶 Q5 购自美国 NEB 公司。PCR 扩增循环反应条件 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30 个循环，72 ℃ 10 min。回收长度正确的目的片段(1 290 bp)并纯化。

1.2.2　FAD6 基因 3′端终止子同源片段的克隆　取 100 μL 保存于-80 ℃的卷枝毛霉孢子悬液(孢子悬液浓度为 10^8 个/mL)，接种于 50 mL PDA 液体培养基，28 ℃振荡培养 48 h。取过夜培养好的菌液 1 mL 于 1.5 mL EP 管中，用真菌基因组试剂盒提取基因组，试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。以卷枝毛霉基因组 DNA 为模板，Δ6-3′ F /Δ6-3′ R 为引物进行 PCR 扩增，PCR 反应体系和反应条件同 FAD6 基因 5′端同源片段的扩增。回收长度正确的目的片段(1 022 bp)并进行纯化。

1.2.3　潮霉素 B 抗性基因(HmB)的克隆　质粒 pRLM30 上带有潮霉素 B 抗性基因 HmB，同时 HmB 基因上游带有 pki 启动子，下游带有 cbh2 终止子。提取质粒 pRLM30 的 DH5α 菌株的质粒，以质粒 pRLM30 为模板，HmB F /HmB R 为引物进行 PCR 扩增，PCR 扩增循环反应条件为 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环，72 ℃ 10 min。回收长度正确的目的片段(2 800 bp)并纯化。

1.2.4　重叠延伸 PCR 连接三个基因片段　利用重叠延伸 PCR 的方法将 FAD6 基因 5′端启动子同源片段、FAD6 基因 3′端终止子同源片段和潮霉素 B 抗性基因进行连接，获得了三个基因的连接片段，PCR 扩增循环反应条件为 94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环，72 ℃ 10 min。此轮反应 DNA 聚合酶 Ex Taq 购自大连 TaKaRa 公司。回收目的片段连接至载体 pMD18-T simple vector 进行测序分析。重叠延伸 PCR 所需引物见表1。

1.2.5　载体 pUMCD6-HmB 的构建　将使用重叠延伸 PCR 得到的 FAD6 基因 5′端启动子同源片段、FAD6 基因 3′端终止子同源片段和潮霉素 B 抗性基因的连接片段分别进行 PstI/Sac I 双酶切，在 30 ℃

表 1　本文中载体构建所用到的引物序列

Table 1　Sequences of primers used in plasmid construction

引物名称	序列(5′→3′)	设计原则
Δ6-5F	*TGCA CTGCA G*GAATTCTGATCTAGTCCAACAGC	与 D6 启动子片段上游序列同源
Δ6-5R	TGGGATAAGGGACCGGCCGCTTTTGTAAGAGGGAGAATGTGTAG	与 D6 启动子片段下游序列同源
Δ6-3F	GATTCCGCAGCACAAGCTGGTACTGGAAATACGCAAGAGAGGG	与 D6 终止子上游序列同源
Δ6-3R	CGAGCTCCTAATGAGCGCGTTCTATATCAT	与 D6 终止子下游序列同源
HmBF	CTACACATTCTCCCTCTTACAAAAGCGGCCGGTCCCTTATCCCA	与质粒 pRLM30 的 pki 启动子片段上游序列同源
HmBR	CCCTCTCTTGCGTATTTCCAGTACCAGCTTGTGCTGCGGAATC	与质粒质粒 pRLM30 的 cbh2 终止子片段下游序列同源

下酶切 2 h,限制性内切酶 PstI/Sac I 购自美国 NEB 公司。同时使用相同的内切酶对 pUC18 进行酶切,之后以 T4 连接酶(美国 NEB 公司)将三个基因片段和 pUC18 连接,16 ℃连接反应 5 h 后转化 *E.coli* DH5α,抗性筛选重组菌落、提取质粒并进行双酶切验证和目的基因测序。重组 FAD6 基因敲除质粒 pUMCD6-HmB 的构建过程如下所示,见图 3。

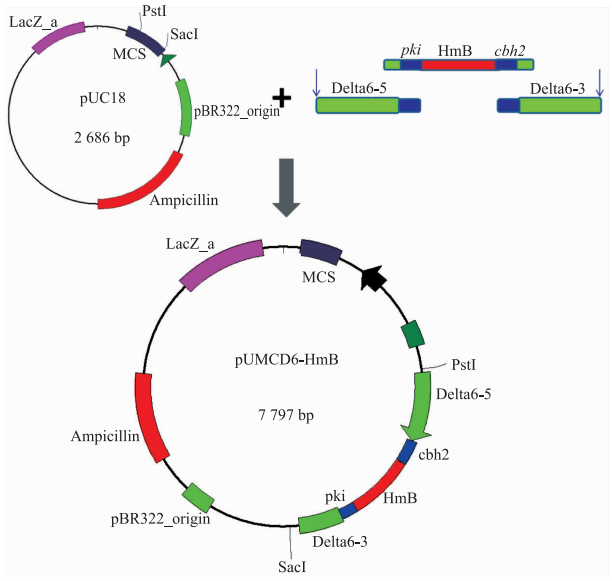


图 3　重组敲除质粒 pUMCD6-HmB 的构建

Fig. 3　Construction of homologous plasmid pUMCD6-HmB

1.2.6　卷枝毛霉原生质体 PEG/$CaCl_2$ 转化　首先将同源重组质粒 pUMCD6-HmB 用限制性内切酶 sphI 酶切线性化,37 ℃消化 24 h 后,回收酶切产物并进行电泳检测。制备卷枝毛霉的原生质体以及验证卷枝毛霉原生质体生长的最佳浓度过程见文献[12]。取 200 μL 制备好的原生质体悬液(原生质体浓度为 10^6~10^7 个/mL),加入 10 μg 线性化后的同源重组质粒 pUMCD6-HmB,混匀后加入 50 μL PEG 溶液,颠倒混匀后冰浴 30 min。取出混匀后加入 1 mL PEG 溶液,再次混匀,室温放置 20 min。加入 1 mL 0.5 mol/L 的 NaCl,取 1/4 体积与 5 mL 原生质体转化上层培养基(温度为 50~60 ℃)混匀后,立即平铺于原生质体转化底层培养基,28 ℃培养 2~3 d。将转化复筛板上的每个菌接种于含 100 μg/mL 的玫瑰红溶液和 3 μg/mL 二硝基苯胺和 150 μg/mL 的潮霉素 B 的 YPG 液体培养基,28 ℃培养 2 d。将上述培养好的菌体于 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,提取转化菌的基因组 DNA 进行阳性转化子的 PCR 验证。使用 PCR 扩增卷枝毛霉 FAD6 基因的方法来验证经原生质体转化的菌株 FAD6 是否已经被敲除。模板为野生型和筛选敲除的卷枝毛霉基因组,引物为 FAD6 两端 5′和 3′端各 15 bp 核苷酸序列。

1.2.7　总脂肪酸提取与气相色谱分析　称取烘干的阳性克隆菌体 0.5 g 左右,置于 10 mL 离心管中,向其中加入 5 mL 预先配好的 6 mol/L HCl,剧烈振荡 1~2 min 后,于 80 ℃下水浴消化 1 h,直到消化完全。冷却后加入 750 μL 无水乙醇和 2 mL 正己烷,充分摇匀后,静置分层,1 200 r/min 离心2 min,取上清液,按第 3 步重复 2~3 次,洗至上层基本无色。真空泵抽干,去除有机溶剂,称质量并计算得率。取粗油脂0.1 g,溶于2 mL 正己烷。加入 2 mL 10% HCl/CH_3OH 溶液,62 ℃甲酯化 3 h,冷却后加 2 mL 正己烷,充分振荡后静置分层。取上层有机相,立即进行 GC-MS 分析。GC-MS 分析条件为:气相色谱仪,HP-INNOWax polyethylene glycol 极性柱(30.0 m × 0.25 mm×φ0.25 μm)。柱加热程序:150 ℃维持1 min,150~210 ℃(10 ℃/min),210 ℃保持 5 min,210~230 ℃(2 ℃/min),230 ℃保持 4 min,240 ℃保持 5 min。进样口温度 250 ℃,检测器温度 280 ℃,进样量 1 μL 的,分流比 10:1。质谱条件:检测器离

子源温度 230 ℃，四极杆温度 150 ℃；电离能 70 eV；全扫描范围：M/Z30~500，1.61 scans/s；溶剂切除时间 3 min。

2 结果与分析

2.1 FAD6 基因 5′端、3′端同源片段及 HmB 基因的克隆

以质粒 pYMD6PMCD6 为模板，Δ6-5′F /Δ6-5′R 为引物进行 PCR 扩增 FAD6 基因 5′端同源片段；以卷枝毛霉基因组为模板，Δ6-3′F /Δ6-3′R 为引物进行 PCR 扩增 FAD6 基因 3′端同源片段；以质粒 pRLM30 为模板，HmBF / HmBR 为引物进行PCR 扩增 HmB 基因，3 个扩增出的基因片段见图4。

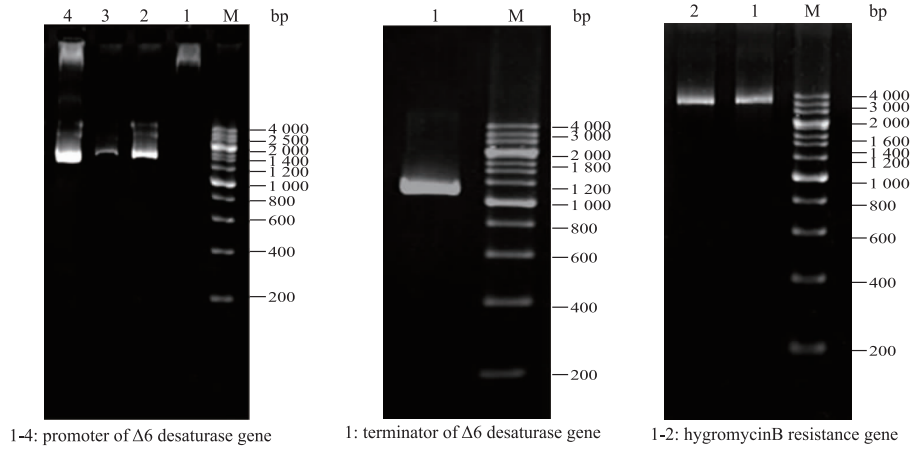


图 4 FAD6 基因 5′ 端(a)、3′ 端同源片段(b)和 HmB 基因(c)的克隆

Fig. 4 Cloning of the 5′ homologous fragment (promoter) of Δ6 desaturase gene (a),3′ homologous fragment of Δ6 desaturase gene(terminator)(b) and hygromycinB resistance gene(c)

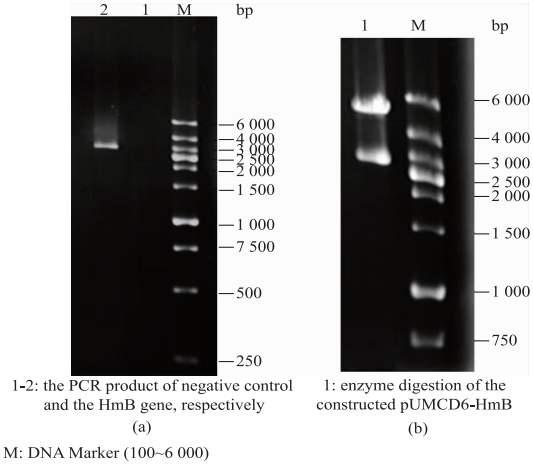


图 5 重组质粒 pUMCD6-HmB 的验证

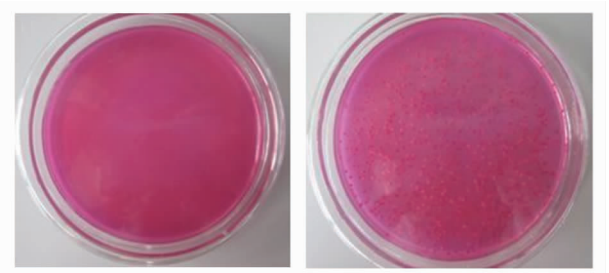
Fig. 5 Identification of pUMCD6 -HmB by PCR and enzyme digestion

2.2 载体 pUMCD6-HmB 的 PCR 及双酶切验证

将使用重叠延伸 PCR 得到的 FAD6 基因 5′端启动子片段、FAD6 基因 3′端终止子片段和潮霉素 B 抗性基因的连接片段分别进行 *Pst*I/*Sac* I 双酶切，构建质粒 pUMCD6-HmB，将重组质粒转化大肠杆菌 DH5a，并涂布于含 100 μg/mL Ampr 抗性的LB 筛选平板上。培养后挑取平板上的单菌落以 HmBF 为上游引物，HmBR 为下游引物进行菌落PCR，并进行 *Pst*I/*Sac* I 双酶切验证质粒构建情况。电泳结果表明，PCR 扩增产物为 2 800 bp 大小条带，双酶切显示在 5 000 bp 以上有清晰条带，见图 5。提质粒测序后表明核苷酸序列正确，重组质粒pUMCD6-HmB 构建成功。

2.3 原生质体 PEG/$CaCl_2$ 转化

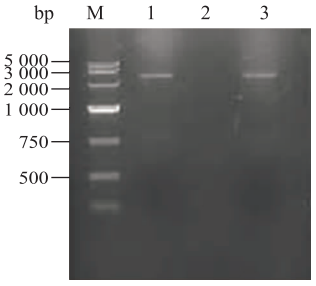
在用卷枝毛霉原生质体进行 PEG/$CaCl_2$ 转化实验之前，需要做潮霉素 B 抑制卷枝毛霉原生质体生长的最佳浓度筛选。为了转化的稳定性，最终选择的潮霉素 B 的转化质量浓度为 150 μg/mL。以卷枝毛霉孢子制备的原生质体为受体材料，在 PEG/$CaCl_2$ 的介导下，将同源重组质粒 pUMCD6-HmB 转入原生质体，结果表明，对照组转化板没有长，转化实验组平板上长出单菌落，见图 6。然后使用 PCR 扩增 FAD6 的方法来验证卷枝毛霉敲除菌株中 FAD6 基因是否已经被敲除掉。图 7 说明经过原生质体转化并筛选到的重组子中 FAD6 基因已被成功敲除，见图 7。



(a)野生型　(b)含潮霉素抗性基因的FAD6缺失菌株

图 6　卷枝毛霉 FAD6 敲除菌株的筛选

Fig. 6　Screening of protoplasts of *Mucor circinelloides* EIM–10 with FAD6 disrupted strains



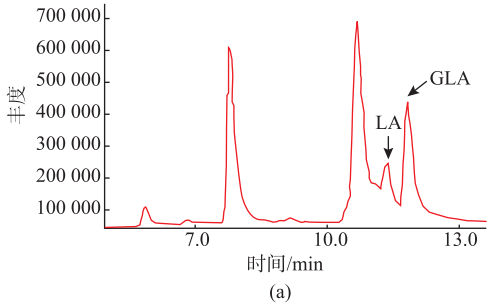
1,3 为野生型,2 为 FAD6 敲除株

图 7　FAD6 敲除菌株 PCR 验证

Fig. 7　PCR identification of the FAD6 disrupted strains

2.4　FAD6 敲除菌株合成脂肪酸结果

在 FAD6 敲除菌株和野生型照菌株中均出现和脂肪酸产物 GLA 甲酯标准品(11.813 min)相对应的峰,见图 8。在敲除菌株中,GLA 甲酯保留时间为 11.788 min。在对照菌株野生型卷枝毛霉中,GLA 甲酯保留时间为 11.807 min。通过质谱分析证明转化菌株和对照菌株出现 GLA 甲酯的峰。FAD6 敲除菌株中 GLA 质量浓度为 0.611 g/L，明显低于野生型对照菌株的 1.306 g/L，说明Δ6–脂肪酸脱饱和酶基因的缺失导致其产物 GLA 质量浓度的减少,但 GLA 峰并没有完全消失,提示卷枝毛霉生物体内还有其他代谢途径可以将碳源转化为 GLA。



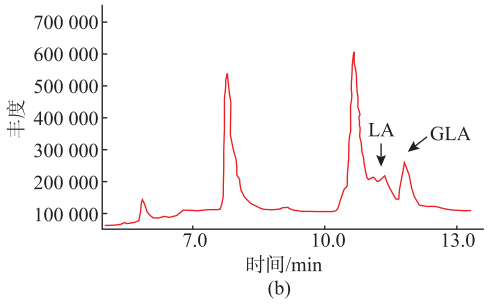


图 8　*Mucor circinelloides* EIM–10 菌株(a)和 FAD6 基因敲除菌株(b)产油脂成分气相色谱分析

Fig. 8　GC analysis of GLA contents of the wild type *Mucor circinelloides* EIM–10

3　结　语

Δ6–脂肪酸脱饱和酶一般被认为是包括高等动物在内的几乎所有细胞合成多不饱和脂肪酸酯的关键酶[60],也是 GLA 生物合成途径的限速酶。目前通过 cDNA 文库筛选、cDNA 文库随机测序和 cDNA 末端扩增技术(RACE)等多种方法已经从动物、植物、真菌、低等生物等不同生物中克隆到Δ6–脂肪酸脱饱和酶基因[13–15]。作者是通过基因敲除的方法研究卷枝毛霉Δ6–脂肪酸脱饱和酶的功能和作用。FAD6 基因可以在 *Mucor circinelloides* EIM–10 菌体中克隆得到,说明卷枝毛霉合成 GLA 也是遵循传统的碳链延长–脱饱和–碳链延长这种途径,然而丝状真菌 GLA 的合成途径也可能通过其他途径，比如 PKS 途径来实现[16]。Metz 等报道过海洋裂殖壶菌胞内脂肪酸的合成就是通过 PKS 途径,并对此进行了深入系统的研究[9]。这条途径在合成细胞所需PUFAs 的同时可以快速补给细胞 NADPH 的需要，然而卷枝毛霉是否会通过 PKS 途径合成多不饱和脂肪酸目前还尚未有报道。我们分别从 pYMD6PMCD6、卷枝毛霉基因组和 pRLM30 克隆到了 FAD6 基因 5′端启动子同源片段、FAD6 基因 3′端终止子同源片段和潮霉素 B 抗性基因，并通过重叠延伸 PCR 的方法将三段基因序列进行连接,进而连接在 pUC18 载体上构建了重组 FAD6 基因敲除质粒 pUMCD6–HmB,载体线性化处理后转化进入事先制备好的卷枝毛霉原生质体中，具有 FAD6 基因同源臂的重组原件通过同源重组将 FAD6 基因敲除。结果显示,FAD6 敲除菌株中 GLA 质量浓度为总油脂质量浓度的 8.529%,明显低于野生型对照菌株的18.286%。

与野生型卷枝毛霉相比,敲除菌株 GLA 合成量减少了 50%以上,说明 Δ6-脂肪酸脱饱和酶基因的缺失确实影响了 GLA 的合成途径,FAD6 应该在卷枝毛霉 PUFAs 合成途径中占有核心的地位。同时也观察到,GLA 峰并没有完全消失，提示卷枝毛霉胞内很可能还有其他代谢途径可以将碳源转化为 GLA,是否通过 PKS 途径来实现GLA 的补充,需要进一步的实验证明。从另一方面分析,GLA 在微生物 PUFAs 合成途径中还是花生四烯酸（Arachidonic acid, ARA）和二十二碳五烯酸（Docosapentenoic acid, DPA)等其他 PUFAs 的前体,这些 PUFAs 在 FAD6 基因缺失的条件下仍然可以继续合成,并且敲除菌株的生物量并没有受太大的影响,这些结果更加说明在卷枝毛霉胞内,除了 Δ6-脂肪酸脱饱和酶参与的 PUFAs 合成途径之外,必定有另外的脂肪酸延长脱饱和途径，来替代和补充 GLA 和其他 PUFAs 的正常补给,并且替代途径发挥的作用并不亚于 Δ6-脂肪酸脱饱和酶途径。卷枝毛霉 PUFA 合成替代途径有待进一步的深入研究,如果能够阐明参与这条途径的酶以及能量代谢的特征,就更有利于开发高产 GLA、ARA 和 DPA 等其他高附加值多不饱和脂肪酸的菌株。本研究初步阐明 Δ6-脂肪酸脱饱和酶 FAD6 在卷枝毛霉 PUFAs 代谢中的功能,为探索卷枝毛霉脂肪酸生物合成机制提供参考。

参考文献：

[1] MAO Shaochun, LI Zhuying, LI Cong. Study on extraction and purification of PUFA from elsholtzia rugulosa seed oil[J]. **Journal of Food Science and Biotehnology**, 2008, 27(2): 61-63. (in Chinese)

[2] ZHANG Qi, LI LINGYAN, ZHAO Ruli, et al. Research progress on the enhancement of the production of polyunsaturated fatty acids in microorganisms[J]. **Journal of Food Science and Biotehnology**, 2015, 34(8): 785-789. (in Chinese)

[3] CERTIK M, SAKURADANI E, SHIMIZU S. Desaturase-defective fungal mutants: useful tools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids[J]. **Trends in Biotechnology**, 1998, 16: 500-505.

[4] FAN Y Y, CHAPKIN R S. Importance of dietary gamma-linolenic acid in human health and nutrition [J]. **Journal of Nutrition**, 1998, 128: 1411-1414.

[5] FAKAS S, PAPANIKOLAOU S, BATSOS A, et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*[J]. **Biomass and Bioenergy**, 2009, 33: 573-580.

[6] XIAN M, YAN J, KANG Y, et al. Production of γ-linolenic acid by Mortierella isabellina grown on hexadecanol [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2001, 33: 367-370.

[7] STREDANSKY M, CONTI E, STREDANSKA S, et al. [γ]-Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace[J]. **Bioresource Technology**, 2000, 73: 41-45.

[8] SAYANOVA O, BEAUDOIN F, LIBISCH B, et al. Mutagenesis and heterologous expression in yeast of a plant Δ6-fatty acid desaturase[J]. **Journal of Experimental Botany**, 2001, 52: 1581-1585.

[9] 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: 290-293.

[10] LI Mingchun, SUN Yin, ZHANG Qi, et al. Expression of Δ6-fatty acid desaturase gene from mortierella alpina in *Pichia pastoris* [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2004, 20: 34-38. (in Chinese)

[11] LAOTENG K, MANNONTARAT R, TANTICHAROEN M, et al. Δ-6-desaturase of *Mucor rouxii* with high similarity to plant Δ-6-desaturase and its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2000, 9: 17-22.

[12] CHEN Qingxia, JIANG Xianzhang, LIU Jinqing, et al. Preparation and regeneration of protoplasts of *Mucor circinelloides* spores [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2011, 9(2): 49-52. (in Chinese)

[13] CHO H P,NAKAMURA M T,CLARKE S D. Cloning,expression,and nutritional regulation of the mammalian Δ-6 desaturase [J]. **Journal of Biological Chemistry**,1999,274:471-477.

[14] SATO M,ADAN Y,SHIBATA K,et al. Cloning of rat Δ6-desaturase and its regulation by dietary eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid[J]. **World Review of Nutrition and Dietetics**,2001,88:196-199.

[15] NAPIER J A,HEY S J,LACEY D J,et al. Identification of a caenorhabditis elegans D6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biochemical Journal**,1998,333:847-847.

[16] RATLEDGE C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production [J]. **Biochimie**,2004,86:807-815.

会　议　消　息

会议名称(中文):2017 中国生物材料大会

所属学科:生物技术与生物工程,生物及医药化工,纺织材料与纺织技术,材料科学基础学科

开始日期:2017-10-27

结束日期:2017-10-29

所在城市:江西省　南昌市

主办单位:中国生物材料学会、中国生物医学工程学会生物材料分会、华东交通大学

会议主席:王迎军 万 明

摘要截稿日期:2017-04-15

联系人:敖海勇 15797863906

联系电话:0791-87046893

E-MAIL:aohyong@126.com

会议网站:http://clxy.ecjtu.edu.cn/meeting2017/Action/TouristMain

会议背景介绍:由中国生物材料学会(CSBM)、中国生物医学工程学会生物材料分会(CSBME-BMB)和华东交通大学共同主办的"2017 中国生物材料大会"将于 2017 年 10 月 27-29 日在"英雄城"南昌举行。"2017 中国生物材料大会"以"生物医用材料创新研发与产业化"为主题,邀请学养深厚的专家学者就生物材料科学与产业的研究热点、发展前沿在南昌论道。大会将由 6 个大会报告、24 个专题报告会(专题分会场近百个)、4 个专题研讨会及论坛和墙报等组成。