

产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展

刘 波 孙 艳 刘永红 赵宗保*

(中国科学院大连化学物理研究所生物技术部 大连 116023)

摘 要:自然界中少量微生物在适宜条件下产生并贮存质量超过其细胞干重 20% 的油脂,具有这种表型的菌种称为产油微生物。产油微生物利用可再生资源,得到的微生物油脂与植物油脂具有相似的脂肪酸组成,有的还含有丰富的多不饱和脂肪酸,具有广阔开发应用前景。简要介绍了产油微生物的种类和代谢特点,较详细地阐述了微生物产油机制和代谢调控途径的最新研究进展,并对微生物油脂研究的未来发展方向提出了初步见解。

关键词:产油微生物,微生物油脂,生物合成,代谢调控

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)01-0153-04

利用微生物生产油脂的研究最早可追溯到第一次世界大战期间,当时德国曾准备利用内孢霉属(*Endomyces*)和单细胞藻类镰刀属(*Fusarium*)的某些菌种生产油脂以解决食用油匮乏问题。随后美国、日本等国也开始研究微生物油脂的生产。第二次世界大战前夕,德国科学家筛选到了适于深层培养的菌种,并进行规模生产。后来发现利用微生物生产普通油脂成本太高,无法与动、植物来源的油脂相竞争。有关微生物油脂的探索此后一度集中在获取功能性油脂,如富含多不饱和脂肪酸的油脂。近年来,随着现代生物技术的发展,已获得更多具有高产油能力或其油脂组成中富含稀有脂肪酸的产油微生物资源,提高了微生物产油的效率。日本、德国、美国等国目前已有商品菌油面市。同时,在油脂积累代谢调控的分子机制方面也取得了一些重要成果。更重要的是,随着人类社会资源压力和环境问题日益突出,通过微生物转化可再生资源生产油脂及其它相关代谢产品,部分替代化石资源,将是可持续发展的必然。因此,进一步探索有关微生物积累油脂具有重要的现实意义。

本文拟简要介绍产油微生物的种类和特征、微生物油脂生物合成途径及其代谢调控机制等方面的最新研究进展,并对微生物油脂研究的未来发展方向进行展望。

1 产油微生物及微生物油脂概述

某些微生物在一定条件下能将碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂等碳源转化为菌体内大量贮存的油脂,如果油脂含量能超过生物总量 20%,即称为产油微生物(*Oleaginous microorganisms*)^[1]。相应地,从产油微生物中提取的油脂称为微生物油脂,又称为单细胞油脂。细菌、酵母、霉菌、藻类中都有产油菌株,但以酵母菌和霉菌类真核微生物居多。在酵母、霉菌等真核微生物中,某些产油种属能积累占其生物总量 70% 以上的油脂,其中以甘油三酯(*Triacylglycerol*, TAG)为主,约占 80% 以上,磷脂约占 10% 以上。TAG 的主要功能普遍认为是作为碳源和能源的储备化合物,因它具有比碳水化合物和蛋白质高的热值,一经氧化将产生很高的能量。另外

还具有维持膜结构完整和正常功能的作用。TAG 在能量贮存和能量平衡上占有重要的地位,与游离脂肪酸相比,其具有低生物毒性,因而为不同种类的脂肪酸提供了合适的贮存形式。

产油微生物资源丰富,能在多种培养条件下生长,进行工业规模生产和开发有着巨大的潜力。目前,微生物油脂已成为获取高附加值脂肪酸^[2],如 γ -亚麻酸(*GLA*)^[3]、花生四烯酸(*ARA*)^[4]、二十碳五烯酸(*EPA*)^[5]、二十二碳六烯酸(*DHA*)^[6]等的重要原料。最近希腊学者 Papanikolaou S. 等报道利用 *M. isabellina* 进行高浓度糖发酵(初始糖浓度达 100g/L),油脂产量达到 18.1g/L,显示出很好的应用前景^[7]。而且,由于某些微生物油脂在脂肪酸组成上同植物油,如菜籽油、棕榈油、大豆油等相似,富含饱和和低度不饱和的长链脂肪酸,是生产生物柴油(*Bio-diesel*)的潜在原料。

2 微生物油脂的生物合成与代谢调控机理

2.1 微生物油脂的生物合成

生物合成 TAG 是在动、植物和微生物界广泛存在的多酶催化过程,属初级代谢的一部分。目前研究表明^[8],TAG 的合成代谢中关键的两个中间产物是磷脂酸(*PA*)和甘油二酯(*DAG*)。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)细胞中 PA 的合成与其他真核细胞中 PA 合成类似,存在两条合成途径,即甘油-3-磷酸(*G-3-P*)途径和磷酸二羟丙酮(*DHAP*)途径。甘油-3-磷酸途径通过其酰基转移酶(*GAT*)在 *sn*-1 位酰化,形成溶血磷脂酸(*LPA*)。同样地,DHAP 在其相应的酰基转移酶(*DHAPAT*)催化下在 *sn*-1 位酰化,生成的 1-acyl-DHAP 被其还原酶(*ADR*)还原也生成 LPA。最近在分子水平上研究 TAG 的生物合成时还发现,*Gat1p* 和 *Gat2p* 均能以 G-3-P 和 DHAP 为底物,而表现为双重底物特性的 *sn*-1 位酰基转移酶^[9]。溶血磷脂酸在相应脂肪酰转移酶(*AGAT*)作用下在 *sn*-2 位酰化,形成 PA。另外 PA 也可以磷脂为前体在磷脂酶 D 作用下生成。

磷脂酸在磷脂酸磷酸酶(*PAP*)作用下去磷酸化形成 DAG,这是 DAG 形成的主要途径。另外,DAG 也可由磷脂酶

* 通讯作者。Tel/Fax 86-411-84379211; E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

作者简介:刘 波(1969-),女(回族),河北省人,副研究员,硕士,研究方向为微生物及发酵工程。

收稿日期:2004-05-24,修回日期:2004-11-08

C 催化水解磷脂得到。研究表明, DAG 转化为 TAG 时的酰基转移反应并不是由单一的脂肪酰基转移酶完成的^[10]。酿酒酵母 DAG 酰化生成 TAG 主要有两个酶 Dgalp 和 Lro1p 参与催化,前者是标准的甘油二酯酰基转移酶(DAGAT),同 TAG 合成途径中另外两个酰基转移酶一样以脂肪酰 CoA 为酰基供体,后者则以卵磷脂为酰基供体,表现为磷脂:甘油二酯酰基转移酶(PDAT)的活性,将供体分子中 sn-2 位酰基转至 TAG 的 sn-3 位^[11]。最近的研究发现还有两个具有脂肪酰 CoA 胆甾醇酰基转移酶(ACAT)活性的蛋白质 Are1p 和 Are2p,可能也用脂肪酰 CoA 为酰基供体,参与 DAG 酰化反应^[12]。另外,放射性同位素标记实验发现酿酒酵母的微粒体成份能以 DAG 和游离脂肪酸为底物合成 TAG^[13]。但到目前为止,尚未见分离或详细生物化学表征这种利用游离脂肪酸为酰基供体的酰基转移酶的报道。

关于产油酵母 TAG 合成多酶体系的研究工作直到最近才开始^[14]。实验表明粘红酵母(*R. glutinis*)TAG 合成多酶体系存在于细胞溶胶中,主要通过蛋白质间相互作用复合在一起。实验中分离出的多酶体系包含酰基载体蛋白(ACP)酰基-ACP 合成酶、AGAT、PAP 和 DAGAT。该多酶体系不仅能利用 LPA 和脂肪酰 CoA 合成 TAG,而且还可接受游离脂肪酸,合成 TAG 及其相关中间体。有趣的是,后来还发现一个铁超氧化物歧化酶(FeSOD)也和 TAG 合成多酶体系复合在一起,其作用可能是防止底物(如不饱和脂肪酸)和多酶体系中的蛋白质受到活性氧化物的损害^[15]。EMS 基因突变法使粘红酵母细胞溶胶 TAG 合成多酶体系失活,导致细胞生长和 TAG 生物合成速率下降^[16]。

可见,微生物 TAG 的生物合成途径中仍然存在着许多富有挑战性的研究课题,尤其对产油微生物 TAG 合成途径的研究还刚起步。比如,PA 合成时不同途径的生理功能及其相互关系问题;TAG 合成时两条主要途径的生理功能、相互关系以及其它旁路在甘油三酯生物合成代谢中的作用问题等。对这些问题的深入研究非常有利于将来在生产实践中应用产油微生物资源。

2.2 微生物油脂合成代谢调控

微生物高产油脂的一个关键因素是培养基中碳源充足,其他营养成分,特别是氮源缺乏。在这种情况下,微生物不再进行细胞繁殖,而是将过量的碳水化合物转化为脂类。虽然阐明从脂肪酰 CoA 合成 TAG 的途径在油脂合成中非常重要,但该途径并不是产油微生物所特有的。事实上,产油微生物对油脂积累的重要调控元件是有关脂肪酸合成的一些因素。

目前,人们对产油酵母和产油霉菌利用葡萄糖为碳源积累 TAG 的代谢途径已有比较深入的认识,图 1 简要说明了产油酵母中与 TAG 合成代谢调控相关的一些重要步骤。当产油微生物培养基中可同化氮源耗尽并且可同化碳源丰富的情况下,其 TAG 积累过程被激活。这个过程牵涉到微生物代谢和与代谢相关的一系列生理生化过程的变化。首先,当氮源枯竭时,产油微生物的腺苷一磷酸(AMP)脱氨酶活性增加,AMP 脱氨酶将 AMP 大量转化为肌苷一磷酸(IMP)和氨,相当于微生物对缺氮的一种应激反应^[17]。通常产油酵母线粒体中异柠檬酸脱氢酶(ICDH)都是 AMP 依赖性脱氢酶,细胞内 AMP 浓度的降低将减弱甚至完全停止该酶的活性^[18]。因此,异柠檬酸不再被代谢为 2-酮戊二酸,三羧酸(TCA)循环陷入低迷状态,代谢路径发生改变。线粒体中积累的柠檬酸

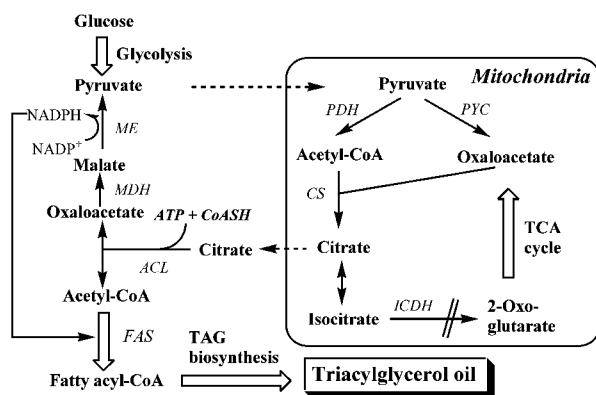


图 1 产油酵母油脂积累代谢调控途径简图

Fig.1 Outline of the metabolic regulation of lipid accumulation in oleaginous yeasts

ACL: ATP: Citrate lyase; CS: Citrate synthase; FAS: Fatty acid synthase; ICDH: Isocitrate dehydrogenase; MDH: Malate dehydrogenase; ME: Malic enzyme; PDH: Pyruvate dehydrogenase; PYC: Pyruvate carboxylase.

通过线粒体内膜上的苹果酸/柠檬酸转移酶转运进入细胞溶胶中^[19],在 ATP 柠檬酸裂解酶(ACL)的作用下裂解生成乙酰 CoA 和草酰乙酸。这样,微生物在氮源枯竭、蛋白质合成停滞的情况下仍可将葡萄糖有效地代谢为乙酰 CoA,并在脂肪酸合成酶(FAS)的作用下完成脂肪酰 CoA 的合成。然而,在产油真菌 *M. circinelloides* 和 *M. alpina* 中 ICDH 的体外活性并不完全依赖于 AMP^[20]。当环境氮源耗竭后 AMP 的浓度降低,仍然会减量调节 ICDH 的活力,激活这些真菌的油脂积累代谢。在产油接合菌(*Zygomycetes*)中,只有当无细胞抽提物中检测不出 ICDH 活性时,油脂的积累过程才会启动^[21]。如果能发展一种选择性抑制产油微生物 ICDH 的工具,也许可以在更宽松的培养基条件下使微生物在菌体内大量富积油脂。因此,我们正以油脂酵母为模型,探索专一性调控 ICDH 体内活性的化学生物学方法。然而到目前为止,产油微生物在响应限氮条件时 AMP 脱氨酶的上游信号传导机制还很不明确。另一个很基础的问题是,产油微生物为什么选择 AMP 而不是体内其它更易得到的含氮有机分子,作为氮的补充来源?

产油微生物油脂合成代谢调控中有两个关键酶,即 ACL 和苹果酸酶(ME)。柠檬酸裂解酶在细胞溶胶中催化柠檬酸裂解反应,提供油脂合成所需的乙酰 CoA。ACL 的活性与产油微生物的油脂积累的能力具有很强的相关性,还没有发现微生物能积累 TAG 超过其生物量的 20% 却没有 ACL 活性的例子。然而有一小部分的酵母菌具有 ACL 活性,但油脂的积累仍然不会超过生物量的 10%。因此,柠檬酸裂解酶是油脂积累的一个先决条件,但并不是有这种酶的微生物都是产油微生物^[22]。在不同酵母和真菌中也没有发现油脂积累的程度和 ACL 的活性具有明确的定量关系。

ACL 催化反应的另一产物草酰乙酸首先由苹果酸脱氢酶(MDH)还原成苹果酸,再在 ME 作用下氧化脱羧得到丙酮酸,并释放 NADPH。其中丙酮酸可透过线粒体膜进入线粒体,参与新一轮循环,而 NADPH 作为脂肪酸合成酶进行链延伸必不可少的辅助因子留在细胞溶胶中。线粒体中的丙酮酸既可以通过丙酮酸脱氢酶(PDH)产生乙酰 CoA,又可在丙

酮酸羧化酶(PYC)的作用下产生草酰乙酸。这两个产物在柠檬酸合成酶(CS)催化下合成柠檬酸,即 ACL 的底物,完成产油微生物 TAG 合成调控最重要的代谢循环。值得注意的是,线粒体中的乙酰 CoA 无法直接穿透线粒体内膜而进入细胞溶胶中参与脂肪酸合成。

脂肪酸合成不仅需要连续供给乙酰 CoA 用于碳链延伸,还需要提供足够的 NADPH。每一个乙酰 CoA 单元在新生脂肪酸碳链上延伸时需消耗两当量的 NADPH 用于还原反应。研究表明,产油微生物油脂积累的多少与 ME 的代谢调控有关,如果 ME 受到抑制,则油脂积累下降。这是因为虽然微生物代谢途径中有许多生成 NADPH 的过程,但 FAS 几乎只能利用由 ME 产生的 NADPH(图 1)^[23]。因此,有人认为产油微生物中 FAS 和 ME 等可能有机地复合在一起,形成成脂代谢体(Lipogenic metabolon)^[24]。研究推测真菌 *M. circinelloides* 至少含有六个 ME 同功酶,在不同的时空范围内或不同的生长环境下同功酶的活性表现出对不同代谢途径的调控过程^[25]。但目前尚未见分离出产油微生物 ME 基因的报道。最近 dos Santos 等^[26]以酿酒酵母为模型,利用基因工程方法成功实现对苹果酸酶表达量的调控。因此,如果能鉴定和分离产油微生物的 ME 基因,就可以利用基因工程手段甚至化学生物学手段选择性调控苹果酸酶的活性,提高微生物产油能力。相应地,本实验室已通过常规诱变等方法筛选得到一株具有较高产油能力的油脂酵母,正在开展该酵母菌中 ME 基因的分离和鉴定工作。

最后需要特别说明的是,当外界条件改变时产油微生物体内的 TAG 也可能被降解。例如,产油霉菌 *M. isabellina* 只要培养基中碳源耗竭后就会大量分解储存的 TAG,对于 *C. echinulata* 则还需要培养环境中具有较丰富的铁离子、镁离子或酵母提取物时才会启动降解储存 TAG 的机制^[21]。这些结果对产油微生物的发酵工程设计具有重要参考价值。

尽管目前对产油微生物 TAG 生物合成和代谢调控机制的研究已取得了重要进展,但尚未见成功地通过基因调控手段增加细胞内油脂贮存含量的例子。因此,微生物产油脂领域具有广阔的研究发展空间。随着化石资源日益枯竭和世界各国能源供应形势日趋严峻,通过微生物转化和利用基于碳水化合物的可再生资源已成为社会经济可持续发展的迫切要求。应充分利用现代分子生物学、化学生物学和生物化工技术的最新成果,加快对产油微生物菌种筛选、改良、代谢调控和发酵工程的研究,降低获取微生物油脂的成本,使微生物产油的研究领域取得更快的发展。

参 考 文 献

- [1] Ratledge C, Wynn J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, **51**: 1–51.
- [2] Certik M, Shimizu S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**: 1–14.
- [3] Somashekar D, Venkateshwaran G, Sambiah K, et al. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochemistry*, 2002, **38**: 1719–1724.
- [4] 朱法科,林炜铁,鲍时翔,等.花生四烯酸高产菌株的选育. *工业微生物*, 1999, **29**: 1–3.
- [5] Bajpai P, Bajpai P K, Ward O P. Eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, **31**: 267–272.
- [6] Singh A, Ward O. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Adv Appl Microbiol*, 1997, **45**: 271–312.
- [7] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technol*, 2004, **95**: 287–291.
- [8] Sorger D, Daum G. Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**: 289–299.
- [9] Zheng Z, Zou J. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphatidyl substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 1710–1716.
- [10] Oelkers P, Cromley D, Padamsee M, et al. The DAG1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 8877–8881.
- [11] Dahlqvist A, Stahl U, Lanman M, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyl-transferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **12**: 6487–6492.
- [12] Sandager L, Gustavsson M, Stahl U, et al. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 6478–6482.
- [13] Sorger D, Daum G. Synthesis of triacylglycerols by the acyl coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 519–524.
- [14] Gangar A, Karande A A, Rajasekharan R. Isolation and localization of a cytosolic 10 S triacylglycerol biosynthetic multienzyme complex from oleaginous yeast. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 10290–10298.
- [15] Raychaudhuri S, Reddy M, Rajkumar N R, et al. Cytosolic iron superoxide dismutase is a part of the triacylglycerol biosynthetic complex in oleaginous yeast. *Biochem J*, 2003, **372**: 587–594.
- [16] Gangar A, Raychaudhuri S, Rajasekharan R. Alteration in the cytosolic triacylglycerol biosynthetic machinery leads to decreased cell growth and triacylglycerol synthesis in oleaginous yeast. *Biochem J*, 2002, **365**: 577–589.
- [17] Evans C T, Scragg A H, Ratledge C. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts by adenine nucleotides. *Eur J Biochem*, 1983, **132**: 609–615.
- [18] Botham P A, Ratledge C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *J Gen Microbiol*, 1979, **114**: 361–375.
- [19] Palmieri L, Palmieri F, Runswick M J, et al. Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein. *FEBS Lett*, 1996, **399**: 299–302.
- [20] Wynn J P, Hamid A A, Li Y, et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 2001, **147**: 2857–2864.
- [21] Papanikolaou S, Sarantou S, Komaitis M, et al. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *J Appl Microbiol*, 2004, **97**: 867–875.
- [22] Adams I P, Dack S, Dickinson F M, et al. The distinctiveness of ATP: citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1597**: 36–41.
- [23] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**: 1047–1050.
- [24] Linn T C, Srere P A. Binding of ATP citrate lyase to the microsomal fraction of rat liver. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 13379–13384.
- [25] Song Y, Wynn J, Li Y, et al. A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucor circinelloides*. *Microbiology*, 2001, **147**: 1507–1515.
- [26] dos Santos M M, Raghevedran V, Kotter P, et al. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metab Eng*, 2004, **6**: 352–363.

Progress on microbial glyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms

LIU Bo SUN Yan LI Yong-hong ZHAO Zong-bao*
(Division of Biotechnology , Dalian Institute of Chemical Physics , Chinese Academy of Sciences , Dalian 116023 ,Chian)

Abstract : Oleaginous microorganisms are small portion of organisms that have ability to accumulate lipids over 20% of their biomass. These species can transform renewable material into microbial oil with similar fatty acid composition to that of plant-based oil. Some organisms may also produce glycerides with high content of poly-unsaturated fatty acids. Therefore , microbial lipids are considered as potential oil resource. Summarized here are some features of oleaginous species and recent developments on their biosynthetic machinery and metabolic regulation mechanism.

Key words :Oleaginous microorganisms , Microbial lipids , Biosynthesis , Metabolic regulation

* Corresponding author. Tel/Fax 86-411-84379211 ; E-mail :zhaozb@dicp.ac.cn
Received date :05-24-2004

《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编	李季伦	院 士	中国农业大学生物学院		
副主编	谭华荣	研究员	中国科学院微生物研究所		
	陆德如	研究员	第二军医大学遗传研究所		
	王敖全	研究员	中国科学院微生物研究所		
	曲音波	教 授	山东大学生命科学学院		
	徐建国	研究员	中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所		
编 委	(按姓名拼音排序 , * 2003 年 7 月增补)				
	蔡永峰	高 工	天津市工业微生物研究所	盛 军	研究员 长春生物制品研究所
	陈永青	教 授	复旦大学生命科学学院	唐 宏	研究员 中国科学院微生物研究所
	程 池	高 工	中国食品发酵工业研究所	田 波	院 士 中国科学院微生物研究所
	东秀珠	研究员	中国科学院微生物研究所	王 平	教 授 华中农业大学生命科技学院
	范云六	院 士	中国农业科学院生物技术所	* 王华明	研究员 Genencor International , USA
	郭 俊	研究员	广东省微生物研究所	谢 红	研究员 山西省生物研究所
	胡福泉	教 授	第三军医大学微生物教研室	杨苏声	教 授 中国农业大学生物学院
	胡远扬	教 授	武汉大学生命科学学院	翟中和	院 士 北京大学生命科学学院
	黄 力	研究员	中国科学院微生物研究所	* 张耀平	教 授 Department of Bacteriology , University of Wisconsin-Madison ,USA
	陆承平	教 授	南京农业大学动物医学院	郑天凌	教 授 厦门大学生命科学学院
	闵 航	教 授	浙江大学生命科学学院	朱宝泉	研究员 上海医药工业研究院
	钱世钧	研究员	中国科学院微生物研究所	诸葛健	教 授 江南大学生物工程学院
	邵一鸣	研究员	卫生部艾滋病预防中心		
编 辑	王晋芳	王 敏			