

提高微生物油脂生产能力的研究进展

郭小宇 杨兰 李宪臻 杨帆*

(大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

摘要: 微生物油脂是生物柴油生产领域具有广阔前景的新油脂资源。然而, 利用产油微生物进行油脂的工业化生产仍存在限氮条件下油脂生产强度不够高、对廉价高氮生物质原料的利用效率低等瓶颈问题。随着近年来发酵工程、生物信息学及分子生物学技术的发展, 国内外研究者利用不同策略优化微生物油脂的生产条件, 并对其油脂积累代谢途径进行改造, 旨在获得适用于工业化生产的产油性能优良的油脂菌。本综述总结了国内外利用生化工程、基因工程以及新兴的转录因子工程策略提高产油微生物油脂生产强度和扩大产油微生物廉价底物利用范围方面的研究进展, 并展望了基于组学研究、模块途径工程以及反向代谢工程的综合策略在理性改造产油微生物以提高其油脂发酵性能中的应用。

关键词: 微生物油脂, 生化工程, 基因工程, 转录因子工程

Advance in enhancing production of microbial lipids

GUO Xiao-Yu YANG Lan LI Xian-Zhen YANG Fan*

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: Microbial lipid is the novel and promising oil resource for biodiesel production, whereas its production is difficult to meet industrial demand because of the low lipid productivity at the nitrogen-limited condition or inefficient conversion of cheap biomass into lipid. In the last decade, as the development of fermentation engineering, bioinformatics and molecular technologies, many strategies were used to modify the metabolic pathway for lipid accumulation and build up an excellent lipid-producing strain. In this paper, three potential strategies for enhancing the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31201302, 31000052)

*通讯作者: Tel: 86-411-86318692; ✉: fayeyang1026@gmail.com

收稿日期: 2013-07-23; 接受日期: 2013-08-29

lipid productivity of oleaginous microorganism was reviewed, which includes the biochemical engineering (BE) approach, the genetic engineering (GE) approach, and the transcription factor engineering (TFE) approach. A comprehensive strategy based on the genomic information, the inverse metabolic engineering and the modular pathway engineering (MOPE) was described for rational construction of an industrial oleaginous strain.

Keywords: Microbial lipid, Biochemical engineering, Genetic engineering, Transcription factor engineering

世界人口的急剧增长加速了对石油、煤和天然气等化石能源的消耗。此外,化石能源的过量使用造成全球自然环境的不断恶化。因此,从资源开发与环境保护角度出发,积极开发能替代化石燃料的可再生新能源成为亟待解决的世界性问题。生物柴油的主要化学成分为长链脂肪酸(甲)酯,由于其具有能量密度高、含硫量低、燃烧充分、润滑性能好、可再生、易生物降解、储运安全、抗爆性好等特点,被认为是化石柴油的很有潜能的替代品,日益受到国内外的关注。目前,国内外多采用含油植物,如大豆、油菜、棕榈和蓖麻等作为生物柴油的生产原料。然而,这类农作物生长周期长、耗费人力资源、并且占用大量的耕地面积,使得生物柴油生产的原料成本占总成本的 70%–85%。所以依靠植物油脂资源是制约生物柴油产业发展的瓶颈^[1]。由此,生物柴油产业化关键是寻找廉价油脂资源。

微生物油脂(Microbial lipid)又称单细胞油脂(Single cell oil, SCO),是由酵母、霉菌、藻类和细菌等微生物在一定条件下,将碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂作为碳源转化并贮存在体内的油脂。其中,酵母菌、霉菌产生的油脂组成与植物油一致,主要为甘油三酯(Triacylglycerol, TAG),以 C16、C18 系脂肪酸为主;藻类胞内合成油脂中多不饱和脂肪酸含量较高,而细菌则主要积累一些特殊的类脂(如蜡、聚- β -羟丁基等)^[2]。与种植油料植物相比,微生物油脂由于其生产具

有很多不可比拟的优越性,如周期短、可连续生产、可规模化利用自然界丰富的碳水化合物资源,因此,微生物油脂是具有广阔前景的新油脂资源,可能在未来生物柴油产业中发挥重要作用。然而,利用产油微生物进行油脂的工业化生产仍存在问题:首先,限氮条件下油脂生产强度不够高[通常小于 1.0 g/(L·h)];其次,许多廉价生物质原材料的氮含量高,原料碳氮比不适用于油脂发酵。目前,针对微生物油脂所展开的研究工作仍以富含多不饱和脂肪酸的高附加值菌油为目标。

随着现代分子生物学和生物化工技术的发展,越来越多的新策略被用来对产油微生物菌种进行优化发酵、改良及代谢调控,旨在获得适于微生物油脂工业化放大生产的工程菌株。本综述从生化工程(Biochemical engineering, BE)、基因工程(Genetic engineering, GE)以及新兴的转录因子工程(Transcription factor engineering, TFE)三方面策略出发,介绍国内外在提高产油微生物油脂生产强度和扩大产油微生物廉价底物利用范围方面的研究进展,并展望了组学研究、模块途径工程以及反向代谢工程在理性改造产油微生物以提高其油脂发酵性能中的应用。

1 利用生化工程策略提高微生物的产油性能

生化工程策略指的是通过控制培养基成分或培养条件,如发酵的温度、pH 值及发酵方式等,

引导代谢流由碳源指向油脂的生物合成。到目前为止, 氮源限制是激发微生物进行油脂合成最普遍采取的手段, 微生物在这种外界环境的刺激下将培养基中过量的碳源转化为油脂贮存在胞内。

李永红等^[3]采用均匀设计及单因素法考察了一株产油菌株圆红冬孢酵母(*Rhodosporidium toruloides* Y4) 在不同碳氮比条件下产油发酵情况。碳氮比 C/N (mol/mol) 为 315、571、593、694 时油脂含量分别达到细胞干重的 67.6%、72.4%、74.9%、72.5%, 表明胞内油脂含量随着 C/N 的增加而增大。曲威等^[4]以斯达氏油脂酵母(*Lipomyces starkeyi* AS 2.1560) 为出发菌株, 采取紫外诱变和氯化锂复合诱变的方法成功筛选到一株油脂高产菌株 M36, 并考察了该菌株在摇瓶中进行限氮培养的发醇条件, C/N 为 200 时脂肪得率系数最高, 达到 19.25, 由此可见, 氮源限制对斯达氏油脂酵母油脂积累有明显的促进作用。

已有研究表明, 除了限氮手段外, 对培养基中其他营养成分(如磷、硫、铁等)的限制也能够使细胞停止增殖并开始油脂的合成与积累。Youngquist 等^[5]对一株高产脂肪酸的大肠杆菌分别进行了限碳、限氮和限磷恒化培养。结果表明, 较之限碳培养, 培养基中氮源及磷源匮乏均能激发脂肪酸的合成和积累。其中, 限磷培养条件下脂肪酸产量达 0.1 g FFA/g glucose。吴思国等^[6-7]以葡萄糖为碳源, 考察了限磷及限硫条件对圆红冬孢酵母菌 *R. toruloides* Y4 胞内油脂含量的影响。当培养基初始 C/P 为 9 550 mol/mol 时, 即使 C/N 低至 6.1 mol/mol, *R. toruloides* Y4 油脂含量仍达到 62.2%, 油脂得率为 0.205 g/g glucose。当 C/S 为 46 750 mol/mol 时, 胞内油脂含量可达到 58.3%, 以上结果表明, 控制培养基初始 C/P 或 C/S 能调控 *R. toruloides* Y4 油脂积累, 磷限制及硫限制可作为微生物油脂合成积累一个有效的调控手段, 为利用富含氮源的廉价生物质底物生

产微生物油脂提供了崭新的思路。

除了培养基的营养限制手段, 对产油微生物发酵培养方式进行适当优化也能够提高微生物油脂产量。林金涛等^[8]采用细胞增殖和油脂积累分离的两阶段模式, 即细胞增殖阶段获得 *R. toruloides* AS 2.1389 细胞, 重悬接种在高浓度葡萄糖溶液中使其快速积累油脂, 菌体油脂含量超过自身干重的 55%。此外, 研究还发现, 增殖阶段细胞的菌龄越高, 产油能力越强。Zhao 等^[9]随后利用菊芋浸提液及菊芋稀酸水解液为碳源进行 *R. toruloides* Y4 油脂发酵。当采用 15 L 发酵罐进行批式发酵 45 h 时, 生物量和油脂产量分别达到 40 g/L 和 17.2 g/L, 较之摇瓶发酵结果分别提高了 57%和 70%。而当采用发酵罐进行批式补料发酵 118 h 时, 生物量和油脂产量分别达到了 70 g/L 和 39.6 g/L, 较之批式发酵, 分别提高了 75%和 130%。以上结果均表明不同发酵方式对产油微生物的产油能力有较大影响。

作为调控微生物油脂积累的有效途径, 生化工程方法也有其局限性, 其中最大的障碍是激发油脂过量积累所需要的营养元素的限制所引起的生物量偏低。针对于此, 目前对产油微生物采取两阶段发酵方式: 第一阶段利用氮源充足培养基促进细胞生长及增殖; 第二阶段在氮源限制或其他生理压力下激发油脂的合成与积累。这种方式造成了微生物油脂生产周期过长, 生产力过低, 不利于工业化生产。随着分子生物学技术的迅速发展以及途径工程理念的日益深入, 越来越多的基因工程策略被应用于理性改造产油微生物, 旨在免去人为添加促进油脂合成的生理压力, 而直接利用丰富培养基发酵微生物进行油脂生产。

2 利用基因工程策略提高微生物的产油性能

基因工程又称 DNA 重组技术, 可以改变生

物原有的遗传特性,增加原有代谢物的生成量或合成新的代谢物。随着基因工程相关技术的迅速发展,对产油微生物油脂积累代谢相关途径进行遗传学改造,以获得适合工业化生产的优良菌株已经越来越成为研究的热点。迄今,由于产油酵母、霉菌的基因组测序工作处于起步阶段,遗传学背景并不清晰,缺乏成熟的遗传操作平台,因此,利用基因工程手段进行菌株改造还处在起步阶段。对于产油微藻,由于与其亲缘关系较近的几株微藻已经完成了全基因组测序,并且有比较成熟的遗传转化体系,对其的遗传学改造已经展开^[10]。目前,大部分的研究工作集中在对一些非产油模式物种的遗传改造,并在促进细胞油脂合成方面取得了一定的进展,为今后对产油微生物的改造提供了有价值的研究背景。

2.1 甘油三酯(TAG)合成途径关键酶的过量表达

细胞内油脂的生物合成包括三个关键步骤:(1) 乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA)羧化形成丙二酸单酰辅酶 A (Malonyl-CoA),该步骤是脂肪酸生物合成的关键步骤;(2) 酰基链的延长;(3) 甘油三酯 TAG 的形成。

图 1 所示为脂肪酸及甘油三酯生物合成的关键途径。在脂肪酸的合成及酰基链的延长途径中,乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl-CoA carboxylase, ACC)催化乙酰辅酶 A 通过生物素依赖型的羧化反应形成丙二酸单酰辅酶 A,是脂肪酸合成重要的第一步。丙二酸单酰辅酶 A 一旦合成,便被丙二酸单酰辅酶 A:ACP 转移酶转运至脂肪酸合酶(Fatty acid synthase, FAS)多酶复合体中的酰基转运蛋白(Acyl-carrier protein, ACP),FAS 通过将乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 进行缩合反应实现脂肪酸链的延长。TAG 合成的第一步是脂酰辅酶 A (Fatty acyl-CoA) 和 甘油 -3- 磷酸(Glycerol-3-phosphate)缩合形成 1-单酰甘油-3-磷

酸(Lysophosphatidate, LPA),这一步反应是由酰基辅酶 A:甘油-3-磷酸酰基转移酶(Acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyl-transferase GPAT)催化的,该酶表现出 TAG 合成途径中的最低酶活,因此被认为是限速步骤^[11]。LPA 随后继续被 GPAT 催化与另一个酰基辅酶 A 缩合形成 1,2-二脂酰甘油-3-磷酸(磷脂酸, Phosphatidic acid, PA)。之后,PA 被磷脂酸磷酸酶(Phosphatidic acid phosphatase, PAP)去磷酸化生成甘油二酯,最后,在酰基辅酶 A:甘油二酯酰基转移酶(Acyl-CoA:diacylglycerol acyl-transferase, DGAT,被认为是 TAG 合成路径中重要的调节元件)的作用下,第三个酰基辅酶 A 被整合到甘油二酯,即得到最终产物 TAG^[11]。综上,微生物体内油脂合成的几种关键酶,如 ACC、FAS、及 DGAT 等成为基因工程改造微生物油脂合成途径的主要靶点,国内外相关研究工作也围绕着这几种关键酶展开。

作为脂肪酸生物合成限速步骤的催化酶,乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC 在油脂合成中的功能受到

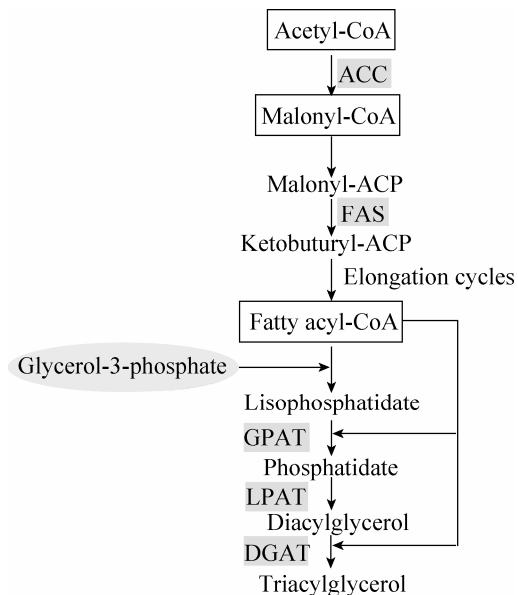


图 1 脂肪酸及甘油三酯的生物合成^[10]

Fig. 1 The pathway for the biosynthesis of fatty acids and TAG^[10]

广泛关注。Ruenwai 等^[12]在非产油酵母 *Hansenula polymorpha* 中异源表达了来自产油真菌 *Mucor rouxii* 的 ACC 基因, 使其胞内脂肪酸含量提高了 40%, 表明产油菌株的 ACC 在油脂积累过程中起到重要作用。Lennen 等^[13]在大肠杆菌 *Escherichia coli* 里过表量达了 ACC 基因, 抑制了 β -氧化途径, 同时表达了来源于月桂 *Umbellularia californica* 的酰基载体蛋白硫酯酶, 最终的重组菌株脂肪酸含量提高了 7 倍。随后, Lu 等^[14]在大肠杆菌中过量表达了 ACC 羧化酶以增加前体丙二酸单酰-CoA 的供应, 通过同时敲除 *fadD* 基因限制长链脂肪酸分解途径, 过量表达来源于油料植物种子的硫酯酶以加强脂肪酸合成速率, 表达内源硫酯酶解除长链脂酰-CoA 反馈抑制, 最后脂肪酸产量达到 2.5 g/(L·d)。然而, 重组大肠杆菌的油脂产量仍未见明显提高, 意味着脂肪酸形成后存在一种次级限制步骤, 阻止了大肠杆菌中脂肪酸向油脂的有效转化。

脂肪酸合酶 FAS 具有多酶复合体的复杂结构, 其包含的各亚基活性受到彼此制约, 且由于不同物种来源的 FAS 有不同的多点调控机制, 因此, 异源表达 FAS 比较困难, 使之被认为是增强脂肪酸代谢过程中一个非常具有挑战性的遗传操作靶点。Verwoert 等^[15]在油菜籽中过表达了大肠杆菌的 *KAS III* 基因, 导致所产脂肪酸成分发生了改变, 其中短链脂肪酸(14:0)所占比例增加, 而长链脂肪酸(18:1)所占比例减少。这一改变显著地影响了植物细胞的生长。同样的, Shin 等^[16]在一株高产三十碳六烯的酿酒酵母菌中过表达了 *FAS1* 和 *FAS2* 基因, 结果导致胞内固醇和三十碳六烯含量的显著增加, 同时伴随着脂肪酸含量的降低。目前, 尚未见单独表达 FAS 或其亚基引起油脂含量显著增高的报道。

如前所述, 酰基辅酶 A:甘油二酯酰基转移酶 DGAT 催化甘油二酯和酰基辅酶 A 生成 TAG, 为 TAG 生物合成途径中最后一步反应, 因此被预测

在油脂合成途径中可能起到关键作用。奥地利学者 Athenstaedt^[17]在一株 TAG 合成缺陷的酿酒酵母 *S. cerevisiae* 突变株中过量表达了来自耶氏解脂酵母 *Yarrowia lipolytica* 的 DGAT, 令该缺陷型菌株恢复了合成积累 TAG 的能力。而当 *Y. lipolytica* 的 DGAT 被敲除后, 当以葡萄糖为碳源时, 胞内 TAG 积累水平显著下降。Yu 等^[18]在 *S. cerevisiae* 中过表达了甘油激酶 GUT1、DGAT 及磷脂:二酰基甘油酰基转移酶 LRO1, 使得重组菌在以甘油为碳源时, 三磷酸甘油的积累量提高了 2.4 倍; 当发酵时间为 96 h 时, 该重组菌产生 8.2% 的 TAG, 比野生型 *S. cerevisiae* 产量提高了 2.3 倍。Tai 等^[19]将 *Y. lipolytica* 的 *DGAT* 基因克隆在一种强启动子——翻译延长因子启动子(TEF)的下游, 使其表达水平提高了 17 倍, 最终导致重组菌株的油脂含量达细胞干重的 33.8%, 较之野生型菌株提高了 4 倍。以上研究结果可以归因为关键酶 DGAT 的过表达能够使更多的甘油二酯流向 TAG 的合成路径而非磷脂的形成路径, 并证明了 DGAT 催化的反应对于油脂的生物合成来说是一步重要的限速步骤。

2.2 油脂积累调控关键酶的过量表达

研究表明, 相对于非产油微生物, 产油微生物并不具有额外的油脂合成途径, 其胞内油脂积累是通过一个可调控的高度偶联的代谢网络和选择性的物质运输系统来实现的^[20]。因此, 除了 TAG 合成途径中的关键酶, 还有一些酶虽然不直接参与油脂的代谢, 但是能够通过增加油脂合成所需的一些关键的中间代谢产物而对微生物胞内的油脂积累起到重要的调控作用。如图 2 所示, 当培养基中氮源耗尽, 产油微生物的 AMP 脱氨酶被激活, 将大量的 AMP 转化为 IMP 和 NH_4^+ , 这是一种应对氮源匮乏特有的应激反应。AMP 浓度的降低, 直接导致受其变构调节的线粒体异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase, IDH)活性的降低甚至失活, 异柠檬酸不再被代谢为 α -酮戊二酸, 三羧酸循环陷入低迷状态。线粒体中的柠

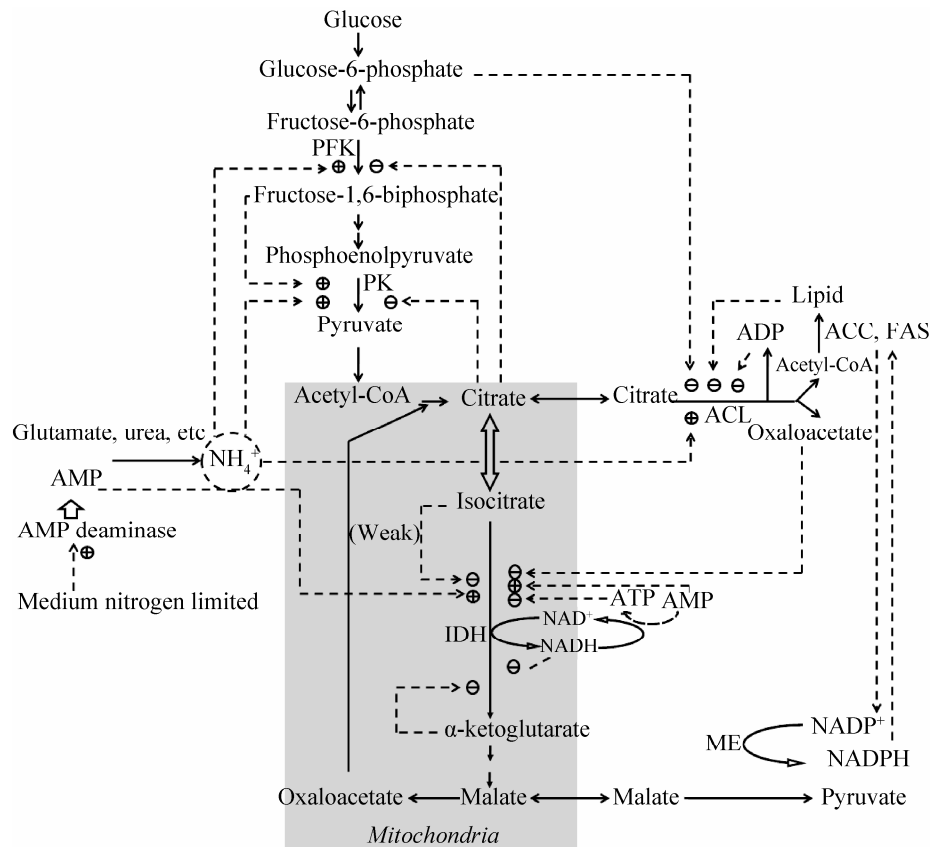


图2 产油微生物油脂积累过程中关键酶的调控机制^[21]

Fig. 2 Regulatory controls of key enzymes during microbial lipid accumulation^[21]

柠檬酸将大量积累并通过线粒体内膜载体转运至胞浆中,在ATP-柠檬酸裂解酶(ATP citrate lyase, ACL)的催化作用下分解为草酰乙酸和乙酰辅酶A,后者在脂肪酸合酶(FAS)的作用下合成脂肪酰辅酶A,最终进入TAG的合成路径^[21]。值得一提的是,ACL在非产油微生物中没有活性或者根本不存在,这也是产油微生物区别于其他微生物的特性之一。事实上,脂肪酸是高度还原性物质,要实现其生物合成需要大量的NADPH供给,苹果酸酶(Malic enzyme, ME)能够催化苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸和NADPH,而脂肪酸合酶恰恰几乎只能利用ME产生的NADPH,因此,ME的活性直接影响到胞内油脂积累的量的多少^[22]。

基于已探明的微生物油脂积累调控机制,国

内外学者近年来针对几种油脂调控关键酶相继展开了研究。Yang等^[21]对产油酵母*R. toruloides*的异柠檬酸脱氢酶IDH的编码基因进行了克隆,并在IDH基因缺失的酿酒酵母BY4741中进行了异源表达。结果表明,随着碳氮比的增加,重组菌株胞内油脂含量及胞外柠檬酸含量均显著增加,而野生型酿酒酵母并未表现出类似的关联性。意味着不同于酿酒酵母IDH,来自*R. toruloides*的IDH可能对油脂积累起到调控作用。Tang等^[23]对*S. cerevisiae*油脂调控途径进行了遗传改造以增加油脂合成前体乙酰辅酶A的含量。首先,*S. cerevisiae* IDH基因的敲除导致胞浆中柠檬酸水平提高了4-5倍;随后又在IDH基因缺失的酿酒酵母中过表达了来自小家鼠的ACL基因,

使得不饱和脂肪酸得到大量积累, 其中 C16:1 脂肪酸含量增加了 92%, C18:1 脂肪酸含量增加了 77%, 证明 ACL 的过表达有效地将过量积累的柠檬酸转化为了油脂合成前体乙酰辅酶 A。

Li 等^[22]在一株产油红酵母 *Rhodotorula glutinis* 中过表达了来源于卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 的苹果酸酶 ME, 重组菌株油脂发酵 96 h 时, ME 酶活性提高了 2 倍, 酵母胞内油脂含量提高到了 39.35%, 较之野生型菌株提高了约 2 倍, 并且脂肪酸的组成未见明显变化。Zhang 等^[24]也采取了相似的策略使油脂合成由于 ME 的过表达不再受到还原力的限制, 他们将卷枝毛霉 *M. circinelloides* 及高山被孢霉 *Mortierella alpine* 的 ME 编码基因 *malEMt* 和 *malEMc* 分别在 *M. circinelloides* 中过表达, 重组菌株的 ME 酶活分别提高了 2 倍和 3 倍, 油脂含量分别提高了 2.5 倍和 2.4 倍。以上研究均表明 *M. circinelloides* 的 ME 在油脂合成积累过程中起重要作用。

2.3 油脂积累竞争途径的阻断

根据代谢工程的观点, 将油脂合成的竞争途径阻断, 同样能达到加强代谢流指向 TAG 合成路径的目的。微生物体内油脂合成积累主要的竞争途径包括: β -氧化、磷脂的生物合成及磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)向草酰乙酸的转化。

β -氧化是真核生物降解脂肪酸的主要代谢途径, 但由于 β -氧化对细胞能量的供应有着至关重要的作用, 并且脂肪酸的大量积累会对细胞产生毒性。因此, 不可能将这条途径完全阻断。目前还没有通过直接抑制 β -氧化而提高脂肪酸含量的报道。Cao 等^[25]采用了一种间接方式减弱了假丝酵母 *Candida tropicalis* 的 β -氧化途径, 即通过抑制过氧化酶体及线粒体 TCA 循环中与 β -氧化偶联的乙酰辅酶 A 转运系统来实现 β -氧化途径的衰减。当 *C. tropicalis* 乙酰辅酶 A 转运酶 CAT 的活性降低 50%, 导致能够在 β -氧化中被降解的二羟酸含量增加了 21%。

磷脂由于与 TAG 有着相同的底物——磷脂酸, 当磷脂酸转化为 CDP-甘油二酯而非甘油二酯时, 就进入了磷脂的生物合成途径。因此磷脂的生物合成成为 TAG 生物合成的另一个“竞争者”。如前所述, DGAT 的过表达能够有效地使磷脂酸流向 TAG 合成路径, 另一方面, 对磷脂合成途径的阻断, 将导致额外的脂肪酸延长循环, 造成非正常脂肪酸的形成^[26]。

第三条竞争途径是 PEP 羧化酶(PEPC)所催化磷酸烯醇式丙酮酸 PEP 向草酰乙酸的转化。由于 PEP 同时为 TAG 的合成提供大量的丙酮酸及乙酰辅酶 A, 因此, PEPC 活性的阻断将导致 PEP 主要流向 TAG 的生物合成。Deng 等^[27]考察了限氮培养时绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中油脂积累的情况, 结果表明, 氮源匮乏时 *C. reinhardtii* 油脂含量明显增加, 同时伴随着 PEP 羧化酶转录水平的显著降低。随后, 通过 RNAi 技术下调 PEP 羧化酶转录水平, 导致重组菌胞内油脂含量提高了 14%–28%。该研究表明, PEP 羧化酶 mRNA 丰度与 *C. reinhardtii* 胞内油脂含量负相关。

3 利用转录因子工程策略提高产油性能

转录因子是指一类通过识别特殊的 DNA 序列, 并建立蛋白质-DNA 及蛋白质-蛋白质相互作用而调控 DNA 转录的蛋白质。根据保守结构和 DNA 结合域, 转录因子家族超过 50 种。转录因子可以被用作某代谢物合成的阻遏物, 也可以仅仅对某代谢产物的合成起到轻微的抑制作用^[10]。基于该原理, 近年来转录因子工程(Transcription factor engineering, TFE)得到了发展, 即利用转录因子来调控一系列酶的丰度或活性, 以提高这些酶参与合成的目标代谢物的产量。

油脂的积累涉及到油脂的生物合成及分解代谢, 是一个非常复杂的系统, 通过改变一种或几种基因显著提高油脂含量难度很大。针对以上问

题,已有学者提出利用转录因子途径调控油脂的积累。该途径的主要优势在于,转录因子参与调控代谢途径中的一系列基因。因此,可以通过调控相关转录因子,进而带动 TAG 合成代谢途径中的一系列基因表达水平上调或下降,促使碳源流向 TAG 的合成路径并得到大量积累。虽然利用转录因子工程改造产油微生物的研究还处于襁褓期,但是对模式非产油菌株进行转录因子调控,以提高胞内油脂含量的研究已经展开,并取得了一定的进展。Kamisaka 等^[28]在酿酒酵母 *S. cerevisiae* 中发现了转换/蔗糖不发酵染色质重建复合体(Switching/sucrose nonfermenting chromatin-remodelling complex, SWI/SNF),其中的组成部分——转录因子 SNF2 参与油脂的积累。通过对 *S. cerevisiae* BY4741 SNF2 编码基因的敲除,使其油脂含量有显著的提高。同时,通过在 $\Delta snf2$ 型菌株中过表达 DGAT 和 ACC,使胞内油脂含量达到了 30%。该研究利用转录因子敲除策略成功地将一株非产油酵母改造为高产油酵母菌,为产油微生物的转录因子工程改造提供了非常有价值的技术信息平台。

目前,几种产油微生物基因组中的转录因子已经被注释出来,而其中仅有少数几种转录因子的生物学功能得到确定。此外,与产油微生物油脂积累调控密切相关的转录因子的鉴定还鲜有报道^[10]。因此,采用先进技术从庞大的基因组数据库中鉴定、纯化出转录因子并对其功能进行注释,对于利用转录因子工程理性改造产油微生物意义重大。目前,转录因子的鉴定手段主要是目标代谢物生产与非生产发酵条件下的转录组与蛋白质组的比较。Nguyen 等^[29]于 2008 年利用微芯片技术对一株莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 的转录组进行了分析,试图找出调控产氢的转录因子。他们利用微芯片获得了限硫产氢过程中不同时间点 *C. reinhardtii* 高丰度 mRNA 表达谱,随后利用实时定量反转录及蛋白质分析技术,预测出 10 个具

备转录调控功能的基因,其中 4 个基因在产氢阶段表达上调。此外,多种技术已经被用来对转录因子的结构及与特定 DNA 序列的相互作用进行分析,包括凝胶迁移阻滞实验(EMSA)^[30]、DNase I 保护实验(DNA 印记)^[31]、Southwestern 杂交实验^[32]、核磁共振技术^[33]及 X 射线晶体衍射技术^[34]等。目前,利用转录因子策略改造产油微生物产油性能的研究还处于起步阶段,为了加速该策略的应用,与产油微生物油脂积累代谢调控密切相关的转录因子的鉴定工作显得尤为重要。

4 展望

迄今为止,对油脂代谢途径的基因工程改造主要是针对单个或少数几个基因进行操作,而对该路径上的多个基因操作及调控由于技术难度目前还鲜见报道。今后,借助以下三方面技术、理念的发展,我们可以采用综合性策略对微生物进行理性改造以获得产油性能优良的工程菌株。

首先,高通量测序技术的迅猛发展,将基因组、转录组的研究带入了一个崭新的时期。随着 454 Life Science 公司、ABI 公司和 Illumina 公司推出第二代测序技术及 Helicos Heliscope 和 Pacific Biosciences 推出单分子测序技术,产油微生物全基因组测序的时间及成本都已大大降低,更多与产油微生物油脂积累代谢调控密切相关的遗传信息及表达调控相关转录因子将陆续被揭示。其次,由强大测序技术所支持的反向代谢工程理念(Inverse metabolic engineering, IME)也为我们对产油微生物的遗传操作提供了新的思路。Ohnishi^[35]与他的同事利用反向代谢工程手段构建了一株高产赖氨酸的谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum*。他们测序并比较了生长性能不佳的基因工程菌株及生长性能良好的野生型菌株的基因组信息,在基因工程菌株中发现了可能影响赖氨酸合成的突变信息,随后,将这些与赖氨酸合成密切相关的遗传靶点引入到

野生型菌株中,以考察赖氨酸的产量是否有所改变。该研究成功的构建了赖氨酸生产力为 3 g/(L·h) 的高产工程菌。最后,新兴的“模块途径工程”策略为快速、有效地同时操作多个油脂积累调控相关的遗传靶点提供了技术保障。中国科学院大连化学物理研究所的周雍进等^[36]于 2011 年首次提出“模块途径工程”策略(Modular pathway engineering strategy, MOPE)。该策略所使用的一步重叠延伸 PCR 技术(One-step SOE PCR)大大减少了构建不同遗传操作靶点表达盒(模块)所需的时间,随后可将构建的模块按照不同的排列组合通过一步电击转化法导入 *S. cerevisiae* 中,在 *S. cerevisiae* 高效同源重组机制的作用下,各模块按照预定的顺序迅速组装,最终形成研究所需的重组菌株(图 3)。

综上所述,在未来的研究工作中,我们可以综合以上的先进技术和理念,发展一种综合策略来理性改造油脂生产菌(图 4)。利用反向代谢工程的理念,通过人工突变筛选出具备优良产油表型的菌株,利用基因组、转录组测序技术,比较突变前后遗传信息的变化,找出这些关键遗传操作靶点,利用模块途径工程技术,同时操作多个靶点,实现对产油微生物的多靶向性改造,最终获得适于工业化生产的性能优良的微生物油脂生产菌株。

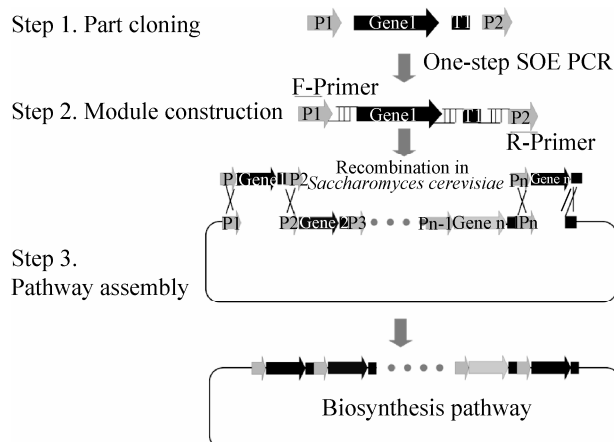


图 3 “模块途径工程”策略^[36]

Fig. 3 Modular pathway engineering (MOPE) strategy^[36]

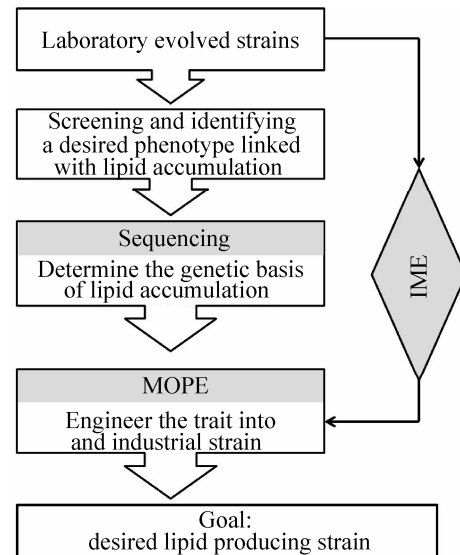


图 4 构建具有优良油脂生产表型工程菌的综合策略
Fig. 4 A comprehensive strategy for the construction of excellent lipid producing strains

参考文献

- [1] 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.
- [2] 易绍金, 郑义平. 产油微生物的研究及其应用[J]. 中外能源, 2006, 11(2): 90-94.
- [3] Li YH, Liu B, Zhao ZB, et al. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22: 650-656.
- [4] 曲威, 刘波, 吕建州, 等. 高产油脂斯达氏酵母菌株的选育及摇瓶发酵条件的初步研究[J]. 辽宁师范大学学报, 2006, 29: 88-92.
- [5] Youngquist JT, Rose JP, Pfleger BF. Free fatty acid production in *Escherichia coli* under phosphate-limited conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 5149-5159.
- [6] Wu SG, Hu CM, Jin GJ, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 6124-6129.
- [7] Wu SG, Zhao X, Shen HW, et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions[J]. Bioresource Technology,

- 2011, 102(2): 1803–1807.
- [8] 林金涛, 沈宏伟, 张泽会, 等. 圆红冬孢酵母两阶段培养法生产微生物油脂[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 997–1002.
- [9] Zhao X, Wu SG, Hu CM, et al. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37: 581–585.
- [10] Courchesne N, 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.
- [11] Athenstaedt K, Daum G. Lipid storage: Yeast we can[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113: 1188–1197.
- [12] Ruenwai R, Cheevadhanarak S, Laoteng K. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase gene of *Mucor rouxii* enhanced fatty acid content in *Hansenula polymorpha*[J]. Molecular Biotechnology, 2009, 42: 327–332.
- [13] Lennen RM, Braden DJ, West RA, et al. A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* and catalytic conversion to alkanes[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 106(2): 193–202.
- [14] Lu X, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10: 333–339.
- [15] Verwoert II, van der Linden KH, Walsh MC, et al. Modification of *Brassica napus* seed oil by expression of the *Escherichia coli fabH* gene, encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 875–886.
- [16] Shin GH, Veen M, Stahl U, et al. Overexpression of genes of the fatty acid biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2012, 29: 371–383.
- [17] Athenstaedt K. YALI0E32769g (DGA1) and YALI0E16797g (LRO1) encode major triacylglycerol synthases of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1811(10): 587–596.
- [18] Yu KO, Jung J, Ramzi AB, et al. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for increasing the accumulation of triacylglycerol as a microbial oil feedstock for biodiesel production using glycerol as a substrate[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110: 343–347.
- [19] Tai M, Stephanopoulos G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production[J]. Metabolic Engineering, 2013, 15: 1–9.
- [20] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. Advances in Applied Microbiology, 2001, 51: 1–52.
- [21] Yang F, Zhang S, Zhou YJ, et al. Characterization of the mitochondrial NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4): 1095–1105.
- [22] Li Z, Sun H, Mo X, et al. Overexpression of malic enzyme (ME) of *Mucor circinelloides* improved lipid accumulation in engineered *Rhodotorula glutinis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(11): 4927–4936.
- [23] Tang X, Feng H, Chen WN. Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2013, 16: 95–102.
- [24] Zhang Y, Adams I, 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, 2013, 153: 2013–2025.
- [25] Cao Z, Gao H, Liu M, et al. Engineering the acetyl-CoA transportation system of *Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid[J]. Biotechnology Journal, 2006, 1(1): 68–74.
- [26] Jiang P, Cronan Jr J. Inhibition of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid synthesis and release of inhibition by thioesterase action[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(10): 2814–2821.
- [27] Deng XD, Li YJ, Fei XW. The mRNA abundance of *pep2* gene is negatively correlated with oil content in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(5): 1811–1817.

- [28] Kamisaka Y, Tomita N, Kimura K, et al. DGA1 (diacylglycerol acyltransferase gene) overexpression and leucine biosynthesis significantly increase lipid accumulation in the *Δsnf2* disruptant of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Biochemical Journal*, 2007, 408(1): 61–68.
- [29] Nguyen AV, Thomas-Hall SR, Malnoë A, et al. Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(11): 1965–1979.
- [30] Lower KM, De Gobbi M, Hughes JR, et al. Analysis of sequence variation underlying tissue-specific transcription factor binding and gene expression[J]. *Human Mutation*, 2013, 34(8): 1140–1148.
- [31] Boyle AP, Song L, Lee BK, et al. High-resolution genome-wide *in vivo* footprinting of diverse transcription factors in human cells[J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 456–464.
- [32] Jiang D, Jia Y, Jarrett HW. Transcription factor proteomics: identification by a novel gel mobility shift-three-dimensional electrophoresis method coupled with southwestern blot and high-performance liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry analysis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(39): 7003–7015.
- [33] Raiber EA, Kranaster R, Lam E, et al. A non-canonical DNA structure is a binding motif for the transcription factor SP1 *in vitro*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(4): 1499–1508.
- [34] Yao MD, Miyazono K, Ohtsuka J, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the DNA-binding domain of AdpA, the central transcription factor in the A-factor regulatory cascade in the filamentous bacterium *Streptomyces griseus*, in complex with a duplex DNA[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2012, 68: 946–949.
- [35] Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(2): 217–223.
- [36] Zhou YJ, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(6): 3234–3241.