

$\Delta 12/\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶在多不饱和脂肪酸生产中的应用研究进展

吴琛¹ 史海粟² 陈海琴^{1*}

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: $\Delta 12/\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶(FADS12/15)广泛存在于植物、动物和微生物中,是多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)合成的关键酶,在其生产中发挥着重要作用。PUFAs具有广泛的益生功能,但是由于人体内缺乏FADS12/15,无法合成亚油酸和 α -亚麻酸,因此必须通过食物摄入来补充。此外,人体对其他PUFAs的需求也很高,迫切需要开发优质的PUFAs生产者。微生物是脂肪酸生产的潜在资源,通过FADS12/15基因工程改造可有效提高 ω -3和 ω -6 PUFAs的产量,从而为人类提供优质的生物脂质资源。作者综述了FADS12/15参与的脂肪酸合成途径及其催化机理,以及FADS12/15基因过表达体系和基因工程微生物种类,总结了FADS12/15同源或异源表达生产PUFAs的研究现状,旨在为FADS12/15基因工程研究和PUFAs的高效生产提供参考。

关键词: $\Delta 12/\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶;多不饱和脂肪酸;基因工程微生物;异源表达;催化机制

Advances in Application of $\Delta 12/\Delta 15$ Fatty Acid Desaturases in Polyunsaturated Fatty Acid Production

WU Chen¹ SHI Haisu² CHEN Haiqin^{1*}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Fatty acid desaturase, namely $\Delta 12/\Delta 15$ (FADS12/15) are widespread in plants, animals, and microorganisms. They are involved in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and play an important role in the production of PUFAs. PUFAs provide various biological and physiological benefits, however, due to the lack of FADS12/15 in the human body, linoleic acid and α -linolenic acid cannot be synthesized. Therefore, their intake must be derived from the diet. Furthermore, other PUFAs are essential for improving diet and human health. Thus, it is urgent to develop high-level PUFA producers. Microorganisms are potential fatty acid producers, and FADS12/15 genetic engineering has been performed to increase the yield of ω -3/ ω -6 PUFAs, which provide humans with high-quality lipid resources. This article summarizes the fatty acid biosynthetic pathways and the catalytic mechanism of FADS12/15. It also reviews FADS12/15 overexpression system and genetically engineered microorganisms for PUFA production as well as the homologous or heterologous expression of FADS12/15 gene to produce PUFAs. The objective of this review is to provide the fundamental theory and efficient expression strategy for FADS12/15 genetic engineering to produce PUFAs.

Keywords: $\Delta 12/\Delta 15$ fatty acid desaturase (FADS12/15); polyunsaturated fatty acids; genetically engineered microorganisms; heterologous expression; catalytic mechanism

基金项目:国家自然科学基金优秀青年基金项目(31722041)。

通信作者:陈海琴(1978—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:haiqinchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-11-26 改回日期:2023-01-06

不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids, UFAs)是一类包含一个或多个双键的脂肪酸,可以被分为单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFAs)和 PUFAs。PUFAs 与癌症^[1]、炎症性疾病^[2-3]、神经退行性疾病^[4]、自身免疫性疾病^[5]以及心血管疾病、糖尿病、肥胖症等^[6-9]多种慢性疾病相关。此外,PUFAs在许多植物、深海鱼类、藻类和微生物中具有调节膜流动性、储存能量和传导信号等多种生物学功能^[10-11],也可促进人体生长发育和改善认知及视觉功能等^[12-14]。但是,由于人体缺乏 FADS12/15,导致人体无法自身合成亚油酸(linoleic acid, LA)和 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA),因此需要外源补充 PUFAs。在众多 PUFAs 生产者中,植物生产长链 PUFAs 的能力有限;海洋鱼类受到捕捞限制和海水污染的影响。相比之下,微生物具有生命周期短,受地域、季节、气候影响小,且易于规模化培养的特点。因此,利用微生物生产 PUFAs 是一种可替代传统 PUFAs 来源的有前景的途径。FADS12/15 在 PUFAs 的生产中发挥重要作用,已经有大量的试验用于 FADS12/15 基因工程微生物生产 PUFAs。然而,由于不同物种之间的表达系统存在差异,实现 FADS12/15 高效表达的关键是选择合适的目的基因和表达系统来转化宿主细胞,从而提高其催化活性。作者综述了 FADS12/15 参与的脂肪酸合成途径及其催化机理,以及用于 FADS12/15 基因表达的原核和真核表达系统及宿主微生物,并讨论了 FADS12/15 基因工程在 PUFAs 生产中的应用。

1 FADS12/15 参与的脂肪酸合成途径

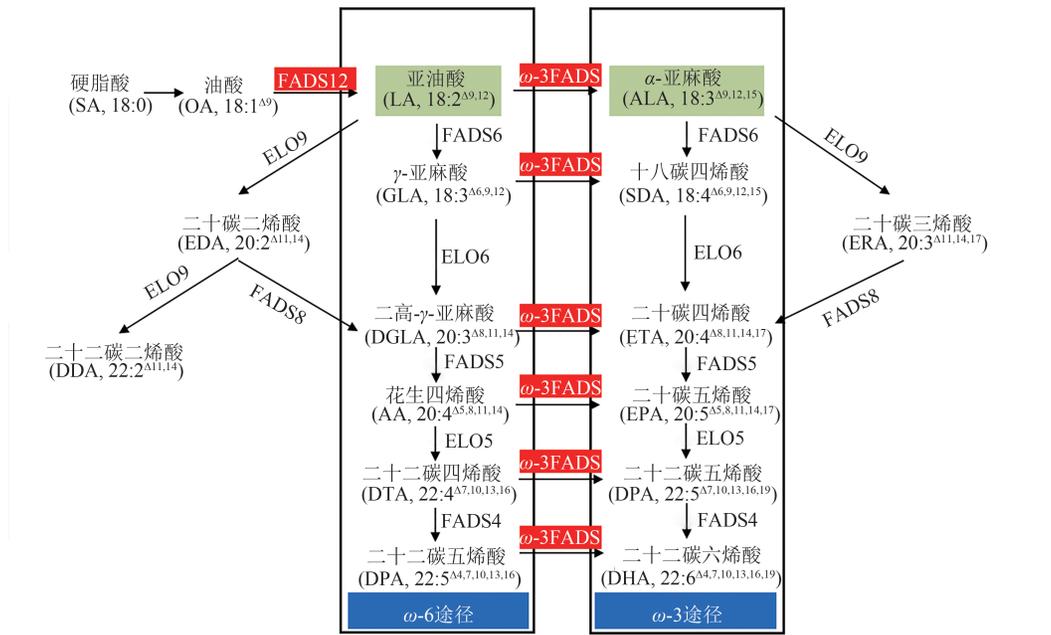
FADS12 和 FADS15 是 PUFAs 从头合成的关键脱饱和酶,分别以油酸和 LA 为底物,在脂肪酸链的第 12 号碳位和第 15 号碳位上引入双键,从而合成 LA 和 ALA,并进一步促进 ω -3/ ω -6 PUFAs 的合成,见图 1。PUFAs 的合成途径广泛存在于植物、线虫、昆虫、海洋无脊椎动物和真核微生物中,而在细菌中较为罕见^[15]。在植物中,PUFAs 的合成可以通过两个途径完成。首先,油酸由 Δ 6 脂肪酸脱饱和酶催化合成 LA,然后由 Δ 7 脂肪酸脱饱和酶或 Δ 8 脂肪酸脱饱和酶催化合成 ALA^[16];另一方面,油酸也可以在内质网中由 FADS12 和 FADS15 分别催化,直接合成 LA 和 ALA,并继续

进行后续的 PUFAs 合成。在一些微藻中,棕榈酸在合成后被转移至细胞质中,并被延长为硬脂酸,随后脱饱和形成油酸。这些反应由 FADS12 和 FADS15 催化,分别合成 LA 和 ALA,并进入 PUFAs 合成途径。在 ω -6 途径中,LA 通过 Δ 6 脱饱和、 Δ 6 延伸和 Δ 5 脱饱和依次合成为花生四烯酸(arachidonic acid, ARA),然后通过 Δ 5 延伸和 Δ 4 脱饱和合成为二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)(见图 1)。在 ω -3 途径中,ALA 以类似的方式通过 Δ 6 脱饱和、 Δ 6 延伸和 Δ 5 脱饱和依次合成为二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA),然后通过 Δ 4 脱饱和酶依赖性途径中的 Δ 5 延伸和 Δ 4 脱饱和合成为二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)。

尽管不同生物都具有类似的 PUFAs 合成途径,但在某些微生物中,FADS12/15 参与的脂肪酸合成路径具有特定的 UFAs 合成偏好。例如,在产油真菌高山被孢霉(*Mortierella alpina*, *M. alpina*)中主要通过 ω -6 途径合成 ARA^[17];在细小微胞藻中通过 ω -3 途径合成 EPA^[17];而在卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*, *M. circinelloides*)中仅通过 ω -6 途径合成 γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA),且没有后续的延伸反应和脱饱和反应^[18]。不同微生物,尤其是产油微生物在长期的进化中形成了特定的 PUFAs 合成路径,其 FADS12/15 基因工程研究对于微生物生产 PUFAs 具有重要意义。

2 FADS12/15 的催化机理

FADS12/15 催化机理研究主要集中于活性差异较大的成员之间的区域交换、确定关键区域并进行氨基酸替换,以明确关键氨基酸位点。其次进行 FADS12/15 拓扑结构预测及三维结构模拟构建,以明确底物与 FADS12/15 结合状态,进而解析 FADS12/15 催化机理。FADS12/15 的催化活性中心由 3 个高度保守的 HX_{3,4}H、HX_{2,3}HH、H/QX_{2,3}HH 基序与 Fe²⁺组成,其催化活性关键位点与组氨酸密切相关。例如,*Spirulina platensis* 中 Δ 6 脂肪酸脱饱和酶的活性依赖于 3 个组氨酸簇及其周围的残基^[19]; *Pseudomonas* sp. AMS8 的 Δ 9 脂肪酸脱饱和酶催化活性关键位点为 His34, His71 和 His206^[20];而在 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 FADS12 中,有 5 个关键组氨酸残基影响其催化活性^[21]。这可能是



FADS12: $\Delta 12$ 脂肪酸脱饱和酶; FADS15: $\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶; $\omega-3$ FADS: $\omega-3$ 脂肪酸脱饱和酶; FADS6: $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶; ELO6: $\Delta 6$ 脂肪酸延伸酶; FADS5: $\Delta 5$ 脂肪酸脱饱和酶; ELO5: $\Delta 5$ 脂肪酸延伸酶; FADS4: $\Delta 4$ 脂肪酸脱饱和酶; FADS8: $\Delta 8$ 脂肪酸脱饱和酶; ELO9: $\Delta 9$ 脂肪酸延伸酶。

图 1 微生物中 PUFAs 合成途径

Fig. 1 PUFA biosynthesis in microbes

因为保守组氨酸容易与 Fe^{2+} 和底物形成氢键相互作用,从而保持三者间的特定距离,维持空间构象的稳定性^[22]。除了保守序列外,非保守序列特定氨基酸的理化性质、突变和替换也会导致 FADS12/15 催化活性的改变。例如, *Claviceps purpurea* FADS12 和三功能 FADS12/15/ $\omega-3$ 脱饱和酶的催化活性和特异性由 Ile152 和 Ala206 决定^[23]; 在白地霉 FADS12 中,具有苯环结构的氨基酸发生突变后,其活性显著增加^[24]; 而 *M. alpina* 1S-4 突变体 FADS12 中的 His116Tyr 和 Pro166Leu 替换导致催化活性丧失^[25], 这表明氨基酸性质对 FADS12/15 的催化活性至关重要。虽然部分 FADS12/15 的关键氨基酸位点已被解析,但由于 FADS12/15 是膜结合蛋白,难以分离获得高浓度的纯蛋白质,限制了对其纯化蛋白质的酶学性质研究和晶体结构解析。目前仅有来自 *M. alpina* 和 *Brassica napus* 的 FADS12 及 FADS15 被成功分离和纯化。Chen 等^[26] 在毕赤酵母中表达 *M. alpina* FADS12 基因,经分离纯化分别获得 2.5 mg/L FADS12 和 4.6 mg/L FADS15, 并发现在体外 FADS12 蛋白催化活性提高了 (116 \pm 40)%; Halima 等^[27] 在大肠杆菌 BL21 中异源表达

Brassica napus FADS12 基因,通过分离纯化后获得 0.728 mg/mL 蛋白质,揭示了 FADS12 蛋白质二级结构由 47.3% 的 α -螺旋和 0.9% 的 β -折叠组成,并预测其熔解温度为 50.2 $^{\circ}\text{C}$ 。此外, Wang 等^[28] 和 Bai 等^[29] 成功解析了人类和鼠的 $\Delta 9$ 脂肪酸脱饱和酶晶体结构,指出脱饱和酶在内质网膜上的三维结构类似于蘑菇的形状,并具有 4 次跨膜结构。这也首次揭示了 $\Delta 9$ 脂肪酸脱饱和酶与底物结合和催化的关键位点,为研究 FADS12/15 的晶体结构及其催化机理奠定了理论基础。

3 FADS12/15 的表达与影响因素

3.1 目的基因与载体

FADS12/15 基因广泛分布于不同生物中,但它们所表现的生物活性在不同物种间差异显著。在一些微生物中,由 FADS12/15 基因编码的脱饱和酶具有 2 种或 3 种催化功能,表现出不同的底物选择性、区域选择性、立体选择性和催化活性。这些差异表明不同来源的 FADS12/15 基因对催化性能具有重要影响^[30]。目前,众多的 FADS12/15 基因已被鉴定、克隆和表达^[31-35]。此外,对 FADS12/15 进行进化关系分析有助于 FADS12/15 基因的发掘及其功

能特性的解析, 这为 *FADS12/15* 基因工程研究提供了高效的候选基因。目前, 用于大肠杆菌、毕赤酵母和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 转化的商业载体已被广泛应用 (见表 1), 但用于霉菌转化的载体尚未商业化生产。在上述菌株中进行 *FADS12/15* 基因过表达的研究已相对成熟, 以这些载体为基本骨架构建的新型载体, 在提高 *FADS12/15* 基因表达量及其活性方面也取得了重要进展。最近, Lamers 等^[6] 构建的含有荧光蛋白基因的

FADS12/15 表达载体, 成功在油脂酵母中表达, 在非发酵条件下, LA 产量达到 1.23 g/L, 促进了 *FADS12/15* 基因工程在 PUFAs 生产中的应用。尽管用于 *FADS12/15* 基因表达的载体种类繁多, 但试验中使用的霉菌宿主转化载体多由实验室在真核载体的基础上自行构建, 或根据菌株的表达特性进行优化改造。丝状真菌 *M. alpina* 和 *M. circinelloides* 过表达载体的构建为其在霉菌中的表达应用奠定了基础。

表 1 *FADS12/15* 基因表达的原核或真核载体Table 1 Prokaryotic or eukaryotic vector for *FADS12/15* gene expression

载体	类型	目的基因(来源)	宿主细胞	转化方法	参考文献
pYES-DEST52	E	SIΔ12 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	醋酸锂转化法	[37]
pYES2/NT-C	E	BaΔ12 (<i>Buglossoides arvensis</i>)	<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	醋酸锂转化法	[38]
pYES2	E	PiΔ12 (<i>Phytophthora infestans</i>)	<i>S. cerevisiae</i> YPH500	醋酸锂转化法	[39]
pPICZαA	E	AjΔ12 (<i>Apostichopus japonicas</i>)	<i>P. pastoris</i> GS115	电转化	[40]
pZPK	E	MaΔ12 (<i>Mortierella alpina</i>)、FmΔ12 (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>R. toruloides</i>	根瘤农杆菌介导转化法	[41]
pMAT1552/pLEU4	E	McΔ12 (<i>Mucor circinelloides</i>)	<i>M. circinelloides</i>	—	[42-43]
pBIG	E	CcΔ12 (<i>Coprinopsis cinerea</i>)	<i>M. alpina</i>	根瘤农杆菌介导转化法	[44]
pY5-13/pY5-13GPDN	E	FmΔ12 (<i>Fusarium moniliforme</i>)、FgΔ12 (<i>Fusarium graminearum</i>)、MgΔ12 (<i>Magnaporthe grisea</i>)	<i>Y. lipolytica</i>	醋酸锂转化法	[45]
pKS-18S-hph	E	LsΔ12 (<i>Lipomyces starkeyi</i>)、LsΔ12/Δ15 (<i>Lipomyces starkeyi</i>)	<i>L. starkeyi</i> CBS1807	—	[46]
pBluescript SK plus T1T2	S	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803Δ15、GfΔ12/Δ15 (<i>Gibberella fujikuroi</i>)	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	—	[47]
pET30a	P	IpΔ12 (<i>Idesia polycarpa</i>)	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	—	[48]
pUC57	P	ω-3 desaturase	<i>E. coli</i> TOP10	电转化	[49]
pMLD30	P	<i>Mortierella</i> sp. Δ12	<i>E. coli</i> DH5α	感受态细胞转化法	[50]

注: P 表示原核载体; E 表示真核载体; S 表示穿梭载体。

3.2 启动子和内含子

启动子对于 *FADS12/15* 基因的表达至关重要。在植物中, *FAD12* 启动子中富含 5'UTR Py 的片段赋予其高转录水平, 从而增加 *FADS12* 基因表达; 而 CAAT-box 是启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件, 调节 *FADS12* 基因表达^[51]。在蓝藻中, NtcA 可通过与 *FADS12/15* 基因的启动子结合来调节脂肪酸脱饱和^[52]。此外, 对 *M. alpina* 1S-4 中的启动子分析明确了不同启动子的作用效果, 为 *M. alpina* 中的 *FADS12/15* 基因表达奠定了基础^[53]。内含子的顺式调节元件对调节表达也十分重要。在藻类中, *FADS12* 基因是单拷贝的, 含有 7

个或 9 个内含子; 而在植物进化过程中, *FADS12* 基因的拷贝数开始增加, 内含子消失或减少, 在陆生植物中内含子完全丢失^[51]。不同生物中的内含子数目的变化可能导致转录调控差异, 从而调节 *FADS12* 基因的表达。

3.3 同源性与物种进化

同源性和物种进化也是影响 *FADS12/15* 基因表达的关键因素。特定的氨基酸组成决定了 *FADS12/15* 的底物识别和催化活性, 而相近物种的 *FADS12/15* 氨基酸序列具有更高的同源性, 可以确保外源基因在宿主体内的稳定表达。选择与宿主 *FADS12/15* 具有较高同源性的氨基酸序列的

编码基因,可以增加表达的成功率。此外,密码子的适用性也可以进一步提高表达效率。在众多试验中,通过多序列比对和密码子优化来选择目的基因并提高其表达的适用性,从而提高 *FADS12/15* 基因的表达。氨基酸序列的相似性表明了其理化性质的一致性,这也说明它们在催化功能上的相似性。*FADS12/15* 基因编码的氨基酸在不同物种中的同源性也会影响 *FADS12* 基因的表达。此外,物种的进化与表型密切相关,环境的长期选择会赋予物种一定的特征,这可能导致 *FADS12/15* 基因表达的外部修饰,从而产生表型差异。而具有相近进化关系的物种在生存方式和进化方向上具有相似性,这种亲缘关系更有利于物种间 *FADS12/15* 基因的表达。

3.4 培养条件与环境

环境条件如温度、氧气、碳源、氮源对 *FADS12/15* 基因的表达具有调控作用。在 *L. kluyveri* 和 *Rhodotorula glutinis* 中^[54-55], *FADS12* 基因表达受低温的诱导;而在 *Kluyveromyces lactis* 和 *Hansenula polymorpha* 中^[56], 低氧环境会诱导 *FADS12* 基因的表达;低温和乙醇能够在 *L. kluyveri* 和 *K. lactis* 中诱导 *FADS15* 基因的表达^[57]。碳源和氮源是微生物生长的必需营养素,其种类、浓度及比例对微生物脂质合成至关重要,碳源影响脂肪酸合成的碳流向,而氮源的限制或缺乏会增加脂质的积累,并可能改变 *FADS12/15* 基因的表达^[58-59]。此外,外源底物、光源、植物激素等附加培养条件也对微生物中 *FADS12/15* 基因表达起到调控作用。例如,脱饱和酶底物的外源添加可以提高基因表达水平,光照能下调 *Nigrospora sphaerica* 和 *Aspergillus nidulans* 中 *FADS12/15* 基因的表达,赤霉素和玉米素能促进 *Chlorella sp.* 的 *FADS12/15* 基因表达,这表明 *FADS12/15* 基因表达对培养条件有不同的响应^[60-61]。此外,即使是相同的影响因子,对不同属间微生物的 *FADS12/15* 基因表达影响也存在差异。例如,在乳酸克鲁维酵母、毕赤酵母和粟酒裂殖酵母中^[62-64], *MGA2* 基因能上调 *FADS12* 基因的表达,而在 *Y. lipolytica* 中 *MGA2* 对 *FADS12* 基因表达却具有抑制作用^[65]。

4 *FADS12/15* 基因工程微生物生产 ω -6 PUFAs

FADS12 作为决定 ω -6 PUFAs 合成途径的关

键脱饱和酶,其基因工程研究为微生物生产 PUFAs 奠定了基础。产油脂酵母和真菌是工程化生产 ω -6 PUFAs 的重要微生物资源,但是由于不同微生物的产油脂特性和工业应用价值各不相同,需要针对特定 ω -6 PUFAs 产量提升进行深入研究。*M. alpina* 是用于工程化生产 LA 和 ARA 的重要微生物菌株。在 *M. alpina* ST66 中表达 *Coprinopsis cinerea FADS12* 基因后,LA 的最高产量达到了 3.32 g/L。而在 *M. alpina* JT-180 中通过表达 *M. alpina FADS12* 基因,ARA 质量占总脂肪酸质量的 39.0%。在 LA 工程化生产微生物中,*Y. lipolytica* 被广泛用于 *FADS12* 基因的表达,这显示了其用作细胞工厂的巨大潜力。在 *FADS12* 基因表达研究中,*Fusarium moniliforme FADS12* 基因具有更广泛的表达应用,其在 *Schwanniomyces occidentalis* 中表达能够产生 2.05 g/L 的 LA,表明该基因在不同宿主中具有稳定的表达特性。

4.1 圆红冬孢酵母

圆红冬孢酵母(*Rhodospidium toruloides*)是一种产类胡萝卜素的担子菌酵母,脂质占细胞干质量的 70.0%,并且在葡萄糖、果糖、木糖、纤维二糖、阿拉伯糖、蔗糖和甘油等碳源中具有很强的生长能力和脂质合成能力^[66-68]。以葡萄糖作为底物时,*R. toruloides* 可产生 8.0 g/L 的脂质,而当甘油作为单独碳源或与糖类共同作为碳源时,可进一步促进脂质合成^[69-70]。由于 *R. toruloides* 在脂质生产中的重要作用,其脱饱和酶基因工程研究已经变得更加广泛。例如,研究人员在 *R. toruloides* 中表达来源于 *M. alpina* 和 *Fusarium verticillioides* 的 *FADS12* 基因,以生产富含 LA 的脂质^[41]。此外,参与脂质生物合成的苹果酸酶和 $\Delta 9$ 脂肪酸脱饱和酶也已成功在 *R. toruloides* 中过表达,并且在葡萄糖分批发酵和分批补料发酵培养时,*R. toruloides* 工程菌株的脂质产量分别达到了 27.4 g/L 和 89.4 g/L^[69]。

4.2 许旺酵母

许旺酵母(*Schwanniomyces occidentali*)是近期发现的可用于 *FADS12/15* 基因工程的酵母,其脂肪酸产量约占总脂肪酸的 42.0%,并能广泛利用木糖、甘油、乳糖、菊粉和纤维二糖等碳源。因其对高浓度木质纤维素水解物抑制剂的突出耐受性,使其在众多产油酵母中具有独特的脂肪酸生

产优势。更为重要的是, *S. occidentalis* 的脂肪酸组成中油酸质量分数为 69.0%, 而 LA 质量分数仅为 4.8%, 这一差异吸引了研究者通过 FADS12 基因工程改造来提高 LA 产量的兴趣。Lamers 等^[36]通过在 *S. occidentalis* 中同源或异源表达 FADS12 基因, 成功构建了 2 株基因工程菌株, 并在非优化发酵条件下, 使 LA 产量分别提高至 2.23 g/L 和 2.05 g/L, 在优化发酵条件下进一步提高 *S. occidentalis* 生产 LA 的能力, 这使其成为一个生产 PUFAs 的潜在菌株。

4.3 高山被孢霉

产油丝状真菌 *M. alpina* 长期用于 ARA 的商业生产, 其脂肪酸可积累至细胞干质量的 50.0%, 其中 ARA 质量占总脂肪酸质量的 70.0%^[71]。*M. alpina* 的基因组信息和脱饱和酶基因信息已被充分解析, 是最早用于基因工程微生物研究的模式真菌之一。在 *M. alpina* 1S-4、*M. alpina* ATCC 32221、*M. alpina* ATCC 32222、*M. alpina* DSA-12、*M. alpina* ME-1 等 ARA 商业生产菌株中^[72], *M. alpina* 1S-4 和 *M. alpina* ATCC 32222^[60]是主要用于基因工程生产 PUFAs 的研究菌株。其中, *M. alpina* 1S-4 的脱饱和酶缺陷突变体也被用于工程化生产 LA 和 ARA。在 *M. alpina* 1S-4 的 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶缺陷突变体中过表达 *Coprinopsis cinerea* FADS12 基因, LA 产量为 3.32 g/L; 在 *M. alpina* 1S-4 的 FADS12 缺陷突变体过表达 *M. alpina* 1S-4 FADS12 基因, ARA 产量为 2.0 g/L。*M. alpina* 1S-4 脱饱和酶缺陷突变体在工程化生产 LA 中的应用, 为提高 PUFAs 产量提供了解决方案, 尤其是通过 FADS12 基因与其他脱饱和酶基因共表达, 对提高超长链 PUFAs 的生产具有重要意义。

4.4 卷枝毛霉

Mucor sp. 是首个被用于生产富含 GLA (微生物油脂) 的真菌属^[73], 其中 *Mucor* sp. 中的 *M. circinelloides* 是典型的产油丝状真菌, 其体内含有大量未被转化为 LA 或 GLA 的油酸, 这使其成为基因工程生产 LA 或 GLA 的潜在改造菌株。由于在 *M. circinelloides* 自身脂肪酸合成途径中, 缺少 FADS15 催化的 ALA 反应路径、 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶引导的 ω -3 脂肪酸合成途径以及 GLA 之后的延伸酶和脱饱和酶系列反应。因此其基因工程改造研究主要集中于 FADS12 和 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶,

以提高 LA 或 GLA 的产量。现有研究表明, 通过过表达 FADS12 和 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶, LA 和 GLA 的质量分数可分别提高到 24.0% 和 43.0%^[43], 在此基础上, 利用 FADS12 和 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶共表达载体转化 *M. circinelloides* 以提高 GLA 产量具有潜在的应用价值。

4.5 米曲霉

米曲霉 FADS12 的活性与转录调控和响应乙醇应激的脂质代谢产物的变化紧密相关。米曲霉 FADS12 活性随着培养基中的乙醇终体积分数 (0%、2.0%、4.0%) 的升高而增加, 当乙醇终体积分数为 4.0% 时, LA 的质量分数从 25.4% 增加至 38.0%, 这是由于 FADS12 作为应对胁迫的保护性基因, 其表达量上调促进了 LA 的合成以响应乙醇胁迫^[74-75]。而在米曲霉中过表达 FADS12 基因可以将 LA 质量分数增加至 71.9%。因此, 在此基础上解析 FADS12 基因转录调控机制具有重要意义。近年来, 根癌农杆菌介导转化法已成功用于米曲霉的转化, 为米曲霉基因工程菌株的构建提供了系统的试验方案^[76-77]。此外, 利用米曲霉在食品发酵工业的独特优势, 解析乙醇调控 FADS12 表达机制, 并结合实际生产提高米曲霉 PUFAs 的产量, 将极大地丰富 FADS12 基因工程菌株的应用。

5 FADS12/15 基因工程微生物生产 ω -3 PUFAs

ω -3 PUFAs 对人体健康具有重要的作用, 利用基因工程微生物提高 ω -3 PUFAs 生产始终是众多学者关注的热点话题之一。近年来, 随着生物技术的发展, 人们对不同微生物中脂肪酸合成途径的了解更为深入, 加上产 ω -3 PUFAs 潜力微生物的不断发现, 促使对 FADS12/15 基因工程微生物研究更加广泛。微生物通过 FADS12 基因工程化方式生产 ω -3 PUFAs, 主要为 ALA 和 EPA, 其中常用的生产微生物是 *Y. lipolytica*。当 *Y. lipolytica* 表达来自不同微生物的 FADS12 基因时, ALA 产量有所不同。例如, 当 *Rhodospiridium kratochvilovae* 的 FADS12/15 基因在 *Y. lipolytica* 中表达时, ALA 产量为 1.4 g/L; 而当 *Fusarium moniliforme* 的 ω -3 脱饱和酶基因在 *Y. lipolytica* 中表达时, ALA 产量为 10.5 mg/g (以细胞干质量计)。此外, 相同来源的 FADS12 基因在不同的操作菌株中表达也会影响 ALA 产量, 见表 2。而

EPA 的生产主要通过 *FADS12* 基因与其他脱饱和酶和延伸酶基因共同表达以获得 EPA 重组菌株。

5.1 解脂耶氏酵母

Y. lipolytica 是产油酵母的模式生物,能够积累占细胞干质量 38.0%~50.0% 的脂质,其作为潜在的基因工程和代谢工程宿主菌株,已有众多工程设计通过过表达脂质生物合成途径中的关键酶或敲除参与脂质分解代谢的酶来增加脂质产量^[78-81]。在脂肪酸生产方面,脱饱和酶基因工程改造可提升 *Y. lipolytica* 中 LA、ALA 和 GLA 的产量^[45, 82]。在 *Y. lipolytica* 突变菌株中表达不同微生物的双功能 $\Delta 12/\omega$ -3 脱饱和酶可以将 ALA 质量增加至总脂肪酸质量的 17.8%^[45],在低温培养和补料分批发酵条件下,过表达 *FADS12/15* 基因的 *Y. lipolytica* 工程菌株中 ALA 产量提高至 1.4 g/L^[83]。同时,分子生物学技术的发展也促进了 *Y. lipolytica* 作为异源蛋白质生产的适宜宿主的建立,这为 *Y. lipolytica* 高效表达脱饱和酶奠定了基

础。此外,通过代谢工程生产 EPA^[82],以及 PUFAs 生物合成基因簇的表达生产 DHA^[84],扩展了 *Y. lipolytica* 在 PUFAs 工业生产中的应用,表明 *Y. lipolytica* 用作基因工程菌株生产 PUFAs 具有极大的商业价值。

5.2 斯达氏油脂酵母

斯达氏油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 是一种高产油微生物,脂质约占细胞干质量的 80.0%,其 PUFAs 主要由油酸、LA 和 ALA 组成,是一种潜在的 PUFAs 生产者^[85-86]。目前, *L. starkeyi* 的 *FADS12* 基因和双功能 $\Delta 12/\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶基因已在 *S. cerevisiae* 中进行鉴定和催化特性分析,并且通过其同源过表达, LA 和 ALA 的质量分数分别提高到 40.3% 和 24.9%^[46];此外,亚麻 *FADS15* 基因转化 *L. starkeyi* 也用于提高 DHA 和 ALA 产量^[87]。这为 *FADS12/15* 基因工程在 *L. starkeyi* 生产 PUFAs 中的应用奠定了基础。虽然关于 *L. starkeyi* 的基因工程研究还相对较少,但采用改进的醋酸锂转化

表 2 基因工程微生物生产 PUFAs

Table 2 PUFA production via genetically engineered microorganisms

PUFAs	目的基因(来源)	宿主细胞	目标脂肪酸产量	参考文献
	Cc $\Delta 12$ (<i>Coprinospora cinerea</i>)	<i>M. alpina</i> ST66	3.32 g/L, 45.9%	[44]
	So $\Delta 12$ (<i>Schwanniomyces occidentalis</i>)	<i>S. occidentalis</i>	2.23 g/L, 23.3%	[36]
	Fm $\Delta 12$ (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>S. occidentalis</i>	2.05 g/L, 22.7%	[36]
	Fm $\Delta 12$ (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>Y. lipolytica</i> L36DGA1	1.88 g/L, 26.7%	[83]
ω -6-LA	Ma $\Delta 12$ (<i>Mortierella alpina</i>)+Fm $\Delta 12$ (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>R. toruloides</i>	1.30 g/L, 46.4%	[41]
	Fm $\Delta 15$ (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>Y. lipolytica</i> L36DGA1	0.67 g/L	[83]
	Fm $\Delta 12$ (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>Y. lipolytica</i>	65.2%	[45]
	Yl $\Delta 12$ (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	<i>Y. lipolytica</i>	38.7%	[90]
	Ls $\Delta 12$ (<i>Lipomyces starkeyi</i>)	<i>L. starkeyi</i>	34.6%	[46]
	Mc $\Delta 12$ (<i>Mucorcircinelloides</i>)	<i>M. circinelloides</i>	24.0%	[43]
	Ma $\Delta 12$ (<i>Mortierella alpina</i>)	<i>M. alpina</i> JT-180	2.0 g/L, 39.0%	[72]
ω -6-ARA	Tc $\Delta 12$ (<i>Tribolium castaneum</i>)	<i>M. alpina</i> 1S-4	36.0%	[72]
	No $\Delta 12$ (<i>Nannochloropsis oceanica</i>)	<i>N. oceanica</i>	50.0%~75.0%	[91]
	Rk $\Delta 12/\Delta 15$ (<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>)	<i>Y. lipolytica</i>	1.4 g/L	[83]
	Fm ω -3 (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>Y. lipolytica</i>	10.5 mg/g 细胞干质量	[92]
ω -3-ALA	Rk $\Delta 12/\Delta 15$ (<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>)	<i>Y. lipolytica</i> L36DGA1	310 mg/L	[83]
	Rk $\Delta 12/\Delta 15$ (<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>)	<i>Y. lipolytica</i> E26E1	150 mg/L	[83]
	Fm $\Delta 15$ (<i>Fusarium moniliforme</i>)	<i>Y. lipolytica</i>	28.1%	[45]
ω -3-EPA	Eg $\Delta 5$ (<i>Euglena gracilis</i> $\Delta 5$ desaturase), Pd $\Delta 5$, Eg $\Delta 8$ (<i>Euglena gracilis</i> $\Delta 8$ desaturase), Fm $\Delta 12$ (<i>Fusarium moniliforme</i> $\Delta 12$ desaturase), Pa $\Delta 17$ (<i>Pythium aphanidermatum</i> $\Delta 17$ desaturase), Eg $\Delta 9$ -Elo, EgC16-Elo, YlCPT (<i>Yarrowia lipolytica</i> cholinephosphotransferase gene)	<i>Y. lipolytica</i> (Y4184, pex10 Δ)	56.6 %	[82]

注:JT-180 表示 $\Delta 12$ 脱饱和酶缺陷突变体;ST66 表示 $\Delta 6$ 脱饱和酶缺陷突变体;pex10 Δ 表示过氧化物酶体生物发生基因敲除菌株。

方案建立的 *L. starkeyi* 优化转化体系能够极大地提高转化效率。同时, Oguro 等^[88]开发的通过原生质体-聚乙二醇转化整合多拷贝异源基因的系统也为脱饱和酶基因过表达提供新的思路, 这为 *L. starkeyi* 的 FADS12/15 基因工程应用提供了重要支撑。此外, 在 *L. starkeyi* 发酵培养过程中, Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 可增加 *L. starkeyi* 生物量和脂质合成^[85], 由于参与 *L. starkeyi* 脂质合成的酶系对金属离子具有敏感性^[89], 因此可针对 *L. starkeyi* 重组菌发酵生产 PUFAs 需求调节离子浓度, 从而增加脂肪酸产量。

6 展望

FADS12/15 在不同生物脂肪酸合成中至关重要, 但其催化机理研究较为缺乏, 解析其催化机理将有助于 FADS12/15 基因工程改造的深入操作以及促进其在 PUFAs 生产中的应用。通过调控原件的添加、冗余基因的敲除或多基因载体的构建, 获得 FADS12/15 高效表达的基因工程微生物, 并通过发酵培养优化等下游工程操作增加 PUFAs 产量, 对于充分挖掘菌株生产潜能具有重要意义。利用从传统发酵食品中发掘的优势微生物菌种, 通过 FADS12/15 基因工程构建富含 PUFAs 的重组菌株, 对于未来食品行业的发展意义深远。

参考文献

- [1] FASANO E, SERINI S, CITTADINI A, et al. Long-chain *n*-3 PUFA against breast and prostate cancer: which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans?[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(11):2245-2262.
- [2] KHAN S A, JACKSON R T. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and metabolic syndrome in South Asian Americans in Maryland[J]. *Food Science & Nutrition*, 2018, 6(6):1575-1581.
- [3] BUS I, WITKAMP R, ZUILHOF H, et al. The role of *n*-3 PUFA-derived fatty acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation[J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2019, 144:106351.
- [4] CZUMAJ A, ŚLEDZIŃSKI T. Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5):356.
- [5] ZARATE R, JABER-VAZDEKIS N, TEJERA N, et al. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2017, 6(1):25.
- [6] MAEHRE H K, JENSEN I J, ELVEVOLL E O, et al. ω -3 fatty acids and cardiovascular diseases: effects, mechanisms and dietary relevance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9):22636-22661.
- [7] MANUELLI M, DELLA GUARDIA L, CENA H. Enriching diet with *n*-3 PUFAs to help prevent cardiovascular diseases in healthy adults: results from clinical trials[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7):1552.
- [8] WANDERS A J, BLOM W A, ZOOCK P L, et al. Plant-derived polyunsaturated fatty acids and markers of glucose metabolism and insulin resistance: a meta-analysis of randomized controlled feeding trials[J]. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 2019, 7(1):e000585.
- [9] MARVENTANO S, KOLACZ P, CASTELLANO S, et al. A review of recent evidence in human studies of *n*-3 and *n*-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter?[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2015, 66(6):611-622.
- [10] HOLTHUIS J C, MENON A K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis[J]. *Nature*, 2014, 510(7503):48-57.
- [11] LI T, COFER T M, ENGELBERTH M J, et al. Defense priming by non-jasmonate producing fatty acids in maize (*Zea mays*)[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11(11):e1243635.
- [12] CALDER P C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2015, 1851(4):469-484.
- [13] GOULD J F, SMITHERS L G. Prenatal *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and children's executive functions[M]. *Omega Fatty Acids in Brain and Neurological Health*. Amsterdam: Elsevier, 2019:83-105.
- [14] BURDGE G C. Is essential fatty acid interconversion an important source of PUFA in humans?[J]. *British Journal of Nutrition*, 2019, 121(6):615-624.
- [15] 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.
- [16] HE M, QIN C X, WANG X, et al. Plant unsaturated fatty acids: biosynthesis and regulation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:390.
- [17] SHI H S, CHEN H Q, GU Z N, et al. Molecular mechanism of substrate specificity for delta 6 desaturase from *Mortierella alpina* and *Micromonas pusilla*[J]. *Journal of*

- Lipid Research, 2015, 56(12):2309-2321.
- [18] 栾霄. 过表达脱饱和酶对卷枝毛霉 γ -亚麻酸合成的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [19] RONG C C, CHEN H Q, WANG M X, et al. Molecular mechanism of substrate preference for ω -3 fatty acid desaturase from *Mortierella alpina* by mutational analysis and molecular docking[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(22):9679-9689.
- [20] GARBA L, YUSSOFF M A M, ABD HALIMI K B, et al. Homology modeling and docking studies of a delta 9-fatty acid desaturase from a cold-tolerant *Pseudomonas* sp. AMS8[J]. PeerJ, 2018, 6:e4347.
- [21] AVELANGE-MACHEREL M H, MACHEREL D, WADA H, et al. Site-directed mutagenesis of histidine residues in the $\Delta 12$ acyl-lipid desaturase of *Synechocystis*[J]. FEBS Letters, 1995, 361(1):111-114.
- [22] WU J R, WU C, RONG C C, et al. Catalytic mechanisms underlying fungal fatty acid desaturases activities[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(5):753-769.
- [23] MEESAPYODSUK D, REED D W, COVELLO P S, et al. Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(28):20191-20199.
- [24] SHI H S, TIAN J L, WU C, et al. Determination of allosteric and active sites responsible for catalytic activity of delta 12 fatty acid desaturase from *Geotrichum candidum* and *Mortierella alpina* by domain swapping[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138:109563.
- [25] 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 & Bioengineering, 2009, 107(2):99-101.
- [26] CHEN H Q, GU Z N, ZHANG H, et al. Expression and purification of integral membrane fatty acid desaturases[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e58139.
- [27] HALIM N, ALI M S M, LEOW A T C, et al. Membrane-bound delta 12 fatty acid desaturase (FADS12): from *Brassica napus* to *E. coli* expression system[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 180:242-251.
- [28] WANG H, KLEIN M G, ZOU H, et al. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2015, 22(7):581-585.
- [29] BAI Y H, MCCOY J G, LEVIN E J, et al. X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase[J]. Nature, 2015, 524(7564):252-256.
- [30] 吴琛, 姜楠, 田文雪, 等. $\Delta 12/\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶在发酵食品中应用的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(3):296-310.
- WU C, JIANG N, TIAN W X, et al. Advances in the application of $\Delta 12/\Delta 15$ fatty acid desaturases in fermented foods[J]. Food Science, 2021, 42(3):296-310. (in Chinese).
- [31] RODRIGUEZ-RODRIGUEZ M F, SALAS J J, VENEGAS-CALERON M, et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding a microsomal oleate $\Delta 12$ desaturase (CsFAD2) and linoleate $\Delta 15$ desaturase (CsFAD3) from *Camelina sativa*[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 89:405-415.
- [32] BRANDSTETTER B, RUTHER J. An insect with a delta-12 desaturase, the jewel wasp *Nasonia vitripennis*, benefits from nutritional supply with linoleic acid[J]. Science of Nature, 2016, 103(5-6):40.
- [33] KAYE Y, GRUNDMAN O, LEU S, et al. Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: overexpression of endogenous $\Delta 12$ desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG[J]. Algal Research, 2015, 11:387-398.
- [34] LUO X, SHI H S, WU R N, et al. Delta 12 fatty acid desaturase gene from *Geotrichum candidum* in cheese: molecular cloning and functional characterization[J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(1):18-25.
- [35] SUN R H, GAO L C, YU X P, et al. Identification of a delta 12 fatty acid desaturase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) involved in the biosynthesis of linoleic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Gene, 2016, 591(1):21-26.
- [36] LAMERS D, VISSCHER B, WEUSTHUIS R A, et al. Overexpression of delta-12 desaturase in the yeast *Schwanniomyces occidentalis* enhances the production of linoleic acid[J]. Bioresource Technology, 2019, 289:121672.
- [37] LEE M W, PADILLA C S, GUPTA C, et al. The fatty acid desaturase 2 family in tomato contributes to primary metabolism and stress responses[J]. Plant Physiology, 2020, 182(2):1083-1099.
- [38] PRASAD P, SREEDHAR R V. Identification and functional characterization of *Buglossoides arvensis* microsomal fatty acid desaturation pathway genes involved in polyunsaturated fatty acid synthesis in seeds[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 308:130-140.
- [39] SUN Q X, LIU J, ZHANG Q, et al. Characterization of three novel desaturases involved in the delta-6 desaturation pathways for polyunsaturated fatty acid biosynthesis from *Phytophthora infestans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(17):7689-7697.

- [40] LIU X Y, WANG L, FENG Z F, et al. Molecular cloning and functional characterization of the fatty acid delta 6 desaturase (*FAD6*) gene in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(9): 4991-5003.
- [41] WANG Y A, ZHANG S F, POTTER M, et al. Overexpression of delta 12-fatty acid desaturase in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 180(8):1497-1507.
- [42] RODRIGUEZ-FROMETA R A, GUTIERREZ A, TORRES-MARTINEZ S, et al. Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(7):3063-3072.
- [43] ZHANG Y, LUAN X, ZHANG H Y, et al. Improved gamma-linolenic acid production in *Mucor circinelloides* by homologous overexpressing of delta-12 and delta-6 desaturases[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16:113.
- [44] SAKAMOTO T, SAKURADANI E, OKUDA T, et al. Metabolic engineering of oleaginous fungus *Mortierella alpina* for high production of oleic and linoleic acids[J]. Bioresource Technology, 2017, 245:1610-1615.
- [45] DAMUDE H G, ZHANG H X, FARRALL L, et al. Identification of bifunctional delta 12/omega 3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega 3 to omega 6 fatty acids in microbes and plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(25):9446-9451.
- [46] MATSUZAWA T, MAEHARA T, KAMISAKA Y, et al. Identification and characterization of delta 12 and delta 12/delta 15 bifunctional fatty acid desaturases in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(20):8817-8826.
- [47] CHEN G, QU S J, 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 for Biofuels, 2014, 7:32.
- [48] FAN R S, LI L, CAI G, et al. Molecular cloning and function analysis of *FAD2* gene in *Idesia polycarpa*[J]. Phytochemistry, 2019, 168:112114.
- [49] GE C F, CHEN H Q, MEI T T, et al. Application of a ω -3 desaturase with an arachidonic acid preference to eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2018, 5:89.
- [50] SAKURADANI E, KOBAYASHI M, SHIMIZU S. Delta 6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*[J]. Gene, 1999, 238(2):445-453.
- [51] ZHAO M, WANG W Y, WEI L, et al. The evolution and biocatalysis of *FAD2* indicate its correlation to the content of seed oil in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(4):849.
- [52] KAUSHIK M S, MISHRA A K. Iron deficiency influences NtcA-dependent regulation of fatty acid desaturation and heterocyte envelop formation in *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 166(2):570-584.
- [53] OKUDA T, ANDO A, SAKURADANI E, et al. Selection and characterization of promoters based on genomic approach for the molecular breeding of oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4[J]. Current Genetics, 2014, 60(3):183-191.
- [54] WATANABE K, OURA T, SAKAI H, et al. Yeast Δ 12 fatty acid desaturase: gene cloning, expression, and function[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, 68(3):721-727.
- [55] HE J, YANG Z J, HU B B, et al. Correlation of polyunsaturated fatty acids with the cold adaptation of *Rhodotorula glutinis*[J]. Yeast, 2015, 32(11):683-690.
- [56] SANGWALLEK J, KANEKO Y, TSUKAMOTO T, et al. Cloning and functional analysis of *HpFAD2* and *HpFAD3* genes encoding Δ 12- and Δ 15-fatty acid desaturases in *Hansenula polymorpha*[J]. Gene, 2014, 533(1):110-118.
- [57] DE ANGELIS L, RINALDI T, CIRIGLIANO A, et al. Functional roles of the fatty acid desaturases encoded by *KIOLE1*, *FAD2* and *FAD3* in the yeast *Kluyveromyces lactis* [J]. Microbiology-Sgm, 2016, 162(8):1435-1445.
- [58] TANG X, CHEN H Q, MEI T T, et al. Characterization of an omega-3 desaturase from *Phytophthora parasitica* and application for eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:1878.
- [59] CHEN H Q, HAO G F, WANG L, et al. Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi[J]. Scientific Reports, 2015, 5:11247.
- [60] SHI H S, CHEN H Q, GU Z N, et al. Application of a delta-6 desaturase with α -linolenic acid preference on eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15:117.
- [61] SIVARAMAKRISHNAN R, INCHAROENSAKDI A. Plant hormone induced enrichment of *Chlorella* sp. omega-3 fatty acids[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1):7.
- [62] MICOLONGHI C, OTTAVIANO D, SILVIO E, et al. A dual signalling pathway for the hypoxic expression of lipid

- genes, dependent on the glucose sensor Rag4, is revealed by the analysis of the *KIMGA2* gene in *Kluyveromyces lactis*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(7): 1734-1744.
- [63] YU A Q, SHI T L, ZHANG B, et al. Transcriptional regulation of desaturase genes in *Pichia pastoris* GS115[J]. *Lipids*, 2012, 47(11): 1099-1108.
- [64] BURR R, STEWART E V, SHAO W, et al. Mga2 transcription factor regulates an oxygen-responsive lipid homeostasis pathway in fission yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(23): 12171-12183.
- [65] LIU L Q, MARKHAM K, BLAZECK J, et al. Surveying the lipogenesis landscape in *Yarrowia lipolytica* through understanding the function of a Mga2p regulatory protein mutant[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 102-111.
- [66] JIN G J, ZHANG Y X, SHEN H W, et al. Fatty acid ethyl esters production in aqueous phase by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 150: 266-270.
- [67] WU S G, HU C M, JIN G J, et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 6124-6129.
- [68] YANG X B, JIN G J, GONG Z W, et al. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 91: 86-91.
- [69] ZHANG S Y, ITO M, SKERKER J M, et al. Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880 for lipid overproduction during high-density fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(21): 9393-9405.
- [70] BOMMAREDDY R R, SABRA W, MAHESHWARI G, et al. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 36.
- [71] CHANG L L, LU H Q, CHEN H Q, et al. Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: current progress and future prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 54: 107794.
- [72] KIKUKAWA H, SAKURADANI E, ANDO A, et al. Arachidonic acid production by the oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4: a review[J]. *Journal of Advanced Research*, 2018, 11: 15-22.
- [73] SUZUKI O, YOKOCHI T, YAMASHINA T. Studies on production of lipids in fungi. II[J]. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 1981, 30(12): 863-868.
- [74] MA L, FU L J, HU Z H, et al. Modulation of fatty acid composition of *Aspergillus oryzae* in response to ethanol stress[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(6): 158.
- [75] KASAVI C, ERASLAN S, ONER E T, et al. An integrative analysis of transcriptomic response of ethanol tolerant strains to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Biosystems*, 2016, 12(2): 464-476.
- [76] SUN Y L, NIU Y L, HE B, et al. A dual selection marker transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* for the industrial *Aspergillus oryzae* 3.042[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(2): 230-234.
- [77] NGUYEN K T, HO Q N, DO L, et al. A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(6): 107.
- [78] FRIEDLANDER J, TSAKRAKLIDES V, KAMINENI A, et al. Engineering of a high lipid producing *Yarrowia lipolytica* strain[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 77.
- [79] LIU L Q, PAN A, SPOFFORD C, et al. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 36-45.
- [80] SILVERMAN A M, QIAO K J, XU P, et al. Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3781-3798.
- [81] QIAO K J, ABIDI S H I, LIU H J, et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 56-65.
- [82] XUE Z X, SHARPE P L, HONG SP, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 734-740.
- [83] CORDOVA L T, ALPER H S. Production of α -linolenic acid in *Yarrowia lipolytica* using low-temperature fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(20): 8809-8816.
- [84] GEMPERLEIN K, DIETRICH D, KOHLSTEDT M, et al. Polyunsaturated fatty acid production by *Yarrowia lipolytica* employing designed myxobacterial PUFA synthases[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4055.
- [85] SUTANTO S, ZULLAIKAH S, TRAN-NGUYEN P L, et al. *Lipomyces starkeyi*: its current status as a potential oil producer[J]. *Fuel Processing Technology*, 2018, 177: 39-55.
- [86] JUANSSILFERO A B, KAHAR P, AMZA R L, et al. Effect of inoculum size on single-cell oil production from

(下转第34页)