

## 高山被孢霉产花生四烯酸及其遗传改造的研究进展

丛蕾蕾, 彭超, 纪晓俊, 黎志勇, 尤江英, 路金森, 黄和

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

**摘要:** 花生四烯酸作为一种重要的多价不饱和脂肪酸, 因其具有多种生理功能而被认为是潜在的食品添加剂和药物。近年来, 利用高山被孢霉合成花生四烯酸已成为研究热点。前期相关研究主要集中在菌种选育及发酵调控方面。随着研究的不断深入, 关于高山被孢霉合成花生四烯酸的代谢途径的研究取得了较大进展。以下简要概述前期工作进展, 着重论述花生四烯酸合成途径的关键酶及其高山被孢霉的遗传改造的研究情况, 包括生物合成花生四烯酸代谢途径、关键酶及其应用、高山被孢霉的遗传操作系统的构建以及遗传改造的应用, 并对其研究前景进行了展望。

**关键词:** 花生四烯酸, 高山被孢霉, 关键酶, 遗传操作系统, 遗传改造

## Progress in production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* and genetic modification

Leilei Cong, Chao Peng, Xiaojun Ji, Zhiyong Li, Jiangying You, Jinmiao Lu, and He Huang

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

**Abstract:** Arachidonic acid, as an important polyunsaturated fatty acid, is identified as potential food additives or pharmaceuticals for their biological activities. In recent years, arachidonic acid production by *Mortierella alpina* is becoming a research highlight. The prophase relevant researches focused on the mutagenic breeding and fermentation optimization. With the depth of investigation, the advancement concerning pathway for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* has been made. In this review, we summarized the prophase work briefly. Mainly, we discussed the biosynthesis pathway of arachidonic acid, the key enzymes, the construction of transformation system and the genetic modification. In addition, the prospect of microorganism arachidonic acid production is put forward.

**Keywords:** arachidonic acid, *Mortierella alpina*, key enzymes, transformation system, genetic modification

多价不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是指一系列含有 2 个或 2 个以上非共轭顺式双键的 C16-22 的多不饱和脂肪酸<sup>[1]</sup>。花生四烯酸 (Arachidonic acid, 简称 AA 或 ARA), 属于  $\omega$ -6 系

**Received:** May 4, 2010; **Accepted:** July 12, 2010

**Supported by:** Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 20936002), National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Nos. 2007CB707805, 2009CB724700), the Fifth of Six Projects Sponsoring Talent Summits of Jiangsu Province (No. 2008-D-63), College Industrialization Project of Jiangsu Province (No. JH09-30), Program for Century Excellent Talents in University from the Ministry of Education of China (No. NCET-09-0157), the Fok Ying Tung Education Foundation, Ministry of Education of China (No. 123014).

**Corresponding author:** He Huang. Tel/Fax: +86-25-83172094; E-mail: biotech@njut.edu.cn

国家自然科学基金重点项目 (No. 20936002), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2007CB707805, 2009CB724700), 江苏省六大人才高峰项目 (No. 2008-D-63), 江苏省高校科研成果产业化推进项目 (No. JH09-30), 教育部新世纪优秀人才计划 (No. NCET-09-0157), 教育部霍英东教育基金 (No. 123014) 资助。

列多不饱和脂肪酸, 结构式如图 1 所示。ARA 不仅是机体组织细胞膜的结构成分; 同时也是前列腺素、环前列腺素和白三烯类等二十碳衍生物的直接前体<sup>[2]</sup>。其具有多种生理活性<sup>[3]</sup>, 已在保健食品、医药、化妆品等领域得到广泛应用。

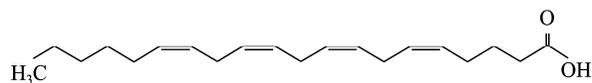


图 1 ARA 结构式

Fig. 1 The structural formula of ARA.

高山被孢霉 *Mortierella alpina* 被认为是最佳的 ARA 生产菌株, 它具有 ARA 含量高且 PUFAs 组成合理等特点, 研究较多。目前, 利用 *M. alpina* 发酵生产 ARA 的研究主要集中在菌种选育、培养基优化和关键酶等方面。近年来, 本实验室在利用 *M. alpina* 发酵生产 ARA 方面展开了研究, 研究工作主要集中在高产菌株的诱变选育<sup>[4]</sup>、培养基优化<sup>[5]</sup>和发酵工艺优化<sup>[6]</sup>等方面。在研究过程中发现, 油脂中 ARA 占总脂肪酸的百分含量较低, 这也是利用微生物发酵生产 ARA 油脂的技术瓶颈。利用传统的生物工程技术, 如诱变选育以及发酵过程控制等, 都无法对 ARA 合成代谢途径进行有针对性的、定向的调控从而突破该瓶颈。利用基因工程技术对 ARA 产生菌 *M. alpina* 进行遗传改造, 可以定向选育 ARA 高产菌株, 进一步大幅度提高 ARA 发酵生产水平。本文简要概述了利用微生物发酵法生产 ARA 的研究进展, 着重论述了生物合成 ARA 代谢途径中的关键酶以及利用基因工程技术对 ARA 生产菌株进行遗传改造的研究, 对未来发展趋势进行展望, 并提出了这一研究领域未来可能的研究方向。

## 1 ARA 产生菌诱变选育

微生物发酵生产 ARA 过程中, 获得一株性状优良的生产菌株是 ARA 发酵生产的关键。因此, 对生产菌种进行诱变选育是提高 ARA 发酵水平的首要工作。1987 年, Totani 和 Oba<sup>[7]</sup>发现 *M. alpina* 的某些菌株中, ARA 积累量能达到总脂肪酸含量的 68.5%~78.8%。1996 年, Eroshin 等<sup>[8]</sup>发现被孢霉菌对培养基中的乙酰水杨酸敏感, 利用含乙酰水杨酸

的培养基选择性地筛选了产 ARA 的被孢霉, ARA 含量超过 40%。1997 年, Chen 等<sup>[9]</sup>在 10℃ 的低温下筛选到一株油脂中 ARA 含量达 42.4% 的菌株 *M. alpina* Wuji-H4。2002 年, Yuan 等<sup>[10]</sup>利用离子束注入生物技术对 *M. alpina* 进行诱变, 筛选到高产菌株 I49-N18, 并进行了 50 t 罐发酵试验, ARA 产量为 5.11 g/L。2004 年, Sakuradani 等<sup>[11]</sup>用亚硝基胍 (MNNG) 诱变 *M. alpina* 1S-4 得到了 ω-3 脱氢酶活性较低的突变株 Y11, 其 ARA 产量从 3.74 g/L 提高到了 4.97 g/L。本实验室 ARA 生产菌株 *M. alpina* ME-1<sup>[12-13]</sup>是利用代谢控制育种原理, 自行诱变筛选获得的。该菌株现保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为: CCTCCM207067。对已有文献报道中 ARA 含量较高的菌株进行了总结比较, 由表 1 可知, 本实验室所保藏的菌株 *M. alpina* ME-1 的 ARA 发酵水平已处于世界领先水平。

表 1 不同菌株发酵产 ARA 水平

Table 1 The fermentation level of ARA production by various microorganisms

Microorganism	ARA yield, cultivation period	Scale	Reference
<i>M. alpina</i> Wuji-H4	3.9 g/L, 5 d	250 mL flask	[9]
<i>M. alpina</i> I49-N18	5.11 g/L, 10 d	50 t fermentor	[10]
<i>M. alpina</i> 1S-4	13 g/L, 10 d	10 t fermentor	[14]
<i>M. alpina</i> ATCC 32222	11.1 g/L, 11d	250 mL flask	[15]
<i>M. alpina</i> ATCC 32221	11 g/L, 16 d	500 L fermentor	[16]
<i>M. alpina</i> UW-1	5.5 g/L, 6 d	20 L fermentor	[17]
<i>M. alpina</i> LPM 301	4.5 g/L, 8 d	30 L fermentor	[18]
<i>M. alpina</i> DSA-12	18.8 g/L, 12.5 d	12 L fermentor	[19]
<i>M. alpina</i> ME-1	19.8 g/L, 7 d	5 L fermentor	[12]

## 2 ARA 发酵调控

ARA 产量主要受菌体生物量、总油脂含量和油脂中 ARA 的含量等因素的制约, 而它们主要都受外界环境如培养基的组成和发酵工艺等因素的影响。为了在实际生产中获得高纯度和高浓度的 ARA 油脂, 必须对培养基和发酵工艺进行研究, 以期获得高生物量、油脂含量和 ARA 含量。

在发酵过程中, 培养基的组成不仅影响生产效率, 也影响菌丝的形态, 而菌丝形态则影响到气体的扩散、物质和热量的转移以及均匀性等。研究人

员通过研究证实溶氧、氮源、C/N 比、以及矿物质和氨基酸的添加等因素都会影响菌丝的形态。Koike 等<sup>[20]</sup>发现 C/N 比为 15~20 时, 菌丝的形态最有利于 ARA 的积累。针对培养基的优化, 国内外研究人员已经进行了大量的研究。Higashiyama 等<sup>[21]</sup>研究了无机盐对 *M. alpina* 菌丝形态和 ARA 产量的影响, 在添加一定无机盐优化的培养基中, ARA 产量达 9.8 g/L。Peng 等<sup>[5]</sup>利用响应面分析法优化 *M. alpina* ME-1 生产 ARA 培养基成分, 生物量达 36.86 g/L, ARA 产量达 9.65 g/L。当在培养基中添加某些外源物质时, ARA 产量也能得到进一步提高。Singh 等<sup>[15]</sup>研究发现, 添加黄豆粉和植物油可以显著提高生物量和 ARA 的产量, ARA 最高达 11.1 g/L。

目前, ARA 发酵工艺优化的研究主要围绕补料分批发酵、溶氧控制、菌丝体老化以及两阶段发酵控制等方面展开。Hwang 等<sup>[19]</sup>通过补料添加葡萄糖, 并用 NH<sub>4</sub>OH 调节 pH 值, 菌体干重提高了 4 倍, ARA 的含量提高到 18.8 g/L。利用 *M. alpina* 发酵生产 ARA 可分为菌体生长及油脂积累 2 个阶段, 油脂积累阶段采用菌丝体老化工艺则有利于 ARA 的快速积累。Jin 等<sup>[22]</sup>对传统老化工艺进行改进, 最终 ARA 产量高达 19.02 g/L, 是传统工艺的 1.55 倍。ARA 发酵过程中溶氧是一个限制因素, 在补料生产过程中高浓度生物量的获得非常困难。针对此问题, 通常采用大通气量和高搅拌输出功率相结合的方法, 但该方法不利于丝状真菌发酵生产过程, 因此研究新的供氧方式十分重要。Jin 等<sup>[12]</sup>利用乙醇胁迫作用及两步法发酵来提高 ARA 产量, 发酵 5 d 后将降低转速, 提高通气量, 延长了发酵稳定期。在第 5 天和第 7 天分别添加 3% 和 2% 的乙醇, ARA 产量为 19.8 g/L, 达到世界领先水平。Peng 等<sup>[6]</sup>采用正十六烷作为氧载体来提高发酵液中溶氧浓度 (DO), 通过在发酵培养基中添加正十六烷, 发酵体系的传氧系数 ( $K_La$ ) 和 DO 值都大大提高, 最终 ARA 产量达到 15.9 g/L, 比单一的两阶段转速控制发酵法提高了 28.9%。

利用现代生物工程新技术, 例如 ARA 生产菌株的诱变选育、发酵培养基和发酵工艺的优化以及发酵过程的实时调控等技术, 最终 ARA 的产量能得到一定幅度的提高。但是, 这些传统的操作手段并未

能从 ARA 合成途径等深层次去指导发酵调控, 从而进一步大幅度提高 ARA 产量。

### 3 ARA 合成的关键酶及其遗传改造

从 20 世纪末开始, 日本、英国等展开了对利用产油微生物生产 PUFAs 的研究。迄今为止, 各国研究人员在利用 *M. alpina* 发酵产 ARA 机理方面的研究已经卓有成效, 尤以日本京都大学 Shimizu 教授实验室为代表。该实验室在利用 *M. alpina* 1S-4 发酵产多不饱和脂肪酸的途径、关键酶以及基因工程育种等方面进行了非常详尽的研究<sup>[23]</sup>。

本实验室在研究过程中发现, C18 脂肪酸累积量较高, 尤其是硬脂酸 (C18:0) 和油酸 (C18:1) 的含量较高, 导致最终 ARA 占总脂肪酸中的百分含量较低, 降低了 ARA 的合成效率, 这也是目前利用微生物发酵产 ARA 油脂的技术瓶颈。运用传统的发酵工程手段并不能较好地解决以上这些问题。因此, 对 ARA 生物合成的代谢途径进行分析, 并从分子水平或者代谢机理方面展开研究, 有望实现富含 ARA 的油脂的高效生产。

#### 3.1 ARA 合成的关键酶

##### 3.1.1 ARA 合成途径以及关键酶

微生物发酵合成 PUFAs 的代谢途径如图 2 所示。PUFAs 生物合成<sup>[24]</sup>从油酸 (Oleic acid, OA) 开始,  $\Delta 12$  脂肪酸脱氢酶催化油酸形成亚油酸。亚油酸是合成亚麻酸的前体物质, 在  $\Delta 6$  脂肪酸脱氢酶催化下形成  $\gamma$ -亚麻酸 (GLA)。GLA 在碳链延长酶催化下, 合成双高- $\gamma$ -亚麻酸 (DGLA), 然后经  $\Delta 5$  脂肪酸脱饱和酶催化, 将 DGLA 第 5 位碳原子上的氢脱除转化成 ARA。纵观 PUFAs 合成途径<sup>[23]</sup>, 脂肪酸脱饱和酶 (Desaturase)、碳链延长酶 (Elongase) 和 NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶等酶都是 ARA 合成代谢途径中的关键酶。

长期以来脱饱和被认为是 PUFAs 生物合成过程中的限速步骤, 因此绝大多数的研究都集中脱饱和酶基因的克隆与表达及其酶学性质研究等方面<sup>[25]</sup>。自 20 世纪 90 年代初, Shimizu 教授的实验室就开始展开关于脱饱和酶酶学性质方面的研究。随后,  $\Delta 5$  脂肪酸脱饱和酶<sup>[26]</sup>、 $\Delta 12$  脂肪酸脱饱和酶<sup>[27]</sup>、 $\Delta 6$  脂

肪酸脱饱和酶<sup>[28]</sup>等去饱和酶的功能逐一被揭开, 并且获得了相应酶缺陷型菌株的特异产物。这些研究为全面剖析 PUFAs 的合成途径奠定了坚实的基础。然而近期的研究却表明, 脱饱和并非 ARA 合成过程的限速步骤。2000 年, Wynn 等<sup>[29]</sup>证实碳链延长酶催化 GLA 合成 DGLA 才是 ARA 合成过程中的限速步骤。2005 年, Takeno 等<sup>[30]</sup>进一步从分子水平验证, 该反应是 *M. alpina* 合成 ARA 过程中的限速步骤。因此, 对碳链延长酶进行基因操作可以作为提高 ARA 产量的一条有效途径。不论脱饱和过程和延长过程两者哪一个步骤是限速步骤, 这两种参与反应的酶都是 ARA 合成途径中不可或缺的关键酶。而

NADH-细胞色素  $b_5$  还原酶 (CbR) 作为电子传递链的一部分, 参与多种酶反应, 其中就包含脂肪酸乙酰辅酶 A 的去饱和反应以及延长反应<sup>[31]</sup>。因而, 这个酶也是 PUFAs 合成过程中的一个关键酶。1999 年, Sakuradani 等<sup>[31]</sup>从 *M. alpina* 中成功克隆得到 CbR 的编码基因, 通过序列比对发现该基因序列与其他来源 (如酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*) 的 CbR 基因序列类似。并且对 *M. alpina* CbR 进行纯化, 纯化后的 CbR 与 NADPH 相比, 更偏爱 NADH 作为给电子体。随着关键酶方面研究的不断深入, 经过多年研究的累积, 研究人员对 *M. alpina* 合成 ARA 代谢途径已有比较清晰完整的认识。

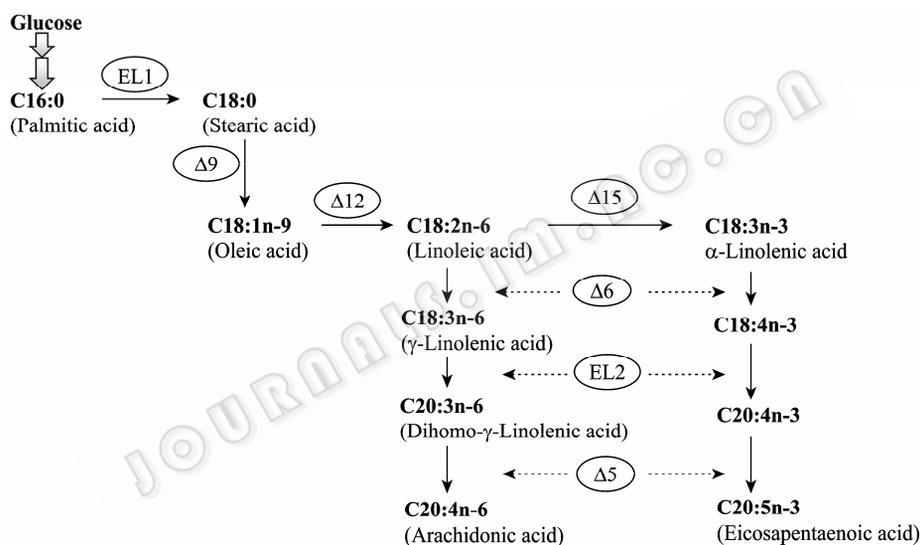


图2 PUFAs 生物合成代谢途径

Fig. 2 Pathways for the biosynthesis of PUFAs in microorganism.  $\Delta N$ :  $\Delta N$  desaturase; EL: fatty acid elongase.

### 3.1.2 关键酶在不同体系中的表达

近些年, 研究人员对 ARA 合成途径中的关键酶进行了大量系统的研究工作, 克隆得到了关键酶的编码基因, 并进一步将这些关键酶的基因在其他缺乏此类酶的生物体系中实现了表达。2001 年, 刘莉等<sup>[32]</sup>将 *M. alpina* ATCC16266 菌株体内  $\Delta 6$  脂肪酸脱氢酶克隆到酿酒酵母后,  $\gamma$ -亚麻酸含量占总脂肪酸的含量达到 31.6%。该基因在酿酒酵母体系中表达量为国内外领先水平。2004 年, 李明春等<sup>[33]</sup>初步建立起  $\Delta 6$  脂肪酸脱氢酶在毕赤酵母中的表达体系, 实现了 *M. alpina*  $\Delta 6$  脂肪酸脱氢酶在毕赤酵母中的表达, 最终  $\gamma$ -亚麻酸含量占总脂肪酸的 16.26%。2006 年, Chen 等<sup>[34]</sup>通过将  $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$  脱饱和酶和碳链延长

酶基因在大豆种子中进行表达, 在大豆油中累积了 GLA、二十碳二烯酸 (EDA)、DGLA 和 ARA, 提升了大豆油的品质。这种方法使得从产油植物中获得所需的 PUFAs 成为可能。

### 3.2 *M. alpina* 遗传操作系统

对 ARA 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。随着人们对于 ARA 生物合成关键酶在分子水平上的认识逐步加深, 利用基因工程手段改造 ARA 生产菌株以提高 ARA 的发酵水平日益受到研究人员的青睐。为了高效使用基因工程技术, 构建适合目的菌株的遗传转化系统是先决条件。目前, 研究人员已成功构建多种高山被孢霉的转化系统, 为日后基因工程育种方

面的研究奠定了坚实的基础。

2000年, Mackenzie等<sup>[35]</sup>首次建立了 *M. alpina* CBS 224.37 的转化系统, 成功构建了 pD4 载体。该载体以同源 his H4.1p 为强启动子, 修正的潮霉素 B 抗性基因 *hpt* (mod) 为标记基因, 采用 PEG 原生质体介导的方法成功地将载体导入宿主细胞, 经潮霉素抗性筛选得到重组子。2004年, Takeno等<sup>[36-37]</sup>针对 *M. alpina* 1S-4 菌株抗潮霉素的性状, 首先利用诱变剂 MNNG 对菌种进行诱变筛选出尿嘧啶缺陷菌株。嘧啶核苷酸合成途径中有 2 个较关键的酶, 即乳清酸磷酸核糖基转移酶 (OPRTase) 和乳清苷单磷酸脱羧酶 (OMPdecase), *ura5* 和 *ura3* 基因分别编码 OPRTase 和 OMPdecase。通过对比分析缺陷型菌株与原始菌株中这两种酶活的变化, 证实尿嘧啶缺陷菌株缺乏 OPRTase, 同时分离得到 *ura5* 基因。然后在 pD4 载体的基础上, 建立了以 *ura5* 基因为选择性基因的 pDura5 载体。该载体以同源 his H4.1p 作为强启动子、*ura5* 基因为标记基因、异源丝状真菌的 *trpCt* 为转录终止子。通过基因枪转化法导入 *M. alpina* 1S-4 孢子, 成功筛选到重组子。2009年, Ando等<sup>[38]</sup>构建了 *M. alpina* 1S-4 的根瘤农杆菌转化系统。该转化系统转化方法为根瘤农杆菌介导法, 载体仍然使用 pDura5 载体。这种方法转化频率高, 且获得的转化子的有丝分裂稳定性比微粒轰击法更高。但是 Shimizu 教授实验室构建的转化系统都需要筛选缺陷菌株, 前期准备工作繁杂、工作量大、重复性不高, 而且转化子具有生长速率低、产油率低等缺点。为了解决这些问题, 构建简便易操作的 *M. alpina* 1S-4 转化系统成为首要任务。2005年, Takeno等<sup>[39]</sup>通过实验验证, 高浓度的争光霉素 (20 mg/mL) 对 *M. alpina* 1S-4 菌丝生长有抑制作用。2009年, Ando等<sup>[40]</sup>证实, 100 μg/mL 萎锈灵能完全抑制 *M. alpina* 1S-4 菌丝生长和孢子萌发。由此, 分别建立 2 种以原始菌株作宿主细胞的新型的转化系统, 载体分别以 *zeo* 和 *sdh B* 基因为抗性基因。这 2 种新型转化系统的构建使得基因操作简便易行。

### 3.3 *M. alpina* 遗传改造

遗传转化系统的建立, 为利用遗传改造 *M. alpina* 进一步提高 PUFAs 发酵水平奠定了基础。一

些分子选育高产 ARA 菌株的基因操作即建立在这些转化系统上。基因工程育种可以定向调控代谢产物的种类及产量。目前, 通过基因工程手段提高 *M. alpina* 生物合成 ARA 水平的主要方法有: 基因敲除、RNA 干扰以及过量表达技术。

Sakuradani等<sup>[23,41]</sup>通过诱变筛选获得 Δ12 脂肪酸脱氢酶缺陷型突变株 *M. alpina* JT-180, 且测得该突变株中的 Δ5 和 Δ6 脂肪酸脱氢酶活性比原始菌株高。将 Δ12 脂肪酸脱氢酶的基因在突变株 *M. alpina* JT-180 中过表达, 在相同的培养条件下, ARA 产量比原始菌株提高 66.7%, 在总脂肪酸中的百分含量也提高了 18%。2005年, Takeno等<sup>[30]</sup>在 pDura5 载体上连接 *GLELO* 基因 (编码脂肪酸延长酶 EL2), 并成功导入目的菌株, 使其催化 GLA 向 DGLA 转化, 因此 ARA 的产率得到了大幅度提高。相同培养条件下, ARA 产量比原始菌株提高了近 1 倍。而脂肪酸延长酶 *ELI* 基因在 *M. alpina* 1S-4 中过表达, 也能加快 ARA 的合成速率并且提高 ARA 产量。碳链延长酶基因的过表达对 *M. alpina* 合成 ARA 有重要的影响。基于 *M. alpina* 基因水平上的深入研究, 推动了研究人员对于 ARA 合成的代谢机理方面的认识。

本实验室长期以来主要在发酵调控方面对 ARA 的合成进行研究, 并且取得了一定的成果。通过对培养基和发酵条件的优化, ARA 的产量已经达到世界领先水平。但是通过对样品分析, 我们发现 C18 脂肪酸百分含量比 ARA 百分含量高, 甚至高出许多。针对该问题, 本实验室拟进一步开展基因工程方面的研究, 对 ARA 生产菌株的某些位点酶进行改造, 从深层次把握整个 ARA 生物合成代谢途径, 来进一步提高 ARA 产量。

## 4 展望

随着对微生物发酵法生产 ARA 一系列关键性问题的解决, ARA 必将大规模走向产业化。ARA 发酵生产中, 还存在着葡萄糖转化率低 (5%~10%)、生长周期长 (7~12 d) 和发酵过程难以控制等问题, 这主要是由于 ARA 的生物合成机制十分复杂, 从葡萄糖至 ARA 的合成涉及 20 多步酶促反应。

传统的发酵调控(例如培养基优化、溶氧、pH调控等)无法对ARA合成进行有针对性的、定向的调控。从基础科学问题上看,由于ARA产生菌多为非模式微生物,对其遗传背景的不了解以及对整个脂肪酸代谢网络的认识不够,导致发酵调控的盲目性以及不稳定性。1991年, Bailey教授在 *Science* 上发表文章<sup>[42]</sup>,首次详细论述了代谢工程,标志了代谢工程新学科的诞生。其与细胞生物学、基因工程等技术的联合应用已成为研究和控制微生物生长代谢的一个必不可少的手段。因此,对ARA发酵过程有必要利用先进的代谢工程方法对整个脂肪酸网络进行系统的分析研究,利用代谢流分析和代谢流控制、优化等理论指导发酵调控,在全局代谢网络调控的基础上实现脂肪酸生产与菌体生长之间的平衡,以期达到ARA产量最大化。

获得一株性状优良的生产菌株是ARA发酵生产的关键。在国内外研究中,尽管利用基因工程技术对菌株进行改造能在一定程度上提高发酵水平,但是总体而言收效甚微。因而,选育高效的ARA高产菌株必定成为未来研究的重点。全局转录组工程<sup>[43]</sup>和多基因组工程<sup>[44]</sup>等新兴发展的工业微生物育种技术,能深入到转录水平和基因组水平对菌株进行选育,成为研究人员热点关注的对象。因此,在未来的研究中,利用新技术选育高产菌株必将成为一种趋势,从而更好地为工业生物技术产业的发展服务。

## REFERENCES

- [1] Heinz E. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids//Lipid Metabolism in Plants. Boca Raton: CRC Press, 1993: 33–89.
- [2] Singh G, Chandra RK. Biochemical and cellular effects of fish and fish oils. *Prog Food Nutr*, 1988, **12**: 371–419.
- [3] Gill I, Valivtry R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**(10): 401–409.
- [4] Chang SM, Peng C, Ji XJ, *et al.* Research progress of strain improvement for high arachidonic acid production. *Food Ferment Ind*, 2010, **36**(2): 158–162.  
常淑梅, 彭超, 纪晓俊, 等. 花生四烯酸高产菌株选育研究进展. *食品与发酵工业*, 2010, **36**(2): 158–162.
- [5] Peng C, Huang H, Jin MJ, *et al.* Optimization of medium components for biomass and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using response surface methodology. *Food Sci*, 2009, **30**(13): 205–211.
- [6] Peng C, Huang H, Ji XJ, *et al.* Effects of n-hexadecane concentration and a two-stage oxygen supply control strategy on arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1. *Chem Eng Technol*, 2010, **33**(4): 692–697.
- [7] Totani N, Oba K. The filamentous fungus *Mortierella alpina*, high in arachidonic acid. *Lipids*, 1987, **22**: 1060–1062.
- [8] Eroshin VK, Dedyukhina EG, Chistyakova TI, *et al.* Arachidonic acid production by species of *Mortierella*. *World J Microbiol Biotechnol*, 1996, **12**(1): 91–96.
- [9] Chen HC, Chang CC, Chen CX. Optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* Wuji-H4 isolate. *J Am Oil Chem Soc*, 1997, **74**(5): 569–578.
- [10] Yuan CL, Wang J, Shang Y, *et al.* Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* I<sub>49-N18</sub>. *Food Technol Biotech*, 2002, **40**(4): 311–315.
- [11] Sakuradani E, Hirano Y, Kamada N, *et al.* Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**(3): 243–248.
- [12] Jin MJ, Huang H, Xiao AH, *et al.* A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**(6): 1087–1091.
- [13] Huang H, Jin MJ, Xiao AH, *et al.* *Mortierella alpina* and use thereof: CN, 101113410. 2008-01-30.  
黄和, 金明杰, 肖爱华, 等. 一种高山被孢霉及其应用: CN, 101113410. 2008-01-30.
- [14] Higashiyama K, Yaguchi T, Akimoto K, *et al.* Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Abstracts of 88th AOCs Annual Meeting*, 1998: 34.
- [15] Singh A, Ward OP. Production of high yields of arachidonic acid in a fed batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**(1): 1–5.
- [16] Totani N, Someya K, Oba K. Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*//Industrial Applications of Single Cell Oils. Illinois: AOCs Press, 1992: 52–60.
- [17] Li ZY, Lu Y, Yadward VB, *et al.* Process or production of arachidonic acid concentrate by a strain of *Mortierella alpina*. *Can J Chem Eng*, 1995, **73**(1): 135–139.
- [18] Eroshin VK, Satroudinov AD, Dedyukhina EG, *et al.* Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis. *Process Biochem*, 2000, **35**(10): 1171–1175.
- [19] Hwang BH, Kim JW, Park CY, *et al.* High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH<sub>4</sub>OH as a nitrogen source and pH control. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**(10): 731–735.
- [20] Koike Y, Cai HJ, Higashiyama K, *et al.* Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *J Biosci Bioeng*, 2001, **91**(4): 382–389.

- [21] Higashiyama K, Yaguchi T, Akimoto K, *et al.* Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, **75**(11): 1501–1505.
- [22] Jin MJ, Huang H, Xiao AH, *et al.* Enhancing arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using improved mycelium aging technology. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, **32**(1): 117–122.
- [23] Sakuradani E, Ando A, Ogawa J, *et al.* Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **84**(1): 1–10.
- [24] Zhang Q, Li MC, Sun HY, *et al.* Progress on molecular biology of  $\Delta^6$ -fatty acid desaturases. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(3): 319–324.  
张琦, 李明春, 孙红妍, 等.  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展. *生物工程学报*, 2004, **20**(3): 319–324.
- [25] Lenard AE, Pereira SL, Sprecher H, *et al.* Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*, 2004, **43**: 36–54.
- [26] Jareonkitmongkol S, Kawashima H, Shirasaka N, *et al.* Production of dihomo- $\gamma$ -linolenic acid by a  $\Delta 5$ -desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(7): 2196–2200.
- [27] Jareonkitmongkol S, Kawashima H, Shimizu S, *et al.* Production of 5,8,11-cis-eicosatrienoic acid by a  $\Delta 12$ -desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4. *J Am Oil Chem Soc*, 1992, **69**(9): 939–944.
- [28] Kawashima H, Nishihara M, Hirano Y, *et al.* Production of 5,8,11-eicosatrienoic acid (mead acid) by a  $\Delta 6$  desaturation activity-enhanced mutant derived from a  $\Delta 12$  desaturase-defective mutant of an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(5): 1820–1825.
- [29] Wynn JP, Ratledge C. Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase. *Microbiology*, 2000, **146**: 2325–2331.
- [30] Takeno S, Sakuradani E, Murata S, *et al.* Molecular evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of an elongase. *Lipids*, 2005, **40**(1): 25–30.
- [31] Kobayashi M, Sakuradani E, Shimizu S, *et al.* Genetic analysis of cytochrome b(5) from arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4: cloning, RNA editing and expression of the gene in *Escherichia coli*, and purification and characterization of the gene product. *J Biochem*, 1999, **125**(6): 1094–1103.
- [32] Liu L, Li MC, Hu GW, *et al.* Expression of  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotech*, 2001, **17**(2): 161–164.  
刘莉, 李明春, 胡国武, 等. 高山被孢霉 ATCC 16266  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达. *生物工程学报*, 2001, **17**(2): 161–164.
- [33] Li MC, Sun Y, Zhang Q, *et al.* Expression of  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina* in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(1): 34–38.  
李明春, 孙颖, 张琦, 等. 高山被孢霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的胞内表达. *生物工程学报*, 2004, **20**(1): 34–38.
- [34] Chen R, Matsui K, Ogawa M, *et al.* Expression of  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  desaturase and *GLELO* elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds. *Plant Sci*, 2006, **170**(2): 399–406.
- [35] Mackenzie DA, Wongwthanasat P, Carter AT, *et al.* Isolation and use of a homologous Histone H4 promoter and a ribosomal DNA region in a transformation vector for the oil-producing fungus *Mortierella alpina*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(11): 4655–4661.
- [36] Takeno S, Sakuradani E, Murata S, *et al.* Cloning and sequencing of the *ura3* and *ura5* genes, and isolation and characterization of uracil auxotrophs of the fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(2): 277–285.
- [37] Takeno S, Sakuradani E, Murata S, *et al.* Establishment of an overall transformation system for an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(4): 419–425.
- [38] Ando A, Sumida Y, Negoro H, *et al.* Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(17): 5529–5535.
- [39] Takeno S, Sakuradani E, Tomi A, *et al.* Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using Zeocin, and application to arachidonic acid production. *J Biosci Bioeng*, 2005, **100**(6): 617–622.
- [40] Ando A, Sakuradani E, Horinaka K, *et al.* Transformation of an oleaginous zygomycete *Mortierella alpina* 1S-4 with the carboxin resistance gene conferred by mutation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Curr Genet*, 2009, **55**(3): 349–356.
- [41] Sakuradani E, Kamada N, Hirano Y, *et al.* Production of 5,8,11-cis-eicosatrienoic acid by a  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturation activity-enhanced mutant derived from a  $\Delta 12$  desaturation activity-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**(3): 281–287.
- [42] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**(5013): 1668–1675.
- [43] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, **9**(3): 258–267.
- [44] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, *et al.* Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, **460**: 894–899.