

蜡酯生物合成研究进展

李亚利^{1,2}, 孔任秋¹, 高宏^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 蜡酯在生物体的生命活动中起重要作用。文中综述了不同生物体中蜡酯合成途径及关键酶的特征, 及蜡酯合成相关基因的异源表达和利用基因工程技术提高蜡酯异源合成产量的方法, 旨在为微生物中异源合成蜡酯提供参考。

关键词 蜡酯; 合成途径; 异源表达; 基因工程

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)02-00512-04

Research Progress on Wax Ester Biosynthesis

LI Ya-li et al (National Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072)

Abstract Wax esters play an important role in life activities of organisms. The biosynthetic pathways of wax esters in different species and characteristics of key enzyme were reviewed, as well as heterologous expression of the related genes for wax esters synthesis, increasing of the production of wax esters heterologous synthesis by using genetic engineering technology, so as to provide reference for wax esters heterologous synthesis in microorganisms.

Key words Wax ester; Biosynthetic pathway; Heterologous expression; Genetic engineering

蜡酯(wax esters)是由长链的脂肪酸和脂肪醇酯化形成的一种中性脂, 在动物、植物和微生物中广泛存在, 具有多种重要的生物学功能。植物的表皮蜡可抵抗干旱、紫外线和致病菌的袭击。抹香鲸的鲸蜡器可调节浮力, 同时还具有“声纳”的作用。用于构筑蜂巢的蜂蜡以及白蜡虫的白蜡, 都对它们各自的生命活动具有重要意义^[1-2]。贝氏不动杆菌^[3]等细菌和纤细裸藻中能积累蜡酯作为碳源和能量储存物质^[4]。蜡酯更是一种重要的经济油脂, 具有防水防锈、耐高温高压、绝缘、可塑、可燃等性质, 因而在医药、化妆品、食品工业等^[5]领域具有多种重要的用途。蜡酯有固态和液态2种形态, 固态蜡酯的长链脂肪酸和脂肪醇的碳链多为饱和碳链, 如蜂蜡, 相反碳链不饱和度高的蜡酯为液态, 如鲸蜡和加州希蒙得木蜡(jobba oil)。液态蜡酯还能作为航空航天工业、人工心脏、精密仪器仪表和特种机械等高科技领域专用的润滑剂^[6-7], 具有相对较高的价值。自从世界捕鲸公约颁布后, 加州希蒙得木蜡成为主要商用蜡酯的来源, 然而有限的资源和不断增长的市场需求使其价格高昂。因此, 有必要通过遗传方法开发廉价、高产的新型可替代基因代谢工程蜡酯。

目前, 蜡酯的合成途径及关键酶和基因在微生物、植物和动物中都有研究, 蜡质酯合成酶(Wax)和脂酰辅酶A还原酶(FAR)是其关键酶^[2]。笔者在文中综述了蜡酯在不同物种中的合成途径及其基因工程产蜡的研究进展。

1 生物体中蜡酯的合成途径

在不同生物体中, 蜡酯最终是在蜡酯合成酶的催化下由长链脂肪酸和长链脂肪醇通过转酯反应形成的, 但它们的合成过程和关键酶有所差异。

1.1 微生物中蜡酯的合成途径 蜡酯是微生物中重要的储存脂类, 当细胞中含有过多的游离脂肪酸时, 它们就会转化为蜡酯等无毒的储存复合物, 使细胞避免受损伤^[8]。Ishige等于2002年发现用于蜡酯形成的长链脂肪醇可由2步相应的脂酰辅酶A还原反应合成^[9]。Kalscheuer等^[10]以*Acinetobacter calcoaceticus* strain ADP1(后被命名为*Acinetobacter baylyi* strain ADP1)为研究对象, 对其蜡酯的生物合成途径进行了细致的研究。首先, 一个依赖于NADPH的长链脂酰辅酶A还原酶(Acr1)催化脂酰辅酶A还原为脂肪醛(Acr1定位在质膜上, 催化C₁₄~C₂₂的酰基辅酶A的还原反应^[10]), 该脂肪醛进一步由一个NADPH-依赖的脂肪醛还原酶还原成相应的脂肪醇(图1)。Wahlen等首次从海杆菌(*Marinobacter aquaeolei*) VT8中克隆了细菌蜡酯合成途径中的脂肪醛还原酶^[11]。最后, 蜡酯合成酶/酰基辅酶A-二酰基甘油酰基转移酶(WS/DGAT)催化脂肪醇与长链脂酰辅酶A酯化生成蜡酯^[12-13]。

2003年, Kalscheuer等^[12]首先在贝氏不动杆菌ADP1中鉴定了催化蜡酯合成最后一步反应的关键酶蜡酯合成酶/脂酰辅酶A: 二脂酰甘油酰基转移酶(WS/DGAT)。它是一个双功能酶, 既有酰基辅酶A: 脂肪醇酰基转移酶活性, 可催化蜡酯合成, 又有酰基辅酶A: 二酰基甘油酰基转移酶活性, 可催化甘油三酯的合成, 而在贝氏不动杆菌中, 前者的活性要高于后者。WS/DGAT是一种底物非特异性酶, 能够接受较宽范围内不同碳链长度的直链醇(C₂~C₃₀)和脂酰辅酶A(C₂~C₂₀)作为底物, 但对C₁₄~C₁₈醇的酰基化反应活性最高。长链的仲醇也可作为酰化反应的底物, 但活性较低, 可能是由于羟基在末端更易接近该酶。该酶对十六烷酰辅酶A作为酰化反应的酰基供体具有最高的特异性, 而当链长低于C₁₂或高于C₁₈时该酶的催化活性较低^[13]。

细菌中性脂的合成严格依赖于质膜, 但不在磷脂片层的中间。Wältermann等^[13]的研究认为, 在细菌中蜡酯的形成

基金项目 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-060); 国家重点实验室专项经费自主研究项目(2011F-BZ06)。

作者简介 李亚利(1985-), 女, 河北武安人, 硕士研究生, 研究方向: 蓝藻基因工程。*通讯作者, 助理研究员, 博士, 从事蓝藻遗传学与生物技术的研究, E-mail: gaoh@ihb.ac.cn。

收稿日期 2012-11-26

首先是 WS/DGAT 结合到细胞质膜上,催化小的油脂液滴形成。这些小油滴直径只有几纳米并与膜结合的 WS/DGAT 相连。在脂类积累阶段,这些小油滴在质膜上形成乳剂质的油脂层。在脂质合成的延伸过程中,小油滴离开膜结合的酰基转移酶,聚集形成脂质前体。在脂质前体中,小油滴相互结合在一起形成一个均匀的脂质中心,使脂质前体表现出粒状的内部结构,最后形成成熟的脂质体。

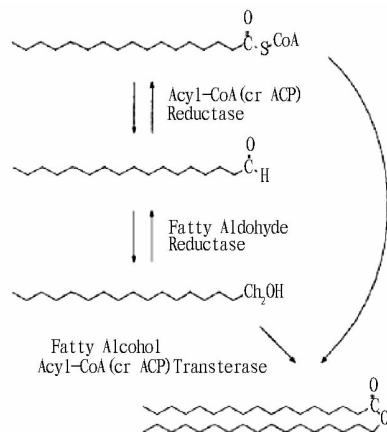


图1 细菌中蜡酯的生物合成途径^[10]

1.2 植物中蜡酯的合成途径 植物中蜡酯合成的研究最早在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中进行,其蜡酯成分主要通过酰基还原途径合成(图2)。在植物中,脂肪醇的形成过程有所差异。Kolattukudy 的研究表明^[14],在甘蓝(*Brassica oleracea*)中,合成伯醇需要2步反应过程和2个单独的酶催化,一个是依赖于 NADH 的脂酰辅酶 A 还原酶,作用是将超长链脂肪酸还原成脂肪醛;另一个是依赖于 NADPH 的脂肪醛还原酶,可将脂肪醛进一步还原成伯醇^[15]。而 Vioque 和 Kolattukudy^[16]又证明在豌豆(*Pisum sativum*)中,由超长链脂肪酸前体形成脂肪醇仅由一个脂酰辅酶 A 还原酶完成。而且,尽管脂肪醇形成需要脂肪醛中间体,但这些脂肪醛并不释放。

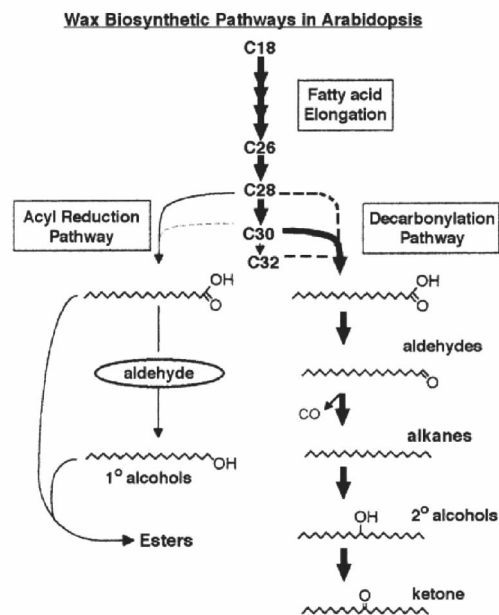


图2 在拟南芥茎中蜡酯的可能代谢途径^[15]

蜡酯是加州希蒙得木种子中主要的储存脂类,在发育胚细胞的细胞质中利用脂肪酸合成系统的产物油酸作为底物合成得到。在加州希蒙得木胚中,双功能的脂肪酰辅酶 A 还原酶催化 NADPH 依赖的还原反应,可将酰基辅酶 A 直接还原为相应的脂肪醇,而不会产生脂肪醛中间产物^[17]。该酶对超长链的脂酰辅酶 A 底物表现出很强的偏好性,而在发育的胚中含有高效的脂酰辅酶 A 延伸系统,可提供这些底物。

脂酰辅酶 A: 脂肪醇酰基转移酶即蜡酯合成酶(WS) 催化蜡酯合成的最后一步。它将脂酰辅酶 A 酰基载体转移给脂肪醇形成蜡酯。在加州希蒙得木油脂(jobba oil)中蜡酯主要由 C_{20:1} 脂酰基和 C_{22:1} 脂肪醇组成。Kathryn 等的体外试验表明加州希蒙得木蜡酯合成酶对于饱和及单一不饱和脂酰辅酶 A C₁₄₋₂₄ 的底物都表现出了明显的活性,但偏好利用 C_{20:1} 脂酰辅酶 A,而对于更短的饱和脂酰辅酶 A 以及多不饱和的(C_{18:2} 和 C_{18:3})脂酰辅酶 A 的催化活性较低。该酶对 C_{18:1} 和 C_{18:2} 脂肪醇的催化活性最高,对 C_{16:0} 脂酰辅酶 A 的活性要高于对 C_{16:0} 脂肪醇的活性^[18]。由于 C_{22:1} 脂肪醇是加州希蒙得木中脂酰辅酶 A 还原酶特有的底物,从而使其在蜡酯组成中占优势。

1.3 动物中蜡酯的合成途径 哺乳动物中的蜡酯合成途径与植物中相似,首先由脂酰辅酶 A 还原酶使用还原性的 NADPH 将脂酰辅酶 A 还原成脂肪醇和辅酶,然后由蜡酯合成酶催化脂肪酸和脂肪醇的转酯反应形成蜡酯^[19](图3)。

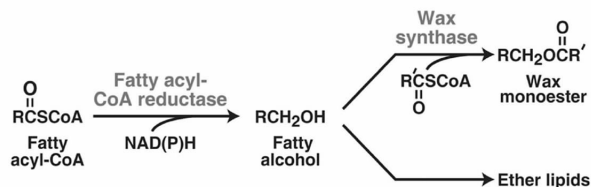


图3 哺乳动物中合成蜡酯的途径^[19]

Cheng 等^[19]用生物信息学方法鉴定了小鼠的2个脂酰辅酶 A 还原酶: FAR1 和 FAR2。FAR1 和 FAR2 的 cDNA 编码同工酶。FAR1 需要 NADPH 作为辅因子,偏好以饱和及不饱和的 C₁₆ 或 C₁₈ 脂肪酸作为底物;而 FAR2 则更偏好饱和的 C₁₆ 或 C₁₈ 脂肪酸。FAR1 mRNA 在小鼠多数组织中都能检测到,其中在皮脂腺组织含量最高;FAR2 mRNA 分布有限,主要分布在眼睑,包括富含蜡酯的睑板腺。这2个 FAR mRNA 都在富含醚脂的脑组织中出现。FAR1 分布广泛且可作用于不同链长度和不同饱和度的脂肪酸,说明该酶在脂肪醇生物合成中起主要作用。

Cheng 等^[20]也在2004年表达克隆鉴定了小鼠包皮腺中编码一个蜡酯合成酶的 cDNA。该酶能够利用饱和、不饱和、多不饱和脂肪醇及多萜醇和脂肪酸合成蜡酯,其 mRNA 主要分布在富含皮脂腺的组织如包皮腺和眼睑中,在其他组织中的含量很低。小鼠蜡酯合成酶对 C_{16:1}、C_{18:1}、C_{16:0}、C_{20:0} 和 C_{14:0} 脂肪酸均有催化活性,但对 C_{16:1} 脂肪酸的利用率最高。几类主要合成中性脂的酰基转移酶家族具有序列相关性,包括 ACAT1 和 ACAT2(合成胆固醇酯),MGAT1 和 MGAT2(合

成甘油二酯), DGAT1 和 DGAT2(合成甘油三酯)。其中, 蜡酯合成酶与 MGAT1、MGAT2 和 DGAT2 关系最近, 与 ACAT1、ACAT2 和 DGAT1 仅有随机的序列相似性。

Teerawanichpan 等鉴定了桡足动物飞马哲水蚤 (*Calanus finmarchicus*) 中 3 个脂酰辅酶 A 还原酶基因 (*CjFAR1*、*CjFAR2* 和 *CjFAR3*), 并在酵母中进行功能研究, 结果表明这 3 个脂酰辅酶 A 还原酶负责飞马哲水蚤中蜡酯脂肪醇部分的合成^[21]。*CjFAR1* 可利用较宽范围的饱和脂肪酸 C₁₈₋₂₆ 作为底物, *CjFAR2* 仅利用非常长链的饱和脂肪酸 C₂₄₋₂₆ 作为底物, 而 *CjFAR3* 可利用饱和脂肪酸 C₁₆₋₁₈ 和不饱和脂肪酸 (C_{18:1} 和 C_{20:1}) 作为底物。

2 蜡酯合成相关基因的异源表达

蜡酯合成途径中的关键酶已在几种细菌、酵母、蓝藻等生物中得到成功表达(表 1)。Kalscheuer 等^[12]在烷烃降解菌——香茅醇假单胞菌 (*Pseudomonas citronellolis*) 中异源表达了贝氏不动杆菌 ADP1 的 *wax/dgat*, 得到了具有双催化活性的 WS/DGAT, 但仅在 0.3% (W/V) 十六醇(1-hexadecanol) 作为碳源时细胞中才合成蜡酯。这表明在 *P. citronellolis* 中异源表达的 WS/DGAT 需以外加的脂肪醇为直接底物, 催化烷烃降解途径产生的脂肪酰辅酶 A 与外加脂肪醇之间进行酯化反应合成蜡酯。

贝氏不动杆菌 ADP1 的 *wax/dgat* 不仅可在异源细菌中有效表达, 在真核生物中也能够表达具有生物活性的蛋白。贝氏不动杆菌 ADP1 的 WS/DGAT 在酵母的四重突变株——酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) H1246 (敲除了甘油三酯和固醇酯合成途径中催化最后酯化反应的相关酰基转移酶 DGA1、LRO1、ARE1 和 ARE2 的编码基因, 从而无法积累油脂) 中表达, 使油脂合成缺陷突变株重新获得积累甘油三酯 (TAG) 的能力。另外, 还可利用氨基酸无氧分解产生的乙醇和异戊醇合成脂肪酸乙酯 (FAEEs) 和脂肪酸异戊醇酯 (FAIEs)。此结果进一步证实了 WS/DGAT 底物的广泛性, 转基因宿主代谢所产生底物的不同直接导致最终合成油脂成分的多样性^[22]。

加州希蒙得木蜡酯合成酶基因在微生物中的异源表达与不动杆菌关键酶基因的表达相比, 并不是很成功。Metz 等在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达加州希蒙得木脂肪酰辅酶 A 还原酶, 仅得到了很低水平的脂肪醇合成^[23], 因为这种酶偏好于催化较长链的脂酰辅酶 A (C_{24:1}), 而在大肠杆菌的代谢中不产生如此长链的脂酰辅酶 A^[23-24]。同时加州希蒙得木的蜡酯合成酶在 *E. coli*、*Saccharomyces cerevisiae* 等微生物中都未得到有效表达^[25]。Lardizabal 等^[25]在拟南芥中表达了加州希蒙得木的蜡酯合成酶和脂酰辅酶 A 还原酶以及银扇草 (*Lunaria annua*) 的 β-酮脂酰-CoA 合酶 (*kcs*, β-ketoacyl-CoA synthase, 一种脂肪酸延长酶), 结果表明转基因植物种子油中有 49% 是蜡酯。

2006 年, Kalscheuer 等^[26]在重组 *E. coli* 中共表达了加州希蒙得木的双功能酰基辅酶 A 还原酶和贝氏不动杆菌 ADP1 的蜡酯合成酶。在外加油酸的条件下, 重组菌中合成了与加州

希蒙得木蜡相似的蜡酯, 如油酸棕榈酯 (C_{34:1})、棕榈油酸棕榈酯 (C_{32:1}) 和油酸油酯 (C_{36:2}), 其中蜡酯产量约占细胞干重的 1%。盛春霞等在光合自养蓝藻鱼腥藻 PCC 7120 中共表达了来源于不动杆菌 ADP1 的蜡酯合成酶基因 (*wax/dgat*) 和小鼠脂酰辅酶 A 还原酶基因的编码序列 (*far1 cDNA*), 得到了产量约为细胞干重 1% 的产蜡酯鱼腥藻, 且在培养过程中不需要添加任何有机培养物, 并发现蜡酯的合成偏好于利用 C₁₆ 和 C₁₈ 饱和脂肪酸作为转酯反应的底物^[27]。若在鱼腥藻 (*Anabaena* sp.) PCC 7120 中仅表达 *ws/dgat* 基因, 则需在外加十六醇的条件下, 才能检测到蜡酯的合成^[28]。何晨柳等通过基因工程的方法在海洋蓝藻聚球藻 (*Synechococcus* sp.) PCC 7002 中共表达了来源于小鼠的脂肪酰辅酶 A 还原酶和来自不动杆菌 ADP1 的蜡酯合成酶, 成功构建了能够异源合成蜡酯的转基因藻株 (*wax-far1* 7002)。海洋蓝藻更能适应大规模培养的要求^[5]。纤细裸藻 (*Euglena gracilis*) 中的 2 个基因 (*EgFAR* 和 *EgWS*) 在酵母中表达, 结果可合成中等长度碳链 (C₁₄ ~ C₁₆) 的蜡酯^[29]。尽管蜡酯异源合成的产量还很少, 但这些研究工作的成功表明: 在未来应用基因工程微生物, 以廉价可再生资源为原料生产与加州希蒙得木蜡相似的蜡酯已成为可能。

表 1 蜡酯合成相关基因的异源表达

蜡酯合成相关基因 (<i>wax</i> 和 <i>far</i>)	异源表达载体	结果
贝氏不动杆菌 ADP1 蜡酯合成酶	香茅醇假单胞菌和酿酒酵母 H1246	表达成功 ^[12,22]
贝氏不动杆菌 ADP1 的蜡酯合成酶和加州希蒙得木的酰基辅酶 A 还原酶	大肠杆菌	表达成功 ^[26]
贝氏不动杆菌 ADP1 蜡酯合成酶和小鼠的脂酰辅酶 A 还原酶 1	鱼腥藻 PCC 7120 和聚球藻 PCC 7002	表达成功 ^[5,27]
加州希蒙得木脂肪酰辅酶 A 还原酶	大肠杆菌	仅有很低水平的脂肪醇合成 ^[23,24]
加州希蒙得木蜡酯合成酶	大肠杆菌和酿酒酵母	表达不成功 ^[24-25]
加州希蒙得木的蜡酯合成酶和脂酰辅酶 A 还原酶	拟南芥	表达成功 ^[25]
纤细裸藻蜡酯合成酶和脂酰辅酶 A 还原酶	酵母	表达成功 ^[29]

3 利用基因工程技术提高异源合成蜡酯的产量

以脂肪酸为基础的蜡酯生物合成包括 2 步: 脂肪酸的合成及脂酰辅酶 A 与脂肪醇的转酯反应。因此要提高蜡酯的产量, 除提高关键酶的活性外, 还需提高蜡酯合成底物脂肪酸和脂肪醇的合成效率, 这与脂肪酸合成系统密切相关。

在脂肪酸延伸系统中, 乙酰辅酶 A 羧化酶催化脂肪酸生物合成途径的第 1 步, 即乙酰辅酶 A 和碳酸氢盐形成丙二酰辅酶 A, 这是脂肪酸生物合成的关键酶。当该酶的活性提高时, 可能会增强脂肪酸的合成。Lu 等^[30]在大肠杆菌中过量表达乙酰辅酶 A 羧化酶基因后丙二酰辅酶 A 的增加了量。Liu 等^[31]在 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中过量表达乙酰辅酶 A 羧化酶基因后, 分泌的脂肪酸含量增加了 2.6 倍。从丙二酰辅酶 A 合成脂酰-ACPs 的过程是由多亚基的脂肪酸合成酶复合体利用自由解离的酰基载体蛋白 (ACP) 进行的。脂

酰-ACP 的一部分参与了细胞膜磷脂的合成。脂肪酸的生产依赖于调控终产物——脂酰-ACP 的反馈抑制,这是脂肪酸生物合成的主要的调控形式。这种反馈抑制可能是一些关键步骤的限速步骤,如乙酰辅酶 A 羧化酶催化脂肪酸生物合成的第 1 步或烯脂酰-ACP 还原酶催化的最后一步或 β -酮脂酰-ACP 合成酶Ⅲ催化的步骤。硫酯酶能够水解脂酰-ACP,生成自由脂肪酸,从而有效地解除这种反馈抑制^[32]。

要提高蜡酯合成底物脂肪酸和脂肪醇的合成效率,离不开对脂肪酸代谢途径的改造。2010 年,Steen 等^[33]在大肠杆菌中共表达了贝氏不动杆菌 ADP1 的 WS/DGAT 和小鼠的脂酰辅酶 A 还原酶(FAR1)及不动杆菌属 BD413 株系的脂酰辅酶 A 还原酶(FAR),以合成蜡酯,还表达了 2 个与乙醇合成相关的基因,使其能够直接积累生物柴油(脂肪酸乙酯)。该研究通过阻止脂肪酸的 β -氧化,增强硫酯酶催化的脂酰-ACP 水解作用,同时提高脂酰辅酶 A 合成酶催化的脂肪酸羧化物类的反应强度,使得脂肪酸代谢明显地转向脂酰辅酶 A 合成的方向,提高了脂肪酸乙酯、蜡酯和脂肪醇等重要底物的产量。该研究还成功表达了半纤维素酶,以利用其作用于植物木质半纤维素如农作物秸秆等来合成新能源,这为建立起更廉价、更高效的可再生能源生产工艺发挥了重要作用。

Kaczmarzyk 等^[34]还发现在蓝细菌中,脂酰基酰基载体蛋白合成酶(由 *aas*:*slr1609* 编码,催化依赖于 ATP 的脂肪酸与酰基载体蛋白巯基的酯化反应,合成酰基-ACP)能激活外源脂肪酸,并阻止膜脂释放的脂肪酸即内源脂肪酸的分泌。这对外源脂肪酸融入细胞脂类代谢非常重要,更重要的是该酶对膜脂持续释放的内源脂肪酸的激活和重新利用,增加了脂肪酸底物。Lu 等^[35]在经基因工程改造的 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中敲除脂酰基酰基载体蛋白合成酶基因,以阻止脂肪酸激活,结果发现游离脂肪酸加倍,烷烃生产减少 90%,脂肪醇生产减少 60%;过表达该基因,对脂肪酸和烷烃的生产没有影响,但脂肪醇生产增加了 60%。这说明在蓝细菌中,脂肪酸的激活对于一些以脂肪酸为基础的生物燃料的生产具有重要作用。在酵母中也发现了这种脂肪酸循环,说明这是一个一般的细胞脂类代谢机制。

4 展望

目前的研究明确了蜡酯的合成途径,但对于蜡酯合成关键酶的生化特征、不同生物之间的差异及进化路线等领域还需深入研究。一些物种如拟南芥中含有与加州希蒙得木蜡酯合成关键酶有重要同源性的未知功能基因以及其他物种中可能存在内源的蜡酯合成酶基因,这些非常有趣的基因还有待鉴定并对其功能进行研究。

利用基因工程技术已使一些蜡酯合成关键酶的基因成功异源表达,并为提高异源合成蜡酯的产量做了有效的遗传改造,这些基础研究为进一步发展可更新的能源开辟了道路。微藻具有光合作用效率高、环境适应能力强、生长周期短、生物产量高且不占用耕地,也不受季节限制等诸多特点,作为生物产蜡酯载体极具潜力;有研究表明,许多蓝藻中可合成烃类并阐明了其相关基因^[36],而纤丝裸藻在异养条件

下(黑暗无氧条件)可积累高达 28% 以上的蜡酯^[29]。因此,利用微藻进行蜡酯合成及提高产量的研究,比细菌和高等植物具有优势。

参考文献

- [1] 谢映平,薛皎亮,郑乐怡. 蛭科昆虫的蜡分泌物超微结构和化学成分[M]. 北京:中国林业出版社,2006:11-12.
- [2] 杨璞,徐冬丽,陈晓鸣,等. 蜡酯合成途径及关键酶的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2012,34(7):695-703.
- [3] FIXTER L M, NAGI M N, MCCORMACK J G, et al. Structure, distribution and function of wax ester in *Acinetobacter calcoaceticus* [J]. Journal of General Microbiology, 1986, 132(11):3147-3157.
- [4] STÖVEKEN T, KALSCHUEER R, MALKUS U, et al. The wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase [J]. J Bacteriol, 2005, 187:1369-1376.
- [5] 何晨柳, 柳任秋, 胡晗华. 产蜡酯聚球藻 PCC 7002 的构建[J]. 水生生物学报, 2010, 34(6):1202-1205.
- [6] BENZIONI A. Jojoba domestication and commercialization in Israel [J]. Horticultural Reviews, 1995, 17:233-266.
- [7] 赵晶晶, 邓利, 谭天伟, 等. 固定化脂肪酶催化菜籽油合成蜡酯[J]. 化工进展, 2007, 26(9):1311-1315.
- [8] WALTERMANN M, STEINBUCHER A. Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots [J]. J Bacteriol, 2005, 187:3607-3619.
- [9] ISHIGE T, TANI A, TAKABE K, et al. Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase [J]. Appl Environ Microb, 2002, 68:1192-1195.
- [10] REISER C, SOMERVILLE C. Isolation of mutants of *Acinetobacter* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase [J]. J Bacteriol, 1997, 179:2969-2975.
- [11] WAHLEN B D, OSWALD W S, SEEFELDT L C, et al. Purification, characterization, and potential bacterial wax production role of NADPH-dependent fatty aldehyde reductase from *Marinobacter aquaeolei* VT8 [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(9):2758-2764.
- [12] KALSCHUEER R, STEINBUCHER A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 [J]. J Biol Chem, 2003, 278:8075-8082.
- [13] MARC WALTERMANN, ALEXANDER STEINBUCHER. Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(11):3607-3619.
- [14] KOLATTUKUDY P E. Enzymatic synthesis of fatty alcohols in *Brassica oleracea* [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 142:701-709.
- [15] KUNST L, SAMUELS A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax [J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42:51-80.
- [16] VIOQUE J, KOLATTUKUDY P E. Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from pea leaves (*Pisum sativum* L.) [J]. Arch Biochem Biophys, 1997, 340:64-72.
- [17] POLLARD M R, MCKEON T, GUPTA L M, et al. Studies on biosynthesis of waxes by developing jojoba seed. II. The demonstration of wax biosynthesis by cell-free homogenates [J]. Lipids, 1979, 14:651-662.
- [18] LARDIZABAL K D, METZ J G, SAKAMOTO T, et al. Purification of a Jojoba Embryo Wax Synthase, Cloning of its cDNA, and Production of High Levels of Wax in Seeds of Transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2000, 122(3):645-655.
- [19] JEFFREY B, CHENG, DAVID W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions [J]. J Biol Chem, 2004, 279(36):37789-37797.
- [20] JEFFREY B, CHENG, DAVID W. Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family [J]. J Biol Chem, 2004, 279(36):37798-37807.

(下转第 518 页)

应图谱的基本原理,可将 31 株真菌大致分为 3 个类群,除少数几株菌按碳源利用分类与真菌形态分类不一致外,大多数菌株按碳源利用分类与形态初步归属分类是一致的,这说明根据碳源利用的分类对形态分类工作作进一步补充是有一定价值的。

2.2 19 种常用于真菌鉴定的碳源同化对 31 株菌的检测结果 在真菌鉴定方面,常用的碳源有 19 种,分别为 D-阿拉伯糖、杨梅苷、纤维二糖、赤藻糖醇、海藻糖、半乳糖、葡萄糖、D-乳糖麦芽糖、D-甘露醇、松三糖、棉白糖、L-鼠李糖、蔗糖、琥珀酸、乙醇、核糖、山梨醇、L-山梨糖、可溶性淀粉^[3]。由表 1 可知,31 株红树林真菌对杨梅苷、赤藻糖醇、琥珀酸碳源利用率较高,而对海藻糖、半乳糖、松三糖、棉白糖利用较低。除菌株 094102 和 083137 只可利用杨梅苷、赤藻糖醇 2 种碳源外,其余的 29 株真菌对 19 种碳源均可利用。这些特征对菌株进一步确认到种起到了辅助作用。

3 讨论

Biolog 微生物鉴定系统利用微生物采用 95 种不同碳源进行新陈代谢过程中产生的酶与四唑类物质(如 TV)发生颜色反应和浊度差异为基础,通过智能软件将待鉴定菌与不同碳源反应图谱和数据库参比,给出待鉴定菌的碳源利用情况及鉴定相似率高的参考菌,其用于鉴定的反应数量多达 95 种,鉴定结果特异性强、分离度大、扩充空间巨大。但真菌种类繁多,Biolog 微生物自动分析系统数据库并不可能具有所鉴定的全部真菌,数据库仍需不断完善^[4]。

碳源同化是测定微生物对不同碳源的利用强度。以生理生化特征为依据能从多方面研究真菌,但采用的指标较多。大多真菌鉴定使用的生理生化指标以碳源同化为主,酵母鉴定中碳源同化是一个必须的生理测定^[5],虽然丝状真菌鉴定仍以形态特征为主,但碳源同化可为真菌鉴定辅助特征

提供有益补充,也可将碳源同化做为真菌分类的一项依据。

Biolog 微生物鉴定系统采用碳源同化方法,可对该试验中 31 株丝状真菌生理生化指标加以补充,并进行分类,初步推测该系统碳源同化在真菌分类鉴定中的应用前景^[6-15]。该试验利用自动微生物鉴别系统碳源反应图谱的基本原理,将 31 株真菌的碳源利用作比较,大致将它们分为 3 个类群,这对于丝状真菌生化鉴定系统的完善及丝状真菌生物学分型的研究有一定意义。

参考文献

- [1] Biolog 系统操作手册 4.2 版[M]. 2004.
 - [2] 李运,盛慧,赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J]. 酿酒科技,2005(7):84-85.
 - [3] 中国科学院微生物研究所. 常见及常用真菌[M]. 北京:科学出版社,1978.
 - [4] 姚粟,程池,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统—丝状真菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业,2006(8):63-67.
 - [5] 李金霞,程池,姚粟,等. Biolog 微生物自动分析系统—酵母菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业,2006(7):50-53.
 - [6] 刘宏媛,李光辉,罗惠波,等. 大曲中酵母菌的分离及 Biolog 微生物系统分析鉴定[J]. 食品与发酵科技,2011(1):1-3,22.
 - [7] 张志华,洪葵,高昊,等. 具有细胞毒活性红树林真菌 094811 的鉴定[J]. 微生物学杂志,2006,26(4):6-11.
 - [8] 谭兆赞,刘可星,廖宗文. 土壤微生物 BIOLOG 分析中特征碳源的判别[J]. 华南农业大学学报,2006(4):10-13.
 - [9] 李胜华,刘可星,廖宗文. 特征碳源简化土壤微生物 Biolog 测定的方法及应用[J]. 中国农业科学,2010(3):523-528.
 - [10] GARLAND J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential source utilization[J]. Soil Biology and Biochemistry,1996,28(2):213-221.
 - [11] 周德庆. 微生物学实验手册[K]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
 - [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[K]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
 - [13] 席劲琪,胡洪营,钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报,2003(1):138-141.
 - [14] 胡桂林,王德良,张雪峰,等. 用 Biolog 微生物自动分析系统鉴定大曲中地衣芽孢杆菌的研究[J]. 酿酒,2007(6):32-33.
 - [15] 韩蕙,翟振华,张燕燕,等. 环境微生物样品真菌群落 BIOLOG 分析方法[J]. 生态学报,2009(5):2368-2373.
- +++++
- (上接第 515 页)
- [21] TEERAWANICHPAN P, QIU X. Molecular and Functional Analysis of Three Fatty Acyl-CoA Reductases with Distinct Substrate Specificities in Copepod *Calanus finmarchicus* [J]. Mar Biotechnol, 2012, 14: 227-236.
 - [22] KALSCHUEER R, LUFTMANN H, STEINBÜCHEL A. Synthesis of Novel Lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by Heterologous Expression of an Unspecific Bacterial Acyltransferase [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 7119-7125.
 - [23] METZ J G, LARDIZABAL K D, LASSNER M W. Jojoba wax biosynthesis gene: US, 5445947 [P]. 1995-08-29.
 - [24] POLLARD M R, METZ J G. Fatty acyl reductases: US, 5411879 [P]. 1995-05-02.
 - [25] LARDIZABAL K D, METZ J G, SAKAMOTO T, et al. Purification of a Jojoba Embryo Wax Synthase, Cloning of its cDNA, and Production of High Levels of Wax in Seeds of Transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2000, 122: 645-655.
 - [26] KALSCHUEER R, STÖVEKEN T, LUFTMANN H, et al. Neutral Lipid Biosynthesis in Engineered *Escherichia coli*: Jojoba Oil-Like Wax Esters and Fatty Acid Butyl Esters [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 1373-1379.
 - [27] 盛春霞. 鱼腥藻脂肪酸代谢途径的遗传改造[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所, 2008.
 - [28] 盛春霞, 孔任秋. 基因工程蓝藻产蜡酯的研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 652-655.
 - [29] TEERAWANICHPAN P, QIU X. Fatty Acyl-CoA Reductase and Wax Synthase from *Euglena gracilis* in the Biosynthesis of Medium-Chain Wax Esters [J]. Lipids, 2010, 45: 263-273.
 - [30] LU X, VORA H, KHOSLA C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production [J]. Metab Eng, 2008, 10: 333-339.
 - [31] LIU X Y, BRUNE D, VERMAAS W, et al. Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria [J]. PNAS, 2010, 10: 1073.
 - [32] LU X F, LIU T G, HARMIT VORA, et al. Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in *E. coli* [J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 78-386.
 - [33] STEEN E J, KANG Y, BOKINSKY G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass [J]. Nature, 2010, 463: 559-562.
 - [34] DANUTA KACZMARZYK, MARTIN FULDA. Fatty Acid Activation in Cyanobacteria Mediated by Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase Enables Fatty Acid Recycling [J]. Plant Physiology, 2010, 152: 1598-1610.
 - [35] LU X F, GAO Q Q, WANG W H, et al. Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(17): 1-9.
 - [36] SCHIRMER A, RUDE M A, LI X Z, et al. Microbial Biosynthesis of Alkanes [J]. Science, 2010, 329: 559-562.