

DOI: 10.13376/j.cbls/2014141

文章编号: 1004-0374(2014)09-0979-12

微藻三酰甘油合成途径及其最新研究进展

何思思, 王元丽, 高保燕, 万凌琳, 李爱芬, 张成武*

(暨南大学水生生物研究中心、生态学系, 广州 510632)

摘要: 三酰甘油 (triacylglycerols, TAGs) 是动物、植物、微生物和微藻细胞主要的储藏性脂类, 它可应用于食品、轻工业和生物燃料等方面, 是一种新型可再生能源——生物柴油生产的重要原料。与高等油料作物相比, 微藻具有光合作用效率高、生长速度快、油脂产量高、不占用农业耕地和适应多种生长环境等优势, 是一种潜在的新型生物柴油生产原料。然而, 目前人们对有机体, 尤其是微藻细胞内 TAG 合成与积累的分子机制及细胞的代谢调控机制还知之甚少。对 TAG 合成的一系列重要过程, 包括脂肪酸的合成, TAG 生物合成的主要途径和旁路途径, 以及与 TAG 合成相关的关键酶和重要基因等进行了综述, 特别对微藻细胞中与 TAG 合成相关的关键基因的最新研究进展进行了总结, 旨在更好地了解油脂代谢的调控途径, 为最大限度地供应生物柴油的生产原料提供理论基础。

关键词: 生物柴油; 三酰甘油; 乙酰 CoA 羧化酶; 二酰甘油酰基转移酶; 磷脂: 二酰甘油酰基转移酶
中图分类号: Q55; TK6 **文献标志码:** A

Biosynthetic pathway of triacylglycerol in microalgae and its latest research progress

HE Si-Si, WANG Yuan-Li, GAO Bao-Yan, WAN Ling-Lin, LI Ai-Fen, ZHANG Cheng-Wu*

(Research Center for Hydrobiology, Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Triacylglycerols (TAGs) are the main storage lipids in the cells of animals, plants, microorganisms and microalgae. It could be used as feedstocks for foods, light industrial products and biofuels. Comparing with higher oil crops, microalgae have the advantages of high photosynthetic efficiency, rapid growth rate, high oil yield, broad growth environments and non-arable land for cultivation. Therefore, they are potential resources for biodiesel production. However, the metabolic and regulatory mechanisms of biosynthesis and accumulation process of TAG in organisms are not clear exactly, especially in microalgal cells. This paper summarized the important pathways of the TAG synthesis, including the synthetic route of fatty acid, the major and alternative pathways of TAG biosynthesis, as well as the key enzymes and genes involved in the pathways, especially in the microalgal cells. Thus, it is aimed at better understanding the regulatory mechanism of the TAG metabolism, and providing a theoretical basis for maximal supplies of raw materials for biodiesel production.

Key words: biodiesel; triacylglycerol; acetyl-CoA carboxylase; diacylglycerol acyltransferase; phospholipid: diacylglycerol acyltransferase

据美国能源部下属能源情报署 EIA 报道^[1], 由于全球人口的增长以及人们生活水平的提高, 特别是中国、印度等国家工业的快速发展, 近 10 多年来, 全球对能源的需求越来越大, 预计还有不断增加的趋势^[2]。随着自然界中储备的自然资源和化石能源的日益消耗以及环境问题的加剧, 新型、环保的可

再生能源越来越受到人们的关注, 尤其是利用微藻

收稿日期: 2013-12-22; 修回日期: 2014-02-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”项目)(2013AA065805); 国家自然科学基金项目(31170337, 41176105); 广东省低碳专项(2011-051)

*通信作者: E-mail: tzhangcw@jnu.edu.cn

生产生物柴油在近年来已成为国内外研究者关注的焦点。

微藻是一类能进行光合作用的低等生物, 其种类繁多, 细胞结构简单, 生长速度快, 生境广, 包括海洋、淡水、土壤、沙漠, 甚至冰雪等极端环境。微藻光合作用的机制与高等植物相似, 但其生长周期短, 光能转化效率高, 易于大规模培养, 不占用耕地。许多微藻能够积累大量的储藏性三酰甘油, 其油脂单位面积产量远远高于陆生油料作物; 另外, 微藻在积累油脂的同时还能合成多种高附加值的生物活性物质, 如长链多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA): 二十碳五烯酸 (C20:5 ω 3, EPA)、二十二碳六烯酸 (C22:6 ω 3, DHA), 以及类胡萝卜素和活性多糖等。因此, 微藻在食品、医药、环保、农业及能源领域具有重要的开发应用价值, 特别是产油微藻已成为目前最具发展潜力的生物燃料生产原料。

生物柴油作为一种可再生替代燃料, 是利用棕榈油、大豆油等植物油或者动物脂肪等油脂类物质与醇进行酯交换反应而得到的有机脂肪酸酯类物质^[3]。TAG 是中性脂的主要成分, 也是真核生物细胞中重要的储能物质; 同时, 它还是将碳转变为食品和燃料的主要来源。但是, TAG 合成与积累的分子机制及细胞调控机制还不十分明确^[4]。TAG 合成途径包括脂肪酸的合成和 TAG 的生成, 它是以脂肪酸和 3-磷酸甘油 (glycerol-3-phosphate, G-3-P) 为中间底物, 经过多步转酰化反应合成来的。其中, 乙酰 CoA 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACCase) 是脂肪酸合成途径的关键酶。ACCase 催化乙酰 CoA 合成丙二酰 CoA, 反应需要 ATP 和 CO₂ (来自 HCO₃⁻) 的参与, 这是脂肪酸合成的第一个关键反应^[5]。Sorger 和 Daum^[6] 研究表明, 二酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 的合成也是 TAG 合成过程中的限速步骤, 对这一过程中起关键作用的基因进行分析可以进一步了解其对 TAG 合成所起的决定性作用。

真核生物 TAG 的合成主要有两种途径^[7]: 第一种是依赖于酰基 CoA 的从头合成途径, 通过相关酶催化 G-3-P 及其后面的酰基化反应最终合成 TAG。这个过程的关键酶是二酰甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT), 它以酰基 CoA 作为酰基的供体, DAG 作为酰基的受体, 催化 DAG 合成 TAG。该途径在哺乳动物^[8-9]、植物^[10-12] 和酵母^[13-14] 中均有研究报道。第二种是不依赖于酰基 CoA 的合成途径, 该途径主要是由磷脂: 二酰

甘油酰基转移酶 (phospholipid: diacylglycerol acyltransferase, PDAT) 催化。它以磷脂等底物为酰基的供体, 从上面转移一个脂酰基给 DAG 来合成 TAG。酵母^[15-16]、维管植物^[15,17] 中有关于 PDAT 催化 TAG 合成途径的报道。除此之外, TAG 还可由二酰甘油转酰酶 (diacylglycerol transacylase, DGTA) 催化, 以两个 DAG 分子分别作为酰基的供体和受体, 这也是一种不依赖于酰基 CoA 的合成途径, 在大鼠 (*Rattus norvegicus*) 肠脏^[18] 以及红花 (*safflower*) 种子^[19] 微粒体中均有发现。

与高等植物相比, 藻类 TAG 合成代谢的研究相对较少, 但目前已有研究证明, 藻类 TAG 合成途径与高等植物基本相似。微藻细胞中合成 TAG 的许多基因与高等植物同源, 从微藻细胞中获得的一些相关基因和酶的理化性质也与高等植物相似。Moellering 等^[20] 和 Riekhof 等^[21] 研究发现, 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 细胞中脂肪酸合成途径相关的蛋白质序列与高等植物具有同源性。硅藻假小海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 以及红藻门的一些藻类细胞中也有与高等植物脂肪酸合成途径相似的同源酶^[22]。然而, 藻类细胞中 TAG 合成也有其独特之处, 如单细胞藻类能完成从 CO₂ 固定到 TAG 合成的全过程, 而高等植物 TAG 的合成只发生在种子、果实、叶片等特定的组织或器官中^[4]。实际上, 在所有含质体的生物体内, 包括非光合生物顶复虫类疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 和弓形虫 (*Toxoplasma gondii*), 都能在质体中合成脂肪酸, 然后运输到内质网中合成 TAG。

本文以微藻为主要阐述对象, 全面系统地对 TAG 合成的一系列重要途径 (包括脂肪酸的合成以及 TAG 从头合成及其衍生出来的旁路途径) 中涉及到的关键酶 (ACCase、GPAT、DGAT、PDAT、DGTA 等) 以及相关基因进行了综述, 并针对提高微藻油脂积累的基因工程策略进行阐述, 为更好地了解 TAG 合成过程和代谢调控机制, 提高生物体内 TAG 的积累效率和相对含量以及生物柴油的开发和应用提供重要的理论依据。

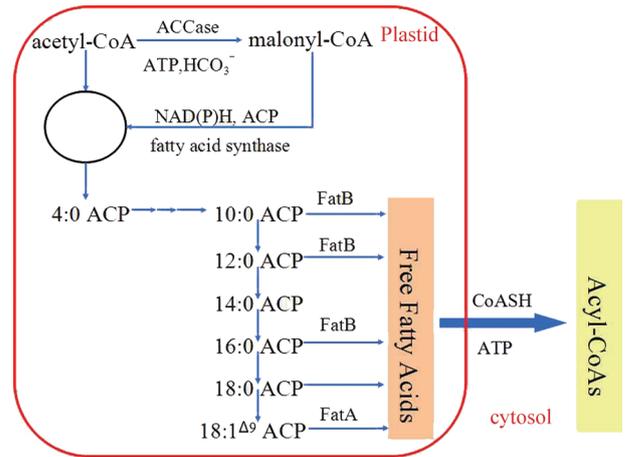
1 脂肪酸的合成

在真核生物中, 脂类物质是细胞内 3 大主要代谢产物之一, 占细胞干重的 10%~90%, 具有重要的生物学作用, 如构成细胞膜的重要组成部分, 作为光合作用中心和光电子运输等功能复合体, 以及

储能物质等^[7]。脂类按极性可分为极性脂(糖脂、磷脂等)和中性脂(TAG、DAG等)。中性脂是油脂的主要组成部分,约占细胞干重的20%~50%,主要以TAG形式存在。生物体内用于合成油脂的脂肪酸主要有5种:软脂酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1^{Δ9})、亚油酸(C18:2^{Δ9,12})和亚麻酸(C18:3^{Δ9,12,15})。在植物和微藻细胞中,脂肪酸的合成反应在质体中进行^[4,23],随后游离的脂肪酸被运输到细胞质中,进入内质网等部位进行TAG的合成。参与脂肪酸合成的酶主要有ACCCase和脂肪酸合成酶(FAS),乙酰CoA和丙二酰CoA是脂肪酸合成和碳链延长的直接前体物质。在质体中,脂肪酸在硬脂酰-酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)去饱和酶的催化下发生第一步去饱和反应,最后在酰基-ACP硫酯酶(Fat A和Fat B)的作用下终止碳链的延长^[24],如图1所示。乙酰CoA在ACCCase催化作用下生成丙二酰CoA,这是脂肪酸合成的一个关键步骤,ACCCase在这一过程中发挥重要作用。随后,脂肪酸合成酶(FAS)以丙二酰CoA为底物进行后续的聚合反应,每次循环增加2个碳链,不断延长的酰基碳链再与酰基载体蛋白ACP结合,由ACP负责转运到脂肪酸合成的相关部位。经过数次循环反应后,在Fat A和Fat B作用下脂肪酸合成终止,最终生成16碳和18碳的游离脂肪酸。16碳的软脂酸通过碳链的延长转变为18碳的硬脂酸,硬脂酸在去饱和酶的作用下,生成单不饱和脂肪酸油酸。油酸通过酯化或降解作用可以转变为相应酰基CoA和乙酰CoA进入到细胞质中,继而进入到内质网中参与甘油酯类物质的合成。油酸也可以进入到细胞质

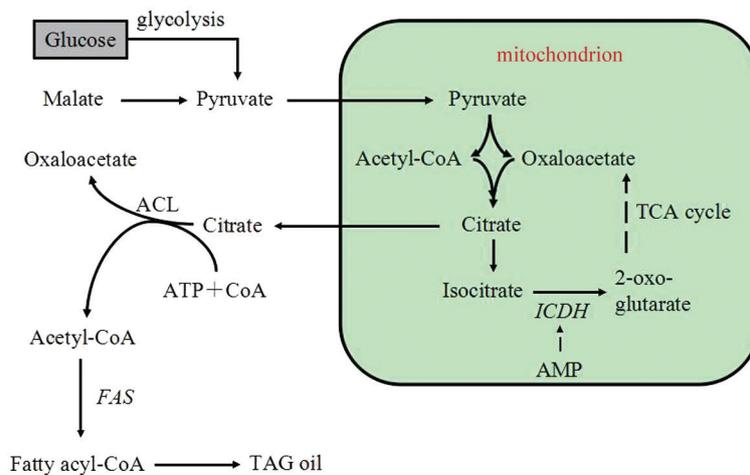
和内质网中,利用乙酰CoA延长碳链合成20碳以上的脂肪酸;但是,脂肪酸从质体到细胞质或内质网的运输方式目前尚不明确,可能与酰基CoA结合蛋白的运输有关。多不饱和脂肪酸的合成是在单不饱和脂肪酸合成上衍生出来的。油酸(C18:1^{Δ9})在脂肪酸脱氢酶的作用下生成亚油酸(C18:2^{Δ9,12}),亚油酸又进一步催化生成亚麻酸(C18:3^{Δ9,12,15})^[25]。

对于大多数动物、酵母以及霉菌等异养生物,脂肪酸的合成在细胞质内进行,如图2所示^[26]。在氮限制条件下,油脂积累过程被激活,AMP脱氢酶活性增加,使AMP转变为IMP和NH₄⁺。在富含油脂的酵母和霉菌中,异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, ICDH)活性完全依赖于AMP浓度的



acetyl-CoA: 乙酰CoA; molonyl-CoA: 丙二酰CoA; ACP: 酰基载体蛋白; ACCCase: 乙酰CoA羧化酶; fatty acid synthase: 脂肪酸合成酶; free fatty acids: 游离脂肪酸; Acyl-CoAs: 酰基CoA。

图1 植物脂肪酸合成的基本过程^[24]



ICDH: 异柠檬酸脱氢酶; ACL, ATP: 柠檬酸裂解酶; FAS: 脂肪酸合酶; TCA循环: 三羧酸循环。

图2 富含油脂的酵母和霉菌中油脂积累的代谢过程^[26]

变化,随着AMP浓度的下降,线粒体中ICDH活性降低或丧失。随着ICDH活性的改变,异柠檬酸不再进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA),而是通过苹果酸/柠檬酸转移酶由线粒体运出到细胞质中。然后,在ATP:柠檬酸裂解酶(ATP:citrate lyase, ACL)的催化下,生成乙酰CoA和草酰乙酸。ACL仅在富含油脂的酵母中发现,是酵母油脂代谢中的关键酶。研究细胞内ACL的代谢调控,通过基因工程手段对油脂酵母进行改良,将有助于提高油脂积累水平。Peksel等^[27]发现,黑曲霉(*Aspergillus niger*)利用葡萄糖在己糖激酶作用下生成柠檬酸。在酵母和真菌糖酵解过程中,柠檬酸会抑制细胞中磷酸果糖激酶(phosphofruccokinase, PFK)活性,而 NH_4^+ 可以消除这种抑制作用^[26]。

异养原生生物的脂肪酸代谢一直备受争议。绝大多数的原生生物,脂肪酸合成产生的16:0和18:0脂肪酸经过一系列的去饱和作用和碳链延长反应生成多不饱和脂肪酸(PUFAs),而海洋破囊壶菌属裂殖壶菌(*Schizochytrium*)除外,它并不需要过去饱和作用或碳链延长反应。这类原生藻菌异养合成PUFAs,如二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, C22:6 ω 3, DHA)。DHA是由聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)途径催化产生的,到目前为止,该途径仅在深海细菌,如希瓦氏菌(*Shewanella*)和海洋被孢霉(*Moritella marina*)中发现^[28]。

在脂肪酸合成途径的第一个反应中,ACCase以生物素为辅基, HCO_3^- 为羧基供体,在ATP、

$\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ 、 Mg^{2+} 以及CoA-SH等辅助因子的作用下,催化乙酰CoA转化为丙二酰CoA,作为脂肪酸合成的中心碳供体。一般来说,ACCase由4个亚基构成:生物素羧化酶(BC)、生物素羧基载体蛋白(BCCP)、 α -羧基转移酶(α -CT)和 β -羧基转移酶(β -CT)^[29],如图3所示。在含质体的生物细胞中,ACCase存在于细胞质和质体中,并有两种不同的存在形式——异质型(heteromeric)和同质型(homomeric)。异质型ACCase存在于原核生物和大多数植物细胞的质体中,其4个亚基分别由4个不同的基因编码,其中 β -CT亚基是由质体中的*accD*基因编码,其余3个亚基均由细胞核内的基因编码,再被运输到质体中;而同质型ACCase存在于动物、植物和酵母等真核生物的细胞质以及禾本科植物的质体中,是一条含4个结构域的长多肽链,由细胞核*acc1*基因编码合成,该基因具有高度的保守性^[30],如图4所示。在动物细胞中,ACCase仅存在于细

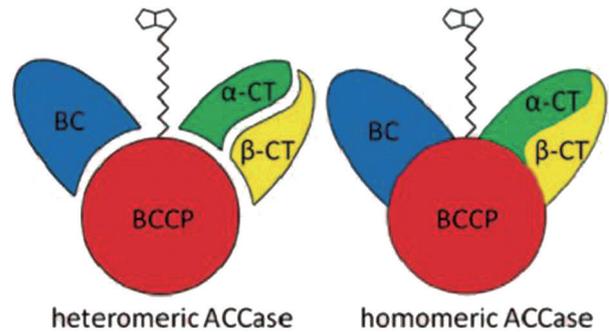


图3 两种不同存在形式的ACCase功能结构域^[29]

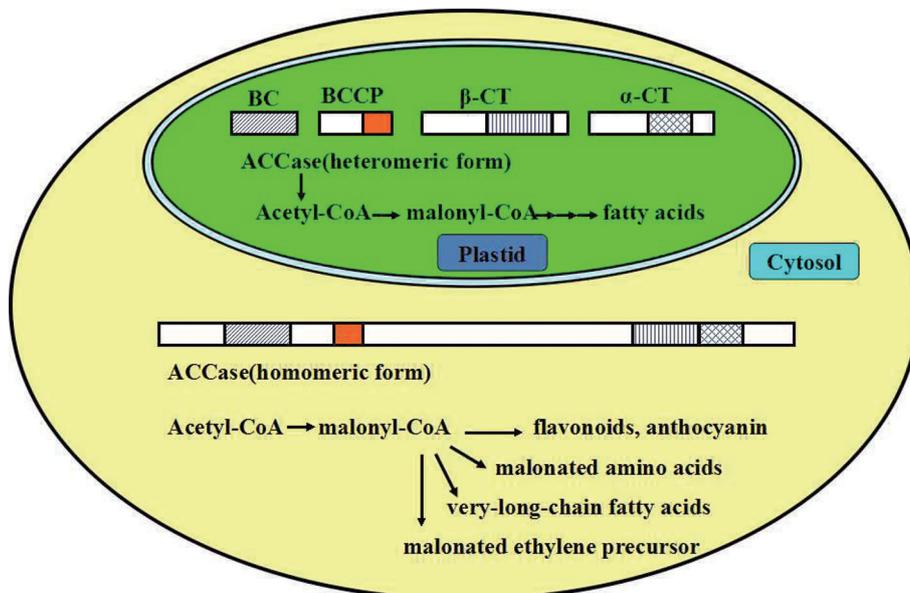


图4 高等植物和藻类细胞中ACCase的区室化分布^[30]

胞质中, 由线粒体提供乙酰 CoA 合成丙二酰 CoA, 作为脂肪酸合成途径的底物以及参与 β -氧化反应。ACCase 在植物细胞的细胞质和质体中均有存在, 质体中异质型 ACCase 催化合成丙二酰 CoA, 进行脂肪酸的从头合成途径。细胞质中同质型 ACCase 合成丙二酰 CoA, 主要作为脂肪酸碳链延长的前体物质。另外, 细胞质中丙二酰 CoA 还可以参与与其他多种反应, 如类黄酮物质和花青素的合成、链脂肪酸 (VLCFA) 的合成、D 型氨基酸以及乙烯前体物 1-氨基环丙烷-1-羧酸的丙二酰化反应^[30]。

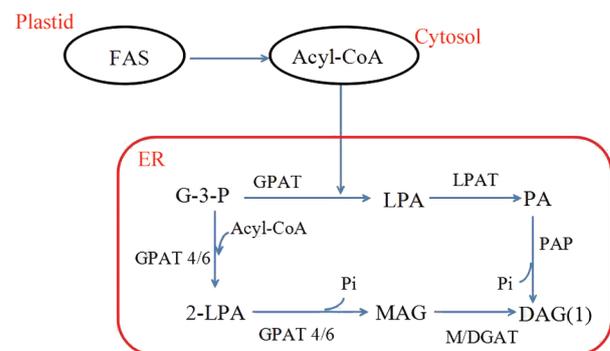
相比植物和动物细胞中 ACCase 的研究, 人们对微藻细胞 ACCase 的相关信息了解得相对较少。之前有很多报道认为, 微藻细胞质体中只有异质型 ACCase 这一存在形式, 但研究表明, 并不是所有微藻细胞都符合这一情况。Livne 和 Sukenik^[31] 以及 Roessler^[32] 在定鞭藻门球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 和硅藻门隐小环藻 (*Cyclotella cryptica*) 细胞的质体中发现同质型 ACCase 存在。而 Huerlimann 和 Heimann^[29] 根据其他物种中 ACCase 相似氨基酸序列, 证明了莱茵衣藻细胞质体中 ACCase 是异质型。最近研究表明, 不同种类的微藻其 ACCase 结构并不相同, 微藻细胞中 ACCase 属于同质型还是异质型取决于细胞中质体的来源。与线粒体相似, 内共生理论也适用于微藻细胞中质体的起源和演化, 因此, 微藻细胞中质体存在有 2 层或 3~4 层膜的现象。结合内共生理论与不同门类的微藻蛋白质组学分析表明, 红藻门 (Rhodophyta) 与绿藻门 (Chlorophyta) 细胞质体具有双层膜结构, 为初级内共生的来源, 质体中 ACCase 为异质型; 绿藻门中的葱绿藻纲 (Prasinophyceae) 除外, 其质体中 ACCase 为同质型。另有一些门类的藻类, 如异鞭藻门 (Heterokontophyta)、定鞭藻门 (Haptophyta)、隐藻门 (Cryptophyta) 以及含顶质体的顶复门 (Apicomplexa) 等细胞中的质体具有 3~4 层膜, 由次级内共生衍生而来, 其质体中 ACCase 为同质型。对绿藻门小球藻细胞内异质型 ACCase 的 β -CT 亚基基因 *accD* 和同质型 ACCase 的基因 *acc1* 研究发现, *accD* 基因表达水平上升, 细胞内总脂含量提高; 而基因 *acc1* 的表达对油脂的积累影响并不大^[33]。

2 DAG的从头合成途径

真核生物 DAG 的合成有多种途径。Kennedy 途径是 TAG 从头合成的主要途径, 该途径从 G-3-P 开始。二羟丙酮磷酸 (DHAP) 和还原态烟酰胺腺

嘌呤二核苷酸 (NADH) 在甘油-3-磷酸脱氢酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 作用下生成 G-3-P 和氧化态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD⁺ 的^[34]。GPDH 是生物体内脂类代谢的一种重要催化酶。通过对莱茵衣藻^[35-36]、杜氏藻 (*Dunaliella*)^[37] 以及嗜糖小球藻 (*Chlorella saccharophila*)^[38] 等微藻细胞内 GPDH 的研究发现, 在一定的渗透压调节下, GPDH 的表达有利于藻细胞内油脂积累。G-3-P 是细胞合成油脂的重要前体物质, 它可以作为 3-磷酸甘油磷酸酶 (glycerol-3-phosphatase, GPP) 的底物生成甘油, 也可以通过酰基化反应合成 DAG^[39], 如图 5 所示。G-3-P 与脂酰 CoA 在甘油-3-磷酸酰基转移酶 (G-3-P acyltransferase, GPAT) 作用下, 在其 sn-1 或是 sn-2 位上进行酰基化, 生成溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA)。LPA 在溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPA acyltransferase, LPAT) 作用下, 利用另一分子脂酰 CoA 进一步生成磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)。最后, PA 在磷脂酸磷酸酶 (PA phosphatase, PAP) 作用下脱去一分子磷酸 (Pi) 生成 DAG, 进一步用于 TAG 的合成。

GPAT 催化 G-3-P 和长链酰基 CoA 发生酯化反应是真核生物中 TAG 合成的第一个限速步骤。对人、小鼠等哺乳动物的研究发现, GPAT 有 4 个亚型: Gpat1、Gpat2、Gpat3 和 Gpat4, 其中 Gpat1 和 Gpat2 位于线粒体外膜上, 两者的活性对巯基试剂, 如 N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 具有耐受性, 而 Gpat3 和 Gpat4 存在于内质网膜上的微粒体中, 其活性受 NEM 的抑制^[40]。GPAT 的 4 个亚型都参与 TAG 合成,



G-3-P: 3-磷酸甘油; LPA: 溶血磷脂酸; PA: 磷酸; DAG: 二酰甘油; MAG: 单酰甘油; GPAT: 3-磷酸甘油酰基转移酶; LPAT: 溶血磷脂酸酰基转移酶; PAP: 磷脂酸磷酸酶; LPAP: 溶血磷脂酸磷酸酶; MGAT: 单酰甘油酰基转移酶; DGAT: 二酰甘油酰基转移酶。

图5 DAG(1)的从头合成途径^[39]

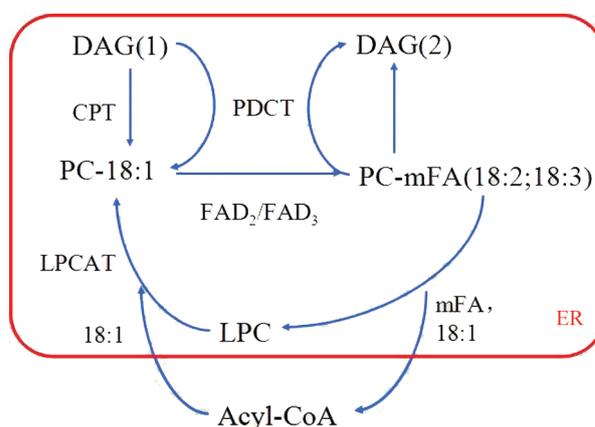
以 G-3-P 作为酰基的受体, 但每个亚型对底物酰基供体的要求不同, 进而对 TAG 的合成调节作用也不同。Gpat1 对底物的选择性很高, 主要是以 16:0-CoA 和 18:0-CoA 等长链饱和酰基 CoA 作为酰基的供体, 在人和鼠的肝脏、脂肪组织等部位高效表达, 对 TAG 合成的调节具有重要作用。Gpat2 对底物的选择性不高, 不要求酰基供体为长链酰基 CoA, 在 TAG 合成过程中具有一定的调节作用。Gpat3 和 Gpat4 对底物的选择范围广, 12~20 碳的酰基 CoA 都可以利用, 在脂肪组织分化时活性升高, 诱导脂肪生成以及 TAG 合成^[40-41]。硅藻假小海链藻 *GPAT* 基因被发现在酵母缺陷株中异源表达, *TpGPAT* 能有效的利用 G-3-P 作为脂酰基的受体, 且对 16:0-CoA 具有优先选择性, 继而影响甘油酯的合成^[42]。

研究证实, 除通过 Kennedy 途径外, 动植物也可以利用单酰甘油 (monoacylglycerol, MAG) 合成 DAG^[39], 如图 5 所示。动物体内 MAG 由胰腺脂肪酶体释放, 进入到肠脏中, 接着单酰甘油酰基转移酶 (MAG acyltransferase, MGAT) 以酰基 CoA 为酰基供体, 以 MAG 为酰基受体合成 DAG。MAG 和 Kennedy 途径最终都在 DGAT 催化作用下合成 TAG。研究认为, MGAT 催化的反应对动物体小肠分解 TAG 产生的 MAG 具有重要的吸收作用^[43]。一直以来, MAG 被认为是动物中油脂合成的重要底物, 很少认为植物也可以利用 MAG 合成 TAG。近年来的研究表明, 植物、酵母等体内存在 MAG^[44-46], 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、向日葵 (sunflower)、大豆 (peanuts) 和烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 等体内可以通过 MAG 合成 TAG, 但是 MGAT 催化的酰基化位点不同, 如向日葵是以 sn2-MAG 作为酰基的受体, 而大豆是以 sn1-MAG 作为酰基受体^[47]。在拟南芥中, 溶血磷脂酸磷酸酶 (LPA phosphatase, LPAP) 可以将 LPA 转变为 MAG, 然后在 M/DGAT 的作用下, sn2-MAG 发生酰基化生成 DAG^[45]。除动物和植物外, 嗜糖小球藻 (*C. saccharophila*)、三角褐指藻 (*P. tricornutum*)、菱形藻 (*Nitzschia* sp.) 等一些微藻也具有 MAG 成分^[48-49]。Liu 等^[48] 对产油微藻若夫小球藻 (*C. zofingiensis*) 油脂成分的分析发现, 该藻在异养培养条件下细胞中会产生少量的 MAG。然而, 微藻细胞中尚未见有 MGAT 途径的研究报道。

3 DAG的其他合成途径

生物体内的脂肪酸可以经过酰基化等修饰用于

膜脂中磷脂酰胆碱 (Phosphatidylcholine-modified FA, PC-mFA) 的合成, 最终参与到 DAG/TAG 的合成途径中, 如图 6 所示。从头合成途径合成的 DAG(1) 在 CDP-胆碱:二酰甘油磷酸胆碱转移酶 (CDP-choline:DAG cholinephosphotransferase, CPT) 或磷脂酰胆碱:二酰甘油磷酸胆碱转移酶 (PC:DAG cholinephosphotransferase, PDCT) 的作用下生成 PC-18:1^[50-52]。PC-18:1 又可以作为底物, 在 FAD₂ 和 FAD₃ 两种脱氢酶的作用下去饱和, 分别生成 PC-18:2 和 PC-18:3。这些被修饰的 PC(PC-mFA) 可以在 PDCT 催化作用下脱去 CDP-胆碱, 形成 DAG(2), 也可以释放出 sn-2 位上的不饱和脂肪酸进入到酰基循环利用 (acyl editing cycle) 过程; 释放出来的脂肪酸还可以在 PDAT 催化下与 DAG(2) 合成 TAG^[53-54]。酰基循环利用过程是一个脱酰-再酰化的过程。首先, PC 释放出一分子酰基, 在酰基 CoA:溶血磷脂酸胆碱酰基转移酶 (acyl-CoA:lyso-phosphatidyl-choline acyltransferase, LPCAT) 反作用催化下, 产生溶血磷脂酸胆碱 (lyso-phosphatidylcholine, LPC), 它是脂肪酸从质体中释放出来进入到酰基循环利用过程的主要受体; 随后, LPC 在 LPCAT 的作用下再酰化, 形成 PC, 完成酰基的循环利用过程; 但并不是所有进入酰基循环过程的脂肪酸都参与合成 PC-mFA, 它也可以进入从头合成途径合成 TAG。芫荽 (coriander) 18:1^{A6} 脂肪酸从质体中释放出来后, 优先于 DAG 的从头合成途径而合成 PC-mFA^[55]。



DAG: 二酰甘油; PC: 磷脂酰胆碱; FA: 脂肪酸; LPC: 溶血磷脂酰胆碱; CPT: CDP-胆碱:二酰甘油磷酸胆碱转移酶; PDCT: 磷脂酰胆碱:二酰甘油磷酸胆碱转移酶; FAD₂/FAD₃: 脂肪酸脱氢酶; LPCAT: 酰基CoA:溶血磷脂酸胆碱酰基转移酶。

图6 酰基循环利用过程及PC衍生的DAG(2)合成过程^[51]

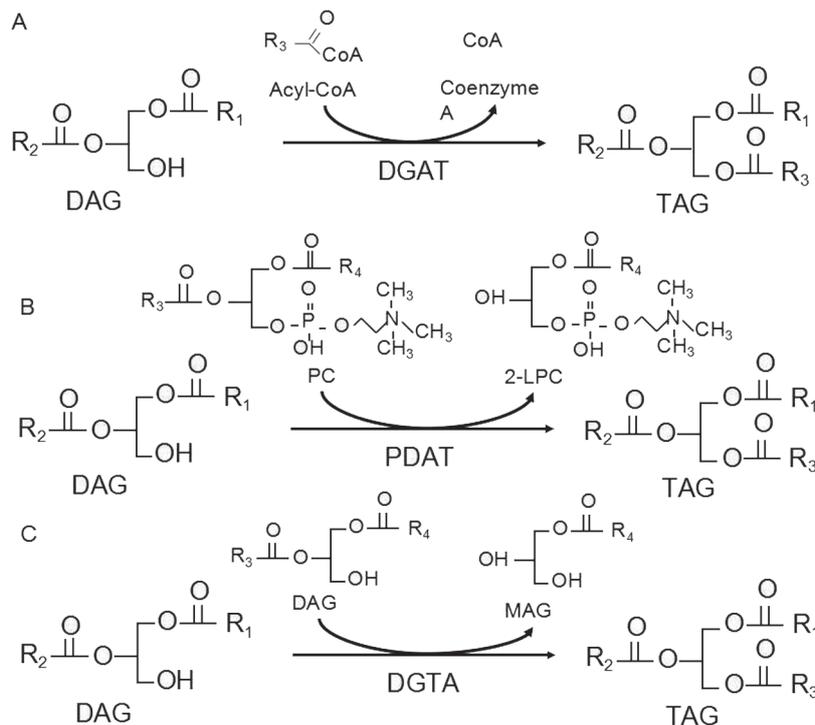
4 从DAG到TAG的合成途径

真核生物 TAG 的合成主要有两种途径, 涉及 3 种关键酶: 第一种途径是依赖于酰基 CoA 的从头合成途径, DGAT 是该途径的限速酶; 第二种是不依赖于酰基 CoA 的合成途径, 其限速酶包括 PDAT 和 DGTA, 如图 7 所示。

DGAT 催化途径是 TAG 从头合成的主要途径, 几乎在所有研究过的真核生物中均有存在。DGAT 主要有两种非同源性的同工酶: DGAT1 和 DGAT2。它们催化相同的反应, 但本身的分子结构和氨基酸序列不同^[56]。在少数的几种植物中有 DGAT3 亚型的报道^[57], 但它在 TAG 合成中的作用尚不清楚。不同生物体内 DGAT1 和 DGAT2 的结构和作用不同。动物中 DGAT2 比 DGAT1 具有更高的酶活性与底物亲和力, 更有利于 TAG 的积累^[58]。小鼠的 *dgat1* 和 *dgat2* 基因敲除实验发现, 这两个亚型发挥的功能并不相同, *dgat1* 缺失的小鼠表现为肥胖, 而 *dgat2* 缺失的小鼠在出生几个小时后便死亡^[59]。高等植物中 DGAT1 与 DGAT2 在 TAG 合成中发挥的功能也各有不同, 如橄榄 (Olive) 中 DGAT1 在 TAG 的积累中发挥着更突出的作用, 而油桐 (Tung

tree) 和蓖麻 (Castor) 种子中 DGAT2 的作用更大。DGAT1 趋向于催化 16:0 和 18:1 脂肪酸与 sn3-DAG 合成 TAG, 而 DGAT2 更趋向于利用含氧和羟基的特殊脂肪酸合成 TAG^[60]。DGAT1 结构也比 DGAT2 复杂, 通过生物信息学软件分析得知, DGAT1 有 6~9 个跨膜结构域, 而 DGAT2 一般只有 1~2 个跨膜结构域^[22]。大多数高等植物、真菌和动物中只编码单个 *DGAT2* 基因, 而藻类有多种 *DGAT2* 基因亚型, 但单细胞红藻梅罗那蓝裂藻 (*Cyanidioschyzon merolae*) 除外。酵母中 DGAT2 的保守序列 “YFP” 是 DGAT2 活性的必需基团^[61], 它在动物和高等植物中高度保守, 而即使同一种藻的不同 DGAT2 其保守程度有很大差异。同时, DGAT2 另一个增强活性的保守序列 “PH” 在藻类中也存在差异^[22], 小鼠 DGAT2 中的 “HPH” 突变为 “AGA” 将导致其催化活性降低 80%^[62]。对 DGAT 酶进行失活处理后发现, 生物体内仍然能合成 TAG, 这表明除了 DGAT 途径外, 生物体内还存在其他途径, 即 PDAT 途径和 DGTA 途径。

PDAT 以磷脂为酰基的供体, 以 DAG 为酰基的受体, 将磷脂上的脂酰基转移给 sn-1,2-DAG, 促进 TAG 合成。PDAT 是一种不依赖于酰基 CoA 的



DAG: 二酰甘油; DGAT: 二酰甘油酰基转移酶; Acyl-CoA: 乙酰CoA; PC: 磷脂酰胆碱; PDAT: 磷脂:二酰甘油酰基转移酶; 2-LPC: sn2-溶血磷脂酰胆碱; MAG: 单酰甘油; DGTA: 二酰甘油转酰酶; TAG: 三酰甘油。

图7 由DAG合成TAG的主要合成途径^[22]

多功能酶, 并与真核生物中膜脂成分的变化密切相关。在植物中, 随着 TAG 的积累, 该酶与膜脂的流动性和降解有关^[7]。在酵母中, PDAT 基因序列与编码哺乳动物卵磷脂-胆固醇 O-酰基转移酶 (phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase, LCAT) 同源, 且酵母细胞内 TAG 合成主要是通过 PDAT 途径, DGAT 的作用很小^[63]。除酵母外, 在向日葵、蓖麻子等油料作物的微粒体中也克隆到了 PDAT 基因^[15]。对莱茵衣藻 PDAT 蛋白的氨基酸序列的分析表明, 该蛋白属于膜结合的 O-酰基转移酶 (MBOAT) 家族。PDAT 是一种膜内在蛋白, 存在一小段的跨膜结构域。酵母和维管植物的 PDAT 存在于内质网中。还有一些植物的 PDAT 定位于叶绿体, 在内质网中并未检测到相关的信号肽。体外 PDAT 酶活性研究表明, PDAT 具有底物专一性, 并且它对 1,2-DAG 的作用比 1,3-DAG 的作用更突出^[7]。

DGTA 可利用两个 DAG 分子分别作为酰基的受体和供体来催化 TAG 合成; 反之, 它也能催化 TAG, 使之脱下一个酰基分子给 MAG, 生成两分子的 DAG^[63]。动物体内 DGTA 对于 TAG 的重新合成起着重要的作用。Lehner 和 Kuksis^[18] 以及 Lung 和 Weselake^[63] 从小鼠小肠微粒体内纯化出 DGTA 酶, 并发现该酶只能利用 sn-1,2-DAG 和 sn-2,3-DAG, 不能利用 sn-1,3-DAG 或其他中性酯。此外, 在向日葵和产油酵母也发现了有类似功能活性的酶。对向日葵种子发育阶段 TAG 形成过程的研究发现, DGTA 途径对 TAG 合成具有重要作用。但是, 目前尚未在任何生物中证实有编码该酶的基因。

5 提高微藻油脂积累水平的基因工程策略

与动植物相比, 微藻油脂产率较高, 是未来生物柴油生产的重要原料之一。近年来, 研究者们主要通过基因敲除和超表达等手段来调节细胞内脂肪酸合成途径和 Kennedy 途径中相关酶的表达, 从而提高动植物、微藻等生物中油脂含量。在脂肪酸合成途径中, ACCase 和 FAS 起着至关重要的作用。研究者们试图通过超表达 ACCase 和 FAS 来提高细胞内油脂含量。Dunahay 等^[64] 对硅藻隐小环藻和腐生舟形藻 (*Navicula saprophila*) 细胞 ACCase 基因进行超表达发现, 细胞内 ACCase 酶活性提高了 2~3 倍, 但油脂含量并没有明显提高。Dunahay 等^[65] 分析原因, 认为可能是受到反馈抑制的调节作用, 虽然 ACCase 酶活性增强了, 但是被细胞内的其他

代谢途径所抵消, 导致 TAG 含量没有明显提高。Verwoert 等^[66] 将油菜籽 FAS 基因的 KAS III 亚基在大肠杆菌中超表达, 结果发现细胞中脂肪酸成分发生变化, 短链脂肪酸 (14:0) 含量增加而 18:1 脂肪酸含量降低, 但是细胞中油脂含量没有提高并严重影响了细胞的生长。这可能是因为 FAS 是一个包含多个亚基的复合酶, 且藻类细胞的基因工程技术不如植物中的成熟, 这给藻类基因的超表达增加了难度^[67]。目前尚未见微藻细胞内超表达 FAS 基因的报道。

虽然脂肪酸合成途径中超表达实验未获得理想的结果, 但高等植物 TAG 合成途径中转基因实验取得了较好的成果。过去为了提高生物体内油脂的合成, 注意力往往集中在脂肪酸的合成与利用上, 而忽略了 3-磷酸甘油的供给在甘油三酯合成过程中所扮演的重要角色。3-磷酸甘油作为重要的前体物质, 其含量的多少直接关系到最终目标产物含量的多少, 因此, 将油脂代谢的前体合成有关基因进行过量表达, 逐渐被认为是一条提高细胞含油总量的有效方法^[68]。Vigeolas 等^[69] 在油菜种子中超表达酵母 GPDH 基因, 使得细胞中油脂含量增加了 40%。Jain 等^[70] 在拟南芥中分别超表达红花和大肠杆菌的 GPAT 基因, 发现油脂含量均有明显的提高。目前已有一些微藻, 如莱茵衣藻^[71] 和硅藻假小海链藻^[42] 中 GPAT 基因相继被报道。Zou 等^[72] 将酵母 GPAT 基因在拟南芥和油菜中超表达, 油脂含量提高 8%~48%。高效表达 DGAT 也会是磷脂酸进入油脂合成途径。Jako 等^[73] 首次在野生型拟南芥中过表达特异性 DGAT 基因, 结果显示 DGAT 酶活性提高了 10%~70%。莱茵衣藻、假小海链藻和海洋真核微藻金牛驼球藻 (*Ostreococcus tauri*) 的基因组中均存在 DGAT 基因。假小海链藻的 DGAT2 基因在酿酒酵母 H1246 突变株中表达后, 具有酰基转移酶的活性^[74]。氮饥饿培养下, 莱茵衣藻的 3 个酰基转移酶 DGAT、PDAT 和 DGTA 的基因的 mRNA 量增加, 同时 TAG 的积累量也显著增加^[75]。目前, 还没有文献报道这些酶的超表达是否会提高微藻油脂的积累, 但鉴于这些酶在植物 (油菜、拟南芥、大豆、玉米等) 中能提高油脂含量, 将其应用到微藻油脂含量提高中, 很可能是一个突破口。

此外, 通过基因工程的手段降低脂类的分解代谢以及抑制脂类流向蛋白质和碳水化合物, 如淀粉、多糖等的合成, 也是提高油脂产率的策略之一。脂

类的分解代谢主要是脂肪酸的 β -氧化过程, 酰基 CoA 氧化酶、酰基 CoA 合成酶、肉碱酰基转移酶 I、脂酰基 CoA 脱氢酶等是该过程的关键酶。通过基因敲除方法敲除该过程中的关键基因可以增加细胞内脂类含量。Roessler^[76] 研究表明, 抑制硅藻隐小环藻中金藻昆布糖合成酶活性, 流向脂类合成的碳增加。Li 等^[77-78] 研究指出, 莱茵衣藻中 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase) 活性丧失, 细胞内淀粉合成受阻, 脂类含量增加 10 倍。对藻细胞内的 TAG 代谢途径和关键基因进行解析, 有利于探索油脂的代谢机理, 为从根本上提高油脂产量提供基础。

6 小结

开发非食用油脂 (如微藻油脂), 用于生物柴油的制备是近年来的研究热点。微藻具有繁殖速度快、生产周期短以及不受场地、气候变化影响等优点。研究表明, 在适当条件下, 微藻细胞内可积累大量油脂。但微藻生物燃料的商业利用还存在许多挑战。在对其脂类代谢, 特别是 TAG 的生物合成和代谢调控有了清楚的认识后, 我们就可以通过生化调控或基因工程策略提高微藻细胞内油脂的含量和产量, 从而使微藻生物燃料的工业化成为可能。微藻的基因工程改造是调控微藻代谢最为有效的手段, 主要在莱茵衣藻中取得了一些与 TAG 积累相关的研究进展。随着微藻基因工程技术的发展, 已经建立了几种有效的微藻遗传转化技术, 如粒子轰击法、玻璃珠法、电穿孔法和农杆菌介导转化法等, 以及选择标记技术^[68,79]。通过转录因子调节基因的表达来调节微藻脂肪代谢是最近提出的一个新策略。随着现代基因工程操作手段的进步, 以及系统生物学、合成生物学和生物信息学等方法的引进, 使得微藻基因工程改造前景广阔^[79]。本文以微藻为主要阐述对象, 全面介绍了 TAG 的生物合成途径、相关关键酶, 以及基因工程改造策略, 为微藻油脂代谢的机理研究及微藻生物燃料的开发提供了理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Outlook AE. Energy Information Administration. United States, 2010
 [2] Outlook AE. Energy Information Administration. United States, 2013
 [3] Taberero A, Martín del Valle EM, Galán MA. Evaluating

the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: scale-up and economics. *Biochem Eng J*, 2012, 63: 104-15
 [4] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*, 2008, 54(4): 621-39
 [5] 朱顺妮, 王忠铭, 尚常花, 等. 微藻脂肪合成与代谢调控. *化学进展*, 2011, 23(10): 2169-76
 [6] Sorger D, Daum G. Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(4): 289-99
 [7] Yoon K, Han D, Li Y, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3708-24
 [8] Cases S, Smith SJ, Zheng YW, et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(22): 13018-23
 [9] Cases S, Stone SJ, Zhou P, et al. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38870-6
 [10] Katavic V, Reed DW, Taylor DC, et al. Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol*, 1995, 108(1): 399-409
 [11] Shockey JM, Gidda SK, Chaptal DC, et al. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, 2006, 18(9): 2294-313
 [12] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific overexpression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 861-74
 [13] Lardizabal KD, Mai JT, Wagner NW, et al. DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38862-9
 [14] Sorger D, Daum G. Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A: diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 2002, 184(2): 519-24
 [15] Dahlqvist A, Ståhl U, Lenman M, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6487-92
 [16] Zhang H, Damude HG, Yadav NS. Three diacylglycerol acyltransferases contribute to oil biosynthesis and normal growth in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2012, 29(1): 25-38
 [17] Ståhl U, Carlsson AS, Lenman M, et al. Cloning and

- functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1324-35
- [18] Lehner R, Kuksis A. Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J Biol Chem*, 1993, 268(12): 8781-6
- [19] Stobart K, Mancha M, Lenman M, et al. Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta*, 1997, 203(1): 58-66
- [20] Moellering ER, Miller R, Benning C. Molecular genetics of lipid metabolism in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: [M]// Wada H, Murata M (eds). *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions*. Dordrecht: Springer, 2009: 139-55
- [21] Riekhof WR, Sears BB, Benning C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(2): 242-52
- [22] Chen JE, Smith AG. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. *J Biotechnol*, 2012, 162(1): 28-39
- [23] Ohlrogge JB, Kuhn DN, Stumpf PK. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1194-8
- [24] Thelen JJ, Ohlrogge JB. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metab Eng*, 2002, 4(1): 12-21
- [25] Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry & molecular biology of plants*[M]. Rockville: Am Soc Plant Physiol, 2000: 1408
- [26] Wynn JP, Ratledge C. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, 51: 1-51
- [27] Peksel A, Torres NV, Liu J, et al. 13C-NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(2):157-63
- [28] Desvilettes C, Bec A. Formation and transfer of fatty acids in aquatic microbial food webs: role of heterotrophic protists [M]// Kainz M, Brett MT, Arts MT. *Lipids in aquatic ecosystems*. New York: Springer, 2009: 25-42
- [29] Huerlimann R, Heimann K. *Comprehensive guide to acetyl-coxylases in algae*. *Crit Rev Biotechnol*, 2013, 33(1): 49-65
- [30] Sasaki Y, Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plan breeding. *Biosci Biotech Biochem*, 2004, 68(6): 1175-84
- [31] Livne A, Sukenik A. Acetyl-coenzyme-A carboxylase from the marine prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31(6): 851-8
- [32] Roessler PG. Purification and characterization of acetyl-coA carboxylase from the diatom *Cyclotella cryptica*. *Plant Physiol*, 1990, 92(1): 73-8
- [33] Wan M, Liu P, Xia J, et al. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(3): 835-44
- [34] Herrera-Valencia VA, Macario-González LA, Casais-Molina ML, et al. *In silico* cloning and characterization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Microbiol*, 2012, 64(5): 477-85
- [35] Husic HD, Tolbert NE. Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* accumulation of glycerol as an osmoregulatory solute. *Plant Physiol*, 1986, 82(2): 594-6
- [36] Siaut M, Cuiñé S, Cagnon C, et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 7
- [37] Takagi M, Yoshida T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(3): 223-6
- [38] Herrera-Valencia VA, Contreras-Pool PY, López-Adrián SJ, et al. The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Curr Microbiol*, 2011, 63(2): 151-7
- [39] Petrie JR, Vanhercke T, Shrestha P, et al. Recruiting a new substrate for triacylglycerol synthesis in plants: the monoacylglycerol acyltransferase pathway. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35214
- [40] Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(6): 501-6
- [41] Cao J, Li JL, Li D, et al. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in *de novo* triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(52): 19695-700
- [42] Xu J, Zheng Z, Zou J. A membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Thalassiosira pseudonana* regulates acyl composition of glycerolipids. *Botany*, 2009, 87(6): 544-51
- [43] Shi Y, Cheng D. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am J Physiol: Endocrinol Metab*, 2009, 297(1): E10-8
- [44] Yang W, Pollard M, Li-Beisson Y, et al. A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 12040-5
- [45] Reddy VS, Rao DK, Rajasekharan R. Functional characterization of lysophosphatidic acid phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(4): 455-61
- [46] Reddy VS, Singh AK, Rajasekharan R. The *Saccharomyces cerevisiae* PHM8 gene encodes a soluble magnesium-dependent lysophosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem*, 2008, 283(14): 8846-54

- [47] Tumaney AW, Shekar S, Rajasekharan R. Identification, purification, and characterization of monoacylglycerol acyltransferase from developing peanut cotyledons. *J Biol Chem*, 2001, 276(14): 10847-52
- [48] Liu J, Huang J, Sun Z, et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresour Technol*, 2011, 102(1): 106-10
- [49] Jones J, Manning S, Montoya M, et al. Extraction of algal lipids and their analysis by HPLC and mass spectrometry. *J Am Oil Chem Soc*, 2012, 89(8): 1371-81
- [50] Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, et al. Acyl-lipid metabolism [M]// *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2010
- [51] Lu C, Xin Z, Ren Z, et al. An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *ROD1* gene of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18837-42
- [52] McConn M, James D, Miquel M. Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of α -linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *J Biol Chem*, 1993, 268(22): 16345-51
- [53] Bates PD. The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Frontiers Plant Sci*, 2012, 3: 147
- [54] Bates PD, Fatihi A, Snapp AR, et al. Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiol*, 2012, 160(3): 1530-9
- [55] Cahoon EB, Ohlrogge JB. Apparent role of phosphatidylcholine in the metabolism of petroselinic acid in developing *Umbelliferae* endosperm. *Plant Physiol*, 1994, 104(3): 845-5
- [56] Cao H. Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms. *BMC Res Notes*, 2011, 4(1): 249
- [57] Rani SH, Krishna TH, Saha S, et al. Defective in cuticular ridges (DCR) of *Arabidopsis thaliana*, a gene associated with surface cutin formation, encodes a soluble diacylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem*, 2010, 285(49): 38337-47
- [58] Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, et al. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res*, 2008, 49(11): 2283-301
- [59] Smith SJ, Cases S, Jensen DR, et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 87-90
- [60] Li R, Yu K, Hildebrand DF. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids*, 2010, 45(2): 145-57
- [61] Liu Q, Siloto RM, Snyder CL, et al. Functional and topological analysis of yeast acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2, an endoplasmic reticulum enzyme essential for triacylglycerol biosynthesis. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13115-26
- [62] Stone SJ, Levin MC, Farese RV. Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-2. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 40273-82
- [63] Lung SC, Weselake RJ. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids*, 2006, 41(12): 1073-88
- [64] Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler PG. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophil*. *J Phycol*, 1995, 31(6): 1004-12
- [65] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, et al. A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 1998
- [66] Verwoert II, Van Der Linden KH, Walsh MC, et al. Modification of *Brassia napus* seed oil by expression of the *Escherichia coli* fabH gene, encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(5): 875-86
- [67] Courchesne NM, Parisien A, Wang B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *J Biotechnol*, 2009, 141(1): 31-41
- [68] 冯国栋, 程丽华, 徐新华, 等. 微藻高油脂化基因工程研究策略. *化学进展*, 2012, 24 (07): 1413-26
- [69] Vigeolas H, Waldeck P, Zank T, et al. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(3): 431-41
- [70] Jain RK, Coffey M, Lai K, et al. Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28(6): 958-61
- [71] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Unraveling algal lipid metabolism: recent advances in gene identification. *Biochimie*, 2011, 93(1): 91-100
- [72] Zou J, Wei Y, Jako C, et al. The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J*, 1999, 19(6): 645-53
- [73] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 861-74
- [74] Wagner M, Hoppe K, Czabany T, et al. Identification and characterization of an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(6): 407-16
- [75] Boyle NR, Page MD, Liu B, et al. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15811-25
- [76] Roessler PG. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 267(2): 521-8

- [77] Li Y, Han D, Hu G, et al. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 387-91
- [78] Li Y, Han D, Hu G, et al. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(2): 258-68
- [79] 于水燕, 赵权宇, 史吉平. 固碳产油微藻的基因工程改造. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(12): 117-24