

综述 ·

新型可再生工业用油脂的代谢工程

岳爱琴, 李润植*

(山西农业大学生物工程研究中心, 太谷 030801)

摘要 植物种子油是一种可再生资源, 亦用作生物燃油和化学工业原料。一些野生植物能高水平合成积累羟化、环氧化和共轭脂肪酸等具有重要工业应用价值的特异脂肪酸。催化这些特异脂肪酸合成的酶主要是类脂肪酸去饱和酶 2 (类 FAD2)。由特异脂肪酸合成到三酰基甘油酯 (TAG) 形成还需要酰基转移酶 (如 DGAT) 的参与。在油料作物种子中表达类 FAD2 酶及其相关基因 (如 DGAT), 已培育出了能合成积累一定含量特异脂肪酸的工程油料品系, 为基于农作物生产高附加值工业用油脂开辟了新途径。本文论述了参与特异脂肪酸生物合成途径的关键酶基因、油料作物代谢工程策略, 以及应用工程油料作物大规模生产重要工业用脂肪酸的研究进展、存在问题和应用前景等。

关键词 油料作物; 代谢工程; 工业用油脂; 再生资源

中图分类号 TQ645.8

Metabolic Engineering to Produce Novel Renewable Industrial Fatty Acids in Oilseeds

YUE Ai-Qin, LI Run-Zhi*

(Center for Agricultural Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China)

Abstract Plant oilseeds represent renewable sources, and also serve as both biofuel and chemical feedstock. A number of non-agronomic plant species synthesize and accumulate high levels of unusual fatty acids including hydroxy, epoxy and conjugated fatty acids in their seeds, which are extremely valuable for industrial applications. The fatty acid desaturase 2 (FAD2)-like enzymes are the major enzymes that catalyze the synthesis of many industrial-value fatty acids in plant seeds. Acyltransferases such as DGAT1 and DGAT2 are a group of key enzymes responsible for the channel of unusual fatty acids into storage in triacylglycerols (TAG). Metabolic engineering by seed-specific coexpressing FAD2-like enzyme and other related genes (e. g. DGATs) has developed the novel engineered oilseed lines that are capable of synthesizing a moderate amount of the target fatty acids in their seeds, opening up a new way for the crop-based production of high-value industrial lipids. Here, we provide an overview of unusual fatty acids biosynthesis pathway and the associated key enzymes, describe the strategies for metabolic engineering of unusual fatty acids in oilseeds, and highlight the recent advances in this field. We also discussed the future perspectives in the commercial production of industrial-value fatty acids by transgenic oil crops along with some of the technical hurdles encountered so far.

Key words oilseed; metabolic engineering; industrial fatty acids; renewable source

植物种子油是人类营养所需脂肪酸的重要来源, 一些植源性脂肪酸还具有保健功效和医药价值。除主要用于人类饮食外, 植物种子油亦是重要的化工原料, 经过一系列加工可生产多种工业用油脂品。作为一种可再生资源, 植物油脂工业用价值 (如用于生物燃油等) 日益显著。特别是在石油等非再生资源日渐短缺的情况下, 研发基于植物油脂的产品倍受关注。

收稿日期: 2008-11-27; 接受日期: 2009-03-10

国家教育部科技重点项目 (No. 2002.03) 和山西省青年科技研究基金项目 (No. 2007021036, No. 20051039) 资助

*联系人 Tel: 0354-6288374; E-mail: rli2001@hotmail.com

Received: November 27, 2008; Accepted: March 10, 2009

Supported by the Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 2002.03) and the Young Scientist Research Fund of Shanxi Province (No. 2007021036, No. 20051039)

* Corresponding author Tel: 0354-6288374;

E-mail: rli2001@hotmail.com

植物能合成 200 多种不同的脂肪酸^[1]。人类主要食用的是棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)等 5 种脂肪酸。这些脂肪酸主要源于大豆、油菜、向日葵和油棕等大田油料作物。一些野生植物种子能合成并高水平积累在工业上有更重要应用价值的稀有脂肪酸,如羟化脂肪酸、环氧脂肪酸和共轭脂肪酸等。目前,工业上所用的这些脂肪酸主要来自石化产品。能合成这些珍稀脂肪酸的野生植物由于其农艺性状差,迄今还不能像普通油料作物一样,大规模种植和商业化生产种子油。植物油脂代谢工程为生产具有独特工业应用价值的植物油脂开辟了一条新途径。通过对大田油料作物种子中脂肪酸合成途径的基因修饰,培育不仅能合成而且能高含量积累稀有脂肪酸的工程油料作物新品系,可望实现这些重要工业用脂肪酸的商业化生产,继而替代石化产品。

近年来,随着对植物脂肪酸合成代谢途径的深入研究,相继鉴定和克隆了参与脂肪酸生物合成积累及其调控的一些重要基因,对普通油料作物种子中脂肪酸成分的遗传修饰进行了许多有益尝试,并已取得一些可喜的成果^[2~4]。结合我们所开展的植物油脂代谢工程和大豆油脂遗传改良的研究^[5~7],本文重点论述参与稀有脂肪酸合成及其调控的一些关键酶基因,应用代谢工程对油料作物进行遗传改良,使其种子能大量合成积累新型工业用油脂的技术策略、研究进展、存在问题以及发展前景。

1 特异脂肪酸的生物合成途径及相关酶基因

植物脂肪酸的生物合成涉及到不同细胞器和诸多酶促生化反应(图 1A)。首先在质体中,脂肪酸合成酶系(fatty acid synthase, FAS)催化生成碳链长度不等(6~18)的饱和脂肪酸以及含有 1 个双键的单不饱和脂肪酸。接着,脂肪酸从质体中转出,进入细胞质转移到内质网(endoplasmic reticulum, ER)上,与磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)分子结合进行各种修饰反应。例如,可经脂肪酸去饱和酶 2 和 3(fatty acid desaturase, FAD2 和 FAD3)的催化,碳链中生成新的双键(如 18:2, 18:3),也可在延伸酶的作用下使碳链加长(如 22:0)。最后,在一系列酰基转移酶催化下,脂肪酸整合到 3-磷酸甘油(3PG)分子上,形成三酰基甘油酯(triacylglycerol, TAG)。TAG 在脂质双层结构中积累形成“脂质凸起”,进而形成油

体从膜中分离出来,贮藏于细胞质中。

在一些野生植物细胞中,脂肪酸在 ER 上经羟化酶、环氧化酶和共轭化酶等的催化,分别发生羟化、环氧化和共轭化等反应,合成具有特殊功能的脂肪酸。这些特异脂肪酸再经过一系列酶促反应,最后也整入 TAG 分子,积累于油体中。近年来研究表明,催化这些特异脂肪酸合成的酶多为类-FAD2(FAD2-like)(图 1B)。典型的 FAD2,即 12-油酸去饱和酶(12-oleic acid desaturase)催化油酸分子(18:1)在 12 位置产生 1 个双键,从而形成亚油酸(18:2)。然而,从一些野生植物鉴定分离的类-FAD2 酶,作用底物仍然是油酸(18:1),但在 12 位置催化生成的不是 1 个双键,而是 1 个羟基、环氧基或共轭键等功能基团^[8]。例如,蓖麻种子油含有高达 90% 的蓖麻油酸(ricinoleic acid),这种脂肪酸就是由一种类-FAD2 酶即羟化酶作用,在油酸分子 12 位置产生 1 个羟基所形成的^[9]。

迄今,已鉴定和克隆到一些催化特异脂肪酸合成的类-FAD2 酶基因。将这些基因在油料作物种子中表达,转基因种子能合成积累目标脂肪酸。但这些特异脂肪酸含量低,远低于在这些基因来源的野生植物种子中的含量。例如,源于蓖麻种子的羟化酶(hydroxylase 12, FAH12)基因,在烟草中表达导致蓖麻油酸的合成,但含量极低^[10]。种子特异表达 FAH12 的转基因拟南芥(*Arabidopsis*)种子积累蓖麻油酸最高也仅有 17%^[11]。一些研究认为,含有羟基和环氧基等功能基团的稀有脂肪酸在细胞中合成后,如不能整入 TAG 分子贮存于油体,就会严重损伤细胞膜。脂肪酸-氧化途径是生物体内一种分解脂肪酸的调控机制^[12]。研究发现,表达类-FAD2 酶基因的油料作物种子中,脂肪酸-氧化分解代谢异常活跃,新合成的特异脂肪酸常被降解^[12]。

新近一些研究暗示,能合成积累特异脂肪酸的野生植物经长期演化,其细胞已进化出相应的机制,能迅速有效地将在内质网上合成的这些特异脂肪酸转移整合到 TAG 分子而积累于油体中。在野生植物种子中,这些特异脂肪酸是如何有效地整入 TAG 分子并高水平积累的详尽机制,目前还不清楚。对参与 TAG 形成的酶分子及其基因的研究为之提供了有益的信息。

TAG 合成的经典途径是 Kennedy 途径(图 1C)。各种不同长度碳链和不同数目双键以及含有其它基团的脂肪酸与 CoA 结合生成脂肪酰基-CoA。在内质网上,这些脂肪酰基-CoA 在 3-磷酸甘油酰基转移酶

(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) 和溶血性磷脂酸酰基酶 (lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAT) 依次作用下, 脂肪酸碳链从各种脂肪酰基-CoA 分子上转移到 3-磷酸甘油 (3PG) 的 *sn*-1 和 *sn*-2 位置上, 从而生成磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)。然后, PA 分子上 *sn*-3 位的磷酸基被磷脂酸磷酸酶 (phosphatidic acid phosphatase, PAP) 切除后就形成二酰甘油酯 (diacylglycerol, DAG)。最后, 在二酰甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 作用下, DAG 的 *sn*-3 位置上发生酰基化 (即结合一个脂肪酸碳链), 形成 TAG。新近发现了另一条不依赖于乙酰-CoA 的 TAG 合成途径, 即在磷脂二酰甘油酰基转移酶 (phospholipid diacylglycerol acyltransferase, PDAT) 的催化作用下, 脂酰基直接从磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 转移至 DAG, 从而合成 TAG, 而没有经过中间产物 CoA^[14]。

这些催化 TAG 合成的酶已成为解析特异脂肪酸积累机制和开展油料作物代谢工程的靶分子。研究发现, 拟南芥基因组至少含有 8 个 GPAT 基因, 所编码的 GPAT 酶蛋白多数定位于内质网^[15]。目前仅对 AtGPAT1 和 AtGPAT5 酶异构体进行了研究, 但还未证明它们对特异脂肪酸合成积累有何独特功能^[16,17]。LPAT 在拟南芥中可能至少有 5 个基因编码^[16], 其他植物的 LPAT 基因也已被克隆, 并发现这些 LPAT 酶对靶标脂肪酸底物具有选择性^[17~19]。异源表达 LPAT 基因可提高转基因油菜种子油中目标脂肪酸含量^[19,20]。

DGAT 是控制 Kennedy 途径中形成 TAG 分子最后一步反应的酶, 对种子中普通脂肪酸和特异脂肪酸的合成积累均有重要的作用^[3,4]。现已从多种植物中分离到编码 DGAT 的基因。据 DGAT 的氨基酸序列和结构特征, 可分为 DGAT1、DGAT2 和 DGAT3 等 3 种类型。前两种定位于内质网, 后一种则是水溶性的, 分布于细胞质中^[21~26]。已有研究证明, DGAT2 是控制特异脂肪酸合成和高水平积累的一个关键酶^[7,24,25]。例如, 油桐 (*Vernicis fordii*) 的种子合成积累高达 80 % 的共轭脂肪酸即桐酸 (eleostearic acid)。在油桐发育种子中 DGAT2 基因的表达量明显高于 DGAT1, 并且 DGAT2 的高表达时间与桐酸大量合成积累时间相吻合^[25]。DGAT2 在酵母中表达可显著增加含桐酸的 TAG 含量, 而在酵母中表达 DGAT1 则没有这样的功能^[25]。再如, 蓖麻 DGAT2 基因在发育种子的表达量是叶子中表达量的 18 倍, 而 DGAT1 在发育种子中的表达水平与叶片中的相同。转基因

实验亦表明, DGAT2 是控制蓖麻亚油酸合成积累的主要酶分子^[24]。我们从高水平积累环氧脂肪酸 *Vernonia galamensis* 种子中分离到 2 个 DGAT1 和 1 个 DGAT2 cDNA 克隆, 在酵母细胞中表达 DGAT1 和 DGAT2, 并进行体外活性检测。结果表明, DGAT2 对环氧脂肪酸底物有特异性, 而 DGAT1 则对环氧脂肪酸底物无选择性^[7]。DGAT1、DGAT2 和 DGAT3 在植物细胞中可能执行的功能不同。因此, 将催化合成特异脂肪酸的酶基因和与之相适应 DGAT 酶基因共表达, 可望提高转基因油料作物种子合成积累特异脂肪酸的水平。

与 DGAT 酶不同, PDAT 酶可直接将脂肪酸从 PC 分子上转移到 DAG 分子上, 形成 TAG。一些离体实验暗示, PDAT 酶也能将特异脂肪酸从 PC 分子直接转移到 DAG 分子上, 生成含特异脂肪酸的 TAG^[27]。一些植物编码 PDAT 酶的基因也被分离, 但还未获得在活体细胞中 PDAT 酶参与特异脂肪酸合成积累的直接证据^[28,29]。

可以想象, 特异脂肪酸的合成和高水平积累不仅需要几种相关酶相互作用, 而且要求这些酶能在内质网上的精细定位和有序组装。油桐的 DGAT1 和 DGAT2 被发现定位于内质网的特定区域^[25]。新近报道指出, 一个类 FAD2 酶即硬脂酸辅酶 A 去饱和酶, 在哺乳动物细胞中, 与 DGAT2 酶协同定位于内质网特定区域, 以确保合成的油酸准确转入 TAG 分子并有效地积累^[30]。

2 应用代谢工程在普通油料作物中合成工业用脂肪酸的技术策略及实践

如前所述, 具有重要工业应用价值的特异脂肪酸能在一些野生植物种子中合成并高水平积累, 而普通油料作物 (如大豆、油菜) 则不能合成这些特异脂肪酸。类 FAD2 酶是催化特异脂肪酸合成关键酶, 它作用的底物是不饱和脂肪酸 (如 18:1 和 18:2)。普通油料作物种子则能合成积累这些底物。因此, 采用代谢工程技术, 通过对普通油料作物脂肪酸合成代谢途径的基因修饰, 有望使特异脂肪酸能在普通油料作物种子中合成并高水平大量积累和商业化生产。

为实现这一目标, 目前建立的油料作物脂肪酸代谢工程的技术策略主要有: 1) 提高转基因受体油料作物种子中类-FAD2 酶作用底物的含量, 以促进目标脂肪酸的合成。可选用底物脂肪酸 (如 18:1 和 18:2) 含量高的油料作物品种/系和/或突变体, 也可

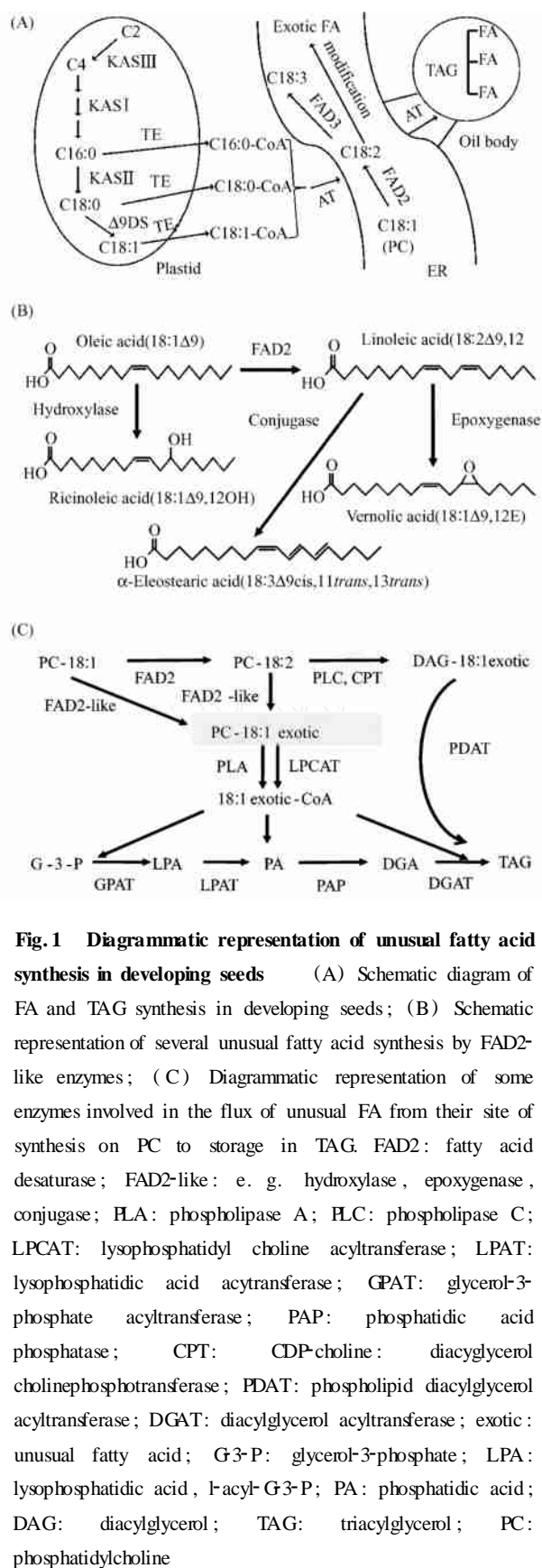


Fig. 1 Diagrammatic representation of unusual fatty acid synthesis in developing seeds

(A) Schematic diagram of FA and TAG synthesis in developing seeds; (B) Schematic representation of several unusual fatty acid synthesis by FAD2-like enzymes; (C) Diagrammatic representation of some enzymes involved in the flux of unusual FA from their site of synthesis on PC to storage in TAG. FAD2: fatty acid desaturase; FAD2-like: e. g. hydroxylase, epoxigenase, conjugase; HLA: phospholipase A; HLC: phospholipase C; LPCAT: lysophosphatidyl choline acyltransferase; LPAT: lysophosphatidic acid acyltransferase; GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase; PAP: phosphatidic acid phosphatase; CPT: CDP-choline: diacylglycerol cholinephosphotransferase; PDAT: phospholipid diacylglycerol acyltransferase; DGAT: diacylglycerol acyltransferase; exotic: unusual fatty acid; G-3-P: glycerol-3-phosphate; LPA: lysophosphatidic acid, 1-acyl-G-3-P; PA: phosphatidic acid; DAG: diacylglycerol; TAG: triacylglycerol; PC: phosphatidylcholine

应用 RNAi 阻断底物脂肪酸正常的后续酶促反应, 或者共表达一个内源基因促进底物脂肪酸的合成,

从而使底物脂肪酸含量提高. 2) 优化特异脂肪酸整入 TAG 分子的机制/途径, 使新合成的特异脂肪酸能准确有效地转移到 TAG 分子并积累于油体中, 保持特异脂肪酸合成积累途径畅通. 这就需要鉴定和分离对特异脂肪酸有选择性的 DGAT 或其它酶分子. 共表达类-FAD2 酶和对目标脂肪酸有选择性的 DGAT 酶, 有助于提高目标特异脂肪酸在普通油料作物种子中合成积累. 3) 应用种子特异表达的启动子 (如 napin、phaseolin 和 -conglycinin 种子特异启动子等) 构建目标基因表达载体, 使转基因仅在种子中高效表达, 减少对受体植物生长发育及其它代谢的影响. 在具体实践中, 可将这些技术策略结合应用, 以培育出理想的工程油料作物品种. 以下论述一些重要工业用脂肪酸的代谢工程实践、研究进展和存在的问题.

2.1 环氧化脂肪酸

环氧化脂肪酸是指不饱和脂肪酸中的双键被氧化成环氧状. 目前, 工业上应用的环氧化脂肪酸主要来自石油加工. 植物不饱和脂肪酸经一些化学加工处理亦可生成环氧化脂肪酸, 但生产成本高. 一些野生植物, 如 *Crepis palaestina*、*Vernonia galamensis*、*Euphorbia lagascae* 和 *Bernardia pulchella* 等种子油含有 50% ~ 90% 的环氧化脂肪酸, 即斑鸠菊酸 (顺-12, 13-环氧-顺-9-十八碳烯酸, vernolic acid). 高含这种环氧化脂肪酸的植物油可用于生产高分子聚合物、塑料、尼龙、粘合剂和油漆等, 亦可作为源于石油的增塑剂 (如邻苯二甲酸二辛酯) 的替代品^[31].

催化斑鸠菊酸合成的酶多数为类-FAD2 酶, 底物脂肪酸为亚油酸 (18:2^{9,12}). 编码这些酶的基因也已被克隆. 转基因表达这些基因导致斑鸠菊酸在受体油料作物种子中合成. 将 *Crepis palaestina* 的类 FAD2 cDNA 克隆, 即 *Cpal2* 在拟南芥种子中表达, 转基因种子中合成了斑鸠菊酸, 含量为 6.2%^[32]. 有趣的是, 这些转基因种子中, 油酸 (18:1⁹) 含量也升高. 这可能是由于导入的外源 *Cpal2* 基因表达影响了内源 FAD2 基因活性, 使得由油酸 (18:1⁹) 生成亚油酸 (18:1^{9,12}) 减少. 亚油酸底物的减少进而造成斑鸠菊酸合成减低. Singh 等^[33]进一步将来自 *Crepis palaestina* 的正常的 FAD2 基因 (12-去饱和酶基因) 导入到 *Cpal2* 转基因拟南芥, 这 2 个基因的共表达使种子中斑鸠菊酸提高到 9.9%, 油酸 (18:1⁹) 含量也提高到正常水平. 这说明提高底物亚油酸含量以及内源 FAD2 活性有促于目标脂肪酸斑鸠菊酸的合成积累.

同样,Rezzonico 等^[34]报道,在拟南芥突变体(*fad3/fad7/fad8*)种子中表达 *Cpal2*,可使斑鸠菊酸含量提高到 3.5%,而在野生型转基因拟南芥种子中含量仅为 2.1%。拟南芥突变体(*fad3/fad7/fad8*)本身种子中亚油酸含量比野生型种子高 60%。*Cpal2* 在另一种拟南芥突变体(*fae1/fad3*, 51% 18 2)种子表达,斑鸠菊酸含量为 8.6%,而在野生型种子(27% 18 2)中表达才获得 6%斑鸠菊酸。若在拟南芥突变体(*fae1/fad3*)种子中共表达 *Cpal2* 和正常 12-去饱和酶基因,斑鸠菊酸含量则高达 21%^[35]。用高含亚油酸(60%)棉花(品种 Coker 315)种子为受体,共表达这 2 个基因,种子中斑鸠菊酸含量为 16.9%,高于单表达 *Cpal2* 基因种子中的

含量(8.3%)。

我们从 *Vernonia galamensis* 种子中分离到编码 DGAT2 的基因(*VgDGAT2*)。该 DGAT2 酶能特异选择斑鸠菊酸并将其整入 TAG 分子。将该基因与源于 *Stokesia laevis* 的环氧化酶(亦属于类-FAD2 酶)基因(SIE)在大豆种子中共表达,转基因种子合成积累的斑鸠菊酸高达 26%(Table 1)。这说明修饰 TAG 合成途径可显著提高特异脂肪酸在转基因油料作物种子中的合成积累量。另外,斑鸠菊酸也可由细胞色素 P450 型-环氧化酶催化亚油酸生成。将来自于 *Euphorbia lagascae* 的 P450 型-环氧化酶基因在大豆体细胞胚中表达,体细胞胚可合成 8% 斑鸠菊酸,表达该基因的烟草愈伤组织中斑鸠菊酸含量为 13%^[36]。

Table 1 Fatty acid composition of the total lipid, triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), phosphatidylcholine (PC), and phosphatidylethanolamine (PE) from mature seeds of non-transformed soybean plants or soybean plants transformed with a seed-specific expression transgene for the vernolic fatty acids (wt % of total fatty acids)

Lipid class	16 0	18 0	18 1	18 2	18 3	Vernolic acid
Non-transgenic lines						
Total	8.5 ±0.2	2.9 ±0.5	11.4 ±0.3	66.2 ±0.9	11.0 ±1.2	ND
TAG	9.1 ±0.6	2.8 ±0.4	10.9 ±1.6	67.2 ±0.7	9.7 ±0.8	ND
DAG	11.5 ±0.4	5.1 ±0.3	5.2 ±0.7	70.4 ±0.9	7.5 ±0.3	ND
PC	14.6 ±1.1	4.8 ±0.6	5.1 ±0.8	68.1 ±0.7	8.1 ±0.8	ND
PE	20.7 ±1.4	3.2 ±0.3	4.3 ±0.8	65.6 ±1.7	5.3 ±0.4	ND
Co-expressing SIE + VgDGAT2 lines						
Total	7.1 ±0.3	2.8 ±0.5	21.2 ±0.6	35.1 ±1.2	7.2 ±0.5	26.1 ±0.8
TAG	4.2 ±0.4	1.8 ±0.4	15.3 ±1.4	28.7 ±1.4	6.5 ±0.7	42.9 ±0.9
DAG	4.5 ±0.4	2.2 ±0.3	22.4 ±4.2	39.0 ±3.1	5.2 ±0.6	27.4 ±2.1
PC	3.9 ±0.5	2.4 ±0.3	23.9 ±2.4	35.8 ±2.7	5.2 ±0.5	27.6 ±2.3
PE	6.6 ±1.3	2.1 ±0.8	28.9 ±4.1	44.7 ±4.2	4.4 ±0.6	12.9 ±1.6

The values shown are the means ±SD for measurements of lipids from three to five single seeds. ND, not detected. 16 0, palmitic acid; 18 0, stearic acid; 18 2, linoleic acid; 18 3, α-linolenic acid; 18 1, oleic acid (18 1 9)

2.2 羟化脂肪酸

羟化脂肪酸是在脂肪酸碳链上附加有羟基的脂肪酸。例如,蓖麻(*Ricinus communis*)油中的蓖麻亚油酸即 12-羟基-顺-9-十八碳烯酸(12-hydroxy-octadeca-*cis*-9-enoic acid;12-OH18 1 9)。该羟化脂肪酸通过化学修饰可以生产出众多产品,包括润滑剂、聚酰胺 11(尼龙 11)、涂料、墨水、防渗漏剂、表面活性剂、乳化剂、胶囊封闭材料、塑料薄膜和生物柴油等。尽管蓖麻油有重要的工业价值,但由于蓖麻种子含有一种剧毒物质即蓖麻毒蛋白和一些过敏原蛋白,给栽培、收获、贮运及加工带来诸多不便。如能将蓖麻亚油酸生物合成基因转移到其他无毒大田油料作物宿主中,则可提高蓖麻油的商业化生产和广

泛的工业应用^[37]。

蓖麻亚油酸是在羟化酶的催化下,在油酸(18 1 9)分子 C12 处引入一个羟基而合成的。现已从蓖麻种子中分离到编码该酶(属于类-FAD2 酶)的基因^[10]。蓖麻羟化酶基因(*FAH12*)在拟南芥种子中表达,使转基因拟南芥种子油中的合成积累 17%的蓖麻亚油酸^[38]。若以油酸含量比野生型高 4 倍的拟南芥突变体(*fae1/fad3*)为转基因 *FAH12* 的受体,种子中蓖麻亚油酸含量可提高到 20%^[39]。有趣的是,Lu 等^[40]将 *FAH12* 基因与其它不直接参与羟化脂肪酸代谢的基因在拟南芥种子中共表达,也获得了蓖麻亚油酸含量达 20%的转基因植物。蓖麻 DGAT2 (*RcDGT2*)对蓖麻亚油酸有特异选择性,将 *RcDGT2*

和 *FAH12* 基因共表达,转基因拟南芥种子中蓖麻亚油酸含量提高到 30 %^[41]. Meesapyodsuk 等^[42]从一种植物病原菌麦角菊 (*Claviceps purpurea*) 分离到类-FAD2 型羟化酶基因 (*CpFAH*), 在拟南芥突变体 (*fae1/fad3*) 种子中仅表达 *CpFAH* 基因,转基因种子中羟化脂肪酸总含量最高可达 29.1 %. 可见,不同来源的羟化酶在异源受体中催化活性有差异. 目前的研究指出,进一步提高转基因种子中羟化脂肪酸合成积累量,还需导入其他一些相关基因.

2.3 共轭脂肪酸

一些植物种子油富含具有共轭双键的脂肪酸称作共轭脂肪酸,如桐油酸 (*calendic acid*; 18 3 8 *trans*, 10 *trans*, 12 *cis*)、-桐油酸 (*-eleostearic acid*, 18 3 9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*)、梓树酸 (*catalpic acid*; 18 3 9 *trans*, 11 *trans*, 13 *cis*)、石榴酸 (*punicic acid*; 18 3 9 *cis*, 11 *trans*, 13 *cis*)、帕里拉油酸 (*parinaric acid*; 18 4 9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*, 15 *cis*) 和 *dimorphecolic acid* (9-OH-18 2 10 *trans*, 12 *trans*) 等^[43,44]. 这些共轭脂肪酸具有干性油的特性,可用作油漆、涂料以及加工墨汁等. 但它们主要来源于生长在亚热带的树木如油桐 (*Vernica fordii*) 以及一些野生植物,远未满足工业需求. 在这些植物中,只有油桐已商业化栽培用于生产桐油 (一种高价值的工业用干性油脂). 其他植物种类不具应有的农艺性状,还未大规模商业化栽培用于生产这种特异的脂肪酸.

迄今,已从观赏植物凤仙花 (*Impatiens balsamina*) 和金盏菊 (*Calendula officinalis*)^[45,46]、苦瓜 (*Momordica charantia*)^[45]、油桐 (*Vernicis fordii*)^[47] 等植物中分离克隆了控制共轭脂肪酸合成的类-FAD2 基因. 将来自凤仙花和苦瓜的脂肪酸共轭酶基因 *ImpFa* 分别为 5 %和 17 %^[45]. 在大豆体细胞胚中表达来自金盏菊的脂肪酸共轭酶基因 *CoFADX-2*,也获得了 22 %的桐油酸^[48]. 表达 *CoFADX-2* 的大豆种子和拟南芥突变体 (*fae1/fad3*) 种子中桐油酸含量分别为 20 %和 15 %. 在拟南芥突变体 (*fae1/fad3*) 中分别表达 *MomoFadX* 和来自油桐的脂肪酸共轭酶基因亦获得 13 %和 6.2 %的 -桐油酸^[48]. 可见,不同来源的脂肪酸共轭酶基因活性不同,转基因受体中底物脂肪酸含量影响着新合成共轭脂肪酸的水平. 与这些基因来源的植物种子相比,异源转基因的种子新合成的共轭脂肪酸,不仅含量低,而且共轭脂肪酸大多数存在于 *PC* 分子中,而不是在 *TAG* 分子中. 显然,转基因种子中缺乏将新合成的共轭脂肪酸从

PC 分子中转移到 *TAG* 分子的机制. 另外,目前获得表达脂肪酸共轭酶基因的大豆种子萌发率低,生长发育欠佳^[48],这有待进一步研究解决.

2.4 特异单烯脂肪酸

一些非农作物种子油含有不同于油酸 (18 1 9) 的特异单不饱和脂肪酸,例如岩芹酸 (*petroselinic acid*, 18 1 6 *cis*) 和 5-二十碳烯酸 (5 *eicosenoic acid*) 等,它们具有重要工业价值. 特异单烯酸在植物细胞中至少有 3 条合成途径,即质体中多种形式的硬脂酰-ACP 去饱和酶催化的途径、普通或特异单烯脂肪酸产物的延长反应途径和位于内质网的脂酰-CoA 去饱和酶催化的途径.

迄今,已克隆了多种质体的去饱和酶基因,例如,来自猫爪花 (*Doxantha unguis-cati*) 和叙利亚马利筋 (*Asclepias syriaca*) 的⁹-16 0-ACP 去饱和酶^[49,50]、来自天竺葵 (*Pelargonium xhortorum*) 的⁹-14 0-ACP 去饱和酶^[51]、来自芫荽 (*Coriandrum sativum*) 中的⁴-16 0-ACP 去饱和酶^[52]. 芫荽种子含有大约为 70 %岩芹酸 (18 1 6 *cis*). 岩芹酸是油酸的异构体,室温下为固体,溶解温度为 33 °C,而油酸在室温下为液体. 岩芹酸这些理化性质使之成为固体油脂的最好替代品.

目前岩芹酸只限于工业应用. 去除 6 位上双键,岩芹酸就生成去污剂和表面活性剂的主要成分月桂酸,以及尼龙 66 的单体乙二酸. 通过基因工程改良油料作物,使种子油中积累岩芹酸已取得一些进展. 例如,将芫荽的⁴-16 0-ACP 去饱和酶基因转入烟草,其超表达导致转基因烟草种子中积累了仅 4 %岩芹酸^[52]. 这表明,芫荽种子中还有其他一些酶参与了岩芹酸的积累. 鉴定分离这些酶基因并在转基因油料作物中与⁴-16 0-ACP 去饱和酶基因协同表达有可能显著提高转基因作物中岩芹酸的含量.

特异单烯酸的第 2 种合成机制是普通或特异单不饱和脂肪酸在质体中或质体外进行碳链延长反应. 例如,在拟南芥或芸薹属 (*Brassica*) 油菜等许多植物中,从质体中转运出来的油酰-CoA 经过类似于质体中脂肪酸合成的一系列反应后被延长,生成芥酸 (C22 1 13 *cis*). 由于在油酰-CoA 的羧基末端新加了 4 个碳原子,因此,双键的位置由原来位于油酸的 9 变成终产物二十二碳脂酰-CoA 的 13 位置. 尽管育种者成功地培育出低芥酸含量的油菜品种,以用作食用油. 然而,芥酸具有特种非食品应用价值,因此,有必要培育高芥酸的油菜品种来专门满足工业的需求.

特异单烯酸的第 3 种合成途径是由结合于内质网的脂酰-CoA 去饱和酶所催化的。现已从 *Limnanthes alba* 植物中鉴定分离到一种新型的脂酰-CoA 去饱和酶^[53]。 *Limnanthes alba* 种子油中 95 % 以上的脂酰基团碳链长度大于 18。这些脂肪酸中约 90 % 脂肪酸的双键位于 5 位置^[54]。 *Limnanthes alba* 种子油的主要脂肪酸是 C22 1 5 *cis* (约 60 %)。这种脂肪酸可用于制造化妆品、表面活性剂和润滑剂^[55]。 C22 1 5 *cis* 的生物合成明显不同于芥酸(C22 1 13 *cis*)。 C22 1 5 *cis* 生物合成时,脂肪酸碳链延长的底物是软脂酰(C16 0)-CoA 而不是油酰(C18 1)-CoA,并且 5*cis* 去饱和酶的作用底物是 C20 0^[56]。 Cahoon 等^[53] 从 *Limnanthes alba* 植物中鉴定分离到编码催化 C20 1 5 *cis* 合成的新型延长酶以及类似哺乳动物和酵母的脂酰-CoA 去饱和酶的 cDNA 克隆。转基因大豆中这两种酶基因的共表达使 C20 1 5 *cis* 脂肪酸积累达到 12 %。这些结果表明,将参与野生植物靶标脂肪酸合成的多个酶基因共同转入大田油料作物,可有效提高转基因油料作物中新型脂肪酸的合成和积累。

2.5 蜡

蜡具有独特的物理性质,可用于化妆品、食品生产和工业润滑剂等方面。鲸鱼油是一种重要的商业用蜡源。然而,由于鲸鱼资源日益减少和对捕鲸业的限制,就需要寻找新的蜡酯资源以取代鲸油。

沙漠灌木植物西蒙得木(*Simmondsia chinensis*)植物种子中贮藏的脂肪酸不是 TAG,而是蜡酯,含量达 97 %。这些蜡酯主要是长链(多为 C20, C22 和 C24),单不饱和脂肪酸,其生物合成开始于油酸(C18 1),依次由延长酶,还原酶和蜡合酶催化而成^[57]。西蒙得木种子油在高温和高压下物理化学特性非常稳定,可用作化妆品和工业润滑剂等。

Lassner 等^[58] 从西蒙得木发育种子中分离到参与蜡酯合成的酶基因,即蜡合酶(wax synthase, WS),又称脂酰-辅酶 A 脂醇酰基转移酶(fatty acyl-coA fatty alcohol acyltransferase)和酯酰-CoA 还原酶(fatty acyl-CoA reductase, FAR)。又从 *Lunaria annua* 植物(种子油中高积累超长链脂肪酸)克隆到 β -酮脂酰辅酶 A 合酶和脂酰延长酶(β -ketoacyl-CoA synthase, KCS)(一种脂酰延长酶)。在拟南芥种子中共表达编码这 3 个酶的 cDNA 克隆,转基因种子合成积累了 75 % 蜡酯^[59]。可见,通过基因工程技术把蜡生物合成途径转入普通大田油料作物中,是一条有潜力大规模生产蜡脂的途径。这些转基因作物可作为

蜡的可再生资源,并且可以与基于石油或动物的蜡脂产品进行竞争,甚至可以取代这些传统的石化产品。

3 展望

众所周知,随着工业化过度消耗,石油资源、各种石化产品加工生产也导致诸多环境污染。这些已对经济及人类社会可持续发展构成威胁。植物种子油是一种环境良好的可再生资源,可开发用于生物燃油和多种油脂产品。自然界一些野生植物种子中可高水平合成积累许多特异脂肪酸。这些特异脂肪酸在工业上有独特的应用价值,然而普通油料作物不能合成这些工业用脂肪酸。应用代谢工程技术策略,对普通油料作物种子中脂肪酸合成代谢途径进行基因修饰,培育可高水平合成积累特异工业用脂肪酸工程油料作物品系,为大规模地生产这些新型的工业用脂肪酸开辟了新途径。

如前文所述,在普通油料作物种子中共表达类-FAD2 酶基因和其它相关基因(如 DGAT1、DGAT2),已培育出一些有希望合成积累特异脂肪酸的新种质。目前存在的主要问题是含量低,不能用于商业化生产。除了以上介绍的脂肪酸底物含量和特异脂肪酸转移整合入 TAG 通道是制约因素外,不同底物库(如 acyl-CoA 库,PC 库,TAG 库)之间脂肪酸通量(fatty acid flux)以及脂肪酸合成途径与积累途径之间对脂肪酸中间产物的竞争也是限制工程油料作物种子积累特异脂肪酸的重要因素。未来需深入探讨介导脂肪酸中间产物在不同库间转运的机制,以建立有效的技术策略提高目标脂肪酸在 TAG 库中的积累量。进一步深入研究野生植物种子中目标特异脂肪酸合成代谢途径的各个酶促反应步骤和相关酶的底物特异性,进而克隆编码靶标酶的基因以及代谢调控机制是未来工作的重点。

代谢工程技术在扩展油料作物的工业用途和市场开发等方面具有良好的发展前景。整合应用分子遗传学、基因组学和细胞生物学的研究所取得的结果可有利于全面了解种子发育过程中脂肪酸合成、修饰和贮藏的途径及其相互关系。未来要对工程油料作物种子脂肪酸代谢途径进行优化组装,以期能高水平地合成积累重要工业用脂肪酸。这样不仅能提高了油料作物的经济价值,而且还能降低基于植物油脂的产品商业化生产的成本,使植物油脂产品最终可取代基于石油的石化产品,有利于人类社会及经济的可持续发展。

参考文献 (References)

- [1] Van de Loo F J, Fox B G, Somerville C. Unusual fatty acids[M]. In: Moore T S, Ed. Plant Lipids, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, 91-126
- [2] Singh S P, Zhou X R, Liu Q, et al. Metabolic engineering of new fatty acids in plants[J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8(2): 197-203
- [3] Cahoon E B, Shockey J M, Dietrich C R, et al. Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux[J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10(3): 236-244
- [4] Napier J A. The production of unusual fatty acids in transgenic plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 295-310
- [5] 吴永美, 毛雪, 王书建, 等. 转基因改良植物的营养价值[J]. 生物工程学报 (Wu Yong-Mei, Mao Xue, Wang Shu-Jian, et al. Improving the nutritional value of plant foods through transgenic approaches[J]. Chin J Biotech, 2004, 20(4): 471-476
- [6] 岳爱琴, 孙希平, 李润植. 食用植物油脂的代谢工程[J]. 植物生理与分子生物学报 (Yue Ai-Qin, Sun Xi-Ping, Li Run-Zhi. Metabolic engineering of edible plant oils[J]. J Plant Physiol Mol Biol, 2007, 33(6): 489-498
- [7] Yu K S, Li R, Hatanaka T, et al. Cloning and functional analysis of two type 1 diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia galamensis* [J]. Phytochemistry, 2008, 69(5): 1119-1127
- [8] Cahoon E B, Kinney A J. The production of vegetable oils with novel properties: using genomic tools to probe and manipulate plant fatty acid metabolism[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2005, 107(4): 239-243
- [9] Voelker T, Kinney A J. Variations in the biosynthesis of seed-storage oils[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2001, 52: 335-361
- [10] Van de Loo F J, Broun P, Turner S, et al. An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(15): 6743-6747
- [11] Broun P, Somerville C. Accumulation of ricinoleic, lesquerolic, and densipolic acids in seeds of transgenic *Arabidopsis* plants that express a fatty acyl hydroxylase cDNA from castor bean[J]. Plant Physiol, 1997, 113(3): 933-942
- [12] 石如玲, 姜玲玲. 过氧化物酶体脂肪酸 氧化[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Shi Ru-Ling, Jiang Ling-Ling. Recent advances in peroxisomal fatty acid -oxidation [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2009, 25(1): 12-16
- [13] Moire L, Rezzonico E, Goeftert S, et al. Impact of unusual fatty acid synthesis on futile cycling through beta-oxidation and on gene expression in transgenic plants[J]. Plant Physiol, 2004, 134(1): 432-442
- [14] Ståhl U, Carlsson A S, Lenman M, et al. Cloning and functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2004, 135(3): 1324-1335
- [15] Zheng Z, Xia Q, Dauk M, et al. *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-Phosphate acyltransferase gene family is essential for Tape tum differentiation and male fertility[J]. Plant Cell, 2003, 15(8): 1872-1887
- [16] Kim H U, Li Y, Huang A H. Ubiquitous and endoplasmic reticulum located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2005, 17(4): 1073-1089
- [17] Brown A P, Slabas A R, Denton H. Substrate selectivity of plant and microbial lysophosphatidic acid acyltransferases[J]. Phytochemistry, 2002, 61(5): 493-501
- [18] Knutson D S, Lardizabal K D, Nelsen J S, et al. Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase that accepts medium-chain-length substrates[J]. Plant Physiol, 1995, 109(3): 999-1006
- [19] Lassner M W, Levering C K, Davies H M, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil [J]. Plant Physiol, 1995, 109(4): 1389-1394
- [20] Knutson D S, Hayes T R, Wyrick A, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase from coconut endosperm mediates the insertion of laurate the sn-2 position of triacylglycerols in lauric rapeseed oil and can increase total laurate levels[J]. Plant Physiol, 1999, 120(3): 739-746
- [21] Hobbs D H, Hills M J. Expression and characterization of diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* in insect cell cultures [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(6): 687-689
- [22] Zou J, Wei Y, Jako C, et al. The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene [J]. Plant J, 1999, 19(6): 645-653
- [23] Lardizabal K D, Mai J T, Wagner N W, 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]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38862-38869
- [24] Kroon J T M, Wei W, Simon W J, et al. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals[J]. Phytochemistry, 2006, 67(23): 2541-2549
- [25] Shockey J M, Gidda S K, Chapal D C, et al. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum[J]. Plant Cell, 2006, 18(9): 2294-2313
- [26] Saha S, Enugutti B, Rajakumari S, et al. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oil seeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase [J]. Plant Physiol, 2006, 141(4): 1533-1543
- [27] 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[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12): 6487-6492
- [28] Ståhl U, Carlsson A S, Lenman M, et al. Cloning and functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2004, 135(3): 1324-1335
- [29] Mhaske V, Beldjilali K, Ohlrogge J, et al. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* knock out line for

- phospholipid:diacylglycerol transacylase gene (At5g13640) [J]. Plant Physiol Biochem, 2005, **43**(4): 413-417
- [30] Man W C, Miyazaki M, Chu K, *et al.* Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis [J]. J Lipid Res, 2006, **47**(9): 1928-1939
- [31] Ayorinde F O, Nana E Y, Nicely P D, *et al.* Syntheses of 12-aminododecanoic and 11-aminoundecanoic acids from vernolic acid [J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, **74**(5): 531-538
- [32] Lee M, Lenman M, Banas A, *et al.* Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation [J]. Science, 1998, **280**(5365): 915-918
- [33] Singh S, Thomaes S, Lee M, *et al.* Transgenic expression of a Δ^12 -epoxygenase gene in *Arabidopsis* seeds inhibits accumulation of linoleic acid [J]. Planta, 2001, **212**(5-6): 872-879
- [34] Rezzonico E, Moire L, Delessert S, *et al.* Level of accumulation of epoxy fatty acid in *Arabidopsis thaliana* expressing a linoleic acid Δ^12 -epoxygenase is influenced by the availability of the substrate linoleic acid [J]. Theor Appl Genet, 2004, **109**(5): 1077-1082
- [35] Zhou X R, Robert S, Singh S, *et al.* Heterologous production of CLA and SDA by expression of an *Echium plantagineum* Δ^6 -desaturase gene [J]. Plant Sci, 2006, **170**(3): 665-673
- [36] Cahoon E B, Ripp K G, Hall S E, *et al.* Transgenic production of epoxy fatty acids by expression of a cytochrome P450 enzyme from *Euphorbia lasiocarpa* seed [J]. Plant Physiol, 2002, **128**(2): 615-624
- [37] Auld D L, Rolfe R D, McKeon T A. Development of castor with reduced toxicity [J]. J New Seeds, 2001, **3**: 61-69
- [38] Broun P, Somerville C. Accumulation of ricinoleic, lesquerolic, and densipolic acids in seeds of transgenic *Arabidopsis* plants that express a fatty acyl hydroxylase cDNA from castor bean [J]. Plant Physiol, 1997, **113**(3): 933-942
- [39] Smith M A, Moon H, Chowrira G, *et al.* Heterologous expression of a fatty acid hydroxylase gene in developing seeds of *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2003, **217**(3): 507-516
- [40] Lu C, Fulda M, Wallis J G, *et al.* A high-throughput screen for genes from castor that boost hydroxy fatty acid accumulation in seed oils of transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2006, **45**(5): 847-856
- [41] Burgal J, Shockey J, Lu C, *et al.* Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil [J]. Plant Biotechnol J, 2008, **6**(8): 819-831
- [42] Meesapyodsuk D, Qiu X. An oleate hydroxylase from the fungus *Claviceps purpurea*: cloning, functional analysis, and expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2008, **147**(3): 1325-1333
- [43] Badami R C, Patil K B. Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils [J]. Prog Lipid Res, 1980, **19**(3-4): 119-153
- [44] Smith Jr C R. Occurrence of unusual fatty acids in plants [J]. Prog Chem Fats Other Lipids, 1971, **11**: 137-177
- [45] Cahoon E B, Carlson T J, Ripp K G, *et al.* Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, **96**(22): 12935-12940
- [46] Cahoon E B, Ripp K G, Hall S E, *et al.* Formation of conjugated Δ^8, Δ^{10} double bonds by Δ^{12} -oleic acid desaturase related enzymes. Biosynthetic origin of calendic acid [J]. J Biol Chem, 2001, **276**(4): 2637-2643
- [47] Dyer J M, Chapital D C, Kuan J W, *et al.* Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity [J]. Plant Physiol, 2002, **130**(4): 2027-2038
- [48] Cahoon E B, Dietrich C R, Meyer K, *et al.* Conjugated fatty acids accumulate to high levels in phospholipids of metabolically engineered soybean and *Arabidopsis* seeds [J]. Phytochemistry, 2006, **67**(12): 1166-1176
- [49] Cahoon E B, Shah S, Shanklin J, *et al.* A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing cat's claw seed [J]. Plant Physiol, 1998, **117**(2): 593-598
- [50] Cahoon E B, Coughlan S J, Shanklin J. Characterization of a structurally and functionally diverged acyl-acyl carrier protein desaturase from milkweed seed [J]. Plant Mol Biol, 1997, **33**(6): 1105-1110
- [51] Schultz D J, Cahoon E B, Shanklin J, *et al.* Expression of a Δ^9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of γ -5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium hortorum*) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, **93**(16): 8771-8775
- [52] Cahoon E B, Shanklin J, Ohlrogge J B. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, **89**(23): 11184-11188
- [53] Cahoon E B, Marillia E F, Stecca K L, *et al.* Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos [J]. Plant Physiol, 2000, **124**(1): 243-251
- [54] Phillips B E, Smith Jr C R, Tallent W H. Glycerides of *Limnanthes douglasii* seed oil [J]. Lipids, 1971, **6**(2): 93-99
- [55] Erhan S M, Kleiman R, Isbell T A. Estolides from meadowfoam oil fatty acids and other monounsaturated fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 1993, **70**(5): 461-465
- [56] Pollard M R, Stumpf P K. Biosynthesis of C20 and C22 fatty acids by developing seeds of *Limnanthes alba*: chain elongation and Δ^5 desaturation [J]. Plant Physiol, 1980, **66**(4): 649-655
- [57] Pollard M R, McKeon T, Gupta L M, *et al.* Studies on biosynthesis of waxes by developing jojoba seed. The demonstration of wax biosynthesis by cell-free homogenates [J]. Lipids, 1979, **14**(7): 651-662
- [58] Lassner M W, Lardizabal K, Metz J G. Producing wax esters in transgenic plants by expression of genes derived from jojoba [M]. In: Janick J (ed.). Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 1999, 220-224
- [59] Lardizabal K D, Metz J G, Sakamoto T. 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 Physiol, 2000, **122**(3): 645-655