

优化硫酯酶表达提高大肠杆菌脂肪酸乙酯的生物合成效率

杨柳^{1,2}, 朱至¹, 刘爱秋^{1,2}, 吕雪峰^{1,3}

1 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 山东省能源生物遗传资源重点实验室, 山东 青岛 266101

杨柳, 朱至, 刘爱秋, 等. 优化硫酯酶表达提高大肠杆菌脂肪酸乙酯的生物合成效率. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1681-1686.

Yang L, Zhu Z, Liu AQ, et al. Improvement of fatty acid ethyl ester production by optimizing thioesterase expression. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1681-1686.

摘要: 利用基因工程大肠杆菌直接从头生物合成脂肪酸乙酯 (生物柴油) 的相关研究引起了国内外研究人员的广泛关注。在本课题组已经构建的能够从头合成脂肪酸乙酯的大肠杆菌菌株 KC3 的基础上, 通过替换表达不同来源的硫酯酶, 发现表达来源于香樟树的硫酯酶 *Cc FatBI* 基因能够提高脂肪酸乙酯产量。进一步通过共表达 *Cc FatBI* 和大肠杆菌硫酯酶 *tesA'* 基因, 以及启动子优化, 获得了高产脂肪酸乙酯工程菌株 KC4。KC4 菌株在摇瓶条件和发酵条件下的单位生物量脂肪酸乙酯产率分别为 21.4 mg/(L·OD₆₀₀) 和 31.16 mg/(L·OD₆₀₀)。该工程菌株的构建进一步提高了脂肪酸乙酯产量, 显示了通过基因工程改造大肠杆菌从头合成生物柴油的应用潜力。

关键词: 硫酯酶, 脂肪酸乙酯, 大肠杆菌, 基因工程

Improvement of fatty acid ethyl ester production by optimizing thioesterase expression

Liu Yang^{1,2}, Zhi Zhu¹, Aiqiu Liu^{1,2}, and Xuefeng Lü^{1,3}

1 Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Shandong Provincial Key Laboratory of Energy Genetics, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: Biosynthesis of fatty acid ethyl ester (FAEE) by genetically engineered *Escherichia coli* has attracted extensive attentions from scientific community. In this study, we evaluated the effects of thioesterase with different origins on FAEE production and the results show that *Cc FatBI* from *Cinnamomum camphorum* is better than *tesA'* from *E. coli* for FAEE production. Then, the optimized FAEE-producing strain KC4, with 21.4 mg/(L·OD₆₀₀) FAEE production under flask condition and 31.16 mg/(L·OD₆₀₀) under 5 L fermentation condition, was constructed by co-expression of *Cc FatBI* and *tesA'*. Compared with the reported FAEE-producing strain KC3, KC4 possesses the higher FAEE productivity.

Received: March 24, 2013; **Accepted:** May 17, 2013

Supported by: Hundred Talent Program of the Chinese Academy of Sciences (No. O91001110A).

Corresponding author: Xuefeng Lü. Tel/Fax: +86-532-80662629; E-mail: lvxf@qibebt.ac.cn

中国科学院“百人计划”(No. O91001110A)资助。

Keywords: thioesterase, fatty acid ethyl esters (FAEE), *Escherichia coli*, genetic engineering

能源需求的持续快速增加与能源价格的不断攀升, 以及石化能源大量使用所导致的环境污染与气候变化等问题使得发展可再生替代能源迫在眉睫^[1-3]。为了减少对石油资源的依赖以及降低二氧化碳排放, 发展以生物质资源利用为基础的转化技术生产生物燃料和化工产品是一个有吸引力的和有效的方式^[4]。

从燃料性能角度考虑, 具有与车用汽油相同燃料性质的新型脂肪族生物燃料, 如脂肪酸乙酯和脂肪烃等, 是石油的最佳替代品^[5]。传统的生物柴油生产主要是将动植物来源的甘油三酸酯经过转酯作用生成的脂肪酸醇酯, 如脂肪酸甲酯和脂肪酸乙酯。然而传统生物柴油生产受到油脂原料供应不足、甘油副产物价格低以及化学转化过程中的能量消耗和环境污染等因素的制约。近年来, 通过基因工程改造微生物合成脂肪酸乙酯的相关代谢途径, 先后实现了从葡萄糖、半纤维素和甘油等不同碳源到脂肪酸乙酯 (FAEE) 的生物转化, 引起了国内外学术界的广泛关注^[6-8]。2011年, 美国加州大学伯克利分校的 Jay D. Keasling 研究组与美国 LS9 公司合作, 通过在重组大肠杆菌中共表达乙醇合成途径以及蜡脂合成酶/酰基辅酶 A 二酰基甘油酰基转移酶 (WS/DGAT) 合成实现了 FAEE 在大肠杆菌体内从头合成, 最终 FAEE 产量达到 674 mg/L^[9]。本课题组也构建了能够从头合成脂肪酸乙酯的大肠杆菌菌株 KC3, 在 5 L 发酵罐上系统优化了重组菌利用葡萄糖合成 FAEE 的发酵过程, 使 FAEE 的产量达到 922 mg/L^[7]。这些研究表明, 通过针对乙醇和脂肪酸代谢途径的改造, 在微生物体内从头合成 FAEE 是完全可行的。

脂肪酸是脂肪酸乙酯生物合成的前体, 提高脂肪酸乙酯的合成效率必须首先通过脂肪酸代谢途径改造提高微生物的脂肪酸合成能力。Davis 等^[10]发现大肠杆菌硫脂酶将脂肪酰-ACP 水解为游离脂肪酸 (Free fatty acids, FFA), 能够解除脂肪酰-ACP 对上游脂肪酸合成途径的反馈抑制作用, 加快上游乙酰辅酶 A 到脂肪酰-ACP 的代谢流。而通过过量表达大肠杆菌硫脂酶和乙酰辅酶 A 羧化酶, 同时敲除脂肪酸氧化途径基因 *fadD*, 大肠杆

菌游离脂肪酸含量得到大幅提升^[11]。

不同来源的硫酯酶, 偏好于不同链长的脂肪酰 ACP 底物, 具有不同的底物特异性。加州月桂树 *Umbellularia californica* 的硫酯酶 (*Uc FatB1* 基因编码) 偏好于 12 个碳链长度的底物^[12], 萼距花 *Cuphea hookeriana* (*Ch FatB2* 基因编码) 的硫酯酶倾向于选择 10 碳和 8 碳链长的脂肪酰-ACP 为反应底物^[13], 来自香樟树 *Cinnamomum camphora* 硫酯酶 (*Cc FatB1* 基因编码) 多选择 14 碳链脂肪酰-ACP 为反应底物^[14]。而来自大肠杆菌本身的硫酯酶则偏好于利用 16 或 18 碳的底物^[15]。

本文以之前发表的具有脂肪酸乙酯高效合成能力的菌株 KC3 为基础^[7], 利用基因工程手段, 构建表达不同来源硫酯酶的大肠杆菌重组菌株, 筛选获得能促进脂肪酸乙酯高效合成的硫酯酶; 并进一步通过基因表达优化, 最终得到甘油为碳源条件下从头合成脂肪酸乙酯的高产菌株。

1 材料与方法

1.1 试剂

Taq DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司 (Burlington, 加拿大), 其他 *Taq* DNA 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司 (Kyoto, Japan)。用于分子克隆的试剂盒及胶回收试剂盒购自 Omega 公司 (Norcross, 美国)。DNA 引物在 Sangon 公司 (中国上海) 合成。十九烷酸购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国)。

1.2 质粒和突变菌株的构建

详细质粒信息见表 1。将质粒 pBAD33 用 *Hind* III 酶切补平回收后再用 *Sal* I 酶切后回收 5.3 kb 的大片段, 与 *Xho* I / *Sma* I 酶切 pSai328 质粒 (美国亚利桑达州立大学刘新尧博士馈赠) 回收的小片段 (目的片段 *Uc FatB1*) 连接, 构建得到质粒 pAL123。用引物 chTE-up 和 chTE-down 从质粒 pSai329 (美国亚利桑达州立大学刘新尧博士馈赠) 上克隆 *trc* 启动子和 *Ch FatB2* 基因片段连接至 pMD18-T, *Pst* I / *Hind* III 酶切后小片段与用 *Pst* I / *Hind* III 酶切处理后 pBAD33

大片段相连,构建得到质粒 pAL124。质粒 pXL49^[11]经 *Xba* I 和 *Spe* I 酶切获得相应 1.2 kb *Cc FatB1* 基因片段与质粒 pBAD33 经过 *Xba* I 酶切后经碱性磷酸酶处理并回收得到 5.4 kb 片段连接构成 pKC7。质粒 pET21b-accBCDA 上的 *accBCDA* 基因是将 *accB*、*accC*、*accD* 和 *accA* 利用 PCR 基因融合技术融合而得的,用 *Xba* I /*Spe* I 双酶切后获得其片段插入 pMSD15 的 *Xba* I 酶切位点得到质粒 pKC3。基因片段 *Cc FatB1* 通过限制性内切酶 *Xba* I /*Spe* I 从质粒 pXL49 酶切并分离后,插入质粒 pKC3 的 *Xba* I 端,得到质粒 pKC4; 形成一个由 P_{BAD} 启动子驱动 *Cc FatB1*、*tesA'* 和 *accBCDA* 基因的多顺反子结构。利用 *Sal* I /*Sph* I 酶将长度为 1.5 kb 的 P_{BAD} 启动子及 *Cc FatB1* 基因片段从质粒 pKC9 切

下,插入到质粒 pKC3 的 *Sal* I /*Sph* I 位点之间,得到质粒 pKC6。以质粒 pKC7 为模板,利用引物 pKC9-up 和 pKC9-down 将克隆片段加 A, 连接在 pMD18-T 载体上获得 pKC9。

1.3 菌株的培养

1.3.1 培养基

LB 液体培养基^[16]灭菌后,根据需要加入相应浓度的抗生素 (25 mg/L 氨苄霉素, 25 mg/L 卡那霉素, 17 mg/L 氯霉素)。复合培养基 (2%蛋白胨 (W/V), 1%酵母提取物 (W/V) 和 1%氯化钠 (W/V)) 和化学培养基加入适当的抗生素作为发酵培养基。其中每升化学培养基成分包括 Na₂SO₄ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.268 g, NH₄Cl 0.05 g, K₂HPO₄ 1.46 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.802 g, (NH₄)₂H-Citrate 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, VB1 0.001 g, 甘油 2 mL 及微

表 1 本研究中所用的菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strain/plasmid	Genotype ^a	Source/reference
Mutant strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ <i>endA1 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR phoA supE44</i> Φ80d/ <i>lacZΔM15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁻</i>), λ ⁻	This laboratory
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal</i> (λ <i>c I</i> 857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1 dem</i>) (DE3)	[11]
KC2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>)	[7]
KC3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>) (pMSD8 pMSD15 pXT11)	[7]
YL3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>) (pMSD8 pAL123 pXT11)	This work
YL4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>) (pMSD8 pAL124 pXT11)	This work
KC4	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>) (pKC4 pXT11)	This work
KC6	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>) (pMSD8 pKC6 pXT11)	This work
KC7	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Δ <i>fadE</i>) (pMSD8 pKC7 pXT11)	This work
Plasmids		
pMSD8	pSC101P _{T7} - <i>accBCDA</i> Carb ^r	[11]
pMSD15	p15A P _{BAD} - <i>tesA'</i> Cm ^r	[11]
pXT11	ColE1 P _{T7} - <i>atfA-fadD-pdc-adh</i> Kan ^r	[7]
pSai328	p15A P _{trc} - <i>ucfatb1</i> Amp ^r	Dr. Xinyao Liu
pSai329	p15A P _{trc} - <i>chfatb2</i> Amp ^r	Dr. Xinyao Liu
pAL96	ColE1 P _{trc} Cm ^r	This laboratory
pAL123	ColE1 P _{trc} - <i>ucfatb1</i> Cm ^r	This laboratory
pAL124	ColE1 P _{trc} - <i>chfatb2</i> Cm ^r	This laboratory
pKC3	p15A P _{BAD} - <i>accBCDA-tesA'</i> Cm ^r	This work
pKC4	p15A P _{BAD} - <i>Cc FatB1 -accBCDA-tesA'</i> Cm ^r	This work
pKC6	p15A P _{BAD} - <i>Cc FatB1 - P_{BAD} -accBCDA-tesA'</i> Cm ^r	This work
pKC7	p15A P _{BAD} - <i>Cc FatB1</i> Cm ^r	This work
pXL49	ColE1 P _{BAD} - <i>Cc FatB1</i> Kan ^r	This work
pKC9	ColE1 P _{BAD} - <i>Cc FatB1</i> Amp ^r	This work
Primers		
chTE-up	AACTGGAGAATTTTCGTCGAGTCCC	This work
chTE-down	CCAAGCTTAAGTCCCCAGTATTGG	This work
pKC9-down	GCATGCTTAAACGCTGGACTCAGCCGGAATT	This work
pKC9-up	GTCGACCCGCTTATTTAAAAGCATTCTGTAAC	This work

^a P_{BAD}, P_{trc} and P_{T7} represent s the *araBAD*, *trc* and T7 promoter, respectively; ColE1, p15A and pSC101 represent the replicons of ColE1, p15A and pSC10, respectively; Amp^r: Ampicillin resistance; Cm^r: Chloromycetin resistance; Kan^r: Kanamycin resistance.

量元素 3 mL (CaCl₂ 0.05 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.018 g/L, MnSO₄·H₂O 0.01 g/L, Na₂-EDTA 1 g/L, FeCl₃ 0.8 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.016 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.018 g/L)。化学培养基中作为补料时, 额外添加 7% 甘油、0.2% MgSO₄·7H₂O 和 0.1% (NH₄)₂SO₄。复合培养基作为补料时额外添加 7% 酵母提取物。

1.3.2 摇瓶培养及发酵种子的培养条件

不同重组大肠杆菌在相应抗性的 LB 固体培养基上划线, 30 °C 培养过夜。挑取单克隆于 10 mL LB 液体培养基, 放于摇床中以 200 r/min 在 30 °C 条件下培养 12 h, 用于种子培养。5 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体重悬于 150 mL 灭菌的 LB 培养基中, 200 r/min、30 °C 培养 12 h。普通 250 mL 三角烧瓶, 装 50 mL 液体 LB 培养^[16], 以 5 g/L 甘油为唯一碳源, 加入相应浓度抗生素。菌株生长至 OD₆₀₀ 在 1.5~2 时加入终浓度 0.4% 的阿拉伯糖诱导 P_{BAD} 启动子, 继续培养 1 h 后加入终浓度 0.5 mmol/L 的异丙基-β-D-取代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导 T7 启动子。

1.3.3 发酵培养条件

5 L 发酵罐 (Biostat Bplus, Sartorius) 装液量 3 L。通过自动补加 2 mol/L HCl 或 5 mol/L NaOH 将 pH 值控制在 7.5 左右。通过调节搅拌速度 (200~600 r/min) 保持溶氧量在 20% 左右, 通气量为 2 L/min, 接种量为 5% (V/V)。菌株生长至 OD₆₀₀ 为 5~6, 以 0.3 g/(L·h) 的流加速率, 流加发酵。菌株生长至 OD₆₀₀ 在 8~10 时, 加入终浓度 0.4% 的阿拉伯糖诱导质粒 pMSD15, pKC3 或 pKC4, 继续培养 1 h 后加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导质粒 pMSD8 和 pXT11。不同时间点取样 (~20 mL) 保存在 -80 °C 中, 用于后续脂肪酸乙酯及自由脂肪酸的检测。

1.4 脂肪酸、脂肪酸乙酯及乙醇的定量检测

脂肪酸、脂肪酸乙酯及乙醇的定量检测参照已报道的方法^[7]。

1.5 总脂的提取和检测

取 5 mL 处于平台期的菌液于 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 醋酸, 振荡混匀后加入 20 μg 十九酸或十七酸内标, 再次振荡混匀。加入 20 mL 氯仿: 甲醇 (1:1) 充分混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 取下层有机相转至酯化管中, 氮气吹干。加入 2 mL

的 0.4 mol/L KOH-CH₃OH, 60 °C 水浴处理 1 h。待冷却后加入 4 mL HCl:CH₃OH=1:9 (V/V), 60 °C 水浴处理 20 min。冷却后在酯化管中加入 1~2 mL 正己烷, 3 mL 饱和 NaCl, 尽量轻柔混匀静置几分钟待两相分离后取出上层有机相于气相色谱专用小瓶中。甲酯的气相色谱升温程序和自由脂肪酸的检测程序相同。

2 结果与分析

2.1 表达不同硫酯酶大肠杆菌工程菌株的构建和筛选

将携带不同硫酯酶基因的质粒 pMSD15、pAL123、pAL124 和 pKC7 分别转化菌株 BL21 (DE3) (*ΔfadE*) (pMSD8 pXT11), 获得工程菌株 KC3、YL3、YL4 和 KC7 (表 1), 并在摇瓶条件下发酵培养。其脂肪酸乙酯合成情况如图 1 所示, 重组菌株 KC7 和 KC3 均有大量脂肪酸乙酯产生, KC7 脂肪酸乙酯总产量比过表达来自大肠杆菌的硫酯酶的菌株 KC3 高了 17%, 其 C14 链长的脂肪酸乙酯提高了 1 倍。而另外两个菌株 YL3 和 YL4 可能因为 WS/DGAT 酶的底物选择亲和性限制, 并没有高的脂肪酸乙酯产量产生。

过表达 *tesA* 的菌株 KC3 高效合成了脂肪酸及脂肪酸乙酯, 其合成的脂肪酸碳链长度一般为 16 和 18 碳, 是 WS/DGAT 酶亲和性最佳的反应底物, 有助于脂肪酸乙酯的合成。而过表达 *Cc FatB1* 的菌株 KC7 脂肪酸乙酯的产量达到了 93 mg/L。为了进一步提高菌株稳定性并减少抗生素在菌株发酵中的选择压力, 并通过增加硫酯酶基因的拷贝数以提高硫酯酶

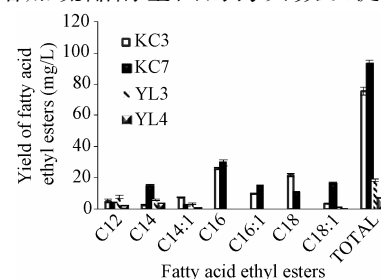


图 1 工程菌株 KC3、YL3、YL4、KC7 摇瓶发酵脂肪酸乙酯产量

Fig. 1 Production of FAEEs with the mutant strains KC3, YL3, YL4 and KC7.

基因表达量, 构建了 *Cc FatB1*、*tesA'*和 *accBCDA* 共表达的质粒 pKC4 和 pKC6。与质粒 pKC4 中 3 个基因均由同一个 P_{BAD} 启动子驱动不同, 质粒 pKC6 中, 一个 P_{BAD} 启动子驱动 *Cc FatB1* 基因, 另一个 P_{BAD} 启动子驱动 *tesA'*和 *accBCDA* 基因的表达。

pKC4、pKC6 转化菌株 BL21 (DE3) ($\Delta fadE$) (pXT11), 获得共表达 *Cc FatB1* 基因和 *tesA'*基因重组菌株 KC4 和 KC6。将这两个菌株与高产脂肪酸和脂肪酸乙酯的菌株 KC3 和 KC7 在相同摇瓶条件下发酵。结果单独过表达 *Cc FatB1* 的菌株 KC7 与单独表达 *tesA'*已知的高产菌株 KC3 总脂产量相比略有优势。菌株 KC4 比菌株 KC3 的脂肪酸及脂肪酸乙酯生产能力相比有明显的提高, 新构建菌株 KC4 的总脂含量 (包括膜脂、游离脂肪酸及其他脂肪酸酰基酯) 达到 898 mg/L, 比 KC3 有将近 1 倍的提高。菌株 KC4 和 KC6 相比, KC4 的硫酯酶基因表达效率更高, 其总脂含量提高了 43%, 游离脂肪酸和脂肪酸乙酯的合成能力也有一定的提高 (图 2)。而在以甘油为唯一碳源摇瓶发酵的条件下, 菌株 KC4 单位合成脂肪酸乙酯的能力 $Y_{FAEE/OD}$ 达 21.4 mg/(L· OD_{600}), C14 的自由脂肪酸和脂肪酸乙酯明显增多, 脂肪酸单位合成达到 29.4 mg/(L· OD_{600}) (图 2)。因此, 选择该菌株作为下一步发酵高产脂肪酸乙酯的重组工程菌株。

2.2 工程菌株 KC4 脂肪酸及脂肪酸乙酯合成能力分析

在 5 L 发酵罐上流加发酵实验进一步验证了菌株 KC4 发酵合成 FAEE 的能力, 并以菌株 KC3 为对照。发酵培养基采用简单合成培养基, 发酵初始以 20 g/L 甘油为唯一碳源, 当初始碳源耗尽, 以 0.3 g/(L·h) 的速率补入 7% 的甘油流加培养基, 整个发酵过程利用甘油共 130 g。与 KC3 相比的发酵结果如图 3 所示, KC4 菌体生长速度明显较快, 发酵 35 h 左右就进入生长稳定期; 过程中得到的乙醇积累量更高, 随着菌体量的增加而增加, 最高达到 2.37 g/L; KC4 发酵过程中产生的 FAEE 总量明显高于 KC3, 发酵 76 h 达到最高量 433 mg/L, 提高了 1.3 倍。生长稳定期时两菌株的菌体量都稳定在 14 左右, KC4 菌株最高菌体单位生物量合成

FAEE 的能力 ($Y_{FAEE/OD}$) 相应比 KC3 提高了 1.4 倍, 达到 31.16 mg/(L· OD_{600})。通过测定发酵过程中不同 OD_{600} 值菌液所对应的单位菌体干重 (DCW), 得到 OD_{600} 与 DCW 换算公式: $DCW=0.495 \times OD_{600}$ 。而将本文 $Y_{FAEE/OD}$ 换算为单位菌体干重的脂肪酸乙酯合成量 ($Y_{FAEE/DCW}$), 可知 KC3 菌株的 $Y_{FAEE/DCW}$ 达到 26.23 mg/g, KC4 菌株的 $Y_{FAEE/DCW}$ 为 62.94 mg/g。

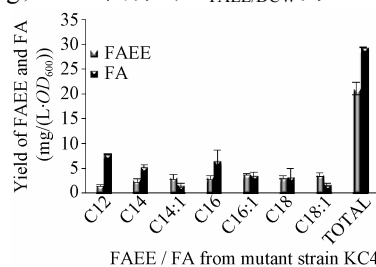


图 2 工程菌株 KC4 摇瓶发酵的脂肪酸 (FA) 与脂肪酸乙酯 (FAEE) 产量

Fig. 2 Production of free fatty acids and fatty ethyl esters from mutant strains KC4 in flask fermentation.

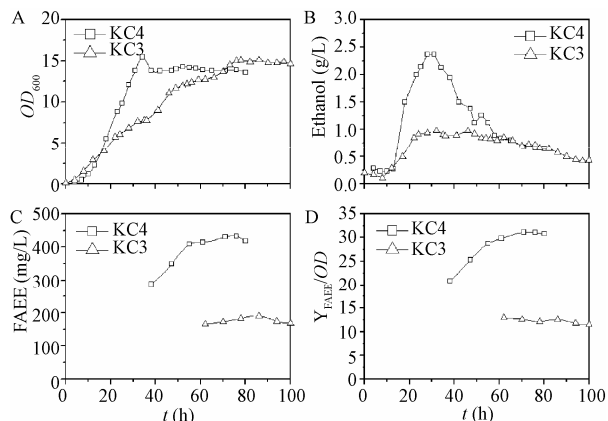


图 3 工程菌株 KC4 与 KC3 罐上发酵过程曲线

Fig. 3 Time-courses of cell growth (A), ethanol accumulation (B), FAEE production (C), and yield coefficient of FAEE production on biomass (D) under glycerol feeding fed-batch of mutant strains KC4 and KC3.

3 结论

作者研究了 4 种不同来源的硫酯酶对脂肪酸乙酯合成的影响, 发现大肠杆菌来源的 *tesA'* 基因和香樟树来源 *Cc FatB1* 硫酯酶可有效提高脂肪酸乙酯的产量。通过进一步基因工程改造和整合, 最终得到了高产脂肪酸乙酯的基因工程菌株 KC4。在相同发酵条件下 (均以甘油为唯一碳源发

醇), 比较菌株 KC3 和 KC4 脂肪酸乙酯产量, 菌株 KC4 的总脂肪酸乙酯产量达到 433 mg/L, 比同条件下发酵的菌株 KC3 的脂肪酸乙酯产量提高了 1.3 倍。KC4 菌体单位合成 FAEE 的能力达到 31.16 mg/(L·OD₆₀₀), 换算为 Y_{FAEE/DCW} 达到 62.94 mg/g。比相同发酵条件下菌株 KC3 菌体的单位生物量合成 FAEE 的能力提高了 1.4 倍。

以菌株 KC3 为对照, 工程菌株 KC4 进一步提高了大肠杆菌体内从头合成生产脂肪酸乙酯的能力, 实现了利用目前生物柴油产业副产物甘油发酵生产回到生物柴油的设计构想。对减少发酵成本以及基因工程改造大肠杆菌从头合成发酵产品具有借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Tarabet L, Loubar K, Lounici MS, et al. Eucalyptus biodiesel as an alternative to diesel fuel: preparation and tests on DI diesel engine. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 235485.
- [2] Gullison RE, Frumhoff PC, Canadell JG, et al. Tropical forests and climate policy. *Science*, 2007, 316(5827): 985–986.
- [3] Kerr, Richard A. Global warming is changing the world. *Science*, 2007, 316(5822): 188–190.
- [4] Campbell JE, Lobell DB, Genova RC, et al. The global potential of bioenergy on abandoned agriculture lands. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(15): 5791–5794.
- [5] Röttig A, Wenning L, Bröker D, et al. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(6): 1713–1733.
- [6] Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 9): 2529–2536.
- [7] Duan Y, Zhu Z, Cai K, et al. De novo biosynthesis of biodiesel by *Escherichia coli* in optimized Fed-Batch cultivation. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e20265.
- [8] Yu KO, Jung J, Kim SW, et al. Synthesis of FAEEs from glycerol in engineered *Saccharomyces cerevisiae* using endogenously produced ethanol by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(1): 110–115.
- [9] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463(7280): 559–562.
- [10] Davis MS, Solbiati J, Cronan JE Jr. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28593–28598.
- [11] Lu X, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 333–339.
- [12] Voelker TA, Davies HM. Alteration of the specificity and regulation of fatty-acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. *J Bacteriol*, 1994, 176(23): 7320–7327.
- [13] Dehesh K, Jones A, Knutzon DS, et al. Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of *Ch FatB2*, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *Plant J*, 1996, 9(2): 167–172.
- [14] Yuan L, Voelker TA, Hawkins DJ. Modification of the substrate-specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(23): 10639–10643.
- [15] Liu X, Sheng J, Curtiss R 3rd. Fatty acid production in genetically modified *Cyanobacteria*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6899–6904.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: CSHL Press, 1989.

(本文责编 陈宏宇)