

谷氨酸棒杆菌脂肪酸合成酶 *fasA* 基因的异源表达 对脂肪酸合成的影响

金晶晶, 孙子羽, 满都拉, 刘瑾, 胡晨玥, 陈忠军

(内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要:旨在为脂肪酸高产菌株的筛选和构建奠定理论基础, 研究谷氨酸棒杆菌脂肪酸合成酶 A (FasA) 对大肠杆菌脂肪酸合成的影响, 利用生物信息学软件预测分析了 FasA 的性质并构建过表达载体 pXMJ19-*fasA*, 转化至大肠杆菌进行表达, 对表达诱导剂异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 浓度进行考察, 并测定了异源表达后的脂肪酸组成。结果表明, 重组菌株在 IPTG 浓度为 1 mmol/L 下诱导 20 h, 棕榈油酸和油酸产量分别达到 1.735、2.325 mg/g, 与对照菌株相比分别提高了 53.95% 和 59.68%。研究结果说明 FasA 对大肠杆菌合成棕榈油酸和油酸有促进作用。

关键词:脂肪酸合成酶; 谷氨酸棒杆菌; 棕榈油酸; 油酸; 异源表达

中图分类号: TE667; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)04-0094-06

Effect of heterologous expression of *fasA* gene of *Corynebacterium glutamicum* fatty acid synthase on fatty acid synthesis

JIN Jingjing, SUN Ziyu, MAN Dula, LIU Jin, HU Chenyue, CHEN Zhongjun

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: In order to lay a theoretical foundation for screening and constructing fatty acid high-yielding strains, the effects of *Corynebacterium glutamicum* fatty acid synthase A (FasA) on the synthesis of fatty acids in *E. coli* were studied, the properties of FasA were predicted and analyzed using bioinformatics software, moreover the overexpression vector pXMJ19-*fasA* was constructed and transformed into *E. coli* for expression, the concentration of expression inducer isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) was investigated and the fatty acid composition after heterologous expression was determined. The results showed that when the recombinant strain was induced under the IPTG concentration of 1 mmol/L for 20 h, the yield of palmitoleic acid and oleic acid reached 1.735, 2.325 mg/g, which increased by 53.95% and 59.68% respectively compared with the control strain. These results indicate that FasA can promote the synthesis of palmitoleic acid and oleic acid by *E. coli*.

Key words: fatty acid synthase; *Corynebacterium glutamicum*; palmitoleic acid; oleic acid; heterologous expression

脂肪酸广泛分布于动植物、细菌和真菌组织中, 是细胞膜、信号分子和能量库的关键组分^[1-2]。目

前, 脂肪酸特别是油酸^[3]和棕榈油酸是生产生物柴油的理想原料, 可以缓解人们日益增长的能源需求与化石能源短缺的问题。

利用微生物生产脂肪酸是一种环境友好型方法, 而大肠杆菌作为相对通用的宿主, 具有活性强、复制速度快、遗传稳定的特点, 是生物合成脂肪酸常用的微生物^[4]。大肠杆菌使用 II 型脂肪酸合成酶系统 (FAS II) 催化合成脂肪酸, 其特点是脂肪酸合成酶以没有酶活性的酰基载体蛋白 (ACP) 为中心,

收稿日期: 2022-03-17; 修回日期: 2022-10-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31860439)

作者简介: 金晶晶 (1996), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术 (E-mail) 15048229065@163.com。

通信作者: 陈忠军, 教授, 博士生导师 (E-mail) nmndchen@126.com。

每一步生化反应都由独立的酶催化完成。大肠杆菌合成产物中油酸产量较少,而提高油酸合成能力对其为生产生物柴油提供原料具有重要意义。目前提高大肠杆菌脂肪酸合成能力的一个主要手段是异源过表达脂肪酸合成途径中的关键基因。

谷氨酸棒杆菌作为一种模式菌株,具有易培养、繁殖快、安全性高等特点,近年来成为脂肪酸生物合成中的研究热点。谷氨酸棒杆菌中脂肪酸合成反应由多功能复合蛋白脂肪酸合成酶 FasA 和 FasB 的不同结构域催化完成,即由 I 型脂肪酸合成酶系统 (FAS I) 催化完成^[5]。在谷氨酸棒杆菌的 FAS I 中, FasA 和 FasB 分别由基因 *fasA*、*fasB* 编码,*fasA* 的表达量远高于 *fasB*, FasA 主要催化产生油酸,是谷氨酸棒杆菌脂肪酸从头合成的关键酶, FasB 从属于 FasA,主要合成棕榈油酸^[6-7]。因此,本文尝试将谷氨酸棒杆菌脂肪酸合成酶 *fasA* 基因在大肠杆菌中进行异源表达以提高大肠杆菌油酸产量。考虑到目前对于 FasA 的具体理化特性和结构信息尚未见报道,且调控 FasA 促进脂肪酸合成的研究较少,本文首先利用生物信息学分析 FasA 的理化性质和结构特征,确定其在基因水平上的可操作性,在此基础上,采用大肠杆菌作为宿主菌株构建 *fasA* 重组载体,实现了在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中异源表达,通过对比异源表达前后菌株的脂肪酸组成,考察 *fasA* 基因对脂肪酸合成的影响,以确定是否达到提高脂肪酸合成的目的,为后续脂肪酸合成相关基因筛选、整合优化,适配上下游代谢模块,最终构建脂肪酸高产菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 感受态细胞、DH5 α 感受态细胞,昂羽公司;表达质粒 pXMJ19,本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂

DNA Marker、高保真酶聚合酶、限制内切酶、无缝克隆试剂盒,大连宝日医生物公司;基因组提取试剂盒、PCR 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,北京天根生化科技公司;高分子质量蛋白 Marker,上海赛默飞世尔科技公司;异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、氯霉素,北京索莱宝公司;脂肪酸甲酯标准品,上海麦克林生化试剂公司;其余试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基

摇瓶种子培养基及发酵培养基均采用 Luria -

Bertani (LB) 培养基 (酵母提取粉 5 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L, pH 7.2), 并添加终质量浓度为 50 μ g/mL 的氯霉素。

1.1.4 仪器与设备

高速冷冻离心机,上海知信实验仪器有限公司;PCR 扩增仪,杭州博日科技有限公司;电泳仪,北京市六一生物科技有限公司;凝胶成像仪,德国耶拿公司;超微量分光光度计,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;超声破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;冷冻干燥机,河南兄弟仪器设备有限公司;气质联用仪,安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

利用在线分析软件 ProtParam 分析 FasA 蛋白分子结构式、分子量、理论等电点、亲水性和稳定性等一系列理化性质。利用在线分析软件 NovoPro 预测分析 FasA 是否存在跨膜结构。利用在线分析软件 DeepLoc - 1.0 分析亚细胞定位。利用 NCBI 中的 Conserved Domain Search 分析 FasA 蛋白结构域。运用 STRING 数据库对 FasA 蛋白的调控作用关系网络进行分析。

1.2.2 目的基因扩增

根据 *fasA* 基因 (基因编号 Cgl0836 和 NCgl0802) 和 pXMJ19 质粒的基因序列,设计重组表达 *fasA* 的上下游引物:P1 为 5' - ATTAAGCTTGCAT GCCTGCAGGTGAGTATTTCTTCACTGACACCGC - 3'; P2 为 5' - GGTACCCGGGGATCCTCTAGAAGCTTTCT TAGCTATCTAACGTTTAGCC - 3'。以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的基因组为模板,PCR 扩增得到 *fasA* 基因。PCR 反应体系 (50 μ L): 上下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 10 μ L, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1 μ L, ddH₂O 32 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预热 1 min, 98 $^{\circ}$ C、10 s, 68 $^{\circ}$ C、15 s, 56 $^{\circ}$ C、9 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增的目的基因进行回收纯化。

1.2.3 重组质粒构建

使用 Pst I 酶和 Xba I 酶对质粒 pXMJ19 进行酶切并胶回收,酶切程序为 37 $^{\circ}$ C/2 h、70 $^{\circ}$ C/15 min。根据无缝克隆试剂盒计算回收的质粒和纯化的 *fasA* 基因添加量,于冰上配制体系:*fasA* 基因 1.5 μ L, 线性载体 3.5 μ L, 5X In - Fusion HD Enzyme Premix 7.5 μ L, ddH₂O 2.5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜,第 2 天 50 $^{\circ}$ C、15 min。转化至 DH5 α 感受态细胞,涂布于含氯霉素的 LB 平板培养基 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取若干个克

降至含氯霉素的液体 LB 培养基中培养过夜,提取质粒进行酶切与测序验证。引物合成与克隆质粒测序由上海生工生物科技有限公司完成。

1.2.4 工程菌株的筛选与表达

将构建好的重组质粒采用热激法转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,在添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 琼脂平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取转化子使用引物 FasA - F (5' - GTCGTCTCCAGAAAGTCCCTTACCG - 3')、FasA - R (5' - ATAAGGGCGACACGGAAATG - 3') 进行菌落 PCR 鉴定,将阳性转化子接种至 5 mL 含氯霉素的 LB 培养基中培养过夜,次日接种至 50 mL 含氯霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8,添加 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 16 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体沉淀,PBS 缓冲液洗脱 3 次后复溶,使用超声波破碎法制备细胞蛋白提取物,超声条件:400 W,工作 3 s,间隔 3 s,时间 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min 收集菌体上清液,用于 SDS - PAGE 分析。SDS - PAGE 分析条件:使用 3% ~ 8% 的 Tris - 乙酸胶,取 15 μL 混合后的蛋白样品上样,150 V 电压运行 1 h。

1.2.5 脂肪酸的测定

将 1.2.4 中阳性转化子接种至 5 mL 含氯霉素的 LB 培养基中,培养过夜,次日按 2% 接种量接种至 100 mL 含氯霉素的 LB 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.6,加入 1.0 mol/L 的 IPTG 诱导 20 h。冰浴 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液收集菌体沉淀,PBS 缓冲液洗脱 3 次后进行真空冷冻干燥处理。称取 50 mg 冻干菌粉于玻璃提脂瓶中,加入 2 mL 10% 盐酸甲醇溶液,振荡混合均匀,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h,每隔 0.5 h 振荡混合,全程防止漏气。冷却后分别加入 2 mL 正己烷和饱和氯化钠离心收取上清液,于氮气气流下挥发有机溶剂,加入 10 μL 三硅烷基重氮甲烷和 400 μL 甲醇以补充甲酯化,准确加入 1 mL 正己烷溶解脂肪酸甲酯,用有机滤膜过滤后密封,利用气相色谱 - 质谱联用仪(GC - MS)运用外标法进行测定。实验做 3

组平行,各脂肪酸含量按下式计算。

$$X = CV/m \times 10^{-6} \quad (1)$$

式中: X 为被测组分含量,mg/g; C 为被测组分溶液质量浓度,ng/mL; V 为试样溶液定容体积,mL; m 为试样溶液代表的试样质量,g。

2 结果与讨论

2.1 生物信息学分析

在线分析软件 ProtParam 显示:FasA 分子式为 C₁₃₉₄₄H₂₂₀₆₇N₃₈₅₅O₄₃₅₃S₅₅,分子质量为 315 128.12 Da,理论等电点为 4.74,脂溶指数为 95.27,不稳定指数为 31.34,此蛋白为稳定蛋白,由 2 969 个氨基酸组成;疏水性氨基酸总平均亲水性(GRAVY)为 2.900,亲水性氨基酸 GRAVY 为 -2.911,GRAVY 绝对值越高表明亲水性越强,因此 FasA 蛋白为亲水性蛋白。NovoPro 进一步预测分析显示 FasA 没有跨膜结构域,不属于分泌蛋白。DeepLoc - 1.0 软件结果显示 FasA 的亚细胞定位分布于细胞质中,是可溶性蛋白。综上,初步确定 FasA 蛋白是定位于细胞质中的可溶性大型复合酶。

结构域是位于超二级结构间和三级结构的一个层次。利用 NCBI 中的 Conserved Domain Search 数据库进行预测分析,FasA 蛋白拥有 6 个结构域(图 1):酰基转移酶结构域;酵母型 FAS I 的烯酰还原酶结构域(COG4981);酵母型 FAS I 的 3 - 氧代酰基 - ACP 还原酶结构域(FabG);3 - 氧代酰基 - ACP 合成酶结构域(FabB),属于催化(脱羧或非脱羧类)克莱森缩合反应的酶家族(c109938)成员;丙二酰辅酶 A - ACP 转酰基酶结构域(FabD)以及热狗结构域。

热狗结构域最初是在大肠杆菌 β - 羟基酰基 - ACP 脱水酶(FabA)结构中鉴定得到,属于 c100509 家族,作为该家族成员,FabA 用于催化脂肪酸延伸的连续循环^[8],FabA 具有双重功能,能与 ACP 结合催化脱水以及催化反式 - 2 - 酰基 - ACP 异构化为顺式 - 3 - 酰基 - ACP,后者是合成不饱和脂肪酸的关键步骤。在 FasA 结构域预测分析中,发现两处热狗折叠结构域的活性位点 FAS_MaoC(active site 1,2)。

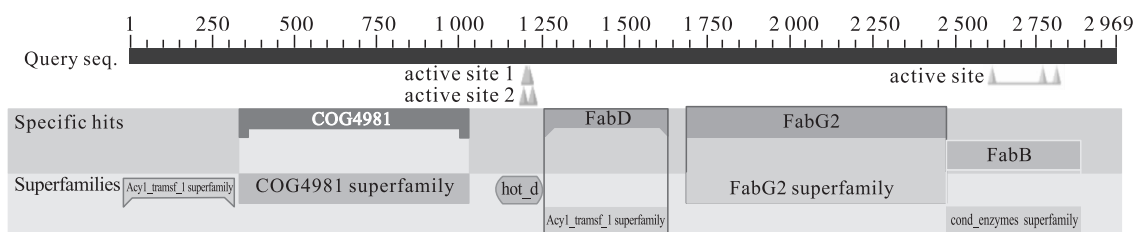
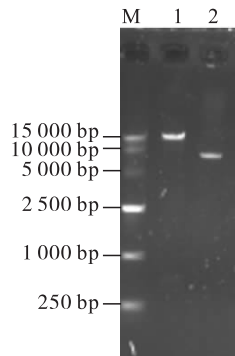


图 1 FasA 保守结构域示意图

2.2 重组质粒的构建

按照 1.2.2 和 1.2.3 中所设计的引物及质粒构建方法构建重组质粒 pXMJ19-*fasA*, 其酶切结果见图 2。由图 2 可知, 重组质粒经过 Xba I 酶切验证, 在 15 000 bp 左右形成条带, 对测序结果进行比对分析发现未发生突变, 表明重组质粒 pXMJ19-*fasA* 构建成功。

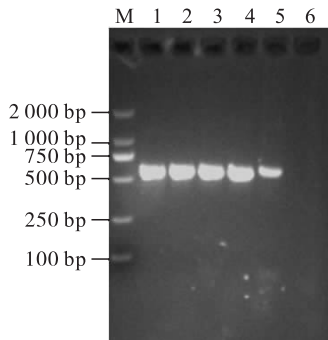


注: M. DNA Marker; 1. 质粒 pXMJ19-*fasA*; 2. 质粒 pXMJ19

图 2 pXMJ19-*fasA* 重组质粒的酶切结果

2.3 工程菌株的筛选与表达

将重组质粒 pXMJ19-*fasA* 采用热激法转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取转化子经过菌落 PCR 验证, 发现其与阳性对照 (PXMJ19-*fasA*) 条带大小相符, 且阴性对照 [BL21 (DE3)] 无条带 (见图 3), 表明重组菌株构建成功, 命名为 pXMJ19-*fasA*/BL21 (DE3)。



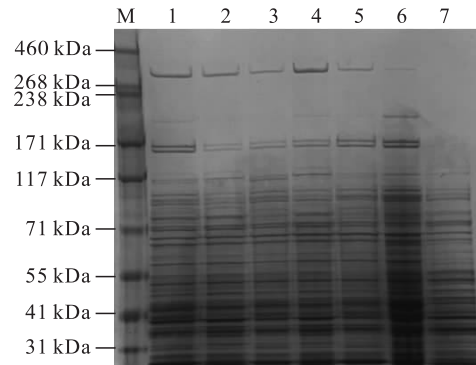
注: M. DNA Marker; 1~4. 转化子的 PCR 鉴定结果; 5. 阳性对照; 6. 阴性对照

图 3 转化子的 PCR 鉴定

2.4 IPTG 诱导浓度的优化

最适的 IPTG 诱导浓度可以提高基因的表达水平, 抑制包涵体的产生。将 pXMJ19-*fasA*/BL21 (DE3) 接种到 LB 培养基后按 1.2.4 方法培养, 不同浓度 IPTG 诱导 16 h 的菌体上清液的 SDS-PAGE 结果如图 4 所示。由图 4 可看出, 重组菌株 pXMJ19-*fasA*/BL21 (DE3) 与空载对照 [PXMJ19/BL21 (DE3)] 相比, 在约 315 kDa 处有 1 条明显特征条带, 表明基因 *fasA* 编码的 FasA 在大肠杆菌中成

功表达, 且 1 mmol/L IPTG 诱导下 FasA 蛋白条带最为明显。因此, 选择最佳的 IPTG 诱导浓度为 1 mmol/L。



注: M. 高分子量蛋白 Marker; 1~6. IPTG 诱导浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1、1.25、0 mmol/L 的 pXMJ19-*fasA*/BL21 (DE3); 7. pXMJ19/BL21 (DE3)

图 4 IPTG 诱导浓度对基因表达量的影响

2.5 脂肪酸的测定

按 1.2.5 方法测定菌株 pXMJ19-*fasA*/BL21 (DE3) 胞内脂肪酸组成及产量, 结果见表 1。由表 1 可知, 重组菌株与对照菌株的脂肪酸组成大致相同, 但相比于对照菌株, 重组菌株的棕榈油酸 (C16:1) 和油酸 (C18:1) 含量显著增加 ($p < 0.05$), 分别较对照菌株提高了 53.95% 和 59.68%。说明 *fasA* 基因的过表达显著增加了菌株胞内棕榈油酸和油酸的产量。

fasA 编码的蛋白主要用于合成分支菌酸^[9-11], 分支菌酸是长链 α -烷基- β -羟基化脂肪酸 (R-CH(OH)-CH(R')-COOH), R 代表具有附加结构修饰的最多含 56 碳的分枝杆菌酸链 (Meromycolate chain), R' 表示最多含 26 碳的较短的脂肪族分支链 (Aliphatic branch), 这两条链通过克莱森缩合酶进行缩合, 还原生成分支菌酸^[12], 在谷氨酸棒杆菌体内, R 和 R' 代表了脂质的最简单形式, 比如两个 C18:1 分子缩合在一起, 还原成 C36:2 分枝菌酸和两种 C16 脂肪酸组成的 C32 分枝菌酸^[11-13]。大肠杆菌不具备合成分支菌酸的能力, 所以 *fasA* 基因在大肠杆菌中的异源表达可以促进菌体合成油酸。

FasA 结构域中的 FabB (结合位点 cd00828) 属于催化 (脱羧或非脱羧类) 克莱森缩合反应的酶家族 cl09938 成员。在大肠杆菌脂肪酸合成系统中, FabB 和 FabF 通过丙二酰-ACP 与酰基-ACP 的克莱森缩合以完成不饱和脂肪酸的生产, 其中 FabB 负责催化延伸循环步骤以生成棕榈油酸^[14-15], 从而造成重组菌株中棕榈油酸含量的增加。Kassab 等^[16] 在大肠杆菌中表达植物来源的 FabB 与 FabF

也同样发现,重组菌株中油酸和棕榈油酸的产量得到了大幅提升。

由表 1 还可知,与对照菌株相比,工程菌株 pXMJ19 - *fasA*/BL21 (DE3) 的总脂肪酸含量略微降低。Baron 等^[17] 研究证明,大肠杆菌自身的 AcpS 不能完全激活结核分枝杆菌体内的脂肪酸合成酶 Fas I, 导致其活性很低。FasA 与 Fas I 具有很高的同源性^[18], 在结核分枝杆菌中, AcpS 蛋白由 *acpS* 基因编码, 4'-磷酸泛氨酸(4'-PP) 基因在 4'-PP 转移酶的催化下, 从 CoA 转移至 ACP 激活 Fas I 结构域。同时, 细胞中脂肪酸的合成不仅受到自身的严格调控, 还需要更多的底物与能量支持, 酶的活性也与代谢物的产量直接相关^[19]。

表 1 大肠杆菌脂肪酸组成及含量 mg/g

| 脂肪酸 | pXMJ19/BL21 (DE3) | pXMJ19 - <i>fasA</i> /BL21 (DE3) |
|-------|-----------------------------|----------------------------------|
| C12:0 | 0.589 ± 0.018 ^a | 0.517 ± 0.026 ^b |
| C14:0 | 0.972 ± 0.024 ^a | 0.851 ± 0.026 ^b |
| C15:1 | 2.739 ± 0.126 ^a | 2.286 ± 0.165 ^b |
| C16:0 | 1.352 ± 0.007 ^a | 1.291 ± 0.045 ^b |
| C16:1 | 1.127 ± 0.102 ^b | 1.735 ± 0.154 ^a |
| C17:1 | 2.442 ± 0.255 ^a | 1.857 ± 0.073 ^b |
| C18:1 | 1.456 ± 0.196 ^b | 2.325 ± 0.138 ^a |
| C21:0 | 0.370 ± 0.045 ^a | 0.281 ± 0.034 ^a |
| 合计 | 12.646 ± 0.865 ^a | 12.097 ± 0.600 ^a |

注:同行不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)

3 结论

本研究实现了谷氨酸棒杆菌 *fasA* 基因在大肠杆菌体内的异源表达, 证明了 FAS I 型脂肪酸合成酶可以在大肠杆菌天然的 FAS II 系统中发挥功能, 外源酶与大肠杆菌自身的 FAS 系统具有兼容性, 切实增加了油酸和棕榈油酸的产量。本研究为后续其他关键基因筛选、共表达关键基因、整合优化代谢途径, 适配上下游代谢模块, 最终构建脂肪酸高产菌株提供了理论依据。

参考文献:

[1] ANGENENT L T, SPORITO C M, ANGENENT L T, et al. High *n*-caprylate productivities and specificities from dilute ethanol and acetate; chain elongation with microbiomes to upgrade products from syngas fermentation[J]. *Energ Environ Sci*, 2016, 9:3482-3494.

[2] 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(7280):559-562.

[3] 卫冶金, 李晓, 王皓楠. 高产油小球藻的低温等离子体诱变育种[J]. *中国油脂*, 2019, 44(7):6-11.

[4] MAGNUSON K, JACKOWAKI S, ROCK C O, et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57(3):522-542.

[5] IKEDA M, NAGASHIMA T, NAKAMURA E, et al. In vivo roles of fatty acid-biosynthetic enzymes in biosynthesis of biotin and α -lipoic acid in *Corynebacterium glutamicum* [J/OL]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(19):e01322-17[2022-03-17]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01322-17>.

[6] STUIBLE H P, WAGNER C, ANDREOU I, et al. Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in *Brevibacterium ammoniagenes*[J]. *J Bacteriol*, 2018, 196, 178(16):4787-4793.

[7] RADMACHER E. Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Microbiology*, 2005, 151(7):2421-2427.

[8] TAKENO S, TAKASAKI M, URABAYASHI A, et al. Development of fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(21):6775-6783.

[9] CAO Y, YANG J, XIAN M, et al. Increasing unsaturated fatty acid contents in *Escherichia coli* by coexpression of three different genes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(1):271-280.

[10] SIGLER P B, XU Z, RYE H S, et al. Structure and function in GroEL-mediated protein folding [J]. *Ann Rev Biochem*, 1998, 67(1):581-608.

[11] GANDE R, GIBSON K J C, BROWM A K, et al. Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacterianae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(43):44847-44857.

[12] KREMER L, DOUGLAS J D, BAULARD A R, et al. Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22):16857-16864.

[13] LANÉLLE M A, TROPIS M, DAFFÉ M. Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(23):9923-9930.

[14] LEE S, JEON E, YUN H S, et al. Improvement of fatty acid biosynthesis by engineered recombinant *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16(4):706-713.

[15] BELD J D, LEE D J, BURKART M D. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(1):38-59.

(下转第 104 页)

- [5] 张琴. 核桃内生细菌发酵棉籽水解糖液产油及其代谢基础分析 [D]. 杭州:浙江大学, 2015.
- [6] 李洁琼. 粘红酵母乙酰辅酶 A 羧化酶基因的克隆及表达 [D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
- [7] DAVIS M S, SOLBIATI J, CRONAN J E, et al. Overproduction of acetyl - CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28593 - 28598.
- [8] XIE W H, PANG F, NIU Y F, et al. Functional characterization of an ACCase subunit from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2013, 60(3): 330 - 335.
- [9] YOU S K, JOO Y C, KANG D H, et al. Enhancing fatty acid production of *Saccharomyces cerevisiae* as an animal feed supplement [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(50): 11029 - 11035.
- [10] HAN X, ZHAO Z, WEN Y, et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by overexpression of ATP - citrate lyase and acetyl - CoA carboxylase in *Schizochytrium* sp. [J/OL]. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13(1): 131[2022 - 02 - 25]. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01767-z>.
- [11] 王伏林, 郎春秀, 刘仁虎, 等. 大肠杆菌乙酰辅酶 A 羧化酶 *accD* 亚基表达载体的构建及遗传转化研究 [J]. *核农学报*, 2011, 25(6): 1129 - 1134.
- [12] MADOKA Y, TOMIZAWA K, MIZOI J, et al. Chloroplast transformation with modified acid operon increases acetyl - CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(12): 1518 - 1525.
- [13] MARINI P, LI S J, GARDIOL D, et al. The genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase subunits of *Bacillus subtilis* acetyl coenzyme A carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(23): 7003 - 7006.
- [14] 王力伟, 赵沛义, 王朝, 等. 梭梭 *HabHLH74* 转录因子基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2020, 41(5): 13 - 18.
- [15] MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796 - 802.
- [16] LIU D, XIAO Y, EVANS B S, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl - CoA sensor - actuator [J]. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(2): 132 - 140.
- [17] LIU W S, ZHANG B R, JIANG R. Improving acetyl - CoA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via the overexpression of pantothenate kinase and PDH bypass [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10(1): 1 - 9.
- [18] FERNANDEZ - MOYA R, DA SILVA N A. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for high - level synthesis of fatty acids and derived products [J]. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(7): 1 - 15.
- [19] MILKE L, MARIENHAGEN J. Engineering intracellular malonyl - CoA availability in microbial hosts and its impact on polyketide and fatty acid synthesis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(14): 6057 - 6065.
-
- (上接第 98 页)
- [16] KASSAB E, FUCHS M, HAACK M, et al. Engineering *Escherichia coli* FAB system using synthetic plant genes for the production of long chain fatty acids [J/OL]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 163[2022 - 03 - 17]. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1217-7>.
- [17] BARON S, PELEG Y, GRUNWALD J, et al. Expression of a recombinant, 4' - Phosphopantetheinylated, active *M. tuberculosis* fatty acid synthase I in *E. coli* [J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0204457[2022 - 03 - 17]. <https://doi.org/10.1101/400622>.
- [18] ORLY D, ALBECK S, PELEG Y, et al. Structure - function analysis of the acyl carrier protein synthase (AcpS) from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Mol Biol*, 2009, 393(4): 937 - 950.
- [19] DENG X, CHEN L, HEI M, et al. Structure - guided reshaping of the acyl binding pocket of "TesA thioesterase enhances octanoic acid production in *E. coli* [J]. *Metab Eng*, 2020, 61: 24 - 32.