

产油核桃内生细菌乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因克隆及优化表达

许思远,张永贵,赵沛,曹娟娟,张琴

(安徽工程大学生物与食品工程学院,安徽芜湖 241000)

摘要:为了探究细菌异质性乙酰辅酶 A 羧化酶 β 亚基生物活性及其对乙酰辅酶 A 羧化酶酶活影响,以高产油核桃内生细菌 *B. subtilis* HB1310 基因组 DNA 为模板,利用 PCR 技术扩增其乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶 β 亚基(β -CT)基因(*acb* 基因),构建 pET-28a-*acb* 载体并在 *E. coli* BL21 中表达,进一步对乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因的诱导表达条件进行了优化。结果表明:乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因在 *E. coli* BL21 中实现了表达,分子质量在 25~35 kDa 之间;重组蛋白最佳诱导表达条件为诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)浓度 1.0 mmol/L、诱导时间 6 h、诱导初始 pH 8.0,在此条件下工程菌的乙酰辅酶 A 羧化酶活性可达(4.11±0.03) U/mL,较野生菌提高 39.7%。综上,乙酰辅酶 A 羧化酶 β -CT 为具有较好生物活性的乙酰辅酶 A 羧化酶亚基。

关键词:核桃内生细菌;产油;乙酰辅酶 A 羧化酶;克隆;优化表达

中图分类号:Q78;TS222.1

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2023)04-0099-06

Cloning and expression optimization of acetyl-CoA carboxylase *acb* gene from oil-producing walnut endophyte

XU Siyuan, ZHANG Yonggui, ZHAO Pei, CAO Juanjuan, ZHANG Qin

(College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: To explore the biological activity of the bacterial heterogeneous acetyl-CoA carboxylase β subunit and its influence on the acetyl-CoA carboxylase activity, the acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit *beta*(β -CT) gene (*acb* gene) was amplified by PCR technology using the genomic DNA of a high oil-producing walnut endophyte *B. subtilis* HB1310 as template, the expression vector pET-28a-*acb* was constructed and expressed in *E. coli* BL21, and the induced expression conditions of this *acb* gene were further optimized. The results showed that the acetyl-CoA carboxylase *acb* gene was expressed in *E. coli* BL21 with a molecular weight of 25-35 kDa. Moreover, the optimal induced expression conditions were determined as follows: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration 1.0 mmol/L, induction time 6 h, and induction initial pH 8.0. Under the optimal conditions, the acetyl-CoA carboxylase activity of the engineering bacteria reached (4.11±0.03) U/mL, which was 39.7% higher than that of the wild bacteria. In conclusion, acetyl-CoA carboxylase β -CT is an acetyl-CoA carboxylase subunit with good biological activity.

Key words: walnut endophyte; oil-producing; acetyl-CoA carboxylase; cloning; expression optimization

收稿日期:2022-02-25;修回日期:2022-12-07

基金项目:国家自然科学基金(21666034);安徽工程大学中青年拔尖人才计划(S022019014)

作者简介:许思远(1998),女,硕士研究生,研究方向为微生物发酵与代谢工程(E-mail) 2656291897@qq.com。

通信作者:张琴,教授,博士(E-mail) jhtabszq@163.com。

脂肪酸是所有生物体必需成分,同时在膜的生物发生、脂质合成和信号传导等生物过程中发挥重要作用^[1-2]。另外,脂肪酸和脂肪酸衍生物,如脂肪醇、脂肪酸甲酯、脂肪酸乙酯、烯炔等,是合成生物燃料、润滑剂、香水、塑料和其他产品的重要化学品^[3]。

细菌作为潜在的产油微生物具有生长周期短、占地面积小、不需要农业用地以及不受气候影响等优点^[4]。推进细菌的脂质研究,全面了解其关键酶基因功能至关重要。张琴^[5]在核桃中筛选出一株高产油核桃内生细菌枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) HB1310,其脂质含量可达到干质量的30%以上。乙酰辅酶A羧化酶是催化脂肪酸从头合成的第一个步骤^[6],因此通常被认为是脂肪酸生物合成中的限速步骤^[7]。乙酰辅酶A羧化酶按照亚基类型主要分为同质型和异质型。同质型乙酰辅酶A羧化酶可提高脂肪酸含量^[2,8-10];而对异质性乙酰辅酶A羧化酶的研究多集中于大肠杆菌^[7,11]和产油植物中^[12],在其他产油细菌中的研究相对较少。高产油核桃内生细菌乙酰辅酶A羧化酶属于异质型乙酰辅酶A羧化酶,由3个功能亚基组成:生物素羧基载体蛋白(BCCP)、生物素羧化酶(BC)和羧基转移酶(CT)^[13]。目前对高产油核桃内生细菌功能基因研究较少,对其脂肪酸合成途径中关键酶的协调过程尚不清晰。本研究克隆了高产油核桃内生细菌*B. subtilis* HB1310乙酰辅酶A羧化酶 β -CT亚基(*acb*)基因,将其在大肠杆菌中诱导表达,并对诱导表达条件进行优化,以期为*B. subtilis* HB1310乙酰辅酶A羧化酶 β 亚基的功能研究提供参考。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒

克隆质粒 pUCm - T, 表达质粒 pET - 28a; *B. subtilis* HB1310, 大肠杆菌(*E. coli*) 克隆宿主 DH5 α 、表达宿主 BL21。

1.1.2 试剂和材料

限制性核酸内切酶(EcoR I, Xho I)、T4 DNA ligase 试剂盒、DNA Marker, Takara 公司; 蛋白质 Marker、细菌基因组提取试剂盒、PCR Master Mix、PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒、T 载体 PCR 产物克隆试剂盒、质粒提取试剂盒、细菌总蛋白提取试剂盒、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素、卡那霉素、新型一步法快速 WB 通用试剂盒、硝酸纤维印迹膜(NC 印迹膜)、小鼠 6 \times His 单克隆抗体, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 乙酰辅酶A羧化酶试剂盒, 苏州科铭生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基(pH 7.0): 胰蛋白胍 10 g/L, 酵母抽提物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L。根据需要使用添加卡那霉素终质量浓度至 30 μ g/mL, 氨苄青霉素的终质量浓度为 20 μ g/mL。

1.2 实验方法

1.2.1 乙酰辅酶A羧化酶 *acb* 基因克隆载体的构建与转化

使用细菌基因组提取试剂盒提取 *B. subtilis* HB1310 基因组 DNA, 以 *B. subtilis* HB1310 基因组 DNA 为模板, 并采用表 1 所列引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3.5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52~68 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。在 DNA 序列中添加 EcoR I 和 Xho I 酶切位点, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证正确后将其回收。使用 T 载体 PCR 产物克隆试剂盒, 将 PCR 产物与质粒 pUCm - T 连接, 构建成为 pUCm - T - *acb* 质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 采用含有氨苄青霉素的 LB 平板, 进一步进行氨苄抗性筛选, 挑取阳性克隆菌落, 接入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 提取质粒, 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切和测序验证正确后用于后续表达载体构建。

表 1 所用引物

引物	引物序列
ACBF1	ATGACATGCGGTGAAGAGAAC
ACBR1	AATGTCACCTCCTGTTTGATG
ACBF11	ATGAATTGACATGCGGTGAAGAGAAC
ACBR11	CTCGAGAATGTCACCTCCTGTTTGATG

注: 序列标注部分为引物所引入的 EcoR I 和 Xho I 酶切位点

1.2.2 乙酰辅酶A羧化酶 *acb* 基因表达载体的构建与转化

构建好的阳性克隆质粒 pUCm - T - *acb* 与质粒 pET - 28a 均采用 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后切胶回收; 使用 T4 DNA ligase 试剂盒将回收的目的产物与表达载体连接, 得到重组表达质粒, 再采用热激法(42 $^{\circ}$ C)将重组表达质粒转化进 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 采用含卡那霉素的 LB 平板筛选阳性转化子, 接入含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 提取质粒, 双酶切验证正确的重组表达质粒, 进一步测序验证, 将验证正确的重组质粒转入 *E. coli* BL21 后进行双酶切与测序验证, 将验证正确的工程菌命名为 BL21 - pET - 28a - *acb*。同法构建空载体菌 BL21 - pET - 28a。

1.2.3 乙酰辅酶A羧化酶 β - CT 亚基重组蛋白 (ACB 蛋白) 在 *E. coli* BL21 中诱导表达

将 *E. coli* BL21 野生菌、空载体菌 BL21 - pET - 28a 和工程菌 BL21 - pET - 28a - *acb* 划线接种于 LB 固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h, 挑取单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基(野生菌接种于不含

卡那霉素的 LB 培养基,工程菌与空载菌接种于含卡那霉素的 LB 培养基)中,37℃、200 r/min 振荡培养 12 h。取培养的菌液,按 0.5% 的接种量接种于 100 mL LB 液体培养基(条件同上)中,37℃、200 r/min 振荡培养 3 h 后至合适的 OD₆₀₀ (0.4~0.6),取 20 mL 菌液添加 IPTG 在一定条件下诱导蛋白表达,取 20 mL 诱导后菌液,使用细菌总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,通过 12% 的 SDS-PAGE 鉴定其表达效果,同时使用乙酰辅酶 A 羧化酶试剂盒检测酶活。酶活定义为每小时 5 亿细菌产生 1 μmol 无机磷的量为一个活力单位(U)。

1.2.4 Western-blot 鉴定

ACB 蛋白经 SDS-PAGE 后转移到 NC 印迹膜,使用新型一步法快速 WB 通用试剂盒分析抗原抗体结合的位置和信号强度以获得目的蛋白在样品中的表达情况信息。

2 结果与讨论

2.1 乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因序列分析

将 *acb* 基因序列转化为氨基酸序列,*acb* 基因注

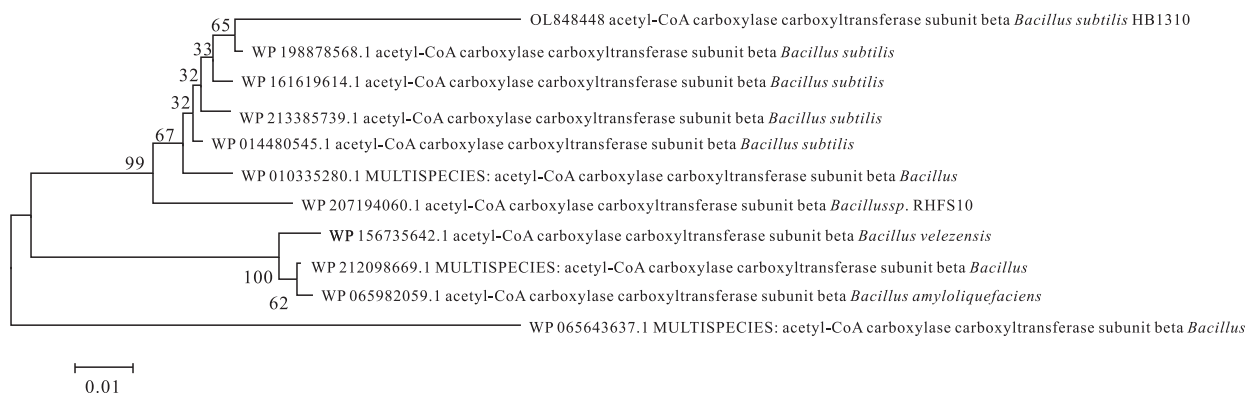
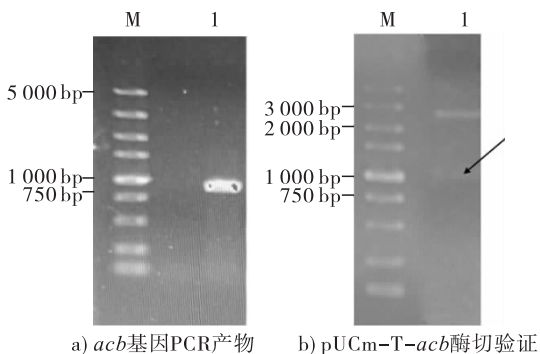


图1 *B. subtilis* HB1310 乙酰辅酶 A 羧化酶 β -CT 系统发育树

2.2 乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因克隆及克隆载体构建

图2为乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因克隆及构建的克隆载体电泳图。



注:M. DNA Marker; a 中 1 为 *acb* 基因 PCR 产物, b 中 1 为 pUCm-T-*acb* 双酶切产物

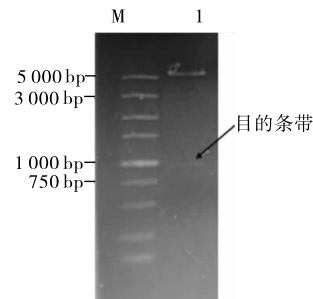
图2 乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因克隆及克隆载体构建电泳图

释为乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶 β 亚基(β -CT)基因,其登录号为 OL848448。将乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因序列通过 Snapgene 软件进行 ORF 预测,其开放阅读框 850 bp,编码 283 个氨基酸;使用 ExPASy ProtParam 在线软件预测蛋白质的理化性质,结果表明,乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因编码的蛋白质分子质量为 31.227 06 kDa,理论等电点为 5.71,带正电荷(Arg + Lys)的氨基酸残基数为 32,带负电荷(Asp + Glu)的氨基酸为 38,其在原核生物 *E. coli* 中的体内半衰期大于 10 h,不稳定系数为 35.40,脂肪系数为 78.94,亲水性系数为 -0.239,说明 ACB 蛋白可稳定存在于 *E. coli* 中。在 NCBI 进行 Blastp 比对,选取相似序列,使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树,如图 1 所示。从图 1 可以看出,*B. subtilis* HB1310 *acb* 基因与枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WP 198878568.1 carboxylase carboxyltransferase subunit beta 亲缘最近。在 NCBI 序列比对显示两基因序列一致性达 99.62%。

由图 2a 可看出,*B. subtilis* HB1310 *acb* 基因 PCR 产物在 1 000 bp 左右可见单一扩增条带,与 *acb* 基因理论值基因片段碱基对数相符。由图 2b 可看出,克隆载体 pUCm-T-*acb* 构建成功。

2.3 乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因表达载体的构建与转化

图3为乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因表达载体电泳图。



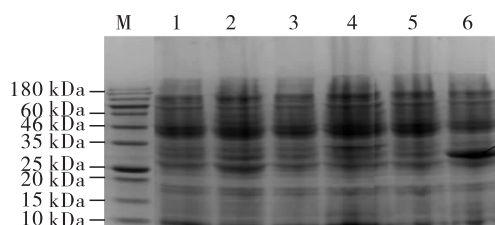
注:M. DNA Marker; 1. pET-28a-*acb* 双酶切产物

图3 乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因表达载体 SDS-PAGE 图

由图 3 可知, *acb* 基因已成功连接到表达载体上。将重组质粒进行测序, 经比对, 序列正确率为 100%, 表明工程菌 BL21 - pET - 28a - *acb* 已构建成功。

2.4 乙酰辅酶 A 羧化酶在 *E. coli* BL21 中诱导表达

按 1.2.3 方法对 *E. coli* BL21 野生菌 (BL21)、空载体菌 BL21 - pET - 28a、工程菌 BL21 - pET - 28a - *acb* 进行 IPTG 诱导表达, 诱导条件为诱导初始 pH 8.0、诱导剂浓度 1.0 mmol/L、诱导时间 6 h。诱导前后菌体总蛋白的 SDS - PAGE 图见图 4。由图 4 可看出, 相比于野生菌、空载体菌和不加 IPTG 诱导的工程菌, 加 IPTG 诱导表达的工程菌在 25 ~ 35 kDa 之间有一条明显较粗的条带。

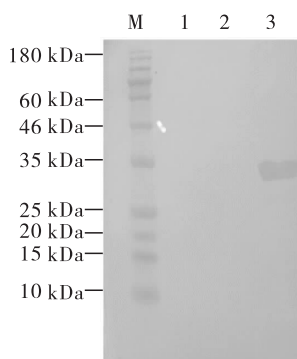


注: M. 蛋白质 Marker; 1. BL21 诱导前; 2. BL21 诱导后; 3. BL21 - pET - 28a 诱导前; 4. BL21 - pET - 28a 诱导后; 5. BL21 - pET - 28a - *acb* 诱导前; 6. BL21 - pET - 28a - *acb* 诱导后

图 4 乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白 SDS - PAGE 图

2.5 Western - blot 鉴定

为了进一步确定乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白表达, 按 1.2.4 方法对诱导后的 BL21 - pET - 28a - *acb* 进行 Western - blot 鉴定, 并以诱导后的 BL21 和 BL21 - pET - 28a 为对照, 结果见图 5。



注: M. 蛋白质 Marker; 1. BL21; 2. BL21 - pET - 28a; 3. BL21 - pET - 28a - *acb*

图 5 乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白 Western - blot 鉴定

由图 5 可看出, 在 25 ~ 35 kDa 之间有一条单一一条带, 表示 *acb* 基因成功表达。

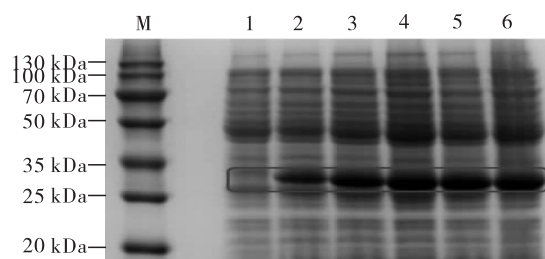
2.6 诱导表达条件优化

研究表明, 合理的诱导条件能够提高重组蛋白的表达量^[14]。为了提高乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋

白表达量, 对诱导时间、诱导剂浓度以及诱导初始 pH 进行优化。

2.6.1 诱导时间的优化

保持诱导初始 pH (7.0) 和诱导剂浓度 (1.0 mmol/L) 不变, 调节诱导时间分别为 0、2、4、6、8、10 h, 按照 1.2.3 方法进行乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白在 *E. coli* BL21 中的诱导表达, 诱导表达结果见图 6。



注: M. 蛋白质 Marker; 1 ~ 6 条带分别对应诱导时间 0、2、4、6、8、10 h

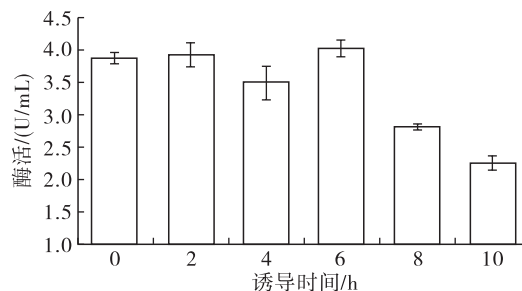
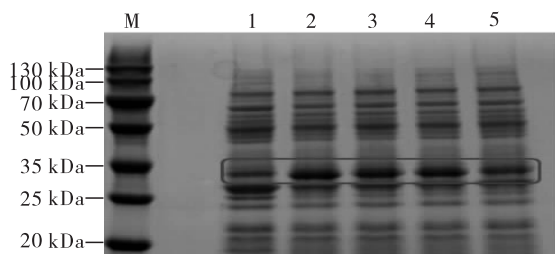


图 6 乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白诱导时间优化

由图 6 可看出, 在 0 ~ 6 h 范围内, 随诱导时间的延长, ACB 蛋白表达量逐渐升高, 6 h 以后基本不变, ACB 酶活在诱导 6 h 时最高, 之后快速降低。酶活快速降低的原因可能是酶或中间产物累积到有毒水平, 抑制了细胞生长^[15-16], 从而抑制了乙酰辅酶 A 羧化酶基因的转录速率^[17]。因此, 确定最佳诱导时间为 6 h。

2.6.2 诱导剂浓度的优化

IPTG 可稳定存在于菌体中, 但是高浓度的 IPTG 对菌株有一定的毒害作用, 因此选择合适的诱导剂浓度至关重要^[18]。保持诱导初始 pH (7.0) 和诱导时间 (6 h) 不变, 分别调节培养基 IPTG 浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L, 按照 1.2.3 方法进行乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白在 *E. coli* BL21 中的诱导表达, 诱导表达结果见图 7。由图 7 可看出, IPTG 浓度为 0.5、1.0、1.5 mmol/L 时, 对乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白表达影响不大, IPTG 浓度为 2.0 mmol/L 时表达量明显降低, 当 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时酶活达到最大值。因此, 选择 1.0 mmol/L 为最佳 IPTG 浓度。



注: M. 蛋白质 Marker; 1~5 条带分别对应 IPTG 浓度 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L

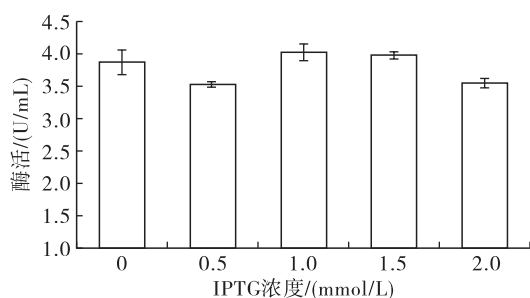
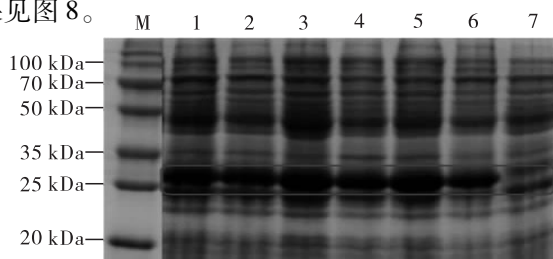


图7 乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白诱导剂 IPTG 浓度的优化

2.6.3 诱导初始 pH 的优化

保持诱导时间(6 h)和诱导剂浓度(1.0 mmol/L)不变,调节诱导初始 pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5,按照 1.2.3 方法进行乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白在 *E. coli* BL21 中的诱导表达,诱导表达结果见图 8。



注: M. 蛋白质 Marker; 1~6 条带分别对应诱导初始 pH 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5,条带 7 为未诱导

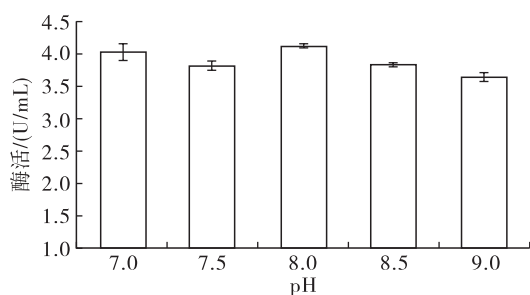


图8 乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白诱导初始 pH 的优化

由图 8 可看出,在初始 pH 为 8.0 时乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白表达量最大,此时酶活也最高。因此,选择最佳诱导初始 pH 为 8.0。

综上,得到最佳的乙酰辅酶 A 羧化酶 ACB 蛋白表达诱导条件为诱导时间 6 h、诱导剂浓度 1.0 mmol/L、诱导初始 pH 8.0。

2.7 高产油核桃内生细菌乙酰辅酶 A 羧化酶在 *E. coli* BL21 中诱导表达对酶活影响

为了进一步了解高产油核桃内生细菌乙酰辅酶 A 羧化酶 β -CT 亚基对 *E. coli* 生长及乙酰辅酶 A 羧化酶酶活影响,检测了在 2.6 优化条件下 OD_{600} 和乙酰辅酶 A 羧化酶酶活,结果见表 2。

表 2 野生大肠杆菌和工程菌乙酰辅酶 A 羧化酶酶活

菌株	OD_{600}	酶活/(U/mL)
<i>E. coli</i> BL21	0.69 ± 0.03	2.94 ± 0.11
<i>E. coli</i> BL21 - pET-28a-acb	0.51 ± 0.02	4.11 ± 0.03

由表 2 可看出,诱导表达后乙酰辅酶 A 羧化酶活性达到 (4.11 ± 0.03) U/mL。与野生菌相比,工程菌乙酰辅酶 A 羧化酶活性提高 39.7%。与文献 [17-19] 报道的由于乙酰辅酶 A 羧化酶的转录和翻译在胞内受到严格调控,所以在许多乙酰辅酶 A 羧化酶基因异源表达时其活性变化并不明显的结果不一致。以上结果表明,乙酰辅酶 A 羧化酶 β -CT 为具有较好生物活性的乙酰辅酶 A 羧化酶亚基。

3 结论

高产油核桃内生细菌 *B. subtilis* HB1310 的乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因在 *E. coli* BL21 中成功表达。进一步对该酶基因的诱导表达条件进行了优化,获得最佳的诱导表达条件为诱导剂 IPTG 浓度 1.0 mmol/L,诱导时间 6 h,诱导初始 pH 8.0。在优化条件下,工程菌的乙酰辅酶 A 羧化酶活性可达 (4.11 ± 0.03) U/mL,较野生菌提高 39.7%,表明乙酰辅酶 A 羧化酶 *acb* 基因的表达可促进 *E. coli* BL21 乙酰辅酶 A 羧化酶活性的提高,由此也证明 β -CT 为具有较好生物活性的乙酰辅酶 A 羧化酶亚基,为乙酰辅酶 A 羧化酶功能的鉴定提供了借鉴。

参考文献:

- [1] LI N, XU C, LI - BEISSON Y, et al. Fatty acid and lipid transport in plant cells [J]. Trends Plant Sci, 2016, 21 (2): 145 - 158.
- [2] LI D W, XIE W H, HAO T B, et al. Constitutive and chloroplast targeted expression of acetyl - CoA carboxylase in oleaginous microalgae elevates fatty acid biosynthesis [J]. Mar Biotechnol (NY), 2018, 20(5): 566 - 572.
- [3] CAO Y, CHENG T, ZHAO G, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of hydroxy fatty acids from glucose [J]. BMC Biotechnol, 2016, 16(1): 1 - 9.
- [4] QADEER S, KHALID A, MAHMOOD S, et al. Utilizing oleaginous bacteria and fungi for cleaner energy production [J]. J Clean Prod, 2017, 168: 917 - 928.

- [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.
- [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.

(上接第 98 页)