

谷氨酸棒状杆菌硫酯酶基因表达对脂肪酸合成的影响

王 佳^{1,2}, 刘 瑾¹, 孙子羽¹, 满都拉¹, 陈忠军¹

(1. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010000; 2. 内蒙古丰镇市检验检测中心, 内蒙古 丰镇 012100)

摘要:旨在为进一步构建脂肪酸高产菌株奠定基础,通过异源和同源表达,研究了谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中硫酯酶的基因(*NCgl2365* 和 *NCgl0090*)对脂肪酸合成的影响。结果表明:硫酯酶的过表达对大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中脂肪酸的种类和含量都产生了影响;基因 *NCgl2365* 在大肠杆菌中过表达后脂肪酸产量增加了 37.86%,且促进了饱和脂肪酸 C16:0、C18:0 和不饱和脂肪酸 C17:1 和 C20:3 的生成,在谷氨酸棒状杆菌中同源表达后脂肪酸产量提高了 33.43%,C17:0 相对含量增加了 51.82%,而 C6:0、C8:0、C12:0、C17:1、C18:0、C18:1 和 C18:3 的相对含量显著减少;基因 *NCgl0090* 在大肠杆菌中过表达后脂肪酸产量增加了 58.15%,促进了饱和脂肪酸 C14:0、C16:0、C18:0 和不饱和脂肪酸 C17:1 的生成,而在谷氨酸棒状杆菌中同源表达后脂肪酸产量提高了 59.12%,其中 C16:0 相对含量增加了 40.18%,促进了 C10:0、C14:0、C14:1、C15:0、C16:1、C18:2、C20:1 和 C21:0 8 种新脂肪酸的合成。综上,基因 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 对宿主菌体中的脂肪酸代谢产生了重要的作用。

关键词:硫酯酶;异源表达;同源表达;脂肪酸

中图分类号:Q81;TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)03-0082-05

Effect of thioesterase gene expression of *Corynebacterium glutamicum* on fatty acid synthesis

WANG Jia^{1,2}, LIU Jin¹, SUN Ziyu¹, Mandlaa¹, CHEN Zhongjun¹

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010000, China;

2. Inner Mongolia Fengzhen Inspection and Testing Center, Fengzhen 012100,

Inner Mongolia, China)

Abstract: In order to lay the foundation for further construction of fatty acid high-yield strains, the effects of the genes for thioesterases (*NCgl2365* and *NCgl0090*) in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 on fatty acid synthesis were determined by heterologous and homologous expression. The results showed that overexpression of thioesterases affected both the type and content of fatty acids in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. Gene *NCgl2365* increased fatty acid production by 37.86% after overexpression in *Escherichia coli* and promoted the production of saturated fatty acids C16:0, C18:0, and unsaturated fatty acid C17:1 and C20:3; fatty acid production increased by 33.43% after homologous expression in *Corynebacterium glutamicum*, and the relative content of C17:0 increased by 51.82%, whereas the relative contents of C6:0, C8:0, C12:0, C17:1, C18:0, C18:1 and C18:3 decreased. Fatty acid production increased by 58.15% after overexpression of gene *NCgl0090* in *Escherichia coli*, which contributed to the production of saturated fatty acids C14:0, C16:0, C18:0, and unsaturated fatty acid C17:1; fatty acid production increased by 59.12% after homologous

expression in *Corynebacterium glutamicum*, with 40.18% increase in the relative content of C16:0, the synthesis of eight new fatty acids, C10:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:1, C18:2, C20:1 and C21:0 was promoted. In conclusion, the genes

收稿日期:2022-12-05;修回日期:2023-11-14

基金项目:国家自然科学基金(31860439)

作者简介:王 佳(1991),女,在读硕士,研究方向为食品微生物与生物技术(E-mail)1014765807@qq.com。

通信作者:陈忠军,教授(E-mail)nmndchen@163.com。

NCgl2365 and *NCgl0090* exerted important effects on fatty acid metabolism in the host bacteriophage.

Key words: thioesterase; heterologous expression; homologous expression; fatty acid

被誉为“天然汽油”的微生物脂肪酸不仅种类繁多且脂肪酸组成与植物油脂相似^[1]。生物体内脂肪酸的合成是由糖酵解和三羧酸循环途径提供底物乙酰辅酶 A (CoA), 其在脂肪酸合成酶系 (FAS) 的催化下转化生成脂酰 CoA, 脂酰 CoA 在硫酯酶的水解作用下释放出游离脂肪酸^[2]。硫酯酶被认为是决定生物体内脂肪酸总量和脂肪酸组成的关键酶之一^[3], 属于水解酶的一种, 通过加强其活性可以提高脂肪酸产量^[4-6]。黄露玄^[7]在野生型浑浊红球菌 PD630 发酵培养过程中发现, 硫酯酶基因 OPAG_00508 和 WP_012687673.1 的表达水平随菌体产脂速率的增加而增加; 酿酒酵母菌株 $\Delta faa1 \Delta faa4$ 编码含有酰基 CoA 的 *Acot 5s* 基因, 过表达此基因后游离脂肪酸水平显著提高^[8]。许多微生物菌株体内的硫酯酶已被鉴定。例如: 在大肠杆菌中的长链酰基 CoA 硫酯酶, 包括硫酯酶 I 和硫酯酶 II 以及参与 β 氧化的硫酯酶 III; 蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 硫酯酶 BcACT1 的活性位点在 Asn23 和 Asp38 残基, 属于 TE6 家族^[9]。

硫酯酶的作用不仅仅在于脂肪酸的积累, 更重要的是可以调节脂肪酸的组成。Jing 等^[10]通过表达多种不同来源的硫酯酶, 发现硫酯酶对于底物特异性、脂肪酸的碳链长度以及不饱和度有重要影响。Zhang 等^[11]在大肠杆菌中分别将橄榄、陆地棉、蓖麻和麻疯树 4 种植物种子细胞内的脂酰 - ACP (酰基载体蛋白) 硫酯酶基因进行过表达, 发现随着时间变化 C14:0 占比逐渐增多。Gong 等^[12]通过在大肠杆菌中异源过表达三角褐藻 ACP 硫酯酶 PtTE, 发现其不同脂肪酸种类占比发生变化, 其中 C16:0、C18:0 在重组菌株中占比增大。

谷氨酸棒状杆菌具有底物范围广、遗传背景清楚、易于工程调控、可高密度发酵等特点^[13], 且谷氨酸棒状杆菌不产生内毒素, 是发酵工业中生产脂肪酸理想的工程菌株, 但是目前对其体内硫酯酶功能相关的研究较少。通过基因注释发现谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中基因 *NCgl2365* 编码产物为硫酯酶, 基因 *NCgl0090* 编码产物可能具有硫酯酶活性。为进一步阐释硫酯酶的功能, 本研究在大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中过表达 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 基因, 测定其对脂肪酸产量和组成的影响, 以期为进一步构建脂肪酸高产菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与试剂

大肠杆菌 BL21 (DE3), Tiangen 公司; 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032、pET-28a 质粒载体, 实验室保存; pXMJ19 质粒, Miaoling Biological 公司。

高保真酶聚合酶、限制内切酶, 大连宝日生物公司; 基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒, 北京天根生化科技公司; 十一烷酸甲酯、37 种脂肪酸甲酯标准品, 美国 Sigma 公司; DNA 分子质量标准、蛋白质质量标准, 生工生物股份有限公司; 其余试剂为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备

SCIENTZ-III 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Perin Elmer 气相色谱仪, 上海斯迈欧分析仪器有限公司; 752 紫外可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学有限公司; TC-EA PLUS 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司; DYY-6D 电泳仪, 北京六一生物科技股份有限公司; 凝胶成像仪, 德国耶拿公司; GHP-9080 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科技仪器有限公司; R134a 离心机, 美国 Sigma 公司; 超微量分光光度仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 振荡恒温金属浴, 上海一恒科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 质粒构建

1.2.1.1 异源表达质粒构建

以谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 基因组为模版, 使用质粒 pET-28a 作为异源过表达质粒, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为异源过表达宿主。上游引物 (2365-BD-S-NdeI: GCGAACCATATGGCA-GCCAACAATG) 和下游引物 (2365-BD-A-SalI: AGCCGCGTCGACGGTGATAGAAAGAGTC) 进行 PCR 获得 *NCgl2365* 异源表达片段; 上游引物 (0090-BD-S-NdeI: GCACGTCATATGTTTCTCACACTCT) 和下游引物 (0090-BD-A-SalI: CACGCTGTGACCCGCAC-TGAGGAGTTGATTA) 进行 PCR 获得 *NCgl0090* 异源表达片段。对质粒 pET-28a 和基因片段进行 *NdeI* 和 *SalI* 双酶切处理后连接转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 冰浴 30 min, 在 42 °C 水浴锅热激 90 s, 冰浴 2 min 后加入 500 μ L LB 液体培养基, 在 37 °C、200 r/min 下培

养 1 h。培养物离心后涂布在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板培养基,培养 16 h 左右后挑选单菌,提取质粒进行酶切与验证。以 2365 - BD - S - *NdeI*/2365 - BD - A - *SalI* 为引物鉴定异源表达质粒 pET - 28a - 2365 的构建,以 0090 - BD - S - *NdeI*/0090 - BD - A - *SalI* 为引物鉴定异源表达质粒 pET - 28a - 0090 的构建。

1.2.1.2 同源表达质粒构建

以谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 基因组为模版,使用质粒 pXMJ19 作为同源过表达质粒。同源表达上游引物(2365 - HB - S - *Hind* III: AAACAGAAGC TTAGAAAGAGGCTAG)和下游引物(2365 - HB - A - *EcoRI*: AGGCCAGAATTCCCTG - AGGTGAT AGAAAGAGT)进行 PCR 获得的同源表达片段与质粒 pXMJ19 进行 *Hind* III 和 *EcoRI* 双酶切;同源表达上游引物(0090 - HB - S - *Xba* I: AGTACTTCTAGATGCAAAT CTAGTA)和下游引物(0090 - HB - A - *Sma* I: CAACCGCCCGGG GGAGTTGATTAACCTGC ACG)进行 PCR 获得的同源表达片段与质粒 pXMJ19 进行 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切。双酶切后的操作同 1.2.1.1 (将 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素换成 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素)。以 2365 - HB - S - *Hind* III/2365 - HB - A - *EcoRI* 为引物鉴定同源表达质粒 pXMJ19 - 2365 的构建,以 0090 - HB - S - *Xba* I /0090 - HB - A - *Sma* I 为引物鉴定同源表达质粒 pXMJ19 - 0090 的构建。

1.2.2 重组菌株的制备

使用热激法将空质粒 pET - 28a、重组质粒 pET - 28a - 2365 和 pET - 28a - 0090 分别转化到大肠杆菌 BL21 得到重组菌株 BL - 1、BL - 5 和 BL - 9。

使用电转化法将空质粒 pXMJ19、重组质粒 pXMJ19 - 2365 和 pXMJ19 - 0090 分别转化到谷氨酸棒状杆菌得到重组菌株 G - 1、G - 5 和 G - 9。

1.2.3 重组菌株硫酯酶的过表达

重组大肠杆菌在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 100 mL LB 液体培养基中,于 200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养至 OD_{600} 为 0.3 ~ 0.6,加入终浓度为 1 mmol/L 异丙基 β - D - 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导培养 20 h。重组谷氨酸棒状杆菌在含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素的 100 mL LB 液体培养基中,于 200 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养至 OD_{600} 为 0.3 ~ 0.6,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h。对培养的菌液细胞进行破碎、离心获得上清液即粗酶液,采用 SDS - PAGE 验证。

1.2.4 脂肪酸组成及含量的测定

采用气相色谱法测定样品脂肪酸组成及含量。

将按 1.2.3 方法过表达的菌液(同源表达重组菌株的 IPTG 诱导时间也为 20 h)离心去除培养基,超纯水洗涤菌体 3 次后冷冻干燥,分别得到重组大肠杆菌菌粉和重组谷氨酸棒状杆菌菌粉。取 120 mg 菌粉加 4 mL 正己烷/异丙醇(体积比 3:2)溶液和 2 mL Na_2SO_4 溶液,室温离心后取上清液氮气吹干,加 2 mL 氢氧化钠/甲醇溶液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,冷却后加 2 mL 盐酸/甲醇溶液于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1.5 h,冷却至室温,加 3 mL 水和 6 mL 正己烷,静置分层。吸取上层液体,定容,加无水硫酸钠干燥后,过滤膜打进色谱小瓶,待测。

色谱条件:DB - WAX 石英毛细管柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm);柱箱升温程序为起始温度 120 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 225 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min,再以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 240 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min;氢火焰离子化检测器温度和进样口汽化温度均为 260 $^{\circ}\text{C}$;载气氮气流速 1.0 mL/min;燃烧气氢气流速 45 mL/min;空气流速 450 mL/min;进样量 1.0 μL 。以标准品保留时间定性,采用峰面积归一化法定量。

以十一烷酸甲酯为内标,测定菌粉中相应脂肪酸含量,脂肪酸含量之和计为脂肪酸产量。

1.2.5 数据处理与统计分析

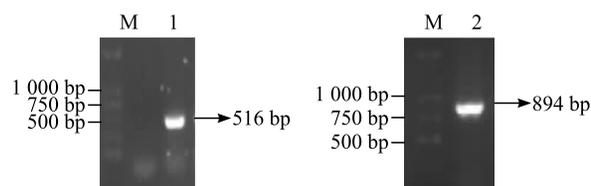
各项指标重复测定 3 次,结果用“平均值 \pm 标准差”表示,采用 SPSS 19.0 的 Tukey's 检验进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 质粒构建的验证

2.1.1 异源表达质粒

异源重组转化子菌液琼脂糖电泳图如图 1 所示。



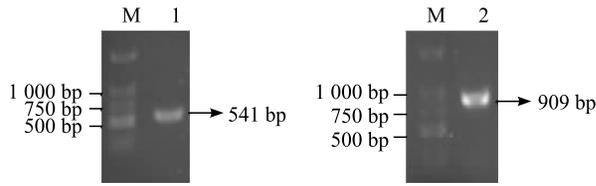
注:M. DNA 分子质量标准;1. BL - 5 菌液;2. BL - 9 菌液

图 1 异源重组转化子菌液琼脂糖电泳图

由图 1 可知,BL - 5 菌液的条带为 516 bp, BL - 9 菌液的条带为 894 bp。通过 NCBI 数据库与测序结果比对,结果显示与功能基因一致,证明重组质粒构建成功。

2.1.2 同源表达质粒

同源重组转化子菌液琼脂糖电泳图如图 2 所示。



注: M. DNA 分子质量标准; 1. G-5 菌液; 2. G-9 菌液

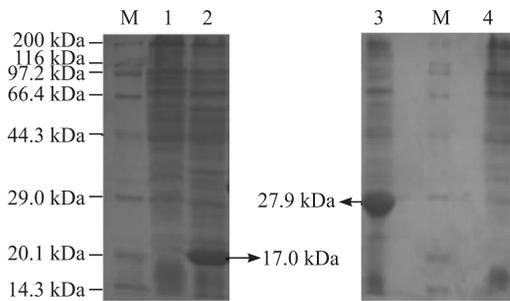
图2 同源重组转化子菌液琼脂糖电泳图

由图2可知,G-5菌液的条带为541 bp,G-9菌液的条带为909 bp。通过NCBI数据库与测序结果比对,结果显示与功能基因一致,证明重组质粒构建成功。

2.2 重组菌株硫酯酶的诱导表达

2.2.1 异源表达

由基因 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 编码的硫酯酶 TE-5 和 TE-9 分子质量分别为 17.0 kDa 和 27.9 kDa。按 1.2.3 方法对以大肠杆菌 BL21 为宿主的 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 硫酯酶过表达菌株中全细胞蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果如图3所示。



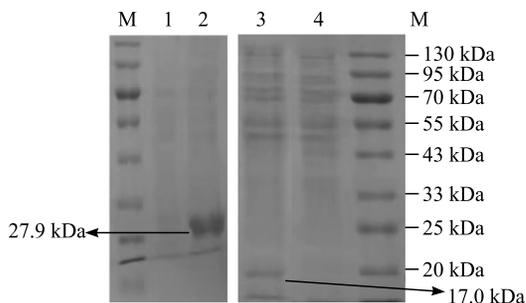
注: M. 蛋白分子质量标准; 1. 4. BL-1; 2. BL-5; 3. BL-9

图3 以大肠杆菌 BL21 为宿主的 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 硫酯酶过表达菌株中全细胞蛋白的 SDS-PAGE 图谱

由图3可知,蛋白酶片段条带清晰且大小与理论预期一致,表明构建的重组质粒可以在大肠杆菌 BL21 中正常表达,表达的蛋白为可溶性蛋白。

2.2.2 同源表达

按 1.2.3 方法对以谷氨酸棒状杆菌为宿主的 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 硫酯酶过表达菌株中全细胞蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果如图4所示。



注: M. 蛋白分子质量标准; 1. 4. G-1; 2. G-9; 3. G-5

图4 以谷氨酸棒状杆菌为宿主的 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 硫酯酶过表达菌株中全细胞蛋白的 SDS-PAGE 图谱

由图4可知,蛋白酶片段条带清晰且大小与理论预期一致,表明构建的同源重组质粒在谷氨酸棒状杆菌中能够正常表达。

2.3 硫酯酶对脂肪酸合成的影响

2.3.1 异源表达对大肠杆菌脂肪酸合成的影响

经过 IPTG 诱导后,对照菌株大肠杆菌 BL21 的脂肪酸产量为 20.31 mg/g,重组菌株 BL-5、BL-9 脂肪酸产量分别达到 28.00、32.12 mg/g,分别比对照菌株增加了 37.86%、58.15%。对照菌株和重组菌株脂肪酸组成及相对含量见表1。

表1 对照菌株和重组菌株的脂肪酸

脂肪酸	组成和相对含量			%
	BL21	BL-5	BL-9	
C12:0	1.69 ± 0.29 ^a	0.60 ± 0.01 ^b	0.80 ± 0.01 ^b	
C14:0	4.10 ± 0.13 ^b	4.16 ± 0.26 ^{ab}	4.48 ± 0.15 ^a	
C16:0	40.89 ± 0.81 ^b	45.94 ± 1.98 ^a	45.07 ± 0.78 ^a	
C16:1	5.28 ± 0.42 ^a	4.86 ± 0.20 ^b	2.24 ± 0.39 ^c	
C17:0	6.81 ± 0.46 ^a	6.67 ± 0.53 ^a	6.71 ± 0.56 ^a	
C17:1	14.68 ± 0.96 ^b	20.51 ± 1.26 ^a	20.40 ± 1.51 ^a	
C18:0	4.34 ± 0.57 ^b	6.08 ± 0.81 ^a	6.10 ± 0.37 ^a	
C18:1	17.80 ± 1.10 ^a	6.62 ± 0.26 ^c	12.42 ± 1.83 ^b	
C18:2	0.69 ± 0.12 ^a	0.93 ± 0.22 ^a	ND ^b	
C18:3	0.58 ± 0.27 ^a	0.66 ± 0.10 ^a	ND ^b	
C20:1	2.65 ± 0.15 ^a	1.98 ± 0.45 ^{ab}	1.12 ± 0.17 ^b	
C21:0	0.17 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.17 ^a	0.25 ± 0.04 ^a	
C20:3	0.32 ± 0.13 ^b	0.66 ± 0.08 ^a	0.41 ± 0.12 ^{ab}	

注:同行不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$);ND表示未检出。下同

由表1可知,C16:0是对照菌株和重组菌株中的主要脂肪酸。与对照菌株相比,BL-5中相对含量显著增加的脂肪酸有C16:0、C17:1、C18:0和C20:3,C12:0、C16:1和C18:1相对含量显著减少,其余脂肪酸相对含量变化不显著。与对照组菌株相比,BL-9中相对含量显著增加的脂肪酸有C14:0、C16:0、C17:1和C18:0,C12:0、C16:1、C18:1、C18:2、C18:3和C20:1相对含量显著减少。结果表明基因 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 在大肠杆菌中不仅具有活性,而且对大肠杆菌体内脂肪酸合成产生了重要影响。

2.3.2 同源表达对谷氨酸棒状杆菌脂肪酸合成的影响

对照菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032(G)的脂肪酸产量为 13.04 mg/g,重组菌株 G-5、G-9 的脂肪酸产量分别达到 17.40、20.75 mg/g,分别比对照菌株提高了 33.43%、59.12%。对照菌株和重组菌株脂肪酸组成及相对含量见表2。

表 2 对照菌株和重组菌株的脂肪酸组成和相对含量 %

脂肪酸	G	G-5	G-9
C6:0	0.47 ± 0.11 ^a	ND ^b	0.67 ± 0.06 ^a
C8:0	0.21 ± 0.06 ^a	ND ^b	0.32 ± 0.08 ^a
C10:0	ND ^b	ND ^b	0.47 ± 0.12 ^a
C12:0	5.66 ± 0.35 ^a	1.78 ± 0.19 ^c	4.12 ± 0.77 ^b
C14:0	ND ^b	ND ^b	1.86 ± 0.15 ^a
C14:1	ND ^b	ND ^b	0.46 ± 0.14 ^a
C15:0	ND ^b	ND ^b	0.59 ± 0.03 ^a
C16:0	36.39 ± 0.58 ^c	39.07 ± 1.15 ^b	51.01 ± 2.08 ^a
C16:1	ND ^b	ND ^b	1.79 ± 0.37 ^a
C17:0	25.82 ± 2.08 ^b	39.20 ± 1.19 ^a	8.37 ± 0.58 ^c
C17:1	1.43 ± 0.38 ^b	ND ^c	4.12 ± 0.81 ^a
C18:0	15.83 ± 1.03 ^b	11.75 ± 1.24 ^c	20.64 ± 1.03 ^a
C18:1	13.57 ± 1.25 ^a	8.20 ± 0.92 ^b	1.60 ± 0.25 ^c
C18:2	ND ^b	ND ^b	1.65 ± 0.16 ^a
C18:3	0.62 ± 0.06 ^b	ND ^c	0.84 ± 0.13 ^a
C20:1	ND ^b	ND ^b	0.38 ± 0.08 ^a
C21:0	ND ^b	ND ^b	1.11 ± 0.17 ^a

由表 2 可知,与对照菌株相比,C17:0 成为 G-5 中相对含量最高的脂肪酸,其相对含量增加了 51.82%,C16:0 的相对含量也显著增加,G-5 中未检出 C6:0、C8:0、C17:1 和 C18:3,C12:0、C18:0 和 C18:1 的相对含量显著减少,其中 C12:0 减少了 68.55%。与对照菌株相比,G-9 中新检出 C10:0、C14:0、C14:1、C15:0、C16:1、C18:2、C20:1 和 C21:0 这 8 种脂肪酸。重组菌株 G-9 中 C16:0 是相对含量最高的脂肪酸,比对照菌株增加了 40.18%,C17:1、C18:3 和 C18:0 的相对含量较对照菌株显著增加,而 C12:0、C17:0、C18:1 这 3 种脂肪酸显著减少,C18:1 和 C17:0 减少得最多,为 88.21% 和 67.58%。

3 结论

本研究对谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 的硫酯酶进行初步研究,分析了谷氨酸棒状杆菌基因 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 的异源表达和同源表达对宿主菌体脂肪酸合成的影响。在异源宿主大肠杆菌中,基因 *NCgl2365* 和 *NCgl0090* 对菌株中脂肪酸产量影响较大,同时调整了脂肪酸组成占比,重组菌株 BL-5、BL-9 脂肪酸产量分别增加了 37.86%、58.15%,C16:0、C17:1 和 C18:0 相对含量均显著增加。在同源宿主谷氨酸棒状杆菌中,基因 *NCgl2365* 可以促进同源宿主谷氨酸棒状杆菌中脂肪酸产量以及改变不同脂肪酸占比,基因 *NCgl0090* 不仅增加脂肪酸产量,同时也丰富了脂肪酸种类,促进了 8 种新脂肪酸的合成。本研究为后续通过基因工程构建高产脂肪酸谷氨酸棒状杆菌菌株提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] SUSHCHIK N N, KALACHEVA G S, GLADYSHEV M I. Secretion of free fatty acids by prokaryotic and eukaryotic algae at optimal, supraoptimal, and suboptimal growth temperatures[J]. *Microbiology*, 2001, 70(5): 542-547.
- [3] HUANG L, ZHAO L, ZAN X, et al. Boosting fatty acid synthesis in *Rhodococcus opacus* PD630 by overexpression of autologous thioesterases[J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(6): 999-1008.
- [4] CLOMBURG J M, VICK J E, BLANKSCHEN M D, et al. A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the β -oxidation cycle[J]. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(11): 541-554.
- [5] KIND S, WITTMANN C. Bio-based production of the platform chemical 1,5-diaminopentane[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(5): 1287-1296.
- [6] BUSCHKE N, SCHRÖDER H, WITTMANN C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose[J]. *J Biotechnol*, 2011, 6(3): 306-317.
- [7] 黄露玄. 硫酯酶对浑浊红球菌 PD630 脂肪酸合成的影响[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2016.
- [8] CHEN L, ZHANG J, LEE J, et al. Enhancement of free fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by control of fatty acyl-CoA metabolism[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(15): 6739-6750.
- [9] PARK J, KIM Y J, LEE D, et al. Structural basis for nucleotide-independent regulation of acyl-CoA thioesterase from *Bacillus cereus* ATCC 14579[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 170: 390-396.
- [10] JING F, CANTU D C, TVARUZKOVA J, et al. Phylogenetic and experimental characterization of an acyl-ACP thioesterase family reveals significant diversity in enzymatic specificity and activity[J/OL]. *BMC Biochem*, 2011, 12: 44[2022-12-05]. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-44>.
- [11] ZHANG X, LI M, AGRAWAL A, et al. Efficient free fatty acid production in *Escherichia coli* using plant acyl-ACP thioesterases[J]. *Metab Eng*, 2011, 13(6): 713-722.
- [12] GONG Y, GUO X, WAN X, et al. Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *J Basic Microbiol*, 2011, 51(6): 666-672.
- [13] BECKER J, ZELDER O, HÄFENER S, et al. From zero to hero: Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production[J]. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 159-168.