

代谢工程改造大肠杆菌利用脂肪酸合成己二酸

李 洋^{1,2}, 闫亚楠^{1,2}, 赵春雷^{1,2}, 郭 亮^{1,2,3}, 高 聪^{1,2,3}, 刘立明^{1,2,3}, 陈修来^{*1,2,3}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 己二酸作为生产尼龙、化纤和工程塑料等聚合物的单体, 在食品、医药、塑料和化工行业具有广泛的应用。目前, 己二酸的生物合成主要利用可食用原料, 碳原子损失较多, 造成己二酸产率较低。为解决上述问题, 设计和重构以脂肪酸为原料的己二酸合成新路径, 提高己二酸的理论得率; 其次, 强化本源的 β -氧化路径和引入异源的 ω -氧化路径; 增强细胞对脂肪酸的利用能力; 再次, 借助系统代谢工程策略, 进一步优化己二酸合成路径。最后, 经发酵条件优化, 最优工程菌 *Escherichia coli* AA0304 能够产生 1.32 g/L 己二酸。上述研究结果为利用废弃脂肪酸类化合物生产高价值化学品奠定了良好的基础。

关键词: 代谢工程; β -氧化路径; ω -氧化路径; 棕榈酸; 大肠杆菌; 己二酸

中图分类号: Q 936 文章编号: 1673-1689(2022)03-0016-13 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.03.003

Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Synthesis of Adipic Acid from Fatty Acids

LI Yang^{1,2}, YAN Yanan^{1,2}, ZHAO Chunlei^{1,2}, GUO Liang^{1,2,3},
GAO Cong^{1,2,3}, LIU Liming^{1,2,3}, CHEN Xiulai^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Adipic acid, as the monomer for manufacturing polymers such as nylon, fiber and plastics, has broad applications in food, pharmaceutical, plastics, and chemical industries. At present, low-level yield of adipic acid generated from food feedstocks was mainly due to the carbon atom loss. To tackle this issue, an artificial adipic acid biosynthesis pathway for obtaining the highest theoretical adipic acid yield from palmitic acid was designed and constructed. Then, cell utilization for fatty acids was improved by enhancing endogenous β -oxidation pathway and introducing heterogenous ω -oxidation pathway. Furthermore, various strategies of system metabolic engineering were used for further optimizing adipic acid biosynthesis pathway. Finally, the optimal recombinant strain *Escherichia coli* AA0304 produced 1.32 g/L adipic acid by optimizing fermentation

收稿日期: 2021-01-30

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2019B020218001); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题项目(LITE2018-08); 江南大学基
本科研计划面上培育项目(JUSRP22031)。

* 通信作者: 陈修来(1985—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物系统代谢工程与合成生物学研究。

E-mail: xlchen@jiangnan.edu.cn

conditions. Therefore, this synthetic platform could lay a good foundation for the production of high-value chemicals from waste oleaginous feedstocks.

Keywords: metabolic engineering, β -oxidation pathway, ω -oxidation pathway, palmitic acid, *E. coli*, adipic acid

己二酸作为一种重要的脂肪族二元酸,在食品、医药、塑料和化学等领域具有广泛的应用^[1-4]。2004年,己二酸被美国能源部认定为12种能利用可再生生物质原料生产的高附加值化学品之一,年产量达285万吨,增长率为4.1%^[3-5]。目前,己二酸的生产主要依赖于化学法,该过程不仅产生大量的温室气体,同时也有较多的副产物,导致己二酸产率较低。因此,基于细胞工厂的生物合成法受到越来越多的关注,即:利用可再生生物质原料高效、持续地合成己二酸^[6-8]。

近年来,关于己二酸的生物合成主要集中在两个方面:1)间接发酵法:将可再生生物质原料首先转化为合成己二酸的前体物质(顺,顺-粘糠酸或D-葡萄糖二酸),随后经化学法生成己二酸^[3]。已有研究表明烯醇还原酶可以催化顺,顺-粘糠酸生成己二酸,例如,通过构建大肠杆菌(*Escherichia coli*)共培养系统,葡萄糖经莽草酸路径转化为顺,顺-粘糠酸,随后利用透明颤菌的血红蛋白降低溶氧量,最终在烯醇还原酶的作用下生成27.6 mg/L己二酸^[9]。但是该酶仅在厌氧条件下才能发挥最大催化效率,难以满足工业化生产的需求^[9]。2)直接合成法:乙酰CoA和琥珀酰CoA在 β -酮基己二酰CoA硫解酶(PaaJ)、5-羟基脂酰CoA还原酶(PaaH1)、烯酰CoA水化酶(Ech)、反式-烯酰CoA还原酶(Ter)、丁酰激酶(Buk1)和磷酸式丁酰转移酶(Ptb)的共同作用下转化为己二酸^[10]。例如,通过构建己二酸合成路径并阻断乙酸、乳酸等副产物生成,工程菌株*E. coli* MB263(Δ sucD)能够产生2.5 g/L己二酸,但是产率仅达到了理论产率的9.6%^[10]。另外,将源于褐色嗜

热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的逆己二酸降解路径,在*E. coli* BL21中进行重构与优化,最终工程菌株*E. coli* Mad123146产生68.0 g/L己二酸,这是目前所报道的最高产量(见表1)。然而,由于碳原子损失,己二酸产率仅有0.378 g/g(以甘油质量计)^[5]。

为了进一步提高生物法合成己二酸在工业化生产上的竞争力,开发高效合成己二酸的微生物细胞工厂受到越来越多的关注。脂肪酸,作为自然界中广泛存在的可再生原料,具有高效生产高价值化学品的潜力:一方面,脂肪酸的使用避免了与可食用粮食作物的竞争,降低了生产成本;另一方面,经脂肪酸分解代谢可实现碳回收率100%,理论上具有最高的产品产率^[11-12]。例如,通过强化脂肪酸代谢路径,获得了一株能够高效利用棕榈酸的工程菌株*E. coli* HP08,3-羟基丙酸的得率达到了1.56 g/g(以棕榈酸质量计),远高于其他原料^[12]。然而,利用脂肪酸生产己二酸的研究较少,主要原因在于缺乏特异性催化中链脂肪酸的细胞色素P450还原酶,代谢辅因子不平衡,底物或产物抑制严重等^[13-14]。因此,构建一种能够高效利用脂肪酸生产己二酸的微生物细胞工厂,有助于实现经济和环境的双收益。

为了开发能够利用脂肪酸合成己二酸的细胞工厂,作者首先结合 β -氧化路径和 ω -氧化路径,设计并构建了一条新型的己二酸合成路径;其次,采用融合蛋白、RBS组合优化、基因敲除等策略优化了己二酸合成路径;最终,通过发酵条件优化,提高了己二酸的积累量,为利用脂肪酸生产其他高价值化学品奠定了良好的基础。

表1 代谢工程改造微生物生产己二酸

Table 1 Production of adipic acid in the metabolically engineered microorganisms

底物	合成路径	生产菌株	代谢改造策略	产量/(g/L)	发酵模式	参考文献
葡萄糖	逆己二酸降解路径	<i>T. fusca</i> B6	过表达5-羧基-2-烯戊酰CoA还原酶(<i>Tfu_1647</i>)。	2.23	摇瓶;分批发酵	[15]
甘油	己二酸合成路径	<i>E. coli</i> MG1655	1) 过表达 <i>paaJ</i> , <i>paaH1</i> , <i>ech</i> , <i>ter</i> , <i>buk1</i> 和 <i>ptb</i> ; 2) 敲除乳酸脱氢酶(<i>ldhA</i>)、丙酮酸脱氢酶(<i>poxB</i>)、磷酸式乙酰转移酶(<i>pta</i>)、醇脱氢酶(<i>adhE</i>)、琥珀酰CoA连接酶(<i>sucD</i>)。	2.5	摇瓶;分批发酵	[10]

续表 1

底物	合成路径	生产菌株	代谢改造策略	产量/ (g/L)	发酵 模式	参考 文献
甘油	逆己二酸降解 路径	<i>E. coli</i> BL21	1) 过表达 β -酮基硫解酶(<i>Tfu_0875</i>)、3-羟基脂酰 CoA 脱氢酶 (<i>Tfu_2399</i>)、3-羟基己二酰 CoA 脱氢酶 (<i>Tfu_0067</i>)、己二酰 CoA 合成酶 (<i>Tfu_2576-7</i>)和 <i>Tfu_1647</i> ; 2) 敲除 <i>ldhA</i> 、 <i>sucD</i> 和乙酰 CoA 乙酰基转移酶 (<i>atoB</i>)。	68.0	发酵罐;补料-分批发酵	[5,16]
葡萄糖	顺,顺-粘糠酸 合成路径	<i>E. coli</i> ATCC 31884	1) 以 <i>E. coli</i> QH4 为底盘微生物; 2) 过表达烯醇还原酶 (<i>CaER</i>) 和血红蛋白 (<i>VHb</i>); 3) 构建共培养系统。	0.028	摇瓶;分批发酵	[9,17-18]
葡萄糖	己二酸合成 路径	<i>E. coli</i> MG1655	1) 过表达 <i>paaJ</i> 、 <i>paaH1</i> 、 <i>ech</i> 、 <i>ter</i> 、 <i>buk1</i> 和 <i>ptb</i> ; 2) 敲除 <i>poxB</i> 、 <i>pta</i> 、葡萄糖特异性的磷酸转移酶系统(<i>ptsG</i>)、转录抑制因子(<i>iclR</i>)和琥珀酸脱氢酶(<i>sdhA</i>)。	0.000 1	摇瓶;分批发酵	[19]
木质素	芳香族化合物 合成路径	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	1) 敲除 β -酮基己二酰 CoA 硫解酶(<i>pcaF</i>); 2) 基因组整合技术。	2.5	发酵罐;补料-分批发酵	[20]
葡萄糖	先 ω -氧化路径, 后 β -氧化路径	<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7212	敲除脂酰 CoA 氧化酶的同工酶(<i>pox4</i>)。	12.1	发酵罐;补料-分批发酵	[21]
棕榈酸	先 β -氧化路径, 后 ω -氧化路径	<i>E. coli</i> ATCC 8739	1) 过表达长链脂肪酸转运蛋白 (<i>fadL</i>)、脂酰 CoA 合成酶(<i>fadD</i>)、脂酰 CoA 脱氢酶(<i>fadE</i>)、脂肪酸氧化酶复合体的 α 亚基 (<i>fadB</i>) 和 β 亚基 (<i>fadA</i>)、硫酯酶(<i>ydjI</i>)、甲酸脱氢酶(<i>fdh</i>)、NADH 氧化酶(<i>nox</i>)、烷烃 1-单加氧酶(<i>alkB</i>)、红素氧化蛋白 (<i>alkG</i>)、红素氧还蛋白-NAD ⁺ 还原酶 (<i>alkT</i>)、6-羟基己酸脱氢酶(<i>chnD</i>)和 6-氧代己酸脱氢酶(<i>chnE</i>); 2) 敲除脂肪酸调控蛋白(<i>fadR</i>)。	1.32	摇瓶;补料-分批发酵	该研究所采用

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒 作者使用的大肠杆菌 *E. coli*

JM109 和 *E. coli* ATCC 8739 分别用于表达载体的构建和生产菌株,其中所使用的基因工程菌和重组质粒分别见表 2 和表 3。

表 2 研究所使用的菌种

Table 2 Strains used in this study

菌株	描述	来源
<i>E. coli</i> JM109	Wild-type <i>E. coli</i> strain	实验室储藏
<i>E. coli</i> MG1655	Wild-type <i>E. coli</i> strain	实验室储藏
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Wild-type <i>E. coli</i> strain	实验室储藏
AA0001	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet- <i>egfp</i> 29, Cm ^R	作者构建
AA0002	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet- <i>egfp</i> 30, Cm ^R	作者构建
AA0003	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet- <i>egfp</i> 31, Cm ^R	作者构建
AA0004	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet- <i>egfp</i> 32, Cm ^R	作者构建
AA0005	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet- <i>egfp</i> 34, Cm ^R	作者构建
AA0006	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac- <i>egfp</i> 29, Kan ^R	作者构建

续表 2

菌株	描述	来源
AA0007	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac- <i>egfp</i> 30, Kan ^R	作者构建
AA0008	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac- <i>egfp</i> 31, Kan ^R	作者构建
AA0009	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac- <i>egfp</i> 32, Kan ^R	作者构建
AA0010	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac- <i>egfp</i> 34, Kan ^R	作者构建
AA0101	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL1, Cm ^R	作者构建
AA0102	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL2, Cm ^R	作者构建
AA0103	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEM-YL1, Amp ^R	作者构建
AA0104	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEM-YL2, Amp ^R	作者构建
AA0105	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEM-YL3, Amp ^R	作者构建
AA0106	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL1 和 pEM-YL1, Cm ^R , Amp ^R	作者构建
AA0107	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL2 和 pEM-YL1, Cm ^R , Amp ^R	作者构建
AA0108	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL2 和 pEM-YL2, Cm ^R , Amp ^R	作者构建
AA0109	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL2 和 pEM-YL3, Cm ^R , Amp ^R	作者构建
AA0201	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac-YL1, Kan ^R	作者构建
AA0202	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac-YL2, Kan ^R	作者构建
AA0203	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac-YL3, Kan ^R	作者构建
AA0204	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac-YL4, Kan ^R	作者构建
AA0205	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 pEtac-YL5, Kan ^R	作者构建
AA0301	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL2, pEM-YL1 和 pEtac-YL4, Cm ^R , Amp ^R , Kan ^R	作者构建
AA0302	<i>E. coli</i> ATCC 8739 带有重组质粒 ptet-YL2, pEM-YL2 和 pEtac-YL4, Cm ^R , Amp ^R , Kan ^R	作者构建
AA0303	<i>E. coli</i> ATCC 8739 $\Delta fadR$	作者构建
AA0304	AA0303 带有重组质粒 ptet-YL2, pEM-YL1 和 pEtac-YL4, Cm ^R , Amp ^R , Kan ^R	作者构建

表 3 研究所使用的重组质粒

Table 3 Plasmids used in this study

质粒	描述	来源
pEtac	tac promoter, Kan ^R , fl ori	实验室储藏
pEM	T5 promoter, Amp ^R , fl ori	实验室储藏
ptet	ptet promoter, Cm ^R , p15A ori	实验室储藏
pCas9	araBAD promoter, Kan ^R , repA101 ori	实验室储藏
pTargetF	sgRNA, Spe ^R	实验室储藏
pTargetF ^{$\Delta fadR$}	sgRNA($\Delta fadR$), Spe ^R	作者构建
pET28a-YL1	pET28a, Kan ^R , P _{T7} - <i>alkB</i> with codon-optimized	金唯智合成
pET28a-YL2	pET28a, Kan ^R , P _{T7} - <i>alkG</i> with codon-optimized	金唯智合成
pET28a-YL3	pET28a, Kan ^R , P _{T7} - <i>alkT</i> with codon-optimized	金唯智合成
pET28a-YL4	pET28a, Kan ^R , P _{T7} - <i>chnD</i> with codon-optimized	金唯智合成
pET28a-YL5	pET28a, Kan ^R , P _{T7} - <i>chnE</i> with codon-optimized	金唯智合成
ptet-YL1	ptet, Cm ^R , P _{tet} - <i>fadL</i> (M)- <i>ydiI</i> (M), p15A ori	作者构建
ptet-YL2	ptet, Cm ^R , P _{tet} - <i>fadL</i> (M)- <i>ydiI</i> (M)-P _{tet} - <i>fdh</i> (M)- <i>nox</i> (M), p15A ori	作者构建
ptet- <i>egfp</i> 29	ptet, Cm ^R , P _{tet} -RBS29- <i>egfp</i>	作者构建
ptet- <i>egfp</i> 30	ptet, Cm ^R , P _{tet} -RBS30- <i>egfp</i>	作者构建
ptet- <i>egfp</i> 31	ptet, Cm ^R , P _{tet} -RBS31- <i>egfp</i>	作者构建
ptet- <i>egfp</i> 32	ptet, Cm ^R , P _{tet} -RBS32- <i>egfp</i>	作者构建
ptet- <i>egfp</i> 34	ptet, Cm ^R , P _{tet} -RBS34- <i>egfp</i>	作者构建

续表 3

质粒	描述	来源
pEM-YL1	pEM, Amp ^R , P ₁₅ - <i>fadD</i> (M)- <i>fadE</i> (M)-PT5- <i>fadB</i> (M)- <i>fadA</i> (M)	作者构建
pEM-YL2	pEM, Amp ^R , P ₁₅ - <i>fadD</i> (M)- <i>fadE</i> (M)-PT5- <i>fadB</i> (M)-GGGS- <i>fadA</i> (M)	作者构建
pEM-YL3	pEM, Amp ^R , P ₁₅ - <i>fadD</i> (M)- <i>fadE</i> (M)-PT5- <i>fadA</i> (M)-GGGS- <i>fadB</i> (M)	作者构建
pEtac-GFP	pEtac, Kan ^R , P _{lac} -RBS- <i>egfp</i>	作者构建
pEtac- <i>egfp</i> 29	pEtac, Kan ^R , P _{lac} -RBS29- <i>egfp</i>	作者构建
pEtac- <i>egfp</i> 30	pEtac, Kan ^R , P _{lac} -RBS30- <i>egfp</i>	作者构建
pEtac- <i>egfp</i> 31	pEtac, Kan ^R , P _{lac} -RBS31- <i>egfp</i>	作者构建
pEtac- <i>egfp</i> 32	pEtac, Kan ^R , P _{lac} -RBS32- <i>egfp</i>	作者构建
pEtac- <i>egfp</i> 34	pEtac, Kan ^R , P _{lac} -RBS34- <i>egfp</i>	作者构建
pEtac-YL1	pEtac, Kan ^R , P _{lac} - <i>alkB</i> (M)- <i>alkG</i> (M)-P _{lac} - <i>alkT</i> (M)-P _{lac} - <i>chnD</i> (M)- <i>chnE</i> (M)	作者构建
pEtac-YL2	pEtac, Kan ^R , P _{lac} - <i>alkB</i> (L)- <i>alkG</i> (L)-P _{lac} - <i>alkT</i> (L)-P _{lac} - <i>chnD</i> (M)- <i>chnE</i> (M)	作者构建
pEtac-YL3	pEtac, Kan ^R , P _{lac} - <i>alkB</i> (H)- <i>alkG</i> (H)-P _{lac} - <i>alkT</i> (H)-P _{lac} - <i>chnD</i> (M)- <i>chnE</i> (M)	作者构建
pEtac-YL4	pEtac, Kan ^R , P _{lac} - <i>alkB</i> (M)- <i>alkG</i> (M)-P _{lac} - <i>alkT</i> (M)-P _{lac} - <i>chnD</i> (L)- <i>chnE</i> (L)	作者构建
pEtac-YL5	pEtac, Kan ^R , P _{lac} - <i>alkB</i> (M)- <i>alkG</i> (M)-P _{lac} - <i>alkT</i> (M)-P _{lac} - <i>chnD</i> (H)- <i>chnE</i> (H)	作者构建

1.1.2 主要仪器和试剂 PCR 扩增仪、全自动凝胶成像系统、电穿孔仪、核酸电泳仪:美国 Bio-rad 公司产品;恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂产品;紫外可见分光光度计:日本岛津公司产品;SBA 生物传感器:山东科学院生物研究所产品;精密 pH 计:瑞士 METTLER 公司产品;XD-650D 超声破碎仪:南京先欧仪器制造有限公司产品;Invitrogen iBright 智能成像系统:赛默飞世尔科技有限公司产品;5804R 型高速离心机:德国 Eppendorf 公司产品;CHB-202 恒温金属浴:日本 Bioer Technology 公司产品;气相色谱仪:日本岛津公司产品。

限制性内切酶、Prime Star 高保真酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker:购自 TaKaRa (大连)有限公司;一步同源重组酶:购自南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒、氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、氯霉素、盐酸大观霉素、阿拉伯糖、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG):购自生工生物工程(上海)公司;细菌基因组提取试剂盒:购自天根公司;棕榈酸、正己酸、己二酸、Brij 58、N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和三甲基硅烷:购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基 大肠杆菌的前培养在 LB 培养基中进行,TB 培养基用于培养细胞进行全细胞转化生产正己酸和己二酸,而己二酸的发酵生产在 M9 无机盐培养基中进行。

LB 培养基:酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 10 g/L。LB 固体培养基额外添加 20 g/L 的琼脂粉。

TB 培养基:酵母粉 24 g/L、胰蛋白胨 12 g/L、甘油 4 g/L、K₂HPO₄ 2.31 g/L、KH₂PO₄·3H₂O 16.42 g/L。

M9 无机盐培养基:Na₂HPO₄·12H₂O 15.11 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、NH₄Cl 1 g/L、NaCl 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L、微量元素液 1 mL/L 和 10 g/L 葡萄糖或棕榈酸。

微量元素液:FeCl₃·12H₂O 2.4 g/L、CoCl₂·6H₂O 0.3 g/L、CuCl₂ 0.15 g/L、ZnCl₂·4H₂O 0.15 g/L、NaMnO₄ 0.3 g/L、H₃BO₃ 0.075 g/L、MnCl₂·4H₂O 0.5 g/L,溶于 0.1 mol/L HCl。

以上培养基均在 121 °C 条件下灭菌 15 min。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建 所有表达质粒的构建均通过标准分子克隆操作和吉布森组装法,其中一步同源重组法是根据目的片段与表达载体之间具有相同序列连接的方法。采用的 *fadL* *fadD* *fadE*、*fadB* *fadA* 基因来源于 *E. coli* MG1655,而来自恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的 *alkB*、*alkG*、*alkT* 基因和不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp. SE19) 的 *chnD* 和 *chnE* 基因在苏州金唯智生物科技有限公司进行密码子优化和合成。此外,辅因子再生系统中来源于博伊假丝酵母 (*Candida boidinill*) 的 *fdh* 基因和大肠杆菌本源的 *nox* 基因也进行密码子优化和合成。所有引物在苏州金唯智生物科技有限公司合成(见表4),同时重组质粒的 Sanger 测序在天霖生物科技

无锡有限公司进行。

以 *E. coli* MG1655 基因组为模板, 用引物对 *fadL^{Ec}*-S/A 和 *ydiI^{Ec}*-S/A 分别扩增 *fadL* 和 *ydiI* 基因, 经同源重组连接至载体 ptet 的 *EcoR* I/*Hind* III 位点产生质粒 ptet-YL1。随后, 用引物对 *fdh^{Bc}*-S/A 和 *nox^{Ec}*-S/A 分别扩增目的片段 *fdh* 和 *nox* 并连接至质粒 ptet-YL1 的 *Bgl* II/*Hind* III 位点, 得到表达载体 ptet-YL2。

以 *E. coli* MG1655 基因组为模板, 用引物对 *fadD^{Ec}*-S/A 扩增 *fadD* 片段并连接至质粒 pEM 的 *Bam*H I/*Sac* I 位点。与此同时, 经引物对 *fadA^{Ec}*-S/A 和 *fadB^{Ec}*-S/A 扩增得到的目的片段 *fadA* 和 *fadB* 连接至 pEM 得到 pEM-*fadB*-*fadA*, 随后酶切连接产生 pEM-*fadD*-*fadB*-*fadA*。最后, 把引物对 *fadE^{Ec}*-S/A 扩增的 *fadE* 片段连接至 pEM-*fadD*-*fadB*-*fadA* 的 *Spe* I/*Pst* I 位点, 产生表达载体 pEM-YL1。除此之外, 含有片段 *FadA* 和 *FadB* 的融合蛋白通过“GGT

GGT GGT TCT”形成的 Linker 连接, 得到载体 pEM-YL2 和 pEM-YL3。

以质粒 pET28a-YL1 和 pET28a-YL2 为模板, 分别用引物对 *alkB^{Phu}*-S/A 和 *alkG^{Phu}*-S/A 扩增片段 *alkB* 和 *alkG* 并连接至质粒 pEtac 的 *EcoR* I/*Sal* I 位点。随后, *chnD* 和 *chnE* 基因连接至 pEtac-*alkB*-*alkG* 的 *Sal* I/*Hind* III 位点形成 pEtac-*alkB*-*alkG*-*chnD*-*chnE*。最后, 把引物对 *alkT^{Phu}*-S/A 扩增的 *alkT* 基因连接至 pEtac-*alkB*-*alkG*-*chnD*-*chnE* 的 *Spe* I/*Sal* I 位点, 获得表达载体 pEtac-YL1。另外, 表达载体 pEtac-YL2/3/4/5 采用相同的方法构建。

E. coli ATCC 8739 的转化采用电击转化的方式, 随后涂布于含有相应抗性的筛选平板, 挑选转化子并提取质粒进行 PCR 验证, 产生一系列工程菌株生产正己酸和己二酸。除此之外, 从基因组上敲除 *fadR* 基因采用 CRISPR-Cas9 系统, 具体方法参照 Zhao 等的研究^[5]。

表 4 研究所使用的引物
Table 4 Primers used in this study

引物	引物序列
<i>fadL^{Ec}</i> -S	CAGTGATAGAGAAAAGAATTCAAAGAGGAGAAAATGAGCCAGAAAACCCTGTTTACA
<i>fadL^{Ec}</i> -A	TTTGGATCCTCAGAACCGCTAGTTAAAGTTAGTACC
<i>ydiI^{Ec}</i> -S	TTTAACTACGCGTTCTGAGGATCCAAAGAGGAGAAAATACATATGATATGGAACCGAAAAAT
<i>ydiI^{Ec}</i> -A	CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCACAAAATGCGCGTCCTCA
<i>fdh^{Bc}</i> -S	AGATCTTAATTCTAATTTTTGTGTTGA
<i>fdh^{Bc}</i> -A	CGAGTGCGGCCGCAAGCTTCTGCAGTTATTATTTTTATCGTGTT
<i>nox^{Ec}</i> -S	CCGCCATTTTGTGAAAGCTTAGATCTATACATCTGCAGAAAGAGGAGAAAATACATATGAAAATCATTAGCATTAA
<i>nox^{Ec}</i> -A	CTGGAGATCCTTACTCGAGCGCATTACGCTCTGCGCA
<i>fadD^{Ec}</i> -S	CACGGATCCGCATGCCAGCTCATGAAGAAGGTTTGGCTTAACCG
<i>fadD^{Ec}</i> -A	ACTCGAGAAGCTTGGCTGCAGTTACGCGGCTTCAACTTTCC
<i>fadE^{Ec}</i> -S	GAGCTCATGATGATTTTGAAGTATTCTCG
<i>fadE^{Ec}</i> -A	CTGCAGTTACGCGGCTTCAACTTTCCGC
<i>fadB^{Ec}</i> -S	GAGCTCTGCAGCCAAGCTTATGCTTTTACAAAGGCGACA
<i>fadB^{Ec}</i> -A	TTTCTCTCTTTTCTAGATTAAGCCGTTTTTCAGGTCCG
<i>fadA^{Ec}</i> -S	CTTAATCTAGAAAAGAGGAGAAAATACATATGGAACAGGTTGTCATTGT
<i>fadA^{Ec}</i> -A	AATTAAGCTGCGACTAGTTAAACCCGCTCAAAACACCG
<i>fadA</i> (AB) ^{Ec} -S	GGTCGACCTGCAGCCAAGCTTATGGAACAGGTTGTCATTGTCGA
<i>fadA</i> (AB) ^{Ec} -A	AGCATAGAACCACCACCAACCCGCTCAAACACCGTC
<i>fadB</i> (AB) ^{Ec} -S	GTTGCTGCTGTTCTATGCTTTACAAA
<i>fadB</i> (AB) ^{Ec} -A	GTTAATTAAGCTGCGACTAGTTTAAGCCGTTTTTCAGGTCCG
<i>fadA</i> (BA) ^{Ec} -S	CTGGTGCTGCTTCTATGGAACAGG
<i>fadB</i> (BA) ^{Ec} -A	TTCCATAGAACCACCACCAAGCCGTTTTTCAGGTCCGC
<i>alkB^{Phu}</i> -S	CAGGAAACAGAATTCGAGCTCATGAATGGTAAAAAGCAGCGTTCT

引物	引物序列
<i>alkB^{P_{hu}}</i> -A	CCATATGTATTTTCTCCTCTTTTATAGCTCGCAACGGCCGTGG
<i>alkG^{P_{hu}}</i> -S	CGAGCTAAAAAGAGGAGAAAATACATATGGCGCGCTACCAGTGCC
<i>alkG^{P_{hu}}</i> -A	GTGGTGCTGCTCGAGAAGCTTATGTATGTCGACTTAACCCAGTTTTT
<i>alkT^{P_{hu}}</i> -S	TTACACAGGAAAAAGAAATTCATACATGGTACCAAAGAGGAGAAAATACACTATGGCCATTGTTATTGTTGG
<i>alkT^{P_{hu}}</i> -A	GTGCTCGAGAAGCTTGTCTGCACTTAATCCGGCAGCTTAATGCTG
<i>chnD^{Δc}</i> -S	AGAATTCGAGCTCCGTCGACTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGAAAAGAGGAGAAAATACACTATGCATTGCC TATTGCCGTG
<i>chnD^{Δc}</i> -A	GTATTTTCTCCTCTTTAGTGTATTTAATTCTCGTGCATCAGAA
<i>chnE^{Δc}</i> -S	CACTAAAGAGGAGAAAATACACTATGAATTACCCGAATATTCC
<i>chnE^{Δc}</i> -A	GTGGTGCTGCTGCTGCTCGAGAAGCTTGTTCAGCTGGGTGATGAATT
RBS30 ^{nE_{lac}} -S	CAGCAAATGGGTGCGCGATCCCGAGCTTATCGACTGCACGG
RBS29 ^{nE_{lac}} -A	GCCCTTGCTCACCATGAATTCGGTTTCCTGTGTGAAC TTGTTATCCG
RBS30 ^{nE_{lac}} -A	GCCCTTGCTCACCATGAATTC TTTCTCCTCTTTAATCTTGTTATCCG
RBS31 ^{nE_{lac}} -A	GCCCTTGCTCACCATGAATTCGGTTTCCTGTGTGACTTGTTATCCG
RBS32 ^{nE_{lac}} -A	GCCCTTGCTCACCATGAATTCCTTTTCCTGTGTGACTTGTTATCCG
RBS34 ^{nE_{lac}} -A	GCCCTTGCTCACCATGAATTC TTTCTCCTCTTTTGTATCCG
RBS29 ^{tet} -S	CAGTGATAGAGAAAAAGAATTCGGTACCGTTCACACAGGAAACCGGATCCATGCTGAGCAAGGGCGAGGA
RBS30 ^{tet} -S	CAGTGATAGAGAAAAAGAATTCGGTACCGATTAAAGAGGAGAAAGGATCCATGCTGAGCAAGGGCGAGGA
RBS31 ^{tet} -S	CAGTGATAGAGAAAAAGAATTCGGTACCGTCACACAGGAAACCGGATCCATGCTGAGCAAGGGCGAGGA
RBS32 ^{tet} -S	CAGTGATAGAGAAAAAGAATTCGGTACCGTCACACAGGAAAGGGATCCATGCTGAGCAAGGGCGAGGA
RBS34 ^{tet} -S	CAGTGATAGAGAAAAAGAATTCGGTACCAAAGAGGAGAAAGGATCCATGCTGAGCAAGGGCGAGGA
RBS ^{tet} -A	CTCGAGTGGCGCCGCAAGCTTTTACTTGTCACAGCTCGTCCATGCC
<i>fadR^W</i> -S	GGATCCCAAGATTTGCCGCCACCTCT
<i>fadR^W</i> -A	TGCTCTTTAAACGGAAGGGAAGTGAGATTTCCATAACACAGCA
<i>fadR^{down}</i> -S	GTGTTATGGAAATCTCACTTCCCTTCCGTTTAAAGAGCA
<i>fadR^{down}</i> -A	GAATTCATATCGCCGGTTCGACTGG
sgRNA ^{<i>fadR</i>} -R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
sgRNA ^{<i>fadR</i>} -F	CTGATTCTTAACGGGATGAAGCTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
ptet-S	CCTTCGATTCCGACCTCAT
ptet-A	GTTACCGACAAAAACAACAGATA
pEM-S	GCATGCAAGGAGATGGCG
pEM-A	ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCA
pE _{tac} -S	GCGGATATAGGCGCCAGCAACCG
pE _{tac} -A	ATTCCGCAATCCGGATATAGTCG
<i>fadR</i> -S	ACCGACTGCAACGCTGATCAC
<i>fadR</i> -A	CCATCTGTATGATGAAGGGAA

1.2.2 全细胞转化法生产己二酸 将前培养的培
养液转接至 150 mL TB 培养基培养, 当 OD_{600} 达
0.6~0.8 时加入 0.43 mol/L IPTG 或 400 ng/mL 无水
四环素诱导路径酶的表达, 并将温度调至 30 ℃培养
12 h。随后, 培养液于 4 ℃下以 6 000 r/min 离心 10 min,
收集菌体并保存至 -40 ℃冰箱作为生物催化剂。

对于棕榈酸降解生成正己酸,转化体系包括 39.1 mmol/L 棕榈酸、10.0 mmol/L ATP、10.0 mmol/L FAD、10.0 mmol/L NAD⁺、10.0 mmol/L CoA-SH、39.1 mmol/L MgSO₄·7H₂O,用 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液 (pH 7.0)定容至 10 mL,菌体量为 30 g/L,反应条件为 30 ℃下 3 d。发酵液用于气质测定。

对于正己酸转化生产己二酸,转化体系包括 86.0 mmol/L 正己酸、10.0 mmol/L NAD^+ 、8.6 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 7.0)定容至 10 mL,菌体量为 30 g/L,反应条件为 30 $^\circ\text{C}$ 下 3 d。发酵液用于气质测定。

1.2.3 摇瓶发酵生产己二酸 摇瓶发酵生产己二酸的方法包括发酵法和转化法:1)发酵法:工程菌株培养于含有葡萄糖的 M9 培养基中,当葡萄糖消耗完后添加 10 g/L 棕榈酸,同时每 24 h 补加 10 g/L 葡萄糖促进细胞生长。2)转化法:将前培养的培养液转接至 50 mL M9 培养基中,当 10 g/L 葡萄糖消耗完后,在 4 $^\circ\text{C}$ 下以 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,并用 20 mL PBS 缓冲液洗涤细胞两次并转接至含有 10 g/L 棕榈酸的 50 mL 发酵培养基中。整个发酵过程添加碳酸钙调节发酵液的 pH。

1.3 分析方法

细胞密度通过测定 600 nm 处的 OD 值来表示,葡萄糖的测定通过生物传感分析仪,而棕榈酸和己二酸用气质联用检测。

葡萄糖的测定:利用 SBA-40E 生物传感分析仪测定,发酵液稀释 10 倍后直接进样,根据葡萄糖标准曲线计算得到发酵液中的葡萄糖含量。

棕榈酸、正己酸和己二酸的测定:利用气相色谱仪测定,取 2 mL 发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至干净的试管中,随后用 2 mL 乙酸乙酯萃取,取 1 mL 有机相转移至试管并用氮气吹干。对于正己酸的测定:向试管中加入 5 mL 含甲醇、硫酸、三氯甲烷(体积比 30:3:1)的混合液,70 $^\circ\text{C}$ 反应 1 h,冷却后加入 1 mL 超纯水,随后用 1 mL 正己烷萃取进行检测。对于棕榈酸和己二酸的测定:向试管中加入 200 μL 吡啶溶解残留物后,加入 200 μL N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和三甲基氯硅烷混合液(体积比 99:1),65 $^\circ\text{C}$ 反应 30 min。反应液用氮气吹干后加入 1 mL 正己烷进行气质测定。气相检测条件:初始温度 50 $^\circ\text{C}$,保持 1 min;以 8 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 速度升高至 180 $^\circ\text{C}$;以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 速度升高至 240 $^\circ\text{C}$,保持 5 min。载气为氦气,流量 1 mL/min,进样量 1 μL 。

2 结果与分析

2.1 己二酸合成路径的设计

为了构建高效的己二酸生产菌株,以棕榈酸为

底物设计了一条新型的己二酸合成路径,该路径主要包括两个模块,1)上游模块:棕榈酸经 β -氧化路径降解为正己酸,该路径主要包括 6 个关键酶,分别是长链脂肪酸转运蛋白(FadL)、脂酰-CoA 合成酶(FadD)、脂酰-CoA 脱氢酶(FadE)、脂肪酸氧化酶复合体 α 亚基(FadB)、脂肪酸氧化酶复合体 β 亚基(FadA)和硫酯酶(YdiI);2)下游模块:正己酸经 ω -氧化路径生成己二酸,该路径主要包括 5 个关键酶,分别是恶臭假单胞菌(*P. putida*)的烷烃-1-单加氧酶(AlkB)、红素氧还蛋白(AlkG)、红素氧化蛋白-NAD⁺还原酶(AlkT)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp. SE19)的 6-羟基己酸脱氢酶(ChnD)和 6-氧代己酸脱氢酶(ChnE)(见图 1)。理论上,该路径可实现 1 mol 棕榈酸到 1 mol 己二酸的转化,不存在碳损失,回收率达 100%。

2.2 己二酸上游合成路径的构建与强化

首先,通过对 β -氧化路径进行改造,提高棕榈酸到正己酸的转化速率(见图 2(a))。代谢改造策略主要包括:1)将 *fadL* 和 *ydiI* 基因连接至低拷贝数表达载体 ptet;2)将 *fadD*、*fadE*、*fadB* 和 *fadA* 基因连接至中拷贝数表达载体 pEM;3)将编码脂酰-CoA 脱氢酶基因的起始密码子“TTG”替换为“ATG”。SDS-PAGE 验证表明,上述所有蛋白质均已成功表达。以棕榈酸为底物,借助全细胞转化,获得了 0.67 g/L 正己酸,而对照菌株并不能转化棕榈酸生产正己酸(见图 2(b))。上述结果表明,强化 β -氧化路径可促进棕榈酸转化为正己酸。

其次,由于 β -氧化路径涉及多种辅因子,测试了不同浓度 FAD 对正己酸产量的影响。随着辅因子 FAD 浓度的减少,正己酸产量也随之降低。上述结果表明,胞内辅因子 FAD 的浓度是影响 β -氧化降解路径的关键因素之一。为了进一步提高正己酸产量,构建了辅因子循环再生系统^[2],在该系统中 FADH₂ 经甲酸脱氢酶转化为 FAD,与此同时 NADH 被 NADH 氧化酶转化生成 NAD⁺。经全细胞转化表明,菌株 AA0107 可以产生 0.77 g/L 正己酸,与菌株 AA0106 相比提高了 14.93%(见图 2(c))。综上所述,提高胞内的辅因子含量可以促进正己酸的合成。

另外,由于 FadB 和 FadA 分别属于脂肪酸氧化酶复合体的两个亚基,通过构建 FadB 和 FadA 的融合蛋白,可以提高底物的传输效率,进而改善正己酸产量。基于此,构建了两种融合蛋白 FadB-FadA

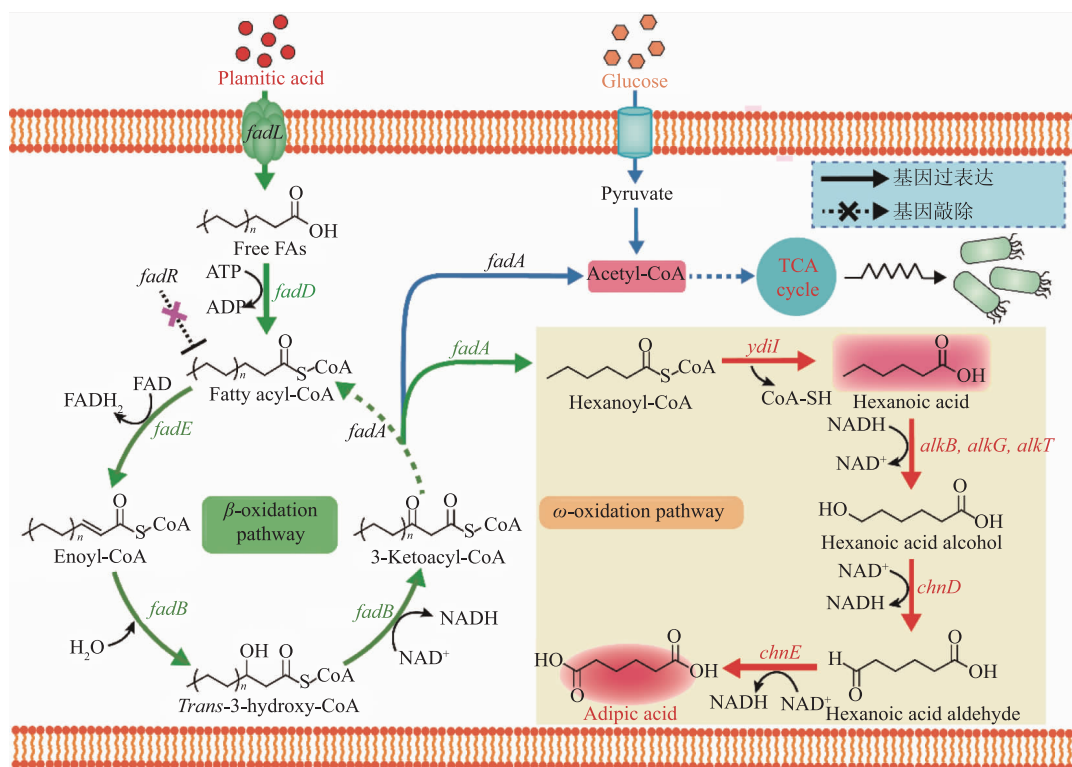


图1 重构大肠杆菌脂肪酸代谢合成己二酸

Fig. 1 Establishing the adipic acid production platform by rewiring fatty acids catabolism in *E. coli*

和 FadA–FadB, 获得菌株 AA0108 和 AA0109。经全细胞转化表明, 工程菌株 AA0108 可以产生 0.13 g/L 正己酸, 与菌株 AA0107 相比降低了 80.60%。另外, 工程菌株 AA0109 没有检测到正己酸产生。上述结果表明, 构建融合蛋白并不能有效促进正己酸的生成, 可能是由于融合蛋白影响了单个蛋白质的结构或功能^[23]。

2.3 己二酸下游合成路径的重构与优化

首先, 通过异源构建 ω -氧化路径, 促进正己酸转化为己二酸。alkB、alkG、alkT、chnD 和 chnE 基因连接至中拷贝数载体 pEtac, 经 SDS-PAGE 验证所有基因均已成功表达。通过全细胞转化表明, 10 g/L 正己酸能被转化生成 0.61 g/L 己二酸 (见图 3(e))。上述结果表明, 异源引入 ω -氧化路径可以氧化正己酸形成己二酸。但是, 己二酸的合成效率还需要进一步提高, 主要原因可能在于异源基因表达不平衡, 导致中间代谢物大量积累, 从而影响细胞的生产性能。

基于上述分析, 模块化优化了 ω -氧化路径。首先, 将 ω -氧化路径分为羟化模块 (包括 alkB、alkG 和 alkT 基因) 和氧化模块 (包括 chnD 和 chnE 基

因)。其次, 以绿色荧光蛋白 (GFP) 为报告蛋白, 将 RBS30、RBS34 和 RBS32 强度分别作为高、中和低 3 种水平。再次, 借助不同强度的 RBS, 构建 5 种基因表达水平的羟化模块和氧化模块组合 (见图 3(a)~图 3(d))。最后, 全细胞转化结果表明, 下调羟化模块降低了己二酸的产量, 仅有 0.56 g/L; 上调羟化模块提高己二酸的产量至 0.69 g/L, 与菌株 AA0201 相比提高了 13.11%。另外, 下调氧化模块提高了己二酸的产量, 达到 0.76 g/L, 与菌株 AA0201 相比提高了 24.59%; 上调氧化模块降低了己二酸产量 (见图 3(e))。上述结果表明, 通过上调羟化模块和下调氧化模块, 优化了 ω -氧化路径, 有效促进了己二酸的合成。

2.4 己二酸合成路径的组装与应用

为了实现棕榈酸到己二酸的转化, 将上述构建的最适上游模块和下游模块进行组装, 获得工程菌株 AA0301。全细胞转化结果表明, 工程菌株 AA0301 能够转化棕榈酸产生 57.0 mg/L 己二酸 (见图 4(a))。为了增强细胞对脂肪酸的利用能力, 敲除了编码脂肪酸代谢调控蛋白的 fadR 基因, 获得工程菌株 AA0303。同时, 将最优的上游模块和下游模块

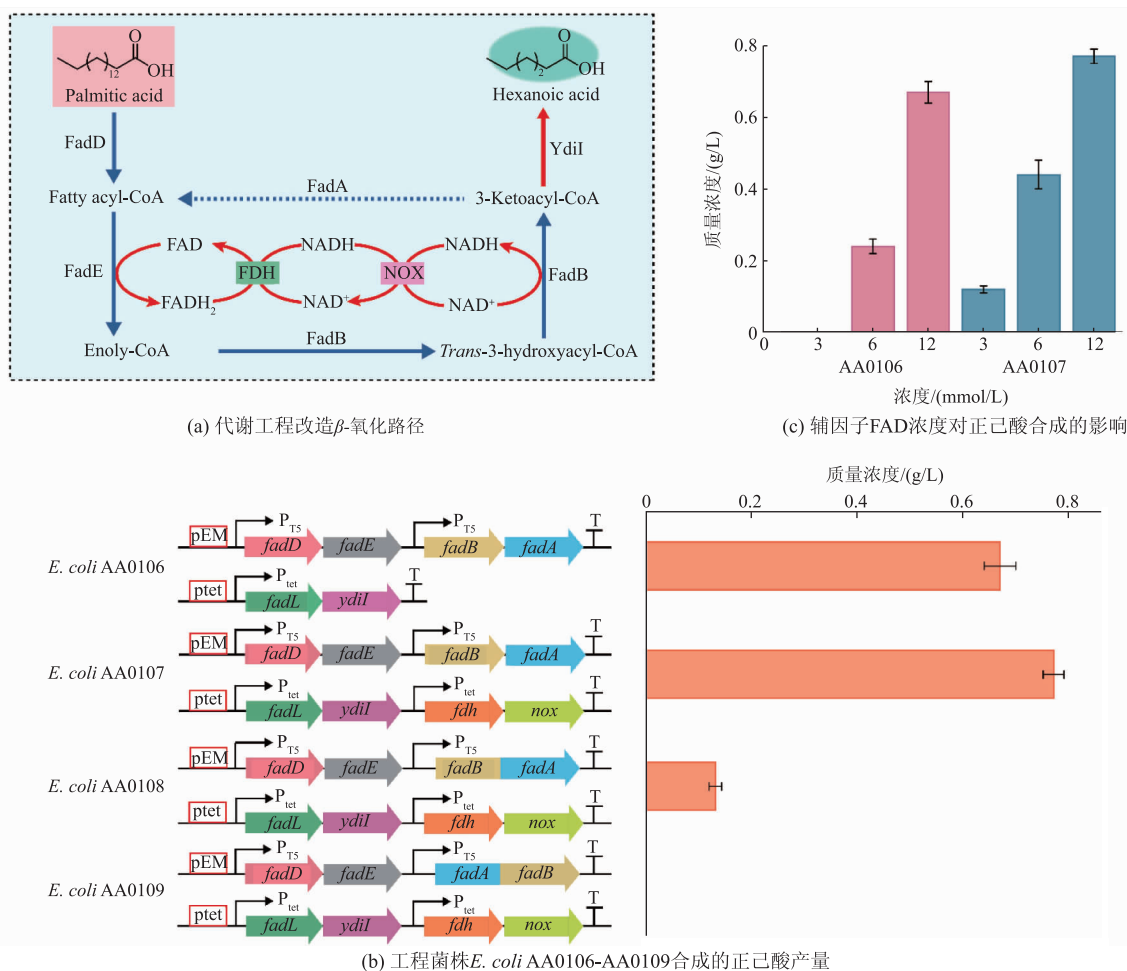


图2 强化 β -氧化途径提高正己酸的合成

Fig. 2 Enhancement of β -oxidation degradation pathway for improving the yield of hexanoic acid

导入菌株 AA0303 中,获得工程菌株 AA0304。随后,采用两种发酵策略进一步提高己二酸产量,1)发酵法:首先将工程菌株 AA0304 培养在 M9 培养基中,培养至一定时间后直接加入棕榈酸,在发酵过程中添加葡萄糖用于细胞生长;2)转化法:首先将工程菌株 AA0304 培养在以葡萄糖为碳源的 M9 培养基中,当培养至一定时间后收集菌体,转接至以棕榈酸为底物的发酵培养基中。研究发现,采用转化法更有利于己二酸积累,产量达到了 110.2 mg/L,与发酵法相比提高了 93.33%(见图 4(b)~图 4(c))。上述结果表明,通过结合 β -氧化途径和 ω -氧化途径,棕榈酸能够有效转化为己二酸。

由于高质量浓度的棕榈酸会附着在细胞膜表面,降低细胞呼吸速率^[24],因此进一步分析了分批添加棕榈酸对己二酸产量的影响。研究发现,棕榈酸的分批添加,使得己二酸产量提高到了 1.32 g/L,与

直接添加棕榈酸相比提高了 11.98 倍。上述结果表明,分批添加棕榈酸,降低了其对细胞的毒性作用,改善了细胞生长状态,从而促进了己二酸生产。

3 讨论

己二酸合成新途径有助于实现更高的己二酸得率。目前,己二酸的合成路径主要包括:顺,顺-粘糠酸路径、D-葡萄糖二酸路径、逆己二酸降解路径、逆 β -氧化路径和 ω -氧化路径等^[4,25-28]。上述路径获得的己二酸产量较低,原因主要包括以下 3 个方面:1)丙酮酸转化为乙酰 CoA 会释放二氧化碳,降低己二酸产率;2)己二酸的合成路径较长,导致了副产物积累;3)细胞生长与己二酸合成之间竞争代谢流。然而,作者构建的己二酸合成路径具有更多的优势,一方面,脂肪酸不仅能通过分解代谢路径生产目标化学品,而且释放的乙酰 CoA 可以促进细胞

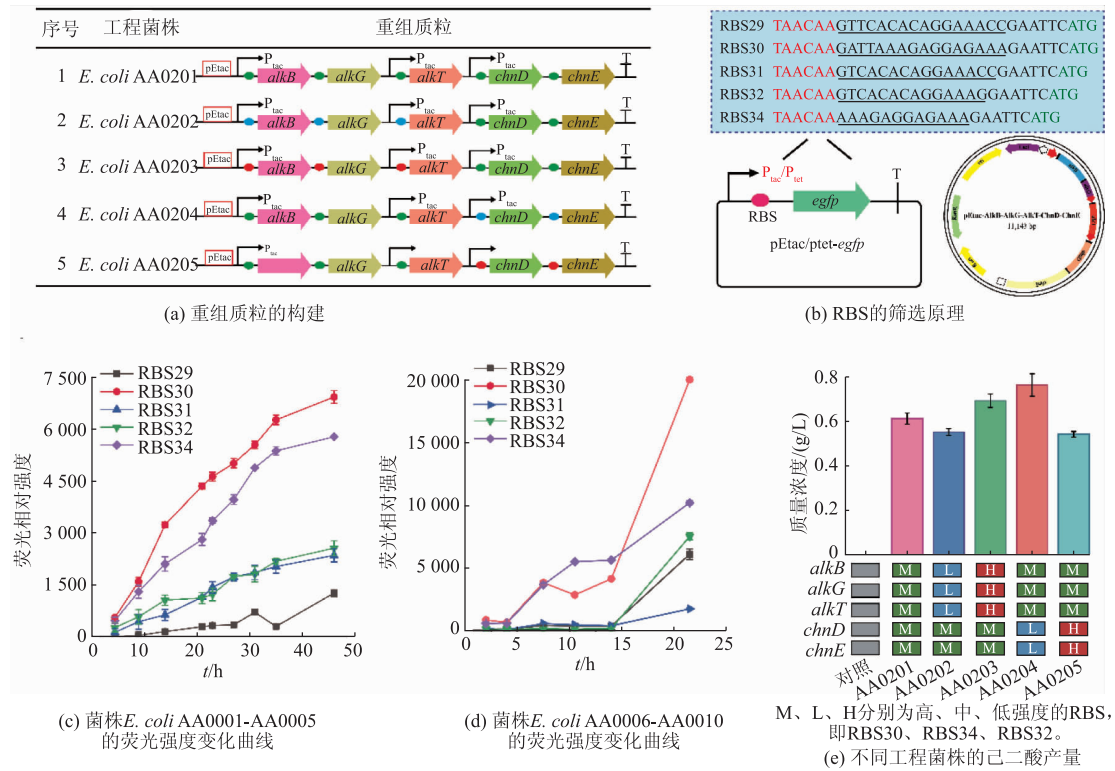
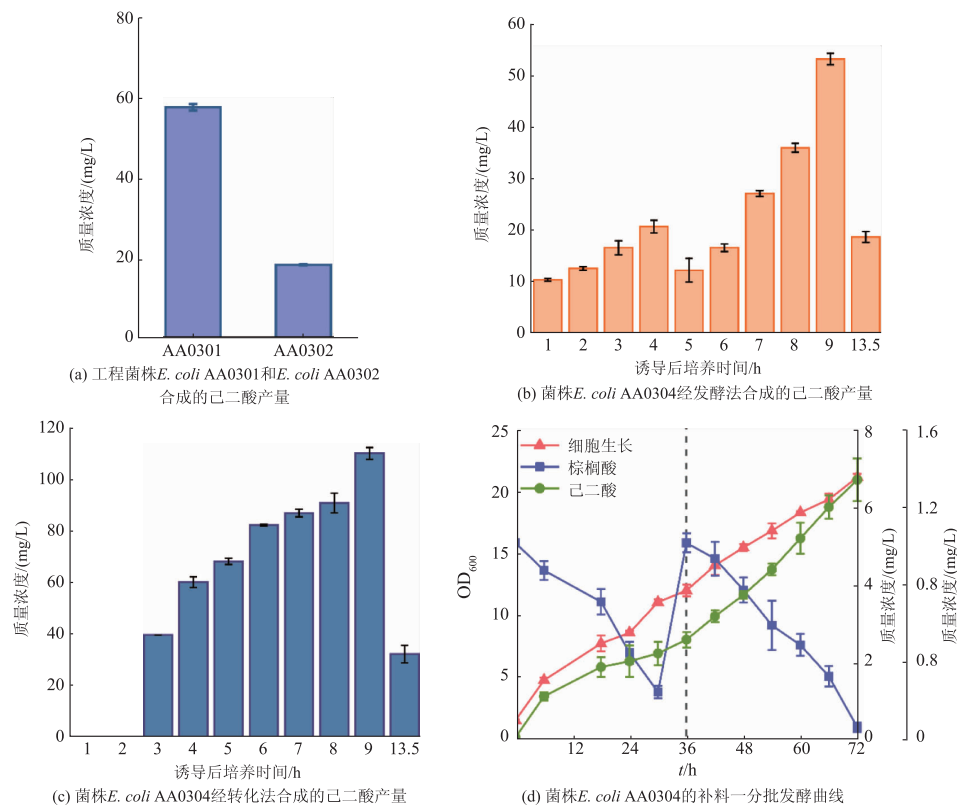
图 3 重构 ω -氧化途径合成己二酸Fig. 3 Reconstructing ω -oxidation pathway for producing adipic acid

图 4 利用棕榈酸发酵生产己二酸

Fig. 4 Production of adipic acid by palmitic acid fermentation

生长,从而避免了细胞生长与产物合成之间的代谢流竞争;另一方面,作者设计的己二酸合成路径能够实现更高的理论得率。以往所报道的己二酸合成路径均以葡萄糖或甘油为底物,己二酸理论得率为33%~67%。该研究中己二酸合成路径却能够实现100%的理论得率,远高于其他合成路径^[1,5,26]。因此,以脂肪酸为基础的合成路径具有较高的产品得率和较低的原料成本,是一种潜在的可替代传统化学法合成己二酸的方法。

脂肪酸利用型菌株的开发不仅拓展了微生物的底物谱,而且有助于促进循环经济的发展。近年来,随着代谢工程、合成生物学的快速发展,越来越多的研究已经转向廉价原料的利用,例如蔗糖、果糖、木质纤维素、粗甘油、废弃食用油等^[14,29-33]。目前,关于己二酸的生物法合成,主要以葡萄糖或甘油为原料,产量相对较低。脂肪酸作为自然界中广泛存在的廉价原料,具有高效生产高附加值化学品的潜力,主要原因在于:1)利用脂肪酸具有较高的碳

原子经济价值,有利于提高己二酸得率;2)利用脂肪酸可避免与可食用农作物的竞争,有利于降低生产成本;3)利用脂肪酸可解决食品废弃物和环境污染的问题。因此,作者以脂肪酸为原料,通过结合 β -氧化路径和 ω -氧化路径设计、构建和优化己二酸合成路径,促使棕榈酸转化生成己二酸,为回收和再利用食品废弃物提供了可能。另外,利用廉价原料合成己二酸,为实现低成本和可持续的工业化生产开辟了新的道路。

4 结 语

结合 β -氧化路径和 ω -氧化路径,设计并构建了一条以脂肪酸为底物合成己二酸的新路径。在此基础上,借助系统代谢工程策略,优化了己二酸合成路径。此外,通过发酵条件优化,提高了己二酸的产量。最终,工程菌株 *E. coli* AA0304 能够产生己二酸 1.32 g/L。为利用脂肪酸合成其他高价值化学品奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] BOWEN C, BONIN J, KOGLER A, et al. Engineering *Escherichia coli* for conversion of glucose to medium-chain ω -hydroxy fatty acids and α, ω -dicarboxylic-dicarboxylic acids[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(3): 200-206.
- [2] LI G, HUANG D, SUI X, et al. Advances in microbial production of medium-chain dicarboxylic acids for nylon materials[J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2020, 5(2): 221-238.
- [3] SKOOG E, SHIN J H, SAEZ-JIMENEZ V, et al. Biobased adipic acid-the challenge of developing the production host[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(8): 2248-2263.
- [4] WANG F, ZHAO J, LI Q, et al. One-pot biocatalytic route from cycloalkanes to α, ω -dicarboxylic acids by designed *Escherichia coli* consortia[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-10.
- [5] ZHAO M, HUANG D, ZHANG X, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate-degradation pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 254-262.
- [6] KO Y, KIM J, LEE J, et al. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(14): 4615-4636.
- [7] LIU J, HOU J. Multidimensional metabolic engineering for constructing efficient cell factories[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(5): 468-469.
- [8] NIELSEN J. Cell factory engineering for improved production of natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(9): 1233-1236.
- [9] SUN J, RAZA M, SUN X, et al. Biosynthesis of adipic acid via microaerobic hydrogenation of *cis, cis*-muconic acid by oxygen-sensitive enoate reductase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 280: 49-54.
- [10] CHEONG S, CLOMBURG J, GONZALEZ R. Energy- and carbon-efficient synthesis of functionalized small molecules in bacteria using non-decarboxylative Claisen condensation reactions[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 556-561.
- [11] CINTOLESI A, RODRIGUEZ-MOYA M, GONZALEZ R. Fatty acid oxidation: systems analysis and applications[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2013, 5(5): 575-585.
- [12] LIU B, XIANG S, ZHAO G, et al. Efficient production of 3-hydroxypropionate from fatty acids feedstock in *Escherichia coli*[J].

- Metabolic Engineering**, 2019, 51 : 121-130.
- [13] PARK H, PARK G, JEON W, et al. Whole-cell biocatalysis using cytochrome P450 monooxygenases for biotransformation of sustainable bioresources (fatty acids, fatty alkanes, and aromatic amino acids) [J]. **Biotechnology Advances**, 2020, 40 : 1-22.
- [14] VIDIGAL I, SIQUEIRA A, MELO M, et al. Applications of an electronic nose in the prediction of oxidative stability of stored biodiesel derived from soybean and waste cooking oil [J]. **Fuel**, 2021, 284 : 1-9.
- [15] DENG Y, MAO Y. Production of adipic acid by the native-occurring pathway in *Thermobifida fusca* B6 [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2015, 119(4) : 1057-1063.
- [16] LIU G, HUANG D, SUI X, et al. Advances in microbial production of medium-chain dicarboxylic acids for nylon materials [J]. **Reaction Chemistry & Engineering**, 2020, 5(2): 221-238.
- [17] LIN Y, SUN X, YUAN Q, et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli* [J]. **Metabolic Engineering**, 2014, 23 : 62-69.
- [18] KRUYER N, PERALTA-YAHYA P. Metabolic engineering strategies to bio-adipic acid production [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2017, 45: 136-143.
- [19] YU J, XIA X, ZHONG J, et al. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli* [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2014, 111(12) : 2580-2586.
- [20] NIU W, WILLETT H, MUELLER J, et al. Direct biosynthesis of adipic acid from lignin-derived aromatics using engineered *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. **Metabolic Engineering**, 2020, 59 : 151-161.
- [21] JU J, OH B, HEO S, et al. Production of adipic acid by short-and long-chain fatty acid acyl-CoA oxidase engineered in yeast *Candida tropicalis* [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2020, 43(1) : 33-43.
- [22] HOU Y, HOSSAIN G, LI J, et al. Metabolic engineering of cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD) synthesis and regeneration in *Escherichia coli* for production of α -keto acids [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2017, 114(9) : 1928-1936.
- [23] THOMPSON B, PUGH S, MACHAS M, et al. Muconic acid production *via* alternative pathways and a synthetic "metabolic funnel" [J]. **ACS Synthetic Biology**, 2018, 7(2) : 565-575.
- [24] SHIN J, YU J, PARK M, et al. Endocytosing *Escherichia coli* as a whole-cell biocatalyst of fatty acids [J]. **ACS Synthetic Biology**, 2019, 8(5) : 1055-1066.
- [25] CHAE T, AHN J, KO Y, et al. Metabolic engineering for the production of dicarboxylic acids and diamines [J]. **Metabolic Engineering**, 2020, 58 : 2-16.
- [26] CLOMBURG J, BLANKSCHEN M, VICK J, et al. Integrated engineering of β -oxidation reversal and ω -oxidation pathways for the synthesis of medium chain ω -functionalized carboxylic acids [J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 28 : 202-212.
- [27] KIM T, KANG S, PARK J, et al. Construction of an engineered biocatalyst system for the production of medium-chain α , ω -dicarboxylic acids from medium-chain ω -hydroxycarboxylic acids [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2020, 117(9) : 2648-2657.
- [28] VANNULAND Y, DEVOGEL F, SCOTT E, et al. Biocatalytic, one-pot diterminal oxidation and esterification of n-alkanes for production of α , ω -diol and α , ω -dicarboxylic acid esters [J]. **Metabolic Engineering**, 2017, 44 : 134-142.
- [29] CHEN X, TIAN K, NIU D, et al. Efficient bioconversion of crude glycerol from biodiesel to optically pure (D)-lactate by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. **Green Chemistry**, 2014, 16(1) : 342-350.
- [30] HE F, QIN S, YANG Z, et al. Butyric acid production from spent coffee grounds by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing galactose catabolism genes [J]. **Bioresource Technology**, 2020, 304 : 1-7.
- [31] NGUYEN C, KIM J, NGUYEN T, et al. Production of L- and D-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation [J]. **Bioresource Technology**, 2013, 146 : 35-43.
- [32] QU C, CHEN L, FU H, et al. Engineering *Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27 with *argR* knockout for enhanced ethanol production from lignocellulosic hydrolysates [J]. **Bioresource Technology**, 2020, 310 : 1-10.
- [33] SHAHAB R, BRETHAUER S, DAVEY M, et al. A heterogeneous microbial consortium producing short-chain fatty acids from lignocellulose [J]. **Science**, 2020, 369(6507) : 1-2.