

短链烷炔的微生物合成

赵传纪

学号：2013304010053

2013年11月18日

主要内容

一、背景介绍

二、短链烷炔类的生产过程优化

(一) 短链FFAs的生成过程优化

(二) SCAs的生成过程优化

(三) 外界条件的优化

三、总结与讨论

一、背景简介

以生物为基础的燃料的可持续生产对我们的可持续发展的未来越来越重要。

例如和现在以石油为基础的燃料或者更好的生物燃料相比，烯炔和烷炔等碳氢化合物在很多方面更有潜力用来作为生物燃料，包括它的高能含量（例如它比乙醇高30%的能量）。

曾经有报道说C13-C17长链的碳水化合物生物合成取代柴油。

(1) 利用一个含有蓝藻烷炔类生物合成操纵子编码一个脂酰ACP还原酶和乙醛脱羧酶的大肠杆菌工程菌可使十五烷和十七烷为主的长链碳氢化合物产量达到300 mg/L。

(2) 在大肠杆菌工程菌中利用枯草芽孢杆菌的*fabH*基因的过表达可以生产偶数和奇数C原子数目的长链烷炔类。

在这些研究中，炔类的生产都是通过脂肪酰基ACPs直接产生脂肪醛的脱羧作用产生的。

另外，最近的一些报道称脂肪酸通过脂肪酸还原酶和乙醛脱羧酶的作用可生成长链烷炔类。

汽油，是一种C4-12的短链碳氢化合物（SCHCs）的混合物，是一种最早用在内部燃料发动机液体燃料。尽管短链醇类可作为汽油的替代品生产，但是他们是比不上汽油的次品。因此，生产SCHCs比直接利用汽油有巨大的利益。但是，目前为止还没有任何利用微生物发酵生产SCHCs的报道。这可能由于大部分细菌性脂肪酸是C14-18的长链类。

因此，这篇文章报道一个大肠杆菌工程菌的开发，能利用脂肪酸的生物合成与降解过程来生产和汽油类似的短链烷炔类（SCAs）。

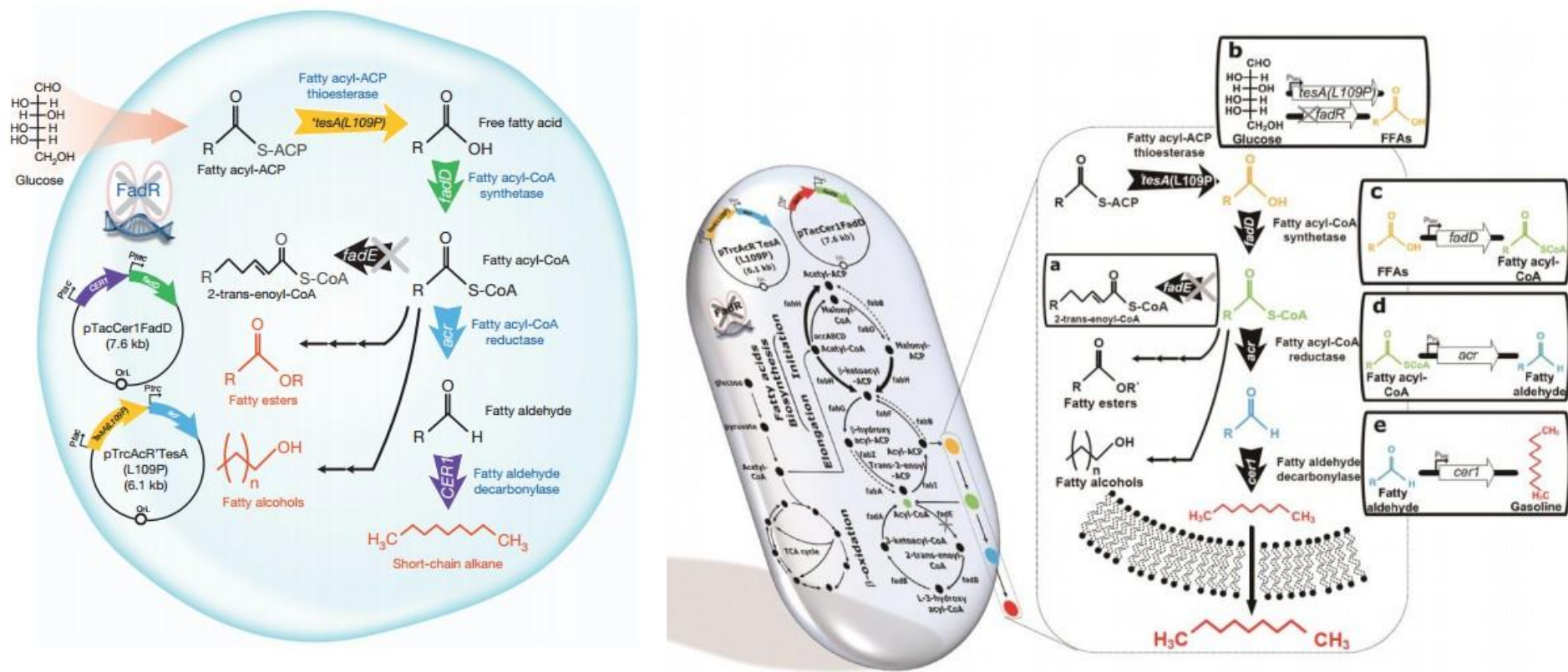


图1

通过引入一个新的途径涉及一个突变的脂肪酰基ACP硫酯酶，脂肪酰基CoA合成酶和还原酶，脂肪醛脱羧酶到大肠杆菌工程菌中来生产短链脂肪酰基ACPs，这个策略还可以生成短链自由脂肪酸（FFAs），脂肪酯类和脂肪醇类。

二、短链烷炔类的生产过程优化

(一) 短链FFAs的生成过程优化

(二) SCAs的生成过程优化

(三) 外界条件的优化

(一) 短链FFAs的生成过程优化

在脂肪酸为基础的生物燃料生产中，FFAs是利用脂肪酰基ACPs通过硫酯酶的作用得到的，是一个重要的中间代谢产物。

(1) 为了检测不同硫酯酶的性能，大肠杆菌W3110中*fadD*基因的缺失是防止FFAs到脂肪酰基CoAs的转化。在这三个大肠杆菌*tesB*基因，*tesA*基因和*UcfatB*基因编码的硫酯酶中，发现Tes A是最好的，能生成产量达到313 mg/l的FFAs混合物（主要是C16，还有一些少量的C8 C10 C12 C14）。

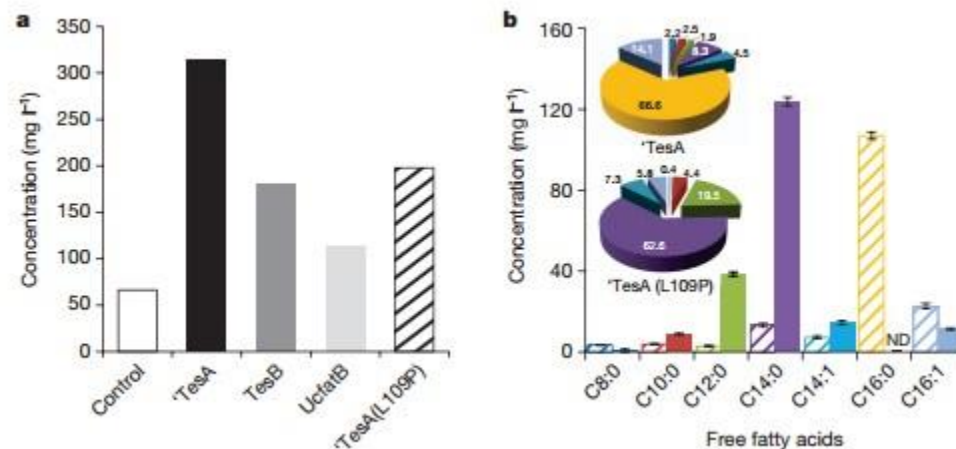


图2

(2) 由于TesA优先的水解长链脂肪酰基ACPs，因此需要一个水解短链脂肪酰基ACPs到FFAs的硫酸酯酶。

带一个L109P突变的TesA对长链和短链的脂肪酰基ACPs都有水解活性。在大肠杆菌中*fadD*缺失W3110并表达TesA (L109P) 重组体能产生一个短链的FFA混合物。使得C16 FFAs减少了91%，C14，C12和C10分别增加了6.8、12.8和2.2倍。重组菌株W3110 (*fadD*基因缺失并包含一个TesA (L109P)) 生成C12和C14 FFAs百分比分别是19.5%和69.9%。(图2b) 很多有底物特异性和活性的硫酸酯酶能同样的使用。还有一些其他的途径来生产短链FFAs。

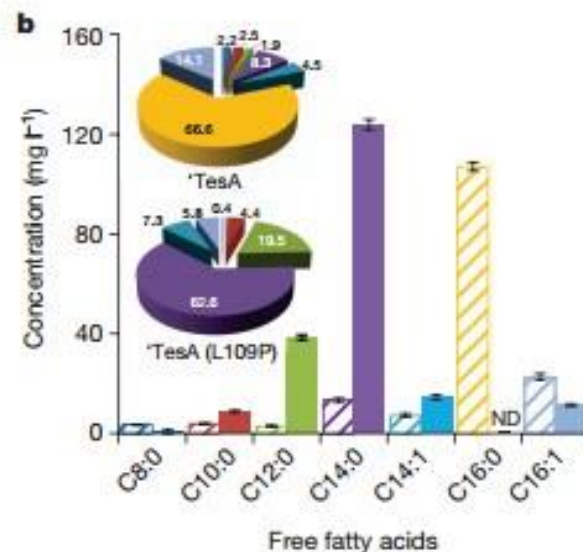


图3

(3) 为了生产SCAs, *fadE*基因缺失来阻止发生 β 氧化反应(图1)。因此利用W3110菌株缺失*fadE*基因来构建一个GAS1菌株。由于W3110中缺失了*fadD*基因, 因此在GAS1中也缺失*fadD*基因, 可以生成FFAs。fadD基因缺失的GAS1菌株中同样表达TesA (L109P) 也能生成短链FFAs(图2c)。这有一些变化在FFAs的组成中, 但是C14是最普遍的一种在表达TesA (L109P) 的*fadD*基因缺失的重组菌W3110菌株中。

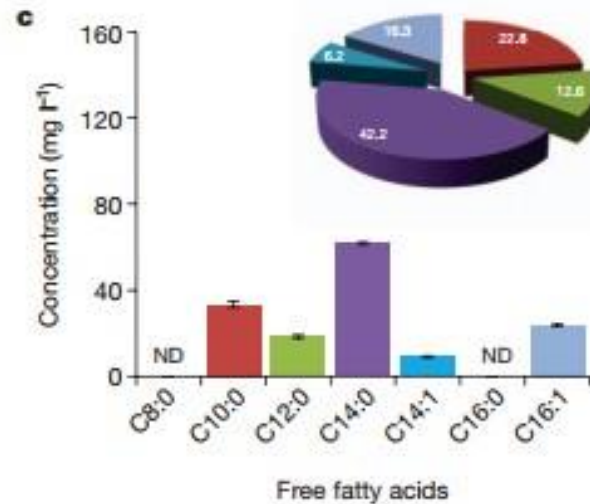


图4

(4) 通过促进脂肪酸生物合成的开始来提高短链FFAs的产量，也就是， β 酮乙基ACP是通过乙酰辅酶A和丙二酰ACP利用3酮乙基ACP合酶（FabH）的缩合作用生成的。因此*fabH*基因的过表达确实能提高短链脂肪酸的生成：C14 FFAs减少77.4%，C8和C10分别增加65%和16%在TesA（L109P）和FabH表达并且*fadD*基因缺失的W3110菌株中。

另外，TesA（L109P）和FabH表达并*fadD*基因缺失的GAS1菌株中比表达TesA（L109P）表达且*fadD*基因缺失的W3110菌株生成多于5.7倍的C8 FFAs（图5）。

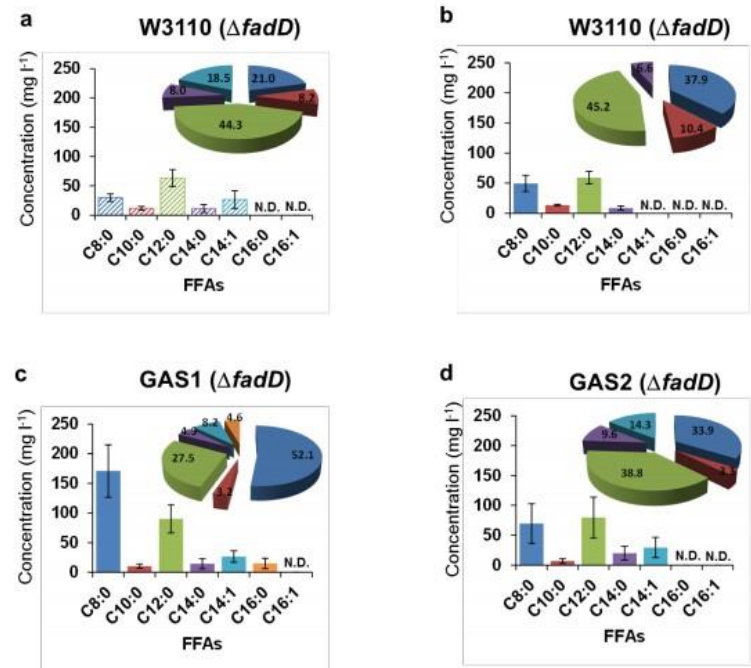


图5 a: W3110FadD strain overexpressing 'TesA(L109P)
 b: : W3110FadD strain overexpressing 'TesA(L109P) and FabH
 c: GAS1FadD overexpressing 'TesA(L109P) and FabH
 d: GAS2FadD overexpressing 'TesA(L109P) and FabH

(5) FabH是受不饱和脂肪酰基ACPs抑制的。FadR通过上调 β 羟烷基 ACP脱氢酶和3酮乙基ACP合酶I操纵子来调控不饱和脂肪酸生物合成，*fadR*基因缺失在GAS1中来构建GAS2菌株。表达TesA (L109P) 的 *fadD*基因缺失的GAS2菌株生产产量增加2.6倍C10和1.6倍C12FFAs和减少64.6%的C14 FFAs相对于GAS1 (图6)

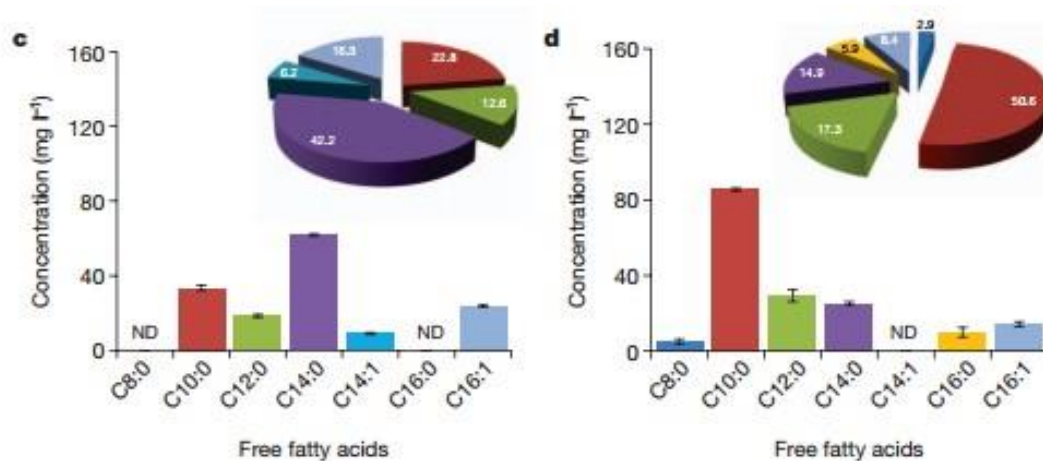


图6 c: *fadD*-deleted GAS1

d: *fadD*-deleted GAS2 expressing 'TesA(L109P)

(6) 因此，不管*fabH*基因的过表达还是*fadR*基因的缺失都导致短链FFAs产量的提高。这两个途径结合起来却不能进一步提高短链FFAs的产量可能是由于生长迟缓的原因。

FabH在提高短链脂肪酸的产量是通过sRNA基因敲除实验来鉴定的。FabH基因敲出后减少了短链脂肪酸和增加长链脂肪酸的值。C1FFA减少94%，C14增加2倍在*fadD*基因缺失的GAS2菌株中（图7）

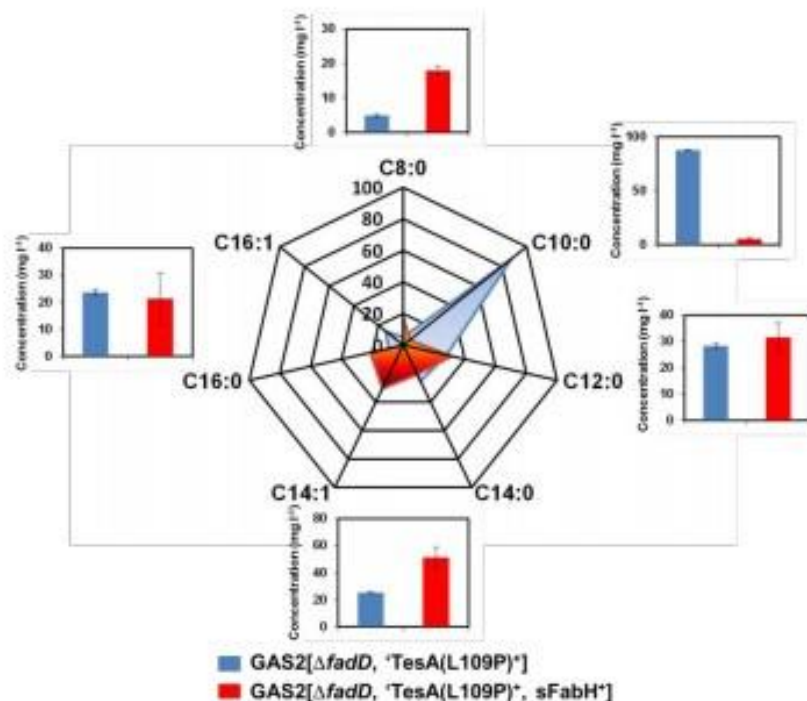


图7

综上所述，短链FFAs在大肠杆菌中能通过缺失*fadD*、*fadE*和*fadR*基因成功生成。

（二）SCAs的生成过程优化

短链FFAs到SCAs的转化是通过*fadD*基因的扩增和脂肪酰基CoA还原酶和脂肪醛类脱羧酶反应在GAS2菌株中执行的（图1）。尽管大肠杆菌利用长链FFAs，但是过表达*fadD*基因的重组大肠杆菌能利用C8和C10 FFAs。这表明FadD能转移CoA到长链和短链FFAs。因此，通过用trc强启动子代替*fadD*基因本身的启动子在GAS2中来构建了GAS3重组菌株。而且，通过*fadD*基因的过表达能使FadD水平的进一步提高。丙酮丁醇梭菌*acr*基因编码一个脂肪酰基CoA还原酶使脂肪酰基CoAs转化成脂肪乙醛，拟南芥*CER1*基因编码一个脂肪乙醛脱氢酶使脂肪乙醛通过脱羧作用到相应的炔类在trc和tac的启动子作用下。

因此，包含pTacCer1FadD和 pTrcAcR'TesA(L109P)的GAS3菌株的发酵操作导致短链碳氢化合物（SCHCs）产量达到396.5 mg/l，包括18.1 mg /l辛烯，34.1 mg /l 2-辛烯,217.0 mg /l壬烷, 100.0 mg /l十二烷, 24.1 mg/l十三烷，和3.2 mg/l十四碳烷（图8）。

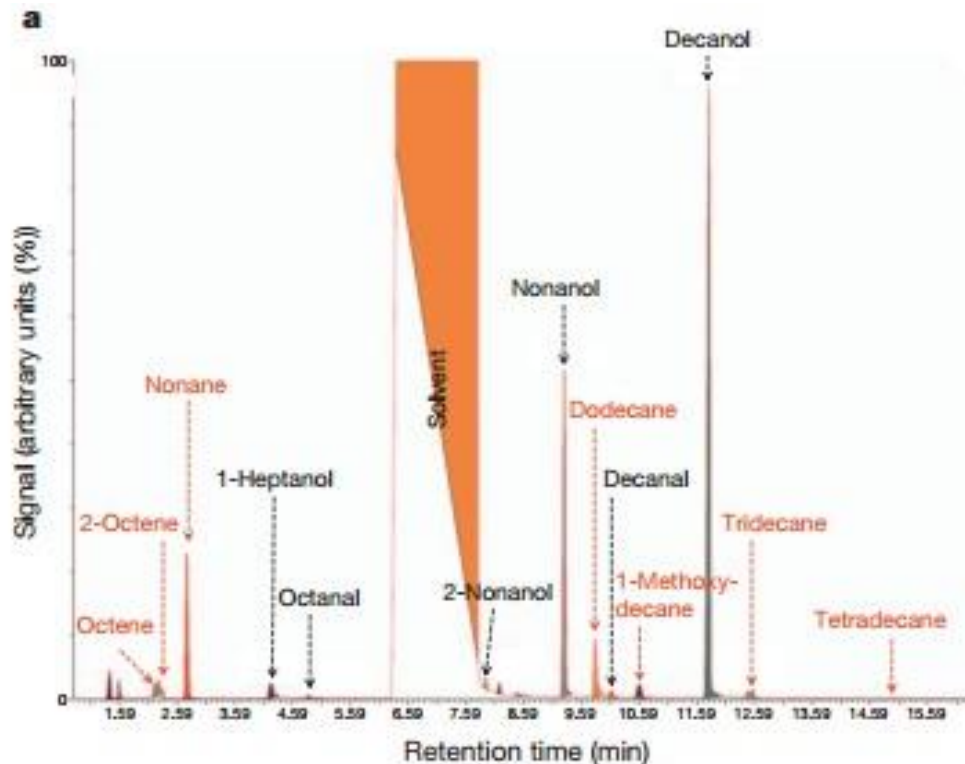
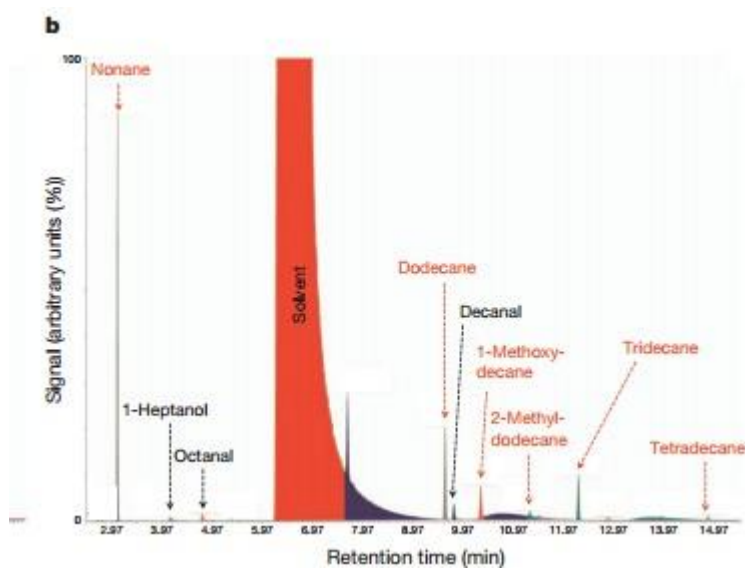


图8

(三) 外界条件的优化

为了进一步增加SCHCs，脂肪乙醛脱羧酶（CER1）的活性需要增强。CER1的表达水平在30℃最高，因此，发酵的最佳温度是30℃。包含pTacCer1FadD和 pTrcAcR'TesA(L109P)的GAS3菌株的发酵操作在30℃导致炔类产量达到580.8mg/l，包括327.8 mg /l壬烷, 136.5mg /l十二烷, 64.8mg/l十三烷, 42.8 mg/l 2-甲基十二烷和8.9mg/l十四碳烷（图9）。因为包含TesA（L109P）和*fadD*缺失的GAS2主要生成了C10 FFA，因此脱羧作用产生了很多壬烷。



三、总结与讨论

(一) 拟南芥脂肪乙醛脱羧酶 (CER1) 对大于30个碳原子数目的长链脂肪醛类有活性。但是，我们的结果证明这个酶对短链脂肪醛类也有活性 (补充表格2)。

另外，短链脂肪醇类和脂肪醛类在发酵结束的时候都检测到了。脂肪醇可能生成由于大肠杆菌内在的醇类脱氢酶作用，即使它在有氧的条件下活性很低，也可能由于能把脂肪醛类转化成脂肪醇的脂肪酰基CoA还原酶的过表达。因此，乙醛脱羧酶的活性需要被促进并进一步的提高SCAs的产量。另外一种可能的途径是CER3的过表达，最近发现能增强CER1的活性。

(二) 最近发展了一种大肠杆菌菌株整合一个动力学传感器调控系统来生产C12-20长链脂肪乙基酯类 (FAEEs)。利用GAS3菌株平台, 尝试生产短链FAEEs。为了乙醇的有氧生产大肠杆菌*adhE^{mut}*基因被表达。为了脂肪酰基CoAs和醇类的酯化反应, 不动杆菌ADP1蜡酯合酶*atfA*基因被表达。包含质粒pTacAdhE^{mut}FadD 和 pTrcAtfA'TesA(L109P)的GAS3菌株的分批发酵能生产477.7 mg/ l的短链FAEEs, 包含22.4 mg/ l的C10, 363.1 mg/ l C12 和 92.2 mg /l 的C14 FAEEs。因此, 这个开发的平台能通过不同的新陈代谢途径来生产短链FAEEs和汽油。但是, FAEEs的组成和SCAs的生产是不一样的。因为壬烷是主要的烷炔类产物, 希望得到大量的C10 FAEE而不是C12。这个矛盾可能是由于对长链脂肪酰基CoAs更高亲和力的蜡酯合酶的底物特异性造成的。

(三) 我们新开发了平台：大肠杆菌菌株，能生产短链FFAs的GAS2菌株和生产SCHCs，脂肪酯类和脂肪醇类的GAS3菌株。可能建立相应的新陈代谢途径通过工程菌大肠杆菌菌株的脂肪酸生物合成和降解途径和硫酯酶。长链烷炔类柴油能生产通过使用相同的平台菌株不使用硫酯酶。这个工作作为一个基石来确立短链脂肪酸生成的生物工艺过程从可再生资源得到化工制品和燃料。

谢谢观赏