代谢工程改造大肠杆菌对中碳脂肪酸生产的加强作用

刘 强[1,2]，郑艳宁[2,3]，姜兴林[2,3]，刘东杰[1]，秦 文[1,*]，咸 漠[2]
(1.四川农业大学食品学院，四川 雅安 625014；2.中国科学院青岛生物能源与过程研究所，山东 青岛 266101；3.中国科学院大学，北京 100049)

摘 要：通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中过量表达来自加州月桂(*Umbellulana californica*)的硫酯酶基因*BTE*，极大地加强了大肠杆菌中碳脂肪酸(MCFAs)的生产。并对MCFAs在大肠杆菌胞内外的分布，以及是否对大肠杆菌细胞膜磷脂组成产生影响等进行了系统的分析。结果发现，产生的MCFAs绝大部分存在于大肠杆菌细胞内，且未对其细胞膜磷脂组成产生明显影响。为了继续提高MCFAs的产量，又进一步对大肠杆菌进行了代谢工程改造，通过结合表达乙酰-CoA羧化酶(ACCase)，优化硫酯酶的表达水平等，最终获得了188.9mg/L的总MCFAs产量，并且产生的MCFAs的比例高达85%以上，实现了MCFAs的高特异性生产。

关键词：中碳脂肪酸；大肠杆菌；硫酯酶；代谢工程

Metabolic Engineering of *Escherich coli* to Enhance the Production of Medium-chain Fatty Acids

LIU Qiang[1,2]，ZHENG Yan-ning[2,3]，JIANG Xing-lin[2,3]，LIU Dong-jie[1]，QIN Wen[1,*]，XIAN Mo[2]
(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China；2. Qingdao Institute of Biomass Energy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China；3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract：Medium-chain fatty acids (MCFAs) are the major components of medium-chain triglycerides (MCT), which play an important role in the food additive industry. In this study, the production of MCFAs was greatly enhanced by overexpressed thioesterase gene of *Umbellulana californica* (*BTE*) in *E. coli*. In addition, the location of the produced MCFAs and the effect of synthesized MCFAs on the composition of membrane phospholipids were also determined. The results indicated that MCFAs were mainly located in *E. coli*, and their production had little effect on the composition of membrane phospholipids. To further improve the production of MCFAs, strategies including co-overexpression of acetyl-CoA carboxylase (ACCase) and the optimization of the expression level of thioesterase BTE were also carried out. Finally, 188.9 mg/L MCFAs were achieved, representing a rather high production of MCFAs. Meanwhile, the MCFAs accounted for over 85% of the total free fatty acids, suggesting the high-specificity production of MCFAs.

Key words：medium-chain fatty acid；*Escherichia coli*；thioesterase；metabolic engineering
中图分类号：Q815 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)21-0131-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201321027

中碳脂肪酸(medium-chain fatty acids，MCFAs)是C12和C14链长游离脂肪酸的总和，是中碳脂肪酸酯(medium-chain triglycerides，MCT)的主要组成成分[1]。MCT具有调节食品风味、口感和质构等功能以及易吸收、低热量的特点，可用来作为保健食品或医疗食品的原料，在食品工业中有着十分广泛而重要的应用[2-6]。目前，MCFAs生产主要以动植物油脂为原料进行生产，但这些油脂受季节、地域等因素限制，生产成本高，不利于大规模工业化生产应用[7]。而且大部分动植物油脂是以长链脂肪酸为主要成分，MCFAs的含量相对较低。

通过微生物发酵来进行MCFAs的生产，具有发酵周期短，不受场地、季节、气候变化的影响，易于连续工业化生产的优点。目前还没有利用野生型菌株进行微生物发酵来进行MCFAs的生产，随着分子生物学技术的发展，通过代谢工程手段对微生物细胞进行定向调控，发酵生产获得优质的MCFAs，具有十分重要的研究价值[8]。

收稿日期：2012-09-26
基金项目：国家自然科学基金项目(21106170)；中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-EW-G-13)；广东省中国科学院全面战略合作项目(2009B091300146)
作者简介：刘强(1986—)，男，硕士研究生，研究方向为食品生物技术。E-mail：liuqiang@qibebt.ac.cn
*通信作者：秦文(1967—)，女，教授，博士，研究方向为食品生物技术。E-mail：qinwen1967@alinyun.com

本研究利用遗传背景清楚、易于工程调控、可高密度发酵的大肠杆菌作为出发菌株，并对其进行代谢工程改造以加强MCFAs的生产。大肠杆菌脂肪酸生物合成与调控机制已得到广泛的研究，在大肠杆菌脂肪酸合成途径中，硫酯酶可以催化脂酰基-ACPs(酰基载体蛋白)水解生成游离脂肪酸和ACP，解除由脂酰-ACPs导致的脂肪酸生物合成调节机制中的反馈抑制作用，进而加强游离脂肪酸的生产[9-13]。已有研究表明表达来源于加州月桂(*Umbellulana california*)的硫酯酶基因*BTE*可以改变宿主的脂肪酸组成，获得MCFAs[14-16]。但是目前尚未考察产生的MCFAs对*E. coli*细胞膜结构磷脂的影响，没有对MCFAs的细胞分泌情况进行考察，也没有通过进一步的代谢工程手段继续改善MCFAs的生产。

本研究通过在大肠杆菌中过量表达来源于加州月桂的硫酯酶基因*BTE*，赋予大肠杆菌MCFAs的生产能力，并对产生的MCFAs在胞内外的分布，以及过量生产MCFAs对大肠杆菌细胞膜磷脂组成的影响进行分析，最后通过共表达乙酰-CoA羧化酶(ACCase)和优化硫酯酶基因*BTE*的表达水平，以进一步提高MCFAs的产量。

1 材料与方法

1.1 试剂与培养基

E.coli BL21(DE3) 美国Invitrogen公司；pCOLA-Duet-1质粒 美国Novagen公司；保有硫酯酶基因*BTE*的质粒pGH-BTE 上海捷瑞生物科技有限公司；Pyrobest DNA聚合酶、dNTP、感受态细胞制备试剂盒 日本TaKaRa公司；限制性内切酶、T4 DNA连接酶 加拿大Fermentas公司；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒 美国Omega公司；异丙基硫代-*β*-*D*-半乳糖苷(IPTG) 美国Biosharp公司；胰蛋白胨和酵母抽提物 英国Oxoid公司；二十酸 美国Alfa Aesar公司。

LB液体培养基(g/L)：蛋白胨10、酵母提取物5、NaCl 10；LB液体培养基加入20g/L的琼脂粉即为LB固体培养基。

M9基本培养基(g/L)：Na_2HPO_4 6、KH_2PO_4 3、NH_4Cl 1、NaCl 0.5、$MgSO_4$ 0.048。所有试剂如无特殊说明均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

7890A-5975C气相色谱-质谱联用仪 美国Agilent Technologies公司；SP6890气相色谱仪 山东鲁南瑞宏有限公司；Mycycler PCR、PowerPac Basic核酸电泳、Gel Doc XR凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司；Allegra X-22R离心机 德国Beckman公司。

1.3 方法

1.3.1 外源基因的克隆

加州月桂(*Umbellularia californica*)硫酯酶基因*BTE*(GenBank：M94159)通过化学合成法合成，合成的基因片段被构建到了pGH克隆载体上。为了将*BTE*基因克隆到表达载体上，以pGH-BTE质粒为模板，BTE-NdeF和BTE-NotR为引物扩增*BTE*基因。

谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)乙酰-CoA羧化酶由两个亚基组成，分别由基因*dstR*和*accBC*编码构成[17]。为了将*dstR*基因和*accBC*克隆到表达载体上，以pGH-BTE质粒为模板，dstR-BspHF和dstR-BamHR为引物扩增*dstR*基因，accBC-PacF和accBC-mfeR为引物扩增*accBC*基因。

以上所有引物的寡核苷酸序列见表1，采用的PCR反应条件如下：94℃预变性3min；94℃变性30s，54～58℃退火30s，72℃延伸1.5min(1kb/min)，35个循环；72℃延伸10min。以上所有PCR产物通过胶回收试剂盒进行切胶回收纯化。

表1 重组质粒和寡核苷酸序列

Table 1 Recombinant plasmids and oligonucleotide primers

质粒和引物		质粒特性和寡核苷酸引物序列
质粒	pYN2	pBR322；Kan^R；P_{T7}:: *BTE*
	pYN12	ColA；Kan^R；P_{T7}:: *BTE*
	pYN22	P15A；Cm^R；P_{T7}:: *BTE*
	pACCase	P15A；Cm^R；P_{T7}:: *BTE*、*dstR*、*accBC*
引物	BTE-NdeF	5′-GGAATTCCATATGGCCACCACCTCTTTAG-3′
	BTE-NotR	5′-ATAAAGAATGCGGCCGCTTACACCCTCGGTTCTGCG-3′
	BTE-NdeF	5′-GGAATTCCATATGGCCACCACCTCTTTAG-3′
	BTE-XhoR	5′-CACCTCGAGTTACACCCTCGGTTCTGCG-3′
	dstR-BspHF	5′-GGAATTCTCATGACCATTTCCTCACCTTTG-3′
	dstR-BamHR	5′-CGGGATCCTTACAGTGGCATGTTGCCG-3′
	accBC-PacF	5′-GCCCGCCAATTGGTCAGTCGAGACTAGGAAG-3′
	accBC-mfeR	5′-CGGCCTTAATTAATTACTTGATCTCGAGGAGAA-3′

注：下划线代表限制性酶切位点。

1.3.2 表达载体的构建

将切胶回收后的*BTE*基因，分别用*Nde*Ⅰ和*Not*Ⅰ、*Nco*Ⅰ和*Bam*HⅠ、*Nde*Ⅰ和*Xho*Ⅰ进行双酶切，然后分别连接到相同限制性内切酶酶切的pET-30a(＋)、pCOLADuet-1、pACYDuet-1表达载体上，获得的重组质粒分别命名为pYN2、pYN12、pYN22(表1)。阳性克隆首先通过菌液PCR进行鉴定，然后再通过测序进行进一步验证。切胶回收后的*dstR*和*accBC*基因，分别以*Bsp*HⅠ和*Bam*HⅠ、*Pac*Ⅰ和*mfe*Ⅰ进行双酶切，然后连接到用*Nco*Ⅰ和*Bam*HⅠ、*Pac*Ⅰ和*mfe*Ⅰ酶切的pACYDuet-1表达载体上，获得的质粒命名为YNA22，阳性克隆通过测序进行验证。

1.3.3 菌体培养

pYN2、pYNA2、pYN12、pYN22转化*E. coli* BL21(DE3)获得的菌株分别命名为YN2、YNA2、YN12、YN22。这些工程菌株在进行摇瓶培养前，首先接到LB液体培养基中培养过夜，活化后的菌体以体积比1:100转接到装有添加5g/L蛋白胨的M9盐培养基的摇瓶中，并加入相应终质量浓度的抗生素(卡那霉素：50mg/L，氯霉素：34mg/L)以及终浓度0.0005mol/L的IPTG，然后置于30℃恒温摇床中进行振荡培养。

1.3.4 产物测定

1.3.4.1 胞内外总游离脂肪酸测定

首先调节摇瓶培养物的pH值为2.0，加入花生酸作为内标，然后加入萃取剂(氯仿、甲醇体积比2:1)，上下颠倒混匀5min后静置过夜，以充分裂解细胞并萃取游离脂肪酸。收集氯仿相，旋蒸除去氯仿后，再用1mL氯仿重新溶解萃取物，有机滤膜过滤后采用气相色谱(GC)进行分析。

气相色谱条件：CP-FFAP CB毛细管柱(25m×0.25mm，0.2μm)，程序升温，150℃保持1min，以10℃/min升至250℃，保持10min，载气(N_2)流速1mL/min，进样量1.0μL，FID检测器。

1.3.4.2 胞内脂肪酸测定

培养物离心收集菌体细胞，菌体细胞加热破壁后用氯仿-甲醇(体积比2:1)抽提总脂，加入花生酸作为内标，收集氯仿相后并除去溶剂氯仿，加入甲酯化试剂(BF_3、CH_3OH体积比2:5)，65℃反应30min进行甲酯化，然后用正己烷萃取脂肪酸甲酯，利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析脂肪酸组成及含量[18]。

1.3.4.3 胞外脂肪酸测定

培养物离心收集上清液，加入等体积正己烷进行萃取，同样加入花生酸作为内标，收集上层正己烷后旋蒸除去正己烷，同1.3.4.2节中的方法进行甲酯化及GC-MS分析。

1.3.4.4 磷脂脂肪酸组成测定

培养物离心收集菌体细胞，菌体细胞加热破壁后用氯仿-甲醇(2:1，*V*/*V*)抽提总脂，收集氯仿相并除去溶剂氯仿。然后通过薄层层析(TLC)从总脂中分离出磷脂，依次采用以下展开剂进行展开：氯仿-甲醇-水(60:40:10，*V*/*V*)至1cm；氯仿-甲醇-水(65:40:5，*V*/*V*)至1.5cm；乙酸乙酯-异丙醇-乙醇-氯仿-甲醇-0.25% KCl(35:5:20:22:15:9，*V*/*V*)至3cm；甲苯-乙醚-乙醇(60:40:3，*V*/*V*)至5cm；正庚烷-乙醚(94:8，*V*/*V*)至7cm；正庚烷至8cm。分离到的组分采用碘熏蒸进行显色。分离到的磷脂采用同1.3.4.2节的方法进行甲酯化及GC-MS分析。

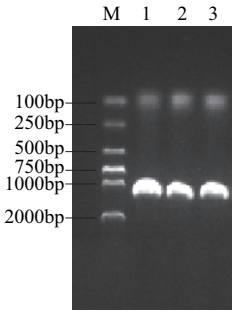
气相色谱条件：HP-INNOWAX毛细管(30m×0.25mm，0.25μm)；升温程序：100℃保持1min，以10℃/min升至250℃，保持5min；载气(He)流速1.2mL/min，压力2.4kPa，进样量1.0μL；分流比：50:1。

电子轰击(EI)离子源：电子能量70eV；传输线温度275℃；离子源温度200℃；母离子*m*/*z* 285；激活电压1.5V；扫描模式：全扫描；质量扫描范围*m*/*z* 10～600。

2 结果与分析

2.1 重组工程菌株的鉴定

通过对构建完成的3株含有硫酯酶基因*BTE*的重组大肠杆菌进行菌液PCR扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定，均获得了与预期大小相符的电泳条带(图1)，DNA测序分析显示插入的*BTE*基因片段与GenBank(检索号：M94159)中报道的序列一致，二者的基因同源性为100%，表明硫酯酶基因均分别成功插入到了pET-30a(+)、pCOLADuet-1、pACYDuet-1表达载体上，所获得的重组菌株均为阳性克隆。



M. Trans2K DNA分子质量标准；1. YN2；2. YN12；3. YN22。

图1 菌液PCR鉴定重组菌株中的硫酯酶基因

Fig.1 PCR identification of recombinant plasmid containing different thioesterase genes

对含有*dstR*和*accBC*的重组大肠杆菌提取质粒，DNA序列分析显示插入的*dstR*和*accBC*基因片段与GenBank(检索号：U35023.1)中报道的序列一致，二者的基因同源性为100%，表明乙酰-CoA基因已成功插入到了pACYDuet-1表达载体上，所获得的重组菌株均为阳性克隆。

2.2 过量表达硫酯酶基因*BTE*对大肠杆菌脂肪酸生产的影响

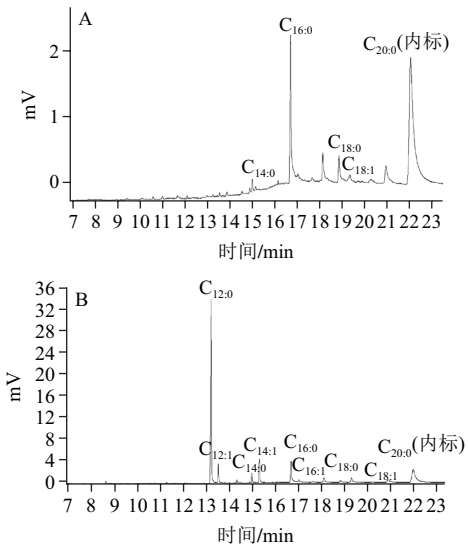


图2 野生型*E. coli* BL21(DE3)(A)和工程菌株YN 2(B)的游离脂肪酸组成

Fig.2 Free fatty acid composition of *E. coli* BL21(DE3) strain (A) and YN2 strain (B)

GC分析结果显示，野生型菌株*E. coli* BL21(DE3)几乎不产生C12和C14链长的游离脂肪酸(MCFAs)(图2A)，

但是过量表达硫酯酶基因*BTE*后，工程大肠杆菌*E. coli* YN2产生了大量的MCFAs(图2B)，表明过量表达硫酯酶BTE确实可以有效的解除脂酰-ACP的反馈抑制，进而显著加强大肠杆菌MCFAs的生产。此外，产生的MCFAs占游离脂肪酸总量的比例高达85%以上，表明硫酯酶BTE对C12和C14链长的脂酰-ACPs展现了很高的底物特异性，可以很好的用于定向生产MCFAs。

2.3 MCFAs在*E. coli* YN2的胞内外分布以及对其细胞膜磷脂组成的影响

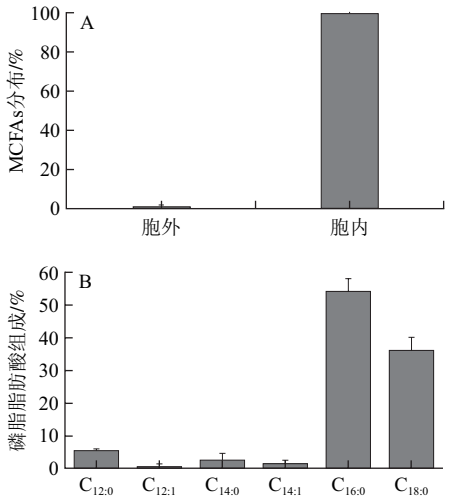


图3 MCFAs在*E. coli* YN2胞内外的分布(A)以及对其细胞膜磷脂脂肪酸组成(B)的影响

Fig.3 MCFAs accumulation in the supernatant and inside *E. coli* YN2 cells (A), and the effect of MCFAs overproduction on the composition of membrane phospholipids (B)

由图3A可知，MCFAs主要存在于*E. coli* YN2细胞内，只有少量能够分泌到胞外(图3A)。虽然有报道硫酯酶能够促进游离脂肪酸的胞外分泌[8]，但可能并不是所有的硫酯酶都具有这一功能，由于大肠杆菌具体的脂肪酸胞外分泌机制尚未阐明，硫酯酶是否直接介导游离脂肪酸的胞外分泌并不得知。

细胞膜磷脂是维持细胞生理活动的重要组成部分，如果磷脂组成发生较大变化，很可能会影响到*E. coli*正常的生理代谢活动。与野生型*E. coli*细胞膜磷脂的脂肪酸组成相比[18]，*E. coli* YN2细胞膜磷脂的脂肪酸组成并没有发生明显变化，仍然主要由C16和C18链长的脂肪酸组成，只有少量的MCFAs酯化进入了膜磷脂(图3B)，没有对菌体细胞的细胞膜结构产生很大的影响。因此，在工程大肠杆菌中大量生产MCFAs不会对*E. coli*的正常生长及代谢活动产生明显影响。

2.4 共表达硫酯酶BTE和乙酰-CoA羧化酶对*E. coli* MCFAs生产的影响

乙酰-CoA羧化酶(ACCase)催化乙酰-CoA的转化生成丙二酰单酰-CoA，ACCase被认为是脂肪酸生物合成中的一个限速酶[19]，因此，过量表达ACCase有可能增加MCFAs的产量。但是，在*E. coli* YN2共同过量表达来源于*Corynebacterium glutamicum*的ACCase(菌株YNA2)并没有继续促进MCFAs的生产，菌株YNA2的产量还没有达到菌株YN2产量的70%(图4A)。过量表达ACCase虽然促进了丙二酰单酰-CoA的合成，但可能引起其他代谢步骤成为新的限速步骤，并不一定能够促进游离脂肪酸的生产，这可能和所共同表达的硫酯酶也有很大的关系，毕竟硫酯酶在微生物合成游离脂肪酸中发挥着决定性的作用。

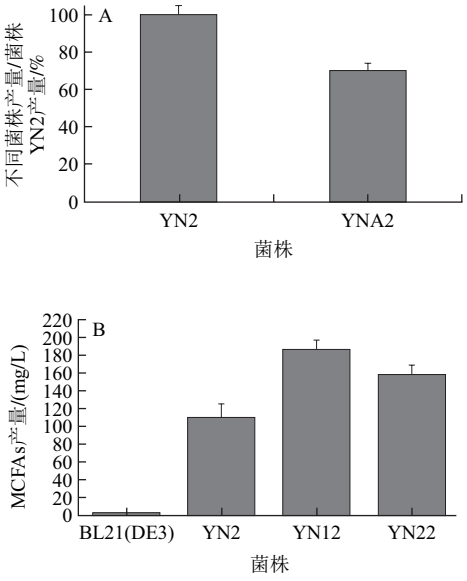


图4 乙酰-CoA羧化酶的共表达(A)以及表达载体质粒拷贝数对MCFAs生产(B)的影响

Fig.4 Effect of co-expression of ACCase (A) and copy number of the plasmid vector on the production of MCFAs (B)

2.5 硫酯酶BTE表达水平的优化

重组蛋白的表达水平对目标产物的生产起着很重要的作用[20]。为了进一步提高MCFAs的产量，本实验采用了pET-30a(+)(高)，pACYCDuet-1(中)以及pCOLADuet-1(低)等不同拷贝数的表达载体来优化硫酯酶BTE的表达水平，所获得的相应工程菌株分别为YN2、YN12和YN22。通过对3株工程菌株进行摇瓶培养及产物分析(图4B)，发现采用中等拷贝的重组质粒对应的工程菌株(YN12)获得了最高的MCFAs产量，达到188.9mg/L；低拷贝数质粒对应的工程菌株(YN22)获得了167.8mg/L的MCFAs；而高拷贝数质粒对应的工程菌株(YN2)获得了最低的MCFAs产量，只有113.3mg/L。该结果表明一个合适的BTE表达水平对于MCFAs的生产确实起着非常重要的作用，过高或过低水平的表达BTE对MCFAs的生产有着较大的影响。同时也证明了通过采用不同拷贝数的质粒来优化蛋白表达水平可有效的改善代谢产物的生产。

3 结 论

利用代谢工程手段改造大肠杆菌以加强MCFAs的生产，代表了脂肪酸产业发展的一个新的方向。通过表达硫酯酶BTE并优化其蛋白表达水平，所获得的工程菌株能够产生188.9mg/L的MCFAs，代表了相当高的微生物MCFAs生产水平，表现出了很好的食品工业应用前景。另外，该研究证明通过质粒拷贝数优化蛋白表达水平可以有效改善MCFAs的生产，并为其他相关产品的生物合成提供了一条很好的思路。在今后的研究中，通过对*E. coli*进行进一步代谢工程改造，MCFAs的生产有望得到进一步的改善和提高。

参考文献：

[1] 夏秋瑜, 赵松林, 李从发, 等. 中碳链脂肪酸甘油三酯的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(7): 150-153.

[2] HOROWITZ J F, MORA-RODRIGUEZ R, BYERLEY L O, et al. Preexercise medium-chain triglyceride ingestion does not alter muscle glycogen use during exercise[J]. Applied Physiology, 2000, 88(1): 219-225.

[3] ST-ONGE M P, JONES P J H. Greater rise in fat oxidation with medium-chain triglyceride consumption relative to long-chain triglyceride is associated with lower initial body weight and greater loss of subcutaneous adipose tissue[J]. International Journal of Obesity, 2003, 27: 1565-1573.

[4] BENDIXEN H, FLINT A, RABEN A, et al. Effect of 3 modified fats and a conventional fat on appetite, energy intake, energy expenditure, and substrate oxidation in healthy men[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2002, 75(1): 47-56.

[5] ST-ONGE M P, ROSS R, PARSONS W D, et al. Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in over-weight men[J]. Obesity Research, 2003, 11: 395-402.

[6] van WYMELBEKE V, HIMAYA A, LOUIS-SYLVESTRE J, et al. Influence of medium-chain and long-chain triglycerides on the control of food intake in men[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 68(2): 226-234.

[7] 程涛, 杨建明, 刘辉, 等. 拟南芥硫酯酶基因(*atfata*)在大肠杆菌中的表达及其对游离脂肪酸合成的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 568-571.

[8] 孟鑫, 程涛, 李良智, 等. 工程大肠杆菌脂肪酸胞外分泌调控研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 331-335.

[9] MAGNUSON K, JACKOWSKI S, ROCK C O, et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1993, 57(3): 522-542.

[10] HUNT M C, ALEXSON S E. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism[J]. Progress in Lipid Research, 2002, 41(2): 99-130.

[11] SAUER U, EIKMANNS B J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 765-794.

[12] DAVIS M S, SOLBIATI J, CRONAN J E, Jr. Overproduction of Acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(37): 28593-28598.

[13] CHO H, CRONAN J E, Jr. Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(9): 4216-4219.

[14] VOELKER T A, WORRELL A C, ANDERSON L, et al. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants[J]. Science, 1992, 257: 72-74.

[15] DEHESH K, EDWARDS P, HAYES T, et al. Two novel thioesterases are key determinants of the bimodal distribution of acyl chain length of *Cuphea palustvis* seed oil[J]. Plant Physiology, 1996, 110(1): 203-210.

[16] 李玲玲, 刘强, 郑艳宁, 等. 利用工程大肠杆菌生产不同类型的游离脂肪酸[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 158-162.

[17] MARINI P E, PEREZ C A, de MENDOZA D. Growth-rate regulation of the *Bacillus subtilis* accBC operon encoding subunits of acetyl-CoA carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis[J]. Archives of Microbiology, 2001, 175(3): 234-237.

[18] 王永乐, 王敏, 沈雁冰, 等. 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜的影响[J]. 天津科技大学学报, 2008, 23(4): 43-48.

[19] 胡亚平, 夏玉平, 吴刚, 等. 重叠延伸PCR克隆拟南芥*ACCase*基因和植物表达载体构建[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 407-412.

[20] ZHENG Yanning, LI Lingling, LIU Qiang, et al. Optimization of fatty alcohol biosynthesis pathway for selectively enhanced production of C12/14 and C16/18 fatty alcohols in engineered *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 65.