

脂肪酶——P450 脂肪酸脱羧酶融合蛋白催化的 α 烯烃合成

孙月^{1,2}, 马莉¹, 陈辉¹, 徐卉芳¹, 郑贤良¹, 齐凤霞¹, 李盛英^{1*}

1. 山东省合成生物学省级重点实验室, 中国科学院生物燃料重点实验室, 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101;

2. 青岛科技大学化工学院, 青岛 266000

* 联系人, E-mail: lishengying@qibebt.ac.cn

2017-02-27 收稿, 2017-03-27 修回, 2017-04-20 接受

国家自然科学基金(31422002, 21406250, 31270855)、山东省自然科学基金(JQ201407)和青岛市应用基础研究计划(15-9-1-106-jch)资助

摘要 α 烯烃是一种独特的微生物天然产物. 由P450脂肪酸脱羧酶催化的中长链(C_{12} - C_{20})脂肪酸脱羧反应生成的 α 烯烃因其在生物燃料和生物材料领域的潜在应用前景倍受关注. 通过将脂肪酶TIL的甘油三酯水解活性与P450脱羧酶OleT_{JE}的脂肪酸脱羧活性偶联, 可将油脂原料两步转化为 α 烯烃. 为了提高油脂到 α 烯烃的转化效率, 并降低两种酶的分步制备成本, 本研究通过20个氨基酸的linker序列将双酶共价连接形成重组融合蛋白N-His₆-OleT_{JE}-linker-TIL(FusC). 在大肠杆菌中表达的FusC经镍柱层析纯化后成功实现双功能活性. 经气相色谱分析, 融合蛋白催化的甘油三酯顺序水解—脱羧偶联反应的产率达到31.7%, 催化效率相对于双酶游离混合体系明显提升, 展现出良好的底物通道效应, 具有潜在的实际应用前景.

关键词 脂肪酶, P450 脂肪酸脱羧酶, 融合蛋白, α 烯烃, 底物通道效应

脂肪烃是一类独特的天然产物, 可由一些植物和微生物在其代谢过程中产生^[1-3]. 由于其生理功能和生物学活性未明, 可初步将其归为次级代谢产物. 相较于生物乙醇和生物柴油, 生物脂肪烃(烷烃和烯烃)的结构和理化性质更接近于石化液体燃料, 具有能量密度高、吸湿性低、与现有发动机和运输系统兼容等优点, 可作为柴油、汽油及航空燃料的直接替代品或添加剂^[4,5]. 生源 α 烯烃(又称1-烯烃或脂肪端烯)更是可以作为单体合成高品质润滑油等高值聚合物. 因此, 脂肪烃催化合成研究已成为先进生物燃料研究领域一大热点^[6,7].

目前脂肪烃的制备主要依赖于高温(250~450℃)、高压(20~70 bar, 1 bar=0.1 MPa)条件下铂、钯等贵金

属催化剂介导的加氢化学工艺^[8]. 与传统化工过程相比, 生物催化与转化具有安全高效、低能耗、环保等优点. 近年来, 已陆续报到了一些脂肪烃生物合成途径. 例如, 来源于聚球藻(*Synechococcus elongates*) PCC 7942的脂酰-ACP还原酶和脂肪醛去甲酰加氧酶能够通过两步反应将脂酰-ACP转化为脂肪烷烃和甲酸^[9]; 来源于蓝细菌*Synechococcus* sp. PCC 7002的OLS聚酮合酶可催化 β -磺基-脂酰-ACP脱羧产生脂肪端烯^[10]; 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) ATCC 4698中的脂肪酸可通过多步酶促反应缩合产生具有内部双键的脂肪烯烃^[11]; 来源于咸海鲜球菌(*Jeotgalicoccus* sp.) ATCC 8456的P450脂肪酸脱羧酶能够利用过氧化氢为辅因子, 催化游离脂肪酸一步脱羧生

引用格式: 孙月, 马莉, 陈辉, 等. 脂肪酶——P450 脂肪酸脱羧酶融合蛋白催化的 α 烯烃合成. 科学通报, 2017, 62: 1-7

Sun Y, Ma L, Chen H, et al. Production of α -alkenes catalyzed by the fused lipase and P450 fatty acid de-carboxylase (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 1-7, doi: 10.1360/N972017-00212

成 α 烯炔^[12]; 来源于假单胞菌的非血红素氧化酶能够催化自由脂肪酸脱羧形成 α 烯炔^[13]等。

上述生物催化方法均是基于脂肪酸代谢途径, 以游离脂肪酸或酰化脂肪酸为底物. 由葡萄糖到脂肪酸的从头合成涉及多步酶促反应组成的复杂代谢网络, 其理论最高转化率仅为36%左右. 由于脂肪酸代谢网络调控的精密性与复杂性, 通过基因敲除阻断脂肪酸分解代谢和过表达脂肪酸合成代谢途径中的关键酶虽取得了一些正面结果, 但仍然与理论最高产率差距明显. 因此, 经由葡萄糖 \rightarrow 脂肪酸途径生产 α 烯炔的成本过高, 制约了其产业化应用。

为了解决 α 烯炔合成途径中廉价脂肪酸原料的来源问题, 我们提出了利用廉价易得的油脂(甘油三酯)取代葡萄糖作为原料, 借助脂肪酶催化甘油三酯水解生成游离脂肪酸的天然特性, 在体外运用合成生物学策略, 通过脂肪酶和P450脱羧酶偶联催化, 成功构建了“油脂 \rightarrow 脂肪酸 \rightarrow α 烯炔”(图1)的人工生物产炔新途径, 其理论最高转化率可达78%左右^[14]. 尽管这条新途径相较之前的“葡萄糖 \rightarrow 脂肪酸 \rightarrow α 烯炔”途径^[15]具有转化率高、步骤简单、副产物少等优势, 但是依旧存在一定缺陷: 首先, 需要分别纯化制备脂肪酶和P450脱羧酶, 成本高且耗时费力; 其次, 混酶体外催化效率不理想, 整体反应时长需9 h以上。

在由多酶串联生化反应组成的生物合成途径中, 已发现某些反应通路中一些酶能够形成松散的复合

体三维结构, 从而形成一种独特的“底物通道”(substrate channel). 底物/中间产物可通过这种通道快速进行多步代谢反应, 如三羧酸循环酶系、色氨酸合成酶系、以及由胞外纤维素水解酶与支架蛋白组成的纤维小体等^[16]. 分布于底物通道中的酶系被形成代谢区室(metabolon), 由多酶复合体构成的天然代谢区室具有明显的底物通道效应, 即多酶串联生化反应过程中, 将一种酶(或活性位点)的产物直接传递给邻近的另一种酶(或活性位点)作为反应底物, 而不释放扩散至周围环境中的代谢增速效应. 此效应仅发生于足够邻近的酶之间, 毗邻的酶活性位点可存在于多功能酶的不同结构域上、多酶复合体的不同亚基上、或者空间足够接近的不同酶上^[17]. 与体内自由分布于细胞质中的游离酶或体外几种酶的简单混合物相比, 底物通道效应通过降低中间产物扩散来增加其在酶附近的局部浓度, 亦可避免不稳定中间产物的降解, 从而使得多酶复合体催化的整个串联反应速率明显提升^[14].

受上述包含串联酶组分的天然代谢区室启发, 构建体外合成代谢区室可望提高串联反应的整体效率, 同时避免多步酶蛋白分离纯化、分步催化等繁琐步骤. 本研究在已建立的脂肪酶和P450脱羧酶偶联催化合成 α 烯炔的基础之上, 在体外构建了脂肪酶TIL和P450脱羧酶OleT_{JE}的融合蛋白代谢区室, 利用底物通道效应成功实现了从油脂原料到 α 烯炔的高效转化. 由于避免了多酶的蛋白分离纯化以及不易控制的分步/混酶催化, 本方法的成本更为低廉。

1 材料与方法

(i) 质粒、菌株和试剂. 本研究所用甘油三酯(三月桂酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯、三软脂酸甘油酯、脂肪酸(月桂酸、肉豆蔻酸、软脂酸)与 α 烯炔(α -十一烯、 α -十三烯、 α -十五烯)标准品以及5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)均购自TCI公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素(kanamycin)和维生素B1购买于北京索来宝科技有限公司; 限制性内切酶与T4 DNA连接酶均购自赛默飞世尔科技有限公司; pET28b质粒购自Novagen公司; GXL高保真DNA聚合酶和dNTPs购自Takara公司; 琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒和质粒提取试剂盒购买于Promega公司; 蛋白纯化Ni-NTA树脂购自Qiagen公司; 超速离心过滤器购买于Millipore公司; Bradford蛋白浓度测定试

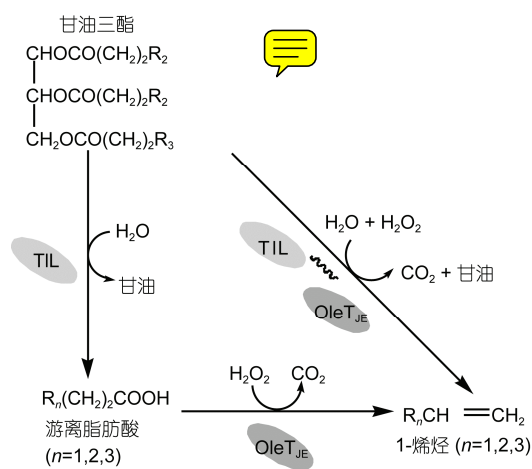


图1 脂肪酶TIL和P450脂肪酸脱羧酶OleT_{JE}偶联催化(游离混合酶或融合蛋白)的油脂 \rightarrow 脂肪酸 \rightarrow α 烯炔的生物转化途径

Figure 1 The biotransformation mediated by the coupled activity of the lipase TIL and the P450 fatty acid decarboxylase OleT_{JE} (two mixed enzymes or one fusion protein)

剂盒购买于碧云天生物技术研究所. 其他试剂均为国产分析纯试剂(国药). 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成.

用于分子克隆的菌株为本实验室冻存的*Escherichia coli* DH5 α 菌株, 用于蛋白表达纯化的宿主菌株为本实验室冻存的*E. coli* BL21(DE3)菌株. *Jeotgali-coccus* sp. ATCC 8456购买于美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC). 疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)脂肪酶TIL的编码基因(GeneBank收录号AF054513.1)的密码子优化与合成由南京金斯瑞科技有限公司完成.

(ii) 目的基因的克隆及表达质粒的构建. 组氨酸标签(His₆-tag)位于N端的融合基因构建: 以合成的TIL基因为模板, 采用引物TIL-Fa1/TIL-Ra1(表1, 下同)进行PCR扩增, 产物为含BamHI酶切位点的His₆-TIL-linker片段; 以*Jeotgali-coccus* sp. ATCC 8456的gDNA为模板, 采用引物OleT_{JE}-Fa1/OleT_{JE}-Ra1进行PCR扩增, 产物为含XhoI酶切位点的linker-OleT_{JE}片段; 以TIL-Fa1/OleT_{JE}-Ra1为引物进行重叠延伸PCR合成融合基因His₆-TIL-linker-OleT_{JE}. 以TIL基因为模板, 采用引物TIL-Fb1/TIL-Rb1进行PCR扩增获得含BamHI酶切位点的linker-TIL片段; 采用引物OleT_{JE}-Fb1/OleT_{JE}-Rb1对OleT_{JE}编码基因进行PCR扩

增获得含XhoI酶切位点的His₆-OleT_{JE}-linker片段; 以OleT_{JE}-Fb1/TIL-Rb1为引物进行重叠延伸PCR合成融合基因His₆-OleT_{JE}-linker-TIL.

组氨酸标签(His₆-tag)位于C端的融合基因构建: 以合成的TIL基因为模板, 采用引物TIL-Fa2/TIL-Ra2进行PCR扩增, 产物为带有NcoI酶切位点的TIL-linker片段; 以*Jeotgali-coccus* sp. ATCC 8456的gDNA为模板, 采用引物OleT_{JE}-Fa2/OleT_{JE}-Ra2进行PCR反应, 产物为带有XhoI酶切位点的linker-OleT_{JE}-His₆片段; 以TIL-Fa2/OleT_{JE}-Ra2为引物进行重叠延伸PCR合成融合基因TIL-Linker-OleT_{JE}-His₆. 以TIL基因为模板, 采用引物TIL-Fb2/TIL-Rb2进行PCR反应获得带有BamHI酶切位点的linker-TIL-His₆片段; 采用引物OleT_{JE}-Fb2/OleT_{JE}-Rb2对OleT_{JE}编码基因进行PCR扩增获得带有NcoI酶切位点的OleT_{JE}-linker片段; 以OleT_{JE}-Fb2/TIL-Rb2为引物进行重叠延伸PCR合成融合基因OleT_{JE}-linker-TIL-His₆.

PCR产物和质粒pET28b相应双酶切后胶回收, 限制性内切酶等各种工具酶的使用按照说明书进行, PCR产物和酶切片段于1%琼脂糖凝胶进行电泳. DNA连接反应使用T4 DNA连接酶, 16℃反应过夜. 连接产物转化感受态*E. coli* DH5 α 细胞, 提取质粒, 酶切鉴定和DNA测序分析无误后用于转化*E. coli*

表1 本研究使用的引物信息^{a)}

Table 1 The primers used in this study

引物	序列(5'→3')
TIL-Fa1	CGGGATCCTATGAGTCCTATTCGTCG
TIL-Ra1	ACCACCTTCAGAGCCACCGCCTTCAGAACC CGCCG CACCAGACGCAAGACATGTCCCAATTAAC
OleT _{JE} -Fa1	GGTTCTGAAGGCGGTGGCTCTGAAGGTGGTACCTCTGGTGCGACCGCAACACTTAAGAGG
OleT _{JE} -Ra1	CCGCTCGAGTTATGTTCTGTCTACAACCTTCGC
TIL-Fa2	CATGCCATGGATGAGTCCTATTCGTCGAG
TIL-Ra2	ACCACCTTCAGAGCCACCGCCTTCAGAACC CGCCG CACCAGACGCAAGACATGTCCCAATTAAC
OleT _{JE} -Fa2	GGTTCTGAAGGCGGTGGCTCTGAAGGTGGTACCTCTGGTGCGACCGCAACACTTAAGAGG
OleT _{JE} -Ra2	CCCTCGAGTGTCTGTCTACAACCTTCGC
OleT _{JE} -Fb1	CGGGATCCTATGGCAACACTTAAGAG
OleT _{JE} -Rb1	ACCACCTTCAGAGCCACCGCCTTCAGAACC CGCCG CACCAGACGCTGTTCTGTCTACAACCTTCG
TIL-Fb1	GGTTCTGAAGGCGGTGGCTCTGAAGGTGGTACCTCTGGTGCGACCGCAACACTTAAGAGG
TIL-Rb1	CCGCTCGAGCTAAAGACATGTCCCAATTAAC
OleT _{JE} -Fb2	CATGCCATGGATGGCAACACTTAAG
OleT _{JE} -Rb2	ACCACCTTCAGAGCCACCGCCTTCAGAACC CGCCG CACCAGACGCTGTTCTGTCTACAACCTTCG
TIL-Fb2	GGTTCTGAAGGCGGTGGCTCTGAAGGTGGTACCTCTGGTGCGACCGCAACACTTAAGAGG
TIL-Rb2	CCCTCGAGAAGACATGTCCCAATTAAC

a) 倾斜字体为linker重叠片段; 加粗字体为linker非重叠片段; 下划线字体为酶切位点; 完整linker(20 AA)的编码序列为CGCTCTGGTGCGGGCGGTTCTGAAGGCGGTGGCTCTGAAGGTGGTACCTCTGGTGCGACC

BL21(DE3), 得到的重组体分别命名为 FusA(His₆-TIL-linker-OleT_{JE})、FusB(TIL-Linker-OleT_{JE}-His₆)、FusC(His₆-OleT_{JE}-linker-TIL)和FusD(OleT_{JE}-linker-TIL-His₆)。

(iii) 重组蛋白的表达、纯化及浓度测定. 将过夜活化的重组体FusA-D分别以1:100比例接种至1L TB培养基(添加稀土盐溶液, 维生素B1以及50 μg/mL卡那霉素), 37℃培养3~4 h至光密度(OD₆₀₀)≈0.6, 加入IPTG母液至终浓度0.2 mmol/L, 5-ALA母液至终浓度0.5 mmol/L, 18℃培养18 h, 培养结束后离心收集菌体, 菌体加入适量裂解缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10%甘油和10 mmol/L咪唑, pH 8.0)重悬, 超声破碎. 破碎后菌体于4℃, 12000 r/min离心30 min, 收集上清, 向其加入适量Ni-NTA树脂后于4℃混合1 h. 取混悬液装柱, 用清洗缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10%甘油和20 mmol/L咪唑, pH 8.0)冲柱, 并用G250染色液检测, 直至流出液中无蛋白成分. 然后采用洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10%甘油和250 mmol/L咪唑, pH 8.0)对结合在Ni-NTA树脂上的目的蛋白进行洗脱收集. 对收集蛋白采用Millipore超滤离心管进行浓缩. 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析纯化蛋白量以及纯度. 目的蛋白的浓度测定采用Bradford法和CO差光谱法进行测定^[18].

(iv) 重组融合蛋白FusA-D的活性测定. 首先以OleT_{JE}最适底物肉豆蔻酸(200 μmol/L)为底物, 融合蛋白(FusA-D)浓度为0.2 μmol/L, H₂O₂浓度为200 μmol/L, 在200 μL反应体系下, 30℃反应2 h. 然后选取脱羧活性最强的融合蛋白FusC, 以三月桂酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯或三软脂酸甘油酯(200 μmol/L)为底物, FusC浓度为0.2 μmol/L, 在200 μL反应体系下, 30℃反应3 h, 每隔1 h加入200 μmol/L过氧化氢; 以相同浓度TIL和OleT_{JE}游离混合酶在相同条件下的反应作为对照. 以上实验(每组3个平行)反应结束后, 加入100 μL 10 mol/L HCl终止反应, 并加入适量正十七酸作为内标, 用乙酸乙酯抽提后取有机相进行GC测定, 并以不同浓度标准品绘制标准曲线进行产物定量.

2 结果与讨论

2.1 重组融合蛋白的构建和活性分析

可能影响重组融合蛋白的可溶性表达与催化活

性的因素包括: linker序列的选择、组氨酸纯化标签的位置以及融合蛋白中组件串联的前后顺序, 据此我们选择了由美国哈佛大学Martin等人^[19]报道的含有20个氨基酸的linker序列, 并构建了4种不同串联结构的重组融合蛋白FusA-D(图2). 在相同培养及诱导条件下表达FusA-D, 经镍柱纯化后发现4种融合蛋白均可以实现良好的可溶性表达, 但不同蛋白产量有所差异.

就催化活性而言, 组氨酸标签位于蛋白C端的两种融合蛋白(FusB和FusD)不能催化肉豆蔻酸脱羧生成1-十三烯, 因此未进一步考察其甘油三酯水解活性; 而当组氨酸标签位于融合蛋白N端时, 两种融合蛋白(FusA和FusC)均表现出甘油三酯水解活性和脂肪酰脱羧活性: FusA和FusC水解活性相近(图3(a)), 但FusC的脱羧活性远高于FusA(图3(b)). 以上结果表明组氨酸标签的位置以及TIL和OleT_{JE}的融合次序可显著影响融合蛋白的脱羧反应活性, 而融合蛋白水解活性主要受组氨酸标签位置的影响.

2.2 FusC催化活性分析

选取脱羧活性最高的融合蛋白FusC作为催化剂, 以相同摩尔浓度的TIL和OleT_{JE}游离酶混合体系作为对照, 分别评价水解、脱羧及水解-脱羧偶联活性. 如图4所示, 当进行体外水解反应时, 两种酶混合体系催化三肉豆蔻酸甘油酯产酸率仅为3.3%±0.3%, 同等条件下FusC产酸率为14.8%±1.9%(图4(a)); 在脱羧活性测试中, 双酶混合体系催化肉豆蔻酸产1-十三烯的产率为29.9±3.3%, 同等条件下FusC催化肉豆蔻酸产经率为61.2±3.9%(图4(b)). 油脂转经体外实验结果

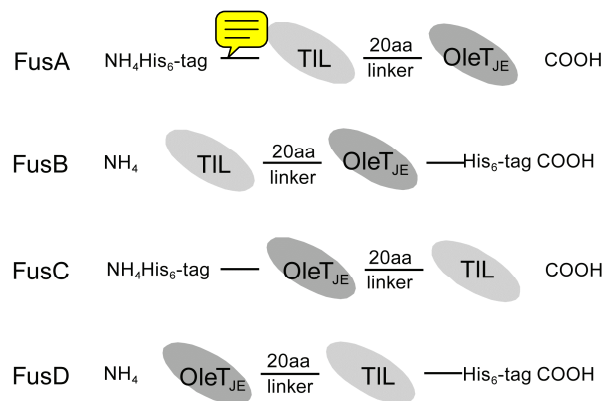


图2 四种重组融合蛋白的结构示意图

Figure 2 Schematic structures of four recombinant fusion proteins

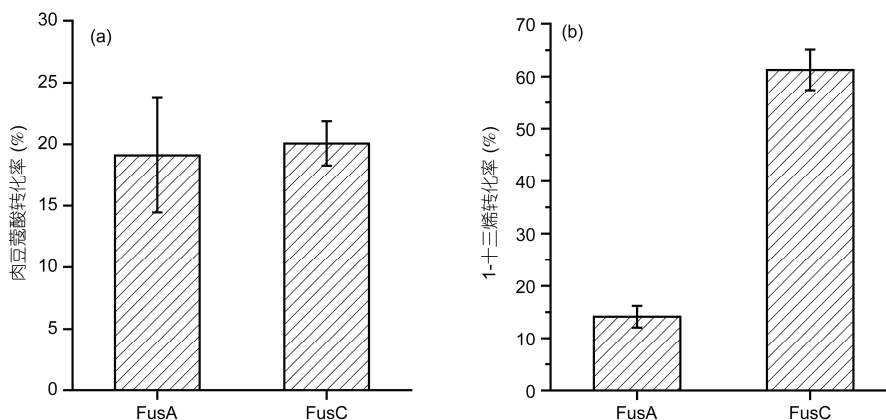


图3 FusA和FusC的催化活性分析。(a) 水解活性分析, 三肉豆蔻酸甘油酯为底物; (b) 脱羧活性分析, 肉豆蔻酸为底物

Figure 3 Analysis of FusA and FusC activities. (a) The hydrolytic activity (trimyristin as substrate). (b) The decarboxylation activity (myristic acid as substrate)

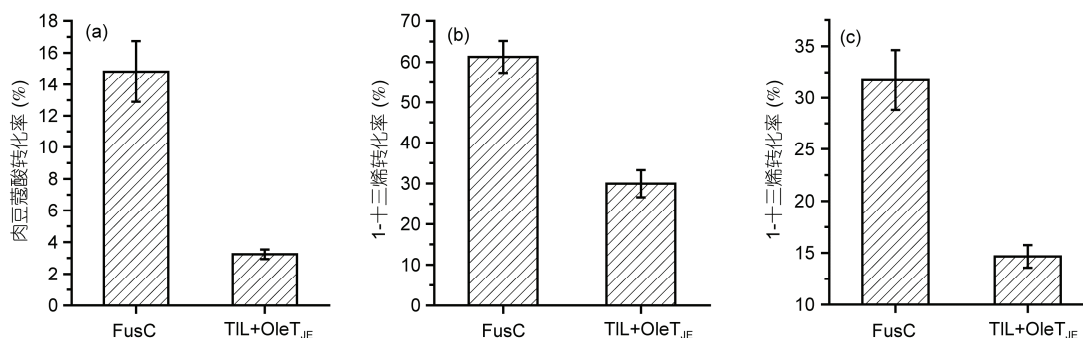


图4 融合蛋白FusC和TIL/OleT_{JE}分离蛋白的催化活性分析。(a) FusC水解活性分析, 三肉豆蔻酸甘油酯为底物; (b) FusC脱羧活性分析, 肉豆蔻酸为底物; (c) FusC水解-脱羧偶联活性分析, 三肉豆蔻酸甘油酯为底物

Figure 4 Activity analysis of the fusion protein FusC and the separated TIL and OleT_{JE}. (a) The hydrolytic activity (trimyristin as substrate). (b) The decarboxylation activity (myristic acid as substrate); (c) the coupled hydrolysis-decarboxylation activities (trimyristin as substrate)

表明FusC能够顺序催化水解和脱羧反应, 且形成了底物通道效应使得产烃率明显提升: 双酶混合催化产烃率为 $14.7 \pm 1.1\%$, FusC产烃率则为 $31.7 \pm 2.9\%$ (图4(c)). 值得一提的是, 若两种酶分步进行反应, 需大于9 h的反应时长才可达到 $32.7 \pm 1.4\%$ 的产烃率^[14], 而FusC仅需3 h便可达到同等效果(图4).

接着我们又对FusC的底物多样性进行了考察. 选取三月桂酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯和三软脂酸甘油酯进行催化产烃实验. 以TIL和OleT_{JE}游离酶混合体系为对照, 实验结果表明FusC能够催化3种不同的甘油三酯发生顺序水解/脱羧反应, 分别生成1-十一烯、1-十三烯和1-十五烯; 其中三肉豆蔻酸甘油酯为最适底物; 同等条件下FusC的产烃率明显高于双酶混合体系(图5). 上述结果均表明通过将脂肪酶TIL由linker序列融合在P450脂肪酸脱羧酶OleT_{JE}的C端可能形成了一个良好的代谢区室, 实现了预期的底

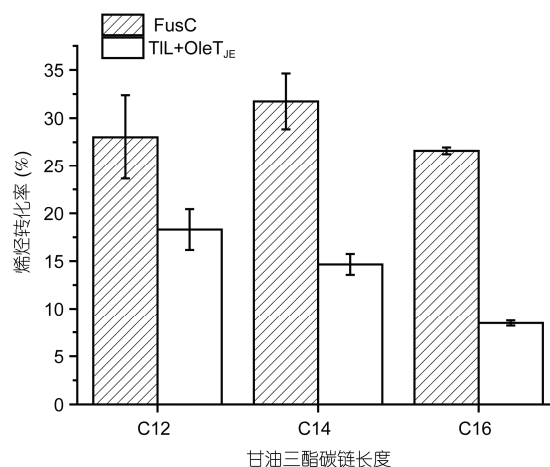


图5 融合蛋白FusC催化三月桂酸甘油酯(C12)、三肉豆蔻酸甘油酯(C14)和三软脂酸甘油酯(C16)顺序水解/脱羧生成相应的 α 烯烃. 甘油酸酯为底物

Figure 5 Production of corresponding 1-alkenes from trilaurin (C12), trimyristin (C14), and tripalmitin (C16) by sequential hydrolysis and decarboxylation catalyzed by FusC (triglyceride as substrate)

物通道效应。

3 结论

本研究在体外成功构建了一种能够较为高效地将油脂转化为 α 烯烃的脂肪酶——P450脂肪酸脱羧酶融合蛋白体系。通过发挥两种酶结构功能域之间的临近效应,防止中间产物脂肪酸的扩散以提升脱羧酶的局部底物浓度,因此反应效率明显提高; α 烯烃产率3 h可达31.7%,与双酶混合体系相比(9 h达到32.7%^[14])产率显著提升。由于该策略同时具备蛋白

一步纯化优势,其整体效率和经济性均有所提高。融合蛋白FusC作为 α 烯烃生物合成的新型催化剂,还将为构建新一代产烃微生物细胞工厂,利用内源性甘油三酯生产先进生物燃料提供新的思路。但是,脂肪酶——P450脂肪酸脱羧酶融合蛋白产烃体系的产率距离理论最高产率乃至最终的产业化应用还存在较大差距,仍需进一步改造优化,例如:试验不同的脂肪酶/P450脂肪酸脱羧酶组合与linker序列、提高两种酶的H₂O₂耐受性以及反应条件和过程优化等。

致谢 ~~感谢~~感谢中科院青岛生物能源与工程研究所公共实验室的王聪老师在样品测试中的指导和帮助。

参考文献

- 1 Zhao Z Y, Liu C Y. Formation, Evolution and Hydrocarbon Occurrence Of Sedimentary Basins in North China Craton (in Chinese). Xi'an: Northwest University Press, 1990 [赵重远, 刘池洋. 华北克拉通沉积盆地形成与演化及其油气赋存. 西安: 西北大学出版社, 1990]
- 2 Kong L, Li G, Zhang B, et al. Hydrogen production from biomass wastes by hydrothermal gasification. *Energy Sources Part A*, 2008, 30: 1166–1178
- 3 Demirbas A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Appl Energy*, 2009, 86: 108–117
- 4 Balasubramanian R. Role of nanophase oxides in short-term atmospheric corrosion of structural steels. Doctor Dissertation. Norfolk: Old Dominion University, 2003
- 5 Zhang W. Experiment apparatus of diffraction imaging. China Patent, 2003, 2290557
- 6 Lee S K, Chou H, Ham T S, et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: From bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19: 556–563
- 7 Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energy Rev*, 2010, 14: 557–577
- 8 Belcher J, McLean K J, Matthews S, et al. Structure and biochemical properties of the alkene producing cytochrome P450 OleT_{JE} (CYP152L1) from the *Jeotgalicoccus* sp. 8456 bacterium. *J Biol Chem*, 2014, 289: 6535–6550
- 9 Schirmer A, Rude M A, Li X, et al. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*, 2010, 329: 559–562
- 10 Mendez-Perez D, Begemann M B, Pflieger B F. Modular synthase-encoding gene involved in α -olefin biosynthesis in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 4264–4267
- 11 Beller H R, Goh E B, Keasling J D. Genes involved in long-chain alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 1212–1223
- 12 Rude M A, Baron T S, Brubaker S, et al. Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel p450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* species. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 1718–1727
- 13 Staijen I E, van Beilen J B, Witholt, B. Expression, stability and performance of the three - component alkane mono - oxygenase of *Pseudomonas oleovorans* in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 1957–1965
- 14 Yan J, Liu Y, Wang C, et al. Assembly of lipase and P450 fatty acid decarboxylase to constitute a novel biosynthetic pathway for production of 1-alkenes from renewable triacylglycerols and oils. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 34
- 15 Liu Y, Wang C, Yan J, et al. Hydrogen peroxide-independent production of alpha-alkenes by OleT_{JE} P450 fatty acid decarboxylase. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 28
- 16 Zhang Y H P. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol Adv*, 2011, 29: 715–725
- 17 You C, Zhang Y H P. Self-assembly of synthetic metabolons through synthetic protein scaffolds: One-step purification, co-immobilization, and substrate channeling. *ACS Synth Biol*, 2012, 2: 102–110
- 18 Johnston W A, Huang W, De Voss J J, et al. Quantitative whole-cell cytochrome P450 measurement suitable for high-throughput application. *J Biomol Screen*, 2008, 13: 135–141
- 19 Martin A, Baker T A, Sauer R T. Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature*, 2005, 437: 1115–1120

Summary for “脂肪酶——P450 脂肪酸脱羧酶融合蛋白催化的 α 烯烃合成”

Production of α -alkenes catalyzed by the fused lipase and P450 fatty acid de-carboxylase

SUN Yue^{1,2}, MA Li¹, CHEN Hui¹, XU HuiFang¹, ZHENG XianLiang¹, QI Fengxia¹ & LI ShengYing^{1*}

¹ Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Key Laboratory of Biofuels at Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China;

² College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266000, China

* Corresponding author, E-mail: lishengying@qibebt.ac.cn

The irreversibly diminishing reserves and the fluctuating price of crude oil, together with the serious concerns on the global environment and energy security, all suggests an unpleasant future of fossil fuel. Within this context, it is imperative to find alternative eco-friendly fuel with properties that highly mimic fossil fuel. Aliphatic alka(e)nes generated from renewable resources via biosynthetic pathways perfectly suits the criteria and represents the ideal “drop-in” biofuels. α -Alkenes are special microbial natural products. These biohydrocarbons have attracted much attention due to their potential application as biofuels and biomaterials. By coupling the activity of lipase and P450 decarboxylase, lipids (i.e. triglycerides) can be transformed into α -alkenes via free fatty acid intermediates. To improve the conversion efficiency of lipids to α -alkenes, in this study, four different versions of fusion proteins of the lipase TIL from *Thermomyces lanuginosus* and the P450 decarboxylase OleT_{JE} from *Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456, including FusA (His₆-TIL-linker-OleT_{JE}), FusB (TIL-Linker-OleT_{JE}-His₆), FusC (His₆-OleT_{JE}-linker-TIL) and FusD (OleT_{JE}-linker-TIL-His₆), were constructed and comparatively evaluated. The optimal fusion enzyme FusC was able to convert a number of triacylglycerols including trilaurin (C12), trimyristin (C14) and tripalmitin (C16) into corresponding α -alkenes via the coupled hydrolysis and decarboxylation. The 31.7% yield of 1-tridecene from trimyristin demonstrates good substrate channeling effect. Due to the higher catalytic efficiency compared to the mixed TIL and OleT_{JE}, as well as the simplified enzyme purification and hence the lower cost, this fusion strategy may hold significant potential of application.

Lipase, P450 decarboxylase, fusion protein, α -alkene, substrate channeling effect

doi: 10.1360/N972017-00212