

Research
Green Chemical Engineering—Review

1,5-戊二胺的细菌合成及应用

马伟超^{a,b,c}, 陈可泉^{a,b*}, 李艳^{a,b}, 郝宁^{a,b}, 王昕^{a,b}, 欧阳平凯^{a,b}^a State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China^b College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China^c College of Bioengineering and Biotechnology, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2016

Revised 15 April 2017

Accepted 18 April 2017

Available online 23 May 2017

关键词

1,5-戊二胺

代谢

细菌生产

生物基聚酰胺

PA 5X

摘要

1,5-戊二胺是一种广泛分布于原核和真核生物中的具有多种生物活性的天然多胺，正日益成为一种重要的工业化学品，并在多个领域展现出广泛的应用前景，特别是作为单体用于合成生物基聚酰胺。基于1,5-戊二胺的聚酰胺5X具有优异的性能和环境友好特性，因而有广泛的应用前景。本文总结了近期关于1,5-戊二胺在细菌中的生物合成、代谢及生理学功能，着重介绍了1,5-戊二胺在大肠杆菌的代谢调控机制。文中还综述了微生物发酵法和全细胞催化法生产1,5-戊二胺的进展及1,5-戊二胺的分离纯化方法。此外，对1,5-戊二胺在生物基聚酰胺合成中的应用进行了总结，并对利用可再生资源生产1,5-戊二胺进行了展望和对以后的研究提出了建议。

© 2017 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of the Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

1,5-戊二胺(尸胺)是一种具有多种活性的天然多胺，广泛存在于原核生物和真核生物中，在生物体中由L-赖氨酸经赖氨酸脱羧酶直接脱羧生成。1,5-戊二胺在保护细胞免受低pH环境中H⁺的伤害，维持菌体在酸性环境及在缺乏磷酸盐和氧气的环境中存活方面起着重要作用[1,2]。而且1,5-戊二胺在植物生长发育、细胞信号传递、胁迫响应及抗虫等多个方面发挥作用[3]。此外，1,5-戊二胺与动物的生长[4]和癌细胞的增生[5,6]有密切的关联。因而，1,5-戊二胺在农业、食品和医药领域有着广泛的应用。此外，由于其结构和性质与石油化工来源的己二胺类似，可替代己二胺用于聚酰胺、聚氨酯、重

金属结合剂等产品的生产中[7,8]，因此1,5-戊二胺正日益成为一种重要的工业化学品，特别是在利用1,5-戊二胺与生物来源的二元酸聚合制备完全生物基聚酰胺方面有广阔的应用前景。目前，1,5-戊二胺可以通过微生物发酵或全细胞催化生产两种途径获得。由于L-赖氨酸是1,5-戊二胺的前体，因此在微生物发酵生产方面，传统的赖氨酸生产菌种谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*)[9]和大肠杆菌(*E. coli*)[10]是主要的基因工程技术改造出发菌。而在全细胞催化研究方面则较多使用过表达赖氨酸脱羧酶的*E. coli*作为催化剂[11,12]。本文将对1,5-戊二胺在细菌中的合成及代谢调控机制、生理学功能、生物合成方法和应用现状进行详细论述，并对生物法生产1,5-戊二胺的研究进行展望。

* Corresponding author.

E-mail address: kqchen@njtech.edu.cn

2. 细菌中 1,5-戊二胺的代谢

2.1. 1,5-戊二胺的代谢

1,5-戊二胺是L-赖氨酸的脱羧产物，因而其生物合成与L-赖氨酸的合成密切相关。在生物体中存在两种赖氨酸合成途径：一种是二氨基庚二酸(DAP)途径，主要存在于细菌和植物中；另一种是 α -氨基己二酸(AAA)途径，主要存在于高等真菌和古生菌中，两个途径间没有直接的进化关系[13,14]。其中，DAP途径存在三条不同的合成DAP路径[15-17]，如图1所示。

第一条路径生成琥珀酰化的中间代谢物，是DAP途径中使用最多的一条路径，广泛分布在真细菌(eubacteria)[18]、低等真菌[19]、植物[20]及古细菌中[14,21]。第二条路径生成乙酰化的中间代谢物，目前仅在一些芽孢杆菌中发现，如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)

[18,22]。第三条路径利用二氨基庚二酸脱氢酶由 Δ^1 -吡啶-2,6-二羧酸一步合成消旋-2,6-二氨基庚二酸，该途径分布较少，目前已知在一部分细菌，如*C. glutamicum*、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)和短杆菌属(*Brevibacterium* spp.)，以及一些植物，如大豆、玉米和小麦中使用[13,18]。

目前对于微生物中1,5-戊二胺的合成调控机制在*E. coli*中已有深入的研究。*E. coli*中存在两种赖氨酸脱羧酶，一种为组成型表达的LdcC蛋白[23]，另一种为诱导型表达的CadA蛋白[24]，它们的DNA和氨基酸序列相似度分别为68%和69%，但最适pH分别为7.6(LdcC)和5.6(CadA)[25]。此外，CadA具有更好的热稳定性和催化脱羧活力[25,26]。

CadA蛋白是*E. coli* Cad系统中的重要组成部分，Cad系统在环境为低pH及有高浓度L-赖氨酸存在时被

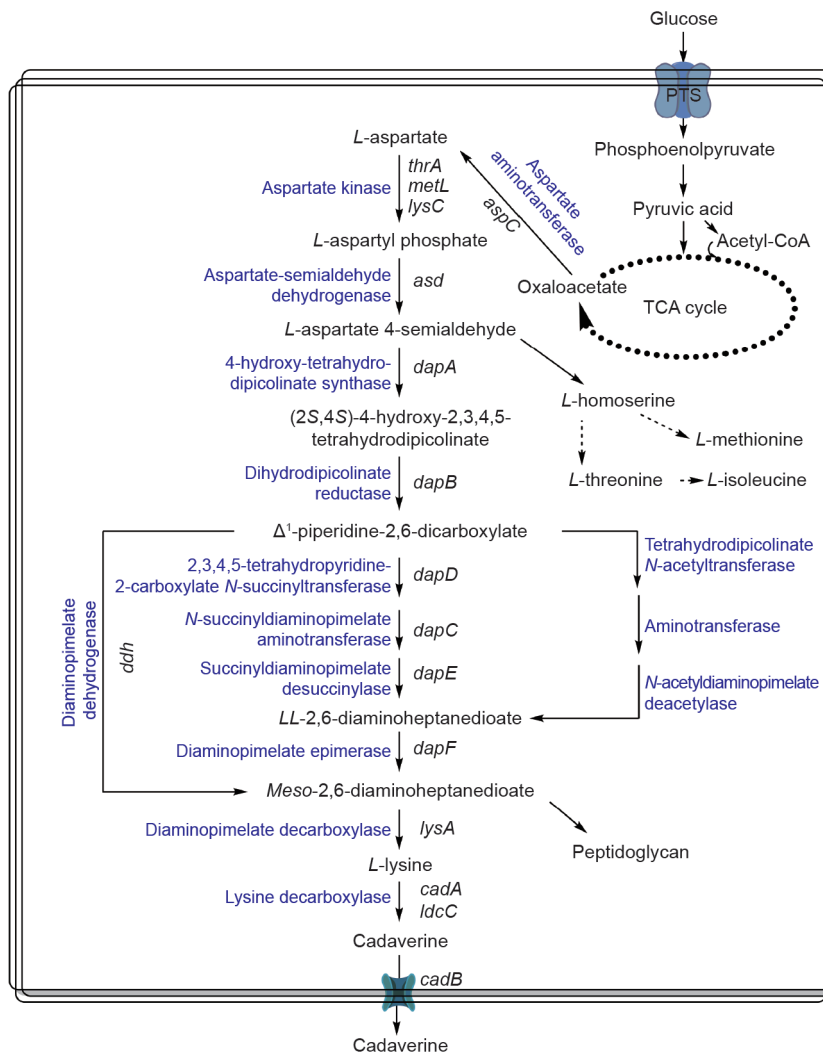


图1. 二氨基庚二酸(DAP)途径合成1,5-戊二胺。

诱导表达, 从而应对酸胁迫对菌体的伤害[27]。Cad系统主要包括负责合成赖氨酸脱羧酶(CadA)和赖氨酸/戊二胺双向转运蛋白(CadB)的*cadBA*操纵子以及调控蛋白CadC两部分[28,29]。CadC蛋白是一个多功能的内膜蛋白, 它由一个位于胞质的含有螺旋-转角-螺旋DNA结合结构域的N端、一个跨膜结构域(TM)和一个位于周质的C端组成[30]。其中, N端可以与*cadBA*启动子上游的Cad1和Cad2区域结合, 激活*cadBA*起始转录[31]; C端具有pH感测功能, 负责感应环境中的pH变化[32], 而跨膜结构域(TM)和其位于周质的部分氨基酸可以与赖氨酸透过酶(LysP)通过形成盐桥或二硫键等方式特异性结合[30]。LysP是L-赖氨酸特异性的透过酶, 其在Cad系统通过响应胞外L-赖氨酸浓度及调控激活蛋白CadC方面起到重要作用[30,33,34]。另外, 组蛋白样蛋白H-NS也参与了调控*cadBA*操纵子的转录, 起到在非诱导环境下抑制细胞CadA和CadB蛋白合成的作用[35,36]。

Cad系统的表达调控如图2所示, 在正常的生长环境下, *E. coli*中H-NS蛋白结合到操纵子*cadBA*的启动子上游-144~-112 bp的Cad1区和-89~-59 bp的Cad2区, 抑制了基因*cadBA*的表达[31,35,36]。同时, 激活蛋白CadC因为与LysP结合而固定在细胞内膜上, 无法行使其转录激活功能, 因而此时操纵子*cadBA*无法表达, 胞内没有1,5-戊二胺的积累[37]。当菌体处于酸胁迫(pH<6.8)且环境中有充足的L-赖氨酸(>5 mmol·L⁻¹)时, 过量的H⁺与CadC蛋白和LysP蛋白结合, 会使两者

构象发生改变, 并使两者间的二硫键断裂, 从而减弱了两者间的相互作用, 这种减弱现象会随环境中pH的降低而增强[32,37]。此外, LysP蛋白因结合和转运L-赖氨酸而发生构象的进一步改变, 从而与CadC蛋白彼此分离[30,38]。激活的CadC蛋白随即取代H-NS蛋白, 与*cadBA*启动子上游Cad1和Cad2区域结合, 并激活*cadBA*的转录和表达[36,38]。随着1,5-戊二胺的含量增加, 过量的1,5-戊二胺(>235 μmol·L⁻¹[37])通过结合到CadC蛋白的二聚体界面使其失活, 从而关闭*cadBA*操纵子的转录[28,39]。此外, L-赖氨酸脱羧酶的活性被ppGpp所抑制, ppGpp是菌体应急应答的效应物, 在细胞氮源缺乏条件下大量合成, 这种调控方式可以减少L-赖氨酸的过度消耗[40]。

除*E. coli*中的Cad系统外, 在乳酸菌*Lactobacillus saerimneri* 30a中发现另一1,5-戊二胺合成系统——KDC系统, 其包含一个L-赖氨酸专一性的脱羧酶和一个双功能的双向转运蛋白, 该蛋白既可以双向转运鸟氨酸/丁二胺, 又可以双向转运赖氨酸/戊二胺[41]。

2.2 1,5-戊二胺的中间代谢

在1,5-戊二胺的胞内分解和利用方面, 尚没有证据表明在*E. coli*中存在相关路径[8], 但在其他一些微生物中存在以1,5-戊二胺为中间代谢物的代谢路径。戊二胺的乙酰化已经在*C. glutamicum*中被深入研究。*C. glutamicum*的NCgl1469基因产物被发现具有戊二胺乙酰

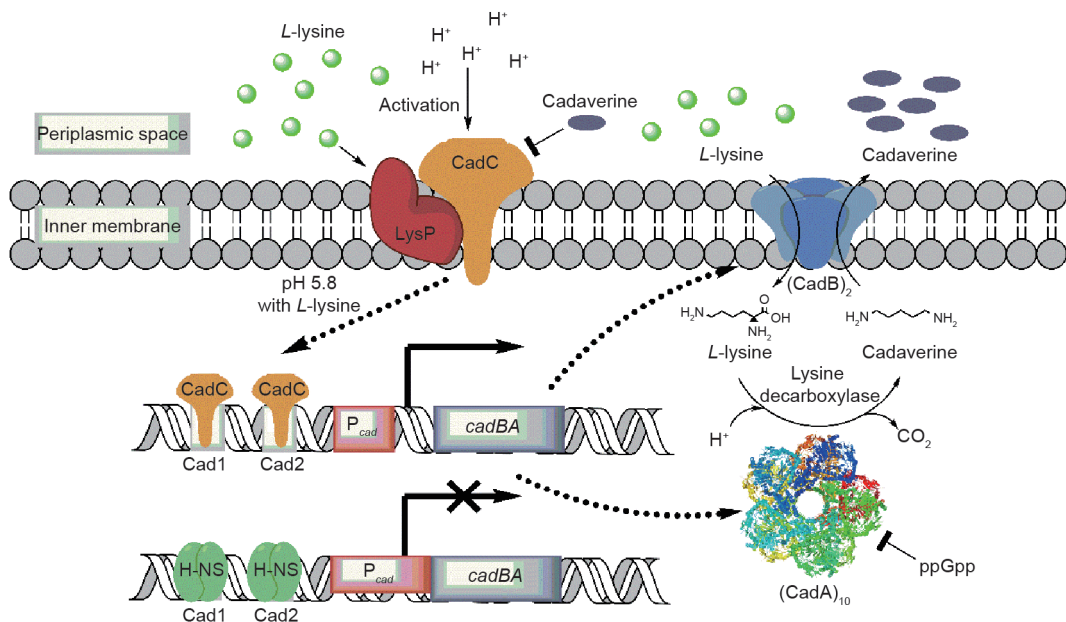


图2. *E. coli* 中1,5-戊二胺的合成调控。

转移酶功能，负责合成 N -乙酰戊二胺。缺失试验表明，敲除 $NCg11469$ 的菌株不能合成 N -乙酰-戊二胺且1,5-戊二胺生成量提高了11%[42]。在嗜热古菌(*Pyrococcus furiosus*)中发现胍丁胺/戊二胺氨丙基转移酶(ACAPT)，可以将1,5-戊二胺转化为 N -(3-氨丙基)-戊二胺(APC)[43]。在一些假单胞菌(*Pseudomonas*)中，推测1,5-戊二胺能被转氨酶催化生成 α -哌啶，进而氧化生成 δ -氨基戊酸(AMV)[44]。

此外，在一些严格厌氧菌中，1,5-戊二胺是细胞壁的重要组成部分之一，在连接外膜和肽聚糖方面起到重要作用[45]。这一现象最早由Kamio等[46,47]在反刍月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)的细胞壁肽聚糖中发现。而后在产碱韦荣球菌(*Veillonella alcalescens*)[48]、小韦荣球菌(*Veillonella parvula*)[49]和解脂厌氧弧菌(*Anaerovibrio lipolytica*)[50]中陆续发现，它们都有相同的肽聚糖重复单位结构[45,50]，如图3所示。

1,5-戊二胺还参与铁载体的合成，铁载体被分泌到环境中，并以高亲和力结合环境中的 Fe^{3+} [51,52]。目前已知的1,5-戊二胺参与合成的铁载体(图4)包括：arthrobactin[51,53]、bisucaberin B[54]、bisucaberin[55]、desferrioxamine B[56–58]、desferrioxamine E[57,59]、desferrioxamine G₁[60]等。

3. 1,5-戊二胺的生物合成

在生物体中，1,5-戊二胺是由赖氨酸脱羧酶直接脱羧 L -赖氨酸生成。然而应用酶催化直接生产1,5-戊二胺的

研究却较少报道，由于赖氨酸脱羧酶存在产物抑制现象，其在 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的1,5-戊二胺溶液中，活力会降低50%[61]。仅在近期一篇研究中，作者尝试利用戊二醛交联法固定化赖氨酸脱羧酶进行催化生产，然而其固定化后的产率和酶活性仅剩余30.5%和8.04%[62]。因此目前仍无法直接利用游离酶或固定化酶直接催化生产1,5-戊二胺。但在利用代谢工程菌直接发酵生产或添加前体 L -赖氨酸通过全细胞催化生产两个方面取得了较大的突破。

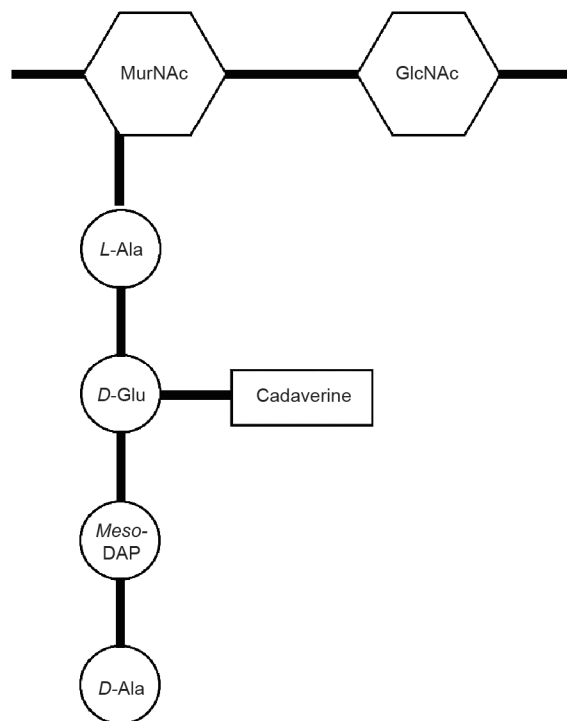


图3. 含有1,5-戊二胺的肽聚糖结构。

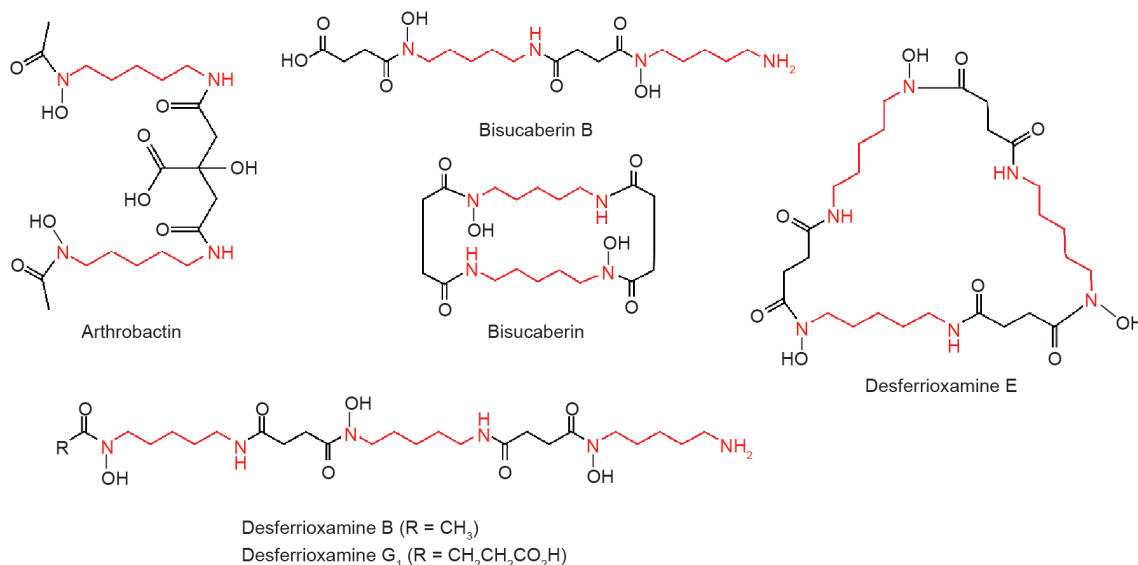


图4. 含有1,5-戊二胺的铁载体。

3.1. 代谢工程改造菌株合成戊二胺

在微生物发酵生产方面, 由于L-赖氨酸是1,5-戊二胺的直接前体, 因而1,5-戊二胺的生产菌株构建主要以广泛研究的赖氨酸生产菌种*C. glutamicum*为出发菌。谷氨酸棒状杆菌自1957年由Kinoshita等筛选出至今已60多年的时间[63], 作为L-赖氨酸的主要生产菌的研究也已经超过50年的历史[7]。特别是近年来的代谢工程改造[64–69], 大大提升了菌株的L-赖氨酸生产能力, 现已实现经过30 h分批补料发酵可产出 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的L-赖氨酸, 生产强度达到 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 糖转化率达到 $0.55 \text{ g(L-赖氨酸)} \cdot \text{g(葡萄糖)}^{-1}$ [7,70]。目前利用*C. glutamicum*每年生产近 $2 \times 10^6 \text{ t}$ 的L-赖氨酸[71]。

*C. glutamicum*因具有高效合成L-赖氨酸的能力而最早被改造为1,5-戊二胺生产菌株。Mimitsuka等[72]通过在*C. glutamicum*的高丝氨酸脱氢酶基因(*hom*)位点敲入来自*E. coli*的赖氨酸脱羧酶基因*cadA*, 构建了一株L-高丝氨酸营养缺陷型*C. glutamicum*菌株, 经过18 h发酵产出1,5-戊二胺 $2.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但试验同时也发现有 $2.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的L-赖氨酸残余, 因而推测由于*C. glutamicum*缺少1,5-戊二胺的外排蛋白, 导致胞内高浓度的1,5-戊二胺积累, 进而抑制了赖氨酸脱羧酶的活力。这一推测经Li等[73]的试验得以证实, Li等通过在*C. glutamicum*中过表达*E. coli*的赖氨酸/戊二胺双向转运蛋白(CadB)和蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)的赖氨酸脱羧酶(Ldc), 使1,5-戊二胺的外排速率增加了22%, 总产量及发酵液中1,5-戊二胺的含量分别增加了30%和73%[73]。类似的调控细胞通透性的研究还有Matsushima等[74]通过在发酵的对数中期添加吐温-40使1,5-戊二胺的收率比不添加吐温-40提高1.5倍。

在*C. glutamicum*生产1,5-戊二胺研究方面取得重大突破的是Kind等[42], 他们在系统地研究了*C. glutamicum*的L-赖氨酸生产的基础上, 通过转录组研究发现了与1,5-戊二胺转运相关的一个转运蛋白超家族透过酶cg2893, 其在*C. glutamicum*中的过表达可使1,5-戊二胺的葡萄糖收率提高20%、产率提高40%[61]。

其后以L-赖氨酸高产菌株*C. glutamicum* LYS-12[70]为出发菌, 将经密码子优化的*E. coli* LdcC基因整合在基因组中表达, 并缺失N-乙酰转移酶NCgl1469和L-赖氨酸外排蛋白(LysE), 并将染色体上cg2893的启动子替换为强启动子 P_{cod} , 构建得到1,5-戊二胺生产菌*C. glutamicum* DAP-16, 经过50 h的补料发酵, 1,5-戊二胺的产量达到了 $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、生产强度达到 $2.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、葡萄糖

转化率达到 $0.29 \text{ g(1,5-戊二胺)} \cdot \text{g(葡萄糖)}^{-1}$ [75]。而后, Buschke等[76]通过对比*C. glutamicum*利用葡萄糖和木糖在代谢流和转录组的差异, 找到影响*C. glutamicum*利用木糖发酵生产1,5-戊二胺的关键基因, 从而构建了过表达果糖二磷酸酶(*fbp*)和*tkt*操纵子, 抑制异柠檬酸脱氢酶(*icd*)的表达及敲除赖氨酸转运蛋白(*lysE*)和N-乙酰戊二胺合成基因*cg1722*, 并异源表达了*E. coli*中的木糖异构酶基因*xylA*和木酮糖激酶基因*xylB*, 成功构建了一株利用木糖作为碳源的基因工程菌, 经补料分批发酵, 最终1,5-戊二胺的产量达到 $103 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、木糖转化率达到32%。

除*C. glutamicum*外, *E. coli*也具有高效合成L-赖氨酸的能力。基于*E. coli*和*C. glutamicum*有类似的L-赖氨酸合成途径及代谢调控方式, 对其也进行了类似的代谢途径改造和发酵条件优化以合成L-赖氨酸[77–80], 现已实现L-赖氨酸产量为 $136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、生产强度达到 $2.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、糖转化率达到 $0.56 \text{ g(1,5-戊二胺)} \cdot \text{g(葡萄糖)}^{-1}$ [81]。然而, 利用*E. coli*发酵生产1,5-戊二胺的研究尚未深入展开, 目前最高产量仅为 $9.61 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、生产强度为 $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、葡萄糖转化率为 $0.12 \text{ g(1,5-戊二胺)} \cdot \text{g(葡萄糖)}^{-1}$ [10]。*E. coli*中1,5-戊二胺转化率低可能有两个原因: 一是*E. coli*对1,5-戊二胺的低耐受, $0.3 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,5-戊二胺处理8 h即会抑制*E. coli*的生长并造成细胞裂解[10]; 其二是1,5-戊二胺影响*E. coli*细胞膜的通透性。研究表明1,5-戊二胺作用于细菌膜孔蛋白OmpC和OmpF, 并呈现出浓度依赖性的膜孔关闭现象[82,83], 且周质中, 1,5-戊二胺关闭膜孔的能力强于胞外[84]。因而, *E. coli*的能量摄取和毒害产物外排效率都将降低, 从而阻碍了L-赖氨酸转化为1,5-戊二胺。由于*E. coli*具有合成高浓度L-赖氨酸的能力, 且具有高的赖氨酸脱羧酶活力[12], 因而, *E. coli*是非常有潜力的1,5-戊二胺生产菌种, 但其合成1,5-戊二胺的能力还没有得到充分开发。

在拓宽1,5-戊二胺发酵的底物谱方面也有部分研究报道, 如Tateno等[85]在*C. glutamicum*中过表达牛链球菌(*Streptococcus bovis* 148) α -淀粉酶基因(*amyA*)和赖氨酸脱羧酶基因(*cadA*), 以可溶性淀粉为碳源发酵生产1,5-戊二胺, 发酵21 h, 1,5-戊二胺的产量可以达到 $2.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过将*E. coli*的赖氨酸脱羧酶基因在甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)中进行异源表达, 实现了以甲醇为碳源发酵生产1,5-戊二胺, 经过高密度补料分批发酵, 1,5-戊二胺产量达到 $11.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ [86]。

3.2. 全细胞催化合成戊二胺

全细胞催化法生产1,5-戊二胺是一种非常有前景的生产方法,因其操作相对简单、生产效率高、目标产物浓度高且成分较为单一,降低了下游分离纯化的成本。此外,由于全细胞催化法生产1,5-戊二胺的前体L-赖氨酸的商业化生产已经非常成熟,L-赖氨酸年产量达到百万吨[8]。

与以*C. glutamicum*为主发酵生产1,5-戊二胺不同,全细胞催化剂的构建通常以*E. coli*为主。最早应用全细胞催化法生产1,5-戊二胺的报道是Nishi等[87]通过利用过表达赖氨酸脱羧酶CadA的*E. coli*菌株,经过6 h的补料转化生产得到69 g·L⁻¹的1,5-戊二胺溶液,生产强度达到了11.5 g·L⁻¹·h⁻¹[87]。

在全细胞催化法生产过程中,细胞通透性是主要的制约因素之一,细胞壁和细胞膜的天然属性限制了底物进入胞内以及产物的快速外排[88,89],因此一个高效的底物/产物转运系统对全细胞催化法的应用至关重要。虽然细胞通透性可以通过化学法(如加入表面活性剂或溶剂)或物理法(如热激细胞)等方式进行调控[90],但这些处理会造成细胞损伤,并导致后续分离纯化的困难[88]。因而,利用分子生物学技术对全细胞催化剂的细胞结构进行微调则更具优势。对于1,5-戊二胺的转运,*E. coli*中存在一个赖氨酸/戊二胺双向转运蛋白(CadB),可以同步将胞内1,5-戊二胺外排和将胞外L-赖氨酸转至胞内,且这一过程并不需要消耗能量[29,91],因而非常适合1,5-戊二胺全细胞催化系统。Ma等[11]最先研究了过表达CadB对全细胞催化剂活力的影响,结果表明共同过表达赖氨酸脱羧酶(CadA)和N端融合了来源于*Erwinia carotovora*果胶酸裂解酶的pelB信号肽的赖氨酸/戊二胺双向转运蛋白(CadB),可有效改善菌株细胞通透性,利用构建得到的菌株BL-DAB可催化得到221 ± 6 g·L⁻¹的1,5-戊二胺转化液,L-赖氨酸的摩尔转化率达到92%以上。

此外,磷酸吡哆醛(PLP)作为赖氨酸脱羧酶的辅酶,对静息细胞的催化活力影响较大。研究表明,赖氨酸脱羧酶的酶活与PLP含量呈正相关,1 mol的赖氨酸脱羧酶蛋白需要1.0~1.2 mol的PLP才能达到最大酶活性[24]。Kim等[92]的研究表明,使用静息细胞在不添加PLP的条件下,1 mol·L⁻¹的底物L-赖氨酸仅有20%转化为1,5-戊二胺,而在转化体系中添加0.025 mmol·L⁻¹ PLP后,L-赖氨酸转化率可提升到80%。转化所需的PLP也可以由菌

体自身合成供给,如Ma等[93]在一株过表达CadA/CadB的菌株BL-DAB中,异源表达了来源于枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的PLP从头合成途径(R5P途径)基因,从而构建得到一株强化了胞内PLP合成的全细胞催化菌AST3。经优化蛋白表达的调控方式和培养条件,使菌体中胞内PLP含量达到1051 nmol·g(DCW)⁻¹(DCW:菌体干重),且菌体在不外源添加PLP条件下的1,5-戊二胺产率达到28 g·g(DCW)⁻¹·h⁻¹,是菌株BL-DAB在添加0.1 mmol·L⁻¹ PLP条件下的1.2倍,是菌株BL-DAB在不添加PLP条件下的2.9倍。

除PLP供给外,底物浓度对全细胞催化剂活力也有显著的影响,Oh等[12]的研究表明,在含菌量OD₆₀₀为10的转化体系中,当初始底物L-赖氨酸浓度增加到150 g·L⁻¹时,细胞催化活性有显著的降低,说明在全细胞催化过程中存在较明显的底物抑制现象。这种底物抑制现象可以通过优化底物L-赖氨酸的补料方式得以解除[11]。

菌体活力的保持也是全细胞催化生产1,5-戊二胺的研究热点之一。在1,5-戊二胺的全细胞催化生产过程中,随着1,5-戊二胺浓度增加,菌体活力显著下降,Oh等[12]的研究结果表明,催化起始时的L-赖氨酸消耗速率可达40.42 mmol·L⁻¹·h⁻¹,但整个催化生产周期的平均转化速率仅10 mmol·L⁻¹·h⁻¹。菌体活力下降的其中一个原因是转化过程中细胞破裂,因而应用固定化细胞催化生产1,5-戊二胺的工艺在近期被广泛研究。Bhatia等[94]检测了固定化细胞和游离细胞的失活能,结果表明固定化细胞比游离细胞的失活能高10%,分别为66.7 kJ·mol⁻¹和56.9 kJ·mol⁻¹,说明固定化细胞更加稳定;菌体循环使用试验也表明游离细胞循环使用10次活力已全部丧失,而固定化细胞循环使用18次后仍保留56%的活力,表明应用固定化技术对稳定静息细胞的催化能力有一定的作用。

在1,5-戊二胺全细胞生产菌株构建中使用的赖氨酸脱羧酶除来源于*E. coli*诱导型蛋白CadA外,Oh等[12]在*E. coli*菌株中过表达了*ldcC*基因编码的组成型赖氨酸脱羧酶,并以含192.6 g·L⁻¹ L-赖氨酸的发酵液为原料经120 h催化生产出133.7 g·L⁻¹的1,5-戊二胺转化液,L-赖氨酸的转化率达到99.90%,但转化过程中的最高生产强度仅为4.1 g·L⁻¹·h⁻¹。Li等[95]在*E. coli* MG1655中过表达来自产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)的赖氨酸脱羧酶(Ldc),并对蛋白转录的启动子进行了筛选,试验表

明使用 P_{lac} 启动子调控*Ldc*表达的方式构建的菌株LN24具有最好的催化活力，*L*-赖氨酸的转化率可达92%、单位菌体的*L*-赖氨酸转化效率可达 $0.133\% \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。此外，Wang等[96]通过易错PCR(聚合酶链式反应)技术，对来自蜂房哈夫尼菌(*H. alvei* AS1.1009)的赖氨酸脱羧酶进行突变，获得活力提高了1.48倍的LDC^{E583G}突变体，将该突变体导入到*E. coli*中，通过全细胞催化5 h，*L*-赖氨酸的转化率为93.4%、1,5-戊二胺的最终浓度达到 $63.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3. 1,5- 戊二胺分离纯化

1,5-戊二胺的分离纯化主要借鉴其他二元胺的分离纯化方法，目前，比较常用的分离方法主要以溶剂萃取法为主，溶剂萃取法具有能耗低、选择性高、分离效果好、设备简单、操作方便等优点。

在萃取剂选择方面，对比了发酵液中1,5-戊二胺在正丁醇、仲丁醇、仲辛醇和环己醇中的分配系数，结果表明，正丁醇可以较好地萃取1,5-戊二胺[75]。此外，对比了4-壬基酚、2-乙基己基磷酸酯(D2EHPA)、新葵酸(Versatic acid 1019)、2-壬基萘磺酸(DNNSA)和4-辛基苯甲醛作为1,5-戊二胺萃取剂的分配系数，结果表明4-壬基酚的萃取效果最好，通过一步萃取及反萃取后，1,5-戊二胺的萃取率超过了90%[97]。

经溶剂萃取后，1,5-戊二胺可以通过色谱法、精馏或加酸成盐沉淀等方式分离回收[9,98]。其中，精馏是较适合工业化中1,5-戊二胺萃取液分离纯化的方法，但其具体条件需要依据萃取液中1,5-戊二胺的浓度、萃取剂的物性等因素的变化而确定。

为避免由于精馏过程中高温造成的1,5-戊二胺分解，文献[99]中的专利公开了一种在精馏过程中添加高沸点

溶剂的方法。该方法通过添加高沸点溶剂，如 C_{14} 烷或 C_{11}/C_{14} 混合烷，以提高在减压精馏过程中物料的流动性。结果表明，仅100%的1,5-戊二胺可以在低于1,5-戊二胺的沸点 50°C ，即 130°C 下被回收。

1,5-戊二胺的分离纯化方法虽取得了一定进展，但还没有达到商业化生产的要求。由于使用1,5-戊二胺单体进行的聚合反应中，要求1,5-戊二胺的纯度至少要达到99.5%，因此开发出满足工业化生产需求的生物基1,5-戊二胺的分离纯化工艺对1,5-戊二胺的产业化具有重要的意义。

4. 1,5- 戊二胺在生物基聚酰胺制备中的应用

4.1. 生物基聚酰胺研究进展

生物基聚酰胺(尼龙)研究从20世纪40年代开始，近年来，由于经济和环境的因素，生物基聚酰胺成为研究的热点。据欧洲生物塑料协会统计，全球生物基塑料在2014年的产量约为 $1.7 \times 10^6 \text{ t}$ ，预计到2019年，将达到 $7.8 \times 10^6 \text{ t}$ [100]。

现已商品化的生物基聚酰胺主要有完全生物基聚酰胺(如PA 11、PA 1010)和部分生物基聚酰胺(如PA 610、PA 1012、PA 410、PA 10T等)，其分类及生产商见表1 [101–105]。目前规模化生产的生物基聚酰胺单体主要是以蓖麻油为原料制备的癸二酸、癸二胺和 ω -氨基十一烷酸，其制备路线如图5所示[106–108]。

除上述已商品化的生物基聚酰胺外，一些新型完全生物基聚酰胺也正在广泛研究，如生物基 PA 46、PA 6和PA 5X等。完全生物基PA 46是基于生物基己二酸和丁二胺聚合而成。生物基己二酸的生产研究已经非常深入，使用不同可再生原料的生产路线已被开发出来，例

表1 已商品化的生物基聚酰胺的分类及生产商

Classification	Monomers	Materials	Bio-based content (%)	Producers
PA 11 [101]	ω -Amino-undecanoic acid	Castor oil	100.0	Arkema, Suzhou Hipro Polymers, SAB-IC
PA 1010 [102]	Sebacic acid Decan-1,10-diamine	Castor oil	100.0	Arkema, DuPont, Evonik
PA 610 [103]	Sebacic acid Hexamethylenediamine	Castor oil Butadiene	63.5	SABIC, Toray, DuPont, BASF
PA 1012 [104]	Dodecanedioic acid Decan-1,10-diamine	Alkane Castor oil	42.9	Arkema, Evonik
PA 410 [105]	Sebacic acid Putrescine	Castor oil Acrylonitrile	69.7	DSM
PA 10T [102]	Terephthalic acid Decan-1,10-diamine	Benzene Castor oil	51.8	Evonik, Kingfa

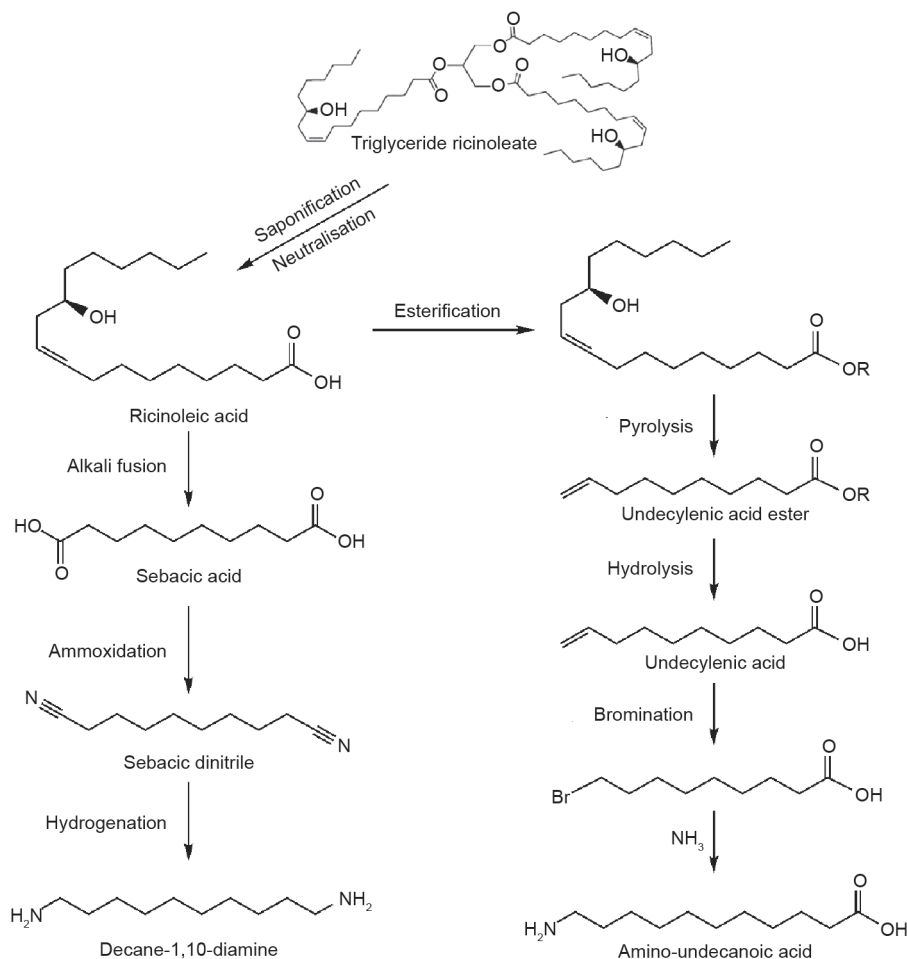


图5. 蓖麻油制备癸二酸、癸二胺和 ω -氨基十一烷酸。

如, Draths等[109]和van Duuren等[110]分别利用酶转化法和发酵法以D-葡萄糖为原料生成顺,顺-己二烯二酸,而后通过加氢还原得到己二酸; Lange等[111]将纤维素酸解得到乙酰丙酸,再经氢化、脱水,生成 γ -戊内酯,其经酯交换、加成、水解等反应获得己二酸; Boussie等[112]以纤维素为原料催化氧化葡萄糖二酸,经过催化加氢得到己二酸。1,4-丁二胺的生物法合成研究也有所进展, Schneider等[113]利用基因工程*C. glutamicum*通过34 h的分批补料发酵得到 $19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁二胺,生产强度达到 $0.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、葡萄糖转化率达到 $0.16 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Qian等[114]利用基因工程*E. coli*发酵得到丁二胺 $24.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,生产强度达到 $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

另外, PA 6的单体己内酰胺的生产研究也取得阶段性成果,其可以从L-赖氨酸催化获得[115]或由纤维素生物质水解中间产物 γ -戊内酯经酸解等途径制得[116]。此外,由己二酸、己二腈、1,3-丁二烯、6-氨基己酸、己二酰胺及粘康酸等起始催化生产己内酰胺的工艺也有报道[117]。

表2 生物基聚酰胺PA 6、PA 66、PA 56及PA 510性能对比

Properties	PA 6	PA 66	PA 56	PA 510
Melting point (°C)	220	260	253	215
Glass transition temperature (°C)	54	60	55	50
Density ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	1.14	1.14	1.14	1.07
Water absorption (%)	3.0	2.8	3.3	1.8

4.2. 生物基聚酰胺 5X 的研究现状

近年来,利用生物来源的1,5-戊二胺替代石油化工来源的己二胺合成生物基聚酰胺的研究也逐步展开。使用1,5-戊二胺与生物来源的二元酸,如丁二酸、己二酸或癸二酸,聚合即可得到完全生物基聚酰胺PA 54、PA 56或PA 510。与石油化工来源的PA 66相比,基于1,5-戊二胺合成的生物基聚酰胺同样具有较好的机械强度、较高的熔点及耐各种有机溶剂的特性,在部分领域可以替代PA 66使用。表2对生物基聚酰胺PA 6、PA 66、PA 56及PA 510的部分性能进行了对比[75,105,118]。

PA 56因具有高的吸水率和较低的玻璃化温度,在制备纺织类纤维方面优势显著。高的吸收率使PA 56纤

维具有好的吸湿排汗性能,大大提高了穿着舒适度,并起到减少了静电的作用。其低玻璃化温度有利于在高寒区域穿着使用时不脆不硬,大大提高材料的耐低温性能。此外,PA 56有极好的强度、牢度和耐磨性,从而提高了衣服的使用寿命[118]。

PA 510是由戊二胺和癸二酸合成而来,具有低吸水率、良好的低温抗冲击性和尺寸稳定性[75],因而可以进入因一般聚酰胺吸水性大而不能胜任的领域,在机械、电子电器、无线电技术等工业领域及生活用品中有广泛的应用前景,可用于制造各种工业结构件、减摩件、电绝缘件。此外,PA 510的密度低,因而非常适合应用到汽车、飞机等运输工具上,可以减轻运输工具的重量,实现更好的节能、环保功能。

但由于化学法生产的戊二胺价格昂贵,目前还没有高纯度的工业规模的戊二胺产品,高性能的PA 5X尚未能实现商业化。其他以1,5-戊二胺为单体的完全生物基聚酰胺生产研究尚处于起步阶段[119]。由于生物基聚酰胺5X具有优良的性能且环保,因而基于1,5-戊二胺的生物基聚酰胺具有广阔的应用前景。

5. 展望

1,5-戊二胺的生物合成研究尚处于起步阶段,还有诸多因素制约其大规模产业化生产。在发酵法生产过程中,1,5-戊二胺对生产菌株的毒害作用是制约其工业化生产的主要因素之一。这需要对其损伤细胞的机制进行深入研究,从而针对性地对生产菌株进行改造或对发酵条件进行优化。在全细胞催化法生产过程中,物质在胞内外的转运和对催化反应的影响机制等理论研究还需进一步深入。此外,*L*-赖氨酸脱羧过程释放一分子的CO₂,从发酵经济学角度看,全细胞催化过程存在碳资源的浪费和生产成本的增加问题。因此脱羧产生的CO₂的循环利用研究是降低全细胞催化法生产成本的突破方向之一。

赖氨酸脱羧酶的筛选及改造是降低1,5-戊二胺生产成本的另一个研究方向。目前使用的赖氨酸脱羧酶大多为*E. coli*的CadA蛋白,该酶虽然较其他来源的赖氨酸脱羧酶有更高的脱羧活性,但同时存在显著的底物和产物抑制现象,且仅在弱酸性(pH 5~6.8)条件下有催化活力,制约了其生产高浓度的碱性1,5-戊二胺。并且生产过程需要调控体系的pH在弱酸性,而在1,5-戊二胺分离纯化时通常又需要将发酵液(或转化液)调至碱性

(pH>12)以便萃取分离,整个过程需消耗大量的酸和碱,不仅增加生产成本,同时不利于清洁生产。因而可以尝试筛选耐碱性的赖氨酸脱羧酶,或采用定点突变、定向进化等分子生物学及合成生物学方法对赖氨酸脱羧酶进行改造,以减轻其底物和产物的抑制现象,增强其酸碱稳定性,这对进一步提升1,5-戊二胺的产量和产率、减少酸碱用量、降低生产成本都有重要的意义。

致谢

感谢国家重点研发计划(2016YFA0204300)、国家自然科学基金(批准号:21390200,31440024)、甘肃省科技支撑计划项目(1304FKCE106)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Weichao Ma, Kequan Chen, Yan Li, Ning Hao, Xin Wang, and Pingkai Ouyang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Moreau PL. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J Bacteriol* 2007;189(6):2249–61.
- [2] Samartzidou H, Mehrazin M, Xu Z, Benedik MJ, Delcour AH. Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J Bacteriol* 2003;185(1):13–9.
- [3] Jancewicz AL, Gibbs NM, Masson PH. Cadaverine's functional role in plant development and environmental response. *Front Plant Sci* 2016;7:870.
- [4] Andersson AC, Henningson S, Rosengren E. Formation of cadaverine in the pregnant rat. *Acta Physiol Scand* 1979;105(4):508–12.
- [5] Wang Q, Wang Y, Liu R, Yan X, Li Y, Fu H, et al. Comparison of the effects of *Mylabris* and *Acanthopanax senticosus* on promising cancer marker polyamines in plasma of a Hepatoma-22 mouse model using HPLC-ESI-MS. *Biomed Chromatogr* 2013;27(2):208–15.
- [6] Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining mysteries of molecular biology: The role of polyamines in the cell. *J Mol Biol* 2015;427(21):3389–406.
- [7] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels—*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23(4):631–40.
- [8] Schneider J, Wendisch VF. Biotechnological production of polyamines by bacteria: Recent achievements and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91(1):17–30.
- [9] Kind S, Wittmann C. Bio-based production of the platform chemical 1,5-diaminopentane. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91(5):1287–96.
- [10] Qian ZG, Xia XX, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: A five carbon diamine. *Biotechnol Bioeng* 2011;108(1):93–103.
- [11] Ma W, Cao W, Zhang H, Chen K, Li Y, Ouyang P. Enhanced cadaverine production from *L*-lysine using recombinant *Escherichia coli* co-overexpressing CadA and CadB. *Biotechnol Lett* 2015;37(4):799–806.
- [12] Oh YH, Kang KH, Kwon MJ, Choi JW, Joo JC, Lee SH, et al. Development of engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts for high-level conversion of *L*-lysine into cadaverine. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2015;42(11):1481–91.
- [13] Velasco AM, Leguina JI, Lazcano A. Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways. *J Mol Evol* 2002;55(4):445–59.
- [14] Bakhiet N, Forney FW, Stahly DP, Daniels L. Lysine biosynthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* is by the diaminopimelic acid pathway. *Curr Microbiol* 1984;10(4):195–8.
- [15] Weinberger S, Gilvarg C. Bacterial distribution of the use of succinyl and acetyl blocking groups in diaminopimelic acid biosynthesis. *J Bacteriol*

- 1970;101(1): 323–4.
- [16] Misono H, Togawa H, Yamamoto T, Soda K. *Meso- α , ϵ -diaminopimelate D-dehydrogenase: Distribution and the reaction product.* J Bacteriol 1979;137(1):22–7.
- [17] White PJ. The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. Microbiology 1983;129:739–49.
- [18] Scapin G, Blanchard JS. Enzymology of bacterial lysine biosynthesis. In: Purich DL, editor Advances in enzymology and related areas of molecular biology. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 279–324.
- [19] L john HB. Enzyme regulation, lysine pathways and cell wall structures as indicators of major lines of evolution in fungi. Nature 1971;231(5299):164–8.
- [20] Azevedo RA, Lea PJ. Lysine metabolism in higher plants. Amino Acid 2001; 20(3):261–79.
- [21] Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. Science 1996;273(5278):1058–73.
- [22] Sundharadas G, Gilvarg C. Biosynthesis of α , ϵ -diaminopimelic acid in *Bacillus megaterium*. J Biol Chem 1967;242(17):3983–4.
- [23] Kikuchi Y, Kojima H, Tanaka T, Takatsuka Y, Kamio Y. Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. J Bacteriol 1997;179(14):4486–92.
- [24] Sabo DL, Fischer EH. Chemical properties of *Escherichia coli* lysine decarboxylase including a segment of its pyridoxal 5'-phosphate binding site. Biochemistry 1974;13(4):670–6.
- [25] Lemonnier M, Lane D. Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. Microbiology 1998;144(Pt 3):751–60.
- [26] Yamamoto Y, Miwa Y, Miyoshi K, Furuyama J, Ohmori H. The *Escherichia coli* *ldcC* gene encodes another lysine decarboxylase, probably a constitutive enzyme. Genes Genet Syst 1997;72(3):167–72.
- [27] Kanjee U, Houry WA. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol 2013;67:65–81.
- [28] Neely MN, Olson ER. Kinetics of expression of the *Escherichia coli* *cad* operon as a function of pH and lysine. J Bacteriol 1996;178(18):5522–8.
- [29] Meng SY, Bennett GN. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *cad* operon: A system for neutralization of low extracellular pH. J Bacteriol 1992;174(8):2659–69.
- [30] Rauschmeier M, Sch ppel V, Tetsch L, Jung K. New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*. J Mol Biol 2014;426(1):215–29.
- [31] Kuper C, Jung K. CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol 2005;10(1):26–39.
- [32] Haneburger I, Eichinger A, Skerra A, Jung K. New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*. J Biol Chem 2011;286(12):10681–9.
- [33] Popkin PS, Maas WK. *Escherichia coli* regulatory mutation affecting lysine transport and lysine decarboxylase. J Bacteriol 1980;141(2):485–92.
- [34] Steffes C, Ellis J, Wu J, Rosen BP. The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. J Bacteriol 1992;174(10):3242–9.
- [35] Shi X, Waasdorp BC, Bennett GN. Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1993;175(4): 1182–6.
- [36] Krin E, Danchin A, Soutourina O. Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli*. BMC Microbiol 2010;10:273.
- [37] Fritz G, Koller C, Burdack K, Tetsch L, Haneburger I, Jung K, et al. Induction kinetics of a conditional pH stress response system in *Escherichia coli*. J Mol Biol 2009;393(2):272–86.
- [38] Neely MN, Dell CL, Olson ER. Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli* *cad* operon. J Mol Biol 1994;176(11):3278–85.
- [39] Haneburger I, Fritz G, Jurkschat N, Tetsch L, Eichinger A, Skerra A, et al. Deactivation of the *E. coli* pH stress sensor CadC by cadaverine. J Mol Biol 2012;424(1–2):15–27.
- [40] Kanjee U, Gutsche I, Alexopoulos E, Zhao B, El Bakkouri M, Thibault G, et al. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: The structure of the inducible lysine decarboxylase. EMBO J 2011;30(5):931–44.
- [41] Romano A, Trip H, Lolkema JS, Lucas PM. Three-component lysine/ornithine decarboxylation system in *Lactobacillus saerimneri* 30a. J Bacteriol 2013;195(6):1249–54.
- [42] Kind S, Jeong WK, Schröder H, Zelder O, Wittmann C. Identification and elimination of the competing *N*-acetyldiaminopentane pathway for improved production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol 2010;76(15):5175–80.
- [43] Cacciapuoti G, Porcelli M, Moretti MA, Sorrentino F, Concilio L, Zappia V, et al. The first agmatine/cadaverine aminopropyl transferase: Biochemical and structural characterization of an enzyme involved in polyamine biosynthesis in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J Bacteriol 2007;189(16):6057–67.
- [44] Revelles O, Espinosa-Urgel M, Fuhrer T, Sauer U, Ramos JL. Multiple and interconnected pathways for *L*-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. J Bacteriol 2005;187(21):7500–10.
- [45] Kojima S, Kamio Y. Molecular basis for the maintenance of envelope integrity in *Selenomonas ruminantium*: Cadaverine biosynthesis and covalent modification into the peptidoglycan play a major role. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2012;58(3):153–60.
- [46] Kamio Y, Itoh Y, Terawaki Y, Kusano T. Cadaverine is covalently linked to peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*. J Bacteriol 1981;145(1):122–8.
- [47] Kamio Y, Itoh Y, Terawaki Y. Chemical structure of peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*: Cadaverine links covalently to the *D*-glutamic acid residue of peptidoglycan. J Bacteriol 1981;146(1):49–53.
- [48] Kamio Y. Structural specificity of diamines covalently linked to peptidoglycan for cell growth of *Veillonella alcalescens* and *Selenomonas ruminantium*. J Bacteriol 1987;169(10):4837–40.
- [49] Kamio Y, Nakamura K. Putrescine and cadaverine are constituents of peptidoglycan in *Veillonella alcalescens* and *Veillonella parvula*. J Bacteriol. 1987;169(6): 2881–4.
- [50] Hirao T, Sato M, Shirahata A, Kamio Y. Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. J Bacteriol 2000;182(4):1154–7.
- [51] Burrell M, Hanfrey CC, Kinch LN, Elliott KA, Michael AJ. Evolution of a novel lysine decarboxylase in siderophore biosynthesis. Mol Microbiol 2012;86(2):485–99.
- [52] Soe CZ, Telfer TJ, Levina A, Lay PA, Codd R. Simultaneous biosynthesis of putrebactin, avaroferrin and bisucaberin by *Shewanella putrefaciens* and characterisation of complexes with iron(III), molybdenum(VI) or chromium(V). J Inorg Biochem 2016;162:207–15.
- [53] Schafft M, Diekmann H. [Cadaverine is an intermediate in the biosynthesis of arthrobactin and ferrioxamine E]. Arch Microbiol 1978;117(2):203–7. German.
- [54] Fujita MJ, Nakano K, Sakai R. Bisucaberin B, a linear hydroxamate class siderophore from the marine bacterium *Tenacibaculum mesophilum*. Molecules 2013;18(4):3917–26.
- [55] Kadi N, Song L, Challis GL. Bisucaberin biosynthesis: An adenylating domain of the BibC multi-enzyme catalyzes cyclodimerization of *N*-hydroxy-*N*-succinylcadaverine. Chem Commun (Camb) 2008;(41):5119–21.
- [56] Barona-G mez F, Lautru S, Francou FX, Leblond P, Pernodet JL, Challis GL. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambifaciens* ATCC 23877. Microbiology 2006;152(Pt 11):3355–66.
- [57] Sidebottom AM, Karty JA, Carlson EE. Accurate mass MS/MS/MS analysis of siderophores ferrioxamine B and E1 by collision-induced dissociation electrospray mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 2015;26(11):1899–902.
- [58] Dhungana S, White PS, Crumbliss AL. Crystal structure of ferrioxamine B: A comparative analysis and implications for molecular recognition. J Biol Inorg Chem 2001;6(8):810–8.
- [59] Meiwes J, Fiedler HP, Z hner H, Konetschny-Rapp S, Jung G. Production of desferrioxamine E and new analogues by directed fermentation and feeding fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 1990;32(5): 505–10.
- [60] Imbert M, B chet M, Blondeau R. Comparison of the main siderophores produced by some species of *Streptomyces*. Curr Microbiol 1995;31(2):129–33.
- [61] Kind S, Kreye S, Wittmann C. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*. Metab Eng 2011;13(5):617–27.
- [62] Park SH, Soetyono F, Kim HK. Cadaverine production by using cross-linked enzyme aggregate of *Escherichia coli* lysine decarboxylase. J Microbiol Biotechnol 2017;27(2):289–96.
- [63] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of *L*-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol 2004;50(6):331–43.
- [64] de Graaf AA, Eggeling L, Sahn H. Metabolic engineering for *L*-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Adv Biochem Eng Biotechnol 2001;73:9–29.
- [65] Becker J, Klopffrogge C, Herold A, Zelder O, Bolten CJ, Wittmann C. Metabolic flux engineering of *L*-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*—Over expression and modification of G6P dehydrogenase. J Biotechnol 2007;132(2):99–109.
- [66] Blombach B, Schreiner ME, Moch M, Oldiges M, Eikmanns BJ. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on *L*-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol 2007;76(3):615–23.
- [67] Eggeling L, Oberle S, Sahn H. Improved *L*-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: Use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. Appl Microbiol Biotechnol 1998;49(1):24–30.
- [68] Mitsuhashi S, Hayashi M, Ohnishi J, Ikeda M. Disruption of malate: Quinone oxidoreductase increases *L*-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Biosci Biotechnol Biochem 2006;70(11):2803–6.
- [69] Takeno S, Murata R, Kobayashi R, Mitsuhashi S, Ikeda M. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for *L*-lysine production. Appl Environ Microbiol 2010;76(21):7154–60.
- [70] Becker J, Zelder O, H fner S, Schröder H, Wittmann C. From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for *L*-lysine production. Metab Eng 2011;13(2):159–68.
- [71] Pérez-García F, Peters-Wendisch P, Wendisch VF. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for fast production of *L*-lysine and *L*-pipercolic acid. Appl Microbiol Biotechnol 2016;100(18):8075–90.
- [72] Mimitsuka T, Sawai H, Hatsu M, Yamada K. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71(9):2130–5.
- [73] Li M, Li D, Huang Y, Liu M, Wang H, Tang Q, et al. Improving the secretion of cadaverine in *Corynebacterium glutamicum* by cadaverine-lysine antiporter. J

- Ind Microbiol Biotechnol 2014;41(4):701–9.
- [74] Matsushima Y, Hirasawa T, Shimizu H. Enhancement of 1,5-diaminopentane production in a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* by Tween 40 addition. J Gen Appl Microbiol 2016;62(1):42–5.
- [75] Kind S, Neubauer S, Becker J, Yamamoto M, Völkert M, Abendroth Gv, et al. From zero to hero—Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. Metab Eng 2014;25:113–23.
- [76] Buschke N, Becker J, Schäfer R, Kiefer P, Biedendieck R, Wittmann C. Systems metabolic engineering of xylose-utilizing *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane. Biotechnol J 2013;8(5):557–70.
- [77] Kikuchi Y, Kojima H, Tanaka T. Mutational analysis of the feedback sites of lysine-sensitive aspartokinase of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 1999;173(1):211–5.
- [78] Van Dien SJ, Iwatani S, Usuda Y, Matsui K. Theoretical analysis of amino acid-producing *Escherichia coli* using a stoichiometric model and multivariate linear regression. J Biosci Bioeng 2006;102(1):34–40.
- [79] Cheraghi S, Akbarzade A, Farhangi A, Chiani M, Saffari Z, Ghassemi S, et al. Improved production of L-lysine by over-expression of *meso*-diaminopimelate decarboxylase enzyme of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli*. Pak J Biol Sci 2010;13(10):504–8.
- [80] Ying H, He X, Li Y, Chen K, Ouyang P. Optimization of culture conditions for enhanced lysine production using engineered *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol 2014;172(8):3835–43.
- [81] Wang Y, Li Q, Zheng P, Guo Y, Wang L, Zhang T, et al. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method. J Ind Microbiol Biotechnol 2016;43(9):1227–35.
- [82] delaVega AL, Delcour AH. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. EMBO J 1995;14(23):6058–65.
- [83] Hamner S, McInerney K, Williamson K, Franklin MJ, Ford TE. Bile salts affect expression of *Escherichia coli* O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions. PLoS One 2013;8(9):e74647.
- [84] Iyer R, Delcour AH. Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines. J Biol Chem 1997;272(30):18595–601.
- [85] Tateno T, Okada Y, Tsuchidate T, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. Direct production of cadaverine from soluble starch using *Corynebacterium glutamicum* coexpressing α -amylase and lysine decarboxylase. Appl Microbiol Biotechnol 2009;82(1):115–21.
- [86] Naerdal I, Pfeifenschneider J, Brautaset T, Wendisch VF. Methanol-based cadaverine production by genetically engineered *Bacillus methanolicus* strains. Microb Biotechnol 2015;8(2):342–50.
- [87] Nishi K, Endo S, Mori Y, Totsuka K, Hirao Y, inventors; Ajinomoto KK, assignee. Method for producing cadaverine dicarboxylate and its use for the production of nylon. European Patent EP1482055. 2006 Jan 3.
- [88] de Carvalho CC. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. Biotechnol Adv 2011;29(1):75–83.
- [89] Chen RR. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. Appl Microbiol Biotechnol 2007;74(4):730–8.
- [90] León R, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral JMS. Whole-cell biocatalysis in organic media. Enzyme Microb Tech 1998;23(7–8):483–500.
- [91] Soksawatmaekhin W, Uemura T, Fukiwake N, Kashiwagi K, Igarashi K. Identification of the cadaverine recognition site on the cadaverine-lysine antiporter CadB. J Biol Chem 2006;281(39):29213–20.
- [92] Kim HJ, Kim YH, Shin JH, Bhatia SK, Sathiyarayanan G, Seo HM, et al. Optimization of direct lysine decarboxylase biotransformation for cadaverine production with whole-cell biocatalysts at high lysine concentration. J Microbiol Biotechnol 2015;25(7):1108–13.
- [93] Ma W, Cao W, Zhang B, Chen K, Liu Q, Li Y, et al. Engineering a pyridoxal 5'-phosphate supply for cadaverine production by using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis. Sci Rep 2015;5:15630.
- [94] Bhatia SK, Kim YH, Kim HJ, Seo HM, Kim JH, Song HS, et al. Biotransformation of lysine into cadaverine using barium alginate-immobilized *Escherichia coli* overexpressing CadA. Bioprocess Biosyst Eng 2015;38(12):2315–22.
- [95] Li N, Chou H, Yu L, Xu Y. Cadaverine production by heterologous expression of *Klebsiella oxytoca* lysine decarboxylase. Biotechnol Bioproc Eng 2014;19(6):965–72.
- [96] Wang C, Zhang K, Chen Z, Cai H, Wan H, Ouyang P. Directed evolution and mutagenesis of lysine decarboxylase from *Hafnia alvei* AS1.1009 to improve its activity toward efficient cadaverine production. Biotechnol Bioproc Eng 2015;20(3):439–46.
- [97] Krzyżaniak A, Schuur B, de Haan AB. Extractive recovery of aqueous diamines for bio-based plastics production. J Chem Tech Biot 2013;88(10):1937–45.
- [98] Kind S, Wittmann C, inventors; BASF (China) Company Limited, BASF SE, assignee. Processes and recombinant microorganisms for the production of cadaverine. PCT Patent WO2012114256 A1. 2012 Aug 30.
- [99] Liu X, Liu C, Dai D, Qin B, Li N, inventors; Cathay R&D Center Co., Ltd., Cathay Industrial Biotech Ltd., assignee. Purification of cadaverine using high boiling point solvent. PCT Patent WO2014/114000 A1. 2014 Jul 31.
- [100] Aeschelmann F, Carus M. Bio-based building blocks and polymers in the world—Capacities, production and applications: Status quo and trends toward 2020. 3rd ed. Hürth: NOVA-Institut GmbH; 2015.
- [101] Martino L, Basilissi L, Farina H, Ortenzi MA, Zini E, Di Silvestro G, et al. Bio-based polyamide 11: Synthesis, rheology and solid-state properties of star structures. Eur Polym J 2014;59:69–77.
- [102] Wang Z, Hu G, Zhang J, Xu J, Shi W. Non-isothermal crystallization kinetics of Nylon 10T and Nylon 10T/1010 copolymers: Effect of sebacic acid as a third comonomer. Chin J Chem Eng 2016. In press.
- [103] McKeen LW. Polyamides (Nylons). In: McKeen LW The effect of temperature and other factors on plastics and elastomers. 3rd ed. Oxford: William Andrew Publishing; 2014. p. 233–340.
- [104] Wu Z, Zhou C, Qi R, Zhang H. Synthesis and characterization of nylon 1012/clay nanocomposite. J Appl Polym Sci 2002;83(11):2403–10. .
- [105] Rulkens R, Koning C. Chemistry and technology of polyamides. In: Matyjaszewski K, Möller M, editors Polymer science: A comprehensive reference. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 431–67.
- [106] Karak N. Polyamides, polyolefins and other vegetable oil-based polymers. In: Karak N, editor Vegetable oil-based polymers: Properties, processing and applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2012. p. 208–25.
- [107] Moorthy JN, Singhal N. Facile and highly selective conversion of nitriles to amides via indirect acid-catalyzed hydration using TFA or AcOH-H₂SO₄. J Org Chem 2005;70(5):1926–9.
- [108] Azcan N, Demirel E. Obtaining 2-octanol, 2-octanone, and sebacic acid from castor oil by microwave-induced alkali fusion. Ind Eng Chem Res 2008;47(6):1774–8.
- [109] Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. J Am Chem Soc 1994;116(1):399–400. .
- [110] van Duuren JB, Brehmer B, Mars AE, Eggink G, Dos Santos VA, Sanders JP. A limited LCA of bio-adipic acid: Manufacturing the nylon-6,6 precursor adipic acid using the benzoic acid degradation pathway from different feedstocks. Biotechnol Bioeng 2011;108(6):1298–306.
- [111] Lange JP, Vestering JZ, Haan RJ. Towards 'bio-based' nylon: Conversion of γ -valerolactone to methyl pentenoate under catalytic distillation conditions. Chem Commun (Camb) 2007;(33):3488–90.
- [112] Boussie TR, Dias EL, Fresco ZM, Murphy VJ, Shoemaker J, Archer R, et al., inventors; Rennovia, Inc., assignee. Production of adipic acid and derivatives from carbohydrate-containing materials. US Patent US8669397 B2. 2014 Mar 11.
- [113] Schneider J, Eberhardt D, Wendisch VF. Improving putrescine production by *Corynebacterium glutamicum* by fine-tuning ornithine transcarbamoylase activity using a plasmid addiction system. Appl Microbiol Biotechnol 2012;95(1):169–78.
- [114] Qian ZG, Xia XX, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: A four carbon diamine. Biotechnol Bioeng 2009;104(4):651–62.
- [115] Frost JW, inventor; Board of Trustees of Michigan State University, assignee. Synthesis of caprolactam from lysine. US Patent US8367819 B2. 2013 Feb 5.
- [116] Chan-Thaw CE, Marelli M, Psaro R, Ravasio N, Zaccheria F. New generation biofuels: γ -valerolactone into valeric esters in one pot. RSC Adv 2013;3:1302–6.
- [117] Beerthuis R, Rothenberg G, Shiju NR. Catalytic routes towards acrylic acid, adipic acid and ϵ -caprolactam starting from biorenewables. Green Chem 2015;17:1341–61.
- [118] Eltahir YA, Saeed HAM, Chen Y, Xia Y, Wang Y. Effect of hot drawing on the structure and properties of novel polyamide 5,6 fibers. Text Res J 2014;84(16):1700–7.
- [119] Kato K, Masunaga A, Matsuoka H, inventors; Toray Industries Inc., assignee. Polyamide resin, polyamide resin composition, and molded article comprising same. US Patent US 20120016077 A1. 2012 Jan 19.