

过量表达苹果酸酶对*E. coli*脂肪酸合成能力的影响

孟鑫, 尚宏丽, 郑益

(辽宁医学院食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121000)

摘要:为了考察苹果酸酶对原核生物脂肪酸合成能力的影响,本研究从*E. coli* K-12中克隆了苹果酸酶基因(NADP ME, EC1.1.1.40)MaeB,并插入质粒pET30a-T,构建了重组质粒pMX20,经IPTG诱导在*E. coli* BL21(DE3)获得了大量表达。摇瓶发酵结果表明,过量表达苹果酸酶基因会改变大肠杆菌脂肪酸合成能力,并在添加适宜底物苹果酸(15mmol/L)时,胞内总酯含量比受体菌提高了4倍,约197.74mg/g,产率为1.89%。本研究为脂肪酸生产提供了优良菌株,具有一定的应用开发前景。

关键词:大肠杆菌,苹果酸酶,脂肪酸

Effect of overexpression of malic enzyme on fatty acid production of *Escherichia coli*

MENG Xin, SHANG Hong-li, ZHENG Yi

(College of Food Science and Engineering, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract:In order to investigate the impact of malic enzyme on the capacity of fatty acid synthesis about prokaryotes, the MaeB gene encoding NADP ME was amplified from *E. coli* K-12 genome by PCR and inserted in the vector pET30a-T to build recombinant plasmid pMX20. Malic enzyme was overproduced by *E. coli* BL21(DE3) harboring pMX20 under the condition of IPTG induction. The results of fermentation indicated that overexpression of malic enzyme in *E. coli* would have influence on the capacity of fatty acid synthesis, and meanwhile, the total lipids in recombinant cell was 4 times to *E. coli* BL21(DE3) under the condition of adding appropriate substrate of malic acid (about 197.74mg/g), and the yield was 1.89%. These results also showed that the recombinant strain MX20 was useful and had certain development prospects which would provide an excellent strain for fatty acid production.

Key words:*E. coli*; malic enzyme; fatty acid

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)12-0207-04

苹果酸酶(malic enzyme, ME)普遍存在于各种生物体中,是一种对细胞生长、有机酸代谢^[1]和脂肪酸合成^[2]等途径有重要作用的关键酶。按照辅酶专一性和对底物的选择性不同,苹果酸酶分为3种类型:第1类是NAD依赖型ME(NAD-ME)(EC1.1.1.38),具有催化草酰乙酸脱羧的能力;第2类ME(NADP-ME)(EC1.1.1.39),能同时利用NAD和NADP,但利用NAD时活性更高,不能催化草酰乙酸脱羧;第3类是NADP依赖型ME(EC1.1.1.40),也具有催化草酰乙酸脱羧的能力。苹果酸酶的催化产物参与机体多种生物反应过程,例如,调节机体不同组织和亚细胞定位的代谢途径,NADPH的主要来源及组织快速繁殖时线粒体能量的供给等^[3],尤其是在产油微生物油脂合成与积累中发挥着重要的调节作用^[4-5]。对苹果酸酶的生

化特性、空间结构特点、催化机理等分子生物学方面的研究,已成为近年来国内外专家学者探索的焦点^[6-7]。ME是调控苹果酸代谢的关键酶,催化苹果酸

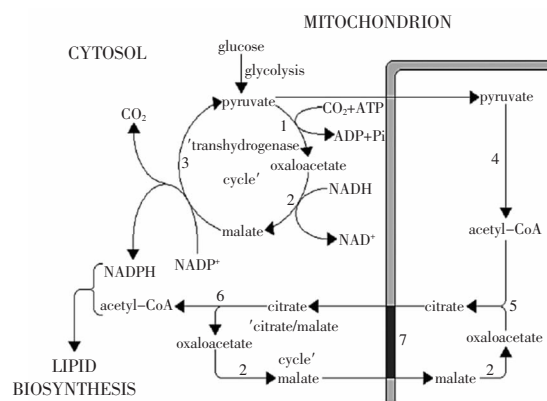


图1 油脂积累机制

Fig.1 Lipid accumulation mechanism in oleaginous microorganism

收稿日期: 2012-12-19

作者简介: 孟鑫(1981-), 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物化学。

基金项目: 辽宁医学院博士科研启动基金项目资助(Y2011B10)。

氧化脱羧的可逆反应,产生丙酮酸和CO₂,以及伴随NAD(P)的还原反应。催化的反应如下:



目前,已从多种产油微生物中克隆了苹果酸酶基因,证明了该酶在油脂积累过程中的关键作用。在产油微生物油脂合成过程中,通过人工调控苹果酸酶来调控碳流,提高苹果酸酶活性,为脂肪酸合成提供充足的还原力NADPH,从而调控油脂积累的增加。已有报道克隆毛霉菌*Mucor circinelloides*苹果酸酶基因后,细胞内总脂含量提高了2.5倍^[8]。然而,ME对原核生物脂肪酸合成能力的研究尚处于探索阶段。大肠杆菌包含2种ME: NADP-ME (MaeB)和NAD-ME (SfcA)。酶动力学研究表明: MaeB以NADP为辅酶的催化活性是SfcA以NAD为辅酶的催化能力的5倍多。为此,本研究通过更系统、更广泛地研究大肠杆菌苹果酸酶的亚型NADP-ME (MaeB),并将其在*E. coli*中大量表达,探索苹果酸酶对原核生物油脂合成及积累的调控规律,以期提高工程菌油脂产量,降低油脂合成成本,进而实现产业化。产油微生物油脂积累机制如图1所示^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli* K-12) 购自ATCC,用于扩增苹果酸酶NADP ME基因;原核表达载体pET30a-T 购自Novagen,用于重组质粒构建;宿主菌株*E. coli* BL21 (DE3) 由本实验室保藏;PCR扩增使用的Taq DNA polymerase, T₄ DNA连接酶, dNTP,感受态细胞制备试剂盒 Takara公司;限制性内切酶及胶回收试剂盒 Fermentas公司;溶菌酶、Tris饱和酚、RNaseA、Agarose Biowest分装产品;异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG) AMERSCO公司产品;胰蛋白胨Trypton和酵母抽提物Yeast Extract Oxoid公司产品;游离脂肪酸测定试剂盒 北京普利莱基因技术有限公司;三氟化硼-乙醚 Alfa公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基及培养条件 LB培养基和M9基本培养基,参考文献[10]:将-80℃甘油保存的大肠杆菌*Escherichia coli* K-12接种于LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜,用于提取基因组DNA。

1.2.2 苹果酸酶基因的克隆及表达载体构建 用试剂盒提取*E. coli* K-12基因组DNA。根据GeneBank中公布的*E. coli*苹果酸酶基因的全长序列,设计一对PCR引物,上游引物ME-F: CATGCCATGGCTGATGACAGTTAAAACAAAG,下游引物: ME-R: ACGCGTCGACTTACAGCGGTTGGTTTGC(下划线为酶切位点)。PCR反应条件为:94℃预变性3min,94℃变性30s,62℃退火30s,72℃延伸2.5min,35个循环。PCR反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,测定DNA浓度。PCR产物用Fermentas凝胶回收试剂盒纯化后,经NcoI和SalI酶切后与被相同酶切的表达载体pET30a片段连接,构建表达载体。CaCl₂法转化至*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞中,涂布卡那平板。挑取抗性克隆,提质粒经双酶切和PCR鉴定,筛选阳性克隆,

并送北京华大基因公司测序。

1.2.3 重组酶的诱导表达 按1%的接种量将重组菌株和含有pET30a(+)空质粒的*E. coli* BL21 (DE3)菌株(作对照)分别接种至含50mL50μg/mL Kan的LB液体培养液中,37℃,180r/min振荡培养至OD₆₀₀约为0.6~0.8,加入IPTG至终浓度0.1mmol/L,30℃诱导表达8~12h,4℃下,12000r/min离心10min收集菌体,超声波破壁上清液即为粗酶液,进行酶活分析和SDS-PAGE蛋白电泳检测。

1.2.4 重组酶活性测定^[11] 配制最适反应体系:50mmol/L Tris-HCl,10mmol/L MgCl₂,10mmol/L L-malate,0.5mmol/L NADP⁺。加入酶液混匀后迅速在340nm下比色测定,连续监测1min内OD值的变化。酶活力单位定义为:每分钟催化产生1μmol NADH所需的酶量。

1.2.5 代谢产物分析 将重组菌MX20接种至M9基本培养基中,37℃摇瓶发酵,至OD₆₀₀约为0.6时,加入IPTG至终浓度为0.1mmol/L,同时,在发酵液中添加不同浓度的苹果酸钠(0~40mmol/L),30℃诱导12h后,12000r/min离心收集菌体细胞,并用pH7.8磷酸缓冲液清洗细胞。测定总脂含量及葡萄糖含量的变化,考察不同底物浓度条件下,过量表达苹果酸酶对重组菌总脂合成能力的影响。

总脂含量用游离脂肪酸试剂盒测定。离心收集50mL发酵液,收集菌体沉淀,加入5mL提取剂(氯仿:甲醇=2:1),超声波破壁(工作5s,间隔5s,共5min)破碎细胞,并在小型涡旋振荡器上充分振荡混匀,12000r/min离心10min,取上清,挥发除去有机溶剂(通N₂保护),残留的微量黄色液体即为提取到的粗油脂。将提取到的粗油脂直接加入5mL皂化试剂(甲醇:水=4:1,含6% NaOH),60℃水浴皂化反应1h,4000r/min离心5min,取10μL上清液测定游离脂肪酸含量,进而反映细胞内总脂的变化情况。

葡萄糖含量用生物传感仪测定,总脂含量测定方法见生物量的测定600nm下的吸光度值(OD₆₀₀)。

2 结果与分析

2.1 苹果酸酶基因的克隆

如图2(a)所示,从*E. coli* K12中扩增得到MaeB

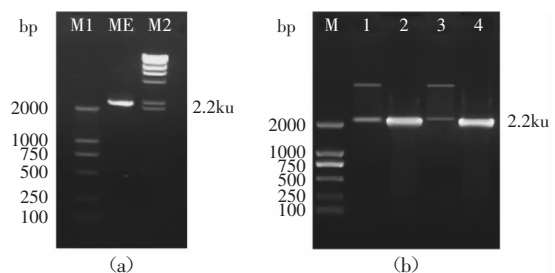


图2 ME基因的PCR扩增及重组质粒pMX20酶切、PCR鉴定

Fig.2 PCR amplification of NADP-ME from *E. coli* and identification of recombinant plasmid pMX20 by double digestion and PCR amplification

注:(a)基因的PCR扩增:M1:DNA marker DL 2000;M2:λDNA;(b)酶切鉴定、PCR鉴定:M:DNA marker DL 2000;1,3:重组质粒pMX20双酶切鉴定;2,4:重组质粒pMX20 PCR鉴定。

基因片段,扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,得到清晰的单一目的条带,大小为2.2ku,并经测序进一步验证,与预期结果完全一致。PCR鉴定和双酶切鉴定结果完全一致,得到单一目的条带,说明已成功构建重组质粒pMX20(图2(b))。随机挑取2~4个阳性重组菌MX20测序,结果表明,目的片段成功插入到表达载体的相应位点上,且构建过程中未发生突变。

2.2 蛋白诱导表达

将重组质粒pMX20转化至*E.coli* BL21(DE3)中,SDS-PAGE检测结果表明,MaeB基因在*E.coli*中均能正常表达,蛋白约为85000U,与预期结果一致,结果如图3。IPTG的使用量一般控制在0.01~1mmol/L,而诱导温度越低越有利于重组蛋白表达,但温度过低不利于菌体生长。综合以上因素,本研究选择0.1mmol/L IPTG,30℃进行诱导表达,重组蛋白表达量较高。

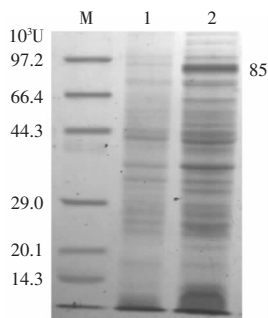


图3 苹果酸酶在大肠杆菌中诱导表达

Fig.3 Expression of NADP ME proteins in recombinant *E. coli*
注: M: 蛋白分子量标准; 1: 空白对照; 2: 0.1mmol/L IPTG诱导。

2.3 酶活力测定

按照上述建立的苹果酸酶测定体系,配制反应混合物,加入粗酶液后测得340nm下吸光度,同时通过考马斯亮蓝G250法测定蛋白含量,重组菌MX20中苹果酸酶的粗酶液酶活力为40.79U/mg,酶活力扫描光谱如图4所示,表明重组酶具有一定的生物催化活性。

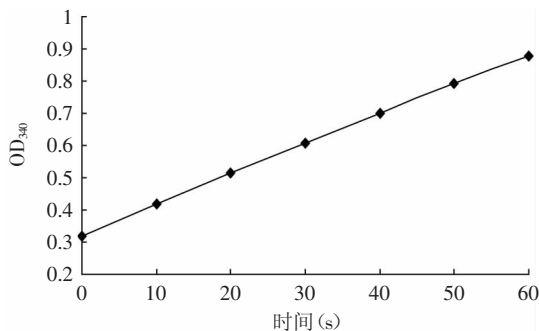


图4 苹果酸酶活力曲线

Fig.4 The curve of NADP ME activity

2.4 发酵及代谢产物分析

在上述成功表达的基础上,为验证MaeB基因对*E.coli*总脂变化的影响,将重组菌MX20接种至M9基本培养基中,测定细胞内总脂变化情况。结果表明:

与原始菌株*E.coli* BL21 (DE3)相比,重组菌MX20胞内总脂变化不大,胞内总脂约为70mg/L。

苹果酸酶在真核生物脂肪酸合成与积累过程中的作用已有深入研究,为脂肪酸合成提供充足的还原力NADPH,是脂肪酸积累的关键调控酶之一。而苹果酸酶在原核生物脂肪酸合成和积累中的功能却鲜有报道。研究报道,微生物脂肪酸合成需要脂肪酸合成酶,而脂肪酶合成似乎只能利用有苹果酸酶催化产生的NADPH。苹果酸是苹果酸酶催化脱羧反应的重要底物,当底物充足时,酶有足够的底物进行催化,产生还原力NADPH,而当底物不足时,会严重影响酶功能的发挥。本实验虽然在*E.coli*中过量表达苹果酸酶基因,但发酵结果表明,重组菌脂肪酸含量提高不明显,推测可能由于底物不足,限制了苹果酸酶功能的发挥。因此,为了证明这一推断,在重组菌MX20诱导表达同时加入苹果酸钠至终浓度为5mmol/L(原始菌株为空白对照),以期反应提供充足的底物原料,促进苹果酸酶功能的发挥。结果表明,30℃诱导12h后,重组菌MX20胞内总脂约为115mg/L,而在原始菌株中添加底物苹果酸对胞内总脂影响却不大,胞内总脂含量仅为60mg/L。这一结论充分证明了底物苹果酸的添加,对重组菌中苹果酸酶基因功能的发挥起到至关重要的作用。

为进一步验证底物苹果酸的最适浓度,重组菌MX20在37℃摇瓶培养,培养至饱和加入IPTG至终浓度为0.1mmol/L,同时,加入不同浓度的苹果酸钠(0~40mmol/L),30℃诱导16h后,测定重组菌总脂含量,考察不同底物浓度对胞内总脂产量和产率的影响。摇瓶发酵结果如图5所示,当苹果酸浓度为15mmol/L时,重组菌胞内总脂含量最高,约为169.67mg/g,产率1.69%;当苹果酸浓度大于15mmol/L时,胞内总脂含量并没有随着底物浓度的增加而增加,因此确定最佳底物浓度为15mmol/L。

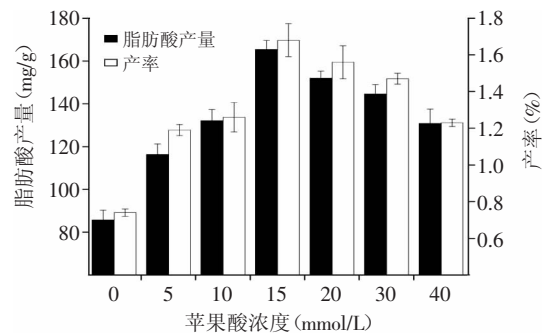


图5 不同底物浓度对脂肪酸产量的影响

Fig.5 Fatty acid production under various concentrations of malate

注:所有实验重复3次以上,误差小于10%。

鉴于在重组菌MX20中添加苹果酸钠能够提高胞内总脂含量,为验证这一结论,在重组菌中添加终浓度为15mmol/L苹果酸钠,摇瓶发酵,考察发酵0~30h重组菌总脂含量的变化情况。结果表明,当诱导

(下转第228页)

2001,56(9):683-687.

[7] Kim D H, Song M J, Bae E A, *et al.* Inhibitory effects of herbal medicines on rotavirus infectivity[J]. *Biological and Pharmaceutical*, 2000, 23: 356-360.

[8] Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats [J]. *Journal of nutritional science and Vitaminology*, 2008, 54(1): 95-98.

[9] Ohtsuki K, Abe A, Mitsuzumi H, *et al.* Glucosyl hesperidin improves serum cholesterol composition and inhibits hypertrophy in vasculature[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2003, 49(6): 447-450.

[10] 何健, 夏凡. 亚临界水萃取技术在食品工业中的应用[J].

江西食品工业, 2010(1): 45-47.

[11] 袁金斌, 周志炎. HPLC测定陈皮提取物及制剂中橙皮苷的含量[J]. *中成药*, 2006, 28(3): 455-456.

[12] 齐兵, 何志勇, 秦彤, 等. 陈皮中橙皮苷的提取与纯化工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 343-346.

[13] Shalmashi A, Abedi M, Golmohammad F, *et al.* Isolation of caffeine from tea waste using subcritical water extraction [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2010, 33(4): 701-711.

[14] Masahiro Tanaka, Arata Takamizu, Munehiro Hoshino, *et al.* Extraction of dietary fiber from Citrus junos peel with subcritical water[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2012, 90(2): 180-186.

[15] 吴仁铭. 亚临界水萃取在分析化学中的应用[J]. *化学进展*, 2002, 14(1): 32-36.

(上接第209页)

30h后, 胞内总酯含量约197.74mg/g(胞内总酯含量约为对照菌株的4倍), 产率为1.89%。这一结果进一步证明了在*E.coli*中表达内源苹果酸酶后, 在添加适宜底物浓度后, 对*E.coli*脂肪酸积累有一定的促进作用, 提高了*E.coli*脂肪酸合成能力。

3 结论与讨论

苹果酸酶作为生物体中枢代谢途径的关键酶, 已应用于厌氧混合酸的发酵工程及酿酒工业。目前对该基因的分子生物学研究主要集中在植物抗性、防卫反应和果实成熟等方面。不同来源的ME具有相似的四级结构, 说明它们可能具有相似的催化和调节机制。深入了解苹果酸酶的生理生化特性、结构及功能、催化机制, 将为探讨生物体中苹果酸代谢以及与辅酶再生的研究奠定理论基础。

随着现代分子生物学和工业生物技术的发展, 对产油微生物菌种筛选、改良、代谢调控和发酵工程的研究日趋深入。与天然菌株相比, 工程大肠杆菌具有遗传背景清楚, 易于工程调控, 可高密度发酵等诸多优点, 已经成为微生物催化合成化学品和燃料的理想受体菌。具有酵母、霉菌等不可替代的优势, 已成功用于生物乙醇和生物丁醇等大宗化学品的生产。基于苹果酸酶对微生物油脂积累的重要调控作用, 如果能鉴定和分离微生物的苹果酸酶基因, 利用基因工程手段选择性增加或降低苹果酸酶的活性, 将有利于定向获得功能性油脂及次生代谢产物。

本研究通过更系统、更广泛地代谢工程手段研究苹果酸酶的亚型及其基因, 定向调控工程大肠杆菌脂肪酸合成能力。结果表明, 在*E.coli*中过量表达MaeB基因, 胞内总酯含量为原始菌株的4倍, 约197.74mg/g。本研究通过对大肠杆菌脂肪酸合成能力的探索, 将可以实现对原核生物中油脂代谢及生长的调控, 从而提高油脂产量, 降低油脂合成成本, 是获得优质、低成本油脂生产原料的有效手段, 具有重要的经济价值和社会效益。目前, 本课题组正通过调控大肠杆菌脂肪酸胞外分泌相关基因, 以期获得胞

外游离脂肪酸, 减少油脂分离、纯化等复杂的工艺流程, 并有望实现工业化。

参考文献

- [1] 姜岷, 谢鑫, 许琳, 等. 过量表达苹果酸酶对*E.coli* FMJ39厌氧混合酸发酵的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(1): 69-74.
- [2] 程万, 林辉, 赵宇华, 等. 苹果酸酶调控微生物油脂积累的研究进展[J]. *科技通报*, 2010, 26(6): 853-857.
- [3] Dolezal P, Vanacova S. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins[J]. *Gene*, 2004, 329: 81-92.
- [4] Wynn JP, Ratledge C. Malic enzyme is a major source of NADPH for lipids accumulation by *Aspergillus nidulans* [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 253-257.
- [5] Li Z, Sun H, Mo X. Overexpression of malic enzyme (ME) of *Mucor circinelloides* improved lipid accumulation in engineered *Rhodotorula glutinis* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, doi: 10.1007/s00253-012-4571-5.
- [6] Zhang Y, Ratledge C. Multiple isoforms of malic enzyme in the oleaginous fungus, *Mortierella alpina* [J]. *Mycol Research*, 2008, 112: 725-730.
- [7] 王金霞, 谭海东, 赵宗保. 大肠杆菌K12苹果酸酶的克隆、表达与纯化[J]. *生物加工过程*, 2006(4): 35-38.
- [8] Zhang Y, Adams LP, Ratledge C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation [J]. *Microbiology*, 2007, 153: 2013-2025.
- [9] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production [J]. *Biochimie*, 2004, 86: 807-815.
- [10] Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP. Mutants of *E. coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase [J]. *J Bacteriology*, 1989, 171(1): 342-348.
- [11] Hsu RY, Lardy HA. Malic enzyme [J]. *Methods Enzymol*, 1969(13): 230-235.