

刘曹彤,陆依琳,徐 慧,等. *Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶与烯醇化酶研究[J]. 江苏农业科学,2021,49(12):45-50.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.12.006

# *Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶与烯醇化酶研究

刘曹彤,陆依琳,徐 慧,彭 学

(江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116)

**摘要:**对羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoate,4HBA)应用广泛,在工业领域上被当作前体合成各种芳香族化合物,其中包括液晶材料、农药等;在食品和化妆品等领域上被当作防腐剂。微泡菌属(*Microbulbifer* sp.) A4B-17 是一种能将葡萄糖合成 4HBA 的海洋细菌,为了提高 4HBA 的合成效率对合成莽草酸途径前体的 2 个关键酶:GM004356 编码的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEPCK)和 GM0031333 编码的烯醇化酶(Enolase)进行研究。通过构建蛋白系统进化树发现,PEPCK 与 *Microbulbifer* sp. GL-2 的 PEPCK 相似度为 95.15%,Enolase 与 *Microbulbifer variabilis* 的 Enolase 相似度为 98.13%。利用低温表达载体在大肠杆菌中对 2 个酶进行高效表达,提取和纯化后,采用 BCA 法蛋白定量计算后得到纯化后的 PEPCK 和 Enolase 分别占各自粗酶液的 1.304% 和 1.123%。酶活采用 PK/LDH(丙酮酸激酶/乳酸脱氢酶)偶联检测法检测 NADPH 的减少量。根据米氏常数双倒数法求得 PEPCK 和 Enolase 的  $K_m$  值分别为 0.041 mmol/L 和 0.056 mmol/L,PEPCK 反应的最适温度为 30 ℃,最适 pH 值为 7,Enolase 的最适温度为 30 ℃,最适 pH 值为 7。以上结果为高效生产 4HBA 提供了理论依据。

**关键词:**对羟基苯甲酸;磷酸烯醇式丙酮酸;烯醇化酶;磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶

**中图分类号:**S188<sup>+</sup>.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)12-0045-06

对羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoate,4HBA)及其酯类物质,不仅能抑制真菌和细菌的生长,还能调节一些酶的代谢,应用非常广泛<sup>[1]</sup>,覆盖了衣食住行各个方面,比如用于食品与化妆品的防腐剂、农业中的杀菌剂与化肥、手机电脑等的液晶制品等方面<sup>[2-6]</sup>。4HBA 的毒性较低,抑菌效果也好,所以在 2002 年,对羟基苯甲酸酯类物质已经被我国批准作为食品防腐剂添加使用<sup>[7]</sup>。

目前大部分 4HBA 通过石油分馏<sup>[8]</sup>得到,也有报道利用植物<sup>[9]</sup>或者重组大肠杆菌<sup>[10]</sup>合成 4HBA,但是这些方法存在很多的缺陷,植物合成得到的 4HBA 提纯难度大<sup>[11]</sup>。微泡菌属(*Microbulbifer* sp.) A4B-17 菌株是能将葡萄糖合成 4HBA 及其酯类的海洋细菌,笔者所在课题组已经完成了 A4B-17 菌株的基因组测序和注释<sup>[12]</sup>。合成 4HBA 的途径有 2

条:葡萄糖降解途径和莽草酸途径,在后者途径中磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和 4-磷酸赤藓糖缩合反应生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合成酶(DAHP),PEP 的合成量较低成为莽草酸途径的限速步骤。A4B-17 菌株合成 PEP 的途径有 2 条:2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡糖酸途径(ED 途径)和糖酵解途径(EMP 途径)。在 ED 途径中,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)将草酰乙酸(OAA)脱羧生成 PEP;在 EMP 途径中烯醇化酶(Enolase)将 2-磷酸甘油酸(OAA)脱水生成 PEP。EMP 途径和 ED 途径<sup>[13]</sup>的共同点是将合成 PEP 作为通路的最后一步反应。同时在之后的合成途径中,PEP 作为起始物质,4HBA 及其酯类合成多少完全取决于它的积累量<sup>[14]</sup>。可以说要想大量合成 4HBA 及其酯类,就需要大量合成 PEP。A4B-17 菌株的 PEPCK 和 Enolase 这 2 个酶分别由编号为 GM004356 和 GM001333 的基因编码,而且在该细菌体内,有且只有这 2 种酶能够合成 PEP,因此对这 2 个基因编码的蛋白酶的研究是非常有必要的。对这 2 个酶的研究不仅能了解它们的理化性质,还能够为提高 PEP 的产量提供理论基础,从而提高 4HBA 的产量打下基础<sup>[15]</sup>。

收稿日期:2020-11-04

基金项目:江苏师范大学科研创新计划校立项目(编号:2020XKT485)。

作者简介:刘曹彤(1996—),女,江苏淮安人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail:3220859786@qq.com。

通信作者:彭学,博士,教授,主要从事环境微生物学研究。E-mail:pengxue@jsnu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试验材料

*Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株(由笔者所在课题组从海水中分离得到,并保存于江苏师范大学生命科学学院);大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (笔者所在实验室长期保存于-80℃超低温冰箱中);pET-21a(+ )载体(购买自武汉淼灵生物科技有限公司)。

1.2 试验试剂

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase,5 $\times$  Q5 High GC Enhancer(optional),5 $\times$  Q5 Reaction Buffer,dNTP Mix, dd Water, LB 肉汤,100 mg/mL Ampicillin (Amp)母液,50 $\times$  TAE Buffer(pH 值 8.5),1% 琼脂糖凝胶,DNA marker,DNA loading buffer,GoldView 核酸染料,质粒提取相关试剂<sup>[16]</sup>,磷酸缓冲液 PBS 母液(0.2 mol/L),0.1 mol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代

半乳糖苷(IPTG),30% (质量浓度)丙烯酰胺溶液(Acr-Bis),10% (质量浓度)过硫酸铵,5 $\times$  Tris-Glycine Buffer(电泳缓冲液),1 mol/L Tris-HCl(pH 值为 6.8),1.5 mol/L Tris-HCl(pH 值为 8.8),10% SDS 考马斯亮蓝 R-250 染色液,考马斯亮蓝脱色液,5 $\times$  SDS-PAGE loading Buffer, $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME),蛋白纯化试剂盒等。

1.3 GM004356 和 GM001333 编码基因的克隆与鉴定

1.3.1 目的片段的扩增 首先分别设计 GM004356 和 GM001333 这 2 个目的基因的引物,引物设计见表 1,引物序列交由上海捷瑞生物工程有限公司合成。设计 PCR 反应体系,加入 PCR 管中,混匀,放入 PCR 仪,设置好反应条件,运行程序。35 次循环。

表 1 GM004356 和 GM001333 引物设计

名称	序列(5'→3')	$T_m$ (℃)
GM004356F	CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCACAGATCGACGACTC	75.8
GM001333R	GCAAGCTTGTCGACGGAGCTCTTAGGCTTTAGGGCCTGCAT	75.5
GM001333F	CAAATGGGTCGCGGATCCATGAGCAAGATTGTCGCT	68.0
GM001333R	GTGCTGGTGGTCTCGAGCTTGAATTCAGCACG	68.0

1.3.2 载体酶切 选择 pET-21a(+ )载体,大小为 5 443 bp,酶切位点为 *Bam*H I 和 *Xho* I,采用双酶切,载体酶切后,需要将目的基因与载体进行连接,形成重组质粒。选择的酶连试剂盒为 Ready-to-Use Seamless Cloning Kit。总反应体系为 50  $\mu$ L,混合均匀后于 37℃水浴 5 min。

1.3.3 阳性转化子质粒提取 将重组质粒转入大肠杆菌,培养结束后,挑取部分单菌落进行液体培养,然后利用十二烷基硫酸钠(SDS)碱裂法提取质粒。

1.3.4 阳性转化子酶切鉴定 将酶切体系加到 PCR 管中,混合均匀,放入 37℃水浴锅中孵育 5~10 min,然后琼脂糖凝胶电泳验证结果。

1.4 PEPCK 和 Enolase 的表达与酶活探究

1.4.1 粗酶提取 将活化好的菌落接入含氨苄青霉素(Amp)的 LB 三角瓶中,37℃,180 r/min,培养至吸光度为 0.4~0.6,再加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)低温低速诱导培养 12~24 h,使目的蛋白充分表达。将培养好的菌液 5 000 r/min,低

温离心 10 min,弃上清,用 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液(磷酸缓冲盐溶液)重悬细胞,再离心,再重悬,用超声波破碎仪破碎细胞,4℃离心,上清即为粗酶混合液。

1.4.2 蛋白纯化 提取出的粗酶中,绝大部分是不需要的杂蛋白,想要研究目的蛋白的性质,需要将目的蛋白提取出来,选择蛋白纯化试剂盒进行纯化。为了给后续试验提供一个定量结果,需要计算出粗酶中 PEPCK 和 Enolase 的含量。采用 BCA(聚氰基丙烯酸正丁酯)蛋白定量法,根据吸光度与蛋白浓度成正比,绘制蛋白浓度标准曲线,从而能够计算出目的蛋白占粗酶的百分比。

1.4.3 PEPCK 和 Enolase 酶活检测方法 PEPCK 和 Enolase 酶活检测方法采用 PK(丙酮酸激酶)/LDH(乳酸脱氢酶)偶联检测法,即将不方便检测的磷酸烯醇式丙酮酸,经 PK 和 LDH 催化后,生成丙酮酸,然后与还原型辅酶 II(NADPH)反应生成 NADP<sup>+</sup>,而 NADPH 容易被检测,NADPH 浓度的减少量与 PEPCK 和 Enolase 的活性成正相关,通过测

定在 340 nm 处 NADPH 吸光度的减少,来反映酶的活性。

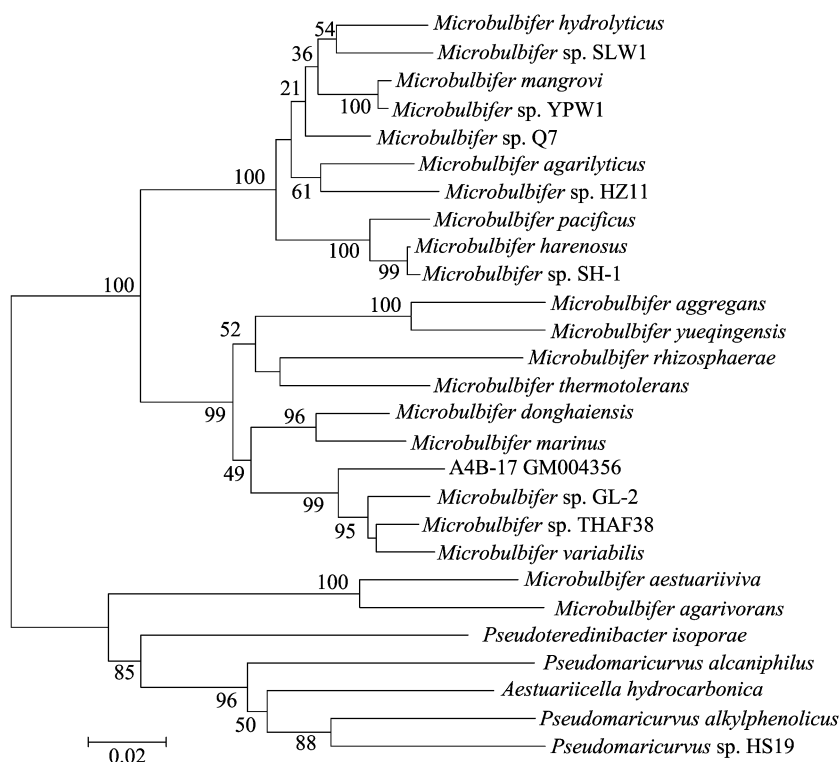
根据 PK/LDH 偶联检测法探究 2 个酶的最适温度和最适 pH 值。研究 PEPCK 的最适温度,要控制 pH 值、反应时间、调控剂不变。设置不同反应温度,固定 pH 值不变;研究 PEPCK 最适 pH 值时,要控制温度、反应时间、调控剂不变,各反应成分与研究最适温度时一致,只是改变缓冲液的 pH 值不同。用同样的方法来探究 Enolase 的最适温度和最适 pH 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 系统进化树分析

在 *Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株中找到编号

为 GM004356 和 GM001333 的全部碱基序列,经 NCBI 数据库比对分析,确定这 2 个基因分别编码 PEPCK 和 Enolase。GM004356 编码的 PEPCK 与 *Microbulbifer* sp. GL-2、*Microbulbifer* sp. THAF38 和 *Microbulbifer variabilis* 编码的 PEPCK 相似度较高,相似度都为 95.15%,系统进化树见图 1。GL-2 菌株分离自硬骨鱼肠道中<sup>[17]</sup>,是一个新的降解纤维素的菌株。*Microbulbifer variabilis* 分离自太平洋海藻,能够产生抗癌吩嗪抗生素<sup>[18]</sup>。关于 THAF38 菌株还没有相关报道。GM001333 编码的 Enolase 与 *Microbulbifer variabilis* 和 *Microbulbifer* sp. THAF38 的 Enolase 相似度较高,相似度都为 98.13%,系统进化树见图 2。



*Microbulbifer hydrolyticus*—水解微泡菌; *Microbulbifer mangrove*—红球藻微泡菌; *Microbulbifer agarilyticus*—解琼脂微泡菌; *Microbulbifer pacificus*—太平洋微泡菌; *Microbulbifer harenosus*—鳞茎微泡菌; *Microbulbifer aggregans*—凝集微泡菌; *Microbulbifer yueqingensis*—乐清湾微泡菌; *Microbulbifer rhizosphaerae*—根瘤微泡菌; *Microbulbifer thermotolerans*—耐热微泡菌; *Microbulbifer donghaiensis*—东海微泡菌; *Microbulbifer marinus*—海微泡菌; *Microbulbifer variabilis*—可变微泡菌; *Simidiua agarivorans*—河口西米地亚菌; *Pseudoteredinibacter isopora*—异孢西米地亚菌; *Pseudomarcicurvus alcaniphilus*—嗜阿尔卡氏假单胞菌; *Aestuariicella hydrocarbonica*—水芹烃类菌; *Pseudomarcicurvus alkylphenolicus*—烷基酚假单胞菌; *Pseudomarcicurvus* sp. HS19—假单胞菌 HS19

图1 GM004356 系统进化树的构建

### 2.2 高效表达质粒的构建

2 个目的基因 GM004356 和 GM001333 分别进行 PCR,琼脂糖凝胶成像分析(图 3)。选用 pET-21a(+)载体,采用双酶切,与目的基因相连,构成重组质粒,导入大肠杆菌体内。通过验证,获得阳

性转化子,并测序,与原始目的基因比对,发现重组质粒中的目的基因未发生突变或缺失,与原始基因完全一致,可以利用该菌落进行后续蛋白研究。

### 2.3 蛋白质的提取和纯化

低温低速诱导目的蛋白表达,提取粗酶,电泳

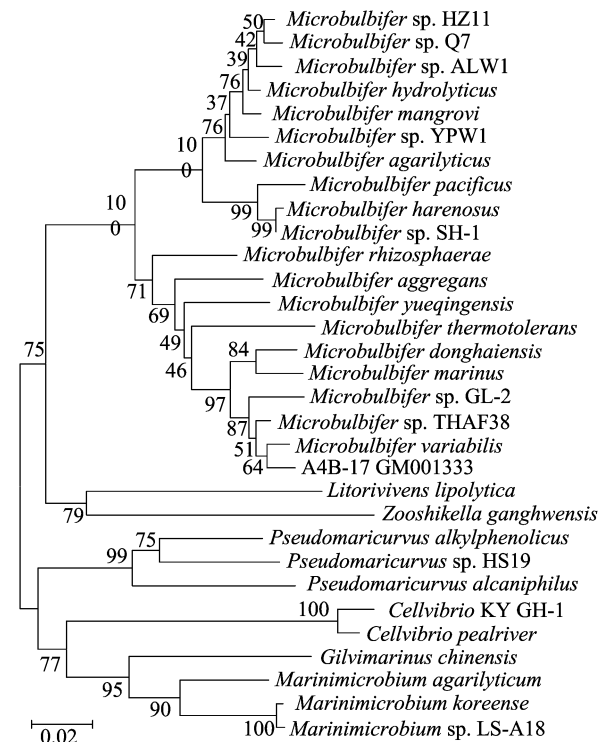


图2 GM001333系统进化树的构建

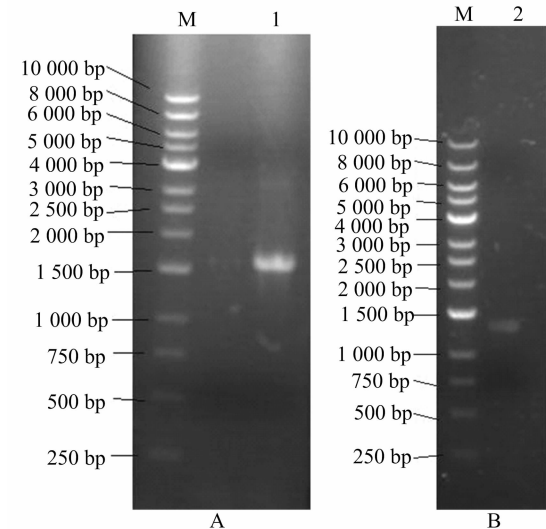
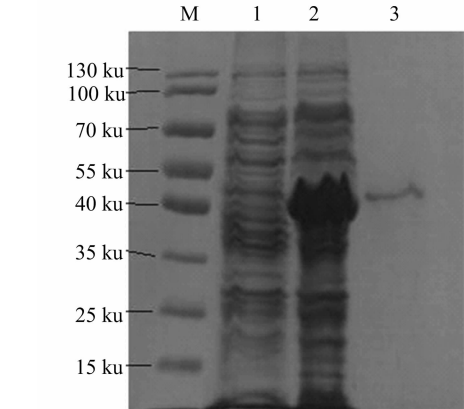
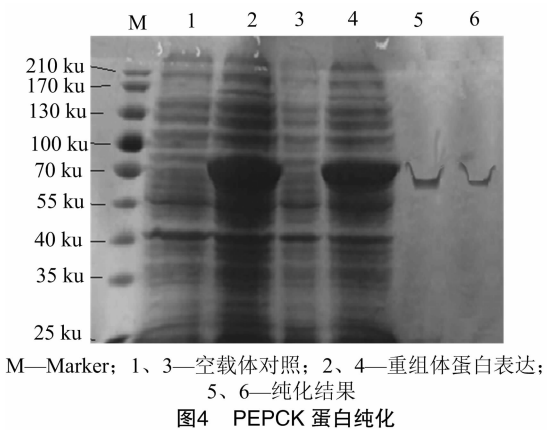


图3 GM004356(A)和 GM001333(B)PCR 扩增

初步判断转入大肠杆菌的目的基因成功表达,接着对粗酶进行纯化,电泳验证纯化结果,发现目的蛋白 PEPCK 和 Enolase 均能被纯化,且效果明显,可以进行后续的定性分析,具体结果见图 4 和图 5。

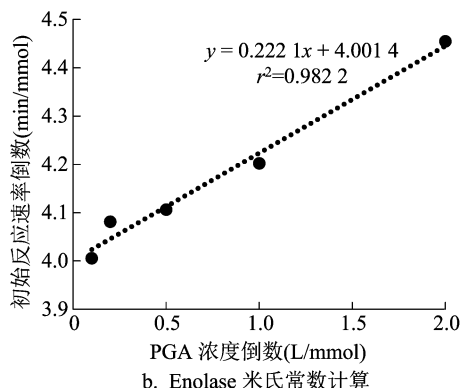
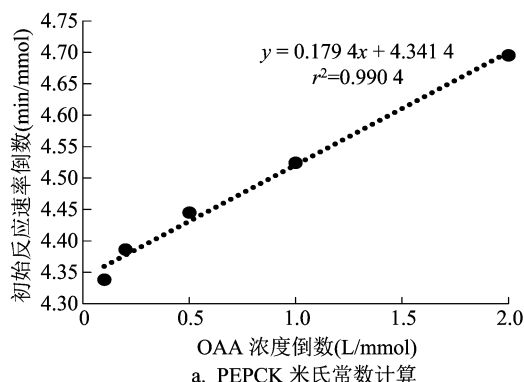
将粗酶液稀释 10 倍后用 BCA 法测得样品吸光度为 2.526 4,通过标准曲线,计算出粗酶液中蛋白



总浓度为 3.298 mg/mL。纯化之后目的蛋白 PEPCK 吸光度为 0.337,根据标准曲线,计算出纯化后的 PEPCK 浓度为 0.043 mg/mL,占粗酶液的 1.304%。同样的方法,得到 Enolase 占粗酶液的 1.123%。

#### 2.4 PEPCK 和 Enolase 米氏常数的研究

米氏常数( $K_m$ )定义为当酶促反应达最大速度( $v_m$ )一半时底物(S)的浓度。对  $K_m$  的研究,能揭示其在参加反应时的重要性质,为该酶应用到工业生产中提供重要的理论依据。根据米氏常数双倒数求法的计算公式: $1/v = K_m/(v_{max}[S]) + 1/v_{max}$ ,可以看成  $y = ax + b$  的形式,需要做出初始反应速率的倒数,以及反应底物浓度的倒数,设定反应时间为 2 min,底物浓度足够大。因为当  $y = 0$  时,横截距即为  $-1/K_m$ ,得到 PEPCK 的  $K_m$  值为 0.041 mmol/L,如图 6 - A 所示。Enolase 的  $K_m$  值为 0.056 mmol/L,如图 6 - B 所示。2 个  $K_m$  值都较低,说明 PEPCK 与 OAA,Enolase 与底物 2 - 磷酸甘油 (PGA) 的酶促反应很容易进行,从而转化生产磷酸烯醇式丙酮酸

图6 米氏常数( $K_m$ )计算

(PEP), 因此更有利于重要中间产物 PEP 在菌体中的积累。

## 2.5 最适温度和最适 pH 值

探究 PEPCCK 的最适温度, 设置不同反应温度, 固定 pH 值保持不变, 反应结束后测定 NADPH 的吸光度, 结果见图 7, 发现在 30 ℃ 左右时, PEPCCK 活性最高。探究最适 pH 值时, 设置不同 pH 值, 保持温度为 30 ℃, 发现 pH 值为 7 时酶活最高 (图 8)。

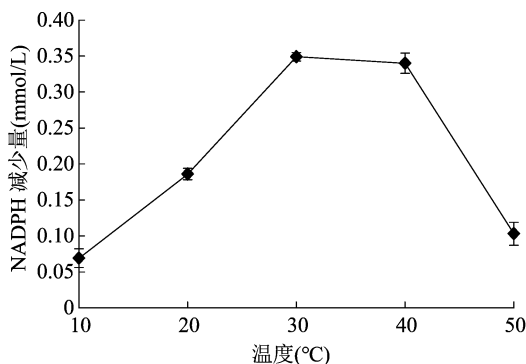


图9 不同温度下 NADPH 消耗量

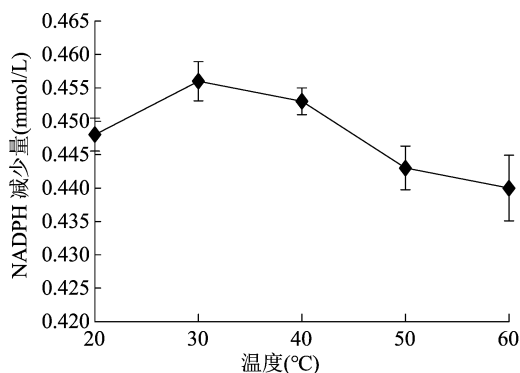


图7 不同温度下 NADPH 消耗量

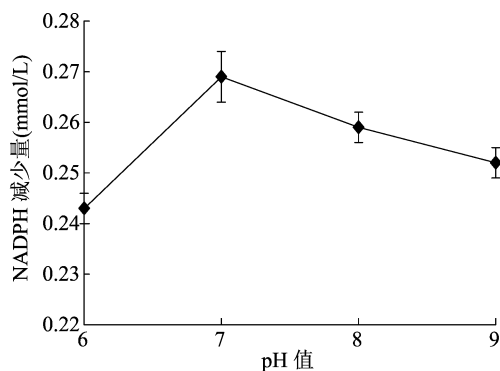


图10 不同 pH 值下 NADPH 消耗量

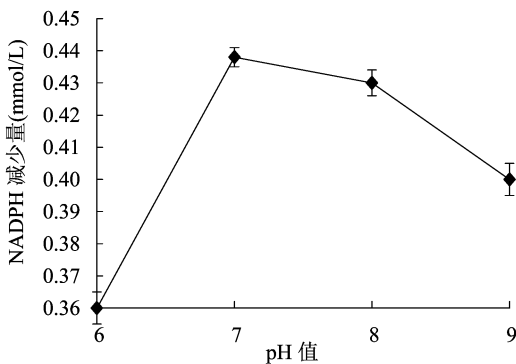


图8 不同 pH 值下 NADPH 消耗量

同样的方法, 分别设置 Enolase 的反应温度和缓冲液 pH 值, 发现 Enolase 的最适反应温度为 30 ℃, 最适 pH 值为 7, 结果如图 9 和图 10 所示。

## 3 讨论与结论

*Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株的特点是本身就可以合成对羟基苯甲酸及其酯类, 而且产量较高, 不会产生对人体有毒有害的物质。本研究对细菌细胞内编号为 GM004356 和 GM001333 的 2 个目的基因进行转化克隆, 高效表达 PEPCCK 和 Enolase, 通过提取纯化计算出纯化之后目的蛋白 PEPCCK 占粗酶液的 1.304%, 纯化后的 Enolase 占粗酶液的 1.123%。PEPCCK 酶反应的最适温度为 30 ℃。最适 pH 值为 7; Enolase 的最适温度为 30 ℃, 最适 pH 值为 7。PEPCCK 和 Enolase 的米氏常数分别是

0.041、0.056 mmol/L, 较低的  $K_m$  值更有利于酶促反应的快速进行。通过蛋白系统进化树分析, PEPCK 与 *Microbulbifer* sp. GL-2 的 PEPCK 相似度为 95.15%; Enolase 与 *Microbulbifer variabilis* 的 Enolase 相似度为 98.13%。本研究对 PEPCK 和 Enolase 2 种酶进行深入研究, 为将来 2 个酶的优化研究建立标准。笔者所在课题组期望通过对该菌株的深入研究, 改变传统的生产方式, 利用可再生资源合成 4HBA 等工业原料。

本试验所采用的酶活性研究方法均为 PK/LDH 酶偶联法, 该方法虽操作简单, 思路清晰, 但是在偶联法中, PK 以及 LDH 的活性会对整个试验结果产生较大影响, 而且最终得到的米氏常数其实是目的蛋白酶与 PK、LDH 共同作用的结果。目前对 PEP 的检测暂无有效可行的方法, 开辟一种新的检测方法还需要大量工作, 后续可以在本研究的基础上进行拓展研究。

#### 参考文献:

- [1] 郭阳, 臧埔, 郜玉, 等. 化妆品防腐剂的使用现状及进展[J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1258-1263.
- [2] 石金娥, 刘静秋, 尚淑霞, 等. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂在酱油、食醋中应用状况分析[J]. 中国调味品, 2011, 36(7): 11-12.
- [3] 李欣航, 张金龙, 毕永贤, 等. 无尼泊金酯类化妆品防腐体系的应用研究[J]. 日用化学品科学, 2018, 41(8): 14-21.
- [4] 陈建文, 厉华明, 周荣荣. 食品中对羟基苯甲酸酯类的应用现状与检测方法[J]. 中国酿造, 2008(8): 4-5.
- [5] 胡梅. 化妆品防腐及防腐体系的构建[C]//第九届中国化妆品学术研讨会论文集. 北京: 品观网, 2012: 105-107.
- [6] 朱莉, 许超艳, 李晶晶, 等. 生物合成对羟基苯甲酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2015, 31(3): 328-337.
- [7] 林忠洋, 马万里, 齐迹, 等. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂的人体暴露[J]. 化学进展, 2015, 27(5): 614-622.
- [8] Okai N, Miyoshi T, Takeshima Y, et al. Production of protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing chorismate-pyruvate lyase from *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(1): 135-145.
- [9] 董秀梅, 晁青, 王柏臣. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 研究进展[J]. 植物学报, 2013, 48(3): 320-328.
- [10] Zhang H R, Pereira B, Li Z J, et al. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(27): 8266-8271.
- [11] Sommer S, Heide L. Expression of bacterial chorismate pyruvate-lyase in tobacco: evidence for the presence of chorismate in the plant cytosol [J]. Plant & Cell Physiology, 1998, 39(11): 1240-1244.
- [12] Tian J, Zhu L, Wang W J, et al. Genomic analysis of *Microbulbifer* sp. strain a4B-17 and the characterization of its metabolic pathways for 4-hydroxybenzoic acid synthesis [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3115.
- [13] 张丽平, 汪文君, 李智, 等. 对羟基苯甲酸甲酯降解菌的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 337-340.
- [14] 郭晶, 高菊芳, 唐振华. 羧酸酯酶及其在含酯类化合物代谢中的作用[J]. 农药, 2007, 46(6): 365-368.
- [15] Fiske M J, Whitaker R J, Jensen R A. Hidden overflow pathway to L-phenylalanine in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 1983, 154(2): 623-631.
- [16] 李载平. 分子克隆实验指南[J]. 科学通报, 2002, 47(24): 1888.
- [17] Sugimoto Y, Ohnishi K I, Suzuki S. Complete genome sequence of cellulase-producing *Microbulbifer* sp. strain GL-2, isolated from marine fish intestine [J]. Microbiology Resource Announcements, 2020, 9(32): 720-746.
- [18] Nishijima M, Takadera T, Imamura N, et al. *Microbulbifer variabilis* sp. nov. and *Microbulbifer epialgicus* sp. nov., isolated from Pacific Marine algae, possess a rod-coccus cell cycle in association with the growth phase [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1696-1707.