

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20620141151455

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

海洋微生物苹果酸脱氢酶的基因表达和发
酵过程优化

Gene Expression and Fermentation Process Optimization of
Marine Microbial Malate Dehydrogenase

苏洁茹

指导教师姓名: 方柏山 教授

企业导师姓名: 李专成 高级工程师

企业导师单位: 厦门欧米克生物科技有限公司

专业名称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 7 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 1 7 年 5 月

学位授予日期: 2 0 1 7 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

苹果酸脱氢酶 (MDH) 是一种氧化还原酶, 其正反应可催化 L-苹果酸和辅酶 NAD⁺ 氧化形成草酰乙酸, 逆反应可催化草酰乙酸以及辅酶 NADH 合成 L-苹果酸。同时 MDH 在食品、临床医药和农业生产等领域, 都具有非常重要的应用。由于目前国内的 MDH 酶制剂价格昂贵, 且大多来自于动物心脏, 存在提取复杂且容易造成环境污染等问题, 故从丰富的海洋微生物中, 提取 MDH 具有重要的意义。独特海洋环境造就具有耐盐、嗜热、嗜冷、耐压和耐酸、耐碱等特性的极端酶。海洋微生物在新基因、新蛋白开发等方面的应用潜力极大, 为从海洋菌株中挖掘 MDH 基因, 并构建相应的工程菌株, 从而进行以下实验:

(1) 目标菌株的筛选。从实验室保存的 14 株由国家海洋局第三研究所馈赠的海洋菌菌株出发, 筛选出 1 株 MDH 酶活最高的野生型菌株 *Pseudomonas beteli*。

(2) 构建表达 MDH 的重组大肠杆菌。以 *Pseudomonas beteli* 基因组为模板, 克隆出 MDH 基因, 并连接至载体 pET-28a, 转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 和 *E.coli* Rosetta (DE3), 得到表达 MDH 的工程菌。

(3) MDH 酶促反应最适条件和稳定性的考察。重组菌株 Rosetta-pET28a-MDH 通过诱导, 产生目的蛋白 MDH 并通过镍柱进行蛋白纯化, 纯化后 MDH 的比酶活为 31.3U/mg。MDH 酶促反应最适温度为 60 °C, 40 °C 以下孵育 1 h, 酶活都能保持在 60 % 以上。最适酶促反应 pH 为 8.0, 40 °C 孵育 1 h, MDH 在 pH=7.0 时最为稳定。

(4) 培养基优化。以苹果酸脱氢酶高产菌株 Rosetta -pET28a-MDH 为发酵菌株, 利用 PB 实验以及均匀设计实验, 结合 DPS 数据处理系统对其培养基组成进行优化, 最终确定了其最佳的培养基成分 (g/L): 葡萄糖 10, 酵母粉 37.5, 磷酸氢二钾 8.0, 磷酸二氢钠 2.5, 硫酸铵 1.4, EDTA 0.5, 微量元素 1.1。

(5) 多阶段调控 50L 高密度发酵。接种前维持转速 200rpm 和溶氧值 40% 左右。第一阶段: 在接种后, 采用与通气量偶联的方法调节转速, 维持通气量不变, 转速最高达 500rpm, 设置溶氧值为 30%, 温度 37 °C。第二阶段: 采用与通气量偶联的方法调节通气量, 转速维持在 500 rpm 不变, 系统自动调节通气量,

设置溶氧值为 30 %，温度 37 °C。第三阶段：当发酵液的 OD 值达到 10~11 时，加入 IPTG，进行诱导，维持转速 500 rpm，设置溶氧值为 30%，温度 20°C。发酵过程中，采用恒 pH 补料方法，每隔 1~2h 收集 30ml 发酵液。测定其 OD 值最高达 15.1，苹果酸脱氢酶的粗酶比酶活和粗酶酶活分别为 67.5U/mg 和 41.0 U/ml，1L 的发酵液含有酶活 41000U。

关键词：海洋微生物；苹果酸脱氢酶；基因重组；高密度发酵

Abstract

Malate dehydrogenase (MDH) is an oxidoreductase, which can catalyze the oxidation of L-malic acid and coenzyme NAD^+ to form oxaloacetic acid. The reverse reaction catalyzes the synthesis of L-malic acid by oxaloacetate and coenzyme NADH. At the same time MDH in food, clinical medicine and agricultural production and other fields, have a very important application. As the current domestic MDH enzyme preparation is expensive, and mostly from the animal heart, there are complex and easy to cause environmental pollution and other issues, so from the rich marine microorganisms, the extraction of MDH is of great significance. Unique marine environment to create a salt, heat, cold, pressure and acid, alkali and other characteristics of the extreme enzyme. Marine microorganisms in the new genes, new protein development and other aspects of the great potential for the application of marine plants from the mining of MDH gene, and the construction of the corresponding engineering strains, the following experiments:

(1) Screening of target strains. A strain of *Pseudomonas beteli* with high MDH activity was screened from 14 strains of marine strains fed by the State Oceanic Administration's third institute, which were stored in the laboratory.

(2) Construction of recombinant *E. coli* expressing recombinant MDH. The MDH gene was cloned from the *Pseudomonas beteli* genome and ligated into vector pET28a, transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* Rosetta (DE3) to obtain MDH-expressing engineering bacteria.

(3) The optimum conditions and stability of enzymatic reaction of MDH were investigated. The recombinant strain Rosetta-pET28a-MDH was induced to produce the target protein MDH and purified by nickel column. The specific activity of the purified MDH was 31.3U / mg. The optimal temperature of MDH was 60 °C, and incubated at 40 °C for 1 h. The activity of enzyme was kept above 60%. The optimal enzymatic pH was 8.0, incubated at 40 °C for 1 h, and MDH was the most stable at pH = 7.0.

(4) medium optimization. The results showed that the optimum medium

composition (g/L) was optimized by using PB experiment and homogeneous design and the DPS data processing system to optimize the culture medium composition of the maltate dehydrogenase strain Rosetta-pET28a-MDH as the fermentation strain: glucose 10, yeast powder 37.5, dipotassium hydrogen phosphate 8.0, sodium dihydrogen phosphate 2.5, ammonium sulfate 1.4, EDTA 0.5, trace element 1.1.

(5) multi-stage regulation of 50L high-density fermentation. Maintain the speed before running 200rpm and dissolved oxygen value of about 40%. The first stage: after inoculation, the use of ventilation coupled with the method to adjust the speed to maintain the same ventilation, speed up to 500rpm, set the dissolved oxygen value of 30%, temperature 37 °C. The second stage: the use of ventilation coupled with the method to adjust the ventilation, speed maintained at 500 rpm the same, the system automatically adjust the ventilation, set the dissolved oxygen value of 30%, temperature 37 °C. The third stage: When the OD value of the fermentation broth reaches 10 ~ 11, add IPTG, induction, maintain the speed of 500 rpm, set the dissolved oxygen value of 30%, temperature 20 °C. Fermentation process, the use of constant pH feeding method, every 1 ~ 2h collection of 30ml fermentation broth. The enzyme activity and crude enzyme activity of malate dehydrogenase were 67.5U / mg and 41.0 U / ml, respectively. The fermentation broth of 1L contained 41000U of enzyme activity.

Key words: marine microbes; malate dehydrogenase; gene recombination; high density fermentation

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 海洋微生物.....	1
1.1.1 海洋微生物的主要特性.....	1
1.1.2 海洋微生物中氧化还原酶的研究.....	2
1.2 苹果酸脱氢酶.....	3
1.2.1 苹果酸脱氢酶的性质.....	6
1.2.2 苹果酸脱氢酶的用途.....	7
1.3 高密度发酵.....	7
1.3.1 高密度发酵的影响因素.....	8
1.3.2 补料策略.....	9
1.3.3 发酵方式.....	10
1.4 本课题研究目的及意义.....	12
第二章 产苹果酸脱氢酶菌株筛选及重组表达菌株的构建.....	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 实验仪器.....	13
2.1.2 主要实验试剂.....	14
2.1.3 主要分子操作试剂.....	15
2.1.4 溶液、缓冲液的配制.....	16
2.1.5 培养基的配制.....	17
2.2 实验方法.....	18
2.2.1 海洋菌株的培养.....	18
2.2.2 粗酶液的制备.....	18
2.2.3 酶活性测定.....	18
2.2.4 引物设计.....	19
2.2.5 苹果酸脱氢酶基因的克隆.....	20
2.2.6 重组质粒载体的构建.....	22
2.2.7 重组大肠杆菌的构建.....	24

2.3 实验结果	27
2.3.1 目标菌株的筛选	27
2.3.2 温度梯度 PCR.....	28
2.3.3 目的基因 MDH 片段的克隆.....	29
2.3.4 NdeI和 XhoI双酶切及质粒连接	29
2.3.5 重组大肠杆菌 pET28a-MDH-BL21 构建	30
2.3.6 测序结果	31
2.3.7 MDH 基因及其编码蛋白的生物信息学分析	32
2.3.8 重组大肠杆菌 pET28a-MDH-Rosetta 构建.....	35
2.4 小结	36
第三章 苹果酸脱氢酶的纯化及酶学性质的研究	37
3.1 实验材料.....	37
3.1.1 菌株	37
3.1.2 主要试剂及仪器设备	37
3.2 实验方法.....	37
3.2.1 重组大肠杆菌的诱导表达	37
3.2.2 菌体的收集及粗酶液的制备	37
3.2.3 酶活的测定	38
3.2.4 MDH 的纯化.....	38
3.2.5 MDH 的脱盐	38
3.2.6 蛋白质含量测定	39
3.2.7 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳	40
3.2.8 MDH 最适温度和温度的稳定性的测定	41
3.2.9 MDH 最适 pH 及 pH 稳定性的测定	42
3.3 实验结果.....	43
3.3.1 重组菌株中 MDH 酶活比较	43
3.3.2 MDH 分离纯化	44
3.3.3 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳图	46
3.3.4 IPTG 浓度优化	47
3.3.5 IPTG 诱导时间的优化	48
3.3.6 最适温度及温度稳定性	49

3.3.7 酶的最适 pH 及 pH 稳定性	51
3.3.8 金属离子对 MDH 活性的影响	53
3.4 小结	54
第四章 高密度发酵	55
4.1 实验材料和方法	55
4.1.1 菌种	55
4.1.2 实验试剂和试验仪器	55
4.1.3 培养基	56
4.1.4 实验方法	57
4.2 Plackett-Burman 实验	57
4.3 均匀设计优化培养基	62
4.4 5L 发酵罐发酵	66
4.4.1 培养基	66
4.4.2 酶活的测定	66
4.4.3 生物量的测定	66
4.4.4 多阶段调控高密度发酵	67
4.4.5 结果与讨论	68
第五章 总结与展望	72
5.1 总结	72
5.2 展望	73
附录 1	74
参考文献	76
致谢	81

Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Marine microbes.....	1
1.1.1 Main features of marine microbes	1
1.1.2 Study on Oxidoreductase in Marine Microorganisms	2
1.2 Malate dehydrogenase.....	3
1.2.1 The properties of malate dehydrogenase	6
1.2.2 The use of malate dehydrogenase.....	7
1.3 The high density fermentation.....	7
1.3.1 The effect of high density fermentation	8
1.3.2 Feeding strategy.....	9
1.3.3 Fermentation method	10
1.4 The purpose and significance of this project.....	12
Chapter 2 Screening of malate dehydrogenase producing strains and construction of recombinant expression strains.....	13
2.1 The experimental materials	13
2.1.1 experimental apparatus	13
2.1.2 Main experimental reagent	14
2.1.3 The main molecular operating reagent	15
2.1.4 The mixture of solution and buffer.....	16
2.1.5 The preparation of culture medium	17
2.2 The experimental method.....	18
2.2.1 The cultivation of marine strains	18
2.2.2 The preparation of crude enzyme	18
2.2.3 Measurement of enzyme activity.....	18
2.2.4 Primer design	19
2.2.5 The cloning of malate dehydrogenase genes	20
2.2.6 The construction of the recombinant plasmid vector	22

2.2.7 The recombinant of E.coli	24
2.3 The experimental results	27
2.3.1 Target strain screening.....	27
2.3.2 Temperature gradient PCR	28
2.3.3 The clone of the target gene	29
2.3.4 The double cut of NdeI and XhoI and the connection of plasmid.....	29
2.3.5 The build of recombinant E.coli pET28a-MDH-BL21	30
2.3.6 The sequencing results.....	31
2.3.7 Bioinformatics analysis of MDH gene and its encoded protein.....	32
2.3.8 Construction of Recombinant Escherichia coli pET28a-MDH-Rosetta.....	35
2.4 Summary	36
 Chapter 3 Purification of Malate Dehydrogenase and Study on its Enzymatic Properties	
3.1 Experimental materials.....	37
3.1.1 strain	37
3.1.2 Main reagents and equipment.....	37
3.2 Experimental methods.....	37
3.2.1 Induced expression of recombinant E. coli	37
3.2.2 collection of bacteria and crude enzyme preparation	37
3.2.3 Determination of enzyme activity	38
3.2.4 purification of MDH.....	38
3.2.5 Desalination of MDH	38
3.2.6 Determination of protein content.....	39
3.2.7 Protein SDS-PAGE gel electrophoresis	40
3.2.8 Determination of optimum temperature and temperature stability of MDH	41
3.2.9 Determination of optimum pH and pH stability of MDH	42
3.3 Experimental results.....	43
3.3.1 Comparison of MDH Activity in Recombinant Strain.....	43
3.3.2 Isolation and purification of MDH using AKTA Protein Purifier.....	44
3.3.3 Protein SDS-PAGE gel electrophoresis	46

3.3.4 IPTG concentration optimization	47
3.3.5 IPTG induction time optimization	48
3.3.6 optimum temperature and temperature stability	49
3.3.7 Optimal pH and pH stability of the enzyme	51
3.3.8 Effect of metal ions on MDH activity	53
3.4 Summary	54
Chapter 4 High - density Fermentation	55
4.1 Experimental materials and methods	55
4.1.1 strains	55
4.1.2 Experimental reagents and test equipment	55
4.1.3 Medium	56
4.1.4 Experimental methods	57
4.2 Plackett-Burman experiment	57
4.3 Uniform design optimization medium	62
4.4 5L fermentor fermentation	66
4.4.1 Medium	66
4.4.2 Determination of enzyme activity	66
4.4.3 Determination of biomass	66
4.4.4 multi-stage regulation of high-density fermentation	67
4.4.5 Results and discussion	68
Chapter 5 Summary and Prospect	72
5.1 Summary	72
5.2 prospect	73
Appendix 1	74
References	76
Acknowledge	81

第一章 绪论

1.1 海洋微生物

人类所赖以生存的地球是一个三分陆地、七分海洋的星球，海洋资源占全部水源的 97%。海洋中的微生物十分丰富，包括细菌、真菌、放线菌及病毒等，它们组成了地球大约 50%的初级生产力，并显著地影响着全球的气候变化^[1]，在物质传递和能量循环中扮演重要的角色^[2]。海洋中富含药物资源和酶资源，对现代工业生产具有重要意义^[3]。近年来，国内外学者一直致力于从分子生态学的角度出发研究海洋微生物^[4-6]。海洋分子生态学作为研究海洋环境微生物资源的强有力的武器，贯通了现代分子生物学领域和传统生态学领域之间的学科壁垒，使人们对海洋微生物资源有更深刻的认识。现有研究资料表明，许多种高强度的生物活性物质，是由微生物分泌产生的，种类繁多、形态各异的海洋微生物有助于我们挖掘新的基因、发现新的功能、研发新的材料和构建新的机制，有助于研究人员在医疗、食品、卫生、环保等相关领域有更进一步的研究^[7]。若期望更全面的开发和更好的利用微生物资源，创造更好的社会、经济价值，就必须对海洋微生物的多样性有更深入的研究，使其成为探究微生物资源的强有力武器。

海洋极端环境孕育了独特的生物类群，尤其是微生物资源十分丰富。美国马萨诸塞州海洋生物实验室在美国《国家科学院学报》上报道：仅海洋里的细菌种类就高达 500 万-1000 万（是地球上所有生物种类的 5~10 倍），占据海洋生命形态总数的 98 %。因此，开发海洋微生物新基因、新酶、新蛋白等方面的潜力极大。

1.1.1 海洋微生物的主要特性

海洋微生物指生活在海洋水体中的并赖以生存的一切微生物，它们和生活在地上的生物类群具有许多相同的特性，但是由于海洋环境的特殊、复杂多变又导致了海洋微生物具有许多不同的特性，尤其是海洋细菌，具有异于寻常的适应性和多样性。形态上，在水深小于 50 m 的表层海水中，海洋细菌以杆菌为

主，而在深海水域中，海洋细菌则以球菌为主。球菌的表面积相对杆菌、螺菌小得多，但其抗深海静水压力的能力较强。结构上，海洋细菌多为革兰氏染色阴性，且绝大多数具有很强的活动能力，这主要是由于大约75-85%的海洋细菌具有鞭毛，鞭毛的存在使其更适应水体环境，大大的增强了细菌的运动能力。生理特征上，大多数的海洋细菌对温度的变化比较敏感，当温度高于30℃时，细菌的活力会降低。总体来说，海洋微生物具有生长温度较低、耐高盐度、耐较高静水压、可在较贫瘠营养环境下生长等普遍特点。

表 1.1 海洋微生物的主要特性

Table 1.1 The main characteristics of the marine microorganisms

特性	主要表现
嗜盐性	海水中富含各种无机盐类和微量元素。海洋菌需要在海水环境下才能生长 ^[8] 。
嗜冷性	大多数海洋菌对热比较敏感，不适应在30℃以上的温度下生长 ^[9] 。
嗜压性	约56%以上的海洋环境处在100~1100大气压的压力之中，海洋菌能够适应高压并保持酶系统的稳定性。
低营养性	海水中营养物质比较稀薄，部分海洋菌要求在营养贫乏的环境中生长，否则容易因其自身代谢产物积聚过甚而致死。
多形性	在显微镜下观察细菌形态时，同一株细菌纯培养中可以同时观察到多种形态，如球形、椭圆形、大小长短不一的杆状或各种不规则形态的细胞。
发光性	海洋菌中有少数几个表现出发光特性。

1.1.2 海洋微生物中氧化还原酶的研究

随着科学技术的发展和人们对开发海洋资源意识的增强，有关海洋微生物产生新型生物酶的报道逐渐增多，海洋微生物成为开发新型酶制剂的重要来源^[9]。海洋微生物是氧化还原酶的天然宝库。氧化还原是细胞的基本的代谢过程，而在

海洋极端环境中,有可能存在与现有的常态环境中不同的氧化还原酶,或者是活性比现有的氧化还原酶高很多的酶系。海洋微生物生产的酶,其优异的催化效果给众多的领域注入了新的活力,在生物技术和工业应用中已充当了重要的角色^[10]。

海洋微生物氧化还原酶以其独特的底物选择性和催化性能,在新酶开发领域具有广阔的应用前景。对海洋微生物及其氧化还原酶系的挖掘、催化机制研究和改造,将会大大拓展氧化还原酶在手性药物、手性农药和手性食品添加剂等精细化工品产业的实际应用。由于在高盐、高温、低温、强酸、强碱等条件下存在的极端海洋微生物酶在极端条件的化学和工业过程中能保持较高的活性和较好的稳定性,因此,氧化还原酶是海洋微生物酶研究和开发的重点。目前来自深海和极地的极端微生物作为产酶资源也成为研究热点,低温酶、碱性酶和耐盐酶等结构和功能新颖的极端酶以其独特的催化作用大大拓宽了微生物酶的应用范围^[11]。例如, Batistagarcía 从深海海绵 *Stelletta normani* 分离的真菌的木质纤维素酶,其温度在 50-70°C 为最佳温度和 pH 在 5-8 之间为最适 pH 值,同时还具有良好的热稳定性和耐热性^[12],显示了其在未来涉及木质纤维素材料的生物质转化中的巨大前景^[12]。再例如 Ogasawara 对海藻对抗微生物感染具有独特的防御策略的研究,可为天然寻找抗菌方法和农业生产提供理论依据和理论指导^[13]。

1.2 苹果酸脱氢酶

苹果酸脱氢酶 (Malate dehydrogenase, MDH) 广泛存在于动、植物和微生物中,是三羧酸循环 (见图 1.1) 中的关键酶,并且在不同物种间具有较高的保守性。如图 1.2 所示,它能够催化苹果酸羟基上的 H^+ 定向地转移至 $NAD(P)^+$ 上,使苹果酸转化成草酰乙酸,且这一过程是可逆反应^[14-15]。苹果酸脱氢酶的活性部位由底物和辅酶结合位点构成,反应过程中,酶-辅酶-底物形成三聚体复合物,并使蛋白质发生构象变化。变化的过程中,三聚体的一个环盖住活性位点,防止底物和起催化作用的氨基酸受溶剂的干扰,使其慢慢地靠近,从而进行催化反应^[16]。在某些微生物细胞中,MDH 还能够与三羧酸循环的其他酶相互影响,拓宽底物通道,从而增大酶活,例如在枯草杆菌中,MDH 能够与柠檬酸酶和异柠檬酸酶相互作用,从而增大 MDH 酶活^[17-18]。目前报道的苹果酸脱氢酶大部分是多聚体酶,主要是二聚体或四聚体。组成二聚体或四聚体的每个亚基相同或相似且具有

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库