

# 过表达去饱和酶基因对大肠杆菌脂肪酸合成的影响

叶景, 许思远, 张琴\*, 钱程, 曹娟娟, 赵沛  
(安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000)

**摘要:** 为获得高效产油脂工程菌株, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中表达了来自产油核桃内生菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) HB1310 的去饱和酶基因, 构建了单基因表达菌株 BL21 (DE3) /pET-*de1*、BL21 (DE3) /pET-*de2* 及共表达菌株 BL21 (DE3) /pET-*de*。结果表明, 去饱和酶基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中实现了高水平的表达, 3 株工程菌的酶活性在 60 h 诱导过程中均高于野生菌株, 尤以 24 h 的酶活性最高, 分别为同时刻野生菌株的 1.38、1.48 倍和 1.75 倍。外源去饱和酶基因的过表达可引起 *E. coli* 中油脂产量和脂肪酸组分的变化, 与野生菌相比, 3 株工程菌的油脂产量有较大提高, 其发酵 24 h 的油脂产量分别可达 0.57、0.58、0.72 g/L, 其中, 饱和脂肪酸含量分别提高 72.26%、66.93%、123.21%, 不饱和脂肪酸含量分别提高 112.18%、44.18%、134.30%。本研究可为产油脂工程菌的开发和应用提供有价值的菌种来源。

**关键词:** 去饱和酶; 过表达; 共表达; 大肠杆菌; 脂肪酸

## Effect of Desaturase Gene Overexpression on Fatty Acid Synthesis in *Escherichia coli*

YE Jing, XU Siyuan, ZHANG Qin\*, QIAN Cheng, CAO Juanjuan, ZHAO Pei  
(College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

**Abstract:** In order to obtain efficient engineered strains for oil production, the desaturase gene from *Bacillus subtilis* HB1310, an endophytic bacterium isolated from walnut, was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), the single-gene-expression strains BL21(DE3)/pET-*de1* and BL21(DE3)/pET-*de2* and the co-expression strain BL21(DE3)/pET-*de* were constructed. The results showed that the desaturase gene was highly expressed in *E. coli* BL21(DE3), and the desaturase activities of the three engineered strains were higher than that of the wild-type strain after induction for up to 60 h, and they reached their maximum after 24 h, which were enhanced by 1.38, 1.48 and 1.75 times compared with that of the wild-type strain at the same time point, respectively. The overexpression of exogenous desaturase gene led to changes in oil yield and fatty acid components in *E. coli*. The oil yields of the engineered strains were significantly improved compared with that of the wild-type strain, and reached 0.57, 0.58 and 0.72 g/L after 24 h, respectively. The contents of saturated fatty acids were increased by 72.26%, 66.93% and 123.21%, respectively, and unsaturated fatty acids by 112.18%, 44.18% and 134.30%, respectively in the engineered strains compared with the wild-type strain. This study provides a valuable strain source for the development and application of engineered bacteria for oil production.

**Keywords:** desaturase; overexpression; co-expression; *Escherichia coli*; fatty acids

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230509-076

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0072-07

引文格式:

叶景, 许思远, 张琴, 等. 过表达去饱和酶基因对大肠杆菌脂肪酸合成的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 72-78.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230509-076. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-05-09

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (21666034); 安徽省自然科学基金项目 (2108085MB34);

安徽工程大学中青年拔尖人才计划项目 (S022019014)

第一作者简介: 叶景 (1997—) (ORCID: 0000-0003-1234-1606), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物发酵与代谢工程。

E-mail: 2503320900@qq.com

\*通信作者简介: 张琴 (1980—) (ORCID: 0000-0001-5718-526X), 女, 教授, 博士, 研究方向为生物能源、微生物代谢工程。

E-mail: jhtabszq@163.com

YE Jing, XU Siyuan, ZHANG Qin, et al. Effect of desaturase gene overexpression on fatty acid synthesis in *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2024, 45(2): 72-78. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230509-076. <http://www.spkx.net.cn>

脂肪酸去饱和酶代表一类氧依赖性酶,在脂肪酸不同位置引入双键,将饱和脂肪酸降饱和为不饱和脂肪酸,催化脱饱和反应,从而产生单不饱和脂肪酸和双不饱和脂肪酸<sup>[1]</sup>。脂肪酸去饱和酶已被分类为氧化还原酶,通常利用NADP或NAD<sup>+</sup>作为辅助因子,通过与分子氧(加氧酶)结合作用于单个供体,除了氧的存在(作为氢受体),反应还需要细胞色素b5(电子载体)和NADH依赖性细胞色素b5还原酶<sup>[2-3]</sup>。作为脂肪酸合成途径中的关键酶参与脂肪酸的合成,对微生物脂肪酸双键位置、结构、数量产生特异性影响<sup>[4]</sup>,不但可以增加脂肪酸的不饱和度,还有利于促进脂质积累,对维持生物膜正常结构和功能具有重要意义<sup>[5]</sup>。脂肪酸去饱和酶的分布十分普遍<sup>[6-9]</sup>,只有少数例外,如大肠杆菌(*Escherichia coli*),但其具有复制快、可在各种碳源上生长、遗传背景清晰、易于进行基因改造等众多优点,使其成为最有吸引力的生产脂肪酸的宿主生物<sup>[10-11]</sup>。

目前,去饱和酶的研究主要集中在其结构表达与调控机制上,少数致力于探究过表达脂肪酸去饱和酶代谢途径工程,改善细胞资源动态重新分配以及途径表达对提高脂肪酸生产力和产量的影响。Garba等<sup>[12]</sup>克隆了来自*Pseudomonas* sp. A3的 $\Delta 9$ -脂肪酸去饱和酶基因,并在*E. coli*中成功表达,使其不饱和脂肪酸含量显著增加。Xue Zhixiong等<sup>[13]</sup>通过对产油酵母进行代谢工程改造,得到了1株能产生15%干细胞质量花生五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)的菌株。工程酵母脂质中含有56.6%的EPA和5%以下的饱和脂肪酸,分别为已知EPA生产菌来源中最高和最低的比例。Yan Fengxin等<sup>[5]</sup>在解脂耶氏酵母中过表达 $\Delta 15$ 去饱和酶,菌株积累的脂质含量达30.7%,而共表达 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶基因积累的脂质含量则可达42.6%。由此看来,不管是单表达还是共表达去饱和酶基因,都可在一定程度上提高微生物的油脂含量、改善其饱和、不饱和脂肪酸的组成比例。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) HB1310是1株已报道的高产油核桃内生菌,饱和酶是该菌株脂肪酸合成途径中的关键酶之一<sup>[14]</sup>,本研究将克隆其去饱和酶基因 $de1$ 、 $de2$ ,实现这两种基因在*E. coli* BL21(DE3)中的单表达与共表达,探究去饱和酶基因过表达对*E. coli*油脂产量及其脂肪酸组分的影响,获得高效的产油工程菌,以期为高产油工程菌的开发和应用提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株与质粒

本研究使用的菌株和质粒见表1。其中产油核桃内生菌(*B. subtilis* HB1310)用于克隆实验所需目的基因,*E. coli* DH5 $\alpha$ 及pET-28a用于质粒构建,*E. coli* BL21(DE3)作为表达菌株用于构建脂肪酸生产菌株,pUCm-T购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

表1 实验所用菌株和质粒

菌株/质粒	特性	来源
<i>B. subtilis</i> HB1310	产油核桃内生菌	实验室保存
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	基因克隆宿主菌	实验室保存
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	基因表达宿主菌	实验室保存
BL21 (DE3) /pET-28a- <i>de1</i>	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 含去饱和酶基因 $de1$ , 工程菌	本研究构建
BL21 (DE3) /pET-28a- <i>de2</i>	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 含去饱和酶基因 $de2$ , 工程菌	本研究构建
BL21 (DE3) /pET-28a- <i>de</i>	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 含去饱和酶基因 $de1$ 和 $de2$ , 工程菌	本研究构建
pUCm-T	<i>Amp<sup>r</sup></i> , T载体	生工生物工程(上海)股份有限公司
T- <i>de1</i>	<i>Amp<sup>r</sup></i> , 重组T载体含去饱和酶基因 $de1$	本研究构建
T- <i>de2</i>	<i>Amp<sup>r</sup></i> , 重组T载体含去饱和酶基因 $de2$	本研究构建
T- <i>de</i>	<i>Amp<sup>r</sup></i> , 重组T载体含去饱和酶基因 $de1$ 和 $de2$	本研究构建
pET-28a	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 表达质粒	本实验室保存
pET-28a- <i>de1</i>	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 重组质粒含去饱和酶基因 $de1$	本研究构建
pET-28a- <i>de2</i>	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 重组质粒含去饱和酶基因 $de2$	本研究构建
pET-28a- <i>de</i>	<i>Kan<sup>r</sup></i> , 重组质粒含去饱和酶基因 $de1$ 和 $de2$	本研究构建

#### 1.1.2 培养基

LB培养基: 蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、NaCl 10 g/L, pH 7.0~7.5, 120 °C, 20 min。

发酵培养基: 葡萄糖2 g/L、酵母粉5 g/L、蛋白胨10 g/L、NaCl 10 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, pH 7.0~7.5, 110 °C, 30 min。

#### 1.1.3 试剂

葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、七水硫酸镁、氢氧化钠、琼脂粉、琼脂糖、蛋白胨、氨苄霉素、卡那霉素、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside, IPTG)、细菌总蛋白提取试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)变性丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、细菌总蛋白提取试剂盒、Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒、SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒、SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、5×Tris-硼酸电泳缓冲液 生工生物工程(上海)股份有限公司;

6×Loading Buffer、限制性内切酶、T4 DNA连接酶、2×Premix Taq™ 北京宝日医生物技术有限公司；甲醇、氯仿 上海国药集团化学试剂有限公司；正己烷（色谱纯）、红四氮唑、磷酸盐缓冲溶液粉剂 上海麦克林生化科技有限公司；十五烷酸甲酯、37种脂肪酸标准品 广州硕谱生物科技有限公司。

### 1.1.4 引物

引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，具体序列见表2。

表2 实验所用引物  
Table 2 Primer sequences used in this study

引物	序列 (5'-3')	酶切位点
DEF1	ATGACTGAACAAACCATTGC	
DER1	GTTTTCTGGTGAATCAGGC	
DEF11	ATGAATTCGACTGAACAAACCATTGC	EcoR I
DER11	CTCGAGGTTTTCTGGTGAATCAGGC	Xho I
DEF2	TTGTGCAATTCCTTATTTCTTA	
DER2	TTTGCCTTCTTCATCCCATAG	
DEF21	CGGATCCCTGTGCGATTTCTTATTTCTTA	BamH I
DER21	CTCGAGTTTGCCTTCTTCATCCCATAG	Xho I
DE1	CGGATCCCTGTGCGATTTCTTATTTCTTA	BamH I
DE2	AATGGTTTGTTCAGTCATTTTGCCTTCTTCATCCCA	
DE3	TGGGATGAAGAAGGCAAAATGACTGAACAAACCATT	
DE4	CTCGAGGTTTTCTGGTGAATCAGGC	Xho I

注：下划线部分为限制性酶切位点。

## 1.2 仪器与设备

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）仪、电泳仪、凝胶成像仪 上海伯乐生命医学产品有限公司；冷冻离心机 大龙兴创实验仪器（北京）股份有限公司；紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司；GC 8860气相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 基因 $del1$ 、 $de2$ 及 $de$ 的克隆

采用Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒提取*B. subtilis* HB1310的基因组DNA并作为模板，采用引物对DEF1/DER1、DEF2/DER2分别扩增 $del1$ 、 $de2$ 基因，并分别采用引物对DEF11/DER11、DEF21/DER21为 $del1$ 基因引入酶切位点EcoR I、Xho I，为 $de2$ 基因引入酶切位点BamH I、Xho I。

采用融合PCR将 $del1$ 、 $de2$ 基因整合，并命名为 $de$ 。以*B. subtilis* HB1310的基因组DNA为模板，采用引物对DE1/DE2扩增得到基因 $del1$ ，上游引入酶切位点BamH I，采用引物对DE3/DE4扩增得到基因 $de2$ ，下游引入酶切位点Xho I。将扩增产物以物质的量比1:1混合进行自我延伸，PCR条件：94℃预变性4 min；94℃变性30 s，61℃退火30 s，8个循环；72℃延伸2 min。反应结束以其为模板DNA进行扩增，PCR体系（10 μL）：上下游引物各0.4 μL，模板DNA 0.4 μL，2×Premix Taq™ 5 μL，加水补充至10 μL。PCR条件：94℃预变性4 min；94℃变性

30 s，61℃退火30 s，72℃延伸2 min，25个循环；72℃延伸10 min。

### 1.3.2 重组质粒及工程菌株的构建

纯化回收PCR扩增产物，与pUCm-T载体连接，转化至*E. coli* DH5α感受态细胞，氨苄霉素抗性筛选，PCR检测及双酶切和测序验证筛选转化子，验证正确的阳性转化子即为成功构建的克隆质粒T- $del1$ 、T- $de2$ 、T- $de$ 。构建好的克隆质粒，采用限制性内切酶进行双酶切，与同样双酶切的pET-28a载体连接，转化*E. coli* DH5α感受态细胞，抗性（含质量浓度为10 μg/mL的卡那霉素）筛选，进行PCR检测及双酶切和测序验证，验证正确的质粒即为构建成功的原核表达质粒pET-28a- $del1$ 、pET-28a- $de2$ 、pET-28a- $de$ 。提取并纯化各重组质粒，并转化至*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞，抗性（10 μg/mL卡那霉素）筛选，获得转化子，并抽提质粒，再进行双酶切和测序验证，验证正确的菌株即为构建的工程菌株BL21（DE3）/pET-28a- $del1$ （DE1）、BL21（DE3）/pET-28a- $de2$ （DE2）、BL21（DE3）/pET-28a- $de$ （DE）。

### 1.3.3 目的蛋白诱导表达和SDS-PAGE检测

参考许思远等<sup>[15]</sup>的方法，活化的工程菌株DE1、DE2、DE分别接种于含10 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中，于37℃、200 r/min过夜培养，取培养的菌液按照0.5%接种量接种于含10 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中，至OD<sub>600 nm</sub>达0.4~0.6，加入已灭菌的IPTG（终浓度1 mmol/L）继续诱导6 h，将获得的菌液离心收集菌体，采用细菌总蛋白提取试剂盒提取各菌株蛋白，再用SDS-PAGE变性聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒对菌株蛋白进行电泳检测。

### 1.3.4 各工程菌株生长和酶活性的测定

活化好的野生菌株和工程菌株DE1、DE2、DE分别接种于LB液体培养基中（工程菌的培养基中加10 μg/mL卡那霉素）培养60 h，每12 h取培养液检测OD<sub>600 nm</sub>。工程菌株DE1、DE2、DE采用1.3.3节方法诱导产酶，再转入发酵培养基中继续培养，同时补充IPTG和卡那霉素，相同培养条件下培养至60 h，每12 h取样检测去饱和酶活性，野生菌株*E. coli* BL21（DE3）则在不含卡那霉素的LB液体培养基中培养，同样监测60 h内的去饱和酶活性。

去饱和酶活性检测参考姚笛等<sup>[16]</sup>的方法：取新鲜菌液20 mL，离心收集菌体，采用细菌总蛋白提取试剂盒提取细菌蛋白。取等量蛋白提取液依次加入Tris-HCl缓冲液（pH 8.0）、质量分数0.4%红四氮唑溶液各2 mL，25℃培养2 h，甲苯萃取，取有机层测量OD<sub>485 nm</sub>，依据红四氮唑标准曲线计算甲攢含量，将该条件下甲攢含量每增加1 μg定义为1个酶活性单位。

### 1.3.5 野生菌株和工程菌株DE1、DE2、DE发酵产油

采用250 mL的锥形瓶作为发酵瓶，100 mL装液量。挑取单菌落接种于含有卡那霉素的3 mL LB液体培养基中，37℃、180 r/min过夜培养，将上述3 mL菌液接种



于30 mL LB培养基中, 培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 为0.4~0.6, 加入1 mol/L IPTG, 使IPTG终浓度为1 mmol/L, 37 °C、180 r/min诱导6 h, 以10%接种量接入发酵培养基中, 同时补充IPTG和卡那霉素(野生菌株发酵过程中不添加IPTG和卡那霉素), 相同培养条件下培养24 h, 各实验重复6次, 取样、离心收集菌体, 将3次重复收集的菌体烘干至质量恒定用于检测菌体干质量, 并用于细菌油脂的提取及其后续油脂含量换算和组分分析。

### 1.3.6 细菌油脂的提取及换算

参考张琴<sup>[17]</sup>的方法, 采用酸热法提取细菌油脂, 测得的油脂质量换算为每升的量即为油脂产量, 油脂质量分数采用式(1)计算:

$$\text{油脂质量分数}/\% = \frac{\text{油脂质量}}{\text{菌体干质量}} \times 100 \quad (1)$$

### 1.3.7 油脂组分分析

甲酯化: 提取的细菌油脂加入5%硫酸-甲醇溶液2 mL混匀, 90 °C水浴2 h, 冷却后添加2 mL正己烷振荡混匀, 离心收集上清液, 添加适量无水硫酸钠, 静置5 min。吸取上清液1 mL, 过0.22 μm滤膜, 添加2 μL 100 mg/mL内标(十五烷酸甲酯)溶液, 用于气相色谱上样。

气相色谱条件: HP-5色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.5 μm); 升温程序: 40 °C保持10 min, 以5 °C/min升温至120 °C, 4 °C/min升温至190 °C, 3 °C/min升温至240 °C, 保持20 min; 载气(N<sub>2</sub>)流速1.2 mL/min, 压强2.4 kPa, 进样量1 μL, 分流比15:1。

脂肪酸质量分数及不饱和脂肪酸提高量计算方法如式(2)~(4)所示:

$$I/\% = \frac{A_i}{\sum A - A_{Ei}} \quad (2)$$

$$\text{组分含量} = \text{油脂产量} \times I \quad (3)$$

$$\text{脂肪酸组分提高量}/\% = \frac{\text{工程菌组分含量} - \text{野生菌组分含量}}{\text{野生菌组分含量}} \times 100 \quad (4)$$

式中:  $I$ 为脂肪酸质量分数%;  $A_i$ 为脂肪酸的峰面积;  $\sum A$ 为除溶剂峰和杂质峰外所有峰面积之和;  $A_{Ei}$ 为十五烷酸甲酯峰面积。

### 1.4 数据处理与分析

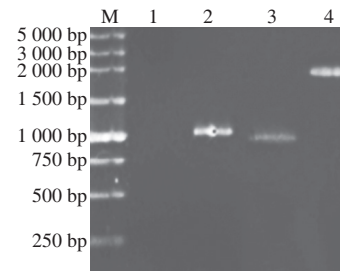
所有实验均进行3次重复, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用SPSS软件进行方差分析,  $P < 0.05$ , 差异显著, 使用Origin 2019软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 去饱和酶基因的克隆

采用1.0%琼脂糖凝胶电泳对 $de1$ 、 $de2$ 、 $de$ 基因的PCR扩增产物进行检测, 结果如图1所示。从电泳图可看出, 3个基因的PCR扩增产物碱基长度约1 036、822、

1 856 bp, 与预期目标条带大小相符, 表明这些基因片段扩增成功。

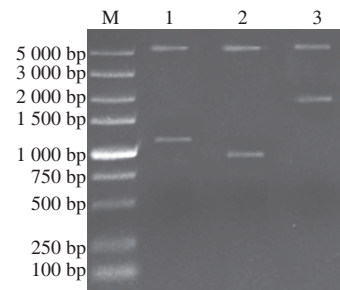


M. DL5000 DNA Marker, 图2同; 1.空白对照; 2.  $de1$ 扩增产物; 3.  $de2$ 扩增产物; 4.  $de$ 扩增产物。

图1  $de1$ 、 $de2$ 、 $de$ 基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig. 1 Agarose gel electrophoretograms of PCR products of the  $de1$ ,  $de2$  and  $de$  genes

### 2.2 重组表达质粒与工程菌的构建

重组表达质粒pET-28a- $de1$ 、pET-28a- $de2$ 、pET-28a- $de$ 抽提纯化, 分别采用限制性内切酶EcoR I/Xho I、BamH I/Xho I、BamH I/Xho I双酶切, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 各重组表达质粒酶切后均产生两条带(图2), 其中大片段均与质粒pET-28a单酶切片长度一致, 小片段分别与 $de1$ 、 $de2$ 、 $de$ 基因的目的片段长度一致, 进一步测序结果证实3个基因的重组表达质粒均构建成功。



1.质粒pET-28a- $de1$ 双酶切产物(EcoR I/Xho I); 2.质粒pET-28a- $de2$ 双酶切产物(BamH I/Xho I); 3.质粒pET-28a- $de$ 双酶切产物(BamH I/Xho I)。

图2 重组表达质粒pET-28a- $de1$ 、pET-28a- $de2$ 、pET-28a- $de$ 双酶切产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

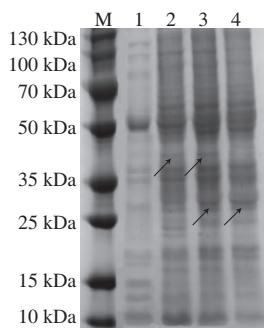
Fig. 2 Agarose gel electrophoretograms of double enzyme digestion products of recombinant plasmids pET-28a- $de1$ , pET-28a- $de2$ , and pET-28a- $de$

将重组质粒转化至BL21(DE3)得到工程菌株BL21(DE3)/pET- $de1$ (DE1), BL21(DE3)/pET- $de2$ (DE2)及共表达菌株BL21(DE3)/pET- $de$ (DE), 对工程菌株进行PCR检测、质粒及酶切验证, 序列比对结果显示工程菌构建成功。

### 2.3 工程菌株DE1、DE2、DE去饱和酶基因诱导表达产物的SDS-PAGE分析

对工程菌株DE1、DE2、DE去饱和酶基因诱导表达的酶蛋白进行SDS-PAGE检测, 结果见图3。与E. coli BL21(DE3)的蛋白SDS-PAGE结果进行对比分析, 发现工程菌株DE1、DE2的重组酶在分子量约40、32 kDa左右

的条带分别较*E. coli* BL21 (DE3) 明显加深, 与理论分子质量较接近 (DE1的为39.8 kDa, DE2的为31.8 kDa)。结果表明, 去饱和酶基因 $de1$ 、 $de2$ 在*E. coli* BL21 (DE3) 中实现了高效单表达和共表达。



M. 蛋白Marker; 1. *E. coli* BL21 (DE3); 2. DE1; 3. DE; 4. DE2。

图3 工程菌株DE1、DE2、DE去饱和酶蛋白的SDS-PAGE分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of desaturase proteins from engineered strains DE1, DE2 and DE

#### 2.4 去饱和酶基因 $de1$ 、 $de2$ 单表达和共表达对菌株生长的影响

对工程菌株DE1、DE2、DE培养60 h内的 $OD_{600\text{ nm}}$ 进行监测, 其生长曲线如图4所示。发现3株工程菌均能在24 h内快速生长, 并在24 h左右达生长峰值, 其后生长趋于稳定。从培养过程的生长曲线看, 3株菌株呈现与野生菌株类似的生长曲线, 说明外源的去饱和酶基因 $de1$ 、 $de2$ 单表达和共表达过程中, 工程菌株仍能维持有效的生长。然而, 24~60 h, 工程菌株的生长均略低于野生菌株, 可能由于外源基因表达过程中, 插入新的酶会造成合成代谢干扰内源性代谢, 合成代谢和内源性代谢之间的竞争导致代谢负担, 从而导致宿主的应激反应和生理变化, 引起工程菌株生长量的降低<sup>[18-20]</sup>。

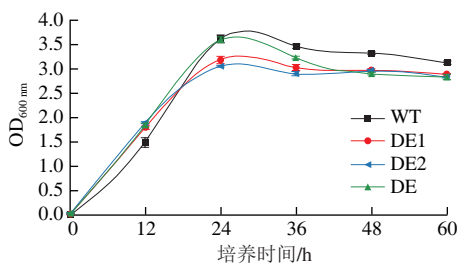


图4 工程菌株和野生菌株的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of engineered strains and wild-type strain

#### 2.5 工程菌株和野生菌株的去饱和酶活性变化

红四氮唑作为一种氧化剂, 可以从去饱和酶接受电子, 后自身从无色被还原为红色的甲攞, 从而可以表征细胞内去饱和酶活性<sup>[16]</sup>。工程菌株和野生菌株60 h内的酶活性变化曲线如图5所示, 工程菌株DE1、DE2、DE的去饱和酶活性在60 h诱导过程中均高于野生菌株, 尤以24 h的酶活性最高, 分别为同时刻野生菌株的1.38、1.48倍

和1.75倍, 表明去饱和酶基因 $de1$ 、 $de2$ 在24 h内即实现了高水平的表达; 24 h后工程菌株酶活性呈下降趋势, 可能是由于外源基因的过表达导致*E. coli*中形成大量的包涵体<sup>[21]</sup>。而发酵后期随着营养物质消耗以及细菌生长进入衰退期, 去饱和酶活性趋于平稳, 但仍略高于或与野生菌株的酶活性接近。

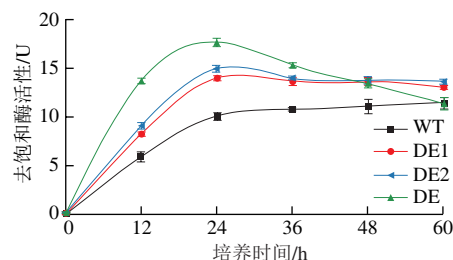


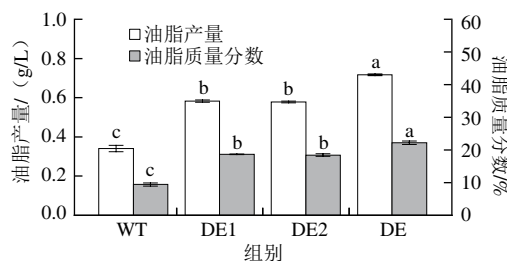
图5 工程菌株和野生菌株的去饱和酶活性变化曲线

Fig. 5 Changes in desaturase activity of engineered strains and wild-type strain

#### 2.6 去饱和酶基因 $de1$ 、 $de2$ 单表达和共表达对油脂产量及脂肪酸组分的影响

为最大程度排除可能由于包涵体的形成导致部分菌株去饱和酶活性下降, 而造成后续实验对细菌脂肪酸产量及脂肪酸组成成分的实验偏差, 本研究仅收集了工程菌株和野生菌株发酵24 h的菌体样品进行细菌油脂的提取及其脂肪酸组分分析。

如图6所示, 去饱和酶基因的表达有效增强了细菌脂质的积累, 与野生菌株相比, 工程菌株的油脂产量和质量分数均显著提高。DE1、DE2、DE的油脂产量分别可达0.57、0.58、0.72 g/L, 均较野生菌株提高83%以上, 而油脂质量分数从野生菌的9.45%提高至18.44%以上, 分别较野生菌株提高97.78%、95.17%、135.09%。总的来看, 去饱和酶基因 $de1$ 与 $de2$ 共表达对油脂产量和含量提高的促进作用显著优于这两个基因单表达的, 这与Yan Fengxin等<sup>[5]</sup>在解脂耶氏酵母中共表达 $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$ 去饱和酶基因促进脂质积累效果更显著的结论一致。



相同指标不同组别小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。图7同。

图6 工程菌株和野生菌株发酵24 h的油脂产量和含量

Fig. 6 Oil yields and contents of engineered strains and wild-type strain after 24 h fermentation

将提取的细菌油脂进行甲酯化后, 利用气相色谱对脂肪酸组分进行定性和定量分析。基于37种脂肪酸甲酯

混标对油脂样品进行分离定性,对照标准品参考图谱得出各组分的出峰时间,采用十五烷酸甲酯作为内标对脂肪酸甲酯进行定量分析<sup>[22]</sup>。菌株脂肪酸组分及其质量分数见表3。

表3 工程菌株和野生菌株的脂肪酸组分及其质量分数  
Table 3 Composition and content of fatty acids from engineered strains and wild-type strain

脂肪酸	质量分数/%			
	WT	DE1	DE2	DE
C <sub>8:0</sub>	1.25±0.01 <sup>d</sup>	7.29±0.04 <sup>a</sup>	1.99±0.13 <sup>c</sup>	4.31±0.13 <sup>b</sup>
C <sub>12:0</sub>	3.39±0.00 <sup>b</sup>	3.88±0.04 <sup>a</sup>	3.07±0.03 <sup>c</sup>	3.78±0.12 <sup>a</sup>
C <sub>14:0</sub>	7.09±0.02 <sup>a</sup>	5.41±0.08 <sup>c</sup>	5.35±0.23 <sup>c</sup>	5.76±0.09 <sup>b</sup>
C <sub>15:1</sub>	0.89±0.11 <sup>d</sup>	2.74±0.15 <sup>a</sup>	1.62±0.05 <sup>c</sup>	1.98±0.06 <sup>b</sup>
C <sub>16:0</sub>	33.58±0.19 <sup>b</sup>	33.47±0.27 <sup>b</sup>	35.83±1.76 <sup>a</sup>	37.86±1.00 <sup>a</sup>
C <sub>16:1</sub>	4.13±0.24 <sup>a</sup>	2.71±0.14 <sup>c</sup>	3.41±0.02 <sup>b</sup>	3.34±0.03 <sup>b</sup>
C <sub>17:0</sub>	1.10±0.38 <sup>a</sup>	1.01±0.01 <sup>a</sup>	1.31±0.08 <sup>a</sup>	1.02±0.06 <sup>a</sup>
C <sub>18:0</sub>	10.06±0.04 <sup>a</sup>	10.52±0.08 <sup>b</sup>	11.21±0.13 <sup>c</sup>	10.53±0.15 <sup>b</sup>
C <sub>18:2</sub>	5.58±0.01 <sup>c</sup>	7.85±0.05 <sup>a</sup>	4.56±0.04 <sup>d</sup>	6.37±0.28 <sup>b</sup>
C <sub>21:0</sub>	5.16±0.05 <sup>a</sup>	1.48±0.54 <sup>d</sup>	4.11±0.06 <sup>b</sup>	3.23±0.03 <sup>c</sup>
C <sub>22:2</sub>	1.50±0.03 <sup>ab</sup>	1.98±0.70 <sup>a</sup>	0.99±0.05 <sup>b</sup>	2.09±0.03 <sup>a</sup>
C <sub>24:0</sub>	1.96±0.89 <sup>ab</sup>	2.19±0.14 <sup>ab</sup>	1.43±0.10 <sup>b</sup>	2.52±0.09 <sup>a</sup>

注: C<sub>8:0</sub>、C<sub>12:0</sub>、C<sub>14:0</sub>、C<sub>15:1</sub>、C<sub>16:0</sub>、C<sub>16:1</sub>、C<sub>17:0</sub>、C<sub>18:0</sub>、C<sub>18:2</sub>、C<sub>21:0</sub>、C<sub>22:2</sub>、C<sub>24:0</sub>分别为辛酸、月桂酸、豆蔻酸、十五碳烯酸、棕榈酸、棕榈油酸、十七烷酸、硬脂酸、亚油酸、二十一烷酸、二十二碳二烯酸、二十四烷酸。

表3显示, *E. coli* BL21 (DE3) 的油脂脂肪酸组分以棕榈酸 (C<sub>16:0</sub>) 和硬脂酸 (C<sub>18:0</sub>) 为主, 其次为豆蔻酸 (C<sub>14:0</sub>)、亚油酸 (C<sub>18:2</sub>)。3 株工程菌中油脂脂肪酸仍以上述4 个组分为主, 但各组分的质量分数却发生了明显的变化。其中, C<sub>8:0</sub>、C<sub>15:1</sub>、C<sub>18:0</sub>脂肪酸质量分数均高于野生菌株, 尤其是工程菌株DE1、DE中的不饱和脂肪酸组分C<sub>15:1</sub>、C<sub>18:2</sub>、C<sub>22:2</sub>质量分数均显著高于野生菌株。为揭示去饱和酶基因*del*、*de2*单表达及共表达对油脂脂肪酸组分的影响, 统计了工程菌株DE1、DE2、DE相对于野生菌株中饱和与不饱和脂肪酸的提高量。如图7所示, 工程菌株中饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸含量均提高, 饱和脂肪酸含量分别提高72.26%、66.93%、123.21%, 不饱和脂肪酸含量分别提高112.18%、44.18%、134.30%, 表明去饱和酶基因的表达有利于 *E. coli* 中脂肪酸组分的改善。

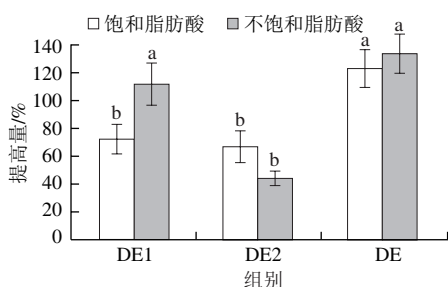


图7 工程菌株DE1、DE2、DE相对于野生菌株的饱和与不饱和脂肪酸的提高量

Fig. 7 Improvements in saturated and unsaturated fatty acid contents from engineered strains DE1, DE2 and DE compared with wild-type strain

理论上, 去饱和酶特异性地促进成熟脂肪酸中顺式双键的形成, 将饱和状态下的脂肪酸去饱和, 关键结构域和关键位点构成去饱和酶的活性中心并影响其活性, 且不同的催化底物对催化速率也产生一定的影响<sup>[23]</sup>。有研究表明, 脂肪酸去饱和酶的类型、表达水平和活性决定了不饱和脂肪酸的定性和定量组成, 特殊去饱和酶的过表达可以促进细胞内单不饱和脂肪酸的富集和脂质积累, 从而达到改善脂肪酸组分的效果<sup>[23-25]</sup>。例如, Paulucci等<sup>[26]</sup>将去饱和酶基因*PhFAD12*在 *E. coli* BL21 (DE3) 中高效表达, 该基因在转化菌株中的表达降低了棕榈酸和硬脂酸的水平, 将棕榈酸和硬脂酸脱饱和为单不饱和脂肪酸, 提高了棕榈油酸的表达水平; Yin Dongmei等<sup>[27]</sup>实现了 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的高效表达, 发现该酶能特异性地将油酸 (C<sub>18:1</sub>) 转化为亚油酸等, 本研究也通过对工程菌株相对于野生菌株中饱和与不饱和脂肪酸含量的提高量进行统计分析, 证明了去饱和酶基因的表达有利于 *E. coli* 中脂肪酸组分的改善, 尤其是不饱和脂肪酸含量的提高。表4总结了近年来酵母菌和 *E. coli* 中过表达去饱和酶基因引起菌株不饱和脂肪酸组分和含量变化的研究结果, 可见去饱和酶对于脂肪酸组分的改善至关重要, 过表达不同来源的去饱和酶基因对于高产油工程菌或特殊组分工程菌的构建具有重要应用价值和理论意义。

表4 酵母菌和 *E. coli* 中过表达去饱和酶基因效果比较

Table 4 Comparison of outcomes of desaturase gene overexpression in oleaginous yeast and *E. coli*

表达菌株	去饱和酶基因	不饱和脂肪酸变化	参考文献
产油酵母	$\Delta 15D$	C <sub>18:2</sub> ↑	[5]
	$\Delta 12D$	C <sub>18:2</sub> ↑	[5]
	<i>PaFAD2</i>	C <sub>18:1</sub> → C <sub>18:2</sub> 、C <sub>16:1</sub> → C <sub>16:2</sub>	[28]
	<i>SCD</i> 、 <i>DGAI</i> 、 <i>ACCI</i>	C <sub>18:1</sub> ↑	[29]
	<i>PA3FAD9</i>	C <sub>16:0</sub> → C <sub>16:1</sub>	[12]
	<i>PhFAD12</i>	C <sub>16:0</sub> → C <sub>16:1</sub>	[26]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>FAD2</i>	C <sub>18:1</sub> → C <sub>18:2</sub>	[27]
	<i>AtFab2</i> 、 <i>AtFatA</i>	C <sub>16:0</sub> ↓、C <sub>18:1</sub> ↑、C <sub>16:1</sub> ↑	[30]
	<i>FAD12</i>	C <sub>18:1</sub> → C <sub>18:2</sub>	[31]
	$\Delta 5Des-Iso$	ERA ↑、ARA ↑	[32]
	<i>de1</i>	C <sub>15:1</sub> ↑、C <sub>18:2</sub> ↑、C <sub>22:2</sub> ↑	本研究
	<i>de2</i>	C <sub>15:1</sub> ↑	本研究
	<i>de1</i> 、 <i>de2</i>	C <sub>15:1</sub> ↑、C <sub>18:2</sub> ↑、C <sub>22:2</sub> ↑	本研究

注: ERA、ARA 分别为二十碳五烯酸、二十碳四烯酸。

### 3 结论

在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达了来自产油核桃内生菌 *B. subtilis* HB1310 的去饱和酶基因, 构建了单基因表达菌株 BL21 (DE3) *lpET-de1*、BL21 (DE3) *lpET-de2* 及共表达菌株 BL21 (DE3) *lpET-de*, 实现了去饱和酶基因的高表达, 有效促进了 *E. coli* 去饱和酶活性的提高, 使脂肪



酸积累量得以增加,提高了菌株油脂产量和含量,改善了脂肪酸组分,尤其使饱和和脂肪酸含量显著提高。本研究可为产油脂工程菌的开发和应用提供有价值的菌种来源,对高效产油工程菌的构建具有一定的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] STARIKOV A Y, SIDOROV R A, MIRONOV K S, et al. Delta or omega  $\Delta 12$  ( $\omega 6$ ) fatty acid desaturases count 3C after the preexisting double bond[J]. *Biochimie*, 2020, 179: 46-53. DOI:10.1016/j.biochi.2020.09.009.
- [2] HALIM N F A A, ALI M S M, LEOW A, et al. Membrane fatty acid desaturase: biosynthesis, mechanism, and architecture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(18): 5957-5972. DOI:10.1007/S00253-022-12142-3.
- [3] CZUMAJ A, ŚLEDZIŃSKI T. Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 356. DOI:10.3390/nu12020356.
- [4] STARIKOV A Y, SIDOROV R A, GORIANOV S V, et al. Acyl-lipid  $\Delta 6$ -desaturase may act as a first FAD in cyanobacteria[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1795. DOI:10.3390/biom12121795.
- [5] YAN F X, DONG G R, QIANG S, et al. Overexpression of  $\Delta 12$ ,  $\Delta 15$ -desaturases for enhanced lipids synthesis in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 289. DOI:10.3389/fmicb.2020.00289.
- [6] LOU Y, SCHWENDER J, SHANKLINI J. FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling *in vivo*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(26): 17996-18007. DOI:10.1074/jbc.M114.572883.
- [7] NACHTSCHATT M, OKADA S, SPEIGHT R, et al. Integral membrane fatty acid desaturases: a review of biochemical, structural, and biotechnological advances[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2020, 122(12): 2000181. DOI:10.1002/ejlt.2000181.
- [8] 曾硕士, 江黎明, 元冬娟, 等. 脂肪酸去饱和酶的研究进展[J]. *生命科学*, 2008, 20(5): 816-820.
- [9] LOS D A, MURATA N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1998, 1394(1): 3-15. DOI:10.1016/S0005-2760(98)00091-5.
- [10] LI W, WU H, LI M, et al. Effect of NADPH availability on free fatty acid production in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(2): 444-452. DOI:10.1002/bit.26464.
- [11] CAO Y J, LIU W, XIN X, et al. Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1-11. DOI:10.1186/1754-6834-7-59.
- [12] GARBA L, ALI M S M, OSLAN S N, et al. Molecular cloning and functional expression of a  $\Delta 9$ -fatty acid desaturase from an antarctic *Pseudomonas* sp. A3[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0160681. DOI:10.1371/journal.pone.0160681.
- [13] XUE Z X, SHARPE P L, HONG S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 734-740. DOI:10.1038/nbt.2622.
- [14] ZHANG Q, LIU P P, LI Y B, et al. Metabolic pathway analysis of walnut endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HB1310 related to lipid production from fermentation of cotton stalk hydrolysate based on genome sequencing[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(9): 1883-1894. DOI:10.1007/s10529-021-03160-8.
- [15] 许思远, 张永贵, 赵沛, 等. 产油核桃内生细菌乙酰辅酶A羧化酶 $acb$ 基因克隆及优化表达[J]. *中国油脂*, 2023, 48(4): 99-104. DOI:10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220108.
- [16] 姚笛, 于长青, 杨健, 等. 深黄被孢霉的脱饱和酶活性与花生四烯酸产量的关系[J]. *农产品加工(学刊)*, 2009(11): 24-26; 29.
- [17] 张琴. 核桃内生细菌发酵棉秆水解糖液产油及其代谢基础分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 18.
- [18] DAHL R H, ZHANG F, ALONSO-GUTIERREZ J, et al. Engineering dynamic pathway regulation using stresses response promoters[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(11): 1039-1046. DOI:10.1038/nbt.2689.
- [19] WANG C Y, LEMPP M, FARKE N, et al. Metabolome and proteome analyses reveal transcriptional misregulation in glycolysis of engineered *E. coli*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4929-4929. DOI:10.1038/S41467-021-25142-0.
- [20] ZHA W J, RUBIN-PITEL S B, SHAO Z Y, et al. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(3): 192-198. DOI:10.1016/j.ymben.2009.01.005.
- [21] KAPRAKKADEN A, SRIVASTAVA P, BISARIA V S. *In vitro* synthesis of 9,10-dihydroxyhexadecanoic acid using recombinant *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 1-10. DOI:10.1186/s12934-017-0696-7.
- [22] 陈云锋, 任轩, 张永琴. 气相色谱内标法测定生物柴油中脂肪酸甲酯及亚麻酸甲酯含量[J]. *中国油脂*, 2013, 38(11): 75-77.
- [23] WU J R, WU C, RONG C, et al. Catalytic mechanisms underlying fungal fatty acid desaturases activities[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(5): 753-769. DOI:10.1080/07388551.2022.2063106.
- [24] CZUMAJ A, ŚLEDZIŃSKI T. Biological role of unsaturated fatty acid desaturases in health and disease[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 356. DOI:10.3390/nu12020356.
- [25] GONZALEZ-ROVIRA A, MOURENTE G, IGARTUBURU J M, et al. Molecular and functional characterization of a SCD 1b from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 258: 110698. DOI:10.1016/j.cbpb.2021.110698.
- [26] PAULUCCI N S, DARDANELLI M S, DE LEMA M G. Biochemical and molecular evidence of a  $\Delta 9$  fatty acid desaturase from *Enstifer meliloti* 1021[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(5/6): 463-468. DOI:10.1016/j.micres.2013.08.003.
- [27] YIN D M, CUI D Q, JIA B. Construction of a high-efficient expression vector of  $\Delta 12$  fatty acid desaturase in peanut and its prokaryotical expression[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(1): 81-88. DOI:10.1016/s1673-8527(07)60009-5.
- [28] MATSUZAWA T, MAEHARA T, KAMISAKA Y, et al. Identification and characterization of *Pseudozyma antarctica*  $\Delta 12$  fatty acid desaturase and its utilization for the production of polyunsaturated fatty acids[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(6): 604-609. DOI:10.1016/j.jbiosc.2020.07.019.
- [29] QIAO K, ABIDI S H I, LIU H, et al. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 56-65. DOI:10.1016/j.ymben.2015.02.005.
- [30] PU Y, CAO Y, XIA N M, et al. Modification of fatty acid composition of *Escherichia coli* by co-expression of fatty acid desaturase and thioesterase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Bioengineering*, 2022, 9(12): 771. DOI:10.3390/bioengineering912077.
- [31] HALIM N F A A, ALI M S M, LEOW A T C, et al. Membrane-bound  $\Delta 12$  fatty acid desaturase (FAD12); from *Brassica napus* to *E. coli* expression system[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 180: 242-251. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.072.
- [32] THIYAGARAJAN S, KHANDELWAL P, SENTHIL N, et al. Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in *E. coli* using  $\Delta 5$ -desaturase gene from *Microalga isochrysis* sp.[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(3): 869-883. DOI:10.1007/s12010-020-03460-1.