

# 重组大肠杆菌全细胞转化马来酸高效合成富马酸

房月芹<sup>1</sup>, 周丽<sup>2</sup>, 刘文茂<sup>2</sup>, 周哲敏<sup>\*2</sup>

(1. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 重组 *Escherichia coli* 细胞催化马来酸合成富马酸时, 细胞中富马酸酶将产物富马酸转化成苹果酸, 转化率达 15.5%, 降低了富马酸的转化率和纯度。将 *E. coli* BL21 (DE3) 基因组中 *fumA*–*fumC* 基因敲除, 并高效表达马来酸顺反异构酶, 重组菌 BL21 (DE3)  $\Delta$ *fumA*–*fumC*/pET24a–*maiA* 经发酵罐培养, 可产生 64 g/L 菌体, 马来酸顺反异构酶表达量达 306 U/mL。按照 60 g/L 的发酵液: 2 mol/L 富马酸为 1:4 的体积比配置反应液, 37 °C 反应 1 h, 富马酸转化率高达 98.4%, 仅产生 0.7% 的苹果酸副产物。该结果为全细胞催化法合成富马酸的工业化奠定了基础。

**关键词:** 富马酸; 马来酸顺反异构酶; 全细胞催化; 苹果酸

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)12—1323—07

## Efficient Production of Fumarate from Maleate Using Recombinant *E.coli* as Whole Cell Biocatalyst

FANG Yueqin<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>2</sup>, LIU Wenmao<sup>2</sup>, ZHOU Zheming<sup>\*2</sup>

(1. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Fumarate could be produced from maleate with whole cell of recombinant *Escherichia coli*. However, malate, with a yield of 15.5%, was generated as byproduct by the cellular fumarase, resulting in a decreased fumarate yield and purity. The chromosomal genes, *fumA* and *fumC*, in *E. coli* BL21 (DE3) were inactivated, followed by over expression of the maleate *cis*–*trans* isomerase. After cultured in a bioreactor, the resulting strain BL21 (DE3)  $\Delta$ *fumA*–*fumC*/pET24a–*maiA* could generate 64 g/L dry cell weight and maleate *cis*–*trans* isomerase of 306 U/mL. With a volumetric ratio of fermentation broth (60 g/L dry cell weight): fumarate (2 mol/L)=1:4, fumarate yield of 98.4% and malate yield of 0.7% were produced after incubation at 37 °C for 1 h. These results laid a foundation for industrial production of fumarate by whole-cell biocatalyst.

**Keywords:** fumarate, maleate *cis*–*trans* isomerase, whole-cell biocatalysis, malate

富马酸(Fumaric acid), 又称反丁烯二酸、延胡索酸, 是一种天然存在的有机酸。作为一种重要的

收稿日期: 2015-07-08

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20130131, BK20130139); 江苏省产学研联合创新资金——前瞻性联合研究项目(BY2014023-21)。

作者简介: 房月芹(1969—), 女, 安徽砀山人, 理学硕士, 讲师, 主要从事微生物方面的研究。E-mail: yqfang2003@hotmail.com

\* 通信作者: 周哲敏(1969—), 男, 河北石家庄人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程方面的研究。

E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

四碳平台化合物和精细化工产品,富马酸广泛用于食品、医药、化工、涂料、增塑剂等领域<sup>[1]</sup>。例如,在食品方面,可用作口味纯正的酸味剂、风味增强剂。在医药方面,富马酸铁则广泛应用于医学上治疗人体的小红血球贫血病。

目前,工业上主要以顺丁烯二酸酐为原料通过化学转化的方法生产富马酸<sup>[2-3]</sup>。然而,化学转化过程需高温条件,化学反应平衡严格限制了转化率,反应过程中形成副产物影响富马酸的产量和产物的质量。以酶作为催化剂生产富马酸,具有反应条件温和、副产物少、特异性强、专一性高和转化率高等优点。马来酸顺反异构酶(EC 5.2.1.1, Maleate cis-trans Isomerase, MaiA)属于天冬氨酸、谷氨酸消旋酶超家族<sup>[4]</sup>,能够催化马来酸在碳碳双键不断裂的情况下异构化生成富马酸。其中,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)来源的马来酸顺反异构酶具有转化率高、pH 范围宽泛、 $K_m$  值较低等特点,是有望用于工业生产富马酸的生物催化剂之一<sup>[5]</sup>。作者所在实验室前期用 *Serratia marcescens* 来源的马来酸顺反异构酶的游离酶转化马来酸合成富马酸,转化率可达 99%<sup>[6]</sup>。进一步使用含有该酶的细胞进行生物催化反应,可避免游离酶提取和纯化成本高、稳定性低、回收利用困难等问题<sup>[7]</sup>。同时,全细胞催化只需对细胞进行培养就能获得大量的全细胞生物催化剂,通过简单的过滤或者离心就能对产品进行分离纯化<sup>[8]</sup>,简化了生物催化剂的制备步骤,在许多工业生物转化过程都得到应用。然而,细胞内

同时存在多种酶,全细胞生物转化工程中最严重的问题是会产生副产物<sup>[9]</sup>。例如用全细胞催化马来酸合成富马酸时,富马酸酶(又名延胡索酸水合酶)的存在导致富马酸被转化成 L-苹果酸,降低富马酸的转化率和纯度。Ichikawa 等<sup>[10]</sup>通过加热方法将产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)XD-1 中的富马酸酶失活,从而将 XD-1 全细胞转化合成富马酸的转化率由 69.8%提高为 95%。然而,加热易导致细胞裂解,释放复杂的细胞内含物质,影响产品质量。

作者敲除大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的 *fumA* -*fumC* 和 *fumB* 基因,减少富马酸到 L-苹果酸的代谢通路。以所获得的重组菌株为宿主,表达来源于 *Serratia marcescens* 的马来酸顺反异构酶。最终获得的重组细胞可高效转化马来酸底物合成高纯度富马酸,几乎不合成苹果酸副产物,为全细胞法催化马来酸生产富马酸的工业化提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与引物

菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/ pET-24a(+)-*maiA*、重组质粒 pET-24a(+)-*maiA*:由作者所在实验室构建和保藏<sup>[6]</sup>;质粒 pKD46(温度敏感型,含有阿拉伯糖启动子调控的 *gam*,*bet* 和 *exo* 基因,  $Amp^r$ )、pKD13 (含有 *FRT-kan-FRT* 突变盒,  $Kan^r$ )、pCP20 (温度敏感型,含有 FLP 重组酶,  $Amp^r$ ):购于耶鲁大学基因保藏中心<sup>[11]</sup>。

本研究所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in this study

| 名称          | 引物序列(5'→3')                                                                           |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| FumC-pKD13F | ATTCCACGGTGTCACCTGTATGTTGCAGATTAACGCCCGGCTTTCATACtgttaggctggagctgcttc <sup>a</sup>    |
| FumA-pKD13R | AACACCCGCCCAGAGCATAACCAAACCAGGCAGTAAGTGAGAGAACAATGatccggggatccgctgacc <sup>a</sup>    |
| FumB-pKD13F | GCATGCTGCCAGGCGCTGGGCCGAAGAGGTTACTTACTGTCAGTTTCGCGCAgtgtaggctggagctgcttc <sup>a</sup> |
| FumB-pKD13R | GGCAGCCATTTTCGAATAACAAATACAGAGTTACAGGCTGGAAGCTATGatccggggatccgctgacc <sup>a</sup>     |
| YfumCF      | AGTCCAACACGCCTGCCCTACAC                                                               |
| YfumAR      | AGCAAGAATCCTACGGGAAGTAACCTGG                                                          |
| YfumBF      | TCACCGGTGTCACCTCCATCAGC                                                               |
| YfumBR      | GTTGATTGCTGTGAGCGTATCGTGC                                                             |

a:小写字母表示与 pKD13 质粒同源碱基序列

1.2 主要试剂与培养基

ExTaq DNA 聚合酶:宝生物工程(大连)公司;质粒提取、纯化试剂盒、抗生素:生工生物工程(上

海)股份有限公司;马来酸、富马酸及其他试剂:国药化学试剂有限公司产品。

LB 培养基成分为(g/L):胰蛋白胍 10,酵母粉

5, NaCl 10。

摇瓶发酵培养基(g/L):甘油 10, 胰蛋白胨 12, 酵母粉 12,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  16.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6.1。

发酵罐种子培养基(g/L):LB 培养基。

发酵罐发酵培养基(g/L):甘油 8, 胰蛋白胨 2, 酵母粉 2,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.7,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.5;微量元素液 10 mL。

补料培养基(g/L):甘油 500, 胰蛋白胨 4, 酵母粉 4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.4。

微量元素成分为(g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.3,  $(\text{NH}_4)_2\text{M}_2\text{O}_{24}$  0.1,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  2, 溶于 1 mol/L HCl 溶液中。

### 1.3 重组菌株摇瓶发酵培养方法

-80℃冰箱保存的重组菌株在 LB 固体平板上划线活化,挑取 LB 平板上单菌落,接种至 5 mL 含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养 8 h。上述培养液以 1%的接种体积分数转接入 30 mL 含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的摇瓶发酵培养基,于 37℃恒温摇床中 200 r/min 培养至  $\text{OD}_{600}$  约为 2.2 时,加入乳糖至终质量浓度为 4 g/L,同时移至 20℃恒温摇床中进行诱导表达,200 r/min 继续培养 20 h。

### 1.4 重组菌株发酵罐发酵培养方法

**1.4.1 种子培养方法** 取-80℃冰箱的甘油管保藏物 200  $\mu\text{L}$  菌液接种于 30 mL 含有 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素抗性的 LB 培养基中,置于 37℃的恒温摇床中 200 r/min 培养 7.5 h。

**1.4.2 发酵罐培养方法** 5 L 发酵罐 (Winpact FS-02, Major Science, Saratoga, CA, USA) 初始装液量为 2 L。培养温度设定为 37℃,初始转速 200 r/min,通气量为 5 L/min,设定此时罐内初始溶解氧(DO) 100%。将种子培养液以 7%的接种体积分数接入发酵罐中,同时加入终质量浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的卡那霉素,将发酵罐的溶氧与转速相偶联,维持罐内溶氧浓度在 30%。接种约 5~6 h 后出现溶氧反弹现象,此时以指数流加补料策略补加补料培养基,控制菌体比生长速率( $\mu$ )为 0.25( $\text{h}^{-1}$ )。当  $\text{OD}_{600}$  达到 60 时,改变温度为 30℃,并以 0.22 g/(L·h) 的恒流速流加乳糖进行诱导。整个发酵用体积分数 25%的氨水维持 pH 在 7.2。

**1.4.3 指数补料控制策略** 发酵罐培养过程中,以甘油为限制性底物,根据以下公式<sup>[12]</sup>进行指数补料,控制恒定的比生长速率:

$$F(t) = \frac{\mu_{\text{set}} X_0 V_0 \exp(\mu_{\text{set}} t)}{Y_{\text{XS}}(S_f - S_0)}$$

其中, $F(t)$ 是补料速率(L/h); $X_0$ 和 $V_0$ 分别是分批补料初始阶段的细胞干重(g/L)和培养基体积(L); $\mu_{\text{set}}$ 是设定的比生长速率( $\text{h}^{-1}$ ); $t$ 为流加时间(h); $Y_{\text{XS}}$ 是细胞对底物的得率系数(g/g),其经验值为 0.46 g/g; $S_f$ 和 $S_0$ 分别是补料培养基和分批发酵结束后发酵罐中的甘油质量浓度(g/L)。实验中补料速率( $F$ )每 2 小时改变一次。

### 1.5 分析方法

**1.5.1 菌体量测定方法** 菌体密度采用浊度法间接测量,通过  $\text{OD}_{600}$  来表示,并换算为菌体干重(DCW)。取不同浓度的菌液,8 000 r/min 离心 10 min 去上清液,用去离子水洗涤 3 次,将菌体放于-80℃预冷冻 24 h,用冷冻干燥机处理 72 h,将干燥后菌体质量与对应的细胞密度绘制曲线,得到菌体干重(DCW)和  $\text{OD}_{600}$  的关系:1  $\text{OD}_{600}$ =0.408 3 g/L DCW。

### 1.5.2 全细胞马来酸顺反异构酶酶活测定方法

1) 细胞预处理方法:离心收集发酵液中的菌体,用 pH 8 的 66.7 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液洗涤 1 次。

2) 粗酶液制备方法:菌体洗涤后,用超声波破碎细胞,12 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。取 100  $\mu\text{L}$  适度稀释的菌液或粗酶液,加入 50  $\mu\text{L}$  1 mol/L 的马来酸溶液,用 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液将反应体系补充到 500  $\mu\text{L}$ ,于指定温度下保温 10 min。100℃煮沸 10 min,离心,取上清液稀释 50 倍,测定生成的富马酸含量。

酶活力单位定义:在上述反应条件下,每分钟转化生成 1  $\mu\text{mol}$  富马酸产物所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

相对酶活计算公式为:

$$Y_{\text{rel}} = \frac{Y}{Y_{\text{max}}} \times 100\%$$

其中, $Y_{\text{rel}}$ 是相对酶活(%); $Y$ 是本样品的酶活(U); $Y_{\text{max}}$ 是本次实验所有样品中最高的酶活(U)。

**1.5.3 马来酸、富马酸和苹果酸的测定方法** 马来酸、富马酸和苹果酸浓度用高效液相色谱(HPLC)法测定。HPLC 检测条件:色谱柱 Prevail Organic Acid



(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m ; Grace Davison Discovery Sciences), 流动相为 pH 2.5 的 25 mmol/L  $K_2HPO_4$  溶液, 流速 1 mL/min, 柱温 40  $^{\circ}C$ , 紫外检测器波长 210 nm, 进样量 10  $\mu$ L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 BL21 (DE3)/pET24a-*maiA* 全细胞转化马来酸合成富马酸

按照 BL21(DE3)/pET24a-*maiA* 发酵液:2 mol/L 富马酸为 1:4 的体积比配置反应液, 在 40  $^{\circ}C$  下反应 3 h。由图 1 可见, BL21(DE3)/pET24a-*maiA* 全细胞反应过程中, 底物马来酸主要转化为富马酸, 并积累苹果酸副产物, 导致目的产物富马酸的转化率和纯度降低, 不利于产品的应用。

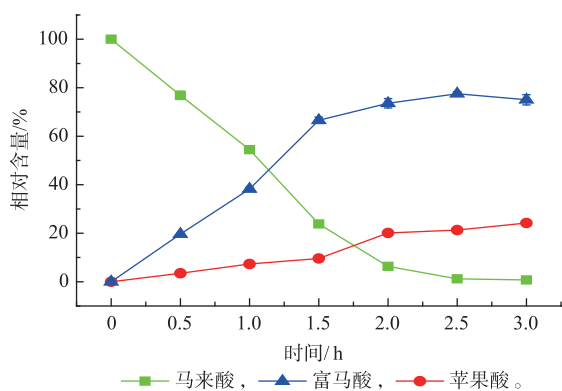


图 1 BL21(DE3)/pET24a-*maiA* 全细胞转化马来酸合成富马酸过程

Fig. 1 Biosynthetic process of fumarate from maleate by BL21(DE3)/pET24a-*maiA* cell

### 2.2 BL21 (DE3) $\Delta$ *fumA-fumC*/pET24a-*maiA* 和 BL21(DE3) $\Delta$ *fumB*/pET24a-*maiA* 菌株的构建

*E. coli* 的 TCA 循环中具有富马酸酶, 能够催化富马酸水合生成 L-苹果酸。富马酸酶有 3 个同工酶<sup>[13]</sup>, 分别是 FumA、FumB、FumC, 其中 FumA 在有氧条件下参与 TCA 循环的运行<sup>[14]</sup>; FumB 在厌氧条件下有功能<sup>[15]</sup>; FumC 是酶学性质和 FumA 类似的备用酶, 并且在胁迫环境中可以代替 FumA 行使功能<sup>[14]</sup>。因此, 为了保证富马酸产物的高效合成, 降低副产物的积累, 作者进一步将富马酸酶的编码基因敲除。*fumA* 和 *fumC* 基因在基因组中位于相邻的位置, 所以将这两个基因同时敲除, 保留 *fumB* 基因; 或者保留 *fumA* 和 *fumC* 基因, 敲除 *fumB* 基因, 以维持菌株生长。

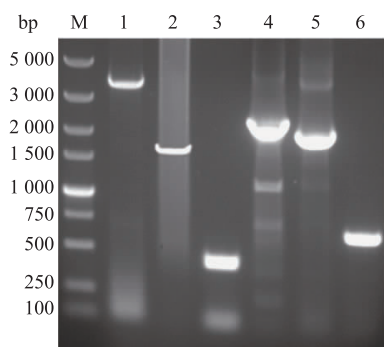
用 Datsenko 等<sup>[11]</sup>报道的基因删除方法, 分别将 BL21(DE3)染色体上的 *fumA-fumC* 和 *fumB* 基因删除。其具体过程为: 以 pKD13 质粒为模板, 分别用 FumC-pKD13F/FumA-pKD13R 引物和 FumB-pKD13F/FumB-pKD13R 引物进行 PCR 扩增, 得到两端为同源臂、中间为 *FRT-kan-FRT* 基因片段的线性同源重组片段(大小为 1 303 bp)。将同源重组片段分别电转入含有 pKD46 质粒的 BL21(DE3)菌株中, 借助 pKD46 质粒上的 Red 重组系统将同源重组片段整合于染色体上, 在卡那霉素抗性平板上筛选转化子。重组菌株 PCR 验证结果见图 2。出发菌株 BL21(DE3)、转化子 BL21(DE3)*fumA-fumC*::*FRTKm* 分别用 YfumCF/YfumAR 引物 PCR 扩增, 其电泳条带分别为 3 526 bp 和 2 036 bp; BL21(DE3)和 BL21(DE3)*fumB*::*FRTKm* 分别用 YfumBF/YfumBR 引物 PCR 扩增, 其电泳条带分别为 1 660 bp 和 1 716 bp, 表明 *fumA-fumC* 和 *fumB* 基因成功被 *FRT-kan-FRT* 片段替换。最后用 pCP20 质粒去除重组菌中的卡那霉素抗性基因, 转化子 BL21(DE3)*fumA-fumC*::*FRT* 和 BL21(DE3)*fumB*::*FRT* 分别用 YfumCF/YfumAR 引物和 YfumBF/YfumBR 引物 PCR 扩增, 其电泳条带为 438 bp 和 494 bp, 表明 *fumA-fumC* 和 *fumB* 基因已经被成功敲除。所获得的重组菌株分别命名为 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumA-fumC* 和 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumB*。

进一步将 pET24a-*maiA* 质粒分别转化到 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumA-fumC* 和 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumB* 菌株中, 分别获得 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumA-fumC*/pET24a-*maiA* 和 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumB*/pET24a-*maiA* 菌株。

### 2.3 *fumA-fumC* 和 *fumB* 基因删除对全细胞催化过程中苹果酸积累量的影响

收集 BL21(DE3)/pET24a-*maiA*、BL21(DE3)  $\Delta$ *fumA-fumC*/pET24a-*maiA* 和 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumB*/pET24a-*maiA* 菌体, 并用 pH 8 的 66.7 mmol/L  $Na_2HPO_4-KH_2PO_4$  缓冲液重悬至  $OD_{600}=10$ 。取菌液各 1 mL, 加入 4 mL 500 mmol/L 的马来酸溶液中, 在 40  $^{\circ}C$ 、pH 8 条件下反应 10 min。如表 2 所示, 菌株 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumB*/pET24a-*maiA* 的反应液中, 苹果酸副产物的积累量与出发菌株相似, 而菌株 BL21(DE3)  $\Delta$ *fumA-fumC*/pET24a-*maiA* 仅产生了少量的苹果酸副产物。因此, *fumA-fumC* 基因是全细胞催化反应过程中苹果酸合成的主要途径, BL21(DE3)

$\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  菌株更适合应用于全细胞催化马来酸合成富马酸。



M:DL 5 000 marker;1: 菌株 BL21 (DE3) 用引物 YfumCF/YfumAR PCR 扩增条带;2: 菌株 BL21 (DE3) $fumA-fumC::FRTKm$  用引物 YfumCF/YfumAR PCR 扩增条带;3: 菌株 BL21 (DE3) $fumA-fumC::FRT$  用引物 YfumCF/YfumAR PCR 扩增条带;4: 菌株 BL21 (DE3)用引物 YfumBF/YfumBF PCR 扩增条带;5: 菌株 BL21 (DE3) $fumB::FRTKm$  用引物 YfumBF/YfumBF PCR 扩增条带;6: 菌株 BL21 (DE3) $fumB::FRT$  用引物 YfumBF/YfumBF PCR 扩增条带。

图 2 基因敲除菌株 PCR 验证电泳图

Fig. 2 PCR identification of the deletion strains

表 2 苹果酸副产物积累量的比较

Table 2 Comparison of malate byproduct

| 菌株                                           | 苹果酸浓度/(mmol/L) | 马来酸浓度/(mmol/L) | 富马酸浓度/(mmol/L) |
|----------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| BL21/pET24a- <i>maiA</i>                     | 71.6           | 3.2            | 325.2          |
| BL21 $\Delta fumB$ /pET24a- <i>maiA</i>      | 70.5           | 3.2            | 326.3          |
| BL21 $\Delta fumA-fumC$ /pET24a- <i>maiA</i> | 8.56           | 3.2            | 388.3          |

## 2.4 菌株 BL21 (DE3) $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$ 发酵罐发酵性能

进一步将 BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  菌株在 5 L 罐发酵中培养,考察其菌体生长与马来酸顺反异构酶合成性能。由图 3 可知,发酵培养最高可获得干重达 64 g/L 的菌体细胞,最高酶活可达 306 U/mL。表明基因敲除后仍可实现菌体和马来酸顺反异构酶的高效合成,显示出大规模应用的潜力。

## 2.5 BL21 (DE3) $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$ 菌全细胞催化的最适温度和 pH 优化

BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  的菌体分别在 pH 8、不同温度下以 100 mmol/L 马来酸为底物催化 10 min,测定相对酶活。细胞催化马来

酸合成富马酸的活性随温度升高而升高,当温度升高到 50 ℃时达到最大催化能力,之后随温度升高酶活很快下降,见图 4(a)。

BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  菌体分别在 50 ℃、不同 pH 下测定相对酶活。由图 4(b)可知,溶液 pH 对全细胞催化活性影响不大,在 pH 8.3 时获得最高酶活。这可能是因为外界 pH 的改变对胞内环境影响较小,导致细胞对马来酸催化活性不受显著影响。

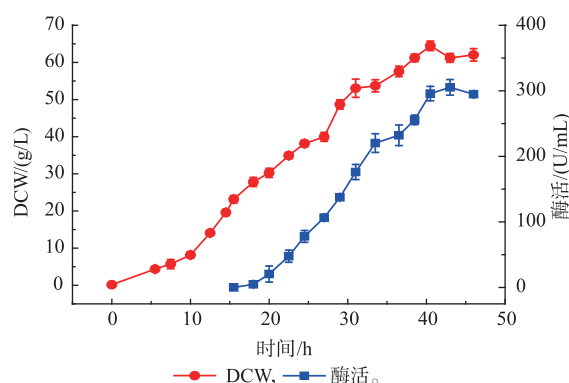


图 3 菌株 BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  5 L 发酵罐发酵菌体生长及产酶曲线

Fig. 3 Growth and enzyme production status of BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  in 5 L bioreactor

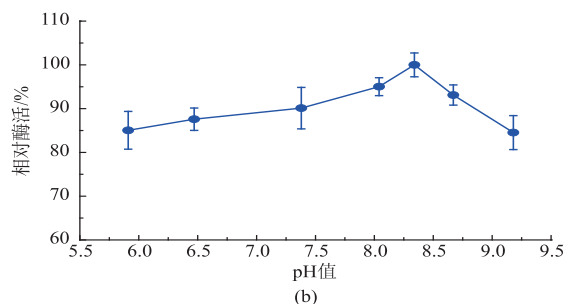
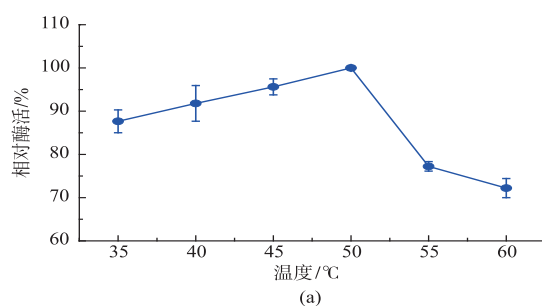


图 4 BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  全细胞催化最适温度和 pH

Fig. 4 Optimum temperature and pH of BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$

## 2.6 BL21 (DE3) $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$ 全细胞催化的稳定性

如果将全细胞应用于工业化富马酸的生产,为产品纯度和提纯工艺考虑,菌液添加量不宜过大,底物浓度应尽量增大,这就需要延长细胞催化时间。而大肠杆菌细胞在高温条件下易裂解,因此对细胞的温度稳定性进行考察。由图 5 可以看出,在大肠杆菌最适生长温度 37 °C 下保温 10 h 后,细胞依然保留 75% 的初始酶活性;而在细胞最适催化温度 50 °C 下保温 3 h 后,细胞仅具有 25% 的初始酶活性,所以 37 °C 更适宜工业化的长时间催化。此外,细胞在 37 °C 时的催化活性可达 50 °C 下的 90%,并且比 50 °C 高温条件的能耗低,因此,37 °C 下进行全细胞反应更为适宜。

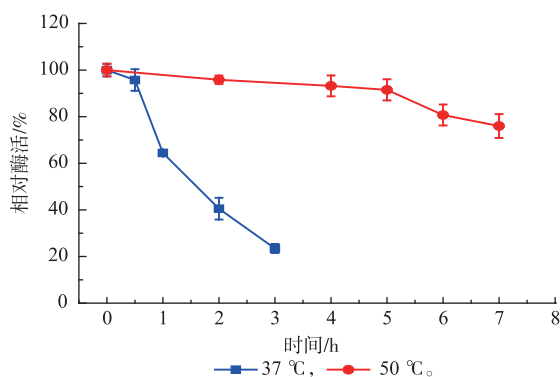


图 5 BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  细胞在 37 °C 和 50 °C 下稳定性比较

Fig. 5 Stability of BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  at 37 °C and 50 °C

## 2.7 BL21 $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$ 全细胞催化马来酸生产富马酸的性能

重组菌株经 5 L 罐发酵培养,按照发酵液(菌体

细胞干重为 60 g/L):2 mol/L 富马酸体积比为 1:4 配置反应液,在 37 °C 下催化 1 h。由表 3 可见,原始菌株苹果酸副产物积累量达 0.25 mol/L,仅产生 1.34 mol/L 的富马酸,富马酸摩尔转化率仅为 84%;BL21  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  则仅生成 0.011 mol/L 的苹果酸,富马酸的合成量提高为 1.57 mol/L,富马酸转化率提高为 98.4%,高于 Ichikawa 等<sup>[10]</sup>用产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*) XD-1 进行全细胞催化的结果(富马酸产量为 0.49 mol/L,富马酸对马来酸的转化率 95%)。

表 3 细胞催化马来酸合成富马酸性能比较

Table 3 Comparison of whole-cell biocatalysis of fumarate from maleate

| 菌株                                  | 苹果酸<br>转化率/% | 马来酸<br>转化率/% | 富马酸<br>转化率/% |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| BL21/pET24a-maiA                    | 15.5         | 0.79         | 84           |
| BL21 $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$ | 0.7          | 0.8          | 98.4         |

## 3 结 语

作者用 Red 重组方法对 *E. coli* BL21 (DE3) 进行改造,分别敲除基因组中的 *fumA-fumC* 以及 *fumB* 基因,表明 *fumA-fumC* 基因编码的代谢途径是全细胞催化马来酸合成富马酸过程中副产物苹果酸合成的主要途径。重组菌株 BL21 (DE3)  $\Delta fumA-fumC/pET24a-maiA$  经发酵罐培养可实现菌体(64 g/L)和马来酸顺反异构酶的高效合成(306 U/mL)。该发酵液可将 1.6 mol/L 的马来酸转化为 1.57 mol/L 富马酸,富马酸转化率提高到 98.4%,而苹果酸的转化率仅为 0.7%,显示出较好的工业应用潜力。

## 参考文献:

- [1] ROA ENGEL C A, STRAATHOF A J J, Zijlman T W, et al. Fumaric acid production by fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3): 379-389.
- [2] 关共凑, 黄耀威. 由糠醛合成富马酸[J]. 广州化工, 2001, 29(2): 20-22.  
GUAN Gongcou, HUANG Yaowei. Synthesis of fumaric acid from furfural [J]. *Guang Zhou Chemical Industry and Technology*, 2001, 29(2): 20-22. (in Chinese)
- [3] 苏秋芳, 陈少华. KBr-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 催化顺酐异构化合成富马酸[J]. 化学试剂, 2001, 23(2): 120-121.  
SU Qiufang, CHEN Shaohua. Synthesis of fumaric acid by isomerization of maleic anhydride with KBr-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as catalyst [J]. *Chemical Reagents*, 2001, 23(2): 120-121. (in Chinese)
- [4] YASUO K, JINSAKU Y, YASUHISA A. Maleate cis-trans isomerase from *Arthrobacter* sp. TPU 5446 [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 80(6): 610-612.

- [5] KAZUHISA H, MAKOTIO G, ASUKAZI U, et al. Molecular analysis of maleate *cis-trans* isomerase from thermophilic bacteria [J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2000, 64(3): 569-576.
- [6] 王亚, 崔文璟, 周丽, 等. 粘质沙雷氏菌马来酸顺反异构酶表达纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(11): 1204-1209.  
WANG Ya, CUI Wenjing, ZHOU Li, et al. Purification and characterization of maleate *cis-trans* isomerase from *Serratia marcescens* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(11): 1204-1209. (in Chinese)
- [7] ISHIGE T, HONDA K, SHIMIZU S. Whole organism biocatalysis [J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2005, 9(2): 174-180.
- [8] RICHTER N, NEUMANN M, LIESE A, et al. Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing glycerol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and its application in the synthesis of L-glyceraldehyde [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2010, 106(4): 541-552.
- [9] NIKOLOVA P, WARD O P. Whole-cell biocatalysis in nonconventional media [J]. **Journal of Industrial Microbiology**, 1993, 12(2): 76-86.
- [10] ICHIKAWA S, IINO T, SATO S, et al. Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1 [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2003, 13(1): 7-13.
- [11] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [12] LEE S Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* [J]. **Trends in Biotechnology**, 1996, 14(3): 98-105.
- [13] WOODS S A, SCHWARTZBACH S D, GUEST J R. Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1988, 954(1): 14-26.
- [14] PARK S J, GUNSALUS R P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*-role of the *arcA*, *fur*, and *soxR* gene-products [J]. **Journal of Bacteriology**, 1995, 177(21): 6255-6262.
- [15] TSENG C P. Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability; role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1997, 157(1): 67-72.

## 科技信息

### 美国 FDA 将重新定义食品标签中“健康的”声明

2016 年 9 月 27 日, 美国 FDA 宣布已启动一项公共进程, 重新定义食品标签中“健康的”营养成分声明。在此期间, 食品生产商在满足现行法规定义的情况下可以继续使用该字眼。FDA 还发布过一份指南文件, 表明在某些条件下, 不必满足法规要求也可以使用该字眼。

各种营养素的公共健康建议已进步, 体现在 2015-2020 美国人膳食指南和更新的营养成分标签。例如, 健康的饮食结构目前聚焦于食物组别、脂肪类型而不是食用脂肪的总量, 以及减肥餐中添加的糖。此外, 消费者摄入不足的与公共健康相关的营养素也发生了变化。FDA 目前通过“信息请求”向公众征求重新定义“健康的”的意见, 后续计划通过其他公共论坛收集更多的意见。

[信息来源] 厦门 WTO 工作站. 美国 FDA 将重新定义食品标签中“健康的”声明 [EB/OL]. (2016-9-29). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=52588>