

共表达抗氧化酶促进脂肪氧合酶在大肠杆菌中的表达

邱芳芳^{1,2}, 刘松^{1,2}, 堵国成^{*1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 基于脂肪氧合酶(LOX)活性对宿主菌潜在的危害,分别共表达了超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,以期提高铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* BBE 来源的 LOX 在大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) 中的表达。将 *P. aeruginosa* BBE 超氧化物歧化酶基因 *sodB* 和 *sodM* 及 *E. coli* 过氧化氢酶基因 *katE* 克隆至 pRSFDuet-1, 分别得到表达质粒 pRSF-*sodB*, pRSF-*sodM* 和 pRSF-*katE*, 将上述表达质粒转化至表达 LOX 的重组大肠杆菌 N6, 得到菌株 N6-B, N6-M 和 N6-K。在 20 °C 和 1 mmol/mL 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)条件下诱导 70 h, N6-B、N6-M 和 N6-K 胞内外 LOX 总酶活分别为 21.6、28.1 和 7.1 U/mL, 其中 N6-B 和 N6-M 较对照菌株 N6(11.8 U/mL)提高了 83% 和 138%。通过正交实验确定 LOX 较优的诱导表达条件为: IPTG 浓度 2 mmol/mL, 诱导菌体浓度(OD₆₀₀)2.5, 诱导温度 20 °C。研究表明: 共表达超氧化物歧化酶能有效促进 LOX 在大肠杆菌中的表达, 为该酶高效异源表达研究提供了新思路。

关键词: 脂肪氧合酶; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 大肠杆菌; 共表达; 正交试验

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)10-0023-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.004

Enhanced Expression of Lipoygenase in *Escherichia coli* by Co-Expressing Antioxidases

QIU Fangfang^{1,2}, LIU Song^{1,2}, DU Guocheng^{*1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Based on the potential hazards of lipoygenase (LOX) activity to host strain, three antioxidantases (two superoxide dismutases and a catalase) are respectively co-expressed to improve the expression of lipoygenase expression in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). The superoxide dismutase genes (*sodB* and *sodM*) from *P. aeruginosa* BBE and catalase gene (*katE*) from *E. coli* are cloned into expression plasmid pRSFDuet-1, yielding the plasmids pRSF-*sodB*, pRSF-*sodM* and pRSF-*katE*. The recombinant plasmids are transformed into N6 (a LOX expressing strain generated by *E.*

收稿日期: 2017-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401638); 江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2016629)。

* 通信作者: 堵国成(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、发酵过程优化与控制等领域的研究。

E-mail: gedu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 邱芳芳, 刘松, 堵国成, 等. 共表达抗氧化酶促进脂肪氧合酶在大肠杆菌中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 23-29.

coli) to obtain strains N6-B, N6-M and N6-K, respectively. Under the induction with 1 mmol/mL IPTG at 20 °C, the total LOX activities of N6-B, N6-M and N6-K reach 21.6, 28.1 and 7.1 U/mL respectively. The yield of LOX in N6-B and N6-M is increased by 83% and 138% in contrast to N6 (11.8 U/mL), respectively. The optimized induction by using orthogonal test is as follow: OD₆₀₀=2.5, IPTG=2 mmol/mL, and inducing temperature is 20 °C. The results show that the co-expression of superoxide dismutases could effectively improve the expression of LOX in *E. coli*, which provides a new idea for efficient heterologous expression of this enzyme.

Keywords: superoxide dismutase, catalase, lipoygenase, *Escherichia coli*, co-expression, orthogonal test

脂肪氧合酶(EC1.13.11.12, LOX)是一类能够专一催化多元不饱和脂肪酸(含顺-1,4-戊二烯结构)形成具有共轭双键的脂肪酸氢过氧化物的酶^[1-2]。此类酶分子一般含有非血红素铁。LOX作为一种无毒无害的生物制剂,可替代溴酸钾和苯甲酰过氧化物等化学增白剂提高面粉白度。此外,LOX能够改善面粉筋力,改善面团的水合力,增加面包体积,改善面包质构。LOX催化不饱和脂肪酸的氧化产物可进一步转化为己醇、己醛、壬烯醛等风味化合物。

目前商业化的LOX产品由大豆提取。然而,由于大豆中存在多种同工酶,提取法获得的LOX产品批次稳定性差,不利于最终产品质量的控制和大规模应用。目前,大豆、豌豆、人、猪等真核细胞生物来源的LOX已经在大肠杆菌,毕赤酵母或酿酒酵母中获得活性表达,但胞内产酶水平最高仅为4.5 U/mL。最近的报道显示,鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC 7120) LOX在枯草芽孢杆菌中成功表达,但按标准酶活力定义计算,其胞外LOX产量仅为0.01 U/mL^[2]。本文作者所在团队将铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* BBE)来源的LOX基因至大肠杆菌(*Escherichia coli*),首次实现了LOX在大肠杆菌中的高效分泌^[1]。

一般认为,导致重组LOX的总体表达水平不高的主要原因可能是活性LOX产生的氧自由基会对宿主细胞产生毒性,进而抑制宿主细胞的生长和重组蛋白合成及分泌^[1]。为降解活性氧中间体,细菌会产生超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)来消除活性氧中间体对细胞的毒害^[3-6]。本研究通过共表达*P. aeruginosa* BBE来源SOD(*sodB*, *sodM*)和*E. coli*来源的CAT(*katE*),以期降低LOX表达对细胞的毒性,进一步提高其在大肠杆菌中的表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 *E. coli* Rosetta(DE3)(pET-22b(+)/*pre-LOXlox1*)(N6)为分泌表达*P. aeruginosa* BBE来源LOX的重组*E. coli* Rosetta(DE3)^[1]。pRSFDuet-1为表达载体。*E. coli* JM109分别用于基因克隆。

1.1.2 培养基 LB培养基:蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,NaCl 10 g/L。

发酵培养基(TB培养基):蛋白胨12 g/L,酵母提取物24 g/L,甘油4 mL/L, K₂HPO₄ 72 mmol/L, KH₂PO₄ 17 mmol/L,诱导时培养基中添加终浓度为1 mmol/L的IPTG和1.5%(V/V)的吐温20。

1.1.3 试剂 Taq DNA聚合酶, T4 DNA连接酶,限制性内切酶, DNA和蛋白Marker等购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒抽提试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。DNA凝胶回收试剂盒, PCR产物纯化试剂盒购自赛默飞世尔科技公司,亚油酸为Sigma-Aldrich公司产品。引物由深圳华大基因科技有限公司合成。其余常用试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因的PCR扩增 设计合成分别带有Not I和Xho I两种酶切位点的SodB、SodM、CAT引物。以*P. aeruginosa* BBE基因组为模板,以P1和P2为上下游引物扩增5'端带有Not I和3'端带有和Xho I两种酶切位点的sodB基因;以P3和P4为上下游引物,扩增5'端和3'端分别带有Not I和Xho I两种酶切位点的sodM基因。以大肠杆菌JM109基因组为模板,以P5和P6为引物,扩增5'端和3'端分别带有Not I和Xho I两种酶切位点的katE基因。

PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence

引物名称	引物序列 (5'-3')
P1	TTGCGGCCGCAGAAGGAGATATACCATGGCTTTC GAATTGCCGC
P2	CCCTCGAGGGCAGCGAAATTCTTCGCTAC
P3	TTGCGGCCGCAGAAGGAGATATACCATGCCCCAC GCCTTGCCGC
P4	CCCTCGAGGGCCAGGGCTTGCGCATAG
P5	TTGCGGCCGCAGAAGGAGATATACCATGTGCGAA CATAACGAAAAG
P6	CCCTCGAGCGCCGGAATTTTGTCAATCTTAG

1.2.2 表达载体的构建及转化 将上述 PCR 产物分别克隆至 pRSFDuet-1 上的 *Not* I 和 *Xho* I 之间,分别构建得到表达 *sodB*, *sodM* 和 *katE* 的重组质粒 pRSF-*sodB*, pRSF-*sodM* 和 pRSF-*katE*, 3 个质粒分别转化 *E. coli* Rosetta (DE3) (pET-22b (+)/pre-LOXlox1) 感受态细胞, 冰浴 30 min, 42 °C 热激 90 s, 再加入 1 mL LB 培养基 37 °C 振荡培养 1 h, 涂布 LB 平板 (含 50 μg/mL 氨苄霉素, 10 μg/mL 卡那霉素和 34 μg/mL 氯霉素), 置于 37 °C 培养箱中培养 12 h。挑取若干 LB 平板单菌落分别接种于 3 mL LB 液体培养基中 (含 50 μg/mL 氨苄霉素, 10 μg/mL 卡那霉素和 34 μg/mL 氯霉素), 培养 12 h, 用质粒抽提试剂盒提取质粒, 用表 1 中的引物进行 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 以验证各质粒是否已转化成功, 并进行测序。PCR 产物纯化和凝胶回收按试剂盒说明书进行操作, 基因的酶切和连接按试剂说明书进行操作。

1.2.3 共表达 N6-B, N6-M 和 N6-K 菌株的诱导表达 将表达质粒 pRSF-*sodB*, pRSF-*sodM* 和 pRSF-*katE* 转化至表达 LOX 的重组大肠杆菌 N6, 分别得到菌株 N6-B, N6-M 和 N6-K。从固体培养基上挑取原始菌株 N6 及 N6-B, N6-M 和 N6-K 的单菌落, 分别接种于装有 20 mL LB 的 250 mL 三角瓶中, N6 培养基中加入 50 μg/mL 氨苄霉素 (终浓度) 和 34 μg/mL 氯霉素 (终浓度), N6-B, N6-M 和 N6-K 的培养基中加入 50 μg/mL 氨苄霉素 (终浓度), 34 μg/mL 氯霉素 (终浓度) 和 10 μg/mL 卡那霉素 (终浓度), 于 37 °C 和 200 r/min 培养过夜, 按 1% 接种量接入装有 50 mL LB 的 500 mL 三角瓶中, 37 °C, 200 r/min 培

养至 OD₆₀₀ 至 0.6 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 和终浓度为 1.5% 的吐温 20, 20 °C 诱导 70 h^[7]。

1.2.4 诱导条件优化 外源基因在工程菌中的诱导表达受到很多因素例如菌株类型, 目的基因密码子优化, 载体类型, 培养基, 诱导条件 (如诱导剂类型和浓度, 诱导时间, 诱导温度) 等的影响, 因此确定还原酶在 N6 中表达的优化条件对提高 LOX 最终产量具有重要意义^[8]。根据第一步的实验结果, 选取 LOX 酶活最高的 N6-M 重组菌株, 由于 N6-M 中的两个质粒均为 T7 启动子, 所以选取诱导剂浓度和诱导时菌体浓度两个因素。采用 L₁₂ (4¹ × 3¹) 正交表, 选定诱导时异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 浓度和菌体浓度 (OD₆₀₀) 作为考察因子。其中 IPTG 的浓度为 4 水平, OD₆₀₀ 为 3 水平, 进行正交试验。实验以诱导 30 h 胞内 LOX 酶活为评价指标, 实验因素水平设置如表 2 所示, 选择最佳条件和水平。

表 2 诱导条件正交因素水平表

Table 2 Orthogonal factor levels of induction conditions

水平	因素	
	A (IPTG/(mmol/L))	B (OD ₆₀₀)
1	0.5	0.5
2	1.0	1.5
3	1.5	2.5
4	2.0	—

1.2.5 重组菌株生长测定 将各共表达菌株和对照菌株接种至含有相应抗生素的 LB 液体培养基, 200 r/min, 采用比浊法 (OD₆₀₀) 测定菌体生长。

1.2.6 酶活检测 LOX 酶活测定: 在 25 °C 下和 234 nm 条件下以亚油酸为底物, 使用 Shimadzu UV-2450 分光光度计在线测定吸光值的变化, 以吸光值变化曲线稳定上升部分的斜率计算酶活^[7]。LOX 酶活单位定义: 25 °C 下每分钟催化亚油酸形成亚油酸氢过氧化物 (HPOD, ε=25 000 L/(mol·cm)) 1 μmol 所需要的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

SOD 酶活测定: 邻苯三酚在碱性条件下的自氧化反应生成红橘酚, 同时有 O₂⁻ 产生, 邻苯三酚的自氧化速率与 O₂⁻ 的浓度有关; SOD 能通过催化 O₂⁻ 发生歧化反应得到 H₂O₂ 和 O₂, 来抑制邻苯三酚的自氧化; 检测邻苯三酚自氧化速率的抑制率, 可得知样品中的 SOD 的含量; 故, 使用 Shimadzu UV-2450 分光光度计测定在 25 °C 条件下邻苯三酚在 325 nm 处吸光值变化曲线的斜率, 计算酶活^[6]。酶活单位定

义:25 ℃时抑制邻苯三酚自氧化速率 50%时所需要的 SOD 酶量为一个酶活力单位(U)。

CAT 酶活测定:在 240 nm 波长下 H_2O_2 有强烈吸收;过氧化氢能被过氧化氢酶分解,从而反应溶液的吸光值(A_{240})随反应时间下降,使用 Shimadzu UV-2450 分光光度计测定该反应体系在 25 ℃条件下 240 nm 处的吸光值变化,以吸光值变化拟合斜率,计算酶活^[6]。酶活单位定义:使 0.1 mol/L H_2O_2 在 1 min 内 A_{240} 减少 0.1 的酶量为一个酶活单位(U)。

为了分析重组菌中 SOD 和 CAT 的表达情况,将不同时间点取的样品离心收集菌体,用 pH 7.5 的 PBS 缓冲液漂洗一遍后重悬,超声破碎,离心去上清得到胞内可溶物质。破碎后上清液检测 SOD 和 CAT 的酶活性。

1.2.7 SDS-PAGE 分析 将不同诱导时间的发酵液离心,0.5 mL 的菌体用磷酸缓冲液(PBS,pH 7.5)漂洗一遍,然后用 1.5 mL PBS 悬浮,超声破碎 10 min,

离心取上清。破碎后的胞内可溶物质和发酵液上清一起进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 重组质粒 pRSF-sodB, pRSF-sodM, pRSF-katE 的构建

研究显示,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶可以降解细胞内的活性氧中间体^[3-6]。为考察抗氧化酶对 LOX 表达的影响,将 PCR 扩增得到的 *P. aeruginosa* BBE 超氧化物歧化酶基因 *sodB* 和 *sodM* 以及 *E. coli* 过氧化氢酶基因 *katE* 克隆至 pRSFDuet-1,分别得到表达质粒 pRSF-sodB, pRSF-sodM 和 pRSF-katE(图 1)。重组的 pRSF-sodB、pRSF-sodM、pRSF-katE 经双酶切后可以分别得到约 600、600 bp 和 2 400 bp 的 DNA 片段。测序结果显示 DNA 序列无突变,证明重组表达载体构建成功,抗性平板上长出的即为阳性克隆。

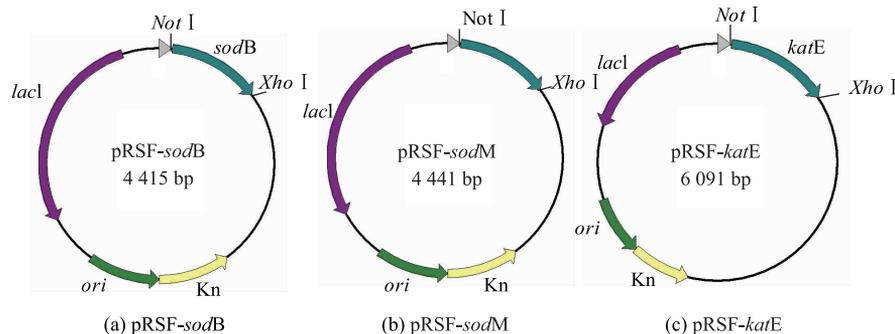


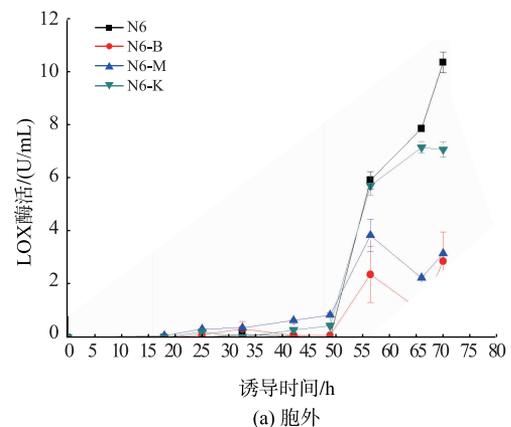
图 1 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids

2.2 抗氧化酶共表达对 LOX 表达的影响

将构建得到的抗氧化酶表达质粒 pRSF-sodB, pRSF-sodM 和 pRSF-katE(图 1)转化 LOX 表达菌 N6,分别得到重组菌 N6-B、N6-M 和 N6-K。将重组菌进行摇瓶发酵,IPTG 诱导 70 h。如图 2 所示,诱导 70 h 后,N6、N6-B、N6-M 和 N6-K 胞外 LOX 酶活分别为 10.3,2.9,3.1 和 7.1 U/mL,胞内 LOX 酶活分别为 1.5,18.7,25.0 和 0 U/mL。因此,N6-B、N6-M 和 N6-K 诱导 70 h 的 LOX 总酶活分别为 11.8,21.6,28.1 和 7.1 U/mL,其中,N6-B 和 N6-M 的 LOX 酶活分别较对照菌株 N6 分别提高的 1.8 和 2.4 倍,N6-K 较对照菌株 N6 下降 40%,值得注意的是,当 IPTG 诱导 32 h,N6-M 中胞内 LOX 酶活达到最大值 27.2 U/mL,是 N6 胞内 LOX 酶活的 3.1 倍。

结果表明:共表达超氧化物歧化酶能有效促进胞内 LOX 的高效合成,但降低了其向胞外分泌;共表达过氧化氢酶(katE)抑制了重组菌表达与分泌 LOX。



(a) 胞外

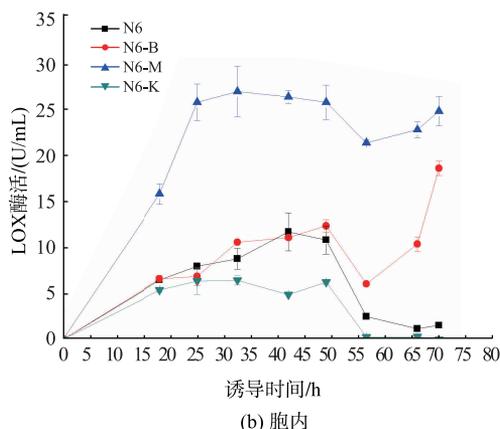
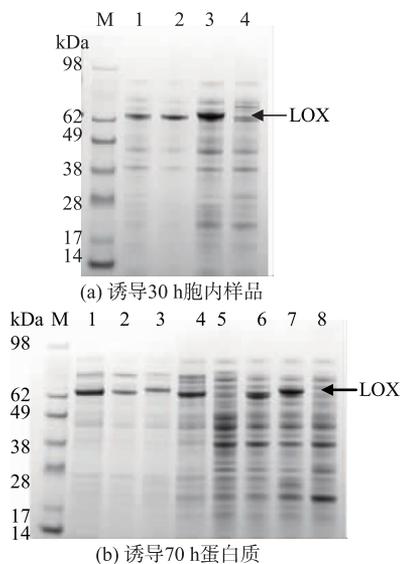


图2 重组菌发酵产 LOX

Fig. 2 Fermentation production of the LOX by the recombinant strains

为进一步分析 LOX 在重组菌 N6-B、N6-M 和 N6-K 中的表达情况,对其胞内可溶物质和发酵液上清液进行 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示,诱导表达 32 h 和 70 h 后,N6、N6-B、N6-M 和 N6-K 胞内均存在 70 kDa 条带,与 LOX 的理论分子量一致^[1]。其中,N6-M 的 LOX 条带明显较对 N6 相应条带增粗,与酶活测定结果一致(图 3)。此外,在胞内样品中未见 SodB (21 kDa)、SodM (22 kDa) 和 CAT (84 kDa) 蛋白条带,可能这几种酶表达量不高或者表达后被快速降解。



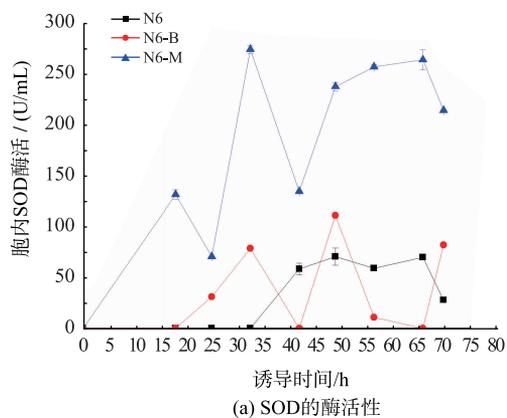
注:1:N6;2:N6-B;3:N6-M;4:N6-K;5:N6;6:N6-B;7:N6-M;8:N6-K

图3 SDS-PAGE 电泳分析 LOX 与抗氧化酶的共表达

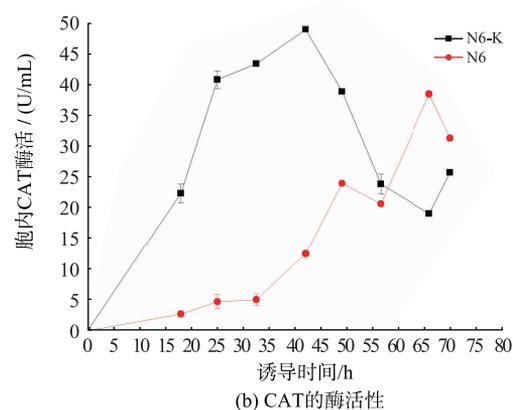
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the co-expression of LOX and antioxidantase

2.3 重组菌胞内抗氧化酶活分析

为了分析重组菌中抗氧化酶的表达情况,测定了破碎后上清液检测 SOD 和 CAT 活性。如图 4(a) 所示,N6-B 和 N6-M 胞内 SOD 酶活波动较大,但总体上 N6-M 中 SOD 的酶活明显高于 N6-B 和 N6; N6-B 中 SOD 酶活总体水平较 N6 未见明显提高,但其酶活较 N6 出现更早。研究表明,SOD 的表达受环境中 K^+ 和 Ca^{2+} 影响较大^[3],整个发酵周期中伴随着大肠杆菌的生长和裂解,环境中的离子浓度会随着菌体变化产生一些波动可能引起了 N6-B 和 N6-M 中 SOD 酶活波动。因此,SOD 胞内活性的增加可能是 LOX 大量累积的重要原因。由图 4(b)可知,在诱导前期 N6-K 中 CAT 酶活显著提高,表明 CAT 在 N6 中也得到了活性表达。但是,N6-K 与 N6 中胞内 LOX 酶活未见明显差异,胞外酶活有所下降。这说明 CAT 活性未对 LOX 的表达产生明显促进作用,可能表达 CAT 加重重组菌株表达外源蛋白质的负担^[9]。



(a) SOD 的酶活性



(b) CAT 的酶活性

图4 重组菌胞内抗氧化酶活

Fig. 4 Antioxidase activity in recombinant strains

2.4 诱导条件的优化

重组蛋白的表达水平在一定范围内与工程菌的生长具有一定的关联性,其依赖于培养温度、培养基组成、IPTG 的浓度和诱导时间等因素^[9]。因此,确定重组菌株的诱导条件对 LOX 的最终产量和工业化生产具有重要意义。根据第一步的实验结果,选择 LOX 酶活力最高的 N6-M 重组菌株作为优化对象,由于 N6-M 中的两个质粒均为 T7 启动子,同时 IPTG 存在着潜在的毒性,所以选取诱导剂浓度和诱导时菌体浓度两个因素。由于诱导 30 h 胞内 LOX 已经大量积累,所以检测诱导 30 h 细胞破碎后上清中 LOX 酶活作为实验的判断标准。正交试验结果如表 3 所示。

分析正交试验得出以下结论:1)由极差大小可以直观判断出各因素对 LOX 酶活的影响主次顺序为:诱导时菌体浓度(A)>IPTG 终浓度(B)。蛋白的表达依赖于足够量和生长旺盛的菌体,所以重组菌的生长和蛋白的表达在时间上存在差异^[8]。重组菌的数量不足,即菌株处于对数期前期及对数期前,能够表达重组蛋白的菌体不足,重组蛋白的表达量会受到较大影响。2)N6-M 发酵产 LOX 的因素最佳

条件组合为:诱导时菌体浓度(OD_{600})2.5+ IPTG 终浓度 2.0 mmol/L(即 A3B4),胞内 LOX 酶活为 28.8 U/mL,较优化前(诱导 OD_{600} =0.6,IPTG=1 mmol/L)提高 5.88%。

3 讨论

作为典型的过氧化物酶,LOX 在工业生产中的应用受到人们的日益关注。LOX 可以对面粉进行漂白,改善面粉筋力,改善面团的水合力,提高面团强度和增加食物风味,大豆提取的 LOX 各批次之间会有较大差异,因此利用大肠杆菌表达 LOX 是工业化生产稳定的 LOX 的重要基础。来源于动物,植物等真核生物的 LOX 基因在大肠杆菌^[10]、酵母、曲霉等系统中实现了表达。原核 LOX 基因研究较少,仅 *Cyanobacterium*、*N. punctiforme* 及 *P. aeruginosa* 在大肠杆菌系统中得到表达^[11]。酵母系统中研究者利用信号肽使 LOX 分泌到胞外,简化了下游操作,但产量十分有限;枯草芽孢杆菌中 LOX 胞外产量仅有 0.01 U/mL^[12-13],Steczko 在 *E. coli* 表达系中实现了大豆 LOX 的胞内表达,酶活达到 4.5 U/mL^[14-15]。但总体而言,LOX 的异源表达的水平偏低。

氧毒性在各种物种中均有发现,是由分子氧的一价还原产物介导的,包括超氧自由基(O_2^-),过氧化氢(H_2O_2)和羟基(OH^-)[3]。氧毒性对生物和非生物物的威胁可能来自于 O_2^- 内在和相对选择性的反应性,而且 O_2^- 可以通过质子化得到氧化性更强的 HO_2^- , 或者通过铁催化的 Haber-Weiss 反应生成 $OH\cdot$ 。而 LOX 能催化内源性化学物如花生四烯酸的反应并伴有活性氧的产生,LOX 还能通过影响细胞间的信号转导而激活其他活性氧产生途径;此外,LOX 还能催化外源化学物代谢为高活性的自由基中间体而诱发活性氧的产生。因此,如何降低 LOX 活性对宿主菌的毒性可能是其高效表达的关键。

SOD 是非常高效的催化剂,25 °C 下速度约为 2×10^9 m/s,活化能为 26.9 kJ/M^[16]。N6 表达的 LOX 为铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa* BBE) 来源,而 *P. aeruginosa* 中会产生几种 SOD 包括 SodB 和 SodM,与降解胞内活性氧中间体有关^[17]。因此,本研究选择 *P. aeruginosa* 来源的 SodB,SodM 和 *E. coli* 来源的 CAT 三种抗氧化酶,构建共表达载体,降低 N6 中 LOX 大量合成对细胞产生的压力,从实验结果来看,共表达 SodM 时,N6-M 中 LOX 酶活提高最多,

表 3 正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment

编号	IPTG 的终浓度/ (mmol/L)	菌体浓度/ (mmol/L)	胞内 LOX 酶 活/(U/mL)
1	0.5	0.5	19.6(±1.0)
2	0.5	1.5	17.9(±0.7)
3	0.5	2.5	21.6(±1.5)
4	1.0	0.5	23.9(±0.6)
5	1.0	1.5	24.3(±0.5)
6	1.0	2.5	27.0(±2.2)
7	1.5	0.5	19.7(±1.3)
8	1.5	1.5	20.5(±0.5)
9	1.5	2.5	23.9(±1.1)
10	2.0	0.5	15.0(±0.8)
11	2.0	1.5	27.9(±1.3)
12	2.0	2.5	28.8(±0.4)
K_1	59.1	78.2	—
K_2	75.2	90.6	—
K_3	64.1	101.3	—
K_4	71.7	—	—
K_1'	19.7	19.6	—
K_2'	25.1	22.7	—
K_3'	21.4	25.3	—
K_4'	23.9	—	—
R	5.4	5.7	—

注: K_1, K_2, K_3 及 K_4 分别表示各因素水平下发酵 LOX 酶活的总, K_1', K_2', K_3' 及 K_4' 为平均值,R 为极差

是原始 N6 的 2.4 倍(图 2)。虽然影响外源蛋白在宿主中表达因素还有很多,但本研究为 LOX 的异源表达提供了一个方向,降低胞内活性氧中间体可能是一种解决方法。

4 结 语

微生物发酵产品想要成功实现产业化,发酵工

艺的优化是重要的环节。本研究通过正交实验对 N6-M 发酵的菌体浓度和 IPTG 浓度两个条件进行优化,实验结果表明 OD₆₀₀ 为 2.5 时,添加终浓度为 2 mmol/mL 的 IPTG 诱导 30 h 后胞内 LOX 酶活达到 28.8 U/mL,与 OD₆₀₀ 0.6, IPTG 终浓度 1 mmol/mL 的初始条件相比提高了 5.88%。

参考文献:

- [1] LU X, ZHANG J, LIU S, et al. Overproduction, purification, and characterization of extracellular lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(13): 5793-5800.
- [2] LIU Song, LU Xinyao, ZHOU Jingwen, et al. Research advance on the structure, molecular modification, and fermentation of lipoxygenases[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2015, 31(12): 34-41. (in Chinese)
- [3] ANTOINE C, DANIELE T. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: Is superoxide dismutase necessary for aerobic life?[J]. **EMBO Journal**, 1986, 5(3): 623-630.
- [4] LI Y, WANG W, WU Q, et al. Molecular control of tio (2)-nps toxicity formation at predicted environmental relevant concentrations by mn-sods proteins[J]. **PLoS One**, 2012, 7(9): e44688.
- [5] VALDERAS M W, HART M E. Identification and characterization of a second superoxide dismutase gene (sodm) from *Staphylococcus aureus*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2001, 183(11): 3399-3407.
- [6] GHORBAL S K, MAALEJ L, CHOURABI K, et al. Antioxidant defense mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. Role of Iron-Cofactored superoxide dismutase in response to uv-c radiations[J]. **Current Microbiology**, 2016, 73(2): 159-164.
- [7] 陆信曜. *Pseudomonas aeruginosa* 脂肪氧合酶的分泌表达及热稳定性改造[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [8] LIU Xiang, LI Hui. Construction of *E. coli* outer protein OmpA expression vector and optimization of inducing conditions[J]. **Biotechnology**, 2013, 23(4): 14-19. (in Chinese)
- [9] CHEN Fengxiang, GUAN Bo, CHEN Yun, et al. Effect of co-expression of protein folding factor on expression of fusion protein IFN β -HAS in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(12): 1246-1250. (in Chinese)
- [10] VIDAL-MAS J, BUSQUETS M, MANRESA A. Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42a2 [J]. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 2005, 87(3): 245-251.
- [11] MERGULHAO F J, SUMMERS D K, MONTEIRO G A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* [J]. **Biotechnology Advances**, 2005, 23(3): 177-202.
- [12] BIRGIT K, DITER W. Expression and secretion of pea-seed lipoxygenase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1992, 37: 342-351.
- [13] REDDY R G, YOSHIMOTO T, YAMAMOTO S, et al. Expression, purification, and characterization of porcine leukocyte 12-lipoxygenase produced in the methylotrophic yeast, *pichia-pastoris* [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1994, 205(1): 381-388.
- [14] NAKAMURA M, MATSUMOTO T, NOGUCHI M, et al. Expression of a cDNA encoding human 5-lipoxygenase under control of the *sta1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Gene**, 1990, 89(2): 231-237.
- [15] STECZKO J, DONOHO G A, DIXON J E, et al. Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase 1-1 in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression and Purification**, 1991, 2(2/3): 221-227.
- [16] IRWIN F. Superoxide radical: An endogenous toxicant[J]. **Pharmacology and Toxicology**, 1983, 23: 239-257.
- [17] PALMA M, DELUCA D, WORGALL S, et al. Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide[J]. **Journal of Bacteriology**, 2003, 186(1): 248-252.