

# 大肠杆菌表达类黄酮 O-甲基转移酶合成槲皮素甲基化衍生物

田苗苗<sup>1,2</sup>, 郭佳婧<sup>\*1,2</sup>, 刘娟<sup>1,2</sup>, 单杨<sup>\*1,2</sup>

(1. 湖南省农业科学院农产品加工研究所/果蔬贮藏加工与质量安全湖南省重点实验室/湖南省果蔬加工与质量安全国际科技创新合作基地, 湖南长沙 410125; 2. 湖南大学隆平分院, 长沙 410082)

**摘要:** 槲皮素是一种重要的柑橘类黄酮, 具有抗菌、抗炎和抗氧化等生物学活性, 但水溶性和脂溶性较差, 研究表明可通过甲基化提高其代谢稳定性和生物利用度, 目前微生物转化法是获得甲基化槲皮素的良好方法。作者筛选了 11 种不同来源的类黄酮 O-甲基转移酶(FOMT), 并根据甲基化位点进行分类构建相应的大肠杆菌工程菌, 以槲皮素为底物进行发酵分别合成了 4 种单 O-甲基槲皮素(槲柳黄素、鼠李素、异鼠李素和 3-O-甲基槲皮素), 最高产量分别为 31.17、11.17、8.90、52.95 mg/L。随后构建了大肠杆菌共培养体系, 分步添加含有 MpOMT4 和 OsNOMT 的重组大肠杆菌全细胞催化剂, 并通过调整体系中两种菌体的比例和生物量, 最终确定菌体细胞质量浓度为 24 g/L(以细胞干质量计)、两种菌体质量比为 1:2 时, 4',7-二甲氧基槲皮素的最高产量为 21.56 mg/L。

**关键词:** 槲皮素; 类黄酮 O-甲基转移酶(FOMT); 槲皮素甲基化衍生物; 生物合成

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2022)07-0111-09 DOI: 10.3969/j.issn.1673-1689.2022.07.010

## Synthesis of Quercetin Methylated Derivatives by Expression of FOMT in *Escherichia coli*

TIAN Miaomiao<sup>1,2</sup>, GUO Jiajing<sup>\*1,2</sup>, LIU Juan<sup>1,2</sup>, SHAN Yang<sup>\*1,2</sup>

(1. Hunan Agricultural Products Processing Institute/ Hunan Province Key Lab of Fruits, Vegetables Storage, Processing, Quality and Safety/Hunan Province International Joint Lab on Fruits, Vegetables Processing, Quality and Safety, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 2. Longping Branch Graduate School, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** Quercetin is a kind of important citrus flavonoid with antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities, but with poor water solubility and lipid solubility. It has been proved that the metabolic stability and bioavailability of quercetin can be improved by methylation, and microbial transformation method is a good method to obtain methylated quercetin. In this study, 11 flavonoid

收稿日期: 2022-02-07

基金项目: 湖南省农业科技创新项目(2021CX05); 湖南省农业科技创新资金重点项目(2020CX47); 湖南省科技厅重点领域研发技术项目(2019NK2041)。

\* 通信作者: 单杨(1963—), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术、农产品深加工等研究。

E-mail: sy6302@sohu.com

郭佳婧(1986—), 女, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: guojiajing1986@163.com

O-methyltransferase (FOMT) from different sources were screened and classified according to methylation sites, and then the corresponding *Escherichia coli* engineering bacteria were constructed. Four mono O-methylated quercetin (tamarixetin, rhamnetin, isorhamnetin and 3-O-methylquercetin) were synthesized by fermentation with quercetin as substrate. The highest yields were 31.17, 11.17, 8.90, 52.95 mg/L, respectively. Then, the co-culture system of *E. coli* was constructed, and the whole cell catalyst containing MpOMT4 and OsNOMT was added step by step. By adjusting the proportion and biomass of the two bacteria in the system, it was finally determined that when the dry weight of cell was 24 g/L and the ratio of cell 1 and cell 2 was 1:2, and the highest yields of 4', 7-dimethoxyquercetin was 21.56 mg/L.

**Keywords:** quercetin, flavonoid O-methyltransferase (FOMT), quercetin methylated derivatives, biosynthesis

柑橘是世界上产量最大的水果之一,我国柑橘种植面积位居世界前列,柑橘因具有丰富的营养价值和独特口感而广受欢迎<sup>[1]</sup>。类黄酮是柑橘中一种重要的次生代谢产物,其中槲皮素(3',4',3,5,7-五羟基黄酮,又名栲精、槲黄素)是柑橘类黄酮中重要的一种组分,具有抗菌<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>和抗氧化<sup>[4]</sup>等生物学活性,并且在预防和治疗各种慢性疾病方面具有广泛的应用前景<sup>[5]</sup>。但是,由于槲皮素水溶性和脂溶性较差,导致其在人体小肠表面不易被吸收、生物利用度较低,从而限制了其广泛应用<sup>[6]</sup>。

研究表明,甲基化修饰可以提高槲皮素分子的代谢稳定性和脂溶性,进而提高其生物利用度<sup>[7]</sup>;4'-O-甲基槲皮素(桉黄素)的抗氧化活性是槲皮素糖苷的3倍,且与槲皮素相比其抗炎活性提高了80%<sup>[8]</sup>;3'-O-甲基槲皮素(异鼠李素)可以通过抑制脂多糖诱导的活性氧蛋白的产生而防止细胞死亡和炎症反应<sup>[9]</sup>,Ader等通过在猪体内进行实验,证明异鼠李素比槲皮素更有利于肠道吸收,生物利用度由原来的0.54%提高到17.00%<sup>[10]</sup>。但是槲皮素甲基化衍生物在植物中含量极少,目前主要通过化学合成和微生物合成两种方式获取,其中化学合成需要高温高压等反应条件并伴有有毒副产物的产生<sup>[11]</sup>,微生物合成由于生产周期较短、生产过程绿色安全且有利于大规模生产等多种优势而备受关注<sup>[12]</sup>。

在植物体内,类黄酮的O-甲基化主要通过类黄酮O-甲基转移酶(FOMT)催化甲基从S-腺苷-L-甲硫氨酸(SAM)向类黄酮羟基的转移<sup>[13]</sup>。不同来源的FOMT可以催化合成不同的甲基化类黄酮,如杨树来源的POMT7可以催化芹菜素合成7-O-甲

基芹菜素<sup>[14]</sup>,大豆来源的SOMT2可以催化柚皮素合成异樱花素等<sup>[15]</sup>。同时不同来源的FOMT可甲基化不同位点合成不同的甲基化类黄酮,如槲皮素可在F4'-OMT、F7-OMT、F3'-OMT和F3-OMT的催化下分别合成桉柳黄素、鼠李素、异鼠李素和3-O-甲基槲皮素(见图1)。作者筛选出11种不同来源的FOMT,并根据催化位点对其进行分类,将其分别导入大肠杆菌中构建相应的工程菌,以槲皮素为底物进行发酵,合成槲皮素甲基化衍生物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 菌株与质粒** *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3):作者所在实验室保存。pETDuet-1、pGEX-4T-1:上海生工生物工程股份有限公司产品。PCR引物以及优化后的基因序列:上海生工生物工程股份有限公司合成。基因来源及登录号见表1。

**1.1.2 试剂** 蛋白胨、酵母粉:英国OXOID公司产品;乙酸乙酯、甘油、氨苄青霉素钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、甲醇、二甲基亚砜(DMSO)、Tris-HCl缓冲液:国药集团化学试剂有限公司产品;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG):上海瑞永生物科技有限公司产品;槲皮素、异鼠李素、4',7-二甲氧基槲皮素标准品:成都德斯特生物技术有限公司产品;桉柳黄素、鼠李素、3-O-甲基槲皮素液相标准品:上海源叶生物科技有限公司产品;限制性核酸内切酶、一步克隆试剂盒、胶回收试剂盒、2 $\times$ Phanta Max Master Mix高保真DNA聚合酶以及质粒提取试剂盒:南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;5 $\times$ 蛋白质上样缓

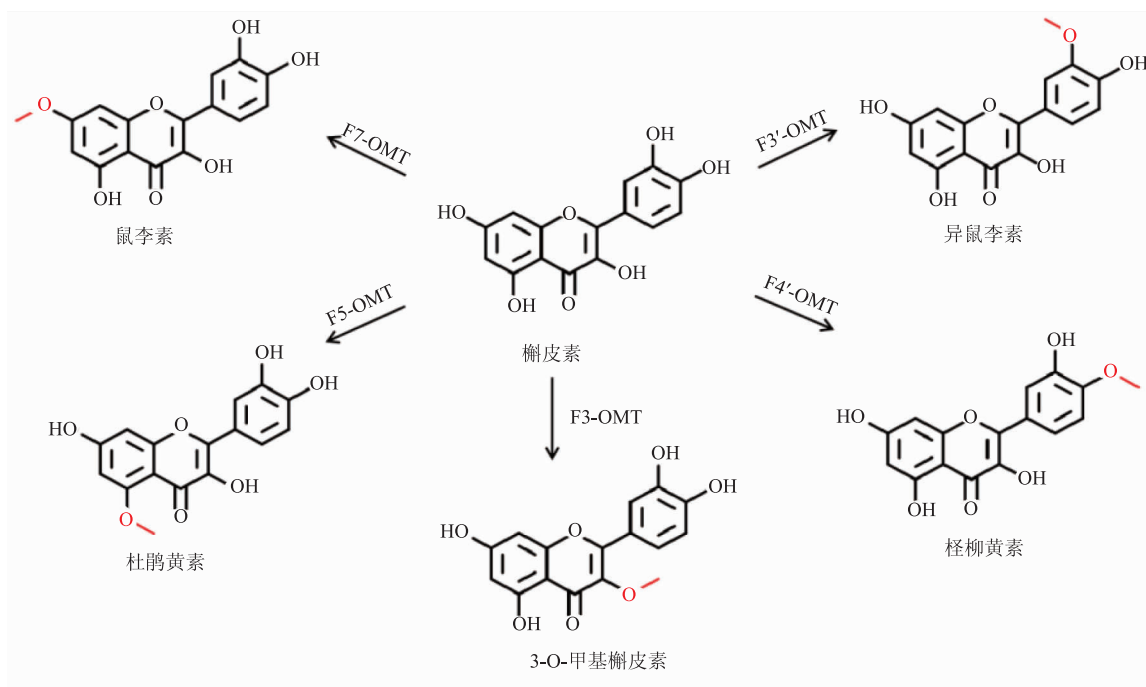


图 1 单 O-甲基槲皮素

Fig. 1 Mono O-methylquercetin

表 1 FOMT 基因来源

Table 1 Source of FOMT gene

编号	基因名称	物种	登录号	催化位点
1	<i>ShMOMT3</i>	番茄	KC513419.1	3-OH(F3-OMT)
2	<i>ROMT9</i>	水稻	DQ288259.1	3'-OH(F3'-OMT)
3	<i>SOMT9</i>	大豆	NM_001249311.2	3'-OH(F3'-OMT)
4	<i>CrOMT6</i>	长春花	AY343489.1	4'-OH(F4'-OMT)
5	<i>MpOMT4</i>	薄荷	AY337461.1	4'-OH(F4'-OMT)
6	<i>ObFOMT3</i>	罗勒	JQ653277.1	4'-OH(F4'-OMT)
7	<i>PaCOMT4</i>	钝鳞紫背苔	KY977690.1	4'-OH(F4'-OMT)
8	<i>OsNOMT</i>	水稻	AB692949.1	7-OH(F7-OMT)
9	<i>POMT7</i>	杨树	TC29789	7-OH(F7-OMT)
10	<i>MpOMT1A</i>	薄荷	AY337457.1	7-OH(F7-OMT)
11	<i>SaOMT2</i>	阿维菌素链霉菌	BAC70093.1	7-OH(F7-OMT)

冲液、5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液、彩虹 130 广谱蛋白质 maker、考马斯亮蓝快速染色液:索莱宝生物科技有限公司产品。

TB 液体培养基:1.2 g/dL 的胰蛋白胨,2.4g/dL 的酵母提取物,0.4 mL/dL 的甘油,17 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,72 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 。并按要求添加氨苄青霉素(Amp)至终质量浓度为 100 mg/L。

### 1.2 仪器与设备

TOne 96 PCR 仪:德国 Biometra 公司产品;核酸电泳仪:北京君意东方电泳设备有限公司产品;

凝胶成像仪:英国 UVItec 公司产品;5424R 小型台式高速离心机:德国 Eppendorf 公司产品;AcpitiJ-26XP 离心机:美国 Beckman 公司产品;SYNERGY H1 酶标仪:美国 Bio Tek 公司产品;LDZM-80L-III 高压灭菌锅:上海申安医疗器械厂产品;DZKW-4 电热恒温水浴锅:北京市永光明医疗仪器有限公司产品;ZQPZ-115 振荡培养箱:天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司产品;H-class 超高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;qtof6550 型质谱仪:美国 Agilent Technologies 公司产品;蛋白质电泳仪:美国

BIO-RAD 公司产品。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 重组表达载体的构建** DNA 片段按照 2× Phanta Max Master Mix 试剂盒方法进行 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后按照 DNA 胶回收试剂盒方法进行基因的回收,使用一步克隆试剂盒进行质粒构建,得到重组质粒 pETDuet-CrOMT6、pETDuet-MpOMT4、pETDuet-ObFOMT3、pETDuet-PaCOMT4、pETDuet-OsNOMT、pETDuet-POMT7、pETDuet-MpOMT1A、pETDuet-SaOMT2、pGEX-4T-ShMOMT3、pGEX-4T-ROMT9、pGEX-4T-SOMT9,使用 *E.coli* DH5 $\alpha$  进行质粒扩增,使用 CaCl<sub>2</sub> 法制备感受态细胞并进行转化,质粒提取后由上海生工生物工程股份有限公司测序验证。

**1.3.2 SDS-PAGE 分析 FOMT 蛋白的异源表达** 测序后序列比对成功的质粒再次转入 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中进行表达,从过夜活化的平板上挑取单菌落于含 Amp (质量浓度为 100 mg/L) 的 TB 液体培养基中于 37 °C、220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,添加 IPTG 至终物质的量浓度为 0.2 mmol/L 诱导蛋白质表达,取诱导 8 h 发酵液于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,随后加入等比例 PBS 缓冲液重悬,用超声细胞破碎仪破碎细胞,超声功率为 300 W,超声 2 s 后停 8 s 继续超声 7 min,整个过程在冰上进行。超声完毕后,将细胞破碎液于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min,取离心后的上清液按照体积比 4:1 比例加入 5×蛋白质上样缓冲液,混匀后于沸水中水浴加热 5 min 后于冰上冷却,离心后取上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

**1.3.3 单 O-甲基槲皮素的合成** 上述构建得到 4 株含 F4'-OMT、4 株含 F7-OMT、2 株含 F3'-OMT 和 1 株含 F3-OMT 的大肠杆菌工程菌,并分别以槲皮素为底物进行发酵培养分别合成 4 种单 O-甲基槲皮素(桉柳黄素、鼠李素、异鼠李素和 3-O-甲基槲皮素)。工程菌的培养方法如下:从过夜培养的平板上挑取单菌落至 5 mL 含 Amp(质量浓度为 100 mg/L) 的 TB 液体培养基中,然后置于 37 °C、220 r/min 条件下过夜培养得到种子液,按照体积分数为 1% 接种量转接至 20 mL 含有 Amp(质量浓度为 100 mg/L) 的 TB 液体培养基中于 37 °C、220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,之后添加 IPTG 至终物质的量浓度为 0.2 mmol/L,槲皮素底物(溶于 DMSO 中)至终质

量浓度为 100 mg/L,于 23 °C、220 r/min 培养 10 h,然后使用 UPLC 进行分析。

**1.3.4 二 O-甲基槲皮素的合成** 4',7-二甲氧基槲皮素是槲皮素分子经 4'-OH 和 7-OH 甲基化后的产物,属于二 O-甲基槲皮素中的一种。由于其分子结构中含有两个甲氧基,因此其甲基化过程需要两步反应(见图 2)。在本研究中,4',7-二甲氧基槲皮素的合成途径被分为两个基本的大肠杆菌细胞模块,模块 1 为 OsNOMT 催化的 7-OH 的甲基化,模块 2 为 MpOMT4 催化的 4'-OH 的甲基化;先将模块 1 的细胞用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液稀释至相应细胞质量浓度分别为 8、16、24、32 g/L(以细胞干质量计),随后添加槲皮素底物,于 23 °C、220 r/min 下反应 10 h,当体系中积累到一定量的鼠李素后,再按模块 1 与模块 2 质量比分别为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3 的比例添加模块 2 的细胞进行转化(槲皮素底物终质量浓度为 100 mg/L),反应 10 h 后取发酵液使用 UPLC 进行分析。

全细胞催化剂的制备参考 Wang 等<sup>[16]</sup>方法,并稍有修改,具体方法如下:大肠杆菌工程菌的活化方法参考 1.3.2,将活化后的种子液按照体积分数为 1% 接种量转接至含有 Amp(质量浓度为 100 mg/L) 的 TB 液体培养基中 37 °C、220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,添加终物质的量浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG,于 23 °C、220 r/min 诱导蛋白质表达 12 h;然后于 5 000 g、15 °C 离心 10 min,收集菌体细胞,用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液冲洗后重悬至细胞质量浓度为 8、16、24、32 g/L(以细胞干质量计,细胞干质量与 OD<sub>600</sub> 之间的转换关系为 OD<sub>600</sub> 为 1 时代表细胞质量浓度为 0.35 g/L)<sup>[17]</sup>。

**1.3.5 产物的分析与鉴定** 取发酵液等比例加入乙酸乙酯进行萃取,静置后取上清液经氮吹浓缩后加甲醇重溶,经 0.22  $\mu$ m 尼龙滤膜过滤后进行分析。UPLC 检测条件:使用安捷伦 C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×150 mm)、PDA 检测器进行检测。检测条件:梯度洗脱;A 相为乙腈,B 相为体积分数 0.4% 醋酸水溶液,0~20 min,B 相由 20% 升至 85%(体积分数);流量为 0.2 mL/min;检测波长为 254 nm。LC-MS 检测条件:液相色谱按照上述进行,质谱分析采用安捷伦 qtof6550 系统,在 100~1 200 m/z、电喷雾离子源负离子模式、电压 3 200 V 下进行质谱扫描分析。



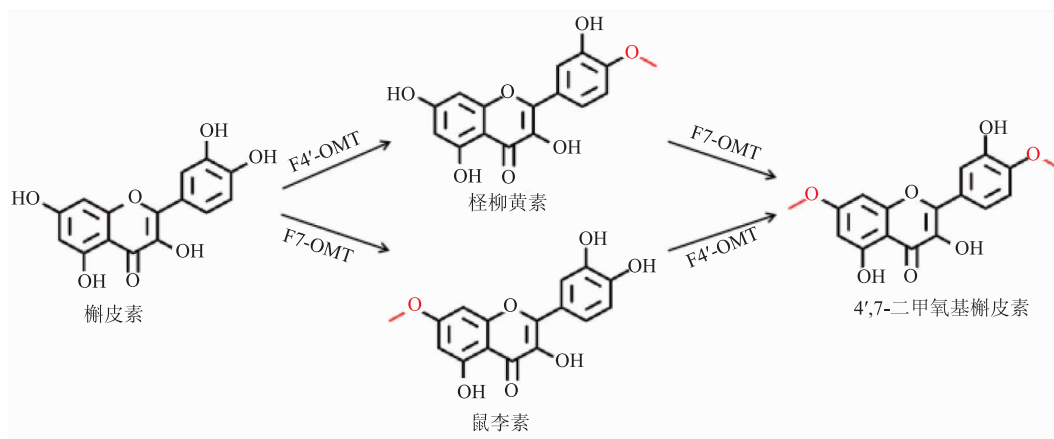


图2 槲皮素到4',7-二甲氧基槲皮素的转化

Fig. 2 Transformation of quercetin into 4',7-dimethoxyquercetin

## 2 结果与分析

### 2.1 FOMT 基因的优化及重组表达载体的构建

在大肠杆菌体内表达异源蛋白时存在密码子偏好性问题,若存在稀有碱基或AT含量过高均会导致蛋白质合成受阻,密码子可能发生错配,使得外源蛋白难以在大肠杆菌体内高效表达<sup>[8]</sup>。因此对不同来源的FOMT基因进行密码子优化,可有效提高其表达水平。表2为基因优化后的各项指数,其中密码子适应指数(CAI)是用来反应编码区的同义密码子和最佳密码子使用频率的相符合程度,一般可用CAI来评估外源基因在宿主内的表达水平,其取值在0~1.00;当CAI为0.80~1.00时认为基因与宿主的偏好性较高。GC含量的最佳百分比为40.00%~60.00%。

表2 基因优化后各项指标

Table 2 Indexes after gene optimization

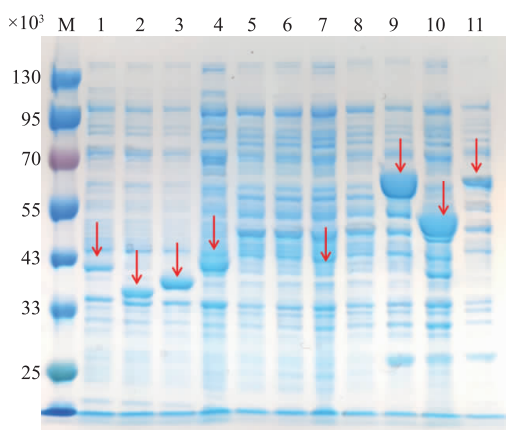
编号	基因	CAI	GC含量/%
1	<i>ShMOMT3</i>	0.99	50.42
2	<i>ROMT9</i>	0.98	57.70
3	<i>SOMT9</i>	1.00	52.71
4	<i>CrOMT6</i>	0.98	51.10
5	<i>MpOMT4</i>	0.97	55.30
6	<i>ObFOMT3</i>	0.99	56.90
7	<i>PaCOMT4</i>	0.98	55.30
8	<i>OsNOMT</i>	0.98	58.73
9	<i>POMT7</i>	0.97	52.73
10	<i>MpOMT1A</i>	0.99	54.94
11	<i>SaOMT2</i>	0.95	63.42

### 2.2 FOMT 蛋白的异源表达鉴定

使用SDS-PAGE对大肠杆菌工程菌诱导8h后细胞内可溶性蛋白质进行检测,SDS-PAGE结果如图3所示。结果表明,表达CrOMT6( $4.07 \times 10^4$ )、MpOMT4( $3.78 \times 10^4$ )、ObFOMT3( $3.68 \times 10^4$ )、PaCOMT4( $4.15 \times 10^4$ )、OsNOMT( $4.00 \times 10^4$ )以及带有GST标签的ROMT9( $6.57 \times 10^4$ )、SOMT9( $5.36 \times 10^4$ )和ShMOMT3( $6.66 \times 10^4$ )蛋白的重组大肠杆菌中检测到了符合目的蛋白相对分子质量的蛋白质条带且条带较亮,说明其在大肠杆菌中能够可溶表达且蛋白质表达量高。对含有POMT7( $3.96 \times 10^4$ )和MpOMT1A( $3.80 \times 10^4$ )的菌株中的可溶性蛋白进行检测,发现其表达量极少;而含有SaOMT2( $3.75 \times 10^4$ )的重组菌株中的蛋白质几乎不能可溶性表达,在后期的发酵中也无法发挥催化活性。

### 2.3 单O-甲基槲皮素的合成

构建了含有11种不同来源FOMT的大肠杆菌工程菌,并根据FOMT催化位点对其进行分类,其中包括4种F4'-OMT、4种F7-OMT、2种F3'-OMT和1种F3-OMT,重组菌株按上述方法加入槲皮素底物至终质量浓度为100 mg/L进行发酵培养,随后使用UPLC对发酵液进行分析(见图4),并分别与槲柳黄素、鼠李素、异鼠李素以及3-O-甲基槲皮素标准品检测结果进行对比。样品检测结果发现,含不同催化位点FOMT的重组菌中均检测到与相应标准品出峰时间相同的产物峰。其中4种含F4'-OMT的重组菌中,仅有PaCOMT4没有检测到槲柳黄素;4种含F7-OMT的重组菌中,除SaOMT2外,在11.2 min处均检测到鼠李素;其余3株工程菌分



M 为蛋白质 marker;1~11 号泳道分别为含有 CrOMT6、ObFOMT3、MpOMT4、PaCOMT4、POMT7、MpOMT1A、OsNOMT、SaOMT2、ROMT9、SOMT9 和 ShMOMT3 蛋白的重组菌株表达的可溶性蛋白质。

图 3 SDS-PAGE 分析 FOMT 蛋白表达

Fig. 3 Analysis of FOMT protein expression by SDS-PAGE

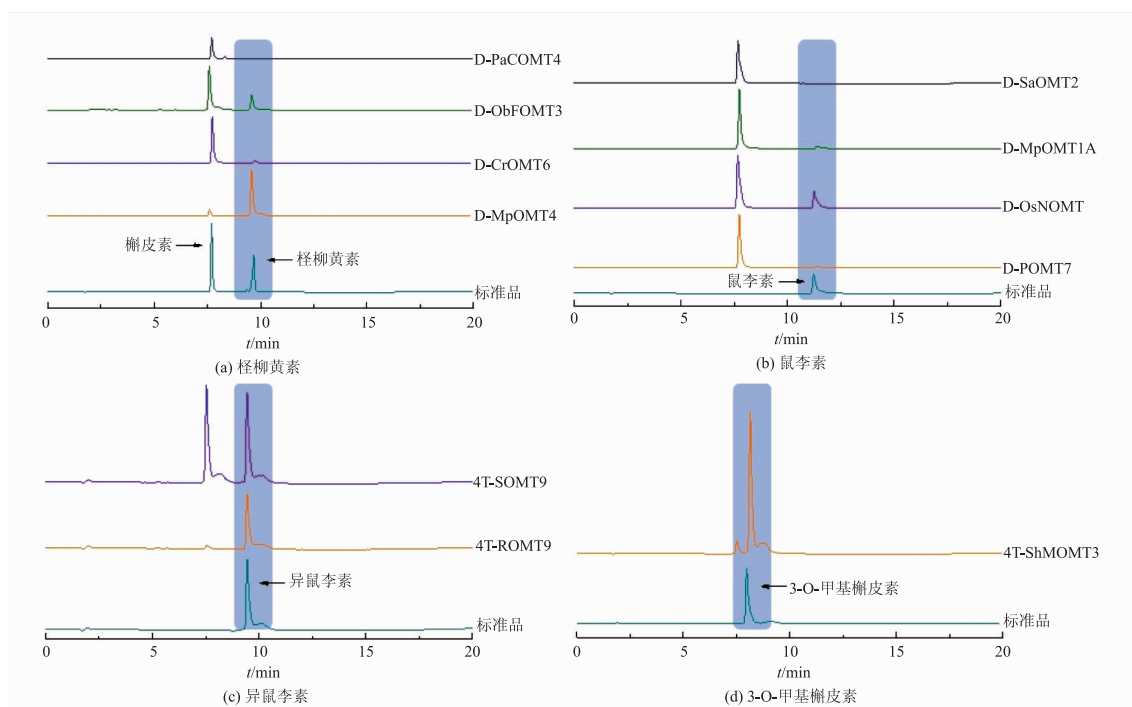
别检测到异鼠李素、3-O-甲基槲皮素相应峰。质谱分析显示 4 种产物与相应标准品离子峰位置一致,进一步验证了实验结果。

重组菌株经发酵培养后通过 UPLC 检测并计算

产量 (见图 5)。结果表明,4 种 F4'-OMT 中, MpOMT4 活性最高,合成了 31.17 mg/L 槲柳黄素, CrOMT6 和 ObFOMT3 催化合成槲柳黄素产量分别为 4.12 mg/L 和 12.18 mg/L;4 种 F7-OMT 中, OsNOMT 最高催化合成了 11.17 mg/L 鼠李素;两种 F3'-OMT (ROMT9 和 SOMT9) 催化合成的异鼠李素的产量分别为 8.72 mg/L 和 8.90 mg/L;ShMOMT3 催化合成 3-O-甲基槲皮素的产量为 52.95 mg/L。在表达钝磷紫背苔来源的 PaCOMT4 和阿维菌素链霉菌来源的 SaOMT2 的大肠杆菌工程菌发酵液中未检测到相应目标产物,这可能是因为它在大肠杆菌中不能有效可溶性表达,产生蛋白质包涵体而无法发挥催化活性<sup>[19]</sup>。而且,研究表明 FOMT 存在底物偏好性差异,不同来源的 FOMT 对槲皮素底物的亲和性可能会影响其催化效率,从而导致目标产物产量之间的差异<sup>[20]</sup>。

## 2.4 4',7-二甲氧基槲皮素的合成

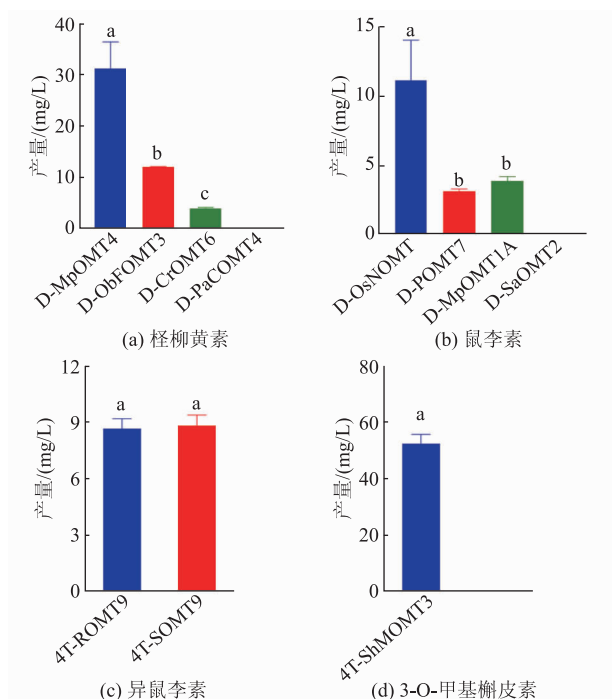
**2.4.1 不同添加顺序对 4',7-二甲氧基槲皮素产量的影响** 按照大肠杆菌共培养方法进行发酵实验,通过改变模块 1 (OsNOMT) 与模块 2 (MpOMT4) 细胞前后添加顺序,探究 4',7-二甲氧基槲皮素合成产量的变化。在细胞质量浓度为 16 g/L (以细胞干质



D 和 4T 为质粒载体名称缩写。

图 4 4 种单 O-甲基槲皮素 UPLC 检测结果

Fig. 4 UPLC results of four kinds of O-methylated quercetin



D 和 4T 为质粒载体名称缩写。

图 5 不同来源 FOMT 发酵结果

Fig. 5 Fermentation results of FOMT from different sources

量计), 菌体质量比为 1:1 条件下进行发酵 (见图 6)。结果表明, MpOMT4 可利用鼠李素作为底物, 而 OsNOMT 不可利用槲柳黄素作为底物。当细胞质量浓度为 16 g/L (以细胞干质量计), 模块 1 与模块 2 质量比为 1:1 时, 先将模块 1 细胞添加底物, 反应 10 h 后再添加模块 2 细胞进行催化, 可以得到 15.75 mg/L 4',7-二甲氧基槲皮素; 若先添加模块 2 细胞, 催化 4'-OH 甲基化, 再添加模块 1 细胞进行催化, 发酵液中未检测到 4',7-二甲氧基槲皮素的合成。这可能是由于槲皮素 4'-OH 的甲基化导致其分子构象发生变化, 导致 OsNOMT 无法与其结合发生催化活性。研究发现 FOMT 具有严格的催化位点特异性和底物特异性, 一种 FOMT 只能特异性地结合某一类黄酮底物。Kim 等通过在大肠杆菌中构建 RSOMT 共表达载体发现, ROMT9 不能以 4'-甲氧基槲皮素为底物, 而 SOMT2 能够以 3'-甲氧基槲皮素为底物<sup>[21]</sup>。根据国内外已经报道的关于多种植物 FOMT 晶体结构分析表明, 不同植物来源的 FOMT 底物特异性主要是与其结合的类黄酮底物结合域之间的差异而引起的<sup>[22]</sup>。

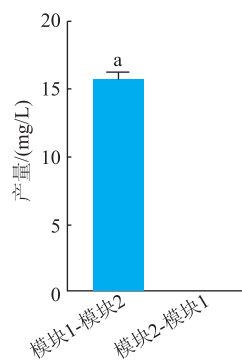


图 6 不同添加顺序对 4',7-二甲氧基槲皮素产量的影响  
Fig. 6 Effects of different addition sequences on 4',7-dimethoxyquercetin yield

随后通过 UPLC 对发酵液进行分析 (见图 7)。结果表明样品中出现与 4',7-二甲氧基槲皮素标准品保留时间相同的峰, 随后按照本文 1.3.5 中的方法对产物进行质谱扫描, 发现样品中存在与 4',7-二甲氧基槲皮素标准品一致的离子峰, 相对分子质量检测结果一致 (见图 8)。

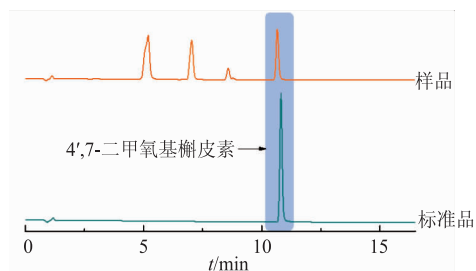


图 7 4',7-二甲氧基槲皮素 UPLC 检测结果  
Fig. 7 Determination results of 4',7-dimethoxyquercetin by UPLC

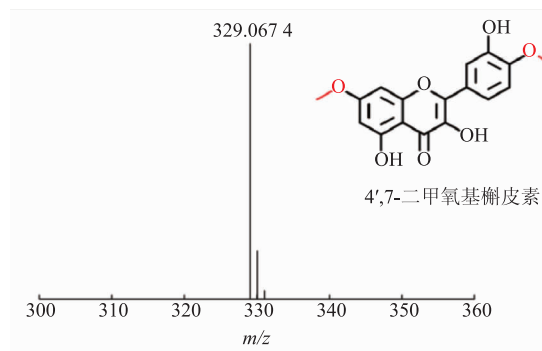


图 8 4',7-二甲氧基槲皮素 LC-MS 检测结果  
Fig. 8 Determination results of 4',7-dimethoxyquercetin by LC-MS

2.4.2 不同缓冲液对 4',7-二甲氧基槲皮素产量的影响 为了探究不同缓冲液和 pH 对发酵产量的影

响,选取 PBS 6.0(pH 6.0)、PBS 7.0(pH 7.0)、PBS 8.0 (pH 8.0)、50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液进行对比;在细胞质量浓度为 16 g/L(以细胞干质量计),模块 1 与模块 2 质量比为 1:1 条件下进行发酵(见图 9)。结果表明,在 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液中 4',7-二甲氧基槲皮素产量最高,为 15.75 mg/L;在 3 种不同 pH 的 PBS 缓冲液中发酵结果显示,在 PBS 6.0、PBS 7.0、PBS 8.0 缓冲液中 4',7-二甲氧基槲皮素质量浓度分别为 10.57、9.64、5.68 mg/L。

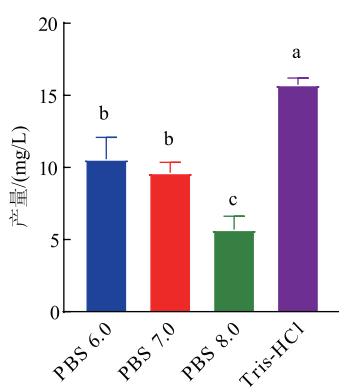


图 9 不同缓冲液对 4',7-二甲氧基槲皮素产量影响

Fig. 9 Effects of different buffers on 4',7-dimethoxyquercetin yield

**2.4.3 培养体系的优化** 为了提高 4',7-二甲氧基槲皮素产量,通过调整培养体系中模块 1 与模块 2 细胞的比例和生物量对其进行优化(见图 10)。菌体细胞质量浓度分别设置为 8、16、24、32 g/L(以细胞干质量计);模块 1 与模块 2 质量比为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3。结果表明,随着菌体细胞质量浓度的增加,4',7-二甲氧基槲皮素产量呈现先上升后下降趋势;在槲皮素底物添加量(质量浓度)为 100 mg/L 情况下,当模块 1 与模块 2 质量比为 1:2,细胞质量浓度为 24 g/L(以细胞干质量计)时,4',7-二甲氧基槲皮素产量最高,为 21.56 mg/L。

一些具有生物活性的 O-甲基黄酮类化合物,如鼠李素、4',7-二甲氧基槲皮素等,在不同的芳香环和类黄酮骨架中含有两个或两个以上的甲基<sup>[23]</sup>。由于 FOMT 具有严格的区域特异性,所以多甲氧基类黄酮的生物合成需要两个以上的 FOMT 和甲基化反应<sup>[24]</sup>。研究发现,当试图在单个微生物中表达多种酶以构建体内全细胞催化剂时,经常会出现

蛋白质表达负担和氧化还原平衡等问题<sup>[25]</sup>;为了解决这些问题,4',7-二甲氧基槲皮素的生物催化途径被分为两个基本的大肠杆菌细胞模块,模块 1 为 OsNOMT 催化的 7-OH 的甲基化,模块 2 为 MpOMT4 催化的 4'-OH 的甲基化。先将模块 1 的细胞添加槲皮素底物,当发酵液中积累了一定量的鼠李素后,再添加模块 2 的细胞,用以催化鼠李素转化合成 4',7-二甲氧基槲皮素,并通过对发酵体系进行优化,最高合成了 21.56 mg/L 的 4',7-二甲氧基槲皮素。

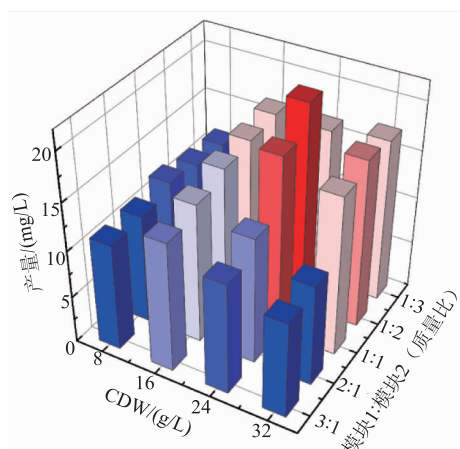


图 10 培养体系的优化

Fig. 10 Optimization of cultivation system

### 3 结语

研究表明,甲基化修饰可提高槲皮素分子的药理活性和生物利用度,然而由于甲基化槲皮素的植物获取与化学合成具有诸多限制,利用微生物表达 FOMT 催化槲皮素转化为甲基化槲皮素因具有生产周期短、环境污染小等优点而受到广泛关注。本研究中通过构建 11 种含有不同来源 FOMT 的大肠杆菌工程菌,成功合成了 4 种单 O-甲基槲皮素(怪柳黄素、鼠李素、异鼠李素和 3-O-甲基槲皮素),最高产量分别为 31.17、11.17、8.90、52.95 mg/L;另外还通过构建大肠杆菌共培养体系成功合成了 4',7-二甲氧基槲皮素,在槲皮素底物质量浓度为 100 mg/L 时 4',7-二甲氧基槲皮素产量最高为 21.56 mg/L,为解决在单个微生物中表达多种酶导致蛋白质表达负担和氧化还原平衡等问题以及为合成不同甲基化黄酮或多甲氧基黄酮提供了科学参考。



## 参考文献:

- [1] 单杨,刘娟,王振,等. 生物合成柑橘类黄酮研究进展[J]. 中国食品学报,2019,19(11):1-13.
- [2] LIM H J,KANG S H,SONG Y J,et al. Inhibitory effect of quercetin on propionibacterium acnes-induced skin inflammation[J]. **International Immunopharmacology**,2021,96(1):1-8.
- [3] NAM J S,SHARMA A R,NGUYEN L T,et al. Application of bioactive quercetin in oncotherapy:from nutrition to nanomedicine[J]. **Molecules**,2016,21(1):1-23.
- [4] 王立,姚惠源,陶冠军,等. 乌饭树叶中槲皮素的提取分离与鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):89-91.
- [5] LEE H,KROON P A,RIMM E B,et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. **American Journal of Clinical Nutrition**,2008(1):38-50.
- [6] 李阳杰,姜亚玲,刘秋伟,等. 槲皮素衍生物的生物活性研究进展[J]. 中国药学杂志,2021,56(3):175-180.
- [7] KOIRALA N,THUAN N H,GHIMIRE G P,et al. Methylation of flavonoids:chemical structures,bioactivities,progress and perspectives for biotechnological production[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2016,86:103-116.
- [8] ERDAL B,IREM I T,RIAZ A K,et al. Biologically active secondary metabolites from ginkgo biloba[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,2002,50(11):3150-3155.
- [9] SEO K,YANG J H,KIM S C,et al. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: a potential role of HO-1[J]. **Inflammation**,2014,37(3):712-722.
- [10] ADER P,WESSMANN A,WOLFFRAM S,et al. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig[J]. **Free Radical Biology and Medicine**,2000,28(7):1056-1067.
- [11] LI N G,SHI Z H,TANG Y P,et al. An efficient partial synthesis of 4'-O-methylquercetin via regioselective protection and alkylation of quercetin[J]. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**,2009,5(1):1-5.
- [12] 洪煦琳,贾笑,肖毅. CRISPRi/ddCpf1 促进大肠杆菌中丙二酰辅酶 A 的积累[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(12):17-25.
- [13] EDWARDS R,DIXON R A. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-O-methyltransferase from suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. **Archives of Biochemistry & Biophysics**,1991,287(2):372-379.
- [14] LEE H,KIM B G,KIM M,et al. Biosynthesis of two flavones, apigenin and genkwanin, in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Microbiology & Biotechnology**,2015,25(9):1442-1448.
- [15] KIM M J,KIM B G,AHN J H. Biosynthesis of bioactive O-methylated flavonoids in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(16):7195-7204.
- [16] WANG F,ZHAO J,Li Q,et al. One-pot biocatalytic route from cycloalkanes to  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acids by designed *Escherichia coli* consortia[J]. **Nature Communications**,2020,11(1):1-10.
- [17] WU Y,CHEN T,LIU Y,et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*[J]. **Nucleic Acids Research**,2020,48(2):996-1009.
- [18] 闫子祥,杨然,李秀婷. 微生物表达系统研究进展[J]. 中国食品学报,2013,13(10):126-135.
- [19] 马成英,吕海鹏,林智,等. 茶树类黄酮 O-甲基转移酶基因的克隆及原核表达分析[J]. 中国农业科学,2013,46(2):325-333.
- [20] WEN L R,JIANG Y M,YAANG J L,et al. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids[J]. **Annals of the New York Academy of Sciences**,2017,1398(1):120-129.
- [21] KIM B G,SHIN K H,LEE Y S,et al. Multiple regiospecific methylations of a flavonoid by plant O-methyltransferases expressed in *E. coli*[J]. **Biotechnology Letters**,2005,27(23/24):1861-1864.
- [22] 张传丽,仲月明,沈丹红,等. 植物类黄酮 O-甲基转移酶研究进展[J]. 西北植物学报,2012,32(6):1274-1281.
- [23] YU Y,CAI W,PEI C G,et al. Rhamnazin, a novel inhibitor of VEGFR2 signaling with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy[J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**,2015,458(4):913-919.
- [24] LEE D,PARK H L,LEE S W,et al. Biotechnological production of dimethoxyflavonoids using a fusion flavonoid O-methyltransferase possessing both 3'- and 7-O-methyltransferase activities[J]. **Journal of Natural Products**,2017,80(5):1467-1474.
- [25] SONG H,DING M Z,JIA X Q,et al. Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications[J]. **Chemical Society Reviews**,2014,43(20):6954-6981.