

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(8):919-925; 4 August 2014  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.010

## 聚苹果酸聚合途径中苹果酰辅酶 A 连接酶基因的克隆、表达及酶学性质

吴小燕<sup>1,2</sup>, 周峰<sup>1,2</sup>, 涂光伟<sup>1,2</sup>, 邹祥<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>西南大学药学院, 重庆 400715

<sup>2</sup>重庆药物过程与质量控制工程技术中心, 重庆 400715

**摘要:** 【目的】研究出芽短梗霉聚苹果酸聚合途径中苹果酰辅酶 A 连接酶基因及其酶学特性。【方法】通过设计兼并引物, 采用 IPCR 技术从出芽短梗霉 CCTCC M2012223 的基因组中扩增得到苹果酰辅酶 A 连接酶基因的 cDNA 全长序列, 构建表达载体, 通过大肠杆菌异源表达, Ni-NTA 柱层析纯化酶蛋白, 分析其酶学特性。【结果】获得苹果酰辅酶 A 连接酶基因序列全长为 1498 bp, 编码 440 aa, 含有 4 个外显子和 3 个内含子。该重组酶最适反应温度为 25℃, 最适反应 pH 值为 8.0, 高浓度底物 ATP 明显对酶活性具有抑制作用, 单体选择性表明对底物草酸、草酰乙酸、丁酸、丙二酸也具有很好催化活性。【结论】成功从出芽短梗霉 CCTCC M2012223 中克隆获得聚苹果酸聚合途径的苹果酰辅酶 A 连接酶基因, 为聚苹果酸聚合途径解析及新型可降解材料创制奠定基础。

**关键词:** 出芽短梗霉, 苹果酰辅酶 A 连接酶基因, 聚合途径, 单体选择性

**中图分类号:** Q936      **文章编号:** 0001-6209(2014)08-0919-07

聚苹果酸 (Polymalic acid, PMA) 是一种新型生物可降解聚酯型聚合物, 以苹果酸为唯一单体聚合形成<sup>[1]</sup>。由于聚苹果酸具有良好的水溶性, 生物降解性和生物相容性, 可作为新型药物载体与微胶囊材料、生物医学材料、食品包装材料等, 具有广泛的应用前景。

目前, 聚苹果酸生产方式主要有化学合成和微生物发酵法。早在 1969 年, Shimada 等<sup>[2]</sup>发现一种以苹果酸为结构单元的聚合物能够抑制圆囊青霉菌的酸性蛋白酶活性, 最终证实为聚苹果酸; 之后, 从

多头绒泡菌 *Physarum polycephalum* 和出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* 中分离得到聚苹果酸<sup>[3-4]</sup>。相比多头绒泡菌, 出芽短梗霉具有更好的聚苹果酸合成能力<sup>[5]</sup>, 本课题组也分离得到一株聚苹果酸高产菌株 *A. pullulans* CCTCC M2012223, 采用固定化纤维床反应器, 聚苹果酸发酵产量达到 123.7 g/L, 并建立了聚苹果酸酸水解制备苹果酸新工艺技术<sup>[6-7]</sup>。

已有的研究表明, 聚苹果酸主要通过 TCA 循环来源的苹果酸聚合而成<sup>[8]</sup>, 出芽短梗霉中聚苹果酸

**基金项目:** 国家 863 计划项目 (2014AA021205); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2013B039); 重庆药物过程与质量控制工程技术研究中心能力提升项目 (CSTC2012 gg-yyjsb10002-33)

\* 通信作者。Tel: +86-23-68251225; E-mail: zhx1030@swu.edu.cn

**作者简介:** 吴小燕 (1988-), 女, 硕士研究生, 专业方向为微生物与生化药学。E-mail: wuxiaoyan6@126.com

**收稿日期:** 2014-01-30; **修回日期:** 2014-04-03

聚合途径可能涉及苹果酰辅酶 A 连接酶 (malate-CoA ligase, Mcl) 和聚苹果酸合成酶 (polymalic acid synthase, Pas) 的参与<sup>[9]</sup>, 相关基因及序列尚未见报道。其中苹果酰辅酶 A 连接酶是在 ATP 及辅酶 A 参与下, 实现对单体苹果酸的酰基化<sup>[10]</sup>, 酶的底物选择性对于聚合单体选择及新型共聚物材料的创制具有重要意义。苹果酰辅酶 A 连接酶基因目前主要在原核生物中报道, 因此, 本研究通过生物信息学分析得到苹果酰辅酶 A 连接酶基因的保守序列, 从真核生物出芽短梗霉 *A. pullulans* CCTCC M 2012223 中首次克隆获得苹果酰辅酶 A 连接酶基因, 基因长度 1498 bp, 编码 440 aa, 并通过表达载体构建, 蛋白表达、优化, 表征酶学特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、载体和试剂:** 出芽短梗霉 (*A. pullulans* CCTCC M2012223) 由西南大学药学院发酵工程研究室筛选保藏, 用于基因克隆。大肠杆菌 BL21 (DE3) 用于蛋白表达, 表达载体 pET-32a (+) 购自 Novagen (Germany), 克隆载体 pMD 19-T 购自大连宝生物工程公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Ex Taq* 酶购于大连宝生物工程公司; T4 DNA ligase, *Taq* DNA polymerase 购于 TransGen 公司; 胶回收试剂盒 (Axygen)、质粒小提试剂盒、酵母基因组提取试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购于 TIANGEN 公司; DNase I, RNase-Free 购于 Fermentas 公司; 反转录试剂盒购于 Thermo 公司; 真菌 RNA 提取试剂盒购于 Omega 公司; Ni-NTA 纯化柱购于上海新睿生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.2 培养基及培养条件:** PDA 培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 自然 pH, 121°C 灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.6% 的琼脂, 用于 *A. pullulans* 的培养; LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 121°C 灭菌 20 min, 固体培养基添加 1.6% 的琼脂。

**1.1.3 实验所用引物:** 根据 NCBI 公布的苹果酰辅酶 A 连接酶基因序列, 通过生物信息学分析, 设计简并引物, 表中下划线表示引物的识别位点, 括号中的字母表示限制性内切酶酶切位点, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study

primers	sequences and restriction sites (5'→3')
Core1F	ARGGHGCTATGGACATTGAGG
Core1R	CCRCCRAARATGTTGACRAAG
IPCR71R	GGTRATGATGGCATCGGGGTTCT
IPCR72R	CGTCTTCTCCATGAAGACCTTGT
IPCR73F	TGAATTCATCAAGCTYACGGTG
IPCR74F	CATCAGAAGTGCCTTCGAGCTCAT
cDNA7F	ATGTTCAAGCTCGCCCGCAG
cDNA7R	TTAGATACCGAGAGAACTCGACAC
pET32a7F	ATAGGATCCATGTTCAAGCTCGCCCG ( <i>Bam</i> H I)
pET32a7R	GCGAAGCTTGATACCGAGAGAACT ( <i>Hind</i> III)

### 1.2 苹果酰辅酶 A 连接酶核心片段克隆

根据苹果酰辅酶 A 连接酶的保守序列设计兼并引物, 以 Core1F、Coer1R 为兼并引物进行 PCR 克隆得到核心片段。反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min; 25°C 10 min。PCR 产物连接 pMD 19-T Vector 载体, 测序验证。

### 1.3 IPCR 法扩增苹果酰辅酶 A 连接酶基因全长

根据 IPCR 原理, 苹果酰辅酶 A 连接酶基因全长的扩增如下: ①选用 *Hind* III 对 *A. pullulans* CCTCC M201223 基因组中 DNA 进行酶切, 200 μL 酶切体系中含有 2 μg 基因组和 2 μL 的酶, 37°C 水浴 10 h。②酶切产物经酚:氯仿抽提和乙醇沉淀, 溶于 50 μL 无菌水中。③纯化后的酶切产物加 1 μL T4 DNA ligase, T4 DNA 连接缓冲液 5.6 μL, 8°C 反应 16 h。④第一次巢式 PCR 体系: 取稀释 25 倍的连接产物 1.1 μL, 2.5 μL 10 × *Ex Taq* 缓冲液, 2 μL MgCl<sub>2</sub>, 2 μL dNTP, 1 μL IPCR72R 和 IPCR73F, 0.1 μL Takara *Ex Taq* 酶, 用无菌水补体积至 25 μL。反应条件为 94°C 5 min; 94°C 50 s, 59°C 50 s, 72°C 4 min, 35 个循环; 72°C 10 min; 25°C 10 min。⑤第二次巢式 PCR 体系: 取稀释 10 倍的第一次巢式 PCR 产物 1 μL, 2.5 μL 10 × *Ex Taq* 缓冲液, 2 μL MgCl<sub>2</sub>, 2 μL dNTP, 1 μL IPCR71R 和 IPCR74F, 0.1 μL TaKaRa *Ex Taq* 酶, 用无菌水补体积至 25 μL。 *A. pullulans* CCTCC M201223 基因组 *Eco*R I 酶切, 采用上述方法得到全长。

### 1.4 苹果酰辅酶 A 连接酶 cDNA 全长获得

用真菌 RNA 提取试剂盒提取 *A. pullulans* CCTCC M2012223 的总 RNA, DNase, RNase-Free 处理总 RNA, 消化基因组 DNA。将处理过后的 RNA 用反转录酶试剂盒合成 cDNA 的第一条链, 以 cDNA

的第一条链为模板, 以 cDNA7F、cDNA7R 为引物进行 PCR, 得到该基因的 cDNA 全长。

### 1.5 PCR 产物克隆与测序

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 将 PCR 所得片段经试剂盒胶回收纯化后与 pMD 19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5a, 在含有 X-Gal (20 mg/L)、IPTG (24 mg/mL)、AMP (100 mg/L) 的 LB 琼脂平板培养基上培养, 挑选白色菌落。提取质粒, 使用 PCR 法及质粒酶切鉴定, 测序结果经 Blast 比对最终成功得到目的片段。

### 1.6 苹果酰辅酶 A 连接酶基因表达载体构建、诱导表达与纯化

根据测序后的 cDNA 基因序列设计引物, T-cDNA7 为模板, 以 pET32a7F、pET32a7R 为引物进行 PCR, 得到 cDNA1, 构建重组表达载体 pET-Mcl, 测序验证后将重组表达载体 pET-Mcl 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 经预培养, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 25℃ 诱导培养 12 h, 收集菌体, 将菌体重新悬浮于细胞裂解液, 利用超声破碎法裂解菌体, 离心分离得到细胞上清; 上清用 AKTA primer 核酸蛋白纯化仪纯化目的蛋白, 用 100 mmol/L MOPS 缓冲液 (pH 7.4) 透析处理除去咪唑。由 SDS-PAGE 法检测蛋白纯度, 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。

### 1.7 苹果酰辅酶 A 连接酶酶活性测定

采用 Ellman 法<sup>[10]</sup>, 通过检测底物辅酶的减少来测定苹果酰辅酶 A 连接酶的活性。反应体系为 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)、50 mmol/L KCl 溶液, 0.2 mmol/L ATP, 45 μmol/L 辅酶 A, 2 mmol/L 苹果酸及酶液, 催化温度 25℃, 反应时间 10 min, 加入 0.2 mg/mL 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 溶液终止反应。在 412 nm 波长下检测 5-巯基-2-硝基苯甲酸 (TNB) 的生成量。酶活性定义为在 412 nm 波长下每分钟 1 μmol 酶消耗底物辅酶 A 的量。

### 1.8 苹果酰辅酶 A 连接酶酶的酶学性质

**1.8.1 Mcl 酶最适 pH 测定:** 由于 DTNB 在酸性条件下不稳定<sup>[11]</sup>, 选用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5 - 9.0) 作为反应液, 于恒定温度下测定酶蛋白活性, 筛选其最适反应 pH 值。

**1.8.2 Mcl 最适温度测定:** 在最适 pH 值下, 在 Tris-HCl 缓冲液中测定不同反应温度 (15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃) 水浴中进行反应, 筛选其最适反应温度。

**1.8.3 Mcl 的最适 ATP 底物浓度:** 由于 ATP 浓度

过高, 会抑制反应的进行<sup>[12]</sup>, 本实验分别选取 ATP 浓度为 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L 时, 在最适反应温度和 pH 值下测定酶蛋白活性, 筛选最适 ATP 底物浓度。

**1.8.4 酶促动力学参数测定:** 由于该反应涉及 3 个底物 ATP、CoA 和苹果酸, 而 ATP 对反应有抑制作用, 因此分别考察不同浓度的 CoA 和苹果酸对酶促反应的影响。底物 CoA 浓度范围为 15 - 75 μmol/L 和苹果酸浓度范围为 0.1 - 2 mmol/L, 重组酶含量为 4.58 μg/mL, 在其它 2 个变量一定的条件下, 按标准酶活测定方法测定酶活。

**1.8.5 底物特异性测定:** 反应体系中分别添加 2 mmol/L 琥珀酸、草酰乙酸、柠檬酸、丁酸、草酸、丙二酸不同底物<sup>[13]</sup>, 在最适反应温度和 pH 值下, 按标准酶活测定方法测定酶活。

## 2 结果和分析

### 2.1 苹果酰辅酶 A 连接酶基因克隆

通过生物信息学分析 NCBI 中已报道的苹果酰辅酶 A 连接酶基因序列, 通过保守序列设计简并引物, 扩增出一条约 580 bp 大小的 DNA 片段 (图 1)。将片段同 pMD-19T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5a, 蓝白斑筛选获得阳性重组子, 测序获得核心片段。

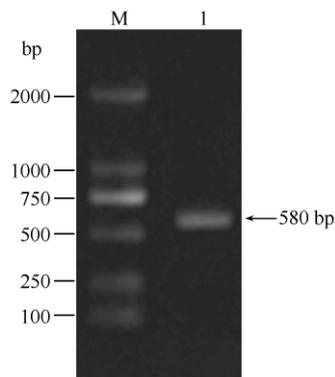


图 1. 苹果酰辅酶 A 连接酶基因核心片段电泳图

Figure 1. The core fragment of malate-CoA ligase gene.

根据核心片段的基因序列, 设计引物 IPCR71R、IPCR72R、IPCR73F、IPCR74F, 分别用 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切 *A. pullulans* CCTCC M2012223 基因组 (图 2-A), 通过 IPCR 法最终得到含核心片段的基因全长 (图 2-B)。将片段同载体 pMD-19T 连接, 转化 *E. coli* DH5a, 筛选获得阳性重组子, 测序获得苹果

酰辅酶 A 连接酶基因全长。

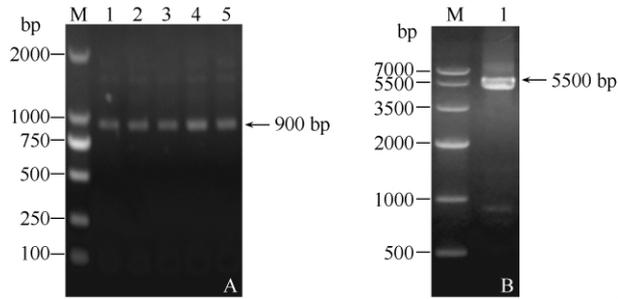


图 2. 出芽短梗霉基因组酶切和 IPCR 扩增

Figure 2. The genome restriction enzyme analysis and IPCR amplification.

经过测序获得了该酶编码基因序列全长为 1498 bp, 共编码 440 aa, 含有 4 个外显子和 3 个内含子, 根据氨基酸序列推导其编码多肽链分子量约为 48 kDa。经 Clustalw 多序列对比, 真核生物 *A. pullulans* 来源苹果酰辅酶 A 连接酶与来自白螺菌属 *Phaeospirillum molischianum* 苹果酰辅酶 A 连接酶的氨基酸同源性为 51% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/488817930>); 与红杆菌属 *Rhodobacter capsulatus* 的苹果酰辅酶 A 连接酶同源性为 49% ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP\\_013066464.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_013066464.1))。

## 2.2 苹果酰辅酶 A 连接酶 cDNA 全长扩增及表达载体构建

为实现在大肠杆菌表达, 用真菌 RNA 提取试剂盒提取 *A. pullulans* 的总 RNA 为模板 (图 3-A), 用反转录酶试剂盒合成 cDNA 的第一条链并为模板, 扩增出 1500 bp 片段 (图 3-B)。将片段同载体 pMD-19T 连接, 转化 *E. coli* 感受态, 筛选获得阳性重组子, 测序获得苹果酰辅酶 A 连接酶 cDNA 全长。并将目的基因片段与经相应酶切处理的表达载体 pET32a(+) 连接后转入 *E. coli* DH5a, 通过菌落 PCR 筛选获得阳性菌落, 提取所得的重组质粒送华大测序, 测序结果表明片段连接成功。

## 2.3 酶蛋白的表达与纯化

表达载体 pET-Mcl 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 通过预培养及 IPTG 诱导 12 h 后, 收集的菌体经过超声破碎、离心分离, 细胞裂解液上清通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化蛋白。从 SDS-PAGE 蛋白电泳图 4-A 可以看出, 细胞裂解液在 66 kDa 左右处有明显蛋白条带; 纯化后蛋白电泳图显示 (图 4-B) 为单一条带, 苹果酰辅酶 A 连接酶基因加上载体标签共约

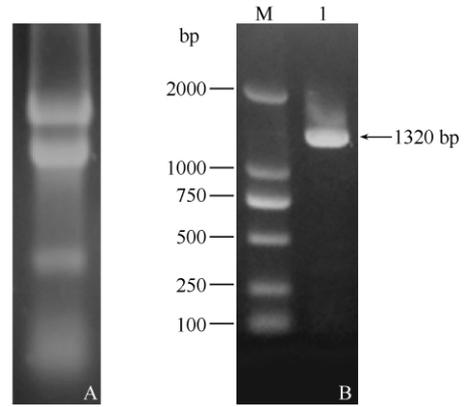


图 3. 出芽短梗霉总 RNA 和苹果酰辅酶 A 连接酶 cDNA 全长电泳图

Figure 3. The total RNA from *A. pullulans* and cDNA full-length of malate-CoA ligase.

68 kDa, 同计算分子量大小一致, 表明苹果酰辅酶 A 连接酶在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功高效表达, 且蛋白纯化效果较好。

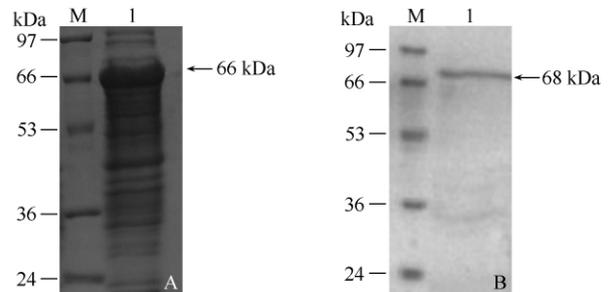


图 4. 苹果酰辅酶 A 连接酶蛋白表达 SDS-PAGE 分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis for malate-CoA ligase.

## 2.4 苹果酰辅酶 A 连接酶酶学性质

**2.4.1 酶的最适反应温度:** 实验结果如图 5-A 所示, Mcl 酶蛋白的最适酶促反应温度为 25℃ (将此催化活性设定为 100%), 与发酵最佳控制温度一致。在 20-40℃ 下, 相对酶活力较高, 达到 70%-100%, 说明该酶蛋白对温度的耐受力比较强。

**2.4.2 酶的最适反应 pH:** 测定酶蛋白在不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液中的相对活性发现其最适反应 pH 为 8.0 (图 5-B), 酶蛋白具有较窄的 pH 适应范围, 当 pH 值高于或低于 8.0 时, 酶蛋白的相对活性急剧下降。

**2.4.3 酶的最适 ATP 底物浓度:** 由于高浓度 ATP 对酶促反应存在抑制作用, 测定不同 ATP 底物浓度下的酶蛋白相对活性发现 (图 5-C), ATP 浓度为 0.2 mmol/L 时, 酶反应速度最大, 随着 ATP 浓度逐渐增大, 酶的催化活性急剧下降, 当 ATP 浓度为

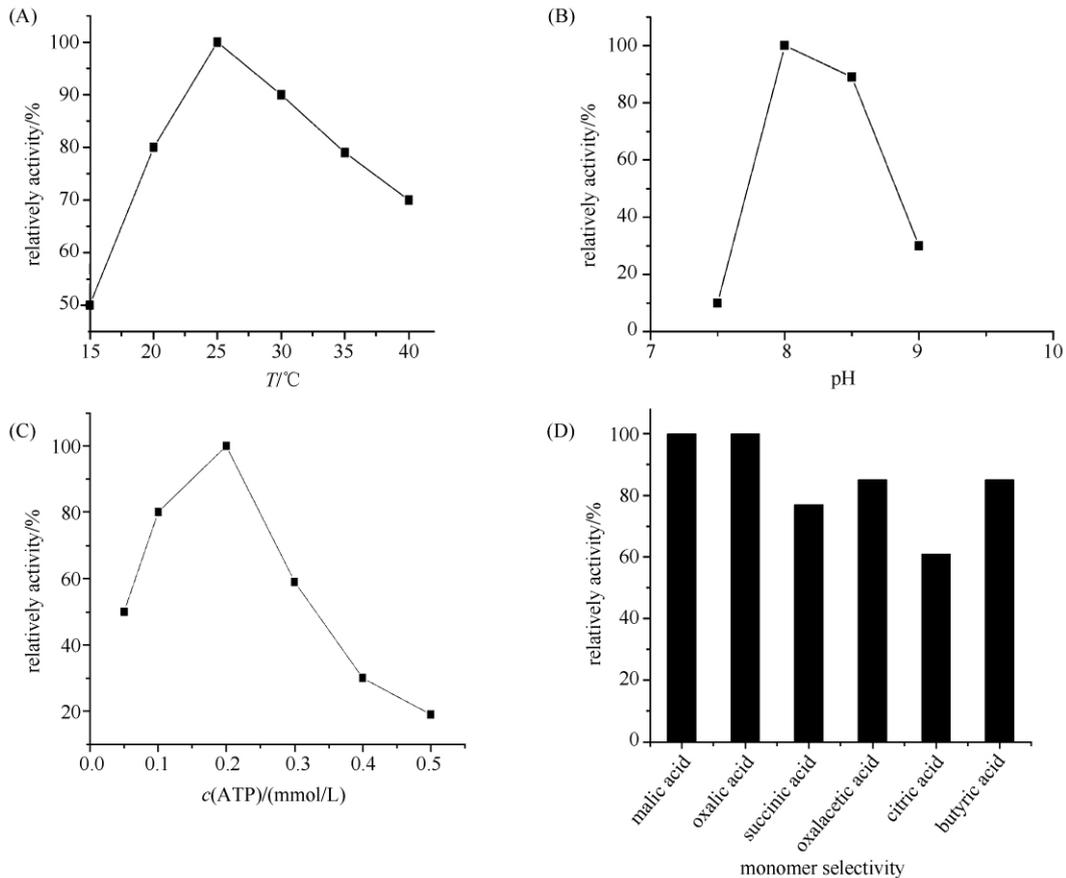


图 5. 苹果酸辅酶 A 连接酶的酶学性质

Figure 5. The characterization of malate-CoA ligase. A: Temperature; B: pH; C: the concentration of ATP; D: monomer selectivity.

0.5 mmol/L时,酶促反应基本受到抑制。

**2.4.4 酶的单体选择性:**以催化苹果酸时催化活性设定为酶活标准(100%),测定重组酶蛋白对不同单体底物的催化活性,结果如图 5-D 所示,酶蛋白具有较广的底物选择性,可以催化不同单体草酸、草酰乙酸、琥珀酸、柠檬酸、丁酸、丙二酸;苹果酸为该酶蛋白催化的最适单体,其次为草酸、草酰乙酸、丁酸、丙二酸,对柠檬酸和琥珀酸的催化活性相对较低。

**2.4.5 酶促动力学参数:**苹果酰辅酶 A 连接酶酶促反应涉及底物 ATP、CoA 和苹果酸,由于 ATP 对反应有抑制作用,在酶促反应动力学参数测定中分别选择 CoA 和苹果酸为催化底物,采用双倒数作图求得酶蛋白酶促动力学参数,线性拟合如图 6 所示。

由图 6-A 所示,改变底物 CoA 浓度,在 ATP 和苹果酸的浓度一定,计算得到苹果酰辅酶 A 连接酶表观米氏常数为  $K_m = 0.546$  mmol/L,最大反应速度  $V_{max} = 0.282$   $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ,专一性常数  $K_{cat}/K_m = 1.29 \times 10^6$  [ $\text{S}^{-1}\cdot(\text{mol}/\text{L})^{-1}$ ];由图 6-B 所示,改

变底物苹果酸的浓度,ATP 和 CoA 的浓度一定,计算获得苹果酰辅酶 A 连接酶表观米氏常数为  $K_m = 0.092$  mmol/L,最大反应速度  $V_{max} = 0.190$   $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ,专一性常数  $K_{cat}/K_m = 5.157 \times 10^6$  [ $\text{S}^{-1}\cdot(\text{mol}/\text{L})^{-1}$ ]。

### 3 讨论

聚苹果酸作为一种新型生物可降解聚合物,由于聚苹果酸的聚合途径尚未阐明,制约对其进行深入研究。本文通过生物信息学分析,首次从出芽短梗霉中克隆得到苹果酰辅酶 A 连接酶基因,并成功在大肠杆菌中实现表达纯化。与原核生物来源的苹果酰辅酶 A 连接酶基因相比,出芽短梗霉同褐螺菌属 *Phaeospirillum molischianum* 苹果酰辅酶 A 连接酶编码氨基酸同源性的 51%,同红杆菌属 *Rhodobacter capsulatus* 苹果酰辅酶 A 连接酶氨基酸同源性的 49%,说明本研究克隆得到的苹果酰辅酶

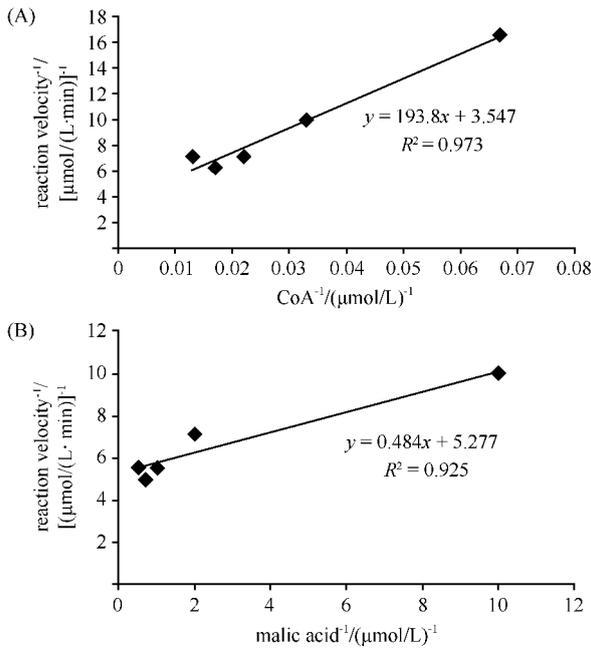


图 6. 苹果酰辅酶 A 连接酶的酶促反应动力学参数

Figure 6. The kinetic parameters of catalyzed reaction of malate-CoA ligase. A: CoA; B: malic acid.

A 连接酶为一种新型酶蛋白。酶学性质研究表明, 该酶蛋白最适反应温度为  $25^{\circ}\text{C}$ , 在  $20-40^{\circ}\text{C}$  条件下也具有较好的催化活性, 可以保持 70% 以上的酶活; 最适酶促反应 pH 为 8.0, 显示具有较窄的 pH 适应范围。苹果酰辅酶 A 连接酶是 ATP 依赖型酶<sup>[14]</sup>, 本实验发现底物 ATP 浓度大于  $0.2\text{ mmol/L}$  时, 明显对酶活性具有抑制作用, 因此, 采用定向进化等手段提高苹果酰辅酶 A 连接酶对底物 ATP 的耐受浓度, 将可能提高聚苹果酸的单体聚合能力。

聚合物材料性质通常与单体组成有关, 苹果酰辅酶 A 连接酶单体选择性实验表明, 出芽短梗霉来源的苹果酰辅酶 A 连接酶具有较宽的底物选择性, 草酸、草酰乙酸、琥珀酸、柠檬酸、丁酸、丙二酸等均可作为该酶的催化底物。已知报道与苹果酰辅酶 A 连接酶具有相似酰基化作用的琥珀酰辅酶 A 连接酶, 仅对琥珀酸具有选择性, 而对丁酸、草酸、丙二酸、戊二酸、己酸、延胡索酸、马来酸等没有催化活性<sup>[15-17]</sup>。此外, 微生物产生另一类聚酯型聚合物聚  $\beta$ -羟基丁酸 (PHB), 同样需要对单体的酰基化, 除羟基丁酸外, 底物单体的不同, 可形成具有不同材料特性的共聚物<sup>[18-19]</sup>。本研究从真核生物来源获得的苹果酰辅酶 A 连接酶基因具有广泛的底物选择性, 将为在生物体内构建不同单体聚合物生物合成途径及创制新型可降解材料奠定基础。

## 参考文献

- [1] Lee BS, Holler E. Beta-poly (L-malate) production by non-growing microplasmidia of *Physarum polycephalum* - Effects of metabolic intermediates and inhibitors. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 193 (1) : 69-74.
- [2] Shimada K, Matsushima Ki, Fukumoto J, Yamamoto T. Poly-(L)-malic acid; A new protease inhibitor from *Penicillium cyclopium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 35 (5) : 619-624.
- [3] Lee BS, Holler E. Effects of culture conditions on beta-poly (L-malate) production by *Physarum polycephalum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51 (5) : 647-652.
- [4] Liu SJ, Steinbuchel A. Production of poly (malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 1997, 19 (1) : 11-14.
- [5] Zhang H, Cai J, Dong J, Zhang D, Huang L, Xu Z, Cen P. High-level production of poly (beta-L-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92 (2) : 295-303.
- [6] Zan ZQ, Zou X. Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013, 88 (10) : 1822-1827.
- [7] Zou X, Zhou Y, Yang ST. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110 (8) : 2105-2113.
- [8] Cheng RD, Wang H, Zhou H, Cheng YY, He RP, Wei P. Investigation of poly ( $\beta$ -malic acid) synthesis pathways and regulation by strains of *Aureobasidium pullulans*. *CIESC Journal*, 2012, 63 (11) : 3640-3644. (in Chinese)
- [9] Willibald B, Bildl W, Lee BS, Holler E. Is beta-poly (L-malate) synthesis catalysed by a combination of beta-L-malyl-AMP-ligase and beta-poly (L-malate) polymerase? *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265 (3) : 1085-1090.
- [10] Willibald B, Boves H, Holler E. Preparative synthesis of beta-L-malyl-coenzyme-A assisted by malyl-coenzyme-A synthetase from *Pseudomonas* AM1. *Analytical*

- Biochemistry, 1995, 227 (2) : 363-367.
- [11] Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1958, 74 (2) : 443-450.
- [12] Hersh LB. Malate Thiokinase. the reaction mechanism as determined by initial rate studies. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249 (19) : 6264-6271.
- [13] Hersh LB. Malate adenosine triphosphate lyase. Separation of the reaction into a malate thiokinase and malyl coenzyme A lyase. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248 (21) : 7295-7303.
- [14] Galperin MY, Koonin EV. A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Science*, 1997, 6 (12) : 2639-2643.
- [15] Gibson J, Upper CD, Gunsalus I. Succinyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli* I. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242 (10) : 2474-2477.
- [16] Leutwein C, Heider J. Succinyl-CoA: (R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (14) : 4288-4295.
- [17] Nandi D, Waygood E. Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves. I. Succinate: CoA ligase (ADP). *Canadian Journal of Biochemistry*, 1965, 43 (10) : 1605-1614.
- [18] Meng DC, Shi ZY, Wu LP, Zhou Q, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. Production and characterization of poly (3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metabolic Engineering*, 2012, 14 (4) : 317-324.
- [19] Park SJ, Kim TW, Kim MK, Lee SY, Lim SC. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*, 2012, 30 (6) : 1196-1206.

## Gene cloning, expression and characterization of malate-CoA ligase in the polymerization pathway of polymalic acid from *Aureobasidium pullulans*

Xiaoyan Wu<sup>1,2</sup>, Feng Zhou<sup>1,2</sup>, Guangwei Tu<sup>1,2</sup>, Xiang Zou<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715 China

<sup>2</sup>Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 400715, China

**Abstract:** [Objective] To clone and characterize the malate-CoA ligase in the polymalic acid biosynthetic pathway from *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. [Methods] The malate-CoA ligase gene was cloned into the expression vector pET-Mcl by IPCR technique, and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). After purified with Ni-NTA column chromatography, the protein was characterized. [Result] The full-length of malate-CoA ligase gene was 1498 bp, and composed with 440 amino acids containing 4 exons and 3 introns. The optimal temperature and pH was 25°C and 8.0, respectively, but the high substrate concentration of ATP could obviously inhibited the enzyme activity. The monomer selectivity showed that the enzyme catalyzed the substrates of oxalic acid, oxaloacetic acid, butyric acid, and malonic acid. [Conclusion] The malate-CoA ligase gene in the polymerization pathway of polymalic acid from *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 was successfully cloned, which will be helpful in deeply understanding the polymerization pathway and producing new polymers.

**Keywords:** *Aureobasidium pullulans*, malate-CoA ligase, polymerization pathway, monomer selectivity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2014AA021205), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2013B039) and by the Ability Program of Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control (CSTC2012 gg-yyjsb10002-33)

\* Corresponding author. Tel: +86-2368251225; E-mail: zhx1030@swu.edu.cn

Received: 30 January 2014/Revised: 3 April 2014