



在大肠杆菌中拓展合成途径合成异胡椒醇

马文晓, 陈弼致, 孟春, 王航*

福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350108

马文晓, 陈弼致, 孟春, 王航. 在大肠杆菌中拓展合成途径合成异胡椒醇[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1243-1253.

MA Wenxiao, CHEN Bizhi, MENG Chun, WANG Hang. Expanding the pathway to synthesize isopiperitenol in *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1243-1253.

摘要: 天然异胡椒醇作为一种植物来源香料, 具有很高的经济价值。目前国内外还未见利用大肠杆菌工程菌株转化生产异胡椒醇的报道。【目的】构建工程菌, 采用生物合成方法获得天然香料异胡椒醇。【方法】对来自胡椒薄荷的细胞色素 P450 家族的柠檬烯-3-羟化酶(LIM3H)基因 *PM2* 进行改造, 截短 LIM3H 的 N 端疏水区, 分别添加 17 α 短肽或 2B1 短肽增加其亲水性, 采用 CO 差示光谱法检测 LIM3H 活性; 将 N 端疏水区截短后的来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因(*trATR*)和修饰后 LIM3H 基因(*Modi-LIM3H*)融合后表达, 最终以柠檬烯为底物进行全细胞转化。【结果】3 种 N 端修饰 LIM3H 基因均检测到 LIM3H 表达和异胡椒醇生成, 其中 17 α 短肽修饰后的蛋白表达量最高, 异胡椒醇产量达到 1.94 mg/L。【结论】本研究在大肠杆菌中增加外源 LIM3H 与 ATR, 成功催化柠檬烯生成异胡椒醇, 为天然异胡椒醇的生产提供了新的方法。

关键词: 柠檬烯-3-羟化酶; 大肠杆菌; N 端修饰; 异胡椒醇

Expanding the pathway to synthesize isopiperitenol in *Escherichia coli*

MA Wenxiao, CHEN Bizhi, MENG Chun, WANG Hang*

College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

Abstract: As a plant-derived aromatic compound, isopiperitenol has a high economic value. Little is known about the production of isopiperitenol in *Escherichia coli* engineering strains.

资助项目: 福建省自然科学基金(2022J01094)

This work was supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation (2022J01094).

*Corresponding author. Tel: +86-591-22866379, E-mail: whbio@foxmail.com

Received: 2022-08-01; Accepted: 2022-10-09; Published online: 2022-10-20

[Objective] To construct the engineering strains of *E. coli* for the biosynthesis of natural isopiperitenol. **[Methods]** We modified the limonene-3-hydroxylase (LIM3H) gene *PM2* of cytochrome P450 family from *Mentha×piperita* by truncating the N-terminal hydrophobic region or adding 17 α short peptide or 2B1 short peptide of LIM3H to increase its hydrophilicity. The activity of LIM3H was detected by CO differential spectroscopy. The NADPH-cytochrome P450 reductase gene with truncated N-terminal hydrophobic region (*trATR*) from *Arabidopsis thaliana* was fused with the modified *LIM3H* (*Modi-LIM3H*) gene and the fusion gene was expressed in *E. coli*. The obtained fusion protein was used to catalyze the production of isopiperitenol from limonene. **[Results]** LIM3H expression and isopiperitenol production were detected in all the strains with the *LIM3H* N-terminus modified in three different ways. The *LIM3H* modified by addition of 17 α short peptide showed the highest protein level, and the strain carrying this modified gene had the highest yield (1.94 mg/L) of isopiperitenol. **[Conclusion]** In this study, exogenous *LIM3H* and *ATR* were introduced into *E. coli* and the fusion protein catalyzed the production of isopiperitenol from limonene, which provided a new method for the production of natural isopiperitenol.

Keywords: limonene-3-hydroxylase; *Escherichia coli*; N-terminal modification; isopiperitenol

异胡椒醇即 3-甲基-6-(1-甲基乙烯)-2-环己烯-1-醇, 又称异薄荷二烯醇、异紫堇醇^[1], 是主要在苏菲亚玫瑰草和胡椒薄荷微粒体中存在的一种天然香料, 也是薄荷醇、薄荷酮、青蒿素等重要药用物质生物转化途径中的必要前体^[2-3]。由于受季节性限制以及自然生长周期较长, 从天然植物中提取异胡椒醇存在成本高、纯化困难以及产率低等问题; 化学反应合成生物安全性难以保证; 基于代谢工程的微生物合成异胡椒醇被认为是可工业化的合成“天然”香料的新方法。

植物中异胡椒醇的生物合成途径以柠檬烯为底物, 通过细胞色素 P450 还原酶传递电子, 由柠檬烯-3-羟化酶催化生成。1998 年, van Dyk 等^[4]将柠檬烯作为黑色酵母样真菌 *Hormonema* sp. UOFS Y-0067 的底物, 首次报道了通过微生物合成途径得到异胡椒醇。Haudenschild 等^[5]在酿酒酵母 WAT21 和大肠杆菌 JM109 中表达出 2 种有活性的 LIM3H: *PM2* 和 *PM17*, 通过构建体外微粒体重组膜系统证明了 LIM3H 催化柠檬烯生成异胡椒醇的能力。2021 年, Schempp 等^[6]

从出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)中筛选并鉴定出柠檬烯-3-羟化酶功能蛋白 CYP65FA1, 并命名为 L3H. Ap, 将其基因转入毕赤酵母中, 利用高浓度酵母($OD_{600}=2\ 250$)在 100 mL 密闭玻璃瓶中发酵 51 h, 获得 165 mg/L 异胡椒醇。

本研究中, 我们对真核来源 LIM3H N 端进行修饰, 获得了在大肠杆菌中具有生物活性的蛋白, 并与拟南芥 NADPH-细胞色素 P450 还原酶(*Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductase, *ATR*)在大肠杆菌中融合表达, 成功催化柠檬烯合成异胡椒醇。

1 材料与方法

1.1 材料

PM2 基因(GenBank 登录号为 AF124817)由安徽滁州通用生物公司合成, *ATR* 基因(GenBank 登录号为 X66017.1)由南京金斯瑞公司合成; 大肠杆菌 BL21(DE3)为本实验室保存; pETDuet-1 载体为本实验室保存。S-柠檬烯购自 Sigma 公司, 异胡椒醇对照品由上海纳孚生物公司定制, *Taq* 酶、限

制性内切酶、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司, DNA 提取、无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 LIM3H 载体构建和表达

将 *PM2* 基因构建在 pETDuet-1 载体的 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点之间, 重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中得到重组菌株 BL21-Duet-PM2。

将重组菌株 BL21-Duet-PM2 按接种量 1% (体积分数)接种于 4 mL 氨苄(ampicillin, Amp)抗性的 LB 试管培养基中, 37 °C、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 约 0.6 时加入 0.5 mmol/L IPTG、1 mmol/L 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid, ALA)和 0.5 mmol/L 的硫酸铁铵。37 °C、200 r/min 振荡培养 16 h, 通过 SDS-PAGE 电泳验证目的蛋白表达情况。

1.3 LIM3H 二级结构分析及 N 端修饰

在 ExPASy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)对该基因编码蛋白质的理论相对分子质量和理论等电点进行预测, 使用 TMpred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)对该基因编码蛋白质的跨膜区进行预测, 使用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对该基因编码蛋白质的信号肽进行预测。最后根据预

测的跨膜区及信号肽序列设计对 LIM3H 的修饰。

设计 *PM2* 基因不含 5'端 4–69 bp 的 5'端引物(表 1), 通过 PCR 得到截短的 *PM2* (*trPM2*); 将 2 种不同的亲水性修饰片段 17 α 和 2B1 序列通过 5'端引物设计加入到 *trPM2* 中, 分别得到 17 α *trPM2*、2B1*trPM2*。

分别以表 1 中引物 2/5、3/5、4/5 为上下游引物, 以 *PM2* 为模板, PCR 产物分别克隆至 pETDuet-1 载体 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点之间, 并转化至表达菌 BL21(DE3)中, 得到 BL21-Duet-*trPM2*、BL21-Duet-17 α *trPM2*、BL21-Duet-2B1*trPM2* 三种重组菌株, 经修饰后表达的 LIM3H 统称为 Modified LIM3H (Modi-LIM3H)。通过琼脂糖凝胶电泳和测序验证阳性转化菌。

1.4 Modi-LIM3H 蛋白浓度测定

采用 Omura 等于 1964 年报道的 CO 差示光谱法测定^[7]。

1.5 ATR 与 Modi-LIM3H 融合

以表 1 中引物 6/7 为上下游引物, 以携带有 *ATR* 基因的 pETDuet-1 载体为模板, 扩增得到 *trATR* 基因, 同源重组至 pETDuet-1 的 MCS2 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点之间得到重组质粒 pETDuet-*trATR*。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

No.	Primer name	Sequences (5'→3')
1	Duet-PM2-F	TTAAGAAGGAGATATACCATGGAACTGCTGCAGCTG
2	Duet- <i>trPM2</i> -F	AGAAGGAGATATACCATGGAAAATCAGTGGCGC
3	Duet-17 α <i>trPM2</i> -F	GAAGGAGATATACCATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTATGGAAAATCAGTGCG
4	Duet-2B1 <i>trPM2</i> -F	AAGAAGGAGATATACCATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGCTCC CACCAGGACCTAGCATGGAAAATCAGTGGCGC
5	Duet-PM2-R	CATTATGCGGCCGCTTAGCTAGACGGAT
6	Duet- <i>trATR</i> -F	TAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCGCAACTCGAAGC
7	Duet- <i>trATR</i> -R	CTTTACCAGACTCGAGTTACCACACATCGCGCAGATA
8	Duet-FX-Fus-F(<i>trAt</i>)	GGATCTATCTCTTCAGGATCCGGAATGGGCAGCGCAACT
9	Duet-FX-Fus-R(<i>trAt</i>)	CCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATT
10	Duet-PM2FUS-R	TCCGGATCCTGAAGAGATAGATCCGCTAGACGGATCATACGGGGT

Underscore: Hydrophilic modified peptides; Bold: Linker.

以重组质粒 pETDuet-*trATR* 为模板, 以表 1 中引物 8/9 为上下游引物, 通过反向 PCR 扩增出携带有 *trATR* 基因的 pETDuet-1 线性化质粒。分别以表 1 中引物 2、3、4 为上游引物, 引物 10 为下游引物对 *PM2* 进行扩增, 人工构建 Modi-LIM3H 与 *trATR* 的融合蛋白, 得到重组菌株 BL21-Fus-*trPM2-trATR*、BL21-Fus-17 α *trPM2-trATR*、BL21-Fus-2B1*trPM2-trATR*。各重组菌株蛋白表达方法同 1.2。

1.6 全细胞反应

将融合表达菌株按 1%接种量接种至 200 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.4–0.6 时, 添加终浓度 0.2 mmol/L IPTG、1 mmol/L ALA、0.5 mmol/L 硫酸铁铵, 16 °C 诱导 16 h, 离心收集菌体重悬至 30 mL LB 培养基中, 并加入终浓度 2.5 g/L (S)-柠檬烯、15 g/L 葡萄糖, 于 32 °C 进行全细胞催化, 反应于 24 h 后终止。

1.7 产物分析方法

采用安捷伦 MSD5977A 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 仪进行分析。色谱条件: 色谱柱 Hp-INNOWAX (30 m \times 0.250 mm \times 0.25 μ m); 检测器为 TCD; 进样口温度 250 °C; 压力 7 psi; 载气为氦气, 总流量 19 mL/min; 进样模式为标准, 不分流; 隔垫吹扫流量: 3 mL/min。质谱电离方式: EI; 电子能量 70 eV; 扫描方式: 全扫描。升温程序: 初始温度 40 °C, 保持 5 min。按 15 °C/min 升温, 升至 240 °C, 保持 5 min。

异胡椒醇对照品合成: 委托上海纳孚生物科技有限公司通过化学合成的方法得到了纯度>95%的异胡椒醇对照品, 并进行了核磁氢谱 (HNMR) 与液相色谱-质谱联用 (LCMS) 检测 [HNMR 和 LCMS 数据已提交到国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmcd.cn>), 编号为 NMDCX0000143]。

样品预处理: 取 1 mL 发酵液于 2 mL EP 管中, 加入 0.6 g 的磷酸氢二钾, 加入 200 μ L 乙酸乙酯溶剂, 旋涡振荡直至磷酸氢二钾完全溶解, 4 °C、5 000 \times g 离心 10 min, 取上层有机相进行 GC-MS 检测。

2 结果与分析

2.1 薄荷来源 LIM3H 在 *E. coli* 中异源表达策略

在胡椒薄荷中 (图 1A), 微粒体细胞色素 P450 LIM3H 在柠檬烯(1)烯丙基位置引入一个氧原子, 产生(-)-反式异胡椒醇(2)。为了具有催化活性, P450 必须与细胞色素 P450 还原酶 (cytochrome P450 reductase, CPR) 结合, CPR 将 2 个电子从 NAD(P)H 顺序转移到 P450 血红素中心^[8]。

从 Uniprot 蛋白质序列数据库中查询到 *PM2* 对应的蛋白质序列 CYP71D15, 通过在线分析软件 TMpred, 确定其跨膜区为 3–23 aa。ExPASy 分析表明 *PM2* 基因全长 1 497 bp, 共编码 498 个氨基酸, 理论等电点为 pI 8.30。为了使 LIM3H 在 *E. coli* 中可溶性表达产生活性蛋白, 对其跨膜区结构设计了 3 种修饰方法 (图 1B), 修饰方法 1 仅截除其 N 端输水区, 修饰方法 2、3 分别在截短后的序列 N 端再接上一段亲水性修饰短肽 17 α 、2B1 从而促进其可溶性表达, 3 种修饰方法统称为 Modi-LIM3H。

2.2 Modi-LIM3H 蛋白表达及优化

PM2 基因编码蛋白质的理论分子量为 54.89 kDa。如图 2 所示, 图中 A、B、C 分别表示 BL21-Duet-*PM2* 在不同诱导温度、诱导时间以及不同 IPTG 诱导浓度下全菌的蛋白表达情况, 蛋白电泳在 50–70 kDa 之间均未检测到外源基因的过表达情况。

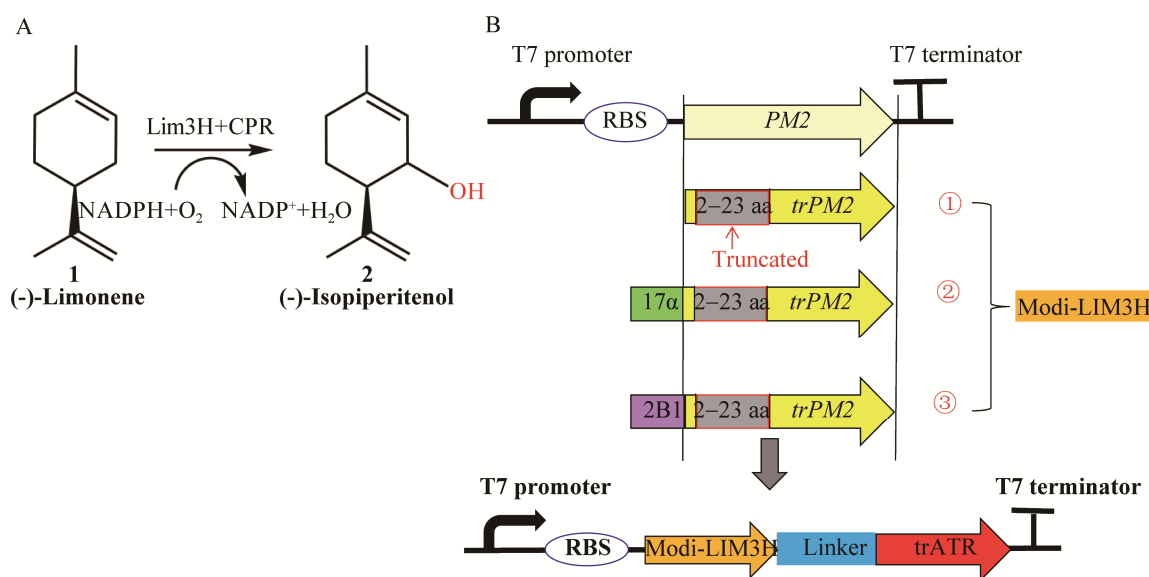


图1 LIM3H 催化反应过程及改造和表达策略

Figure 1 LIM3H catalytic reaction process and transformation and expression strategies. A: LIM3H catalytic reaction. B: LIM3H transformation and expression strategies.

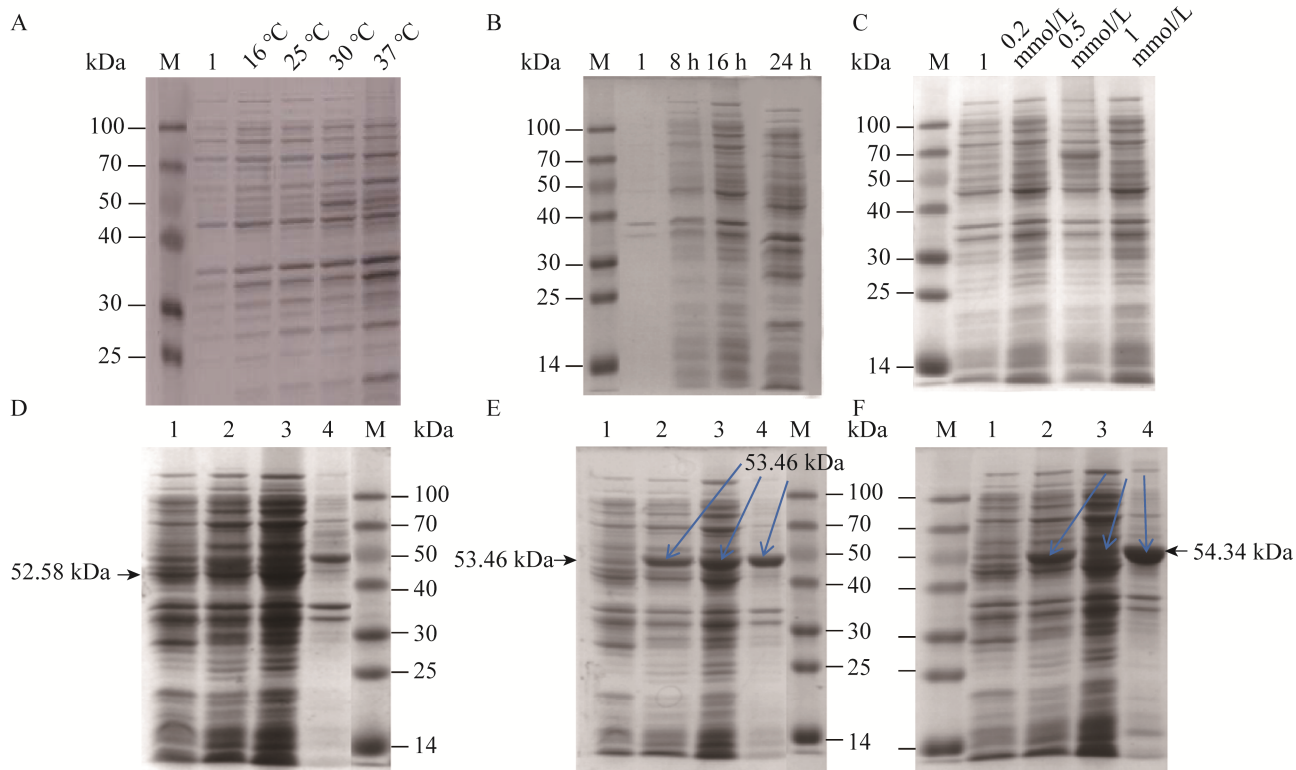


图2 LIM3H 和 Modi-LIM3H 蛋白表达优化

Figure 2 Protein expression optimization of LIM3H and Modi-LIM3H. A: LIM3H recombinant strain at different induction temperatures with 0.5 mmol/L IPTG for 16 h. B: LIM3H recombinant strain at different induction times with 0.5 mmol/L IPTG in 37 °C. C: LIM3H recombinant strain at different IPTG inducing concentrations in 37 °C for 16 h. D–F: Modi-LIM3H protein expression induced by 0.2 mmol/L IPTG at 16 °C for 16 h. M: Marker; 1: Uninduced; 2: Whole bacteria; 3: Supernatant; 4: Precipitation. D: BL21-Duet-trPM2. E: BL21-Duet-17αtrPM2. F: BL21-Duet-2B1trPM2.

根据基因改造示意图构建 3 种 LIM3H N 端修饰的重组菌, 分别对 *Modi*-LIM3H 蛋白表达的诱导温度、时间及 IPTG 浓度进行优化, 确定了最佳诱导条件为 0.2 mmol/L IPTG 在 16 °C 诱导 16 h, 图 2D、2E、2F 分别表示 BL21-Duet-trPM2、BL21-Duet-17 α trPM2、BL21-Duet-2B1trPM2 三种菌株在最佳诱导条件下的蛋白表达情况, 其中

BL21-Duet-17 α trPM2 蛋白上清表达量最高。

LIM3H 属于 P450 家族, 根据 P450 具有特定索瑞吸收峰的特性, 测定了其在还原态下与 CO 的吸收光谱, 结果显示, BL21-Duet-trPM2、BL21-Duet-17 α trPM2、BL21-Duet-2B1trPM2 菌株均在 450 nm 处显示出有吸收峰(图 3A), 重组菌株表达出的 LIM3H 具有酶活性。

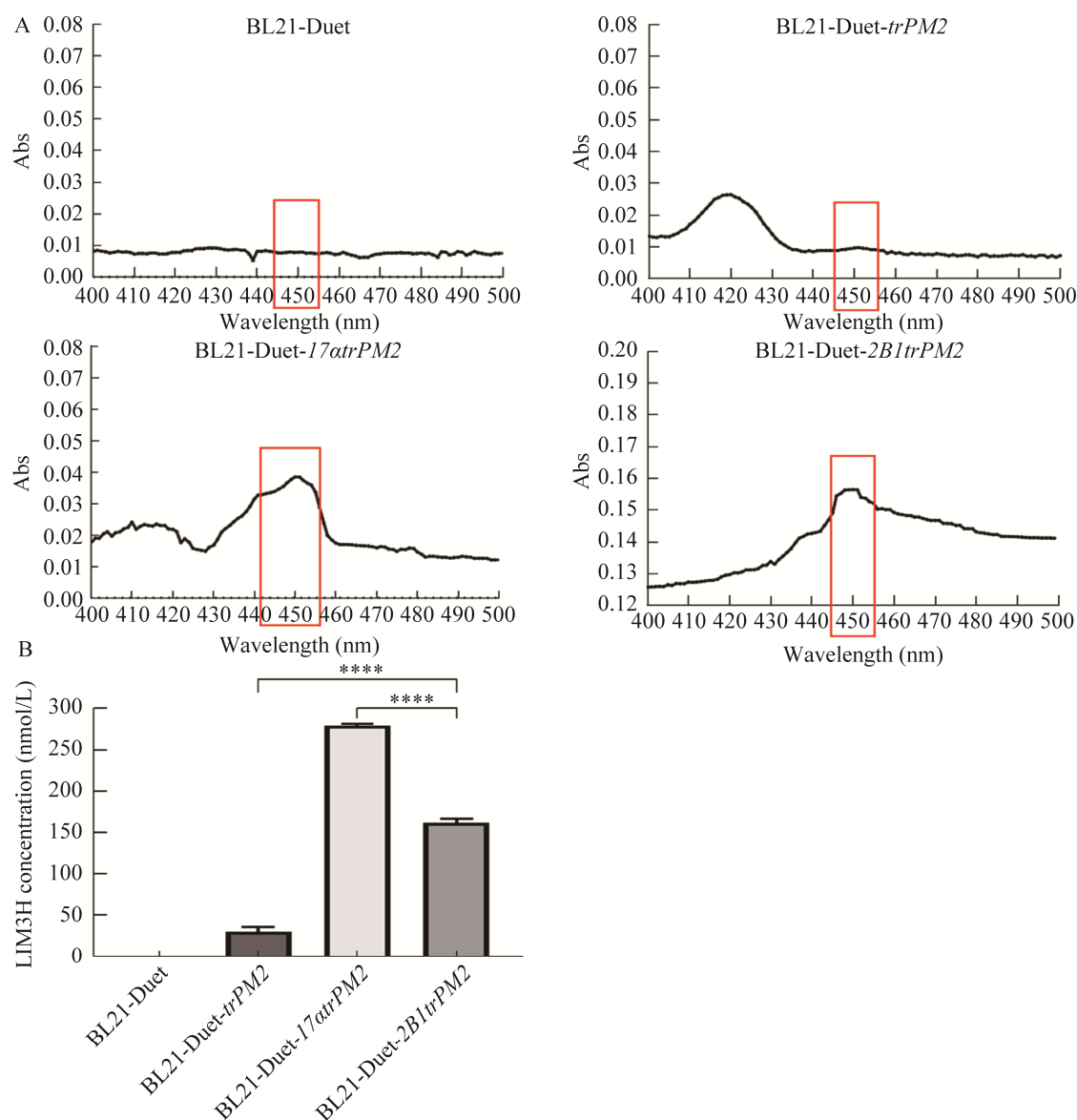


图 3 *Modi*-LIM3H CO 吸收光谱和活性 LIM3H 蛋白浓度

Figure 3 *Modi*-LIM3H CO absorption spectrum and protein concentration of active LIM3H. A: CO absorption spectrum. B: Protein concentration of active LIM3H. According to the one-way ANOVA test to analyze the significance between the data of each group. ***: There is a significant difference.

根据 CO 还原前、后的 ΔA_{450} 与 ΔA_{490} 吸光值之差代入 Omura^[7] 的公式, 我们得到各菌株表达的活性 LIM3H 蛋白浓度(图 3B)。其中, BL21-Duet-17 α trPM2 表达的 LIM3H 浓度最高, 为 278 nmol/L。表 2 中详细展示了各菌株 CO 还原前后的 ΔA_{450} 与 ΔA_{490} 数值。

2.3 ATR 与 Modi-LIM3H 融合及全细胞转化

通过同源重组成功构建了 Modi-LIM3H 与 ATR 的融合表达菌株: BL21-Fus-trPM2-trATR、BL21-Fus-17 α trPM2-trATR 和 BL21-Fus-2B1trPM2-trATR, 经测序比对完全正确。在 Modi-LIM3H

最佳诱导条件下对 3 株重组菌株进行 SDS-PAGE 蛋白电泳验证。

3 种融合蛋白理论分子量分别为 123.16 kDa、124.04 kDa、124.92 kDa。如图 4 所示, BL21-Fus-trPM2-trATR 仅在全菌中观察到融合蛋白的微量表达, BL21-Fus-17 α trPM2-trATR、BL21-Fus-2B1trPM2-trATR 两株菌均可在 100–135 kDa marker 之间观察到明显的蛋白过表达情况。

经 GC-MS 检测, 异胡椒醇对照品离子流色谱图(TIC) (图 5A)在 14.4 min 出峰, 而重组的融合表达菌株全细胞催化反应产物也在该位置有丰度最强信号峰。提取异胡椒醇对照品和 BL21-Fus-17 α trPM2-trATR 在 14.4 min 的质谱图进行比对(图 6A、6B), 它们的主要特征峰均相似, 表明在保留时间 14.4 min 时的色谱峰即目标产物异胡椒醇。最终, 由异胡椒醇标准曲线可知, BL21-Fus-17 α trPM2-trATR 的产物浓度最高为 1.94 mg/L。

表 2 Modi-LIM3H CO 还原前后 ΔA_{450} 与 ΔA_{490} 值
Table 2 ΔA_{450} and ΔA_{490} values before and after Modi-LIM3H CO reduction

Strain	ΔA_{450}	ΔA_{490}
BL21-Duet-trPM2	0.009 7	0.007 2
BL21-Duet-17 α trPM2	0.038 4	0.013 2
BL21-Duet-2B1trPM2	0.142 0	0.157 0

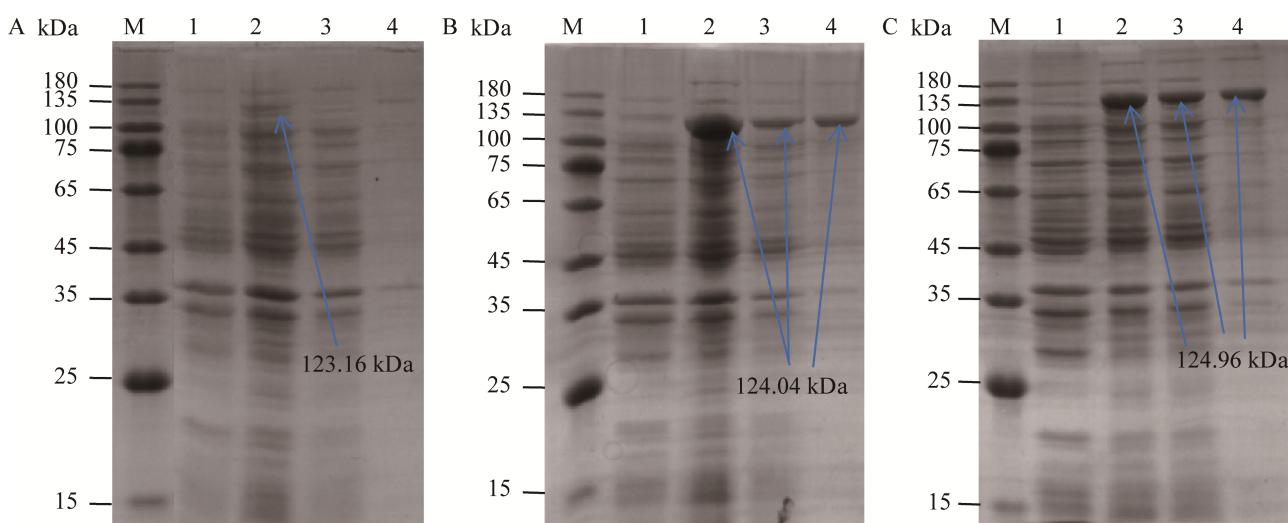


图 4 融合表达菌株的蛋白表达情况

Figure 4 Protein expression of fusion expression strains. A: BL21-Fus-trPM2-trATR. B: BL21-Fus-17 α trPM2-trATR. C: BL21-Fus-2B1trPM2-trATR. M: Marker; 1: Uninduced; 2: Whole bacteria; 3: Supernatant; 4: Precipitation.

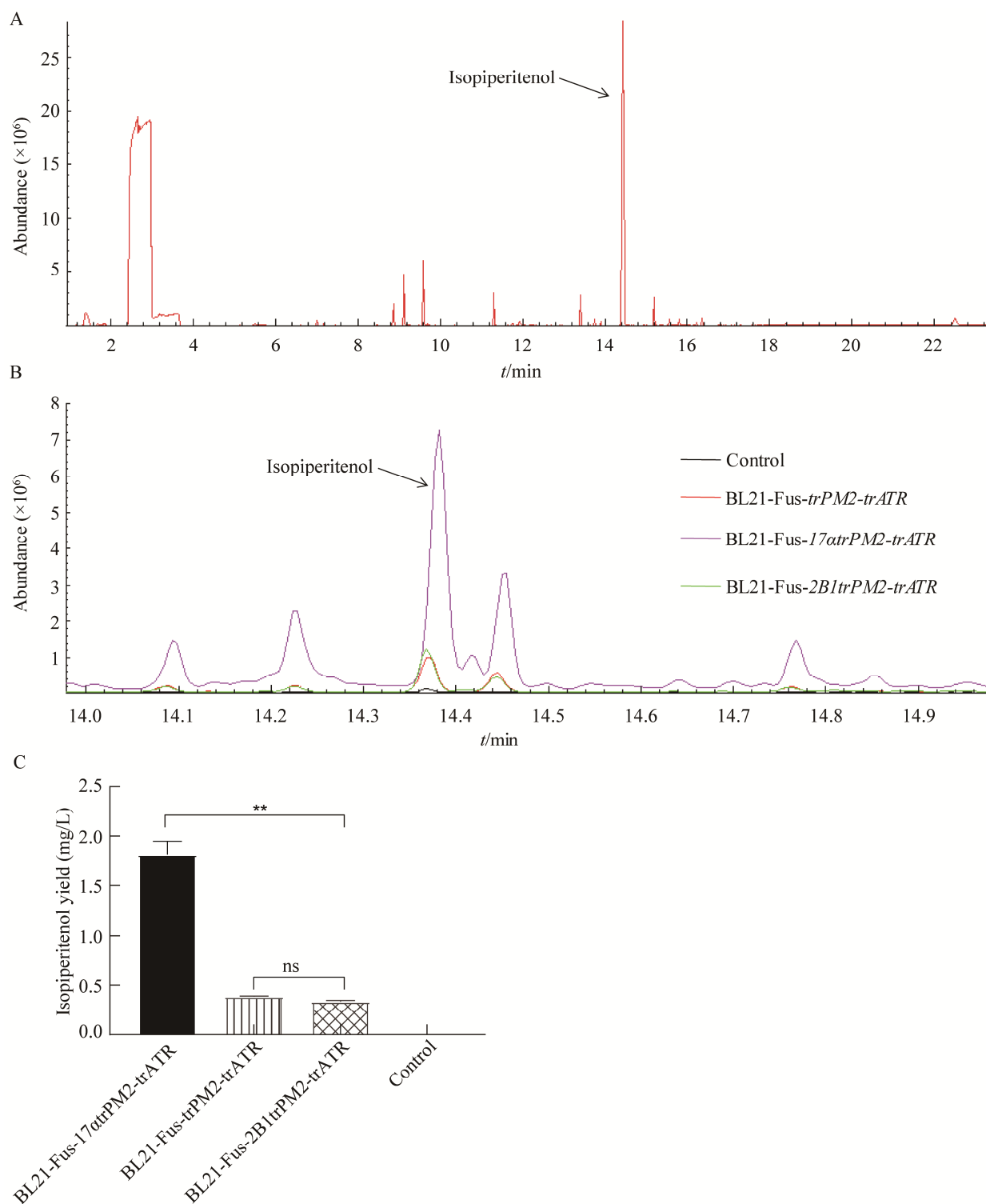


图5 异胡椒醇 TIC 图及其在各重组菌中的产量

Figure 5 TIC of isopiperitenol and its yield in each recombinant strain. A: TIC chart of isopiperitenol reference substance. B: Chromatogram of transformed products by fusion expression strain. C: Yield of transformation products of recombinant strain. **: T-test shows significant differences, ns: T-test shows no significant differences.

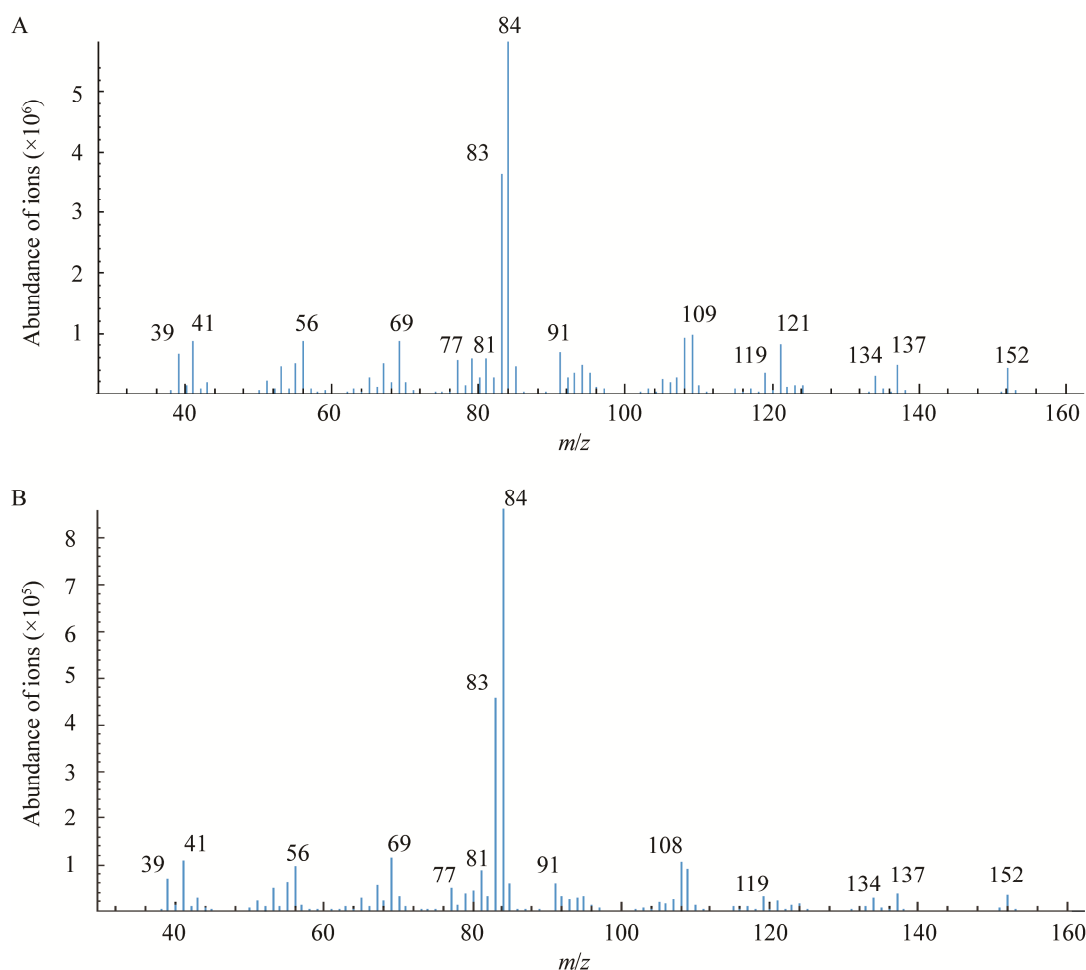


图 6 异胡椒醇质谱图

Figure 6 Mass spectra of isopiperitenol. A: Mass spectra of isopiperitenol reference substance at $t=14.4$ min. B: Mass spectra of BL21-Fus-17atrPM2-trATR at $t=14.4$ min.

3 讨论与结论

研究表明^[9], 由于真核 CYP450 及其还原蛋白均在其 N 端有一段疏水性螺旋区域, 导致异源表达水平偏低甚至不表达。本研究中, 构建的 *PM2* 基因重组菌在不同诱导温度、诱导时间以及不同 IPTG 诱导浓度下均未检测到外源基因的过表达情况。

Ichinose 等^[10]的研究表明, 用适当的“chimeric partners”替换 N 末端结构域可以改善许多 P450 的异源表达, 尽管这些“partners”并不

总是对其他 P450 有效。根据真核来源 P450 在大肠杆菌中成功表达的报道, 我们设计了 3 种对于 LIM3H 异源表达的 N 端修饰。

第一种是将 *PM2* 基因的 5'端疏水区基因截除, 这种 N 端截短的方法曾被用来提高哺乳动物 P450 酶在大肠杆菌中表达的溶解度^[11]。麦婉莹等^[12]指出, 真菌来源的 P450 基因 *Au8002* 只有敲除 N 端疏水区序列全长时才能实现蛋白可溶性表达。基于 LIM3H 生物信息学分析的结果, 它的跨膜区存在于第 3-23 aa, 结合文献[12], 我们设计敲除其 2-23 aa 得到 *trPM2*。

牛心 17 α 羟化酶最早是在 1991 年由 Barnes 等^[13]发现, 在大肠杆菌 JM109 中可以重建羟化酶的酶活性, 开创了真核来源 P450 在大肠杆菌中表达的先例。Haudenschield^[5]根据这种设计方法, 以牛心 17 α 羟化酶上 7 个氨基酸的短肽替换 limonene-6-hydroxylase (LIM6H) 和 LIM3H 的 N 端疏水区, 在大肠杆菌中重建了 LIM6H 和 LIM3H 的酶活性, PM2 基因编码的 LIM3H 含量达到 500 nmol/L, 随后作者通过整合了 ATR 酵母微粒体膜提取物与纯化的 LIM3H 构建了体外重组反应, 通过 GC-MS 检测到了异胡椒醇的产生(未定量)。

Effendi 等^[14]在 2007 年、Li 等^[9]在 2019 年还应用了另外一种亲水性短肽 2B1 替换 P450s 的 N 端疏水区, 通过与长春花和拟南芥的 CPR 重组, 分别实现了异黄酮和黄芩素在大肠杆菌中的全细胞催化转化。

为了促进 LIM3H 更好地可溶性表达, 本研究将 2 种不同的亲水性修饰片段 17 α 和 2B1 序列通过 PCR 加入到 *trPM2* 5'端。结果表明, N 端截短及 2 种 N 端替换修饰均可以有效促进 LIM3H 在大肠杆菌中蛋白表达的可溶性, 其中 17 α 修饰的可溶性蛋白表达量最高。

由于大肠杆菌中 CPR 的缺失, P450 在细胞内无法发挥活性作用, 因此还需外源导入一段 CPR 基因, 而遗憾的是薄荷的 CPR 基因序列至今还未见报道。参考植物细胞 P450 在大肠杆菌中能够实现全细胞催化的相关报道^[5,9,15], ATR 对其他非拟南芥 P450 酶具有协同作用, 可作为一个较好的还原伴侣蛋白应用于酶的催化反应。与原核的恶臭假单胞菌 P450 类似^[16], 可以通过将 LIM3H 基因与 ATR 基因用一定长度的柔性肽链(linker)连接在一起构建成人工融合蛋白, 以满足 LIM3H 对氧化还原蛋白的需求以及防止 2 个相近的蛋白结构折叠错误。Effendi^[14]报道了

异黄酮合酶与长春花 CPR 在融合表达时所选用的一种 linker, 该片段编码多肽序列 GSTSSGSG。我们应用这个 linker 成功将 ATR 与 LIM3H 融合表达出有活性的蛋白, 将柠檬烯转化为异胡椒醇。

本研究中, LIM3H 上清蛋白表达量最高的修饰菌株 BL21-Duet-17 α trPM2, 其对应的融合菌株异胡椒醇产量也最高。该菌株在摇瓶中转化 24 h 的终产量为 1.94 mg/L, 与 Schempp 等^[6]报道的酵母菌株浓缩前在最佳发酵条件下转化产量相当。对 PM2 和 L3H. *Ap* 碱基序列进行 blast 比对发现, 二者没有显著的相似性, 这可能归因于它们的种属来源不同, PM2 来源于胡椒薄荷 (*Mentha×piperita*), 而 L3H. *Ap* 从出芽短梗霉菌 (*Aureobasidium pullulans*) 中筛选得到。它们在催化功能上也存在一些差异, L3H. *Ap* 对底物特异性较弱, 不仅可以催化柠檬烯, 还可以催化 α -蒎烯、 β -蒎烯和 3-蒎烯的羟化。而 PM2 表达的 LIM3H 选择特异性较强^[17], 仅催化柠檬烯。由于底物柠檬烯的强挥发性以及微溶于水的特性, 目前异胡椒醇产量提升仍面临着巨大的挑战。

综上所述, 本研究以编码 LIM3H 的 PM2 为研究对象, 重点探索了植物来源 P450 酶在大肠杆菌中经不同 N 端修饰后蛋白的可溶性表达情况以及以 ATR 为电子传递蛋白构建融合表达蛋白, 最终成功在大肠杆菌中合成了异胡椒醇。

参考文献

- [1] 陈吟, 元希武, 徐东北, 陈泽群, 房海灵, 梁呈元. 薄荷柠檬烯-6-羟化酶基因(*MhL6OH*)的克隆与表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(2): 25-31.
CHEN Y, QI XW, XU DB, CHEN ZQ, FANG HL, LIANG CY. Cloning and expression analysis on limonene-6-hydroxylase gene (*MhL6OH*) of *Mentha haplocalyx*[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2019, 28(2): 25-31 (in Chinese).

- [2] NÍ CA, MANSELL DAVID J, TOOGOOD HELEN S, SHIRLEY T, ANTONIOS L, SCRUTTON NIGEL S, GARDINER JOHN M. Chemoenzymatic synthesis of the intermediates in the peppermint monoterpenoid biosynthetic pathway[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(7): 1546-1552.
- [3] 薛劲松, 李鸿雁, 傅强, 马世平. 左旋薄荷酮抗抑郁作用及机制研究[J]. *药学与临床研究*, 2015, 23(3): 238-241.
- XUE JS, LI HY, FU Q, MA SP. Antidepressant-like effects of L-menthone in depressed mice and its possible mechanisms[J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2015, 23(3): 238-241 (in Chinese).
- [4] van DYK M, van RENSBURG E, MOLELEKI N. Hydroxylation of (l)-limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(4): 431-436.
- [5] HAUDENSCHILD C, SCHALK M, KARP F, CROTEAU R. Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 379(1): 127-136.
- [6] SCHEMPF FLORENCE M, INGMAR S, ETSCHMANN MARIA MW, ELENA B, JOHANNES P, HENDRIK S, JENS S, MARKUS B. Identification of fungal limonene-3-hydroxylase for biotechnological menthol production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(10): e02873-20.
- [7] OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239(7): 2370-2378.
- [8] HUSSAIN R, AHMED M, KHAN TA, AKHTER Y. Fungal P450 monooxygenases - the diversity in catalysis and their promising roles in biocontrol activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 989-999.
- [9] LI JH, TIAN CF, XIA YH, MUTANDA I, WANG KB, WANG Y. Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered *E. coli* from available phenylalanine and tyrosine[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 124-133.
- [10] ICHINOSE H, HATAKEYAMA M, YAMAUCHI Y. Sequence modifications and heterologous expression of eukaryotic cytochromes P450 in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 120(3): 268-274.
- [11] WILLIAMS PA, COSME J, SRIDHAR V, JOHNSON EF, McREE DE. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(1): 121-131.
- [12] 麦婉莹, 洪葵. 真菌细胞色素 P450 在大肠杆菌中的表达[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1092-1099.
- MAI WY, HONG K. Heterologous expression of a fungal cytochrome P450 in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1092-1099 (in Chinese).
- [13] BARNES HJ, ARLOTTO MP, WATERMAN MR. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli*[J]. *PNAS*, 1991, 88(13): 5597-5601.
- [14] EFFENDI L, KOFFAS MATTHEOS AG. Engineering of artificial plant cytochrome P450 enzymes for synthesis of isoflavones by *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7246-7251.
- [15] MORRONE D, CHEN XM, COATES RM, PETERS RJ. Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis[J]. *The Biochemical Journal*, 2010, 431(3): 337-344.
- [16] MUNRO AW, GIRVAN HM, MCLEAN KJ. Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2007, 1770(3): 345-359.
- [17] WÜST M, LITTLE DB, SCHALK M, CROTEAU R. Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs by recombinant (-)-limonene 3- and 6-hydroxylases from mint (*Mentha*) species: evidence for catalysis within sterically constrained active sites[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 387(1): 125-136.