

研究报告

不同植物源的黄烷酮-3-羟化酶的催化特性

张欣宇¹, 董潞娜^{1,2}, 曹浩¹, 刘加鼎¹, 赵百锁¹, 王海胜^{*1}

1 中国农业科学院研究生院, 北京 100081

2 北京市田村路街道办事处, 北京 100043

张欣宇, 董潞娜, 曹浩, 刘加鼎, 赵百锁, 王海胜. 不同植物源的黄烷酮-3-羟化酶的催化特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 875-887

Zhang Xinyu, Dong Luna, Cao Hao, Liu Jiading, Zhao Baisuo, Wang Haisheng. Catalytic properties of flavanone-3-hydroxylase from different plant sources[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 875-887

摘要:【背景】黄烷酮-3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H)是黄酮类化合物代谢途径中的关键酶之一, 不同植物来源的 F3H 催化特性可能存在差异, 并对黄酮类化合物的生物合成产生重要影响。【目的】比较分析不同植物源 F3H 的酶学性质、异源催化能力差异, 为今后在黄酮类化合物代谢工程中 F3H 的选用提供参考。【方法】通过系统进化分析选择来自茶树(*Camellia sinensis*)、银杏(*Ginkgo biloba*)和大豆(*Glycine max*)的 F3H 基因, 诱导表达后用亲和层析对 F3H 进行纯化, 以柚皮素为底物表征不同植物来源 F3H 的酶学性质; 采用单因素分析法对 F3H 在原核宿主 *Escherichia coli* 和真核宿主 *Saccharomyces cerevisiae* 体内的催化活性进行分析。【结果】酶学性质分析发现, CsF3H、GbF3H 和 GmF3H 的最适反应温度分别为 40、40 和 35 °C, 最适反应 pH 值分别为 7.5、7.0 和 7.5。催化动力学研究发现, CsF3H 的 k_{cat}/K_m 为 0.36 L/(mmol·s), 高于 GbF3H 和 GmF3H。体内催化实验表明, 当底物柚皮素的浓度为 500 μmol/L 时, CsF3H、GmF3H 单基因大肠杆菌工程菌对柚皮素的转化率达 80%以上, 而 GbF3H 工程菌对柚皮素的转化率仅为 23.8%; 3 种单基因酵母工程菌对柚皮素的转化率都在 40%左右, 没有明显差异。【结论】不同植物源的 F3H 催化活性存在差异, 而且同一种 F3H 在原核底盘细胞与真核底盘细胞中催化能力也存在较大差异, 3 种 F3H 中 CsF3H 具有优良的催化性能, 并在原核底盘细胞内有较好的应用潜力。

关键词: 黄烷酮-3-羟化酶; 酶学性质; 异源表达; 二氢山奈酚; 柚皮素

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610042018005)

Supported by: Special Fund for Basic Research Operations of Central Public Welfare Research Institutes (1610042018005)

*Corresponding author: E-mail: wanghaisheng@caas.cn

Received: 2021-06-12; Accepted: 2021-08-04; Published online: 2021-10-09

Catalytic properties of flavanone-3-hydroxylase from different plants

ZHANG Xinyu¹, DONG Luna^{1,2}, CAO Hao¹, LIU Jiading¹, ZHAO Baisuo¹,
WANG Haisheng^{*1}

¹ Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

² Beijing Tiancun Road Sub-District Office, Beijing 100043, China

Abstract: [Background] Flavanone-3-hydroxylase (F3H) is one of the key enzymes in the metabolic pathway of flavonoids. The catalytic properties of F3H from different plants may be different, which has an important impact on the biosynthesis of flavonoids. [Objective] In order to compare and analyze the enzymatic properties and catalytic abilities of F3H, providing reference for the selection of F3H in the metabolic engineering of flavonoids in the future. [Methods] Three genes, *CsF3H* (*Camellia sinensis*), *GbF3H* (*Ginkgo biloba*) and *GmF3H* (*Glycine max*), were identified by phylogenetic analysis. The three F3H were purified by affinity chromatography, and the enzymatic properties were characterized by naringenin as substrate *in vitro*. Single-factor culture method was used to analyze the activities of F3H in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. [Results] Enzymatic analysis showed that the optimal temperature of *CsF3H*, *GbF3H* and *GmF3H* was 40, 40 and 35 °C, and the optimal pH was 7.5, 7.0 and 7.5, respectively. The k_{cat}/K_m of *CsF3H* was 0.36 L/(mmol·s), which was higher than that of *GbF3H* and *GmF3H*. When substrate naringenin concentration was 500 μmol/L, the conversion rate was more than 80% of the *E. coli* contained *CsF3H*, *GmF3H*, while the strain contained *GbF3H* was only 23.8%. As for the *S. cerevisiae* with different *F3H*, the conversion efficiency was 40%, with no significant difference. [Conclusion] There were different catalytic activities of F3H from different plants. Moreover, one F3H also showed great differences within prokaryotic and eukaryotic chassis cells. *CsF3H* has excellent catalytic capacity and showed better development and application potential in prokaryotic chassis cells.

Keywords: flavanone-3-hydroxylase; enzymatic properties; heterologous expression; dihydrokaempferol; naringenin

黄烷酮-3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H)在黄酮类化合物的生物合成途径中发挥重要作用,其主要功能包括催化柚皮素C环第3位羟基化形成二氢山奈酚(dihydrokaempferol)^[1],而后二氢山奈酚在类黄酮-3'-羟基化酶(flavonoid-3'-hydroxylase)、黄酮-3',5'-羟基化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase)、二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol-4-reductase)、无色花青素双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase)、花青素

还原酶(anthocyanidin reductase)及甲基转移酶(methyltransferase)的作用下形成槲皮素(quercetin)、山奈酚(kaempferol)、杨梅素(myricetin)、儿茶素(catechin)和异鼠李素(isorhamnetin)等一系列黄酮类化合物^[2-3]。F3H是类黄酮生物合成途径中的一个重要调节点,对拟南芥突变体 *tt6-5* 的研究发现, *F3H* 基因突变导致了突变株柚皮素含量增加和二氢山奈酚含量减少,进而造成下游一系列类黄酮含量减

少, 株系表现为种皮颜色、成苗颜色变浅, 突变体植物对一系列非生物胁迫(氧化胁迫、盐胁迫)更加敏感^[4]。因此, F3H 是类黄酮代谢调节的中枢位点^[5], 在植物次生代谢过程中发挥重要作用。

系统进化分析发现, 黄酮类化合物合成途径中的 F3H 来源于共同的祖先, 虽然各个物种的 F3H 具有明显的亲缘差异性, 但它们的氨基酸序列非常保守^[6]。F3H 普遍含有 2-酮戊二酸依赖的双加氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2-ODD)超家族成员保守结构功能区域, 但该区域内氨基酸的位置或种类可能存在差异。这种功能位点氨基酸的变化将直接或间接地影响酶的催化性能。茶树、金花茶、浙江红花茶的 3 种 F3H 在氨基酸序列上有 9 个差异位点, 表现出不同的花青素合成能力^[7]。

本研究对 GenBank 数据库进行检索, 选取 18 种植物来源的 F3H 蛋白, 使用 MEGA-X 软件采用邻接(neighbor-joining)法构建系统进化树, 根据进化树的拓扑结构选取 3 种进化关系相对较远的 F3H 蛋白, 即茶树 CsF3H、大豆 GmF3H 和银杏 GbF3H。本研究对以上 3 种 F3H 进行了体外酶学性质分析并进行异源表达, 比较其在原核宿主和真核宿主内的催化能力, 以期为研究黄酮类化合物代谢工程中 F3H 的选用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因序列

GenBank 数据库中获取茶树 (*Camellia sinensis*)、银杏 (*Ginkgo biloba*) 和大豆 (*Glycine max*) 的 F3H 基因 (CsF3H 的登录号为 AY641730.1、GbF3H 的登录号为 AY742228.1、GmF3H 的登录号为 NM_001249868.2) 由南京金斯瑞生物科

技有限公司分别根据大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的密码子偏好性进行优化合成。

1.1.2 菌株和质粒

E. coli DH5 α 及 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞购自北京博迈德生物技术有限公司, 菌株 *S. cerevisiae* WAT11 由安徽农业大学王云生教授惠赠, pETM6^[8]、pET-32a (TrxA-His6 标签) 和 pESC-URA 载体均由本实验室保存。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 如需添加氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 100 μ g/mL。酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 液体培养基 (g/L): 胰蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, 葡萄糖 20.0。酵母缺陷型 SC-URA 培养基 (g/L): SC-URA Broth 8.0, 半乳糖 20.0, 用 1.0 mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 至 5.8, 用于酿酒酵母基因工程菌的筛选及发酵培养。以上培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.4 主要试剂和仪器

柚皮素、二氢山奈酚标准品, 北京索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙酸乙酯、乙腈 (色谱纯)、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 *Spe* I、*Nde* I、*Eco*R I, Thermo 公司; 高纯度质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, Omega 公司; ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, TaKaRa 公司。引物合成和测序工作由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 凝胶成像分析系统, Syngene 公司; 液相色谱仪, Agilent 公司; 超声波细胞粉碎机, Branson 公司; ÄKTA Avant 多维蛋白纯化系统, GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 F3H 系统发育分析

从 NCBI 数据库中获得 18 个不同植物的 F3H 蛋白序列, 用 Clustal X^[9] 进行同源序列比对, 然后利用 MEGA-X 基于 Kimura 双参数模型(Kimura-2-parameter, K2P)^[10] 采用邻接法^[11] 构建系统进化树, 使用 1 000 次重复检测的 bootstrap 值^[12] 表示树上各节点的置信度。

1.2.2 F3H 氨基酸序列理化性质分析

使用 ExPASy ProtParam 工具在线预测 CsF3H、GbF3H 和 GmF3H 的分子量、等电点、稳定系数及疏水性等基本理化性质。

1.2.3 载体的构建

F3H 纯化表达载体的构建: 根据同源重组的引物设计原则, 分别为目的片段和载体添加同源臂, 设计正反向引物(表 1)。以 pET-32a 为模板, 用 F3H-F 和 F3H-R 扩增出载体的线性化片段; 以合成的 pUC57-CsF3H、pUC57-GbF3H 和 pUC57-GmF3H 为模板, 用 pET-32a-F 和 pET-32a-R 扩增出 F3H 线性化片段, 将目的片段与载体采用试剂盒连接, 产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 均匀涂布到含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 平皿上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 重组阳性质粒进行测序验证。

F3H 原核及真核表达载体的构建: 构建原核表达载体时, 将 3 个 F3H 基因(CsF3H、GbF3H、GmF3H)与 pETM6 分别使用 *Nde* I 和 *Spe* I 进行双酶切; 构建真核表达载体时, 将 F3H 与载体 pESC-URA 分别使用 *Eco*R I 和 *Spe* I 进行双酶切; 使用 T4 DNA 连接酶将酶切产物进行连接, 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 中, 挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 并测序验证。

1.2.4 F3H 的诱导表达与纯化

将活化的种子液按 1% 接种量转接到 100 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀ 处于 0.6–0.8 之间, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导表达, 16 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 16–18 h。随后培养物在 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 再将细胞重悬于裂解缓冲液(5 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O、10 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O、500 mmol/L NaCl、30 mmol/L 咪唑)中, 用超声波细胞破碎仪(超声功率为 40 W, 工作 3 s, 间歇 5 s, 共破碎 30 min)破碎细胞, 随后 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 45 min 收集破碎上清液作为粗酶液。使用 HisTrapTM HP 纯化柱对粗酶液进行纯化。预先用 5 倍柱体积的

表 1 用于构建表达质粒的引物

Table 1 The primers used for constructing expression plasmids

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
CsF3H-F	ATCATCATCATCTTCTGTTATGGCGCCGACCACCAC
CsF3H-R	GGAGCTCGAATTCGGATCCTTACGCAAAAATTCGTCGGTGCTCT
GbF3H-F	CATCATCATCATCTTCTGTTATGGCGCCGGTGCAGAG
GbF3H-R	CGGAGCTCGAATTCGGATCCCTATTTGCTTTCATCTTGCTGCAGCT
GmF3H-F	TCATCATCATCTTCTGTTATGGCGCCGACCGCGAAGA
GmF3H-R	CGGAGCTCGAATTCGGATCCTTACGCCAGAATCTCTTTCAGCGGCTT
pET-32a-F	ACCAGAAGAATGATGATGATGATGGTGTC
pET-32a-R	GGATCCGAATTCGAGCTCCGTC

裂解缓冲液平衡纯化柱, 上样完成之后用 5 倍体积的裂解缓冲液洗去杂蛋白, 再用 10 倍体积的洗脱缓冲液 (5 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、10 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、500 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白, 根据峰值收集纯酶。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯酶浓度, SDS-PAGE 电泳分析酶纯化后的分子量和纯化程度。

1.2.5 F3H 的酶学性质研究

F3H 酶活测定按照 Owens 等^[13]的方法进行, 酶反应体系 (500 μL): 50 mmol/L (pH 7.5) Tris-HCl, 纯酶 10 μg , 0.5 mmol/L 柚皮素, 50 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 , 10 mmol/L 抗坏血酸, 10 mmol/L 2-酮戊二酸, 于 35 $^\circ\text{C}$ 恒温孵育 10 min 后, 加入 1 mL 乙酸乙酯终止反应, 吸出上层的乙酸乙酯, 用 N_2 吹干, 再用 1 mL 甲醇重新溶解样品, 用 HPLC 检测反应产物。试验重复 3 次, 以不加酶的反应体系为对照组。F3H 的酶活定义为: 在最适反应条件下, 蛋白每分钟催化生成 1 μmol 二氢山奈酚所消耗的酶量为一个酶活力单位 U。

pH 对 F3H 酶活性的影响: 在 35 $^\circ\text{C}$ 反应条件下, 在不同 pH 的 Na_2HPO_4 -CA (pH 4.0–6.5), 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8–8.5), 50 mmol/L Gly-NaOH (pH 9.0–10.5) 缓冲液中, 每 0.5 为一个间隔, 用上述方法测定 F3H 的酶活力, 最高酶活力记为 100%, 分别计算各 pH 下的相对酶活力。其中, 不加酶的体系作为对照组, 所有组均设置 3 个重复。

温度对 F3H 酶活性的影响: 在最适 pH 条件下, 在不同温度 (5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 $^\circ\text{C}$) 下用上述反应体系和方法测定不同 F3H 的活性, 最高酶活力记为 100%, 分别计算各温度下的相对酶活力。其中, 不加酶的体系作为对照组, 所有组均设

置 3 个重复。

F3H 的催化及动力学特性分析: 以不同浓度 (2、5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$) 的柚皮素为底物, 依次在最适温度和最适 pH 条件下反应 10 min, 通过 Lineweaver-Burk 双倒数法计算 K_m 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 。

1.2.6 F3H 在不同宿主内的催化能力比较

F3H 在原核宿主中的表达: 将表达载体 pETM6-CsF3H、pETM6-GbF3H、pETM6-GmF3H 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 于 37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜。将阳性重组子活化后按 1:100 的比例接种至 100 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 培养至菌液 OD_{600} 处于 0.6–0.8 之间时加入 IPTG 至终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 进行诱导表达, 30 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 诱导 5 h, 向菌液中加入底物柚皮素 (底物用二甲基亚砷溶解) 至终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 24 h。取 1 mL 发酵菌液, 加入等体积甲醇, 涡旋振荡提取 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 通过 HPLC 检测上清中二氢山奈酚的产生量。

F3H 在真核宿主中的表达: 将表达载体 pESC-URA-CsF3H、pESC-URA-GbF3H、pESC-URA-GmF3H 电击转化至 *S. cerevisiae* WAT11 中, 均匀涂布在 SC-URA 固体培养基上, 于 30 $^\circ\text{C}$ 下培养 48 h。出现约 1 mm 的单菌落后, 挑选阳性单克隆菌落接种至 20 mL 含有半乳糖的 SC-URA 液体培养基中, 30 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h 作为种子液。将种子液按 5:100 的比例再次接种于上述培养基中, 培养至 OD_{600} 处于 0.6–0.8 之间, 加入柚皮素至终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$, 30 $^\circ\text{C}$ 、220 r/min 发酵培养 48 h。取 1 mL 菌液, 用上述方法萃取处理样品。

1.2.7 二氢山奈酚的检测

液相色谱条件: 色谱柱为 Eclipse XDB C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 进样量为 5 μL , 流动

相为乙腈和超纯水，梯度洗脱。洗脱程序参照周天山等^[14]的方法，分离洗脱 17 min，柱温为 25 °C，检测波长为 280 nm。

2 结果与分析

2.1 F3H 系统进化分析

对 18 个不同来源的 F3H 进行系统进化分析(图 1)，银杏 F3H (*Ginkgo biloba* Q5XPX2)与辐射松 F3H (*Pinus radiata* A0A088BGJ0)属于裸子植物，分支最早。大豆 F3H (*Glycine max* Q53B69)与拟南芥 F3H (*Arabidopsis thaliana* Q9S818)归于同一个进化支，亲缘关系最近。

茶树 F3H (*Camellia sinensis* Q6DV45)与樱桃 F3H (*Prunus avium* F2VR47)、櫻桃李 F3H (*Prunus cerasifera* A0A0K1TPE7)处于同一分支，具有较近的亲缘关系。从进化树上看，CsF3H、GbF3H、GmF3H 的遗传距离相对较远，截至目前，关于 CsF3H^[15]、GbF3H^[16]和 GmF3H^[17]的研究主要集中在基因的克隆、组织特异性表达等方面，系统地比较 CsF3H、GbF3H 和 GmF3H 酶学性质以及在不同底盘细胞内的催化能力差异的研究还未有报道。因此，本研究选取 CsF3H、GbF3H、GmF3H 为目标蛋白进行下一步研究。

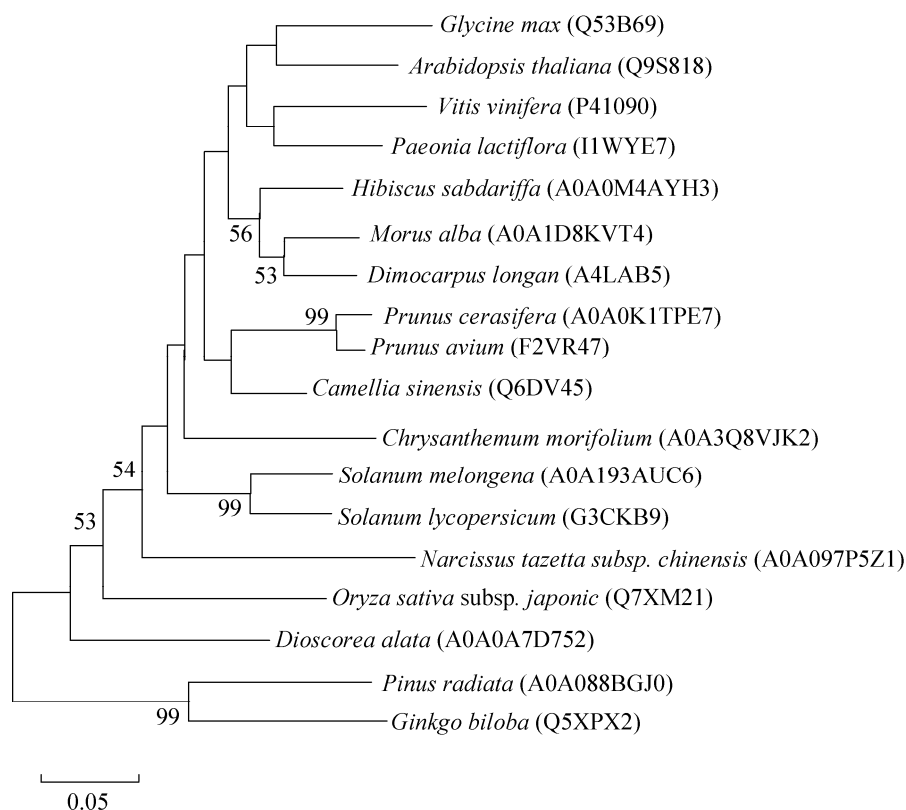


图 1 基于氨基酸序列的黄烷酮-3-羟化酶系统进化树分析 括号内为相应蛋白序列在 UniProt 中的登录号；分支上的数值为自举值大于 50%的结果；线段 0.05 代表进化距离单位

Figure 1 Phylogenetic analysis of flavanone-3-hydroxylase based on amino acid sequences. The numbers in parentheses represent the accession numbers in the UniProt for the corresponding protein sequences; Bootstrap values more than 50% are shown at branching points; Bar, 5 amino acid substitution per 100 amino acids of protein sequence.

2.2 F3H 氨基酸序列理化性质分析

CsF3H、GbF3H 和 GmF3H 的分子量分别为 41.46、40.41 和 42.67 kDa (表 2), 理论等电点分别为 5.61、5.57 和 5.55。3 种蛋白的总平均亲水性小于 0, 不稳定系数均大于 40, 属于亲水性不稳定蛋白, 其中, GbF3H 的不稳定系数远高于 CsF3H 和 GmF3H, 在体外环境下更不稳定。预测显示, CsF3H 的总平均亲水性较低、脂溶性系数较高、不稳定系数适中, 相比于 GbF3H 和 GmF3H 更有机会折叠成较稳定的高级结构, 行使生物催化功能^[18]。

2.3 酶学性质分析

为了增加 F3H 的稳定性, 将 F3H 的 N-端与 TrxA 标签融合后在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达。有关 F3H 的报道显示, 去除 TrxA 标签的过程会造成 F3H 蛋白水解, 对酶活性的影响较大^[19-20]。因此, 本研究关于 F3H 酶活性的分析都是在 TrxA-F3H 融合蛋白的状态下进行的。SDS-PAGE 电泳结果显示, 在相对分子质量约 55 kDa 处有目标蛋白条带(图 2), 与生物信息学预测的蛋白大小一致(融合标签的分子量约为 14 kDa)。

2.3.1 pH 对 F3H 催化活性的影响

3 种 F3H 能够发挥酶活性的 pH 范围相似

(图 3)。GbF3H 的最适反应 pH 值为 7.0, 而 CsF3H 和 GmF3H 的最适反应 pH 值为 7.5。随着 pH 值的升高, 酶活力呈先升高后下降的趋势。在 pH 6.0–8.0 范围内, 3 种 F3H 都表现出 80% 的酶活力, pH 5.0–8.0 内, 仍有 50% 以上的酶活力。对于 GbF3H 和 GmF3H, 在 pH>8.0 时酶活力大幅度降低, 而此时 CsF3H 的酶活力仍能维持相对较高的水平, 在 pH 9.0 时仍表现出 60.9% 的酶活力, 表明其耐碱性更高, 发挥酶活力的 pH 范围更为广泛。

2.3.2 温度对 F3H 催化活性的影响

3 种 F3H 所能耐受的温度范围大致相似(图 4)。CsF3H 和 GbF3H 的最适反应温度为 40 °C, 而 GmF3H 的最适反应温度为 35 °C。三者均在 15–60 °C 范围内均有活性, 在 25–45 °C 之间保留 60% 以上酶活力。当温度由 40 °C 上升到 50 °C 时, CsF3H 和 GmF3H 的酶活力几乎呈直线式降至 35% 以下, 在 50 °C 时 GmF3H 仅有 15.1% 的酶活力。相比之下, GbF3H 对这一阶段的温度变化不敏感, 在 50 °C 时仍有 72.1% 的酶活力, 而当温度继续升高至 55 °C 时, GbF3H 的酶活力骤降至 20.1%。相较于 CsF3H 和 GmF3H, GbF3H 发挥酶活力的温度范围更为广泛。

表 2 3 种 F3H 序列的理化性质分析

Table 2 Analysis of physical and chemical properties of three F3H sequences

Physical and chemical properties	CsF3H	GbF3H	GmF3H
分子量	41.46	40.41	42.67
Molecular weight (kDa)			
等电点	5.61	5.57	5.55
Isoelectric point			
蛋白质不稳定系数	47.72	56.88	45.45
Instability index			
脂溶性系数	85.87	82.44	80.08
Aliphatic index			
总平均亲水性	-0.40	-0.41	-0.55
Grand average of hydropathy			

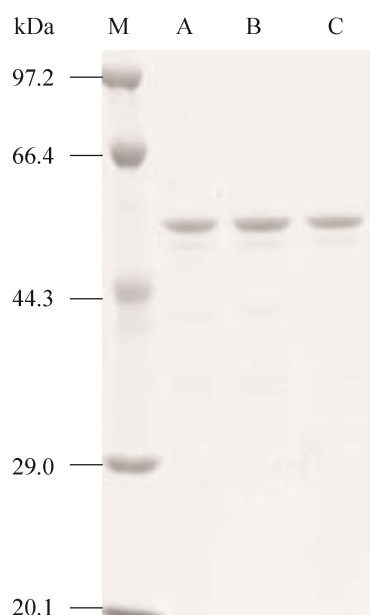


图2 F3H蛋白的SDS-PAGE分析 M: 蛋白质分子量标准; A: CsF3H; B: GbF3H; C: GmF3H
Figure 2 SDS-PAGE analysis of F3H protein. M: Protein molecular weight standard; A: CsF3H; B: GbF3H; C: GmF3H.

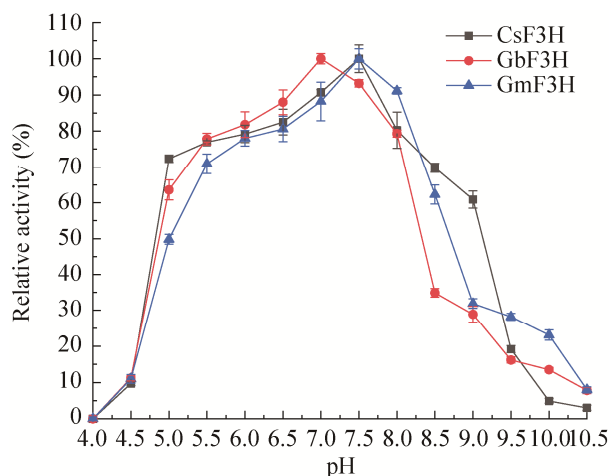


图3 pH对F3H催化能力的影响
Figure 3 Effects of pH on the catalytic efficiency of F3H. The results present the mean \pm SD of three replicates.

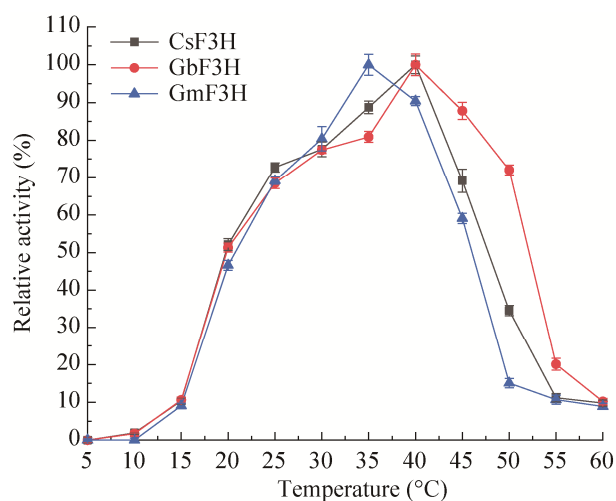


图4 温度对F3H催化能力的影响 结果为3次重复的平均值 \pm 标准差

Figure 4 Effects of temperature on the catalytic efficiency of F3H. The results present the mean \pm SD of three replicates.

2.3.3 F3H的催化动力学分析

如表3所示, CsF3H、GbF3H和GmF3H米氏常数 K_m 值分别为52.75、28.61、63.68 $\mu\text{mol/L}$, 即3个酶中GbF3H对底物柚皮素的亲和力最大。 k_{cat}/K_m 值依次为CsF3H>GmF3H>GbF3H, 表明CsF3H酶对柚皮素的转化效率更高, 催化能力最强。

2.4 F3H在原核宿主中的催化活性分析

将含有pETM6-CsF3H、pETM6-GbF3H和pETM6-GmF3H的*E. coli* BL21(DE3)发酵24 h后, 通过HPLC检测发酵液中二氢山奈酚的产生量, 结果发现3种F3H均表现出酶活性。其中, CsF3H能将500 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素转化为

表3 重组F3H蛋白的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of recombinant F3H

Recombinant F3H	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$)
CsF3H	52.75	0.019 0	0.360
GbF3H	28.61	0.002 5	0.087
GmF3H	63.68	0.017 0	0.270

428.6 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚, 转化率高达 85.7%; GmF3H 次之, 对柚皮素的转化率为 82.5%, 但 GbF3H 仅能催化产生 119.2 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚, 转化率为 23.8%, 远远低于前 2 种 F3H 的催化活性(图 5)。因此, 当以 *E. coli* 为底盘细胞构建基因工程菌时, 来自被子双子叶植物的 CsF3H 和 GmF3H 更适用于二氢山奈酚的发酵生产。

2.5 F3H 在真核宿主中的催化活性分析

将含有 pESC-URA-CsF3H、pESC-URA-GbF3H 和 pESC-URA-GmF3H 的 *S. cerevisiae* WAT11 喂饲底物柚皮素, 培养 48 h 后通过 HPLC 检测 F3H 对柚皮素的转化情况。3 种 F3H 均能将柚皮素转化为二氢山奈酚(图 6)。CsF3H 的催化能力最高, 能催化生成 222.1 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚, GbF3H 的催化能力稍低于 CsF3H, GmF3H 的催化能力相对最弱。CsF3H、GbF3H 和 GmF3H

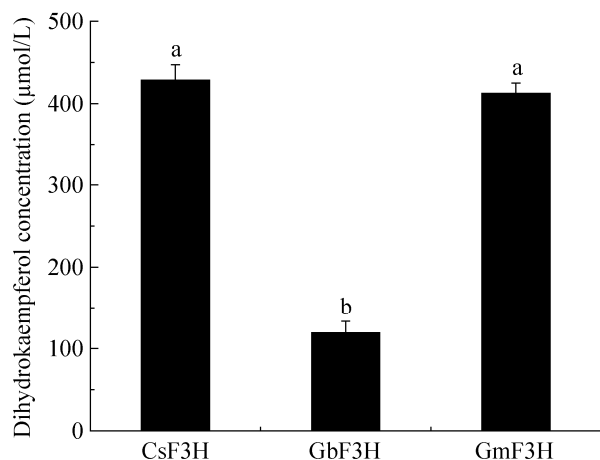


图 5 不同 F3H 在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中催化能力分析 数据采用 one-way ANOVA 方差分析(LSD 法), 数据柱形标注不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Figure 5 Catalytic capacities of different F3H in *Escherichia coli* BL21(DE3). The data was analyzed using one-way ANOVA and LSD test, value columns with different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$), the same below.

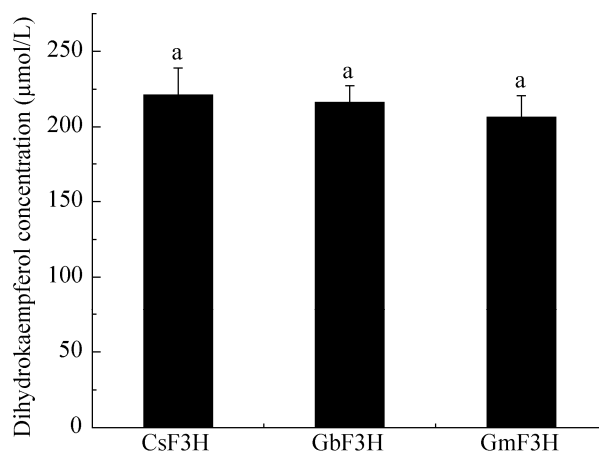


图 6 不同 F3H 在 *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 中催化能力分析

Figure 6 Catalytic capacities of different F3H in *Saccharomyces cerevisiae* WAT11.

对柚皮素的转化率分别为 44.4%、43.2%和 41.4%, 三者的差异不明显。

3 讨论与结论

通过代谢工程提高代谢产物产量首先需要构建最优的生物合成途径, 基因来源、酶表达水平、酶活性和特殊酶性质都会影响代谢通量和产量^[21-22]。目前, 多种植物源 F3H 的酶活性已经得到表征, 但活性普遍较低。因此, 利用微生物宿主异源合成二氢山奈酚等羟基化黄酮的产量也受到限制^[23]。二氢山奈酚的低积累量也严重限制了其下游化合物的高效积累。因此, 选用高活性的、与宿主适配性好的 F3H 是利用代谢工程手段高效生产二氢山奈酚等 3 位羟基化黄酮的关键手段之一^[24]。

研究表明, 在氨基酸水平上, 不同植物源的 F3H 相似性很高, 其中, 铁离子结合位点(HxDxnH)和 2-酮戊二酸结合位点(RxS)的氨基酸种类相同, 仅仅在位置上有所变动^[25-26]。CsF3H 蛋白序列中 5 个保守功能氨基酸(H²¹⁸、D²²⁰、H²⁷⁶、D²⁸⁶、S²⁸⁸)与 GmF3H 中同功能氨基

酸(H²¹⁹、D²²¹、H²⁷⁷、D²⁸⁷、S²⁸⁹)在序列上的相对位置保持一致^[27-28],而 GbF3H 功能活性位点(H²²⁵、D²²⁷、H²⁸²、D²⁹²、S²⁹⁴)中 H²⁸² 的相对位置与 CsF3H、GmF3H 序列上同功能氨基酸的相对位置不一致^[16]。这可能使 GbF3H 蛋白的结构和酶活性与 CsF3H、GmF3H 产生较大差异。本研究中生物信息学分析显示,3 种 F3H 都属于亲水性蛋白,CsF3H、GbF3H 和 GmF3H 在等电点上没有明显差别,经 SDS-PAGE 检测,3 种 F3H 的分子量与其同源蛋白的分子量大小相符^[29-30]。同源建模与晶体学研究显示,无论 F3H 的氨基酸序列差异如何,这些酶采用了非常相似的空间构型,即活性位点包藏在 β -片层形成的拓扑结构中,多肽的 C-末端形成覆盖活性位点腔的盖子,以尽可能降低蛋白氧化水解损伤、去折叠的几率,稳定酶的活性中心^[31-32]。蛋白稳定性的强弱会对蛋白的功能产生一定的影响^[18]。在过量表达外源基因进行花色遗传育种时,结构稳定性更高的浙江红花茶 CcF3H 被认为是合成花青素的优选酶^[7]。本研究中,理化性质预测的结果显示 CsF3H 的稳定性最好,GbF3H 的稳定性较差。因此,CsF3H 被认为具有更强的催化能力。

对酶学性质分析发现,CsF3H 和 GmF3H 的最适 pH 为 7.5, GbF3H 的最适 pH 为 7.0,比兰花 (*Ascoenda orchid*)^[33] (pH 8.0) 和黄花蒿 (*Artemisia annua*)^[34] (pH 8.5) 的最适 pH 低,但 CsF3H 的最适 pH 与已报道的茶树(*Camellia sinensis*)^[35] F3H 的最适 pH 相一致。3 种 F3H 均在中性条件下酶活力较高,在强酸和强碱条件下几乎无催化活性。F3H 蛋白发挥作用的温度条件较为温和,研究发现矮牵牛 PhF3H 在温度为 37 °C 时酶活力最佳^[36];拟南芥 AtF3H 的最适反应温度为 40 °C^[13]。本研究中的 3 种 F3H 在 35-40 °C 范围内能发挥最大活性。酶的催化

动力学显示, GbF3H 蛋白对柚皮素的亲和力最强,但 CsF3H 对柚皮素的转化率更快,催化效率也更高,具有更好的开发利用潜能,这与理化性质预测结果一致。

在微生物代谢工程中, *E. coli* 是理想的宿主,也是黄酮发酵生产研究中最常用的原核宿主之一。目前已经在 *E. coli* 中成功构建了如漆黄素、甲基香橙素等多种高价值黄酮的异源合成途径^[37-38]。本研究中 3 种植物来源的 F3H 成功在 *E. coli* 表达。含有 CsF3H 和 GmF3H 的菌株二氢山奈酚的产生量高出 GbF3H 转化菌株 4 倍左右,即 GbF3H 对底物柚皮素的催化能力远低于 CsF3H 和 GmF3H,这可能与酶自身的不稳定性以及与宿主的适配性有关^[39]。相较于原核细胞, *S. cerevisiae* 拥有更为成熟的细胞膜系统且遗传背景清楚。现有研究认为, *S. cerevisiae* 在表达类黄酮等相关真核基因元件上占有一定优势^[40-42]。本研究对含 F3H 的单基因酵母工程菌株进行底物发酵,发现 3 种 F3H 在底物柚皮素利用上无明显差异, GbF3H 的催化能力也与 CsF3H 和 GmF3H 相当,可能是 GbF3H 自身的特性使其更适应于真核细胞的环境^[16]。对于同一种 F3H,其在原核和真核细胞内的催化能力还存在明显不同。在原核细胞内,酶对柚皮素的转化能力明显高于真核细胞(GbF3H 除外),并且在原核细胞中,酶所展现出的催化特性与体外酶学特性及理化性质分析的结果更吻合,这可能与酶对底物的作用能力不同及酶对细胞微环境的适应能力差异有关^[43-44]。因此,对于同一种 F3H,其不同底盘生物中的催化能力也存在差异。

在类黄酮代谢途径研究中,关键酶的分析是解析类黄酮生物合成调控机制的重要途径,本研究在分子水平上为研究黄酮类化合物的生物合成提供了思路与理论依据,具有很大的应

用前景。同时我们的结果也印证了在利用代谢工程生产目的产物时, 选择合适的宿主也是至关重要的。

REFERENCES

- [1] Forkmann G. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering[J]. *Plant Breeding*, 1991, 106(1): 1-26
- [2] Pandey RP, Parajuli P, Koffas MAG, Sohng JK. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(5): 634-662
- [3] Shah FLA, Ramzi AB, Baharum SN, Noor NM, Goh HH, Leow TC, Oslan SN, Sabri S. Recent advancement of engineering microbial hosts for the biotechnological production of flavonoids[J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(6): 6647-6659
- [4] 孙鹏. 拟南芥黄烷酮-3-羟化酶调控非生物胁迫抗性机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014
Sun P. The study of *Arabidopsis* flavanone-3-hydroxylase in regulating abiotic stress tolerance[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [5] Zhang HR, Zhao LX, Wang J, Zheng LL, Dang ZH, Wang YC. Cloning and functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Reaumuria trigyna*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(5): 1221-1229
- [6] Prescott AG, John P. Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 245-271
- [7] 范晶, 黄明远, 吴苗苗, 叶红, 张西玉. 山茶属三个F3H基因的分子特性、系统进化及蛋白结构差异分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(5): 1195-1205
Fan J, Huang MY, Wu MM, Ye H, Zhang XY. Comparison of molecular characteristics, phylogeny and structure of three *Camellia* F3H genes[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(5): 1195-1205 (in Chinese)
- [8] Xu P, Vansiri A, Bhan N, Koffas MAG. ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(7): 256-266
- [9] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882
- [10] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [12] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 1985, 39(4): 783-791
- [13] Owens DK, Crosby KC, Runac J, Howard BA, Winkel BSJ. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 β -hydroxylase[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(10): 833-843
- [14] 周天山, 余有本, 肖斌, 鲍露, 高岳芳. 操纵茶树类黄酮3'-羟基化酶生物合成B环-3',4'-二羟基黄酮类化合物[J]. *微生物学报*, 2017, 57(3): 447-458
Zhou TS, Yu YB, Xiao B, Bao L, Gao YF. Engineering of a flavonoid 3'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*) for biosynthesis of B-3',4'-dihydroxylated flavones[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 447-458 (in Chinese)
- [15] Han YH, Huang KY, Liu YJ, Jiao TM, Ma GL, Qian YM, Wang PQ, Dai XL, Gao LP, Xia T. Functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Camellia sinensis*: a critical role in flavonoid accumulation[J]. *Genes*, 2017, 8(11): 300
- [16] Shen GA, Pang YZ, Wu WS, Deng ZX, Zhao LX, Cao YF, Sun XF, Tang KX. Cloning and characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Ginkgo biloba*[J]. *Bioscience Reports*, 2006, 26(1): 19-29
- [17] Kim BG, Kim JH, Kim J, Lee C, Ahn JH. Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in

- soybean is related to induction of flavanone 3-beta-hydroxylase and flavonol synthase[J]. *Molecules and Cells*, 2008, 25(2): 247-252
- [18] Nakai S. Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31(4): 676-683
- [19] Lukacin R, Gröning I, Schiltz E, Britsch L, Matern U. Purification of recombinant flavanone 3beta-hydroxylase from *Petunia hybrida* and assignment of the primary site of proteolytic degradation[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 375(2): 364-370
- [20] Lester DR, Phillips A, Hedden P, Andersson I. Purification and kinetic studies of recombinant gibberellin dioxygenases[J]. *BMC Plant Biology*, 2005, 5(1): 19
- [21] Leonard E, Lim KH, Saw PN, Koffas MAG. Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(12): 3877-3886
- [22] Xiong DD, Lu SK, Wu JY, Liang CN, Wang W, Wang WZ, Jin JM, Tang SY. Improving key enzyme activity in phenylpropanoid pathway with a designed biosensor[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 115-123
- [23] 高松, 周景文, 陈坚. 水飞蓟来源黄酮 3-羟化酶鉴定及黄杉素发酵优化[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(12): 2838-2849
- Gao S, Zhou JW, Chen J. Identification of flavonoids 3-hydroxylase from [*Silybum marianum*(L.) Gaertn] and its application in enhanced production of taxifolin[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(12): 2838-2849 (in Chinese)
- [24] Pei JJ, Chen AN, Dong P, Shi XJ, Zhao LG, Cao FL, Tang F. Modulating heterologous pathways and optimizing fermentation conditions for biosynthesis of kaempferol and astragalin from naringenin in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(2): 171-186
- [25] Britsch L, Dedio J, Saedler H, Forkmann G. Molecular characterization of flavanone 3beta-hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 217(2): 745-754
- [26] Lukacin R, Britsch L. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3beta-hydroxylase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 249(3): 748-757
- [27] Singh K, Rani A, Kumar S, Sood P, Mahajan M, Yadav SK, Singh B, Ahuja PS. An early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase, exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*)[J]. *Tree Physiology*, 2008, 28(9): 1349-1356
- [28] Zabala G, Vodkin LO. The *wp* mutation of *Glycine max* carries a gene-fragment-rich transposon of the CACTA superfamily[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(10): 2619-2632
- [29] Ma G, Guo JP. *In silico* cloning and sequence analysis of *F3H* gene in *Raphanus sativus* L.[A]//Lecture Notes in Electrical Engineering[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015: 117-124
- [30] Song XY, Diao JJ, Ji J, Wang G, Guan CF, Jin C, Wang YR. Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98: 89-100
- [31] Schofield CJ, Zhang Z. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, 9(6): 722-731
- [32] Wellmann F, Matern U, Lukačín R. Significance of C-terminal sequence elements for *Petunia* flavanone 3β-hydroxylase activity[J]. *FEBS Letters*, 2004, 561(1/2/3): 149-154
- [33] Khumkarjorn N, Thanonkeo S, Yamada M, Thanonkeo P. Cloning and expression analysis of a flavanone 3-hydroxylase gene in *Ascocenda orchid*[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 26(2): 179-190
- [34] Xiong S, Tian N, Long JH, Chen YH, Qin Y, Feng JY, Xiao WJ, Liu SQ. Molecular cloning and characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Artemisia annua* L.[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 105: 29-36

- [35] Punyasiri PAN, Abeysinghe ISB, Kumar V, Treutter D, Duy D, Gosch C, Martens S, Forkmann G, Fischer TC. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 431(1): 22-30
- [36] Britsch L, Grisebach H. Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*[J]. European Journal of Biochemistry, 1986, 156(3): 569-577
- [37] Stahlhut SG, Siedler S, Malla S, Harrison SJ, Maury J, Neves AR, Forster J. Assembly of a novel biosynthetic pathway for production of the plant flavonoid fisetin in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 84-93
- [38] Malla S, Koffas MAG, Kazlauskas RJ, Kim BG. Production of 7-O-methyl aromadendrin, a medically valuable flavonoid, in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(3): 684-694
- [39] Lyu Y, Marsafari M, Koffas M, Zhou JW, Xu P. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(11): 2514-2523
- [40] Li YR, Li SJ, Thodey K, Trenchard I, Cravens A, Smolke CD. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast[J]. PNAS, 2018, 115(17): E3922-E3931
- [41] Yang JZ, Liang JC, Shao L, Liu LH, Gao K, Zhang JL, Sun ZJ, Xu WD, Lin PC, Yu RM, et al. Green production of silybin and isosilybin by merging metabolic engineering approaches and enzymatic catalysis[J]. Metabolic Engineering, 2020, 59: 44-52
- [42] Gao S, Lyu YB, Zeng WZ, Du GC, Zhou JW, Chen J. Efficient biosynthesis of (2S)-naringenin from p-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(4): 1015-1021
- [43] De Carolis E, De Luca V. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization[J]. Phytochemistry, 1994, 36(5): 1093-1107
- [44] Cheng AX, Han XJ, Wu YF, Lou HX. The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(1): 1080-1095