

研究报告

二氧化碳固定酶固碳效率及其对地衣芽孢杆菌代谢的影响

杨明飞^{1,2}, 何贺贺^{1,2}, 李由然^{*1,2}, 石贵阳^{*1,2}

1 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

杨明飞, 何贺贺, 李由然, 石贵阳. 二氧化碳固定酶固碳效率及其对地衣芽孢杆菌代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2390-2404.

YANG Mingfei, HE Hehe, LI Youran, SHI Guiyang. Carbon fixation efficiency of carbon dioxide fixation enzymes and its effect on the metabolism of *Bacillus licheniformis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2390-2404.

摘要:【背景】随着代谢工程与合成生物学的快速发展, 通过对异养微生物进行代谢改造, 利用生物法进行二氧化碳固定成为一个新的趋势。生物代谢途径中存在着大量固碳酶, 这些酶尚待挖掘与应用, 不同的酶固碳效率之间也缺少比较。【目的】在体外和体内对固碳功能和效率进行评价。【方法】选取 3 种固碳酶, 即核酮糖 1,5-二磷酸羧化加氧酶(ribose 1,5-diphosphate carboxylation oxygenase, RuBisCo)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PCK)和乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl coenzyme A carboxylase, ACC)在大肠杆菌中异源表达并纯化。测定纯酶的酶活, 并建立无细胞催化实验-液质联用评价酶固碳能力的方法。在厌氧发酵条件下检测代谢指标, 比较过表达固碳酶的地衣芽孢杆菌相较于原始菌的代谢差异。【结果】3 种酶均实现可溶性表达, 纯酶的比酶活分别为 66.43、1.16 和 12.52 U/mg。通过体外无细胞催化实验, ACC 在 3 种酶中表现出最高的固碳效率。分别过表达了 PCK、ACC 的重组地衣芽孢杆菌, 厌氧发酵主产物乳酸的转化率从 48.6%分别提升至 58.1%和 59.7%。【结论】可以通过体外、体内结合的方式对固碳酶的效率进行评价, 该研究可为固碳酶在微生物遗传改造中理性、精准地应用提供参考。

关键词: 核酮糖 1,5-二磷酸羧化加氧酶; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 二氧化碳固定; LC-MS/MS; 地衣芽孢杆菌

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907704); 国家自然科学基金(32172174)

This work was supported by the Key Research and Development Program of China (2020YFA0907704) and the National Natural Science Foundation of China (32172174).

*Corresponding authors. E-mail: LI Youran, liyouran@jiangnan.edu.cn; SHI Guiyang, gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-09-13; Accepted: 2022-12-08; Published online: 2023-01-19

Carbon fixation efficiency of carbon dioxide fixation enzymes and its effect on the metabolism of *Bacillus licheniformis*

YANG Mingfei^{1,2}, HE Hehe^{1,2}, LI Youran^{*1,2}, SHI Guiyang^{*1,2}

1 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] With the rapid development of metabolic engineering and synthetic biology, carbon dioxide fixation by biological methods through metabolic modification of heterotrophic microorganisms has become a new trend. There are a large number of carbon fixation enzymes in biological metabolic pathways, which are yet to be explored and applied, and there is a lack of comparison among the carbon fixation efficiencies of different enzymes. **[Objective]** To evaluate the carbon fixation function and efficiency *in vitro* and *in vivo*. **[Methods]** Three carbon fixation enzymes, namely, ribulose 1,5-diphosphate carboxylation oxygenase (RuBisCo), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK), and acetyl coenzyme A carboxylase (ACC), were heterologously expressed in *Escherichia coli* and then purified. The enzymatic activities of the pure enzymes were determined, and a cell-free catalytic assay-liquid mass spectrometry method was established to evaluate the carbon fixation capacity of the enzymes. Metabolic indicators were examined under anaerobic fermentation conditions and the differences between *Bacillus licheniformis* overexpressing carbon fixation enzymes compared to the original bacteria were compared. **[Results]** All three enzymes achieved soluble expression with specific enzyme activities of 66.43, 1.16, and 12.52 U/mg for pure enzymes, respectively. RuBisCo and ACC exhibited stronger carbon fixation efficiency in cell-free catalytic assays. The conversion of lactic acid, the main product of anaerobic fermentation, was increased from 48.6% to 58.1% and 59.7%, respectively, in *B. licheniformis* with the two expressed recombinant enzymes. **[Conclusion]** The efficiency of carbon fixation enzymes can be evaluated by *in vitro* and *in vivo* binding. This study may provide references for rational and precise application of carbon fixation enzymes in microbial genetic modification.

Keywords: ribose 1,5-diphosphate carboxylation oxygenase; phosphoenolpyruvate carboxykinase; acetyl coenzyme A carboxylase; carbon dioxide fixation; LC-MS/MS; *Bacillus licheniformis*

21 世纪以来, 随着人们对环境保护及可持续发展认识的提升, 人类面临的两大主要难题——全球变暖和资源问题变得愈发棘手, 而这两大难题又都与二氧化碳的排放和利用密不可分^[1]。近些年来, 空气中二氧化碳的含量也在急剧上升, 而人类活动还主要是依靠

传统的化石资源。因此, 为了满足可持续发展这一目标, 通过对二氧化碳进行减排和利用, 将为全球变暖和化石燃料资源枯竭提供新的解决方案^[2], 也能为实现碳达峰、碳中和这一目标贡献一份力量。

在微生物自身代谢及固碳途径中存在大量

的固碳酶^[3], 其中大部分是羧化酶, 其催化二氧化碳分子与有机底物结合, 除了固定二氧化碳的功能外, 羧化酶也起着生物合成的功能, 当然一种酶也可能兼具多种功能^[4-5], 这些酶对微生物的机体生长及代谢发挥着重要的作用。但是不同固碳酶之间的固碳能力缺少比较, 也没有现有的方法或者条件把它们进行比较。

Guadalupe-Medina 等在酿酒酵母中表达了磷酸核酮糖激酶(phosphoribulokinase, PRK)和核酮糖 1,5-二磷酸羧化/加氧酶, 构建了一条 CO₂ 固定旁路途径, 使得乙醇的产量提高了 10%^[6]; Gong 等在大肠杆菌中导入 PRK 和 RuBisCo 这 2 种酶, 并引入 CCM 碳浓缩机制, 开发的碳代谢通量指数 MFIh-CO₂ 可用于表征二氧化碳的固定量, 证明了重组菌的固碳功能^[7]; Mattozzi 等

将天然固碳途径 3-羟基丙酸双循环分为 4 个模块导入大肠杆菌中, 每个模块都能发生作用, 证明了该固碳途径在大肠杆菌中的巨大潜力^[8]。地衣芽孢杆菌是重要的工业微生物, 有着酶系丰富、抗逆性强、不易染菌等特点^[9-10]。但是在氧限制条件下发酵, 地衣芽孢杆菌会将大量碳源以二氧化碳的形式释放, 不仅造成了大量的碳排放, 也是对原料的严重浪费。因此, 筛选固碳酶并在地衣芽孢杆菌中建立固碳系统具有较高的研究价值和较广的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/Plasmids	相关特征 Correlated characteristic	来源 Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Wild type, used for gene expressing	This lab
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Wild type (CICIM B0030)	This lab
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a	Harboring plasmid pET-28a	This lab
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a-RuBisCo	Harboring plasmid pET-28a-RuBisCo	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a-PCK	Harboring plasmid pET-28a-PCK	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28a-ACC	Harboring plasmid pET-28a-ACC	This study
<i>E. coli</i> JM109	Wild type, used for gene cloning	This lab
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a (BL ₂)	Wild type	This lab
BL ₂ -pHY-P2-PCK	Harboring pHY-P2-PCK	This study
BL ₂ -pHY-P2-ACC	Harboring pHY-P2-ACC	This study
Plasmids		
pET-28a	Expressing vector, Kan ^r	This lab
pET-28a-RuBisCo	pET-28a expressing vector, carrying gene encoding RuBisCo, Kan ^r	This study
pET-28a-PCK	pET-28a expressing vector, carrying gene encoding PCK, Kan ^r	This study
pET-28a-ACC	pET-28a expressing vector, carrying gene encoding ACC, Kan ^r	This study
pHY-P2-CimA3.7	Shuttle vector, carrying gene encoding CimA3.7, Amp ^r and Tet ^r	This lab
pHY-P2-PCK	Shuttle vector, carrying gene encoding PCK, Amp ^r and Tet ^r	This study
pHY-P2-ACC	Shuttle vector, carrying gene encoding ACC, Amp ^r and Tet ^r	This study

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶, Thermo Fisher 公司; 2×*Taq* PCR Master Mix、2×Phanta PCR Master Mix、质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 蛋白胨、酵母粉、琼脂粉, OXOID 公司; RuBP、PEP、乙酰辅酶 A、ATP、ADP, 上海源叶有限公司; 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶试剂盒、乙酰辅酶 A 羧化酶试剂盒, 苏州科铭生物技术有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

酶标仪, TECAN 公司; 台式高速离心机, Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司; PCR 仪、核酸凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0; 固体 LB 培养基需加入 20 g/L 的琼脂粉。TB 培养基(g/L): 甘油 5.00, 蛋白胨 12.00, 酵母粉 24.00, 磷酸氢二钾 12.54, 磷酸二氢钾 2.31。合成培养基(g/L): 氯化铵 5.349, 磷酸二氢钾 4.082 7, 磷酸氢二钠 5.34, 七水硫酸镁 0.197, 补加微量元素 1 mL; 微量元素(mg/L): 氯化钙 0.727, 七水硫酸亚铁 1.112, 硫酸锰 0.169。以上培养基均需 115 °C 灭菌 20 min。培养基中添加的氨苄青霉素、卡那霉素、四环素终质量浓度分别为 100、30、20 µg/mL。

1.1.4 引物

本研究引物序列信息见表 2。所有引物合成和测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
用于 pET-28a 载体构建 For pET-28a vector construction	
RuBisCo- <i>Bam</i> HI-F	CGGGATCCATGACGGATAGACTGAGAGCGAC
RuBisCo- <i>Eco</i> RI-R	CGGAATTCCTTACGGCGCCAGTCCG
PCK- <i>Sac</i> I-F	CGAGCTCATGAACTCAGTTGATTGACCGCTG
PCK- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTTATACGAGAGGGCCGCCTG
ACC- <i>Bam</i> HI-F	CGGGATCCATGAGCGTCGAAACGAGAAAAATCAC
ACC- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTTATTTGATTTCAGAAAGGACGACTCCTTG
用于 pHY 载体构建 For pHY vector construction	
PCK-F	aaaattaattaagaggtgaaggaaaATGAACTCAGTTGATTGACCGCTG
PCK-R	aaaattgatcctttttataacagTTATACGAGAGGGCCGCCTGC
ACC-F	aaaattaattaagaggtgaaggaaaATGAGCGTCGAAACGAGAAAAATCAC
ACC-R	aaaattgatcctttttataacagTTATTTGATTTCAGAAAGGACGACTCCTTTG
pHY-F	CTGTTATAAAAAAAGGATCAATTTTGAACCTCTCTCCC
pHY-R	TTTCCTTCACCTCTTAATTAATTTGGGAGCTC

下划线部分为酶切位点; 小写字母表示同源臂序列

The underlined are restriction enzyme cutting sites; The sequences of homologous arms are indicated with lowercase letters.

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌重组菌的构建

将 pET-28a 载体通过对应核酸内切酶双酶切, 胶回收所需载体片段; 通过对应引物 RuBisCo-BamHI-F 和 RuBisCo-EcoRI-R (表 2) PCR 得到目的基因片段 RuBisCo, 通过对应引物 ACC-BamHI-F 和 ACC-XhoI-R PCR 得到目的基因片段 ACC, 通过酚抽提法得到枯草芽孢杆菌基因组 DNA, 通过对应引物 PCK-SacI-F 和 PCK-XhoI-R PCR 得到目的基因片段 PCK。PCR 反应体系: 2×Phanta PCR Master Mix 50 μ L, 上、下游引物(0.2 μ mol/L)各 2 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 45 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 kb/min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将目的片段纯化后进行双酶切, 使其露出黏性末端, 并胶回收所需目的基因片段。将载体片段与目的片段连接, 再经过转化、菌落 PCR 验证、基因测序、双酶切验证等分子生物学手段, 最终得到 *E. coli* DE3/pET-28a-RuBisCo、*E. coli* DE3/pET-28a-PCK 和 *E. coli* DE3/pET-28a-ACC 这 3 株重组菌。

1.2.2 固碳酶的诱导表达与纯化

将菌株 *E. coli* DE3/pET-28a 及 3 株重组大肠杆菌以乳糖为诱导剂进行诱导培养。以 3% 的接种量转接至 TB 培养基中, 并添加对应浓度的抗生素, 补加甘油至终浓度为 8 g/L, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 4 h, 添加乳糖至终浓度为 2 g/L, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导培养 20–24 h。

将诱导培养结束的细胞收集, 以 10 000 r/min 离心 5 min。用清水洗涤 2 次, 每 2 g 湿重的菌体加 10 mL 的结合缓冲液, 重悬后进行细胞破碎。破碎条件: 工作 1 s, 停止 2 s, 40 W, 5 min。破碎结束后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min。分离上清液和沉淀, 将上清溶液转移至新的离心管, 采用 Mag-Beads His-Tag 蛋白纯化磁珠进

行纯化。收集纯化的酶液, 超滤去除多余的咪唑和盐, 并将纯酶浓缩。取粗酶液及纯化后酶液用 SDS-PAGE 分析。蛋白浓度测定参照 Bradford 法^[11], 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为标准。

1.2.3 固碳酶的功能鉴定

由于 3 种酶催化不同的反应, 所以分别采用 3 种不同的酶活测定方法。PCK 酶活分析参考于丽等^[12]的方法; RuBisCo 酶活采用 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶试剂盒测定; ACC 酶活采用乙酰辅酶 A 羧化酶试剂盒测定。

1.2.4 无细胞催化实验

固碳酶催化底物与 CO₂ 反应生成新的产物, 理论上通过无细胞催化反应模拟细胞内的环境进行固碳酶的体外催化实验是可行的。由于产物的不稳定性(如草酰乙酸)等原因, 以稳定存在的底物消耗量为指标, 根据不同底物之间消耗的摩尔数比, 经 LC-MS/MS 分析, 建立一种定性半定量的方法研究固碳酶的固碳能力。

首先以 RuBisCo 为例, RuBisCo 在激活剂 Mg²⁺的作用下催化底物 RuBP 与 CO₂ 的反应生成 3-磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate, 3-PGA), 无细胞催化体系为 1,5-二磷酸核酮糖(ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP) 0.06 g/L、MgCl₂ 0.5 g/L、NaHCO₃ 0.3 g/L、酶 0.1 g/L。首先加入除关键底物 RuBP 外的其他所有成分, 在 30 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 然后补加底物 RuBP 室温反应 20 min, 加入适量的三氯乙酸终止反应。12 000 r/min 离心 20 min 取上清进行 LC-MS/MS 检测。对照以相同体积的水代替加酶量。

为了探究催化反应与加酶量及反应时间的关系, 第 1 组改变反应的不同加酶量, 分别为 0.05、0.075 和 0.1 g/L; 第 2 组改变不同的反应时间, 分别为 10、15 和 20 min, 其余条件保持不变。

为了探究不同 CO_2 加入形式对反应的影响, 以3种酶分别进行试验。第1组加入一定浓度的 NaHCO_3 溶液; 第2组直接通入气体形式的 CO_2 (瓶装 CO_2 气体通过减压阀、橡胶管、针头通入反应体系中, 持续缓慢地冒泡, 达到过量的效果); 第3组加入一定量的饱和碳酸水溶液 (取一定量的水, 通入 CO_2 气体, pH 值从7.0降至5.6 直至稳定, 说明溶液饱和)。其余条件不变, 对照以相同体积的水代替加酶量, 并且对照采用加入一定浓度的 NaHCO_3 溶液提供底物 CO_2 。

1.2.5 固碳酶的固碳能力分析

三种固碳酶催化不同的底物与 CO_2 的反应, 每种反应首先混合除关键底物 RuBP、PEP、乙酰辅酶 A 外的其他所有成分, 在 30°C 激活 10 min。加入关键底物, 室温反应 15 min 后, 加入一定的三氯乙酸终止反应, 12 000 r/min 离心 20 min 取上清进行 LC-MS/MS 检测。对照以相同体积的水代替加酶量。各反应组分及其浓度分别为: 第1组 RuBP 0.06 g/L、 MgCl_2 0.5 g/L、 NaHCO_3 0.3 g/L、RuBisCo 0.1 g/L; 第2组 PEP 0.2 g/L、 MgCl_2 、ADP 0.5 g/L、 NaHCO_3 0.3 g/L、PCK 0.1 g/L; 第3组 acetyl-CoA 0.1 g/L、 MgCl_2 、ATP 0.5 g/L、 NaHCO_3 0.3 g/L、ACC 0.1 g/L。

1.2.6 地衣芽孢杆菌重组菌厌氧发酵

将 PCK 和 ACC 分别连接到 pHY-P2 载体并电转至地衣芽孢杆菌中, 得到 2 株重组菌 BL_2 -pHY-P2-PCK 和 BL_2 -pHY-P2-ACC。将 2 株重组菌与对照菌株进行平板活化, 挑取单菌落至 15 mL LB 培养基于 37°C 、250 r/min 培养 16 h, 以 2% 的接种量转接至 100 mL 合成培养基 (100 mL 血清瓶), 并添加对应浓度的抗生素, 补加葡萄糖至终浓度为 10 g/L, 补加 KNO_3 至终浓度为 1 g/L, 37°C 静置培养 96 h。

细胞浊度测定: 取不同时间点的细胞, 用 2 mol/L 的盐酸稀释, 在 600 nm 下检测吸光值。

葡萄糖、2,3-丁二醇、乳酸、乙酸浓度检测:

取不同时间取样的细胞 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 500 μL , 加入 10% 三氯乙酸沉淀 3 h, 120 000 r/min 离心 20 min, 取上清液进行 HPLC 测定, 以 Dikma CarboPac H+ (300 mm \times 8.0 mm, 6 μm) 为色谱柱, 0.5% 的稀硫酸溶液作为流动相, 流速为 0.8 mL/min, 柱温 50°C , 示差检测器。

2 结果与分析

2.1 固碳酶的挖掘

通过文献调研及 NCBI、KEGG 等各个网站挖掘出大量固碳酶。其中 RuBisCo 是卡尔文循环中的关键酶, 在异养生物酿酒酵母和大肠杆菌中过表达 RuBisCo, 并表达 PRK 为其提供底物 RuBP, 可以构建一条旁路途径, 固定二氧化碳的同时提高碳的利用率^[13-15]。PCK 在代谢途径中通常用来回补草酰乙酸, 在固碳反应的同时伴随生成 ATP^[16-17]。ACC 可以催化乙酰辅酶 A 生成丙二酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 作为代谢中的产物被广泛研究, 丙二酰辅酶 A 也可以被转化为多种化学品^[18-19]。3种酶在芽孢杆菌中参与的部分代谢途径见图1, 酶的相关信息见表3。基于酶所在代谢途径及其功能性和可行性分析, 3种酶具有较大的研究价值及应用潜力。选取了来源于红色红螺菌的 RuBisCO^[20-21], 该 RuBisCO 为 II 型结构, 由 2 个大亚基组装而成; 枯草芽孢杆菌来源的 PCK 为 II 型 PCK, 以 ATP 为底物。谷氨酸棒状杆菌来源的 ACC^[22] 为第 3 类 ACC, 仅有 α 和 β 两个亚基组成, 用于后续实验。RuBisCo (GenBank 登录号为 ABC22798.1) 和 ACC (GenBank 登录号为 ALP49462.1) 根据 NCBI 网站上提供的氨基酸序列, 送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCK (GenBank 登录号为 CP053102.1) 以提取的枯草芽孢杆菌基因组为模板, 通过 PCR 获得。

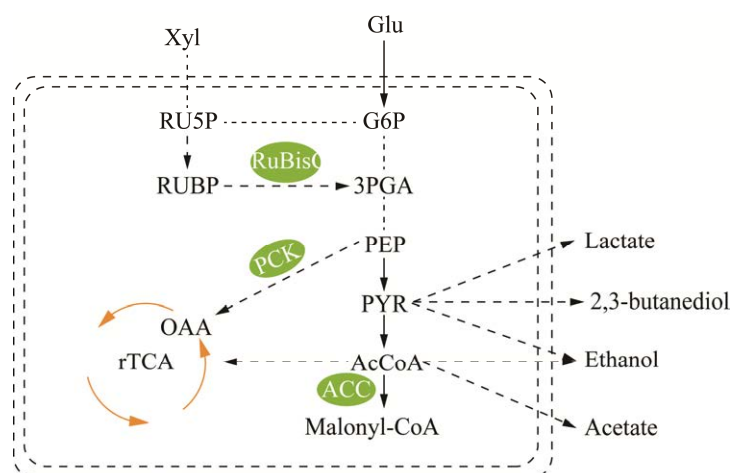


图 1 固碳酶在芽孢杆菌中参与的部分代谢途径

Figure 1 Metabolic pathway of carbon fixase in *Bacillus*.

表 3 二氧化碳固定酶

Table 3 Carbon dioxide fixation enzymes

Enzyme	Substrate (Except for CO ₂ and H ₂ CO ₃)	Product	Energy	Metabolic pathway
RuBisCo	RuBP	3-PGA	-ATP	Calvin cycle ^[16]
PCK	PEP	OAA	+GTP/+ATP	Oxaloacetate replenishment ^[14]
ACC	Acetyl-CoA	Malonyl-CoA	-ATP	3-hydroxypropionic acid pathway ^[23]

2.2 含固碳酶表达质粒的构建与验证

按照 1.2.1 中的方法成功构建了单基因表达质粒 pET-28a-RuBisCo、pET-28a-PCK 与 pET-28a-ACC。重组质粒的大小分别为 6 494、6 931 和 7 111 bp；将 3 个重组质粒分别用对应核酸内切酶双酶切。pET-28a-RuBisCo 酶切理论大小为 1 125 bp 和 5 369 bp；pET-28a-PCK 酶切理论大小为 1 584 bp 和 5 347 bp；pET-28a-ACC 酶切理论大小为 1 776 bp 和 5 335 bp，结果如图 2 所示，电泳条带大小与理论值一致，说明 3 种重组质粒构建成功。

2.3 固碳酶的诱导表达与纯化

按照 1.2.2 中的方法对含有重组质粒 pET-28a-RuBisCo、pET-28a-PCK 与 pET-28a-ACC 的重组菌进行诱导培养。3 种重组菌理论上表达的蛋白大小约为 42.4、60.7 和 63.6 kDa。结果

如图 3A-3C 所示，电泳条带大小与理论值一致，说明 3 种酶均实现可溶性表达，其生物学活性有待进一步验证。

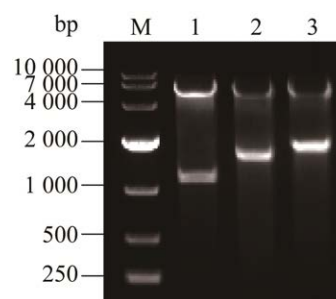


图 2 重组质粒酶切验证 M: DNA Marker 10 000 bp; 1-3: 重组质粒 pET-28a-RuBisCo、pET-28a-PCK、pET-28a-ACC

Figure 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmids. M: DNA Marker 10 000 bp; 1-3: Recombinant plasmid: pET-28a-RuBisCo, pET-28a-PCK and pET-28a-ACC.

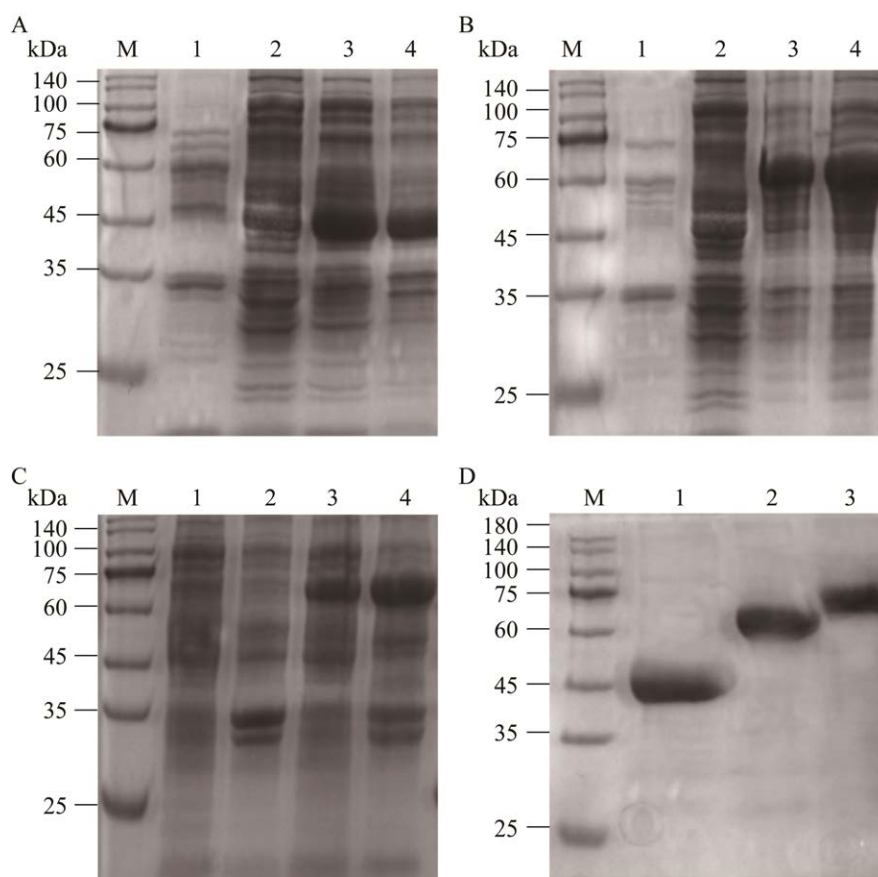


图3 不同重组菌株的蛋白表达情况和纯酶 A: RuBisCo. B: PCK. C: ACC. 1: 对照菌株破碎后上清液; 2: 对照菌株破碎后沉淀; 3: 重组菌株破碎后上清液; 4: 重组菌株破碎后沉淀. D: 1: RuBisCo; 2: PCK; 3: ACC. M: 蛋白 Marker.

Figure 3 Protein expression of different recombinant strains and pure enzymes. A: RuBisCo. B: PCK. C: ACC. 1: The supernatant after the control strain was disrupted; 2: The control strain was crushed and precipitated; 3: The supernatant after the recombinant strain was disrupted; 4: Recombinant strains are crushed and precipitated. D: 1: RuBisCo; 2: PCK; 3: ACC. M: Protein Marker.

2.4 固碳酶的功能鉴定

三种酶纯化后的结果如图 3D 所示。在 35–75 kDa 位置有目的蛋白条带，与目标大小 42.4、60.7 和 63.6 kDa 相符，获得了纯度较高的目的蛋白，可用于进一步研究。将纯化后的酶采用 1.2.3 中的方法对酶进行功能鉴定，结果见表 4。可以看出，3 种酶的比酶活分别为 66.43、1.16 和 12.52 U/mg，表达出的 3 种酶均有活性。其中，于丽等^[12]测得菌株 YL2 的 PCK 粗酶比酶活为 0.63 U/mg，本研究经过亲和层

析，测得纯酶的比酶活为 1.16 U/mg。固碳酶均可催化二氧化碳与底物反应，但是不同的酶催化机制不同，现有研究偏重于酶功能的定性鉴定，而固碳效率的定量尚不清晰。为了理性、精准地指导固碳酶在微生物遗传改造中的应用，有必要对它们固定二氧化碳的效率进行评价。现有的酶活测定方法并不能精准地反映酶的固碳效率，如 RuBisCo 催化核酮糖 1,5-二磷酸与 CO₂ 羧化生成 3-PGA，3-PGA 可通过外加 3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用

用产生甘油醛-3-磷酸并使 NADH 氧化, 可以通过测定在 340 nm 下的吸光值来反映酶活的大小。3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的后续催化反应导致其并不能直接反映 RuBisCo 的固碳能力。所以不同酶之间的固碳能力无法通过酶活比较, 建立一种比较不同酶固碳能力的方法很有必要。

2.5 固碳酶固碳能力研究

2.5.1 无细胞催化实验

通过 1.2.4 建立的体外无细胞催化实验, 经 LC-MS/MS 分析得到的结果如图 4 所示。从图 4B 中可以看到, 反应 2、3 与对照 1 相比, 峰面积从 677 减少至 10、11, 说明该反应底物基本消耗完, 酶具有功能性且底物也稳定, 该无细

胞催化实验方法可行。

2.5.2 加酶量与反应时间

通过 1.2.4 中的方法, 改变加酶量及调整反应时间得到的结果见图 5。可以看出, RuBisCo 与 ACC 两种酶所催化的反应, 当固定反应时间时, 随着加酶量的增加, 底物的消耗也越多; 固定加酶量, 反应时间越长, 底物的消耗也越多, 说明底物的消耗与加酶量以及反应时间呈正相关。由于 PCK 催化的反应为产 ATP 的反应, 该反应在体外很难进行, 但是底物的消耗与加酶量以及反应时间也呈正相关。所以, 在保证一定的反应时间内底物过量, 通过无细胞催化实验去比较不同酶的固碳速率方法可行。

表 4 酶活性分析

Table 4 Enzyme activity analysis

Enzyme	Total activity (U)	Total protein (mg/mL)	Specific activity (U/mg)
RuBisCo	10.50	0.16	66.43
PCK	0.37	0.32	1.16
ACC	3.76	0.30	12.52

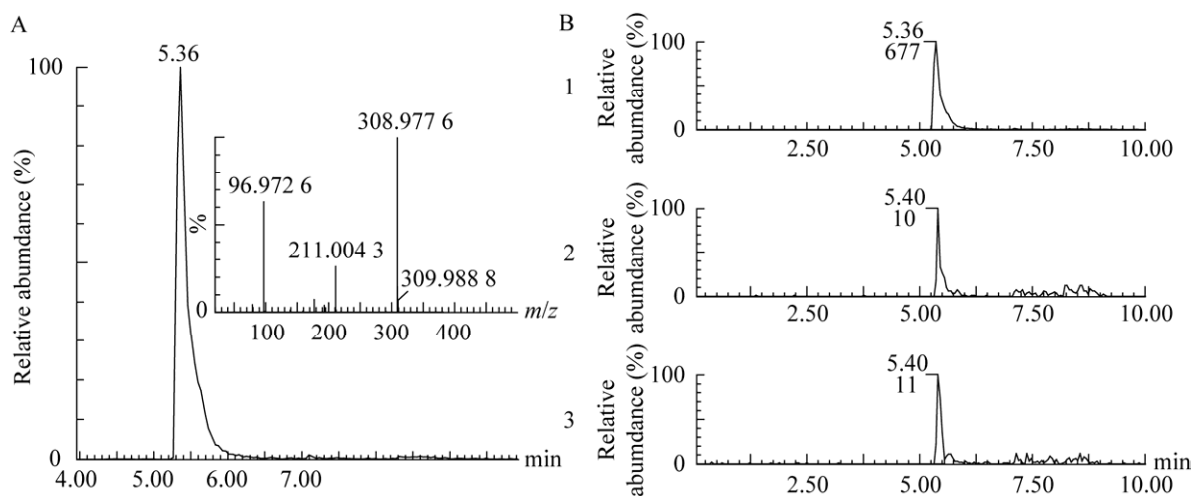


图 4 RuBisCo 催化反应 LC-MS/MS 检测结果 A: 底物 RuBP 色谱质谱图. B: 反应液底物色谱图. 1: 对照组; 2、3: 反应组

Figure 4 LC-MS/MS detection results of RuBisCo catalytic reaction. A: Substrate RuBP chromatogram and mass spectrum. B: Reaction substrate chromatogram. 1: Control group; 2, 3: Reaction groups.

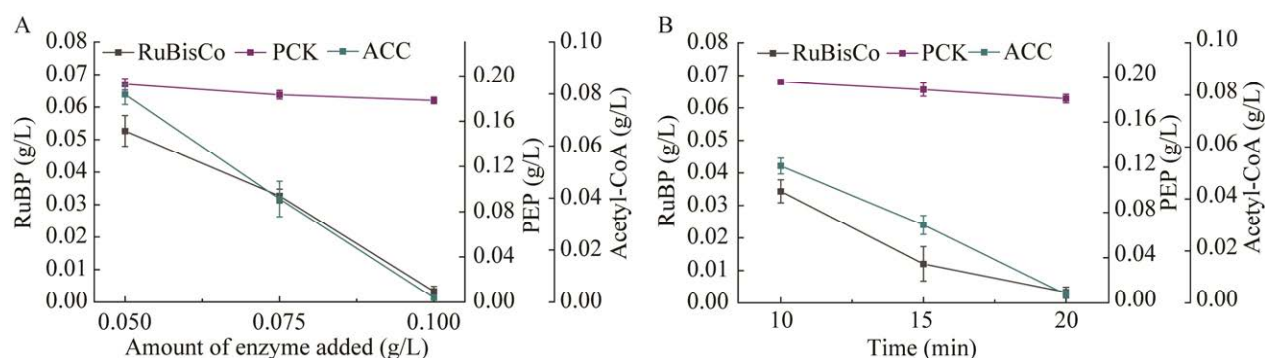


图 5 三种酶加酶量与反应时间对反应的影响 A: 不同加酶量. B: 不同反应时间

Figure 5 Effect of the amount of enzyme addition and reaction time of the three enzymes on the reaction. A: The different amount of enzyme added. B: The different reaction time.

2.5.3 CO₂ 加入形式

通过 1.2.4 中的方法改变不同的 CO₂ 加入形式, 结果如图 6 所示。在 3 个酶所催化的反应中, 反应 1 采用了添加 NaHCO₃ 溶液作为无机碳的加入形式, 反应 2 为通入气体形式的 CO₂, 反应 3 为添加饱和碳酸水溶液, 对照组添加 NaHCO₃ 溶液作为对照。经无细胞催化实验后, 3 种反应与对照反应 1 相比, 峰面积都减少至同一数量级。该结果表明 CO₂ 以 3 种形态均可作为酶的底物高效参与反应。因此, 后续无细胞催化实验采用在水中溶解度最高的碳酸氢钠提供 CO₂, 以维持反应中的底物过量。

2.6 固碳酶的固碳能力分析

通过 1.2.5 中的方法得到的结果如图 7 所示。3 种酶催化不同的底物与 CO₂ 结合生成产物且摩尔比为 1:1。在保证相同加酶量以及底物过量的前提下, 从图 7A、7B 可以看出 RuBisCo 催化的固碳反应, 底物 RuBP 基本消耗完, 即消耗了 0.193 mmol/L 的底物, 从图 7C、7D 可以看出 PCK 大约只催化了微量的底物 PEP 反应, 在 7E、7F 中, ACC 催化的固碳反应底物乙酰辅酶 A 也基本消耗完, 即消耗了 0.124 mmol/L 的底物。考虑到 PCK 催化的反应为可逆反应, 且其催化的固碳反向的反应为产

生 ATP 的反应, 导致其固碳反向的反应很难进行, 所以 PCK 在体外有着较低的固碳速率, 而 RuBisCo 和 ACC 都有较高的体外催化活性。考虑到 RuBisCo 既能催化底物与二氧化碳的羧化反应, 又能催化与氧气的加氧反应, 并且加氧反应与羧化反应的比例为 3:1, 而且正常条件下氧气浓度远大于二氧化碳浓度, 由于无细胞催化实验避免了加氧反应, 所以正常条件下的固碳反应 RuBisCo 固碳速率低于 ACC。

2.7 重组地衣芽孢杆菌厌氧发酵

直接在异养微生物中强化内源性羧化反应, 是常见的增强 CO₂ 固定的一种方式^[24]。PCK 与 ACC 是两种常见的内源性羧化酶。通过 1.2.6 中的方法得到的结果如图 8 所示。细胞在培养初期, 由于血清瓶内有少量氧气, 细胞迅速生长, 菌体量达到一定阶段的最大值, 随后下降, 进入平稳期, 最后随着培养基营养成分的减少, 菌体量开始下降。原始菌比重组菌消耗葡萄糖更多、更快。地衣芽孢杆菌代谢的产物如图 1 所示, 细胞的主要 3 种代谢产物乳酸、2,3-丁二醇在 96 h 内呈现积累的趋势; 乙酸在 24 h 时达到最大值, 随后有一定程度的下降。对照菌株比重组菌消耗了更多的葡萄糖,

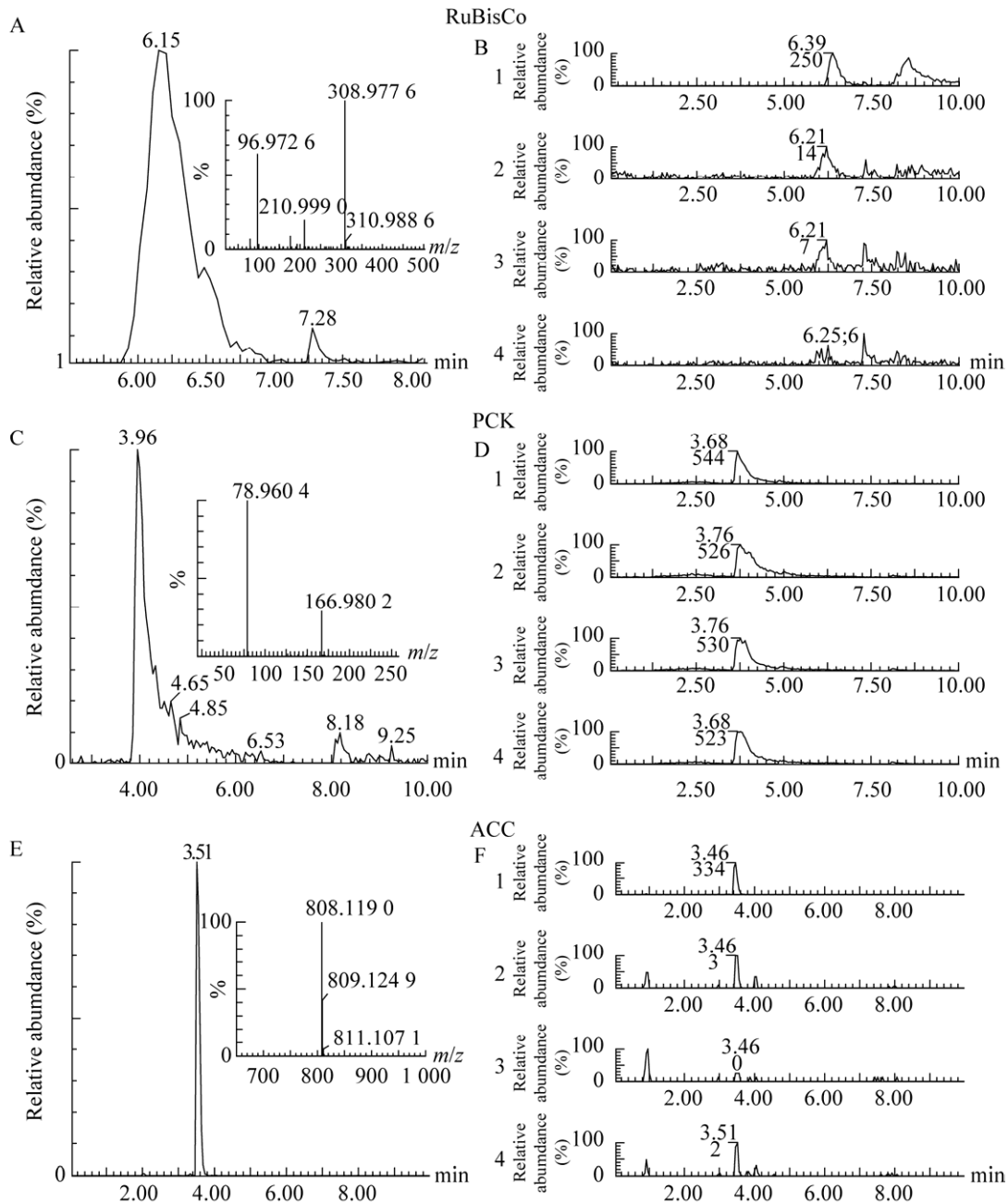


图6 三种酶催化反应LC-MS/MS检测结果 A: RuBP色谱质谱图. B: RuBisCo反应底物色谱图. C: PEP色谱质谱图. D: PCK反应底物色谱图. E: Acetyl-CoA色谱质谱图. F: ACC反应底物色谱图. 1: 对照组; 2: 添加NaHCO₃溶液; 3: 通入气体形式的CO₂; 4: 添加饱和碳酸水溶液

Figure 6 LC-MS/MS detection results of three enzymes catalytic reaction. A: RuBP chromatogram and mass spectrum. B: RuBisCo reaction substrate chromatogram. C: PEP chromatogram and mass spectrum. D: PCK reaction substrate chromatogram. E: Acetyl-CoA chromatogram and mass spectrum. F: ACC reaction substrate chromatogram. 1: Control group; 2: Adding NaHCO₃ solution; 3: Passing CO₂ in the form of gas; 4: Adding saturated carbonic acid aqueous solution.

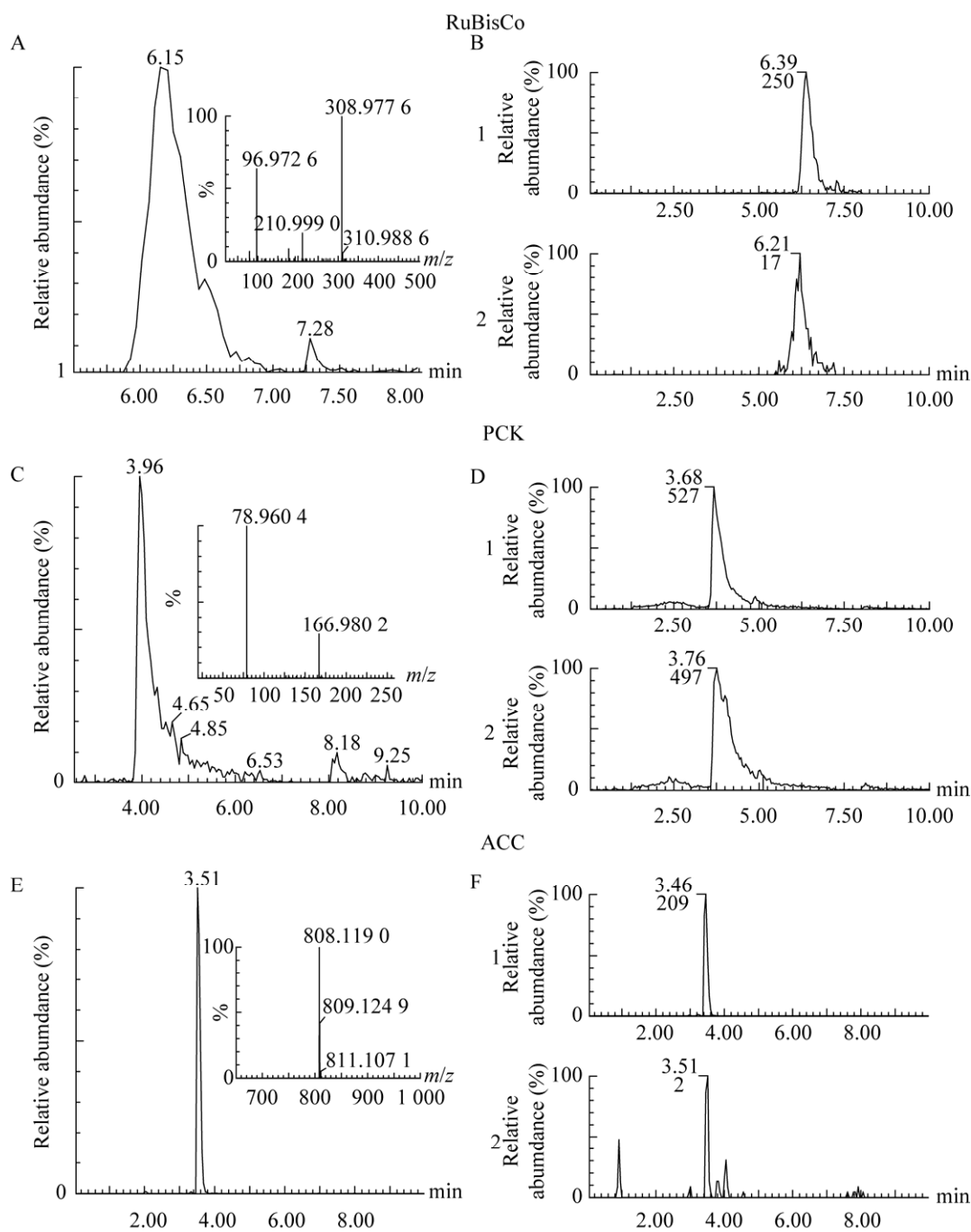


图7 三种酶催化反应 LC-MS/MS 检测结果 A: RuBP 色谱质谱图. B: RuBisCo 反应底物色谱图. C: PCK 色谱质谱图. D: PCK 反应底物色谱图. E: Acetyl-CoA 色谱质谱图. F: ACC 反应底物色谱图. B、D、F 中, 1: 对照组; 2: 反应组

Figure 7 LC-MS/MS detection results of three enzymes catalytic reaction. A: RuBP chromatogram and mass spectrum. B: RuBisCo reaction substrate chromatogram. C: PCK chromatogram and mass spectrum. D: PCK reaction substrate chromatogram. E: Acetyl-CoA chromatogram and mass spectrum. F: ACC reaction substrate chromatogram. In B, D and F: 1: Control group; 2: Reaction group.

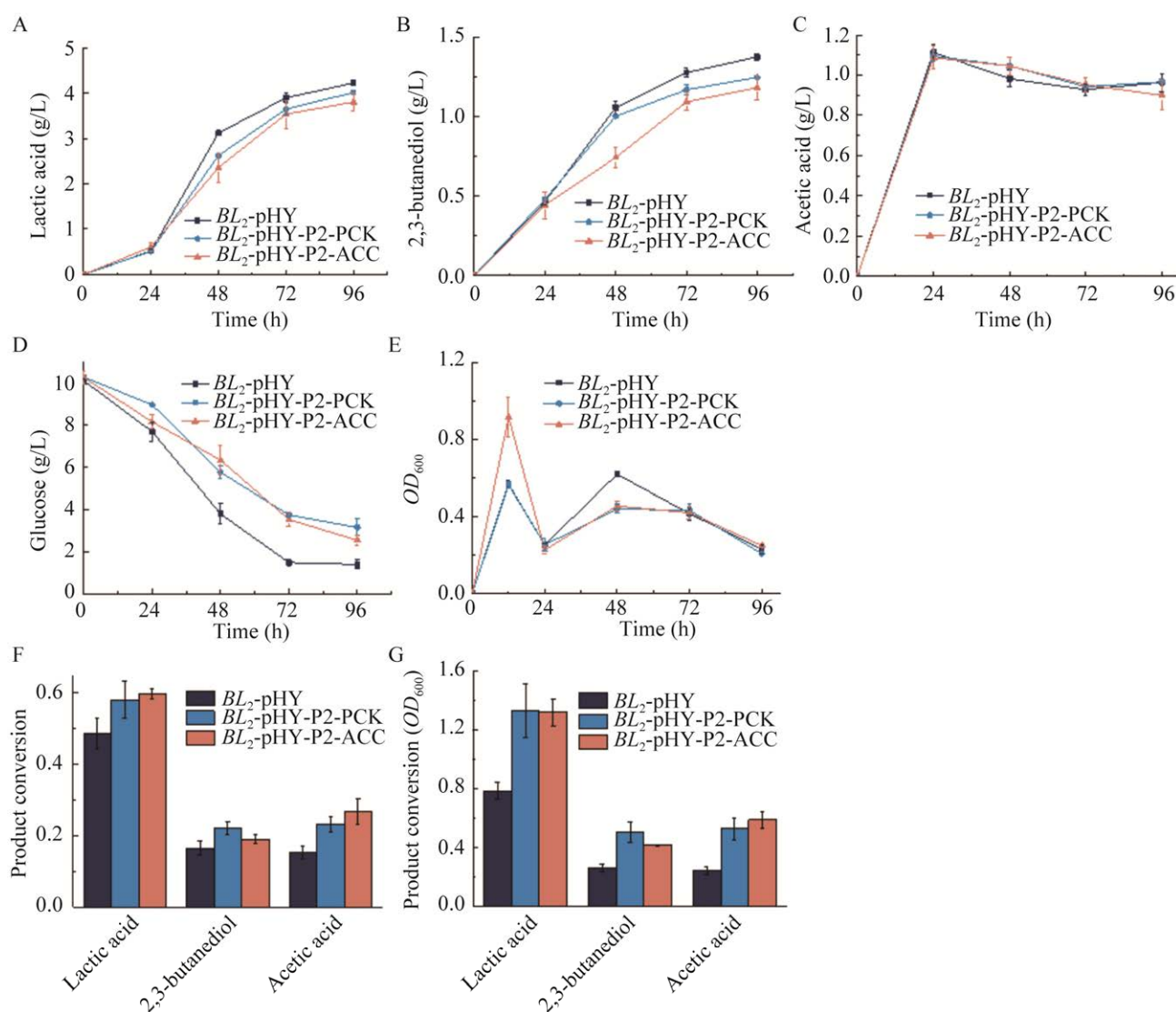


图 8 地衣芽孢杆菌代谢产物及转化率 A: 乳酸浓度. B: 2,3-丁二醇浓度. C: 乙酸浓度. D: 葡萄糖浓度. E: OD_{600} . F: 产物转化率. G: 单位细胞产物转化率

Figure 8 Metabolites of *Bacillus licheniformis* and conversion rate. A: Lactic acid concentration. B: 2,3-butanediol concentration. C: Acetic acid concentration. D: Glucose concentration. E: OD_{600} . F: Product conversion rate. G: Unit cell product conversion rate.

并且利用更加迅速。以细胞在稳定期 48 h 为例, *BL*₂-pHY-P2-PCK 使得 3 种产物的转化率分别从 48.6%、16.5%和 15.3%提高到 58.1%、22.2%和 23.2%; *BL*₂-pHY-P2-ACC 使得 3 种产物的转化率分别提高到 59.7%、18.9%和 26.8%, 考虑到细胞生长情况的不同, 单位细

胞的产物转化率重组菌比对照菌株提高得更加明显。

3 讨论与结论

本研究通过文献调研及 NCBI 等网站挖掘出了 3 种固碳酶, 分别在大肠杆菌中构建了含

RuBisCo、PCK、ACC 的单基因表达质粒, 并进行诱导表达纯化, 通过酶活测定对 3 种固碳酶进行基因的功能鉴定, 3 种酶的比酶活分别为 66.43、1.16 和 12.52 U/mg。通过无细胞催化实验建立了一种定性半定量分析的方法进行酶固碳能力的对比, 酶的固碳速率与加酶量以及反应时间呈正相关, 并且 3 种酶在溶液中催化反应时, 对于二氧化碳加入形式并无区别, 乙酰辅酶 A 羧化酶具有最高的固碳能力。该研究对于固碳酶之间的比较提供了研究思路。

在异养微生物中过表达羧化酶是常见增强 CO₂ 固定的一种方式。本研究在地衣芽孢杆菌中分别过表达了 PCK 和 ACC 两种固碳酶, 提高了产物乳酸、2,3-丁二醇、乙酸的转化率。通过基因工程手段简化代谢途径, 结合某种特定产物, 利用 ¹³C 同位素标记技术和 GS-MS 分析, 可进一步了解地衣芽孢杆菌对 CO₂ 的固定能力。虽然不同固碳酶的催化效率不同, 但是考虑到其在代谢途径中存在的位置, 各种酶之间也是不能替代的。RuBisCo 存在于自养生物中, 是卡尔文循环中的关键酶, 也在一些古生菌里发现, 在模式异养生物酿酒酵母与大肠杆菌中表达 RuBisCo 与可以给 RuBisCo 提供底物的 PRK, 可以构成一个旁路途径, 提高生物的固碳效率。PCK 在大部分生物中都存在, 其主要催化草酰乙酸的回补, 该反应在固定二氧化碳的同时还能产生 ATP, 因此该酶具有极大的开发利用潜力。ACC 催化的反应是脂肪酸合成的第一步, 乙酰辅酶 A 存在于生物代谢中的特殊位置, 受到广泛研究, 而产物丙二酰辅酶 A 也被作为中间产物合成其他新的产物。在芽孢杆菌中建立相关固碳途径的研究较少, 本研究为生物二氧化碳固定提供了研究价值。

REFERENCES

- [1] SHIN J, SONG Y, JEONG Y, CHO BK. Analysis of the core genome and pan-genome of autotrophic acetogenic bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1531.
- [2] GLUECK SM, GÜMÜS S, FABIAN WMF, FABER K. Biocatalytic carboxylation[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(1): 313-328.
- [3] 葛喜珍, 赵有玺, 刘晓宇, 辛鑫, 田平芳. 生物固定 CO₂ 代谢途径及关键酶的研究进展[J]. *北京联合大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(1): 63-68.
GE XZ, ZHAO YX, LIU XY, XIN X, TIAN PF. Research advances in biological CO₂ fixation pathways and key enzymes[J]. *Journal of Beijing Union University (Natural Science Edition)*, 2013, 27(1): 63-68 (in Chinese).
- [4] ANTONOVSKY N, GLEIZER S, NOOR E, ZOHAR Y, HERZ E, BARENHOLZ U, ZELCBUCH L, AMRAM S, WIDES A, TEPPER N, DAVIDI D, BAR-ON Y, BAREIA T, WERNICK DG, SHANI I, MALITSKY S, JONA G, BAR-EVEN A, MILO R. Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 115-125.
- [5] ERB TJ. Carboxylases in natural and synthetic microbial pathways[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8466-8477.
- [6] GUADALUPE-MEDINA V, WISSELINK HW, LUTTIK MA, de HULSTER E, DARAN JM, PRONK JT, van MARIS AJ. Carbon dioxide fixation by Calvin-cycle enzymes improves ethanol yield in yeast[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 125.
- [7] GONG FY, LIU GX, ZHAI XY, ZHOU J, CAI Z, LI Y. Quantitative analysis of an engineered CO₂-fixing *Escherichia coli* reveals great potential of heterotrophic CO₂ fixation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 86.
- [8] MATTOZZI MD, ZIESACK M, VOGES MJ, SILVER PA, WAY JC. Expression of the sub-pathways of the *Chloroflexus aurantiacus* 3-hydroxypropionate carbon fixation bicycle in *E. coli*: toward horizontal transfer of autotrophic growth[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 16: 130-139.
- [9] XIAO FX, LI YR, ZHANG YP, WANG HR, ZHANG L, DING ZY, GU ZH, XU S, SHI GY. Construction of a novel sugar alcohol-inducible expression system in *Bacillus licheniformis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(12): 5409-5425.
- [10] ZHANG YP, LI YR, XIAO FX, WANG HR, ZHANG L, DING ZY, XU S, GU ZH, SHI GY. Engineering of a biosensor in response to malate in *Bacillus licheniformis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(7): 1775-1784.
- [11] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical*

- Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [12] 于丽, 姜岷, 马江锋, 岳方方, 刘树文. 过量表达 *Bacillus subtilis* 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶对大肠杆菌产琥珀酸的影响[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 325-330.
- YU L, JIANG M, MA JF, YUE FF, LIU SW. Effect of overexpression of *Bacillus subtilis* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2010, 37(3): 325-330 (in Chinese).
- [13] ANDREWS TJ, WHITNEY SM. Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 414(2): 159-169.
- [14] KOAY TW, WONG HL, LIM BH. Engineering of chimeric eukaryotic/bacterial rubisco large subunits in *Escherichia coli*[J]. Genes & Genetic Systems, 2016, 91(3): 139-150.
- [15] WHITNEY SM, HOUTZ RL, ALONSO H. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco[J]. Plant Physiology, 2011, 155(1): 27-35.
- [16] DONG XM, CHAO Q, WANG BC. Research progress in plant phosphoenolpyruvate carboxykinase[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(3): 320-328.
- [17] 关淑艳, 孙苏, 马义勇, 魏晓禹, 费建博, 刘冀, 王丕武. 植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的调控机制及功能研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(5): 505-512.
- GUAN SY, SUN S, MA YY, WEI XY, FEI JB, LIU J, WANG PW. Research progress of regulatory mechanism and function of phosphoenolpyruvate carboxylase in plants[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(5): 505-512 (in Chinese).
- [18] 李洁琼, 郑世学, 喻子牛, 张吉斌. 乙酰辅酶A羧化酶: 脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 753-758.
- LI JQ, ZHENG SX, YU ZN, ZHANG JB. Research progress of acetyl-CoA carboxylase: the key enzyme of fatty acid metabolism and its gene cloning[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(5): 753-758 (in Chinese).
- [19] 龚莹, 彭少丹, 汪骞, 官春云, 王学军, 杨进成, 瞿观, 刘坚坚, 林良斌. 乙酰辅酶A羧化酶的结构·功能及基因的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(35): 19893-19896.
- GONG Y, PENG SD, WANG Q, GUAN CY, WANG XJ, YANG JC, QU G, LIU JJ, LIN LB. Research progress on the structure function of acetyl-CoA carboxylase and its genes[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(35): 19893-19896 (in Chinese).
- [20] ANTONOVSKY N, GLEIZER S, MILO R. Engineering carbon fixation in *E. coli*: from heterologous RuBisCO expression to the Calvin-Benson-Bassham cycle[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 47: 83-91.
- [21] ANDERSSON I, BACKLUND A. Structure and function of Rubisco[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2008, 46(3): 275-291.
- [22] MILKE L, MARIENHAGEN J. Engineering intracellular malonyl-CoA availability in microbial hosts and its impact on polyketide and fatty acid synthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6057-6065.
- [23] BERG IA. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 1925-1936.
- [24] 胡贵鹏. CO₂封存工程改造微生物生产 L-苹果酸[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.
- HU GP. Production of L-malic acid by CO₂ sequestration engineering and microbial transformation[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).