

## 乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 基因功能的鉴定\*

马金成 罗彪 胡喆 王海洪\*\*

(华南农业大学生命科学学院, 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广州 510642)

**摘要** 大肠杆菌(*Escherichia coli*)是Ⅱ型脂肪酸合成系统的模式生物, 3-羟基脂酰 ACP 脱水异构酶(FabA)是不饱和脂肪酸合成中的关键酶. 生物信息学分析表明, 乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的基因组中没有标注为 3-羟基脂酰 ACP 脱水异构酶的基因, 但有两个标注为 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶基因 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2*, 其编码的蛋白质与 EcFabZ 的相似性分别为 41%和 45.1%, 且都具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶两个保守的  $\alpha$  螺旋结构. 用携带 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 的质粒载体遗传互补大肠杆菌 *fabA* 温度敏感突变株 CY57, 在 42℃ 下不能恢复生长, 但无细胞抽提物的结果显示 LiFabZ1 能够使反-2-癩烯酰 ACP 异构成顺-3-癩烯酰 ACP, 而 LiFabZ2 则不能. 互补大肠杆菌 *fabZ* 突变株 HW7 显示, 在诱导的条件下, 含有 *LlfabZ2* 的转化子能够恢复生长, 而 *LlfabZ1* 则不能. 体外重建脂肪酸合成反应及蛋白质活性测定表明, LiFabZ1 具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水异构酶功能, 而 LiFabZ2 只具有 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶功能. 另外, 未得到 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 的突变株, 表明 LiFabZ1 和 LiFabZ2 可能是乳酸乳球菌脂肪酸合成酶系中的必不可少的关键蛋白. 上述结果证实了乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 两个基因在脂肪酸合成中的功能.

**关键词** 乳酸乳球菌, 细菌脂肪酸合成, 3-羟基脂酰 ACP 脱水异构酶, 3-羟基脂酰 ACP 脱水酶

**学科分类号** Q93

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2014.00025

细菌不饱和脂肪的合成机制首先是由 Bloch 等于 20 世纪 60 年代在研究丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)时提出<sup>[1-2]</sup>, 后来在大肠杆菌中鉴定了相应的酶蛋白<sup>[3-5]</sup>: FabA(3-羟基癩脂酰 ACP 脱水异构酶)和 FabB(3-酮基脂酰 ACP 合成酶 I). FabA 使 3-羟基癩脂酰 ACP 脱水, 形成反-2-癩烯酰 ACP, 部分反-2-癩烯酰 ACP 被癩脂酰 ACP 还原酶(FabI)还原, 用于饱和脂肪酸的合成, 最终生成棕榈酸或硬脂酸, 另一部分反-2-癩烯酰 ACP 则进一步被 FabA 异构化, 生成顺-3-癩烯酰 ACP. 顺-3-癩烯酰 ACP 不能被 FabI 还原, 只能作为 FabB 的底物, 与二碳底物缩合成顺-5-3-酮基豆蔻烯酰 ACP 进入脂肪酸合成的循环反应, 最后合成棕榈油酸或十八碳烯酸<sup>[6]</sup>. 长期以来一直认为细菌均以 FabA-FabB 途径合成不饱和脂肪酸, 然而随着大量细菌的全基因组序列测序完成, 发现 FabA-FabB 途径仅存在于变形细菌门(Proteobacteria)的  $\alpha$  和  $\gamma$  类群中<sup>[7-8]</sup>. 在众多革兰氏

阳性细菌的基因组中不存在 *fabA-fabB* 同源基因, 催化这些细菌的不饱和脂肪酸合成的酶不同于大肠杆菌的 FabA 和 FabB. 研究发现, 在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和变异链球菌(*Streptococcus mutans*)中, 有一个反-2-顺-3-癩烯酰 ACP 异构酶(FabM)<sup>[9]</sup>, 它可以将由 FabZ(3-羟基脂酰 ACP 脱水酶)脱水产生的反-2-癩烯酰 ACP 异构成顺-3-癩烯酰 ACP. 在粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中, 有两个拷贝的 *fabZ* 同源基因(*fabZ* 和 *fabN*)<sup>[10]</sup>. 研究表明 FabN 是一个 FabZ 类似酶(FabZ like enzyme), 但是它具有 3-羟基癩脂酰 ACP 脱水

\* 国家自然科学基金(31200028), 高等学校博士学科点专项科研基金(20104404110005)和广东高校优秀青年创新人才培养计划(LYM10038)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 020-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

收稿日期: 2013-12-22, 接受日期: 2014-05-05

酶和异构酶的双重活性<sup>[11]</sup>。在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中, 不饱和脂肪酸的合成是在形成磷脂后进行的<sup>[12]</sup>。Δ5 脂酰脂质去饱和酶可将磷脂中的棕榈酸氧化脱饱和, 产生顺-5-十六烯酸。更为有趣的是, 虽然铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)属于变形细菌门α类群细菌, 但此菌中有三条不饱和脂肪酸合成的途径<sup>[7, 13]</sup>: FabA-FabB途径、DesA途径和DesBC途径, 其中FabA-FabB是厌氧途径, 而DesA和DesBC是有氧途径。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是人类胃肠道中的益生菌, 它能够控制内毒素, 抑制肠道内腐败菌生长繁殖和腐败产物的产生, 对机体的营养状态的改善和激活免疫反应等起着重要作用<sup>[14-15]</sup>。乳酸乳球菌具有生长快速、不产生内毒素、具孢子和胞外蛋白酶等特点, 已经成为代谢工程不可多得的宿主, 被誉为生产食品级代谢产物的超级“细胞加工厂”<sup>[16-19]</sup>。因此, 过去几年以乳酸乳球菌为对象的基因组学、蛋白质组学和代谢组学研究非常活跃, 这为研究乳酸乳球菌的生理生化代谢提供了良好的基础<sup>[20]</sup>。目前, 乳酸乳球菌的脂肪酸合成代谢研究已经取得了积极的进展, 鉴定了FabF(3-酮基脂酰 ACP合成酶Ⅱ)<sup>[21]</sup>、FabH(3-酮基脂酰 ACP合成酶Ⅲ)<sup>[22]</sup>和FabG(3-酮基脂酰 ACP还原酶)<sup>[23]</sup>的功能和特性。乳酸乳球菌的脂肪酸组成与大肠杆菌相似, 但是基因组分析显示, 该菌缺少与大肠杆菌*fabA*和*fabB*的同源基因, 也未发现有与肺炎链球菌*fabM*类似的同源基因, 却有两个与大肠杆菌*fabZ*同源的基因。已经证明乳酸乳球菌的FabF具有大肠杆菌FabB和FabF的双重活性, 因此, 我们推测, 在乳酸乳球菌拥有的两个*fabZ*基因中, 有一个可能编码3-羟基癸脂酰 ACP脱水异构酶, 另一个可能编码3-羟基脂酰 ACP脱水酶。为此本课题采用异体遗传互补、无细胞抽提物分析和体外酶活性检测等技术, 研究了乳酸乳球菌两个FabZ同源蛋白在细菌不饱和脂肪酸合成代谢中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和培养基

本研究所用的大肠杆菌菌株有MG1655、DH5α、BL21(DE3)、CY57*fabA*(Ts)<sup>[24]</sup>和HW7(*fabZ::kan*)<sup>[10]</sup>, 乳酸乳球菌菌株为*L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (wild-type)。使用的质粒有pMD19-T、pSU18、pBluescript II SK(+)和pET28(b), 其他载

体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建见1.2)。LB用作培养大肠杆菌的丰富培养基, RB作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基。AC液体培养基: 10 g/L Trypton, 10 g/L Yeast Extract, 5.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g/L 葡萄糖。常用试剂和抗生素的使用浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素, 30 mg/L 卡那霉素, 30 mg/L 氯霉素, L-阿拉伯糖(Ara) 0.02%, 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG) 1 mmol/L, 0.1 mg/L 三氯生<sup>[25-26]</sup>(Triclosan, TCL)。

#### 1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4连接酶、Taq酶、*pfu* DNA聚合酶、Marker DL2000、标准蛋白质等试剂、T-载体克隆、质粒提取和DNA凝胶回收等试剂盒均购自大连TaKaRa公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素等购自北京鼎国公司; IPTG、三氯生、各种脂肪酸等试剂购自Sigma公司。PCR扩增引物寡核苷酸由上海生工Sangon公司合成。

### 1.2 重组DNA技术

本研究使用的PCR引物见表1, 以乳酸乳球菌IL1403基因组DNA为模板, 使用*pfu* DNA聚合酶PCR扩增*LlfabZ1*和*LlfabZ2*基因。回收PCR扩增产物, 经Taq DNA聚合酶催化末端加尾后, 分别连接至pMD19-T载体, 并转化大肠杆菌DH5α。筛选阳性克隆, DNA序列测定验证T载体上携带的基因序列, 得到质粒pMJC1(*fabZ1*)和pMJC2(*fabZ2*)。使用*Nde* I和*Hind* III分别消化pMJC1(*fabZ1*)和pMJC2(*fabZ2*), 回收酶切产物并分别克隆到载体pBluescript II SK(+)上, 得到表达载体pMJC3(*fabZ1*)和pMJC4(*fabZ2*)。用同样的方法将*LlfabZ1*和*LlfabZ2*克隆到pSU18上得到表达载体pMJC5(*fabZ1*)和pMJC6(*fabZ2*), 再用相似的策略克隆到pET28(b)上得到表达载体pMJC7(*fabZ1*)和pMJC8(*fabZ2*)。

Table 1 Sequences of the PCR primers used in this work

| Primer name             | Primer sequence (5' to 3')   |
|-------------------------|------------------------------|
| T7 terminator           | GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG        |
| T7 promoter             | TAATACGACTCACTATAGGGG        |
| M13 forward             | CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC       |
| M13 reverse             | GAGCGGATAACAATTCACACAGG      |
| <i>LlfabZ1 Nde</i> I    | TAACATATGACTAAAAAATACGC      |
| <i>LlfabZ1 Hind</i> III | CAGAAGCTTCAATGCCACATTGC      |
| <i>LlfabZ2 Nde</i> I    | GAACATATGACTGAAGTAAACATTAATG |
| <i>LlfabZ2 Hind</i> III | GAAAAGCTTACGCCCTAAGGCAAAAG   |

### 1.3 遗传互补分析与无细胞抽提物检测

将构建好的 pMJC3、pMJC4, 以及实验室保存的 pBlue-EcfabA 和 pBluescript II SK(+)空载体分别转化进大肠杆菌的 *fabA* 温度敏感突变株 CY57 中, 涂布于 LB 培养基平板(含氨苄青霉素)上, 30℃ 静置培养过夜, 筛选转化子, 将转化子分别划线转接在 RB 培养基(含氨苄青霉素, IPTG)上, 并于 30℃ 和 42℃ 培养过夜, 观察细菌生长情况。

无细胞抽提物的制备参照文献[23], 并且体外合成了 3- 羟基酯酰 ACP. 检测方法如下: 反应体积为 40  $\mu$ l, 羟酯酰 ACP 30  $\mu$ l, 无细胞抽提物 45  $\mu$ g, 5 mmol/L NADPH 1  $\mu$ l, 5 mmol/L NADH 1  $\mu$ l, 2 mol/L LiCl 2  $\mu$ l; 三氯生根据需要添加 4  $\mu$ l, 预先加入管中, 吹干, 如体积不够 40  $\mu$ l 则补加 0.1 mol/L 磷酸缓冲液到足量. 37℃ 反应 20 min. 用含 2 mol/L 尿素的 17.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 1.4 *fabZ1* 和 *fabZ2* 蛋白表达与分离纯化

将表达载体质粒 pMJC7 (*fabZ1*) 和 pMJC8 (*fabZ2*) 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 乳酸乳球菌 LIFabZ1 和 LIFabZ2 蛋白质的表达和分离纯化参照文献进行<sup>[27]</sup>. 同时参照文献的方法, 分别分离纯化大肠杆菌 3- 酮基酯酰 ACP 合成酶 I (FabB)、3- 酮基酯酰 ACP 还原酶 (FabG)、3- 羟基酯酰 ACP 脱水酶 (FabZ)、3- 羟基酯酰 ACP 脱水 / 异构酶 (FabA)、烯酯酰 ACP 还原酶 (FabI)、哈氏弧菌酯酰 ACP 合成酶 (AasS) 和大肠杆菌 holo-ACP 蛋白, 并且体外合成了丙二酸单酰 ACP (Mal-ACP)、辛酯酰 ACP、癸酯酰 ACP、3- 羟基癸酯酰 ACP、反 -2- 癸烯酯酰 ACP、月桂酯酰 ACP 和豆蔻酯酰 ACP。

### 1.5 *fabZ1* 和 *fabZ2* 体外功能检测

体外检测 LIFabZ1 和 LIFabZ2 是否具有 3-羟基酯酰 ACP 脱水异构酶的活性参照文献[28]. 检测脱水酶功能的具体做法如下: 反应体积 50  $\mu$ l, 其中含有 0.1 mol/L 磷酸钠、50  $\mu$ mol/L NADH、50  $\mu$ mol/L 3- 羟基癸酯酰 ACP、0.1  $\mu$ g FabI. 反应在添加 0.1  $\mu$ g 3- 羟基癸酯酰 ACP 脱水酶(乳酸乳球菌 LIFabZ1、LIFabZ2 或大肠杆菌 EcFabA、EcFabZ)后开始计时, 37℃ 保温 1 h. 用癸酯酰 ACP 和反 -2- 癸烯酯酰 ACP 作为对照, 使用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 2 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳分析反应产物. 检测异构酶活性的具体做法如下: 反应体积 50  $\mu$ l, 其中含有 0.1 mol/L 磷

酸钠、50  $\mu$ mol/L NADH、50  $\mu$ mol/L 3- 羟基癸酯酰 ACP、50  $\mu$ mol/L Mal-ACP、FabB 和 FabG 各 0.1  $\mu$ g. 反应在添加 0.1  $\mu$ g 3- 羟基癸酯酰 ACP 脱水酶(乳酸乳球菌 LIFabZ1、LIFabZ2 或大肠杆菌 EcFabA)后开始计时, 37℃ 保温 1 h. 用癸酯酰 ACP 和反 -2- 癸烯酯酰 ACP 作为对照, 使用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 2 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳分析反应产物。

### 1.6 *fabZ1* 和 *fabZ2* 酶活性测定

体外合成不同碳长的 3- 羟基酯酰 ACP, 在被 3- 羟基酯酰 ACP 脱水酶脱水后, 底物进一步被烯酯酰 ACP 还原酶在有 NADH 作为辅因子的条件下还原为饱和的酯酰 ACP, 通过测定辅因子 NADH 的消耗来间接测定 3- 羟基酯酰 ACP 脱水酶的活性<sup>[27]</sup>. 具体的反应体系如下: 50  $\mu$ mol/L 3- 羟基酯酰 ACP、50  $\mu$ mol/L NADH、0.1 mol/L 磷酸钠、EcFabI 2  $\mu$ g、3- 羟基酯酰 ACP 脱水酶 2  $\mu$ g。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

乳酸乳球菌 IL1403 的全基因组测序已经完成, 利用大肠杆菌 3- 羟基酯酰 ACP 脱水酶 (EcFabZ) 蛋白序列, 同源比对乳酸乳球菌 IL1403 基因组, 结果发现, LIFabZ1 与 EcFabZ 同源性为 41%, LIFabZ2 与 EcFabZ 同源性为 45.1%, 且都具有 3- 羟基酯酰 ACP 脱水酶两个保守的  $\alpha$  螺旋结构(图 1a)。

在粪肠球菌基因组中同样缺乏 *fabA* 和 *fabB* 的同源基因, 但已经证明粪肠球菌的 *fabO* 基因编码 3- 酮基酯酰 ACP 合成酶, 具有大肠杆菌 FabB 和 FabF 的双重活性, 而 *fabN* 编码 3- 羟基酯酰 ACP 脱水 / 异构酶, 具有 FabA 类似的活性<sup>[9]</sup>. 另外, 研究表明, 乳酸乳球菌的 FabF 也具有大肠杆菌 FabB 和 FabF 的双重活性<sup>[21]</sup>, 因此, 将乳酸乳球菌 FabZ1 和 FabZ2 与粪肠球菌的 FabN 和 FabZ 进行了同源对比. 结果显示 LIFabZ1 与 EnFabN 相似性为 69.9%, 与 EnFabZ 的同源性为 55%, 而 LIFabZ2 与 EnFabN 相似性为 45.4%, 与 EnFabZ 的相似性为 49.3%(图 1b). 根据上述分析, 我们推测 LIFabZ1 和 LIFabZ2 很可能具有与 EnFabN 和 EnFabZ 类似的功能, 即其中一个具有 3- 羟基酯酰 ACP 脱水 / 异构酶双重活性. 为了验证这一观点, 本课题组对乳酸乳球菌 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 基因做了以下研究。

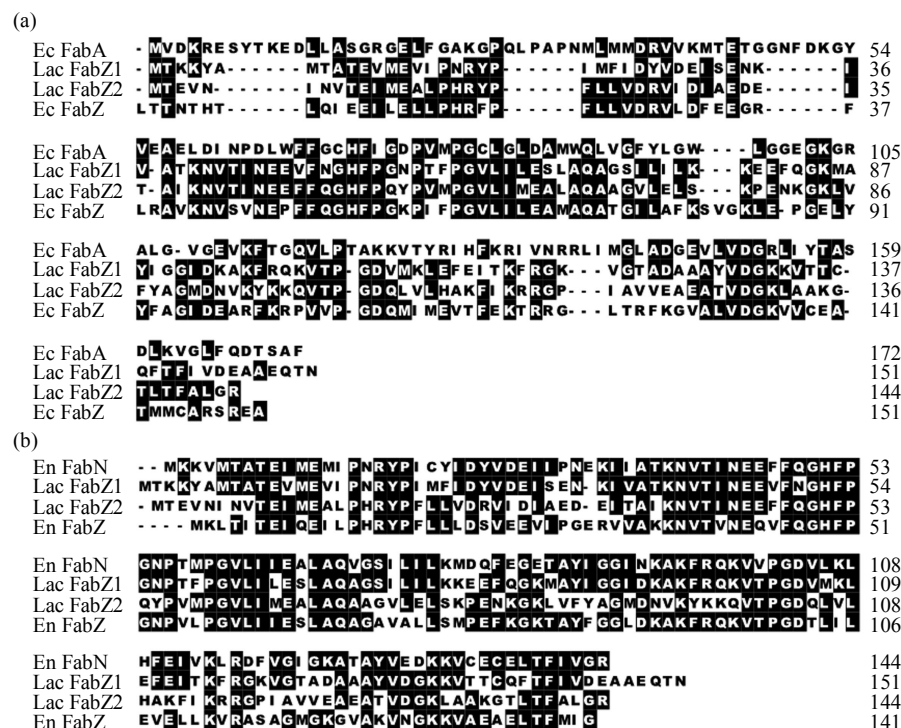


Fig. 1 The alignment of bacteria FabA, FabN and FabZ proteins

(a) Alignments of *Lactococcus lactis* FabZ1 and FabZ2 with their homologues EcFabA and EcFabZ from *E. coli* are shown. Identical residues are indicated by white letters. (b) Alignments of *L. lactis* FabZ1 and FabZ2 with their homologues EnFabN and EnFabZ from *Enterococcus faecalis* are shown.

## 2.2 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 遗传互补大肠杆菌突变菌株

在大肠杆菌中, FabA(3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶)和 FabZ(3- 羟脂酰 ACP 脱水酶)是参与脂肪酸合成的两个关键酶, 已经证明 *fabA* 和 *fabZ* 基因是大肠杆菌生长必需基因。为了研究乳酸乳球菌 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 基因的功能, 课题组用 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 分别异体遗传互补了大肠杆菌的 *fabA* 和 *fabZ* 两个突变菌株, 分析这两个基因是否具有类似大肠杆菌 *fabA* 或 *fabZ* 的功能。CY57 是大肠杆菌 *fabA* 的温度敏感突变株, 在 30℃ 正常生长, 在 42℃ 时, 由于 *fabA* 基因失去活性, 不饱和脂肪酸合成受阻, 不能正常生长。HW7 是大肠杆菌 *fabZ* 的条件突变菌株, 其染色体上的 *fabZ* 被卡那霉素抗性基因 (*kan*) 替换, 而缺失 FabZ 的功能由 pBAD24 质粒携带的丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 的 *fabZ* 基因提供, 但该基因的表达受外源添加阿拉伯糖的诱导<sup>[10]</sup>, 因此, 在无阿拉伯糖的条件下, 突变株是不能生长的。首先以乳酸乳

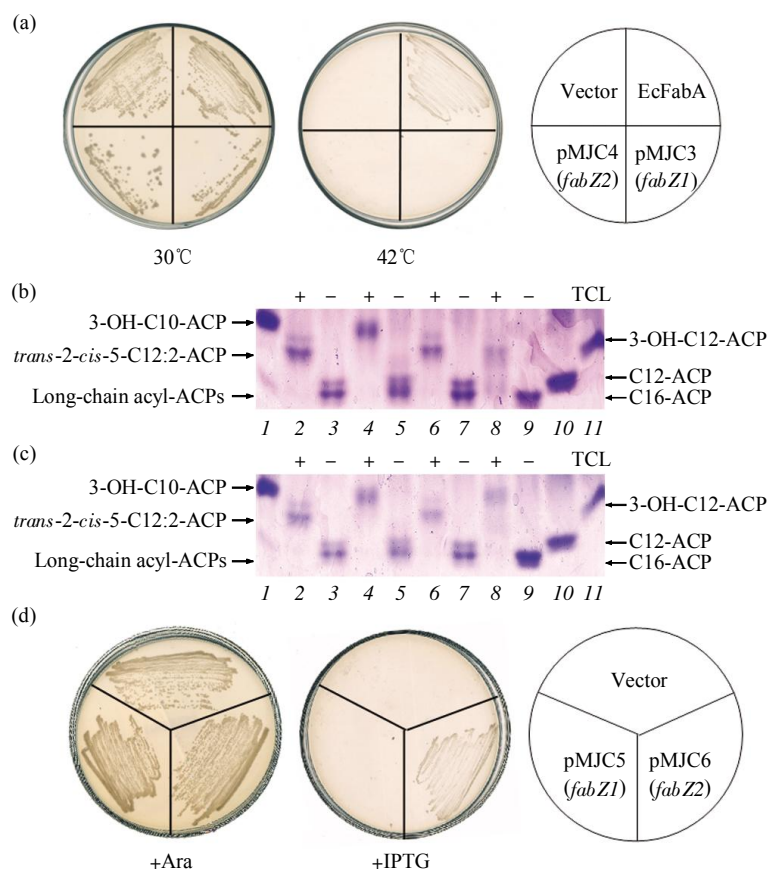
球菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得这两个基因, 并将这两个基因分别克隆到受外源 IPTG 诱导的质粒载体 pBluescript II SK(+)和质粒载体 pSU18 上, 分别得到 pMJC3(*fabZ1*)和 pMJC4(*fabZ2*)以及 pMJC5(*fabZ1*)和 pMJC6(*fabZ2*)。

将 pMJC3(*fabZ1*)和 pMJC4(*fabZ2*)转化大肠杆菌温敏突变株 CY57, 在不同培养温度下检查各转化子的生长情况。结果显示, 在 42℃ 含有 IPTG 的 RB 平板上, 只有携带有 *EcfabA* 的菌株能够生长, 转化 pBluescript II SK(+), pMJC3(*fabZ1*)和 pMJC4(*fabZ2*)的菌株均不生长(图 2a), 这表明 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 不能遗传互补 CY57 的生长表型。无生长表型并不能排除 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 编码的蛋白不具有与大肠杆菌 FabA 类似的功能。为了进一步验证 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 是否有大肠杆菌 FabA 的功能, 课题组制备了大肠杆菌 CY57 携带不同质粒的无细胞抽提物, 在体外分析了各种无细胞抽提物的 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶活性。反应混合物

包括 3- 羟基癸脂酰 ACP、holo-ACP、NADH、NADPH 和适量的无细胞抽提物, 并添加三氯生(抑制抽提物中的烯脂酰 ACP 还原酶 FabI 的活性<sup>[10,29-30]</sup>). 混合物 37℃ 保温 2 h 后, 使用 17.5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分离生成的蛋白质条带. 结果发现, CY57/pMJC3 (*fabZ1*) 泳道中出现了和大肠杆菌 MG1655 以及 CY57/pBlue-EcfabA (*EcfabA*) 相同的反 -2- 顺 -5- 月桂双烯脂酰 ACP 条带, 表明 LIFabZ1 具有 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水异构酶活性, 有与大肠杆菌 FabA 类似的功能, 但是比 EcFabA 弱(图 2b, 泳道 8). 而在 CY57/pMJC4(*fabZ2*)泳道中未出现相应的条带(图 2c, 泳道 8), 表明 LIFabZ2 不具大肠杆菌 FabA 的功能.

为了验证 FabZ1 和 FabZ2 是否具有类似大肠

杆菌 FabZ 的功能, 将 pMJC5 (*fabZ1*) 和 pMJC6 (*fabZ2*) 转化大肠杆菌 HW7, 30℃ 筛选转化子, 在不同培养条件下检查各转化子的生长情况. 携带有外源质粒的 HW7 系列菌株分别在含有阿拉伯糖和 IPTG 的平板上培养, 结果发现在加入阿拉伯糖诱导的条件下, 各菌株均能够生长. 在不添加阿拉伯糖, 但加入 IPTG 的条件下, 只有携带有 pMJC6 (*fabZ2*) 的转化子能够生长, 转化 pSU18 和 pMJC5 (*fabZ1*) 的菌株均不能够生长(图 2d). 这说明 *LlfabZ2* 能够互补大肠杆菌 *fabZ* 突变菌株, 可以替代大肠杆菌 *fabZ* 功能. 而携带 *fabZ1* 的菌株不能生长, 表明 *LlfabZ1* 不具有互补大肠杆菌 *fabZ* 突变菌株的功能.



**Fig. 2 Growth of transformants of *E. coli* mutants with plasmids carrying *L. lactis fabZ1* or *fabZ2* and products of *in vitro* synthesis of *E. coli* extracts containing *L. lactis fabZ1* or *fabZ2*, *E. coli fabA* or *fabZ***

(a) *E. coli* strains CY57 *fabA* (Ts) carrying the pBlue or pBlue-derived plasmid pMJC3 (*fabZ1*), pMJC4 (*fabZ2*) and pBlue-EcFabA were grown at 30°C and 42°C on RB medium containing IPTG. (b) *In vitro* fatty acid synthesis products of extracts of derivatives of *E. coli* strain CY57 *fabA* (Ts) carrying pMJC3 (*fabZ1*) with or without the presence of Triclosan (TCL). Extracts of the wild-type strain MG1655 and the mutant strain CY57 with pBlue or *E. coli fabA* were analyzed in parallel. Triclosan was added as shown. Lane 1, 3- hydroxydecanoyl-ACP; lanes 2 and 3, MG1655; lanes 4 and 5, CY57 with pBlue; lanes 6 and 7, CY57 with *E. coli fabA*; lanes 8 and 9, CY57 with *L. lactis fabZ1*; lane 10, dodecanoyl ACP; lane 11, 3-hydroxydodecanoyl-ACP. (c) *In vitro* fatty acid synthesis products of extracts of derivatives of *E. coli* strain CY57 *fabA* (Ts) carrying pMJC4 (*fabZ2*) with or without the presence of Triclosan. Lanes 8 and 9, CY57 with *L. lactis fabZ2*, other lanes are similar to be shown in (b). (d) *E. coli* strains HW7 carrying the pSU18 or pSU18-derived plasmid pMJC5 (*fabZ1*), pMJC6 (*fabZ2*) were grown at 30°C on RB medium containing arabinose or IPTG.

### 2.3 乳酸链球菌 FabZ1 和 FabZ2 的表达与纯化

为了在体外研究 LIFabZ1 和 LIFabZ2 的功能, 将 pMJC1 和 pMJC2 质粒上携带的 *LlfabZ1* 和 *LlfabZ2* 基因分别克隆到 pET28(b)质粒上, 构建了能在大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中高效表达的载体: pMJC7(*fabZ1*)和 pMJC8(*fabZ2*). 热激转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株, 在 37℃ 进行两个蛋白质的表达, 结果显示 LIFabZ1 和 LIFabZ2 在 BL21(DE3)菌株中均能高效表达, 且主要以可溶性形式存在(结果未列). 根据这一结果, 采用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析, 分别分离纯化了 N 端融合有 His-tag 标签的 LIFabZ1 和 LIFabZ2 蛋白. 经检测 FabZ1 和 FabZ2 蛋白在 15% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上均为单一条带(图 3), 分别为 16.8 ku 和 15.9 ku, 与推测的 FabZ1 和 FabZ2 蛋白的大小相符, 表明蛋白质纯化成功.

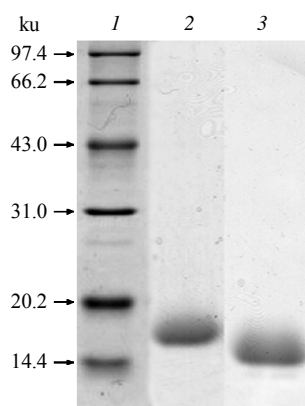


Fig. 3 Purification of *L. lactis* FabZ1 and FabZ2

Purification of *L. lactis* FabZ1 and FabZ2. Lane 1, Protein marker; Lane 2, LIFabZ1; Lane 3, LIFabZ2.

### 2.4 乳酸链球菌 FabZ1 和 FabZ2 的体外活性检测

体外重建大肠杆菌脂肪酸合成体系, 通过分析合成产物来研究相关酶蛋白的活性是细菌脂肪酸合成代谢常用的技术手段, 为此课题组采用类似的技术分析了 LIFabZ1 和 LIFabZ2 的酶活性.

首先检测了 LIFabZ1 和 LIFabZ2 是否具有 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水酶的活性. 以 3- 羟基癸脂酰 ACP 为底物, 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶催化脱水生成反-2- 烯脂酰 ACP, 然后 FabI 将反-2- 烯脂酰 ACP 还原成癸脂酰 ACP, 由于脂酰 ACP 和羟脂酰 ACP 的

构象不同, 在非变性蛋白质凝胶电泳时因迁移速率不同而呈现不同的条带, 以此来检测脱水酶的活性. 结果显示: 加入大肠杆菌 FabA(图 4a 和 b, 泳道 5)和大肠杆菌 FabZ(图 4a 和 b, 泳道 3)均能将 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水生成反-2- 烯脂酰 ACP 并在 FabI 的作用下进一步还原生成癸脂酰 ACP; 加入 LIFabZ1(图 4a, 泳道 1)和 LIFabZ2(图 4b, 泳道 1)的反应也有癸脂酰 ACP 的生成. 这表明 LIFabZ1 和 LIFabZ2 与 EcFabA/FabZ 一样具有脱水酶活性, 能够在体外蛋白质反应中催化 3- 羟基脂酰 ACP 脱水生成反-2- 烯脂酰 ACP.

用相似的策略检测了 LIFabZ1 和 LIFabZ2 是否具有异构酶的活性. 我们以 3- 羟基癸脂酰 ACP 为底物, 首先 FabA 能使 3- 羟基癸脂酰 ACP 脱水, 形成反-2- 烯脂酰 ACP, 同时能将饱和双键异构化, 生成顺-3- 烯脂酰 ACP, 接着 FabB 聚合顺-3- 烯脂酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP, 产生 3- 酮基-5- 顺式月桂烯脂酰 ACP, FabG 将此产物还原, 生成 3- 羟基-5- 顺式月桂烯脂酰 ACP. 从图 4c 的结果看出: LIFabZ1 和大肠杆菌的 EcFabA 一样能催化反-2- 烯脂酰 ACP 异构生成顺-3- 烯脂酰 ACP, 在反应体系中继续添加 Mal-ACP、EcFabB 和 EcFabG 后, 顺-3- 烯脂酰 ACP 能生成延长 2 个碳原子的 3- 羟基顺-5- 月桂烯脂酰 ACP, 该产物进一步被 EcFabA 或 LIFabZ1 脱水生成反-2- 顺-5- 月桂二烯脂酰 ACP<sup>[10]</sup> (图 4c, 泳道 3 和 5). 即 LIFabZ1 具有顺-3- 烯脂酰 ACP 异构酶活性, 能够将反-2- 烯脂酰 ACP 异构化成顺-3- 烯脂酰 ACP, 作为 FabB 的底物参与到不饱和脂肪酸链的延伸反应中去. 而 LIFabZ2 和 EcFabZ 则不能生成 3- 羟基顺-5- 月桂烯脂酰 ACP (图 4c, 泳道 7 和 9), 即 LIFabZ2 不具有顺-3- 烯脂酰 ACP 异构酶活性.

### 2.5 乳酸链球菌 FabZ1 和 FabZ2 酶活性测定

由于 *fabZ1* 和 *fabZ2* 都不能在体内互补大肠杆菌 CY57 突变株, 只有 *fabZ2* 能互补 HW7 突变株, 而体外反应检测到 FabZ1 具有脱水 / 异构酶活性, FabZ2 具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 为检测是否 FabZ1 的脱水酶活性太弱导致不能互补 CY57 和 HW7 突变株, 故进一步测定了 FabZ1 和 FabZ2 酶活性. 酶活性检测如方法部分所述, 以纯化后的不同链长的羟脂酰 ACP 为底物检测, 添加相应的辅因子, 在 340 nm 条件下测定, 酶活测定结果如图 5 所示. FabZ1 对各种底物链长的 3- 羟基脂酰 ACP 均表现出较弱的活性: 3- 羟基辛酰 ACP,

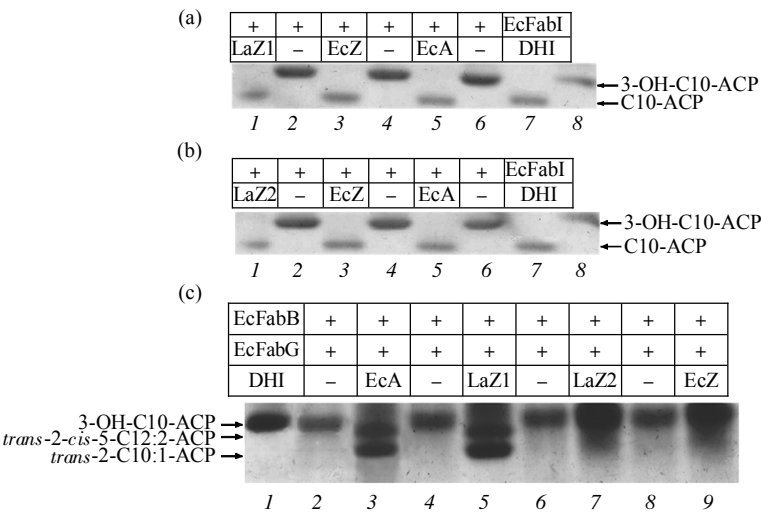


Fig. 4 Enzymatic characterization of *L. lactis* FabZ1 or FabZ2 in fatty acid biosynthesis

(a) Assay of *L. lactis* FabZ1 dehydratase activities *in vitro*. Fatty acid biosynthesis was reconstructed by the sequential addition of each purified enzyme to a reaction mixture containing EcFabI, NADH and 3-hydroxydecanoyl-ACP. Completion of the acyl-ACP synthesis reaction was determined by conformationally sensitive gel electrophoresis. The migration positions of decanoyl-ACP and 3-hydroxydecanoyl-ACP on gel are shown (lane 7 and 8). Lane 1, LIFabZ1; lane 3, EcFabZ; lane 5, EcFabA. DHI, dehydratase and isomerase. (b) Assay of *L. lactis* FabZ2 dehydratase activities *in vitro*. Lane 1, LIFabZ2; lane 3, EcFabZ; lane 5, EcFabA. (c) Assay of *L. lactis* FabZ1 or FabZ2 isomerase activities *in vitro*. Fatty acid biosynthesis was reconstructed by the sequential addition of each purified enzyme to a reaction mixture containing EcFabB, EcFabG, NADPH, Malonyl-CoA and 3-hydroxydecanoyl-ACP. Lane 1, 3-hydroxydecanoyl-ACP; lane 3, EcFabA; lane 5, LIFabZ1; lane 7, LIFabZ2; lane 9, EcFabZ.

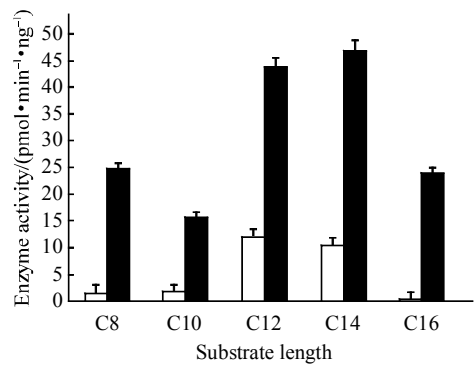


Fig. 5 Enzyme activities of *L. lactis* FabZ1 or FabZ2 with different substrates

Enzyme activities of *L. lactis* FabZ1 or *L. lactis* FabZ2. C8, 3-hydroxyoctanoyl-ACP; C10, 3-hydroxydecanoyl-ACP; C12, 3-hydroxydodecanoyl-ACP; C14, 3-hydroxytetradecanoyl-ACP; C16, 3-hydroxyhexadecanoyl-ACP. □: FabZ1; ■: FabZ2.

1.4 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 癸 酰 ACP, 1.8 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 月 桂 酰 ACP, 11.9 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 十 四 碳 酰 基 ACP, 10.4 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 十 六 碳 酰 基 ACP,

0.5 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>. FabZ2 则表现出较高的活性: 3- 羟基 辛 酰 ACP, 24.8 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 癸 酰 ACP, 15.8 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 月 桂 酰 ACP, 44.0 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 十 四 碳 酰 基 ACP, 46.8 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>, 3- 羟基 十 六 碳 酰 基 ACP, 24.1 pmol ·min<sup>-1</sup> ·ng<sup>-1</sup>. 这有可能就是 *fabZ1* 不能互补大肠杆菌 *fabA* 温度敏感突变株 CY57 和 HW7 突变株的原因. 而 FabZ2 具有较高活性, 所以能够互补大肠杆菌 *fabZ* 缺失突变株 HW7.

### 3 讨 论

生物信息学分析表明, 在乳酸乳球菌基因组中, 编码脂肪酸合成酶系的基因集中在两个基因簇 (图 6). 其中 *fabZ1* 基因位于含有 2 个脂肪酸合成酶的基因簇中, 而 *fabZ2* 所在的基因簇则由 11 个基因组成. 生物信息学分析表明, 虽然这两个基因簇中的基因在大肠杆菌基因组中均有同源基因<sup>[3]</sup>, 但是这两个基因簇中没有不饱和脂肪酸合成的关键基因 *fabB* 和 *fabA* 的同源基因, 说明乳酸乳球菌的不饱和脂肪酸合成不同于大肠杆菌的 FabA-FabB 途径. 以往的研究证明该菌的 FabF 具有大肠杆菌 FabB 和 FabF 的双重功能, 是参与不饱和脂肪酸合



成的关键酶之一<sup>[21]</sup>, 然而 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶并未得到鉴定. 将乳酸乳球菌 LIFabZ1 和 FabZ2 与粪肠球菌的 FabN 和 FabZ 进行同源对比发现 LIFabZ1 与 EnFabN 相似性为 69.9%, 与 EnFabZ 的同源性为 55%, 而 LIFabZ2 与 EnFabN 相似性为 45.4%, 与 EnFabZ 的相似性为 49.3%(图 1).

因此, 我们推测乳酸乳球菌的 LIFabZ1 与 EnFabN 功能类似, 具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶活性, 而 LIFabZ2 与 EnFabZ 相同, 仅具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶活性. 本课题组通过遗传互补、体外酶学分析等研究证明了上述推测是正确的.

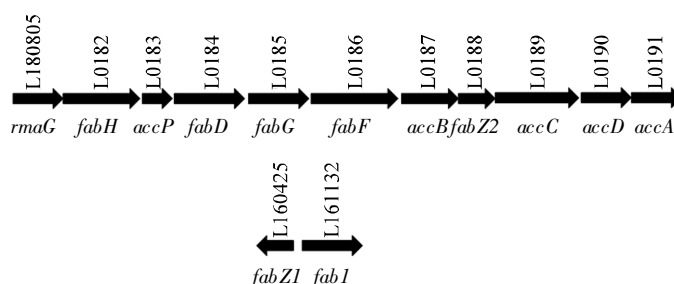


Fig. 6 The *L. lactis* fatty acid biosynthetic gene clusters

采用遗传互补, 恢复突变菌株的生长表型是鉴定未知功能基因常用的技术手段. 因此, 在鉴定 LIFabZ1 或 LIFabZ2 是否具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶活性时, 本课题组首先使用遗传互补技术, 检测乳酸乳球菌 *fabZ* 同源基因能否恢复大肠杆菌 *fabA* 温敏突变株 CY57 的生长表型. 实验结果显示乳酸乳球菌的 *fabZ1* 和 *fabZ2* 均不能互补 CY57 的生长(图 2). 尽管乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 都不能互补大肠杆菌突变株 CY57, 我们不能排除乳酸乳球菌 FabZ1 和 FabZ2 参与了不饱和脂肪酸的合成. 为此制备了携带 *fabZ1* 和 *fabZ2* 基因的 CY57 的无细胞提取物, 并通过非变性凝胶电泳分析了这些抽提物的 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶活性, 结果显示仅有携带 *fabZ1* 基因的 CY57 无细胞抽提物具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶活性, 这表明 *fabZ1* 基因的编码产物的确具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水异构酶活性. 这一结果也被后来的体外研究证实(图 4). 上述结果说明不能生长互补, 但不能排除未知基因产物不具有应有的生理功能, 仍需进一步的生化互补分析. 不能生长互补的可能原因是在突变菌株中未知基因产物的活性较低或与寄主的底物适应性较差(特别是在异源突变菌株中), 不足以产生足够的产物维持突变菌株的生长<sup>[10, 32]</sup>.

虽然 LIFabZ1 也具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 但是遗传互补大肠杆菌 HW7 时, *fabZ1* 基因

却不能使其恢复生长表型, 造成这一现象的主要原因是 LIFabZ1 与大肠杆菌 FabZ 是两种不同性质的酶, EcFabZ 仅具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 而 LIFabZ1 具有 3- 羟基脂酰 ACP 脱水和异构双重酶活性. 另外, 本课题组比较了 LIFabZ1 和 LIFabZ2 对不同链长底物的 3- 羟基脂酰 ACP 脱水酶活性, 发现 LIFabZ1 对不同链长底物活性均比 LIFabZ2 低(图 5), 这也可能是 *fabZ1* 不能互补 HW7 的另一原因.

本课题组从异体遗传互补和体外脂肪酸合成体系重建对乳酸乳球菌 *fabZ1* 和 *fabZ2* 基因的功能做了初步的探讨, 为了进一步研究这两个基因的生理功能, 最好的策略是采用基因敲除获得突变菌株和回复菌株, 比较突变菌株的生理特性来确定其功能. 本课题组利用同源重组方法试图获得 *fabZ1* 和 *fabZ2* 的插入突变菌株, 但经过多次筛选均未成功, 推测 *fabZ1* 和 *fabZ2* 是乳酸乳球菌的必需基因, 具有敲除致死性. 为了验证这一推测, 本课题组正在筛选其条件突变株, 相关实验数据将另行发表.

## 参 考 文 献

- [1] Goldfine H, Bloch K. On the origin of unsaturated fatty acids in clostridia. J Biol Chem, 1961, **236**(10): 2596-2601
- [2] Scheuerbrandt G, Goldfine H, Baronowsky P E, et al. A novel mechanism for the biosynthesis of unsaturated fatty acids. J Biol Chem, 1961, **236**(10): PC70-PC71
- [3] Gelmann E P, Cronan J E, Jr. Mutant of *Escherichia coli* deficient



- in the synthesis of *cis*-vaccenic acid. J Bacteriol, 1972, **112**(1): 381-387
- [4] Garwin J L, Klages A L, Cronan J E, Jr. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. J Biol Chem, 1980, **255**(8): 3263-3265
- [5] Heath R J, Rock C O. Roles of the FabA and FabZ beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. J Biol Chem, 1996, **271**(44): 27795-27801
- [6] Campbell J W, Cronan J E, Jr. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. Annu Rev Microbiol, 2001, **55**: 305-332
- [7] Hoang T T, Schweizer H P. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the fabAB operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). J Bacteriol, 1997, **179**(17): 5326-5332
- [8] Lu Y J, Zhang Y M, Rock C O. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. Biochem Cell Biol, 2004, **82**(1): 145-155
- [9] Marrakchi H, Choi K H, Rock C O. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2002, **277**(47): 44809-44816
- [10] Wang H., J. E. Cronan. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues. J Biol Chem, 2004, **279**(33): 34489-34495
- [11] Lu Y J, White S W, Rock C O. Domain swapping between *Enterococcus faecalis* FabN and FabZ proteins localizes the structural determinants for isomerase activity. J Biol Chem, 2005, **280**(34): 30342-30348
- [12] Aguilar Pablo S, John E Cronan, Diego De Mendoza. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J Bacteriology, 1998, **180**(8): 2194-2200
- [13] Zhu K, Choi K H, Schweizer H P, et al. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 2006, **60**(2): 260-273
- [14] Alvarez-Olmos Martha I, Richard A. Oberhelman. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. Clinical Infectious Diseases, 2001, **32**(11): 1567-1576
- [15] Matsuzaki Takeshi, James Chin. Modulating immune responses with probiotic bacteria. Immunology and Cell Biology, 2000, **78**(1): 67-73
- [16] Kleerebezem M, Boels I C, Groot M N, et al. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. J Biotechnol, 2002, **98**(2): 199-213
- [17] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, **68**(6): 705-717
- [18] Mierau I, Leij P, Van Swam I, et al. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. Microbial Cell Factories, 2005, **4**(1): 15
- [19] Kuiper Harry A, Kleter G A, Noteborn H P J M, et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. The Plant Journal, 2001, **27**(6): 503-528
- [20] Bolotin Alexander, Patrick Wincker, Stéphane Mauger, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Research, 2001, **11**(5): 731-753
- [21] Morgan-Kiss R M, Cronan J E. The *Lactococcus lactis* FabF fatty acid synthetic enzyme can functionally replace both the FabB and FabF proteins of *Escherichia coli* and the FabH protein of *Lactococcus lactis*. Arch Microbiol, 2008, **190**(4): 427-437
- [22] Lai C Y, Cronan J E. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for bacterial fatty acid synthesis. J Biol Chem, 2003, **278**(51): 51494-51503
- [23] Wang H, Cronan J E. Only one of the two annotated *Lactococcus lactis* fabG genes encodes a functional beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase. Biochemistry, 2004, **43**(37): 11782-11789
- [24] Cronan J E Jr, Ray T K, Vagelos P R. Selection and characterization of an *E. coli* mutant defective in membrane lipid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1970, **65**(3): 737-744
- [25] Heath R J, Rubin J R, Holland D R, et al. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. J Biol Chem, 1999, **274**(16): 11110-11114
- [26] Hoang T T, Schweizer H P. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. J Bacteriol, 1999, **181**(17): 5489-5497
- [27] Zhu L, Lin J, Ma J, et al. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. Antimicrob Agents Chemother, 2010, **54**(2): 689-698
- [28] Cheng J, Ma J, Lin J, et al. Only one of the five *Ralstonia solanacearum* long-chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase homologues functions in fatty acid synthesis. Applied and Environmental Microbiology, 2012, **78**(5): 1563-1573
- [29] 胡喆, 马金成, 蒋晶晶, 等. 苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因功能的鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2013, **40**(11): 1148-1159
- Hu Z, Ma J C, Jiang J J, et al. Prog Biochem Biophys, 2013, **40**(11): 1148-1159
- [30] Marrakchi H, Choi K H, Rock C O. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2002, **277**(47): 44809-44816
- [31] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res, 2001, **11**(5): 731-753
- [32] Massengo-Tiasse R P, Cronan J E. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. Cell Mol Life Sci, 2009, **66**(9): 1507-1517

## Identification and Function Research of *fabZ1* and *fabZ2* of *Lactococcus lactis*\*

MA Jin-Cheng, LUO Biao, HU Zhe, WANG Hai-Hong\*\*

(College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of  
Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, Guangzhou 510642, China)

**Abstract** *E. coli* is well studied in fatty acid synthesis II. FabA, a bifunctional enzyme, is the key enzyme of the classic anaerobic pathway of unsaturated fatty acid synthesis. Sequence alignments indicated that *Lactococcus lactis* lacks homologues of *E. coli* FabA, however it owns two homologues of *E. coli* FabZ, *LlfabZ1* and *LlfabZ2*. LIFabZ1 and LIFabZ2 are 41% and 45.1% identical to *E. coli* FabZ, respectively. Further analysis showed that the conservative active-site in *E. coli* FabZ is also found in LIFabZ1 and LIFabZ2. Although the genetic complementary revealed that *LlfabZ1* and *LlfabZ2* were not able to restore the growth and the fatty acid synthesis of the *E. coli* temperature sensitive mutant CY57 at nonpermissive temperature, cell-free extract data showed LIFabZ1 was able to catalyze the isomerization of the trans-2-double bond to the cis-3 species. Moreover, *LlfabZ2* was able to complement the *EcfabZ* knock out mutant HW7. *In vitro* assay identified that LIFabZ1 was able to introduce the cis double bond into a 10-carbon intermediate, and LIFabZ2 was able to dehydrated 3-hydroxyacyl-ACP to trans-2-decenoyl-ACP. However, we also attempted to inactivate the *fabZ1* and *fabZ2* genes by allelic replacement but none of the *fabZ1* and *fabZ2* deletion mutant was obtained, and it seemed likely that *fabZ1* and *fabZ2* are essential genes in *L. lactis*. These results demonstrated that LIFabZ1 and LIFabZ2 are key enzymes in fatty acid synthesis in *L. lactis*.

**Key words** *Lactococcus lactis*, bacterial fatty acid synthesis, 3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase/isomerase, 3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2014.00025

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31200028), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20104404110005) and Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong (LYM10038).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-20-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

Received: December 22, 2013 Accepted: May 5, 2014