

E. coli M15 (pQTPL) 高效发酵生产酪氨酸酚裂解酶的控制策略

时 优¹, 刘立明¹, 段作营¹, 李华钟^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学医学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 在摇瓶和 4 L 发酵罐上研究了营养和环境条件对重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 分批发酵生产酪氨酸酚裂解酶 (TPL) 的影响. 在培养基中添加 20 g/L 葡萄糖和 1.0 g/L 玉米浆使 TPL 酶活提高到 63.1 U/g (干重). 在此基础上, 维持发酵液中溶氧水平为 30%, 可使菌体浓度在 8 h 达到 4.78 g/L, 酶活为 54.6 U/g, 比对照组 (不控制溶氧) 分别提高了 21% 和 31.6%. 采用溶氧反馈调节-限制性补料策略, 可使菌体浓度提高到 31.5 g/L. 采用两阶段温度和 pH 控制策略, 在发酵前 8 h 控制 pH 7.0、温度 37 °C, 8 h 至发酵结束之间控制 pH 为 8.0、温度为 30 °C, 可使重组菌的 TPL 酶活达到 154.4 U/g, 并使 TPL 在细胞中过量表达, 实现了高菌体浓度和高 TPL 酶活的统一.

关键词: *E. coli* M15 (pQTPL); 酪氨酸酚裂解酶; 高效生产

中图分类号: Q925

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2007)05-0999-05

1 前 言

左旋多巴(3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine, L-DOPA) 是生物体内一种重要的生物活性物质, 它是从 L-酪氨酸到儿茶酚或黑色素的生化代谢途径过程中的重要中间产物, 目前仍是治疗帕金森氏病(Parkinson's disease)的首选药物^[1,2]. 据报道, 目前全世界年产量约 300 t, 随着全球老龄化人口的增加, L-DOPA 的需求量将会日益增大. L-DOPA 主要由微生物酶法合成, 即以邻苯二酚、丙酮酸和氨为底物, 磷酸吡哆醛(Pyridoxal Phosphate, PLP)为辅酶, 在酪氨酸酚裂解酶(Tyrosine Phenol Lyase, TPL, E.C. 4.1.99.2)的作用下催化合成^[3,4]. 作为合成 L-DOPA 的关键酶, TPL 的氨基酸组成、酶学性质、酶的立体结构及其编码基因序列已有较深入的研究^[5,6]. 近年来, 一些研究者采用基因工程手段将 TPL 的基因片段克隆到不同宿主中使其表达^[7,8], Foor 等^[8]利用重组菌获得 105 mmol/L (20.7 g/L) 的 L-DOPA 产量, 但目前尚未见关于重组菌 TPL 酶法生物合成 L-DOPA 工业化的报道.

本研究室在前期研究中成功地构建了过量表达 TPL 的重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL)^[9], 但由于重组菌体浓度较低^[10], 导致生产成本过高, 限制了 L-DOPA 酶法生产的工业化进程.

本研究在对重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 的生理代谢特性进行分析的基础上, 采用单因素实验研究了葡萄糖浓度和氮源种类及浓度对产酶的影响, 同时研究了溶氧、温度和 pH 等环境条件对重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 发酵生产 TPL 的影响, 在此基础上提出了重组菌 *E. coli*

M15 (pQTPL) 高效生产 TPL 的控制模式, 实现了高菌体浓度和高 TPL 酶活的相对统一.

2 材料与 方法

2.1 菌种与试剂

菌种 *E. coli* M15(pQTPL) 由本研究室构建和保藏.

化学试剂: 磷酸吡哆醛、乳酸脱氢酶均为 Sigma 公司产品, NADH 为 Amresco 公司产品, 氨苄青霉素为华美生物工程公司产品, 其他试剂均为国产分析纯.

2.2 培养基

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 氨苄青霉素(Amp) 100 μg/mL, pH 7.0.

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, (NH₄)₂SO₄ 3, 蛋白胨 1, KH₂PO₄ 12.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, 柠檬酸 1.5, 乳糖 2.3, 微量元素母液 5 mL/L, pH 7.0.

流加培养基(g/L): 葡萄糖 500, (NH₄)₂SO₄ 35, 蛋白胨 15. 总补料体积为 200 mL.

2.3 摇瓶与发酵罐培养

2.3.1 摇瓶发酵

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(20 mL/250 mL 锥形瓶), 同时添加 100 μg/mL Amp 和 50 μg/mL 卡那霉素(Kana), 37 °C 下 150 r/min 摇瓶培养 12 h.

2.3.2 发酵罐发酵

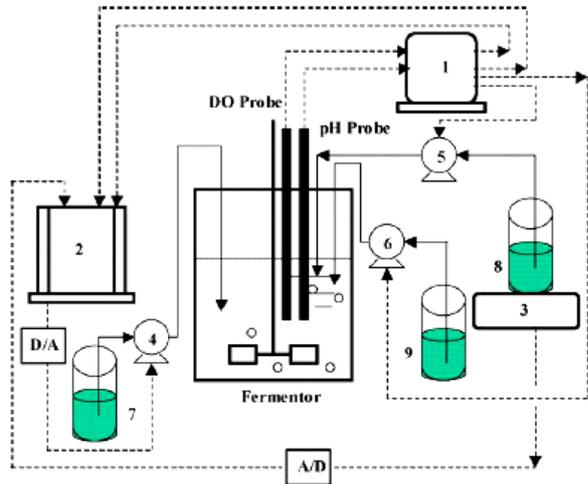
从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(50 mL/250 mL 锥形瓶), 同时添加 100 μg/mL Amp 和 50 μg/mL Kana, 37 °C 下 50 r/min 摇瓶培养 8 h 后, 以 5%(φ)接种量接入发酵培养基. 3.7 L 发酵罐(Benchtop KLF2000, 瑞

收稿日期: 2006-12-25, 修回日期: 2007-03-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2006AA02Z153)

作者简介: 时优(1982-), 女, 江苏省无锡市人, 硕士研究生, 微生物专业; 李华钟, 通讯联系人, Tel/Fax: 0510-85876906, E-mail: hzhli@sytu.edu.cn.

士)中发酵培养基体积为 2 L, 温度为 37℃, 用 4 mol/L NaOH 控制 pH 恒定在 7.0 左右. 流加发酵初始葡萄糖为 10 g/L. 发酵罐中溶氧(DO)水平恒定为 30%, 当溶氧降至 30% 以下时, 搅拌转速每 30 s 提高 10 r/min 以增大溶氧; 若溶氧超过 30%, 搅拌转速每 30 s 降低 10 r/min



1. Fermentor controller
2. Central PC for physiological state recognition and adaptive control
3. Electronic balance
4. Main feeding pump
5. Assistant feeding pump
6. pH adjusting pump
- 7,8. Glucose feeding reservoirs
9. Base reservoir

图1 发酵罐培养系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of the fed-batch cultivation control system

以降低溶氧. 最高转速和最低转速分别为 900 和 400 r/min. 采用溶氧反馈调节-限制性补料策略进行流加发酵, 葡萄糖及氮源流加的时间范围为 4.5~10.5 h. 当发酵液中 DO>30% 时, 开始向发酵培养基中流加 500 g/L 葡萄糖浓缩液, 直至 DO<30%. 发酵罐培养系统如图 1 所示.

2.4 检测方法

细胞干重(Dry Cell Weight, DCW)测定方法参见文献[11]. 葡萄糖浓度的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法.

酶活测定: 取 2 mL 菌液离心、洗涤、收集细胞, 磷酸钾缓冲液重悬细胞, 超声波破碎后于 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于测定酶活^[7].

3 结果与讨论

3.1 初始葡萄糖浓度及其流加方式对产酶的影响

发酵培养基中初始葡萄糖浓度对菌体生长和产酶的影响如表 1 所示. 在葡萄糖浓度为 0~20 g/L 范围内, 重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 的菌体浓度和 TPL 酶活随着培养基中葡萄糖浓度的增加而增加, 当葡萄糖浓度为 20 g/L 时, 菌体浓度(3.96 g/L)和产酶水平(31.2 U/g)均达到最大值. 继续增加葡萄糖浓度(>20 g/L)则抑制了菌体生长和产酶水平的进一步提高.

表1 初糖浓度对重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 生长和产酶的影响

Table 1 Effect of initial glucose concentration on cell growth and TPL production

Initial glucose (g/L)	Residual glucose (g/L)			DCW (g/L)			TPL activity (U/g)		
	2 h	4 h	10 h	2 h	4 h	10 h	2 h	6 h	10 h
10	8.02	2.7	0.5	0.72	2.06	3.40	0	23.6	28.9
20	18.9	8.7	1.1	0.61	1.89	3.96	0	28.3	31.2
30	27.3	22.9	0.7	0.62	2.16	3.78	0	22.3	25.4

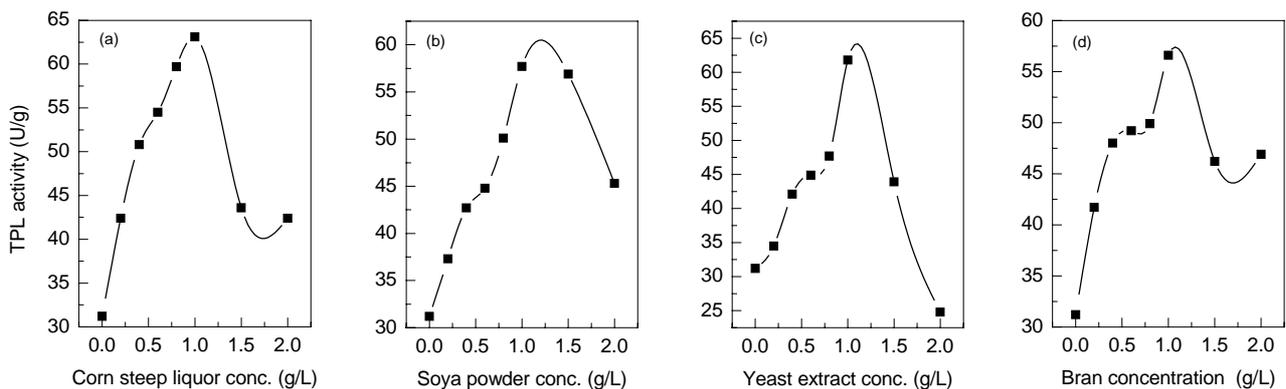


图2 营养强化因子对酶活合成的影响

Fig.2 Effect of organic nitrogen source on TPL production

3.2 营养强化因子对 TPL 生产的影响

在前期研究中发现, 合成培养基因营养的缺乏限制了重组菌生长, 从而导致产酶水平下降(仅为 31.2 U/g).

为了更进一步提高重组菌生产 TPL 的能力, 研究了不同营养强化剂(玉米浆、豆饼粉、酵母膏、麸皮)对 TPL 酶生产的影响, 结果如图 2 所示. 在发酵培养基中添加一

定浓度的营养强化剂能有效提高 TPL 酶活, 在所研究的浓度范围内, TPL 酶活水平随着营养强化剂浓度(0~1.0 g/L)的增加而增加, 当营养强化剂的浓度为 1.0 g/L 时酶活均达到最大值. 在 4 种营养强化剂中, 玉米浆和酵母膏对产酶水平的促进明显高于其他强化剂. 在培养基中添加 1.0 g/L 玉米浆使酶活提高到 63.1 U/g [图 2(a)], 与对照组(未添加)相比提高了 100%. 然而, 进一步提高培养基中营养强化剂的浓度并不能有效地提高酶活.

3.3 控制溶氧模式对 TPL 的影响

发酵罐上溶氧对重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 菌体

生长和产酶的影响如图 3 所示. 在恒定的搅拌转速和通气量条件下, 发酵进行到 4 h 时, 菌体生长进入对数生长期, 溶氧水平开始急剧下降, 在 6 h 降为 0, 导致最终菌体浓度仅为 3.96 g/L, 酶活为 40.1 U/g [图 3(a)]. 这一结果表明, 在恒定转速和通气量的条件下, 溶氧成为重组菌生长和外源蛋白过量表达的限制性因素. 维持发酵过程中溶氧水平恒定为 30%, 发酵进行到 8 h 时菌体浓度达到 4.78 g/L, 酶活为 54.6 U/g [图 3(b)], 与不控制溶氧的对照组比较分别提高了 21% 和 36.1%.

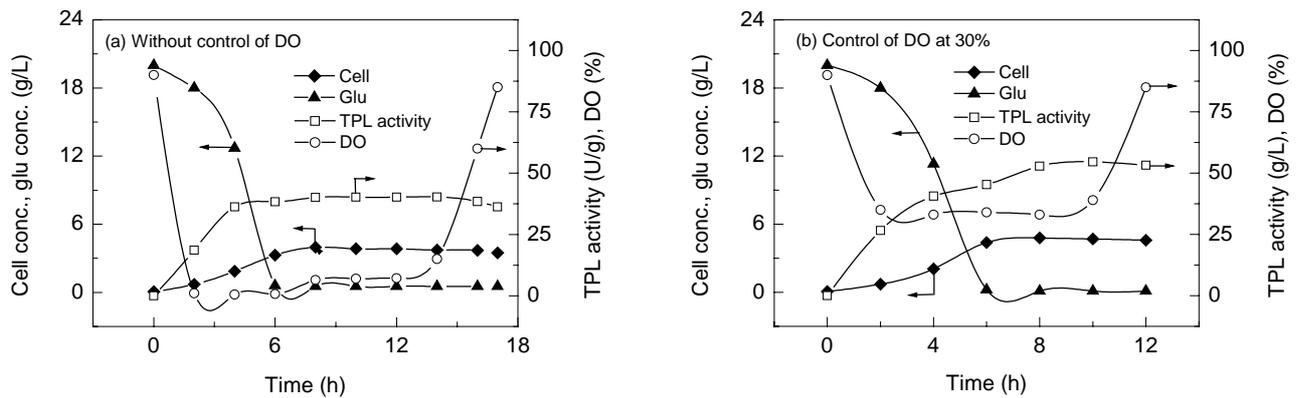


图 3 溶氧水平对菌体培养的影响
Fig.3 Effect of dissolved oxygen control on cell growth and TPL activity

3.4 基于固定溶氧补料的 *E. coli* M15 (pQTPL) 高密度发酵

利用重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 发酵生产 TPL 的过程中, 维持溶氧水平为 30% 时, 葡萄糖在发酵进行到 6 h 时耗尽, 随后溶氧水平急剧上升, 使细胞生长和 TPL 酶积累受阻. 然而, 若在发酵初始时添加高浓度的葡萄糖则易导致细胞生长延滞期增长和部分副产物积累. 为进一步提高菌体浓度和 TPL 酶活, 在发酵过程中采用溶

氧反馈调节-限制性补料方式进行发酵. 当发酵液中 DO>30% 时, 以 30 mL/h 的速度向培养系统中流加 500 g/L 葡萄糖与氮源浓缩液, 直至 DO<30%. 如此反复, 当发酵进行到 11 h 时, 菌体浓度和 TPL 酶分别达到 31.5 g/L 和 66.8 U/g, 且在发酵过程中细胞比生长速率始终维持在 0.35~0.21 之间(图 4).

3.5 pH 和温度对 TPL 的影响

重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL) 生长的最适温度和 pH 分别为 37 °C 和 7.0, 而 TPL 最适反应条件则为 30 °C 和 pH 8.0. 前期研究发现, 发酵进行到 8 h 时细胞进入生长稳定期. 在本研究中, 在 0~8 h 温度和 pH 维持在 37 °C 和 7.0, 8 h 后将温度和 pH 分别调为 30 °C 和 8.0, 以恒定温度和 pH 为对照, 结果如表 2 所示. 在 8 h 后将 pH 值调到 8.0, TPL 酶活在 9 h 达到最大值 132.7 U/g, 比对照组(31.2 U/g)提高了 325%; 在 8 h 后将温度降为 30 °C, 酶活在 9 h 达到最大值 134.4 U/g, 比对照提高了 330%, 而同时调节温度和 pH, 发酵结束时 TPL 酶活为 154.4 U/g, 比对照提高了 394%.

3.6 优化培养条件后的酶活

最优的营养与环境条件下 TPL 发酵过程曲线如图 5 所示, 表明发酵 8 h 时改变温度为 30 °C 及 pH 8.0 条件

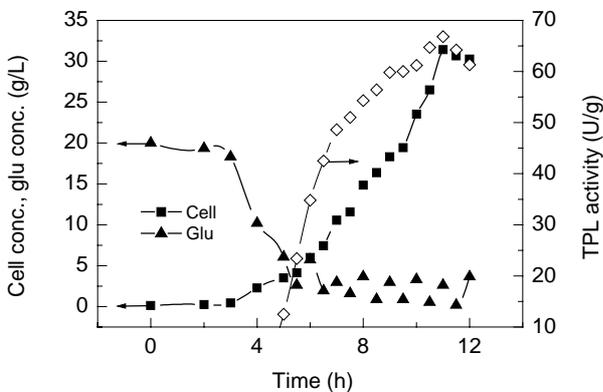


图 4 固定溶氧补料分批培养结果
Fig.4 Time courses of TPL production in the DO-stat fed-batch culture

下,发酵 9 h TPL 酶活达到 154.4 U/g,为对照组(31.2 U/g) 酶在细胞中的表达量大幅度增加(图 6)的 4.94 倍,此时细胞干重为 31.4 g/L. 经优化后, TPL

表 2 分阶段控制 pH 和温度的菌体培养结果比较
Table 2 The results of bi-stage pH and temperature control

Item	TPL activity (U/g)	Cell concentration (g/L)	TPL activity increment (%)
The control	31.2	12.3	-
pH change	132.7	17.8	325
Temperature change	134.4	19.5	330
Both pH and temperature changes	154.4	31.4	394

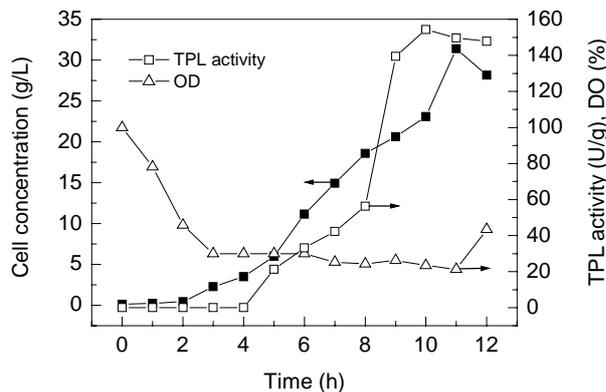


图 5 最优条件下重组菌发酵生产 TPL 酶的过程曲线
Fig.5 Time-courses of *E. coli* M15 (pQTPL) growth under the optimum conditions

4 结论

在培养基中添加 20 g/L 葡萄糖和 1.0 g/L 玉米浆可使酶活提高到 63.1 U/g(细胞干重). 在此基础上,维持发酵液中溶氧水平为 30%,可使菌体浓度在 8 h 达到 4.78 g/L,酶活为 52.8 U/g,比对照组(不控制溶氧)分别提高了 21% 和 36.1%. 采用溶氧反馈调节-限制性补料策略可使菌体浓度提高到 31.5 g/L. 重组菌 *E. coli* M15 (pQTPL)合成 TPL 酶的过程中,菌体生长的最适 pH 为 7.0,最适温度为 37℃;而 TPL 酶合成最适 pH 为 8.0,最适温度为 30℃. 在发酵过程中采用单一的难以实现菌体浓度的高产量和 TPL 较高酶活的统一. 在对不同温度和 pH 条件下细胞生长和 TPL 酶生产详尽分析的基础上,提出了两阶段温度和 pH 控制策略,在发酵前 8 h 控制 pH 7.0、温度 37℃;8 h 至发酵结束时 pH 控制为 8.0,温度为 30℃. 实验结果表明,重组菌的 TPL 酶活比控制 pH 7.0、温度 37℃时提高了 3.94 倍.

参考文献:

- [1] Enei H, Matsui H, Yamashita K, et al. Distribution of Tyrosine Phenol Lyase in Microorganisms [J]. *Agr. Biol. Chem.*, 1972, 36(11): 1861-1868.
- [2] Regina K, Andrew J L. Treatment of Parkinson's Disease: Levodopa as the First Choice [J]. *J. Neurology*, 2002, 249(2): 19-24.
- [3] Enei H, Nakazawa H, Yamada H, et al. Enzymatic Preparation of

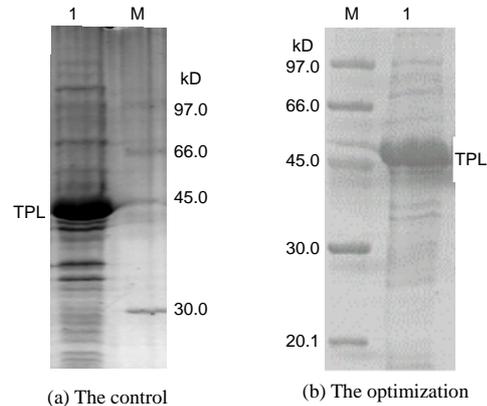


图 6 酪氨酸酚裂解酶的 SDS-PAGE
Fig.6 SDS-PAGE analysis of Tyrosine phenol lyase (M. Standard protein molecular weight; I. Cell extracts)

- L-Tyrosine or 3,4-Dihydroxyphenyl-L-alanine from Pyruvate, Ammonia and Phenol or Pyrocatechol [J]. *FEBS Lett.*, 1972, 21(1): 39-41.
- [4] Enei H, Yamada H. 3,4-Dihydroxyphenylalanine [J]. *Process. Industrial Microbiol.*, 1986, 24: 280-285.
 - [5] Antson A A, Demidikina T V, Gollnick P, et al. Three-dimensional Structure of Tyrosine Phenol-lyase [J]. *Biochemistry*, 1993, 32(16): 4195-4206.
 - [6] Smith H Q, Somerville R L. The TPL Promoter of *Citrobacter freundii* Is Activated by the TyrR Protein [J]. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(18): 5914-5921.
 - [7] Kurusu Y, Fukushima M, Kohama K, et al. Cloning and Nucleotide Sequencing of the Tyrosine Phenol Lyase Gene from *Escherichia intermedia* [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1991, 13: 769-772.
 - [8] Foor F, Morin N, Bostian K A, et al. Production of L-Dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the Tyrosine Phenol-lyase Gene Cloned from *Erwinia herbicol* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59(9): 3070-3075.
 - [9] 李伟平, 王树英, 严群, 等. 构建高表达酪氨酸酚裂解酶重组大肠杆菌合成左旋多巴 [J]. *中国医药工业杂志*, 2005, 36(12): 743-746.
 - [10] Yu J, Si Y T, Keung W, et al. Kinetic Modeling of Inhibition and Utilization of Mixed Volatile Fatty Acids in the Formation of Polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha* [J]. *Process Biochem.*, 2002, 37(7): 731-738.
 - [11] 李华钟, 孙伟, 刘吉泉, 等. 弗氏柠檬酸细菌酪氨酸酚裂解酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达 [J]. *工业微生物*, 2001, 31(3): 9-12.
 - [12] Chun Y L, Seok J L, Kyung H J, et al. High Dissolved Oxygen Tension Enhances Heterologous Protein Expression by Recombinant *Pichia pastoris* [J]. *Process Biochem.*, 2003, 38(8): 1147-1154.

Enhanced Production of Tyrosine Phenol Lyase by Recombinant *E. coli* M15 (pQTPL) through Controlling Nutritional and Environmental Conditions

SHI You¹, LIU Li-ming¹, DUAN Zuo-ying¹, LI Hua-zhong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. School of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: The effects of nutritional and environmental conditions on production of tyrosine phenol lyase (TPL) were investigated in flask and 4 L fermentor. The optimal concentrations of glucose and corn steep liquor for recombinant strain growth and TPL production were 20 g/L and 1.0 g/L, respectively. When the level of dissolved oxygen was kept at 30%, a high cell concentration and TPL activity reached 4.78 g/L and 52.8 U/g (DCW), which were 21% and 36.1% higher than those without dissolved oxygen control, respectively. The cell concentration reached 31.5 g/L when the strategies of dissolved oxygen feedback regulation and restrictive supplement of nutrients were used. By using a bi-stage pH and temperature control strategy, in which pH value and temperature were controlled at 7.0 and 37°C in the first 8 h and then switched to pH 8.0 and 30°C, a high cell concentration and high TPL activity [154.4 U/g (DCW)] were achieved.

Key words: *E. coli* M15 (pQTPL); tyrosine phenol lyase; high-efficiency production