

文章编号 : 1009 - 038X(2001)03 - 0265 - 05

高左旋多巴合成活性的重组大肠杆菌培养条件优化

李华钟, 孙伟, 陈坚

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘 要 :对重组大肠杆菌进行培养条件的研究, 得到细胞合成 L-DOPA 最佳培养条件为 : L-tyrosine 0.2%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、 ZnSO_4 0.001%、磷酸吡哆醛 0.005%、牛肉膏 0.5%、蛋白胨 2%、DL-Alanine 0.1%、温度 37 °C、pH 值 7.0、培养时间 16 h、摇瓶转速 150 r/min.

关键词 :高左旋多巴 大肠杆菌 ; 优化

中图分类号 :TQ92

文献标识码 :A

Optimization of Culture Conditions for Recombinant *E. coli* Containing High Activity of L-DOPA Synthesis

LI Hua-zhong, SUN Wei, CHEN Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract : Culture conditions for recombinant *E. coli* containing high tyrosine phenol lyase were studied. Optimum condition of enzyme formation was cells cultured at 37 °C for 16 hours in the medium containing 0.2% L-tyrosine, 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% pyridoxal phosphate, 0.5% meat extract, 2% polypeptone, and 0.1% DL-Alanine. Initial pH and rotation rate were 7.0 and 150 r/min respectively.

Key words : high L-DOPA ; *E. coli* ; optimization

L-DOPA 是治疗帕金森综合症的有效药物. 20 世纪 60 年代末, 国外一些学者开始致力于微生物酶法合成 L-DOPA 的研究. 用来自 *Citrobacter freundii*、*Erwinia herbicola*、*Escherichia intermedia* 的酪氨酸酚解酶生产 L-DOPA 是一种高效的微生物方法^[1], 因为这些菌含有高水平的 TPL 酶活. 酪氨酸酚解酶 (EC 4.1.99.2) 是依赖于磷酸吡哆醛的多功能酶, 这种酶能够催化丙酮酸、邻苯二酚和氨形成 L-DOPA^[2~4]. 20 世纪 90 年代初有人从 *C. freundii* MT-10419^[5] 和 *E. intermedia* FKU10N^[6] 中

克隆出编码 TPL 酶的基因并测定其核酸顺序. 作者与日本富士大学的刘吉泉博士合作, 从 *C. freundii* 中将编码 TPL 酶的基因片段克隆到 *E. coli* JM109 中, 得到重组菌 *E. coli* JM109(pTPL) 并对此株菌的培养条件进行了研究.

1 材料与方法

1.1 菌株 重组菌 *E. coli* JM109(pTPL)

收稿日期 2000 - 10 - 16 修订日期 2001 - 03 - 13.

作者简介: 李华钟 (1959 -), 男, 山东烟台人, 工学硕士, 副教授.

万方数据

1.2 种子培养条件

LB 液体培养基 + 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Amp, 37 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min, 12 h.

1.3 细胞 L-DOPA 合成能力的测定^[7]

酪氨酸酚解酶活性可通过测定 L-DOPA 的生成量来确定酶活性的大小. 标准测定体系(10 mL)含有 120 mg 的邻苯二酚、100 mg 的丙酮酸、200 mg 的乙酸铵、20 mg 的亚硫酸钠、20 mg 的 EDTA, 用氨水调 pH 值至 8.0, 加入从 10 mL 发酵液中得到的菌体, 15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 1~3 h.

从图-1 可知, L-DOPA 的合成在 1~3 h 范围内呈线性关系, 因此, 可用细胞合成 L-DOPA 的能力来表示酪氨酸酚解酶活性的大小. 作者将反应时间定为 3 h, 因为较长的反应时间会生成较多的 L-DOPA, 可以减小测定误差.

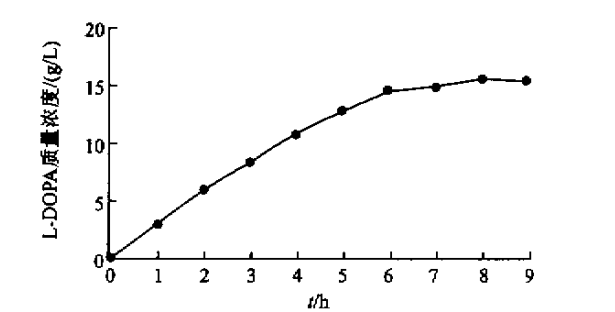


图 1 反应时间与 L-DOPA 生成量的关系
Fig.1 The relationship of reaction time and the amount of L-DOPA

1.4 菌体生物量的测定

将发酵液离心得到的菌体洗涤一次, 用水稀释 10 倍. 以蒸馏水作为空白, 在 600 nm 下测定其吸光值.

1.5 L-DOPA 的测定

纸上层析法^[2]或 HPLC 法.

2 结果与讨论

2.1 无机盐对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

微生物在生长和代谢过程中需要无机盐, 因为有些无机离子是不同酶的辅助因子. 以前曾报道在 TPL 酶合成过程中需要 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及一些微量元素^[8,9], 因此作者研究了 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和一些微量元素对 TPL 酶合成的影响.

2.1.1 KH_2PO_4 对细胞合成 L-DOPA 能力的影响
在培养基中分别加入不同质量浓度的 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 结果见图 2、图 3, 从图 2 中可看出 KH_2PO_4 的质量浓度为 0.2 g/dL 时细胞合成 L-

DOPA 的能力最高. 从图 3 中可看出 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度为 0.1 g/dL 时细胞合成 L-DOPA 的能力最高.

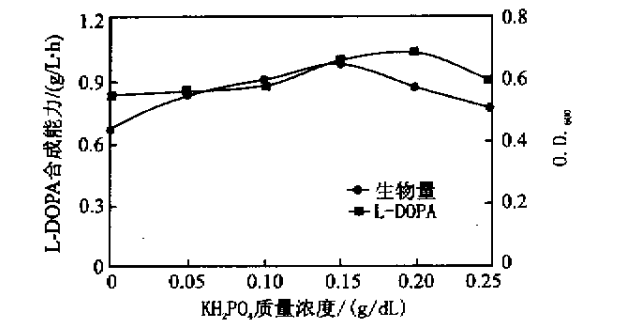


图 2 KH_2PO_4 质量浓度对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

Fig.2 The effect of KH_2PO_4 concentration on the activity of L-DOPA synthesis

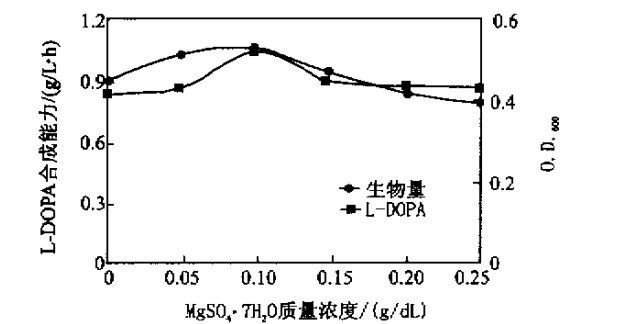


图 3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

Fig.2 The effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on the activity of L-DOPA synthesis

2.1.2 微量元素对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

在培养基中加入微量元素, 结果见表 1. 同时加入铁离子和锌离子有利于提高细胞合成 L-DOPA 的能力.

表 1 微量金属离子对细胞合成 L-DOPA 的能力的影响

Tab.1 The effect of minor metal ions on the activity of L-DOPA synthesis

金属离子(添加质量分数均为 10^{-5})	生物量 (O.D)	L-DOPA 合成能力/(g/(L·h))
不添加	0.36	1.073
Ca^{2+}	0.34	1.019
Fe^{2+}	0.38	1.085
Mn^{2+}	0.34	1.064
Li^{+}	0.36	0.988
Zn^{2+}	0.32	1.096
Cu^{2+}	0.36	1.070
$\text{Fe}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$	0.34	1.237
$\text{Fe}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$	0.33	1.126
$\text{Fe}^{2+} + \text{Zn}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$	0.37	1.168

2.2 碳源对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

碳既可作为微生物生长的主要能源,又可供给微生物合成自身的物质.因此作者在培养基中加入下列几种碳源物质,以考察其对细胞合成 L-DOPA 能力的影响,结果见表 2.

表 2 碳源对细胞合成 L-DOPA 的能力的影响
Tab.2 The effect of carbon source on the activity of L-DOPA synthesis

碳源(质量分数均为 1%)	发酵終了 pH 值	生物量 (O.D)	L-DOPA 合成能力/(g/(L·h))
无	8.4	0.50	1.244
葡萄糖	4.6	0.35	0
麦芽糖	5.0	0.56	0
甘油	6.0	0.65	0.534
柠檬酸	8.6	0.29	0.580
琥珀酸	9.0	0.45	0.715
反丁烯二酸	9.0	0.44	0.760

从表 2 可知,在培养基中加入葡萄糖、麦芽糖时,发酵終了 pH 值较低,L-DOPA 的转化结果表明此时菌体没有合成 L-DOPA 的能力.原因可能是较高质量分数的葡萄糖、麦芽糖在重组菌代谢过程中产生大量的乙酸,而乙酸对重组蛋白的表达有抑制作用,而加入甘油有利于菌体的生长但是对于重组蛋白的表达起不到正面效应,这可能与发酵过程中较低的 pH 造成重组蛋白不能很好地表达有关.另外,对其它一些有机酸的研究表明,它们对菌体的生长和产酶都没有促进作用.

2.3 氮源对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

在培养基中加入不同的氮源,以考察其对细胞合成 L-DOPA 能力的影响,其结果见表 3.

表 3 氮源对细胞合成 L-DOPA 的能力的影响
Tab.3 The effect of nitrogen source on the activity of L-DOPA synthesis

氮源	添加量(质量分数/%)	生物量 (O.D)	L-DOPA 合成能力/(g/(L·h))
对照	—	0.015	0.236
酵母膏	0.5	0.05	0.259
	1.0	0.1	0.436
	2.0	0.2	0.715
	0.5	0.15	0.726
蛋白胨	1.0	0.32	0.895
	2.0	0.57	1.094
	0.5	0.1	3.78
牛肉膏	1.0	0.15	0.457
	2.0	0.25	0.538
氯化铵	1.0	0.015	0.221
硫酸铵	万方数据	0.015	0.205

从表 3 可知,无机氮源的加入降低了细胞合成 L-DOPA 的能力,而在有机氮源中蛋白胨不仅有利于菌体的生长而且对细胞合成 L-DOPA 的能力都有较大的促进作用.

2.4 氮源的正交优化

从表 3 中可看出有机氮源对重组菌合成 L-DOPA 的能力有较大促进作用,因此对 3 种有机氮源进行正交优化实验,以得到其最优配比.正交实验设计见表 4,实验结果和数据分析见表 5 所示.

表 4 $L_9(3^3)$ 正交设计表
Tab.4 $L_9(3^3)$ table of orthogonal array

水平	A	B	C
	酵母膏/%	牛肉膏/%	蛋白胨/%
1	0	0.5	1.0
2	0.5	1.0	1.5
3	1.0	1.5	2.0

表 5 试验方案和试验结果
Tab.5 Test scheme and results

试验号	A	B	C	L-DOPA 合成能力/(g/(L·h))
1	1	1	1	1.198
2	1	2	2	1.255
3	1	3	3	1.376
4	2	1	2	1.220
5	2	2	3	1.259
6	2	3	1	1.265
7	3	1	3	1.352
8	3	2	1	0.972
9	3	3	2	0.860
k				
K_1	3.820	3.829	3.436	
K_2	3.744	3.711	3.334	
K_3	3.184	3.493	3.978	
k_1	1.273	1.274	1.146	
k_2	1.248	1.236	1.112	
k_3	1.061	1.164	1.326	
R	0.358	0.185	0.362	

根据极差大小分析得出因素的主次:主
 $C \rightarrow A \rightarrow B$ 次

得出较优的组分为: $A_1B_1C_3$ 即 0.5% 的牛肉膏,2% 的蛋白胨.

2.5 维生素对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

在培养基中加入维生素,结果见表 6.加入盐酸吡哆醇和磷酸吡哆醛(PLP),对细胞合成 L-DOPA

的能力有明显的促进作用,其它维生素的加入对细胞合成 L-DOPA 的能力有不同程度的抑制作用.这是由于磷酸吡哆醛是 TPLase 的辅酶^[10,11],而盐酸吡哆醇对细胞合成 L-DOPA 的能力促进作用可能是其在结构上与磷酸吡哆醛相似的缘故.

表 6 维生素对细胞合成 L-DOPA 的能力的影响*
Tab.6 The effect of vitamins on the activity of L-DOPA synthesis

维生素的种类	添加量/ (mg/L)	生物量 (O.D)	L-DOPA/ (g/(L·h))
不添加	0	0.29	0.687
盐酸硫胺素	0.5	0.30	0.435
	10	0.025	0.337
生物素	0.5	0.23	0.483
	10	0.21	0.438
抗坏血酸	0.5	0.12	0.455
	10	0.22	0.43
核黄素	0.5	0.23	0.446
	10	0.19	0.349
盐酸吡哆醇	0.5	0.32	0.975
	10	0.26	0.862
	20	0.24	0.821
磷酸吡哆醛(PLP)	0.5	0.35	1.034
	10	0.28	0.916
	20	0.24	0.875

注 培养基为 L-tyr 0.2 g/dL, Polypeptone 1 g/dL

2.5.1 磷酸吡哆醛对细胞合成 L-DOPA 能力的影响 从表 6 可知,磷酸吡哆醛对细胞合成 L-DOPA 有明显的促进作用,确定适合的 PLP 质量浓度对细胞合成 L-DOPA 能力是很重要的.由图 4 可知,添加 5 mg/L 的 PLP 细胞合成 L-DOPA 能力最大.

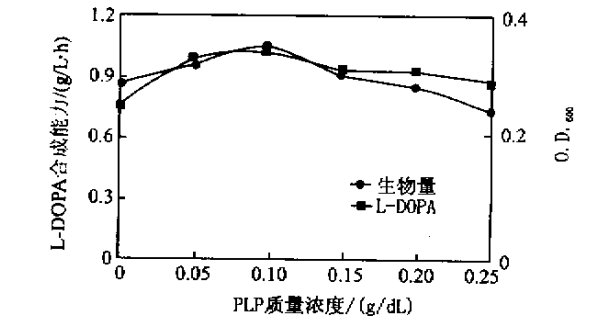


图 4 不同质量浓度的磷酸吡哆醛(PLP)对产酶的影响
Fig.4 The effect of PLP concentration on the activity of L-DOPA synthesis

2.6 氨基酸对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

2.6.1 各种氨基酸对细胞合成 L-DOPA 能力的影响 氨基酸在微生物生长过程中可作为碳架物质或直接作为结构单元.在培养基中加入不同的氨基酸,结果见表 7,甘氨酸和丙氨酸对产酶有促进作用,其中丙氨酸效果很明显.从酪氨酸酚解酶的酶蛋白氨基酸组成分析表明,丙氨酸和甘氨酸含量高,因此,加入的丙氨酸和甘氨酸可能用于合成酶蛋白.

表 7 不同氨基酸对细胞合成 L-DOPA 的能力的影响
Tab.7 The effect amino acids on the activity of L-DOPA synthesis

氨基酸 (0.2 g/dL)	发酵終了 pH 值	生物量 (O.D)	L-DOPA/ (g/(L·h))
不添加	8.2	0.35	1.080
甘氨酸	8.3	0.45	1.097
丙氨酸	8.6	0.46	1.303
谷氨酸	8.7	0.47	1.044
丝氨酸	8.0	0.45	1.023
蛋氨酸	8.3	0.34	0.981
异亮氨酸	8.2	0.39	1.041
亮氨酸	8.1	0.40	1.076
苯丙氨酸	8.3	0.39	1.044
脯氨酸	8.3	0.46	0.876
胱氨酸	8.4	0.38	0.939

2.6.2 丙氨酸的质量浓度对细胞合成 L-DOPA 能力的影响 由于丙氨酸对细胞合成 L-DOPA 能力的促进作用最明显,因此,在培养基中加入不同质量浓度的丙氨酸以确定其最适添加量,图 5 显示在培养基中加入 0.1 g/dL 的丙氨酸对酶合成的促进最大.

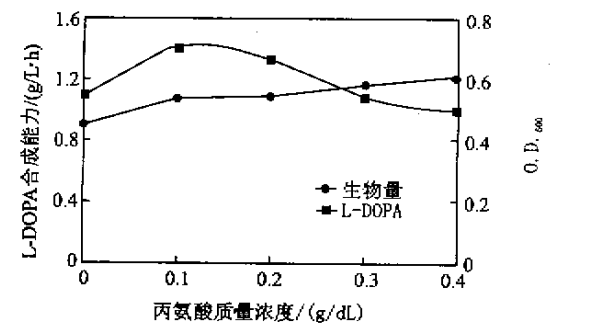


图 5 丙氨酸的添加量对 TPL 合成的影响
Fig.5 Effect of alanine concentration on TPL synthesis

2.7 酪氨酸作为诱导物对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

在细胞培养过程中添加 L-tyrosine 诱导产生 TPL 酶^[7,11],不同质量浓度的酪氨酸对产酶的影响不同.图 6 显示 0.2 g/dL 的酪氨酸对细胞合成 L-DOPA 的能力最有利.在不添加 L-tyrosine 的培养基中细胞合成 L-DOPA 的能力也较高,这可能是培养基中含有 L-tyrosine.酪氨酸在水中的溶解度很低,当酪氨酸的质量浓度大于 0.2 g/dL 时,溶解性不好,沉淀较多.又酪氨酸分解时形成苯酚,苯酚的过多积累会对细胞产生毒害作用^[9].

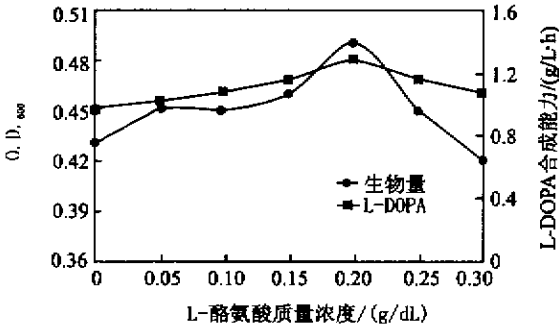


图 6 酪氨酸的添加量对 TPL 合成的影响

Fig.6 Effect of tyrosine concentration on TPL synthesis

2.8 初始 pH 值和培养温度对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

通过对摇瓶培养基初始 pH 值和培养温度的研究可知,pH 值为 7.0、培养温度为 30 ℃时细胞合成 L-DOPA 的能力最高.

2.9 装液量对细胞合成 L-DOPA 能力的影响

研究表明,20 mL 的装液量及 5% 的接种量时,细胞合成 L-DOPA 的能力最高.

2.10 小 结

综上,研究得到的最适培养条件为:L-tyrosine 0.2 g/dL、KH₂PO₄ 0.2 g/dL、MgSO₄·7H₂O 0.1 g/dL、FeSO₄·7H₂O 10 mg/L、ZnSO₄·7H₂O 10 mg/L、磷酸吡哆醛 5 mg/L、牛肉膏 0.5 g/dL、蛋白胨 2 g/dL、DL-Alanine 0.1 g/dL、温度为 37 ℃、初始 pH 为 7.0、摇瓶转速 150 r/min.

在上述优化的条件下在摇瓶中考察菌体生长量、L-DOPA 合成能力和培养过程中发酵液 pH 变化三者之间的动态关系,其结果如图 7 所示.

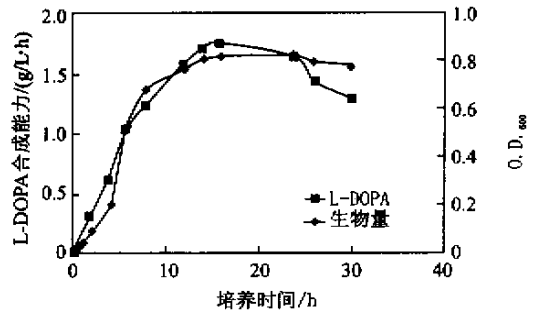


图 7 最适条件下摇瓶发酵过程曲线

Fig.7 Curve of fermentation process in the optimization of culture conditions

从图 7 中可以看出,当细胞生长进入稳定期初期时(16 h),细胞合成 L-DOPA 能力达到最大.整个生长过程中 pH 值不断升高,最高可至 8.0.这可能是由于有机氮源和诱导物(L-酪氨酸)在细胞生长过程被分解产生氨所致.pH 值的升高对细胞合成 L-DOPA 能力影响不大,但会抑制菌体的生长,造成菌体的密度较低.另外,在培养基中没有碳源也会造成菌体生长不好.在摇瓶发酵中的这些不足之处可以在发酵罐中得到控制.

参考文献：

[1] TORU N,TAKAFUMI I, HIDEAKI Y. Location of tyrosine phenol lyase in some Gram-negative bacteria [J]. FEMS Microbio lett,1985,30 :269 ~ 272.

[2] YAMADA H, KUMAGAI H,KASHIMA N, et al. Synthesis of L-tyrosine from pyruvate , ammonia and phenol by crystalline tyrosine phenol lyase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1972,46 :370 ~ 374.

[3] ENEI H, MATSUI H, YAMASHITA K, et al. Distribution of tyrosine phenol lyase in microorganism [J]. Agr Biol Chem, 1972,36(11) :1861 ~ 1868.

[4] ENEI H, NAKAZAWA H, KUMURA S O. Synthesis of L-tyrosine or 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine from pyruvate, ammonia and phenol or pyrocatechol [J]. Agric Biol Chem,1973,37 :725 ~ 735.

[5] IWAMORI S, YOSHINO S, ISHIWATA K. Structure of TPLase genes with Citrobacter freundii and structure comparison with tryptophase from E. coli [J]. J Ferment Bioeng, 1991,72 :147 ~ 151.

[6] KURUSU Y, FUKUSHIMA M, KOHARA K, et al. Cloning and nucleotide sequencing of the TPLase gene from Escherichia intermedia [J]. Biotechnol Lett, 1991,13 :769 ~ 772.

(上接第 269 页)

- [7] HITOSHI E, KOICHI Y, SHINJI O. Culture conditions for the preparation of cells containing high Tyrosine phenol lyase activity [J]. **Agric Bio Chem**, 1973,37(3) :485 ~ 492.
- [8] KUPLETSKAIA M B. Synthesis of tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by bacteria *Citrobacter freundii* [J]. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, 1979,15 :827 ~ 831.
- [9] SYSUEV, TYSIACHNAIA V A, KUPLETSKAIA I V. purification and some properties of tyrosine phenol lyase [J]. **Biokhimiia**, 1980,45 :889 ~ 895.
- [10] KUMAGAI H, YAMADA H, MATSUI H. Tyrosine phenol lyase [J]. **J Biol Chem**, 1970,245 :1767 ~ 1773.
- [11] KUMAGAI H, KASHIMA N, TORII H, *et al*. Purification, crystallization and properties of tyrosine phenol lyase from *Erwinia herbicola* [J]. **Agr Biol Chem**, 1972,36 :472 ~ 476.

万方数据

(责任编辑 朱 明)