

苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌的培养

崔建东, 谭之磊, 李飞, 贾士儒

(天津科技大学, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300222)

摘要: 为了提高苯丙氨酸解氨酶的产量和活力, 对高效表达圆红冬孢酵母苯丙氨酸解氨酶基因的重组大肠杆菌 JM109 进行培养, 优化了发酵培养基成分、培养条件以及发酵工艺, 结果表明, 最佳葡萄糖浓度为 20 g/L, 碳氮比为 7.86, 添加 5 g/L 酵母粉和蛋白胨有利于菌体产酶, 最佳发酵液初始 pH 为 7.5, 接种量为 10%。通过以上优化, 重组大肠杆菌培养 18 h 时酶活可达到 70 U/g (DCW), 酶活比原工艺提高了 1.6 倍。

关键词: 苯丙氨酸解氨酶; 重组大肠杆菌; 发酵; 优化

中图分类号: TS201.2⁺5; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)09-0032-04

Culture of Recombinant *E. Coli* Strain Producing Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL)

CUI Jian-dong, TAN Zhi-lei, LI Fei, JIA Shi-ru

(Tianjin Key Laboratory of Industry Microbiology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: In order to improve the yield and activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) produced by recombinant *E. coli* strain, the culture conditions of recombinant *E. coli* strain carrying PAL gene of *Rhodotorula toruloides* was studied and optimized. The results showed that the optimal original glucose concentration, C/N ratio, the inoculation size and the initial pH value, fermentation time were 20 g/L, 7.86, 10%, 7.5 and 18 h, respectively. It was also found that the PAL activity was significantly improved by adding 5 g/L peptone and 5g/L yeast powder in fermentation medium. Under the optimized conditions, the PAL activity reached 70 U/g (DCW), which is 1.6 times higher than that under original fermentation conditions.

Keyword: phenylalanine ammonia lyase; recombinant *E.coli* Strain; fermentation; optimization

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine Ammonia lyase, PAL, EC4.3.1.5) 可以用于治疗某些肿瘤, 监控苯丙酮尿患者血浆中的苯丙氨酸含量, 可治疗苯丙酮尿患者^[1-2]。但其主要用途是催化反式肉桂酸转化生产 L-苯丙氨酸。在大多数高等植物、部分丝状真菌、酵母和某些链霉菌中都含有 PAL^[3]。L-苯丙氨酸生产中所用的 PAL 酶主要来自红酵母属^[4]。在生产过程中, 由于红酵母的 PAL 产量低, 酶活迅速下降, 极大的限制了 L-苯丙氨酸的生产。为了改善这种情况, 一些学者在红酵母培养过程中, 利用不同的氨基酸作为诱导物来提高 PAL 产量^[5]。一些学者通过改善红酵母细胞通透性来提高 PAL 酶活^[6]。还有一些学者试图用苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌高效表达合成 PAL^[7-8]。尽管红酵母 PAL 在大肠杆菌中得到表达, 但对苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌培养条件的研究少见报道。本文探讨了不同的培养条件对苯丙氨酸解氨酶重组大肠杆菌生长和产酶的影响, 以获得最佳的菌体生长和产酶条件。

收稿日期: 2007-05-27

1 材料与方法

1.1 菌种

重组大肠杆菌 JM109 (含有质粒 PBV220-PAL, 携带 PAL 基因, Amp 抗性), 参考文献方法构建^[9]。圆红冬孢酵母苯丙氨酸解氨酶基因被克隆进入表达质粒 PBV220 (中国北京 306 医院李建欣惠赠), PAL 的表达被启动子 P_RP_L 控制。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 葡萄糖 1, 氨苄青霉素 0.1, pH 7.0

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20, KH₂PO₄ 13.3, (NH₄)₂HPO₄ 4, MgSO₄·7H₂O 1.2, 柠檬酸 1.7, 微量元素 (mg/L): EDTA 8.4, CoCl₂·6H₂O 2.5, MnCl₂·4H₂O 15, CuCl₂·4H₂O 1.5, H₃BO₄ 3, Na₂MoO₄·2H₂O 2.5, Zn(CH₃COO)₂·2H₂O 13, pH 7.0。

1.3 培养方法

将活化后的菌种 1 mL 转入装有 50 mL 种子培养

基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C, 200 r/min 培养 12 h。以 10% 接种量将种子培养液接入装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C, 200 r/min 摇瓶培养 16 h, 在 42 °C 培养 6 h 诱导 PAL 表达。

1.4 生物量的测定

测定方法参照文献^[10]。

1.5 酶活的确定

1.5.1 反式肉桂酸标准曲线的绘制

用 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.8) 分别配置 1 mg/L、2 mg/L、3 mg/L、4 mg/L、5 mg/L、6 mg/L 的反式肉桂酸, 用 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.8) 做参比, 测定其在 A₂₈₀ 的吸光值, 得到反式肉桂酸标准曲线, 相关计算公式: $C=7.1812A+0.0638$, $r^2=0.9994$, 其中: C-肉桂酸浓度 (mg/L), A₂₈₀-吸光值。

1.5.2 细胞悬浮物的制备

取 2 mL 的细菌培养液, 3000 r/min 离心 10 min, 沉淀用生理盐水洗一次, 再离心, 用 10 mL 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.8) 悬浮细胞。

1.5.3 PAL 酶活性的测定

测定方法见文献^[11], 略做修改, 表 1 是酶反应液成分。

表 1 酶反应液成分

试剂	参比管/mL	样品管/mL
50 mmol/L L-苯丙氨酸	2.5	2.5
细胞悬浮物	-	2.0
25 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.8)	2.0	-
土温 80(0.5 g/L)	0.5	0.5

将以上试剂依次加入离心管中混合均匀, 30 °C 水浴保温 10 min, 加入 6 mol/L HCl 0.2 mL 终止反应, 离心除去细胞, 上清在 752 分光光度计上测 A₂₈₀ 的吸光值, 根据标准曲线得出肉桂酸浓度。酶活性的计算公式:

$$U = (C \times V) / (MW \times T)$$

其中, U 是酶的活力单位, MW 是肉桂酸的分子量, V 是反应体积 (mL), T 是反应时间 (min), C-生成的肉桂酸的浓度 (mg/L)。

酶比活力的测定: 苯丙氨酸解氨酶比活力表示为在上述条件下每毫克干重细胞的活力单位数, 计算公式如下:

$$U_{\text{比活力}} = U/W_c$$

其中, U: 酶的活力单位, W_c: 细胞干重 (mg)。一个酶活单位定义为每分钟转化 1 μmol L-苯丙氨酸成为肉桂酸的酶量。PAL 比酶活表示为每毫克干重细胞的活力单位数。

2 结果与讨论

2.1 碳氮比对 PAL 活性影响

考察了发酵培养基中碳氮比 (葡萄糖与无机氮源中 C、N 元素的摩尔比) 对菌体生长及 PAL 活力的影响。结果见图 1。

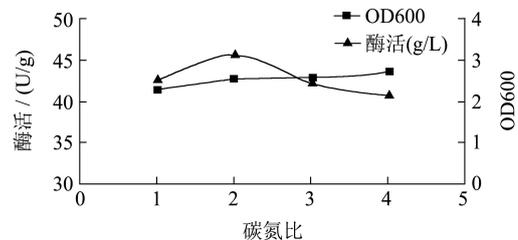


图 1 碳氮比对 PAL 活性影响

注: (碳氮比): 1: 11.79; 2: 7.86; 3: 5.9; 4: 4.72

不同的碳氮比对酶活力影响较大。当碳氮比为 7.86 时, 酶活力最高, 但菌体量并不是最大。随着碳氮比的提高, 酶活力反而下降, 但菌体量仍在增加。表明较高的碳氮比可能抑制酶的合成, 但有利于菌体的生长。

2.2 有机氮源对菌体生长及产酶活力的影响

在发酵培养基中加入不同浓度的有机氮源, 考察有机氮源对产酶和菌体生长的影响。

表 2 有机氮源对菌体生长以及产酶的影响

有机氮源	OD ₆₀₀	比酶活/(U/g)	相对酶活/%
Control (no add organic nitrogen)	2.26	42.53	100
蛋白胨(5 g/L)	2.53	52.16	122.6
酵母粉(5 g/L)	2.55	64.33	151.2
蛋白胨(5 g/L)+酵母粉(5 g/L)	3.1	67.71	159.2
蛋白胨(5 g/L)+酵母粉(10 g/L)	5.6	40.0	94.05
蛋白胨(5 g/L)+酵母粉(15 g/L)	5.8	41.82	98.33

表 2 结果表明, 蛋白胨和酵母粉对菌体生长以及产酶有较大的影响, 特别是在加入了酵母粉后, 菌体量和酶活都有显著的增加, 当蛋白胨和酵母粉以 5 g/L 同时加入时, 酶活达到了最大, 是对照的 1.5 倍以上, 为 67.71 U/g。说明酵母粉中可能含有某些生长因子或某些诱导因子, 促进了产酶。但随着酵母粉浓度的提高, 菌体量虽然还在增加, 酶活却开始下降, 表明过高酵母粉的加入虽然有利于菌体的生长, 但对产酶起到了抑制作用, 使酶活下降。

2.3 葡萄糖浓度对酶活力的影响

如图 2 所示, 当初始葡萄糖浓度为 20 g/L 时, 菌体量和产酶最高, 随着葡萄糖浓度升高, 菌体量和酶活开始下降, 这可能是由于过高的葡萄糖浓度抑制了菌体的生长和酶的合成。葡萄糖浓度过高会产生过多

的代谢副产物-乙酸,抑制细胞的生长。而且,在某一浓度下碳源会阻遏一个或更多的负责产物合成的酶,产生碳分解代谢物阻遏。

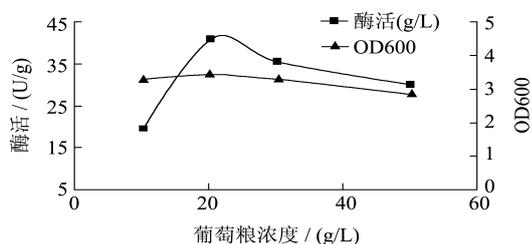


图2 葡萄糖浓度对酶活力的影响

2.4 发酵液初始 pH 对 PAL 活性的影响

将发酵培养基的初始 pH 调整为 6.5、7.0、7.5、

8.0, 考察初始 pH 对菌体生长及产酶影响。

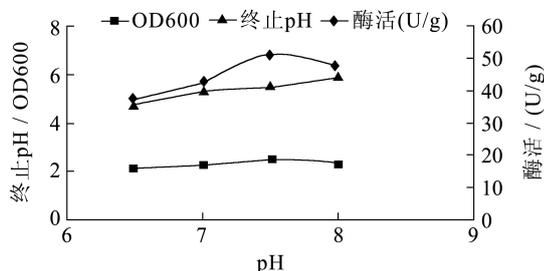


图3 发酵液初始 pH 对 PAL 活性的影响

图3表明,随着初始 pH 升高,发酵终止时发酵液的 pH 也在升高,菌体量和酶活都在提高。当初始 pH 为 7.5 时,菌体量和酶活力最大。但初始 pH 为 8.0 时,酶活却开始下降。表明,发酵液初始 pH 为 7.5 是菌体的最佳产酶初始 pH。

2.5 接种量对菌体生长以及酶活的影响

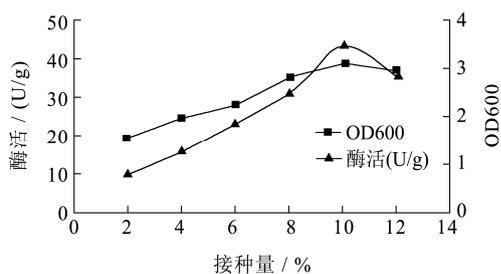


图4 接种量对菌体生长以及酶活的影响

结果如图4表明,接种量对菌体生长以及产酶有着较大的影响,随着接种量的增大,菌体浓度和酶活都在增加,当接种量为 10% 时,菌体浓度和酶活达到最大,随后又开始下降。较大的接种量可缩短生长达到高峰的时间,使产物的合成提前。但是,如果接种量过大,也可能使菌种生长过快,培养液黏度增加,导致溶氧不足,影响产物的合成。

2.6 培养时间对菌体生长及产酶的影响

根据以上优化过的条件,确定最佳的重组菌培养

时间,结果如图5。

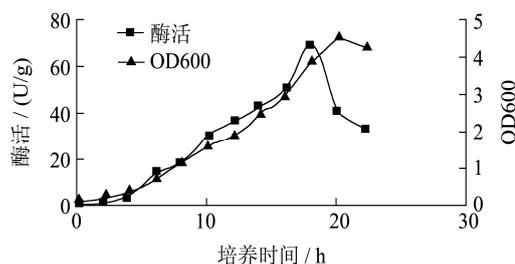


图5 培养时间对菌体生长及产酶的影响

重组大肠杆菌在培养前 6 h 为潜伏期,在这一时期,菌体生长慢,酶活性也低。在培养至 10~18 h 期间,为对数生长期,此时 PAL 活性迅速增加,到 18 h 达到最高,随后迅速下降。菌体量在培养 20 h 后也开始下降。

以优化后的发酵培养基和培养条件进行摇瓶发酵培养 22 h,在培养至 18 h 最大酶比活力基本稳定在 70 U/g 左右,菌体量 OD_{600} 达到 5.0 左右。分别是优化前的 1.6 和 2.2 倍。

3 结论

(1) 优化了苯丙氨酸解氨酶工程菌发酵培养基中的碳氮比、有机氮源。发现最佳的碳氮比(葡萄糖与无机氮源中的碳、氮元素摩尔比)是 7.86。同时发现添加酵母粉对菌体生长和酶活力的提高有较大的影响,当酵母粉和蛋白胨混合添加(浓度分别为 5 g/L),酶活力提高到 67.71 U/g,是初始发酵培养基(未优化)的 1.5 倍以上。最优的初始葡萄糖浓度是 20 g/L,过高或过低的糖浓度都不利于菌体生长和酶活力的提高。

(2) 最佳接种量 10%,最优的发酵液初始 pH 是 7.5。

(3) 通过以上优化,摇瓶发酵培养 18 h 时,酶活可达到 70 U/g,发酵周期大大缩短(最初是 24 h)。酶活力提高了 1.6 倍(比未优化的)。

参考文献

- [1] Sikora L A, Marzluff G A. Regulation of L-Phenylalanine ammonia lyase by L-Phenylalanine and nitrogen in *Neurospora Crassa*. *Journal of bacteriology*,1982(150):1287-1293.
- [2] Gilbert H J, Clarke I N, Gibson R K. Molecular Cloning of the Phenylalanine Ammonia Lyase Gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*,1985(161):314-317

(下转第 38 页)