

两相体系中固定化联苯双加氧酶全细胞产靛蓝特性研究

曲媛媛*, 许炳雯, 丛培, 吴英格, 朱丹, 马桥, 张旭旺, 周集体

(大连理工大学 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要: 微生物全细胞转化靛蓝的过程中, 靛蓝易被游离细胞吸附, 造成产物提取困难, 是微生物产靛蓝工业化进程中面临的主要问题之一. 为解决该问题, 尝试了不同固定化方法将基因工程菌固定, 其中海藻酸钠包埋法取得了最好的效果, 最佳包埋条件为 3.5% 海藻酸钠、1% 氯化钙, 固定化细胞在有机-水两相体系中可以重复利用两次, 首次转化 6 h 后, 靛蓝浓度为 15.9 mg/L. 另外, 两相体系的引入有效避免了固定化细胞产靛蓝过程中伴随的产物分解现象, 选择正十二烷作为有机相, 优化得到其最佳比例为体积分数 40%. 体系对吡啶的最佳耐受浓度为 400 mg/L, 在此条件下, 靛蓝产率为 0.28 mg/mg.

关键词: 联苯双加氧酶; 基因工程菌; 靛蓝; 海藻酸钠; 两相体系

中图分类号: Q814; X172 **文献标志码:** A

0 引言

靛蓝是世界上最古老、产量最大的染料之一, 广泛应用于印染、医药和食品工业^[1]. 其合成方法主要包括 3 种: 植物提取、化学合成、微生物合成, 其中微生物合成以高效、高选择性、环境友好等优点备受关注^[2-3]. 微生物利用体内表达的芳烃加氧酶, 通过单加氧或者双加氧途径将吡啶、色氨酸、葡萄糖转化为靛蓝^[4-6].

固定化技术和两相体系在靛蓝的微生物转化过程中分别发挥着重要的作用. 固定化技术通过包埋、吸附、交联等固定化手段, 将微生物游离细胞固定于载体孔径之间, 有利于产物的分离, 提高了生物转化的稳定性, 同时还可以延长其活性的保留时间^[7-9]. 陆燕^[10]利用海藻酸钠法固定重组 P450 BM3 工程菌制备靛蓝, 取得了较高的靛蓝收率. 两相体系可以降低高浓度底物及产物对细胞的毒害作用^[11-13], 同时还能够将产物及时萃取到有机相中, 大大简化了产物提取的程序^[14]. Doukyu 等对高浓度吡啶在两相体系中的转化情况, 做了一系列研究, 取得了较好的效果^[12-13].

本文针对目前靛蓝产物易被菌体吸附以及游离态靛蓝易分解的具体问题, 提出将固定化技术

与两相体系相结合的新思路, 研究基因工程菌 BphAB_{LA-4} 的固定化细胞在两相体系中的靛蓝转化特性, 旨在为微生物产靛蓝的工业化发展提供新的思路.

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) 培养基

LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0; pH 7.0.

改良马丁培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 1.0, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 1.0, 葡萄糖 10.0; pH 自然.

(2) 实验仪器

实验所用仪器主要有: ZHWY-2102C 恒温摇床(上海智城), AvantiTMJ-30 型高速低温冷冻离心机(美国 Beckman), SK-1 型快速混匀器(常州国华), SIL-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津).

(3) 实验试剂

海藻酸钠、无水氯化钙、聚乙烯醇、硼酸、丙酮、三氯甲烷均购于天津市富宇精细化工有限公司(分析纯); IPTG、氯霉素购于大连宝生物公司

收稿日期: 2012-02-15; 修回日期: 2013-04-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21176040, 51078054).

作者简介: 曲媛媛*(1976-), 女, 副教授, 博士生导师, E-mail: qyy007@126.com.

(分析纯)。

本研究使用的缓冲溶液:50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.2)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养

(1) 基因工程菌 BphAB_{LA-4} 的培养

将菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4 的基因片段 *bphAB* 导入大肠杆菌 *E. coli* BL21 中,成功构建基因工程菌 BphAB_{LA-4}。取 200 μ L 保存于 -80°C 的基因工程菌菌种,加入 25 mL 无菌 LB 培养基中(氯霉素 34 mg/L),于摇床中(30°C ; 150 r/min)过夜活化 12 h,备用。取 2 mL 活化菌种,加入 100 mL 无菌 LB 培养基中(氯霉素 34 mg/L),于摇床中(37°C ; 150 r/min)培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$,加入 100 μ L 浓度为 500 mmol/L 的 IPTG,继续培养至 $OD_{600} = 1.0$,离心收集菌体(8 000 r/min; 5 min),得到的休眠细胞储存于 -80°C 冰箱中备用。

(2) *Penicillium* sp. QQ 的培养

取 4°C 保存的 *Penicillium* sp. QQ 孢子,室温活化 24 h,加入无菌去离子水制成孢子悬液($OD_{600} = 0.3$),取 2 mL 孢子悬液加入 100 mL 改良马丁培养基中,置于摇床中(30°C ; 150 r/min)培养 5 d,以纱布滤去培养基,用 pH = 7.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液冲洗 3 遍,灭菌备用。

1.2.2 固定化细胞的制备

(1) 海藻酸钠包埋

将 20 mL 质量分数为 6% 的海藻酸钠加热溶解,与质量分数为 1% 的 CaCl_2 溶液经 121°C 灭菌 20 min,冷却至 30°C 左右,与同体积的基因工程菌悬液($OD_{600} = 3.0$; 干质量 890 mg/L)混合均匀,形成 3% 的海藻酸钠-基因工程菌混合液,用 10 mL 灭过菌的医用注射器取出适量混合液,逐滴滴入 CaCl_2 溶液中。将制备好的小球置于磁力搅拌器上搅拌 1 h 后,转移至 4°C 冰箱中交联 12 h 后,用无菌缓冲溶液冲洗 3 遍,灭菌备用。

(2) PVA- H_3BO_3 包埋

取 4 g PVA 加热溶于 20 mL 去离子水中,经 121°C 高温灭菌 20 min 后,冷却至 $45 \sim 50^{\circ}\text{C}$,迅速将其与同体积的菌悬液($OD_{600} = 3.0$; 干质量 890 mg/L)混合并搅拌均匀;用 10 mL 灭过菌的医用注射器取适量混合物,逐滴滴入 H_3BO_3 饱和溶液中,制备成小球,于 4°C 冰箱中交联 12 h 后,用无菌缓冲溶液冲洗 3 遍,备用。

(3) *Penicillium* sp. QQ 吸附

取经过灭菌处理的 *Penicillium* sp. QQ,置于 20 mL 基因工程菌悬液中($OD_{600} = 3.0$; 干质量 890 mg/L),吸附 12 h,用纱布滤去菌液,备用。

1.2.3 固定化细胞转化吲哚 将制备好的固定化细胞放入 100 mL 缓冲溶液中(葡萄糖 0.4%),加入 100 mg/L 吲哚启动反应,将锥形瓶置于摇床中(30°C ; 150 r/min)转化 12 h,每隔 2 h 取样 1 mL,经三氯甲烷萃取后,利用高效液相色谱检测靛蓝浓度。基因工程菌 BphAB_{LA-4} 产靛蓝机理见图 1。在重复利用实验中,反应 6 h 后,用纱布滤去反应液,重新加入吲哚和葡萄糖,进行下一轮反应。其中,葡萄糖的添加有助于辅酶 NADH 再生,为重组联苯双加氧酶转化吲哚提供电子。通过单因素优化,得出葡萄糖的最佳比例为 0.4%,在最佳条件下,悬浮细胞的最高靛蓝产量为 45.52 mg/L。

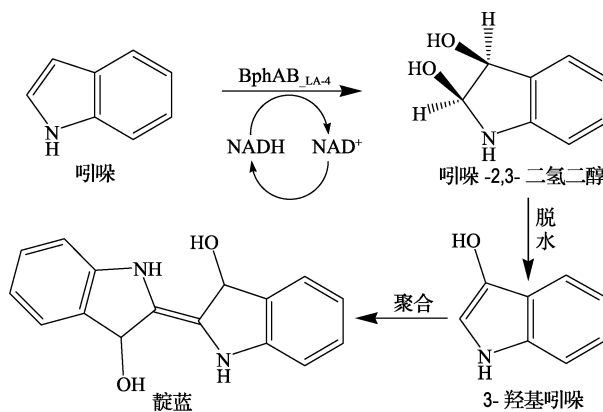


图1 异源表达的联苯双加氧酶产靛蓝示意图
Fig.1 Sketch map of the production of indigo by recombinant biphenyl dioxygenase

1.2.4 两相体系转化吲哚的条件优化 向反应体系中加入定量(20%、40%、60%、80%)的有机溶剂(正辛烷、正癸烷、正十二烷, log *P* 分别为 6.6、5.6、4.5),形成有机-水两相体系,每隔 2 h 从有机相中取样 1 mL,利用高效液相色谱检测靛蓝浓度。

2 结果与讨论

2.1 不同固定化方法对靛蓝产量的影响

目前,常用的固定化方法包括凝胶包埋法和吸附法,前者是工业应用最为广泛的固定化技术,该方法可以将细胞包埋在各种凝胶内部的微孔中而使细胞固定,有较高的细胞容量,且不易渗漏,

稳定性好. 后者是最早出现的固定化方法, 主要包括物理吸附和离子交换吸附, 近期, 利用真菌为载体的生物吸附法也得到了广泛的研究. 前期研究过程中, 筛选得到一株真菌 *Penicillium* sp. QQ, 它形成的菌丝球可以将细菌吸附于其菌丝体之间, 形成的固定化小球可以提高其对金属废水以及染料废水的处理效果^[15-16]. 本文尝试了 3 种固定化方法: 海藻酸钠包埋法(SA)、聚乙烯醇包埋法(PVA)、真菌吸附法(QQ), 结果如图 2 所示.

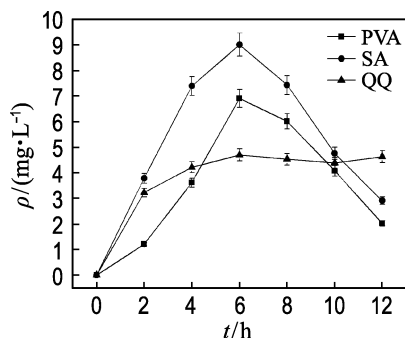


图 2 不同固定化方法对靛蓝产量的影响

Fig. 2 Effects of different kinds of immobilization on indigo production

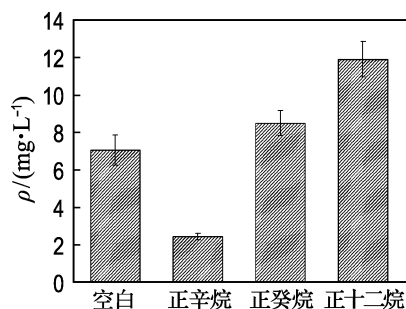
3 种方法固定的 BphAB_{LA-4} 均可以将吲哚转化为靛蓝, 其中两种包埋方法可以有效避免靛蓝被菌体吸附的现象, 而真菌吸附法在转化过程中, 依然会出现靛蓝被菌体吸附的现象. 另外, 研究发现, 利用两种包埋法固定的菌体在吲哚转靛蓝的过程中, 伴随着靛蓝的分解, 反应 6 h 后, 海藻酸钠和聚乙烯醇包埋法的靛蓝产量达到最大值, 靛蓝浓度分别为 9.0 和 6.9 mg/L, 随着反应时间的继续推移, 生成的靛蓝逐渐被分解. 靛蓝不稳定的性质导致了暴露于空气中未被菌体吸附的靛蓝分子极易被分解. 真菌吸附法的靛蓝产量在 6 h 后达到稳定的状态, 但其靛蓝产量低于其他两种方法, 且仍然存在菌体吸附靛蓝的现象, 因此选择靛蓝产量最大的海藻酸钠包埋法进行下一步研究.

2.2 有机溶剂对固定化体系的影响

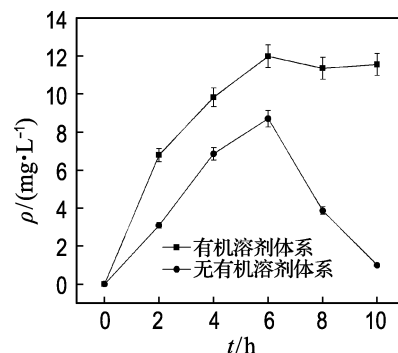
上文提到, 海藻酸钠包埋的固定化细胞虽然可以解决靛蓝产物不被吸附的问题, 但在实际过程中却出现了另外一个棘手的问题: 靛蓝的生成伴随着靛蓝的分解. 为解决该问题, 本研究在固定化细胞转化的基础上建立了有机-水两相体系, 使生成的靛蓝可以及时被萃取到体系的有机相中. 两相体系因可以增加底物负荷, 减小高浓度底物

及产物对微生物的毒害作用, 提高产量等优点被广泛应用于微生物转化的研究中^[17-18], 利用两相体系结合固定化技术的生物转化研究已有前瞻性的报道^[19], 然而利用该体系解决靛蓝微生物转化过程中出现的具体问题却尚无报道.

有机相溶剂的选择是建立该体系的关键因素, 需要遵循以下几点原则: 较低生物毒性(研究认为 $\log P > 4$ 的有机溶剂对大部分微生物细胞无毒性^[20]), 较高的底物分配率, 较高的产物分配率. 根据以上原则, 本研究选择了 3 种有机溶剂: 正辛烷、正癸烷、正十二烷, 分别考察其对靛蓝转化的影响(见图 3). 结果表明, 以正十二烷为有机相的转化体系靛蓝产量最高, 反应 6 h 后的靛蓝浓度可达到 11.9 mg/L, 该体系有效避免了非两相体系中靛蓝被分解的现象, 从而使靛蓝产量得到了提高.



(a) 有机溶剂的选择



(b) 有机溶剂对靛蓝产量的影响

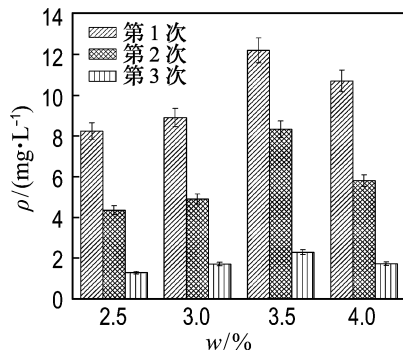
图 3 有机溶剂的选择及其对靛蓝产量的影响

Fig. 3 Choose of the organic solvents and the effect on indigo production

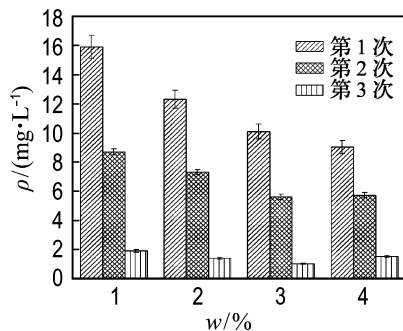
2.3 最佳包埋条件的确定

为进一步增加靛蓝的产量, 本研究对固定化过程的包埋条件进行了优化. 固定化过程中, 海藻酸钠的用量和交联剂氯化钙的用量对固定化细胞的活性、力学强度、内部多孔结构的影响较大, 通

过单因素条件优化,确定了这两个关键因素(见图4)分别为3.5%和1.0%。在此条件下,两相体系中固定化细胞的最高靛蓝产量分别为12.0和15.9 mg/L。第2次重复利用的固定化小球仍然保持了较高的活性,最高靛蓝产量分别为8.2和8.4 mg/L。底物和产物的毒性作用,以及反应条件的变化导致了固定化全细胞的活性降低,因此第3次重复利用的固定化小球转化吲哚的活性极弱,靛蓝产量较低。



(a) 海藻酸钠



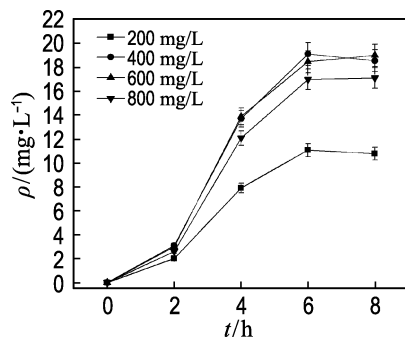
(b) 氯化钙

图4 海藻酸钠和氯化钙质量分数对靛蓝产量的影响

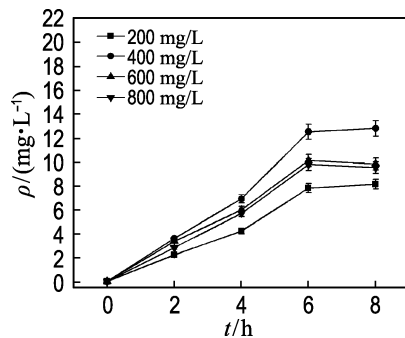
Fig. 4 Effects of mass fraction of SA and CaCl_2 on indigo production

2.4 有机溶剂比例和底物浓度对靛蓝产量的影响

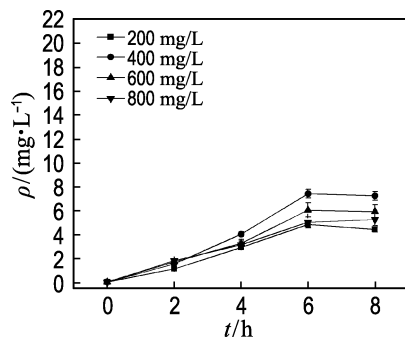
有机溶剂比例和吲哚浓度对靛蓝产量的影响见图5,靛蓝浓度在反应6 h后均达到最大值,不同吲哚浓度在不同有机相配比反应体系中的靛蓝产量有着相同的趋势,其中,吲哚浓度为400 mg/L时的靛蓝浓度是最高的,600 mg/L吲哚体系次之,200 mg/L吲哚体系的靛蓝浓度最低。当体系中的正十二烷为40%,吲哚浓度为400 mg/L时,固定化基因工程菌的靛蓝产率达到最大:0.28 mg/mg,是20%正十二烷体系的1.31倍。



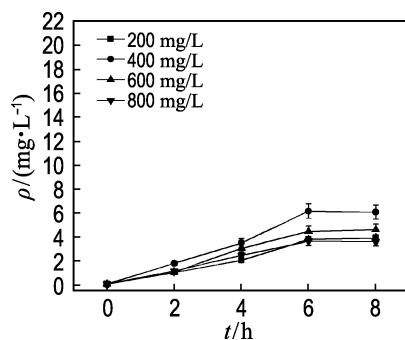
(a) 20%正十二烷



(b) 40%正十二烷



(c) 60%正十二烷



(d) 80%正十二烷

图5 有机溶剂比例以及吲哚浓度对靛蓝产量的影响

Fig. 5 The effects of organic solvents ratio and indole concentration on indigo production

以上结果证明,以海藻酸钠固定的 BphAB_{LA-4}

保留了较高的转化活性,在转化吡啶的过程中可以使生成的靛蓝避免被菌体细胞吸附,同时具有较好的回收利用价值.然而,靛蓝生成的同时却伴随着靛蓝的分解,在反应 8 h 后,反应体系中生成的靛蓝几乎完全被分解.两相体系的引入可以有效避免生成的靛蓝马上被分解的现象,当体系中正十二烷的比例为 40%,吡啶浓度为 400 mg/L 时,靛蓝产量达到最大值.虽然如此,本研究距离工业化规模的生产仍然还有相当大的距离,造成工程菌转化效率较低的原因,主要是重组菌的联苯双加氧酶的活性较弱,本实验室目前正在对重组菌株的基因改造进行进一步的研究,旨在获得较为理想的转化能力和转化效果,为微生物转化靛蓝的工业化生产提供更加详尽的信息.

3 结 论

(1) 利用不同方法固定基因工程菌 BphAB_{LA-4},其中海藻酸钠法固定的 BphAB_{LA-4} 有最高的转化活性,反应 6 h 后的靛蓝浓度为 9 mg/L;利用两相体系成功避免了反应过程中出现的靛蓝被分解的现象,正十二烷是效果最好的有机溶剂,反应 6 h 后的靛蓝浓度为 11.9 mg/L,是无机溶剂体系靛蓝浓度的 1.32 倍.

(2) 海藻酸钠法包埋 BphAB_{LA-4} 的最佳条件是 3.5% 海藻酸钠,1% 氯化钙,以此条件包埋的固定化小球在两相体系中可以重复利用两次;两相体系中正十二烷的最佳比例是 40%,吡啶的浓度为 400 mg/L,靛蓝产率达到最大 0.28 mg/mg.

参考文献:

- [1] Ensley B D, Ratzkin B J, Ossulund T D, *et al.* Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo [J]. **Science**, 1983, **222**(4620):167-169.
- [2] Gillam E M J, Notley L M, CAI Hong-liang, *et al.* Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes [J]. **Biochemistry**, 2000, **39**(45):13817-13824.
- [3] Guengerich F P, Sorrells J L, Schmitt S, *et al.* Generation of new protein kinase inhibitors utilizing cytochrome P450 mutant enzymes for indigoid synthesis [J]. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2004, **47**(12):3236-3241.
- [4] Murdock D, Ensley B D, Serdar C, *et al.* Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli* [J]. **Biotechnology (N Y)**, 1993, **11**(3):381-386.
- [5] McClay K, Boss C, Keresztes I, *et al.* Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regiospecificity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, **71**(9):5476-5483.
- [6] Bhushan B, Samanta S K, Jain R K. Indigo production by naphthalene-degrading bacteria [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2000, **31**(1):5-9.
- [7] 肖美燕,徐尔尼,陈志文.包埋法固定化细胞技术的研究进展[J].食品科学,2003,**24**(4):158-161.
XIAO Mei-yan, XU Er-ni, CHEN Zhi-wen. Development and application of the immobilized cell technology by entrapping methods [J]. **Food Science**, 2003, **24**(4):158-161. (in Chinese)
- [8] 李 蕾,李 杰.生物细胞固定化技术中的包埋材料[J].净水技术,2005,**24**(1):40-42.
LI Lei, LI Jie. Entrapping materials used in immobilization technology of microbial cells [J]. **Water Purification Technology**, 2005, **24**(1):40-42. (in Chinese)
- [9] 王 新,李培军,巩宗强,等.固定化细胞技术的研究与进展[J].农业环境保护,2001,**20**(2):120-122.
WANG Xin, LI Pei-jun, GONG Zong-qiang, *et al.* Development and application of immobilized cell technology [J]. **Agro-Environmental Protection**, 2001, **20**(2):120-122. (in Chinese)
- [10] 陆 燕.重组 P450 BM3 工程菌制备靛蓝过程优化、P450 BM3-GDH 共表达体系建立及其在靛蓝制备中的应用研究[D].杭州:浙江大学,2007.
LU Yan. Preparation of indigo by recombinant *E. coli* BL21 (pET28a(+)-P450 BM3) and *E. coli* BL21 (pET28a(+)-P450 BM3-GDH0310) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007. (in Chinese)
- [11] 薛 颖,张 芳,王 旻,等.两相体系中固定化细胞生物合成(S)-3, 5-双三氟甲基苯乙醇[J].中国医药工业杂志,2009,**40**(8):573-577.
XUE Ying, ZHANG Fang, WANG Wen, *et al.* Biosynthesis of (S)-3, 5-bis (trifluoromethyl) phenethyl alcohol with immobilized cells in biphasic system [J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, 2009, **40**(8):573-577. (in Chinese)
- [12] Doukyu N, Nakano T, Okuyama Y. Isolation of an *Acinetobacter* sp. ST-550 which produces a high level of indigo in a water-organic solvent two-phase system containing high levels of indole [J]. **Applied**

- Microbiology and Biotechnology**, 2002, **58**(4):543-546.
- [13] Doukyu N, Aono R. Biodegradation of indole at high concentration by persolvent fermentation with *Pseudomonas* sp. ST-200 [J]. **Extremophiles**, 1997, **1**(2):100-105.
- [14] 黄霞,俞毓馨,王蕾. 固定化细胞技术在废水处理中的应用[J]. 环境科学, 1992, **14**(1):41-48. HUANG Xia, YU Yu-xin, WANG Lei. Application of immobilization technology in wastewater treatment [J]. **Environmental Science**, 1992, **14**(1):41-48. (in Chinese)
- [15] 时胜男. 真菌和细菌协同脱色偶氮染料及其脱色特性研究[D]. 大连:辽宁师范大学, 2010. SHI Sheng-nan. Decolorization of azo dye by fungi and bacteria co-cultures and study on the characteristics [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2010. (in Chinese)
- [16] 谭靛. *Exiguobacterium* sp. TL 的性能及其处理高盐偶氮染料废水的研究[D]. 大连:大连理工大学, 2010. TAN Liang. Study of high-salt azo dye wastewater treatment by *Exiguobacterium* sp. TL and its performance [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2010. (in Chinese)
- [17] Leon R, Fernandes P, Pinheiro H M, *et al.* Whole-cell biocatalysis in organic media [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998, **23**(7-8): 483-500.
- [18] 梅建凤,陈虹,王鸿,等. 水/有机溶剂两相体系中生物转化合成 2-苯乙醇[J]. 化学反应工程与工艺, 2009, **25**(1):69-73. MEI Jian-feng, CHEN Hong, WANG Hong, *et al.* Synthesis of 2-phenylethanol by bioconversion in aqueous/organic solvent two-phase system [J]. **Chemical Reaction Engineering and Technology**, 2009, **25**(1):69-73. (in Chinese)
- [19] Garikipati S V B J, Mciver A M, Peeples T L. Whole-cell biocatalysis for 1-naphthol production in liquid-liquid biphasic systems [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, **75**(20):6545-6552.
- [20] 吴兆亮,胡滨,郑辉杰,等. 两液相培养中有机溶剂对细胞毒性的研究进展[J]. 生物技术, 2000, **10**(2):37-40. WU Zhao-liang, HU Bin, ZHENG Hui-jie, *et al.* Advances in studies on effects of toxicity of organic solvents on cells [J]. **Biotechnology**, 2000, **10**(2): 37-40. (in Chinese)

Research on characteristics of biotransformation of indigo by immobilized whole cell expressing biphenyl dioxygenase in biphasic system

QU Yuan-yuan*, XU Bing-wen, CONG Pei, WU Ying-ge,
ZHU Dan, MA Qiao, ZHANG Xu-wang, ZHOU Ji-ti

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education,
Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The extraction of indigo is delayed due to the adsorption of indigo by the free whole cell, which is one of the major difficulties during the biotransformation of indigo. Three immobilization methods are used, and sodium alginate immobilization method obtains the best results. The immobilized cell can be repeatedly used for two times in a biphasic system under the optimum immobilization condition: 3.5% sodium alginate, 1% CaCl_2 , and the indigo production is 15.9 mg/L after 6 h of the first transformation. Besides, the indigo decomposition can be avoided by the biphasic system with 40% dodecane as the optimal organic phase. The optimum indole tolerance concentration is 400 mg/L, and the productivity of indigo is 0.28 mg/mg.

Key words: biphenyl dioxygenase; gene engineering bacteria; indigo; sodium alginate; biphasic system