

苯酚羟化酶生物转化吡啶及甲基吡啶研究

张旭旺¹, 张强¹, 曲媛媛^{*1}, 时胜男², 许炳雯¹, 马桥¹, 沈娥¹, 周集体¹

(1. 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;

2. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 利用苯酚羟化酶基因工程菌 PH_{IND} 对吡啶及甲基吡啶进行生物转化. 结果表明, 除了 3-甲基吡啶外, PH_{IND} 能将吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶和 7-甲基吡啶转化成靛蓝类色素. 采用薄层色谱和液相-质谱等手段对转化产物进行鉴定, 结果表明, PH_{IND} 转化吡啶和 4-甲基吡啶得到的蓝色产物分别为靛蓝和 4,4'-二甲基靛蓝, 并推测了 PH_{IND} 转化吡啶及 4-甲基吡啶的反应途径. 采用表面响应法对 PH_{IND} 转化吡啶、2-甲基吡啶及 4-甲基吡啶的条件进行了优化, 在最优条件下, 菌株 PH_{IND} 转化吡啶合成靛蓝的最大产量为 93.74 mg/L, 其吡啶的转化效率为 52.63%, 且菌株 PH_{IND} 对 2-甲基吡啶和 4-甲基吡啶的最大转化率分别为 67.66% 和 95.61%.

关键词: 吡啶; 甲基吡啶; 苯酚羟化酶; 表面响应法

中图分类号: Q814; X172 **文献标志码:** A

0 引言

靛蓝是最古老的色素之一, 广泛用于印染、医药和食品等行业^[1-3]. 目前, 靛蓝的合成主要采用化学法, 但是, 化学合成过程中使用的原料和催化剂等均有潜在的致癌性, 而且还会产生含有苯胺等有毒物质的废水, 对环境有严重的污染^[4-5]. 因此, 绿色安全的微生物法合成靛蓝逐渐受到研究人员的广泛关注. 靛蓝的微生物合成最早报道于 1928 年, 但直到 1983 年后, 研究才取得了突破性的进展^[2,6-7]. 根据文献报道, 靛蓝的微生物合成主要利用双加氧酶或单加氧酶催化吡啶羟化形成 3-羟基吡啶, 后者在空气中氧化二聚形成靛蓝^[7-9]. 羧双加氧酶最早被用于靛蓝的微生物合成, 随后, 甲苯单加氧酶、黄素单加氧酶、P450 单加氧酶以及苯酚羟化酶等均有相关用于靛蓝合成的报道^[9-12]. 目前, 也有研究人员利用芳烃加氧酶转化吡啶衍生物合成靛蓝类色素或羟基吡啶, 这些产物是一些染料和药物合成的重要前体物质^[13-14]. 但对于吡啶衍生物转化途径及其产物的鉴定还有待深入研究.

本实验室分离了一株苯酚降解菌 *Arthrobacter* sp. W1, 扩增得到完整的苯酚羟化酶基因簇 PH, 并将其导入大肠杆菌 BL21(DE3) 中构建基因工程菌. 该苯酚羟化酶的 6 个组分 KLMNOP 与其他已报道的苯酚羟化酶各组分的相似性只有 51%~87%, 是一种新颖的苯酚羟化酶, 能很好地催化苯酚、甲酚等物质进行单加氧反应. 本研究将苯酚羟化酶用于吡啶及甲基吡啶的生物转化, 以期得到新颖的色素, 为靛蓝类色素的绿色合成探索新的途径.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本实验所用菌株为含有携带 PH 基因质粒的基因工程菌 *Escherichia coli* BL21(DE3), 命名为 PH_{IND}.

1.1.2 培养基 本实验所用培养基为 LB 培养基, 其组成(g/L)为 NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0; pH 7.0.

1.1.3 试剂与仪器 实验试剂靛蓝、吡啶、甲基吡啶、卡那霉素、IPTG(异丙基-β-D-硫代吡喃半

收稿日期: 2011-10-25; 修回日期: 2013-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51078054, 21176040, 20923006).

作者简介: 张旭旺(1986-), 男, 博士生; 曲媛媛*(1976-), 女, 副教授, 博士生导师, E-mail: qyy007@126.com.

乳糖苷)均购自百灵威公司,其余试剂均为国产分析纯.实验所用主要仪器有 Beckman Avanti™ J-30 型高速低温冷冻离心机(美国)、JASCO V-560 型紫外-可见分光光度计(日本)、Shimadzu LC-20A 型液相色谱(日本)、Agilent/HP 1100 MSD 型液质联机(美国).

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养 从 LB 平板中挑取单菌落于含 30 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的种子 LB 培养基中,在 150 r/min、30 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜培养.将种液按 2% 的接种量接种于含有 30 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6.向培养基中添加 1 mmol/L IPTG 诱导苯酚羟化酶的表达,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 下培养至 OD_{600} 为 1.0.然后将培养液在 8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min.收集的菌体用磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 7.0)洗涤 2 次后备用.

1.2.2 吲哚及甲基吲哚的转化实验 将收集好的菌体用磷酸盐缓冲溶液调节 OD_{600} 为 2.0,移取 20 mL 悬浮菌液于 50 mL 三角瓶中,再加入 1 mmol/L 葡萄糖,并分别加入 0.2 g/L 的吲哚以及 4 种不同甲基吲哚,然后置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 下反应 20 h.吲哚及甲基吲哚溶于 N,N-二甲基甲酰胺中配成母液添加.反应结束后,向反应液中加入 20 mL 乙酸乙酯进行产物的萃取,并进一步分析.

1.2.3 产物的分离、鉴定及定量检测

(1) 薄层色谱(TLC)分析

萃取得到的产物首先经氮吹去除乙酸乙酯,干燥后的产物悬浮于 500 μL 二氯甲烷中,并取 200 μL 进行 TLC 分析,展开剂为二氯甲烷/甲醇(体积比为 50:1).

(2) 液相-质谱(LC-MS)分析

选取吲哚和 4-甲基吲哚为模式底物对其转化产生的蓝色色素进一步鉴定.将 TLC 板上的蓝色产物分离出来,并重新悬浮于二氯甲烷中,然后利用 Agilent/HP 1100 MSD 进行分析.其中 LC 分析条件如下:RX-C18 色谱柱(5 μm , 150 mm $\times$ 2.1 mm, 美国),进样量为 10 μL ,流速为 0.3 mL/min,检测波长为 280 nm.流动相为甲醇/水,采用梯度洗脱:0~5 min, 60% 甲醇;5~15 min, 60%~65% 甲醇;15~30 min, 65%~100% 甲醇;30~45 min, 100% 甲醇. MS 分析条件如下:采用 APCI

离子源;以 N_2 为保护气和干燥气,干燥气流速为 8 L/min;雾化室温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;进行正模式扫描.

(3) 液相色谱(HPLC)定量检测

将乙酸乙酯萃取得到的产物经 0.45 μm 的有机滤膜过滤后,利用 Shimadzu LC-20A 测定产物的产量以及底物的消耗量. HPLC 条件如下: Hypersil ODS2 色谱柱(5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm);进样量为 10 μL ;流速为 1 mL/min;检测波长为靛蓝 280 nm,吲哚及甲基吲哚 265 nm. 流动相为甲醇/水,梯度洗脱:0~20 min, 60%~70% 甲醇.

1.2.4 吲哚及甲基吲哚转化的条件优化 采用表面响应法对吲哚及甲基吲哚生物转化过程进行条件优化.表面响应法可以对受多个变量影响的问题进行建模与分析,考察多个变量对目标的响应以及变量之间的相互作用,在有限的实验次数下对响应目标进行条件优化^[15]. 本研究中,以靛蓝的产量或甲基吲哚的转化率为响应目标,主要考察接菌量、底物浓度、反应体系 pH 和葡萄糖浓度对生物转化过程的影响.采用 Design Expert 7.1.3 软件设计实验及分析数据,由此得到 PH_{IND} 转化吲哚及甲基吲哚过程的显著影响因素及最佳条件.

2 结果与讨论

2.1 苯酚羟化酶对吲哚及甲基吲哚的生物转化

选取吲哚、2-甲基吲哚、3-甲基吲哚、4-甲基吲哚和 7-甲基吲哚 5 种底物,考察菌株 PH_{IND} 全细胞利用不同吲哚衍生物合成靛蓝类色素的可行性.由图 1 可知, PH_{IND} 能较好地转化吲哚、4-甲基吲哚和 7-甲基吲哚合成蓝色色素,同样,还能转化 2-甲基吲哚产生黄色色素,但是基本不能转化 3-甲基吲哚合成色素. Kim 等分别利用萘双加氧酶、甲苯双加氧酶和苯酚羟化酶(mPH_{KL28} 和 mPH_{KL33})对多种吲哚衍生物进行转化,结果表明,萘双加氧酶和苯酚羟化酶 mPH_{KL28} 均能转化吲哚、4-甲基吲哚和 7-甲基吲哚合成蓝色色素,但是对 2-甲基吲哚的转化没有明显效果,而甲苯双加氧酶和苯酚羟化酶 mPH_{KL33} 能转化吲哚合成蓝色色素,但是对甲基吲哚没有明显反应^[13-14]. 与之相比, PH_{IND} 对甲基吲哚的生物转化具有较好的活性.

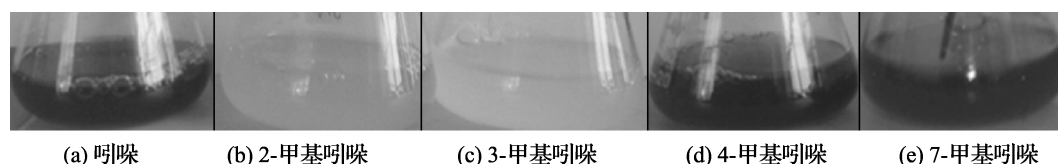


图 1 PH_{IND} 转化吲哚及甲基吲哚合成靛蓝类色素

Fig. 1 Production of indigo dyes from indole and methylindoles by PH_{IND}

2.2 吲哚及甲基吲哚转化产物的分离

选取吲哚、2-甲基吲哚和 4-甲基吲哚的转化产物进行 TLC 分析(见图 2). PH_{IND} 转化吲哚生成了粉色、紫色和蓝色 3 种色素,其中,蓝色色素的 R_f 值与标准靛蓝样品的 R_f 值一致,说明蓝色色素可能是靛蓝. 2-甲基吲哚的转化产物主要为黄色. 4-甲基吲哚的转化产物有蓝色和紫色 2 种色素,其中,蓝色色素的 R_f 值与标准靛蓝样品的 R_f 值接近,说明该蓝色色素可能与靛蓝具有类似的结构.

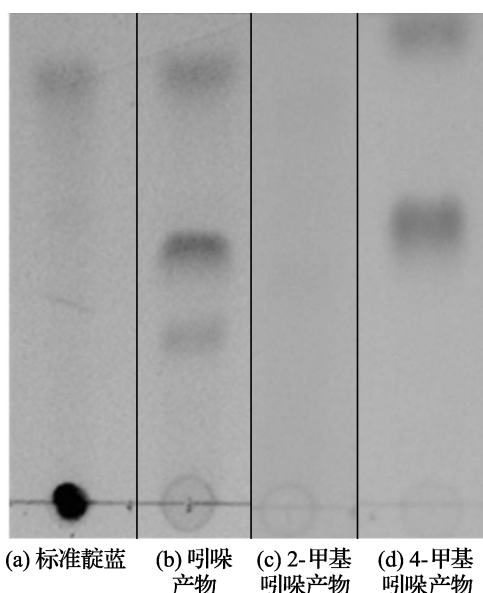


图 2 吲哚及甲基吲哚转化产物的 TLC 分析
Fig. 2 Identification of transformation products formed from indole and methylindoles by TLC

根据国内外的文献报道,微生物转化吲哚合成靛蓝,通常是利用单加氧酶或双加氧酶在吲哚吡咯环上的 C-3 位置进行羟化加氧,形成 3-羟基吲哚,随后,3-羟基吲哚在空气中氧化二聚形成靛蓝^[2,8]. 因此,PH_{IND} 能够利用苯酚羟化酶对吲哚、4-甲基吲哚和 7-甲基吲哚进行氧化,进而形成 3-羟基吲哚及甲基取代 3-羟基吲哚,并进一步合成靛蓝类色素. 对于 2-甲基吲哚,C-2 位置上的甲基

可能会在空间上阻碍苯酚羟化酶在 C-3 位置上的加氧,从而难以形成 3-羟基吲哚衍生物,阻碍了靛蓝类色素的合成,其转化产生的黄色色素则可能是苯酚羟化酶氧化产生的羟基吲哚类物质,这也与国外文献报道的相类似^[13-14]. 而对于 3-甲基吲哚,C-3 位置上的甲基完全阻碍了 C-3 位置上的羟化,因此难以得到靛蓝类色素.

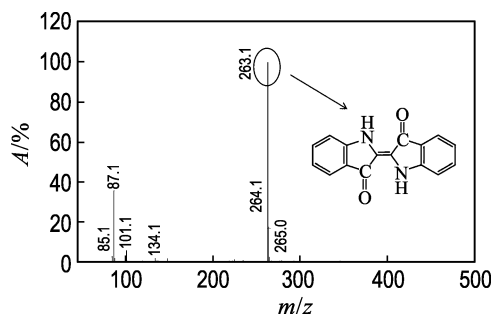
2.3 吲哚及甲基吲哚转化产物鉴定及机理推测

对吲哚和 4-甲基吲哚转化合成的蓝色色素进行 MS 分析. 由图 3(a)可知,吲哚转化的蓝色产物的分子离子峰为 263($[M-H^+]$),液相保留时间以及质谱特征与标准靛蓝样品的相一致,说明 PH_{IND} 转化吲哚合成的蓝色色素为靛蓝. 由图 3(b)可知,4-甲基吲哚转化的蓝色产物的分子离子峰为 291($[M-H^+]$),推测其为 4,4'-二甲基靛蓝. 目前文献报道中,对于吲哚的转化产物有了比较多的研究,但是对于甲基吲哚转化产物的研究相对较少^[8-9,13-14]. 本研究中,吲哚及 4-甲基吲哚转化产生的粉色和紫色产物还有待进一步深入解析.

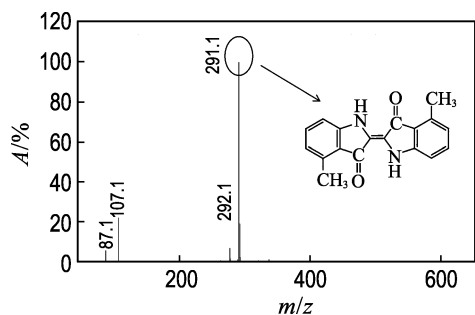
根据以上结果,结合国内外文献报道,本文推测了 PH_{IND} 转化吲哚以及 4-甲基吲哚合成蓝色色素的可能途径^[8-9]. 如图 4 所示,首先,吲哚或 4-甲基吲哚在 PH_{IND} 表达的苯酚羟化酶催化下在 C-3 位置氧化,形成 3-羟基吲哚或 3-羟基-4-甲基吲哚. 然后,3-羟基吲哚或 3-羟基-4-甲基吲哚可在空气中自发重排,并进一步氧化二聚形成靛蓝或 4,4'-二甲基靛蓝.

2.4 吲哚及甲基吲哚转化的条件优化

在吲哚及甲基吲哚的生物转化过程中,投加的菌量和底物浓度对于底物的消耗及产物的合成均有着直接的影响;反应体系 pH 可能对细胞内酶蛋白的稳定性有一定影响,进而影响细胞的催化活性;PH_{IND} 在转化吲哚及甲基吲哚时需要还原型辅酶 NADPH 提供电子,在反应过程中投加适量的葡萄糖可促使细胞不断再生还原型辅



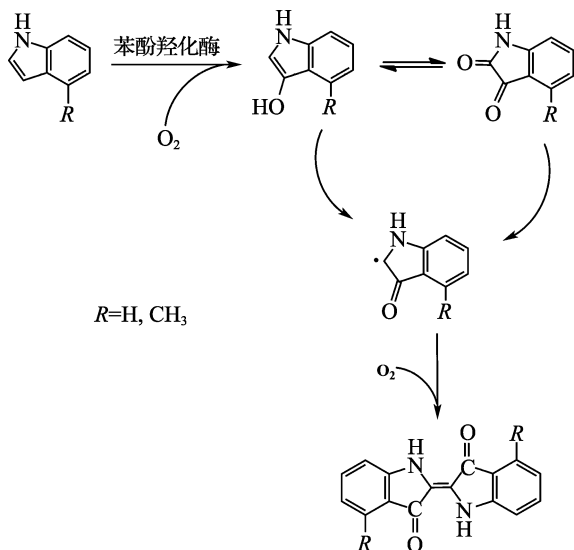
(a) 吲哚



(b) 4-甲基吲哚

图3 吲哚和4-甲基吲哚主要转化产物(蓝色色素)的MS图谱

Fig. 3 Mass spectra of major products (blue pigments) formed from indole and 4-methylindole

图4 PH_{IND}转化吲哚及4-甲基吲哚的推测途径Fig. 4 Proposed transformation pathway of indole and 4-methylindole by PH_{IND}

酶,进而保持反应的正常进行.因此,以吲哚、2-甲基吲哚和4-甲基吲哚为研究底物,选取接菌量(OD_{600} ,因素A)、底物浓度(mg/L,因素B)、反应体系pH(因素C)和葡萄糖浓度(mmol/L,因素

D)为主要影响因素,采用表面响应法对其生物转化过程进行优化.以靛蓝的产量(mg/L)为吲哚转化的响应目标,而由于2-甲基吲哚和4-甲基吲哚的转化产物缺少标准品,以2-甲基吲哚和4-甲基吲哚的转化率(%)为其条件优化的响应目标,实验设计及结果如表1所示.

利用软件 Design Expert 7.1.3 对实验数据进行二次多元回归拟合,得到响应目标的预测值函数分别如下.

吲哚:

$$Y = -383.2 + 85.01A + 0.2220B + 90.43C + 84.29D + 0.01726AB - 3.462AC - 5.594AD - 0.01904BC + 0.1241BD - 2.682CD - 10.10A^2 - 7.495 \times 10^{-4}B^2 - 5.656C^2 - 45.44D^2$$

2-甲基吲哚:

$$Y = -33.73 + 17.02A + 0.2953B + 6.724C + 32.97D + 0.1132AB - 1.297AC + 7.928AD + 5.356 \times 10^{-3}BC - 0.07962BD - 3.169 \times 10^{-3}CD - 7.037A^2 - 1.258 \times 10^{-3}B^2 - 0.5307C^2 - 13.54D^2$$

4-甲基吲哚:

$$Y = -32.57 + 40.69A - 0.2703B + 23.99C + 40.62D + 0.08623AB - 0.06412AC - 0.05086AD + 9.397 \times 10^{-3}BC - 0.02566BD - 0.5030CD - 10.54A^2 - 4.731 \times 10^{-5}B^2 - 1.932C^2 - 16.32D^2$$

其中Y为靛蓝产量或2-甲基吲哚及4-甲基吲哚的转化率.根据上式进行计算,得到的响应目标预测值列于表1.

利用ANOVA对各回归模型进行显著性检验,结果见表2.其中,F值为回归模型中回归平方和方差与残差平方和方差的比值, p 值($P > F$)小于0.05时说明考察的模型及因素具有统计学意义^[15].由表2可知,3种模型的 p 值均小于0.0001,表明模型具有显著性.对于吲哚、2-甲基吲哚和4-甲基吲哚,各模型的 R^2 (复相关系数的平方)分别为0.9157、0.9014和0.9354,表明对应的模型可信度为91.57%、90.14%和93.54%,说明模型对实际情况拟合得较好.

表 1 PH_{IND} 转化吲哚及甲基吲哚的优化实验设计

Tab. 1 Optimization experimental design for transformation of indole and methylindoles by PH_{IND}

序号	A	B	C	D	靛蓝产量(吲哚)/(mg·L ⁻¹)		转化率/%			
					实验值	预测值	2-甲基吲哚		4-甲基吲哚	
							实验值	预测值	实验值	预测值
1	2.50	300.00	5.00	0.50	58.67	56.88	44.80	51.68	74.80	76.58
2	2.00	400.00	7.00	1.00	40.23	45.35	2.92	7.62	65.93	69.18
3	2.00	200.00	7.00	1.00	93.72	86.78	59.90	57.10	89.90	86.12
4	1.00	300.00	5.00	1.50	4.95	17.53	5.82	6.14	35.82	32.50
5	1.00	100.00	9.00	0.50	47.50	46.08	26.87	28.33	56.87	58.56
6	2.00	200.00	7.00	1.00	90.87	86.78	57.22	57.10	87.22	86.12
7	2.50	300.00	9.00	0.50	35.22	46.36	45.41	42.09	75.41	75.76
8	0	200.00	7.00	1.00	0	0	0	8.19	0	0
9	3.00	100.00	5.00	0.50	73.87	60.84	18.46	29.64	78.46	82.01
10	3.00	100.00	9.00	0.50	70.11	72.87	13.75	13.31	73.75	71.72
11	1.00	300.00	5.00	0.50	4.33	18.99	9.16	16.03	39.16	34.78
12	2.00	200.00	7.00	1.00	78.60	86.78	55.83	57.10	85.83	86.12
13	1.00	300.00	9.00	0.50	12.05	13.76	10.32	14.09	40.32	32.20
14	3.50	200.00	7.00	1.00	87.86	85.11	67.56	56.84	97.57	85.34
15	2.50	300.00	9.00	1.50	29.04	43.86	27.85	44.08	67.86	71.38
16	2.00	200.00	7.00	0	31.95	38.31	36.13	37.64	66.13	70.57
17	2.50	100.00	5.00	1.50	31.06	34.76	56.11	53.87	86.11	89.26
18	2.00	0	7.00	1.00	0	0	100.00	10.58	100.00	99.85
19	2.00	200.00	7.00	2.00	40.00	37.39	50.67	49.48	70.67	69.02
20	2.00	200.00	3.00	1.00	5.33	0.05	61.18	57.76	61.18	62.68
21	2.00	200.00	7.00	1.00	89.45	86.78	56.41	57.10	86.42	86.12
22	2.50	100.00	9.00	1.50	29.33	20.12	39.69	40.13	69.70	77.08
23	2.00	200.00	9.00	1.00	29.32	56.88	38.03	50.41	68.03	74.67
24	1.00	100.00	5.00	1.50	13.00	13.13	30.00	40.18	70.47	71.20
25	2.00	200.00	7.00	1.00	89.45	86.87	56.53	57.10	86.54	86.12
26	2.00	200.00	7.00	1.00	72.90	86.78	55.53	57.10	85.53	86.12
27	2.50	300.00	5.00	1.50	47.50	59.08	45.94	53.82	75.95	76.36
28	1.00	100.00	5.00	0.50	16.45	11.89	46.58	34.27	76.58	68.35
29	1.00	300.00	9.00	1.50	5.71	10.10	10.62	4.18	30.63	27.90
30	1.00	100.00	9.00	1.50	8.00	6.08	39.59	34.22	69.59	59.40

表 2 3 种模型的 ANOVA 结果

Tab. 2 ANOVA results for the three models

模型	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	p 值	R ²
吲哚	25 294.88	1 806.78	10.86	<0.000 1	0.915 7
2-甲基吲哚	10 441.54	745.82	9.14	<0.000 1	0.901 4
4-甲基吲哚	11 777.92	841.28	14.49	<0.000 1	0.935 4

同样,对这 3 种模型中各因素进行 ANOVA,结果如表 3 所示.对于吲哚,A、D、A²、B²、C²和 D²的 p 值均小于 0.05,可见接菌量、吲哚浓度、

反应体系 pH 以及葡萄糖浓度对 PH_{IND} 转化吲哚合成靛蓝均具有显著的影响.对于 2-甲基吲哚,A、AB、A²和 B²的 p 值小于 0.05,说明接菌量和 2-甲基吲哚浓度对 PH_{IND} 转化 2-甲基吲哚具有显著影响,但是反应体系 pH 和葡萄糖浓度影响不明显.此外,模型中 AB 的 p 值小于 0.05,说明这两个因素对 PH_{IND} 转化 2-甲基吲哚存在显著的相互作用.对于 4-甲基吲哚,A、B、AB、A²、C²和 D²的 p 值均小于 0.05,说明接菌量、4-甲基吲哚浓度、反应体系 pH 以及葡萄糖浓度对 PH_{IND}

表 3 各模型中不同因素的 ANOVA 结果
Tab.3 ANOVA results for different factors from each model

因素	p 值		
	吲哚	2-甲基吲哚	4-甲基吲哚
A	0.000 2	0.001 0	< 0.000 1
B	0.133 3	0.326 8	0.001 5
C	0.177 1	0.055 7	0.065 6
D	0.048 6	0.148 3	0.811 3
AB	0.675 1	0.001 3	0.002 8
AC	0.098 2	0.359 2	0.956 5
AD	0.495 8	0.178 9	0.991 6
BC	0.258 7	0.643 5	0.341 9
BD	0.077 8	0.103 4	0.516 5
CD	0.420 7	0.998 9	0.796 2
A ²	0.009 2	0.009 5	0.000 1
B ²	0.037 9	< 0.000 1	0.810 1
C ²	< 0.000 1	0.376 9	0.001 5
D ²	0.000 4	0.072 3	0.014 8

转化 4-甲基吲哚均具有显著的影响,并且接菌量和 4-甲基吲哚浓度存在显著的相互作用.综合考虑,在 PH_{IND} 转化吲哚及甲基吲哚的过程中,主要影响因素是接菌量和底物浓度.

利用软件 Design Expert 7.1.3 可以得到这 3 个模型中各因素间相互作用的 3D 图,其中典型的如图 5 所示,由图可明显看出两两因素的相互作用对响应目标的影响.

经模型预测,得到 PH_{IND} 转化吲哚及甲基吲哚的最优条件分别如下.

吲哚:接菌量 OD₆₀₀ 为 2.96,吲哚浓度为 159.09 mg/L,反应体系 pH 为 6.44,葡萄糖浓度为 0.75 mmol/L,在此条件下 PH_{IND} 转化吲哚合成靛蓝的最大产量为 93.74 mg/L,吲哚的转化效率为 52.63%.

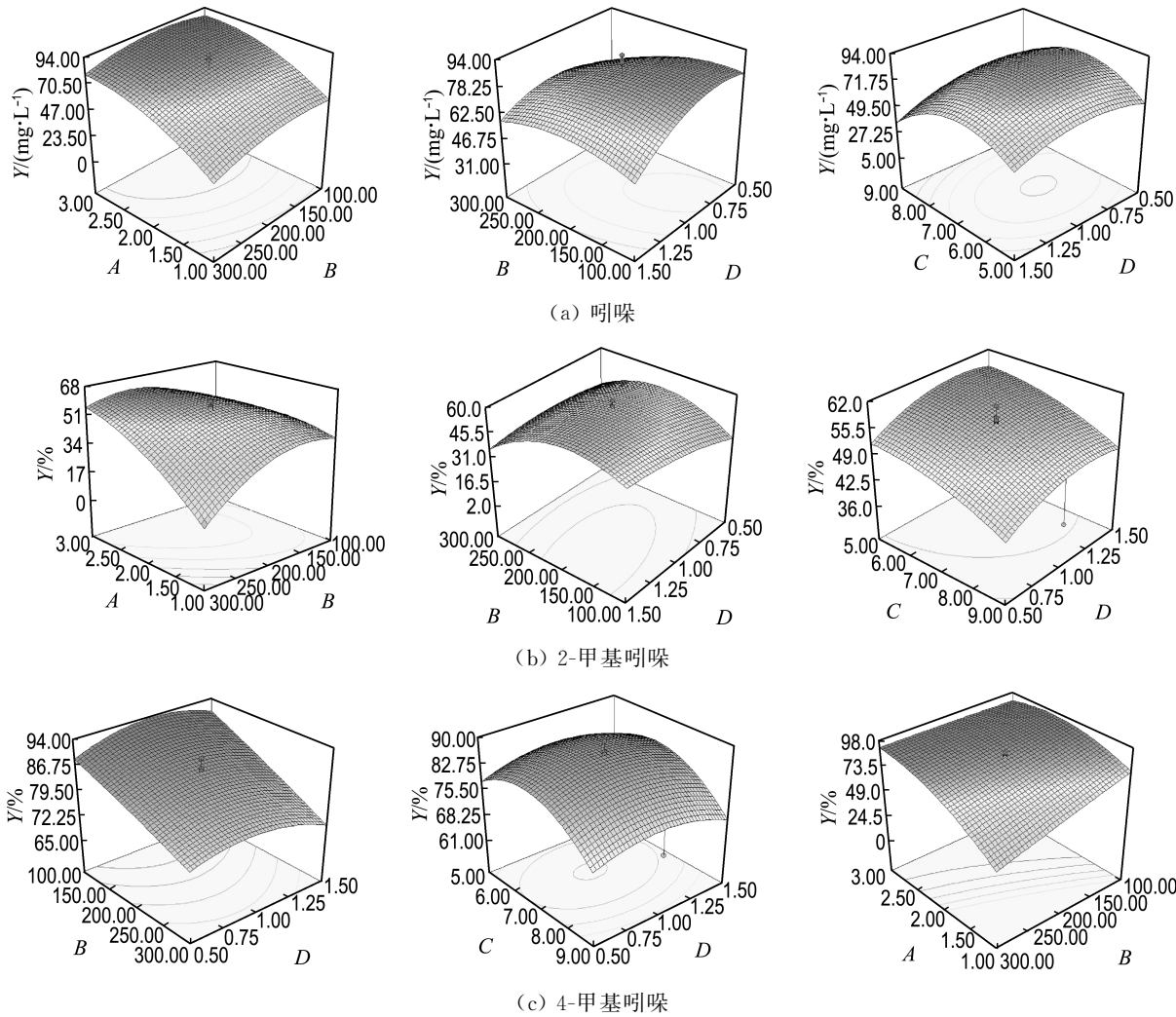


图 5 PH_{IND} 转化吲哚、2-甲基吲哚和 4-甲基吲哚过程中四因素相互作用的 3D 表面响应图
Fig.5 3D response surface plot showing the effect of the four factors on transformation of indole, 2-methylindole and 4-methylindole by PH_{IND}

2-甲基吲哚:接菌量 OD_{600} 为 2.96,2-甲基吲哚浓度为 209.55 mg/L,反应体系 pH 为 5.11,葡萄糖浓度为 1.50 mmol/L,在此条件下 PH_{IND} 对 2-甲基吲哚的最大转化率为 67.66%.

4-甲基吲哚:接菌量 OD_{600} 为 2.32,4-甲基吲哚浓度为 100.00 mg/L,反应体系 pH 为 6.28,葡萄糖浓度为 1.07 mmol/L,在此条件下 PH_{IND} 对 4-甲基吲哚的最大转化率为 95.61%.

通过采用表面响应法对菌株 PH_{IND} 转化吲哚及甲基吲哚过程中的关键因素进行了优化,为工程菌 PH_{IND} 走向实际应用提供了一定的理论和实践基础.本研究的结果也表明,苯酚羟化酶基因工程菌 PH_{IND} 对吲哚及其衍生物具有较好的转化能力,将其应用于靛蓝类色素的合成具有一定的潜力.

3 结 论

(1) 苯酚羟化酶基因工程菌 PH_{IND} 能转化吲哚、2-甲基吲哚、4-甲基吲哚和 7-甲基吲哚合成不同色素,但不能转化 3-甲基吲哚合成色素.

(2) 采用 TLC 和 LC-MS 等手段对 PH_{IND} 转化吲哚和甲基吲哚的产物进行鉴定,证实吲哚和 4-甲基吲哚转化的蓝色产物分别为靛蓝和 4,4'-二甲基靛蓝,同时推测了其转化途径.

(3) 采用表面响应法考察了接菌量、底物浓度、反应体系 pH 和葡萄糖浓度对 PH_{IND} 转化吲哚、2-甲基吲哚和 4-甲基吲哚的影响,并得到了转化的最优条件,为深入探索微生物合成靛蓝的工艺条件奠定了基础.

参考文献:

- [1] 吴 祺. 拜耳与合成靛蓝[J]. 化学通报, 2001, 64(8):527-529.
WU Qi. Adoef von Baeyer and the synthetic indigo [J]. **Chemistry**, 2001, 64 (8): 527-529. (in Chinese)
- [2] 韩晓红,王 伟,肖兴国. 靛蓝及其同类色素的微生物生产与转化[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 921-926.
HAN Xiao-hong, WANG Wei, XIAO Xing-guo. Microbial biosynthesis and biotransformation of indigo and indigo-like pigments [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2008, 24 (6): 921-926. (in Chinese)
- [3] QU Yuan-yuan, PI Wen-qing, MA Fang, *et al.* Influence and optimization of growth substrates on indigo formation by a novel isolate *Acinetobacter* sp. PP-2 [J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101(12):4527-4532.
- [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**, 1993, 11(3):381-386.
- [5] 顾毓刚,吕 敏,刘京伟. 靛蓝生产废水治理[J]. 上海化工, 2001(16):12-14.
GU Yu-gang, LV Min, LIU Jing-wei. The treatment for indigo production wastewater [J]. **Shanghai Chemical Industry**, 2001(16):12-14. (in Chinese)
- [6] Gray P M M. The formation of indigotin from indole by soil bacteria [J]. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, 1928, 102:263-280.
- [7] Ensley B D, Ratzkin B J, Osslund 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.
- [8] Meyer A, Würsten M, Schmid A, *et al.* Hydroxylation of indole by laboratory-evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(37):34161-34167.
- [9] 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.
- [10] Gillam E M, Guengerich F P. Exploiting the versatility of human cytochrome P450 enzymes: the promise of blue roses from biotechnology [J]. **IUBMB Life**, 2001, 52(6):271-277.
- [11] Doukyu N, Toyoda K, Aono R. Indigo production by *Escherichia coli* carrying the phenol hydroxylase gene from *Acinetobacter* sp. strain ST-550 in a water-organic solvent two-phase system [J].

- Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, **60**(6):720-725.
- [12] Han Gui-hwan, Bang Seong-eun, Babu B K, *et al.* Bio-indigo production in two different fermentation systems using recombinant *Escherichia coli* cells harboring a flavin-containing monooxygenase gene (*fmo*) [J]. **Process Biochemistry**, 2011, **46**(3): 788-791.
- [13] Kim J Y, Lee K, Kim Y, *et al.* Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2003, **36**(6):343-348.
- [14] Kim J Y, Kim J K, Lee S O, *et al.* Multicomponent phenol hydroxylase-catalysed formation of hydroxyindoles and dyestuffs from indole and its derivatives [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2005, **41**(2):163-168.
- [15] PAN Hai-feng, XIE Zhi-peng, BAO Wen-na, *et al.* Optimization of culture conditions to enhance cis-epoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2008, **42**(2): 133-138.

Research on biotransformation of indole and methylindoles by phenol hydroxylase

ZHANG Xu-wang¹, ZHANG Qiang¹, QU Yuan-yuan^{*1}, SHI Sheng-nan²,
XU Bing-wen¹, MA Qiao¹, SHEN E¹, ZHOU Ji-ti¹

(1. Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education,

Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology,
Harbin 150090, China)

Abstract: The gene engineering strain PH_{IND} expressing phenol hydroxylase is used to catalyze the biotransformation of indole and methylindoles. The experimental results indicate that indole, 2-methylindole, 4-methylindole and 7-methylindole can be transformed into various indigoid pigments except for 3-methylindole. The predominant color products are identified by thin-layer chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analyses, and the major products (blue pigment) derived from indole and 4-methylindole are authenticated as indigo and 4, 4'-dimethylindigo, respectively. Meanwhile, the biotransformation pathways of indole and 4-methylindole by PH_{IND} are proposed. Response surface methodology is applied to optimize the biotransformation conditions of indole, 2-methylindole and 4-methylindole by PH_{IND}. Under the optimal conditions, the indigo yield and transformation efficiency of indole are 93.74 mg/L and 52.63%, respectively, while the maximum transformation rates of 2-methylindole and 4-methylindole are 67.66% and 95.61%, respectively.

Key words: indole; methylindoles; phenol hydroxylase; response surface methodology