

## 用重组大肠杆菌 JM109(pKST11)转化苯生产 顺-1,2-二羟基-3,5-环己二烯

曲向华<sup>1</sup> 陈金春<sup>2\*</sup> 马祺祥<sup>2</sup> 孙世尧<sup>2</sup> 陈国强<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(新疆大学生物科学与技术学院微生物室, 乌鲁木齐 830046)

<sup>2</sup>(清华大学生物科学与技术系微生物实验室, 北京 100084)

**摘要** 顺-1,2-二羟基-3,5-环己二烯(简称 DHCD)是航天业、电子工业、医药业以及精细化工业上重要的手性化合物。利用重组 *E. coli* JM109(pKST11)采用适时监测发酵过程中全细胞甲苯双加氧酶(Toluene dioxygenase, TDO)活性的方法,研究了发酵生产 DHCD 工艺中的重要影响因子 IPTG 以及底物苯的供给方式对 DHCD 产量的影响。研究表明(1)发酵初期利用 IPTG 诱导 TDO 的表达,不利于细胞生长,在对数生长期(6 或 8h),采用 0.5mmol/L IPTG 即可诱导出 TDO 的最高表达。(2)发酵液中的苯对全细胞甲苯双加氧酶(TDO)的活性有抑制作用,而利用液体石蜡作为缓释剂进行两相法发酵则降低了苯的毒害,明显提高了 DHCD 的产量。当采用传统的通气供苯方法, DHCD 的产量仅有 7.5 g/L,批式添加液体石蜡与苯的混溶物使 DHCD 的产量提高到 22.6 g/L,是通气供苯法的 3 倍;而采用流加的方式添加液体石蜡与苯的混溶物使 DHCD 的产量进一步提高到 36.8 g/L,是通气供苯法的 5 倍。证明通过发酵工艺的优化可以解决苯的毒害与苯作为反应底物在水相中需要有一定浓度之间的矛盾,获得较好的转化结果。

**关键词** 顺-1,2-二羟基-3,5-环己二烯, 甲苯双加氧酶, 重组大肠杆菌, 生物转化

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2003)01-0074-07

聚芳香族化合物是电子工业和航天航空工业所需要的高性能聚合物,具有稳定性好、强度高、耐高温、阻燃、耐久性好、耐腐蚀、电性能好等一系列优异综合性能<sup>[1]</sup>。其中聚苯在所有的高分子材料中,最不易被氧化,最耐高温(可耐 600~800℃),最耐腐蚀(不被强酸强碱以及微生物降解),最抗辐射,最耐磨,同时因为其三维螺旋状结构,而具有更为独特的性能。例如,当对聚苯通以电流时,苯环的  $\pi$  键会产生振动而发光,经过处理,能发出蓝光、绿光和红光,这项技术的突破,将会给超薄显示器业带来一场革命<sup>[2]</sup>。但是也正因为苯环的稳定性,使得单纯利用化学技术生产聚苯,存在很多缺点。目前,可以通过直接聚合苯、卤苯或者 1,3-环己二烯等单体获得聚苯,但是都存在反应条件苛刻、需要使用大量的金属催化剂、反应产物不纯、反应后处理复杂、合成聚苯分子量低等缺点<sup>[3]</sup>。因此,如何利用合适的前体化合物进行聚合,以避免制造聚苯工艺上的困难,成为

聚苯在工业上广泛应用的瓶颈。利用微生物如 *Pseudomonas putida* 可以将苯转化为顺-1,2-二羟基-3,5-环己二烯(DHCD),将 DHCD 衍生化之后,通过分步加热的过程可以控制合成聚苯的分子量。整个反应具有条件温和、立体专一性强、产量高、没有杂原子掺入、成本低以及环境污染小的优点<sup>[1]</sup>。因为无法用化学方法直接转化苯合成 DHCD<sup>[4]</sup>,使得利用微生物进行苯的转化成为极为可行的研究重点。

手性化合物 DHCD 除了可以聚合为聚苯以外,在医药产业以及精细化工业也是极为重要的单体,如可以合成前列腺素<sup>[5]</sup>、右旋肌醇甲醚<sup>[6]</sup>、磷酸肌醇<sup>[7]</sup>、萜烯<sup>[8]</sup>、生物碱<sup>[9]</sup>等。DHCD 的发酵生产是利用可以降解苯等芳香化合物的微生物 *Pseudomonas putida* 所具有的甲苯双加氧酶(Toluene dioxygenase 或 TDO),在苯环上引入 2 个氧原子而得以实现。利用 *P. putida* 缺失 DHCD 降解酶的突变株可以将苯转化为 DHCD 并进一步累积<sup>[10]</sup>。但是利用

收稿日期 2002-07-01, 修回日期 2002-10-24。

基金项目 2000 中国航天科技创新基金 2002 年 863 计划课题 基金资助(No. 2002AA333030)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-62783844; Fax: 86-10-62788784; E-mail: chenjc@mails.tsinghua.edu.cn; chenqc@mails.tsinghua.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

突变体生产,存在回复突变的弊端,导致产量低,产物不纯,夹杂副产物等结果<sup>[11]</sup>。

已有报道认为,TDO只占细胞总蛋白的极小一部分,所以提高细胞内酶的浓度有可能增加反应速率。将TDO酶基因克隆至一个高拷贝质粒上,使其表达控制在有效的可调节的启动子的作用下即可实现TDO酶的过表达<sup>[12-13]</sup>,同时,重组工程菌的稳定性可以控制,也可以解决由于突变体不稳定造成的副产物的产生以及DHCD的分解等问题。本论文利用重组*E. coli* JM109(pKST11)研究了发酵生产DHCD的过程中主要的影响因子IPTG以及底物苯对于苯的转化的影响,确定了切实可行的发酵工艺流程,为进一步合成聚苯的研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*E. coli* JM109(pKST11)由英国Warwick大学Heather Luckarift教授惠赠,清华大学生物系微生物室保存。

### 1.2 培养基

种子培养基为LB加氨苄青霉素(100mg/L),发酵培养基采用修改的LB加氨苄青霉素(100mg/L)培养基。发酵过程中采用流加方式补加葡萄糖,流加葡萄糖浓度为500g/L。

### 1.3 发酵方法

在LB加氨苄青霉素(100mg/L)平板上检验单菌落,具有甲苯双加氧酶活性的单菌落可将挥发的吡啶转化为靛蓝而形成蓝色菌落。将检验为阳性的单菌落转至LB加氨苄青霉素(100mg/L)摇瓶中,37℃,200 r/min培养10~12h后,以10%接种量接至装有3L发酵培养基的5L BioFLO3000(NBS, New Brunswick, USA)发酵罐中。pH及溶氧(Dissolved oxygen或DO)用在线自动检测(P-I-D)监测。转速200~1000r/min,通过转速调节溶氧,使之恒定于30%。当转速不上升,不产酸时流加500g/L葡萄糖,根据细菌的生长状况控制葡萄糖的流加速度。发酵初期温度设为37℃,空气流速设为3.0L/min,在利用IPTG诱导甲苯双加氧酶活性前,温度设为30℃。通苯前将空气流速设为1.5 L/min,以减少苯的损失。在研究IPTG的使用量及使用时间对于DHCD产量的影响时,均采用两相法,批式流加初始比例为15:1的液体石蜡与苯的混溶物,流加时间为补加IPTG之后的2h,补加次数以不大幅度改变转速和溶氧的变化为原则,平均为1次/2h。研究供苯方式对于苯转

化的影响时,均采用0.5 mmol/L IPTG,在诱导后2h时(批式流加)或同时(连续流加)流加不同比例液体石蜡与苯的混溶物,连续流加时流速的设定以转速和溶氧的变化情况作为参比,以不大幅度改变两者的变化为原则,平均流速在0.2mL/min~1.5mL/min之间,DHCD累积结束时发酵终止。批式流加时,第一次补加不同比例的液体石蜡和苯的混溶物,之后补加的均是液体石蜡与苯1:1的混溶物。连续流加时流加的始终是不同比例的液体石蜡和苯的混溶物。

### 1.4 细胞光密度(optical density或OD)的测定

菌液稀释合适倍数后于波长620 nm处以灭菌后的发酵培养基为对照进行比色测定。

### 1.5 全细胞甲苯双加氧酶(Toluene dioxygenase或TDO)活性的测定

据Woo *et al.*<sup>[14]</sup>稍改,在靛蓝的特定吸收峰600 nm以乙酸乙酯为空白测定OD<sub>600</sub>,利用靛蓝-OD<sub>600</sub>标准曲线定量靛蓝,每分钟形成1mg靛蓝为1个酶活力单位(u)。

### 1.6 DHCD的测定

采用BIO-RAD公司Biologic Duo-Flow HPLC测定。色谱柱为Diamonsil公司C18烷基化硅柱(250mm×5mm,5μm)。流动相为甲醇:水(2:1),流速0.6 mL/min,进样量为50μL,检测器为254nm紫外检测器。以标准DHCD(Sigma)与峰面积做标准曲线测定发酵液中DHCD含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 IPTG使用时间对于TDO活力的影响

本研究中采用的质粒pKST11选用*tac*启动子的高拷贝质粒,转入的*E. coli* JM109工程菌中已插入*lacI<sup>q</sup>*基因以保证有较多的*lacI*阻遏蛋白产生,实现严密调控外源基因的转录能力。IPTG目前已经被广泛用于诱导*tac*启动子的转录,但已有研究表明,IPTG的使用量可以影响外源基因的表达水平<sup>[11]</sup>。由于利用苯作为反应底物时,对于细胞生长有极大的抑制,使得IPTG的加入时间直接影响细胞转化时间的长短。本研究采用两相法,将液体石蜡与苯的混溶物以15:1的初始比例进行批式流加,分别考察了0.5mmol/L IPTG于0,4,6,8h添加时对于TDO活力的影响(图1)。研究结果表明,IPTG的使用时间直接影响TDO的活力。发酵初始即加入IPTG时,尽管在4h TDO即有低量表达,但是TDO活力仅持续至10h,同时对于细胞生长有严重抑制。

$OD_{620\max}$  仅有 5.48(表 1)。4h 诱导时, TDO 活力较低, 虽然后期持续在一定水平, 但是此时细胞转化能力下降, 因此最终 DHCD 的产量仅有 12.1g/L(表 1), 说明发酵初期使用 IPTG 诱导 TDO 基因时, 可能是由于外源基因的表达竞争利用物质、能量、核糖体等干扰宿主细胞的正常代谢活动, 使得细胞的生长严重受抑, 导致转化效率极低。对数中期(6 或 8h)诱导 TDO 基因的表达时, 细胞的 TDO 活性均高于未用 IPTG 的对照组, 说明在合适的时间利用 IPTG 进行诱导, 有利于外源基因的表达, 最终 DHCD 的产量均达到 20~22g/L。无论是对照组还是诱导时间为 6h 或者 8h 添加苯之后, 对于 TDO 活力来说, 都显示相同的快速下降趋势, 说明发酵液中的苯对于 TDO 的活力有较强的抑制, 因此降低苯在发酵液中的浓度, 尽可能的使 TDO 活力维持在较高水平, 同时延长细胞的对数生长期有可能提高 DHCD 的产量。没有采用 IPTG 诱导的对照组, 同样有较高的 TDO 活力, 说明对于高拷贝复制子构建表达的载体, *tac* 启动子关闭不严, 仍有较高的本底转录, 这对于细胞初期生长可能会有一些不利的影响。

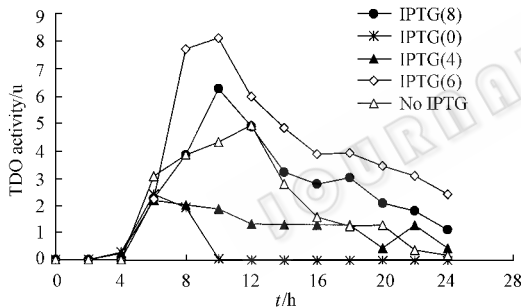


图 1 IPTG 的使用时间对于细胞 TDO 活力的影响

Fig.1 Effect of various IPTG adding times on TDO activity in whole cells

*E. coli* JM109 (pKST11) was grown at 37°C in a 5 L NBS fermentor. Transformation was conducted at 30°C. Number in“( )” indicates time of IPTG addition

## 2.2 IPTG 的使用量对 DHCD 产量的影响

在发酵中, 采用 IPTG 诱导外源基因的表达, 除了对细胞生长有一定的抑制作用以外, 还具有增加经济成本的缺点。但是低剂量诱导有可能导致诱导效率低, 未能达到 TDO 基因的最高表达, 因此继续就 IPTG 的使用量对 DHCD 的产量的影响进行考察。不改变其他发酵条件, 分别于 6, 8h 添加 1mmol/L IPTG, 2h 后采用批式流加初始比例为 15:1 的液体石蜡与苯的混溶物的方法进行研究(表 1)。比较细胞生长的最大值( $OD_{620\max}$ )、6 及 8h 添加 IPTG 的, 无

论 IPTG 的使用量是多少, 都远高于在发酵初期(0 或者 4h)使用 IPTG 的实验组, 说明 IPTG 的早期诱导不利于细胞的生长, 尤其在发酵初始添加 0.5mmol/L IPTG 的实验组(表 1(0)项), 因为细胞生长量较少,  $OD_{620\max}$  仅有 5.48, 因此添加苯的量远远低于其他组, 达到 80mL 时细胞即没有转化力, 最终 DHCD 的产量仅有 7.5g/L。使用时间为 6h 或者 8h 的 4 个实验组, 就细胞生长而言, 与未加 IPTG 的对照组差别不大。但是比较 TDO 活力可见, 相同的使用时间下, 1mmol/L IPTG 的实验组, 最大细胞量稍高于 0.5mmol/L IPTG 的条件下,  $TDO_{\max}$  反而低于使用量为 0.5mmol/L IPTG 的实验组, 说明 0.5mmol/L IPTG 已经可以诱导出 TDO 的最高表达, 因此研究苯的供给方式的影响时, 均采用 0.5mmol/L IPTG 于 6h 进行诱导。从  $TDO_{\max}$  和 DHCD 最终产量的关系而言, 并没有呈现相关性: 如 8h 使用 1mmol/L IPTG 实验组的  $TDO_{\max}$  只有 5.83u, 比 6h 使用 0.5mmol/L IPTG 的实验组的 8.16u 低, 但是最终 DHCD 的产量相差无几, 说明 *E. coli* JM109 (pKST11) 转化苯生产 DHCD 的过程中, 与 TDO 作用时间长短以及细胞所处的生长期密切相关。

## 2.3 通气供苯对于 *E. coli* JM109 (pKST11) 转化苯的影响

通气供苯时, 0.5mmol/L IPTG 于 6h 加入, 8h 时以 0.4mL/min 的平均速度通入饱和苯蒸汽(图 2), 在通入苯蒸汽之后的 2h 内, 因为苯的水溶性很低, 发酵液中苯浓度较低, 对细胞的影响较小, 细胞仍然持续生长, 但是 TDO 的活性可能对于苯更为敏感, 8h 通入苯蒸汽后, 就快速由 6.55u 下降至 5.87u, 至发酵 16h, TDO 活力检测不出, 没有靛蓝的生成, 此后尽管仍保持一定的细胞量, 但是 DHCD 的产量持续在 7.5g/L 没有增加。说明影响苯转化的关键因子是 TDO 的活力的水平高低以及持续时间, 而不是细胞量的多少。Brazier 在利用 *Pseudomonas putida* 转化甲苯为顺-2, 3-二羟基-1-甲基-5, 6-环己二烯(TCG)时发现, 甲苯在水相中的浓度超过饱和浓度(1.5g/L)的 40%~50% 时, 即对 TDO 酶所催化的反应速率有极强的抑制作用<sup>[15]</sup>。本研究结果说明发酵液中的苯对细胞的生长以及 TDO 活性都有极其严重的抑制作用, 相对与细胞的生长而言, TDO 的活力更为敏感。因此, 发酵工艺流程的优化应着重于解决苯的毒害与苯作为反应底物在水相中需要有一定浓度之间的矛盾。

表 1 IPTG 的诱导对于 *E. coli* JM109(pKST11) 转化苯的影响Table 1 Effect of IPTG on benzene transformation by *E. coli* JM109(pKST11)

	$OD_{620\text{nm}}$	Benzene/mL	TDO activity/u	DHCD/(g/L)	$Y_{\text{DHCD/Ben}}/\%$
No IPTG	49.44	156	4.98	15.8	35
I(0)	5.48	80	2.42	7.5	32
I(4)	29.64	171	2.22	16.5	33
I(6)	50.64	156	8.16	22.0	48
I(8)	50.53	141	6.31	20.0	49
II(6)	51.04	156	7.98	20.5	45
II(8)	52.90	141	5.83	21.5	52

I : 0.5mmol/L IPTG ; II : 1mmol/L IPTG. *E. coli* JM109(pKST11) was grown at 37°C for 4~8 h in a 5L NBS fermentor, then transformation was conducted at 30°C for 16~20h

对于利用 *Pseudomonas putida* 的突变株或者 *E. coli* 重组基因工程菌转化甲苯为 TCG 的研究已有较多报道<sup>[11,15-16]</sup>。其中,甲苯的供入方式可以分为 3 种:通入甲苯蒸汽,直接流加液体甲苯,以及两相法缓释。本文研究结果显示,通气供苯时,苯的转化率只有 6.4%(图 5),苯会随尾气大量逸散造成浪费,增加生产成本,同时污染环境。而直接流加纯苯液体,则要求快速搅拌以免造成局部苯浓度过高,造成对细胞的伤害,抑制 TDO 催化反应速率,而这一点在生产中是极难实现的。

两相法是在反应体系中引入另一个无毒的有机相,该有机相可以溶解有毒的底物,使得水相中的底物浓度保持在较低的水平。有毒的反应底物在有机相和水相之间以一定的分配系数达到两相之间的平衡,由此使得有机相中的底物达到缓慢释放至水相的结果。两相法成功的关键是有机溶剂的选择及其与底物比例的确定<sup>[11]</sup>。Phumathon<sup>[11]</sup>采用十四烷作为缓释剂时是在发酵接种前就加入十四烷,之后菌体细胞达到一定比例时再补加甲苯,由此造成局部甲苯浓度太高,缓释效果不好。本研究则是利用液体石蜡为无毒缓释剂,可以与苯以任意比例混溶,在发酵至对数中期以一定比例进行批式流加或者连续流加,由此达到缓释苯的目的。

## 2.4 两相法对于 *E. coli* JM109(pKST11) 转化苯生产 DHCD 的影响

### 2.4.1 两相法对于全细胞 TDO 活性的影响

通苯方式对于全细胞的 TDO 活性的影响见图 3。批式流加不同初始浓度比例的液体石蜡与苯的混溶物时(图 3a)尽管 8h 补苯以后,所有比例处理的 TDO 都呈现一致的下降趋势,但是不同的初始液体石蜡与苯的混溶比例浓度对于 TDO 活力影响明显不同,液

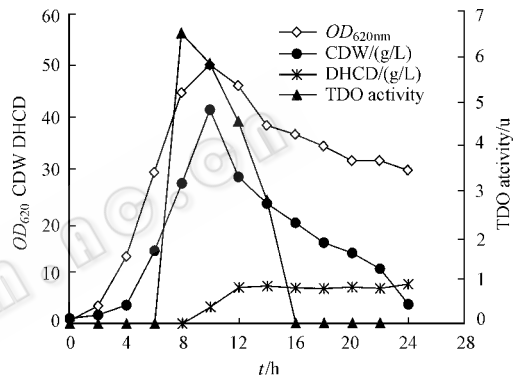
图 2 通入苯蒸汽对 *E. coli* JM109(pKST11) 转化苯的影响

Fig.2 Effect of benzene vapor on biotransformation of benzene to DHCD

体石蜡的使用量越多,对于细胞 TDO 活性影响越小,比例为 15:1 时全细胞的  $TDO_{\text{max}}$  与比例为 5:1 时的  $TDO_{\text{max}}$  虽然相差不大,但是下降趋势较慢,甚至自 8h 至 10h 还呈现稍微上升趋势(图 3a)。对于细胞的转化较为有利。同时也证明了液体石蜡量越多,缓释效果越好,对 TDO 影响越小。采用连续流加不同比例的液体石蜡与苯的混溶物时对于全细胞的 TDO 活力影响比批式流加复杂,各比例之间的差异不如批式流加明显,TDO 的活力与液体石蜡使用量之间没有呈现出与批式流加相类似的变化趋势,其原因可能是因为采用连续流加策略通苯时,即使液体石蜡与苯的混溶比例不同,但是初期通苯时进入发酵罐中的苯的量都较少,并且很快被转化为无抑制的 DHCD 溶于水相中,所以各比例之间差异不明显。整个发酵过程中,TDO 的动力曲线变化趋势也较为复杂,有可能是发酵过程中罐压的不同导致的流加量不均一的结果(见图 3b)。虽然在这两种通苯策略下  $TDO_{\text{max}}$  均为 6.5~7.0 u,但是连续流加方式从

总体上延缓了 TDO 活力的下降趋势,如液体石蜡与苯的比例均为 5:1 时,批式流加时,TDO 活力至 18h 已检测不出;而连续流加时,TDO 活力则可以持续 28h,细胞转化时间比批式流加长了 10h,说明连续流加时,水相中的苯因被快速转化成 DHCD,使得水相中的苯保持在一个较低的浓度,对于 TDO 的伤害较小。

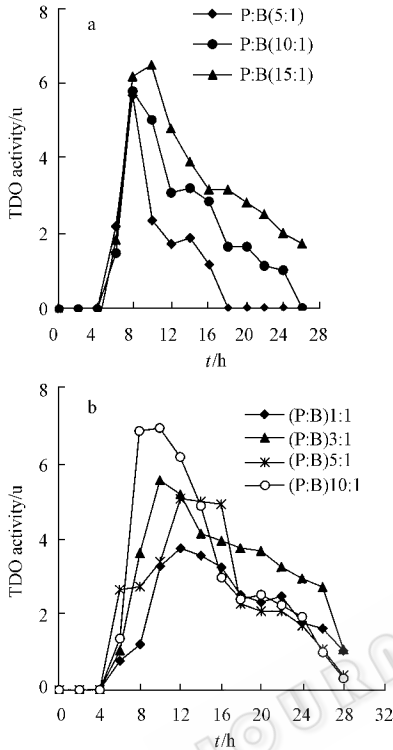


图3 通苯方式对全细胞 TDO 活力的影响

Fig.3 Effect of various benzene adding strategies on TDO activity in whole cells

- a. The mixture of liquid paraffin and benzene was added in fed-batch  
 b. The mixture of liquid paraffin and benzene was added continuously by peristaltic pump. P.Paraffin ; B. Benzene.  
*E. coli* JM109 (pKST11) was grown at 37°C in a 5L NBS fermentor for 6-8 h, then transformation was conducted at 30°C for 20~22 h

**2.4.2 两相法对于 DHCD 的产量、苯转化率的影响** :采用液体石蜡作为苯的缓释剂对于 DHCD 的产量和苯的转化率有明显的影 响。批式流加不同初始比例的液体石蜡和苯的混溶物时 ,DHCD 的产量和苯的转化率随着液体石蜡的使用量的增多而增大 (图 4.5)。如液体石蜡与苯的初始混溶比例为 15:1 时 ,DHCD 达到 22.6g/L(图 4),苯转化率为 42%,但是 ,此时液体石蜡使用量高达 1120mL(表 2),大幅度地降低了发酵罐的有效工作容积 ,同时大量的液体石蜡与发酵液混合 ,也不利于后期的 DHCD 的提取。改进通苯方式为连续流加以后 ,DHCD 的产量明显

高于批式流加策略。如液体石蜡与苯的比例均为 5:1 时 ,批式流加时 ,DHCD 的最终产量只有 13.6 g/L,而采用连续流加方式时 ,DHCD 的产量达到 33.1g/L,大约是批式补加方式的 2.5 倍 ,这是由于采用连续流加液体石蜡与苯的混溶物时 ,TDO 的作用时间较长的缘故。单独就连续流加的通苯策略而言 ,对比不同比例液体石蜡与苯的混溶物对 DHCD 产量的影响 ,可以发现相对于比例为 3:1 而言 ,5:1 , 10:1 时 DHCD 产量依次下降 ,其原因可能是采用流加方式时 ,液体石蜡与苯的混溶比例越高 ,通苯时进入发酵罐的液体石蜡量越多 ,相对而言 ,苯的量就越少 ,而此时细胞处于对数生长中期 ,代谢旺盛 ,转化力较强 ,但因为苯的量不足导致 TDO 酶所催化的反应因为底物浓度限制 ,未能发挥最大的转化能力。1:1 时 ,液体石蜡的使用量较少导致缓释过快 ,TDO 酶活上升速度不如 3:1 ,5:1 和 10:1 ,而且最高酶活也较低 (图 3.b) ,使 DHCD 产量明显低于 3:1 和 5:1 ,只有 17.8g/L。但是对于转化率而言 ,尽管连续流加时 ,比例为 5:1 和 10:1 时 DHCD 的产量低于 3:1 (图 3) ,但是同时苯的使用量更少(表 2) ,因此转化率反而高于比例为 3:1 的实验组 ,如当液体石蜡与苯的比例为 10:1 时 ,苯的使用量最少 ,转化率高达 84%。

表 2 两相法发酵中苯和液体石蜡的使用量

Table 2 Amount of benzene and paraffin used in two liquid phase fermentation

	Benzene/mL	Paraffin/mL
B(5:1)	156	390
B(10:1)	186	780
B(15:1)	186	1120
C(1:1)	280	280
C(3:1)	220	660
C(5:1)	180	900
C(10:1)	115	1150

- B. Mixture of liquid paraffin and benzene was added in fed-batch ;  
 C. The mixture of liquid paraffin and benzene was added continuously using peristaltic pump.

Ratios following B or C were the volume ratios of paraffin to benzene

因为苯对环境存在严重的污染 ,除了要获得较高的 DHCD 的产量以外 ,还必须考虑要提高苯的转化率 ,由此尽可能减少生产过程可能出现的对环境的不利影响。两种通苯方式之间相比 ,连续流加组的转化率

明显高于批式补加方式,说明连续流加使得苯以一定速度缓慢进入发酵液之后被细胞快速转化为DHCD,提高了苯的利用率。在细胞生长至对数期时,将液体石蜡与苯以3:1或者5:1进行连续流加,液体石蜡表现了极好的缓释效果,DHCD的产量可达到33~36g/L,苯的转化率可达到57%~63%,同时大幅度地降低了液体石蜡的用量,提高了发酵罐的有效工作容积,减少了后期DHCD的提取压力,为利用重组基因工程菌发酵生产DHCD提供了切实可行的工艺流程。

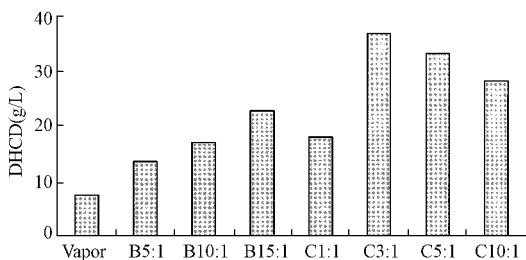


图4 通苯方式对于 DHCD 产量的影响

Fig.4 Effects of various benzene addition strategies on DHCD production

Vapor. Benzene vapor was used; B. The mixture of liquid paraffin and benzene was added in fed-batch; C. The mixture of liquid paraffin and benzene was added continuously by peristaltic pump.

Ratios following B or C were the volume ratios of paraffin to benzene.

*E. coli* JM109 (pKST11) was grown at 37°C in a 5L NBS fermentor for 6 h, then transformation was conducted at 30°C for 22 h

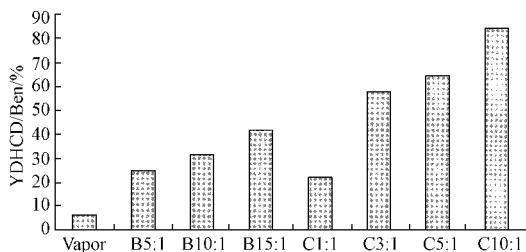


图5 通苯方式对与苯的转化率的影响

Fig.5 Effects of various benzene addition strategies on the yield of DHCD from benzene

Vapor. Benzene vapor was used; B. The mixture of liquid paraffin and benzene was added in fed-batch; C. The mixture of liquid paraffin and benzene was added continuously by peristaltic pump.

Ratios following B or C were the volume ratios of paraffin to benzene.

*E. coli* JM109 (pKST11) was grown at 37°C in a 5 L NBS fermentor for 6 h, then transformation was conducted at 30°C for 22 h

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Dordick J S. In : Harnessing biotechnology for the 21st century ; Ed. Ladisch , M R , Bose A. Eds : Amer chem Soc : Washington , 1992 : 164 - 176
- [ 2 ] Mobley D P. In : Plastics from microbes. Ed. Mobley D P , Hanser Publish - ers. 1994 : 139 - 168
- [ 3 ] Ballard D G H , Courtis A , Shirley I M , Taylor S C. Synthesis of polyph-nylene from a cis-dihydrocatechol , a biologically produced monomer , *Macromolecular* , 1988 , **21** : 294 - 304
- [ 4 ] Nakajima M , Tomida I , Takei S. Darstellung von cis-Benzolglykol , stereoisomeren mucondiadehydren und kondurit-F. *Chem Ber* , 1959 , **92** : 163 - 172
- [ 5 ] Hudlicky T , Thorpe A J. Current status and future perspective of cyclohexa-diene-cis-diols in organic synthesis : versatile intermediate in the concise design of nature products , *Chem Commun* , 1996 , **17** : 1993 - 2000
- [ 6 ] Ley S V , Stenfeld F , Taylor S C. Microbial oxidation in synthesis : A sixstep preparation of (+)-pinitol from benzene. *Tetrahedron Lett* , 1987 , **28** : 225 - 226
- [ 7 ] Ley S V , Parra M , Redgrave A J , Sternfeld F. Microbial oxidation in synthesis : Preparation of myo-inositol phosphates and related cyclitol derivatives from benzene. *Tetrahedron* , 1990 **46** : 4995 - 5026
- [ 8 ] Hudlicky T , Luna H , Barbieri G , Kwart L D. Enantioselective synthesis through microbial oxidation of arenes. 1. Efficient preparation of terpene and prostanoid synthons. *J Am Chem Soc* , 1988 , **110** : 4735 - 4741
- [ 9 ] Hudlicky T , Luna H , Price J D , Rulin F. Microbial oxidation of chloroaromatics in enantiodivergent synthesis of pyrrolizidine alkaloids : Trihydroxyheliotridane-s. *J Org Chem* , 1990 , **55** : 4683 - 4687
- [ 10 ] Jenkins R O , Stephens G M , Dalton H. Production of toluene cis-glycol by *Pseudomonas putida* in glucose fed-batch culture. *Biotech Bioeng* , 1987 , **29** : 873 - 883
- [ 11 ] Phumathon P , Stephens G M. Production of toluene cis-glycol using recombinant *Escherichia coli* strains in glucose-limited fed batch culture. *Enzyme Microb Technol* , 1999 , **25** : 810 - 819
- [ 12 ] Axcell B C , Geary P J. Purification and some properties of a soluble benzene-oxidizing system from a strain of *Pseudomonas* . *Biochem J* , 1975 , **146** : 173 - 183
- [ 13 ] Subramanian V , Liu T-N , Yeh W K. Toluene dioxygenase : purification of an iron sulphur protein by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* , 1979 , **91** : 1131 - 1139
- [ 14 ] Woo H J , Sanaeveruno J. The measurement of toluene dioxygenase activity in biofilm culture of *Pseudomonas putida* F1. *J microbial Med* , 2000 **40** : 181 - 191
- [ 15 ] Brazier A J , Lilly M D. Toluene cis-glycol synthesis by *Pseudomonas putida* ; kinetic data for reactor evaluation. *Enzyme Microb Technol* , 1990 , **12** : 90 - 94
- [ 16 ] Quintana M. G , Dalton H. Biotransformation of aromatic compounds by immobilized bacterial strains in barium alginate beads , *Enzyme Microb Technol* , 1999 , **24** : 232 - 236

## Biotransformation of Benzene to *cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene Using Recombinant *Escherichia coli* JM109 ( pKST11 )

QU Xiang-Hua<sup>1</sup> CHEN Jin-Chun<sup>2\*</sup> MA Qi-Xiang<sup>2</sup> SUN Shi-Yao<sup>2</sup> CHEN Guo-Qiang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>( College of Biological Science and Biotechnology , Xinjiang University , 830046 , China )

<sup>2</sup>( Department of Biological Science and Biotechnology , Tsinghua University , 100084 , China )

**Abstract** *Cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene ( DHCD ) can be used as a valuable chiral intermediates for applications in pharmaceuticals , aerospace , electrical and fine chemical industries. By on-line detection of toluene dioxygenase ( TDO ) activity in whole recombinant *Escherichia coli* JM109 ( pKST11 ) cells that harbored TDO gene under a *tac* promoter , effects of IPTG and various benzene addition strategies on bioransformation of benzene to DHCD were investigated. When IPTG was used at the beginning of fermentation , the growth of cells was inhibited and TDO activity only maintained for 4 hours while same experiments with addition of IPTG at 6h or 8h generated TDO activity for 18 hours. Suitable induction time for IPTG was in the cell logarithmic growth phase and 0.5 mmol/L IPTG was sufficient for inducing maximum TDO activities. Benzene strongly inhibited the activity of TDO which catalyses the conversion of benzene to DHCD. It was found that both cell growth and TDO activity was remarkably inhibited by feeding of benzene vapor , only 7.5 g/L DHCD was obtained. While the benzene inhibition effect was ameliorated by two – liquid phase culture fermentation in which liquid paraffin was used as second phase in the broth. Using different initial ratios of paraffin to benzene in fed – batch culture , DHCD contents were increased to 22.6 g/L , which was 3 – fold more compared with that in benzene vapor culture. A further improvement of DHCD production was achieved when the mixture of liquid paraffin and benzene was added continuously by peristaltic pump , the DHCD contents were increased to a final concentration of 36.8 g/L. It was proven that the key to improving DHCD production by recombinants is to prolong TDO activity in cells , which can be achieved by using suitable addition benzene strategies.

**Key words** *cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene , DHCD , toluene dioxygenase , TDO , recombinant *Escherichia coli* , bio-transformation

Received : 07-01-2002

This work was supported by grants from Chinese Foundation for Aerospace Research and 863 Project ( No. 2002AA333030 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62783844 , Fax 86-10-62788784 E-mail : chcnjc@mail.tsinghua.edu.cn ; chengq@mail.tsinghua.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn