

研究报告

## 产顺式-4-L-羟脯氨酸工程菌的构建及转化条件的优化

赵利维<sup>1</sup> 燕瑾<sup>2</sup> 韩蕊<sup>1</sup> 田路<sup>1</sup> 王立安<sup>1</sup> 张金秀<sup>1,3\*</sup>

(1. 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050024)

(2. 北京市射线应用研究中心 北京 101113)

(3. 南开大学 药物化学生物学国家重点实验室 天津 300071)

**摘要:**【目的】构建产顺式-4-L-羟脯氨酸(*cis*-4-Hyp)的工程菌并优化其转化条件。【方法】通过调整大肠杆菌的密码子偏好性以及 mRNA 二级结构对顺式-4-L-脯氨酸羟化酶(*cis*-P4H)基因进行优化,构建该基因的表达菌株。采用 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化 *cis*-P4H,测定 *cis*-P4H 的酶活和稳定性。然后采用全细胞催化法制备 *cis*-4-Hyp,通过单因素试验和正交试验对相关的转化条件进行优化。【结果】构建了一株产 *cis*-4-Hyp 的工程菌, *cis*-P4H 的比活为 2.65 U/mg,半衰期为 2.32 h。经过条件优化后,采用  $OD_{600}$  为 0.9 时加入 IPTG 获得的工程菌菌体构建转化体系,在转化体系 pH 6.5,转化温度为 31 °C,转化时间为 60 h 时, L-脯氨酸转化率最高达到 83.33%。【结论】研究获得的工程菌及转化条件具有良好的工业应用前景。

**关键词:** L-脯氨酸, 顺式-4-L-羟脯氨酸, 转化条件, 转化率

## Construction of an engineered strain producing *cis*-4-L-hydroxyproline and optimization of its biotransformation

ZHAO Li-Wei<sup>1</sup> YAN Jin<sup>2</sup> HAN Rui<sup>1</sup> TIAN Lu<sup>1</sup> WANG Li-An<sup>1</sup> ZHANG Jin-Xiu<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China)

(2. The Radiation Research Center of Beijing, Beijing 101113, China)

(3. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain an engineered strain producing *cis*-4-L-hydroxyproline and optimize the related transformation conditions. [Methods] The DNA sequence encoding *cis*-4-proline hydroxylase (*cis*-P4H) was adjusted based on the codon bias of *Escherichia coli* and mRNA secondary structure, an engineered strain expressing the optimized *cis*-P4H gene was constructed. The *cis*-P4H was purified by Ni-NTA column and its activity and stability were analysed.

**Foundation item:** The Research Foundation of the Education Bureau of Hebei Province (No. QN20131028); The Open Fund of the State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology (No. 20130270); The Doctoral Startup Foundation of Hebei Normal University of Science and Technology (No. L2012B10)

\*Corresponding author: Tel: 86-311-80787572; E-mail: xiudou882003@163.com

Received: August 24, 2015; Accepted: February 29, 2016; Published online (www.cnki.net): March 09, 2016

基金项目: 河北省教育厅自然科学基金项目(No. QN20131028); 药物化学生物学国家重点实验室开放基金项目(No. 20130270); 河北师范大学科学研究基金项目博士科研启动基金项目(No. L2012B10)

\*通讯作者: Tel: 86-311-80787572; E-mail: xiudou882003@163.com

收稿日期: 2015-08-24; 接受日期: 2016-02-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-09

Whole-cell catalysis was used for the production of *cis*-4-Hyp, then the related transformation conditions were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. **[Results]** An engineered strain was obtained to produce *cis*-4-Hyp. The specific activity of *cis*-P4H was 2.65 U/mg and the half-life period of *cis*-P4H was 2.32 h. When the optical density ( $OD_{600}$ ) of the cells reached up to 0.9, IPTG was added for inducing protein expression, then the cells were used for transformation system. The transformation rate from L-proline to *cis*-4-Hyp was more than 83.33% at the optimized condition (pH 6.5, 31 °C, 60 h). **[Conclusion]** The engineered strain and related transformation conditions have a good prospect for industrial application.

**Keywords:** L-proline, *cis*-4-L-hydroxyproline, Transformation condition, Transformation rate

羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)是胶原蛋白的主要组成成分<sup>[1]</sup>, 包括顺式-3-L-羟脯氨酸、反式-3-L-羟脯氨酸、顺式-4-L-羟脯氨酸和反式-4-L-羟脯氨酸 4 种立体异构体。其中, 顺式-4-L-羟脯氨酸(*cis*-4-L-hydroxyproline, *cis*-4-Hyp)是合成宜他霉素和微鞘藻素两种肽类抗生素的原料, 并且临床上被认为可作为抗癌药物<sup>[2]</sup>, 因此 *cis*-4-Hyp 的生产和应用一直受到业界的广泛关注。目前 *cis*-4-Hyp 的生产主要采用化学提取工艺, 但存在污染严重、生产成本高和分离纯化困难等缺点<sup>[3-5]</sup>, 因此亟需进行低污染、低成本、高转化率的生物转化法的研究与应用。

*cis*-4-Hyp 最早发现于鹅膏蕈菌毒素鬼笔环肽中<sup>[6]</sup>, 也可游离存在于檀香中<sup>[7]</sup>, 但至今未清楚在这种植物中 *cis*-4-Hyp 的生物合成途径<sup>[8-9]</sup>。2006 年 Bontoux 等研究发现, 许多微生物含有顺式-4-L-脯氨酸羟化酶(*cis*-4-Proline hydroxylase, *cis*-P4H)<sup>[10]</sup>, 能将 L-脯氨酸转化为 *cis*-4-Hyp。2009 年 Hara 和 Kino 从苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)和百脉根根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)中分离鉴定出两种 *cis*-P4H, 证实了这两种酶均可以特异地将 L-脯氨酸催化生成 *cis*-4-Hyp, 但酶活力比较低<sup>[11]</sup>。进行 *cis*-P4H 基因的高效表达和建立有效的转化方法成为实现 *cis*-4-Hyp 生物转化的关键。本研究以苜蓿中华根瘤菌中的 *cis*-P4H 基因为基础, 进行 *cis*-P4H 高效表达菌株的构建及全细胞转化法制备 *cis*-4-Hyp 的研究, 以期为 *cis*-4-Hyp 的工业化生产提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21-CodonPlus 和质粒 pET-M-3C<sup>[12]</sup>均由本实验室保藏。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 质粒抽提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, 宝生物工程(大连)有限公司; *Taq* 2×Master mix, 天津纽赛生物技术有限公司; 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)、头孢替安、氯甲酸(9-苄甲基)酯和氨苄青霉素, 北京索来宝生物科技有限公司。镍柱, 通用电气(中国)有限公司北京办事处; 超声波破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 超速冷冻离心机, 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司; mySPEC 超微量分光光度计, 环亚生物技术有限公司(APG Bio Ltd); 紫外分光光度计, 德国艾本德股份公司; 高效液相色谱仪, 上海伍丰科学仪器有限公司。

**1.1.3 培养基:** LB 培养基<sup>[13]</sup>, 除特殊说明外, 所用 LB 培养基均含有 100 mg/L 氨苄青霉素和 25 mg/L 氯霉素。

### 1.2 工程菌的构建

**1.2.1 *cis*-P4H 基因的优化:** *cis*-P4H 基因序列来源于 GenBank (登录号 FU758039.1)。为了使来源于苜蓿中华根瘤菌的 *cis*-P4H 在大肠杆菌中高效表达, 在不改变氨基酸序列的条件下, 利用密码子优化软件 JCAT<sup>[14]</sup>, 通过同义转换调整密码子的偏好性, 将 *cis*-P4H 基因的低使用率密码子替换为在大肠杆

菌中高使用率密码子,并保持其 G+C 含量在 50% 左右。然后利用 RNAstructure 5.3 软件预测 *cis*-P4H 基因的 mRNA 二级结构,计算出 mRNA 的二级结构的自由能 $\Delta G$ ,并调整 mRNA 二级结构,以便后期基因的转录和翻译。为了便于基因操作,在优化好的 *cis*-P4H 基因 5'和 3'端分别加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.2.2 工程菌的构建与验证:** 将新合成的 *cis*-P4H 基因经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,连接到经同样酶双酶切的 pET-M-3C 质粒上,构建重组质粒 pET-M-3C-*cis*-P4H。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21-CondonPlus 感受态中,涂布在含有氨苄青霉素和氯霉素抗性的 LB 固体培养基平板上,37 °C 培养过夜,挑选阳性重组子,提取重组质粒并进行 PCR 和双酶切验证。上游引物 T7 5'-TAATACGACT CACTATAGGG-3',下游引物 T7<sub>ter</sub>:5'-TGCTAGTTA TTGCTCAGCGG-3'。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)为: *Taq* 2 $\times$ Master mix 25  $\mu$ L,上、下游引物各(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L,超纯水 22  $\mu$ L。PCR 扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,54 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 5 min。

### 1.3 *cis*-P4H 的酶活及稳定性测定

**1.3.1 *cis*-P4H 的诱导表达和纯化:** 挑取工程菌单菌落至 5 mL 液体 LB 培养基中,37 °C、180 r/min 连续培养三代。将第三代菌液以 10%的接种量接种至 300 mL 的 LB 培养基中,37 °C、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  值为 0.9 时,加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,16 °C、140 r/min 培养过夜,空白对照为未加 IPTG 的工程菌。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,菌体悬浮至 10 mL 缓冲液(50 mmol/L PIEPS pH 7.0,100 mmol/L NaCl)中进行超声波破碎。将菌体破碎液 18 000 r/min 离心 40 min,收集上清,采用镍柱纯化蛋白,脱盐柱(PD-10)除去咪唑和 NaCl,mySPEC 分光光度计定量蛋白浓度,SDS-PAGE 进行蛋白纯度检测,考马斯亮蓝染色。

**1.3.2 菌体密度( $OD_{600}$ )测定:** 将菌液稀释适当倍

数,用 Eppendorf 可见分光光度计在 600 nm 下测定吸光值,LB 液体培养基做空白对照。 $OD_{600}$ =吸光值 $\times$ 稀释倍数。

**1.3.3 *cis*-P4H 酶活测定:** 向反应体系(50 mmol/L 1,4-哌嗪二乙磺酸 pH 7.0,5 mmol/L L-脯氨酸,5 mmol/L  $\alpha$ -酮戊二酸,0.5 mmol/L 硫酸亚铁,1 mmol/L 维生素 C)加入 25  $\mu$ L 的酶液,终体积为 1 mL。25 °C、140 r/min 反应 10 min 后将反应体系放于沸水中煮 10 min 以终止反应,采用 HPLC 测定 *cis*-4-Hyp 的生成量。根据 *cis*-4-Hyp 的生成量计算酶活。酶活单位(U)定义为在给定反应条件下,1 min 生成 1  $\mu$ mol *cis*-4-Hyp 所需的酶量。

**1.3.4 *cis*-4-Hyp 定量检测:** 取 1 mL 反应液,12 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,上清液备用。配制 *cis*-4-Hyp 和 L-脯氨酸标准品混合溶液(浓度均为 5 mmol/L)。取混合标准溶液或反应液上清 500  $\mu$ L,依次加入 250  $\mu$ L 120 mmol/L 的四硼酸钠,50  $\mu$ L 0.07 mmol/L 氯甲酸(9-芴甲基)酯(FMOC-Cl)乙腈溶液,蒸馏水 200  $\mu$ L,摇匀,常温下反应 2 min,用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后进样分析。参考 Castelain 等<sup>[15]</sup>和 Klein 等<sup>[16]</sup>方法对制备好的样品进行 HPLC ( $C_{18}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu$ m, Wondasil)检测。流动相:A 为 0.1%三氟乙酸,B 为纯乙腈。梯度洗脱程序:0-5 min, A:B (70%:30%);5-10 min, A:B (48%:52%);10-20 min, A:B (44%:56%);20-25 min, A:B (42%:58%);25-30 min, A:B (70%:30%);流速为 1 mL/min。检测波长为 260 nm;柱温为 28 °C;进样量为 10  $\mu$ L,同时以 *cis*-4-Hyp 标准品制作标准曲线。

**1.3.5 *cis*-P4H 的稳定性测定:** 将纯化后的 *cis*-P4H 置于 pH 7.0 的缓冲液中,25 °C 下放置 10 h,每隔 1 h 按 1.3.3 所述方法检测酶活力,每组样品重复 3 次。

### 1.4 转化条件的优化

**1.4.1 转化体系与转化方法:** 按 1.3.1 所述方法,将工程菌培养至  $OD_{600}$  值为 0.9 时加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,28 °C、140 r/min 诱导培养 5 h。离心收集菌体,以菌体做酶源,按每克菌体加 10 mL

的转化液(100 mmol/L 1,4-哌嗪二乙磺酸 pH 7.0, 200 mmol/L L-脯氨酸, 200 mmol/L  $\alpha$ -酮戊二酸, 6 mmol/L 硫酸亚铁, 8 mmol/L 维生素 C, 20 mg/L 头孢替安)构建转化体系<sup>[17]</sup>, 25 °C、140 r/min 条件下反应, 每隔 20 h 取样一次, 用 HPLC 检测转化体系中 *cis*-4-Hyp 的生成量并计算 L-脯氨酸转化率, 检测方法同 1.3.4. L-脯氨酸转化率=(*cis*-4-Hyp 生成量/L-脯氨酸量) $\times$ 100%。

**1.4.2 诱导起始菌体浓度( $OD_{600}$ )的优化:** 将工程菌分别培养至  $OD_{600}$  值为 0.5、0.7、0.9、1.3, 按照 1.4.1 的方法构建转化体系并测定不同诱导起始菌体浓度对 L-脯氨酸转化率的影响, 每个处理 3 次重复。

**1.4.3 转化体系 pH 的优化:** 采用优化的诱导起始菌体浓度, 按照 1.4.1 的方法构建转化体系并测定转化体系 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 时对 L-脯氨酸转化率的影响, 每个处理 3 次重复。

**1.4.4 转化温度的优化:** 采用优化的诱导起始菌体浓度和转化体系 pH, 按照 1.4.1 的方法构建转化体系并测定转化温度为 20、25、28、37 °C 对 L-脯氨酸转化率的影响, 每个处理 3 次重复。

**1.4.5 正交试验:** 参考单因素筛选的结果, 以诱导起始菌体浓度( $OD_{600}$ )、转化体系 pH、转化温度为

考察因素, 按正交设计表  $L_9(3^3)$  设计 3 个因素、3 个水平的正交试验, 根据 L-脯氨酸转化率确定三因素最优组合。

**1.4.6 转化时间的优化:** 依据正交试验优化结果构建转化体系, 测定转化时间为 20、40、60、80、100 h 时 L-脯氨酸转化率, 确定 L-脯氨酸转化率最高的转化时间, 每个处理 3 次重复。

**2 结果与分析**

**2.1 工程菌的构建及验证**

**2.1.1 *cis*-P4H 基因的优化结果:** 如图 1 所示, 优化后的 *cis*-P4H 基因共改变了 179 个核苷酸和 159 个密码子, G+C 含量为 51.95%。计算得知优化前的 mRNA 折叠能  $\Delta G$  为 -987.437 kJ/mol, 优化后的 mRNA 折叠能  $\Delta G$  为 -1 088.99 kJ/mol。

**2.1.2 工程菌的验证:** 按照新合成的基因序列, *cis*-P4H 基因分子量大小应为 855 bp。PCR 结果显示(图 2), 通过通用引物扩增出一条约为 1 105 bp 的条带, 由于通用引物选自质粒, 扩增产物带有质粒部分片段, 因此条带大于 855 bp。对重组质粒双酶切结果显示, 质粒中含有分子量约为 855 bp (图 3)的片段, 与预期分子量相符, 含有重组质粒 pET-M-3C-*cis*-P4H 的菌株即为构建好的工程菌。

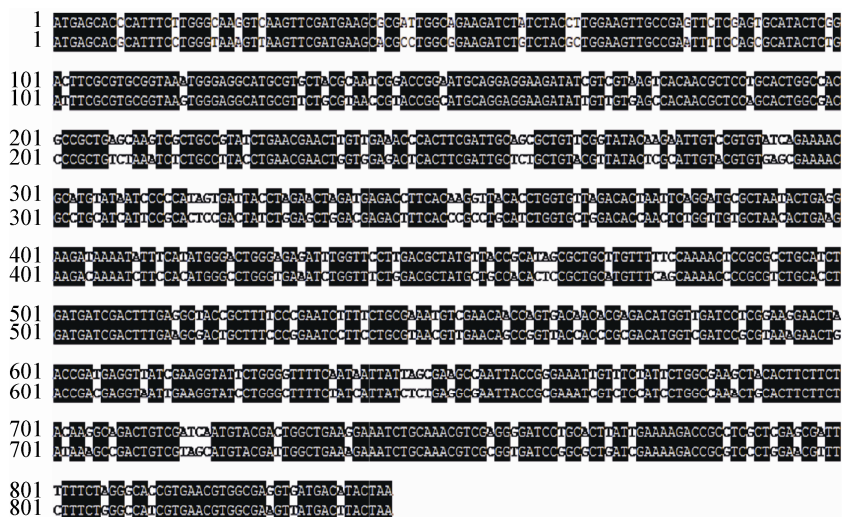


图 1 *cis*-P4H 基因(上)与优化后的 *cis*-P4H 基因(下)的序列比对

Figure 1 Alignment of nucleotide sequences between *cis*-P4H gene (upper) and synthetic optimized (lower)

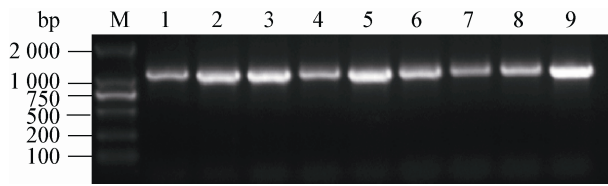
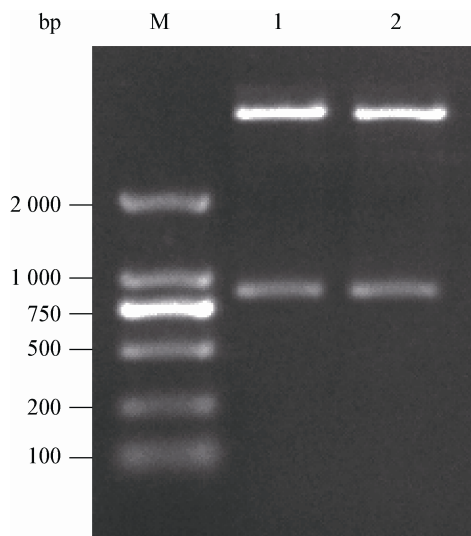


图2 阳性克隆 PCR 鉴定

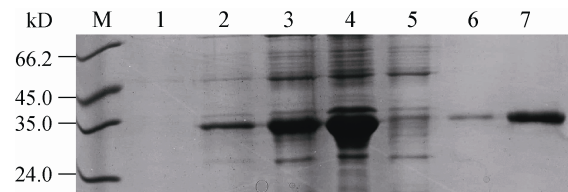
**Figure 2 PCR identification of positive clones**

注: M: DL2000 分子量标准; 1-9: PCR 产物.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-9: PCR products.

图3 重组质粒 pET-M-3C-*cis*-P4H 双酶切鉴定**Figure 3 Identification of recombinant pET-M-3C-*cis*-P4H by double digestion**注: M: DL2000 分子量标准; 1-2: 重组质粒 pET-M-3C-*cis*-P4H 双酶切产物.Note: M: DL2000 DNA marker; 1-2: pET-M-3C-*cis*-P4H digested by *Eco*R I and *Hind* III.**2.2 *cis*-P4H 酶活及稳定性**

**2.2.1 *cis*-P4H 的诱导表达和纯化:** 工程菌诱导表达及纯化后的蛋白电泳检测结果如图 4 所示。未经 IPTG 诱导的工程菌菌体破碎液(泳道 1)没有目的蛋白, 诱导后菌体破碎液(泳道 2)、上清液(泳道 3)和沉淀(泳道 4)均出现一条分子量约为 32.0 kD 的条带, 与目的蛋白理论分子量 32.0 kD 一致, 表明 *cis*-P4H 在工程菌中诱导表达成功。泳道 7 为经镍柱纯化后的 *cis*-P4H, 分子量约为 32 kD 且呈单一条带。经测定蛋白浓度为 4 g/L。

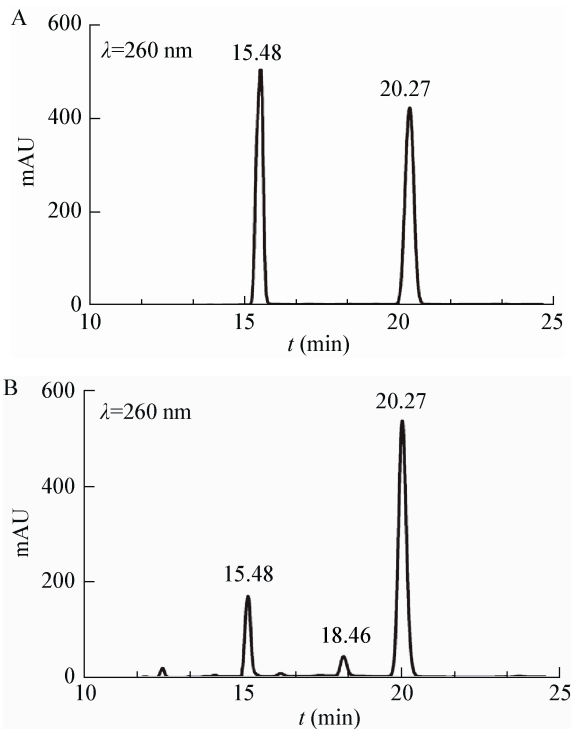
图4 工程菌中 *cis*-P4H 的诱导表达及纯化**Figure 4 Expression and purification of *cis*-P4H in engineered strain**注: M: 蛋白分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导工程菌细胞破碎液; 2: 经 IPTG 诱导工程菌细胞破碎液; 3: 经 IPTG 诱导工程菌细胞破碎液上清; 4: 经 IPTG 诱导工程菌细胞破碎液沉淀; 5-6: 洗脱液; 7: 纯化后的 *cis*-P4H.Note: M: Protein marker; 1: Total cell lysate of engineered strain without IPTG; 2: Total cell lysate of engineered strain induced by IPTG; 3: Soluble fraction of engineered strain induced by IPTG; 4: Insoluble fraction of engineered strain induced by IPTG; 5-6: Elution; 7: Purified *cis*-P4H.

**2.2.2 *cis*-P4H 酶活:** 采用氯甲酸(9-苄基)酯对 *cis*-4-Hyp 标准品、L-脯氨酸及 *cis*-P4H 的催化反应产物进行衍生化处理, 利用 HPLC 分析, 由图 5A 可知 *cis*-4-Hyp 标准品出现的保留时间为 15.48 min, L-脯氨酸出现的保留时间为 20.27 min。图 5B 在 15.48 min 出现保留峰, 表明该物质为 *cis*-P4H 的催化反应产物 *cis*-4-Hyp, 20.27 min 出现的保留峰应为剩余的底物 L-脯氨酸。此外 *cis*-P4H 的催化反应产物还在 18.46 min 出现一个保留峰, 推测应为其其他副产物。然后根据 *cis*-4-Hyp 的生成量计算 *cis*-P4H 的酶活并通过酶活与比活换算公式, 得出 *cis*-P4H 的比活为 2.65 U/mg。

**2.2.3 *cis*-P4H 的稳定性:** 如图 6 所示, *cis*-P4H 随着反应时间的延长, 酶活力迅速下降。当处理时间达到 6 h 后, 酶活力几乎为 0。计算得知其半衰期为 2.32 h, 稳定性较差。

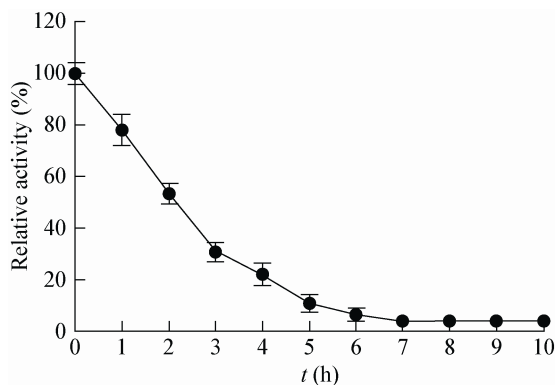
**2.3 转化条件的优化**

**2.3.1 诱导起始菌体浓度、转化体系 pH 及转化温度的优化:** 诱导起始菌体浓度( $OD_{600}$ )、转化体系 pH 及转化温度的优化结果如图 7 所示。图 7A 显示, 诱导 *cis*-P4H 表达的最佳起始菌体浓度为  $OD_{600}=0.9$ ; 图 7B 和图 7C 显示, 转化体系的适宜 pH 为 6.5, 转化温度为 28 °C。

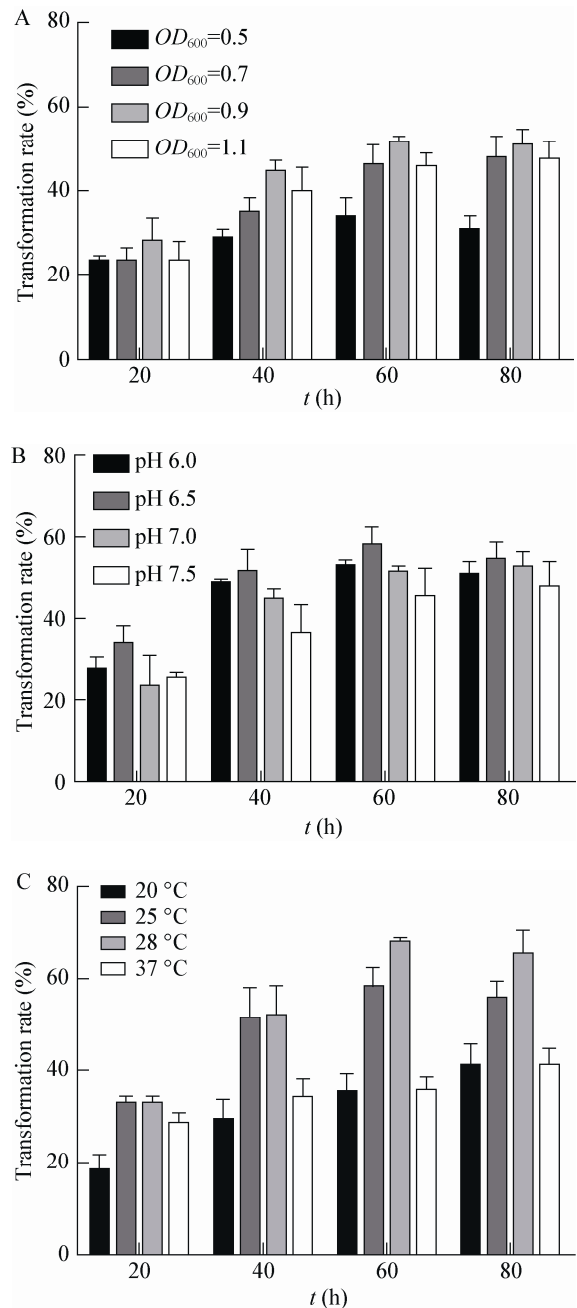
图5 *cis*-4-Hyp 的 HPLC 检测Figure 5 Detection of *cis*-4-Hyp by HPLC

注：A：*cis*-4-Hyp 和 L-proline 标准品混合物；B：*cis*-P4H 催化反应产物。

Note: A: Standard mixture containing *cis*-4-Hyp and L-proline; B: Products catalyzed by *cis*-P4H.

图6 *cis*-P4H 的稳定性Figure 6 The stability of *cis*-P4H

2.3.2 正交试验结果：以诱导起始菌体浓度 ( $OD_{600}$ )、转化体系 pH、转化温度为考察因素，按  $L_9(3^3)$  正交表设计的试验方案及结果如表 1 所示，由  $R$  值(极差)的大小判断，对 L-脯氨酸转化率影响程度从大到小依次为  $A > B > C$ ，即影响因素最大的为

图7  $OD_{600}$  值、转化体系 pH 和转化温度对 L-脯氨酸转化率的影Figure 7 The effect of  $OD_{600}$ , pH and temperature of the biotransforming system on the L-proline transformation rate

注：A：不同  $OD_{600}$  值下 L-脯氨酸转化率；B：不同转化体系 pH 下 L-脯氨酸转化率；C：不同转化温度下 L-脯氨酸转化率。

Note: A: The transformation rate of L-proline at different  $OD_{600}$ ; B: The transformation rate of L-proline at different pH of transformation system; C: The transformation rate of L-proline at different transformation temperature.

表 1 正交试验  $L_9(3^3)$  结果及极差分析  
Table 1 The analysis of range and results of orthogonal experiment

实验号 Medium No.	A $OD_{600}$	B pH	C Temperature (°C)	转化率 Transformation rate (%)
1	1 (0.7)	1 (6.0)	1 (25)	37.25
2	1 (0.7)	2 (6.5)	2 (28)	45.13
3	1 (0.7)	3 (7.0)	3 (31)	29.81
4	2 (0.9)	1 (6.0)	2 (28)	56.97
5	2 (0.9)	2 (6.5)	3 (31)	83.33
6	2 (0.9)	3 (7.0)	1 (25)	37.30
7	3 (1.1)	1 (6.0)	3 (31)	36.04
8	3 (1.1)	2 (6.5)	1 (25)	49.58
9	3 (1.1)	3 (7.0)	2 (28)	50.23
$K_1$	37.40	43.42	41.38	
$K_2$	59.20	59.35	49.73	
$K_3$	45.28	39.11	50.78	
R	21.80	20.24	9.40	

诱导起始菌体浓度( $OD_{600}$ ), 其次是转化体系 pH, 影响因素最小的是转化温度。 $K$  值大小反映每个因素在不同水平下对 L-脯氨酸转化率影响程度,  $K$  值越大对 L-脯氨酸转化率影响程度越大。从 3 个因素各自的  $K$  值中选择最大值组合在一起便得到三因素的最优组合, 因此最适转化条件为  $A_2B_2C_3$ , 即采用  $OD_{600}$  为 0.9 时加入 IPTG 诱导培养后获得的菌体构建转化体系 转化体系 pH 为 6.5 转化温度为 31 °C。在正交试验确定的转化条件下, L-脯氨酸转化率达到 83.33%, 比单因素筛选结果组合条件下的 L-脯氨酸转化率 68.23%提高了 1.22 倍。

**2.3.3 最适转化时间的确定:** 结果如图 8 所示, 当转化时间为 60 h 时, L-脯氨酸的转化率最高, 然而随后 L-脯氨酸的转化率开始下降, 并且根据 HPLC 结果显示, 18.46 min 处的保留峰的面积逐渐变大, 推测原因可能是随着转化时间的延长, *cis*-4-Hyp 部分分解为其他物质, 因此确定最适转化时间为 60 h。

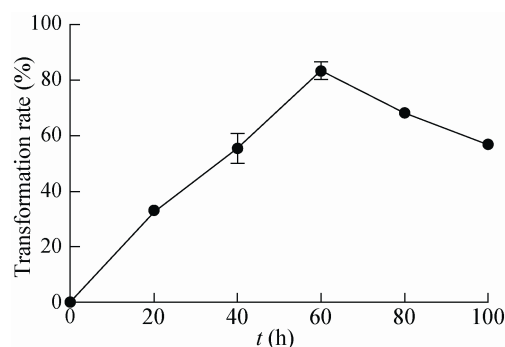


图 8 转化时间对 L-脯氨酸转化率的影响

Figure 8 The effect of transformation time on the L-proline transformation rate

### 3 讨论

生物转化是利用酶或者生物有机体(细胞、细胞器、组织等)作为催化剂进行化学转化的过程, 因具有特异的立体选择性、对环境友好、产率高等特点而备受关注。近年来, 在反式-4-L-羟脯氨酸的生物转化及工业化生产方面有一定的研究。Shibasaki 等将反式-4-L-脯氨酸羟化酶基因片段重组到载体并转化至大肠杆菌, 实现了反式-4-L-脯氨酸羟化酶的异源表达。该基因工程菌在发酵罐中发酵 100 h 后反式-4-L-羟脯氨酸的产量为 41 g/L<sup>[18]</sup>。刘合栋等通过优化反式-4-脯氨酸羟化酶基因和发酵条件, 使得工程菌在发酵罐中发酵 48 h 后反式-4-L-羟脯氨酸的产量为 42.5 g/L<sup>[19]</sup>, 大大提高了生产效率。*cis*-P4H 和反式-4-L-脯氨酸羟化酶有着相似的分子结构和酶学性质。依据反式-4-L-羟脯氨酸的生物转化思路进行 *cis*-P4H 的异源表达, 有望实现 *cis*-4-Hyp 的生物转化。本研究依据大肠杆菌对密码子偏好性进行了 *cis*-P4H 基因密码子优化, 通过表达载体的构建和转化得到了能够高效表达 *cis*-P4H 的大肠杆菌 BL21-CodonPlus 工程菌。该工程菌中 *cis*-P4H 的比活为 2.65 U/mg, 比 Hara 和 Kino 报道的两种 *cis*-P4H 的比活提高了约 3.8 倍。表明通过密码子优化可以使 *cis*-P4H 基因更适合在大肠杆菌中表达, 从而实现提高酶活性的目的。

得到高效表达的工程菌后就是建立有效的 *cis*-4-Hyp 生物转化法。通过研究发现 *cis*-P4H 在体

外的稳定性较差,且提取费时、成本高,利用酶催化生产 *cis*-4-Hyp 没有应用价值。全细胞催化是利用完整的生物有机体作为催化剂进行化学转化的过程,本研究以离心获得的菌体为酶源,在含有底物 L-脯氨酸的转化液中实现了 *cis*-4-Hyp 的生物转化,通过单因素和正交试验设计确定的最优转化条件为:将工程菌培养至  $OD_{600}$  值为 0.9 时加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,诱导 5 h 后收集菌体,用含有底物 L-脯氨酸的转化液(pH 6.5)重悬,在 31 °C 下转化 60 h。全细胞催化过程是一个复杂的细胞学和酶学过程, Falcioni 等的研究表明羟脯氨酸的转化效率取决于重组大肠杆菌对底物 L-脯氨酸的摄取速率以及脯氨酸在细胞内的分解代谢速率<sup>[20]</sup>。本研究在转化体系中添加了头孢替安,头孢替安作为一种抗生素可以分解大肠杆菌的细胞壁,利于底物 L-脯氨酸的进入和产物 *cis*-4-Hyp 的释放,因而推测本研究 L-脯氨酸的高转化率可能与加入头孢替安增加了菌体细胞通透性有关。当然,本研究只是为 *cis*-4-Hyp 的工业化生产提供了科学依据,最终实现真正产业化仍有很长的路要走。Theodosiou 等报道指出,通过敲除 *putA* 可以提高脯氨酸的利用率<sup>[21]</sup>,在后续研究中计划尝试敲除 *putA* 以进一步提高 L-脯氨酸转化率;同时,在本研究结果基础上,拟通过高密度发酵技术获得大量菌体、放大转化体系,继续优化转化条件,以期为实现 *cis*-4-Hyp 的工业化生产奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Vickery HB, Schmidt CLA. The history of the discovery of the amino acids[J]. Chemical Reviews, 1931, 9(2): 169-318
- [2] Metzner L, Kalbitz J, Brandsch M. Transport of pharmacologically active proline derivatives by the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004, 309(1): 28-35
- [3] Shi Q, Sang LH, Wang ZZ. Isolating L-Hyp and L-Pro from bone glue[J]. Food Science, 1998, 19(10): 26-29 (in Chinese)  
施强, 桑立红, 王在震. 从骨胶中提取 L-羟脯氨酸和 L-脯氨酸[J]. 食品科学, 1998, 19(10): 26-29
- [4] Gao HC, Li WY. Isolating L hydroxyproline and L proline from hydrolytic-liquor of bone glue[J]. Journal of Tianjin University of Light Industry, 1997(2): 33-37 (in Chinese)  
高焕春, 李文英. 从骨胶水解液中分离 L-羟脯氨酸和 L-脯氨酸[J]. 天津轻工业学院学报, 1997(2): 33-37
- [5] Lü HX. Study on L-HYP preparation from osseocolla[J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry, 1997, 11(4): 53-56 (in Chinese)  
吕红线. 从骨胶中制备 L-羟脯氨酸的研究[J]. 山东轻工业学院学报, 1997, 11(4): 53-56
- [6] Wieland T. Poisonous principles of mushrooms of the genus Amanita. Four-carbon amines acting on the central nervous system and cell-destroying cyclic peptides are produced[J]. Science, 1968, 159(3818): 946-952
- [7] Giri KV, Gopalkrishnan KS, Radhakrishnan AN, et al. Proline and hydroxyproline in leaves[J]. Nature, 1952, 170(4327): 579-580
- [8] Kuttan R, Radhakrishnan AN. The biosynthesis of *cis*-4-hydroxy-L-proline in sandal (*Santalum album* L.)[J]. Biochemical Journal, 1970, 117(2): 1015-1017
- [9] Kuttan R, Radhakrishnan AN. Studies on bound *trans*-4-hydroxy-L-proline in sandal (*Santalum album* L.)[J]. Biochemical Journal, 1970, 119(4): 651-657
- [10] Bontoux MC, Gelo-Pujic M. Microbial screening in hydroxylation of L-proline[J]. Tetrahedron Letters, 2006, 47(51): 9073-9076
- [11] Hara R, Kino K. Characterization of novel 2-oxoglutarate dependent dioxygenases converting L-proline to *cis*-4-hydroxy-L-proline[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 379(4): 882-886
- [12] Yan XJ, Zhou H, Zhang JX, et al. Molecular mechanism of inward rectifier potassium channel 2.3 regulation by tax-interacting protein-1[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 392(4): 967-976
- [13] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. Translated by Huang PT. Beijing: Science Press, 2002: 1595-1604 (in Chinese)  
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 BW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 1595-1604
- [14] Grote A, Hiller K, Scheer M, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Suppl 2): W526-W531
- [15] Castelain S, Kamel S, Picard C, et al. A simple and automated HPLC method for determination of total hydroxyproline in urine. Comparison with excretion of pyridinolines[J]. Clinica Chimica Acta, 1995, 235(1): 81-90
- [16] Klein C, Hüttel W. A simple procedure for selective hydroxylation of L-Proline and L-Pipecolic acid with recombinantly expressed proline hydroxylases[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011, 353(8): 1375-1383
- [17] Li W, Ju JS, Xue ZW, et al. Having a high conversion rate of *trans*-4-hydroxy-L-proline hydroxylase gene and its application transformation: CN, CN103146720A[P]. 2013-06-12 (in Chinese)  
李玮, 鞠建松, 薛张伟, 等. 一种具有高转化率的反式-4-羟基-L-脯氨酸羟化酶改造基因及其应用: 中国, CN103146720A[P]. 2013-06-12
- [18] Shibasaki T, Mori H, Ozaki AMH. Enzymatic production of *trans*-4-hydroxy-L-proline by regio- and stereospecific hydroxylation of L-proline[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(4): 746-750
- [19] Liu HD, Yuan CW, Zhang ZY. Expression of codon-optimized proline-4-hydroxylase in *Escherichia coli* and its effect on *trans*-4-hydroxyproline biosynthesis[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2014, 12(6): 44-51 (in Chinese)  
刘合栋, 袁春伟, 张震宇. 脯氨酸-4-羟化酶在大肠杆菌中的密码子优化表达及对反式-4-羟脯氨酸生物合成的作用[J]. 生物加工过程, 2014, 12(6): 44-51
- [20] Falcioni F, Blank LM, Frick O, et al. Proline availability regulates proline-4-hydroxylase synthesis and substrate uptake in proline-hydroxylating recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(9): 3091-3100
- [21] Theodosiou E, Frick O, Bühler B, et al. Metabolic network capacity of *Escherichia coli* for Krebs cycle-dependent proline hydroxylation[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 108