

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.01.08

反式-4-羟基-L-脯氨酸发酵菌株的筛选

李春玲,丁亚莲,谢文静,牛春,张萍*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,银川 750101)

[收稿日期] 2018-10-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 01-0050-04 [中图分类号] TQ922

[摘要] 为选育出反式-4-羟基-L-脯氨酸发酵生产的优良菌株,以 8 株产反式-4-羟基-L-脯氨酸的大肠杆菌(*Escherichia coli*)为出发菌株,对其生长特性、发酵效率进行了比较分析,筛选出 2 株遗传稳定性好、生产效率高的菌株 Hyp-Y1801、Hyp-Y1808,其发酵效价分别为 50.4、47.5 g/L,对实现反式-4-羟基-L-脯氨酸的工业化生产具有重要意义。

[关键词] 反式-4-羟基-L-脯氨酸;发酵菌株;大肠杆菌;筛选

Screening of Fermentation Strain for Trans-4-Hydroxy-L-Proline

LI Chun-ling, DING Ya-lian, XIE Wen-jing, NIU Chun, ZHANG Ping*

(Ningxia Tairui Pharmaceutical Company Limited, Yinchuan 750101, China)

Corresponding author: ZHANG Ping, E-mail: 18995018336@163.com

Abstract: In order to select a good fermentation producing strain of trans-4-hydroxy-L-proline (Hyp), comparative analysis were made in growth characteristics and production efficiency of 8 strains *Escherichia coli* producing Hyp. Hyp-Y1801 strain and Hyp-Y1805 strain with high inheritance stability and high fermentation efficiency were screened. The fermentation potency of Hyp-Y1801 and Hyp-Y1808 were 50.4 and 47.5 g/L respectively. The result had great significance for industrial production of trans-4-hydroxy-L-proline.

Key words: trans-4-hydroxy-L-proline; fermentation strain; *Escherichia coli*; screening

反式-4-羟基-L-脯氨酸(trans-4-hydroxy-L-proline, Hyp),简称羟脯氨酸,是一种稀有亚氨基酸,在医药保健、材料化工、食品营养和护肤美容等行业都具有广泛的应用^[1-3]。值得关注的是,Hyp是胶原蛋白的组成成分,也是肝和胆囊的构成成分,具有多种生理功能和生物活性,对维持动物正常生理代谢、提高体内营养物质利用效率起着重要作用^[4-6]。目前,Hyp的生产方法有三种,即生物组

织提取法、化学合成法和微生物合成法。生物组织提取法是利用动植物组织作为原料,通过系列化学方法回收得到Hyp^[7]。目前,该方法是国内生产Hyp的主要方法,但存在生产和纯化步骤多、杂酸含量高、产率低、成本高、环境污染大、废水废渣难处理等诸多问题^[5]。化学合成法多以(S)-苄氧甲基环氧乙烷为原料,通过系列化学反应,最终生成Hyp。该方法存在原材料成本高,生产过程中会使

作者简介:李春玲,从事微生物发酵菌种选育研究。

通讯作者:张萍。E-mail:18995018336@163.com

用有毒性物质等问题,实际生产已经弃用^[8]。微生物合成法即微生物发酵法,是通过微生物细胞发酵表达反式-4-脯氨酸羟化酶(trans-4-proline hydroxylase),将游离的L-脯氨酸(L(-)-proline,)转化为Hyp的生产方法。与前两种方法相比,微生物发酵法具有反应所需能耗低、专一性极强、无副产物、原材料来源广泛、不使用或很少使用有毒物质、环境污染小等优点^[8-10]。

采用生物组织提取法生产Hyp的方法已经不符合我国日益严峻的环保形式,而且有限的动植物资源也严重制约了本行业的发展。化学合成法工艺复杂,成本较高,且环境污染严重。因此,采用微生物发酵法生产Hyp将成为未来发展的必然趋势。但是,国内有关Hyp的微生物发酵法研究起步较晚,仅见盛花开^[11]、袁春伟^[12]、刘合栋^[13]等关于基因工程菌株构建、初级发酵条件优化的研究,鲜见工业化生产目的菌株筛选相关报道。鉴于此,实验以工业化生产应用为目的,对引进的8株产Hyp菌株的生长特性、发酵效率进行比较分析,以期筛选出优良菌株,为实现Hyp微生物发酵工业化生产奠定一定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 出发菌株为8株含有重组质粒的产Hyp大肠杆菌,由宁夏泰瑞制药股份有限公司技术中心引进保存。胰蛋白胨、酵母提取物购自Oxoid公司,琼脂粉购自Sigma公司,其他试剂均为国产分析纯。

活化平板(LB固体):包含胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠,pH7.0~7.2,琼脂粉。抗性平板(LB固体):包含胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂粉、抗性RL,pH7.0~7.2。抗性培养基(LB液体):包含胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂粉、灭菌冷却后添加抗性RL,pH7.0~7.2。非抗性培养基(LB液体):包含胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂粉,pH7.0~7.2。Hyp摇瓶培养基(MCG):包含葡萄糖、甘油、尿素、玉米浆、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 VB_1 、抗性RL、L-脯氨酸,pH7.4。发酵罐(50L)培

养基:葡萄糖、甘油、尿素、玉米浆、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 VB_1 、抗性RL、L-脯氨酸,pH7.4。

恒温大幅振荡摇床(HQL150C,武汉科学仪器厂)、恒温培养箱(LHP160,江苏杰瑞尔电器有限公司)、分光光度计(BECKMANDU-600)、高效液相色谱系统(Waters)。

1.2 方 法

1.3.1 菌种活化 将冷藏于-80℃冰箱的菌种取出,室温融化,接种环划线接种于活化平板上,30℃培养过夜,用活化后的菌种制备斜面种子,保存待用。

1.3.2 菌株重组质粒稳定性测定 参照盛花开等的方法^[11],活化后的菌种接至装30mL抗性培养基的三角瓶(规格250mL)中,30℃、220r/min、摇床培养20h后转接非抗性培养基,连续转接6次,取菌液梯度稀释至 10^{-6} ,涂布至活化平板,然后挑单菌落接种至抗性平板,统计质粒留存率。质粒留存率=生长菌落数/点接菌落数×100%。

1.3.3 种子制备 活化后的菌种挑取单菌落,接种至装有30mL抗性培养基的三角瓶(规格250mL)中,30℃、220r/min、摇床培养10h。

1.3.4 菌株生长曲线测定 取种子液3.6mL接种于装有60mL抗性培养基的三角瓶(规格500mL)中,间隔2h取发酵液,连续取样12次,以ddH₂O为对照,测定样液在600nm吸光值,作生长曲线。

1.3.5 菌株全细胞酶活测定 参照刘合栋等的方法^[13],取发酵液1.5mL,12000r/min离心2min;弃去上清液,回收菌体,加入500μL酶反应缓冲液(MES240mmol/L、L-脯氨酸20mmol/L、α-酮戊二酸40mmol/L、硫酸亚铁4mmol/L、Vc8mmol/L)重悬菌体细胞,混匀,30℃220r/min、摇床培养15min后,沸水浴2min,终止酶反应,测定Hyp浓度,分析细胞全酶活性。定义1个单位酶活为1min将1nmol/L L-脯氨酸完全转化为反式-4-羟脯氨酸的酶量,单位为U。全细胞酶活是每mg干菌体的酶活,单位为U/mg。

1.3.6 Hyp浓度测定 参照盛花开等的方法^[11],取发酵时间24~48h的发酵液,每隔4h取样1次,

利用高效液相色谱法测定 Hyp 浓度。液相条件：C18 柱 (200 mm×4.6 mm)，流动相为乙腈：水 = 5：95，流速为 1.0 mL/min，柱温为室温。

2 结果

2.1 菌株重组质粒稳定性分析 8 株菌株经活化后，对其菌株重组质粒稳定性进行测定分析，结果发现编号 Hyp-Y1801、Hyp-Y1805、Hyp-Y1808 的菌株重组质粒的留存率均超过 95%，重组质粒稳定性较好，作为出发菌株(表 1)。

表 1 菌株重组质粒稳定性

Tab 1 Stability of recombinant plasmid in strains

菌株号	质粒留存率/%
Hyp-Y1801	97.3
Hyp-Y1802	63.5
Hyp-Y1803	52.6
Hyp-Y1804	74.8
Hyp-Y1805	96.7
Hyp-Y1806	85.4
Hyp-Y1807	71.5
Hyp-Y1808	98.6

2.2 菌株生长曲线分析 对 Hyp-Y1801、Hyp-Y1805、Hyp-Y1808 菌株的发酵生长曲线进行分析发现，三菌株均在发酵 4 h 时进入对数生长期，在 2 h

后进入平稳期，对数期约为 8 h(图 1)。种子培养时间确定为 10 h。

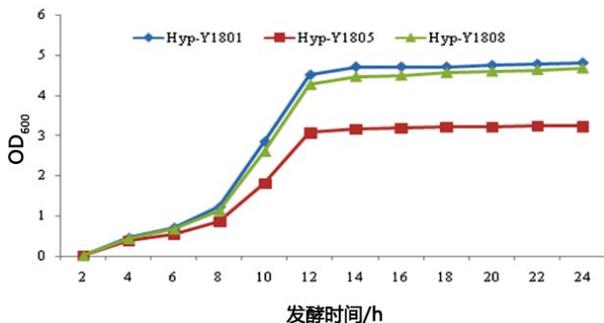


图 1 菌株生长曲线分析

Fig 1 Strain growth curve analysis

2.3 菌株全细胞酶活分析 取 Hyp-Y1801、Hyp-Y1805、Hyp-Y1808 平稳期(12 h)发酵液，对菌株全细胞酶活进行分析发现，Hyp-Y1801、Hyp-Y1805、Hyp-Y1808 全细胞酶活分别为 0.076、0.037、0.071 U/mg，其中 Hyp-Y1801、Hyp-Y1808 酶活较高。

2.4 菌株发酵效率分析 以 Hyp-Y1801、Hyp-Y1808 为生产菌株进行发酵小试，每隔 4 h 取样 1 次，测定发酵液中 Hyp 的浓度，以此确定菌株的生产效率。表 2 结果表明，随着时间延长 Hyp 的浓度逐渐升高，发酵 44 h 时 Hyp 浓度达到最高，分别为 50.4 g/L、47.5 g/L。

表 2 菌株发酵效率

Tab 2 Fermentation efficiency of strains

菌株号	不同发酵时间的 Hyp 浓度/(g · L ⁻¹)											
	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h	28 h	32 h	36 h	40 h	44 h	48 h
Hyp-Y1801	1.1	1.5	2.2	4.6	7.5	10.6	14.2	18.9	27.5	44.3	50.4	49.8
Hyp-Y1808	0.9	1.3	1.9	4.2	7.2	10.1	13.6	16.2	24.6	40.3	47.5	47.1

3 分析与讨论

目前，国内主要依靠生物组织提取生产 Hyp，该方法存在最主要的问题是产物的得率很低，仅为 4%~7%，而且产生大量排放物，带来巨大的环保风险，这些问题大大限制了该技术规模化应用^[6]，导致国内 Hyp 生产发展十分缓慢，生产规模较小，产

量极其有限。但是，随着 Hyp 的广泛应用，市场对其需求急剧增加。微生物发酵法生产技术具有成本低、效率高等优势，采用该技术开展 Hyp 规模化、高效化生产，是未来发展的必然。目前，国内尚未见微生物发酵法工业化生产 Hyp 的报道。

Hyp 生产的发酵菌株主要包括细菌、霉菌以及

链霉菌等,其中对大肠杆菌(细菌)发酵菌株研究较多,应用较为成熟^[8]。本研究引进了 8 株产 Hyp 大肠杆菌菌株,并对其发酵生产性能进行系统分析。引进的产 Hyp 大肠杆菌为基因工程菌株,菌体所含的重组质粒负责编码 Hyp 合成的关键酶。重组质粒的稳定性是保障 Hyp 发酵生产的根本。本研究发现, Hyp-Y1801、Hyp-Y1808 菌株重组质粒的稳定性很好,留存率均超过了 95%,可以有效保障 Hyp 发酵生产的顺利进行。在此基础上,本研究对菌株的生长特性、全细胞酶活和生产效率进行了分析,发现 Hyp-Y1801、Hyp-Y1808 发酵 4 h 时,进入对数生长期,在 12 h 后进入平稳期,对数期约为 8 h,这与盛花开^[11]、刘合栋^[13]等的研究报道较一致。Hyp-Y1801 菌株的全细胞酶活较高,且发酵效价达到了 50.4 g/L,较袁春伟^[12]、刘合栋^[13]等报道的高 18.6%,较 Shibasaki 等^[8]报道的高 22.9%,具有较好的实际生产应用潜力。有关 Hyp-Y1801 中试生产试验正在进行之中,菌株的优良特性在规模化生产中的实际表现还有待进一步验证。

参考文献:

- [1] Remuzon P. Trans-4-Hydroxy-L-proline, a useful and versatile chiral starting block [J]. *Tetrahedron Letters*, 1996, 52(44): 13803-13835.
- [2] Kumar A V, Rao K R. Trans-4-hydroxy-L-proline: a novel starting material for N-alkylpyrroles synthesis [J]. *Tetrahedron Letters*, 2011, 52(25): 3237-3239.
- [3] Nagumo S, Matoba A, Ishii Y, et al. Synthesis of (-)-TAN1251A using 4-hydroxy-L-proline as a chiral source [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 9871-9877.
- [4] 周汉林,莫放,黄鸿威,等. 羟脯氨酸在反刍动物营养研究中的应用 [J]. *草业科学*, 2005, 22(11): 84-87.
Zhou H L, Mo F, Huang H W, et al. Application of hydroxyproline in ruminant nutritional research [J]. *Pratacultural Science*, 2005, 22(11): 84-87.
- [5] 朱亚娟,彭青,陈艳,等. 反式-4-羟基-L-脯氨酸的研究进展 [J]. *发酵科技通讯*, 2018, 47(2): 115-121.
Zhu YJ, Peng Q, Chen Y, et al. Reserch progress of trans-4-hydroxy-L-proline [J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2018, 47(2): 115-121.
- [6] Aoki M, Suto K, Komatsu M, et al. Increasing effect of an oral intake of L-hydroxyproline on the soluble collagen content of skin and collagen fragments in rat serum [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76(6): 1242-1244.
- [7] 张自强,赵东旭,杨新林. 羟脯氨酸的研究与开发 [J]. *氨基酸与生物资源*, 2006, 28(1): 55-58.
Zhang Z Q, Zhao D X, Yang X L. Research and development of hydroxyproline [J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2006, 28(1): 55-58.
- [8] Shibasaki T, Mori H, Ozaki A. 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.
- [9] 衣玉兰. 反式-4-羟脯氨酸的生物合成 [D]. 华东理工大学, 2013.
Yi Y L. Biosynthesis of trans-4-hydroxy-proline [D]. East China university of science and technology, 2013.
- [10] Falcioni F, Blank L M, Oliver F, et al. Proline availability regulates proline-4-hydroxylase synthesis and substrate uptake in proline-hydroxylating recombinant *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 3091-3100.
- [11] 盛花开,衣玉兰,李志敏,等. 重组大肠杆菌多基因串联表达合成反式-4-羟基-L-脯氨酸 [J]. *生物技术*, 2016, 26(1): 81-86.
Sheng H K, Yi Y L, Li Z M, et al. Co-expression of multiple genes for the synthesis of trans-4-hydroxy-proline in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology*, 2016, 26(1): 81-86.
- [12] 袁春伟,何艳春,张胜利,等. 重组大肠杆菌 BL21(pUC19-Hyp)产羟脯氨酸的补料分批培养 [J]. *生物加工过程*, 2014, 12(4): 43-48.
Yuan C W, He Y C, Zhang S L, et al. Production of hydroxyproline by fed-batch culture of novel recombinant *Escherichia coli* BL21 (pUC19-Hyp) [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(4): 43-48.
- [13] 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): 44-50.
Liu H D, Yuan C W, Zhang Z Y. Expression of codon-optimized proline-4-hydroxylase in *Escherichia coli* and it effect on trans-4-hydroxyproline synthesis [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(6): 44-50.