

不同培养条件对大肠杆菌工程菌产 - 胡萝卜素的影 响

杜桂彩¹, 刘 敏², 赵 瑜¹, 李荣贵¹

(1.青岛大学生物系, 山东省天然色素重点实验室, 山东 青岛 266071;

2.山东师范大学逆境植物研究所, 山东 济南 250014)

摘 要: 将克隆了噬夏孢欧文氏菌类胡萝卜素合成相关基因 *crtE*、*crtB*、*crtI* 的重组质粒 pET-15bcrEIB 和 *crtY* 的重组质粒 pACYC-184crtY 共转化 *E.coli* BL21(DE3) 构建工程菌。研究了碳源、氮源、金属离子、培养温度、光照、pH 值、诱导时间等参数对工程菌生长及色素累积的影响, 确定了合适的培养条件: 培养基为改良 LB 培养基(蛋白胨 10g/L、酵母提取物 10g/L、可溶性淀粉 5g/L、MgCl₂ 0.04g/L、FeCl₃ 0.01g/L、NaCl 10g/L, pH5.8), 光照, 起始培养温度为 37℃, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 诱导温度降至 28℃; 诱导时间为 12h。发酵完成后工程菌的生物量为 7.32g dw/L, β-胡萝卜素的最高含量可达 5.11mg/g dw。

关键词: β-胡萝卜素; 工程菌; 培养条件

Effects of Different Culture Conditions on Production of β-carotene by Engineering *Escherichia coli*

DU Gui-cai¹, LIU Min², ZHAO Yu¹, LI Rong-gui¹

(1.Department of Biology, Qingdao University, Key Laboratory for Natural Pigment of Shandong Province, Qingdao 266071, China; 2.Institute of Plant Stress, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Two expression vectors, pET-15bcrEIB in which *crtE*, *crtB*, *crtI* of *Erwinia uredovora* were cloned and pACYC-184crtY in which *crtY* was cloned, were transformed into *E.coli* BL21(DE3) simultaneously to construct engineering bacterium. The engineering bacterium could accumulate β-carotene when induced by IPTG. Effects of different culture conditions such as carbon sources, nitrogen sources, metal ions, culture temperature, light, medium pH and induction time on bacterial growth and β-carotene accumulation were investigated. The optimal culturing conditions obtained are as follows: Modified LB broth (trypton 10 g/L, yeast extract 10 g/L, soluble starch 5 g/L, MgCl₂ 0.04 g/L, FeCl₃ 0.01 g/L and NaCl 10 g/L as well as pH 5.8) as medium and in light, the engineering bacterium firstly is shake-cultured at 37 °C to OD₆₀₀ 0.6 of culture liquid, subsequently IPTG added to final concentration 0.5 mmol/L, and then further cultured for 14 h at 28 °C. The engineering bacterium could grow to 7.32 g dw/L in LB medium and accumulate β-carotene to 5.11 mg/g dw under optimal culture conditions.

Key words: β-carotene; engineering bacterium; culture conditions

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0272-05

类胡萝卜素(carotenoids)是一类呈现黄色、橙色或红色的植物色素, 它们广泛存在于各种动植物和微生物中。许多类胡萝卜素是 VA 的重要来源, 同时又是强抗氧化剂, 具有一定的癌症预防功效。其中, β-胡萝卜素是类胡萝卜素家族中的典型代表, 分子式为 C₄₀H₅₆, 相对分子质量 536.85。随着许多生物类胡萝卜素合成基因的相继克隆和合成途径中相关催化酶性质的

深入研究, 为类胡萝卜素合成机理的研究提供了便利, 也为利用微生物发酵来获取类胡萝卜素提供了可能。微生物繁殖速度快、适应性强, 且通过控制不同的转入基因, 可定向大量产生不同种类的类胡萝卜素。

噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*)是一种植物病原菌, 可合成番茄红素、β-胡萝卜素、玉米黄素、玉米黄素二糖苷等多种类胡萝卜素, 其合成途径最早被

收稿日期: 2007-08-27

基金项目: 青岛市自然科学基金项目(05-1-JC-91)

作者简介: 杜桂彩(1971-), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为天然色素的开发与利用。E-mail: rongguili@yahoo.com

Masaki 等阐明^[1], 参与代谢的多个相关酶的编码基因也被克隆。汪靖超等^[2-3]纯化了噬夏孢欧文氏菌重组八氢番茄红素合成酶和 GGPP 合成酶并对其性质进行了研究; 李丽等^[4]表达纯化了番茄红素- β -环化酶, 并对重组蛋白的催化活性进行了研究, 所有这些工作为类胡萝卜素的构建以及通过代谢调控提高类胡萝卜素的含量研究打下了基础。李丽等^[5]还研究了无机盐和碳氮源对噬夏孢欧文氏菌中类胡萝卜素积累的影响, 确定了该菌累积类胡萝卜素的最佳培养条件; 刘敏等^[6]则构建了生产番茄红素的工程菌, 并对影响番茄红素累积的因素进行了探讨; 刘敏等^[7]也将噬夏孢欧文氏菌的 *crtE*、*crtB*、*crtI* 以及 *crtY* 基因置于 T7 启动子的控制之下, 共转化大肠杆菌, 获得了累积 β -胡萝卜素的工程菌。本实验是在该研究的基础上, 通过培养条件的优化, 为大量生产这种类胡萝卜素提供参考, 同时为 β -胡萝卜素的代谢调控研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂仪器

1.1.1 供试菌种

噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*)20D3 菌株(ATCC 19321) 美国典型菌种保藏中心(ATCC); *E.coli* DH5 α 、*E.coli* BL21(DE3) 美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基与化学试剂

蛋白胨、酵母提取物 英国 Oxoid 公司; 氨苄青霉素、氯霉素、IPTG 美国 Sigma 公司; 其余试剂为国产生化试剂或分析纯试剂。

1.1.3 仪器与设备

CR21G 高速冷冻离心机 日本日立公司; UV-1601 紫外可见分光光度计、LC-6A 高效液相色谱仪 日本岛津公司; JYPC-II 型超声波细胞破碎仪 宁波新芝科器研究所; HZQ-X100 振荡培养箱 哈尔滨东联电子技术有限公司; MB205B 型电子天平 上海精密天平公司。

1.2 方法

1.2.1 生产 β -胡萝卜素的构建

将噬夏孢欧文氏菌的 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 基因串联在一起克隆到 pET-15b 上构建重组质粒 pET-15bcrEIB, 将 *crtY* 首先克隆到 pET-15b 上, 再将该基因连同上游的 T7 启动子和下游的 T7 终止子切下克隆到 pACYC-184 上构建 pACYC-184crtY, 将这两个重组质粒共转化 *E.coli* BL21(DE3) 构建工程菌, 具体过程参照刘敏等^[7]的方法进行。

1.2.2 工程菌的基本培养条件

工程菌单菌落接种于 20ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 30 μ g/ml 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养(200r/min)过夜, 按 1:20(V/V)的比例接种于含同样抗生素的液

体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 培养温度降至 28 $^{\circ}$ C, 诱导 8h 后, 4 $^{\circ}$ C, 8000r/min 离心 10min 收集菌体。

1.2.3 不同碳源对工程菌累积 β -胡萝卜素的影响

在 LB 培养基中分别添加浓度为 5g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、柠檬酸钠、可溶性淀粉, 其他培养方法同基本培养条件。发酵结束后, 分别测定菌体干重和 β -胡萝卜素含量。

1.2.4 不同氮源对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

在 LB 培养基中分别添加 0.05% 的氮源, 每升 LB 培养基中分别添加蛋白胨 3.933g、酵母提取物 5.10g、牛肉浸膏 6.00g、硝酸铵 1.43g 或脲 1.07g(本实验所用蛋白胨的含氮量为 12.7%, 酵母提取物含氮量为 9.8%, 牛肉浸膏含氮量为 8%), 其他培养条件同基本培养条件。发酵结束后, 分别测定菌体干重和 β -胡萝卜素含量。

1.2.5 无机盐对工程菌生长和 β -胡萝卜素合成的影响

在 LB 培养基分别添加 CaCl_2 (0.02g/L)、 MgCl_2 (0.02g/L)、 NiCl_2 (0.02g/L)、 FeCl_3 (0.02g/L)、 MnCl_2 (0.02g/L) 或 ZnCl_2 (0.02g/L), 其他培养条件同基本培养条件。发酵结束后, 分别测定菌体干重和 β -胡萝卜素含量。

1.2.6 培养基初始 pH 工程菌生长和 β -胡萝卜素合成的影响

在 LB 培养基中添加磷酸二氢钠和磷酸氢二钠以改变培养基的初始 pH, 分别配制 pH 为 5.8、6.4、7.0、7.6、8.0 的 5 种培养基, 其他培养同基本培养条件。发酵结束后, 分别测定菌体干重和 β -胡萝卜素含量。

1.2.7 不同诱导温度对工程菌 β -胡萝卜素产量的影响

选用 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 当菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 向培养基内加入诱导剂 IPTG 至 0.5mmol/L, 分别于 37 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C 继续培养 14h。离心收集菌体, 发酵结束后, 分别测定菌体干重和 β -胡萝卜素含量。

1.2.8 光照对工程菌 β -胡萝卜素产量的影响

选用 LB 培养基, 日光灯照射条件下(光强约为 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, 对照组用黑纸包起来同时培养, 当菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 向培养基内加入诱导剂 IPTG 至 0.5mmol/L, 分别于 30 $^{\circ}$ C 继续培养 6h。离心收集菌体, 测定菌体中 β -胡萝卜素的含量。

1.2.9 优化条件下的工程菌的发酵

挑取工程菌单菌落, 接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按照 1:20(V/V)的比例接种于优化培养基(蛋白胨 10g/L、酵母提取物 10g/L、可溶性淀粉 5g/L、 MgCl_2 0.04g/L、 FeCl_3 0.01g/L、NaCl 10g/L, pH5.8), 光照; 起始培养温度为 37 $^{\circ}$ C; 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 诱导温度降至 28 $^{\circ}$ C, 诱导时间

为12h。发酵完成后,分别测定菌体干重和 β -胡萝卜素含量。

1.2.10 β -胡萝卜素的提取与鉴定

参照刘敏等^[7]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

工程菌在添加了柠檬酸钠和可溶性淀粉的LB培养基中培养时, β -胡萝卜素含量较对照高25%,添加了可溶性淀粉的菌体生物量与对照相当,添加了柠檬酸钠的菌体生物量有所下降(图1)。而葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油4种碳源,均明显降低了 β -胡萝卜素含量,且不能通过增加菌体生物量来弥补。因此,工程菌培养最适宜的添加碳源为可溶性淀粉。

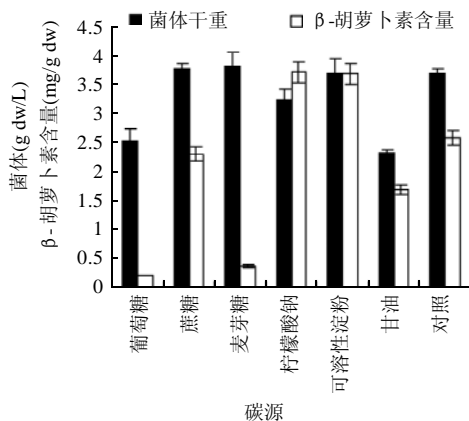


图1 不同碳源对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

Fig.1 Effects of different carbon sources on growth and β -carotene contents of engineering bacterium

2.2 不同氮源对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

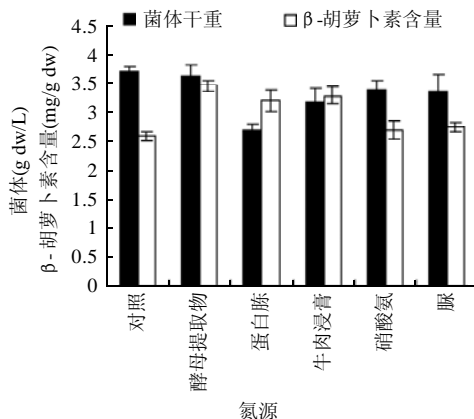


图2 不同氮源对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

Fig.2 Effects of different nitrogen sources on growth and β -carotene contents of engineering bacterium

工程菌在添加了酵母提取物的LB培养基中培养时, β -胡萝卜素含量较对照高30%,菌体生物量与对照相当(图2)。说明酵母提取物是产 β -胡萝卜素的*E.coli*的较适合的添加氮源。另外,五种添加氮源都促进了 β -胡萝卜素产率的提高,说明LB培养基的氮源不能满足工程菌产 β -胡萝卜素的需要,培养时应该适当补充氮源。

2.3 不同金属离子对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

各种金属离子中 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 能够明显促进工程菌中 β -胡萝卜素的合成,而不影响菌体生长,菌体中 β -胡萝卜素的含量较对照分别高38%、26%。而 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 等对 β -胡萝卜素的累积具有一定的抑制作用(图3)。为了寻找培养基中合适的 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 添加浓度,该研究又检测了两种金属离子浓度变化对工程菌 β -胡萝卜素产量的影响,从图4、5可以看出,随着 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 浓度的上升,菌体中 β -胡萝卜素的含量有不同程度的上升, $MgCl_2$ 浓度达 $0.04 \mu g/L$ 时, $FeCl_3$ 浓度达 $0.01 \mu g/L$ 时,菌体中 β -胡萝卜素产量分别达最高。因此,培养时培养基中 $MgCl_2$ 的添加量为 $0.04 \mu g/L$, $FeCl_3$ 的添加量为 $0.01 \mu g/L$ 。

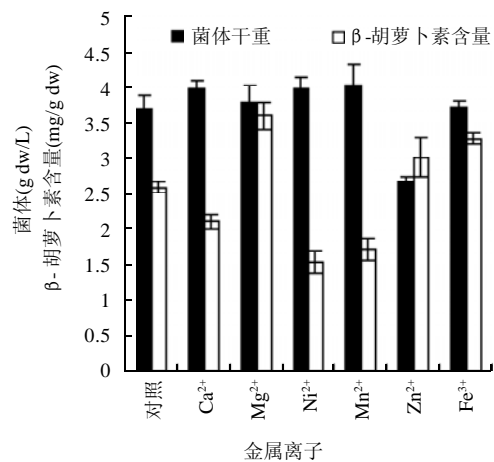


图3 各种金属离子对工程菌生长和 β -胡萝卜素量的影响

Fig.3 Effects of different metal ions on growth and β -carotene contents of engineering bacterium

2.4 培养基初始pH值对工程菌生长和 β -胡萝卜素含量的影响

工程菌在pH6.8左右培养时,发酵液的生物量达到最大,而在pH5.8菌体的工程菌中 β -胡萝卜素产率最高(图6)。综合考虑单位发酵液中类胡萝卜素的得率,选择pH5.8作为该工程菌培养的最适初始pH。

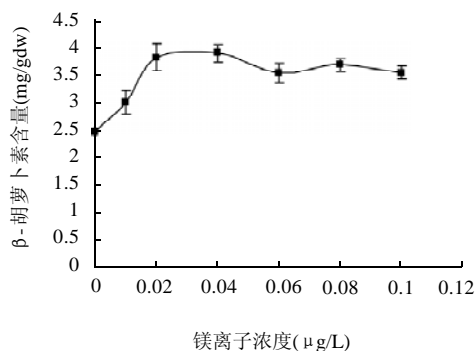


图4 镁离子浓度对β-胡萝卜素产率的影响

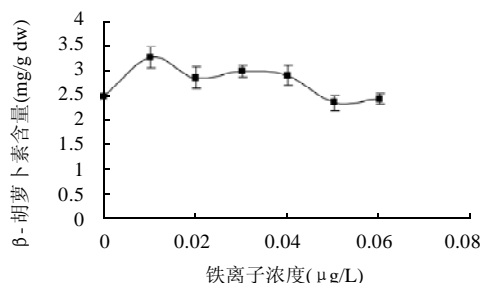
Fig.4 Effects of different Mg^{2+} concentrations on β -carotene content of engineering bacterium

图5 铁离子浓度对β-胡萝卜素产率的影响

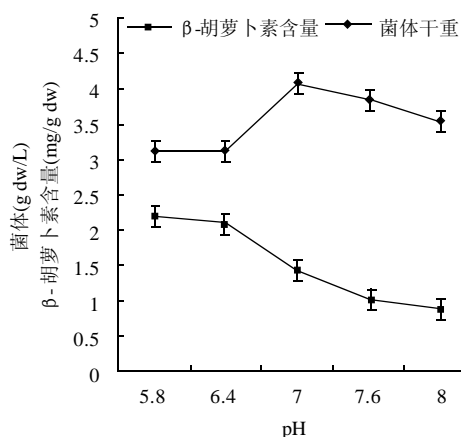
Fig.5 Effects of different Fe^{3+} concentrations on β -carotene content of engineering bacterium

图6 pH对工程菌生长和β-胡萝卜素量的影响

Fig.6 Effects of pH on growth and β -carotene content of engineering bacterium

2.5 不同诱导温度对工程菌β-胡萝卜素产率的影响

从图7可以看出,在10h以内,37℃或30℃培养对细胞番茄红素的累积影响不大,37℃培养10h胞内β-胡萝卜素含量达最大值,进一步培养则含量急速下降;28℃培养12h,胞内累积的β-胡萝卜素达最大值,含量较37℃培养时高5%。

2.6 光照对工程菌生长和β-胡萝卜素含量的影响

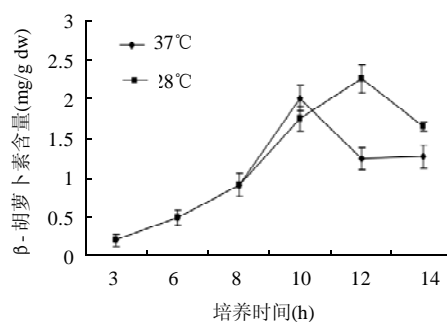


图7 不同诱导温度对工程菌β-胡萝卜素含量的影响

Fig.7 Effects of induction temperature on β -carotene content of engineering bacterium

从图8可以看出,光照可明显提高β-胡萝卜素的产率,幅度可达50%,但菌体生物量有所下降。可能是因为随着工程菌中β-胡萝卜素产量的增加,β-胡萝卜素作为一种疏水的次生代谢物对细菌生长有抑制作用。

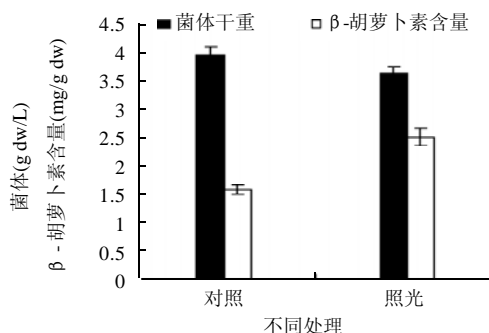


图8 光照对工程菌生长和β-胡萝卜素量的影响

Fig.8 Effects of light on growth and β -carotene content of engineering bacterium

2.7 优化条件下工程菌的生长和β-胡萝卜素的含量

根据不同培养条件下确定的最适因素进行了优化组合,结果表明在该条件下,发酵完成后工程菌的生物量为7.32g dw/L,β-胡萝卜素的含量可达5.11mg/g dw,生物量和β-胡萝卜素含量都比其他培养条件下获得的生物量和β-胡萝卜素的含量都高。

3 讨论

β-胡萝卜素是具有多种生物活性的类胡萝卜素,广泛应用于食品、化妆品和药品等领域,传统上此类天然色素主要从胡萝卜等植物中获得。目前β-胡萝卜素的生产方法有微生物发酵、植物提取和化学合成3种。虽然β-胡萝卜素在很多植物和微生物中均有分布,但由于其中所含色素的成分复杂,且很多番茄红素、β-胡萝卜素与脂肪酸形成酯,致使提取单一成分的成本较高。天然β-胡萝卜素为反式和顺式的混合构

型, 而化学合成的 β -胡萝卜素为全反式构型, 这种单一的结构使得产品的生物利用率较低, 其在人体内的吸收率仅为天然产品的10%。化学合成法生产的 β -胡萝卜素, 还残留少量合成过程中加入一些成分, 这些成分能致染色体畸变, 人体过多摄入会造成中毒。生物发酵法生产的 β -胡萝卜素为天然产品, 人体吸收好, 营养成分高, 无毒副作用^[8]。目前, 通过大面积养殖盐藻获得类胡萝卜素的方法最为成熟。但杜氏盐藻的养殖需要长时间的高温和强烈光照, 且需要10%以上的高盐浓度。国内许多地方也尝试过培养, 但其生物量和类胡萝卜素含量都不是太高^[9]。随着类胡萝卜素合成途径的阐明和相关基因的相继克隆, 为通过基因工程的方法使原本不产生类胡萝卜素的生物大量累积这类色素成为可能, 工业上可为类胡萝卜素的生产提供新的原料。目前已成功的实现了类胡萝卜素合成代谢途径重建的微生物有大肠杆菌、酵母菌、欧文氏菌等。

本实验将 β -胡萝卜素合成相关基因 $crtE$ 、 $crtB$ 、 $crtI$ 、 $crtY$ 都置于强启动子(T7启动子)的下游, 且在基因的下游利用强的终止子(T7终止子)进行表达, 工程菌大量累积 β -胡萝卜素, 其含量明显高于利用这4个基因本身启动子的噬夏孢欧文氏菌, 推测这4个基因的表达水平直接影响 β -胡萝卜素合成, 暗示GGPP合成酶、八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素去饱和酶、番茄红素 β -环化酶所催化的反应中的一步或多步反应是 β -胡萝卜素合成的限速步骤。Kang等^[10]发现 dxs 、 $appY$ 、 crl 和 $rpoS$ 过量表达会促进工程菌番茄红素的累积, 最高可达原工程菌产量的8倍, 该研究为进一步通过对工程菌中的相关基因的改造以获得更高产番茄红素和 β -胡萝卜素的工程菌的研究提供了借鉴, 同时 β -胡萝卜素前体物质番茄红素的增加, 也会进一步促进番茄红素向 β -胡萝卜素的转化。

本研究还发现, 在LB培养基中添加可溶性淀粉、酵母提取物、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 能明显促进 β -胡萝卜素的合成, Mg^{2+} 可能是 β -胡萝卜素合成相关酶的辅因子, Fe^{3+} 则可能是催化从番茄红素至 β -胡萝卜素的番茄红素 β -

环化酶辅因子, 已有的研究表明, 噬夏孢欧文氏菌 $crtB$ 基因编码的八氢番茄红素合成酶以与 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 结合的ATP作为必需的辅助因子^[11]。另外, 光照、偏酸性培养基(pH5.8)很可能是类胡萝卜素合成相关酶的有力因素和最适条件。Bartley等^[12]在生产番茄红素的工程菌的代谢控制研究中发现, 光照在前八氢番茄红素的合成过程中是必需的。

参考文献:

- [1] MISAWA N, NAKAGAWA M, KOBAYASHI K, et al. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 1990, 172(12): 6704-6712.
- [2] 汪靖超, 姜颖, 杜桂彩, 等. 噬夏孢欧文氏菌类 $crtB$ 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 青岛大学学报:自然科学版, 2006, 19(2): 74-78.
- [3] 汪靖超, 孙东平, 李荣贵. 噬夏孢欧文氏菌(*Erwinia uredovora*)类胡萝卜素合成相关基因 $crtE$ 的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 276-279.
- [4] 李丽, 吴拓, 郭道森, 等. 噬夏孢欧文氏菌 $crtY$ 基因在大肠杆菌中的表达及其产物的纯化[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 203-207.
- [5] 李丽, 杜桂彩, 凌树宽, 等. 无机盐和碳氮源对噬夏孢欧文氏菌积累类胡萝卜素的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 183-186.
- [6] 刘敏, 李荣贵, 杜桂彩, 等. 累积番茄红素的大肠杆菌工程菌及其培养条件的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8): 47-51.
- [7] 刘敏, 李荣贵, 杜桂彩, 等. 生产 β -胡萝卜素大肠杆菌工程菌的构建[J]. 药物生物技术, 2006, 14(1): 1-4.
- [8] 朱秀灵, 车振明, 徐伟, 等. β -胡萝卜素生理功能及提取技术的研究进展[J]. 西华大学学报, 2005, 24(1): 71-75.
- [9] 施跃峰. 天然 β -胡萝卜素研究开发生态[J]. 食品研究与开发, 2000, 21(2): 13-16.
- [10] KANG M, LEE Y, YOON S, et al. Identification of genes affecting lycopene accumulation in *Escherichia coli* using a shot-gun method[J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91(5): 636-642.
- [11] NEUDERT U, MARTINEZ-FEREZ I, FRAZER P D, et al. Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1392: 51-58.
- [12] BARTLEY G E, SCOLINIK P A, BEYER P. Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturases, phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-cis pathway to yield pro-lycopene[J]. Eur J Biochem, 1999, 259: 396-403.