

· 医药生物技术 ·

# 大肠杆菌高密度发酵表达 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶及咖啡酸的高效生物合成

张红<sup>1</sup>, 林金连<sup>1</sup>, 胡定行<sup>1</sup>, 刘贵友<sup>2</sup>, 孙磊<sup>1,2</sup>

1 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006

2 江苏第二师范学院 生命科学与化学化工学院, 江苏 南京 211200

张红, 林金连, 胡定行, 刘贵友, 孙磊. 大肠杆菌高密度发酵表达 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶及咖啡酸的高效生物合成. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3466-3477.

ZHANG H, LIN JL, HU DH, LIU GY, SUN L. High-density fermentation of *Escherichia coli* to express 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase and efficient biosynthesis of caffeic acid. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3466-3477.

**摘要:** 来源于大肠杆菌的 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶 (4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase, 4HPA3H) 可以催化对香豆酸生物合成咖啡酸。为了实现 4HPA3H 的扩大生产和咖啡酸的高效生物合成, 首先构建过表达 4HPA3H 的大肠杆菌工程菌, 其次使用 5 L 发酵罐进行高密度发酵生产 4HPA3H, 再而优化采用工程菌株进行全细胞催化产咖啡酸的条件。最终实现了在 5 L 发酵罐中发酵, 工程菌株生物量达到干重 34.80 g/L。通过使用 5 L 发酵罐作为生物反应器进行全细胞催化, 经过 6 h 的催化可产生 18.74 g/L (0.85 g/(L·OD<sub>600</sub>)) 咖啡酸, 摩尔转化率为 78.81%, 是目前文献报道 4HPA3H 以对香豆酸为底物合成咖啡酸的最高水平。初步实现了高密度培养大肠杆菌表达 4HPA3H 并高效生物合成咖啡酸, 为工业化生产奠定了基础。

**关键词:** 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶; 咖啡酸; 高密度发酵; 全细胞催化

**Received:** March 18, 2022; **Accepted:** May 6, 2022; **Published online:** May 9, 2022

**Supported by:** Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (2114050001492); Natural Science Foundation of the Higher Education Institutions of Jiangsu Province, China (19KJA430013)

**Corresponding authors:** SUN Lei. E-mail: nj.sunleith@outlook.com

LIU Guiyou. E-mail: liuguiyou2001@163.com

**基金项目:** 广东省自然科学基金 (2114050001492); 江苏省高校自然科学基金 (19KJA430013)

# High-density fermentation of *Escherichia coli* to express 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase and efficient biosynthesis of caffeic acid

ZHANG Hong<sup>1</sup>, LIN Jinlian<sup>1</sup>, HU Dinghang<sup>1</sup>, LIU Guiyou<sup>2</sup>, SUN Lei<sup>1,2</sup>

1 School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 School of Life Sciences and Chemical Engineering, Jiangsu Second Normal University, Nanjing 211200, Jiangsu, China

**Abstract:** The 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (4HPA3H), originated from *Escherichia coli*, converts *p*-coumaric acid to caffeic acid. In order to improve the efficiency of caffeic acid biosynthesis, we engineered *E. coli* for overexpression of 4HPA3H. The high-density fermentation of the engineered *E. coli* was conducted in a 5 L bioreactor. Subsequently, the conditions for whole-cell biocatalysis were optimized. The dry cell weight of the 4HPA3H-expressed strain reached 34.80 g/L. After incubated in the bioreactor for 6 h, 18.74 g/L (0.85 g/(L·OD<sub>600</sub>)) of caffeic acid was obtained, with a conversion rate of 78.81% achieved. To the best of our knowledge, the titer of caffeic acid is the highest reported to date. The high-density fermentation of *E. coli* for overexpression of 4HPA3H and the efficient biosynthesis of caffeic acid may facilitate future large-scale production of caffeic acid.

**Keywords:** 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase; caffeic acid; high-density fermentation; whole-cell biocatalysis

咖啡酸 (caffeic acid, CA) 是一种归属于 4-羟基肉桂酸类的衍生物, 化学名为 3-(3,4-二羟基苯基)-丙烯酸 (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>COOH, 分子量为 180.15), 广泛存在于一些食品和天然药物中, 如蓝莓、猕猴桃、李子、咖啡和蜂胶等<sup>[1]</sup>。研究发现咖啡酸具有多种药理作用<sup>[2]</sup>, 如抗癌<sup>[3]</sup>、预防和治疗阿尔兹海默症<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>等。咖啡酸在食品、制药和化妆品行业均发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。但是, 植物中的咖啡酸合成积累需要消耗大量的时间成本, 并且产量会受到环境因素的影响<sup>[7]</sup>。另一方面, 咖啡酸的化学合成需要有毒试剂在苛刻的反应条件下进行, 从而导致经济和环境问题<sup>[8]</sup>。随着近年来合成生物学的兴起和发展, 咖啡酸的生物合成已成为了有吸引力

的替代方案<sup>[9]</sup>。其中以对香豆酸 (*p*-coumaric acid) 为底物, 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶 (4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase, 4HPA3H) 为生物催化剂, 可一步合成目标产物咖啡酸, 该方法具有较高的催化效率并且对环境更友好 (图 1)<sup>[10-12]</sup>。

1994 年已有研究学者对 4HPA3H 的分子机理进行研究<sup>[13]</sup>。而严亚军课题组在 2012 年鉴定和表达了大肠杆菌来源的 4HPA3H, 并使用该酶催化对香豆酸生物合成咖啡酸, 最终咖啡酸的产量达到 3.82 g/L (461.12 mg/(L·OD<sub>600</sub>))<sup>[14]</sup>。4HPA3H 是由 4-羟基苯乙酸酯 3-单加氧酶 (4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, HpaB) 和 NAD(P)H-黄素氧化还原酶 (NAD(P)H-flavin

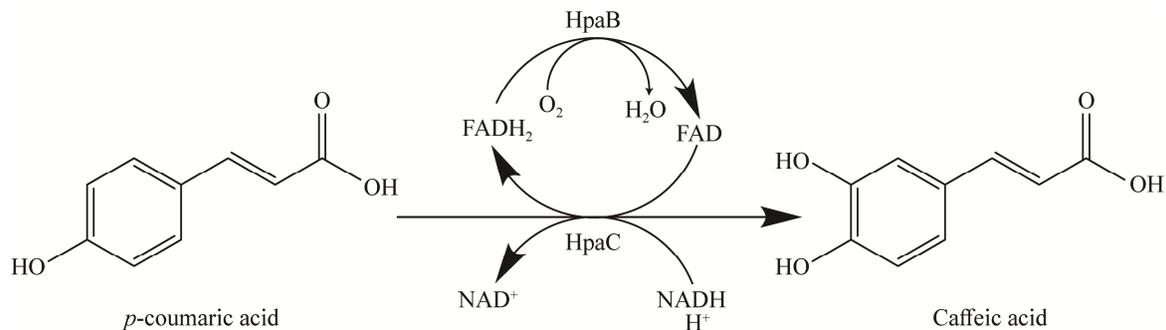


图1 咖啡酸的生物合成途径<sup>[12]</sup>

Figure 1 Biosynthesis pathway of caffeic acid<sup>[12]</sup>.

oxidoreductase, HpaC) 两个部分组成<sup>[15]</sup>。此后, 严亚军课题组又在 2019 年报道了 4HPA3H 中 HpaB 的蛋白晶体结构<sup>[16]</sup>。目前, 已有研究表明 4HPA3H 可以通过不同的催化方式起作用<sup>[12,14-16]</sup>, 如全细胞催化和体外酶催化。与酶催化相比, 全细胞催化具有制备简单、纯化步骤少、稳定性高和抗环境压力能力强的优点<sup>[17]</sup>。采用 4HPA3H 催化对香豆酸合成咖啡酸的反应需要 NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H 和 FADH<sub>2</sub>/FAD 的参与, 而存活的大肠杆菌中能生成这两组辅酶因子, 因此采用全细胞催化的方式不需要额外添加辅酶, 可以节省大量的成本<sup>[18]</sup>。目前已有一些采用大肠杆菌全细胞催化获得目标化合物的研究, 如采用 L-谷氨酸氧化酶全细胞催化 L-谷氨酸生产酮戊二酸, 酮戊二酸的产量最终可达到 5 160 g/L<sup>[19]</sup>; 采用重组大肠杆菌 BL21(DE3) (pRSF-aad-ldh<sub>10</sub>-fdh) 作为工程菌株全细胞催化 L-苯丙氨酸生产苯乳酸, 苯乳酸的时空产率可以达到 48.48 g/(L·d)<sup>[20]</sup>。然而, 现有菌株的摇瓶培养不足以满足咖啡酸的生物合成工业化要求<sup>[14]</sup>。相比于摇瓶培养, 高密度发酵技术可以缩短生产周期, 从而降低生产成本, 大大提高了市场竞争力, 目前高密度发酵技术已经得到很广泛的应用<sup>[21-22]</sup>。

因此, 本研究先构建过表达 4HPA3H 的大

肠杆菌工程菌株, 其次通过高密度发酵技术获得具有催化活性的工程菌。同时通过优化全细胞催化的条件以获得高摩尔转化率和高产量的咖啡酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

实验所用的大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21(DE3)、*E. coli* XL1 和质粒 pET28a 为实验室前期所有。

#### 1.1.2 培养基与主要试剂

连接酶 In-Fusion 和限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 均购自 TaKaRa 公司; 质粒小量提取试剂盒和小量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自广州美基生物科技有限公司; 卡那霉素购自上海麦克林生化科技有限公司; 无机盐等试剂均购自中国国药集团科技有限公司。

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10。

M9 培养基 (g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17, 磷酸二氢钾 3, 葡萄糖 5, 酵母粉 5, 氯化铵 1, 氯化钠 0.5, 七水硫酸镁 0.5, 氯化钙 0.011。

初始发酵培养基 (g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17, 磷酸二氢钾 3, 葡萄糖 10, 酵母粉 5,

氯化铵 1, 氯化钠 0.5, 七水硫酸镁 0.5, 氯化钙 0.011。

补料培养基 (g/L): 葡萄糖 500, 酵母粉 100, 蛋白胨 10, 七水硫酸镁 7。

以上培养基的灭菌条件为 115 °C、30 min, 其中葡萄糖、硫酸镁和氯化钙单独灭菌。

微量元素溶液 (g/L): 乙二胺四乙酸 0.84, 六水合氯化钴 0.25, 四水合氯化锰 1.50, 氯化铜 0.15, 硼酸 0.30, 钼酸钠二水合物 0.25, 二水乙酸锌 1.30, 柠檬酸铁 1.00, 溶于 0.10 mol/L HCL, 采用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

诱导剂 (g/L): 乳糖母液 60, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG) 母液 2.38, 采用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。

50 mmol/L 的 PB 缓冲液 (g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17, 磷酸二氢钾 3, pH 为 7.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 工程菌株构建及诱导剂浓度优化

大肠杆菌来源 4HPA3H 的 *HpaBC* 基因序列可从 *E. coli* BL21(DE3) 获得<sup>[14]</sup>。首先根据 NCBI 网站上 *E. coli* BL21(DE3) 的基因序列使用 Snap Gene (4.2.6) 设计引物, 引物设计选取基因的前 23 bp 和后 26 bp 作为引物的一部分, 并加上载体 pET28a 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 为位点的 15 bp 同源臂序列。最终引物设计为 *HpaBC*-F: 5'-GACGGAGCTCGAATTATGAAACCAGAAG ATTTCCGCGC-3'和 *HpaBC*-R: 5'-AATGGGTC GCGGATCTTAAATCGCAGCTTCCATTTCCAG CA-3', 引物由广州擎科生物科技有限公司合成。设计的引物以 BL21(DE3) 基因组 DNA 为模板经菌落 PCR 扩增后切胶回收 *HpaBC* 基因片段; pET28a 质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后切胶回收。用 In-Fusion 连接酶将 *HpaBC* 基因片段连接至 pET28a 载体上, 转入至克隆菌株 *E. coli* XL1 感受态细胞中。挑选具有卡那霉

素抗性的阳性单克隆, 提质粒测序, 测序结果正确表明获得了 pET28a-*HpaBC* 质粒。将 pET28a-*HpaBC* 质粒通过化学转化法转入至大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。获得阳性单克隆后, 采用摇瓶培养, 菌株生长至  $OD_{600}$  为 0.6 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h, 诱导结束后加入底物对香豆酸反应 20 h。其中扩大培养、诱导和反应条件一致均为 37 °C、250 r/min。菌株诱导结束后采用 SDS-PAGE 检测蛋白表达, 反应 20 h 后采用高效液相色谱仪 (HPLC) 检测咖啡酸。

IPTG 是一种具有潜在毒性的诱导剂, 对于菌株具有一定的毒副作用<sup>[23]</sup>。因此我们采用 M9 培养基培养菌株生长至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 并对诱导剂 IPTG 的浓度进行优化, 加入 IPTG 至终浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6 mmol/L。诱导 3 h 后, 加入终浓度为 4 g/L 的底物对香豆酸, 37 °C、250 r/min 反应 20 h。用紫外分光光度计检测反应结束后菌液的  $OD_{600}$  值, HPLC 检测咖啡酸的产量。

### 1.2.2 种子培养

取甘油保存的菌种 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC*, 接种于装有 100 mL LB 培养基 (含有 0.1% 卡那霉素) 的锥形瓶中, 置于 37 °C、250 r/min 的摇床中培养, 菌株生长至  $OD_{600}$  约 2.0 作为种子液。

### 1.2.3 高密度发酵

种子液以 4% 的接种量接种于装有 2.5 L 初始发酵培养基的 5 L 发酵罐中, 设定培养温度为 37 °C, 初始转速为 300 r/min, 通气量为 3 L/min。溶氧通过关联转速 (300–800 r/min) 维持在 30% 左右, 用含氨 25%–28% (W/V) 的水溶液控制培养环境的 pH 值为 7.0。随着菌株的生物量不断增加, 发酵罐中的溶氧不断下降, 搅拌转速达到上限设置值后固定为 800 r/min, 此时,

溶氧还是偏低,调节通气量至 8 L/min。当发酵罐中的初始葡萄糖耗尽时,菌株则无法继续生长,溶氧开始迅速上升,此时开始补料,补料采用控制溶氧在 10%–30%的补料方式,通过 5 L 发酵罐所配置的蠕动泵流加补料培养基来进行补料。记录菌株的光密度  $OD_{600}$  和葡萄糖的残留量,并根据菌株生长的光密度计算其比生长速率。在发酵中后期直接加入终浓度为 2 g/L 的乳糖诱导蛋白的表达。为了探索诱导时长的影响,取同批次发酵中不同诱导时长 (2、4、6、8、10、12 h) 的相同菌株量 ( $OD_{600}=5$ ),采用 SDS-PAGE 检测蛋白表达;将诱导后的工程菌株重悬于 50 mmol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.0) 反应体系中,加入终浓度为 4 g/L 的底物,反应装液量为 3.3% (V/V),在摇瓶中催化反应 20 h, HPLC 检测咖啡酸产量。

#### 1.2.4 摇瓶催化条件优化

采用摇瓶进行全细胞催化的基础反应条件:取诱导后的工程菌株,重悬于 50 mmol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.0) 反应体系中 ( $OD_{600}=5$ ),置于 37 °C、250 r/min 摇床中反应 20 h。分别考察底物添加方式、葡萄糖添加浓度、反应体系装液量和底物一次性加入量对全细胞催化合成咖啡酸的影响。

#### 1.2.5 使用发酵罐全细胞催化

以 5 L 发酵罐为反应器,取干重 8 g/L ( $OD_{600}=22$ ) (按最终体积 3 L 计算) 经高密度发酵诱导后的工程菌株,重悬于 50 mmol/L PB (pH 7.0) 缓冲液中作为生物催化剂。葡萄糖以 1.67 g/(L·h) 的速度流加至反应器中。反应 pH 控制为 7.0、搅拌转速设置为 800 r/min、通气量为 8 L/min。底物对香豆酸以 5.4 g/(L·h) 的流加速度加入反应中,在 37 °C 反应 6 h。

#### 1.2.6 检测和计算方法

咖啡酸产量的检测:取反应液用色谱甲醇

稀释 10 倍,离心后上清经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。高效液相色谱仪 (HPLC) 检测条件如下:流动相为乙酸 (0.1%, W/V) 水-甲醇;洗脱方式为梯度洗脱;流速为 1 mL/min;波长为 323 nm;紫外检测器;色谱柱为 EF-C18M (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );柱温 35 °C;进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

葡萄糖检测方法:采用 SBA-40E 生物传感器进行检测。

菌株生物量:菌株的光密度  $OD_{600}$  是采用紫外分光光度计在吸收波长为 600 nm 下测定。根据  $OD_{600}$  值和细胞干重关系进行换算:干重 (g/L)=0.361 5  $OD_{600}$ 。

采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 根据蛋白分子量的不同在凝胶电泳中分离检测蛋白表达。取诱导后  $OD_{600}$  为 5 的菌量,离心收集菌体,加入 50 mmol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.0),超声破碎后检测蛋白表达。

比生长速率的计算方法<sup>[24]</sup>:  $\mu = \frac{1}{N} \times \frac{dN}{dt}$ ;

实验重复 3 次,最终结果用平均数 $\pm$ 标准偏差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,并使用 Origin Pro 制作柱形图和折线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 获得工程菌株及诱导剂浓度优化结果

以大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 基因组为模板,通过 PCR 扩增获得 *HpaBC* 的基因片段,如图 2 所示,凝胶电泳检测 PCR 获得的基因片段,其条带大小为 2 093 bp。经 In-Fusion 连接酶构建而成的质粒 pET28a-*HpaBC*,其条带大小为 7 462 bp。将质粒 pET28a-*HpaBC* 转入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中,蛋白表达结果如图 3, *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC* 和对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a 相比,在约 58.9 kDa

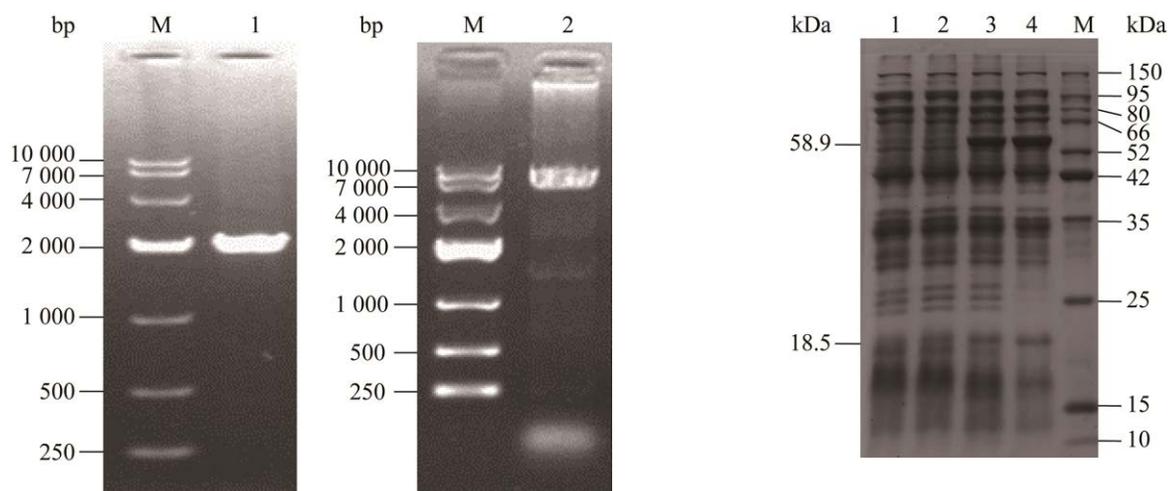


图2 4HPA3H 基因 (*HpaBC*) 的 PCR 扩增产物 (电泳条带 1) 和 pET28a-*HpaBC* 质粒 (电泳条带 2)  
Figure 2 PCR amplified products of 4HPA3H gene (*HpaBC*, lane 1) and pET28a-*HpaBC* plasmid (lane 2). M: DNA marker.

和 18.5 kDa 处有明显条带, 分别是 HpaB 和 HpaC。液相结果显示如图 4 所示, 工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC*(I) 催化 20 h 后, 检测到产咖啡酸。但对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28a(II) 反应液中未检测到咖啡酸的积累, 证明工程菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pET28a-*HpaBC* 具有催化对香豆酸羟基化合成咖啡酸的活性。

诱导剂 IPTG 的浓度会对菌株生长的光密度和咖啡酸产量有影响。结果如图 5A 所示, 菌株经终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导,

图3 蛋白表达分析

Figure 3 Protein expression analysis. M: protein marker; 1–2: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a; 3–4: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC*.

菌株的光密度  $OD_{600}$  为 5.52。诱导剂的终浓度增加至 0.4 mmol/L 时, 菌株  $OD_{600}$  出现下降趋势, 表明诱导剂 IPTG 浓度过高会影响菌株的生长。如图 5B, 检测反应后咖啡酸的产量, 发现菌株经终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导, 催化产咖啡酸产量最高为 1.80 g/L, 摩尔转化率为 40.93%。通过计算菌株的单位  $OD_{600}$  的酶活性发现, 如图 5C, 菌株经终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导, 其单位  $OD_{600}$  的酶活性相对较高, 单位酶活性达到 0.33 g/(L· $OD_{600}$ )。

## 2.2 工程菌株的高密度发酵

为了扩大对 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC*

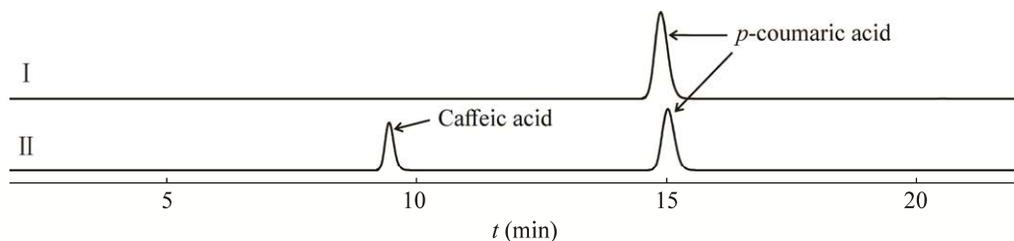


图4 液相检测催化反应后结果

Figure 4 Liquid phase detection results after catalysis of *p*-coumaric acid by *E. coli* BL21(DE3)/pET28a (I) and *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC* (II).

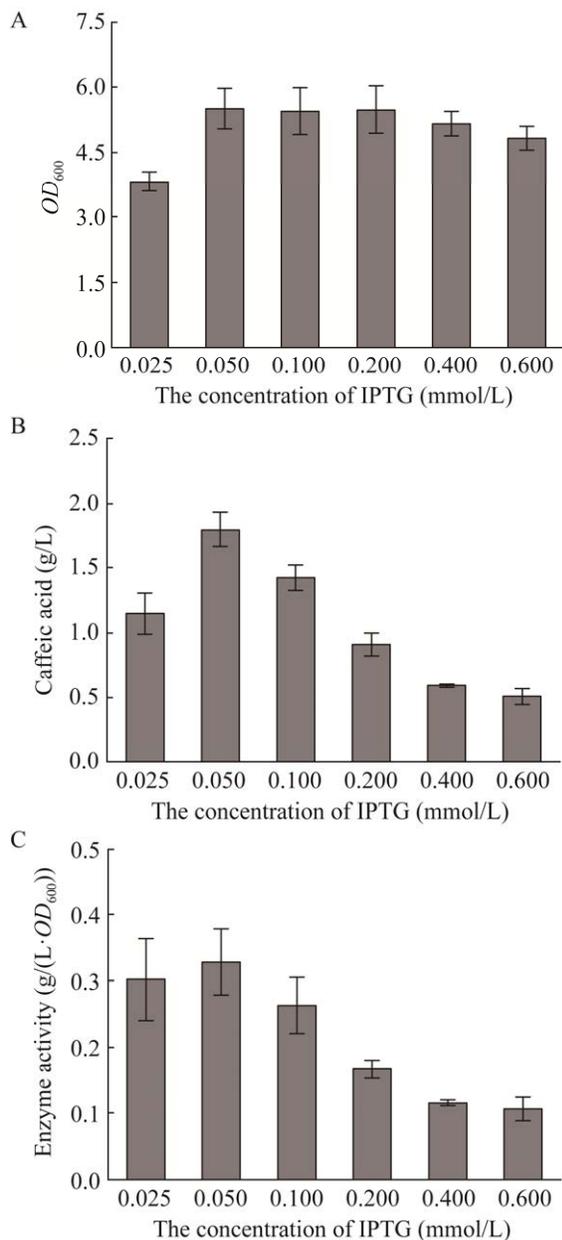


图5 IPTG浓度对菌株生长、咖啡酸产量和单位 $OD_{600}$ 酶活性的影响

Figure 5 Effect of IPTG concentration on strain growth (A), caffeic acid production (B), and enzyme activity per unit  $OD_{600}$  (C).

工程菌株的批量生产, 采用 5 L 发酵罐进行高密度发酵培养。在初始发酵培养基的培养中, 菌株发酵时间为 5 h,  $OD_{600}$  可以达到 16。在初始培养基消耗完 (残留葡萄糖约为 0 g/L) 时,

进行补料以维持菌株的生长。当菌株发酵时间为 15 h, 菌株的比生长速率为  $0.06 \text{ h}^{-1}$ , 发酵罐中葡萄糖残留量较低 (0.5 g/L) 时可以进行诱导。工业化生产中, 乳糖和 IPTG 均可以对含有 *lac* 操纵子的菌株进行诱导, 乳糖以其无毒害特点会比 IPTG 更适合作为高密度发酵的诱导剂<sup>[23]</sup>。但乳糖本身作为一种碳源可以被菌体代谢利用<sup>[23]</sup>, 因此在摇瓶中以含有葡萄糖的 M9 培养基培养菌株时, 由于在诱导点葡萄糖含量较高会影响乳糖诱导的效果。而在发酵罐中培养菌株, 葡萄糖可以控制在较低水平, 减少对诱导的不利影响。

通过对高密度发酵菌株诱导时长的研究发现, 如图 6, SDS-PAGE 检测结果显示菌株诱导 2 h 和 4 h 蛋白较少, 而菌株诱导 6、8、10、12 h 蛋白较多且相差并不大。HPLC 检测咖啡酸产量发现, 如图 7, 菌株诱导 8 h 催化效果较好, 咖啡酸产量为 4.46 g/L, 摩尔转化率为 96.52%。高密度发酵中代谢副产物的积累会影响菌株的状态<sup>[25]</sup>, 诱导时间过长而可能影响菌株的活性。高密度发酵生长曲线如图 8, 经过 24 h 的高密度发酵, 最终可获得干重 34.80 g/L ( $OD_{600}=96.27$ )

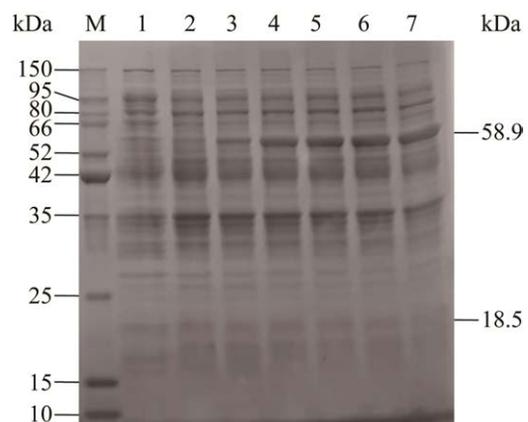


图6 不同诱导时长对4HPA3H蛋白表达的影响

Figure 6 Effect of different induction lengths on 4HPA3H protein expression. M: protein marker; 1: without induction; induction for 2 h (2), 4 h (3), 6 h (4), 8 h (5), 10 h (6), 12 h (7).

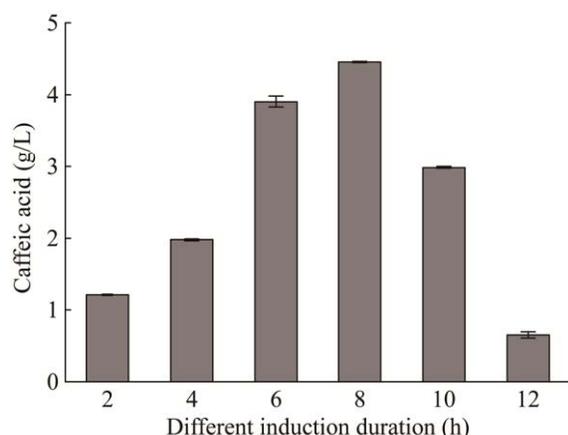


图 7 不同诱导时长对咖啡酸产量的影响  
Figure 7 Effect of different induction duration on caffeic acid production.

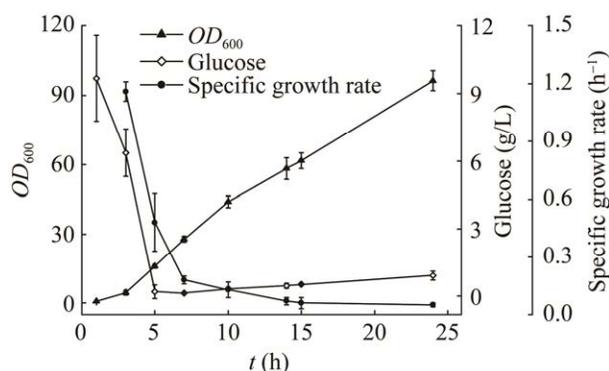


图 8 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC* 高密度发酵生长曲线  
Figure 8 Growth curve of high-density fermentation of *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*HpaBC*.

的生物量, 该生物量高于已有文献报道的重组大肠杆菌高密度发酵表达 4HPA3H 的水平<sup>[26]</sup>。

## 2.3 优化小体系全细胞催化的条件

### 2.3.1 底物加入形式对咖啡酸产量的影响

在 4HPA3H 催化底物对香豆酸合成咖啡酸的反应中, 添加的底物对香豆酸为酸性物质<sup>[27]</sup>, 并且在水中的溶解度较低, 而在碱性溶液中溶解量较大。考察底物添加方式对全细胞催化合成咖啡酸的影响, 底物分别以混悬液 (pH 3.0) 和溶液 (pH 7.0、pH 9.0) 的形式加入至反应体

系中, 控制反应底物终浓度为 4 g/L、反应装液量为 9.9%、葡萄糖添加量为 5 g/L。

结果发现加入底物的形式不同对菌株催化产咖啡酸有较大的影响。如图 9A, 终浓度 4 g/L 的对香豆酸以水为溶剂则为混悬液且 pH 为 3.0, 以粉末混悬液加入反应中咖啡酸的产量为 0.70 g/L, 摩尔转化率为 15.15%。而将底物用氢氧化钠调节成 pH 7.0 时, 底物的溶解度得到了提高, 此时为溶液状态, 再以溶液的方式加入至反应体系中, 咖啡酸的产量提高了 4.7 倍, 咖啡酸产量达到 3.32 g/L, 摩尔转化率为 71.78%。将底物 pH 调节至 9.0 时底物的溶解度更大, 但是加入后使溶液终 pH 升高, 反应 20 h 后生成了黑色聚合物, 而较低 pH 却不会产生黑色聚合物 (黑色素)<sup>[28-29]</sup>, 最终咖啡酸的产量降低至 2.27 g/L, 摩尔转化率为 49.20%。生成了黑色聚合物可能是咖啡酸产量降低的原因<sup>[14]</sup>。综上可以发现, 底物对香豆酸以 pH 为 7.0 的溶液形式加入反应体系, 全细胞催化产咖啡酸产量最高。

### 2.3.2 葡萄糖浓度对咖啡酸产量的影响

对香豆酸合成咖啡酸的反应需要大肠杆菌提供 NADH<sup>[18]</sup>, 因此可以添加葡萄糖为大肠杆菌提供能量。对反应中添加的葡萄糖浓度 (0、2.5、5.0、7.5 和 10.0 g/L) 进行分析, 控制反应装液量为 9.9%、底物 (溶液状态 pH 为 7.0) 终浓度为 4.0 g/L。

结果如图 9B 所示, 不添加葡萄糖, 咖啡酸的产量只有 0.07 g/L, 摩尔转化率 1.59%。葡萄糖浓度为 5 g/L 比较合适, 咖啡酸的产量为 2.93 g/L, 摩尔转化率为 63.34%。当葡萄糖浓度增加至 7.5 g/L 时, 咖啡酸的产量减少至 2.18 g/L, 摩尔转化率为 47.11%。浓度再增加至 10 g/L, 咖啡酸的产量降至更低, 降低的原因可能是葡萄糖在代谢中产生了酸性副产物, 进而抑制了菌体的

活性<sup>[18]</sup>。因此,葡萄糖浓度为 5 g/L 较合适。

### 2.3.3 装液量对咖啡酸产量的影响

以对香豆酸为底物全细胞催化合成咖啡酸的过程需要消耗氧气<sup>[30]</sup>。为探究溶氧对全细胞催化合成咖啡酸的影响,采用摇瓶装不同体积的反应液量来定量调节不同溶氧的供应,反应装液量越少,传氧系数越大。设置反应装液量为 3.3、6.6、9.9、13.2、16.5、23.1、26.4 和 29.7% (体积分数),并控制反应中葡萄糖的添加浓度为 5 g/L、底物 (溶液状态 pH 为 7.0) 终浓度为 4 g/L。

结果如图 9C,可以发现反应装液量越少,咖啡酸产量越高。在装液量为 3.30% 时,咖啡

酸产量可以达到 4.43 g/L,摩尔转化率为 95.80%。反应装液量增大至 29.70% 时,咖啡酸产量仅为 0.35 g/L,摩尔转化率为 7.65%,说明较多溶氧的供应可以提高咖啡酸的产量。

### 2.3.4 底物一次性加入量对咖啡酸产量的影响

已有研究发现底物对香豆酸一次性添加浓度过高会对反应有抑制作用<sup>[14]</sup>。控制反应装液量为 3.3%、葡萄糖添加浓度为 5 g/L,在底物对香豆酸的终浓度分别为 2、4、6、8 和 10 g/L 下进行生物转化。

结果如图 9D 所示,可以发现底物的一次性添加浓度会影响咖啡酸产量。一次性加入终

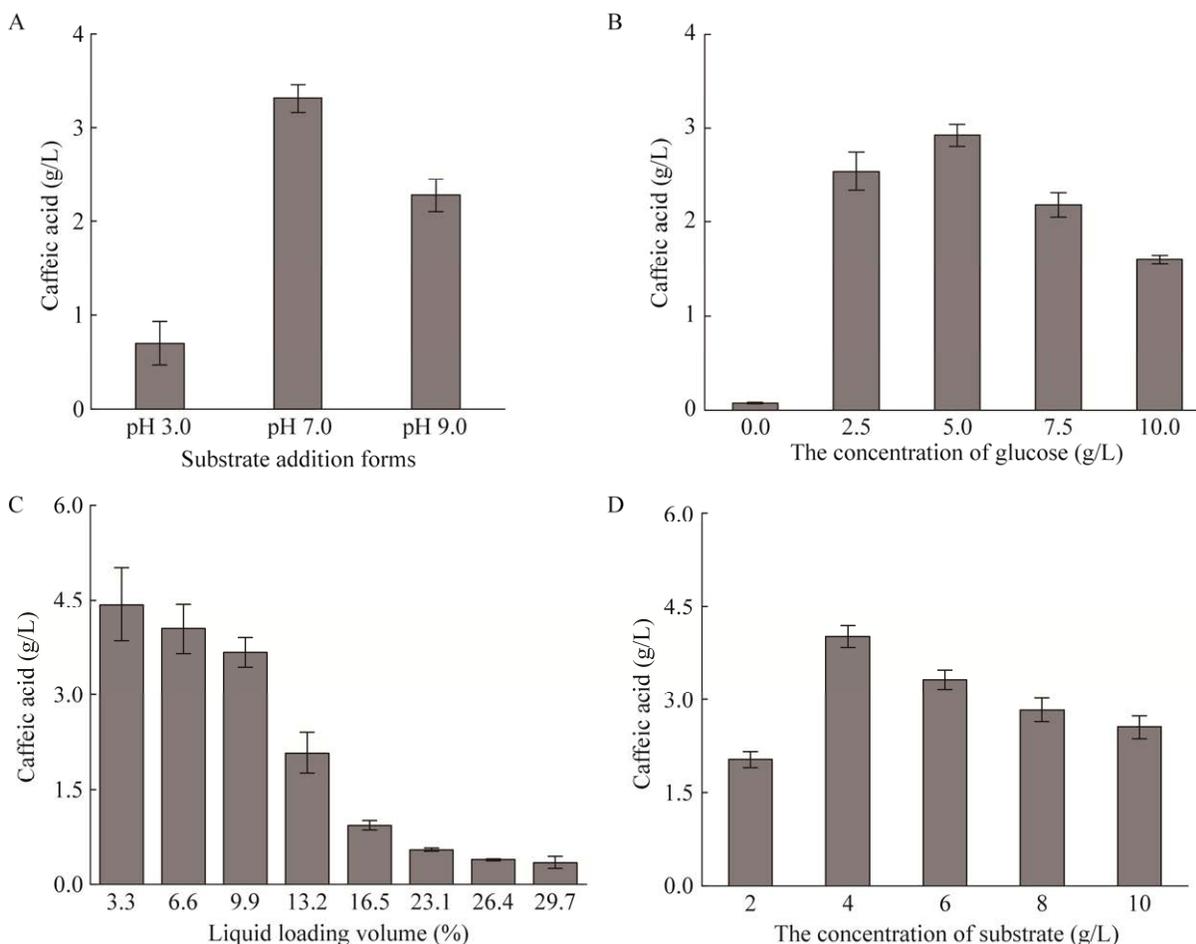


图 9 底物加入形式、葡萄糖浓度、装液量和底物一次性加入量对咖啡酸产量的影响

Figure 9 Influence of substrate addition forms (A), glucose concentration (B), liquid loading volume (C), and one-time addition of substrate (D) on caffeic acid production.

浓度为 4 g/L 的底物,咖啡酸产量达到 4.01 g/L,摩尔转化率为 86.71%。当一次性加入终浓度大于 4 g/L 的底物时,咖啡酸产量开始下降。而一次性加入终浓度为 10 g/L 的底物,咖啡酸产量降低至 2.55 g/L,摩尔转化率为 55.26%。因此,较合适的底物一次性加入终浓度为 4 g/L。

#### 2.4 使用 5 L 发酵罐的催化结果

通过高密度发酵后,可以获得大量菌体,而其催化反应也需要更大的适用体系。取经过高密度发酵诱导后的工程菌株作为生物催化剂,在 5 L 发酵罐中全细胞催化对香豆酸生物合成咖啡酸。综合 2.3 摇瓶催化的结果,底物的一次性加入量过大会降低咖啡酸产量。因此利用发酵罐中的蠕动泵,底物以流动加入的方式加入至反应中,可以控制单位时间加入较少的底物量,流加速度约为 5.4 g/(L·h),底物加入时间为 4 h。反应搅拌转速为 800 r/min,通气量为 8 L/min,以保证充足的溶氧供应。葡萄糖流加速度为 1.67 g/(L·h),为菌株提供能量。结果如图 10,底物的流动加入,经过 6 h 的催化,单批次催化反应可以产生 18.74 g/L (0.85 g/(L·OD<sub>600</sub>)) 咖啡酸,摩尔转化率为 78.81%,达到了工业化的要求。

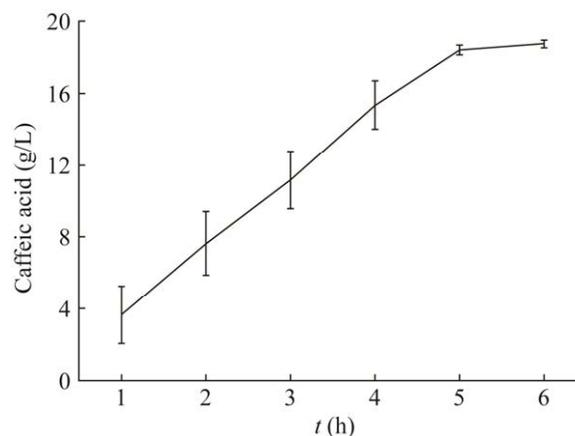


图 10 使用 5 L 发酵罐催化产咖啡酸的过程  
Figure 10 Production of caffeic acid by whole-cell biocatalysis in 5 L fermentor.

### 3 结论

目前对于大肠杆菌来源的 4HPA3H 合成咖啡酸的研究多处于摇瓶水平 (表 1)。本研究采用高密度发酵生产过表达 4HPA3H 的大肠杆菌工程菌,其生物量干重达到 34.80 g/L,该生物量是目前报道表达 4HPA3H 工程菌的最高值<sup>[10,26]</sup>。并且在高密度发酵中实现了用相对廉价和安全的乳糖进行诱导产 4HPA3H。通过高密度发酵可以为全细胞催化提供丰富的生物酶,这不仅

表 1 生物合成咖啡酸水平比较

Table 1 Comparison of biosynthesis of caffeic acid

Hosts	Inducer	Cultivating way	Gene (organism)	Scale (L)	Substrate	Titer (g/L)	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–	Shake-flask cultures	<i>Tal</i> ( <i>R. glutinis</i> ), <i>HpaB</i> ( <i>P. aeruginosa</i> ), <i>HpaC</i> ( <i>Z. mobilis</i> )	0.05	L-tyrosine	0.57	[11]
<i>E. coli</i>	IPTG	Shake-flask cultures	<i>CYP199A2</i> ( <i>R. palustris</i> )	0.05	<i>p</i> -coumaric acid	2.80	[31]
<i>E. coli</i>	IPTG	Shake-flask cultures	<i>HpaB</i> ( <i>P. aeruginosa</i> ), <i>HpaC</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	0.05	<i>p</i> -coumaric acid	10.20	[18]
<i>E. coli</i>	IPTG	Shake-flask cultures	<i>HpaB</i> ( <i>E. coli</i> ), <i>HpaC</i> ( <i>E. coli</i> )	0.02	<i>p</i> -coumaric acid	3.82	[14]
<i>E. coli</i>	Lactose	High-density fermentation	<i>HpaB</i> ( <i>E. coli</i> ), <i>HpaC</i> ( <i>E. coli</i> )	3.00	<i>p</i> -coumaric acid	18.74	This work

为咖啡酸的大量生产提供较好的工业化应用基础, 还为 4HPA3H 催化其他底物<sup>[12,15]</sup> (白藜芦醇、柚皮素和酪氨酸等) 提供了生物酶的生产基础。通过优化菌株的全细胞催化条件, 使用 5 L 发酵罐进行体系放大催化, 最终咖啡酸产量达到 18.74 g/L (0.85 g/(L·OD<sub>600</sub>)), 摩尔转化率为 78.81%。如表 1, 本文以对香豆酸为底物生产咖啡酸的产量是现有文献报道的最高水平, 为咖啡酸的工业化生产奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(14): 1818-1892.
- [2] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展. *中国药理学杂志*, 2013, 48(8): 577-582.  
Yang JL, Zhu XL, Li CW, et al. Research progress on pharmacological action of caffeic acid and its derivative phenethyl caffeic acid. *Chin Pharm J*, 2013, 48(8): 577-582 (in Chinese).
- [3] Mirzaei S, Gholami MH, Zabolian A, et al. Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: new hope in the fight against cancer. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105759.
- [4] Andrade S, Loureiro JA, Pereira MC. Caffeic acid for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: the effect of lipid membranes on the inhibition of aggregation and disruption of A $\beta$  fibrils. *Int J Biol Macromol*, 2021, 190: 853-861.
- [5] Kassa T, Whalin JG, Richards MP, et al. Caffeic acid: an antioxidant with novel antisickling properties. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(12): 3293-3303.
- [6] Sova M, Saso L. Natural sources, pharmacokinetics, biological activities and health benefits of hydroxycinnamic acids and their metabolites. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2190.
- [7] Xing Y, Peng HY, Zhang MX, et al. Caffeic acid product from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens* post-phytoremediation: its extraction, purification, and identification. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(6): 487-493.
- [8] Flourat AL, Combes J, Bailly-Maitre-Grand C, et al. Accessing *p*-hydroxycinnamic acids: chemical synthesis, biomass recovery, or engineered microbial production? *ChemSusChem*, 2021, 14(1): 118-129.
- [9] Cao MF, Gao MR, Suástegui M, et al. Building microbial factories for the production of aromatic amino acid pathway derivatives: from commodity chemicals to plant-sourced natural products. *Metab Eng*, 2020, 58: 94-132.
- [10] Hernández-Chávez G, Martínez A, Gosset G. Metabolic engineering strategies for caffeic acid production in *Escherichia coli*. *Electron J Biotechnol*, 2019, 38: 19-26.
- [11] Zhou PP, Yue CL, Shen B, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced production of caffeic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(14/15): 5809-5819.
- [12] Lin YH, Yan YJ. Biotechnological production of plant-specific hydroxylated phenylpropanoids. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(9): 1895-1899.
- [13] Prieto MA, Garcia JL. Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. a two-protein component enzyme. *J Biol Chem*, 1994, 269(36): 22823-22829.
- [14] Huang Q, Lin YH, Yan YJ. Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(12): 3188-3196.
- [15] Louie TM, Xie XS, Xun LY. Coordinated production and utilization of FADH<sub>2</sub> by NAD(P)H-flavin oxidoreductase and 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase. *Biochemistry*, 2003, 42(24): 7509-7517.
- [16] Shen XL, Zhou DY, Lin YH, et al. Structural insights into catalytic versatility of the flavin-dependent hydroxylase (HpaB) from *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7087.
- [17] Wachtmeister J, Rother D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 42: 169-177.
- [18] Furuya T, Kino K. Catalytic activity of the two-component flavin-dependent monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* toward cinnamic acid derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(3): 1145-1154.
- [19] 樊祥臣, 陈瑞东, 刘佳, 等. L-谷氨酸氧化酶高密度发酵及催化合成  $\alpha$ -酮戊二酸. *过程工程学报*, 2016,

- 16(2): 292-297.
- Fan XC, Chen RD, Liu J, et al. High cell density fermentation of L-glutamate oxidase and its catalysis for synthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid. *Chin J Process Eng*, 2016, 16(2): 292-297 (in Chinese).
- [20] 王秀婷. 重组大肠杆菌全细胞转化 L-苯丙氨酸合成苯乳酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- Wang XT. Study of biosynthesis of phenyllactic acid by recombinant *E. coli* whole-cell biotransformation of L-phenylalanine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese).
- [21] 李民, 陈常庆. 重组大肠杆菌高密度发酵研究进展. *生物工程进展*, 2000, 20(2): 26-31.
- Li M, Chen CQ. Progress studies of high cell-density culture of recombinant *Escherichia coli*. *Prog Biotechnol*, 2000, 20(2): 26-31 (in Chinese).
- [22] 徐冰冰, 雷庆子, 曾伟主, 等. 高密度发酵产酪氨酸酚裂解酶及催化合成 L-DOPA. *食品与发酵工业*, 2019, 45(12): 7-14.
- Xu BB, Lei QZ, Zeng WZ, et al. High-density fermentation for preparing tyrosine phenol lyase and application in L-DOPA synthesis. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(12): 7-14 (in Chinese).
- [23] 陈亮, 任随周, 许玫英, 等. 乳糖替代 IPTG 诱导脱色酶 TpmD 基因在大肠杆菌中的高效表达. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 551-556.
- Chen L, Ren SZ, Xu MY, et al. Over-expression of highly active triphenylmethane dyes decolorization enzyme (TpmD) induced by lactose instead of IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Microbiology*, 2009, 36(4): 551-556 (in Chinese).
- [24] 王岁楼. 微生物比生长速率  $\mu$  的含义. *郑州轻工业学院学报*, 1993, 8(4): 6-9.
- Wang SL. Meaning on specific growth rate of microorganism. *J Zhengzhou Inst Light Ind*, 1993, 8(4): 6-9 (in Chinese).
- [25] 迟雷. 基于过程控制优化的重组大肠杆菌高密度发酵研究[D]. 西安: 西北大学, 2011.
- Chi L. Study on high cell density cultivation in recombinant *Escherichia coli* based on optimization of process control[D]. Xi'an: Northwest University, 2011 (in Chinese).
- [26] Fordjour E, Adipah FK, Zhou SH, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21(DE3) for *de novo* production of L-DOPA from D-glucose. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 74.
- [27] 胡铮璐, 刘玉环, 阮榕生, 等. 阿魏酸、对香豆酸碱法制备及应用研究进展. *食品科学*, 2009, 30(21): 438-442.
- Hu ZR, Liu YH, Ruan RS, PENG H, ZHANG JS, LIU CM, et al. Ferulic acid and *p*-coumaric acid: applications in various fields and preparation. *Food Sci*, 2009, 30(21): 438-442 (in Chinese).
- [28] Battistella C, McCallum NC, Gnanasekaran K, et al. Mimicking natural human hair pigmentation with synthetic melanin. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(7): 1179-1188.
- [29] Ahn SY, Jang S, Sudheer PDVN, et al. Microbial production of melanin pigments from caffeic acid and L-tyrosine using *Streptomyces glaucescens* and FCS-ECH-expressing *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2413.
- [30] Kim SH, Hisano T, Takeda K, et al. Crystal structure of the oxygenase component (HpaB) of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 33107-33117.
- [31] Furuya T, Arai Y, Kino K. Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(17): 6087-6094.

(本文责编 陈宏宇)