

丙酮酸的酶法转化及乳酸氧化酶的研究进展*

谷劲松^{1,2} 曲音波¹

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)¹ (济南大学化学与环境工程学院 济南 250002)²

摘要: 丙酮酸是一种用途非常广泛的有机酸, 酶法转化乳酸生成丙酮酸由于具有条件温和、对环境污染小、成本低、得率高的优点而成为目前最具竞争力和吸引力的丙酮酸生产方法。常规的酶转化法是通过乳酸脱氢酶催化乳酸转化为丙酮酸, 但此酶需要 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 作电子受体, $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 价格昂贵, 且不易重复使用, 使乳酸脱氢酶不能广泛和大规模使用, 乳酸氧化酶则克服了这一缺点, 它不需要辅助因子即可催化乳酸, 从而成为制备丙酮酸的理想的酶。迄今为止, 人们已经找到了数种能合成乳酸氧化酶的微生物, 并对该酶进行了较深入的分子生物学研究, 其研究成果为将这种有价值的酶源推向生产奠定了基础。

关键词: 丙酮酸, 乳酸氧化酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0086-06

丙酮酸是一种重要的医药、化工产品, 许多氨基酸生物合成都需要以丙酮酸为起始物质, 如: L-二羟基-苯丙氨酸 (L-DOPA) 作为一种有效的抗癌药物, 就是以丙酮酸为底物, 在酚基裂解酶的作用下获得的^[1]; 另外, L-亮氨酸、L-半胱氨酸、L-色氨酸和 L-酪氨酸的生产也都采用丙酮酸为原料^[2]。除此以外, 丙酮酸还是一些农药和植保产品合成的有效起始物, 还能作为动物细胞培养基中不可缺少的添加物; 另外, 它还可用来合成一种无公害的制冷剂 (据了解, 日本国内几家冰箱生产公司正致力于丙酮酸生产的研究)。

丙酮酸的应用越来越广泛, 需求量也越来越大, 然而, 它在世界上生产规模并没有有效的增加, 这就造成了目前丙酮酸的价格非常昂贵, 因此, 丙酮酸的成为目前化工和生物技术领域的一大热点。

丙酮酸的生产方法主要有三种: 化学合成法, 直接发酵法, 酶转化法。

1 化学合成法生产丙酮酸

传统的化学合成法以酒石酸为原料, 通过和硫酸氢钾高温下反应得到丙酮酸, 这个反应过程中还需要引入氰化钠和乙酰卤化物合成乙酰氰化物, 并进一步水解乙酰氰化物。整个制备过程不易操作, 成本也较高, 而且废物不易处理。

另外一个改进的方法是: 在经修饰的银或铜催化剂存在下, 乳酸酯气相空气氧化制备丙酮酸酯, 修饰剂为卤化物, 反应温度 $300^\circ\text{C} \sim 600^\circ\text{C}$, 得到的丙酮酸酯需进一步精馏, 要获得丙酮酸还需水解。

2 直接发酵法生产丙酮酸的研究

直接发酵法是以糖质或其他碳源为原料, 通过微生物发酵生成丙酮酸。实际上,

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39970020)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No.39970020)

收稿日期: 2001-12-07, 修回日期: 2002-03-15

在微生物正常的糖代谢过程中, 会有少量的丙酮酸分泌到基质中。在特定的条件下, 细菌、酵母及担子菌都能产生丙酮酸^[3-5], 而且也有报道利用休止细胞或干细胞以不同底物生产丙酮酸。

国外发酵法制取丙酮酸已有近十年的历史, 但是通过微生物发酵的方法生产的丙酮酸往往转化率较低, 这是因为丙酮酸在糖代谢中处于最具活力的中间点, 在细胞中很容易转化为其他化合物, 因此很难累积。

若要使细胞累积丙酮酸, 必须将图 1 中的 I, II, III, IV 位置全部阻断, 日本一研究机构已获得烟酸 (NA)、维生素 B1、维生素 B6 和生物素 (Bio) 4 种维生素营养缺陷型的球拟酵母属 (*Torulopsis*) 菌株^[6], NA 和 B1 是丙酮酸脱氢酶系 (PDH) 的辅因子; Bio 是丙酮酸羧化酶 (PC) 的辅因子; B6 是转氨酶 (PT) 的辅因子; B1 是丙酮酸脱羧酶 (PDC) 的辅因子。由于细胞自身不能合成这些维生素, 在不添加这些营养物质的培养基中有可能使该缺陷型累积丙酮酸, 但烟酸 (NA)、维生素 B1、维生素 B6、生物素 (Bio) 的缺乏势必会严重影响微生物细胞的正常生长代谢, 因为这些辅因子并不

只是仅仅在 I, II, III, IV 位置起作用, 如: 烟酸的缺乏, 就会降低 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (V) 的活力, 从而影响到糖酵解途径, 最终影响丙酮酸的累积。而且, 丙酮酸作为发酵产物混合物的一种成分, 往往是相当低浓度的, 从如此复杂的发酵液中分离提取丙酮酸, 一般是难以进行的, 费用也很昂贵。

3 酶法生产丙酮酸的研究

由于发酵法生产丙酮酸存在诸多缺陷, 这就使人们想到通过固定化酶直接转化底物生成丙酮酸。这其中最合适的底物就是乳酸, 乳酸脱氢酶和乳酸氧化酶都可转化乳酸一步生成丙酮酸, 而且乳酸和丙酮酸的价格相差很大 (约 20 倍), 这就使乳酸酶法生产丙酮酸成为最具活力的研究热点之一。

3.1 乳酸脱氢酶 近年来世界上有许多专利涉及用酶法生产丙酮酸, 乳酸脱氢酶作为一种经典的催化酶, 广泛地存在于各种生物体中, 如: 动物、酵母、细菌^[7-9], 脱氢酶催化如下反应, $\text{Lactate} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$

该反应是可逆反应, 反应平衡倾向于乳酸一边; 辅酶 NAD^+ 为小分子化合物, 很难固定, 不易再生, 而且价格昂贵, 这些因素限制了脱氢酶的应用。

德国化学与生物中心的 Simon 教授课题组^[10]使用奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 和普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 作为酶源, 细胞内的主要转化酶被称作 2R-羧酸-紫罗碱-氧化还原酶 (2R-hydroxycarboxylate-viologen-oxidoreductase, HVOR), 这种酶的特点是不需要 NAD 或 NADP 作为辅因子, Schinschel 用蒽醌-2, 6-二磺酸 (anthraquinone-2, 6-

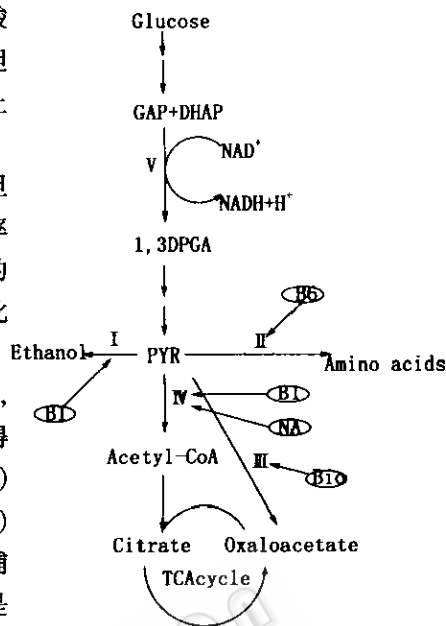


图 1 丙酮酸的代谢途径

I: Pyruvate Decarboxylase (PDC),

II: Transaminase (PT),

III: Pyruvate Carboxylase (PC),

IV: Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDH)

disulphonate, AQDS) 作为氧化还原的电子转移中间体, 同时用二甲基亚砷 (dimethylsulphoxide, DMSO) 还原酶对 AQDS 进行再生, 取得了良好的效果。

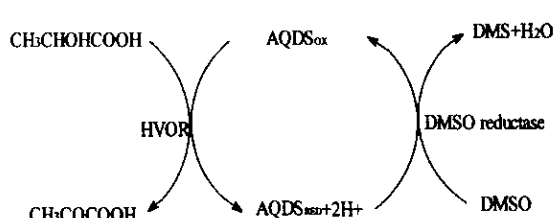


图 2 AQDS 的循环再生

DMS 为二甲基硫, 它的沸点为 38℃, 在这种情况下, 如果把反应体系温度控制在 40℃, 生成的 DMS 就会很快逸出, 这就意味着反应会不断地向丙酮酸生成的方向进行。另外, 由于 HQOR 的电子传递不需经 NAD⁺ 和 NADP⁺ 等一系列的中间体而直接传递给人工氧化还原中间体

(AQDS), 氧化还原电位差会增加几百毫伏, 反应平衡常数也会相应增加十几倍, 从而更加有利于丙酮酸的生成。

Schinschel 使用奇异变形杆菌的菌体细胞作为酶源, 该菌体含有一定数量的丙酮酸甲酸裂解酶, 为了避免生成的丙酮酸被丙酮酸甲酸裂解酶降解, 根据这种酶的激活机理, 将反应必需的 Fe²⁺ 与低浓度的 EDTA 混合加入, 可以稳定反应系统中的丙酮酸^[11]。这种方法虽然由于电子转移中间体的循环使用而大大降低了生产成本, 但由于所用酶源仍是脱氢酶, 本身所带的局限性没有解决, 最终产物丙酮酸与辅酶的分离存在困难。

3.2 乳酸氧化酶 昂贵的电子受体限制了乳酸脱氢酶的应用, 这就使人们把目光投向乳酸氧化酶, 细菌细胞内乳酸氧化酶催化的生化反应式为:



乳酸氧化酶作为一种黄素蛋白, 是以 FMN 或 FAD 作为辅因子, 其电子转移的形式不同于经典的电子传递链, 而是直接以氧作底物, FMN 或 FAD 和酶蛋白结合非常牢固, 整个反应过程不需要游离的外源辅酶参与, 这就彻底解决了辅酶再生的问题。

1946 年 美国哥伦比亚大学的 Blanchard 发现从大鼠肾脏中分离出的 L-氨基酸氧化酶具有 α-羟酸氧化酶的活性, 该酶为一种黄素蛋白, 它能催化乙醇酸和乳酸生成乙醛酸和丙酮酸, 在过氧化氢酶 (Catalase) 的存在下, 该酶催化反应的氧消耗呈线性增长。进一步将乳酸转化形成的丙酮酸与 2, 4-二硝基苯肼反应生成 2, 4-二硝基苯腙, 以腙的形式进行分离鉴定。

近年来, 许多研究机构对乳酸氧化酶进行了大量的研究。1989 年 Ducan 等从浅绿气球菌 (*Aerococcus viridans*) 分离纯化了一种乳酸氧化酶^[12], 1995 年 Minagawa 等报道了通过随机突变得到浅绿气球菌耐热性的乳酸氧化酶^[13]。他们将来自浅绿气球菌乳酸氧化酶 (Lactate oxidase, LOD) 基因被克隆、测序, 从一系列通过 PCR 随机突变而产生的突变体中筛选到一个突变的 LOD, 在 65℃, 其衰变期为 6.2 分钟, 其耐热稳定性大约为野生型 LOD 的 3 倍。突变发生在它的氨基酸序列的 212 位, 使得天冬酰胺变成天冬氨酸。

他们采用 Sambrook 等所描述的标准的重组 DNA 技术^[14], 用 EcoRI 对浅绿气球菌的基因组 DNA 进行酶切, 酶切后的片段插入 pBR322 的 EcoRI 位点。重组质粒采用 Dower 等的方法^[15] 对大肠杆菌 DH5 进行转化, 为了筛选到能够表达 LOD 的转化体, 将细胞培养于 37℃ 条件下含有氨苄青霉素的 LL 平板上。能够产生 LOD 的转化体会因为 LOD 活性而在其菌落周围产生紫色圈。然后利用一个 QIAGEN 柱 (Diagen GmbH) 从一个有颜

色的菌落中纯化出质粒,命名为 pBRLOD。他们将 pBRLOD 上的 LOD 的结构基因,通过 PCR,使用两个寡聚核苷酸引物 PrN (5'-AAT, AAC, AAT, GAC, ATT, GAA, TAT, AAT, GCA, CCT-3') 和 PrC (5'-GCC, TAA, ATC, TAG, TAT, TCA, TAA, CCG, TAT, GGG-3'),分别为 5' 和 3' 引物进行扩增。扩增的 LOD 基因去磷酸化,平头钝化,连接到 Pkk223-3 的 EcoRI 钝端上,该重组体命名为 pLODwt。

采用稍加修改的 Ducan 等^[12]的方法,从用 pLODwt 转化的大肠杆菌 JM109 中纯化 LOD。然后用 pLODwt 上的 LOD 基因作为 PCR 模板,PrN 和 PrC 为引物,通过 PCR 方法进行随机突变^[16],并进行耐热 LOD 的随机突变和分离,就是将突变片段修改成平头,连到 Pkk223-3 的 EcoRI 平头上,然后去转化大肠杆菌 JM109。转化体涂于 LL 上,于 37℃ 培养。将紫边的菌落转移到 L 平板上,于 37℃ 培养 12h。在 70℃ 进行 1h 的热处理后,用 LOD 活性检测液对平板染色,收集紫色菌落。LOD 突变体用和野生型 LOD 同样的方法进行纯化。他们的研究结果表明了 LOD 结构基因的核苷酸序列,包括它的旁侧区。从最长的开放阅读框架推导而来的 N-末端氨基酸序列符合于从转化体纯化的 LOD 的氨基酸序列。开放阅读框架的多肽的分子量为 40,930,利用凝胶过滤计算的活性的 LOD 的分子量为 160,000。这些结果支持 Ducan 等^[12]的结果,他认为 LOD 为一个具有相同的亚基的四聚体。从他们的野生型 LOD 的核苷酸和预测的酶氨基酸序列分析结果可知:从起始密码子算起,LOD 耐热突变体在 634 位有一个由 A 到 G 的碱基改变,该碱基的改变导致在氨基酸序列的 212 位,使得天冬酰胺变成天冬氨酸。LOD 序列及突变位点。

他们也分别检测了野生型和纯化自大肠杆菌转化体的 LOD 的活性。在实验条件下,低于 60℃ 时,突变株没有明显的热稳定性的提高。

LOD 的氨基酸序列类似于乙醇酸氧化酶 (GOD)^[17]所报道的三维结构。LOD 和 GOD 的同源性为 40%。由于二者之间较高的氨基酸同源性,LOD 的三维结构应该能够从 GOD 通过计算机模拟^[18]推导出来。目前,为了表明氨基酸的替代 (212, 天冬酰胺变成天冬氨酸) 是如何提高热稳定性而构建 LOD 模式结构的工作也正在进行之中。

1999 年 A. Gibello 等^[19]利用 Southern blot 杂交分析技术从海肠链球菌 (*Streptococcus iniae*) 中也分离纯化到了乳酸氧化酶基因,该基因被命名为 *lctO*。他们采用 Lawson 方法提取海肠链球菌细菌细胞内的 DNA,然后用 Hind III 进行酶切,酶切片段通过 0.7% 琼脂糖电泳分离,再转移到一张尼龙薄膜上,再用 3 种 DNA 探针进行杂交分析,它们分别是:两个 5'-末端生物素标记的寡核苷酸引物 FWL (5'-TGG, TTG, CAC, AGG, TAT, CTG, GGT, A-3') 和 RVL (5'-TTT, GTG, AAC, CTG, TTA, ATT, GCA, T-3'),一个长度为 300-bp、生物素标记的 DNA 片段 (该片段是通过用前两种引物,以 PCR 扩增的方式从浅绿气球菌 DNA 中获得)。预杂交和杂交过程均在 5XSSC (1XSSC 是 0.15mol/L NaCl + 0.015mol/L 柠檬酸钠) 和 0.1% SDS 溶液体系中进行,60℃ 杂交 3h,标记探针的浓度为 20ng/mL,杂交完成后,用 0.5XSSC + 0.1% SDS、65℃ 冲洗,杂交产物通过 CDP-star 程序 (Boehringer Mannheim) 进行检测。

结果表明,海肠链球菌 DNA 中一段长度约为 4kb 的片段能和 300-bp 生物素标记的 DNA 形成杂交带,为了进一步验证结果,A. Gibello 等以 FWL 和 RVL 作为引物对海肠链球菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,获得另一 300-bp 的 DNA 片段,该片段和从浅绿气球菌 DNA 中获得的 300-bp 片段很相似,这些结果表明,海肠链球菌中的 *lctO* 和浅绿气球

菌的乳酸氧化酶基因具有较大程度的同源性。

将 HindⅢ 酶解的海肠链球菌染色体 DNA 片段和 pBluescript II SK (+) 质粒连接, 构建基因组文库, 然后以 *E. coli* 作为受体细胞进行转化, 转化子在含有 IPTG 和 X-gal 的 AMP 平板上进行初步筛选; 筛选乳酸氧化酶阳性克隆的培养基还需添加 0.2% 的 L-乳酸、0.01% ABTS、0.5 U/mL 的辣根过氧化物酶, 阳性克隆表现为紫色菌落。

A. Gibello 等^[19]从 6680 个氨苄抗性的重组子中筛选到两个具有明显乳酸氧化酶活性的菌落, 从这两个克隆中分离的质粒相同, 都含有 4kb 的 DNA 外源片段, 这个重组质粒被命名为 PGR002。对 PGR002 进行序列分析, 发现 PGR002 质粒上的海肠链球菌 DNA 片段含有四个开放阅读框 (ORFs), *lctO* 基因对应于 ORF4, 起始位点 ATG 位于 2781, 含有 398 个氨基酸残基, 分子量为 44,700D。将该序列和 Genebank 中浅绿气球菌的 L-乳酸氧化酶序列相比较, 发现具有很高的相似性 (200 个氨基酸残基完全一致, 有 34 个保守残基), 同黄素蛋白家族的其他酶序列比较也具有较大的同源性, 与菠菜的乙醇酸氧化酶的同源性达到 59%, 并且 *lctO* 还含有黄素蛋白家族所特有的 6 个氨基酸保守残基。以上结果表明, 海肠链球菌的乳酸氧化酶可以被认为是黄素蛋白酶家族中的一个新成员。

海肠链球菌的乳酸氧化酶在有氧条件下, 可将乳酸代谢为丙酮酸和过氧化氢, 这和浅绿气球菌中的乳酸氧化酶也是一致的, 该酶源在丙酮酸生产中毫无疑问是很有价值的。

利用乳酸氧化酶转化乳酸生产丙酮酸, 不需要外源辅酶, 成本大大降低; 直接固定化乳酸氧化酶比较简单、方便, 也不存在丙酮酸与辅酶的分离问题。因此, 酶制备酮酸具有广阔的发展前景, 从而备受关注。

参 考 文 献

- [1] Nagasawa T, Utagawa T, Goto J, *et al.* Eur J Biochem, 1981, 117: 33 ~ 40.
- [2] Yonehara T, Miyata R. J Ferment Bioeng, 1994, 78: 155 ~ 159.
- [3] Izumi Y, Matsumura Y, Tani Y, *et al.* Agric Biol Chem, 1982 46: 2673 ~ 2679.
- [4] Moriguchi M, Shuto K, Hashimoto T. J Ferment Technol, 1984, 62: 243 ~ 248.
- [5] Yokota A. J Ferment Bioeng, 1997, 83 (2): 132 ~ 138.
- [6] Yonehara T, Miyata R. J Ferment Bioeng, 1994, 78: 155 ~ 159.
- [7] Gremona T. J Biol Chem, 1964, 239: 1457.
- [8] Nygaard A P. The Enzyme, 1963, 7: 559.
- [9] Gunther H, Neumann S, Simon H. J Biotechnol, 1987, 5: 53 ~ 65.
- [10] Schinschel C, Simon H. J Biotechnol, 1993, 31: 191 ~ 203.
- [11] Knappe J, Sowers G. FEMS Microbiol Rev, 1990, 75: 383 ~ 398.
- [12] Duncan J D, Wallis J O Azari M R. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 164: 919 ~ 926.
- [13] Minagawa H, Nakayama N, Nakamoto S. Biotech Lett, 1995, 17: 975 ~ 980.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning 2nd ed N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W. Nucl Acid Res, 1988, 16: 6127 ~ 6125.
- [16] Leung D W, Chen E, Goeddel D V. Tech-A J Meth in Cell & Molecul Biol, 1989, 1: 11 ~ 15.
- [17] Cederlund E, Lindqvist Y, Soderlund G, *et al.* Eur J Biochem, 1988, 173: 523 ~ 530.
- [18] Blundell T L, Sibanda B L, Sternberg M J E, *et al.* Nature, 1987, 326: 347 ~ 352.
- [19] Gibello A, Collins M D, Dominguez L. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (10): 4346 ~ 4350.