

## 转化葡萄糖为 2-酮基-L-古龙酸的基因工程菌的构建

董文玲 尹光琳

(中科院上海生物工程基地,上海)

重组 DNA 技术的商品化主要是利用微生物或动物细胞宿主生产外源蛋白。近年来此项技术已用于化学工业中小分子化合物的生产,美国的 Anderson<sup>[1]</sup> 等和瑞士的 Hardy<sup>[2]</sup> 等已成功地将重组 DNA 技术用于 D-葡萄糖经 2,5-二酮基-D-葡萄糖酸(简称 2,5-DKG)产生维生素 C(简称 Vc)前体 2-酮基-L-古龙酸(简称 2-KLG)的串联发酵中,从而证实了微生物直接转化 D-葡萄糖为 2-KLG 来制备 Vc 的可能性。

由德国科学家 Reichstein<sup>[3]</sup> 发明,经改进成为目前世界各国沿用的“莱氏法”工艺(图1),不但反应路线长,还需要多种易燃易爆药品,环境污染严重,设备投资也较大。因此,许多科学工作者长期致力于微生物发酵法生产 Vc 前体 2-KLG 的研究<sup>[4-14]</sup>,其中较为成功的是我国发明的“二步发酵法”和日本发明的“葡萄糖串联发酵法”。中国科学院微生物研究所与北京制药厂等单位<sup>[9]</sup>发明并应用的“二步发酵法”将“莱氏法”中的酮化和化学氧化反应简化为微生物氧化,从 D-山梨醇到 2-KLG 的转化只需二步微生物发酵便可实现,既简化了生产工艺又降低了成本。国内许多厂家十多年的实践证明菌种性能稳定,工艺已达到国际先进水平。但是,无论“莱氏法”还是“二步发酵法”都要先以葡萄糖高压加氢制备 D-山梨醇,这需要大量的能源和设备,操作上也存在着相当大的危险性。日本园山高康等人发明的“葡萄糖串联发酵法”,是将 D-葡萄糖经两步微生物发酵转化为 2-KLG 来制取 Vc。它对沿用多年的要以葡萄糖高压加氢制取 D-山梨醇作为 Vc 生产原料的工艺进行了变革,并为今后实现用重组 DNA 技术以 D-葡萄糖直接发酵生产 2-KLG

制备 Vc 的商品化奠定了基础。目前,国内一些单位相继开始了这方面的研究。

### (一) 葡萄糖串联发酵生产 2-KLG 概况

“葡萄糖串联发酵法”是利用两种微生物完成,由葡萄糖经中间体 2,5-DKG 生产 2-KLG,研究工作开始于 70 年代中期。菌种筛选过程中,他们发现细菌中醋酸杆菌属(*Acetobacter*),葡萄糖酸杆菌属(*Gluconobacter*)和欧文氏菌属(*Erwinia*)<sup>[14]</sup>的许多种都能氧化葡萄糖为 2,5-DKG,而产量较高的常为革兰氏阴性、不产孢子的兼性厌氧细菌欧文氏菌。芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)和棒状杆菌属(*Corynebacterium*)的一些种<sup>[13]</sup>能转化 2,5-DKG 为 2-KLG,而产量较高的是革兰氏阳性、圆型或短杆菌型,不产孢子的棒状菌。用两种菌的阻断突变体欧文氏菌 SHS 2629001 和棒状杆菌 SHS 752001<sup>[10]</sup>进行 10 吨通用罐发酵<sup>[11]</sup>,发酵液中 Ca-2,5-DKG 的产量为 328.6 mg/ml, Ca-2-KLG 为 106.3 mg/ml,由葡萄糖到 2-KLG 的总转化率 84.6%,但至今未用于工业生产。这主要是由于 2,5-DKG 对热不稳定。作为第二步发酵原料的含 2,5-DKG 发酵液,只能用 SDS 处理降低其中的活菌数,这不仅增加了能源消耗,也给生产带来不便。

尽管葡萄糖串联发酵对“莱氏法”已作了相当大的简化,但仍需两步生物氧化反应。若将欧文氏菌和棒状杆菌相关的特性结合于一种微生物中,只需一步发酵便可实现葡萄糖到 2-KLG 的转化(图 2)。

棒状杆菌中的 2,5-DKG 还原酶在 C-5 位置上立体专一性地还原 2,5-DKG 为 2-KLG。Anderson<sup>[11]</sup> 和园山高康<sup>[15]</sup>分离纯化并证实了

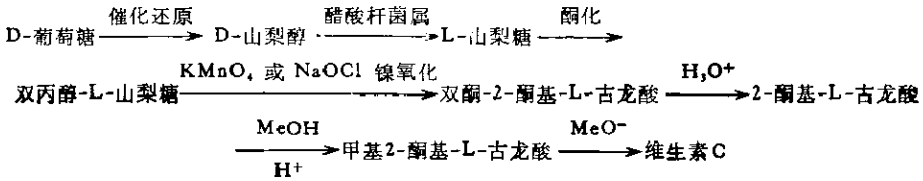


图1 “莱氏法”合成维生素C

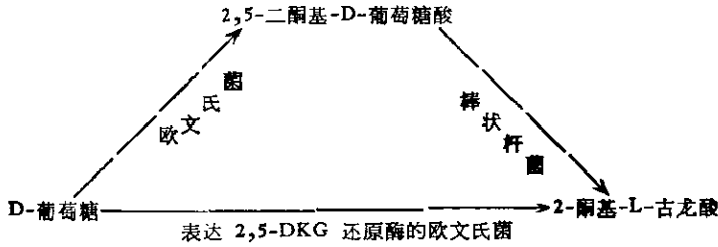


图2 发酵法合成 2-KLG

2,5-DKG 还原酶及其作用。欧文氏菌属于肠杆菌科，可作为来自大肠杆菌质粒的宿主菌。Anderson<sup>[1]</sup> 和 Hardy<sup>[2]</sup> 克隆了 2,5-DKG 还原酶基因，构建了表达载体并转入欧文氏菌中，获得了 2,5-DKG 还原酶在欧文氏菌中的表达。

### (二) 2,5-DKG 还原酶的纯化及其特性

Anderson<sup>[1]</sup> 等从棒状杆菌 SHS 0007 中分离了几种 2,5-DKG 还原酶，并进一步鉴定了其中产 2-KLG 能力较高的一种酶。他们发现纯 2,5-DKG 还原酶为单一多肽，SDS-聚丙烯酰胺电泳测定迁移率确定分子量为 34000 道尔顿，TSK 凝胶透析分子量为 35000 道尔顿。NADPH 作辅助因子时，2,5-DKG 还原酶立体选择完全还原 2,5-DKG 为 2-KLG，而对 NADH 无活性。2,5-DKG 和 NADPH 的米氏常数分别为 15 mol/L 和 34 μmol/L。在 80 mol/L 对 2-羟乙基-氨基-三羟甲基甲烷中的最大反应速度为 10 μmol/min·mg。pH 9.0—9.5 时，2,5-DKG 还原酶催化的还原反应平衡常数  $K_{eq}$  为  $5.6 \times 10^{-13}$ ，这表明生理条件下 2-KLG 在热力学上高度有利。

园山高康<sup>[3]</sup> 从棒状杆菌 SHS 0007 的突变体 SHS 752001 中分离了两种 2,5-DKG 还原酶(酶 I，酶 II 均为单体)。分子量分别为 29000 和 34000 道尔顿，需 NADPH 作辅助因子，只对还原反应有活性，转化 2,5-DKG 为 2-KLG。标准条件下，酶 I 的专一活力比酶 II

大 33 倍。在同样条件下，酶 I 对 2,5-DKG 的米氏常数为酶 II 的 13%。与亲株棒状杆菌 SHS 0007 的 2,5-DKG 还原酶比较(表 1)可见，酶 II 与亲株的酶同为单体，SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量均为 34000，对 2,5-DKG 的米氏常数和  $V_{max}$  相近，尽管对 NADPH 的米氏常数稍低，这两种酶是相似的。由于突变体<sup>[4]</sup> 是用亚硝基胍(NTG)阻断亲株 2,5-DKG 的降解途径得到的，由此推断酶 I 在亲株和突变体中可能以同功酶的形式存在。此外， $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  抑制还原酶 I 对 2,5-DKG 的活性，而对-氯苯甲酸汞，盐酸苯甲脒，N-L-赖氨酸氯甲基酮和 EDTA 对酶 I 并无影响。由此推断酶 I 不是巯基酶，而是丝氨酸酶或带有两价金属离子的酶。

### (三) 2,5-DKG 还原酶的克隆

Hardy 等人对棒状杆菌 SHS 752001 的还原酶 I 进行 N-末端氨基酸序列分析，得到 N-末端的 60 个氨基酸序列和溴化氰衍生片段的 30 个氨基酸序列。根据 N-末端的氨基酸序列 Asn-Tyr-Glu-Asn-Glu-Ser，合成了两条 32 倍冗长的带 17 个碱基探针，5'-GAYTCRTTYT-CRTARTT(探针 1) 和 5'-CTYTCRTTYTC-RTARTT(探针 2)。根据溴化氰衍生的氨基酸序列 Tyr-Phe-Pro-Glu-Ala，合成了一条 37 倍简并的 14 个碱基探针，5'-GCYTGNGGRA-ARTTA(其中 R 代表 A 或 G，Y 代表 G 或 T，N

表1 亲株和突变体的 2,5-DKG 还原酶性质比较

性质	I	2,5-DKG 还原酶 II	亲株
结构	单体	单体	单体
分子量 <sup>a</sup>	29000	34000	34000
对 25 DKG 的 $V_{m,1/2}$ (u/mg) <sup>b</sup>	76	8.2	10
对 25 DKG 的 $K_m$ (mM) <sup>b</sup>	2.0	13.5	13
对 NADPH 的 $K_m$ ( $\mu$ m) <sup>b</sup>	10	13	34
NADH 的活力	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>

a. 由 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定

b. 在 80 mM 亚胺-Tris (pH 6.4) 中, 25°C

c. 无法测定

代表 A、G、C 或 T)。

用限制性内切酶 *Sau* 3A 处理棒状杆菌 SHS 752001 的 DNA 得到不完全消化的 DNA 片段, 用琼脂糖凝胶电泳分离, 洗脱 2-5 Kb 片段, 与经 *Bam*HI 切割的碱性磷酸酶去磷酸化的质粒 PUC8 连接, 平均插入长度为 4 kb 的重组混合物转入大肠杆菌 JM 83 中, 从 22000 单菌落中选出带有能与探针 1、2、3 杂交的质粒的两个菌落, 质粒之一为 PCBR 13, 插入长度为 3 kb。EcoRI 和 *Bam*HI 处理的 2 kb PCBR 13 片段的序列分析表明, 这一 DNA 序列含有编码 277 个氨基酸的开口识别框架, 包括 N-末端序列和溴化氰衍生片段, 与由纯酶衍生肽序列所确定的相同。

Anderson 等<sup>[1]</sup>将棒状杆菌 SHS 0007 DNA 的 2.0-2.5 kb *Bam*HI 片段克隆到质粒 PBR 322 的 *Bam*HI 端, 由得到的部分基因文库中筛选到的 2.2 kb *Bam*HI 片段序列表明它并不含 2,5-DKG 还原酶的全部基因。以 *Bam*HI 片段上 *Pst*I-*Bam* HI 片段作探针, 将含 2,5-DKG 还原酶 COOH-端编码区域的 0.9 kb *Pst*I 片段亚克隆到载体上, 从而得到 2,5-DKG 还原酶全部基因的克隆, 编码 278 个氨基酸。

Hardy 与 Anderson 所报道的 2,5-DKG 还原酶基因中碱基对有 60% 的同源<sup>[2]</sup>。若棒状杆菌 SHS 752001 还原酶序列中引入一氨基酸残基空缺, 用 GAP 比较程序进行比较, 两个序列 28% 相同, 60% 化学相似。由于 Hardy 所用的酶 I (Mr. 29000) 与 Anderson 所用的酶

(Mr. 34000) 虽均能催化 2,5-DKG 还原为 2-KLG, 但它们的动力学常数和专一活性差异较大, 这可能是造成以上差异的主要因素。

#### (四) 2,5-DKG 还原酶基因的表达

Hardy<sup>[2]</sup> 等将质粒 PCBR 13 转入欧文氏菌和大肠杆菌中, 细胞蛋白用聚丙烯酰胺电泳分离并转移到硝酸纤维素膜上, 用 <sup>125</sup>I-标记葡萄糖球蛋白或过氧化氢酶连接的兔抗-免疫球蛋白测定其产生与抗 2,5-DKG 还原酶交叉反应的抗原的能力。结果表明, 既没有不带质粒 PCBR 13 菌的抽提液与抗还原酶抗体反应, 也没有带质粒 PCBR 13 菌的抽提液与前免疫血清反应, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷诱导试验表明, PCBR 13 中 Lac 操纵子至少部分地控制 2,5-DKG 还原酶的合成。为增强 2,5-DKG 还原酶基因的表达, 提高发酵液中 2-KLG 的浓度, 他们又用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*RI 消化质粒 PCBR 13, 得到的 2kb 片段克隆到带有操纵子  $\lambda$ PL 的载体 210 上, 构建质粒 pPL 332, 质粒 pPL 332 转入不能以 2,5-DKG 或 2-KLG 作碳源生长的柠檬欧文氏菌突变体 Er 1026 中。发酵 72 小时 (2 升), 发酵液中 2-KLG 浓度为 19.8 g/L, 转化率为 49.4%。

Anderson 等对亚克隆 (mit 12'') 进行一系列修饰使其更有效地表达。他们删除了亚克隆中棒状杆菌 DNA 从起始编码 ATG 的上游, 并插入在大肠杆菌中有效作用的转录和转译序列内。由合成核糖的结合位点和 2,5-DKG 还原酶区域跟随的大肠杆菌 *trp* 操纵子端插入一

带有四环素抗性基因的 pBR 322 衍生质粒。所得 ptrpl-35 质粒转入草生欧文氏菌 ATCC

KLG 的生物转化需要一有效的 NADPH 再生系统和 2-KLG 分泌到胞外的方式也是影响因素。

随着市场对维生素 C 需求的日益增加,用重组 DNA 技术研究葡萄糖发酵法生产 Vc 前体 2-KLG,使其早日实现工业化生产显得尤为重要。我们认为,提高 2,5-DKG 还原酶基因的表达,可以选择有效的操纵系和载体质粒,也可以将葡萄糖脱氢酶基因与 2,5-DKG 还原酶基因克隆到同一载体质粒上,转入欧文氏菌或大肠杆菌中表达。此外,通过对代谢机制进行深入的研究,可以从代谢上进行调控以提高 2-KLG 的产量。这将有待于国内外科学工作者继续探索和研究。

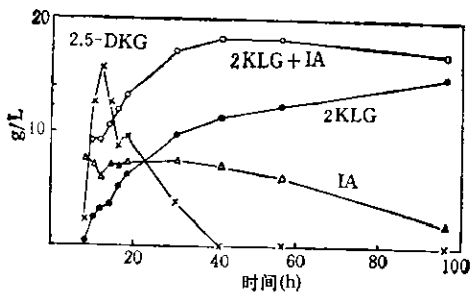


图3 10升发酵罐中草生欧文氏菌 ptrpl-35 转化葡萄糖为 2-KLG IA: 艾杜糖酸

21998 中,选出抗四环素的菌落。SDS-凝胶电泳分析、免疫印痕分析和大肠杆菌转化细胞质抽提液中的酶活力测定均表明,2,5-DKG 还原酶得到了高水平的表达。10 升发酵罐发酵 100 小时<sup>[16]</sup>,2-KLG 浓度为 14.3 g/L,转化率为 47.79 (图 3)。而缺失 2,5-DKG 还原酶基因的对照培养液中无 2-KLG。

### (五) 展望

Anderson<sup>[1,16]</sup> 和 Hardy<sup>[2]</sup> 的研究表明,重组 DNA 技术可使棒状杆菌的某些特性在与其相差较大的欧文氏菌中得到表达。从表达的效果来看,目前的工作水平——2-KLG 产率与园山高康的串联发酵相比仍有很大的距离。这一方面由于转化葡萄糖为 2,5-DKG 的脱氢酶是一种连接在电子传递链上、位于细胞膜外表面的酶,而 2,5-DKG 还原酶是依赖于 NADPH 的胞质酶。两条结构上分开的途径间的转换需要一种特异的渗透过程才能沟通。另一方面,由于 2,5-DKG 还原酶基因在欧文氏菌中的表达不完全(效率不高)。此外,D-葡萄糖到 2-

### 参 考 文 献

1. Anderson S et al.: *Science*, 230: 144—149, 1985.
2. Hardy K G et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1770—1775, 1988.
3. Reichstein T: et al.: *Helv. Chim. Acta*, 16: 1019—1028, 1933.
4. Huang H T: U. S. Patent, 3043749, 1962.
5. Fr. Patent, 1376741 Co7c—Cl2K, 1964.
6. 望月一男等: 特许公报,昭37-43475,1962.
7. 园山高康等: 特许公报,昭54-19468,1982.
8. Kita D A et al.: U. S. Patent, 4316960, 1982.
9. 尹光琳等: 微生物学报,20(3): 246,1980.
10. Sonoyama T et al.: European Patent, 0088408, 1983.
11. Sonoyama T et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 43(7): 1064—1069, 1982.
12. Sonoyama T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51(11): 3039—3047, 1987.
13. Sonoyama T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 52(3): 66—67, 1988.
14. Sonoyama T et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 51(7): 2003—2004, 1987.
15. Sonoyama T and K Kobayashi: *J. Ferment. Tech.*, 65(3): 311—317, 1987.
16. Anderson S et al.: *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*, 187—193, 1989.