

文章编号:1673-1689(2006)01-00115-05

复合酶在生物合成中的应用

刘均洪, 邢晓夏, 李伟伟

(青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 目前生物催化主要用于更加经济简便的合成已知和未知的化合物。利用突变的微生物、加工酶及新颖的酶的复合, 可以提高产量, 也可以探索出新式合成方法。复合酶的应用利用了系统水平的生物学知识, 成为新式的化合物合成方法。随着对蛋白质功能及其相互作用的逐步了解, 这种体外的生物合成方法也正在进一步得到完善。

关键词: 复合酶; 生物合成; 组合

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Utilization of Enzyme Mixtures for Complex Biosyntheses

XING Xiao-xia, LI Wei-wei, LIU Jun-hong

(Department of Bioengineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: Biocatalysis is currently employed to produce known substances more economically and for the synthesis of new compounds. Increased production or novel product synthesis can be achieved through the use of mutant organisms, tailored enzymes or novel combinations of enzymes in reactors. These complex biosyntheses, once only used in the realm of the biopharmaceutical industry, have now been embraced by the food and textile industries and are finding new geochemical and environmental applications. The use of enzyme mixtures is becoming a novel manufacturing methods that utilize the systematic biological knowledge. The enhanced understanding on the functional interaction of proteins and protein networks is also altering the practice of in vitro biosynthesis.

Key words: enzyme mixtures; biosynthesis; combination

利用生物技术进行合成曾经一直局限于生物制药行业, 但如今已应用扩大到纺织业、食品业等, 甚至在地球化学、环境等学科也有应用^[1]。利用微生物进行生物合成时, 需要权衡代谢过程中的毒性与最终产物的收率。代谢产物的毒性常常会影响产物的收率, 这是由于微生物正常的新陈代谢过程受到阻碍。此外, 微生物需要调节自身活动以减少

正常新陈代谢引起的底物转变带来的影响^[2]。使用纯化酶可以避免这个问题, 而使用纯化酶需要极其细致的纯化步骤, 而且成本较高, 占整个成本的 50% 以上。

复杂的生物合成所期望达到的目标有很多: 提高生产率、减少转化步骤、用简单的转化步骤取代复杂的合成 (如利用酶或微生物合成来取代复杂的

收稿日期: 2005-09-06; 修回日期: 2005-10-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20176019).

作者简介: 刘均洪 (1955-), 男, 湖北武汉人, 工学博士, 教授, 博士生导师.

化学合成)以提高产物纯度(如手性纯)、提高反应物或底物的溶解性、改善反应条件使得有危害的反应步骤变成无危害等等。最后这一目标显然包括降低中间产物毒性或降低反应温度或压力。

在制药和食品行业中有很多例子,在反应过程中某一步骤发生改变,或是通过突变引入一个新的基因,或是使用不同酶或微生物的混合剂,都可以带来巨大的经济效益。滕利荣等^[3]研究了热水法及复合酶法提取百合多糖(LBP)的最佳条件,对两种方法得到的多糖的生物活性进行了比较分析,发现复合酶法能显著提高百合多糖的提取率,可达31.03%,是热水法的2.85倍。

1 获取复合酶的方法

1.1 突变方法

随机突变已经用于提高已知底物的转化率及生成新的化合物。随机突变(如紫外线辐射和化学突变)不需要知道微生物的基因,但随后要进行大量的筛选才能离析出合适的突变,加入一些外源的化学物质可作为突变条件,诱导或抑制形成特殊的表型。这种方法需要快速的、有条件的、可逆的、有选择性的及剂量依赖型的生物调控功能。最近,Asami等^[4]利用芸苔素吡咯诱变出显性的芸苔素固醇缺失型 Arabidopsis。

分子生物学的发展促进了定点突变技术的应用,这种方法需要掌握微生物基因组及体内新陈代谢途径的知识。定点突变与随机突变不同,它可以进行选择性的特殊突变,而且可以以人为的方式达到预期的变化。

1.2 无细胞蛋白质合成

对于生物合成药用蛋白质或其他重要蛋白质,无细胞蛋白质合成体系(CFPS, cell-free protein synthesis)是一种新颖方法。该方法是以外源 mRNA 或 RNA 为模板,通过细胞抽提物的酶系来补充底物和能源物质来合成蛋白质的体外系统。一些经典的合成不同模型蛋白质的实例表明,CFPS 中辅因子循环,消除外系物质活性及利用酶的突变体是提高活性产物产率的重要因素。

CFPS 需要的生理条件与大肠杆菌细胞质内几乎相同,而且在不需额外加入昂贵的高能磷酸盐化合物或酶的情况下,可以为蛋白质表达提供稳定的能量。第一代 CFPS 提供的理化环境不稳定,通过加入辅因子(ATP)再生和循环使得 CFPS 的应用有更广阔的应用范围而且更经济。不断加入磷酸烯醇式丙酮酸作为 ATP 再生的二级能源,并选

择迅速降解的氨基酸(如精氨酸,半胱氨酸,色氨酸),可以延长 CFPS 中蛋白质合成的时间。使用大肠杆菌中的二聚体蛋白硫氧还蛋白还原酶和谷胱甘肽还原酶作为模型系统,该系统需要辅因子黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的循环,可以提高 CFPS 中产物的特殊活性及产率。

在具有氧化活性的细胞质折叠蛋白质中利用 CFPS 已经融入了一些先进技术,如碘代乙酰胺氧化还原能力的优化利用,谷胱甘肽氧化型和还原型综合利用,周质分子伴侣 DsbC 或 Skp 的加入,亚精胺代替聚乙二醇发挥作用,这些都提供了自然而稳定的环境,从而可以提高蛋白质产品的溶解性和产率^[5]。正是由于以上这些修饰作用使得 mRNA 的稳定性增加,有利于二硫醚的异构化作用,进而提高活性蛋白质的产率。这样,尽管哺乳动物蛋白质含有比较复杂的二硫键,但经过简单的预处理除去还原活性后,仍然可以在 CFPS 中以活性形式有效表达。

2 纯化酶线性组合与复合酶功能性组合的比较

令许多研究者不解的是,在细胞质中许多反应是如何同时进行而又保持各自特异性的?在细胞质中不同的蛋白质是怎样找到特定的与其相互作用的底物的呢?生理转化的速度为人们提供了最初的线索,即生物系统有着高度的功能划分^[6],并存在内部通道来支持这些高速反应,这种通道支持微溶底物的转化,蛋白质组学的研究为一些蛋白复合体提供了理论依据^[7,8],如通道疏松蛋白复合体的存在,通常称之为蛋白质相互作用。蛋白质相互作用和它的极端形式被认为是蛋白质复合体。在这里,相互作用是相对稳定的。目前生物系统中这些排列被认为与通道中间体有关,并形成了高转化速度,且在受到外界刺激后可迅速转变目标,这些原则已经逐渐被人们接受。直到今天,酶的线性组合仍广泛使用,但是在合成过程中使用组合部件的时代已经来到。在对生物系统中比较普遍存在的酶和蛋白质组织结构理解的基础上,一体化蛋白质相互作用与在一个稳定系统中生产新型化合物的方法见图1。1,5-二磷酸核酮糖的再生依靠纯酶的线性组合,这种线性组合要求反应器大容量,而且步骤要求较多。图2描述的是另一种组合,酶的复合体被分在4个不同的反应器之间,这种功能性的安排会减少反应器容量并很大程度上提高转化速度。

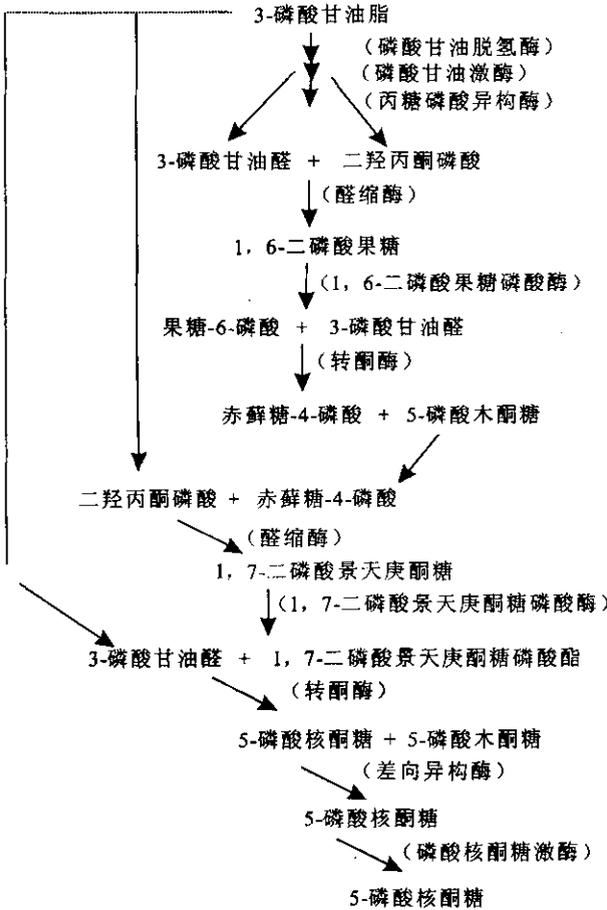


图 1 纯化酶线性组合

Fig. 1 Linear combination of the purified enzyme

3 新型化合物的生成

通过不同的途径使用微生物或酶的复合剂可以生成新型化合物。如:向反应液中加入特殊的前体物质、使用多种不同型的微生物、或使用基因工程技术改造的微生物(如随机突变、定点突变或引入新的基因)等。

Weber 等^[9~11]已经掌握了在聚酮化合物的生物合成中使用微生物的遗传学性质及参与该过程的酶的具体结构,可以利用这一途径来生产一些新的杂交抗生素。

一种新化合物 1-脱噻-3-氮杂-1-氨基-2-氧头孢烯的合成,成功地将酶法与化学合成法有机结合。酶法移去甲基基团,得到的中间体为随后的化学合成提供了前体。CFPS 中转录与翻译相偶联也用于生产新的化合物。合成的核糖核苷三磷酸(rNTP)引起了碱基配对(如 2-氨基-6-嘌呤与吡啶-2-酮),这种非天然的碱基配对有助于扩展基因密码子,且允许在使用大肠杆菌游离细胞系统中,在蛋白质指定的位置用氨基酸类似物有效合成蛋白质。

4 遗传学和蛋白质组学方法

在生物技术发展早期,随机突变是惟一可获得诱变菌株的方法。分子生物学的发展,尤其是 II 型限制性内切核酸酶、DNA 连接酶及 DNA 测序技术的发现,大大改进了菌株诱变的方法,并由此产生了大量基因文库。DNA 测序的进步是与蛋白质组学技术相融合的,如使用质谱技术来测量多肽和蛋白质来确定相对分子质量,并使用串联质谱来为多肽测序。遗传学提供基因信息,而蛋白质组学与免疫沉淀技术相结合,可以提供体内功能蛋白质排列的信息。在生物学和生物化学中真正的功能单元不是机体中某些基因或蛋白质,而是整个新陈代谢途径^[12,13]。

遗传学和蛋白质组学功能上的的结合显示出其巨大计算能力。通过信息的收集整理又产生了许多新的数据库,新式工具和手段又为信息处理和收集提供了方便。BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase; <http://www.brenda.uni-koeln.de/>)是一个非常重要的数据库,利用这些资源有利于生物催化的研究。

5 近期应用

寡糖作为一类新的生理活性物质,在营养与保

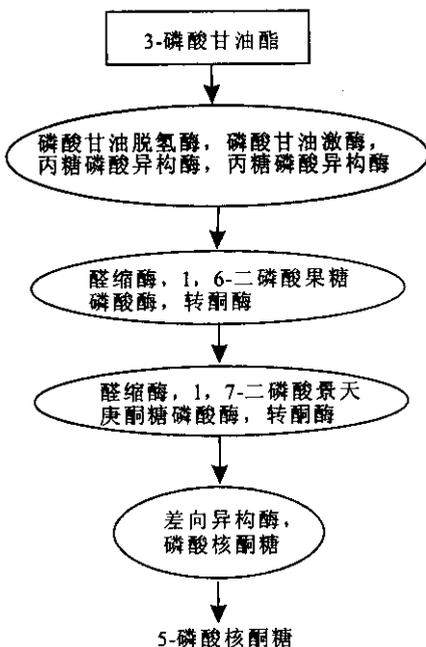


图 2 复合酶的功能性组合

Fig. 2 Functional combination of the enzyme mixtures

健、疾病诊断与防治、畜牧养殖、植物生长调节及抗病害等方面的应用具有极大的潜力。与化学合成相比,酶法合成寡糖可用较少的步骤产生较高的立体选择性^[14]。利用酶法合成一些手性化合物已经用于工业生产^[15],而且有些酶可以在有机溶剂中保持活性,这也为微溶物质的转化提供了可能。

利用流程设计也可以使抗生素如青霉素 G 和 7-ADCA 的生产得以改进^[14,15]。最近,利用复合酶制剂“一锅煮”的方式合成脱氧胸苷二磷酸-4-酮-6-脱氧-D 葡萄糖,该化合物可作为合成抗生素的前体物质。“一锅煮”合成法可以提高产率,减少复杂的合成步骤,同时降低生产成本。

在生产天然产物及其类似物时,复合生物合成及途径工程是非常有效的方法^[16]。途径工程是利用生物学原理系统分析细胞代谢网络,并通过 DNA 重组技术合理设计细胞代谢途径并进行遗传修饰,进而完成细胞特性改造的一门应用型学科。利用途径工程重组的微生物已经用廉价碳源生产出预期性质的多聚体。重组的 *Ralstonia eutropha* 能够以果糖为原料合成 3-羟基丁酸酯和 3-羟基己酸酯的共聚物。这种重组工程菌含有来自 *Streptomyces cinnamonensis* (ccrSc) 的丁烯酰辅酶 A 还原酶基因和来自 *Aeromonas caviae* (phaC-JAc) 的聚羟基烷酸(PHA)合成酶和 R 型烯酰辅酶 A 水合酶基因,可以在体内积聚共聚酯多达细胞干重的 48%。重组的 *R. eutropha* 菌株以果糖为原料产生的共聚酯与 3-羟基丁酸酯相比,其熔点和结晶度较低。在聚 3-羟基丁酸酯序列中引入了少量 3-羟基

己酸酯单元,使 3-羟基丁酸酯的固态特征发生显著变化^[17]。基于所合并单体的大小,聚羟基烷酸(PHA)可分为 3 类:短链长(SCL)含 3-5 个碳原子;中链长(MCL)含 6-14 个碳原子,短-中链(SCL-MCL)长含 4-14 个碳原子。最近在重组的大肠杆菌中利用葡萄糖为原料合成了一种新型的 SCL-MCL 聚羟基烷酸共聚物。该研究利用定点突变的 3-酮酰基载体蛋白合成酶 III 基因,这种酶在脂肪酸生物合成中被修饰并过量表达了其它的突变基因,使得重组大肠杆菌诱导产生 C₄-C₁₀ 的单体随后生成含有 SCL 和 MCL 单元的罕见聚羟基烷酸共聚物^[18]。

基因工程技术也可改善生物降解,例如, *Pseudomonas* 菌属中 KKS102 菌株 bph 操纵子中的天然增强子被取代后的改良菌株提高了对联苯和二氧化联苯的降解活性^[19]。

6 结 语

酶法生物合成是一种无毒无害的化学合成方法。在不同机体系统中可以得到不同的酶,利用这些酶的组合及某些起始原料可以合成许多新的化合物。在环境,地理,食品及制药等行业中都有不同的应用。孟祥河等^[20]采用木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶两种蛋白酶复合水解牛肉制备富含生物活性多肽、肉碱的混合液。复合酶的应用大大拓展了生物合成这一安全有效合成方法的应用,其必将为蛋白质、新陈代谢等的研究带来根本性的变革。

参考文献

- [1] Kirk O, Borchert T V, Fuglsang C C. Industrial enzyme applications[J]. **Curr Opin Biotechnol**, 2002, 13:345-351.
- [2] Velkov T, Lawen A. Non-ribosomal peptide synthetases as technological platforms for the synthesis of highly modified peptide bioeffectors cyclosporin synthetase as a complex example[J]. **Biotechnol Annu Rev**, 2003, 9:151-197.
- [3] 滕利荣,孟庆繁,刘培源,等. 酶法提取百合多糖及其体外抗氧化活性[J]. 吉林大学学报(理学版),2003,41(4):538-542.
- [4] Asami T, Nakano T, Nakashita H, et al. The influence of chemical genetics on plant science: shedding light on functions and mechanism of action of brassinosteroids using biosynthesis inhibitors[J]. **Plant Growth Regul**, 2003, 22:336-349.
- [5] Yin G, Swartz J R. Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2004, 86:188-195.
- [6] Nagradova N. Interdomain communications in bifunctional enzymes; how are different activities coordinated[J]. **IUBMB Life**, 2003, 55:459-466.
- [7] Schneider K, Hovel K, Witzel K, et al. The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2003, 100:8601-8606.
- [8] Morgan J A, Clark D S. Salt-activation of nonhydrolase enzymes for use in organic solvents[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2004, 85:456-459.
- [9] Weber J, Witzel K, Pelzer S, et al. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes [J].

Biotechnol. 2003, 106:221-232.

- [10] Watanabe K, Khosla C, Stroud R M, et al. Crystal structure of an acyl-ACP dehydrogenase from the FK520 polyketide biosynthetic pathway: insights into extender unit biosynthesis[J]. **Mol Biol**, 2003, 334:435-444.
- [11] Mazur M T, Walsh C T, Kelleher N L. Site-specific observation of acyl intermediate processing in thiotemplate biosynthesis by Fourier transform mass spectrometry: the polyketide module of yersiniabactin synthetase[J]. **Biochemistry**, 2003,42:13393-13400.
- [13] Pharkya P, Nikolaev E V, Maranas C D. Review of the BRENDA Database[J]. **Metab Eng**, 2003, 5:71-73.
- [14] Perugino G, Trincone A, Rossi M, et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases[J]. **Trends Biotechnol.**,2004, 22:31-37.
- [15] Patel R N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates[J]. **Curr Opin Drug Discov Dev**, 2003,6:902-920.
- [16] Shen B. Accessing natural products by combinatorial biosynthesis[J]. **Sci STKE**, 2004, 12:23-26.
- [17] Fukui T, Abe H, Doi Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer[J]. **Biomacromolecules**, 2002, 3:618-624.
- [18] Nomura C T, Taguchi K, Taguchi S, et al. Coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-ACP synthase III (fabH) and polyhydroxyalkanoate synthase (phaC) genes leads to short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production from glucose in *Escherichia coli* JM109[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004,70:999-1007.
- [19] Ohtsubo Y, Shimura M, Delawary M, et al. Novel approach to the improvement of biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation activity: promoter implantation by homologous recombination[J]. **Appl Environ Microbiol**,2003, 69:146-153.
- [20] 孟祥河,张铁华,洪伯铿.复合酶水解牛肉的研究[J]. **食品科技**,2002,(2):17-20.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 95 页)

参考文献:

- [1] Danielwski A, Henriquez V, Gjalda K Z. Plastein reaction[J]. **Physiol Chem**, 1911, 71: 485.
- [2] Fujimaki M, Arai S, Yamashita M. Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. In *Food Proteins: Improvement through Chemical and Enzymatic Modification* [M]. Washington: Whiakker. American Chemical Society. 1977. 156-187.
- [3] Anthony T, Andrews, Efstathios Alichanidis. The plastein reaction revisited: evidence for a purely aggregation reaction mechanism[J]. **Food Chemisrey**,1990, 35, 243-261.
- [4] Michiko Yamashita, Soichi Arai, Yoshimasa Amano, et al. A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: application to soy protein and flour for enhancing their methione levels[J]. **Agric Biol Chem**, 1979, 43 (5), 1065-1068.
- [5] 张雅丽,王凤翼,宋世廉,等.蛋白质酶法修饰的初步探讨—大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白研究[J]. **食品与发酵工业**,1994,(2):8-13,7.
- [6] 张雅丽,王凤翼,宋世廉,等.蛋白质酶法修饰的初步探讨—大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白研究[J]. **食品与发酵工业**,1994,(5):67-68.
- [7] Michiko Watanabe, Atsuko Shimada, Etsuko Yazawa, et al. Proteinaceous surfactants produced from gelatin by enzymatic modification: application to preparation of food items[J]. **Journal of food science**,1981, 46: 1738-1981.
- [8] 罗平. **饮料分析与检验**[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1993. 146-147.
- [9] Klotz I M. Succinylation[J]. **Meth Enzymol XI**, 1967, 576-580.
- [10] Wilcox P E. Esterification[J]. **Meth Enzymol XI**, 1967, 605-617.

(责任编辑:杨萌)