

透明颤菌血红蛋白在发酵工业中的应用概述

郭宏秋 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

在生物技术日益产业化的今天,特别是随着基因工程技术的飞速发展,为生产新的生物产品带来了可能,有些产品已进入商业化生产,像干扰素、白细胞介素、生长激素等等。但这些生物过程,尤其是大规模生产和高密度发酵都遇到一个不可避免的矛盾,那就是生产株对氧的需求量和发酵设备的供氧能力。供氧已成为微生物工业中的一个限制因素。众所周知,氧是好气性微生物进行能量代谢的重要物质,生长代谢越旺盛,对氧的需求量也就越大。在一般情况下,微生物在发酵过程中的需氧量约为20~50mmol/L·h,而空气中的氧在培养基中的溶解度在1个大气压,25℃时大约只有0.2mmol/L·h,培养液中的氧还须经过气膜、气液界面、液膜、细胞膜等一系列传递过程最后进入细胞内到达呼吸链,此一过程需要克服相当大的阻力。传统的解决办法是改善设备的供氧能力,提高搅拌,增大通气量,以增加空气在培养液中的截留率,增加气液相接触的比表面积,或者在培养液中加入某些助溶剂,以提高氧的溶解度。所有这些方法均受到设备和能耗的限制,用于通气和搅拌的能耗已占整个发酵成本的1/3,而使发酵工业成为一个高能耗的工业。

1 透明颤菌血红蛋白的发现和遗传学研究

70年代,美国科学家Tyree等在一种叫做透明颤菌(*Vitreoscilla*)的专性好氧菌中发现了血红蛋白,它也是迄今为止在原核生物中发现

的唯一的血红蛋白。这种血红蛋白能够在极低的溶解氧(<5%)条件下被大量诱导合成,结果使*Vitreoscilla*这种专性好氧菌在贫氧环境如泥塘腐地生存,由此预示了该血红蛋白在需氧的微生物发酵工业中的应用价值。

*Vitreoscilla*是一种专性好氧的革兰氏阴性丝状菌,属Beggiatoe族,习惯生长于泥塘腐叶等贫氧的环境中,并能诱导合成一种可溶性的血红素蛋白,该蛋白是由两个完全相同的分子量为15775u的蛋白亚基和二分子b型血红素组成的同型二聚体,其在光谱学性质和氧合动力学上与氧合肌红蛋白、氧合血红蛋白非常相似。该蛋白146个氨基酸全序列及其与五种动植物血红蛋白的序列比较^[1~4],与真核生物的血红蛋白具有相当高的结构同源性和相似性,仅在N端存在某些结构差异,可能是少了 α -螺旋,其中与LLB(Lupinleghaemoglobin)同源性最高,达到24%,并正式命名为*Vitreoscilla* hemoglobin,简称VHb^[5]。

1988年美国IIT和CIT的两个实验室分别成功地从*Vitreoscilla*染色体上克隆了该血红蛋白基因vgb,测定了核苷酸序列并在大肠杆菌中进行了表达。由于VHb的存在,使细菌能够在限氧条件下生存,促进了细胞总蛋白的合成和外源蛋白的积聚,改善了生长特性。khosla等将

1995-04-20收稿

vgb 基因整合到野生型的 *E.coli* K12 菌株 MG1655 染色体上两个不同位置,得到 GRO21、GRO22,分别转入带氯霉素乙酰转移酶(cat)基因的 pTCAT 质粒。在相同的通气搅拌条件下 GRO21 和 GRO22 均显示出比 MG1655 更高的总蛋白合成速率和 CAT 活性,特别在细胞生长后期溶氧成为限制因素时更为明显。在考察 VHb 对细胞生长的影响时发现,在相同的培养条件下 VHb 的表达加快了细胞的生长速率,提高了细胞的呼吸强度,降低了细胞的临界氧浓度。在大幅度的溶氧变化中保持恒定的呼吸率,从而改善了细胞的生长特性,使其在低氧条件下仍然具有生长优势。

VHb 为何能使细菌在低氧下生存的作用机制还不清楚。科学家们对其进行了包括 VHb 定位、VHb 基因调控、能量代谢水平、呼吸链^[6]等多方面的研究,探讨了它的作用机理。1990 年 Chaitan khosla 等提出了两种假设:扩散便利假说和氧化还原效应物假说。扩散便利假说认为在低氧条件下,VHb 大量积累而且有近一半的 VHb 分布于周质中,以活性的氧合 VHb 存在,为有机体在生理状态下可直接利用的蓄氧仓库。另外,氧合 VHb 能提高氧在呼吸链上的传递效率,加快了质子传递,促进 ATP 的合成,提高了整个能量代谢水平。氧化还原效应物假说认为氧合型 VHb 可能影响了细胞内某些关键性的氧化还原敏感分子活性,它可能是传感器(sensor)、调控子(regulator),可能是呼吸链上某个关键酶,这种影响是通过提高能量转换效率逐级传导的。

从 VHb 在大肠杆菌中成功地进行功能表达以来,VHb 已越来越多地应用到微生物工业的许多领域,取得了明显的效果。下面这些实例充分显示 VHb 的功效。

2 VHb 在发酵工程中的应用

2.1 血红蛋白在大肠杆菌表达系统中的应用:

VHb 应用于 α -淀粉酶基因工程菌^[7]:将 vgb 基因克隆到芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的 pMK59 中,得到一新的重组质粒 pMK79,将 pMK59 和 pMK79 转化进大肠杆菌 JM103 中得到两

菌株 MK59 与 MK79,比较其生长和 α -淀粉酶的生产情况。可以看到 MK79 比 MK59 具有明显的生长优势,MK79 的细胞密度是 MK59 的 1.4 倍。对数生长中期, α -淀粉酶的产量对比,MK79 是 MK59 的 2.5 倍。培养 6h,MK79 和 MK59 的 α -淀粉酶都有所减少,但是 MK79 仍高于 MK59 的 α -淀粉酶的产量,是 MK59 的 3.3 倍,可见 VHb 对 α -淀粉酶产量的增强作用。

VHb 对青霉素酰化酶基因工程菌发酵的影响^[8]:青霉素酰化酶(pac)基因的表达是严格受氧调控的。对于 pac 基因的表达存在一个最适的溶氧水平,低于或高于这一水平都会造成产物表达的明显下降。将含有 vgb 基因的质粒 pOK12-vgb 转化 A56(pPA22)进行对照实验,发现在低于最适通气条件时,vgb 基因的加入可明显提高 pac 基因的表达量。在 $DO_2 >$ 最适通气条件时,vgb 基因几乎没有作用。

vgb 不仅能在大肠杆菌中进行功能表达,而且在欧文氏菌(*Erwinia*)中转入带 vgb 基因的大肠杆菌质粒也同样有作用。本实验室通过实验证明,血红蛋白在维生素 C 两步生产法中改善了欧文氏菌的生产状况。中试规模采用两步法生产维生素 C 中^[9],欧文氏菌 scB247 发酵缺氧较为突出。将带有 vgb 及其天然启动子 P1、P2 的大肠杆菌质粒 pWSK130-vgb 转化进 scB247 中进行发酵实验,测定产物 2,5-DKG(2,5-二酮基-D-葡萄糖酸盐)的含量。在弱通气条件下带 vgb 的 scB247 的 2,5-DKG 的产量比对照提高了 30%。通气状况越差,2,5-DKG 的产量比对照相对提高的越多。

2.2 血红蛋白在链霉菌(*Streptomyces*)中的应用^[10]:

链霉菌是抗生素的主要生产菌,由于链霉菌培养产生的致密丝体使发酵液处于高粘度状态而致氧在发酵液中溶解度下降,而且次级代谢产物的合成对氧的供给相当敏感,所以链霉菌发酵中供氧矛盾更为突出。文献报道,当 $DO_2 < 20\%$ 时,阿凡曼菌素 Avermectin(产生菌 *S. avermitilis*)的产量将减少,当 $DO_2 < 75\%$ 时,头孢菌素(产生菌 *S. clavuligerus*)的含量将

减少3倍。Sharon等构建了能在链霉菌中进行功能表达 *vgb* 的质粒 pWLD10(*vgb* 克隆于链霉菌质粒 pIJ699 中)。转化进 *S.coelicolor* 和 *S.lividans* 中,通过免疫印迹分析和 CO 结合实验,证实了 *vgb* 基因在链霉菌中进行了功能表达,在 *S.lividans* 中表达 *vgb*,在减弱通气的条件下得到了比无 *vgb* 表达的菌株高的细胞浓度和高的氧耗速率,细胞密度可提高54%。

同样 VHb 也提高了放线紫素的产量,比较 M145: pWLD10 和 M145: pFBM8(对照质粒)的发酵情况。当保持发酵过程中 500r/min 转速,维持 $DO_2 > 40\%$,上述两菌株的放线紫素产量无大差别(47mg/L)。但当 22h 时降低搅拌至 250r/min 时,溶氧小于 5%,那么此时放线紫素的产量前者是后者的 10 倍,达 65mg/L,而对照株的产量却急剧下降,说明 VHb 不但能促进菌生长,而且克服了由于质粒负载而给细胞带来的生长劣势,更有效地促进次级代谢产物的生产,并减弱其对氧的敏感性。

2.3 血红蛋白在霉菌中的应用^[11]: VHb 除了在细菌放线菌中起作用以外,最近有报道 VHb 也同样能在真核生物霉菌中表达并起作用。1993 年 Demodena 等在 *Acremonium chrysogenum* 中应用 VHb,使头孢菌素 C 的产量在限氧条件下提高了 5 倍以上。

头孢菌素 C 的生物合成途径受环境因素磷、碳、溶解氧等的影响,尤其是氧对头孢菌素 C 的合成是至关重要的因素。因为在头孢菌素 C 的生物途径中包括三个氧化反应。构建了整合型的载体 pULXTRI 转化进 *A.chrysogenum* 中,通过免疫印迹分析和 CO 结合实验证明了 *vgb* 在其中进行了功能表达,筛选(腐草霉素抗性标记)整合有 *vgb* 基因的菌株与对照株进行实验,发现在低氧条件下前者的头孢菌素 C 的产量是 3.0g/L,而后者是 0.6g/L。可见在低氧状态下 VHb 促进了抗生素的合成。

2.4 血红蛋白在酵母中的应用^[12]: 1994 年 Wilfred 等在 Biotechnical Prog 上发表了 VHb 在酵母中的研究结果,他们使 *vgb* 基因在 *Saccharomyces cerevisiae* 中进行了表达,并

研究了它对有氧代谢的影响,构建了 *vgb* 的表达载体,置于 ADH-I 启动子的控制之下。免疫印迹的实验显示了 VHb 的存在,并证明 VHb 在酵母中主要存在于细胞质中。

分别在 *S.cerevisiae* SEY2101 和 Mc65-2A 中转入相应的质粒,研究了它们的生长和乙醇产生的过程,结果表明, *vgb* 对于野生型的 SEY2101 的乙醇产量具有促进作用。在 Mc65-2A: pVHb-trp1 中, VHb 的存在使生长增加,而乙醇下降。作者认为 Mc65-2A 产生乙醇的途径是线粒体乙醛歧化途径。VHb 的存在降低了电子传递链与歧化途径的偶合,从而使酒精的产量下降。

在基因工程中,酵母具有比 *E.coli* 优越的表达系统。在酵母发酵中,当环境贫氧时,酵母的代谢转入乙醇的形成。酵母对乙醇的阻抑作用是相当敏感的(1%~2%)。当乙醇量达到 10%,酵母的生长几乎停止。因此,带 *vgb* 的 Mc65-2A 可作为酵母基因工程菌研究的宿主菌,用于外源基因的高表达和高密度培养研究:减少乙醇的形成,使酵母的代谢向合成外源蛋白方向进行。在野生型 SEY2101 中 VHb 促进乙醇的合成,提示我们可将其应用于酒精的生产菌株之中,提高酒精的产量。

综上所述, VHb 具有在限氧条件下促进细胞生长,提高蛋白质合成能力,增加目的产物产量的作用,使生产菌在限氧条件下正常生长和生物合成目的产物。VHb 应用于发酵工业,可提高产量,降低能耗,又不需要设备投资,将成为发酵工业中的一个新的关键技术,得到广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] Tyree B, Webster D A. J Biol Chem, 1978, 253: 6988~6991.
- [2] Webster D A, Liu C Y. J Biol Chem, 1974, 249: 4257~4260.
- [3] Choc M G, Webster D A, Caughey W S. J Biol Chem, 1982, 257: 865~869.
- [4] Khosla C, Curtis J E, Demodena J, et al. Bio/Technology, 1990, 8: 849~853.
- [5] Wakabayashi S, Matsubara H, Webster D A. Nature,

1986, **322**: 481~483.

[6] Ruizhen C, James E B. *Biotechnol Prog*, 1994, **10**: 360~364.

[7] Khosravi M, Dale A W, Bengamen C S. *Plasmid*, 1990, **24**: 190~194.

[8] 吴 奕. 中国科技首届青年学术年会论文集. 上海: 上海科技出版社, 1992, 196~199.

[9] 严光琳, 马志方, 董文玲等. *微生物学报*, 1991, **31**(3): 198

~205.

[10] Magnolo S K, Leenutaphong D L, Demodena J A, *et al*. *Bio / Technology*, 1991, **9**: 473~476.

[11] Demodena J A, Gutierrez S, Velasco J, *et al*. *Bio / Technology*, 1993, **11**: 926~929.

[12] Wilfred C, Eallas E H, James E B. *Biotechnol Prog*, 1994, **10**: 308~313.