

色氨酸基因工程进展

吴夏英 杨青*

(中国科学院微生物研究所, 北京, 100080)

色氨酸是人类和动物必需氨基酸之一, 在生理上可以促进生长发育。它可用于配制输液和食品添加剂。玉米等谷物中色氨酸的含量很低, 它又是继苏氨酸、赖氨酸之后的第三大饲料添加氨基酸。估计世界年需求量为万吨以上, 目前生产量仅为一千吨上下。日本是色氨酸主要生产国, 1989年销售额为25亿日元。

色氨酸的研究和生产前后经历了20多年, 生产途径多种多样。其难点一是色氨酸生物合成的调控比较复杂, 二是需要另一合成途径的产物丝氨酸作为侧链。

(一) 色氨酸的生物合成与调控

色氨酸是芳香族氨基酸之一, 从前体分支酸起, 分别合成色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。色氨酸合成代谢途径有反馈抑制作用和弱化子调控(图1)^[1-3], 总降低转录水平的抑制效应为600倍^[4,5]。要提高色氨酸产量, 从代谢上应从分支酸起倾向色氨酸的代谢合成, 并解除

上述的抑制作用。调整了上述反应过程还达不到提高色氨酸的产量, 作为侧链的丝氨酸合成量也要相应地提高。为了克服以上难点, 研究出化学合成法、突变株发酵法和突变株酶促转化前体法等, 有些方法已用于生产。如 Ishiwata 等^[6]以化学法合成 DL-丝氨酸, 用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的消旋酶, 将 D 型丝氨酸转型为乙型。加上另一底物吲哚, 用大肠杆菌色氨酸合成酶进行酶促转化, 在 200 升反应器中, 产色氨酸为 110g/L。

(二) 色氨酸基因工程

为探索用遗传工程技术构建重组工程菌生产色氨酸, Hershfield^[7]用 ColEI 为载体, 克隆了色氨酸操纵子, 每个宿主细胞中重组质粒拷贝数为 20—30 个, 色氨酸合成酶活性比供体菌增加了 150 倍。Triba 等^[8]用 ColV 和 F 质粒构建了 ColV-trp 和 F-trp 重组质粒。重组工程菌培养 12.5 小时, 每升积累色氨酸 1 克。

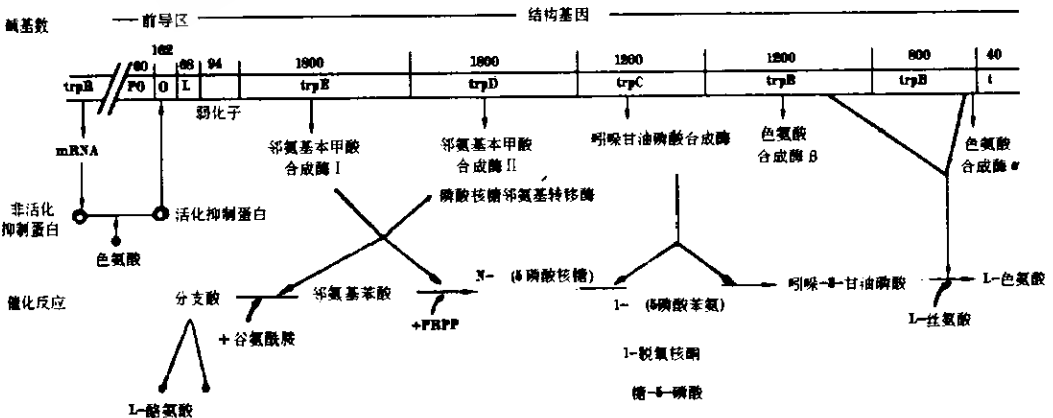


图 1 色氨酸操纵子及色氨酸代谢途径

Aiba 等^[9]用诱变解除色氨酸对受体菌和重组质粒的反馈抑制, 产色氨酸为 0.08g/L·h。Aiba 等^[10]又用质粒 pSC101 为载体, 宿主菌为 trpR

本文在陈瑞、门大鹏先生指导下撰写的, 并得到百泰生物工程公司的资助, 在此一并致谢。

* 现通讯地址是北京市发酵研究所。

(调节基因缺失) 和 TnaA(色氨酸酶基因缺失), 克隆的色氨酸操纵子也是解除了反馈抑制, 同时邻氨基苯甲酸合成酶基因发生了突变, 重组工程菌培养 27 小时产色氨酸 6.2g/L。Anderson 等^[11] 将色氨酸操纵子与 SerB 基因克隆到同一质粒上, 转化 trp 和 Ser 受体菌, 发酵产色氨酸达 15—17g/L。

为了避开色氨酸的反馈抑制、弱化子效应以及合成苯丙氨酸和酪氨酸的干扰, 基因克隆转向色氨酸合成的关键酶色氨酸合成酶基因的克隆。Natsui 等^[12] 把乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) 的色氨酸合成酶基因 (trpBA) 克隆到质粒 pAJ31902 上, 转化受体后, 色氨酸产量比供体菌提高了 47 倍。Anderson^[13] 克隆了大肠杆菌色氨酸合成酶 β_2 亚单位基因 (trpB), 其酶活性提高了 230 倍。以吲哚和丝氨酸为底物, 酶促转化生成色氨酸达 78g/L。据《日经生物技术》^[14] 报道日本三井公司克隆了大肠杆菌色氨酸合成酶基因和丝氨酸转羟甲基酶 (SHTase) 基因, 用甘氨酸为原料合成丝氨酸, 再加入吲哚生产色氨酸, 产量为 90g/L。三井东压公司也用大肠杆菌色氨酸合成酶基因重组工程菌生产色氨酸。三菱石化公司用类似于三井公司的方法, 酶促转化色氨酸达到 200g/L。Yukawa 等^[15] 构建了带有色氨酸合成酶基因的大肠杆菌 K-12, 酶促转化产色氨酸 200g/L。

色氨酸酶基因位于大肠杆菌染色体 80 分处。正常情况下色氨酸酶 (Tase) 降解过量的色氨酸, 生成氨和丙酮酸及吲哚。高浓度的氨和丙酮酸使反应向逆反应进行, 即在氨、丙酮酸和吲哚作底物, 在高浓度条件下, 色氨酸酶催化合成色氨酸。Genex 公司的 Hamilton 等^[16] 克隆了色氨酸酶基因, 酶促转化产色氨酸 200g/L。Terasawa 等^[17] 构建了 pBR322F-TnaA 重组质粒, 酶活性比供体菌提高了 500 倍, 酶转化产色氨酸 200g/L。

(三) 高密度和质粒稳定性

用酶促转化法生产色氨酸, 与加入反应体系中总酶活性的高低成正比。若重组工程菌

的菌体培养采用高密度培养法, 单位体积内菌量增加, 相应地总酶活性也随之提高, 从而提高酶促转化效率和产量。日本三菱石化公司^[14] 培养重组工程菌 20 小时, 菌体量达 120g/L(湿重)。Yukawa^[15] 报道培养的菌体量为 125g/L(湿重)。Matsui 等^[18] 报道培养带有 pBR322: trpBA 的工程菌 14 小时, 菌体量可达到 115g/L(干重)。

在生产规模培养重组工程菌时一般不添加抗生素, 在无选择压力条件下重组质粒表现出不同程度的丢失, 为使重组质粒能稳定的传代, 已研究出一些防治质粒丢失的措施。其中比较有效的方法是在重组质粒中插入具有质粒分配功能的 DNA 片段。Mitsubishi Petrochemicals^[19] 在重组质粒 pBR322: trp 中插入 mini-F 的 EcoRI-BamHI 的分配功能片段, 重组工程菌培养 25 代, 质粒稳定性为 95%。Skogman 等^[20] 在重组质粒 pAcYc184-trp 中插入 par DNA 片段(来自质粒 pSC101), 稳定性提高了 10 倍。Yukawa^[15] 和 Terasawa^[17] 则是把 mini-F 的 EcoRI-BamHI 片段, 插入重组质粒, 培养至结束时可 100% 地稳定传代。

(四) 色氨酸的安全性

色氨酸是一种天然氨基酸, 是蛋白质的组分之一。用化学法、微生物发酵法、酶促转化法以及用重组工程菌发酵或酶促转化法生产色氨酸, 一直安全地应用于医药、食品和饲料添加剂。1989 年在美国突然发生因服用色氨酸引起 7,400 名妇女患嗜曙红细胞增多——肌疼综合症 (EMS) 事件, 1,535 例病例中有 27 人死亡^[21,22]。后经调查, 系服用日本昭和电工 (Showa Denka) 化学公司于 1988 年 1—6 月生产的几批色氨酸。这一事件不仅引起一场法律诉讼, 还引起一场反对生物技术产品的风波。这几批产品经检验和动物实验, 初步证明是色氨酸中污染了色氨酸二聚体。在生产上昭和电工化学公司作了一些改动, 一是用解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 二是产品纯化工艺改用了电渗析法, 三是活性炭过滤时用量由 20 公斤减少到 10 公斤。而解淀粉芽孢杆菌

的色氨酸操纵子是适宜用于生物技术的。问题尚待进一步证明,这是事先所未料到的。

据报道^[23],因昭和电工化学公司色氨酸引起EMS综合症,色氨酸市场曾一度下跌,每月销售量为4,600—6,800 Kilos。近两年来市场销售量又在逐年上升,每月销售量为80,000—100,000 Kilos。市场的销售量恢复,说明色氨酸是安全的,用于生产色氨酸的各种方法也是可行的。

参 考 文 献

1. Yanofsky C J: *J. Am. Med. Assn.*, 218, 1971.
2. Yanofsky C J: *Nature*, 289:751-758, 1981.
3. Yanofsky C J: *Nucleic Acids Res.*, 9:6647, 1981.
4. Jackson E et al.: *J. Mol. Biol.*, 76:89, 1973.
5. Bertrand K et al.: *J. Mol. Biol.*, 103:339, 1974.
6. Ishiwata K et al.: *Biotech. Appl. Biochem.*, 12:141—149, 1990.

7. Hershfield V et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3455, 1974.
8. Triba D E and J Fittard: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:190, 1979.
9. Aiba S et al.: *Biotech. Lett.*, 525:530, 1980.
10. Aiba S, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:369, 1982.
11. Anderson D M et al.: *Genetic Tech. News*, 2:10, 1982.
12. Natsui K et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 52:1863, 1988.
13. Anderson D M et al.: US Patent 4,371,614, 1983.
14. < 日经生物技术 >, (1):8, 1987.
15. Yukawa H et al.: *Process Biotech.*, Dec., p.165, 1987.
16. Hamilton K B et al.: *Trends in Biotechnology*, 3(3):64—68, 1985.
17. Terasawa M et al.: *Process Biochemistry International*, 25:172—175, 1990.
18. Natsui T et al.: *Agri. Biol. Chem.*, 54:619, 1990.
19. Schmid R D, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22(3):157—164, 1985.
20. Skogman G et al.: *Gene*, 23:105, 1983.
21. *Biotechnology Newswatch*, 10(17):3, 1990.
22. Fox J L: *Bio/tech.*, 8(11):992, 1990.
23. *Chemical Industry Note*, 20(15):6, 1991.

(1991-12-5 收稿)