

耐热菌 D-乳酸脱氢酶突变体的可视化建模和大肠杆菌中突变体对产苯乳酸的影响

田晋红^{1,2,3}, 刘琦², 战丽萍², 李小丽²

(1.西南大学蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400716;

2.西南大学药学院, 重庆 400716;

3.重庆市兽药工程技术研究中心, 重庆 400716)

摘要:以生物信息学为基础, 分析 D-乳酸脱氢酶(D-LDH)的保守氨基酸残基、活性中心氨基酸残基、蛋白质三维结构和同源建模, 可视化比较建模突变体空间构象, 优选最佳突变体模型。结果显示, 在 D-LDH 的 20 个保守氨基酸中, 4 个与酶活性中心有关。比较突变体模型发现, 49 和 297 位的 phe 或 try 的苯环形成空间位阻, F49A 或 Y279A 及 F49A 和 Y279A 双突变体可解除位阻。对已构建的三个突变体初步发酵显示, IPTG 和乳糖都能诱导突变体酶在大肠杆菌中产生苯乳酸, 静置培养比振荡培养产量高, 用乳糖诱导时, 突变体 F49A (A.a D-LDH-F49A 株) 苯乳酸的量比野生型 (A.a D-LDH 株) 的高。优选可视化突变体可作为高效构建工程菌的方法之一。

关键词:突变体, 可视化, 苯乳酸, D-乳酸脱氢酶

Visual modeling mutants for D-lactate dehydrogenase form aquifex aeolicus and the effect of mutants on the production of phenyl lactate acid in *E.coli*

TIAN Jin-hong^{1,2,3}, LIU Qi², ZHAN Li-ping², LI Xiao-li²

(1. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China;

3. Chongqing Engineering Technology Research Centre of Veterinary Drugs, Chongqing 400716, China)

Abstract: Based on bioinformatics, the amino acid residues of conservative and activity center of D-lactate dehydrogenase (D-LDH), and the three-dimensional structure model of protein was analysed. The space conformation of visualization mutant had been constructed by homology modeling, the best mutant models were selected by the calculation of the distance and angle. The results showed that the 4 amino acid residues were relevant to the activity center in 20 conservative residues of D-LDH. After the models were compared, it was found that the big molecules substrates were obstructed by the benzyl of the residues of Phenylalanine (phe) or Tyrosine (try) on the 49 and 297 position. When F49A, Y279A, F49A and Y279A were mutated, the obstacles would disappear or weaken. The three mutants constructed were made a preliminary study, the results showed that IPTG or lactose could induce mutant to produce phenyl lactic acid in *E.coli*. The yield of phenyl lactic acid was higher in static culture than in vibration incubator, and the one of the F49A mutant (A.a D-LDH-F49A strains) was higher than the one of the wild type (A.a D-LDH strains) with lactose inducing. It would be a method of constructing gene engineering strain that visualization mutants models were compared and selected.

Key words: mutant; visual; PLA; D-LDH

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)19-0173-05

乳酸脱氢酶的底物适应性较宽, 在厌氧条件下, 除催化丙酮酸或乳酸的互换外, 还对苯丙酮酸或苯乳酸具有部分催化活性, 但只有天然底物丙酮酸活性的 2%~20% 左右^[1]。Dunn C.R 等^[2]对猪的 L-LDH 9LDT

进行研究, El Hawrani AS 等^[3]、Wilks H.M 等^[4]对 *Bacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase (bsLDH) 1LDN 进行研究, 发现改变特定位点的氨基酸残基, 可以改变酶对底物的特异性, Q102A 突变酶大幅提高了催化苯丙酮酸合成苯乳酸的活性。Daff S 等^[5]、Sinclair R 等^[6]、Mowat CG 等^[7]分别用 L-苹果酸、苯甲酰甲酸和丙酮酸为底物对啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Flavocytochrome b2 (依赖细胞色素 C 乳酸脱氢酶, L-LDH) 的野生型和突变体

收稿日期: 2012-02-17

作者简介: 田晋红 (1958-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 资源微生物, 计算机辅助蛋白质工程设计。

基金项目: 重庆市科技创新能力建设 (CSTC, 2009CB1010) 资助项目。

三维结构进行研究,野生型对 L-苹果酸几乎没有活性,而 L230A 和 A198G/L230A 突变体酶的活性却增加了 40~400 倍。改变酶特定位点的氨基酸残基,可以改变酶的底物特异性和提高或降低酶催化活性。为了改变传统突变的盲目性、随机性和耗时耗力,提高构建突变体的效率,现以嗜热细菌 (*Aquifex aeolicus*, *A. aeolicus*) D-乳酸脱氢酶 (D-LDH)^[8] 为例,将同源建模、分析可视化突变体的方法和突变体酶对产苯乳酸的影响报道于下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 A.a.D-LDH 株、A.a.D-LDH-F49A 株、A.a.D-LDH-Y297S 株、A.a.D-LDH-FY/AS 株 本实验室保存;氨苄青霉素、卡那霉素、DNA Marker、蛋白 Marker、IPTG 购自鼎国生物有限公司;色谱纯甲醇、苯丙酮酸钠、苯乳酸、蛋白胨、酵母粉 市售进口或国产生化试剂。

高效液相色谱 日本岛津;LDH 氨基酸序列源自 GenBank, D-LDH 三维结构源自 RCSB PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>);分析软件:蛋白质分子立体结构观察软件 Chime 2.6 插件 从 CPHmodels 下载;RasMol 2.7.2.4 免费三维结构软件 生物软件园;Jmol Version 软件 下载网址 (<http://sourceforge.net/projects/jmol/files/>)。

1.2 实验方法

1.2.1 D-LHD 氨基酸序列比对 在 Genbank 中搜索 D-LDH 氨基酸序列,并随机下载部分 D-LDH 氨基酸序列到本地,用 Multiple Sequence Alignment (MSA) (<http://www.ebi.ac.uk/MAFFT/>) 进行序列比对,对结果进行分析。

1.2.2 蛋白质三维图像分析 用 Chime 软件、RasMol 软件、Molsoft ICM-Browser 软件、Jmol Version 软件和 View in Jmo 软件分析不同形态的模型。

1.2.3 同源建模 在 CPHmodels 网络免费服务器^[9-10] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) 或 SWISS-MODEL 同源建模服务器^[11-13] (<http://swissmodel.expasy.org>) 进行,以 fasta 文件直接通过 web 界面提交建模的氨基酸序列。在 SWISS-MODEL 中有三种建模方式,简捷模式 (First approach mode)、联配模式 (Alignment mode) 和项目模式 (Project mode),并可指定模板。本文以 3KB6 或 PDB 数据库中的其它野生型资源为模板,同源建模野生型与突变体模型,并用 1.2.2 中的软件分析。

1.2.4 突变体菌株 IPTG 诱导发酵^[14-15] 把 A.a.D-LDH 株、A.a.D-LDH-F49A 株、A.a.D-LDH-Y297S 株、A.a.D-LDH-FY/AS 株甘油菌分别接种到 LB 肉汤试管中活化,然后接种到三角瓶中,摇瓶培养过夜,次日以 2% (体积分数) 量接种于新鲜的 250mL 装 50mL LB 肉汤的三角瓶中,37℃ 培养,当 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6h,然后加入终浓度为 4mg/mL 的苯丙酮酸钠,静置培养 16h 后 12000r/min 离心取上清,用 HPLC^[16] 测定苯乳酸的含量。反相高效液相色谱条

件,色谱柱: Waters XBridge C₁₈ 色谱柱 (4.6mm × 150mm, 5μm);流动相为 0.05% 的三氟乙酸/水 (A 泵 55%) 和 0.05% 的三氟乙酸/甲醇 (B 泵 45%) 的混合液,洗脱时间为 10min,流速 1mL/min,柱温 30℃,进样量 5μL,紫外检测波长 210nm。

1.2.5 突变体菌株乳糖诱导发酵 按 1.2.4 所述的方法制种,然后接种到含 5mL/L 甘油的 LB 肉汤中,37℃ 培养,当 OD₆₀₀ 达到 1.5 以上时,加入 20% 的乳糖,使终浓度达 10g/L,诱导表达 4h,加入终浓度为 4mg/mL 的苯丙酮酸钠,静置或摇瓶培养过夜,12000r/min 离心取上清,用 HPLC 测定苯乳酸的含量。

2 结果与分析

2.1 氨基酸序列分析

3KB6 嗜嗜热菌 (*Aquifex aeolicus*) D-LDH 氨基酸序列如下,灰色标记的为保守氨基酸,其中深灰色加框标记为活性氨基酸残基,有框标记的为 F49 和 Y297 氨基酸残基。

```
MNVLFTSVPQEDVPFYQEALKDLSLKIYTTDVSK
VPENELKKAELISV[FVYDKLTEELL SKMPRLKLI
HT[RSV]GFDHIDL DYCKKKGILVTHIPAV[SPESVAE
HTFAMILTLVKRLKRIEDRVKKLNFSQDSEILARE
LNRLTLGVI[GTGRIGSRVAMYGLAFGMKVLVCYD
VVKREDLKEKGCVYTSLELLGLKESDVISLHVPY
TKETHHMINERISLM[KDGVYLINTA[RGKVVD
DALYRAYQRGKFSGLGLDVFED[EILILKKYTEG
KATDKNLKILELACKDNV[HTP[IAVYTDKSLERI
REETVKVVKAFVKGDLEQIKGNFVVGPS.
```

依赖 NAD⁺ 的 310~350 氨基酸的 D-LDH 保守性强,对细菌域或古生菌域下列编号 O66939 _AQUAE、ACN66627.1、ZP _07078106.1、YP _003924957.1、LDHD_LACDA、YP_602533.1、C5NVX3_9BACL、CAP75895.1、A6CV08 _9VIBR、B8K866 _VIBPA、A5FIM6_FLAJ1、C6VSR8_DYAFD、C6XUN9_PEDHD、A3XG39 _LEEBM、D0KWU7 _HALNC、F4ARC5 _9ALTE、A6VZR1 _MARMS、A8UL50 _9FLAO、F3A4W1_9BACL、D3SNV8_THEAH、E8T245 _THEA1、C0QUD1_PERMH、C4FHV5_9AQUI、B2V7N6 _SULSY、C1DWX6 _SULAA、B4U8R3 _HYDS0、D1CAH7 _SPHTD、MSDRAGGTAGCOGGJ9 _9FIRM、A1W7V5_ACISJ、Q11BH0_MESSB、B4VSX6_9CYAN、B2KDH0_ELUMP 的蛋白质氨基酸序列比对,发现有 20 个保守氨基酸。以 O66939_AQUAE 的氨基酸序列为基准, R71、G74、P94、Y96、G147、G149、I151、G152、D170、D196、H201、P203、K221、N228、R231、G232、D256、E261、V289 和 H294 为保守氨基酸,与酶活性中心有关的 5 个氨基酸残基中有 4 个是保守氨基酸,它们是 G74、Y96、R231 和 H294, V73 不是保守氨基酸,但 71 位的 R71 是保守氨基酸。在 147~157 位的辅酶 NADH 的结合域有典型的 GXGXXG 结构,其中 G147、G149、G152 均是保守氨基酸。

297 位是一个次保守氨基酸,不是苯丙氨酸就是酪氨酸,两个氨基酸都含有一个苯基,苯基是向催化中心突出的,占据催化中心空间位置,在对丙酮酸或乳酸小分子底物进行催化时,不产生影响。但在对

苯丙酮酸或苯乳酸进行催化时将产生阻碍作用。这个苯基类似 Razeto A 等^[17]在对保加利亚乳酸杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 的 D-乳酸脱氢酶 (D-LDHb) 底物特异性研究中叙述到 299 位苯丙氨酸的苯基,它对丙酮酸的碳-3 (C-3) 上带有分支的底物产生阻碍作用,而在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 的 D-3-磷酸甘油脱氢酶 (D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, PGDH) 中 Phe299 被甘氨酸 (glycine, Gly, G) 替代,由于 Gly 没有苯基,酶活性中心的空间增大。考虑到 *A.aeolicus* 的 D-LDH 的 297 位是一个酪氨酸,它苯基上的羟基是一个亲水基团,所以用具有亲水基团的丝氨酸替代酪氨酸,即 Y297S。

分析发现,与 *A.aeolicus* D-LDH 的 49 位对应的氨基酸虽不属于保守氨基酸,但在比对的生物中,绝大多数是苯丙氨酸或酪氨酸,残基上的苯基伸向活性中心,有可能对大分子底物造成影响。在比对的微生物中只有链球菌和奈瑟氏球菌对应位置是丙氨酸 (alanine, ala, A),由于苯丙氨酸是一个疏水氨基酸,所以用 Ala 替代它,即 F49A。

为了使活性中心的空间变得更大,分别用 Ala 替代 Phe, Ser 替代 Tyr 形成双突变酶,即 F49A/Y297S,希望苯丙酮酸或苯乳酸与酶结合中心更有效的契合,酶的活力能够提高。

2.2 蛋白质三维结构分析

3KB6 的三维模型见图 1A,它反映野生型 D-乳酸脱氢酶催化中心带有 Phe49、Try297 残基及酶活性中心氨基酸残基与底物的关系及底物与各残基之间的距离。苯基与乳酸 C-3 碳原子的距离不到 5 Å,不利于苯丙酮酸这类在 C-3 上有芳香基团的大分子底物进出酶活性中心。图 1B 是 D-乳酸脱氢酶活性中心的局部三维结构,中心的一侧有 49 位的 Phe,另一侧有 297 位的 Tyr,它们的苯基都伸向中心,干扰大分子底物进入疏水口袋,在疏水口袋中是底物乳酸分子。图 1C、1D 和 1G 是 3KB6 突变体的活性中心局部三维结构,1C 表示 F49A/Y297S 双突变,疏水口袋中底物结合区域空间很大,但可能对底物的催化产生影响。1D 是 Y297S 单突变,底物结合区域的空间有所增加, F49 对底物形成的疏水作用力仍然保持。1G 是 F49A 单突变,底物结合区域的空间有明显的增加,但 F49 对底物形成的疏水作用也消失。在疏水口袋里的催化中心有辅酶 NAD⁺,在活性氨基酸残基中, His294 是酶活性中心最重要的残基,发挥酸碱催化作用。

2.3 突变体三维结构

突变后丙氨酸 (A) 替代苯丙氨酸 (F),丝氨酸 (S) 替代酪氨酸 (Y) 形成的模型,见图 2。图 2A 为 *A.aeolicus* D-LDH 野生型同源建模三维结构局部的疏水口袋;图 2B 为 F49A 突变体三维结构,49 位氨基酸残基上的苯基距底物 C-3 的距离不到 5 Å,而一个苯基的长度超过 6 Å,所以与底物的特异性有密切关系;图 2C 为 Y297S 突变体三维结构,Stoll 等^[18]报道在乳酸杆菌 299 位的苯丙氨酸上的苯基决定底物

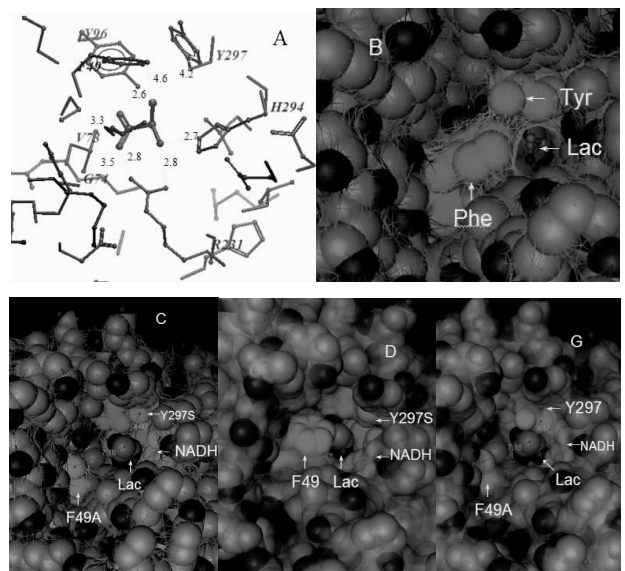


图1 嗜热细菌 D-乳酸脱氢酶活性氨基酸残基与底物之间的距离、分布和突变体三维构象

Fig.1 The active site of X-ray structure of D-LDH from *Aquifex aeolicus*, the map and the distance between substrate and active amino acid residue, mutants 3D

注:A D-LDH 活性中心活性氨基酸残基与底物的距离及分布;
B. D-LDH 活性中心三维结构;C. F49A/Y297S 双突变;
D. Y297S 单突变三维结构;G. F49A 单突变三维结构。

丙酮酸羰基 (C-3) 上的疏水基团的长度和大小,与底物的特异性有关;图 2D 为 F49A/Y297S 双突变三维结构,由于没有苯基,催化中心的空间得到拓展,使苯丙酮酸羰基上有疏水基团的底物能更有效的与催化中心契合。但 Daff S 等^[5]在研究啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Flavocytochrome b2 时发现, A189G/L230G 双突变体酶丧失催化活性,这是由于 A189G/L230G 双突变体酶的催化中心空间过大,破坏了酶的完整性,所以酶催化中心的完整性对维持酶的催化功能很重要。

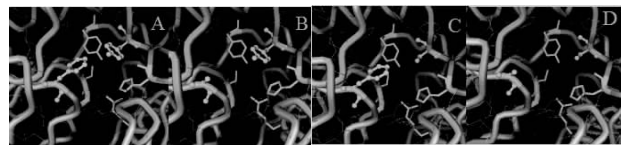


图2 嗜热细菌 D-乳酸脱氢酶同源建模三维构象
Fig.2 Homologous modeling structure of the active site of D-LDH from *Aquifex aeolicus*

注:A. 未突变酶催化中心局部;B. F49A 突变;
C. Y297S 突变;D. F49A/Y297A 双突变。

2.4 突变体发酵实验

2.4.1 IPTG 诱导发酵 突变体菌株 IPTG 诱导静置发酵 24h 后用 HPLC 测定发酵上清液中的苯乳酸含量,未突变的 D-LDH (A.a. D-LDH 株) 247mg/L, Y297S 单突变 (A.a. D-LDH-Y297S 株) 257mg/L, F49A 单突变 (A.a. D-LDH-F49A 株) 301mg/L 和双突变 F49A/Y297A (A.a. D-LDH-FY/AS 株) 243mg/L, 详见图 3。静置发酵 72h 后,苯乳酸产量有所提高,

F49A 单突变的产量最高,达到 400mg/L。

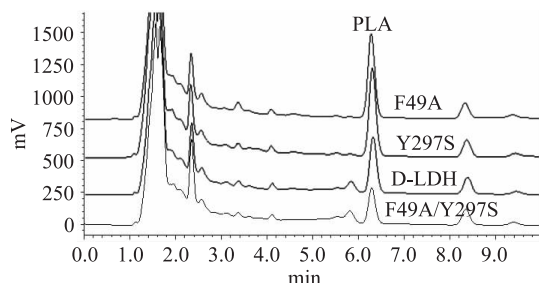


图3 IPTG 诱导发酵结果(HPLC)

Fig.3 HPLC of the fermentation Supernatant of IPTG induction

2.4.2 乳糖诱导发酵 乳糖终浓度的量在 2~12g/L 时对 F49A 单突变的诱导效果无明显差异,苯乳酸产量在 220~240mg/L 之间,乳糖终浓度的量超过 12g/L 后,苯乳酸的产量显著下降。静置发酵的产量比摇振(180r/min)发酵的高。用终浓度 8g/L 的乳糖诱导 3 个突变体和未突变的 D-LDH(A.a.D-LDH 株)发酵,静置发酵 24h,苯乳酸产量为 D-LDH 164mg/L, Y297S 单突变 1179mg/L, 双突变 F49A/Y297A 186mg/L, F49A 单突变 392mg/L, 详细结果见图 4。

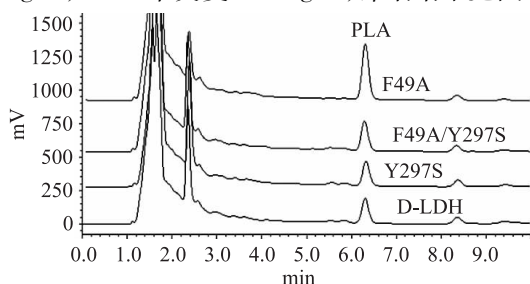


图4 乳糖诱导发酵结果(HPLC)

Fig.4 HPLC of the fermentation Supernatant of lactose induction

三个突变体和未突变的大肠杆菌工程菌在添加苯丙酮酸钠前体物质时,在 IPTG 诱导下都能发酵产生苯乳酸,其中 F49A 单突变的效果最好,延长发酵时间可以提高苯乳酸的产量。乳糖诱导发酵时,乳糖终浓度的量在 2~12g/L 之间,对 F49A 单突变菌株的产量差异不大,但终浓度超过 12g/L 后,苯乳酸产量反而下降,可能是由于乳糖过多,抑制苯乳酸的合成。摇振培养干扰苯乳酸的合成,这是由于乳酸脱氢酶是在厌氧条件下合成乳酸的。未突变的 D-LDH 大肠杆菌工程菌株在乳糖诱导时,苯乳酸合成能力最低,只有 164mg/L, F49A 单突变菌株的效果最好,说明该位点的氨基酸突变,对底物的特异性产生了一定影响。F49A/Y297S 双突变菌株仍然能合成苯乳酸,说明双突变后形成的空隙并没有完全破坏酶的完整性,但苯乳酸的量也没有显著提高,其原因有待进一步探讨。

3 结论

在构建工程菌时,可通过生物信息学的方法对待突变的蛋白质氨基酸序列进行生物信息学综合分析,充分分享现代高科技成果和网络资源,利用现代免费自动化平台对目标蛋白同源建模,可视化详细

分析建模的相关蛋白三维结构,筛选最佳的突变体进行定点突变,并验证创造性思维。

参考文献

- [1] Hummel W, Schütte H, Kula MR. Large scale production of D-lactate dehydrogenase for the stereospecific reduction of pyruvate and phenylpyruvate [J]. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1983, 18: 75-85.
- [2] Dunn CR, Wilks HM, Halsall DJ, et al. Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1991, 332 (1263): 177-184.
- [3] El Hawrani AS, Sessions RB, Moreton KM, et al. Guided evolution of enzymes with new substrate specificities [J]. *Mol Biol*, 1996, 264(1): 97-110.
- [4] Wilks HM, Moreton KM, Halsall DJ, et al. Design of a specific phenyllactate dehydrogenase by peptide loop exchange on the *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase framework [J]. *Biochemistry*, 1992, 34: 7802-7806.
- [5] Daff S, Manson F D, Reid G A, et al. Strategic manipulation of the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b2 [J]. *Biochem J*, 1994, 301: 829-834.
- [6] Sinclair R, Reid G A, Chapman S K. Re-design of *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b2; introduction of L-mandelate dehydrogenase activity [J]. *Biochem J*, 1998, 333: 117-120.
- [7] Mowat CG, Wehenkel A, Green AJ, et al. Altered substrate specificity in flavocytochrome b2; structural insights into the mechanism of L-lactate dehydrogenation [J]. *Biochemistry*, 2004, (29): 9519-9526.
- [8] Antonyuk S V, Strange R W, Ellis M J, et al. Structure of D-lactate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus* complexed with NAD⁺ and lactic acid (or pyruvate) [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2009, 65(12): 1209-1213.
- [9] Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, et al. CPHmodels-3.0-Remote homology modeling using structure guided sequence profiles [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38: 10.1093/nar/gkq535.
- [10] O Lund, M Nielsen, C Lundegaard, et al. CPH models 2.0: X3M a computer program to extract 3D models [C]. Abstract at the CASP5 conference A102, 2002.
- [11] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [12] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 3381-3385.
- [13] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
- [14] 贾江花, 沐万孟, 张涛, 等. 重组 L-乳酸脱氢酶在大肠杆菌中的表达、纯化及活性研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35 (下转第 181 页)

1375mmol/L、搅拌速度 650r/min 条件下进行 *G. oxydans* 转化实验,每次转化反应结束(当溶氧开始急速上升时),离心收集细胞进行下一轮催化反应。根据图 6 显示,反应在前 3 批中均显示很好的重复性,催化活性能保持在上一批 95% 以上,但是在进行到第 4 批时,由于静息细胞长时间暴露在高渗透环境以及较高机械剪切的情况下,导致细胞破裂加剧,离心得到的细胞仅为第三批的 80% 左右,反应体系气泡异常严重影响溶氧,细胞的催化活性开始显著下降,因此目前反应有效批次为 3 批,2-KGA 时空产率达到 67.5~74.0mmol/L/h。

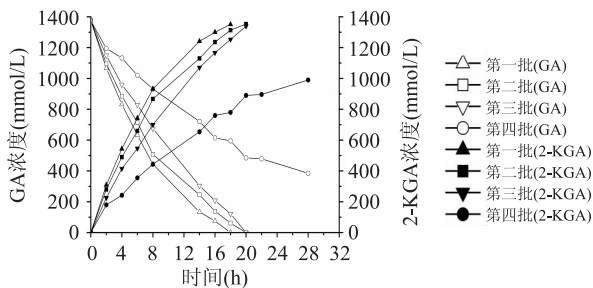


图 6 7L 发酵罐上静息细胞催化

GA 合成 2-KGA 的批次研究

Fig.6 The repeated utilization of resting cells to produce 2-KGA from GA in 7L fermentor

3 结论

本实验已筛选得到的一株高产 2-KGA 的菌株 *G. oxydans* #3A,建立了静息细胞催化法合成 2-KGA 的工艺路线。在 30℃, pH5.0, 细胞浓度 20g/L, 底物浓度 1365mmol/L 条件下,底物转化率在 97% 以上,2-KGA 时空产率高达 74mmol/L/h,细胞能够有效重复利用 3 次。这一路线是 2-KGA 的生物合成中发酵法之外的另一条高浓度合成 2-KGA 的高效工艺路线,而且可以一定意义上解决目前发酵法中存在的主要问题:a.噬菌体污染问题没有从根本上得到解决;b.发酵体系中含有各种复杂的细胞分泌物,大大增加了下游产品分离、纯化与结晶的工艺。

参考文献

- [1] Sievers M, Swings J. The family acetobacteraceae. In: berger's manual of systematic bacteriology 2nd edition [M]. Springer, 2005:41-95.
- [2] 魏国栋,魏东芝,林金萍.氧化葡萄糖酸杆菌立体选择催化 2-甲基-1,3-丙二醇合成(R)-β-羟基异丁酸[J].食品与发酵工业,2010,36(8):12-16.
- [3] 郑大贵,叶红德,余泗莲,等.由 2-酮基-D-葡萄糖酸直接合成异 V_C 的研究[J].食品工业科技,2004,25(7):115-117.

(上接第 176 页)

(5):116-119.

- [15] 李兴峰,江波,潘蓓蓓,等.苯丙氨酸及苯丙酮酸对 *Lactobacillus* sp.SK007 合成苯乳酸的影响[J].过程工程学报,2007,7(6):1202-1206.
- [16] 沐万孟,周宏敏,刘凤丽,等.苯乳酸的快速检测研究[J].食品与发酵工业,2008,34(11):139-142.
- [17] Razeto A, Kochhar S, Hottinger H, et al. Domain closure,

- [4] Asakura A, Hoshino T, Kiyasu T. Manufacture of L-ascorbic acid and D-erythorbic acid [P]. United States Patent: 616860, 2000.
- [5] Hall A N, Kulka D, Walker T K. Formation of arabinose, ribulose and tartronic acid from 2-keto-D-gluconic acid [J]. Biochemical Journal, 1995, 60(2):271-274.
- [6] Dyer J R, Mcgonigal W E, Rice K C. Streptomycin II I streptose [J]. Journal of the American Chemical Society, 1965, 87(3):654-655.
- [7] Wolfrom M L, Shafizadeh F, Wehrmuller J D. Synthesis of amino compounds in the sugar series by phenylhydrazone reduction [J]. Journal of Organic Chemistry, 1958, 23(4):571-575.
- [8] William S, Verona N J. 2, 3: 4, 5 - Di - O - substituted gluconates [P]. United States Patent: 3981860, 1976.
- [9] Chia M, Van N T, Choi W J. DO-stat fed-batch production of 2-keto-D-gluconic acid from cassava using immobilized *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(5):759-765.
- [10] Elseviers M, Coomans S M J, Lemmens H O J, et al. Process for the production of 2-keto-D-gluconic acid [P]. European Patent: 0867446, 2004.
- [11] Neidleman S L, Amon J W F, Geigert J, et al. Production of 2-ketogluconic acid and hydrogen peroxide [P]. European Patent: 160112, 1982.
- [12] 孙文敬,陈丽,任蓓蓓,等.荧光假单胞菌 AR4 在 2-酮基-D-葡萄糖酸工业生产中的应用研究[J].食品科学,2006,27(11):105-108.
- [13] 余泗莲,孙文敬,周强,等.2-酮基-D-葡萄糖酸连续发酵工艺 [P]. 中国专利:101363033, 2009.
- [14] Toyama H, Furuya N, Saichana I, et al. Membrane-Bound, 2-Keto-D-gluconate-Yielding D-gluconate dehydrogenase from "gluconobacter dioxoacetonicus" IF03271: molecular properties and gene disruption [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20):6551-6556.
- [15] Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, et al. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans* characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the profile [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(1):92-98.
- [16] Saeki A, Theeragool G, Matsushita K, et al. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures [J]. Bioscience Biotechnology Biochemical, 1997, 61(1):138-145.
- [17] Ano Y, Shinagawa E, Adachi O, et al. Selective, high conversion of D-glucose to 5-keto-D-gluconate by *Gluconobacter suboxydans* [J]. Bioscience Biotechnology Biochemical, 2011, 75(3):586-589.

substrate specificity and catalysis of d-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 318:109-119.

- [18] Stoll VS, Kimber MS, Pai EF. Insights into substrate binding by D-2-ketoacid dehydrogenases from the structure of *Lactobacillus pentosus* D-lactate dehydrogenase [J]. Structure, 1996, 4:437-447.