



微生物苯丙氨酸解氨酶(PAL)/肉桂酸途径 生物转化制 L-苯丙氨酸酶源菌种选育*

杨 敏 杨顺楷**

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

关键词 菌种选育; 苯丙氨酸解氨酶(PAL); 肉桂酸生物转化

中图法分类号 TQ920.1 TQ922

BREEDING OF MICROBIAL STRAINS CONTAINING PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE (PAL) FOR THE BIOCONVERSION OF TRANS-CINNAMIC ACID INTO L-PHENYLALANINE

YANG Min & YANG Shunkai**

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) has great values in industrial and potential medical applications, especially in the production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid. Strain breeding is important for the development and applications of this bioprocess. In this article, mutiple ways for breeding of microbial strains containing PAL were reviewed in details, including direction screening, enrichment culture technique for isolating strains from nature sources, phsical and chemical mutagenesis for strain improvement, PAL molecular clone and genetic engineering, etc. The significance of protoplast techniques for breeding of *Rhodotorula* strains containing PAL was analysed and discussed.

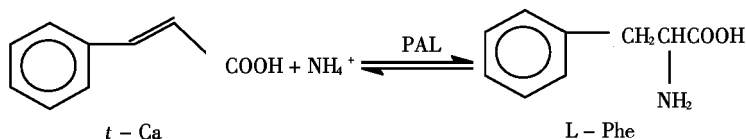
Keywords strain breeding; L-phenylalanine ammonia-lyase(PAL); trans-cinnamic acid biotransformation

L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)是生化营养的必需氨基酸之一,作为临床医药用氨基酸输液、食品、饲料添加剂的必需成份和一些抗癌药物苯丙氨酸氮芥、甲酰溶肉瘤素等合成的中间体而得到广泛应用.自1965年天冬甜肽(Aspartame, APM, 阿斯巴甜)发现并开发生产以来,这一新型甜味剂日渐风行,导致对高光学纯度L-Phe这一主要构成原料需求量激增,人们纷纷开展L-Phe的研制生产.在众多生物合成途径中,肉桂酸酶法转化生产L-Phe的研究开发因其原料易得价廉,倍受国内外的许多公司和研究单位重视^[1].而菌种选育是工业微生物生产的关键和核心,可以说,没有工业微生物育种,就没有微生物工业的发展.苯丙氨酸解氨酶转化肉桂酸合成L-苯丙氨酸途径的工业化,就在于不断开展酶源菌种选育.本文详细介绍了国内外在这方面的研究近况,这有助于推动其它微生物转化工业菌种选育工作.

1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)/肉桂酸转化途径研究历史沿革

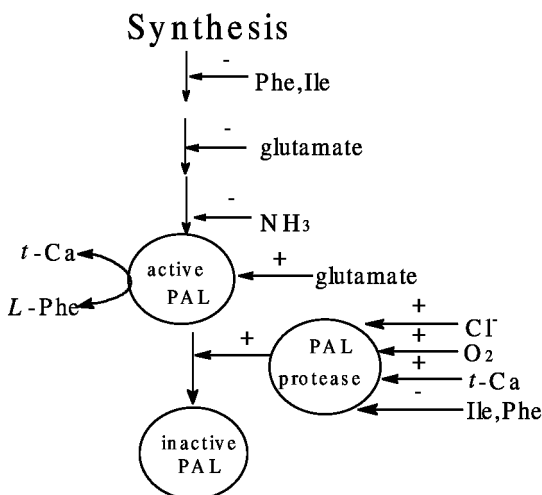
肉桂酸(trans-Cinnamic acid, t-Ca)氨化合成L-Phe的关键酶是苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase,

PAL, EC.4.3.1.5)。1961 年 Koukol 等^[2]从高等植物中发现 PAL。Ogata 等^[3,4]在研究芳香族氨基酸微生物代谢时发现红酵母属(*Rhodotorula*)中的某些种能以 *L*-Phe 为唯一碳、氮源生长而在培养液中积累 *t*-Ca, 首次报道在酵母中发现 PAL, 该酶催化 *L*-Phe 代谢的第一步反应, 在该代谢途径中起重要调控作用。随后该酶相继在其它微生物中发现, 主要为丝状真菌、酵母, 代表性种属有: 红酵母(*Rhodotorula*), 红冬孢酵母(*Rhodospirium*), 掷孢酵母(*Sporobolomyces*), 内孢霉(*Endomyces*), 枝孢菌(*Cladosporium*), 地霉菌(*Geotrium*), 其中最具商业性价值的菌株来源于红酵母属。原核生物仅存在于 *Streptomyces verticillatus* 中^[5], 动物中尚未发现 PAL。此后很多学者相继研究了其酶学性质。Havir 等^[6]首次(1968)研究了 PAL 的解氨机理, 指出该酶具有逆向催化合成 *L*-Phe 特性:



PAL 是诱导性酶, *L*-Phe 或 *L*-Tyr(酪氨酸)或某些结构类似物可诱导其从头合成^[7], 细胞中含量较低, 稳定性差, PAL 活性达到峰值后发生迅速失活现象^[5,8,9], 红酵母内 PAL 的调节^[10]如右图:

早期已知 PAL 逆向反应性, 但有关 *t*-Ca 转化合成 *L*-Phe 的实际应用却少有报道。1976 年和 1977 年美国、英国专利开始报道使用微生物 PAL 进行 *t*-Ca 酶法转化合成 *L*-Phe, 但是转化率小于 5%, *L*-Phe 终浓度小于 2.5 mg/mL。这可能归因于微生物中 PAL 这一诱导酶活性相对较低; 发酵过程中 PAL 活性达到峰值后迅速衰减; 由于平衡常数有利于 *L*-Phe 分解产生 *t*-Ca, 反应过程中高浓度 *t*-Ca 引起的强烈底物抑制, 以及为提高 *t*-Ca 转化率采用的高氨浓度高 pH 也导致 PAL 活性速减, 无法再利用。1981 年 Yamada 等^[11]详细报道具高 PAL 活性菌株 *Rh. glutinis* IFO 0559 转化 *t*-Ca 生产 *L*-Phe 的发酵及反应条件, 包括 PAL 的诱导及稳定性, 酶催化的最适条件, 添加异亮氨酸使酶活相对稳定, *L*-Phe 转化累积



量达 18 g/L, 并首次将转化率提高到 70%, 为实用研究提供了可能性。这以后, 国内外注重高活性、高稳定性的 PAL 酶源微生物的筛选及改良、反应条件优化、细胞或酶的固定化以及生产工艺的改进。到 1985 年前后美国的两家公司即 Genex 和 Synthetech, 德国的 Degussa, 日本的田边制药公司等相继将此途径实现工业化, 产量以 kt/a 级计^[1]。该工艺日益成熟, 是目前商业化制备 *L*-Phe 的重要工艺路线之一。*t*-Ca 转化合成 *L*-Phe 的开发成功, 菌种选育工作起了重要的作用, 这也是一个需连续不断努力的积成性工作过程。

2 微生物 PAL 酶源菌种的筛选

PAL 酶源菌种的筛选, 可大致划分为直接筛选法与天然源采样富集分离筛选法。

2.1 直接筛选法

这种方法基本上是根据文献报道列出最可能符合筛选条件的种属, 尽可能地搜集菌株, 通过 PAL 活性检测分析筛选出符合要求的菌株。这是一种既直接又方便的方法。尽管由这种方法获得的菌株往往活性不高, 但有利于研究初期建立实验模型; 另外, 通过对获得的菌株进行理化诱变等遗传操作也可能获得理想的可供生产的菌株。这对于提高酶源微生物筛选工作效率, 克服一般微生物随机筛选法费时费力效率低的缺点, 仍不失为一种可行的有用的方法学, 国内外对于 PAL 酶源的直接筛选都有报道^[11,12~18]。

Kupletskaya 等^[17]对 417 株产色素酵母和 112 株丝状真菌的直接筛选发现, 从产色素酵母中所选取的 *Phaffia* 属 11 株, *Bullera*, *Cystofilobasidium*, *Tilleliopsis* 三属 45 株不具有 PAL 活性, 从而否定了 Ogata 等^[4]认为

PAL与色素合成有关的观点,进一步证实 PAL在红色素合成中不起作用,而具其它次级代谢功能,与 Gilbert等^[7]和 Evans等^[19]的结果一致.Kupletskaya等还发现,许多能活跃地分解 *L*-Phe 成为 t-Ca 的丝状真菌并不能逆向反应由肉桂酸合成苯丙氨酸.这提示,鉴于实际有用的是 PAL 逆反应的活性,在菌种筛选过程中,通过检测反应条件下 *L*-Phe 的生成更具有直接意义.从搜集的红酵母菌株中获得合成最高量 *L*-Phe 的是橙黄红酵母(*Rh. aurantiaca*)Ka1-1,产品质量浓度(ρ)达 18 g/L,丝状真菌中的芽枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)1699 合成 *L*-Phe 的 ρ 值达 14 g/L,这充分说明了直接筛选法的有效性.

工业上多采用的红酵母属菌株存在 PAL 耐受 t-Ca 能力低,而且不能添加高浓度肉桂酸的缺点.Onishi等^[14]筛选到能耐受高浓度 t-Ca(270 mmol/L)的 *Endomyces lindneri* AJ-6611,经反应条件优化, ρ (*L*-Phe)高达 32 g/L,转化率 71%,但是该菌生长缓慢.此外 Yokozeki 等^[12]也报道获得了耐受高浓度 t-Ca 的菌种.

一直困扰人们的难题是 PAL 活性的迅速衰减.有关酶在反应介质体系中的活性稳定工作研究相对较多,而直接筛选高稳定性菌株的工作较少,仅 1986 年欧洲专利^[13]报道了重复使用两次而酶活基本保持不变的 PAL 活性稳定菌株的筛选工作.但这一工作却非常有意义:可以通过二至多轮反应检测菌株 PAL 催化的稳定性及再利用能力,从而预测菌株是否具有连续催化反应潜力(这是批式反应所无法进行的),而高稳定性菌株的获得是 t-Ca 转化中应高度重视的一个问题.

2.2 天然源富集分离筛选法

重组 DNA 技术的诞生使生物技术进入一个崭新的时期,然而它的出现并不能满足人们在生物技术领域内的全部需求.市场销售的大多数生物技术产品仍来源于与微生物分离和筛选相关的传统方法.而且天然源分离的微生物也是基因材料的最终来源^[20].因此人们再次强调从天然源分离筛选符合人们期望追求的优良菌株,而微生物的多样性,为微生物工业菌种筛选创造了条件.

富集培养技术(Enrichment culture technique)最先由 Winogradsky 和 Beijerinck 发展起来的,通过改变环境条件中的某些因素(如碳源、氮源、温度、气压、盐度、光、pH 等)或加入某些选择性抑制剂确保所需某种特定微生物在其生存环境中能以较其他微生物的绝对优势生长起来,达到富集的作用,增大挑选的机率.在筛选具有生物技术用途的微生物方面,该技术有了很大发展,出现了许多简单、经济、快速而特异性强的检测方法^[21].

从天然源采样、用富集培养技术分离具有 PAL 活性微生物菌株的报道始见于 1987 年^[22],以后 Kupletskaya 等^[17],以及中国科学院成都生物研究所^[23]开展了这方面的工作.具体的程序可归纳为:

天然样品的采集 → PAL 酶源微生物的富集培养 → PAL 酶源微生物的检出 → PAL 酶活测定 → 筛选高 PAL 活性菌株

富集培养技术中最关键的是选择培养基,可以用特殊化合物作为唯一碳源来筛选具有利用或降解这种化合物能力的微生物,或用抑制剂来阻断特异的生化途径和用 pH 的调节剂等^[21].在 PAL 酶源菌的富集筛选中,Evans 等^[22]采用的 3 种培养基,分别以 t-Ca、*L*-Phe 或 *L*-Tyr 作为碳源.他们发现,以 *L*-Phe 作为唯一碳、氮源,对于 PAL 选择并不是很有效的方法,许多微生物可通过脱氨或转氨的方式而经由非 PAL 反应机制利用 *L*-Phe; *L*-Phe 选择培养基上菌落的大小既不能显示 PAL 的活性高低,也不能显示其存在与否. PAL 菌株最大分离频率在 *L*-Tyr 选择培养基中观察到,认为由于 PAL 对 *L*-Tyr 这一结构类似物的低亲和力,导致菌株提高 PAL 酶活以弥补 *L*-Tyr 的高 K_m 值,相信其它低亲和力的结构类似物也可用于高水平 PAL 菌株的筛选.获得的高活性菌株 SP10 鉴定为 *Rh. rubra*,经参数优化评估,具有实用价值和优良生产性能.Kupletskaya^[17]采用类似的筛选程序,使阳性率由 33% 提高到 65% ~ 70%,其中分离到的 *Rh. glutinis* 9/1 可使 ρ (*L*-Phe)达 13 g/L.中国科学院成都生物研究所^[23]利用类似技术,从滇西某芒果园的土壤样品中,分离选育获得高产菌株红酵母 *Rh. sp.* CIBAS A 1401,率先在国内中试成功, ρ (*L*-Phe)可稳定在 30 g/L, $\rho_{\max}$ (*L*-Phe)可达 40 g/L,已有厂家正式投产,充分证实从天然源富集分离的有效性.如能立足于我国特殊代表性生境,广泛搜集土壤、树叶、花、果实等样品,进一步开展 PAL 酶源微生物资源生态分布多样性研究,这不仅有很重要的理论意义,而且具有从中获得可供生产应用的优良菌株材料的应用价值.

3 微生物 PAL 酶源菌种的改良

通过筛选获得的菌株品质往往不尽如人意,因此有必要在已获得的优良菌种基础上,对其进行连续不断

的改良,以便不断地向工业界提供优良菌种,提高产品的市场竞争力。

3.1 理化诱变育种

诱变育种具有方法简便、工作速度快和收效显著等特点,仍是目前最广泛使用的有效育种手段。下面从文献报道的育种策略和方法介绍有关 PAL 酶源菌种诱变改良。

3.1.1 高 PAL 活性菌株 直接筛选高 PAL 活性菌株是见效较快的一种策略。除了诱变后的随机筛选,人们更结合对 PAL 诱导产生、反应机理及理化性质的研究,采用生化遗传学原理,利用底物、产物结构类似物进行理性化选育,获得极大成功。

Evans 等^[19]采用紫外诱变技术,以 *L*-Tyr,对氟-*DL*-苯丙氨酸(PFP)和 β -2-噻吩-*DL*-丙氨酸等弱作用结构类似物进行筛选,高频率获得高 PAL 活性突变体,这类突变体在这些结构类似物抑制浓度下也能很好生长,是由于高水平 PAL 的合成弥补了类似物的高 K_m 值。少数突变体能稳定遗传,其中 FP10M6 的 PAL 活性(指 *L*-Phe 降解生成 t-Ca)五倍于亲本,而 *L*-Phe 产物浓度由小于 10 g/L 增加到 18 g/L。

Omdorff 等^[24]进行了甲基磺酸乙酯(Ethyl methane sulphonate, EMS)诱变处理,筛选出抗苯丙炔酸(Phenylpropionic acid, PPA)高产菌株 GX6000,其 PAL 产率五倍于野生型菌株,该菌株的几个其它生理优势使其具有重大应用价值,包括 PAL 半寿期延长 3~5 倍;PAL 比活提高 6 倍;菌株在 30℃ 以上合成抑制作用减小;而 PAL 的诱导调控减弱, *L*-Leu 与 *L*-Phe 可以协同诱导;表现出在发酵过程中及生物反应器中稳定性较佳。

这两篇报道 PAL 酶活测定都是以 *L*-Phe 降解生成 t-Ca 的速率来指示大小。Evans 指出,通过高 PAL 的活性导致的 *L*-Phe 快速降解,筛选出的高活力菌株不一定会导致快速逆向催化和高转化率。的确,这是无疑的。*L*-Phe 合成中,反应平衡常数, t-Ca 底物抑制,极端操作条件如高 pH 和 NH_4^+ 水平等因子与 *L*-Phe 为底物的高 PAL 活性无直接相关性。以此类推, PAL 催化的稳定性和再利用能力在突变体 PAL 活力检测中不可预测,高活力突变株连续催化反应的潜力也无法预测。因此,直接检测逆向合成能力更具有直接的实际意义。

中科院成都生物所^[23]分别采用酪氨酸,邻氯肉桂酸,间-羟基-肉桂酸以及 *DL*-苯丙氨酸作诱变后选择培养基,开展了类似的选育工作,获得可供中试的一批优良菌株。

3.1.2 高 PAL 稳定性菌株 目前人们对 PAL 稳定性研究着重于采用通氮气、变温培养、去除氯离子、加入还原剂、多元醇等稳定剂、细胞或酶固定化等措施,改善发酵、反应条件^[10,25~29]。已有菌株选育工作中也只是将 PAL 稳定性作为考察性状之一,而从菌株遗传性状背景上解决 PAL 稳定性的研究几乎没有涉及,尚未形成选育策略。但是,随着人们对 PAL 稳定性机理研究的深入,有可能提出合适的实验模型开展相关的工作,以获得稳定性大大提高的 PAL 酶源菌种。

3.1.3 抗代谢阻遏突变株 早在 1982 年, Gilbert 等^[7]研究发现,葡萄糖代谢阻遏抑制 PAL 的合成,这使得必须将细胞从培养基中分离转移至无代谢阻遏物培养基中或使细胞生长直至营养物质基本耗尽的情况下才能进行 PAL 的诱导合成。而产生和分离抗代谢阻遏产 PAL 菌株,可使 PAL 生产大大简化或方便。美国 1987 年专利(NO.4598047)^[30]将诱变后突变株涂布于含有 2-脱氧葡萄糖(2-Deoxyglucose, 2-DG)和 *L*-Phe 的基本培养基上进行抗代谢阻遏菌株的选育。2-DG 是葡萄糖的结构类似物,与葡萄糖一样,阻遏 PAL 合成,却不能被微生物用作培养物。在 2-DG 存在下能利用 *L*-Phe 的菌株很可能是具有抗葡萄糖效应的产 PAL 优良菌株,通过不加糖与加糖时 PAL 合成量的比值,显示突变株的代谢阻遏抗性,其中能稳定遗传的 *Rh. rubra* GX 5902,该比值由亲本的 3.7 下降到 1.3。

3.1.4 组成型突变株 微生物 PAL 是诱导酶,只有在诱导物启动下从头合成,受到高度的遗传性调控,目前生产上需使用诱导物,这无疑会增加总成本。美国 1987 年专利(NO.4681850)^[31]开展了 PAL 组成型突变株选育工作,对于诱变后产生的大样本量的突变株,他们利用免疫学检测手段,在非诱导培养基上用放射性或酶标 PAL 抗体技术等方法,检测 PAL 组成型突变体。这种组成型突变株一方面可以减少诱导 PAL 活性使用的诱导剂用量,降低大规模生产成本,另一方面也使菌株能在加入葡萄糖作碳源的生理条件下生长培养,显著提高生物量,收获较多的活性细胞作为催化剂使用。

尽管 Evans 等^[19]和 Omdorff 等^[24]都未检测出组成型突变株,相信通过诱变,尤其是调节基因 R 和操纵基因 O 的变异,可以使诱导型改变成组成型。在实践中可以通过不同方法选择组成型突变体^[32]。

3.1.5 代谢途径调控缺陷回复突变株 Kane等^[33]进行了苯丙氨酸代谢途径调控缺陷突变株的分离和性能研究.他们将自发突变的 *Rh. glutinis* 涂布于含有 25 $\mu\text{g/mL}$ 对氟-DL-苯丙氨酸(PFP)的基本培养基平板上,意外地获得一类可以积累 L-Phe,能使 *Bacillus subtilis* Phe⁻ 生长,而其本身是能以 L-Phe 为氮源而不能以 L-Phe 为碳源生长的突变株,研究较多的是 FP1.他们认为,PFP对亲株的抑制作用是由于 PAL 的降解形成真正抑制剂一对-氟-肉桂酸,而菌株 FP1 对 PFP 的抗性是由于其调控基因发生突变导致 PAL 的可诱导性丧失.将 FP1 的自发突变株涂于含有 0.2% L-Phe 的基本培养基上又获得了恢复 PAL 可诱导活性的抑制基因突变的回复突变株,其中 FP1a 的 PAL 活性有所提高.这一代谢调控分子机理研究可用于菌种选育,该策略与营养缺陷型回复突变筛选抗阻遏反馈进行高产金霉素菌株选育类似,后者已获得成功^[34].

3.1.6 耐热 PAL 突变株 Evans等^[19]筛得在 37℃ 能较好生长的突变株,与野生株比较,它们的 PAL 活性在 30℃ 或 37℃ 都有提高.在较高温度下生长良好且酶活性提高的菌株有利于生物化工生产.

以上总结了六种类型的突变型菌种选育.相信随着研究的不断深入,必将有更多更新的选育策略应用于 PAL 及其它酶源菌种改良.

3.2 微生物 PAL 的分子克隆研究

PAL 的活性中心包含有脱氢丙氨酸残基,可能在催化中起着重要作用,Hanson等^[35]认为该残基是作为辅基的一部分于转译后添加上去的.这不同寻常的辅基可能导致该酶在异源细胞中难于表达.但是有关 PAL 分子克隆的工作时有报道,过去十多年来国外已取得了很大进展.

1985 年,Gilbert等^[36]报道了来源于红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)PAL 基因在 *E. coli* K-12 中的分子克隆.分析表明,PAL 基因约为 2.7 kb,为一单拷贝单顺反子,但未报道 PAL 基因的表达及相应 PAL 的活性高低.

1992 年,Ørum等^[37]将 *Rhodospiridium toruloides* 完整的 PAL 基因插入 *E. coli* 表达载体 pKK 223-3 形成 pPAL12,该质粒在 *E. coli* JM 101 和 *E. coli* SG 1611 (JM101 的 Lon 蛋白酶缺乏衍生菌株)中可以合成与预计大小相似的蛋白质,具有一种类似 PAL 的活性.令人失望的是,这种重组 PAL 的诱导活性大约为 3~5 mU (milliunits),与野生型的 150~200 mU 相比有很大的差距.1994 年 Faulkner等^[38]构建了一种酵母启动子嵌合体 (pPGK::PEP2),可在 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *E. coli* 中指导 PAL 基因高水平表达,积累的 PAL 分别占细胞内可溶性总蛋白的 9% 和 10%,可诱导 PAL 表达水平约为 Ørum 等报道的重组 PAL 的 100 倍.他们的工作表明,尽管不同寻常的脱氢丙氨酸辅基的存在,PAL 仍可通过分子克隆在宿主细胞中获得表达,他们推测 PAL 催化剂活性中心脱氢丙氨酸辅基的形成不是由于化学修饰,而是由于合成 PAL 本身的自我催化.这一结论无疑将有力地推动微生物 PAL 分子克隆的研究.而 1995 年 Schuster等^[39]运用定点突变 (Site-directed mutagenesis) 技术,获得脱氢丙氨酸前体丝氨酸-202 变为丙氨酸和苏氨酸的两种突变体,研究脱氢丙氨酸辅基在 PAL 反应机制中的作用.今后,在弄清 PAL 结构与功能的基础上,设计出 PAL 基因改造方案,通过定点突变对 PAL 进行选择遗传修饰,有可能在 PAL 高活性水平特别是高稳定性育种中获得突破.而高水平高稳定性 PAL 的获得,将进一步推动 PAL 本身的研究,PAL 也将在工业界和临床医学上得到广泛应用.

3.3 原生质体融合法在 PAL 酶源菌种选育中的前景

工业 PAL 酶主要来自红酵母,其有性生殖阶段尚未完全了解,无法进行常规杂交育种,而 70 年代发展起来的微生物原生质体融合技术可能为红酵母及其它 PAL 酶源菌种选育提供新的途径.该法已广泛用于动植物细胞、真菌、细菌、放线菌的育种,并已有许多成功的例子.1996 年,Kavanagh等^[40]撰文综述了原生质体融合在非传统酵母中的应用,指出这一方法不仅可以构建具有利用新型原材料能力,乙醇产量增加的菌株,而且为氨基酸或酶产量增加提供了可能性.

在众多的酵母中,研究较多的是酿酒酵母,而红酵母细胞壁的结构组成与它有较大的差异:它含有大量的葡甘露聚糖,约占细胞壁骨架结构的 50%,而酿酒酵母主要为葡聚糖和甘露聚糖;红酵母氨基葡萄糖含量高,约为 6%;半乳糖和墨角藻糖与甘露糖形成的 Fucogalactomanna 约占细胞壁的 20%;估计外层有一层蛋白质分子对细胞壁结构起重要作用^[41-43].由于这些特殊性,可能导致红酵母原生质体制备难度较大,有关红酵母属原生质体融合育种报道较少.不过,1990 年 Elinov等^[44]通过深红酵母原生质体融合种内杂交获得提高多糖产

量菌株,1991 年 Sudenko 等^[45]完成了深红酵母与双倒卵形红冬孢酵母属间原生质体融合,获得提高类胡萝卜素产量的菌株.说明红酵母原生质体融合育种还是可行的.而 1993 年德国的 Kaul 等^[46]报道了深红酵母及其它三种酵母原生质体制备所需的细胞壁裂解活性酶源微生物的筛选工作.据此推测,随着红酵母实用价值和范围(生产脂类、类胡萝卜素、异丁烯以及包括 PAL 在内的多种生物转化酶)的拓展,红酵母原生质体技术(包括融合、诱变、转化等)将日益受到重视,结合 PAL 酶源菌种选育,开展红酵母原生质体技术育种具有应用基础工作的重要性.

4 前景与展望

微生物 PAL 具有重要的工业和临床医学价值:(1)可用于治疗实验鼠的某些肿瘤^[8].(2)可进行血清 *L*-Phe 的定量酶法分析^[47].(3)可用于苯丙酮尿症的诊断和治疗^[48~50].(4)可利用 PAL 对 *t*-Ca 结构类似物的不对称氨化作用,合成非天然的芳香氨基酸结构类似物^[51~55].这些非天然氨基酸不仅可用于活性肽的结构改造及其它药物合成而极具价值^[56],也为表征微生物 PAL 结构及活性关系提供了基础资料,在开发酶催化非天然底物转化方面具有酶促分子催化作用基础研究方面的重要性.(5)目前 PAL 最大的用途在于工业化生产二肽甜味剂 APM 的主要原材料——*L*-Phe.该工艺日益成熟,已获得较大成功,并将进一步发展,推动 APM 的生产.(6)最近印度学者^[29,57]报道了另一新思路:PAL 用于合成 APM 制备中更为直接的原料 *L*-苯丙氨酸甲酯(*L*-PheMe).该工艺利用 *Rh. glutinis* NCYC 61 的 PAL,双相介质体系克服底物反式肉桂酸甲酯(*t*-CaMe)在水中的低溶解性,4mMMgSO₄ 和 10% 甘油对 PAL 的显著稳定作用,使 9 轮生产的 *L*-PheMe 总产量达 92 g/L.由于 *t*-CaMe 与 *t*-Ca 价格基本相当,而 *L*-PheMe 价格几乎为 *L*-Phe 的五倍,这使得该工艺极具吸引力,相信今后将日益受到高度重视.

高活性高稳定 PAL 酶源优良菌种的选育工作的不断改进是前述 PAL 价值得到体现的关键.传统的诱变/筛选育种方法仍然是工业界仰赖的必不可少的手段,而理性化育种、重组 DNA 技术、细胞融合等新技术、新方法的运用使菌种选育由随机走向定向,并大为拓展了微生物资源利用的范围.可以预计,随着今后研究工作的不断开展和深入,将会有更新的育种程序用于 PAL 及其它酶源菌种改良,在微生物工业产品的研究开发中有着巨大的潜力和光辉前景.

参考文献

- 1 Klauser A. Building for success in phenylalanine. *Biotechnology*. 1985,3:301 ~ 307
- 2 Koukol J, Eric EC. Metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem*. 1961,236:2692 ~ 2698
- 3 Ogata K, Uchiyama K, Yamada H. Microbial formation of cinnamic acid from phenylalanine. *Agr Biol Chem*. 1966,30(3):311 ~ 312
- 4 Ogata K, Uchiyama K, Yamada H. Metabolism of aromatic amino acids in microorganisms. I. Formation of cinnamic acid from phenylalanine. *Agr Biol Chem*. 1967,31(2):200 ~ 206
- 5 Bezanson GS, Desaty D, Emes AV, Vining LC. Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. *Can J Microbiol*. 1970,16(3):147 ~ 151
- 6 Havir EA, Hanson KK. *L*-phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. *Biochemistry*. 1968,7(5):1904 ~ 1914
- 7 Gilbert HJ, Tully M. Synthesis and degradation of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodotorula toruloides*. *J Bacteriol*. 1982,150(2):498 ~ 505
- 8 Fritz RR, Hodgins DS, Abell CW. Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *J Biol Chem*. 1976,251(15):4646 ~ 4650
- 9 Kalghati KK, Krishna K, Rao PVS. Regulation of *L*-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhizoctonia solani*. *J Bacteriol*. 1976,126(2):568 ~ 578
- 10 Evans CT, Conard D, Hanna K, Peterson W, Choma C, Misawa M. Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to *L*-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1987,25(5):399 ~ 405

- 11 Yamada S, Nabe K, Izuo N, Nakamichi K, Chibata I. Production of *L*-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing *L*-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Appl Environ Microbiol*. 1981,**42**(5):773 ~ 778
- 12 Yokozeki K, Onishi N, Kano H, Hirose Y. *L*-phenylalanine and microorganisms for its production. *European Patent Application*. 1985, **152**:235
- 13 Kamata A, Mikawa T, Imada Y. Microbiological preparation of *L*-phenylalanine. *European Patent Application*. 1986,**167**:411
- 14 Onishi N, Yokozeki K, Hirose Y, Kubota K. Enzymic production of *L*-phenylalanine from trans-cinnamic acid by *Endomyces lindneri*. *Agri Biol Chem*. 1987,**51**(1):291 ~ 292
- 15 Tang Y(唐轶), Chen Q(陈琦). Production of *L*-phenylalanine from trans-cinnamic acid with yeast cell. *Microbiology*(微生物学通报). 1989,**16**(6):328 ~ 331
- 16 Yang SK(杨顺楷), Zhao JS(赵健身), Li GL(李果龙). Investigation of the biotransformation of trans cinnamic acid to *L*-phenylalanine by using yeast cells. *Nat Prod R & D*(天然产物研究与开发). 1990,**2**(1):1 ~ 7
- 17 Kupletskaya MB, Dol'nikova GA. Phenylalanine ammonia-lyase activity in pigmented yeasts and mycelial fungi. *Prikl Biokhim Mikrobiol*(Russ.). 1992,**28**(1):50 ~ 54(CA 1992,117:66206)
- 18 You YC(由英才), Xing WG(邢文革), Wang BS(王朴森), Wang ST(王寿亭), He BL(何炳林). Screening of yeast strains containing high phenylalanine ammonia-lyase activity. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*(南开大学学报(自然科学)). 1993,**4**:18 ~ 20
- 19 Evans CT, Payne C, Conard D, Hanna K, Misawa M. Isolation of various hyperactive mutants of phenylalanine ammonia-lyase containing yeasts. *Can J Microbiol*. 1987,**33**(7):636 ~ 641
- 20 Labeda DP. Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. New York: McGraw Hill Publishing Company. 1990
- 21 Steele DB, Stowers MD. Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu Rev Microbiol*. 1991,**45**:89 ~ 106
- 22 Evans CT, Hanna K, Conrad D, Peterson W, Misawa M. Production of *L*-phenylalanine ammonia-lyase (PAL): isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of *L*-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1987,**25**(5):406 ~ 414
- 23 黄炜. 从天然源分离具有苯丙氨酸解氨酶活性的酵母及菌种选育(中国科学院成都生物研究所硕士论文). 1994
- 24 Orndorff SA, Costantine N, Stewart D, Durham DR. Strain improvement of *Rhodotorula graminis* for production of a novel *L*-phenylalanine ammonia-lyase. *Appl Environ Microbiol*. 1988,**54**(4):996 ~ 1002
- 25 Kishore GM. Stabilization of *D*-phenylalanine ammonia-lyase enzyme. *US Patent*. 1985,4562151
- 26 Vollmer PJ, Schrufer JJ. Stabilization of phenylalanine ammonia-lyase in a bioreactor using reducing agents. *US Patent*. 1986,4574117
- 27 Swann WE. *L*-phenylalanine production by reuse of phenylalanine ammonia-lyase. *UK Patent Application*. 1984,2127821
- 28 Evans CT, Choma C, Peterson W, Misawa M. Bioconversion of trans-cinnamic acid to *L*-phenylalanine in an immobilized whole cell reactor. *Biotechnol Bioeng*. 1987,**30**(9):1067 ~ 1072
- 29 D'Cunha GB, Vduvatha SP, Madhusudanan N. Stabilization of phenylalanine ammonia lyase containing *Rhodotorula glutinis* cells for the continuous synthesis of *L*-phenylalanine methyl ester. *Enzyme Microb Technol*. 1996,**19**:421 ~ 427
- 30 McGuire JC. Phenylalanine ammonia lyase-producing microbial cells. *US Patent*. 1986,4598047
- 31 McGuire JC. Phenylalanine ammonia lyase-producing microbial cells. *US Patent*. 1987,4681850
- 32 罗鹏. 遗传学应用. 北京:高等教育出版社. 1996,266
- 33 Kane JF, Fiske MJ. Regulation of phenylalanine ammonia lyase in *Rhodotorula glutinis*. *J Bacteriol*. 1985,**161**(3):963 ~ 966
- 34 丁友颀, 陈宁. 普通微生物遗传学. 天津:南开大学出版社. 1990,318
- 35 Hanson KR, Havir EA. *L*-phenylalanine ammonia-lyase.IV. Evidence that the prosthetic group contains a dehydroalanyl residue and mechanism of action. *Arch Biochem Biophys*. 1970,**141**:1 ~ 17
- 36 Gilbert HJ, Clarke IN, Gibson RK, Stephenson JR, Tully M. Molecular cloning of the phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodotorula toruloides* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 1985,**161**(1):314 ~ 320
- 37 ørum H, Rasmussen OF. Expression in *E. coli* of the gene encoding phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992,**36**(6):745 ~ 748
- 38 Faulkner JDB, Anson JG, Tuite MF, Minton NP. High-level expression of the phenylalanine ammonia-lyase-encoding gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* using a bifunctional expression system. *Gene*. 1994,**143**(1):13 ~ 20

- 39 Schuster B, Retey J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase; the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995,**92**(18):8433 ~ 8437
- 40 Kavanagh K, Whittaker PA. Application of protoplast fusion to the nonconventional yeast. *Enzyme Microb Technol*. 1996,**18**(1):45 ~ 51
- 41 Arai M, Murao S. Studies on red yeast cell walls. Part III. Red yeast cell lysis by red yeast cell lytic enzyme and protease. *Agric Biol Chem*. 1978,**42**(8):1461 ~ 1467
- 42 Arai M, Murao S. Studies on red yeast cell walls. Part IV. Characterization of oligosaccharides from an enzymatic hydrolyzate of red yeast cell walls by lytic enzyme. *Agric Biol Chem*. 1978,**42**(9):1651 ~ 1659
- 43 Lee TH, Arai M, Murao S. Localization of glucomannan and fucogalactomannan in *Rhodotorula glutinis* cell wall and spheroplast formation of its living cell. *Agric Biol Chem*. 1981,**45**(10):2343 ~ 2345
- 44 Elinov NP, Pronina MI, Karadzova ZS, Sapunkova TY, Kletsko LI, Mokrousov IV, Pajuodis V, Avizienis V, Valancius P. Intraspecific hybridization of *Rhodotorula rubra* (Demme, Lodder) by protoplast fusion. *Mikrobiologiya* (Russ.) 1990,**59**(5):806 ~ 811 (CA 1991, 114:39061t)
- 45 Sudenko VI. Hybridization of pigmented yeast resistant to separate growth inhibitors. *Mikrobiol Zh* (Russ). 1991,**53**(4):23 ~ 26 (CA 1991, 115:275562y)
- 46 Kaul W, Rossow U, Emeis CC. Screening for microorganisms with cell wall lytic activity to produce protoplast-forming enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1993,**39**(4 ~ 5):574 ~ 576
- 47 Watanabe SK, Hernandez-Velazco G, Iturbe-Chinas F, Lopez-Manguia A. Phenylalanine ammonia lyase from *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodospiridium toruloides*: application for phenylalanine and tyrosine deamination. *World J Microbiol Biotechnol*. 1992,**8**(4):406 ~ 410
- 48 Ambrus CM, Ambrus JL, Horvath C, Pederson H, Sharma S, Kant C, Mirand E, Guthrie R, Paul T. Phenylalanine depletion for the management of phenylketonuria; use of enzyme reactors with immobilized enzymes. *Science*. 1978,**201**:837 ~ 839
- 49 Hoskins JA, Jack G, Wade HE, Peiris RJD, Wright EC, Starr DJT, Stern J. Enzymic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *Lancet*. 1980,**23**:392 ~ 394
- 50 Inoue S, Matsunaga Y, Iwane H, Sotomura M, Nose T. Entrapment of phenylalanine ammonia-lyase in silk fibroin for protection from proteolytic attack. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986,**141**:165 ~ 170
- 51 Zhao JS(赵健身), Yang SK(杨顺楷), Jiang YZ(蒋耀忠). The asymmetric amination of trans-cinnamic acid analogs via enzyme. *Chin J Org Chem* (有机化学). 1993,**13**(5):486 ~ 489
- 52 Zhao JS, Yang SK. Red yeast catalyzed amination of olefinic bonds and synthesis of optically pure S-amino acids. *Chin J Chem*. 1993, **13**(3):241 ~ 245
- 53 Zhao JS(赵健身), Zhu L(朱立), Yang SK(杨顺楷). A new chemoenzymatic route for the stereocontrolled synthesis of optically pure 3-(2-pyridyl) alanine. *Acta Pharm Sinica* (药学报). 1994,**29**(7):558 ~ 560
- 54 Zhao JS(赵健身), Yang SK(杨顺楷). A new asymmetric synthesis of L- α -amino acid via microbial transformation. *Acta Chimica Sinica* (化学学报). 1997,**55**(2):196 ~ 201
- 55 Renard G, Guilleux JC, Bore C, Malta-Valette V, Lerner DA. Synthesis of L-phenylalanine analogs by *Rhodotorula glutinis*. Bioconversion of cinnamic acids derivatives. *Biotechnol Lett*. 1992,**14**(8):673 ~ 678
- 56 惠永正, 陈耀全. 化学与生命科学. 北京: 化学工业出版社. 1992, 38 ~ 82
- 57 D' Cunha GB, Vduvatha SP, Madhusudan N. Novel direct synthesis of L-phenylalanine methyl ester by using *Rhodotorula glutinis* PAL in an organic-aqueous biphasic system. *Enzyme Microb Technol*. 1994,**16**:318 ~ 322