

嘌呤核苷磷酸化酶不同表达方式对 发酵利巴韦林的影响

刘莉, 李燕军, 谢希贤, 陈宁

(天津科技大学生物工程学院, 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室,
代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津 300457)

摘要: 嘌呤核苷磷酸化酶 (PNPase, 由 *pupG* 基因编码) 是合成利巴韦林的关键酶, 本研究考察该酶的质粒过表达和基因组整合表达对鸟苷生产菌解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) TA208 发酵生产利巴韦林的影响。以 *B. amyloliquefaciens* TA208 为出发菌株, 分别利用基因过表达和无标记整合技术, 成功构建了 *B. amyloliquefaciens* TA2081 和 TA2082。通过实时定量 PCR 测定这 3 株菌 *pupG* 基因的转录水平, 结果表明与 *B. amyloliquefaciens* TA208 相比, TA2081 和 TA2082 的转录水平均有提高, 但 TA2081 提高的更为显著; 通过测定 PNPase 活性发现, *B. amyloliquefaciens* TA2081 和 TA2082 的 PNPase 活力分别为出发菌株 TA208 的 2 倍和 1.30 倍。7.5 L 分批补料发酵实验表明, 与出发菌 *B. amyloliquefaciens* TA208 相比, 工程菌 TA2081 鸟苷到利巴韦林的摩尔转化率从 20.41% 提高到 98.63%, TA2082 的转化率从 20.41% 提高到 40.95%。综上所述, 增加 *pupG* 的表达量能提高利巴韦林的产量, 本研究为利巴韦林生产菌的代谢工程改造提供了理论依据和技术指导。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 利巴韦林; 嘌呤核苷磷酸化酶; 质粒过表达; 基因组整合表达

文章编号: 1673-9078(2015)12-63-68

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.010

Effect of Different Expression Approaches of Purine Nucleoside Phosphorylase on Ribavirin Accumulation

LIU Li, LI Yan-jun, XIE Xi-xian, CHEN Ning

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology,

Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, National and Local United Engineering Lab of
Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Purine nucleoside phosphorylase (PNPase, encoded by *pupG*) is the key enzyme in the synthesis of ribavirin. The effects of *pupG* overexpression and integrative expression was investigated, on ribavirin production in *Bacillus amyloliquefaciens* TA208. The overexpression and integrative expression procedures resulted in the successful construction of *B. amyloliquefaciens* TA2081 and TA2082 strains. Real-time polymerase chain reaction results showed that the transcriptional levels of *pupG* of TA2081 and TA2082 increased significantly, but the increment of TA2081 was more obvious. PNPase activity of TA2081 and TA2082 was approximately 2- and 1.30-fold compared to that of the original strain TA208, respectively. Finally, in the 7.5 L fed-batch fermentations, the molar yields of ribavirin from guanosine, by *B. amyloliquefaciens* TA2081 and TA2082 were 98.63% and 40.95%, respectively, whereas that of TA208 was 20.41%. In summary, the improvement of *pupG* expression via either plasmid-borne or chromosomal integration approach increased ribavirin production. The results of this study would be useful for development of more efficient ribavirin producers via metabolic engineering.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; ribavirin; purine nucleoside phosphorylase; plasmid overexpression; integrative expression

收稿日期: 2015-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100054); 天津市教委项目 (20140603)

作者简介: 刘莉 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 主要从事核苷生产菌定向改造及发酵过程优化的研究

通讯作者: 陈宁 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 主要从事代谢控制发酵的研究

利巴韦林 (Ribavirin) 是一种高效广谱的核苷类抗病毒药物, 被应用于治疗多种病毒感染如小铁腺病毒肺炎、病毒性肝炎、呼吸道合胞病毒感染等^[1]。目前, 利巴韦林的生产方式主要有化学合成法、酶法和发酵法^[2-4]。化学合成法是目前工业中采用的方法, 但该方法对环境污染严重, 并不是最理想的生产方式。酶法首先利用微生物表达嘌呤核苷磷酸化酶, 将酶纯化

或利用菌体细胞作为酶原催化嘌呤核苷生成核糖-1-磷酸，再与前体物 1,2,4-三氮唑-3-羧甲酰胺 (1,2,4-triazole-3-carboxamide, TCA) 反应合成利巴韦林 (反应式如图 1) [3]。由于使用核苷和 TCA 双底物为原料，成本高，酶法合成利巴韦林不适合大规模生产。1976 年 Ochiai 等首次提出发酵法，该法利用核苷生产菌自身产生前体物鸟苷和表达嘌呤核苷磷酸化酶，只向培养基中添加 TCA，即可实现利巴韦林的合成 [4]。由于菌株自身的嘌呤核苷磷酸化酶活性低，利巴韦林产量仅有 0.28 g/L。然而，发酵法较其他两种方法的优势在于，避免了核苷的分离和纯化过程，具有原料成本低、污染少，工业化潜力强的优点。

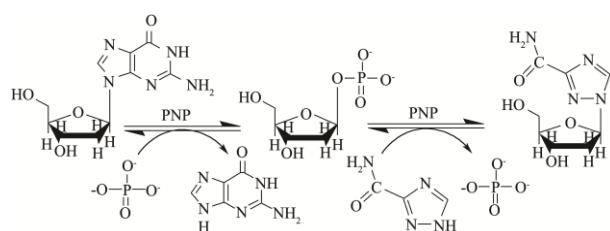


图 1 酶法合成利巴韦林步骤

Fig.1 Ribavirin synthesis catalyzed by PNPase

不同嘌呤核苷磷酸化酶在氨基酸序列和底物特

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype	Source
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , φ80d/lacZΔ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Lab stock
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Lab stock
<i>B. subtilis</i> WB600	<i>trpC2</i> , <i>nprE</i> , <i>nprB</i> , <i>apr</i> , <i>epr</i> , <i>mpr</i> , <i>bpr</i> , Em ^f	Lab stock
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208	Ade ⁻ , 8AG ^f , MSO ^f , overproducing guanosine	Lab stock
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA2081	<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208 containing plasmid pWB980- <i>pupG</i>	This study
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA2082	<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208 Δ <i>nprE</i> : :PP (PP fragment containing P43 promoter, <i>sacB</i> , <i>pupG</i>)	This study
pWB980	<i>Ori Bacillus</i> , Km ^r , Ble ^f , P43 promoter, <i>sacB</i> signal peptide, 3.8 kb	Lab stock
pWB980- <i>pupG</i>	pWB980 containing <i>pupG</i> fragment	This study
pKS1	Temperature-sensitive plasmid vector, 5.1 kb, Em ^r , Km ^r	Lab stock
pKSN	pKS1 containing Δ <i>nprE</i> fragment	This study
pKSNPP	pKSN containing PP fragment	This study

1.2 引物

表 2 为本研究使用的引物，均由 Primer Premier 5.0 软件设计。

1.3 主要试剂和仪器

电穿孔仪，Eppendorf 公司；实时定量 PCR 仪，ABI 公司；高效液相色谱 Agilent 1200，美国安捷伦；

异性上存在很大差异。如枯草芽孢杆菌中嘌呤核苷磷酸化酶以两种形式存在，分别为 *pupG* 基因表达的低分子量同源三聚体和 *deoD* 基因表达的高分子量同源六聚体 [5]。本实验室前期对比研究了多种来源的 PNPase，结果表明，*pupG* 表达的 PNPase 对底物鸟苷的转化率最高，可以达到 87.62% [6]。*Bacillus amyloliquefaciens* TA208 是本实验室通过多级诱变得到的具有多种缺陷型的鸟苷生产菌 [7]。*B. amyloliquefaciens* TA208 自身 *pupG* 基因的表达量不高，不能完全利用其产生的前体物鸟苷，导致利巴韦林的产量低。因此，增加 PNPase 的表达量可能是提高利巴韦林产量的有效手段。本研究克隆了来源于 *B. subtilis* 168 的 *pupG* 基因，通过质粒 pWB980 过表达和无标记基因组定点整合两种方式来提高 PNPase 在 *B. amyloliquefaciens* TA208 中的表达量。

1 材料与方法

3.2 主要菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

7.5 L BioFlo 115 自动控制发酵罐，美国 NBS 公司。限制性内切酶，Fermentas 公司；Solution I 连接酶，大连宝生物工程有限公司；TransStart FastPfu DNA Polymerase，北京全式金生物技术有限公司；质粒快速提取试剂盒，北京博迈德生物技术有限公司；PCR 产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒，北京天恩泽基因科技有限公司；蛋白胨、酵母粉为 Oxoid 公司产品；1,2,4-三氮唑-3-甲酰胺 (1,2,4-triazole-3-carboxamide, TCA)

为本实验室自制；山梨醇、甘露醇购于天津博美科生物技术有限公司；其余试剂均为国产分析纯产品。

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Description
P1-S	GAGAGGATCCCAAGGACAGAATTGAACGC	<i>pupG</i> (<i>Xho</i> I)
P1-A	TGCACTGCAGCATATTTATTCGTAAGGCG	<i>pupG</i> (<i>Pst</i> I)
P2-S	AGATAAGCTTAGAATGCGAGATTGCTGGTT	<i>nprE</i> upstream homologous arm (<i>Hind</i> III)
P2-A	TGAGTCGACATTACGATGTAGGGCCCTTAGAAA CGGCTTCAGGTGAT	<i>nprE</i> upstream homologous arm (<i>Apa</i> I)
P3-S	CCCTACATCGTAATGTCGACTTCTTCTGAAAGCGGCAAAT	<i>nprE</i> downstream homologous arm (<i>Kpn</i> I)
P3-A	CGATGGTACCTAAAAGTTGATGACGGAGTGAGG	<i>nprE</i> downstream homologous arm (<i>Sal</i> I)
P4-S	ACGTGGGCCCAAAGGTGGAGATTTTTTGAGTGA	PP fragment (<i>Apa</i> I)
P4-A	TCGAGTTCGACTTCGTTCTTTTTTACCTCTCG	PP fragment (<i>Sal</i> I)
DL-S	TATGAAGGCTACTCAATGGAGAAAAG	<i>pupG</i> (RT-qPCR)
DL-A	GGGTTTGTCCATAAAGTTGATA	<i>pupG</i> (RT-qPCR)

1.4 培养基

(1) 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 豆饼水解液 20, 酵母粉 10, 玉米浆 30, NaCl 2.5, MgSO₄·7H₂O 1, KH₂PO₄ 1, 味精 5, pH 7.0。

(2) 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 80, 酵母粉 18, 豆饼水解液 42, 玉米浆 23, (NH₄)₂SO₄ 15, MgSO₄·7H₂O 8, K₂HPO₄ 2.5, 味精 15, MnSO₄ 0.006, FeSO₄ 0.012, 无水 CaCl₂ 2.5, D-葡萄糖酸钠 2, pH 7.0。

1.5 感受态的制备及转化方法

解淀粉芽胞杆菌和枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备和转化方法参见文献^[8], 具体转化操作如下: 将构建成功的质粒电转入枯草芽孢杆菌株 WB600 进行 DNA 的修饰, 筛选得到阳性转化子, 提取、纯化质粒后进行解淀粉芽胞杆菌的电转操作。其他分子生物学操作参见精编分子生物学实验指南^[9]。

1.6 实时定量 PCR 分析

将解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) TA208、TA2081 和 TA2082 三株菌接于 5 mL 摇管培养至对数期, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 利用反转录试剂盒获得 cDNA, 并以之为模版、以 *B. amyloliquefaciens* 的 16S rDNA 为参比, 进行实时定量 PCR, 根据 2^{-ΔΔCT} 法计算相关基因的转录水平。

1.7 PNPase 活性检测

粗酶液的制备、蛋白质定量分析和 PNPase 活性

测定参见文献^[10]。

粗酶液的制备: 将菌株在 M9 培养基中 37 °C、200 r/min 过夜培养, 在 4 °C 下以 5500 r/min 离心 10 min 后收集菌体, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.6) 洗涤菌体两次。利用超声破碎仪破碎菌体制得粗酶液。

蛋白浓度检测: 粗酶液中蛋白浓度采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测。

酶活测定: 反应体系为 200 μL, 含 1 mmol/L 肌昔、25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.6) 和适量的粗酶液, 反应液在 37 °C 下保温 3 min, 迅速煮沸终止反应。催化生成的次黄嘌呤采用 HPLC 定量分析。

PNPase 酶活定义: 在上述酶活测定条件下, 1 min 内催化肌昔生成 1 μmol 次黄嘌呤所需要的酶量定义为一个酶活单位 (U)。根据粗酶液蛋白浓度计算 PNPase 比酶活为: 1 g 总蛋白所对应的酶活 (U/g)。

1.8 发酵培养

摇瓶培养: 将 *B. amyloliquefaciens* TA208、TA2081 和 TA2082 菌株经斜面活化后接种于装液量为 30 mL 的种子培养基中 (500 mL 摇瓶), 36 °C 培养 10 h 后以 10% 接种量接种于 30 mL 发酵培养基中 (500 mL 摇瓶), 每组 3 个平行。36 °C 培养, 发酵周期为 60 h, 期间补加葡萄糖。每 12 h 添加 20 g TCA, 共添加 3 次。

7.5 L 发酵罐培养: 将菌株经斜面活化后接种于装液量为 100 mL 的种子培养基中 (1 L 摇瓶), 共 4 瓶。36 °C 培养 10 h 后将种子培养基按 10% 接入 7.5 L 发酵罐中 (装液量为 4 L)。发酵过程中通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0 左右, 培养温度为 36 °C。当培养基中葡萄糖浓度降至 2% 时, 以设定脉冲速度 (5 g/L/h) 将

葡萄糖溶液流加至培养基中,以维持葡萄糖的浓度在2~3%。TCA添加方式同摇瓶培养。

1.9 分析方法

发酵过程中,取适量发酵液稀释后用紫外分光光度计测定600 nm处的吸光度值。取10 mL发酵液,13000 r/min离心10 min,用蒸馏水洗涤菌体3次,置于真空干燥箱中80 °C干燥至恒重,用分析天平称重。葡萄糖浓度采用SBA-40C生物传感仪测定。取适量发酵液离心,用高效液相色谱法测定上清液中的利巴韦林,色谱分离条件:采用离子柱Accurasil C18,以4%乙腈为流动相,流速为1 mL/min,柱温为18.5 °C,检测波长为207 nm;另取适量发酵液煮沸,离心后取上清,用高效液相色谱法测定鸟苷,色谱分离条件:采用离子柱Accurasil C18,以10%乙腈为流动相,流速为1 mL/min,柱温为30 °C,检测波长为254 nm。

1.10 计算方法

菌体生物量以干重(DCW)表示: $1 \text{ OD}_{600 \text{ nm}} = 0.245 \text{ g/L}$ 干菌体

鸟苷到利巴韦林的摩尔转化率(%) = $\frac{\text{产物利巴韦林}(\text{mmol/L})}{\text{产物利巴韦林}(\text{mmol/L}) + \text{剩余鸟苷}(\text{mmol/L})} \times 100\%$

2 结果与讨论

2.1 过表达重组菌的构建

以pWB980质粒为基本骨架,构建过表达质粒pWB980-*pupG*。以*B. subtilis* 168的基因组为模版,用引物P1-S/P1-A扩增*pupG*基因。基因*pupG*和表达载体pWB980分别经限制性内切酶*Xho*I和*Pst*I双酶切,切胶回收目的片段和载体,通过Solution I连接。将构建好的质粒通过电转方式导入*B. amyloliquefaciens* TA208中,获得过表达*pupG*的工程菌*B. amyloliquefaciens* TA2081。

2.2 整合重组菌的构建

以温敏质粒pKS1为基本构架构建整合质粒pKSNPP。以*B. amyloliquefaciens* TA208的基因组为模版,分别用引物P2-S/P2-A和P3-S/P3-A扩增基因*nprE*上下游同源臂。采用重叠PCR的方法扩增重叠片段 Δ *nprE*,使用限制性内切酶*Hind*III和*Kpn*I双酶切 Δ *nprE*和质粒pKS1,二者切胶回收后通过Solution I连接,获得质粒pKSN。再以质粒pWB980-*pupG*为模版,用P4-S/P4-A引物扩增带有强启动子P43及*sacB*信号

肽的*pupG*片段,命名该片段为PP。经限制性内切酶*Sal*I和*Apa*I双酶切片段PP和质粒pKSN,二者切胶回收后通过Solution I连接,构建好整合质粒pKSNPP。

重叠片段中*nprE*基因作为基因组整合的位点,通过双交换的方式将片段PP整合到基因组上,即将带有强启动子P43和*sacB*信号肽的*pupG*插入基因组,最终获得整合工程菌*B. amyloliquefaciens* TA2082。构建步骤如图2所示。

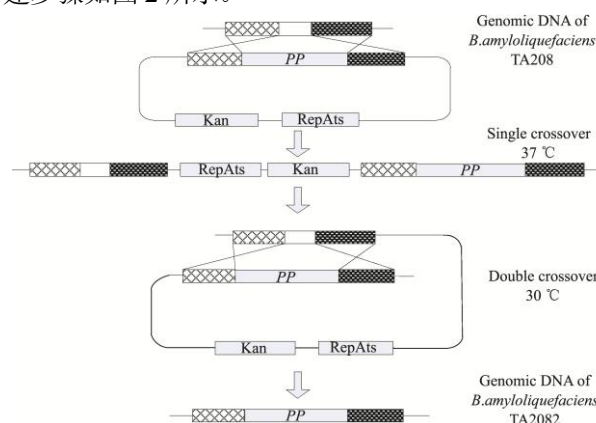


图2 无标记基因整合流程

Fig.2 Marker-less gene integration strategy

2.3 *pupG* 基因的转录分析

嘌呤核苷磷酸化酶 PNPase 对利巴韦林积累起着至关重要的作用,其 mRNA 含量可反映编码基因*pupG*的转录水平。本研究对三株菌的*pupG*转录水平进行了RT-qPCR分析,结果发现,*B. amyloliquefaciens* TA2081的*pupG*转录水平是出发菌TA208的32倍,TA2082的*pupG*转录水平是TA208的4倍。分析结果见表3。

表3 RT-qPCR 检测 *pupG* 基因相对表达水平

Table 3 Reverse transcriptase quantitative PCR analysis of *pupG* gene expression levels during exponential phase

Strains	<i>pupG</i> gene relative expression
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208	1.00 \pm 0.11
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA2081	32.52 \pm 2.34
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA2082	3.87 \pm 0.82

2.4 PNPase 活性分析

PNPase 是发酵法合成利巴韦林的关键限速酶,催化鸟苷或肌苷生成核糖-1-磷酸,核糖-1-磷酸再在该酶的作用下结合底物 TCA 生成利巴韦林,其酶活性的高低直接影响利巴韦林的合成量。酶活性分析(图3)表明过表达*pupG*使工程菌*B. amyloliquefaciens* TA2081的 PNPase 活力达到20.92 U/g,是出发菌株TA208的2倍。刘逸寒等利用质粒pWB980,实现了

在 *B. subtilis* DB403 中高效表达异源中温 α -淀粉酶，酶活达到 770 U/mL^[11]。说明 pWB980 为优秀的异源蛋白表达载体。然而，微生物细胞携带的外源基因表达质粒具有潜在的不稳定性，且抗性筛选标记的残留会影响菌株的安全性和进一步遗传操作。因此，本研究后期利用温敏质粒 pKS1 将带有 P43 启动子和 *sacB* 信号肽的 *pupG* 基因整合到 *B. amyloliquefaciens* TA208 基因组上，增加了 *pupG* 的转录水平，提高了 PNPase 的活力。工程菌 *B. amyloliquefaciens* TA2082 的 PNPase 活力达到 13.43 U/g，仅为出发菌株 TA208 的 1.30 倍，说明表达体系有待进一步优化，来获得更高的 PNPase 表达量。

2.5 利巴韦林发酵

为了研究嘌呤核苷磷酸化酶的不同表达方式（质粒过表达和基因组整合过表达）对利巴韦林积累的影响，本研究进行了利巴韦林摇瓶发酵和 7.5 L 发酵罐分批补料发酵，分别比较了三株菌的生长情况、耗糖速率、利巴韦林积累量以及鸟苷剩余量。表 4 为利巴韦林摇瓶发酵 60 h 后的发酵参数。由结果可知，出发菌 *B. amyloliquefaciens* TA208 利巴韦林产量仅为 1.32

g/L，结合转录和酶活分析发现其原因是 TA208 自身 *pupG* 表达水平低，导致 PNPase 活性低，鸟苷到利巴韦林的摩尔转化率只有 10.54%。与之相比，质粒表达的工程菌 TA2081 利巴韦林产量提高了 7 倍，前体物鸟苷几乎没有剩余，鸟苷到利巴韦林的摩尔转化率达到 99%。工程菌 TA2082 利巴韦林的产量比出发菌株提高了 58.30%，鸟苷仍有大部分剩余，转化率只有 16.30%，说明整合工程菌 PNPase 活力不足以将前体物鸟苷全部转化。

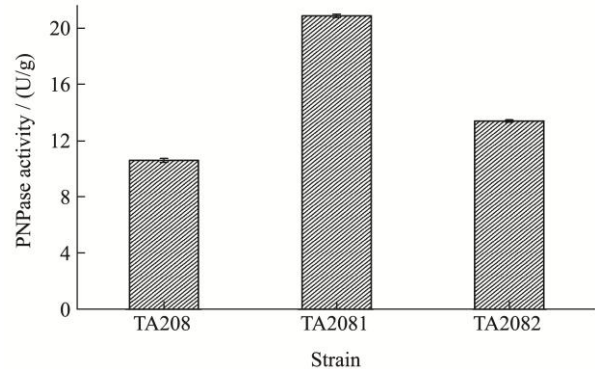


图 3 三株菌的 PNPase 活性比较

Fig.3 Comparison of PNPase activities of three strains

表 4 三株菌的摇瓶发酵参数比较

Table 4 Comparison of parameters of three strains in shake flask fermentation

Strains	DCW/(g/L)	Glucose consumption/(g/L)	C(ribavirin)/(g/L)	C(guanosine)/(g/L)
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208	9.78±0.10	176.00±0.17	1.32±0.39	9.65±0.20
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA2081	11.03±0.14	137.67±0.17	9.20±0.17	0.08±0.25
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA2082	11.29±0.09	178.00±0.10	2.09±0.35	9.19±0.28

7.5 L 发酵罐分批发酵结果表明（图 4），工程菌 *B. amyloliquefaciens* TA2081 生长较出发菌 TA208 缓慢，可能是附加质粒增加了菌体的生长负担，导致其生长受到影响。而在摇瓶发酵中，出发菌 TA208 反而生长慢，可能是由于其 PNPase 活性低，不能完全利用前体物 TCA，TCA 的局部积累对菌体生长造成一定毒害作用；在发酵罐中可能由于搅拌均匀而未表现出该特性。出发菌 TA208 是鸟苷生产菌，发酵 40 h 后鸟苷积累量为 9.07 g/L，由于自身的 PNPase 活力低，鸟苷到利巴韦林的摩尔转化率只有 20.41%。工程菌 TA2081 由于过表达 *pupG* 基因增加了 PNPase 活性，发酵过程中鸟苷几乎全部转化为利巴韦林，转化率高达 98.63%，利巴韦林产量为 11.52 g/L。

枯草芽孢杆菌在表达外源蛋白的同时也会向胞外分泌大量蛋白酶，使外源蛋白无法稳定存在，这也是枯草芽孢杆菌作为宿主菌的瓶颈之一。选择 *B. amyloliquefaciens* TA208 的 *nprE* 基因（编码中性蛋白酶）作为 *pupG* 整合位点，试图同时敲除 *nprE* 来减少

蛋白酶对 PNPase 的降解。有研究报道，*nprE* 基因的敲除不影响枯草芽孢杆菌的生长^[12]。从图 4 可以看出，工程菌 *B. amyloliquefaciens* TA2082 发酵前期生长速率与出发菌 TA208 基本一致，发酵 40 h 后，TA2082 的生长逐渐放缓、生物量趋于稳定，而 TA208 则保持恒定的速率生长，最终获得了较高的生物量。发酵前期工程菌 TA2082 耗糖速率略高于出发菌，发酵中后期二者葡萄糖消耗速率相差不大。由于工程菌 TA2082 在基因组上增加了一个 *pupG* 的拷贝，PNPase 的酶活提高，发酵结束时鸟苷积累量为 6.02 g/L，鸟苷到利巴韦林的摩尔转化率为 40.95%；而与之相比，TA208 在发酵结束时有 9.04 g/L 鸟苷积累，鸟苷转化率只有 20.41%。工程菌 TA2082 利巴韦林产量为 3.60 g/L，比出发菌 TA208 高出 80%。有趣的是，TA208 在发酵 40 h 后利巴韦林的浓度开始下降，推测原因可能是由于 PNPase 活力下降，导致生成的利巴韦林发生逆反应分解为核糖-1-磷酸，而核糖-1-磷酸作为碳源加速了

菌体的生长。

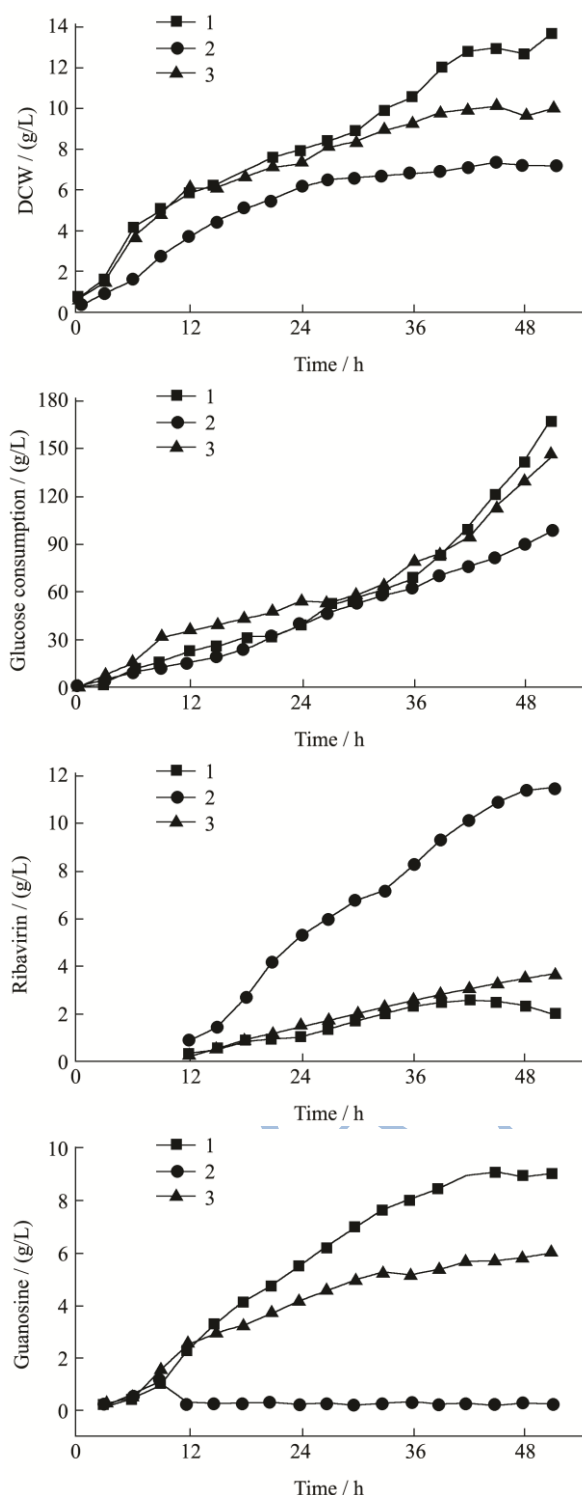


图4 嘌呤核苷磷酸化酶不同表达方式对菌体生长、耗糖、利巴韦林产量和鸟苷积累量的影响

Fig. 4 Effects of different ways of PNPase expression on cell growth, glucose consumption, ribavirin production and guanosine accumulation

注: 1: *B. amyloliquefaciens* TA208; 2: *B. amyloliquefaciens*

TA2081; 3: *B. amyloliquefaciens* TA2082。

3 结论

3.1 枯草芽孢杆菌属是优秀的外源表达系统, 无明显密码子偏爱性, 无致病性, 具有分泌外源蛋白的功能, 并且表达的蛋白多具有生物活性, 纯化方便。本研究中, 利用高效表达载体 pWB980 过表达嘌呤核苷磷酸化酶, 实现了一步法生产利巴韦林。从酶活性上分析, *B. amyloliquefaciens* TA2081 较原菌 PNPase 酶活提高了 2 倍。经 7.5 L 发酵罐优化, 利巴韦林产量较出发菌 *B. amyloliquefaciens* TA208 提高了 5.76 倍, 鸟苷转化为利巴韦林的转化率提高了 78.22%。可见, 利用高拷贝质粒增加 *pupG* 的拷贝数, 进而增加酶的表达量, 能够有效提高利巴韦林的产量。然而, pWB980 这类表达质粒靠滚环方式复制, 复制过程中会产生大量单链 DNA, 使得质粒不稳定, 在无选择压力下很容易丢失; 高拷贝质粒的复制和维持将消耗过多能量, 导致宿主菌生长缓慢^[13]。因此, 工程菌 *B. amyloliquefaciens* TA2081 实际上并不是最适合生产利巴韦林的菌株。

3.2 本研究进一步对工程菌 *B. amyloliquefaciens* TA208 进行改造, 通过无痕基因整合技术构建出 *B. amyloliquefaciens* TA2082, 它较原菌酶活提高了 1.30 倍, 产量提高了 1.80 倍, 鸟苷转化为利巴韦林的转化率提高了 20.54%。然而, *B. amyloliquefaciens* TA2082 较 TA2081 利巴韦林积累低, 鸟苷剩余量高, 说明 *pupG* 基因的拷贝数还是不够的。但是, 将 *pupG* 基因整合到基因组解决了发酵后期质粒不稳定的问题。因此在本研究基础上, 下一步继续将 *pupG* 基因多拷贝整合入宿主菌基因组中, 获得高效稳定的表达, 为实现利巴韦林的发酵法大规模生产奠定基础。

参考文献

- [1] Bausch D G, Hadi C M, Khan S H, et al. Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as postexposure prophylaxis for Lassa fever [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 51(12): 1435-1441
- [2] Crotty S, Maag D, Arnold J J, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen [J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(12): 1375-1379
- [3] 邱蔚然,唐洁宇,高媛,等.由鸟苷经酶法生产利巴韦林[J].中国医药工业杂志,1997,28(1):14-17

QIU Wei-ran, TANG Jie-yu, GAO Yuan, et al. Enzymatic production of ribavirin from guanosine [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 1997, 28(1): 14-17

- [4] Ochiai K, Sato A, Furuya A. Production of virazole by fermentative process [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1976, 50: 423-430
- [5] Jensen K F. Two purine nucleoside phosphorylases in *Bacillus subtilis*. Purification and some properties of the adenosine-specific phosphorylase [J]. Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Enzymology, 1978, 525(2): 346-356
- [6] Xie X, Xia J, He K, et al. Low-molecular-mass purine nucleoside phosphorylase: characterization and application in enzymatic synthesis of nucleoside antiviral drugs [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(6): 1107-1112
- [7] Zhang G, Deng A, Xu Q, et al. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(12): 3142-3143
- [8] Zakataeva N P, Nikitina O V, Gronskiy S V, et al. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 1201-1209
- [9] Frederick M A, Robert E K, Seidman J G, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. Science Press, 2005
- [10] Xie X, Wang G, Xia J, et al. Characterization of a recombinant cold-adapted purine nucleoside phosphorylase and its application in ribavirin bioconversion [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1175-1181
- [11] Liu Y H, Lu F P, Wang J L, et al. High-level expression of the medium-temperature alpha amylase in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2011, 26(4): 1-5
- [12] Wu X C, Lee W, Tran L, et al. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(16): 4952-4958
- [13] O'Hara M B, Hageman J H. Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4161-4170