

文章编号: 1004-0374(2011)09-0912-05

## 发酵生产7-ACA基因工程菌的构建

胡又佳\*, 刘 艳, 朱宝泉

(上海医药工业研究院, 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200437)

**摘要:** 头孢菌素类抗生素是临床用途最广的抗感染药物, 其工业生产的重要中间体 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 采用顶头孢霉发酵产物头孢菌素 C 为前体, 通过化学合成或两步酶法获得。介绍了在了解头孢菌素 C 生物合成的前提下, 在建立了顶头孢霉的遗传改造基础上, 运用合成生物学的知识, 在头孢菌素 C 产生菌顶头孢霉中分别构建了三个头孢菌素 C 酰化酶的表达框架, 通过发酵产物的分析并优选表达框架后, 再采用传统发酵工艺的优化获得了一株可以直接发酵 7-ACA 的高产顶头孢霉工程菌。

**关键词:** 7-ACA; 顶头孢霉; 头孢菌素 C; 合成生物学; 基因工程

**中图分类号:** O621.33; R978.11 **文献标志码:** A

## Construction of an engineering *Acetobacter chrysogenum* for fermentation of 7-ACA

HU You-Jia\*, LIU Yan, ZHU Bao-Quan

(State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

**Abstract:** Cephalosporins antibiotics are the most widely used anti-infectious drugs in clinic. The important intermediate for cephalosporins antibiotics, 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), is produced by semi-chemical synthesis or two-step immobilized enzymatic transformation from cephalosporin C, the metabolites of *Acetobacter chrysogenum*, in industry. We report here that on the basis of understanding the cephalosporin C biosynthesis and establishing the genetic modification of *A. chrysogenum*, three different cephalosporin C acylase expression cassettes were introduced into *A. chrysogenum* upon the advance of synthetic biology. After analysis of the engineering strains metabolites, the best expression cassette was chosen followed by optimization of traditional fermentation process. In conclusion, a high-yield engineering *A. chrysogenum* for direct fermentation of 7-ACA was obtained.

**Key words:** 7-ACA; *Acetobacter chrysogenum*; cephalosporin C; synthetic biology; genetic engineering

### 1 7-ACA的工业生产方式

7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 是生产头孢菌素类抗生素的重要中间体。头孢菌素类抗生素属于  $\beta$ -内酰胺类抗生素, 与同属此类药物的青霉素在母核结构上不同的是, 头孢菌素类抗生素用一个二氢噻嗪环代替了青霉素的噻唑环与  $\beta$ -内酰胺环相连。正是由于这种差异, 使其不易受青霉素酶的破坏, 对许多青霉素耐药菌有效; 不良反应发生率也较青霉素和其他抗菌药物要小。基于这些优点, 头孢菌

素类抗生素已成为临床上广泛使用的重要抗感染药物。

7-ACA 是由顶头孢霉的发酵产物头孢菌素 C (cephalosporin C, CPC) 经过化学半合成或两步酶催化而获得的。传统工艺主要以化学法由头孢菌素 C

收稿日期: 2011-03-15

基金项目: “十二五”重大新药创制项目(2011zx09203-001-06)

\*通信作者: E-mail: hujj@sipi.com.cn

裂解生产<sup>[1]</sup>。由于化学裂解法环境污染大, 原料成本高, 现在大部分厂家采用生物酶催化法进行7-ACA生产。生物酶催化法采用固定化酶作为催化剂, 体外转化CPC形成7-ACA。现有生物酶催化法包括两步酶法<sup>[2]</sup>及一步酶法<sup>[3]</sup>。两步酶法涉及到两个酶(D-氨基酸氧化酶 D-amino acid oxidase 和戊二酰基转移酶 glytaryl-7-ACA-acylase)分步催化, 已有用于工业化生产的报道; 一步酶法是利用头孢菌素C酰基转移酶直接催化CPC形成7-ACA, 尚未见工业化生产的报道。由CPC到7-ACA的生产路线见图1。

## 2 发酵生产7-ACA基因工程菌的构建

尽管一步酶法尚未能应用于产业化, 但它通过转化从CPC来生产7-ACA仍然是目前国际上研究的热点, 这其中的关键问题是要解决CPC酰基转移酶对底物CPC的特异性<sup>[4]</sup>。不过, 无论是二步酶法还是一步酶法, 都需要发酵获得CPC后再通过体外酶催化反应来生产7-ACA。国外有过报道, 将D-氨基酸氧化酶和戊二酰基转移酶的基因克

降至顶头孢霉, 结果在顶头孢霉体内表达的两个酶可以将顶头孢霉发酵获得的头孢菌素C直接在体内转化成7-ACA, 实现了直接发酵生产7-ACA的目的<sup>[5]</sup>。但由于出发菌株本身头孢菌素C的发酵水平就较低, 且两个酶同时转化顶头孢霉, 按现代合成生物学的理论, 再加上对顶头孢霉基础研究的缺乏, 很难使代谢流达到平衡。因此, 没有任何实用价值。随着一步酶法研究的深入, 对头孢菌素C底物特异性更强的头孢菌素C酰化酶被发现, 我们设想能否将CPC酰基转移酶基因直接引入顶头孢霉, 从而使经改造的工程菌具备发酵生产7-ACA的能力, 而对一个表达框架的调控相比两个来说要容易得多, 使之最终能应用于产业化。

### 2.1 头孢菌素C的生物合成

对顶头孢霉进行基因改造, 首先必须要对头孢菌素C的生物合成机制有清楚的阐明。按现有文献总结, 参与头孢菌素C生物合成的基因分为两簇: 早期基因簇由*pcbAB-pcbC*和*cefD1-cefD2*组成, *pcbAB-pcbC*编码的蛋白负责CPC生物合成的前两步反应<sup>[6]</sup>, *cefD1-cefD2*编码的蛋白负责将异青霉素

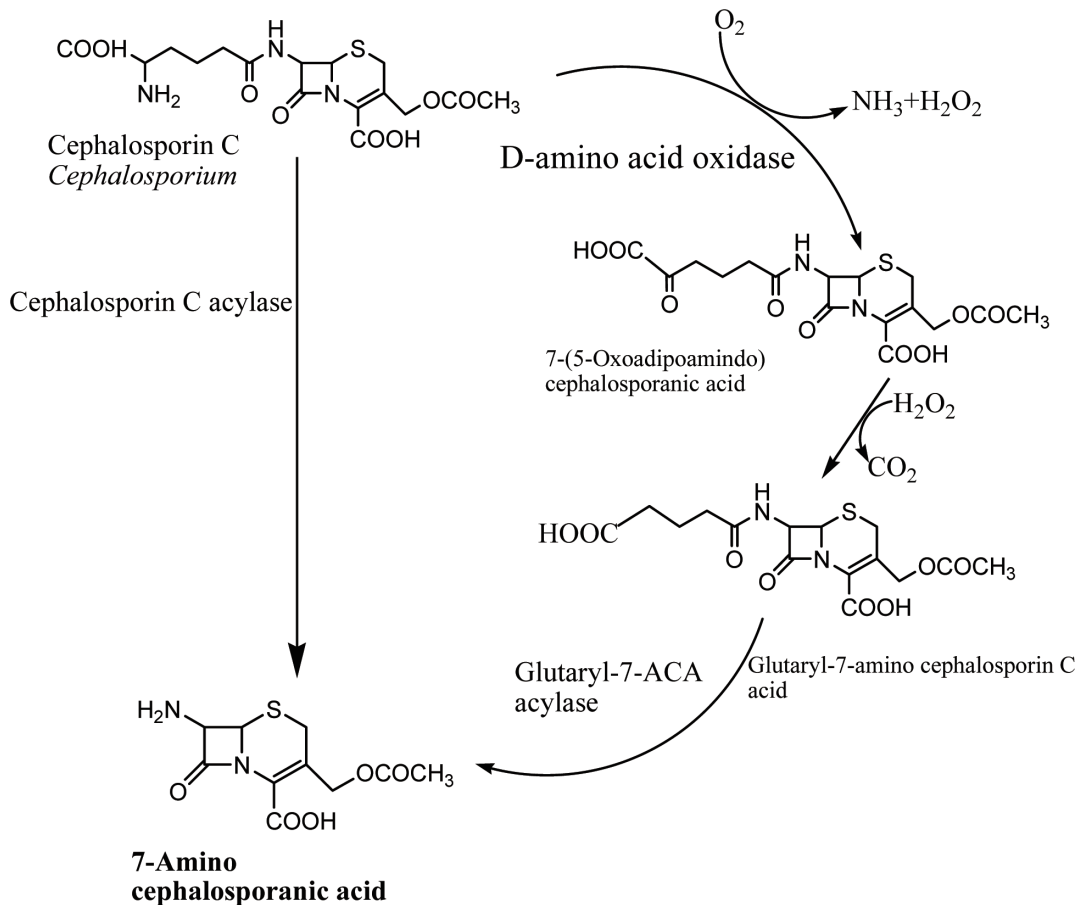


图1 7-ACA的二步酶法和一步酶法生产

N 异构化为青霉素 N<sup>[7]</sup>；晚期基因簇由 *cefEF* 和 *cefG* 组成，所编码的蛋白负责 CPC 生物合成的最后二步反应<sup>[8]</sup>。

CPC 的生物合成途径见图 2。*pcbAB* 编码了 ACV 合成酶，负责将三个前体氨基酸：L- $\alpha$ -氨基己二酸、L-半胱氨酸、L-缬氨酸缩合成三肽 ACV，然后在 *pcbC* 编码的异青霉素 N 合成酶的催化下环化形成异青霉素 N。异青霉素 N 再异构化形成青霉素 N，在顶头孢霉中，编码这一步酶的基因由两个组成：*cefD1-cefD2*。*cefEF* 基因在顶头孢霉中编码了一个独特的双功能酶：脱乙酰氧头孢菌素 C 合成酶-羟化酶，分别顺次将青霉素 N 转化成脱乙酰氧头孢菌素 C(DAOC) 和脱乙酰头孢菌素 C(DAC)，最后一步由 DAC 生成 CPC 则是由 *cefG* 编码的 DAC 乙酰转移酶催化的。其中，*pcbAB*、*cefEF* 和 *cefG* 被普遍认为是整个生物合成过程中的限速步骤<sup>[9]</sup>。

## 2.2 顶头孢霉的遗传改造

由于 *pcbAB* 基因较大，遗传改造比较困难，因此以往对顶头孢霉的分子育种主要着重于 *cefEF* 和

*cefG*。另外研究者还发现，提高编码 CPC 外排泵基因 *cefT* 的拷贝数也证明对 CPC 的生产水平有正面的影响<sup>[10]</sup>。由于顶头孢霉的发酵是个极度耗氧过程，CPC 生物合成途径中的限速酶均为需氧酶，因此，来源于透明颤菌的血红蛋白基因 *vgb* 也引起了人们的重视。因为据文献报道，携带有 *vgb* 的异源表达菌株能大大提高在限氧条件下利用氧的能力，从而改善菌株的发酵水平，这已经在曲霉中得到证实<sup>[11]</sup>。

最早的顶头孢霉菌种改造见于 Eli Lilly 公司研究人员的报道，他们将 *cefEF-cefG* 片段导入顶头孢霉后 CPC 的产量提高了 15%~40%，显示了分子育种的巨大应用价值<sup>[12]</sup>。

将 *vgb* 基因导入顶头孢霉后，果然能明显改善在发酵后期发酵液很黏稠的情况下，菌丝利用氧的能力，并维持更高的比生长速率与比生产速率，这使得 CPC 的产量能大幅度提高 4~5 倍<sup>[13]</sup>。据我们现在采用分子手段验证得出的结论，国外的顶头孢霉生产菌种都含有重组的 *vgb* 基因。

另外有一项研究是将 *cefT* 基因导入顶头孢霉，结果发现可以使 CPC 的发酵水平提高近 1 倍<sup>[14]</sup>，推测可能是由于增加的 *CefT* 表达量使发酵产物的外排得到了加强，更有利于降低胞内酶受终产物反馈抑制的影响从而提高最终产量。

值得注意的，目前文献报道的这些顶头孢霉的遗传改造均针对的是模式菌株 C10 等，出发菌本身的发酵水平比较低，大概为 1 mg/mL 左右，远远低于 CPC 的工业生产水平，因此虽然在提高顶头孢霉发酵水平以及发酵产物的改造上取得了不错的结果，但离菌种的产业化仍相当遥远。

我们实验室则重点针对高产菌株并探索工程菌的产业化应用前景。我们尝试将克隆到的 *cefG/cefEF/cefT/vgb* 以不同的组合分别引入顶头孢霉中，构建了不同的工程菌。结果发现，对于 CPC 高产菌株来说，引入额外拷贝的 *cefG* 基因能够明显提高 CPC 的发酵水平，不同的转化子有不同的提高幅度，其中提高幅度最高的达 100% 以上。相比较而言，*vgb* 基因则没有那么明显的效果，但与仅仅引入一个拷贝的 *cefG* 工程菌相比，再额外引入一个拷贝的 *vgb* 基因可以使 CPC 的发酵水平进一步提高 30% 左右。同时，我们也发现，引入 *cefEF* 和 *cefT* 对于 CPC 高产菌株来说几乎没有什么作用，这一方面说明了模式菌株与高产菌株间的区别；另一方面也可能是由于高产菌株已经经过了几轮的诱变育种，内源性的 *cefEF* 和 *cefT* 基因可能已经达到

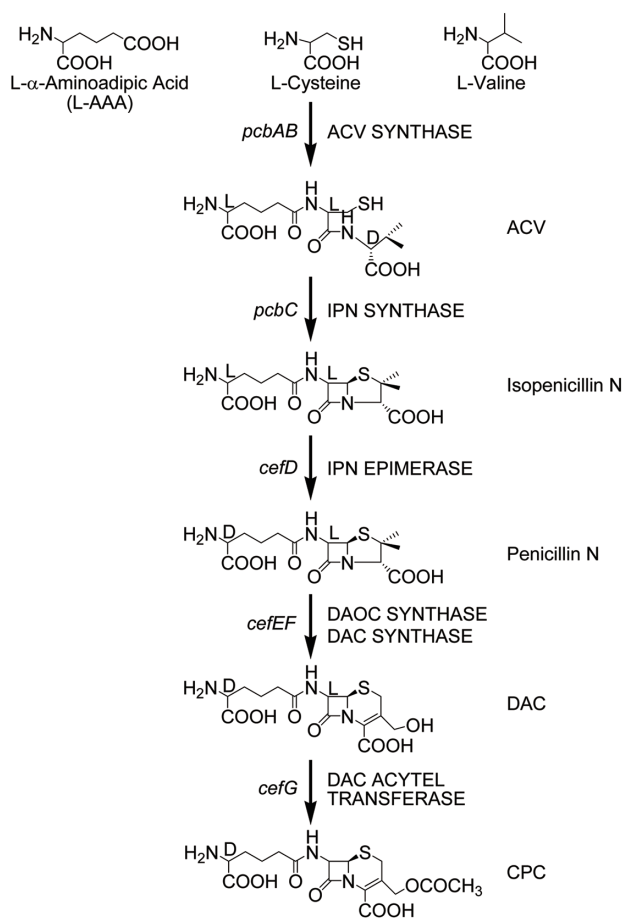


图2 头孢菌素C的生物合成途径

了相当高的活性<sup>[15]</sup>。

对于菌种的遗传改造来说,除了外源基因的导入,内源基因的阻断或沉默也是一个常用手段。近年来新兴的 RNAi 技术可以作为同源重组的一种替代方法实现目的基因的表达沉默。顶头孢霉中的 RNAi 现象由 Janus 等<sup>[16]</sup>首次报道。Ullan 等<sup>[17]</sup>用 RNAi 技术沉默产黄青霉中的 *pcbC* 基因和顶头孢霉中的 *cefEF* 基因。这些实验表明,在丝状真菌顶头孢霉体内实现 RNA 干扰具有很大的可行性。

我们构建了一个含可形成 *cefG* 双链 RNA 转录单元的 RNAi 载体,并将其导入 CPC 工业生产菌株中。定量 PCR 分析转化子 *cefG* 的转录水平,检测到其中两个转化子的 RNA 转录水平在发酵第四天较出发菌株降低了 80% 以上。HPLC 分析它们的 CPC 发酵水平较出发菌株分别降低 34.6% 和 28.8%<sup>[18]</sup>。这一研究结果不仅证明了 RNAi 应用于顶头孢霉工业生产菌株的可行性,而且为在顶头孢霉中重构宿主菌的代谢途径,为其代谢产生新的化合物打下了基础。

### 2.3 7-ACA 基因工程菌的构建

对顶头孢霉,尤其是高产菌株乃至工业生产菌株的成功改造,使得导入头孢菌素 C 酰化酶并构建直接发酵生产 7-ACA 工程菌成为可能,而对于这一目标来说,我们需要在顶头孢霉中构建一条新的代谢途径,即将通过生物合成途径合成的头孢菌素 C 进一步由头孢菌素 C 酰化酶代谢为 7-ACA。为此,我们构建了三个不同的表达单元分别导入顶头孢霉中,这三个表达单元分别由一个启动子控制一个基因,或二个启动子控制一个基因,或二个启动子分别控制二个基因。二个启动子分别选择了顶头孢霉内源性的 *pcbC* 基因的启动子 PpcbC 和来自于构巢曲霉 *trpC* 基因的启动子 PtrpC,终止子则都采用了 *trpC* 基因的终止子 TtrpC。三种头孢菌素 C 酰化酶的表达框架见图 3。

我们将文献报道的来源于假单胞菌 N176 中头孢菌素 C 酰基转移酶基因 *vac*<sup>[19]</sup> 设计了适合于在顶头孢霉中表达的序列,将该基因的密码子改变为顶头孢霉偏爱性同时兼顾大肠杆菌偏爱和密码子利用频率的平衡性,并应用 RNA secondary structure prediction 软件,选择 mRNA 二级结构少、自由能较小、结构简单、利于表达的最优基因序列 *ecs*,全长为 2 349 bp,编码 783 个氨基酸, *ecs* 与 *vac* 的同源性为 94%,共有 121 个密码子改变,占 15.45%。

将 57 个 60~68 bp 的寡核苷酸片段进行酶切、

拼接、PCR 获得了完整的总长为 2 349 bp 的 *ecs* 基因,在大肠杆菌中表达后纯化的 ECS 蛋白进行酶活测定,表明重组 ECS 能将 CPC 转化为 7-ACA。

同时采用本实验室构建的用于将 *vgb* 转化至顶头孢霉的质粒 pYG13<sup>[20]</sup> 作为载体,将不同表达框架的 *ecs* 基因导入顶头孢霉原生质体,通过 PCR、RT-PCR 及 Western 证明 ECS 蛋白在顶头孢霉中表达,且发酵液中出现了目的产物 7-ACA,表明工程菌能够将 CPC 转化成 7-ACA<sup>[21]</sup>。

从结果中我们发现,不同的 *ecs* 表达框架所获得的工程菌产 7-ACA 的水平是不一样的,二个启动子分别控制二个 *ecs* 基因的发酵水平最高,一个启动子控制一个 *ecs* 基因其次,由二个启动子控制一个 *ecs* 基因的则最低。具体发酵水平见表 1。此结果也表明,要在宿主菌中构建一个表达单元,选择合适的启动子强度与基因的拷贝数非常重要,而单纯地增强转录水平往往并不能获得最好的效果。

我们以在大肠杆菌中表达的重组头孢菌素 C 酰基转移酶的酶学性质为基础,对工程菌进行了培养基与发酵工艺的初步优化,即可将工程菌的 7-ACA 发酵水平提高 7 倍以上<sup>[22]</sup>。目前以头孢菌素 C 生产菌株作为对照,我们所获得的 7-ACA 工程菌已经能够将 30% 的头孢菌素 C 在发酵过程中直接转化为 7-ACA,通过构建更有效的转录启动单元及多拷贝整合重组子,并结合传统育种的工艺优化,有

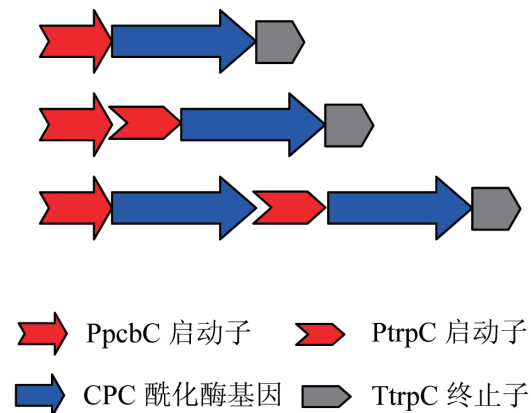


图3 头孢菌素C酰化酶三种表达框架

表1 导入*ecs*基因的不同表达框架获得的7-ACA一步发酵工程菌的发酵水平

表达框架类型	7-ACA发酵水平 (μg/mL)
PpcbC+ <i>ecs</i>	263 ± 37
PpcbC+PtrpC+ <i>ecs</i>	129.5 ± 29
PpcbC+ <i>ecs</i> +PtrpC+ <i>ecs</i>	350.5 ± 36



望获得国际领先的 7-ACA 一步发酵生产工艺。

### 3 结语和展望

7-ACA 属于市场需求量大、出口前景好的大宗原料药,事实上,近几年来 7-ACA 的市场价格居高不下,出口量也逐年提高。对于生产企业来说,7-ACA 的生产成本主要取决于头孢菌素 C 的发酵成本、酶的购买成本、固定化技术及酶的重复利用率等。从降低成本、简化技术角度考虑,世界上一些医药工业发达国家十分重视一步酶法从 CPC 转化生产 7-ACA 的研究。通过顶头孢霉的基因工程改造结合合成生物学的知识来构建直接发酵生产 7-ACA 的工程菌,不仅完全舍弃了化学制备法所造成的环境污染,而且也省略了两步酶法转化所需要的酶的固定化等步骤,实现绿色工艺和技术水平的国际领先,可以大大降低头孢菌素类抗生素的生产成本,对国内药品的价格下降,患者用药成本的降低,以及潜在的减少能耗、降低污染都有很好的市场及社会效益。

#### [参 考 文 献]

- [1] Fechtig B, Peter H, Bickel H, et al. Concerning the preparation of 7-amino-cephalosporanic acid. *Helv Chim Acta*, 1968, 51(5): 1108-19
- [2] Conlon HD, Baqai J, Baker K, et al. Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 46(6): 510-3
- [3] Fritz-Wolf K, Koller KP, Lange G, et al. Structure-based prediction of modifications in glutarylamidase to allow single-step enzymatic production of 7-aminocephalosporanic acid from cephalosporin C. *Protein Sci*, 2002, 11(1): 92-103
- [4] Sonawane VC. Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes. *Crit Rev Biotechnol*, 2006, 26(2): 95-120
- [5] Isogai T, Fukagawa M, Aramori I, et al. Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology: N Y*, 1991, 9(2): 188-91
- [6] Gutierrez S, Diez B, Montenegro E, et al. Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding  $\alpha$ -amino adipyl-cysteinyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J Bacteriol*, 1991, 173(7): 2354-65
- [7] Martin JF, Ullan RV, Casqueiro J. Novel genes involved in cephalosporin biosynthesis: the three-component isopenicillin N epimerase system. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 88: 91-109
- [8] Gutierrez S, Velasco J, Fernandez FJ, et al. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J Bacteriol*, 1992, 174(9): 3056-64
- [9] Brakhage AA, Thon M, Sprote P, et al. Aspects on evolution of fungal  $\beta$ -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*, 2009, 70(15-16): 1801-11
- [10] Nijland JG, Kovalchuk A, van den Berg MA, et al. Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol*, 2008, 45(10): 1415-21
- [11] Lin YH, Li YF, Huang MC, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Aspergillus terreus* to alleviate the effect of a short break in aeration during culture. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(13): 1067-72
- [12] Skatrud P, Tietz A, Ingolia T, et al. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology*, 1989, 7(5): 477-85
- [13] DeModena JA, Gutierrez S, Velasco J, et al. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology*, 1993, 11(8): 926-9
- [14] Ullan RV, Liu G, Casqueiro J, et al. The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267(5): 673-83
- [15] Liu Y, Gong G, Xie L, et al. Improvement of cephalosporin C production by recombinant DNA integration in *Acremonium chrysogenum*. *Mol Biotechnol*, 2010, 44(2): 101-9
- [16] Janus D, Hoff B, Hofmann E, et al. An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(3): 962-70
- [17] Ullan RV, Godio RP, Teixeira F, et al. RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(2): 209-18
- [18] 龚桂花, 刘艳, 胡又佳, 等. RNAi 技术降低头孢菌素 C 工业生产菌株中 *cefG* 基因的转录. *生物技术通报*, 2010, 10: 193-7
- [19] Pollegioni L, Lorenzi S, Rosini E, et al. Evolution of an acylase active on cephalosporin C. *Protein Sci*, 2005, 14(12): 3064-76
- [20] 张丕燕, 朱春宝, 朱宝泉. 顶头孢霉 *pcbAB-pcbC* 双向启动子区域的克隆与应用. *微生物学报*, 2004, 44(2): 255-7
- [21] 刘艳, 龚桂花, 胡又佳, 等. 头孢菌素 C 酰基转移酶在顶头孢霉中的表达. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(12): 902-6
- [22] Liu Y, Gong G, Zhu C, et al. Environmentally safe production of 7-ACA by recombinant *Acremonium chrysogenum*. *Curr Microbiol*, 2010, 61(6): 609-14