

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03804272. X

[51] Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100523179C

[22] 申请日 2003.2.14 [21] 申请号 03804272. X

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 22 [33] EP [31] 02003967. 3

[86] 国际申请 PCT/EP2003/001473 2003. 2. 14

[87] 国际公布 WO2003/070924 英 2003. 8. 28

[85] 进入国家阶段日期 2004. 8. 20

[73] 专利权人 DSM IP 资产有限公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 片冈道彦 清水昌

[56] 参考文献

CN1285410A 2001. 2. 28

EP1074630A 2001. 2. 7

US4156100A 1979. 5. 22

OLD YELLOW ENZYME FROM CANDIDAM-  
ACEDONIENSIS CATALYZES THE STEREOSPE-  
CIFICREDUCTION OF THE C = C BOND OF KE-  
TOISOPHORONE. KATAOKA MICHIIHIKO  
ETAL. BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BI-  
OCHEMISTRY, Vol. 66 No. 12. 2002

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION  
OF TWOENONE REDUCTASES FROM SACCHA-  
ROMYCESCEREVISIAE. WANNER PETER  
ETAL. EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMIS-  
TRY, Vol. 255 No. 1. 1998

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

烯酮还原酶

[57] 摘要

本发明涉及一种分离的烯酮还原酶，其特征在于：分子量为 61,300  $\pm$  5,000Da；辅因子为 NADPH 和 NADH；pH 7.4 下最适温度 55 - 60℃；最适 pH 为 4.5 - 8.5；并且对  $\alpha$ ， $\beta$  - 不饱和酮具底物专一性。本发明还涉及从微生物生产该酶的方法和用该还原酶从酮异佛尔酮生产左旋二酮的方法。

1. 一种具有下面的理化性质的分离的烯酮还原酶:

- (g) 分子量:  $61,300 \pm 5,000$  Da,
- (h) 由分子量  $45,000 \pm 5,000$  Da 的一个亚基组成,
- (i) 辅因子: NADPH 和 NADH,
- (j) 底物专一性: 对  $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和酮具活性,
- (k) 最适温度: pH 7.4 下 55-60°C,
- (l) 最适 pH: 4.5-8.5.

2. 一种根据权利要求 1 的烯酮还原酶, 其来源自能够生产具有权利要求 1 中定义的性质的烯酮还原酶的微生物。

3. 一种根据权利要求 2 的烯酮还原酶, 其中微生物是酵母。

4. 一种根据权利要求 2 的烯酮还原酶, 其中微生物是乳酒假丝酵母 (*Candida macedoniensis*) IFO 0960。

5. 一种生产具有下面理化性质的烯酮还原酶的方法:

- (a) 分子量:  $61,300 \pm 5,000$  Da,
- (b) 由分子量  $45,000 \pm 5,000$  Da 的一个亚基组成,
- (c) 辅因子: NADPH 和 NADH,
- (d) 底物专一性: 对  $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和酮具活性,
- (e) 最适温度: pH 7.4 下 55-60°C,
- (f) 最适 pH: 4.5-8.5,

该方法包括在有氧条件下于水性营养培养基中培养能够产生具有上面性质的烯酮还原酶的微生物, 破坏微生物的细胞并从所述提取物中分离纯化烯酮还原酶。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其中微生物是酵母。

## 烯酮还原酶

### 技术领域

本发明涉及参与从 2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮（此后称为酮异佛尔酮）生产（6R）-2,2,6-三甲基环己烷-1,4-二酮（此后成为左旋二酮）的新酶和生产所述酶的方法，其中所述酶作为烯酮还原酶起作用。

### 背景技术

左旋二酮是类胡萝卜素，如玉米黄质合成中的重要中间体。公知从酮异佛尔酮生产左旋二酮的微生物方法，见例如美国专利 4,156,100。

本发明的酶属于烯酮还原酶类并且可以从酵母如乳酒假丝酵母（*Candida kefir*）或者 *Zygosaccharomyces rouxii* 得到。从乳酒假丝酵母分离的酶是依赖于 NADH 和 NADPH 的，凝胶过滤层析下其分子量为 61.3 kDa。变性电泳条件下发现其由 45 kDa 单亚基组成并且显示出具有 278, 376 和 460nm 吸收峰的紫外可见吸收光谱。

### 发明内容

本发明的一个目的是提供一种具有下面的理化性质的分离的烯酮还原酶：

- a) 分子量：61,300 ± 5,000 Da（由分子量 45,000 ± 5,000 Da 的一个亚基组成）
- b) 辅因子：NADPH 和 NADH
- c) 底物专一性：对  $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和酮具活性
- d) 最适温度：pH 7.4 下 55-60°C
- e) 最适 pH：4.5-8.5。

如本文中所用的术语“烯酮还原酶”根据国际生物化学和分子生物学协会命名委员会（NC-IUBMB）提供的酶命名法包括催化羰基活化的双键的酶促还原的蛋白。其还涉及具有上述烯酮还原酶活性的蛋白，所述蛋白优选催化将酮异佛尔酮转变成左旋酮。

更具体地，本发明涉及具有上述烯酮还原酶活性的分离蛋白，其源自能够产生具有上述理化性质的所述蛋白的微生物。

本发明所用的微生物选自酵母，包括但不限于能够产生此前所定义的烯酮还原酶的假丝酵母属(*Candida*)或接合酵母属（*Zygosaccharomyces*）微生物。所述微生物的功能性等价物、传代培养物、突变株和变体也能够用于本发明中。

在本发明的一个实施方案中，微生物是酵母，优选假丝酵母，更优选乳酒假丝酵母，最优选乳酒假丝酵母（*Candida macedoniensis*）IFO 0960或它们的功能性等价物、传代培养物、突变株和变体。菌株乳酒假丝酵母（*Candida macedoniensis*）IFO 0960可从大阪发酵研究所（Institute for Fermentation Osaka, IFO）（17-85Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, 大阪, 532-8686 日本）公开地得到。

如本文所用，微生物“乳酒假丝酵母”或“*Zygosaccharomyces rouxii*”也包括如原核生物命名法国际编码所定义的、具有相同理化性质的这些菌种的同物异名或有效名。

可通过在有氧条件下在水性营养培养基中培养合适的微生物，破坏微生物的细胞并从破坏的微生物细胞的无细胞提取物中分离纯化烯酮还原酶来制备本发明提供的烯酮还原酶。

从而，本发明的另一个目的是提供一种生产具有上面定义的理化性质的烯酮还原酶的方法，该方法包括在有氧条件下于水性营养培养基中培养能够产生上述性质的烯酮还原酶的微生物，破坏微生物的细胞并从所述细胞提取物中分离纯化烯酮还原酶。

用于生产烯酮还原酶的方法中的微生物是上面已经定义的微生物。在本发明的一个实施方案中，用于生产烯酮还原酶的微生物是酵母，优选假

丝酵母，更优选乳酒假丝酵母，最优选乳酒假丝酵母（*Candida macedoniensis*）IFO 0960 或它们的功能性等价物、传代培养物、突变株和变体。

本发明提供的烯酮还原酶可用作由酮异佛尔酮生产左旋二酮的催化剂。从而本发明的另一个目的是提供从酮异佛尔酮生产左旋二酮的方法，该方法包括（i）在 NADH 或 NADPH 存在下将酮异佛尔酮与具有上面定义的理化性质的烯酮还原酶接触，（ii）将酮异佛尔酮与能够产生（i）中定义的酶的所述微生物的细胞或无细胞提取物接触，以及在每种情况下，从反应混合物中分离所得左旋二酮。

在一个实施方案中，能够生产上面定义的酶并且用于生产左旋二酮的微生物是酵母，优选假丝酵母，更优选乳酒假丝酵母，最优选乳酒假丝酵母 IFO 0960 或它们的功能性等价物、传代培养物、突变株和变体。可将微生物培养于含有糖（如葡萄糖或蔗糖）、醇（如乙醇或甘油）、脂肪酸（如油酸，硬脂酸）或其酯或油（如菜籽油或大豆油）作为碳源；硫酸铵、硝酸钠、脲、氨基酸、玉米浆、麸、酵母提取物等作为氮源；硫酸镁、氯化钠、碳酸钙、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等作为无机盐来源；麦芽汁、肉膏等作为其他营养源的营养培养基中。可以进行有氧培养，通常培养时间为 1 到 7 天，培养基 pH 3 到 9，培养温度 10 到 40℃。更优选地，培养时间为 2 到 4 天，培养基 pH 5 到 8，培养温度 25 到 35℃。

下面简单描述培养后从微生物中分离纯化烯酮还原酶的实施方案：

- （1）通过离心或过滤从培养液收获细胞，
- （2）用水、生理盐水或具有适宜 pH 的缓冲液洗涤收获的手机；
- （3）将洗涤后的细胞悬浮于缓冲液中并通过匀浆器、超声器、弗氏压碎器或用溶菌酶处理等进行破坏以得到破坏的细胞的溶液；和
- （4）从破坏的细胞的无细胞提取物中分离纯化烯酮还原酶。

可以在溶剂如 Tris-HCl 缓冲液、磷酸缓冲液等中，在 NADH 或 NADPH 存在下，及 pH 约 4.5 到约 8.5 下进行反应。本发明的一个实施方案涉及用上面定义的烯酮还原酶或微生物从酮异佛尔酮生产左旋二酮的方

法，其中反应在 pH4.5 到 8.5 下进行，优选 pH 范围 5.0 到 8.0。

本发明的另一个方面涉及用上面定义的烯酮还原酶或微生物从酮异佛尔酮生产左旋二酮的方法，其中反应的温度为 30 到 60℃，优选 55 到 60℃。

当 pH 和温度分别设定在 5.0 到 8.0 和 45℃到 60℃时，反应通常得到最佳结果。优选地，pH 为 5.0 到 8.0 并且温度为 55 到 60℃。

溶剂中酮异佛尔酮的浓度可以发生变化，这取决于其他反应条件，但是通常浓度为 1mM 到 2 M，优选 10 mM 到 100 mM。

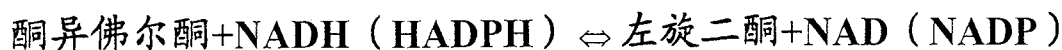
反应中，烯酮还原酶也可以以具有合适载体的固定化状态使用。可以使用本领域中一般公知的任何固定酶的方法。例如，酶可以直接结合到具有一个或多个官能团的树脂膜或颗粒等上，或者其可以通过具有一个或多个官能团的桥接化合物如戊二醛结合到树脂上。

本发明不仅涉及具有上述烯酮还原酶活性的酶的分离，还涉及用本领域已知的方法克隆编码这些酶的相应基因。这些克隆的基因的 cDNA 可以用于导入合适的表达载体，然后将载体导入宿主细胞，例如大肠杆菌或酵母。重组蛋白可用于将酮异佛尔酮转化成左旋二酮，这是生产类胡萝卜素如 actinol 或玉米黄质的重要中间步骤。

根据下文提到的实施例制备的烯酮还原酶的纯化样品的理化性质如下：

#### 1) 酶活性

根据下式，本发明的新烯酮还原酶在辅因子存在下催化酮异佛尔酮还原为左旋二酮：



如下进行标准的酶分析试验：将总体积 1 ml 基本反应混合物（200 μl 1M Tris-HCl 缓冲液 pH7.5，100 μl 80 mM NADH 或 NADPH，100 μl 0.658M 酮异佛尔酮，600 μl H<sub>2</sub>O）补加 5 μl 酶溶液并在 40℃孵育。一单位酶活力定义为每分钟催化 1 μmol 酮异佛尔酮氧化的酶量。用 1ml 乙酸乙酯萃取反应混合物以将左旋二酮回收至乙酸乙酯层。通过气相层析分析

萃取物[柱子: ULBON HR-20M (Shinwa, 日本) 0.25mm  $\phi$  x 30m, 柱子温度: 160℃ (恒定), 注射器温度: 250℃, 载气: He (约 1ml/min)]。通过使用 Bio-Rad 蛋白分析试剂盒 (Bio-Rad, 美国) 确定蛋白浓度。

## 2) 分子量

用凝胶过滤柱 Superdex 200(Amersham Biosciences AB, SE-751 84 Uppsala, 瑞典) 测量该蛋白的分子量 (MW)。与分子量标准蛋白 (Boehringer Mannheim Biochemica: 德国) 铁蛋白 (分子量: 450,000 Da)、过氧化氢酶 (分子量: 240,000 Da)、醛缩酶 (分子量: 158,000 Da)、牛血清白蛋白 (分子量: 68,000 Da)、卵白蛋白 (分子量: 45,000 Da)、胰凝乳蛋白酶原 (分子量: 25,000 Da) 和细胞色素 c (分子量: 12,500 Da) 比较计算得到该酶的表观分子量是  $61,300 \pm 5,000$  Da。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 给出单一条带, 与分子量标准蛋白 (Amersham Biosciences AB) 磷酸化酶 b (分子量: 97,000 Da)、牛血清白蛋白 (分子量: 66,300 Da)、卵白蛋白 (分子量: 42,400 Da)、碳酸酐酶 (分子量: 30,000 Da) 和大豆胰蛋白酶抑制剂 (分子量: 20,100 Da) 相比具有分子量  $45,000 \pm 5,000$  Da。这说明该酶由一个亚基组成。

## 3) 辅因子

研究了酶将酮异佛尔酮转化成左旋二酮的辅因子要求。结果, NADH 和 NADPH 可以作为该还原反应的辅因子。

## 4) 底物专一性

用除以下例外情况外与上面 (1) 中描述相同的酶分析试验测定酶的底物专一性, 所述例外为: 使用各种底物溶液 (反应混合物中 0.05% 终浓度) 代替酮异佛尔酮, 并且在 30℃ 下进行反应。在表 1 中比较了不同底物的相对活性 (%), 用 3-丁烯-2-酮得到最好的结果。

表 1

| 底物         | 相对活性 (%) |
|------------|----------|
| 酮异佛尔酮      | 100      |
| 2-环己烯-1-酮  | 252.1    |
| 3-丁烯-2-酮   | 403.3    |
| R-(-)-香芹酮  | 56.3     |
| 肉桂醛        | 216.7    |
| 1-硝基-1-环己烯 | 373.8    |

### 5) 最适温度

通过使用除以下例外情况外与上面(1)描述相同的酶分析试验在 20 到 70℃ 的温度下测量酶的活力, 所述例外为: 使用 2-环己烯-1-酮作为底物。如表 2 中所概述的, 酶活力的最适温度为 55-60℃。

表 2

| 温度 (°C) | 相对活力 (%) |
|---------|----------|
| 20      | 12.7     |
| 25      | 22.5     |
| 30      | 32.2     |
| 35      | 40.5     |
| 40      | 48.6     |
| 45      | 64.2     |
| 50      | 68.1     |
| 55      | 97.5     |
| 60      | 100      |
| 65      | 30       |
| 70      | 10.3     |

### 6) 最适 pH

用除以下例外情况外与上述(1)中相同的酶分析试验测量酶活力和反应混合物的 pH 值之间的相互关系, 所述例外为: 使用各种 pH 和缓冲液, 并且使用 0.05% (终浓度) 2-环己烯-1-酮作为底物。酶反应的最适 pH 为

4.5-8.5, 如表 3 所示。

表 3

| 缓冲液      | pH   | 酶活力 (单位/ml) |
|----------|------|-------------|
| 乙酸钠      | 4.0  | 7.7         |
|          | 4.5  | 13.1        |
|          | 5.0  | 11.8        |
|          | 5.5  | 8.5         |
| 磷酸钾      | 5.5  | 11.2        |
|          | 6.0  | 10.4        |
|          | 6.5  | 10.9        |
|          | 7.0  | 10.9        |
|          | 7.5  | 9.6         |
| Tris-HCl | 7.5  | 11.3        |
|          | 8.0  | 11.3        |
|          | 8.5  | 11.8        |
|          | 9.0  | 10.2        |
| 甘氨酸-NaOH | 8.5  | 10.7        |
|          | 9.0  | 8.7         |
|          | 9.5  | 8.9         |
|          | 10.0 | 8.1         |
|          | 10.5 | 4.2         |

#### 7) 金属离子和其他化合物的影响

除以下不同之处外, 用与上面 (1) 中描述相同的酶分析试验研究金属离子和其他化合物对酶活力的影响, 所述不同为: 使用 2-环己烯-1-酮作为底物, 并且将各种金属和其他化合物加入到反应混合物中, 其中金属的终浓度为 1 mM。铅离子和吡啶黄强烈抑制酶活力。Ag、Hg、Cu、V 离子和胍适度抑制酶活力。结果描述于表 4。

表 4

| 金属或其他化合物                          | 相对活力 (%) |
|-----------------------------------|----------|
| 无                                 | 100      |
| LiCl                              | 104      |
| NaCl                              | 108      |
| KCl                               | 103      |
| RbCl                              | 107      |
| AgNO <sub>3</sub>                 | 49.1     |
| CaCl <sub>2</sub>                 | 108      |
| MnCl <sub>2</sub>                 | 94.6     |
| BeSO <sub>4</sub>                 | 80.9     |
| CdCl <sub>2</sub>                 | 104      |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 111      |
| CoCl <sub>2</sub>                 | 113      |
| HgCl <sub>2</sub>                 | 40.8     |
| ZnSO <sub>4</sub>                 | 101      |
| CuSO <sub>4</sub>                 | 55.9     |
| NiCl                              | 108      |
| Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 0        |
| NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>   | 9.6      |
| 胍                                 | 61.1     |
| 吡啶黄                               | 0        |
| 硫脲                                | 96.0     |
| 碘乙酸盐                              | 93.6     |
| NaSCN                             | 93.6     |
| 胍                                 | 108      |
| NaF                               | 101      |
| KCN                               | 91.8     |
| EDTA                              | 110      |

## 8) 纯化步骤

原则上烯酮还原酶的纯化可以通过已知纯化方法(如用沉淀剂如硫酸铵、聚乙二醇等分级分离、离子交换层析、吸附层析、凝胶过滤层析、凝胶电泳和盐析及透析)的任何组合进行。

下面的实施例进一步举例阐明本发明。

### 实施例 1: 烯酮还原酶的制备

除非另外说明,所有操作都在 4℃ 于 20 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)中进行。

#### (1) 培养乳酒假丝酵母(*Candida macedoniensis*) IFO 0960

将生长在琼脂板上的乳酒假丝酵母 IFO 0960 接种于试管中 5 ml 培养基(pH 6.0)中并在 28℃ 孵育 2 天,培养基由 D-葡萄糖(5%)、胨(0.5%)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2%)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.1%)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.02%) 和酵母提取物(0.1%)组成。将这样制得的 10 ml 种子培养物接种于装在 2 l Sakaguchi 瓶中的 500 ml 与上相同的培养基中,并在 28℃ 孵育 2 天。将从由此制备的 10 个瓶中得到的 5 升培养物在 8,000 rpm, 4℃ 下离心 20 分钟。总共得到 60.5g 湿细胞。

#### (2) 无细胞提取物的制备

将湿细胞(60.5g)悬浮于 121 ml 缓冲液中,并用 Kubota Insonator 201 超声器(Kubota, 日本)以 190 W 的功率超声 2 小时。超声后,将样品在 10,000 rpm 离心 20 分钟。结果得到含有 1,550 mg 蛋白的 139 ml 无细胞提取物。

#### (3) 硫酸铵沉淀

用固体硫酸铵对前面步骤中得到的无细胞提取物(80 ml)进行分级分离。将 40-80% 级分(78.5 ml)对 5 l 缓冲液透析 4 次,得到 91 ml 透析过的溶液。

#### (4) 二乙基氨基乙基-Sepharose 柱层析

将上面制备的透析样品加到用缓冲液平衡的二乙基氨基乙基 (DEAE) -Sephacel 柱 (直径 2.5 cm, 高 14cm; Amersham Biosciences AB, 瑞典)。用 200 ml 相同缓冲液洗涤柱子后, 用 530 ml 线性梯度 NaCl (0-0.6M) 洗脱酶。用 0.1 M NaCl 洗脱出酶活性。

#### (5) 苯基-Superose HR10/10 柱层析

将前面一步得到的样品补加 NaCl 得到终浓度 4M。将柱子 (1 cm 直径 × 30 cm 高; Amersham Biosciences AB, 瑞典) 用含有 4M NaCl 的缓冲液平衡并加载上面的样品。通过 160 ml 线性梯度缓冲液 (4-0 M NaCl) 洗脱酶。在 2M NaCl 浓度时洗脱出酶活性。

#### (6) Superdex 200 HR10/30 柱层析

将前面步骤得到的样品应用于 Superdex 200 HR10/30 柱 (1 cm 直径 × 30 cm 长; Amersham Biosciences AB, 瑞典) 进行层析。柱子用含有 2M NaCl 的缓冲液平衡并过柱。收集具有酶活性的级分。酶的纯化步骤概述于表 5 中。

表 5

| 步骤                                                 | 总活力<br>(毫单位) | 总蛋白<br>(mg) | 比活<br>(毫单位/mg) | 纯化<br>(-倍数) |
|----------------------------------------------------|--------------|-------------|----------------|-------------|
| 无细胞提取物                                             | 1450         | 1550        | 0.934          | 1           |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 处理 | 1560         | 664         | 2.34           | 2.51        |
| DEAE Sephacel                                      | 933          | 65.7        | 14.2           | 15.2        |
| 苯基 Superose                                        | 874          | 17.1        | 51.2           | 54.8        |
| Superdex 200                                       | 783          | 15.3        | 51.3           | 54.9        |

#### (7) 反应产物的鉴定

将由溶于 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液的 10 mg/ml 酮异佛尔酮、0.6 mg/ml NADP<sup>+</sup>、0.2 mg/ml 葡萄糖脱氢酶 (Amano Enzyme, 日本) 和 50 mg/ml D-葡萄糖组成的反应混合物 (1 ml) 补加 50 毫单位来自表 5 Superdex 200 级分的酶。在 28℃ 孵育 24 小时后, 将混合物用 1 ml 乙酸乙酯萃取。萃取物用气相色谱分析。与左旋二酮标准样品比较鉴定产物为左旋二酮。