

热带假丝酵母代谢烷烃过程中的 β -氧化和代谢调控*

刘树臣 焦 鹏 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

Metabolism and β -Oxidation of Alkane-Utilizing *Candida tropicalis*

Liu Shuchen Jiao Peng Cao Zhuan

(Department of Chemical Engineering, Institute of Biochemical Engineering Tsinghua University, Beijing 100084, China)

关键词: *Candida tropicalis*, 代谢, β -氧化, 烷烃

中图分类号: Q939.5 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0125-04

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 能利用烷烃作唯一碳源和能源。当以烷烃或脂肪酸为碳源时, 在细胞内可形成大量的过氧化物酶体 (peroxisome), 同时诱导生成脂肪酸 β -氧化酶系, 当以葡萄糖为碳源时, 则极少有过氧化物酶体形成^[1], 一些 *C. tropicalis* 能氧化烷烃生成长链二元酸 (long chain dicarboxylic acid, DCA)。由于这些特征, 人们从酶学、分子生物学和实际应用等方面对这种酵母进行了深入研究, 并阐述了 *C. tropicalis* 代谢烷烃的途径、脂肪酸 β -氧化酶系的生理功能及其几种重要酶的基因结构和酶活性的调控, 阐明了它与哺乳动物细胞在脂肪酸代谢及调控方面的差异; 通过 *C. tropicalis* 突变株的筛选和发酵工艺的优化, 使长链二元酸发酵技术实现了产业化^[2,3]。目前, 利用微生物特异性反应进行烃类生物加工生产附加值高的产品一直是人们非常关注的开发课题, 利用代谢工程构建生产长链二元酸工程菌株对降低生产成本提供了有效的途径^[4]。因此, 研究 *C. tropicalis* 代谢烷烃过程中的 β -氧化及其代谢调控对指导生产有重要意义。本文报道了此方面研究的最新进展, 并探讨了利用代谢工程改良菌株对烃类生物加工生产高附加值产品的技术产业化的影响。

1 *Candida tropicalis* 代谢烷烃途径和脂肪酸 β -氧化酶系

1.1 *C. tropicalis* 代谢烷烃途径

自 70 年代起有许多关于 *C. tropicalis* 代谢烷烃途径的报道^[5-8], 烷烃及其代谢产物的降解依次发生在微粒体 (microsome)、过氧化物酶体和线粒体。首先, 细胞摄取的烷烃进入微粒体, 在细胞色素 P-45 (cytochrome P-450) 和 NADPH-细胞色素 P-450 还原酶 (NADPH-cytochrome P-450 reductase, CPR) 催化作用下生成脂肪醇, 然后由长链脂肪醇脱氢酶 (或醇氧化酶) 和醛脱氢酶催化依次生成脂肪醛和脂肪酸, 或通过 ω -氧化最终生成二元酸 (可分泌到细胞外)。其次, 微粒体内的一部分脂肪醇、脂肪酸和二元酸进入过氧化物酶体, 经 β -氧化酶系催化, 最终降解为乙酰-CoA 或丙酰-CoA, 产生细胞生命活动所需能量。乙酰-

* 国家自然科学基金 (29976022, 30000003) 以及国家自然科学基金重点基金 (20036010) 资助

作者简介: 刘树臣 (1962-), 男, 吉林省白城人, 抚顺石油化工研究院生物工程研究室副主任, 高级工程师, 现清华大学博士研究生, 主要从事石油发酵研究。

收稿日期: 2001-03-29, 修回日期: 2001-09-07

CoA 有两种途径跨膜转运到线粒体内,①是进入乙醛酸循环形成中间代谢物,由转移酶运送到线粒体内,②是由肉毒碱乙酰基转移酶(carnitine acetyltransferase, CAT)催化生成乙酰肉毒碱(acetylcarnitine)再转运到线粒体内;丙酰-CoA 通过第 2 种途径转运到线粒体内。最后,进入线粒体的乙酰(或丙酰)肉毒碱由 CAT 催化还原为乙酰(或丙酰)-CoA,经三羧酸循环途径最终氧化成 CO_2 和 H_2O 。在哺乳动物细胞中,脂肪酸的 β -氧化同时发生在线粒体和过氧化物酶体内,而 *C. tropicalis* 降解脂肪酸仅发生在过氧化物酶体内^[9-10]。

1.2 β -氧化酶系

C. tropicalis 降解脂肪酸的 β -氧化酶系包括 4 种酶:脂酰-CoA 氧化酶(acyl-CoA oxidase)、烯脂酰-CoA 水合酶(enoyl-CoA hydratase)、3-羟基脂酰-CoA 脱氢酶(3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)和 3-酮脂酰-CoA 硫解酶(3-ketoacyl-CoA thiolase)。目前对参与脂肪酸 β -氧化第 2 步反应的烯脂酰-CoA 水和酶和第 3 步反应的 3-羟基脂酰-CoA 脱氢酶研究报道较少^[15]。本文仅报道脂酰-CoA 氧化酶和 3-酮脂酰-CoA 硫解酶的研究进展。

脂酰-CoA 氧化酶是 β -氧化第 1 步的酶,可氧化 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{20}$ 脂酰-CoA^[11],分子量为 600 000。该酶由三个同工酶构成^[12,13],同工酶 PXP-4 和 PXP-5 分别由 POX4 和 POX5 基因所编码,各含 709 个氨基酸和 663 个氨基酸,POX4 和 POX5 基因无内含子,有单一开放阅读框架,两个非常保守的疏水性氨基酸序列 Ile-Gly-Val-Asn-Leu-Gly-Leu-Phe-Lue-Ser-Cys-Ile 和 Leu-Phe-Pro-Tyr-Leu-Ala-Ala-Tyr-Val-Ile-Ser-Ala-Gly-Ala-Leu 位于氨基酸序列中部,是定位上述同工酶于过氧化物酶体内的内端信号序列。POX2 编码 PXP-2 蛋白,只有一个 2172 核苷酸序列开放阅读框架,含 724 个氨基酸,蛋白分子量为 82,000,其功能尚不清楚。氨基酸同源性:PXP-2 与 PXP4 为 52%,PXP-4 与 PXP-5 为 62%。POX4 和 POX5 基因可由烷烃和脂肪酸诱导^[14],PXP4 氧化底物范围较宽,且对短碳链底物有较高活性,而 PXP5 氧化底物范围较窄,对长碳链底物活性高。

3-酮脂酰-CoA 硫解酶是 β -氧化最后一步的酶,其作用是将 3-酮脂酰-CoA 裂解生成 1 个乙酰-CoA 和 1 个碳链较原来少 2 个碳原子的脂酰-CoA。通过无细胞提取液分级离心样品的酶活性测定^[15]和免疫电子显微观察^[16],在胞质和过氧化物酶体内同时存在乙酰乙酰-CoA 硫解酶(acetoacetyl-CoA thiolase, thiolase I),而 3-酮脂酰-CoA 硫解酶(thiolase III)仅存在过氧化物酶体内,这两个同工酶由两对等位基因所编码^[17]。通过破坏基因阐明了其生理功能:胞质内的 thiolase I 参与甲羟戊酸代谢,过氧化物酶体内的 thiolase I 和 thiolase III 参与脂肪酸的 β -氧化。编码 thiolase III 的 2 个转录基因都有一个 1224bp 开放阅读框架^[18],相应的氨基酸残基为 408 个,它与构成 thiolase I 氨基酸序列同源性为 35%,分子量 43,000,但它们的生物合成调控机理不同,thiolase I 可由葡萄糖、乙酸等诱导,而 thiolase III 则由烷烃和丁酸等脂肪酸强烈诱导。缺失 thiolase III 酶活性,菌株不能利用烷烃或油酸生长,但可以在葡萄糖培养基中生长,说明长链脂肪酸的 β -氧化已被完全阻断^[17]。

肉毒碱乙酰基转移酶是与 β -氧化相关的一个重要酶,同时存在于过氧化物酶体和线粒体内^[19],在过氧化物酶体与线粒体之间构成一个‘乙酰肉毒碱穿梭体系’^[20],由同一个基因所编码^[21],其核苷酸序列的开放阅读框架为 1881bp,对应 627 个氨基酸,分子量为 70,760。用烷烃培养 *C. tropicalis* 时,酶活性较葡萄糖培养的细胞高 20 倍。CAT 对乙醛酸循环运作起重要作用,同时也是参与乙酰-CoA 跨膜转运的关键酶。乙酰-CoA 不能穿过过氧化物酶体膜,但乙酰肉毒碱却可以,CAT 催化乙酰基团在 CoA 和 carnitine 之间可逆转化。降低其活性,有可能抑制脂肪酸降解速率。

2 *C. tropicalis* 代谢烷烃调节机制的研究

2.1 长链二元酸生产菌株 *Candida tropicalis* 酶活性的调节机制

日本能源公司生产长链二元酸的菌株为突变株 M2030,它是通过对 *C. tropicalis* 1098 菌株经 4 轮紫外线和亚硝基胍诱变获得的。其 β -氧化酶系特征为:缺损脂酰-CoA 氧化酶活性和 3-酮脂酰-CoA 硫解酶活

性,烯脂酰-CoA 水合酶和 3-羟基脂酰-CoA 脱氢酶的活性明显减少,而过氧化氢酶和乙酰肉毒碱转移酶蛋白水平正常表达,异柠檬酸裂合酶和苹果酸合成酶(乙醛酸循环关键酶)的合成未受影响,电子显微镜几乎观察不到过氧化物酶体。这说明突变可能发生在合成 β -氧化酶系的一种公共因子上,它对过氧化物酶体的生成和 β -氧化酶系活性起调控作用^[22]。由于突变株的 β -氧化酶系活性明显下降,用 n -C₁₂ 发酵,其单位体积发酵液产酸量较野生株提高了约 7 倍。

2.2 应用代谢工程构建生产 DCA 工程菌株

Haas 等^[23]以 *C. tropicalis* 尿嘧啶营养缺陷型突变株作为宿主细胞,研究出一种整合 DNA 的转化系统(an integrative DNA transformation system),应用含有 *C. tropicalis* URA3 基因的质粒,通过在 URA3 基因位置上同源重组,使尿嘧啶营养缺陷型突变株转化为原原型菌株,其中 URA3 基因作为挑选标记。该突变株缺损乳清苷一磷酸脱羧酶(orotidine monophosphate decarboxylase),对 5-氟基-乳清酸(5-fluoro-orotic acid, 5-FOA)具有抗性,可用 5-FOA 和尿嘧啶筛选尿嘧啶营养缺陷型突变株。Hara 等^[24]提出构建一种自主复制质粒(autonomously replicating plasmid)的方法,从 *C. tropicalis* 基因组 DNA 中分离一段含有自主复制序列(ARS)片段,在 pUC19 质粒 Aat II 位点和 Nde I 位点分别插入 ARS 序列和 URA3 基因片段,构建含有 ARS 的自主复制质粒 pUCARS,作为穿梭载体能在 *E. coli* 和 *C. tropicalis* 细胞内复制,但 URA3 基因不能整合到染色体上,而是以质粒形式在细胞内复制。它与整合 DNA 转化系统一样,能应用于 *C. tropicalis* 基因的研究。另外,通过定点突变从 *C. tropicalis* 获得一段潮霉素(hygromycin)抗性突变基因(HYG #)作挑选标记,将其开放阅读框架中的 9 个 CTG 密码子变为 CTC 密码子,由丝氨酸读为亮氨酸,用这种突变的潮霉素抗性基因转化的菌株对潮霉素具有抗性,可在含潮霉素培养基上获得转化株,为挑选 *C. tropicalis* 转化株提供简易方法^[25]。

利用代谢工程可以构建用于生产长链二元酸的工程菌株^[4]。将挑选标记 URA3 基因分别插入或全部插入编码脂酰-CoA 氧化酶同工酶的 POX4 和 POX5 基因中,用含有这些基因的质粒转化尿嘧啶营养缺陷型突变株,分别获得菌株 H43、H53 和 H5343,用十二烷(n -C₁₂)发酵, n -C₁₂ 对 DCA12 的分子转化率分别为 21%、35% 和 100%,证明脂肪酸 β -氧化被部分阻断或完全阻断。对编码菌株 H5343 的细胞色素 P-450 单加氧酶和 CPR 的基因进行扩增,扩增 P450alk I 基因没有提高菌株产酸能力,扩增 CPR 基因的菌株较菌株 H5343 产酸速率提高了 30%。用 n -C₁₃ 发酵,以葡萄糖为碳源和能源,转化 120h 产酸量约为 100g/L (校正至初始发酵体积),而工业发酵水平为 140g/L 以上(实际发酵体积)^[2,3],目前未见这种工程菌株用于工业生产报道。

3 改良菌株对长链二元酸生产及其下游产品技术产业化的影响

近 20 年来利用酶学和分子生物学对 *C. tropicalis* 氧化烷烃的代谢机理和应用技术的研究取得一些突破性进展。然而,如何解释过氧化物酶体和相关酶的产生以及这些蛋白如何进入这种亚细胞器等理论问题仍是需要深入研究的课题;在长链二元酸工业生产中发酵过程伴随大量生物热释放,烷烃转化率为 50%~70%,其生产成本已成为高档热熔胶、特性工程塑料和高级润滑油等下游产品产业化的限制因素,其中 DCA12 产品还面临来自化学法同类产品的市场竞争。目前,发酵法生产的长链二元酸及其深加工产品占市场需求份额较小,主要原因是受长链二元酸产品的价格和质量所制约,降低生产成本和改进提取工艺是当务之急。获得高转化率的生产菌株是研究开发的一项重要课题,用物理和化学方法诱变的菌株在生产中容易发生回复突变,而且烷烃转化率还有待提高。因此,利用代谢工程构建工程菌株是解决这些问题的一种有效途径。利用代谢工程研究长链二元酸生产菌株 *C. tropicalis* 的代谢网络和代谢流,控制脂酰-CoA 氧化酶或 3-酮脂酰-CoA 硫解酶的活性,适当阻断 β -氧化程度,维持细胞产酸所需的适宜能量供给,调节跨膜通道转运蛋白的活性或转移酶的活性,减少乙酰-CoA 进入线粒体的流量,定向强化脂肪酸进入 ω -氧化途径的代谢通量,实现物质代谢网络和能量代谢网络的经济匹配,有利于日产物的高效生产,提高烷烃转化率和产酸水平,降低生产成本,促进下游产品产业化进程。

参 考 文 献

- [1] Osumi M, Miwa N, Teranishi Y, et al. *Arch Microbiol*, 1974, **99**:181 ~ 201.
- [2] Uemura N. *Hakko to Kogyo*, 1985, **33**:436 ~ 441.
- [3] 刘树臣, 李淑兰, 方向晨. *微生物学报*, 2000, **40**:318 ~ 322.
- [4] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, et al. *Bio/ Technology*, 1992, **10**:894 ~ 898.
- [5] Ueda M, Yamanoi K, Morikawa T, et al. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**:1821 ~ 1828.
- [6] Ueda M, Tanaka A, Fukui S. *Eur J Biochem*, 1982, **124**:205 ~ 210.
- [7] 中国科学院微生物研究所烃代谢组. *微生物学报*, 1981, **21**:88 ~ 95.
- [8] Yi Z H, Rehm H J. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1982, **15**:175 ~ 179.
- [9] Kunau W H, Dommes V, Schulz H. *Prog Lipid Res*, 1995, **34**:267 ~ 342.
- [10] Kawamoto S, Nozaki C, Tanaka A, et al. *Eur J Biochem*, 1978, **83**:609 ~ 613.
- [11] Shimizu S, Yasui K, Tani Y, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1979, **91**:108 ~ 113.
- [12] Okazaki K, Takechi T, Kambara N, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**:1232 ~ 1236.
- [13] Okazaki K, Tan H, Fukui S, et al. *Gene*, 1987, **58**:37 ~ 44.
- [14] Picataggio S, Deanada K, Mielenz J. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, **11**:4333 ~ 4339.
- [15] Kurihara T, Ueda M, Tanaka A. *FEBS Letters*, 1988, **229**:215 ~ 218.
- [16] Kamasawa N, Naito N, Kurihara T, et al. *Cell Structure and Function*, 1992, **17**:203 ~ 207.
- [17] Kanayama N, Ueda M, Atomi H, et al. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**:690 ~ 698.
- [18] Kanayama N, Ueda M, Atomi H, et al. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, **78**:273 ~ 278.
- [19] Kawamoto S, Ueda M, Nozaki C, et al. *FEBS Letters*, 1978, **96**:37 ~ 40.
- [20] Fukui S, Tanaka A. *Trends Biochem Sci*, 1979, **4**:246 ~ 249.
- [21] Kawachi H, Atomi H, Ueda M, et al. *Eur J Biochem*, 1996, **238**:845 ~ 852.
- [22] Atomi H, Yu C, Hara A, et al. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, **77**:205 ~ 207.
- [23] Haas L O C, Cregg J M, Gleeson M A G. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**:4571 ~ 4577.
- [24] Hara A, Ueda M, Matsui T, et al. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, **87**:717 ~ 720.
- [25] Hara A, Ueda M, Misawa S, et al. *Arch Microbiol*, 2000, **173**:187 ~ 192.