

# 热带假丝酵母转化烷烃过程中 P450 酶活的研究\*

焦 鹏 华玉涛 李书良 黄英明 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

关键词 热带假丝酵母 烷烃 长链二元酸 细胞色素 P450 酶 CO 差光谱

中图分类号 Q939.1 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2001)01-0117-04

$\alpha$ -、 $\omega$ -长链二元酸( $\alpha$ -、 $\omega$ -Long Chain Dicarboxylic Acid, DCA)是一种重要的化工原料,是合成工程塑料、香料、耐寒性增塑剂、涂料和液晶等物质的主要原料。目前,人们主要通过热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)代谢烷烃来生产从 DCA<sub>11</sub>到 DCA<sub>18</sub>等不同碳链长的二元酸<sup>[1,2]</sup>。

多年来在各种微生物,尤其是假丝酵母的烷烃氧化途径方面有大量的研究<sup>[3,4]</sup>。在假丝酵母转化烷烃生成长链二元酸的代谢过程中<sup>[5-7]</sup>,烷烃被吸引进入细胞后,首先经过细胞色素 P450 酶(Cytochrome P450)氧化生成 $\alpha$ -一元醇,再进一步被氧化生成 $\alpha$ -一元酸,引过程称为 $\alpha$ -氧化。接着 $\alpha$ -一元酸经过同样的酶系催化,经过 $\omega$ -氧化途径被氧化生成目标产物 $\alpha$ -、 $\omega$ -二元酸。在烷烃的 $\alpha$ -、 $\omega$ -氧化过程中,其中的细胞色素 P450 酶是关键酶,所以在研究假丝酵母细胞代谢烷烃的过程中,对于 P450 酶活的研究是十分重要的。从目前国内有关长链二元酸的研究来看,其重点主要还是在生产长链二元酸菌株的诱变筛选以及发酵工艺的改造,还没有深入到烷烃代谢途径中酶学的研究。我们在参考了国外有关细胞色素 P450 酶研究的基础上<sup>[8-10]</sup>,逐步建立了研究 P450 酶的方法,这对进一步深入研究和提高二元酸的产率有重要的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)来源于清华大学化工系生物化工研究所。

### 1.2 培养基

种子培养基:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4g/L; NaCl 1.0g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0g/L; 蔗糖 20g/L 酵母膏 1g/L 玉米浆 1g/L 烷烃 50mL/L pH6.5。

发酵培养基:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4g/L; NaCl 1.0g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0g/L; 蔗糖 20g/L 酵母膏 1g/L 玉米浆 1g/L 烷烃 50mL/L pH6.5 进入产酸期后,补加烷烃至 100mL/L,并将 pH 提高到 7.5。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞中细胞色素 P450 酶活力检测方法<sup>[10-12]</sup>:将待测细胞离心收集后,用 TE 缓冲液(pH7.2, Tris 50mmol/L, EDTA 1mmol/L)洗涤细胞,离心,收集细胞。称取 50mg 的湿菌体,加入 1mL 的溶液 A (1% Tween20 40% 甘油 5mmol/L Dithiothreitol, 1mmol/LEDTA, 用 pH7.2 磷酸缓冲液定容),混匀;加入 0.1mL KCN 溶液 KCN 0.1mol/L, Tris 50mmol/L, EDTA 1mmol/L, pH7.2),混匀,于冰浴中放置

\* 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-04-02);国家自然科学基金重点项目(20036010);国家自然科学基金项目(30000003 29976022);中国博士后科学基金项目,中国石油化工总公司基础研究重点项目(x598022)

作者简介 焦 鹏(1972-),男(满族),内蒙古人,博士,清华大学博士后,目前从事代谢工程研究。

收稿日期 2000-01-28, 修回日期 2000-05-12

15min。将细胞悬液分成 2 份(分开前混匀),其中一个用 CO 气体鼓泡 5min,然后用 CO 差光谱法测量。所用仪器为 Shimadzu UV3000 扫描仪,波长范围为 400~500nm。扫描结果中,细胞悬液在波长 450nm 的吸光率即代表细胞中 P450 酶的活性<sup>9-12</sup>。

**1.3.2 不同浓度的烷烃对 P450 酶的诱导作用** 从平板上挑取单菌落接种于种子培养基的基液(不含烷烃)中培养 36h 后,吸取 5mL 菌液加入含 100mL 种子培养液(分别加入 0%、2%、4%、5% 和 8% 的烷烃)的三角瓶,经过 36h 的培养后,测定细胞的 P450 酶活。同时测定不同烷烃浓度培养液中的菌干重。

**1.3.3 发酵过程中细胞 P450 酶活的变化** 在发酵过程中,在生长阶段每 6h 取样测细胞酶活力,进入产酸期后,每 4h 测定细胞酶活力,同时测量二元酸的产量和细胞干重。

## 2 结果和讨论

### 2.1 烷烃对 P450 酶的诱导作用

早在 80 年代,我国就有文献报道<sup>6</sup>在种子培养基中加入烷烃可以提高二元酸的产酸量,但是当时并没有给出其生物学机理,只是猜测烷烃可能对烷烃代谢途径中某些酶有诱导作用。我们通过对不同浓度烷烃对 P450 酶活的影响,证明了这种诱导作用的存在。P450 酶作用烷烃代谢过程中的关键酶,其活力的提高也必然会提高细胞的产酸能力。图 1 显示了在不同烷烃浓度中经过 36h 培养的细胞的 P450 酶 CO 差光谱图(只显示了其中 2 个浓度的谱图,其它的略去)。由于在 450nm 的波长处通过 CO 差光谱所测得的吸光率即代表细胞 P450 酶的活性,所以可以从图中看出,在 8% 浓度的烷烃培养液中生长以后,细胞中 P450 酶在 450nm 的波长处所显示出明显的峰值,表示此时 8% 烷烃培养液中细胞有更高的 P450 酶活。

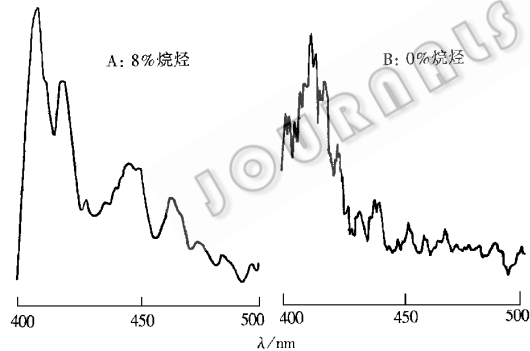


图 1 在不同浓度的烷烃培养条件下细胞的 CO 差光谱图

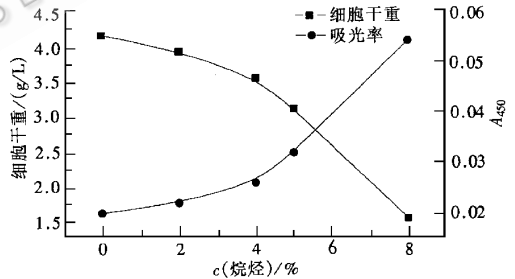


图 2 不同烷烃浓度培养条件下 P450 酶活曲线

通过对经过不同浓度烷烃培养的细胞 P450 酶活的测量,可以看出随着烷烃浓度的增高,P450 酶活也随着增大(图 2)。由于没有进一步提高底物烷烃的浓度,所以,并没有获得细胞 P450 酶活的一个上限,但 8% 烷烃浓度以内的测量结果可以看出,P450 酶活随底物烷烃浓度的变化,并没有出现米氏方程的变化规律,而是初步显示了变构酶的“S”型的变化规律,有关这一方面的研究,我们正在深入进行。此外,在实验中发现,虽然 P450 酶活随底物烷烃浓度的升高而升高,但是高浓度的烷烃却对细胞的生长有抑制作用。从实验结果可以看出,5% 烷烃浓度下,细胞的生长还没有被明显的抑制,而细胞的 P450 酶也可以被很好的诱导。

### 2.2 在二元酸发酵过程中 P450 酶活变化

在二元酸的发酵过程中,细胞首先经过 24h 的生长期,在这个过程中,细胞主要处于分裂生长状态。

其中的 P450 酶表达很少。在接种的初期,所测得的细胞 P450 酶活较高,主要在于此时的细胞 P450 酶活体现了原来种子培养液中细胞的 P450 酶活,但从图 3 中看出,在细胞迟滞期即将结束时,细胞的 P450 酶活降到最低点,此时细胞开始主要合成于生长繁殖有关的酶系。此后,在细胞的对数生长期,细胞 P450 酶活保持在一个相对平稳的升高过程。在细胞的对数生长期末期,通过补加烷烃和提高培养液的 pH 值,促使细胞进入产酸期。在二元酸发酵体系中, pH 值对 P450 酶活的影响还不十分清楚,但从图 3 看出,随着 pH 值的升高和烷烃的加入,细胞的 P450 酶活出现了一定的降低,说明培养条件的改变对细胞的 P450 酶活产生了影响。在经过一定时间的迟滞后,细胞 P450 酶活迅速增高,细胞的产酸速率也随着增高,说明细胞烷烃对于 P450 酶的诱导存在一个延迟期。此外,从图 3 可以看出,细胞产酸速率相对于细胞 P450 酶活的增高,也有一个相对的延滞,当 P450 酶活达到最高的时候,又过了 8h,细胞的产酸速率才达到最高的  $1.64\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ,这可能是因为细胞的产酸还涉及到二元酸的分泌以及细胞对烷烃的吸收等问题。在产酸期的后期, P450 酶活和产酸速率都有一定的降低,这可能和细胞的活力以及培养液中烷烃浓度的降低有关。

从图 3 中的实验结果可以看到,在发酵 52h 后,即细胞进入产酸期 28h 后,细胞 P450 酶活达到最大( $\text{CO}$  差光谱吸光率  $A_{450} = 0.0455$ )。此外,从图 2 可以看到,在 8% 烷烃浓度的种子培养基中,经过 36h 的培养,细胞 P450 酶显示了更高的酶( $\text{CO}$  差光谱吸光率  $A_{450} = 0.0548$ ),这说明细胞色素 P450 酶活一方面与烷烃的浓度和诱导时间有关;另一方面,虽然在转产酸的初期发酵体系中的烷烃浓度为 10%,但随着 P450 酶活的快速增加和产酸速率的增加,细胞快速消耗烷烃产生生长链二元酸,所以,当细胞 P450 酶活达到最大时,此时发酵体系中的烷烃浓度已低于 10%,只接近 7% 左右。而在图 2 所显示的烷烃诱导 P450 酶的实验中,由于细胞在生长过程中只消耗非常少量的烷烃,所以即使经过 36 小时的培养,在培养体系中烷烃浓度依然接近初始的水平,从而在 8% 烷烃初始浓度的种子培养基中对 P450 酶进行诱导,获得了比初始烷烃浓度 10% 的发酵产酸条件下更高的 P450 酶活。

所以,当细胞 P450 酶活达到最大时,此时发酵体系中的烷烃浓度已低于 10%,只接近 7% 左右。而在图 2 所显示的烷烃诱导 P450 酶的实验中,由于细胞在生长过程中只消耗非常少量的烷烃,所以即使经过 36 小时的培养,在培养体系中烷烃浓度依然接近初始的水平,从而在 8% 烷烃初始浓度的种子培养基中对 P450 酶进行诱导,获得了比初始烷烃浓度 10% 的发酵产酸条件下更高的 P450 酶活。

### 3 讨论

在研究热带假丝酵母代谢烷烃生产二元酸的过程中,人们已知在烷烃的代谢过程中 P450 酶是  $\alpha$ - $\omega$ -氧化的关键酶。我们在研究中证实了在种子培养基中(或发酵的生长阶段)加入烷烃确实可以促进细胞 P450 酶活的提高。在烷烃代谢中充当重要作用的 P450 酶,也是一个细胞的“解毒”工具<sup>[10,12]</sup>。在高浓度的烷烃条件下,由于烷烃本身并不利于细胞的生长,但是却促进了 P450 的表达。通过对在不同的烷烃初始浓度培养条件下细胞生长和 P450 酶活的研究,表明 5% 的烷烃初始浓度既对诱导细胞 P450 酶活有利,又无明显的抑制细胞的生长。

通过对发酵过程 P450 酶活变化的研究表明,在细胞的对数生长期, P450 表达量是相对较低,这也从一个侧面反应出细胞的自我调节能力。在进入产酸期后, P450 酶活增大,同时细胞产酸速率增加,也充分说明 P450 酶活与细胞的产酸能力密切相关。

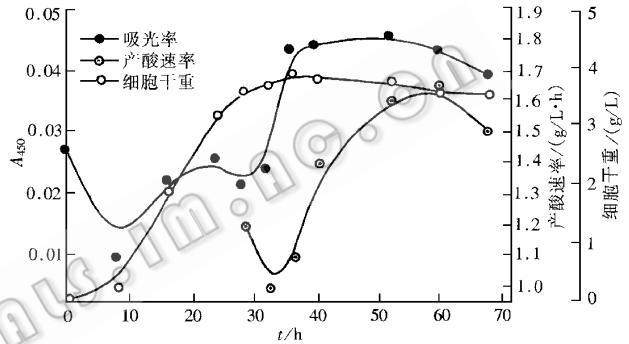


图 3 P450 酶活及产酸速率曲线

### 参 考 文 献

- [ 2 ] 陈远童 郝秀珍. 生物工程学报, 1989, 3(3): 241~245.
- [ 3 ] Chattaway F W, Shenolikar S, R. *J Gen Microbiol*, 1976, 95: 335~347.
- [ 4 ] Erdsieck B, Rietma K. *Antone van Leeuwenhoek* 35, Supp :Yeast Symp, 1969. 19~21.
- [ 5 ] Chan E C, Kuo J, Lin H P, et al. *Appl Micro Biotechnol*, 191, 34: 772~777.
- [ 6 ] 刘祖同 易祖华. 北京轻工业学院学报, 1984, 1(1): 88~96.
- [ 7 ] Kappeli O, Fiechter A. *Biotechnol Bioeng*, 1976, 18: 967~974.
- [ 8 ] Thomas Z, Moriya O, Akinori O, et al. *Biochem Biophy Research Communications*, 1996, 224(3): 784~789.
- [ 9 ] Shaw G C, Kao H S, Sung C C et al. *Current Microbiol*, 1997, 35: 28~31.
- [ 10 ] English N, Hughes V, Wolf C R. *J Biol Chem*, 1994, 269(43): 26836~26841.
- [ 11 ] Iida T, Ohta A, Takagi M. *Yeast*, 1998, 14: 1387~1397.
- [ 12 ] Omura T, Sato R. *J Biol Chem*, 1964, 239(7): 2370~2378.

## STUDY ON THE CYTOCHROME P450 ACTIVITY IN ALKANE CONVERTING PROCESS OF *CANDIDA TROPICALIS* \*

Jiao Peng Hua Yutao Li Shuliang Huang Yingming Cao Zhu'an  
(Department of Chemical Engineering, Institute of Biochemical Engineering,  
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract**: A method of reduced CO-difference spectrum was established to study the cytochrome P450 activity of the whole cell of *Candida tropicalis* during the alkane converting process. Using this method, the cytochrome P450 activities of the whole cells that were cultured in the different concentrations of alkane were studied. The results showed that the 5% alkane could induce the cytochrome P450 activity obviously but not inhibit the growth of cells, so it was determined preliminarily that the alkane concentration of the seed medium was 5%. The cytochrome P450 activities of dicarboxylic acid (DCA) fermentation processing were further studied. During the exponential phase of growth, the cytochrome P450 activity increased smoothly. However, during the phase of production of dicarboxylic acid, the cytochrome P450 activities increased rapidly after a sort decrease. The results still showed that the rate of production of dicarboxylic acid increased with the cytochrome P450 activity.

**Key words**: *Candida tropicalis*, Alkane, Long chain dicarboxylic acid, Cytochrome P450, Reduced CO-difference spectrum

\* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Developemn( 96-C03-04-02 )

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund( 20036010, 30000002, 29976022 )