

流加 H_2O_2 对提高供氧及微生物代谢的影响*

李书良 焦 鹏 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

Effects of H_2O_2 Addition on Oxygen Supply and Metabolism of Microorganisms

Li Shuliang Jiao Peng Cao Zhuan

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

关键词: 供氧, H_2O_2 , 细胞色素 P450 酶

中图分类号: Q815 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2002) 01-0129-04

在大部分的需氧发酵中, 供氧通常是通过向发酵液通气来实现的。在某一临界细胞浓度时, 供氧不能满足细胞生长所需, 成为细胞生长的限制基质, 进而导致细胞密度和产品浓度较低^[1]。传统方法改善供氧主要是从反应器设计和工艺等方面考虑, 如增大搅拌速率, 提高通气速率, 使用纯氧通气, 提高罐压等。但由于氧气的溶解度低以及机械和操作上的原因, 其操作范围有限。近年来出现了一些新的方法来改善发酵过程中的供氧问题, 如加入氧载体^[1-3], 流加 H_2O_2 ^[4-7], 与藻类共培养^[8-10], 以及通过基因克隆转入携带氧的基因等方法。本文将着重讨论流加 H_2O_2 时, 对提高供氧及微生物代谢的影响。

1 采用 H_2O_2 供氧的优点

发酵过程中采用 H_2O_2 供氧有很多优点: 1) H_2O_2 供氧与通气供氧结合, 适宜的 H_2O_2 流加浓度和流加方式可以提高发酵体系的细胞密度; 2) H_2O_2 可以在过氧化氢酶的催化下分解放出氧气, 在反应不是非常剧烈的情况下, 氧气将直接以分子形式传给细胞, 不会形成气-液传质阻力, 提高了氧气的传质速率; 3) 对于剪切力敏感及非常粘稠的发酵体系, 流加 H_2O_2 提供了一种提高供氧的方法; 4) H_2O_2 供氧还可能改变菌体的代谢途径, 促进菌体利用更为有效的代谢途径来合成产物。例如, Sriram^[11] 等人在用 *Xanthomonas campestris* 生产黄原胶时进流加 H_2O_2 的实验表明产物可能是通过一种更为有效的方式合成的。此外, 加入 H_2O_2 还具有对细胞毒性低、成本低、操作简单及不会为产物分离带来困难等优点。

2 发酵体系中流加 H_2O_2 对菌体生长、产物生成的影响

采用 H_2O_2 供氧常常会对细胞产生损害, 这除了 H_2O_2 本身在一定浓度对细胞有损害作用外, 更多的是由于 H_2O_2 在过氧化氢酶的催化作用下可以分解形成一些自由基, 如超氧阴离子 (O_2^-), 羟基自由基 ($OH\cdot$), 原子氧等。它们会阻碍 DNA、RNA 和蛋白质的生物合成^[17]。跨膜的电子传递链是 O_2^- 生成的主要位点, 当电子穿过线粒体电子传递链和 P450 酶系统时, 本来结合很紧的电子有时会丢失, 使得氧气被

* 国家“九五”科技攻关项目 (96-C03-0402); 国家自然科学基金重点项目 (20036010); 国家自然科学基金 (29976022) 中国石化总公司基础研究项目 (x598022)

作者简介: 李书良 (1977-), 女, 辽宁人, 清华大学博士研究生, 目前从事微生物反应工程研究。

收稿日期: 2001-02-26, 修回日期: 2001-08-07

还原成 O_2^- 。核膜也有一个可以产生 O_2^- 的电子传递链,因此可能会损伤 DNA。细胞膜上或靠近细胞膜上产生的 O_2^- 会修饰脂类的羰基基团,对细胞膜产生损害作用。由于细胞本身有一些抗氧化机制,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、维生素 E 等^[12],它们能够降低这种损害作用。大部分需氧细胞内通常含有过氧化氢酶,用来抵御细胞在代谢氧气过程中产生的 H_2O_2 。因此只要加入的 H_2O_2 浓度较低,损害是可以避免的,特别是对于含有过氧化氢酶的微生物。例如, Schlegel^[5] 等人在研究 H_2O_2 对 *Alcaligenes eutrophus* 生长影响时发现,当初始 H_2O_2 浓度为 11mmol/L 时,细胞不生长,而 H_2O_2 浓度为 8mmol/L 时,细胞生长不受影响。这是因为基质中的 H_2O_2 在接种的瞬间就以很快的速率被分解,细胞接触 H_2O_2 的时间只有几分钟。而当 H_2O_2 浓度为 22mmol/L 时,细胞的呼吸作用受到了抑制,但由于该细胞含有过氧化氢酶,因此细胞的呼吸代谢并没有发生不可恢复的损害。

Holst^[7] 等人在研究 *Gluconobacter oxydans* 发酵生产二羟丙酮(dihydroxyacetone, DHA)时,通过不同浓度 H_2O_2 对产 DHA 影响的实验发现,加入 H_2O_2 能够提高 DHA 生产速率,并随着浓度的升高产率加快。Sriram^[11] 等人在用 *Xanthomonas campestris* 生产黄原胶时进行了 H_2O_2 流加,得到最大黄原胶浓度为传统发酵的 1.69 倍,单位基质的黄原胶的得率 $Y_{P/S}$ 大约是传统培养方法的 1.75 倍。采用流加 H_2O_2 进行培养可以克服气-液传质阻力,也就克服了氧气限制问题,因此黄原胶的得率较高。

从以上各实例中我们可以看到,通过优化 H_2O_2 浓度,可以使细胞几乎不受损害。此外,还可以通过改变 H_2O_2 的流加速度和浓度,满足产物生成所需要的溶氧,来提高产物的产率和浓度。

3 H_2O_2 对酶及代谢的影响

我们在研究 H_2O_2 对热带假丝酵母发酵生产长链二元酸影响的实验中发现,向发酵体系中流加 H_2O_2 对菌体产酸有促进作用,这不仅是由于 H_2O_2 的加入,提高了对菌体的供氧,更重要的是它可能改变了菌体的代谢途径。加入 H_2O_2 对烷烃转化为长链二元酸的一个关键酶细胞色素 P450 酶起到了诱导作用,使这个酶的活性大大提高,从而促进了烷烃的 α 、 ω -氧化过程,因此提高了菌体产酸。

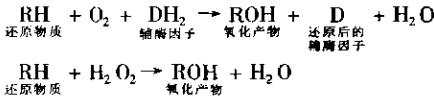
3.1 H_2O_2 对烷烃代谢过程中的关键酶—细胞色素 P450 酶的诱导作用

H_2O_2 在过氧化氢酶的催化下除了产生水和氧气外,还可以以其它形式在细胞内存在,如超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($OH\cdot$)以及过氧化氢(H_2O_2)等^[13-14],它们是一类活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS 参与了细胞的生长调节、细胞凋亡以及调节基因表达的过程^[15-16],其中最主要的是它可以作用于细胞的信号系统和启动基因的表达。当细胞内的 ROS 浓度高于一个忍受浓度时,细胞可以启动遗传程序来适应高浓度的 ROS。ROS 作为细胞内的信使激活转录因子和促进细胞外信号对基因的表达,其中转录因子可以和 DNA 的特异操纵子结合并诱导基因表达。一些研究表明细菌在过量的过氧化氢中培养后,会合成多种新的蛋白质,这些蛋白质有巨大的保护和修复机能,此机制称为 SOS 应答^[13]。 H_2O_2 对热带假丝酵母细胞色素 P450 酶的诱导作用便可能是细胞启动遗传程序发生 SOS 应答的一种表现。 H_2O_2 作为细胞内信使参与调节细胞内蛋白质和酶系的表达,对热带假丝酵母代谢烷烃过程中的关键酶—细胞色素 P450 酶起到了诱导作用。

3.2 加入 H_2O_2 后细胞可以利用一个高效稳定的 H_2O_2 旁路代谢烷烃

细胞色素 P450 酶所催化的是一个氧化还原反应,它在烷烃的代谢中起着重要作用。细胞色素 P450 酶含有一个带有铁离子的卟啉基团,通过铁离子的氧化态与还原态之间的循环来实现电子传递过程,同时将一个氧原子插入到底物中。这一反应过程需要一个复杂的辅酶因子再生系统(由多个氧化还原蛋白构成),稳定性较低^[17]。复杂的辅酶因子再生过程使得细胞不能快速而有效的将烷烃转化为一元醇,而烷烃转化为一元醇的反应是烷烃进行代谢的第一步反应,因此细胞色素 P450 酶的活性成为制约烷烃转化为二元酸的瓶颈。

现已发现,在细胞色素 P450 酶中有一个 H_2O_2 代谢旁路^[17](见图 1),细胞色素 P450 酶将氧原子插入烷烃或烯烃时,也会利用 H_2O_2 旁路^[18]。加入 H_2O_2 后,烷烃可以通过这一旁路被氧化。由于这一旁路不需要辅酶因子,省去了再生辅酶因子的复杂过程,直接从卟啉铁复合物(PFe^{II})变成它的氧化态(PFe^V),因而它是一个更为有效和快速的代谢过程,提高最终产物浓度和烷烃转化速率。从下面的反应式中我们可以看到二者的不同。



加入 H_2O_2 后,由于增加了这一代谢旁路,它可以使烷烃通过一个更加稳定而简捷的途径代谢为一元醇,进而促进产酸。但是,在通常的情况下, H_2O_2 旁路途径并不十分有效,它可能只是与主流途径并存的一个弱化了了的途径。如果能强化这一途径,那么便有可能使烷烃更好地利用这一高效稳定的途径进行氧化,从而提高烷烃转化率和产酸速率。

4 问题与展望

在许多微生物需氧发酵过程中,供氧不足是普遍存在的一个问题。采用流加 H_2O_2 的方法不仅可以提高供氧,并且对菌体的代谢也有影响。这种改善供氧的方法操作简单,对反应器设计要求较低(仅仅需要增加一个流加控制即可),并且不会给后续的产品分离造成困难,目前已有在利用酵母、细菌发酵中通过流加 H_2O_2 来改善供氧的报道^[4-7,11]。流加 H_2O_2 来改善供氧最突出的问题是 H_2O_2 对菌体的损害作用。这可以通过优化 H_2O_2 的流加浓度、选择流加方式等手段来解决。

由于 H_2O_2 不仅可以改善发酵体系的供氧,而且还影响菌体的代谢,因此它对最终产物浓度、细胞浓度以及产率的影响是流加 H_2O_2 过程中值得关注的地方。尤其值得一提的是 H_2O_2 对细胞代谢过程中关键酶的影响,如 H_2O_2 对细胞色素 P450 酶的影响。细胞色素 P450 酶在 H_2O_2 存在下可以利用 H_2O_2 旁路来将氧原子插入到一系列的化合物中,并且不需要一系列的辅酶因子再生过程,这为细胞色素 P450 酶的工业应用提供了可能。细胞色素 P450 酶在氧化还原反应过程中的区域选择性有潜在的商业价值。

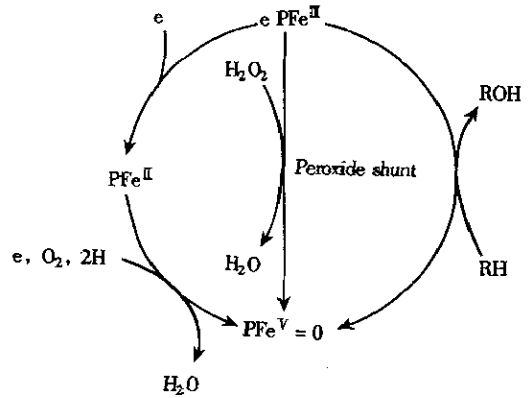


图 1 细胞色素 P450 酶催化烷烃氧化过程
P 代表卟啉基团,通常情况下,细胞色素 P450 酶通过环路在卟啉铁的氧化态与还原态之间循环,在以 H_2O_2 供氧时,细胞色素 P450 酶可以直接通过一个 peroxide shunt 代谢旁路来进行氧化还原反应。

参 考 文 献

- [1] Junker B H, Alan Hatton T, Wang D. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35(3): 578 ~ 585.
- [2] Van Sonsbeek H M, De Blank H, Tramper J. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 40(4): 713 ~ 718.
- [3] Elibil M, Mavituna F. *Process Biochemistry*, 1996, 31(3): 507 ~ 512.
- [4] Van Der Hoeven J S, Hoogendoorn H. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1990, 57(1): 91 ~ 95.
- [5] Shlegel H G. *Biotechnol Bioeng*, 1977, 19(3): 413 ~ 424.
- [6] Ibrahim M, Schlegel H G. *Biotechnol Bioeng*, 1980, 22(10): 1877 ~ 1894.
- [7] Holst O, Erfors S, Mattiasson B. *Europ Journal of Appl Microb Biotechnol*, 1982, 14(1): 64 ~ 68.
- [8] Adlercreutz P, Mattiasson B. *Enzyme Microb Technol*, 1982, 4(3): 332 ~ 336.
- [9] Adlercreutz P, Holst O, Mattiasson B. *Enzyme Microb Technol*, 1982, 4(3): 395 ~ 440.

- [10] Chevalier P. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**(1): 19 ~ 23.
- [11] Sriram G, Manjula Y, Suresh A K, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**(4): 714 ~ 723.
- [12] Lin A, William M. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **40**(4): 505 ~ 516.
- [13] 王爱民, 马 春. 生命的化学: 中国生物化学通讯, 1998, **18**(4): 25 ~ 26.
- [14] 李福洋, 惠 宏. 生命科学, 1999, **11**: 28 ~ 31.
- [15] Goldstone S D, Fragonas J C, Jeitner T M, et al. *Biochemic et Biophysica Acta*, 1995, **21**: 114 ~ 122.
- [16] Clopton D A, Saltman P. *Biochemical and Biophysical*, 1995, **210**(1): 189 ~ 196.
- [17] Sheldon R. *Nature*, 1999, **399**: 636 ~ 637.
- [18] Joo H, Lin Z, Arnold F H. *Nature*, 1999, **399**: 670 ~ 673.
- ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>