

二元酸发酵过程中流加 H_2O_2 对细胞色素 P450 酶 及产物生成的影响*

李书良 华玉涛 黄英明 焦 鹏 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

摘 要 在二元酸发酵过程中流加 H_2O_2 对热带假丝酵母发酵生产二元酸有明显的促进作用, 2mmol/L 的 H_2O_2 对产酸的促进作用最为明显, 比对照提高了 26%。对细胞色素 P450 酶的分析表明, 流加 H_2O_2 对细胞色素 P450 酶的活性有明显的促进作用, 并且细胞色素 P450 酶的活性跟产酸成正相关。此外, 还进一步分析了流加 H_2O_2 对产酸的促进机理。

关键词 热带假丝酵母, 长链二元酸, H_2O_2 , 细胞色素 P450 酶

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)03-0359-05

长链二元酸(Long Chain Dicarboxylic Acid, DCA)是一种重要的化工原料,它是合成工程塑料、香料、耐寒增塑剂、涂料、液晶等物质的重要原料。目前主要利用热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)转化烷烃生产^[1,2]。热带假丝酵母代谢烷烃的过程如下^[3-5]。烷烃被转运到细胞内部以后,首先经过细胞色素 P450 酶(Cytochrome P450)氧化成 α -一元醇,再进一步被氧化成 α -一元酸,此过程称为 α -氧化。接着 α -一元酸经过同样的酶系催化,经过 ω -氧化途径转化为目标产物— α -、 ω -二元酸。在烷烃 α -、 ω -氧化过程中,细胞色素 P450 酶是一个关键酶,它的活性与菌体产酸能力密切相关^[6]。我们在二元酸发酵过程中进行了 H_2O_2 流加,发现 H_2O_2 对热带假丝酵母产酸有明显的促进作用。对细胞色素 P450 酶活性的分析表明, H_2O_2 对细胞色素 P450 酶有明显的诱导作用。此外,在 H_2O_2 存在的条件下,细胞还可能通过一个过氧化氢旁路(peroxide shunt)途径^[7]来氧化烷烃。

1 材料和方法

1.1 菌种

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)突变株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: $(NH_4)_2SO_4$ 5.0g/L; NaCl 1.0g/L; KH_2PO_4 4.0g/L; Na_2HPO_4 2g/L; $MgSO_4$ 1.5g/L; 蔗糖 20g/L; 玉米浆 1.0g/L; 酵母膏 1.0g/L; 尿素 1.5g/L; 烷烃 50mL/L, pH6.5。

发酵培养基: 同种子培养基, 进入产酸期后, 补加烷烃至 100mL/L, 并将 pH 调至 7.5。

1.3 细胞培养

1.3.1 流加 H_2O_2 的摇瓶培养: 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 100mL 的种子培养液的三角瓶, 36h 后补加烷烃至

* 国家自然科学基金重点项目(20036010), 国家自然科学基金(29976022)

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

收稿日期: 2001-09-17, 修回日期: 2001-12-03 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

50mL/L, 调节 pH 至 7.5, 然后每 3h 补加一次 H_2O_2 , 使得发酵液中 H_2O_2 的浓度分别为 0, 0.1, 0.5, 2.0 和 5.0mmol/L。

1.3.2 流加 H_2O_2 的发酵罐培养: 发酵罐实验在 30℃, 600 r/min 条件下进行。将摇瓶中的种子接入发酵罐中, 菌体进入对数生长期后, 每隔一段时间以脉冲形式流加 H_2O_2 5min, 使 H_2O_2 在发酵罐中的浓度在 10mmol/L 左右, 同时记录尾气氧及尾气二氧化碳的变化。

1.4 分析方法

菌量分析: 干重法。**含酸量分析:** 滴定法。**细胞中细胞色素 P450 酶活力检测方法:** 一氧化碳差光谱法^[8]。所用仪器为 ShimadzuUV3000 扫描仪, 扫描波长范围为 400 ~ 500nm。其中在 450nm 波长处测得的 OD 差值反映了 P450 酶的活性, 差值越大, 说明 P450 酶活性越高。

2 结果和讨论

2.1 H_2O_2 对产酸和细胞色素 P450 酶的诱导作用

菌体培养 36h 后进入产酸期, 开始每 3h 补加一次 H_2O_2 , 使得发酵液中的 H_2O_2 浓度分别为 0, 0.1, 0.5, 2.0 和 5.0mmol/L。从图 1 可以看出, 不同浓度的 H_2O_2 对菌体产酸均有不同程度的促进作用, 其中 2mmol/L H_2O_2 对产酸的促进作用最为明显, 比空白的产酸提高了 26%。分析其原因, 可能是 H_2O_2 的加入改善了供氧, 热带假丝酵母细胞内含有过氧化氢酶, 加入的 H_2O_2 在过氧化氢酶的催化作用下放出氧气, 直接供给细胞进行氧化反应。但是 2mmol/L 的 H_2O_2 对产酸的明显促进作用使我们进而猜想 H_2O_2 可能对细胞内的关键酶起了诱导作用, 为此我们重新研究了流加 H_2O_2 对产酸和细胞色素 P450 酶的影响, H_2O_2 的浓度分别为 0、1、2、4 和 5mmol/L。图 2 显示了细胞色素 P450 酶相对活性与菌体产酸之间的关系。从图中可以看出, 细胞色素 P450 酶的活性与产酸之间成正相关, 细胞色素 P450 酶的活性越高, 对应的产酸也越高。

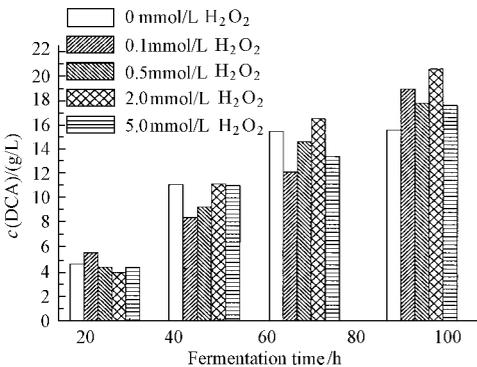


图 1 不同 H_2O_2 浓度对产酸的影响

Fig. 1 Effect of different concentration H_2O_2 on DCA production

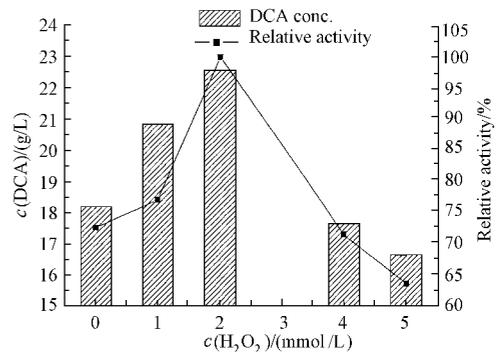


图 2 不同 H_2O_2 浓度下细胞产酸与细胞色素 P450 酶相对活力

Fig. 2 Relative activities of cytochrome P450 and DCA concentration at different H_2O_2 concentration

许多文献指出, 巴比妥盐类和过氧化物酶增殖剂^[9]都可以诱导细胞色素 P450 酶的表达

达。各种生物中的细胞色素 P450 酶是高度保守的,诱导剂对它们的诱导机理也基本相同,都是与其基因上游的转录抑制剂(Bm3R1)相结合,使其与其 DNA 操纵子相分离,从而启动细胞色素 P450 酶的转录。但由于 H_2O_2 的结构很简单,且不稳定,它对细胞色素 P450 酶的诱导机理应该不是与转录抑制剂 Bm3R1 相结合,进而启动 P450 酶的转录。过氧化氢对细胞色素 P450 酶的诱导机理还有待进一步研究。

2.2 流加 H_2O_2 对细胞生长及呼吸代谢的影响

为了考察流加 H_2O_2 对细胞生长的影响,我们在 3L 的发酵罐上进行了生长期流加 H_2O_2 的实验。细胞进入生长期以后,分别在接种后 13.3、17.5、38、41 和 44h 流加 H_2O_2 4min,使得发酵液中 H_2O_2 的浓度不超过 10mmol/L。图 3 显示了细胞生长速率在流加 H_2O_2 过程中的变化情况。流加使得细胞的生长速率变慢,但停止流加后细胞生长又可以逐渐恢复,这表明 H_2O_2 对热带假丝酵母细胞的生长并没有发生不可恢复的损害。进入静止期之后,细胞生长基本不受 H_2O_2 的影响,因此流加 H_2O_2 最好在静止期以后进行。图 4 显示的是流加 H_2O_2 过程中溶氧和尾气 CO_2 组成的变化。溶氧在流加过程中逐渐上升,停止流加后又逐渐恢复到流加前的水平,表明热带假丝酵母细胞内的过氧化氢酶能够将流加进去的 H_2O_2 分解放出氧气。尾气 CO_2 组成的变化表明流加 H_2O_2 对呼吸代谢的影响,流加 H_2O_2 对细胞的呼吸代谢有促进作用。尾气 CO_2 与溶氧有相同的变化趋势,只是比溶氧的变化有一个延迟,这是因为细胞的呼吸代谢涉及到一系列的酶催化反应,要经过一定的适应期。

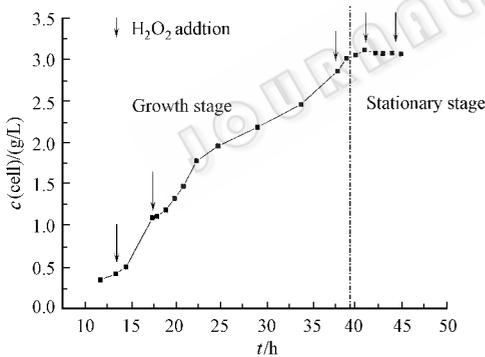


图 3 流加 H_2O_2 对细胞生长的影响

Fig. 3 Effect of H_2O_2 addition on cell growth

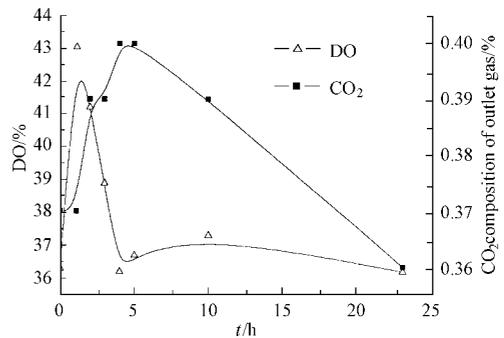


图 4 流加 H_2O_2 过程中溶氧及尾气 CO_2 组成的变化曲线

Fig. 4 Time-profiles of D.O level and out-let CO_2 composition in H_2O_2 addition

2.3 流加 H_2O_2 对细胞色素 P450 酶及产酸促进作用的机理研究

前面已经提到, H_2O_2 对细胞色素 P450 酶的诱导机理应该不是与转录抑制剂 Bm3R1 相结合,我们认为这可能是细胞启动遗传程序发生 $SOS^{[10]}$ 应答的一种表现。 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 ($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基 ($OH\cdot$) 以及过氧化氢 (H_2O_2) 等^[10,11],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^[12,13],其

- [2] 陈远童 郝秀珍. 生物工程学报, 1989 5 :241 ~ 245.
- [3] Chan E C, Kuo J, Lin H P, et al. *Appl Micro Biotechnol*, 191 34 :772 ~ 777.
- [4] 刘祖同 易祖华. 北京轻工业学院学报, 1984 2 :88 ~ 96.
- [5] Kappeli O, Fiechter A. *Biotechnol Bioeng*, 1976 18 :967 ~ 974.
- [6] Picataggio S. Method for increasing the omega-hydroxylase activity in *Candida tropicalis*. USA Patent. 1991, WO91/147.
- [7] Sheldon R. *Nature*, 1999 399 :674 ~ 675.
- [8] 焦 鹏 华玉涛 李书良 等. 微生物学报, 2001 40 :117 ~ 120.
- [9] English N, Hughes V, Wolf C R. *J Biol Chem*, 1994 269 :26836 ~ 26841.
- [10] 王爱民 马 春. 生命的化学 中国生物化学通讯, 1998 18 :25 ~ 26.
- [11] 李福洋 惠 宏. 生命科学, 1999 11 :28 ~ 31.
- [12] Goldstone S D, Fragonas J C, Jeitner T M, et al. *Biochem et Biophysica Acta*, 1995 21 :114 ~ 122.
- [13] Clopton D A, Saltman P. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1995 210 :189 ~ 196.
- [14] Joo H, Lin Z, Arnold F H. *Nature*, 1999 399 :670 ~ 673.

Effects of H₂O₂ Addition on Cell Growth and Product Formation in Long-chain Dicarboxylic Acid Fermentation^{*}

Li Shuliang Hua Yutao Huang Yingming Jiao Peng Cao Zhu 'an

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

Abstract : When *Candida tropicalis* was cultivated in shakig-flask with the H₂O₂ addition , DCA (Dicarboxylic Acid , DCA) concentration was increased , especially at 2mmol/L H₂O₂ concentration. The cytochrome P450 activity assays indicated that H₂O₂ addition significantly increased the activities of cytochrome P450 and DCA production positively correlated with the activities of cytochrome P450. The study on the cell growth demonstrated that the H₂O₂ addition inhibited the cell growth rate. However , the retarding effect was not irreversible since the cell growth rate could recover slowly to the original level after the H₂O₂ addition was halted. The mechanism of inducement on cytochrome P450 by H₂O₂ addition was also discussed in this article.

Key words : *Candida tropicalis* , Long chain dicarboxylic acid , Hydrogen peroxide(H₂O₂) , Cytochrome P450

^{*} Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-C03-04-02)
Project Granted by Chinese National Natural Science Fundation(20036010 , 300002 , 29976022)