

# 热带假丝酵母长链二(脂)酰辅酶 A 合成酶的形成及性质\*

余志华 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 具有不同碳链的二(脂)酰 CoA 合成酶的活力, 原始菌 No. 1230 的十二二酰 CoA 合成酶的活性较其突变株  $U_{3-21}$  高近一倍。生长碳源对酶的形成有一定的影响。十二二酰 CoA 合成酶需有 ATP、CoASH 才显示活性。酶作用的最适 pH 在 6—8, 最适温度为 30℃。该酶耐热性极差, 50℃, 5 分钟酶活全部丧失。ADP、AMP、KF、 $Zn^{2+}$  及 8-羟基喹啉、2, 4-二硝基苯酚、高浓度的 EDTA 和尿素对酶活性有抑制作用。

**关键词** 热带假丝酵母; 长链二(脂)酰辅酶 A 合成酶

正烷烃氧化一般归纳为三种方式: (1) 末端甲基氧化形成醇、醛、酸; (2) 次末端亚甲基氧化形成甲基酮; (3) 两端甲基氧化形成二羧酸。我们从热带假丝酵母 No. 1230 诱变出的  $U_{3-21}$  菌株, 发酵长链正烷烃, 稳定地在发酵液中积累 5% 以上相应链长的二羧酸, 已投入商品化生产。它是先将正烷烃两端甲基氧化生成二羧酸, 再经  $\beta$ -氧化将链切断。  $U_{3-21}$  菌能大量积累长链二羧酸, 这是由于它的  $\beta$ -氧化能力的减弱。进行  $\beta$ -氧化, 须先活化羧酸形成酰基 CoA 衍生物, 再进入  $\beta$ -氧化途径。  $U_{3-21}$  菌氧化长链二羧酸能力的减弱, 是二酰 CoA 合成酶还是  $\beta$ -氧化酶系活力的减弱, 不得而知。Azoulay 等<sup>[1]</sup>曾报道过长链二酰 CoA 合成酶的测定。我们首先测定了  $U_{3-21}$  菌的二酰 CoA 合成酶的活性并与原始菌株 No. 1230 相比较。并较深入地研究了生长碳源对酶形成的影响及十二二酰 CoA 合成酶的某些性质。

## 材料和方法

### (一) 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) No. 1230 及其突变株为  $U_{3-21}$ , 为烃代谢组保藏菌株。

### (二) 菌体培养和收集

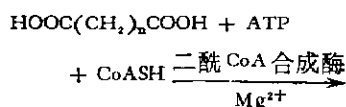
培养基组成(%):  $KH_2PO_4$  0.8,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05, 酵母膏 0.05, 玉米浆 0.03, 尿素 0.15 和长链混合烃( $C_{14}-C_{18}$ ) 3.0(V/V), 自然 pH (约 5.0)。菌种接于合成培养基中, 置 28℃ 旋转摇床上振荡培养 48 小时。4000r/min 离心收集对数期细胞, 用 0.9% KCl 溶液洗涤两次, 用 0.1M pH 7.5 的磷酸盐缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液洗一次。菌体悬浮于该溶液中(湿菌体: 缓冲液为 1:1)。

### (三) 无细胞提取液的制备

菌悬液经 19KC 超声处理 5 分钟, 然后在 12,000r/min 离心 40 分钟, 取上清液为无细胞提取液。

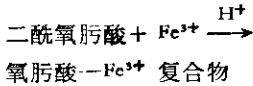
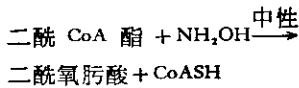
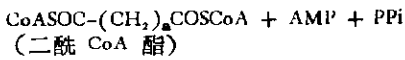
### (四) 十二二酰 CoA 合成酶活性的测定

按照 Azoulay 和 Davnjak 的方法<sup>[1]</sup>测定形成的氧脂酸盐的量, 以此表示二酰 CoA 合成酶的活力。反应式如下:



本文于 1985 年 7 月 13 日收到。

\* 本工作在方心芳先生直接指导下进行, 张树政先生给予很多指导, 并审阅此稿, 提出宝贵意见, 在此一并致谢。



反应系统中加入还原型 CoASH 量为 360—420 单位(用 PTA 酶紫外法<sup>[2]</sup>进行标定)。反应终止后,形成可溶的和不可溶于水的两部分氧肟酸化合物。氧肟酸含量测定如下:于离心清液中加入 0.5ml 10%FeCl<sub>3</sub>-0.2NHCl 溶液,显玫瑰紫色;沉淀物用 2ml 无水乙醇溶解,加 2ml Hill<sup>[3]</sup> 稀释液显色,分别在 520nm 用 0.5cm 比色杯测吸收度。按 Hill 定酯法绘制标准曲线(图 1),查出氧肟酸盐形成的微克分子数,计算十二酰 CoA 合成酶

的活力。比活力以每毫克蛋白每分钟催化形成氧肟酸盐的微克分子数来表示 (nmol/mg 蛋白/min)。蛋白浓度用 Folin-酚法<sup>[4]</sup>测定。

## 结 果

### (一) 热带假丝酵母的二酰 CoA 合成酶活力的测定

用上述无细胞提取液测得的热带假丝酵母 No. 1230 的十二酰 CoA 合成酶的活力为 3.9 单位,其突变株 U<sub>3-21</sub> 为 1.9 单位。原始菌 No. 1230 的酶活力约为 U<sub>3-21</sub> 的 2 倍。

无细胞提取液对不同碳链长的二羧酸的活化作用见图 2。热带假丝酵母具有活化二羧酸的酶系,它对不同链长的二羧酸显示不同的活性。U<sub>3-21</sub> 菌的酶活皆比 No. 1230 低 50 % 左右(见表 1)。

### (二) 生长碳源对热带假丝酵母的乙酰 CoA 合成酶和十二酰 CoA 合成酶活力的影响

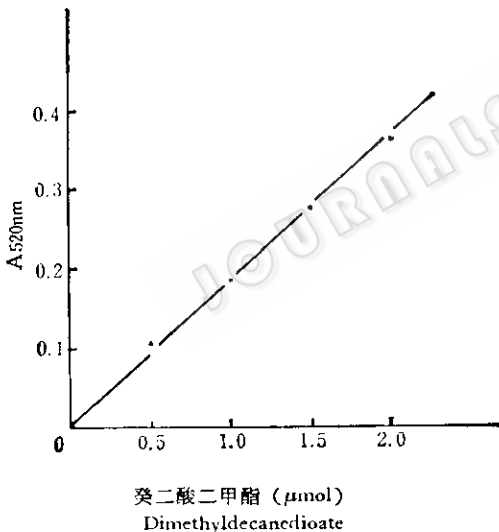
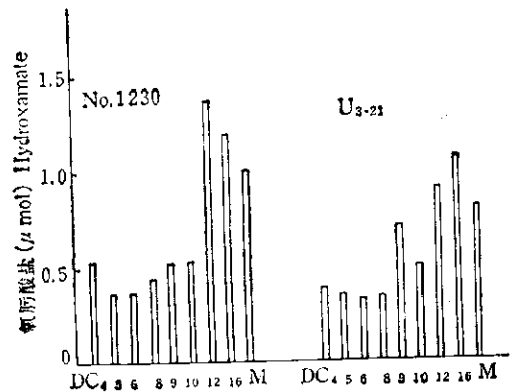


图 1 癸二酸二甲酯标准曲线

Fig. 1 The calibration curve of dimethyl decanedioate

1ml 癸二酸二甲酯醚溶液,加 1ml 中性羟胺甲醇液,在 25℃ 保温 30 分钟后,加 2ml Hill<sup>[3]</sup> 稀释液显色,于 520nm 波长、0.5cm 光程测吸光度。

The reaction mixture containing 1ml dimethyl decanedioate-ether and 1ml neutral hydroxylaminemethanol solution incubated at 25℃ for 30 min. Absorbancy taken at 520nm, cuvette optical path 0.5cm.



二羧酸碳数

Carbon number of dicarboxylic acid

图 2 不同碳链二羧酸的活化作用

Fig. 2 Activation of dicarboxylic acids with different carbon chain DCM: 混合二元酸 Mixture dicarboxylic acid

用长链混合培养基酵母的无细胞提取液 (0.5ml) 进行测定。

Analysis of 0.5ml yeast cell-free extract obtained from long chain alkanes mixture medium.

表 1 两种菌的不同碳链二酰 CoA 合成酶活性比较

Table 1 Comparison of *C. tropicalis* No. 1230 with  $U_{3-21}$  in diacyl-CoA synthetase activity toward different substrates

基质链长 Chain length of substrate		DC <sub>4</sub>	DC <sub>5</sub>	DC <sub>6</sub>	DC <sub>8</sub>	DC <sub>9</sub>	DC <sub>10</sub>	DC <sub>12</sub>	DC <sub>M</sub>	DC <sub>16</sub>
相对酶活力 Relative activity (%)	No. 1230	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	$U_{3-21}$	52.4	69.5	65.5	53.1	82.7	60.5	47.1	49.4	63.8

表 2 不同碳源培养 No. 1230 及  $U_{3-21}$  菌的酰基 CoA 合成酶活性比较Table 2 Comparison of activity of diacyl-CoA synthetase from *C. tropicalis* No. 1230 and  $U_{3-21}$  grown on different carbon sources

生长碳源 Carbon source	乙酰 CoA 合成酶活力 (%) Relative activity of acetyl-CoA synthetase		十二二酰 CoA 合成酶活力 (%) Relative activity of dodecanedioyl-CoA synthetase	
	No. 1230	$U_{3-21}$	No. 1230	$U_{3-21}$
麦芽汁 Malt wort	80	30	100	114
醋酸钠 Acetate	50	100	256	266
长链混合烃 Long chain alkanes mix.	100	52	97	90

以麦芽汁、醋酸钠及长链混合烃分别为生长碳源培养 No. 1230 及  $U_{3-21}$  菌, 测定其细胞中乙酰 CoA 合成酶及十二二酰 CoA 合成酶的活力。从表 2 看出, 醋酸培养的  $U_{3-21}$  菌乙酰 CoA 合成酶酶活是 No. 1230 菌的 2 倍; 十二二酰 CoA 合成酶的酶活相近, 但比麦芽汁、烷烃培养细胞的酶活高一倍多。以麦芽汁为生长碳源,  $U_{3-21}$  菌的乙酰 CoA 合成酶活性特别低。用长链混合烃培养细胞, No. 1230 乙酰 CoA 合成酶酶活是  $U_{3-21}$  菌的 2 倍, 十二二酰 CoA 合成酶两菌近似。

### (三) 十二二酰 CoA 合成酶的性质

1. 十二二酰 CoA 合成酶活化十二二酰必须有 ATP 和 CoASH 存在(表 3)。其酶活力随 CoASH 量的增加而增大, 但当 ATP 增加到一定量时, 由于 AMP 的形成而产生抑制作用(图 3—4)。

2. ADP、AMP 对十二二酰 CoA 合成酶活性的抑制作用见表 4。有 ATP 存在的反应系统中, 加入 ADP, 随着加入量的增加, 对酶活性的抑制作用加强, 当 ADP 达  $60\mu\text{mol}$  时, 酶活抑制 50% 左右; AMP 加入量的增加出现类似情况, 加入  $40\mu\text{mol}$ , 酶活下降 30%。

此外, 从表 3 还可看出, 在无 ATP 或

表 3 ATP、CoASH 和  $Mg^{2+}$  对酶活力的影响  
Table 3 Effect of ATP, CoASH and  $Mg^{2+}$  on diacyl-CoA synthetase

系统 System	对照 Control	-ATP	-CoASH	-ATP -CoASH	- $Mg^{2+}$	- $Mg^{2+}$ + $Mn^{2+}$	- $Mg^{2+}$ + $Zn^{2+}$
相对活力 Relative activity	100	39	48	0	84	116	88

对照指方法中所述的测定系统(酶活力为 100%)。用 1230 菌的无细胞提取液测定, 37℃ 反应 40 分钟。

The control system was the same as described in the methods. The activity obtained by control system as 100%. The reaction was carried out at 37℃ for 40 min. with cell free extract of yeast strain No. 1230.

表 4 ADP、AMP 对十二二酰 CoA 合成酶活性的影响  
Table 4 Effect of ADP, AMP on the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase

添加物 Supplement	ADP ( $\mu$ mol)				AMP ( $\mu$ mol)			
	20	40	60	80	10	20	30	40
相对酶活(%) Relative activity	93.64	75.14	47.4	31.21	98.27	87.86	84.39	70.52
抑制(%) Inhibition	6.36	24.86	52.6	68.79	1.73	12.14	15.61	29.48

以对照系统测得活力为 100%。用 No. 1230 无细胞提取液 0.5ml 测定, 37℃ 反应 40 分钟。

The activity obtained by control system as 100%. The reaction was carried out at 37 °C for 40 min with cell free extract of yeast strain No. 1230.

CoASH 存在时,用无细胞提取液测定二羧酸仍有活化作用,表明其无细胞提取液潜有少量的 ATP 和 CoASH。十二二酰 CoA 合成酶对镁离子的依赖性不是绝对的。当反应系统中无  $Mg^{2+}$  存在时,也能测出 80% 以上的活力。而且  $Mg^{2+}$  可为  $Mn^{2+}$  代替。氟化钾对十二二酰 CoA 合成酶有抑制作用,加入 50  $\mu$ mol 的 KF,酶活被抑制 30% (表 5)。磷酸盐对酶活影响不大,以 1M 磷酸盐缓冲液代替相同浓度的 Tris-HCl 溶液,酶活仅下降 10%。血清蛋白不是必不可少的,这与 Azoulay 等<sup>[2]</sup>人报道相似。以羟胺作为酰基受体,随着羟胺量的增加,反应加强。当加入 0.3ml 时,反应达最大。酶反应速度与加入无细胞液的量

成正比,但不是线性关系。所以取 0.5ml 酶量,线性反应时间 60 分钟测酶的活力。

3. 酶反应 pH: 酶反应最适 pH 在 6—8 之间。

4. 温度对酶反应的影响: 在不同温度下进行酶的催化反应, 30℃ 酶活最高 (图 5)。

5. 热稳定性: 将无细胞提取液置于冰箱深冻,放于 2℃、30℃、50℃ 保温不同时间,测定十二二酰 CoA 合成酶活力。结果在 50℃ 放置 5 分钟,酶活全部丧失;在 30℃ 放置 2 小时还保留 90% 以上的活力。在 2℃ 放置 3—4 小时,活力不变。在深冻状态,甚至反复冻融 5 次,酶活都不变。但以液态保存于 4℃,数天后酶活全部

表 5 KF 对十二二酰 CoA 合成酶活性的影响

Table 5 Effect of KF on the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase

系统 System (S)	相对活力(%) Relative activity	抑制(%) Inhibition
对照 Control (-KF)	100	
全系统 S + KF(50μmol)	69.63	30.37

表 6 金属离子对十二二酰 CoA 合成酶活力的影响

Table 6 Effect of metallic ions on the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase

金属离子 Metal ion	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Cu <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
相对活力 (%) Relative activity	98.0	101.26	95.6	96.86	103.14	88.05	84.24	32.7	91.8	79.2	91.2	101.9	100

注：金属离子加入量为 10μmol，用 No. 1230 无细胞液 0.5ml 测定。以 Mg<sup>2+</sup> 测得酶活力为 100%。  
Metallic ions 10μmol, enzyme activity as 100% in control system with 0.5ml cell free extract of No. 1230.

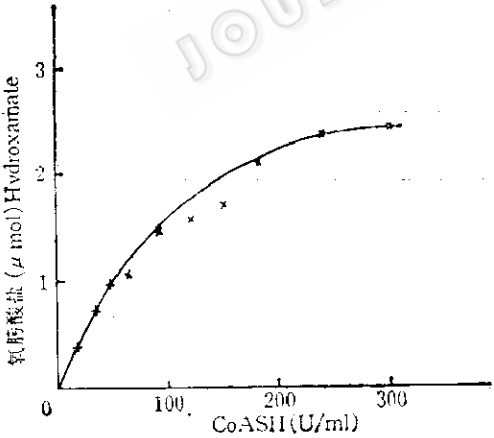


图 3 CoASH 对十二二酰 CoA 合成酶活性的影响  
Fig. 3 Effects of amount of CoASH on the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase  
以 No. 1230 菌的无细胞提取液 0.5ml 测定，37℃ 反应 60 分钟。  
The reaction was carried out at 37℃ for 60 min with cell free extract of *C. tropicalis* No. 1230 (0.5ml).

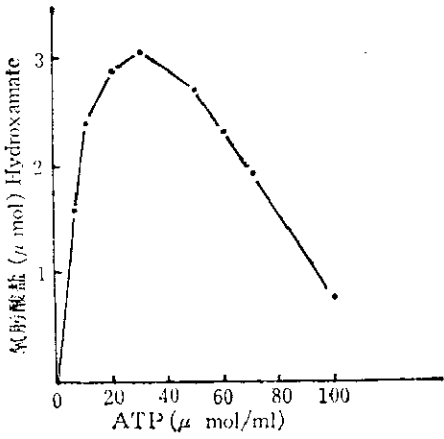


图 4 ATP 对十二二酰 CoA 合成酶活性的影响  
Fig. 4 Effect of ATP amount on the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase  
以 No. 1230 无细胞提取液 0.5ml 测定，37℃ 反应 60 分钟。  
The reaction was carried out at 37℃ for 60 min with cell free extract of *C. tropicalis* No. 1230 (0.5ml).

表7 各种抑制剂和螯合剂对十二酰 CoA 合成酶活力的影响

Table 7 Effect of various inhibitors and chelating agents on the enzyme activity

抑制剂 Inhibitor	相对酶活*(%) Relative activity	相对酶活** (%) Relative activity
EDTA (5mM)	107.5	
EDTA (10mM)	60.5	
EDTA (15mM)	55.0	76.2
Triton (0.2%)	107.5	100.0
Tween 80 (0.2%)	127.5	107.14
聚醚 (0.2%) Polyether	112.5	107.14
SDS (10mM)	0	0
碘乙酸 Iodoacetic acid	117.5	100.0
对氯汞苯甲酸 (7.5mM) <i>p</i> -chloro-mercury -benzoic acid	97.5	92.86
8-羟基喹啉 (5mM) 8-hydroxyquinoline	50.0	23.8
2, 4-二硝基苯酚 (7.5mM) 2, 4-dinitrophenol	60.0	83.3
尿素 (0.8M) Urea	77.5	64.3
对照 Control	100.0	

\* 反应系统中加入抑制剂。

\* Added inhibitor in reaction system.

\*\* 酶加抑制剂混合预热后进行反应。

\*\* Reaction took places after preincubated of the mixture of enzyme plus inhibitors.

丧失。

6. 金属离子对酶活的影响: 从表 6 看出一价金属离子如  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cu}^+$  等对十二酰 CoA 合成酶活力影响很小。它不同于羧酸活化的脂酰基 CoA 合成酶受  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$  的抑制, 而为  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$  所激活。二价金属离子  $\text{Zn}^{2+}$  对酶活有强

抑制作用, 在  $10\mu\text{mol}$  浓度下, 酶活降低 68%。Azoulay 等<sup>[2]</sup>报道  $\text{Zn}^{2+}$  对十四酰 CoA 合成酶仅抑制 1%。

7. 几种抑制剂和螯合剂对酶活的影响: 测定结果见表 7。EDTA 浓度增大, 对十二酰 CoA 合成酶有抑制作用。反应系统中加入几种乳化剂, 有某种程度的

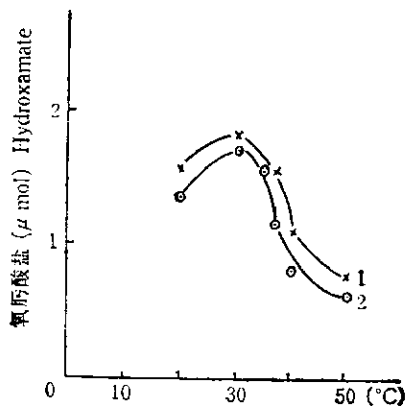


图5 反应温度对酶活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase

1.  $U_{3-21}$  菌无细胞提取液  
Cell free extract of  $U_{3-21}$
2. No. 1230 菌无细胞提取液  
Cell free extract of No. 1230

激活作用。去垢剂(SDS)完全抑制酶活性。8-羟基喹啉及2,4-二硝基苯酚对酶活力也有不同程度的抑制作用。

## 讨 论

热带假丝酵母 No. 1230 及其突变株  $U_{3-21}$  都同化长链正烷烃,以长链正烷烃作

为生长碳源和能源,但是  $U_{3-21}$  菌生长较原始菌 No. 1230 慢一倍,而它能氧化长链烃,并高产率地积累同碳数的二羧酸,特别是十二二羧酸产量最高<sup>[5]</sup>。从两菌的二酰 CoA 合成酶活性的差异及  $U_{3-21}$  菌的十二二酰 CoA 合成酶活性下降快(表1),说明热带假丝酵母的二酰 CoA 合成酶的酶活与它同化正烷烃和氧化积累二羧酸有一定的关系。 $\beta$ -氧化的减弱,导致二羧酸积累的可能性更大,这需进一步证实。从图2结果看出热带假丝酵母菌中具有活化二羧酸的酶不是一个酶,而是对碳链链长有专一性的酶系。从表2得出二酰 CoA 合成酶不是烃诱导酶。

## 参 考 文 献

- [1] Azoulay, E. et Z. Davnjak, *Biochimie.*, **53**: 113-122, 1971.
- [2] 中国科学院微生物研究所烃代谢组: 微生物学通报, **5**(5): 6-9, 1978.
- [3] Hill: *Anal. Chem.*, **18**: 317, 1946.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [5] 中国科学院微生物研究所烃代谢组及发酵车间: 微生物学报, **19**(1): 71-75, 1979.

## FORMATION AND CHARACTERIZATION OF CHAIN DIACYL-COA SYNTHETASE FROM *CANDIDA TROPICALIS*

Yu Zhihua Hao Xiuzhen

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

*Candida tropicalis* possessed diacyl-CoA synthetase which activity toward dicarboxylic acids with various chain length. The activity of dodecanedioyl-CoA synthetase in the initial No. 1230 was twice as high as that in the mutant U<sub>3-21</sub>. The formation of this enzyme was effected by the carbon sources used. ATP and CoASH were necessary for the activity of dodecanedioyl-CoA synthetase. The optimal pH for the enzyme activity was 6—8 and the optimal temperature was 30°C. The thermosta-

bility was very low. It lost all of its activity after incubation at 50°C for 5 minutes. The enzyme activity was inhibited by ADP, AMP, KF, Zn<sup>2+</sup>, 8-hydroxyquinoline, 2,4-dinitrophenol and high concentration of EDTA and urea.

### Key words

*Candida tropicalis*; Long chain diacyl-CoA synthetase