

烷烃对 P450 酶的诱导及二元酸发酵工艺改进

肖云智 焦 鹏* 华玉涛 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

关键词 长链二元酸, 热带假丝酵母, 细胞色素 P450, 烷烃

中图分类号 Q93.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0218-03

α, ω -长链二元酸 Long-chain α, ω -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、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]。

在以往发酵的过程中, 通常在初始培养液中加入 5%~10% 的烷烃。且有文献表明在发酵初期加入烷烃有利于产酸的提高。但我们的研究表明, 在发酵初期加入烷烃也有其不利的一面, 如高浓度的烷烃对于菌体的生长有一定的抑制作用。而且有实验表明适当提高细胞的培养液中糖类对烷烃的比例对于产酸有一定的促进作用^[3]。我们在分析烷烃促进产酸的机理的基础上, 研究了二元酸发酵过程中, 烷烃的加入时期对细胞生长、P450 酶的诱导和产酸的影响, 并据此建立了长链二元酸新的发酵工艺。

1 材料和方法

1.1 菌种

清华大学化工系生物化工研究所保藏的热带假丝酵母(*Candida tropicalis* X.T. 1-12)。

1.2 培养基

培养基组成如下(%) : 蔗糖 3, (NH₄)₂SO₄ 0.05, 玉米浆 0.1, 酵母膏 0.1, 维生素 B₁ 0.01, NaCl 0.1, KH₂PO₄ 0.4, 尿素 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.15, pH5.0, 1atm, 灭菌 20min。

1.3 培养及发酵

菌种从平板上接入液体培养基中, 根据实验要求加入不同浓度的烷烃, 30℃, 200r/min 培养。

1.4 分析方法

菌量分析 : 干重法。

含酸量的测定 : 滴定法。

P450 酶的分析 : 一氧化碳差光谱法^[4]。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 实验结果和讨论

2.1 原有工艺的烷烃最优浓度

热带假丝酵母转化烷烃生成 α, ω -十三碳二元酸的代谢途径为^[5] : 正十三烷首先被吸收进入细胞, 在微粒体中被细胞色素 P450 酶系 α -氧化生成 α -一元醇, α -一元醇再进一步由醇氧化酶和醛脱氢酶催化氧化成 α -一元酸, 其中细胞色素 P450 酶是关键酶。 α -一元酸再在相同酶系的催化下生成目的产物二元酸(ω -氧化), 细胞代谢过程中的 α -一元酸以及目的产物长链二元酸都可以经过 β -氧化而消耗。

上面的代谢过程中 P450 酶是关键酶, 研究表明在一定的范围内, P450 酶活与细胞的产酸能力呈正相关性, 提高 P450 酶的表达量对于产酸量的提高至关重要。我们考察了烷烃加入与 P450 酶的诱导之间的关系。在培养液中直接加入同量的少量烷烃(2%, V/V), 培养一定时间(16~18h)后补加入烷烃, 使烷烃浓度分别为 2%、5%、8%、10%。继续诱导 8h(P450 酶在加入烷烃诱导 6~8h 后酶活达到最大值) 后下摇床, 测量 P450 酶的诱导量。测量结果如下 :

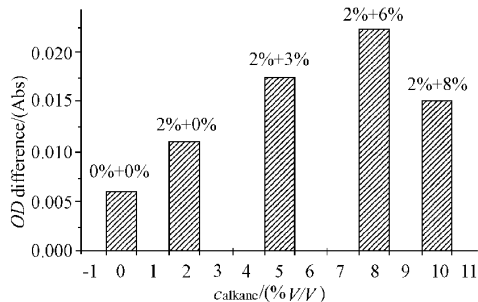


图 1 烷烃加入量对 P450 酶的诱导的影响

Fig. 1 Effect of alkane to the induction of cytochromes P450

收稿日期 2000-09-18, 修回日期 2000-12-15。

基金项目 : 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-04-02), 中国自然科学基金项目(30000003)和(29976022), 中国自然科学基金重点项目(20036010), 中国石油化工总公司基础研究重点项目(x598022)。

* 联系作者。 Tel 86-10-62788568 Fax 86-10-62770304 E-mail jiaoping@mails.jl.jl.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

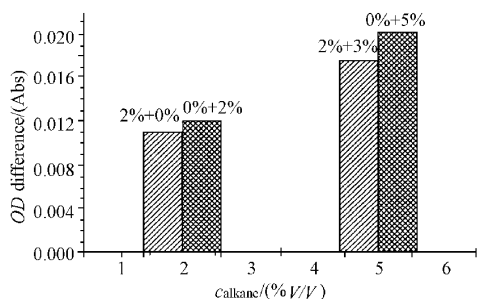


图2 新旧工艺在诱导 P450 方面的对比

Fig. 2 Comparison for the induction of cytochromes P450 based on new and conventional process

在图 1 中,图例表示在代谢过程中批加烷烃的浓度,如“2%+3%”表示在生长前期加入 2% 的烷烃,在生长的后期再加入 3% 的烷烃进一步诱导,其它图例的含义与之相同。由图可知,原工艺条件下(初始烷烃浓度为 2%),在烷烃总浓度在 8% 的范围内,随着烷烃总量的增加,诱导的 P450 酶活相应增加,在烷烃的总加入量为 8% (V/V) 时, P450 酶的诱导量达到最大,为 0.0223,是空白的 3.72 倍(空白的 P450 酶系的诱导量为 0.006)。可见 8% (V/V) 烷烃浓度是最优的 P450 酶诱导浓度,而过高的烷烃浓度(10%) 的诱导作用却相对降低。由此可以看出高浓度的烷烃对于 P450 的诱导有一定的消极作用。

2.2 新旧工艺对 P450 酶诱导的不同影响

烷烃在发酵过程中所起的作用主要是:①在生长期和产酸期作为代谢的底物;②诱导 P450 酶系的表达;③通过诱导细胞产生脂-多糖和诱导细胞改变结构来促进细胞对烷烃的吸收。所以烷烃的加入对于促进二元酸的生产是十分重要的。以前的研究表明在菌体的生长阶段加入烷烃有利于产酸,其机理正是基于上述原因。有观点认为在发酵初期加入高浓度的烷烃(大于 5%) 有利于产酸⁶¹。但是实验表明在生长期高浓度的烷烃对于细胞的增殖有一定的抑制作用。那么,能否找到既可以使细胞快速生长,又能实现对 P450 酶的高效诱导以及使细胞易于吸收烷烃的方法呢?

根据以往的研究可知 P450 酶可由作为底物的烷烃诱导表达,并且有一定的诱导最优时间,烷烃对 P450 酶的诱导以及增加细胞对烷烃吸收能力的诱导作用在 6~8h 内可以达到(接近)最大,所以没有必要在产酸初期就加入足量的烷烃,通过对烷烃的加入时间进行优化,可以找到解决上述问题的方法。

新工艺就是在发酵初期并不加入烷烃,或加入少量的烷烃(小于 2% V/V),让菌体得到快速的生长,然后再加入烷烃诱导 6~8h。这样菌体可以在生长期快速生长,缩短生长周期。同时,有可能获得较高的菌浓,并缩短发酵周期及提高产酸量。

图 2 为总烷烃浓度分别为 2% 和 5% 时新旧工艺对比。图例表示在代谢过程中批加烷烃的浓度,如 2%+0% 表示在生长前期加入 2% 的烷烃,在生长的后期再加入 0% 的烷烃进一步诱导,其它图例的含义与之相同。由图可知,在没

有烷烃的条件下培养 16~18h 后才加入烷烃,诱导 6~8h 得到的 P450 酶系的总量,比先加入部分烷烃再补齐到相同的烷烃浓度得到的 P450 酶系总量多。在烷烃总浓度分别为 2% 和 5% 时,新工艺条件下诱导的 P450 酶系的总量分别高于旧工艺 9.09% 和 14.56%。这就为我们的新工艺提供了实验基础。

2.3 发酵新旧工艺的比较

2.3.1 新旧工艺在菌浓上的对比:由以上的实验表明新的工艺方案对于提高 P450 酶的表达量确有一定的作用,以此为基础进行了摇瓶发酵产酸的比较。这次采用的实验方法与前面的大致相同,只是在补齐烷烃浓度以后,诱导 6~8h,调节 pH 值为 8.0 左右进入产酸期,进行 96h 左右的产酸,所采用的烷烃总浓度为 10%。

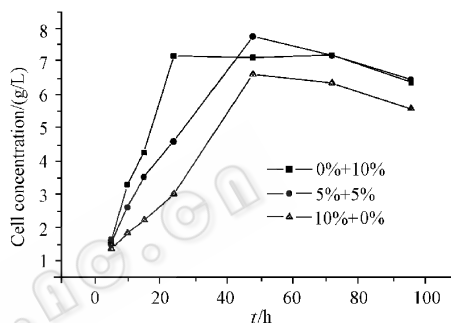


图3 不同烷烃加入过程中细胞生长曲线

Fig. 3 Cell growth curves in different alkane addition processes

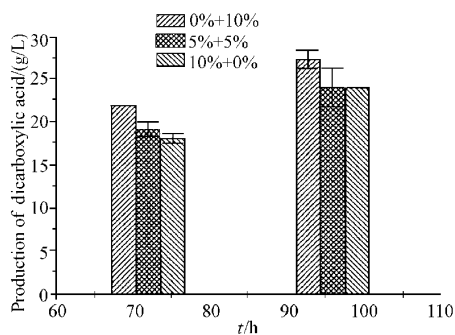


图4 不同的烷烃批加方案对于产酸的影响

Fig. 4 Production of dicarboxylic acid in different alkane addition processes

图 3 为在产酸期菌浓随时间变化的曲线,在产酸前期(0~24h),菌体生长浓度随烷烃浓度的增高而降低。从图中可以看出,初始培养基中没有烷烃的样品(0%+10%),其细胞浓度在 24h 内达到最大,而初始培养基中含有烷烃的样品在 48h 后,细胞浓度才达到最大。这一结果显示在发酵初期不加入烷烃的情况下更有利于细胞的快速生长,在摇瓶的发酵条件下,可以提前近 24h 进入稳定期,为缩短发酵周期打下基础。

2.3.2 新旧工艺在产酸上的对比:产酸量的测量结果如图 4。72h 时,在最初的培养液中不加入烷烃的试样产酸量最高,分别高于开始加入 5%、10% 的烷烃的试样 14.73% 和 21.47%。在 96h 时,产酸量也是在最初培养时不加入烷烃的

试样最佳,为 27.04g/L,分别高于开始加入 5%、10% 的烷烃的试样 13.84% 和 14.15%。由此可见新工艺在对 P450 酶的诱导和产酸方面都优于旧工艺。

3 结 论

本实验主要是对发酵工艺的研究,所选用的菌种并非生产菌种,而是实验室中的模式菌株,所以其产酸水平并不是很高,但对于发酵工艺的研究还是有相当的意义的。此外,我们在将该工艺应用于 15L 发酵罐的实验中表明,该法发酵比传统工艺的对照罐提高产酸 14.5%,达到 140g/L。

在这批实验中,进行了新旧工艺在 P450 酶系的诱导和产酸方面的比较。旧工艺是在发酵初期加入较多的烷烃,考虑到烷烃所起的作用以及诱导最优时间,提出了发酵新工艺。新工艺是在培养初期不加入烷烃,待菌浓达到一定的程度之后再补加入足量的烷烃进行诱导产酸。由以上实验结果可知:①在旧工艺条件下,当烷烃的总浓度为 8%(V/V)时,烷烃对 P450 酶系的诱导效果最佳;②新工艺在 P450 酶系的诱导方面优于旧工艺,在烷烃总浓度分别为 2% 和 5% 时,其 P450 酶系的总量分别高于旧工艺 9.09% 和 14.56%;③新工艺的产酸量也优于旧工艺,摇瓶实验表明可提高产酸 14.15%。

从实验结果来看,新工艺确实有利于菌体较早进入稳定期,在相同的时间内有较高的产酸,说明通过采用新工艺的方法可以达到缩短发酵周期的目的。但具体的达到一定的

产酸量新工艺比旧工艺能缩短多少时间还有待于以后进一步的研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Rehm H J, Reiff J. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv. Biochem. Eng.*, 1981, **19** (1):75~215.
- [2] Boulton C A, Ratledge C. The physiology of hydrocarbon-utilizing microorganisms. Wiseman, chichester. introduction to topics in enzyme and fermentation biotechnology, *Ellis Horwood*, 1990 [C]:11~77
- [3] LING R S(林荣胜), ZHU T(朱涛), CAO Z AN(曹竹安). Increasing the production of long-chain dicarboxylic acid by metabolic network analysis. *Journal of Nanjing University of Chemical Technology*(南京化工大学学报), 1999, **21**(3):6~9
- [4] Toshiya Iida, Akinori Ohta and Masamichi Takagi. Cloning and characterization of an n-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for n-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 1998. **14**:1387~1397
- [5] Casey J R, Dobb R, Mycock G. An effective technique for enrichment and isolation of *Candida cloacae* mutants defective in alkane catabolism. *J Gen. l Microb.*, 1990, **136**:1197~1202
- [6] SHEN Y Q(沈永强), LOU C J(楼纯菊), XU K R(徐可仁) et al. Fermentation of Petroleum for production of long-chain dicarboxylic acid. *Science Acta*(科学通报), 1976, **24**:276~277

Study on Fermentation of Long-chain Dicarboxylic Acid Based on Enzymology

XIAO Yun-Zhi JIAO Peng* HUA Yu-Tao CAO Zhu-An

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

Abstract In this paper, we studied the effects of the adding time of alkane on the expression of P450 and production of dicarboxylic acid. A novel fermentation process in which no or a little alkane was added to make the cells growing more quickly during the growth stage, followed by the addition of alkane to induce cytochromes P450 for 6~8 hours, was established. The results showed that the new process was much better than the old process on inductivities of cytochromes P450 and production of dicarboxylic acid. The new process improved nearly 14.56% expression of P450 and 14.15% production of dicarboxylic acid.

Key words long-chain dicarboxylic acid, *Candida tropicalis*, cytochromes P450, alkane

Received September 18, 2000

This work was supported by Nation Natural Science Foundation of China(29976022); Nation Natural Science Youth Foundation of China(30000003); Nation Natural Science Key Foundation of China(20036010).

* Corresponding author. Tel 86-10-62788568; Fax 86-10-62770304. © 中国科学院微生物研究所学术联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>