

技术与方法

热带假丝酵母酰基辅酶 A 氧化酶的活性测定方法*

欧阳晶 陈远童

(中国科学院微生物学研究所 北京 100080)

摘要: 酰基辅酶 A 氧化酶 (ACO) 是热带假丝酵母内二元酸 β 氧化的限速酶。工业上利用烷烃生产二元酸时, 使用 ACO 低活性的菌株, 将有利于提高二元酸的产量和纯度。本文以热带假丝酵母为材料, 在 Allain 方法基础上加以改进, 可简便、准确地测定 ACO 酶活性, 为二元酸生产菌株的筛选方法提供了量化标准, 并为进一步研究此酶的酶学性质奠定了基础。对本实验室所保存的一系列具有不同产酸能力的热带假丝酵母菌种进行酶活性测定, 发现酶活性与产酸能力有明显的相关性。

关键词: 热带假丝酵母, 酰基辅酶 A 氧化酶, 酶活性测定, 二元酸

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0061-05

ACTIVITY ASSAY OF ACYL COENZYME A OXIDASE (ACO) FROM
CANDIDA TROPICALIS

OUYANG Jing CHEN Yuan-Tong

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Acyl Coenzyme A Oxidase (ACO) is the rate-limiting enzyme of the β -oxidation of dicarboxylic acid in *Candida tropicalis*. Using strains with low Acyl Coenzyme A Oxidase activity to produce dicarboxylic acid on an industrial scale will facilitate the improvement of the yield and purity of dicarboxylic acid. In this research, we improved the method of Allain, so as to determine the activity of Acyl Coenzyme A Oxidase from *Candida tropicalis* easily and correctly. This method can be used as quantity criterion in the screen of industrial strains of dicarboxylic acid production, and this work established the basic of character study of Acyl Coenzyme A Oxidase. We determined the activities of Acyl Coenzyme A Oxidase from a series of *Candida tropicalis* strains with different ability of dicarboxylic acid production, and found the obvious relationship of ACO activity and ability of acid production.

Key words: *Candida tropicalis*, Acyl Coenzyme A Oxidase, Activity assay, Dicarboxylic acid

酰基辅酶 A 氧化酶 (ACO) 为细胞过氧化物体中的多聚体酶, 参与各类脂酸 β 氧化的第一步反应^[1,2]。自从发现 ACO 以来, 陆续有多种测定酶活性的方法问世^[3~7]。各种方法的差异是多方面的: 不同的样品来源、测活底物、催化条件, 直接或使用不同的显色体系间接测定产物生成。由于每种方法各有利弊, 有关其缺陷及校正的研究也方兴未艾^[7]。

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 是重要的工业微生物^[8,9]。近年来, 国内外厂家纷纷应用热带假丝酵母进行工业化发酵生产长链二元酸, 为化工合成工程塑料、香料、涂料、医药等行业提供了重要原料。酵母细胞中 ACO 是二元酸 β 氧化降解代谢的限速

* “九五” 国家攻关基金资助项目 (No.96-C03-03-04)

收稿日期: 2001-09-11, 修回日期: 2001-11-15

酶^[2]。如何获取 ACO 低活性的菌株,从而提高二元酸的产量和纯度,备受厂家和科学家关注。我国早在 20 世纪 70 年代已开始长链二元酸的应用研究,经化学和物理诱变得到一系列具有产不同长链二元酸能力的热带假丝酵母菌株^[8],但是多年来沿用的诱变和筛选方法,受多种因素影响,只能半定量筛选,难以准确地定量筛选。目前,迫切需要改进筛选方法,并对以往的筛选结果进行定量验证。

本文以热带假丝酵母为材料,在 Allain 方法基础上加以改进,可简便、准确地测定 ACO 酶活性。同时,对本实验室保存的一系列具有不同产酸能力的热带假丝酵母菌株进行了 ACO 酶活性测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌种:热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 菌株 $\beta 1$ (即 1230 菌株)、 $\beta 2 \sim \beta 10$, 共 10 株,为本实验室保存。

1.1.2 化学试剂及仪器:各种烷烃及衍生物购自中国医药公司,蜗牛酶购自百泰公司。标准 ACO 为 Sigma 产品。测活所用酰基辅酶 A (油酯酰-CoA $MC_{18:1}$ -CoA、 MC_{16} -CoA)、FAD 及辣根过氧化物酶 (HRP) 为 Sigma 产品,安替比林与苯酚为国产试剂。其它化学试剂均为分析纯。主要仪器为 Beckman XL-90 型超高速低温离心机、Shimadzu UV-2201 紫外可见分光光度计 (TB-85 型恒温水浴) 和 B-BRAUN Labsonic U 型超声破碎仪。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:热带假丝酵母经斜面活化,接入麦芽汁液体培养基培养,作为种子液。以 1% 接种量将种子液接入 YMP 培养基:含 5g $NH_4H_2PO_4$, 2.5g KH_2PO_4 , 1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1g 酵母粉, 0.5g Tween60, 10mL 混合烷烃 ($nC_{12}:nC_{14}:nC_{16}$:油醇 = 4:3:2:1) 用 dH_2O 定容至 1L。28℃ ~ 30℃, 200r/min 摇床培养 2d, 离心收集菌体。

1.2.2 无细胞抽提液的制备:菌体细胞经蜗牛酶 (20mg/g 湿菌体) 处理,制备成原生质体。在冰盐浴中,超声波法破碎细胞。4℃ 离心 $10^5 \times g$, 取上清,为黄色澄清的粗酶液,即无细胞抽提液。

1.2.3 ACO 酶活性测定:在 Allain 方法基础上^[3],方法参考文献 [4~7] 及 Sigma 公司的方法进行一定的改进:采用 pH7.4 磷酸钾缓冲体系,简化操作步骤,缩小反应体积,并降低了底物的使用浓度。

1.2.4 测活原理:ACO 催化酰基辅酶 A 在 β 位氧化,形成烯并释放过氧化氢。随后在显色反应中,过氧化氢与安替比林、苯酚在过氧化物酶催化下,生成显色产物醌亚胺。测定 A_{500} 可计算 ACO 催化反应中过氧化氢的生成量。

1.2.5 酶活性单位定义 (Unit):一个酶活性单位 (U) 是 pH7.4, 30℃ 条件下,通过过氧化物酶显色系统的测定,每分钟催化由酰基辅酶 A 生成烯脂酰辅酶 A 及 $1.0\mu mol H_2O_2$ 所需酶量。

以反应开始 5min 内 A_{500nm} 增加的最大速率计算 $\Delta A_{500nm}/min$ 。酶活性计算公式如下:

$$\text{酶活性 (U)} = \frac{(\Delta A_{500nm} \text{ 样品} / \text{min} - \Delta A_{500nm} \text{ 空白} / \text{min}) \times V_{\text{反应体系}} \times df}{(12.78/2) \times 1} \quad (1)$$

$$\text{酶活性浓度 (U/mL)} = \text{酶活性 (U)} / V_{\text{酶液}} \quad (2)$$

$$\text{酶比活 (U/mg)} = \text{酶活性浓度 (U/mL)} / C_{\text{蛋白}} \quad (3)$$

式中, 12.78: 酰亚胺的摩尔吸光系数 ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), 2: 每 mol 酰亚胺生成, 消耗 2mol H_2O_2 , $V_{\text{反应体系}}$: 反应体系的总体积 (mL), df : 浓酶液被稀释的倍数, $V_{\text{酶液}}$: 加入稀释酶液的体积 (mL), l : 光径 1cm, $C_{\text{蛋白}}$: 酶液的蛋白质浓度 (mg/mL)。

1.2.6 反应体系: 在体积为 0.513mL 的反应体系中, 各成分的终浓度为: 50mmol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液 (KPB), 0.1mmol/L 底物 (酰基辅酶 A), 0.82mmol/L 安替比林, 0.01mmol/LFAD, 10.6mmol/L 苯酚, 30U/mL 过氧化物酶, 0.002~0.010U/mLACO 样品。

1.2.7 溶液配制: 将 ACO 酶样品溶于 50mmol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液 (KPB) 中, 测活前适当稀释至浓度约 0.004~0.020U/mL。底物液: 0.5% (w/v) 酰基辅酶 A (例如 $\text{MC}_{18:1}\text{-CoA}$ 或 $\text{MC}_{16}\text{-CoA}$) 溶于去离子水中。显色液: 60U/mL 过氧化物酶, 1.64mmol/L 安替比林, 20 (mol/LFAD 溶于去离子水中。苯酚浓贮液: 1.06mol/L 苯酚溶于 50mmol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液中, 用前摇匀。

1.2.8 测活操作: 取显色液 0.25mL, 苯酚 5 μL , 酶液 0.25mL, 加入比色杯, 颠倒混匀, 在 30℃ 的恒温分光光度计中平衡, 待 $A_{500\text{nm}}$ 稳定, 加入底物液 8 μL , 立即振荡或颠倒混匀, 开始测定 $A_{500\text{nm}}$ 在 5min 内随时间变化的曲线。空白样以 0.25mL 的 50mmol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液 (KPB) 代替酶液或将等量酶液样品经煮沸 30min 处理, 使酶失活。

1.2.9 蛋白质浓度的测定: 用考马斯亮蓝 G250 染色法^[10]。以牛血清白蛋白作标准。

2 结果

酶活性反应时间曲线 在测活体系中加入过量的标准酶液或粗酶液时, 所测定的酶活性反应时间曲线见图 1。随着反应时间的延长、酶促反应产物量不断积累, 酶反应速度由斜线变为渐趋平稳, 吸光值形成典型的抛物线型曲线。在测定酶活性时, 以斜线阶段所代表的初速度进行计算。

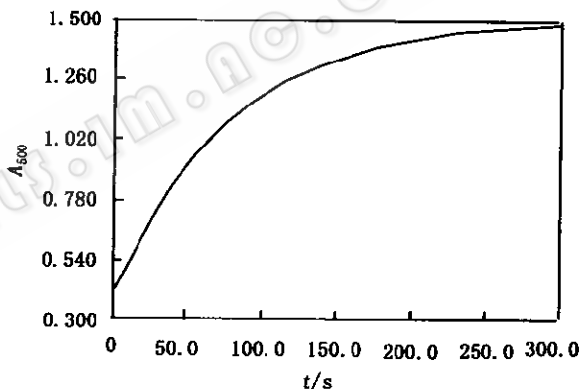


图 1 ACO 酶活性反应吸光值的时间曲线

酶活性测定范围 以 Sigma 标准酶为测定样品, 加入不同的酶量测定酶活性, 结果表明 (见图 2): 在 0.002~0.020U 的范围内, 测定的酶活性大小与加入的标准酶量成线性关系。酶量大于此范围时 (尤其 >0.04U), 由于吸光值变化的斜率改变过快, 斜线部分较短, 难以精确计算初速度, 造成测量值的不准确。

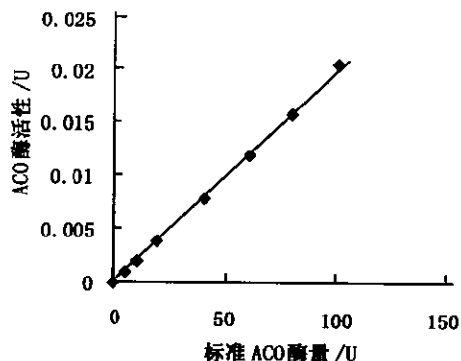


图 2 酶活性测定范围

以 $\text{MC}_{18:1}\text{-CoA}$ 为底物, 测定 10 株菌 ACO 比活性 从本课题组保藏的热带假丝酵母中, 选择 10 株具有不同产酸水平的菌株, 编号为 $\beta\text{-1} \sim \beta\text{-10}$ 。其中, $\beta\text{-1}$ 是野生菌株 1230。ACO

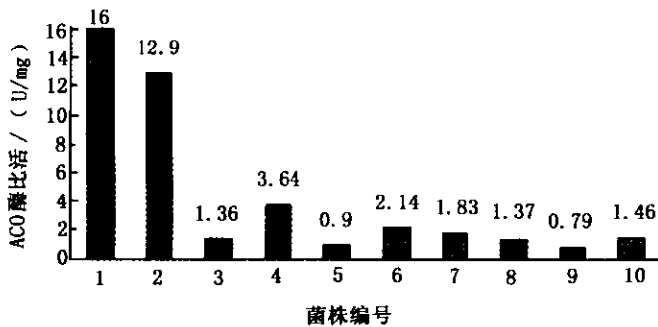


图3 10株菌 ACO 酶比活的比较

是诱导酶,在诱导培养时,以油醇为诱导物和碳源。测定酶活性的底物为与油醇分子结构相对应的十八碳酰基辅酶 A ($MC_{18}-CoA$)。

各菌株的酶比活比较如图3所示。可见,β-1与β-2的酶比活较高于其他菌株。其中,β-1最高,表明这株菌的β氧化能力较强于其他菌株。而β-

3~β-10 7株菌的酶比活明显低于前两株菌,表明它们的β氧化能力较弱,与前两株菌相比,相差约十倍,差异较大。

3 讨论

热带假丝酵母没有线粒体,不受线粒体β氧化的干扰,因此热带假丝酵母菌种的筛选只需以 ACO 酶比活性作为依据。目前 ACO 的测活方法主要分为直接法和间接法。直接法直接测定吡啶丙酰基辅酶 A 的生成量^[5-6];间接法通过偶联反应测定 H_2O_2 的生成量^[3-7]。我们建立的测活方法属于间接氧化偶联法,应用时需注意几点。首先,ACO 是诱导酶,需要有底物存在才被诱导生成。培养基中的烷烃等碳源经微粒体氧化成羧酸后,可诱导 ACO 的合成。其次,ACO 有多种亚基和至少两种同工酶^[1,2]。虽然每种同工酶的功能尚未区分,但推测它们分别负责不同链长和结构的羧酸氧化。测定 ACO 酶活性时,需考虑培养基中诱导物及测活底物的对应问题。我们在 10 株菌的比活测定中,以油醇为诱导物和碳源,以十八碳酰基辅酶 A ($MC_{18:1}-CoA$) 为测定酶活性的底物,以避免其它因素对测定结果造成影响。

在相关研究中我们多次使用本方法,结果表明此测活系统很稳定,测定不同时间、批次的样品,其活性之间的可比性强,可简便、准确地测定 ACO 酶活性。与直接法相比,Gopalan 等人^[6]认为苯酚会抑制酶活性,造成结果偏低,并提供了相应校正数据。

由于 ACO 的重要作用,其酶活性测定方法的应用研究也一直受到关注。如 Veldhoven^[7]将荧光氧化偶联法用于过氧化物异常疾病的检测。我们考虑将本文的方法应用于相关工业菌株的筛选,因此研究了 ACO 酶活性与产酸的相关性。已知^[8-9]10 株菌中,β-1 生产二元酸的产量最低,而且纯度差,不能积累与基质相同链长的酸,只得短链的二元酸,推断其β氧化能力最高;本文测得β-1 的 ACO 酶比活最高(图3),与此相符。β-2 的 ACO 酶比活与β氧化能力次强,与其产酸较强的特点相符。β-3~β-10 是产酸较好的几株菌,能够得到较高的产量,二元酸纯度可达 98% 以上,本文测得它们的酶比活与β氧化能力很弱。可见,以 $MC_{18:1}-CoA$ 为底物时,所测得的 ACO 活力高低与各株菌生产二元酸的产量、纯度有明显的相关性。这几株菌产二元酸能力高低与根据 ACO 的比活大小所推测的结果基本相符。这一方面证实本实验室以往筛选结果的正确性,另一方面表明本文的测活方法可以作为二元酸生产菌株的筛选方法之一。尤其在对少量菌株复筛时使用,将大大提高筛选效率。

参考文献

- [1] Okazaki K, Tan H, Fukui S, *et al.* *Gene*, 1987, **58**: 37 ~ 44.
- [2] Picataggio S, Deanda K, Mielenz J. *Mol. Cell. Biol*, 1991, **11** (9): 4333-4339.
- [3] Allain C C, Poon S L, Chan C, *et al.* *Clin Chem*, 1974, **20** (4): 470 ~ 475.
- [4] Shimizu S, Yasui K, Tani Y, Yamada H. *Biochem Biophys Res Comm*, 1979, **91** (1): 108 ~ 113.
- [5] Wang R, Thorpe C. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **286** (2): 504 ~ 510.
- [6] Gopalan K V, Srivastava D K. *Anal Biochem*, 1997, **250** (1): 44 ~ 50.
- [7] Veldhoven P P. *J Inher Metab Dis*, 1995, **18** Suppl 1: 125 ~ 134.
- [8] 任 刚, 陈远童. *生物工程学报*, 2000, **16** (2): 198 ~ 202.
- [9] 中国科学院微生物研究所烃代谢组. *微生物学报*, 1981, **21** (1): 88 ~ 95.
- [10] 鲁子贤主编《蛋白质与酶学研究方法》, 北京: 科学出版社, 1989. 63 ~ 65.