

现代生物技术在二元酸发酵菌种改良中的应用

佟明友 张 全 李淑兰

(抚顺石油化工研究院 抚顺 113001)

摘要: 在分析微生物发酵生产二元酸的代谢机理和相关酶系的基础上, 对基因工程、代谢调控等现代生物技术在长链二元酸发酵菌种改良中应用的最新进展进行了全面的综述, 对如何将传统的微生物发酵与现代生物技术有机结合作了简要讨论。

关键词: 长链二元酸, 发酵, 基因工程, 菌种改良

中图分类号: TQ921.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0091-04

MODERN BIOTECHNOLOGY APPLIED IN THE IMPROVING OF STAINS THAT USED IN DICARBOXYLIC ACID PRODUCTION

TONG Ming-You ZHANG Quan LI Shu-Lan

(Fushun Research Institute of Petroleum and Petro-chemicals, SINOPEC, Fushun 113001)

Abstract: On the basis of the analysis of metabolic mechanism and related enzymes of microorganisms that produce dicarboxylic acid, the newest evolution of modern biotechnology, for example, genetic engineering and metabolic regulation etc., which used in the improving of stains that applied in producing of dicarboxylic acid was generally summarized. At the same time, how to combine the conventional microorganism fermentation technologies with modern biotechnology was simply discussed.

Key words: Long chain dicarboxylic acid, Fermentation, Improving strains

长链二元酸(简称 DCA)是重要的精细化工中间体, 可以合成许多高附加值产品。发酵法生产 DCA 由于独特优点而取代了传统的化学法。但从自然界得到的野生菌产酸量低, 而且一般只能积累短碳链二元酸, 不能用于工业化生产。国内外从事 DCA 发酵研究人员利用各种手段来提高菌种的产酸量与转化率, 得到一系列高产酸菌株, 特别是近年来, 分子生物学技术应于发酵菌种的改良, 为传统的发酵技术注入了新的活力。

1 烷烃转化为二元酸的代谢机理

Kester 等首先观察到棒状杆菌对正构烷烃的末端氧化特性, 证实微生物中存在 ω -氧化途径。正构烷烃在菌体中经过 ω -氧化即可生成相应碳数的二元酸, 这是对烷烃氧化的最初认识。80 年代, 对烷烃的微生物代谢有了系统的论述。关于烷烃如何转化为二元酸, 目前被普遍接受的观点是底物烷烃在细胞内由 ω -氧化酶系依次氧化为醇、醛、一元酸, 最终氧化成二羧酸。图 1 是正十三烷氧化代谢过程示意图^[1]。

在二元酸发酵过程中, 烷烃氧化为一元脂肪酸后, 有两条代谢途径: ω -氧化和 β -氧化。 ω -氧化把一元酸的 ω 碳末端进一步氧化, 形成目的产物二元酸, 而 β -氧化则将中间产物一元酸以及目的产物降解, 进入 TCA 循环, 为细胞生长提供能量。因此, β -

收稿日期: 2001-12-17, 修回日期: 2002-03-05

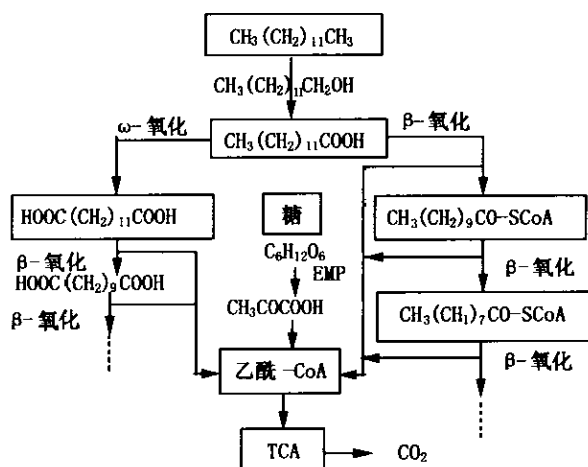


图 1 二元酸底物代谢机理

论以烷烃还是以脂肪酸为底物，都将形成二元酸；在 β -氧化路径中，二元酸或脂肪酸先在线粒体外膜或内质网中形成酯酰辅酶 A，进入线粒体内再被酯酰辅酶 A 脱氢酶、烯酯酰辅酶 A 水合酶、L-3-羟酯酰辅酶 A 脱氢酶和 β -酮酯酰辅酶 A 硫解酶依次分步降解。

Myrthala Moreno DE LA GARZA 等^[2] 1985 年建立了一种分离热带假丝酵母菌中与 β -氧化有关 3 种酶的方法。他们通过离子交换色谱和染料-配基色谱得到上述 3 个酶，研究了它们的性质，并将这些酶定位在过氧化物酶体中。Naoki Kanayama 等^[3] 用遗传学方法分析了能够同化烷烃的热带假丝酵母硫解酶的 3 个同工酶和过氧化物酶体乙酰乙酰辅酶 A 以及 3-酮酯酰辅酶 A 硫解酶的生理功能。其中 3-酮酯酰辅酶 A 硫解酶具有广泛的底物特异性 ($\geq C_4$)，它参与 β -氧化途径中，催化 3-酮酯酰辅酶 A 硫解断裂为乙酰辅酶 A 和酮基辅酶 A。

Moriya Ohkuma 等^[4] 描述了一个可同化 n-烷烃的麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*)，该菌经过烷烃诱导可形成多个细胞色素 P450 酶 (P450alk)。实验表明，这些 P450alk 都具有 n-烷烃末端羟基化活性。Zimmer T 等^[5] 在 1996 年发表的专利中描述了一个单氧化酶系统，该系统由细胞色素 P450 和 NADPH-细胞色素-P450-还原酶组成。它参与到 ω -氧化路径中甲基末端的羟基化反应。

总之，目前已研究清楚烷烃在代谢过程中，细胞色素 P450 酶是 ω -氧化的关键酶，增加该酶的表达可以促进产物 DCA 形成；乙酰辅酶 A 是 β -氧化的关键酶，阻断此酶表达可以抑制产物降解，因此，人们正在寻找各种分子生物学方法来改造这些关键酶系的编码基因^[6,7]。

3 现代生物技术在二元酸菌种改良中的应用

传统的微生物育种技术已经在二元酸菌种改良中得到应用并收到显著效果。这些方法包括紫外线照射诱发突变，亚硝酸或 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 化学诱变，离子束诱变等，此外还用到各种细胞融合技术。随着分子生物学在微生物育种的应用，基因工程运用于二元酸菌种改良，为发酵生产 DCA 带来了新的生机。利用基因

氧化是使产物降解的负反应，它使产酸率大大低于理论值。菌种改良的关键是增强 ω -氧化，减少 β -氧化，提高烃酸转化率。

2 烷烃转化二元酸相关酶系的研究

与烷烃转化为二元酸有关的酶包括烷烃代谢过程中 ω -氧化和 β -氧化两条途径所需的一系列复合酶系。在 ω -氧化路径中，烷烃分子的甲基末端依次被细胞色素 P450 烷烃/脂肪酸氧化酶、羟基氧化酶和醛基氧化酶氧化，最终形成羧基端，无

工程手段可以构建高产工程菌；通过改变代谢流向，加速限速反应或限制有害代谢途径，可以使菌体代谢向对产酸最有利的方向进行，这也是基因工程的一个重要分支——代谢工程。

3.1 对产酸有关基因的研究 产酸菌中烷烃诱导的单氧酶系统（包括 P450alk 和 P450red）是烷烃和脂肪酸同化的第一步和限速步骤^[8]。Donique Sanglard 等人^[9]从可同化烷烃热带假丝酵母菌体中分离出 P450alk 基因，并克隆到质粒 pDS1 中，做了序列测定。他们对质粒 pDS1 回收，得到一个 4.1kb 的 BamH1 片段，该片段包括 P450alk 基因和它两端的侧翼序列，其编码区从第 771 个碱基的一个 ATG 起始密码子到第 2,402 个碱基的终止密码子共编码 543 个氨基酸。他们还发现该基因中存在有酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）基因的启动子与终止子序列，去除该基因的侧翼序列之后，利用酵母乙醇脱氢酶系统使其在酿酒酵母中表达，表达产物具有烷烃末端甲基羟基化活性。Thomas R. Sutter 等人^[10]分离了热带假丝酵母中烷烃诱导的 NADPH-细胞色素 P450 氧化还原酶基因（CPR）并做了特征描述。

编码各种不同酰基辅酶 A 同工酶亚单位的基因（POX）也已经被克隆并测序。Okazaki K 等^[11]报道了热带假丝酵母两个编码过氧化物酶体多肽（PXP）基因的全长序列。一个是 POX-4，它编码在油酸诱导的热带假丝酵母中广泛存在的多肽 PXP-4；另一个是 POX-5，它编码多肽 PXP-5。这两个多肽分别是酰基辅酶 A 氧化酶 II（PXP-4）和酰基辅酶 A 氧化酶 I（PXP-5）的亚单元。Wang H 等^[12]从可利用烷烃的 *Yarrowia lipolytica* 中分离到一个编码酰基辅酶 A 氧化酶同工酶之一的基因 ACO3。这个基因是一个 10kb 大小的片段，编码一个具有 701 个氨基酸残基的蛋白。

3.2 β-氧化的阻断 阻断

产酸菌 β-氧化路径可以抑制菌体利用烷烃和脂肪酸作为碳源，提高转化率。Stephen Picataggio 等^[13]通过连续破坏热带假丝酵母

表 1 部分及全部 β-氧化阻断型菌株发酵结果比较

菌株	底物	产量 (g/L)	转化率 (%)	产酸速率 (g/L/h)	二元酸组成 (%)				
					C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄
H43	C ₁₂	95	21	0.3	10	25	-	65	-
H53	C ₁₂	140	35	0.6	15	-	-	85	-
H5343	C ₁₂	140	80	0.9	-	-	-	100	-
H5343	C ₁₄	210	100	1.3	-	-	-	-	100

编码酰基辅酶 A 两种异构酶的 POX-4 和 POX-5 基因，来达到阻断 β-氧化途径的目的。这两种酶催化 β-氧化途径中的第一个反应。他们用此方法共得到 3 个 β-氧化阻断型工程菌株 H43、H53 和 H5343，其中菌株 H43 两个 POX-4 基因被阻断，H53 两个 POX-5 基因被阻断，而 H5343 的 POX-4 与 POX-5 4 个基因全部被阻断，这 3 个工程菌的 DCA 发酵结果如表 1。

从表 1 可知，当与酰基辅酶 A 有关的 4 个基因全部被阻断之后，十四碳二元酸产量可达 210g/L，产酸速率为 1.3g/L/h，转化率为 100%，比原始菌株及部分 β-氧化阻断型菌株有明显提高。图 2 为 POX-4 与 POX-5 基因阻断盒（DNA 序列组件）。

但是，Hara A 等^[14]指出抑制脂肪酰辅酶 A 基因的表达并不是工业二元酸生产菌株高产必需的决定因素。他们把一株工业

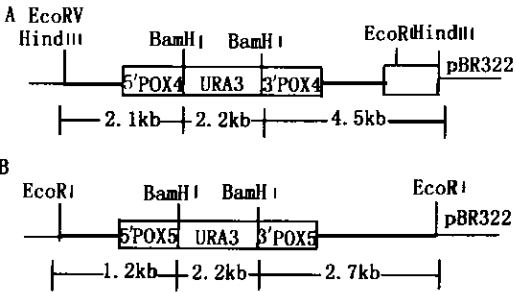


图 2 POX-4 与 POX-5 基因阻断盒

用生产 DCA 的热带假丝酵母菌株 M1210A3 的 POX-4 基因阻断, 产酸没有提高, 如果增加 POX-4 基因在 M1210A3 菌株中的表达, 发现该菌株产酸也并不减少。可见, DCA 菌种改良在分子水平的规律性还需要进一步深入研究。

3.3 ω -氧化的增强 前文提到, P450 酶参与的反应是产酸菌通过 ω -氧化路径的限速步骤, 通过 P450 基因的扩增增加菌体中 ω -羟基化酶的量有利于底物更多的参与 ω -氧化路径, 从而提高产酸量与转化率。Stephen Picataggio 等人^[6]从热带假丝酵母菌株 CATCC No.750 中分离得到 P450alk 和 CPR 基因, 然后利用具有 URA3 选择性标记的 pCU3ALK1 和 pCU3RED 质粒载体, 转化到 H5343 菌株中去。实验表明, 除了只有 P450alk 基因增强的菌株外, 其他 ω -氧化酶增强的菌株与 H5343 菌株相比甲基豆蔻酸发酵产酸量提高了 30%。

4 充分利用菌种优势, 进一步提高二元酸发酵水平

DCA 作为重要的精细化工中间体, 可以合成一系列高附加值下游产品, 有很好的市场前景。但目前发酵 DCA 的成本偏高, 限制了应用范围。因此, 降低成本是急需解决的问题。自从发酵法生产 DCA 研究列入“八五”国家科技攻关计划以来, 菌种改良一直是要解决的技术关键之一。我们从菌种的野外筛选, 人工诱变到工程菌的构建, 做了很多工作, 而且颇见成效。这也是提高产酸量和产酸率、降低成本的有效的方法。

经过“八五”和“九五”科技攻关, 发酵生产 DCA 已进入产业化阶段并继续列入“十五”国家攻关计划。“十五”期间, DCA 生产菌种的优化仍是研究重点。虽然 DCA 生产本身是传统的发酵工艺, 但现代生物技术已溶入其中, 基因工程就是其一。我们可以通过对菌种分子水平的改造来发挥其产酸潜力。通过基因重组, 使某些酶的表达量发生改变, 达到控制代谢流向的目的, 这是代谢工程的宗旨。如果分子操作条件暂不具备, 可以在发酵体系加入外源性调节物质来改变细胞中某一反应的强度, 也可以达到代谢调控的目的。总之, 传统工艺与现代技术相结合, 会使我国发酵生产 DCA 技术保持世界领先水平。

参 考 文 献

- [1] 许小增, 佟明友, 李家鹏. 石油炼制与化工, 1994, 25 (1): 15~18.
- [2] Moreno M, Schultz B U, Crabb J W, *et al.* Eur J Biochem, 1985, 148: 285~291.
- [3] Naoki K, Mitsuyoshi U, Haruyuki A, *et al.* Journal of Bacteriology, 1998, 180 (3): 690~698.
- [4] Moriya O, Thomas Z, Toshiya I, *et al.* The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (7): 3948~3953.
- [5] Zimmer T, Kaminski K, Schunck W H, *et al.* WO 9627678, 1996.
- [6] Picataggio S, Rohrer T, Eirich L. D. US 5648247, 1997.
- [7] Toshiya I, Akinori O, Masamichi T. Yeast, 1998, 14 (15): 1387~1397.
- [8] Sanglard D, Kappeli O, Flechter A, *et al.* Arch Biochem biophys, 1984, 157: 297~302.
- [9] Sanglard D, Chen C, Loper J C, *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1987, 144: 251~257.
- [10] Sutter T R, Sanglard D, Loper J C, *et al.* The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265 (27): 16428~16436.
- [11] Okazaki K, Takechi T, Kambara N, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83 (5): 1232~1236.
- [12] Wang H, Clainche A, Dall M, *et al.* Yeast, 1998, 14 (15): 1373~1386.
- [13] Picataggio S, Deanda K, Mielenz J, *et al.* Mol Cell Biol, 1991, 11 (9): 4333~4339.
- [14] Hara A, Ueda M, Matsui T, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56 (3~4): 478~485.