

## 专论与综述

## 热带假丝酵母正烷烃代谢研究及代谢工程方法进展

何 峰 陈远童\*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

**摘要:** 正烷烃在热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 细胞内的代谢过程主要包括  $\omega$ -氧化和  $\beta$ -氧化两个反应途径, 前者促使脂肪酸的生成, 后者则涉及脂肪酸的降解, 二者均由一系列的酶催化完成。本文综述了烷烃代谢过程的机理, 以及各种相关酶及其基因的研究状况。在此基础上, 进一步对与 *C. tropicalis* 有关的分子遗传学方法, 以及代谢工程方面在近年来的研究进展进行了介绍。

**关键词:** 热带假丝酵母, 正烷烃代谢,  $\omega$ -氧化,  $\beta$ -氧化, 代谢工程

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0109-05

**Advance in Metabolism of n-Alkane and Metabolic  
Engineering of *Candida tropicalis***

HE Feng CHEN Yuan-Tong\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy  
of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract:** Metabolism of n-alkane mainly includes  $\omega$ -oxidation pathway and  $\beta$ -oxidation pathway in *Candida tropicalis*, which are both catalyzed by a series of enzymes. The transformation from n-alkane to fatty acid is accomplished via  $\omega$ -oxidation pathway, and the degradation of fatty acid is involved in  $\beta$ -oxidation pathway. The mechanism on metabolism of n-alkane and studies on related enzymes are summarized in the review. Furthermore, some molecular genetics and metabolic engineering techniques related to *Candida tropicalis* developed in recent years are introduced.

**Key words:** *Candida tropicalis*, Metabolism of n-alkane,  $\omega$ -oxidation,  $\beta$ -oxidation, Metabolic engineering, Molecular genetics

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 能够利用正烷烃作为单一碳源, 并可进行快速生长。其代谢机理为: 烷烃被细胞吸收后, 首先通过  $\omega$ -氧化途径生成脂肪酸, 后者可进一步通过  $\beta$ -氧化途径降解为乙酰辅酶 A, 为细胞提供物质和能量。利用 *C. tropicalis* 进行正烷烃发酵, 可用于长链二元酸的生产, 后者是一种用途极其广泛的化工原料。烷烃代谢过程主要受  $\omega$ -氧化和  $\beta$ -氧化两个反应途径的调控, 因此二者的研究对于烷烃代谢过程的阐明及代谢工程的应用有着重要的意义。此外, 与 *C. tropicalis* 相关的代谢工程操作和相关分子遗传学方法的建立, 对于二元酸代谢工程以及基因功能的研究都具有重大的实际价值。

\* 通讯作者 Tel: 010-62554387, Fax: 010-82626208, E-mail: chenyt@mail.im.ac.cn

收稿日期: 2005-05-18, 修回日期: 2005-06-11

## 1 正烷烃代谢途径的研究

$\omega$ -氧化途径是 *C. tropicalis* 利用烷烃的特征步骤, 在细胞的微粒体中进行。烷烃进入细胞后首先由细胞色素 P450 (CYP) 催化生成脂肪醇, 这个过程由 NADPH-细胞色素 P450 还原酶 (CPR) 辅助完成<sup>[1]</sup>。在脂肪醇氧化酶 (FAO) 催化下, 脂肪醇进一步生成脂肪醛, 然后经脂肪醛脱氢酶 (FALDH) 催化, 最终氧化生成脂肪酸。脂肪酸则可以通过类似途径进一步氧化成二羧酸<sup>[2,3]</sup>。

Gmunder 等比较了 *C. tropicalis* 分别在葡萄糖和十六烷生长条件下, 细胞中的 CYP 含量和一些相关酶的活性<sup>[2]</sup>。结果发现, 在葡萄糖生长条件下未检测到 CYP 的特征吸收峰, 醇脱氢酶 (FADH)、FALDH 的活性均处于非常低的水平。而在烷烃生长条件下, CYP、FADH 和 FALDH 均被明显诱导到较高水平。此外, 他们还研究了在不同的通氧情况下, 酶的含量 (或比活) 变化。发现在低氧条件下 ( $pO_2 < 2\text{kPa}$ ) 的 CYP 含量较高氧条件下 ( $pO_2 > 2\text{kPa}$ ) 可增长数倍, 而醇脱氢酶和 FALDH 的活性并没有发生显著的变化, 由此推测由 CYP 催化的反应为烷烃氧化过程的限速步骤。

Sanglard 等进一步研究了在不同生长条件下, CYP 等酶的组成和催化活性<sup>[4]</sup>。他们发现在分别以葡萄糖和烷烃为底物条件下, *C. tropicalis* 细胞微粒体中存在两种不同性质的 CYP。前者产生的 CYP 不具备  $\omega$ -末端羟化能力, 但其脱甲基能力却明显高于后者产生的 CYP。此外, 对两种底物条件下细胞微粒体内的细胞色素 b5 含量, 以及 CPR 和长链 FADH 的活性也进行了比较, 其中前者的含量相当, 后二者则显著不同。CPR 在葡萄糖生长条件下的比活性仅为烷烃诱导下的三分之一, FADH 则检测不到活性, 说明它们也和 CYP 一样受到烷烃的诱导并参与其氧化过程。

需要指出的是, 由 FADH 催化醇生成醛的结论是不正确的, Kemp 等通过化学计量法证明, 以上测定的醇脱氢酶活性实际上是对醛脱氢酶的重重复测定。他们对烷烃和葡萄糖生长条件下细胞微粒体中 FAO 的活性分别进行了测定, 结果前者是后者的 30 倍, 说明此反应步骤实际上是由 FAO 催化完成<sup>[5]</sup>。

*C. tropicalis* 的  $\beta$ -氧化途径已被证明完全发生在过氧化物酶体中。研究者发现, 在软脂酰辅酶 A (或用软脂酸和 CoA 代替)、NAD 和  $O_2$  等存在的条件下, 从烷烃诱导后的 *C. tropicalis* 细胞中分离出的过氧化物酶体能够生成等量的乙酰辅酶 A 和 NADH。而在同样条件下, 分离的线粒体却没有检测到以上产物, 说明其  $\beta$ -氧化途径仅存在于过氧化物酶体中。与之不同的是, 哺乳动物细胞内的过氧化物酶体和线粒体中均存在  $\beta$ -氧化酶系, 长链脂肪酸首先在过氧化物酶体中被降解成中短链长的脂酰辅酶 A 后, 再进入线粒体彻底降解为乙酰辅酶 A。

*C. tropicalis* 与其它大多数真核生物在过氧化物酶体中的  $\beta$ -氧化机理基本类似, 但与线粒体中的  $\beta$ -氧化途径有着明显的差别。除了接受的底物不同外, 线粒体和过氧化物酶体  $\beta$ -氧化的酶系组成也有所不同。二者的第一步反应分别由酰基辅酶 A 脱氢酶和酰基辅酶 A 氧化酶催化, 前者以 FAD 为辅基进行脱氢, 后者则以氧为电子受体, 生成过氧化氢。此外, 与线粒体不同, 过氧化物酶体中  $\beta$ -氧化的第二步和第三步反应是由一个双功能酶 (烯酰辅酶 A 水合酶、3-羟酰辅酶 A 脱氢酶) 或者三功能酶 (加 3-羟酰辅酶 A 异构酶) 催化生成 3-酮酰辅酶 A<sup>[6]</sup>。

## 2 $\omega$ -氧化途径酶及基因的研究

*C. tropicalis* 的  $\omega$ -氧化途径酶系主要由 CYP、CPR、FAO 和 FALDH 组成, 其中前两个酶的作用最为重要<sup>[2]</sup>。

CYP 是一种以铁卟啉原 IX 作为辅基的血红素蛋白, 其种类繁多, 可以利用多种不同的底物。CPR 则是一种以 FAD、FMN 为辅基的黄素蛋白, 在电子传递过程中发挥主导作用。通过电子传递作用, CYP 可以对底物进行循环催化。当底物与 CYP 结合后, 酶上的铁原子接受一个电子, 形成还原型复合物。复合物与氧分子结合后, 铁原子重新被氧化。形成的氧化型复合物接受另一个电子及两个质子, 形成一个新的复合物。此复合物失去一分子水, 并将氧原子传递给底物。氧化后的底物被释放后, 游离的 CYP 可进入下一个循环<sup>[7]</sup>。

Sanglard 等首先从菌株 ATCC 750 分离了 *C. tropicalis* 的第一个 CYP 基因成员 CYP52A1, 其后 Seghezzi 等分离和鉴定了该菌株的另外 6 个成员<sup>[8]</sup>。大部分成员肽链中存在跨膜区、底物识别区、血红素远端和近端结合区等功能区。底物识别区差异较大, 与不同的底物特异性有关。血红素结合区则非常保守, 表明不同成员间具有相似的结合方式。在这些成员中, CYP52A1、A2 和 A6 被不同底物诱导的能力明显强于其它成员, A1 和 A6 主要受脂肪酸诱导, 而 A2 表现出最强的被烷烃诱导的能力。

Craft 等从菌株 ATCC 20336 中分离得到了 10 个 CYP52 成员, 这些基因同菌株 ATCC 750 表现出菌株间的差异性。其中, CYP52A13 和 A14 被油酸或十八烷诱导的 mRNA 水平最高, 同时成员 A17 和 A18 也具有相对较高的诱导水平<sup>[9]</sup>。

和 CYP 不同, 同一生物体内一般只存在单一的 CPR 基因, 可能是由于前者可选择不同的底物类型, 而后者只催化专一性的反应。Sutter 等分离和鉴定了菌株 ATCC 750 的 CPR 基因, 其读码框编码大小为 76.7kD 的肽链, 序列中存在 NADPH、FAD (FAD1、FAD2)、FMN 结合区及疏水跨膜区等结构<sup>[1]</sup>。作者从产二元酸菌株 1230 中分离了两个 CPR 等位基因, 其编码的肽链之间仅有 9 个氨基酸不同。二者均在酿酒酵母 *cpr* 突变体中获得了高效表达, 并且均可有效恢复 *cpr* 突变体对酮康唑药物的抗性<sup>[10]</sup>。

FAO 催化  $\omega$ -氧化途径的第二步反应, 即由醇氧化为醛, 同时生成过氧化氢。Kemp 等发现, 由十、十二和十四碳链的醇诱导的 FAO 活性明显高于其它链长的底物, 其中十二烷基醇诱导的酶活性最高。而由不饱和脂肪醇诱导的 FAO 活性高于相同链长的饱和脂肪醇<sup>[5]</sup>。Vanhanen 等首先分离到第一个 FAO 的 cDNA 序列。此后, 在菌株 ATCC 20336 中发现了两个 FAO 基因 FAO1 和 FAO2, 后者由一对等位基因组成。底物特异性试验发现, FAO1 可氧化  $\omega$ -羟基脂肪酸但不能氧化 2-烷基醇, FAO2 则正好相反<sup>[11]</sup>。

FALDH 催化  $\omega$ -氧化途径最后一步反应, 反应以 NAD 为电子受体, 生成脂肪酸和 NADH。Ueda 等人发现, 烷烃诱导细胞的 FALDH 活性较葡萄糖诱导要高出 10 倍, 而十八烷醇可诱导出接近于烷烃诱导的活性。底物特异性研究表明, 链长为 C7-C14 的脂肪醛能够被氧化, 而超过 C15 的醛则不能被氧化或仅表现出很低的 FALDH 活性<sup>[12]</sup>。迄今为止, *C. tropicalis* 的 FALDH 基因尚未有克隆和鉴定的报道。

## 3 $\beta$ -氧化途径酶及基因的研究

*C. tropicalis* 的  $\beta$ -氧化酶系包括酰基辅酶 A 氧化酶、烯酰辅酶 A 水合酶、3-羟基辅酶 A 脱氢酶、3-酮酰辅酶 A 硫解酶和乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶。此外, 一些相关酶包括

酰基辅酶 A 合成酶、肉毒碱酰基转移酶等。

酰基辅酶 A 氧化酶 (ACO) 催化脂酰辅酶 A2、3 位反式脱氢生成烯酰辅酶 A, 同时生成过氧化氢, 是  $\beta$ -氧化途径限速酶。ACO 是一种黄素蛋白, 分子量大约 600kD, 由 8 个亚基组成, 每个亚基结合一分子 FAD。ACO 可氧化  $C_4$ - $C_{20}$  脂酰辅酶 A, 但对十二酰基辅酶 A 的活性最高。Okazaki 等克隆了 *C. tropicalis* 中编码 ACO 的 3 个同功酶亚基的基因, 分别为 *POX4*、*POX5* 和 *POX2*。虽然它们编码的肽链长度不一样, 却具有很高的同源性<sup>[13]</sup>。

$\beta$ -氧化第二和第三步反应由一个双功能酶或三功能酶催化, 其中烯酰辅酶 A 水合酶催化将水加到脂酰辅酶 A 的第 3 位, 脱氢酶则催化 3-羟基辅酶 A 脱氢形成 3-酮酰辅酶 A。Nuttley 等分离了三功能酶 (HDE) 的 cDNA, 与葡萄糖比较, HDE 被油酸诱导的活性更高<sup>[6]</sup>。Sloots 等进一步研究了 HDE 在葡萄糖和油酸不同条件下的基因调节机制, 分别对位于基因上游区的葡萄糖反应元件和油酸反应元件进行了定位<sup>[14]</sup>。

过氧化物酶体中存在两种类型的硫解酶, 分别为 3-酮酰辅酶 A 硫解酶 (III) 和乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶 (I)。硫解酶 III 由两个相同的亚基组成, 能被烷烃或脂肪酸强烈诱导合成。硫解酶 I 则由 6 个相同亚基组成, 受烷烃的诱导不明显。前者同时存在于胞质和过氧化物酶体中, 而后者仅存在过氧化物酶体。这两个同工酶由两对等位基因编码, 胞质内的硫解酶 I 参与甲羟戊酸代谢, 而过氧化物酶体内的硫解酶 I 和硫解酶 III 参与脂肪酸的  $\beta$  氧化<sup>[15]</sup>。

细胞中存在两种酰基辅酶 A 合成酶 (合成酶 I 和合成酶 II), 二者在细胞定位、调控机制及功能方面均有所不同。合成酶 I 为组成型酶, 主要分布在微粒体和线粒体中, 其催化生成的酰基辅酶 A 用于细胞合成脂类。合成酶 II 则是诱导型的, 它仅存在于过氧化物酶体中且只催化生成进入  $\beta$  氧化的脂酰辅酶 A。

肉毒碱酰基转移酶 (CAT) 负责乙酰辅酶 A 的转运, 同时存在于过氧化物酶体和线粒体。这两种 CAT 在过氧化物酶体和线粒体之间构成一个“乙酰肉毒碱穿梭体系”, 负责乙酰辅酶 A 的转运。二者均由两个亚基组成, 且都可特异地作用于乙酰辅酶 A 或丙酰辅酶 A。

#### 4 热带假丝酵母代谢工程方法进展

近年来, 随着对 *C. tropicalis* 正烷烃代谢途径在基因水平上研究的不断深入, 以及酵母分子遗传学手段的逐步建立和发展, 有关 *C. tropicalis* 转化系统的建立和代谢工程操作等方面的研究有了一定的进展。

Haas 等人最早建立了以营养缺陷型菌株为基础的 *C. tropicalis* DNA 整合系统<sup>[16]</sup>。利用这套系统, Picataggio 等人通过对关键酶基因 *POX4* 和 *POX5* 进行连续破坏, 获得了  $\beta$  氧化途径被阻断的菌株。利用染色体中 *URA3* 基因拷贝数的增加, 他们进一步将 *CYP* 及 *CPR* 基因分别进行了多拷贝整合和共整合。经过一系列操作后, 菌株的 *CYP* 含量、*CPR* 活性及二元酸产量均有不同程度的提高, 其中一株菌的产酸量提高了 30%<sup>[17]</sup>。

Hara 等人则最先从 *C. tropicalis* 中分离到了染色体自主复制序列 (ARS), 并构建了一个大肠杆菌-热带假丝酵母穿梭载体<sup>[18]</sup>。随后, 通过在载体中引入磷酸甘油激酶启动子和终止子, 成功表达了一个大肠杆菌来源的, 并经过密码子多点突变的潮霉素 B 磷酸转移酶基因。并通过构建破坏 *C. tropicalis* *URA3* 基因的整合型载体及突变盒, 对其在染色体上的两个拷贝分别进行了破坏。这种定向破坏避免了大量的筛选工作, 以及无

法预料的突变发生。此外,还利用共转化方法对 *POX4* 基因进行了单拷贝破坏,这种方法的好处是可以实现目的基因的快速破坏<sup>[19]</sup>。

高弘等首次以 CAT 为靶目标,通过一步置换法使二元酸生产菌株中 CAT 基因的一个拷贝被破坏。据报道,在进行单拷贝缺失后,测定的细胞 CAT 活性较缺失前下降了约 43%, DCA<sub>13</sub> 的产酸量提高了 13%, 同时烷烃的摩尔转化率也得到了提高<sup>[20]</sup>。

除了 *C. tropicalis* 外,应用于其它酵母的一些研究方法也可以借鉴。如利用一步法基因置换法,并结合诱变重组的方法,可分离纯合突变体。Alani 等则在酿酒酵母中建立了一种可重复利用选择标记的方法<sup>[21]</sup>。他们在选择标记基因两端分别插入了一段来源于沙门氏菌的 *hisG* 序列,这两段重复序列可通过高频率的有丝分裂重组,使选择标记在细胞分裂后被剔除。这种方法使得连续的遗传操作变得非常容易,被很快应用于一些二倍体酵母<sup>[22]</sup>。此外,在应用 PCR 一步破坏法时, Wilson 等用 *URA3* 基因 3' 下游一段短序列来替代 *hisG* 序列,避免了由于 *hisG* 序列过长可导致选择标记很容易由于同源区退火而被剔除掉的情况发生<sup>[23]</sup>。除了 *hisG* 序列,其它如来源于细菌噬菌体 P1 的 *loxP* 序列也被应用到多基因破坏的研究,此序列可在 Cre 重组酶的介导下产生特异性重组,使选择标记被剪切,从而实现其重复利用<sup>[24]</sup>。这些方法对于作为二倍体酵母的有着重要的参考意义。

有效的转化方法对于分子遗传学操作也非常重要。经过对传统酵母转化手段加以改进,已经建立了一些比较成熟的热带假丝酵母转化方法。目前转化效率最高的为原生质体转化方法,其转化效率可达  $10^4/\mu\text{g}$  DNA, 其它如电转化方法也被应用<sup>[15,16,25]</sup>。

### 参考文献

- [1] Sutter T R, Sanglard D, Loper J C. *J Biol Chem*, 1990, **265** (27): 16428 ~ 16436.
- [2] Gmunder F K, Kappeli O, Fiechter A. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1981, **12**: 135 ~ 142.
- [3] Eschenfeldt W H, Zhang Y, Samaha H, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** (10): 5992 ~ 5999.
- [4] Sanglard D, Kappeli O, Fiechter A. *J Bacteriol*, 1984, **157** (1): 297 ~ 302.
- [5] Kemp C D, Dickinson F M, Ratledge C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**: 370 ~ 374.
- [6] Nuttley W M, Aitchison J D, Rachubinski R A. *Gene*, 1988, **69** (2): 171 ~ 180.
- [7] Porter T D, Coon M J. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 13469 ~ 13472.
- [8] Seghezzi W, Meili C, Ruffiner R, et al. *DNA Cell Biol*, 1992, **11** (10): 767 ~ 780.
- [9] Craft D L, Madduri K M, Eshoo M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** (10): 5983 ~ 5991.
- [10] He F, Chen Y T. *Yeast*, 2005, **22** (6): 481 ~ 491.
- [11] Eirich L D, Craft D L, Steinberg L, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (8): 4872 ~ 4879.
- [12] Ueda M, Tanaka A. *Methods in Enzymology*, 1990, **188**: 176 ~ 178.
- [13] Okazaki K, Tan H, Fukui S, et al. *Gene*, 1987, **58** (1): 37 ~ 44.
- [14] Sloots J A, Aitchison J D, Rachubinski R A. *Gene*, 1991, **105** (1): 129 ~ 134.
- [15] Kanayama N, Ueda M, Atomi H, et al. *J Bacteriol*, 1998, **180** (3): 690 ~ 698.
- [16] Haas L O, Cregg J M, Gleeson M A. *J Bacteriol*, 1990, **172** (8): 4571 ~ 4577.
- [17] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, et al. *Biotechnology (N Y)*, 1992, **10** (8): 894 ~ 898.
- [18] Hara A, Ueda M. *Biosci Bioeng*, 1999, **87**: 717 ~ 720.
- [19] Hara A, Arie M, Kanai T, et al. *Arch Microbiol*, 2001, **176** (5): 364 ~ 369.
- [20] 高弘, 张剑, 华玉涛, 等. *微生物学报*, 2005, **45** (1): 102 ~ 105.
- [21] Alani E, Cao L, Klockner N. *Genetics*, 1987, **116**: 541 ~ 545.
- [22] Staab J F, Sundstorm P. *Trends Microbiol*, 2003, **11**: 69 ~ 73.
- [23] Wilson R B, Davis D. *Yeast*, 2000, **16**: 65 ~ 70.
- [24] Iwaki T, Takegawa K. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**: 545 ~ 550.
- [25] Rohrer T L, Picataggio S K. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36** (5): 650 ~ 654.