

糖类和 pH 值的改变对十二碳二元酸发酵的影响*

任 刚 陈远童**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词:热带假丝酵母, 十二碳二元酸, 代谢调控

中图分类号:TQ920.1 文献标识码 A 文章编号 0001-6209 (2000) 02-0214-16

烷烃发酵是非均相发酵,其发酵液中存在气相、固相、水相和油相。因此,烷烃发酵与一般微生物发酵方法不一样。它是高耗氧、高产热的发酵过程,并且会在发酵过程中产生乳化剂,以便油相和水相混匀,使微生物更好地利用烷烃^[1-3]。烷烃和糖类等水溶性基质不同:烷烃的疏水性决定了微生物对它的利用是在非均相中进行的。微生物要利用烷烃就必须具有对烷烃的亲合力及将其乳化的能力^[4-5]。而糖类则对二元酸的发酵发生一定的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验室提供的 UH-2-48 菌株,由紫外线诱变筛选获得。

1.2 试剂

正十二烷(nC_{12})(南京石油化工厂分馏);重蜡(锦西石油化工五厂生产)。

1.3 麦芽汁斜面

10Be'的麦芽汁,1.5%琼脂粉,0.06Mpa 灭菌 30min。

1.4 烷烃种子培养基

KH_2PO_4 0.8g;酵母膏 0.5g;玉米浆 0.3g;蔗糖 0.5g,用自来水定容到 100mL,自然 pH,0.06MPa 灭菌 30min。尿素 0.3g,分消;重蜡 5.0g,分消。

1.5 发酵基本培养基

KH_2PO_4 0.8g;NaCl 0.1g;酵母膏 0.2g;玉米浆 0.1g;蔗糖 0.2g,用自来水定容到 100mL,调 pH 到 7.3,0.06MPa 灭菌 30min。 nC_{12} 20mL(v/v),分消;重蜡 3.3mL(v/v),分消;尿素 0.12g,分消。

1.6 发酵时间

种子在种子培养基上培养 48h 到对数生长期。接 3mL 的菌液到发酵培养基中发酵 4d。

1.7 二元酸的测定

1.7.1 二元酸样品的制备:发酵終了,在 500mL 三角瓶中,用 6mol/L HCl 调 pH 值至 3.0,每瓶加入 120mL 乙醚,摇动 100 次,放置 30min 以上,静置分层,取出 40mL 乙醚提取液,加到 100mL 烧杯中,除去乙醚,得到白色固体。然后进行二元酸的测定。

1.7.2 二元酸产量的测定:将提取得到的二元酸用中性热乙醇(95%)溶解,加入一滴酚酞,用标准

* 国家“九五”攻关重大科研项目(96-C03-03-04)

**微生物资源前期开发国家重点实验室成员

作者简介:任刚(1971-),男,湖南省澧县人,中国科学院微生物研究所硕士,从事微生物代谢调控和酵母基因表达研究

收稿日期:1998-10-15,修回日期:1999-01-28

NaOH 溶液滴定,记录消耗的 NaOH 体积,计算 DC₁₂ 产量。

1.7.3 二元酸的纯度分析:在二元酸样品中加入四甲基氢氧化铵和一滴酚酞,用 SP2305 型色谱仪鉴定,选用氢火焰离子化检测器;上海 101 白色担体,80 目,5%SE-30 为固定液;柱温为 190℃~230℃;N₂ 28mL/min;H₂ 12mL/min。

2 实验结果

2.1 糖对十二碳二元酸发酵产量和纯度的影响

本试验选用了几种糖进行了以糖类作为调控因子的实验,其中包括木糖、乳糖、麦芽糖、棉子糖和葡萄糖五种。以分析其对十二碳二元酸产量提高的最佳浓度及纯度。其培养基是以基本培养基为基础(包括重蜡),加入各种糖作为调控因子。各种糖的浓度实验以含 0.2% 蔗糖发酵基本培养基为对照。并对十二碳二元酸样品进行纯度分析。结果表明,所采用的糖加入后均能不同程度提高十二碳二元酸的产量和纯度(见图 1~2 和表 1)。推测某些糖类作为调控因子时可能会比蔗糖更强烈地抑制 β-氧化作用。

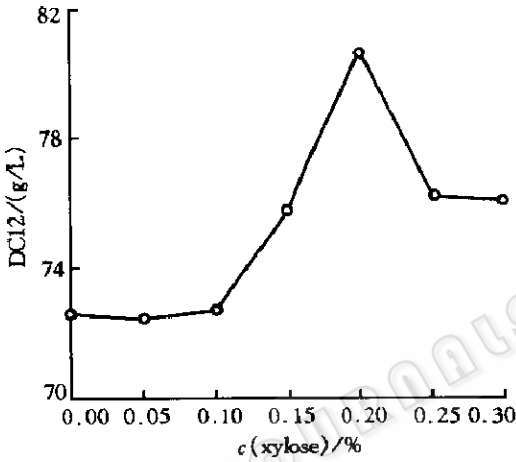


图 1 木糖浓度变化对 DC₁₂ 产酸量的影响

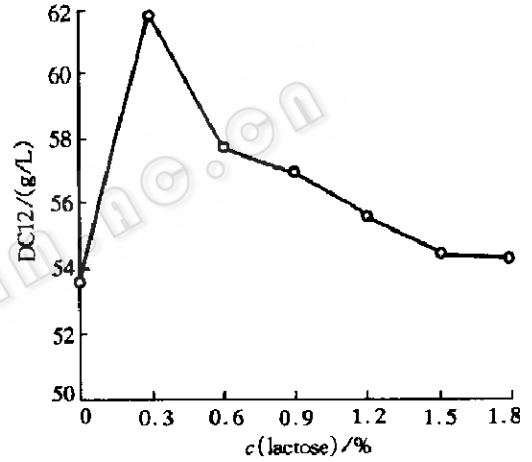


图 2 乳糖浓度变化对 DC₁₂ 产酸量的影响

表 1 十二碳二元酸产品的纯度与各种糖类的关系

糖类	葡萄糖	乳糖	木糖	棉子糖	蔗糖
纯度/%	99.06	98.58	99.30	99.24	97.35

2.2 pH 对十二碳二元酸发酵的影响

2.2.1 培养基初始 pH 值的影响:实验结果表明:发酵液初始 pH 值在 7.0~8.0 对十二碳二元酸的产生较有利。而在酸性环境时虽能促进菌体的生长,却

对十二碳二元酸产酸不利。

2.2.2 发酵过程中 pH 酸性对酸产量的作用:偏酸性环境是酵母菌生长的最适环境,但却不是发酵生产十二碳二元酸的最适环境。本实验采用在基本培养基发酵时每隔 24h 调发酵液 pH 到指定的 pH。从图 3 可以发现在低 pH(4.0~5.5)下基本不产酸。但当 pH 超过 6.0 以后,则十二碳二元酸的产量明显上升。越是偏碱性其产量越高。这可能是因为过量的 H⁺ 使十二碳二元酸在胞内累积,从而造成产物的反馈抑制,减少十二碳二元酸的产量。

2.2.3 发酵过程中 pH 碱性对酸产量的作用:本实验采用在基本培养基发酵时每隔 24h 调 pH 到指定的 pH。在偏碱性环境下,十二碳二元酸的产量明显上升。在 pH8.0 左右达到最高值(图 4)。可能是因为 OH⁻ 中和十二碳二元酸中的 H⁺ 使胞内外 H⁺ 浓度梯度加大,从而使十二碳二元酸加速通过细胞膜而运送到胞外,减少十二碳二元酸在胞内的累积性抑制。

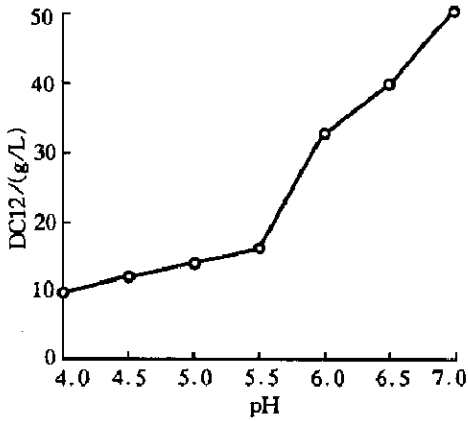


图3 发酵过程中 pH 控制在酸性时
对 DC₁₂ 产量的影响

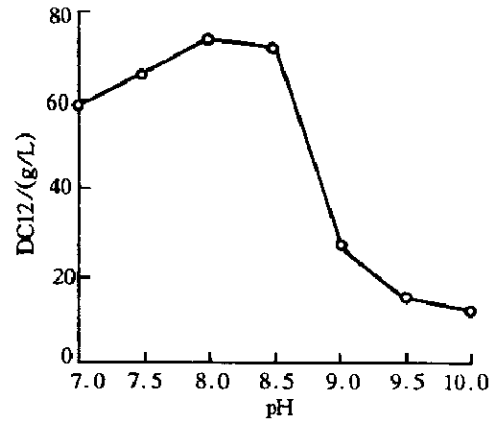


图4 发酵过程中 pH 控制在碱性时
对 DC₁₂ 产量的影响

3 讨论

糖类如葡萄糖、乳糖、木糖、麦芽糖等均能在提高十二碳二元酸纯度方面比蔗糖好。这些糖可能对 β -氧化作用具有抑制作用。十二碳二元酸产品的纯度取决于菌体 ω/β 氧化能力的相对值, 其值越大, 十二碳二元酸产品的纯度越高。

发酵工艺的改变能引起十二碳二元酸产量的改变。其中 pH 值的控制是最重要的。实验证明在发酵液中调 pH7.5~pH8.0 之间产酸量最高。产物是通过 H^+ 和十二碳二元酸的同向运送而跨膜运送到胞外的。

参 考 文 献

- [1] 陈远童, 郝秀珍. 生物工程学报, 1987, 3(4): 307~308.
- [2] 陈远童, 郝秀珍. 生物工程学报, 1989, 5(3): 241~245.
- [3] 陈远童, 庞月川, 方心芳. 微生物学通报, 1984, 11(2): 61~64.
- [4] 植村南海男. 化学工业, 1987, 20: 13~16.
- [5] 陈远童, 郝秀珍. 微生物学报, 1985, 12(2): 65~67.
- [6] Stephen P. *J Cell Biol*, 1991, 61: 188~199.

EFFECT OF SUGARS AND pH ON THE FERMENTATION OF DECANE 1, 10-DICARBOXYLIC ACID

Ren Gang Chen Yuantong

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

Abstract: Some sugars, such as lactose, maltose, raffinose, glucose etc. can increase the purity of DC₁₂ compared with sucrose. The value of pH can affect the process of producing DC₁₂. Controlling the pH value between 7.5~8.0 can highly improve the production of DC₁₂. *Candida tropicalis* can symport the DC₁₂ with H^+ to the outside of the cell.

Key words: *Candida tropicalis*, Decane 1, 10-Dicarboxylic acid, Metabolic regulation