

正烷烃发酵生产长链混合二羧酸

I. 菌种的筛选、诱变及鉴定

中国科学院微生物研究所烃代谢组及发酵车间

(北京)

从702株酵母菌中筛选到21株能利用混合正烷烃产生较多二羧酸的菌株,其中1230号菌株产二羧酸量较高,而产一羧酸极少,经鉴定为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)。1230号菌株以癸二酸及十二碳二羧酸作指示培养基的唯一碳源,经亚硝基胍及紫外线诱变,挑选出在指示培养基上不生长,而在完全培养基上生长的菌落,最后得到产酸量为2.43%的突变株U₃₋₁₁。其发酵产物分离提纯后,经气液相色谱鉴定为与基质链长相应的长链混合二羧酸。

长链二羧酸是生产尼龙工程塑料、耐寒性农用薄膜的增塑剂、粘合剂、日用及名贵香料、药材等的重要原料。目前这种原料来源甚缺,且难以用化学方法合成。以微生物发酵正烷烃产生单一二羧酸虽有许多报道^[1-5],但尚未见到以混合正烷烃发酵产生长链混合二羧酸的资料。本文报道产生长链混合二羧酸的菌种筛选、诱变及鉴定。

玉米浆 0.03, 尿素 0.05—1.0, 长链烷烃 5%(V/V), 自来水, pH 7.0。

2. 诱变培养基: (1) 完全培养基(%): 酵母膏 1.0, 蛋白胍 1.0, NaCl 0.3, 琼脂 2.0, 自来水, pH 7.0。 (2) 无碳源培养基(%): KH₂PO₄ 0.2, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.07, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, (NH₄)₂SO₄ 0.5, 20% 豆芽汁 3.0, 水洗琼脂 2.0, 蒸馏水。 (3) 指示培养基: 无碳源培养基中加1%癸二酸或十二碳二羧酸。

3. 灭菌: 筛选培养基 8磅灭菌 30分钟, 诱变培养基 15磅灭菌 30分钟, 烷烃及尿素分别灭菌。

(四) 种子培养与发酵

供试菌株在麦芽汁琼脂大斜面上, 28℃ 培养 48小时后, 接入 500 毫升盛有 30—50 毫升筛选培养基的三角瓶中, 28℃ 旋转式摇床(约 200 转/分钟)培养 96 小时。

(五) 二羧酸的提取与鉴定

发酵液用盐酸酸化至 pH 2.0, 用乙醚抽提, 去乙醚后即得白色结晶样品。

(1) 纸色谱法: 发酵产物二羧酸与已知 DC₈—DC₁₆ 样品均配成 1% 甲醇溶液, 分别点样于中速新华 1 号滤纸上, 用浓氨水饱和 1 小时左右, 在 95% 乙醇: 浓氨水(87:13) 溶剂系统中展开 12—14

材料和方法

(一) 菌种

本所保藏室及本组保存的酵母菌 702 株。

(二) 试剂

长链混合正烷烃 (C₁₀—C₁₆), 锦西石油化工五厂提供; 200# 轻油 (C₁₀—C₁₄), 北京东方红炼油厂提供; DC₈—DC₁₆, 亚硝基胍及其他试剂均为试剂级; DC₁₁, DC₁₂, DC₁₃, DC₁₄, DC₁₆ 由本组合成, 经分析为纸层析纯。

(三) 培养基

1. 筛选培养基(%): (1) NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.6, KCl 0.02, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 酵母膏 0.05, 玉米浆 0.03, 尿素 1.0, 长链烷烃 2% (V/V), 自来水, pH 4.8—5.1。 (2) Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.0, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 酵母膏 0.05,

本文于 1979 年 2 月 10 日收到。

本文采用如下缩写: C_n 代表正烷烃, DC_n 代表二羧酸。

小时,温度为15—25℃,用甲基红磷酸缓冲液显色。

脂肪酸样品与不同链长的标准一羧酸均配成甲醇溶液,点样于反相纸上。反相纸是中速新华1号滤纸,用7%液蜡(沸点300℃以上)-乙醚液处理,待乙醚挥发后使用。在25—30℃下,在冰醋酸:水(90:10)展开剂中展开12小时。晾干后在醋酸铜溶液(饱和醋酸铜溶液:水=4:96)中浸泡半小时,取出用水冲15分钟,再在1.25%黄血盐溶液中浸10分钟以上,斑点为紫红色。

(2) 气液相色谱法: 二羧酸样品用甲醇-硫酸酐法生成二羧酸二甲酯,用SP 2305型色谱仪鉴定,选用氢火焰离子化检测器;上海101白色担体,60—80目;5% SE-30为固定液;柱温为190—230℃;进样口温度为240—300℃;N₂ 28毫升/分钟;H₂ 12毫升/分钟。

一羧酸的鉴定,采用双火焰离子化鉴定器,N₂ 46毫升/分钟;H₂ 22毫升/分钟;空气1000毫升/分钟。其他条件与二羧酸的鉴定相同。

(3) 滴定法: 二羧酸样品溶解于95%热的中性乙醇中以标定过的NaOH滴定。用混合二羧酸的平均分子量计算产酸量。

(六) 长链二羧酸的合成方法

分别用壬二酸和癸二酸作原料,采用碘链加长的方法合成长链二羧酸,原料酸先酯化成二乙酯^[6],再加氢还原成二醇^[7],二醇与氢溴酸反应生成二溴代烷^[8],再与氰化钠作用生成二腈^[9],这时在原碳链上增加了两个碳原子,二腈水解即得加长两个碳原子的二羧酸。将二溴代烷与丙二酸酯加成,可制取比原碳链加长四个碳原子的二羧酸^[10,11]。

实验结果

(一) 产二羧酸的菌种筛选

从702株菌中筛选出能产生二羧酸的菌株344株(表1),其中21株产酸较多。除一株为红酵母外,其余均为假丝酵母属(表2),并多为解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)及热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)。在21株产酸较多的菌中,菌株1230号产酸量较高,且产一羧酸极少,但多为

C₁₀以下的短链二羧酸,为进一步提高二羧酸产量及积累C₁₀以上的长链二羧酸,选择了1230号作为原始菌株进行亚硝基胍及紫外线诱变。

表1 利用正烷烃产生二羧酸菌株的筛选

菌名	筛选株数	产酸株数
酵母属 <i>Saccharomyces</i>	28	4
拟内孢霉属 <i>Endomycopsis</i>	1	0
裂殖酵母属 <i>Schizosaccaromyces</i>	2	0
地霉属 <i>Geotrichum</i>	2	1
德巴利酵母属 <i>Debaryomyces</i>	25	9
毕赤酵母属 <i>Pichia</i>	14	5
红酵母属 <i>Rhodotorula</i>	2	1
汉逊酵母属 <i>Hansenula</i>	5	1
球拟酵母属 <i>Torulopsis</i>	57	15
油脂酵母属 <i>Lipomyces</i>	1	0
丝孢酵母属 <i>Trichosporon</i>	2	2
念珠菌属 <i>Monilia</i>	1	0
假丝酵母属 <i>Candida</i>	345	295
类酵母属 <i>Saccharomycodes</i>	2	1
隐球酵母属 <i>Cryptococcus</i>	1	1
未鉴定种	214	10

表2 利用正烷烃产生较多二羧酸的菌株

菌名	产二羧酸株数
热带假丝酵母 <i>Candida tropicalis</i>	7
布龙假丝酵母 <i>Candida brumptii</i>	1
解脂假丝酵母 <i>Candida lipolytica</i>	7
类脱发假丝酵母 <i>Candida parapsilosis</i>	1
季也蒙假丝酵母 <i>Candida guilliermondii</i>	1
清酒假丝酵母 <i>Candida sake</i>	2
蜜二糖假丝酵母 <i>Candida melibiosa</i>	1
红酵母 <i>Rhodotorula</i> sp.	1

(二) 1230号菌株的诱变

1. 亚硝基胍诱变: 在麦芽汁斜面上培养24小时的菌种,取出一小环接入盛有20毫升麦芽汁培养基的250毫升三角瓶中,28℃振荡培养20小时,离心收集细胞。用生理盐水洗涤后悬浮于2毫升不同浓度(0.15—1.0毫克/毫升)的亚硝基胍 Tris 缓冲液(pH7.0)中,30℃水浴处理20分钟,

离心后洗涤两次,加 2 毫升生理盐水制成菌悬液。取 0.5 毫升接入盛有 10 毫升麦芽汁培养基的 250 毫升三角瓶中,振荡培养 12 小时,稀释后涂布于完全培养基平板上,28℃ 培养 48 小时。挑单菌落划线于含 1% 癸二酸的指示培养基及麦芽汁平板(或完全培养基平板)上,28℃ 培养 48 小时,挑出在指示培养基上不生长而在麦芽汁平板上生长的菌,接入筛选培养基(2)中进行产酸试验,经复筛后得到比 1230 号产酸量提高的突变株 ND₃₀。其发酵产物经气液相色谱分析,主要为 C₁₀ 以上的二羧酸。

用 0.25 毫克/毫升浓度的亚硝基胍溶液在不同温度(25℃ 及 30℃)下,再次处理 ND₃₀,诱变菌落划线于含 1% 十二碳二酸的指示培养基及麦芽汁平板上,挑出不利用十二碳二酸的突变株接入筛选培养基(2)中,每天以 5N NaOH 调 pH 至 8.0 进行产酸筛选,产酸量用 NaOH 滴定,得到比 ND₃₀ 产酸进一步提高的突变株 T₂₅₋₁₄。

2. 紫外线诱变:取 10 毫升 T₂₅₋₁₄ 菌悬液(3—5 × 10⁸ 个细胞/毫升)于 9 厘米培养皿中,在功率 15 瓦、波长 2537 Å 的紫外灯下距离 30 厘米照射不同时间(0.5—9 分钟),照射时用电磁搅拌器搅动,照射液于暗处,28℃ 温箱培养 48 小时后,将诱变菌落划线于十二碳二酸指示培养基上,得到比 T₂₅₋₁₄ 产酸更进一步提高的突变株 U₃₋₂₁。其产酸量为 2.43%,发酵产物经气液相色谱分析,长链二羧酸占 96.5%。

以 200# 轻油(C₁₀—C₁₄)代替筛选培养基(2)中的长链混合正烷烃(C₁₀—C₁₉),对原始菌株及其突变株进行了产酸能力的比较(表 3),从表 3 看出,突变株 U₃₋₂₁ 产酸能力为原始菌株 1230 号的 5 倍。而且随着诱变方法的改变及次数增多,二羧酸向长链方面的积累也增加,如 DC₁₀、DC₁₁

在各突变株中逐渐下降,而 DC₁₂、DC₁₃ 和 DC₁₄ 在各突变株中则逐渐增高(图 1 及图 2)。

表 3 1230 号菌及其突变株产混合二羧酸能力的比较

菌号	1230	ND ₃₀	T ₂₅₋₁₄	U ₃₋₂₁
产酸(%)	0.46	1.81	2.13	2.43

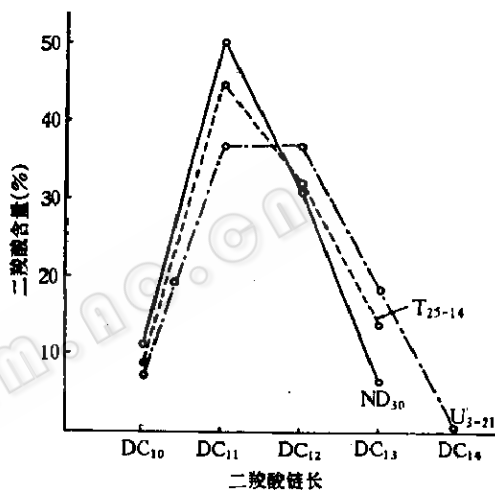


图 1 1230 号菌各突变株产二羧酸各组分含量的比较

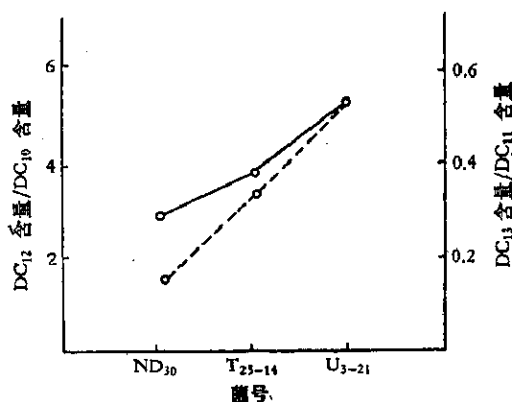


图 2 1230 号菌各突变株积累长链二羧酸的趋势

— DC₁₂ 含量/DC₁₀ 含量
 - - - DC₁₃ 含量/DC₁₁ 含量

(三) 突变株 U₃₋₂₁ 与出发菌株 1230 号生理特性的比较

表 4 1230 号与 U₃₋₂₁ 菌株生理特性的比较

	基 质		1230	U ₃₋₂₁		基 质		1230	U ₃₋₂₁
	糖类的发酵	葡萄糖	+	+		+	同 化	赤藓醇	-
	半乳糖	+	+	+	甘露醇	+		+	
	蔗糖	+	+	+	肌醇	-		-	
	麦芽糖	+	+	+	核糖醇	+		+	
	乳糖	-	-	-	半乳糖醇	-		-	
同 化	葡萄糖	+	+	+	生 长 素 的 需 要	葡萄糖醇	+	+	
	半乳糖	+	+	+		柠檬酸钠	-	-	
	山梨糖	-	-	-		丁二酸钠	+	+	
	蔗糖	+	+	+		乳酸钙	-	-	
	麦芽糖	+	+	+		生物素	++	++	
	纤维二糖	+	+	+	维生素 B ₁	++	++		
	海藻糖	+	+	+	维生素 B ₂	+	+		
	乳糖	-	-	-	维生素 B ₆	+	+		
	蜜二糖	-	-	-	维生素 B ₁₂	+	+		
	棉子糖	-	-	-	叶酸	+	+		
	松三糖	+	+	+	烟酸	+	+		
	菊芋糖	-	-	-	泛酸	+	+		
	可溶性淀粉	+	+	+	肌醇	+	+		
	木糖	+	+	+	对氨基苯甲酸	+	+		
	L-阿戊糖	+	+	+	其 他	硝酸盐	-	-	
	D-阿戊糖	-	-	-		冻化牛奶	-	-	
	核糖	-	-	-		熊果苷分解	-	-	
	鼠李糖	-	-	-		凝固牛奶	-	-	
	α-甲基葡萄糖苷	+	+	+		油脂酶	-	-	
甘油	+	+	+	最高生长温度		39—40°C	39—40°C		
乙醇	+	+	+						

按 Lodder^[12] 的分类系统, 1230 号菌经鉴定为热带假丝酵母 (表 4, 图版 I-1—5)。

表 5 U₃₋₂₁ 及 1230 号菌株在不同碳源上的生长

碳 源	菌 种		光密度之比
	1230	U ₃₋₂₁	
麦 芽 汁	0.95	0.465	2:1
长链混合烷烃	0.43	0.29	1.5:1
200 [#] 轻 油	0.30	0.09	3.3:1
十六 酸 钠	0.23	0.165	1.4:1
长链混合二羧酸	0.135	0.055	2.6:1

所示。由表 4 可以看出, 两株菌对糖类、烷烃、脂肪酸及维生素的需要基本相同, 但 U₃₋₂₁ 菌在上述各种碳源上的生长能力都比原始菌株表现出不同程度的减弱, 特别是在 200[#] 轻油及长链混合二羧酸上减弱尤甚 (表 5)。所以, U₃₋₂₁ 菌在这些培养基上的生成菌落也薄。原始菌株在长链混合二羧酸上的生成菌落直径为 15 毫米, 而 U₃₋₂₁ 则小于 5 毫米。

讨 论

通过筛选, 产生二羧酸的酵母大多属于假丝酵母属。经亚硝基胍及紫外线诱变得到的突变株 U₃₋₂₁, 经两年多来冰箱冷冻

U₃₋₂₁ 与 1230 号菌株生理特征如表 4

保存及传代实验,产酸性能稳定,说明该突变株获得性遗传稳定。

日本科学家^[13]选育出的突变株 MR-12 需要另加非烃生长碳源方能氧化烷烃产生二羧酸。我们诱变得到的 U₃₋₂₁ 突变株同化长链烷烃,因而能利用长链烷烃作碳源产生二羧酸。

1230 号菌利用长链正烷烃产生 DC₁₀ 以下的短链二羧酸,ND₃₀ 突变株则能利用长链正烷烃产生 DC₁₀ 以上的长链二羧酸,这说明 ND₃₀ 的 β 氧化能力比 1230 号大为减弱。T₂₅₋₁₄ 及 U₃₋₂₁ 突变株都能利用长链正烷烃产生长链二羧酸,但它们之间也有差异,即产生的二羧酸中 DC₁₀、DC₁₁ 组份的含量随逐步诱变而下降,DC₁₂、DC₁₃、DC₁₄ 组份的含量却随逐步诱变而上升,这表明这些变异使 β 氧化能力减弱,从而使长链二羧酸的积累总量也逐步增加。因此,我们采用的诱变方法起到了定向选育的作用。

参 考 文 献

- [1] Shoji, I and R. Uhio: 石油と微生物, 1974, No. 11, 14.
- [2] 有马启, 荻野重男: 日本特许公报, 昭 45-24392, 1970.
- [3] Uhio, R. and I. Shoji: *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1389, 1972.
- [4] 赤堀四郎, 椎尾勇, 内尾良辅: 日本特许公报, 昭 50-19630, 1975.
- [5] 古川敏郎等: 日本公开特许, 昭 52-18885, 1977.
- [6] A. H. 勃拉特主编: 有机合成, 中译本第二集, 科学出版社, 北京, 1964, 第 183 页.
- [7] A. H. 勃拉特主编: 有机合成, 中译本第二集, 科学出版社, 北京, 1964, 第 107 页.
- [8] A. H. 勃拉特主编: 有机合成, 中译本第一集, 科学出版社, 北京, 1957, 第 20 页.
- [9] A. H. 勃拉特主编: 有机合成, 中译本第一集, 科学出版社, 北京, 1957, 第 431 页.
- [10] Chit, P.: *Hel. Chem. Acta*, **9**:264, 1962.
- [11] Drake, N. L. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**:617, 1941.
- [12] Lodder, J.: *The Yeast. A Taxonomic Study*. North Holland Publishing, Co., Amsterdam, 1970.
- [13] Uhio, R. and I. Shoji: *Agr. Biol. Chem.*, **36**:1169, 1972.
- [14] 中国科学院微生物研究所烃代谢组及发酵车间: 微生物学报, **19**(1):71-75, 1979.

FERMENTATIVE PRODUCTION OF MIXED LONG CHAIN DICARBOXYLIC ACIDS FROM *n*-ALKANES

I. SCREENING, MUTATION AND IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISMS

Research Group of Hydrocarbon Metabolism and Fermentation
Workshop, Institute of Microbiology, Academia Sinica
(Beijing)

In the course of studying the alkane metabolism, it was found that considerable strains of yeasts can produce dicarboxylic acids.

Among more than 700 strains of yeast tested, including 15 genera and some unidentified species, about a half can produce dicarboxylic acids, and 21 strains yield more dicarboxylic acid than others. One of them is *Rhodotorula* sp. the others are *Candida tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. brumptii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. melibiose* and *C. sake*. Two third of them belong to *C. lipolytica* and *C. tropicalis* (table II).

From these strains we selected *C. tropicalis* strains 1230 which yield shorter chain dicarboxylic acids but it scarcely yielded monocarboxylic acid from *n*-alkanes. In order to accumulate the

dicarboxylic acids longer than ten carbon atoms, strain 1230 was treated with Nitrosoguanidine and Ultraviolet radiation.

During the treatment the sebacic acid and dodecanedioic acid were used as the indicative media respectively. Colonies which can grow on complete media but not on the media were selected. A mutant strain U_{3-21} which can yield dibasic acids with chain length more than 10 carbon atoms from alkane mixture (C_{10} — C_{14}) has been obtained. The yield of dibasic acid is 2.43%, which is four times higher than the strain 1230. Mutant U_{3-21} can grow well on long chain alkanes, but can not utilize dibasic acids, so that can accumulate dibasic acids. After improvement of the fermentation conditions, a yield of over 6% of dibasic acid was obtained.