

微生物的正烷烃代谢

1. 假丝酵母的正烷烃代谢产物的研究

中国科学院微生物研究所烃代谢组

(北 京)

我们研究了假丝酵母属不同菌种代谢正烷烃的产物,观察到其发酵液中均产生醇、酸、酯,由此可认为醇、酸、酯是烷烃代谢中正常而普遍的产物。

由于菌种不同,代谢产物和途径亦不相同,如 AS 2.1207 菌能一端甲基氧化烷烃生成一羧酸,亦能两端甲基氧化生成二羧酸。而 1230 号菌及其突变株 U_{3-21} 则主要两端甲基氧化生成二羧酸。此外,AS2.1207 菌能利用烷烃产生不饱和一羧酸及比基质链长的一羧酸,说明它是一株具有脱氢及加长碳链能力的菌株。

由于基质不同,代谢产物也有差异。例如 AS2.1207 菌发酵癸烷、十六烷产生的一羧酸基本相同,而发酵十三烷产生的酸则与前者大不相同。 U_{3-21} 菌发酵长链混合烷烃、短链混合烷烃及单一烷烃的产物也都不相同。

有关微生物氧化正烷烃的报告很多。其主要氧化类型可分为三类:(1)正烷烃分子末端的甲基氧化生成醇、醛、酸的单端氧化 (Monoterminal oxidation)^[1,2];(2)正烷烃分子第二碳的亚甲基氧化形成甲基酮的次末端氧化 (Subterminal oxidation)^[3-8];(3)正烷烃分子两端的甲基氧化形成二羧酸的双端氧化 (Diterminal oxidation)^[9-14]。在烃类物质的微生物代谢中,这种初期氧化能产生许多有用的中间产物。本文报道我们第一阶段的试验工作,通过代谢产物分析了解假丝酵母属酵母代谢正烷烃的途径,为深入研究代谢机制打下基础。并试图对不同代谢途径的菌株进行选育,以期积累对国民经济有用的产物。

材料和方法

(一) 菌种: 本所保藏及本实验室保藏菌种: 解脂假丝酵母 (*Candida Lipolytica*) AS2.1207; 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 1230 及其突

变株 U_{3-21} 。

(二) 试剂: 癸烷,十一烷,十二烷,十三烷,十五烷和十六烷,纯度均大于 95%; 中链混合正烷烃 ($C_{10}-C_{14}$)*; 长链混合正烷烃 ($C_{11}-C_{19}$); 其他试剂均为试剂级。

(三) 培养基(%): (1) $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.8, KCl 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 酵母膏 0.05, 玉米浆 0.03, 尿素 1.0, 十六烷 2.0, 冷开水, pH4.7。 (2) $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.8, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 酵母膏 0.05, 玉米浆 0.03, 尿素 0.2, 单烷烃或混合烷 10.0, 自来水, pH7.0。

(四) 培养: 培养基中分别接入不同麦芽汁斜面菌种或种子液后,置 28℃ 摇床 (每分钟约 200 转)培养不同时间后收集发酵液。

(五) 样品的制备: AS 2.1207 菌发酵各种正烷烃 40 小时的发酵液,用 6N 盐酸调 pH 至 2.5, 倒入 G, 砂芯漏斗抽滤,滤液用乙醚提取,去乙醚浓缩物为二羧酸样品; 滤饼用乙醇浸洗三次,抽

本文于 1979 年 8 月 6 日收到。

* 本文以 C_n 代表正烷烃, MC_n 代表一羧酸, DC_n 代表二羧酸, 数字 n 代表碳链长度。

滤, 滤液浓缩后加 0.5N NaOH 使生成脂肪酸钠, 每次以三倍于水溶液的乙醚在分液漏斗中提取二次, 醇、酯进入醚层, 用 0.1N NaOH 溶液洗醚层, 水洗液合并入水层, 用盐酸酸化后用乙醚抽提, 浓缩后得长链脂肪酸样品。洗过的醚层浓缩后得醇、酯混合物, 再以薄层层析分离醇和酯。酯的皂化方法是按 1 克酯加 50 毫升 2N KOH 无水乙醇液于水浴回流 4 小时, 去乙醇, 浓缩物加 20 毫升蒸馏水及 50 毫升乙醚抽提, 水层为皂化后的酸, 醚层得皂化后的醇。

(六) 分析方法

1. 纸色谱: 长链一羧酸用新华 1 号中速滤纸, 预先以 7% 的液蜡(沸点在 300℃ 以上)乙醚液处理。溶剂系统: 冰醋酸: 水 = 90:10, 显色剂: 4% 的饱和醋酸铜溶液及 1.25% 黄血盐溶液。展开温度 20—30℃。二羧酸用新华中速滤纸, 溶剂系统: 95% 乙醇: 氨水 = 87:13。显色剂: 1% 甲基红硼酸溶液, 展开温度 15—25℃。

2. 薄层色谱: 将稀盐酸处理过的硅胶及石膏, 分别用 120 目的筛过筛, 按硅胶: 石膏 = 88:12 的比例混合, 用蒸馏水充分调匀, 平铺在 20×8—20 厘米² 的玻板上, 晾干后置 105℃ 烘箱烘 3 小时。溶剂系统: 石油醚: 乙醚: 冰醋酸 = 70:30:2。展开温度: 28℃, 半小时。显色剂: 0.2% 二氯荧光素乙醇液, 或在紫外检示灯下观察。酯的检定用 Hill^[1] 法, 醇的检定用气液色谱。

3. 柱色谱: 取内径为 1.0 厘米的玻璃柱, 加入石油醚 (60—90℃), 将预先经甲醇及乙醚浮选过的硅胶 20 克浸入石油醚中, 然后徐徐装入玻璃柱中。

4. 气液色谱: 一羧酸及醇的分析采用氢火焰离子化鉴定器, 固定液为 15% 二乙二醇琥珀酸聚酯, 6201 担体, 40—60 目, 柱长 1 米, 内径 6 毫米, 氢气流速 48 毫升/分, 氮气流速 56 毫升/分, 空气流速 200 毫升/分, 柱温 173℃。二羧酸采用氢火焰离子化鉴定器, 固定液 5% SE-30; 40—60 目白色担体, 柱长 2 米, 内径 4 毫米, 氢气流速 12 毫升/分, 氮气流速 28 毫升/分, 柱温 170—230℃, 入口温度 240—300℃。

5. 一羧酸及二羧酸的酯化: 采用甲醇-硫酸法制备成甲酯或二甲酯。

6. 不饱和脂肪酸的加氢: 称取 0.1 克发酵的

酸样品, 用少量无水乙醇溶解, 加入小瓶中, 加 0.5 克钯炭, 将小瓶紧密连接于启普发生器通氢气 3 小时, 加氢饱和后的酸样品用乙醚提取后浓缩。

实验结果

(一) 解脂假丝酵母 AS 2.1207 号菌的代谢产物及代谢途径

利用烷烃的酵母菌必须具有对烃的亲合力, 其亲和力的大小随菌种和培养基的 pH 而异, 生长于烷烃的酵母菌还能产生较多的乳化剂, 使烃乳化于水中进一步被菌体利用。

(1) 醇和酯的测定: 分析了 AS 2.1207 号菌发酵正十六烷的醇、酯产物。

薄层色谱: 将醇、酯混合物样品薄层展开后置紫外检示灯下观察, 前沿有暗紫色斑点, 下端有亮紫色斑点, 分别与已知醇、酯样品的 R_f 相同 (图 1)。经 0.2% 二氯荧光素显色, 斑点均显荧光, 小心刮出斑点, 用乙醚洗脱, 用 Hill 定酯法检定前缘斑点为酯, 以气液色谱分析板下端斑点为醇。此法不能分离酯及醇的组份。

柱色谱: 将十六烷发酵得到的醇、酯混合物溶解在 3% 乙醚石油醚中上硅胶柱,

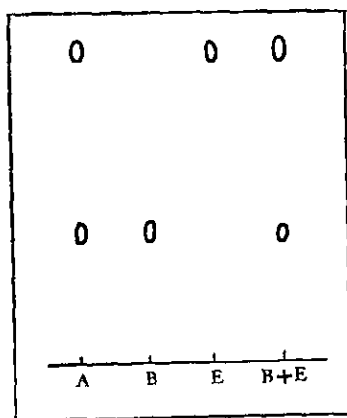


图 1 AS 2.1207 号菌发酵十六烷产生的醇、酯样品的薄层色谱

A: 发酵样品; B: 醇的标准样品;
E: 标准十八酸十八醇酯

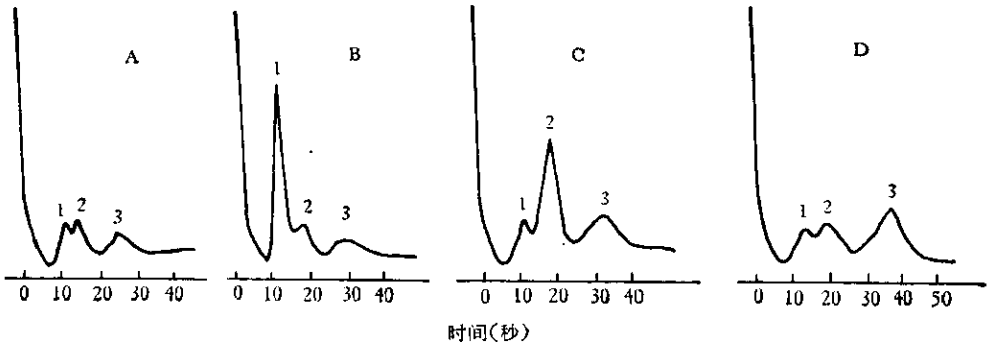


图2 AS2.1207 号菌发酵十六烷产生的醇的气液色谱

A: 样品; B: 样品+标准十四醇; C: 样品+标准十六醇; D: 样品+标准十八醇。
1: 十四醇; 2: 十六醇; 3: 十八醇。

先用3%乙醚-石油醚洗脱,洗脱速度0.4毫升/分(25℃)、每管收集5毫升,共收集45管,然后改用甲醇洗脱液,洗脱速度2—3毫升/分,共收集15管,酯高峰出现在28、29二管中,醇高峰出现在55—57三管中。将分离的醇样品进行气液色谱分析,为十四醇,十六醇及十八醇(图2)。酯水解后得到的酸与游离酸相同(图3)。得到的醇经气液色谱分析亦与游离醇相同,证明十六烷发酵得到的酯为长链酸与长链醇结合成的长链酯。

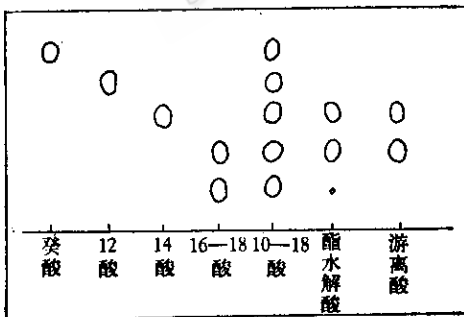


图3 AS 2.1207 号菌发酵十六烷产生的酯水解后酸的纸色谱

(2) 酸的测定: 将 AS2.1207 号菌发酵癸烷, 十三烷及十六烷得到的各种酸样品分别进行纸色谱及气色谱, 经鉴定癸烷发酵产生的二羧酸有丙、丁、戊、己、庚、辛、壬及癸二酸, 其中以己二酸为主(图4)。产

生的一羧酸除癸酸外尚有二种不饱和酸, 该酸加氢后作纸色谱, 与十六酸及十八酸相同, 故加氢前为十六烯酸及十八烯酸(图5), 经气液色谱鉴定为十六一烯酸及十八一烯酸。

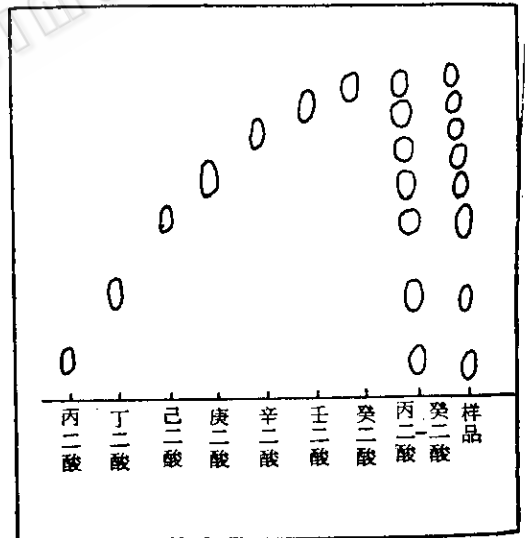


图4 AS 2.1207 号菌发酵癸烷产生的二羧酸的纸色谱
正相快速纸, 95%乙醇:氨水=95:5。

十六烷发酵产生的二羧酸有: 丁、戊、己及辛二酸, 其中也以己二酸为主(图6)。它产生与基质链长相同的饱和脂肪酸十六酸, 此外与癸烷发酵相似也产生不饱和脂肪酸十六一烯酸和十八一烯酸(图7)。

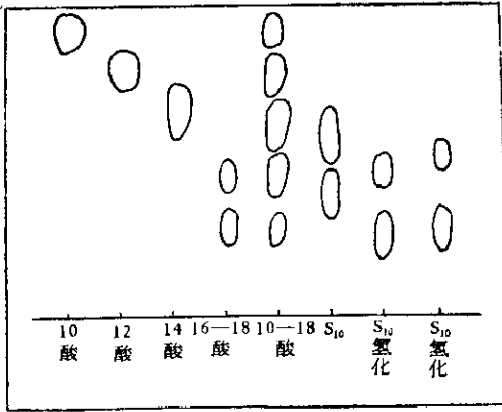


图5 AS 2.1207 号菌发酵癸烷产生的一羧酸的纸色谱
中速反相纸,冰醋酸:水=90:10
S: 发酵样品

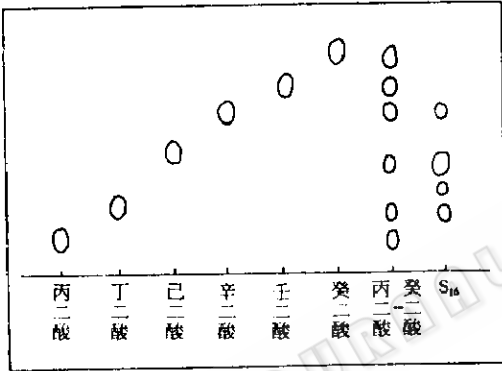


图6 AS 2.1207 号菌发酵十六烷
产生的二羧酸的纸色谱
S: 发酵样品

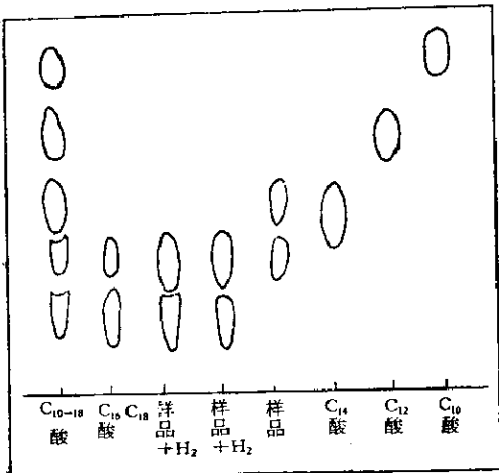


图7 AS 2.1207 号菌发酵十六烷
产生的一羧酸的纸色谱

用十三烷发酵产生的二羧酸有：丁、戊、己、庚及壬二酸，其中以庚二酸为主(图8)。而产生的一羧酸的种类则比偶数碳烷产生的要多，饱和的一羧酸也以奇数酸为多，有 $C_{9:0}$ 、 $C_{11:0}$ 、 $C_{13:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{16:0}$ 及 $C_{16:1}$ 、

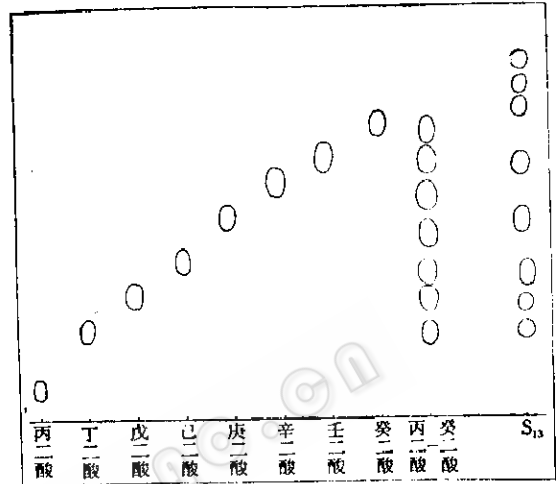


图8 AS 2.1207 号菌发酵十三烷产生的二羧酸的纸色谱
快速纸, 95% 乙醇: 氨水=95:5

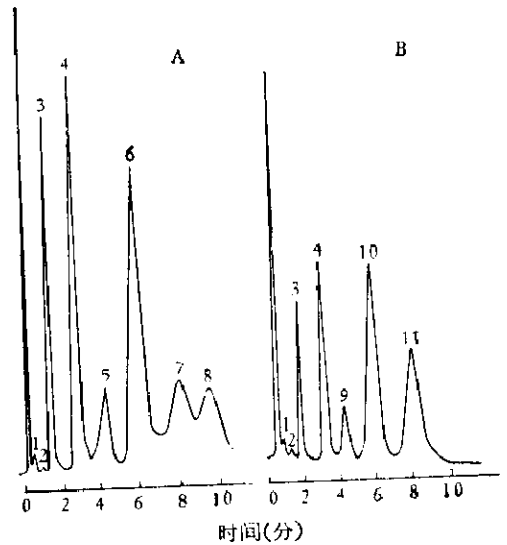


图9 AS 2.1207 号菌发酵十三烷
产生的一羧酸的气液色谱

A: 加氢前, B: 加氢后

1: 壬酸; 2: 十一酸; 3: 十三酸; 4: 十五酸; 5: 十六酸加十六一烯酸; 6: 十七一烯酸; 7: 十八一烯酸; 8: 十八二烯酸; 9: 十六酸; 10: 十七酸; 11: 十八酸。

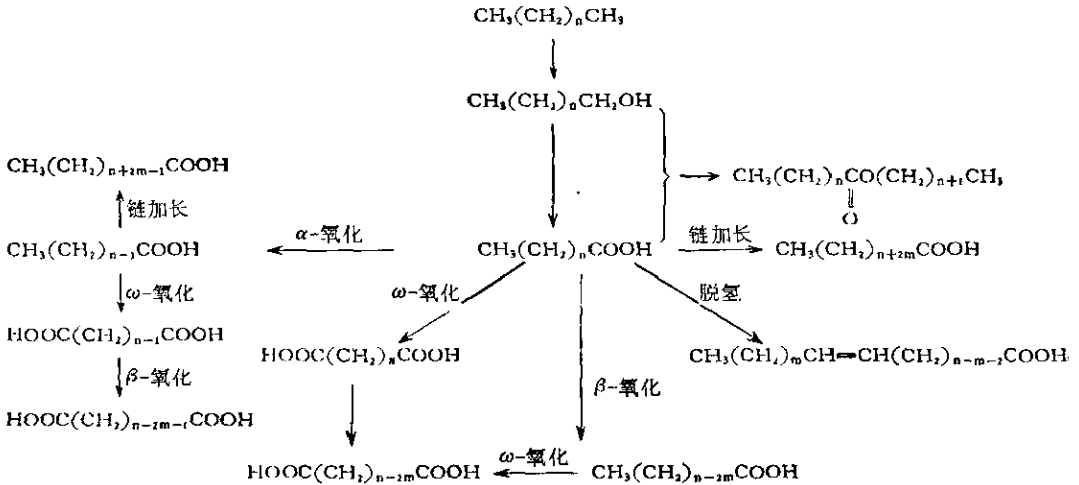


图 10 解脂假丝酵母 AS2.1207 号菌代谢正烷烃的途径

$\text{C}_{17:1}$ 、 $\text{C}_{18:1}$ 和 $\text{C}_{18:2}$ (图 9)。从以上三种基质发酵得到的酸都有比原基质碳链短的二羧酸, 偶数碳烷发酵产生的二羧酸以己二酸为主, 奇数碳烷则以庚二酸为主。三种基质发酵都有比基质碳链加长的一羧酸。根据以上实验结果推测 AS 2.1207 号菌代谢烷烃的途径大致如图 10, 它既存在一端甲基氧化, 也存在两端甲基氧化及脂肪酸的 α -氧化及 β -氧化现象。

(二) 热带假丝酵母 1230 号菌及其突变株 U_{3-21} 的代谢产物及代谢途径

以热带假丝酵母 1230 号菌及其突变株

U_{3-21} 用培养基 (2) 发酵 C_{11} — C_{19} 长链混合正烷烃、 C_{10} — C_{14} 中链混合正烷烃及 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{15} 三种单一正烷烃的代谢产物示于表 1—3, 发酵液中一羧酸的积累甚微。从它们的代谢产物可推测其代谢途径如图 11, 实验表明 1230 号菌代谢正烷烃主要是两端甲基氧化产生二羧酸的菌株。

1230 号菌的 β -氧化能力很强, 所以无论发酵混合或单一正烷烃产生的二羧酸均为戊二酸、己二酸、庚二酸那样的短链二羧酸 (表 1—3)。但 1230 号菌以癸二酸及十二二酸作指示培养基经亚硝基胍及紫外

表 1 1230 号菌及 U_{3-21} 号菌发酵 C_{11} — C_{19} 混合正烷烃产物的气液色谱

二 羧 酸	DC_5	DC_6	DC_7	DC_8	DC_9	DC_{10}	DC_{11}	DC_{12}	DC_{13}	DC_{14}	DC_{15}
1230 号菌产二羧酸(%)	2.5	38.7	46.2	7.8	0.7						
U_{3-21} 号菌产二羧酸(%)	6.0	11.8	13.6	0.6			3.8	10.0	24.9	24.0	4.9

表 2 1230 号菌及 U_{3-21} 号菌发酵 C_{10} — C_{14} 混合正烷烃产物的气液色谱

二 羧 酸	DC_5	DC_6	DC_7	DC_8	DC_9	DC_{10}	DC_{11}	DC_{12}	DC_{13}	DC_{14}
1230 号菌产二羧酸(%)	6.9	40.7	48.8	2.2	1.1					
U_{3-21} 号菌产二羧酸(%)	$\longleftrightarrow 3.5 \longrightarrow$					7.0	34.9	35.7	17.9	6.8

表 3 1230 号菌及 U_{3-21} 号菌发酵单一烷烃产物的气液色谱

菌号	碳源	产 生 的 二 羧 酸 (%)										
		DC ₅	DC ₆	DC ₇	DC ₈	DC ₉	DC ₁₀	DC ₁₁	DC ₁₂	DC ₁₃	DC ₁₄	DC ₁₅
1230	C ₁₁	20.1		76.2		3.6						
	C ₁₂		79.4		13.9		6.6					
	C ₁₃	32.7		64.1		3.0						
U_{3-21}	C ₁₁			2.1				97.9				
	C ₁₂		1.4				0.5		97.9			
	C ₁₃			4.0				0.1		0.5		94.4

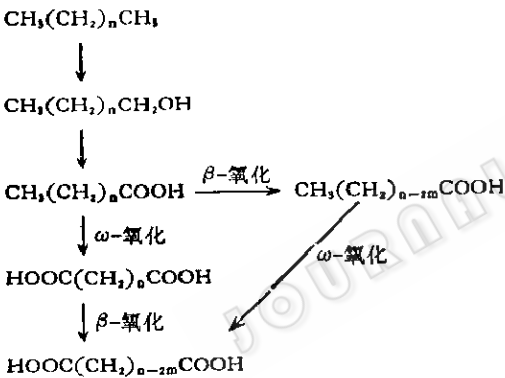


图 11 热带假丝酵母 1230 号菌及其变异株 U_{3-21} 代谢正烷烃的途径

线分别诱变后得到的突变株 U_{3-21} 其 β 氧化能力则大为减弱，产生的多为与基质链长相应的长链二羧酸(表 1—3)，通过对酵母菌代谢正烷烃途径的认识，我们采用了诱变和发酵条件来影响其代谢途径，达到了定向选育生产长链二羧酸优良菌株 U_{3-21} 的目的^[16]，这样便使基础理论研究能很好地为国民经济服务。

讨 论

实验表明利用正烷烃的酵母对正烷烃都具有亲和力，且都能产生乳化剂使水油

两相乳化便于菌体利用。在它们的发酵液中均检出醇、酸、酯。因而可认为醇、酸、酯是烷烃代谢中正常而普遍的产物。由于菌种和基质的不同，酵母菌代谢烷烃的途径和产物也有差异。如解脂假丝酵母 AS 2.1207 号菌能进行一端甲基氧化生成一羧酸，也能两端甲基氧化生成二羧酸。而热带假丝酵母 1230 号菌则主要通过两端甲基氧化生成二羧酸。

实验表明 AS 2.1207 号菌能利用 C_{10} 以上正烷烃产生不饱和一羧酸及不同链长的二羧酸，是一株具有脱氢能力的菌株。从其氧化奇碳烷产生偶碳二羧酸、氧化偶碳烷产生奇碳二羧酸来看，该菌除 ω -氧化后的 β -氧化途径外，尚存在脂肪酸的 α -氧化后再 ω -氧化及 β -氧化途径。而 U_{3-21} 菌则 ω -氧化能力很强，一端甲基氧化后很快进行 ω -氧化，形成的二羧酸还可行微弱的 β -氧化，所以偶碳烷只产生偶碳二羧酸，奇碳烷只产生奇碳二羧酸。AS2.1207 号菌的酯产量比游离一羧酸要高，说明末端甲基氧化生成的一羧酸很快与氧化生成的醇结合成酯。此外，生成的一羧酸大多比基质

的碳链要长。说明该菌的酯合成酶及碳链加长机制都相当活跃。

另一种有趣的现象是 AS2.1207 号菌发酵癸烷、十六烷等偶碳烷产生的一羧酸种类除与基质链长相应者外,其它种类基本相同,且都为偶碳数。而发酵十三烷产生的一羧酸种类则复杂得多,既有奇碳数也有偶碳数。又如 U_{3-21} 菌发酵 $C_{10}-C_{14}$ 中链混合正烷烃及各种单一正烷烃产生的 C_{10} 以下二羧酸量很少,而发酵 $C_{11}-C_{19}$ 长链混合正烷烃则产生较多量的短链二羧酸(表1)说明同一菌种利用不同基质、不同菌种利用同一基质的代谢途径都可能不完全相同。进一步阐明这种基质特异性的代谢机理将是烷烃代谢的一项有意义的研究。

参 考 文 献

- [1] Heringa, J. W. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 27: 51, 1961.
- [2] Seeler, G.: *Arch. Mikrobiol.*, 43: 213, 1962.
- [3] Hoffmann, B. et al.: *Europ. J. Appl. Microbiol.*, 3: 31—41, 1976.
- [4] Souw, P. et al., *ibid.*, 3: 289—301, 1977.
- [5] Kachholz, T. and H. J. Rehm: *ibid.*, 4: 101—110, 1977.
- [6] Thijsse, G. J. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 84: 195, 1964.
- [7] Leadbetter, E. R. and J. W. Foster: *Arch. Mikrobiol.*, 35: 92, 1960.
- [8] Heringe, J. W. and A. C. van der Linden: *Antonie van Leeuwenhoek*, 28: 413, 1962.
- [9] Kester, A. S. and J. W. Foster: *Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriol. 1960)*, p. 168.
- [10] Kester, A. S. and J. W. Foster: *J. Bacteriol.*, 85: 859, 1963.
- [11] Tulloch, A. P. et al.: *Can. J. Chem.*, 40: 1326, 1962.
- [12] Ali Khan, M. Y. et al.: *Nature*, 198: 289, 1963.
- [13] Ogina, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 29: 1009, 1965.
- [14] Kusumose, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 239: 1374—1375, 1964.
- [15] Mitchell, J. Jr. et al.: *Organic analysis* (Interscience Publishers, Inc.), Vol. 2, 1954, p. 19.
- [16] 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*, 20(1):88—93, 1980.

N-ALKANE METABOLISM IN MICROORGANISM

I. INVESTIGATION ON METABOLIC PRODUCTS OF N-ALKANE IN *CANDIDA*

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

The metabolic products of various species of *Candida* have been identified. They all produce aliphatic alcohol, acid and ester in culture broth and it may be suggested that alcohol, acid and ester are normal and general products in the course of n-alkane metabolism. But in different strains, the kind and quantity of their metabolic products may be different. For instance the *Candida lipolytica* strain AS 2.1207 can either produce monocarboxylic acid by monoterminial oxidation or produce dicarboxylic acid by diterminial oxidation.

The results obtained have shown that the strain AS 2.1207 has stronger dehydrogenation and β -oxidation activity. It is able to produce unsaturated monocarboxylic acids and shorter chain dicarboxylic acids. Furthermore it can produce a considerable amount of ester. The most of monocarboxylic acids formed have longer carbon chain than substrates. Therefore the activity of ester synthesis and chain elongation is rather stronger in

this strain.

The strain AS 2.1207 yielded monocarboxylic acid corresponding with substrates chain length, and others with shorter even carbon chain during fermentation with decane and hexadecane as sole carbon source respectively. It is interesting that if with tridecane as carbon source the monocarboxylic acids obtained are complex, comprising either odd or even carbon chain acids.

However, *C. tropicalis* strain 1230 mainly produces shorter dicarboxylic acids by diterminial methyl oxidation and β -oxidation, but it scarcely accumulates monocarboxylic acid from n-alkane. Its mutant strain U_{1-2} can yield dicarboxylic acids with chain length more than 10 carbon atoms from the alkane mixture (C_{10} — C_{14}). Furthermore it produces dicarboxylic acids corresponding with chain length from various individual n-alkanes.

Based on results obtained their metabolic pathway has been mapped out.