

烷烃发酵产生 1, 13-十三碳二元酸及其诱导作用的研究*

易祖华 李冠英 刘祖同**

(中国科学院微生物研究所,北京)

从能利用正十二烷产生 1, 12-十二碳二元酸的热带假丝酵母突变株 D_{28} 出发, 经两次紫外线照射诱变, 选育到一株从正十三烷产生 1, 13-十三碳二元酸较高的突变株 2-23 号菌。该突变株较出发菌株提高产酸率 20%, 达 40.4 g/L。突变株 2-23 也能将一定链长的长链烷烃以较高的产率转变成相应的单一二元酸。此外, 在产酸摇瓶条件试验中观察到烷烃的诱导作用, 使突变株产酸能力得以提高。用烷烃预培养的种子发酵正十三烷, 其产生 1, 13-十三碳二元酸的量较糖质碳源培养的种子发酵时要提高 30%。

关键词 烷烃发酵; 1, 13-十三碳二元酸; 诱导作用

1, 13-十三碳二元酸是合成高级麝香型大环内酯香料重要的原料。在研究烷烃发酵生产长链二元酸的工作中, 人们对获得 1, 13-十三碳二元酸产生了很大兴趣。我们研究组用热带假丝酵母突变株 U_{3-21} 发酵正十三烷取得了中型试验的成功。为了进一步提高 1, 13-十三碳二元酸的产率, 我们用一株从癸烷和正十二烷分别产生癸二酸和 1, 12-十二碳二元酸的优良菌株 D_{28} 为出发菌株进一步诱变, 选育到一株从正十三烷产生 1, 13-十三碳二元酸较高的突变株 2-23, 并对影响二元酸积累的因素, 尤其是烷烃对产生二元酸的诱导作用进行了研究。

材料和方法

(一) 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 突变株 D_{28} (本组的菌种)^[1]; 以 D_{28} 为出发菌株经两次紫外线照射诱变得突变株 2-23。

(二) 试剂

C_{13} 由上海溶剂厂提供; C_{14} , C_{15} , C_{16} 为 Sigma, C_{17} 为 Fluka AG 产品, 重蜡 (C_{9-11} , 长

链混合正烷烃) 由锦西石油化工五厂提供; 200# 轻蜡 (C_{9-11} 混合正烷烃) 为北京东方红炼油厂产品, 其他试剂为国产分析纯。

(三) 培养基

1. 斜面种子培养基: 麦芽汁琼脂斜面。

2. 筛选及发酵培养基 (%): KH_2PO_4 0.8, $NaCl$ 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 酵母膏 0.05, 玉米浆 0.03, 正十三烷或其他正烷烃 10, 尿素 0.1, 自来水定容, 自然 pH。装液量: 250 ml 三角瓶含 10 ml 培养基。

3. 指示培养基 (%): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.07, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, 酵母膏 0.05, 水洗琼脂 2, 1, 13-十三碳二元酸 0.8, 自来水定容。

4. 烷烃种子培养基 (%): KH_2PO_4 0.8, $NaCl$ 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 酵母膏 2, 玉米浆 0.1, 尿素 0.3, 重蜡 3。

上述培养基中, 凡含烷烃及尿素者, 均分别灭菌后于接种前加入培养基中。

(四) 紫外线照射诱变

取出发菌株 D_{28} 于 10 Brix 麦芽汁培养基中

本文于 1987 年 2 月 2 日收到。

* 感谢方心芳先生对本工作的指导。

** 现在地址: 清华大学生物科学与技术系。文中缩写: C_n 正烷烃; DC_n 二元酸

培养 24 h 的种液 30 ml, 3000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用 30 ml 生理盐水分别洗两次, 菌体用 60 ml 生理盐水悬浮, 此悬液以 10 ml 分装于培养皿中, 置 15 瓦紫外灯下 15 cm 处分别照射 3、5 和 7 min。取照射处理后的菌液各 0.2 ml 分别接入 10 ml 麦芽汁中, 28℃ 于暗处增殖 15 h, 逐步稀释至不同浓度 (10^{-2} — 10^{-7}), 将各 0.1 ml 稀释液涂布于麦芽汁琼脂平板上, 28℃ 培养 48 h, 挑取单菌落在指示平板和麦芽汁琼脂平板上划线, 28℃ 保温, 选取那些在麦芽汁平板上生长但在指示平板上不生长或生长弱的菌落, 进行从正十三烷产生 1, 13-十三碳二元酸的筛选。再以筛选得到的一株产酸较高的菌为出发菌株, 如上述步骤再次进行紫外线照射诱变和筛选。

(五) 筛选方法

同前文^[1]

(六) 二元酸的组分分析及测定

同前文^[1]

结 果

(一) D_{28} 菌株的紫外线诱变与突变株的培育

按“材料与方法”中所述, 以产癸二酸和 1, 12-十二碳二元酸的优良菌株 D_{28} 为出发菌株进行紫外线照射诱变。挑出在指示培养基上生长弱的单菌落 112 个, 用正十三烷作发酵碳源进行 1, 13-十三碳二元酸产量的筛选, 并经复筛得到一株产酸较高的突变株 3-10, 它利用正十三烷产 1, 13-十三碳二元酸的产率较出发菌株 D_{28} 提高了 11%。

再以此突变株 3-10 为出发菌株, 用紫外线照射作再次诱变, 挑出在指示平板上生长差的菌落 92 个, 经过筛选及反复复筛, 得到一突变株 2-23, 其 1, 13-十三碳二元酸产率较 3-10 号菌提高 10%, 达 40.4 g/L。

(二) 突变株 2-23 发酵 C_{13} 和其他混合烷烃

和 1, 13-十三碳二元酸一样, 混合二

元酸 (DC_{10-14}) 也已成为一个发酵产品在工业上应用着^[2,3]。为此我们分别用正十三烷、200# 轻蜡、重蜡和混合正烷烃 ($C_{13}:C_{14}:C_{15} = 1:1:1$, v/v/v) 为基质进行发酵, 测定了突变株 2-23 利用它们产生相应链长单一或混合二元酸的量。图 1 用 1, 13-十三碳二元酸的产量 (40.4 g/L) 为单位, 比较了突变株产生其他二元酸的量。结果显示, 该突变株尤适于将正十三烷转变成 1, 13-十三碳二元酸。从 200# 轻蜡产混合二元酸的量也较高。以混合烷烃作基质中, 长链烷含量越高, 生成二元酸的量则越少。

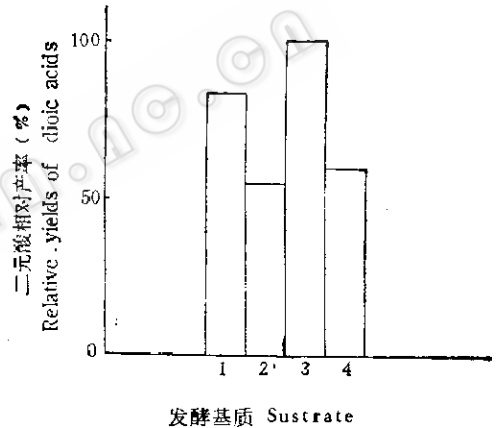


图 1 突变株 2-23 从正十三烷和其他的混合烷烃产生的二元酸

1. 200# 轻蜡; 2. 重蜡; 3. C_{13} ;
4. $C_{13}:C_{14}:C_{15} (1:1:1)$

Fig. 1 Tridecanedioic acid and the mixed diacid produced from tridecane and other alkane mixtures by mutant 2-23, respectively

1. 200# light paraffin; 2. Heavy paraffin;
3. Tridecane; 4. $C_{13}:C_{14}:C_{15} (1:1:1)$

(三) 突变株 2-23 利用 C_{11} — C_{17} 不同链长烷烃产生相应二元酸的基质特异性

结果表明, 突变株 2-23 除了能利用正十三烷产生 1, 13-十三碳二元酸外, 也能从 C_{11} — C_{17} 各单一正烷烃产生相应链长的二元酸。相对 1, 13-十三碳二元酸而言,

其他链长单一二元酸的产量有一定的差异,显示了基质的特异性,但基质在一定的链长范围内,该菌用以产生相应二元酸的量基本相同(图2)。

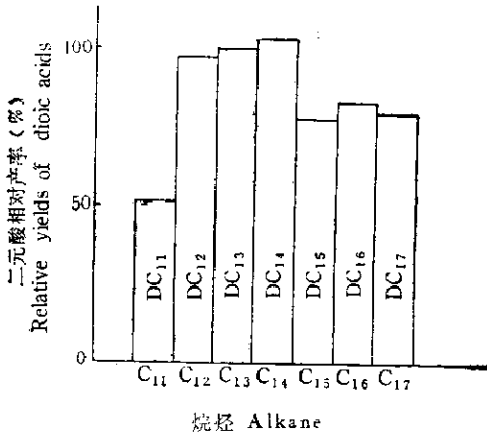


图2 突变株 2-23 从各种单一烷烃产生的相应二元酸

Fig. 2 Dicarboxylic acids produced from various single alkanes by mutant 2-23

(四) 不同单一正烷烃用作生长碳源时对产 1, 13-十三碳二元酸的影响

分别用 C₁₂-C₁₇ 的各单一正烷烃及重蜡作生长碳源培养种子,测定突变株 2-23

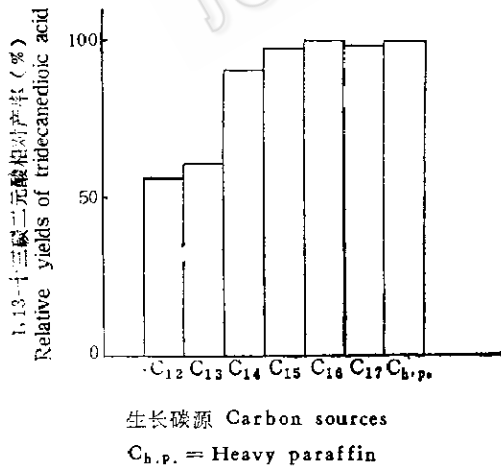


图3 用不同烷烃作生长碳源时产生的 1, 13-十三碳二元酸

Fig. 3 Tridecanedioic acid produced by mutant 2-23 grown on various single alkanes

号菌从正十三烷产生 1, 13-十三碳二元酸的产率(图3)。含十四个碳原子以上的单一正烷烃或重蜡都是很好的生长碳源,用它们分别培养的种子从正十三烷产生二元酸的量基本保持同一水平。

(五) 不同氮源对产 1, 13-十三碳二元酸的影响

氮源对积累 1, 13-十三碳二元酸的作用明显的。试验表明,不同种类的氮源使该菌从烷烃产生二元酸的量差别较大。在克分子含氮量相等的情况下,以尿素作氮源时二元酸的产量最高,而用硫酸铵作氮源时其产酸量与用碳酸铵时相仿。

表1 等克分子含氮量的不同氮源对 1, 13-十三碳二元酸产量的影响

Table 1 Relative yields of tridecanedioic acid produced with different nitrogen sources containing equal molar of N

氮源 Nitrogen source	氮源含量 Amounts of nitrogen source(%)	相对产酸量 Relative yields of tridecanedioic acid (%)
尿素 Urea	0.1	100
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.22	56
碳酸铵 Ammonium carbonate	0.14	63

(六) 烷烃对突变株 2-23 产酸能力的诱导作用

观察了长链烷烃作基质与使用其他基质培养的种子对积累 1, 13-十三碳二元酸的影响。突变株 2-23 的种子经重蜡预培养后能提高发酵液中 1, 13-十三碳二元酸的积累,烷烃对该菌产酸能力有明显的诱导作用。

1. 长链烷烃与糖质碳源培养的种子产酸能力的比较: 在发酵培养基中分别接入用重蜡培养的种子、麦芽汁斜面种子以及麦芽汁液体种子(种量均以滤纸压干的细胞湿重计),发酵四天后按常法测 1, 13-十

三碳二元酸的产量。结果表明, 烷烃培养的种子的产酸量显著高于用糖质碳源培养的种子(表 2)。

表2 不同基质培养的种子产酸能力的比较

Table 2 Comparison of yields of tridecanedioic acid by the cultures grown on different substrates

培养条件 Cultural condition	接种量 Inoculation amount (g)	二元酸产率 Yield of tridecanedioic acid (%)
重蜡培养 Cells grown on heavy paraffin	0.1	4.03
麦芽汁斜面 Cells grown on malt extract slant	0.2	3.32
麦芽汁液体 Cells cultivated in malt extract medium	0.1	3.02
麦芽汁液体 Cells cultivated in malt extract medium	0.2	3.08

2. 长链烷烃使糖质碳源培养的种子产酸增加: 在发酵培养基中接入麦芽汁斜面种子, 并分别添加不同量的重蜡, 发酵后测定 1, 13-十三碳二元酸的产量。结果表

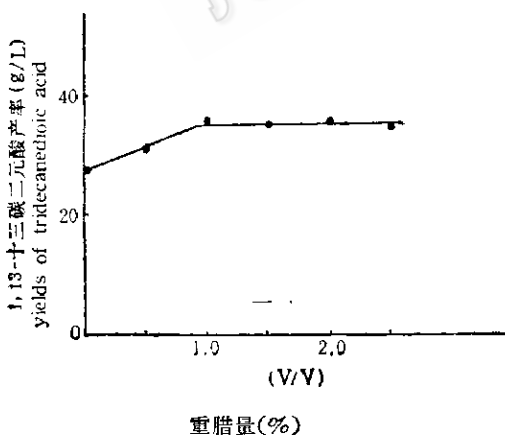


图4 补加重蜡对麦芽汁种子产酸的影响

Fig. 4 Effect of supplement of heavy paraffin on the yield of tridecanedioic acid by mutant 2-23 grown on malt extract

明, 在一定的范围内随着重蜡添加量的增加, 1, 13-十三碳二元酸的产量也增加, 但添加重蜡达 1% 以后, 1, 13-十三碳二元酸产量不再增加(图 4)。

3. 长链烷烃对烷烃培养的种子产酸的影响: 在发酵培养基中接入经重蜡预培养的种子, 并分别添加 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5% 的重蜡, 观察补加重蜡对烷烃培养的种子产生二元酸能力的影响。结果与上不同, 在使用重蜡培养的种子发酵时再补加重蜡不能增加 1, 13-十三碳二元酸的产量。

讨 论

1. 两次紫外线照射处理产 1, 12-十二碳二元酸的菌株 D₂₈, 培育出一株从正十三烷产生 1, 13-十三碳二元酸的突变株 2-23, 其产酸量较出发菌株提高 20% 以上。该菌也能利用其他单一烷烃产生相应链长的二元酸, 表明从各烷烃积累相应二元酸的基质特异性并不十分明显, 可考虑用它来发酵生产其他链长的二元酸。

2. 试验表明, 烷烃对该菌产酸能力有诱导作用。这也说明了在发酵生产二元酸的过程中在后几级种子罐里, 以烷烃培养的种子产酸效果为佳。

3. 就酵母菌而言, Gallo 等^[4]、Bertrand 等^[5]、Gilewicz 等^[6]、Teranishi 等^[7,8]及 Baroncelli 等^[9]报导了烷烃能诱导涉及烷烃初始氧化的一些酶类。我们观察到由于烷烃的诱导作用使菌体从烷烃产生二元酸的能力增加的现象。但它究竟涉及到烷烃氧化的哪些酶类, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 刘祖同等: 遗传, 4(2):16-18, 1982.
- [2] 中国科学院微生物所烃代谢组及发酵车间: 微生物学报, 20(1):88-93, 1980.
- [3] 中国科学院微生物所烃代谢组及发酵车间: 微生物学通报, 7(1): 13-17, 1980.

- [4] Gallo, M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **296**: 624—638, 1973.
- [5] Bertrand, J. C. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **93**: 237—242, 1979.
- [6] Gilewicz, M. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **25**: 201—206, 1979.
- [7] Teranishi, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**(6): 1213—1220, 1974.
- [8] Teranishi, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**(6): 1221—1225, 1974.
- [9] Baroncelli, V. et al.: *Molec. Cell. Biochem.*, **28**: 3—6, 1979.

PRELIMINARY STUDIES ON THE PRODUCTION OF TRIDECANEDIOIC ACID AND THE INDUCTION IN ALKANE FERMENTATION BY A MUTANT OF *CANDIDA TROPICALIS*

Yi Zuhua Li Guanying Liu Zutong

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A mutant strain 2—23 derived from the good dodecanedioic acid producer *D₁₈*, a mutant of *Candida tropicalis*, was obtained through twice treatment with ultra-violet irradiation. The yield of tridecanedioic acid by the mutant from tridecane reached 40.4 g/l, which was 20% higher than that by its ancestor. Moreover, the strain is able to convert some single long chain alkanes having the number of carbon atoms more than 11 to the corresponding dioic acids with higher yield.

The growth of mutant 2—23 on longer chain alkanes led to an induction which promoted the accumulation of tridecanedioic acid from tridecane. A 30% increase in the level of the acid production was observed by the cells grown on alkane as compared to the level by the ones grown on malt extract.

Key words

Alkane fermentation; Tridecanedioic acid; Induction