

热带假丝酵母对癸烯-1 及十二烯-1 的两端氧化*

刘祖同

易祖华

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084) (中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

研究了热带假丝酵母突变株 SD₆ 分别对癸烯-1 及十二烯-1 的两端氧化。在癸烯-1 的主要代谢物中有癸二酸、壬二酸和辛二酸, 而在十二烯-1 的主要代谢物中含十二碳二元酸、十一碳二元酸、癸二酸和壬二酸。这些产物均通过 GC 和 GC-MS 分析确定。根据这些结果提出了烯烃-1 的微生物两端氧化途径。从烯烃-1 得到同碳链的及比其少一个碳原子的饱和二元酸表明, 在该菌的烯烃-1 代谢中, 除末端甲基的氧化外, 另一末端双键的水合作用可能起着重要作用。

关键词 癸烯-1 及十二烯-1; 两端氧化; 癸二酸及十二碳二元酸; 热带假丝酵母

国内外对微生物的烷烃代谢已有深入的研究和报道^[1,2], 相反, 有关微生物对烯烃代谢的报道则甚少, 而且主要限于烯烃-1。通常认为, 微生物对烯烃-1 的代谢既可发生在烯分子饱和末端的甲基, 首先生成不饱和醇, 再进一步氧化; 也可作用在另一端的双键上, 这时形成 1, 2-二醇的中间产物, 可能为环氧化物^[3]。我们用一株对正烷烃具有较强两端氧化能力的热带假丝酵母突变株 SD₆ 对癸烯-1 和十二烯-1 的代谢进行研究, 结果与前人报道的有明显不同: 我们获得了与基质烯烃-1 链长相同的饱和二元酸。这表明微生物对烯烃-1 的代谢与对烷烃的代谢一样, 也是复杂而多样的。

材料和方法

(一) 菌种

作者在美国 W. Alton Jones 细胞科学中心从热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 野生株 1045 诱变得到的突变株 SD₆^[4]。

(二) 试剂

癸烯-1 (Fluka 进口分装, 99%); 十二烯-1 (Fluka 进口分装, >95%)。其他同前文^[4]。

(三) 培养条件

将一环菌苔接入 10ml Sabouraud 麦芽糖肉汁培养基 28℃ 培养 30 小时后, 取 2ml 种液转接于含 10ml 发酵培养基的 250ml 摇瓶中, 28℃ 培养 96 小时, 发酵过程中用 5mol/L NaOH 控制 pH7.5。发酵培养基的成分为: 100ml 自来水中含 K₂HPO₄ 0.8g, NaCl 0.1g, 尿素 1.5g, 酵母膏 0.05g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05g, 另加烯烃-110ml。

(四) 产物的分离与分析方法

本文于 1990 年 11 月 12 日收到。

* 部份工作在联邦德国明斯特大学微生物研究所进行。该校化学研究所的 Lufmann 博士和 Rucker 先生帮助进行 GC-MS 分析, 一并致谢。

文中缩写符号: DC_n: 二元酸; MC_n: 一元酸; n 为碳链长

分离;酸的甲酯化;产物的催化加氢和气相色谱及气相色谱-质谱分析分别同文献[5]、[6]和[7]。

结 果

(一) 癸烯-1 的代谢产物

1. 癸烯-1 的代谢产物经分离后甲酯化,用气相色谱法分析(图 1)。其组分的保留时间分别与标准辛二酸、壬二酸和癸二酸二甲酯峰的保留时间一致,可初步确定代谢产物中的这些组分分别是辛二酸、壬二酸和癸二酸。

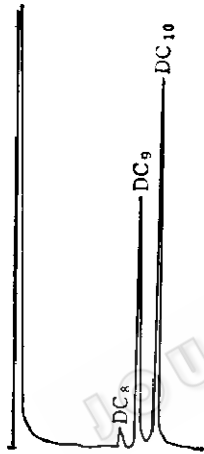


图 1 癸烯-1 代谢产物的气相色谱图

Fig. 1 The gaschromatogram of decene-1 metabolite

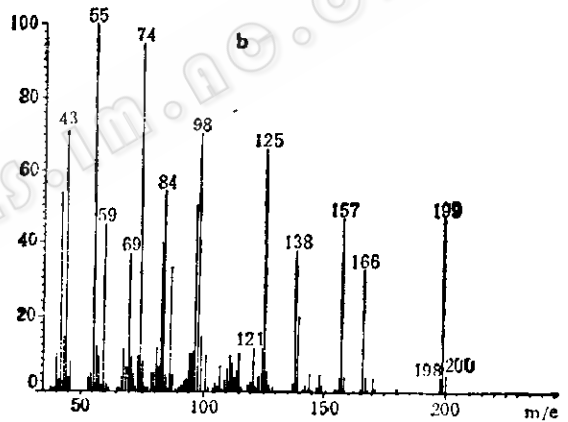
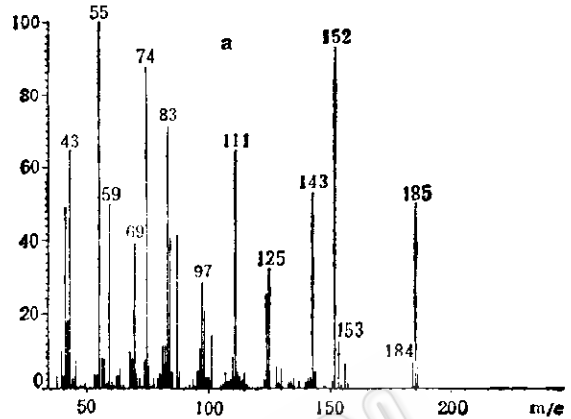


图 2 癸烯-1 代谢物中壬二酸的二甲酯(a)和癸二酸的二甲酯(b)的质谱图

Fig. 2 The mass spectra of dimethyl ester of azelaic acid (a) and dimethyl ester of sebacic acid (b) in decene-1 metabolite

2. 上述样品经催化加氢后,其气相色谱分析结果与加氢前一致,说明产物中没有不饱和和酸。

3. 用气相色谱-质谱分析进一步证实了产物中的上述各个组分。其质谱图分别与标准的辛二酸(未列出)、壬二酸和癸二酸二甲酯的一致(图 2-a 和 2-b)。

4. 癸烯-1 代谢产物中各组分二元酸的比例: 将产物的气相色谱图中各二元酸二甲酯的峰面积进行计算,再转换成各组分二元酸的比例,得知产物中与基质癸烯-1 链长相同的癸二酸占二元酸总量的 58.4%,同时奇碳数的二元酸壬二酸的含量也很高,达二元酸总量的 37.3%,这可能意味着热带假丝酵母突变株 SD₆ 对癸烯-1 双键的作用是通过水分子的加成反应进行的。而且羟基加到烯烃的 α -位碳原子上的可能性较加到 β -位上的可能

性要大一些。

(二) 十二烯-1的代谢产物

1. 采取与处理癸烯-1 代谢产物一样的方法, 将十二烯-1 的代谢产物进行分离并甲酯化, 再用气相色谱法分析(图 3-a)。其大部分组分峰的保留时间与各标准品的保留时间一致, 初步确定这些组分为壬二酸、癸二酸、十一碳二元酸和十二碳二元酸。另在十二碳二元酸二甲酯峰的附近有一未知峰, 此外还检出十六碳一元酸。

2. 代谢产物的甲酯化样品经催化加氢后, 其气相色谱基本与加氢前的一样, 只是上述十二碳二元酸二甲酯附近的未知峰消失, 而十二碳二元酸二甲酯峰的相对面积较加氢前增大, 表明该未知峰可能是不饱和的十二碳二元酸的二甲酯(图 3-b)。

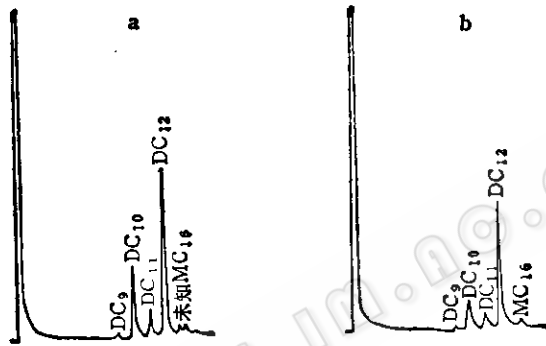


图 3-a 十二烯-1 代谢产物的气相色谱图

Fig. 3-a The gaschromatogram of dodecene-1 metabolite

图 3-b 十二烯-1 代谢产物催化加氢后的气相色谱图

Fig. 3-b The gaschromatogram of dodecene-1 metabolite after catalyzed hydrogenation

3. 用气相色谱-质谱进行分析, 证实了产物中的各组分有壬二酸、癸二酸(其二甲酯的质谱图与图 2-a, 2-b 一致, 未列出)、十一碳二元酸(图 4-a)、十二碳二元酸(图 4-b)和十六酸(未列出), 其甲酯的质谱图均分别与各标准品的一致。上述未知峰为十二烯二元酸二甲酯(图 4-c), 其质谱图与前文中该种物质的质谱图相同^[7], 其双键位置未测定。

4. 十二烯-1 代谢产物中各组分饱和二元酸的比例: 按产物气相色谱图中各饱和二元酸二甲酯的峰面积进行计算, 再转换成各组分二元酸的比例, 得知产物中与基质十二烯-1 键长相同的十二碳二元酸占二元酸总量的 60% 以上, 同时偶碳数二元酸含量之和达二元酸总量的 90% 以上, 而奇碳数二元酸含量之和不足二元酸总量的十分之一, 这一结果与癸烯-1 的氧化有明显的差异, 表明该菌株在对较长链烯烃-1 的代谢中也进行水分子的加成反应, 但羟基加到烯的 α -位碳原子上的可能性比加到 β -位上的可能性具有压倒的优势。

讨 论

一般认为细菌对烯烃-1 的代谢常作用于分子的饱和末端, 生成 ω -不饱和一元醇再进一步代谢, 而在作用于不饱和末端时通常先氧化成环氧化合物, 经形成 1, 2-二醇后进

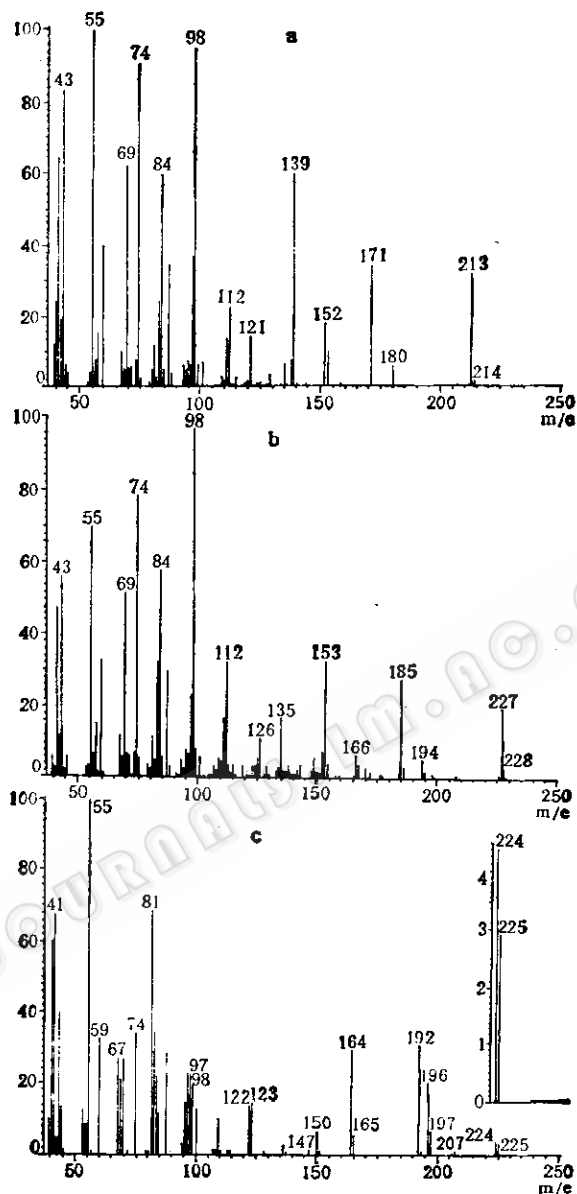


图4 十二烯-1 代谢物的质谱图

a. 十一碳二元酸二甲酯; b. 十二碳二元酸二甲酯; c. 十二烯二元酸二甲酯

Fig. 4 Mass spectra of dodecene-1 metabolite

a. Dimethyl undecanediate; b. Dimethyl dodecanediate;
c. Dimethyl dodecenediate

一步代谢产生 α -羟基酸, 再脱羧生成比基质链长少一个碳原子的一元酸。迄今未见终产物中有与烯烃链长相同的二元酸的报道。

我们使用的热带假丝酵母突变株 SD₆ 对烷烃具有较强的两端氧化能力, 能将长链烷烃氧化成相应链长的二元酸^[5,8]。当它利用烯烃-1 作唯一碳源时, 对分子的饱和末端甲基的氧化是意料之中的。令人感兴趣的在于对不饱和末端的作用。由于有与烯烃-1 链

长相同的饱和二元酸及其 β -氧化产物,以及 α -氧化产物的积累,表明该菌对不饱和末端的作用极可能是首先进行水合作用而不会以环氧化物作为中间物。水合作用时羟基的加成既可发生在双键的 α -位,也可能发生在 β -位的碳原子上,前者进一步氧化可生成与基质链长相同的饱和二元酸,而后者进一步氧化则可生成比基质链长少一个碳原子的二元酸。

根据代谢产物的分析结果,我们认为热带假丝酵母 SD₆ 对烯烃-1的代谢途径可能如图5所示。

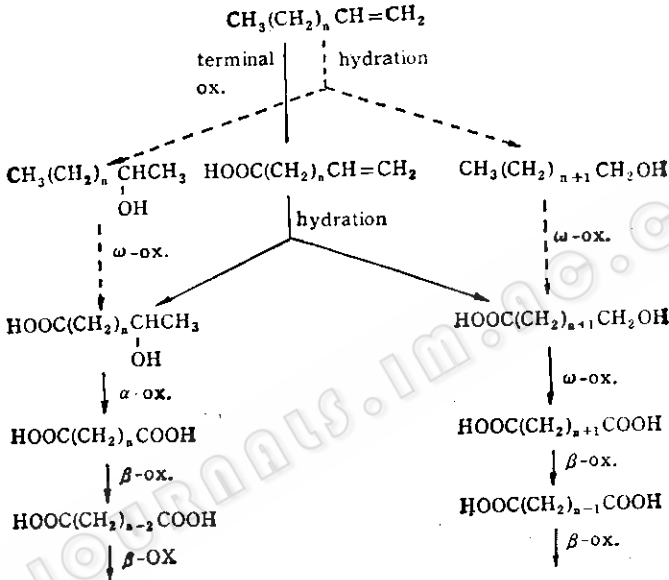


图5 热带假丝酵母 SD₆ 代谢烯烃-1的可能途径

Fig. 5 The proposed metabolic pathways of alkene-1 in the mutant SD₆ of *Candida tropicalis*

在研究烯烃-1的代谢时有人发现产生作为糖脂组分的 ω -与 $(\omega-1)$ -羟基酸^[9],也有人观察到能产生与基质链长相同的饱和一元酸^[10,11],我们在研究油酸的微生物氧化时发现代谢产物中有癸二酸^[7],这些也都显示了微生物在代谢过程中存在对烯基的水合作用。

从癸烯-1和十二烯-1产物中各组分二元酸的比例看来,前者奇数碳二元酸的相对含量远高于后者,表明水合过程中羟基加在烯基 α -位还是加在 β -位碳原子上的随机性与分子的链长有关。以十二烯-1为基质的代谢产物中有十六酸,可能是二元酸 β -氧化后形成的乙酰 CoA 经 de novo 合成所致,但产生十二烯二元酸的原因值得进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物所经代谢组: 微生物学报, 21(1): 88—95, 1981.
- [2] Rehm, H. J. et al.: *Adv. Biochem. Eng.*, 19: 175—215, 1981.
- [3] Bühler, M. et al.: *Biotechnologv.* 6a. 329—385, (Ed. Rehm, H. J. et al.), Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
- [4] 刘祖同等: 石油学报(石油加工), 3(2): 29—37, 1987.

- [5] 刘祖同等: 石油学报(石油加工),4(2): 1-9,1988。
[6] Yi Z. H. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 254-258, 1982.
[7] Yi, Z. H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 520-526, 1988.
[8] 刘祖同等: 石油学报(石油加工),5(2): 80-86,1989。
[9] Jones, D. F. et al.: *J. Chem. Soc. Commun.*, 2801-2808, 1968.
[10] Iida, M. et al.: *Z. Allgem. Mikrobiol.*, 10: 245-251, 1970.
[11] King, D. H. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 21: 85-89, 1975.

DITERMINAL OXIDATION OF DECENE-1 AND DODECENE-1 BY *CANDIDA TROPICALIS*

Liu Zutong

(Department of Biological Science and Biotechnology, Qinghua University, Beijing 100084)

Yi Zuhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The diterminal oxidation of decene-1 and dodecene-1 by a mutant SD₆ derived from *Candida tropicalis* was studied. The main metabolites from decene-1 comprised suberic, azelaic and sebacic acid, and those from dodecene-1 consisted of azelaic, sebacic, undecanedioic and dodecanedioic acid. These products were identified by GC and GC-MS analyses. Based on the results, the microbial metabolic pathways of alkene-1 were proposed. In the course of alkene-1 diterminal oxidation in the strain, the hydration of the terminal double bond of alkene molecule may play an important role, except oxidation of the saturated termination.

Key words Decene-1 and dodecene-1; Diterminal oxidation; Sebacic and dodecanedioic acid; *Candida tropicalis*