

十七碳二羧酸的发酵研究*

陈远童 庞月川 郝秀珍 吕爱燕

(中国科学院微生物研究所,北京)

以热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) UP-3-24 为出发菌株,经亚硝酸多次诱变,获得一株从正十七烷 (nC_{17}) 生产十七碳二羧酸 (DC_{17}) 的优良生产菌株 NP-260。以 20% (V/V) 的 nC_{17} 为碳源,摇瓶发酵 4 天, DC_{17} 达 80 g/L 以上。在 16L 自动控制罐上,不另加其它生长碳源,加入总量 30% (V/V) nC_{17} 进行发酵试验,产酸高峰期,每升发酵液每小时能够产生 1.8g 的 DC_{17} 。其中产酸速率为每小时 0.18%, 24 小时每升发酵液可增加 40g 以上的 DC_{17} 。发酵 6 天, DC_{17} 高达 133g/L 以上,回收残烃后,对 nC_{17} 的转化率为 61.8%, 后处理收率为 77.6%。 DC_{17} 的纯度为 95.4%。

关键词 正十七烷;十七碳二羧酸;热带假丝酵母突变株 NP-260

十七碳二羧酸 (DC_{17}) 是人工合成名贵香料灵猫香的重要原料^[1]。由于用化学方法生产 DC_{17} 比较困难,目前还没有简便,经济可行的路线,因此利用微生物特有的氧化能力,在常温常压下从正十七烷 (nC_{17}) 发酵生产 DC_{17} 已成为人们研究的课题。1979 年,本研究组报道了用一株热带假丝酵母突变株 U_{3-21} , 以生长细胞和休止细胞从 10—18 个碳的各种正烷烃发酵和转化生成 10—18 个碳的相应链长二羧酸,其中 DC_{17} 的产量分别为 41.8g/L 和 52.5g/L^[2]。

1980 年,沈永强等人^[3]用一株热带假丝酵母 N-15 高浓度的休止细胞(菌浓为 15×10^8 个/ml) 转化 nC_{17} 为 DC_{17} 时,达到 101g/L,转化率为 63.1%。1985 和 1987 年,日本植村等人^[4,5]用一株热带假丝酵母 M_{2050} 从各种单一正烷烃发酵生产相应链长的二羧酸,其中从 nC_{17} 生产 DC_{17} , 在 3L 发酵罐中,投入 30% (V/V) nC_{17} , DC_{17} 产量接近 70g/L,转化率为 30% 左右。

一般认为,微生物最容易氧化和同化

C_{16} 以上的正烷烃和二羧酸,因此要积累 C_{16} 以上的二羧酸,提高其产量仍是有待解决的难题。本文报道了优良生产菌株的诱变筛选、条件试验和发酵试验结果。

材料和 方法

(一) 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 突变株 UP-3-24, 由 UP-3-24 诱变得到突变株 NP-260。

(二) 试剂

nC_{17} 纯度 98.9%, 北京化工厂生产;重蜡 (nC_{10} — nC_{18} 的混合正烷烃), 锦西石油化工五厂提供^[6], 其它药品为试剂级。

(三) 培养基

1. 诱变培养基: 10Be' 的麦芽汁琼脂固体斜面。

无碳源培养基 (%): KH_2PO_4 0.2,

本文于 1990 年 8 月 15 日收到。

* 本研究得到中国石油化工总公司和国家自然科学基金的资助,得到方心芳教授的指导。样品元素分析由中国科学院化学研究所进行,特此感谢! 本文缩写用 nC_N 代表正烷烃, DC_N 代表二羧酸,其中 N 为碳原子数。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.07, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, 酵母膏 0.1, 琼脂粉 1.5, 蒸馏水配制, 120°C 灭菌 30 分钟。

2. 指示培养基: 在培养皿上放一张略比培养皿小的吸饱 $n\text{C}_{17}$ 的灭过菌滤纸, 然后倒入无碳源培养基, 做成药 2mm 厚的平板。

3. 液体种子培养基 (%): KH_2PO_4 0.8, 蔗糖 0.3, 酵母膏 0.3, 玉米浆 0.2, 尿素 0.3, 重蜡 5.0, 自来水配制, pH 5.0 左右。于 250ml 三角瓶中装 30ml 培养基, 110°C 灭菌 30 分钟。

4. 筛选和发酵培养基 (%): KH_2PO_4 0.8, NaCl 0.1, 蔗糖 0.15, 酵母膏 0.1, 玉米浆 0.05, 尿素 0.1, 发酵碳源 $n\text{C}_{17}$ 7—20, 自来水配制, 调 pH 7.5, 110°C 灭菌 30 分钟, 尿素和发酵碳源分别灭菌, 接种前加入, 种子的培养和发酵均在 200r/min 的旋转摇床上进行。

(四) 筛选方法

同前报^[1]。

(五) 二羧酸的提取与测定

发酵終了, 用 6mol/L HCl 酸化至 pH 2—3, 用乙醚抽提, 去乙醚后得白色样品, 用中性热乙醇溶解, 用标准 NaOH 溶液滴定, 按原培养基体积 (15ml) 计算发酵液中 DC_{17} 的百分含量。二羧酸的气相色谱测定参考文献[4]。

实验结果

(一) UP-3-24 菌株的 NaNO_2 诱变和筛选

取一滴环在 28°C 培养 36 小时的 UP-3-24 菌体, 接入装有 10ml 诱变培养基的 250ml 三角瓶中, 振荡培养 36 小时, 取培养液 4ml, 加入 2ml 0.1 mol/L 的 NaNO_2 和 2ml pH 4.5 的醋酸缓冲液, 27°C 保温 10 分钟后, 取出 2ml 加入到 10ml 0.07mol/L

pH 8.6 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液中, 终止反应。取 1ml 处理液加入到 10ml 麦芽汁中, 28°C 增殖 20 小时, 稀释成不同浓度涂平板, 28°C 培养两天, 挑出小菌落分别接入含有 $n\text{C}_{17}$ 的指示平板和蔗糖琼脂平板上, 28°C 培养两天, 挑出在 $n\text{C}_{17}$ 指示平板上生长较弱的菌株 203 株, 经过初筛和多次复筛, 最后获得产 DC_{17} 较高的菌株 NP-260, 其产酸水平比亲株 UP-3-24 提高 20% 左右。

(二) 不同生长碳源对 NP-260 生产 DC_{17} 的影响

选用重蜡、蔗糖、麦芽糖、醋酸钠作为生长碳源, 试验其对 NP-260 从 $n\text{C}_{17}$ 发酵生产 DC_{17} 的影响。当分别加入 2% (W/V) 上述生长碳源和 20% (V/V) $n\text{C}_{17}$ 时, 发酵 4 天, DC_{17} 的产量如图 1 所示, 其中麦芽糖最好, 其次为蔗糖, 但都比不加其它生长碳源的差, 说明 NP-260 突变株利用一部分发酵基质 $n\text{C}_{17}$ 作为生长碳源, 便能很好地从 $n\text{C}_{17}$ 发酵生产 DC_{17} 。

(三) 不同起始浓度的 $n\text{C}_{17}$ 对生产

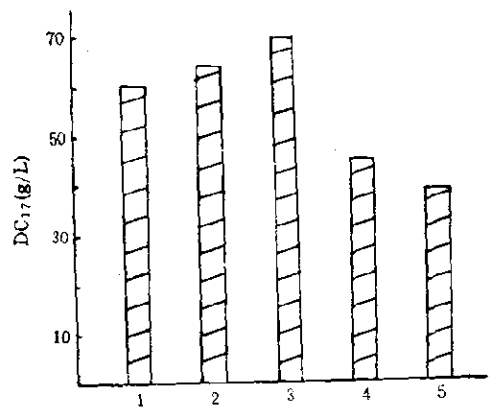


图 1 在不同生长碳源时突变株 NP-260 的 DC_{17} 产量

Fig. 1 Yields of DC_{17} from mutant NP-260 grown on different carbon sources

1. 蔗糖 Sucrose; 2. 麦芽糖 Maltose; 不加 No add 4. 重蜡 Heavy wax; 5. 醋酸钠 NaAc

DC₁₇ 的影响

在发酵培养基中,分别加入 10、15、20、25 和 30% 的 nC_{17} , 发酵 4 天, 测其 DC₁₇ 产量(图 2)。结果表明,在装有 15ml 培养基的 500ml 三角瓶中, nC_{17} 的起始浓度在 15—20% 之间为宜, 浓度过大, 影响通气效果, 浓度过低, 发酵 4 天碳源可能不足, 都使产酸水平降低。

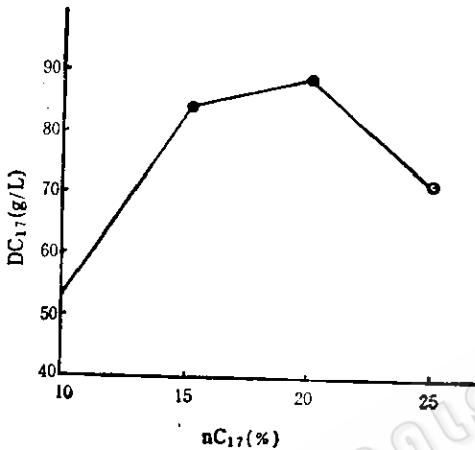


图 2 不同起始浓度 nC_{17} 时突变株 NP-260 的 DC₁₇ 产量

Fig. 2 Yields of DC₁₇ produced by mutant NP-260 in different initial concentration of nC_{17}

(四) 丙烯酸浓度对产 DC₁₇ 的影响

试验了不同丙烯酸浓度 (即 0、0.05、0.10、0.20 和 0.40%) 对 NP-260 从 nC_{17} 发酵生产 DC₁₇ 的影响。以 20% (V/V) nC_{17} 发酵 4 天, 当浓度为 0.05% 时, DC₁₇ 产量最高, 浓度大于 0.2%, 产酸量明显下降, 这是由于浓度大时, 明显抑制菌体生长, 所以产酸量降低(图 3)。

(五) 生长因子 VB 对 NP-260 生产 DC₁₇ 的影响

试验了不同浓度的生长因子 VB, (0、5、10、30、50 和 100 $\mu\text{g/L}$) 对突变株 NP-260 从 nC_{17} 发酵生产 DC₁₇ 的影响,

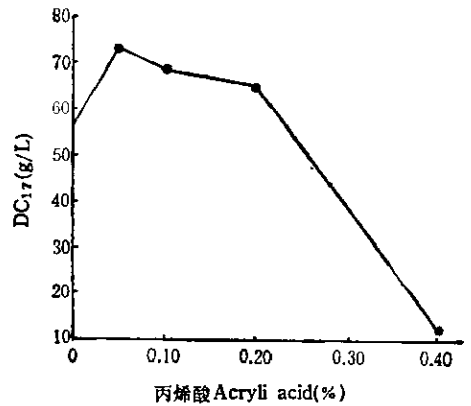


图 3 不同丙烯酸浓度时 NP-260 突变株的 DC₁₇ 产量

Fig. 3 Yields of DC₁₇ produced by mutant NP-260 in different concentration of acrylic acid

以 20% (V/V) nC_{17} , 发酵 4 天, 当浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时, DC₁₇ 产量最高, 一般在 10—30 $\mu\text{g/L}$ 为宜(图 4)。

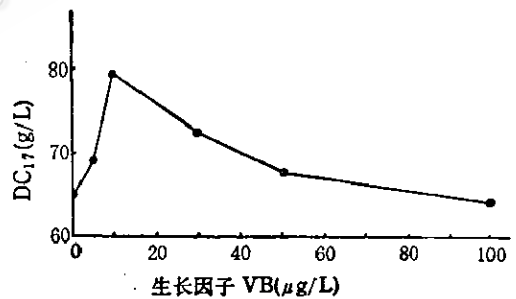


图 4 不同 VB 浓度对突变株 NP-260 DC₁₇ 的产量的影响

Fig. 4 Yields of DC₁₇ produced by mutant NP-260 in different concentration of growth factor VB

(六) 突变株 NP-260 发酵生产 DC₁₇ 的时间进程

考察了 NP-260 突变株从 nC_{17} 生产 DC₁₇ 的时间进程, 当加入 20% (V/V) nC_{17} 时, 接入 4ml 种液 (稀释 60 倍, OD 为 0.36), 发酵 5 天, 其产酸进程如图 5 所示。发酵 4 天时, DC₁₇ 产量达到最高峰,

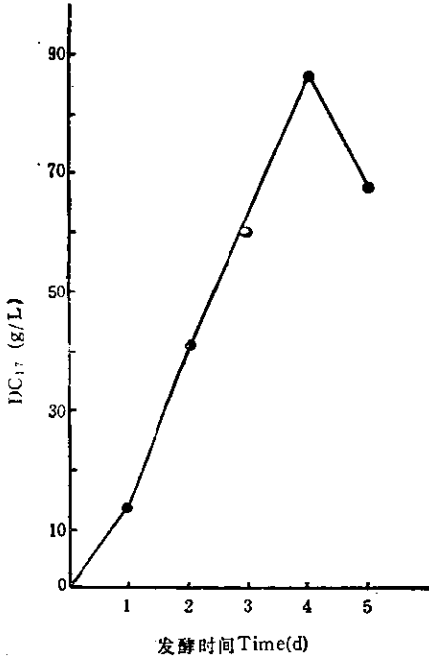


图5 不同发酵时间对 NP-260 突变株的 DC₁₇ 产量的影响

Fig. 5 Yields of DC₁₇ produced by mutant NP-260 in different fermentative time

其后 DC₁₇ 反而减少,这是 nC₁₇ 原料耗尽之故。

(七) 通气量对突变株 NP-260 产 DC₁₇ 的影响

在 500ml 三角瓶中,分别装入 10、15、20、25、30 和 40ml 培养基,进行通气量对突变株 NP-260 从 nC₁₇ 生产 DC₁₇ 的试验。图 6 表明通气量对 DC₁₇ 产量有明显影响。

(八) 16L 自动控制罐的发酵试验

综合了摇瓶发酵试验的最佳条件,加入 15% (V/V) 的 nC₁₇ 和 20% (V/V) 培养两天的 NP-260 种液,发酵开始。控制转速 500r/min,通气量 1:1,罐压 0.7kg/cm²,温度 29℃,溶氧 (DO) 为 100%,pH 6.9,直到 20 小时。当 DO 降至 50% 左右,pH 降至 5.6 时,加入 6mol/L NaOH

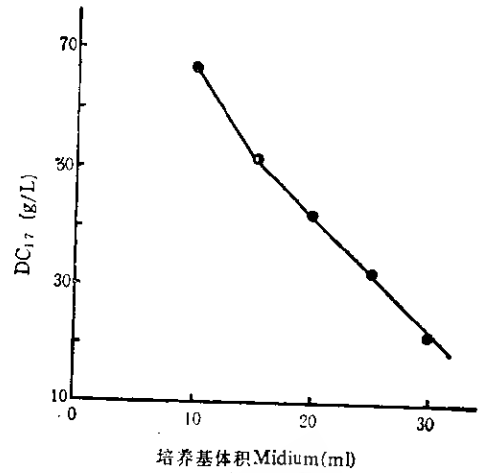


图6 通气量对 NP-260 突变株产 DC₁₇ 的影响

Fig. 6 Effects of air volume on producing DC₁₇ of mutant NP-260

溶液,第一次调 pH 至 7.5,增加转速和罐压,使 DO 保持在 70—90% 之间,从 48 小时起,pH 自控在 7.5,并在 53、77 和 123 小时,分别补加 5% (V/V) 的 nC₁₇,发酵 144 小时,DC₁₇ 产量达到 133.7g/L。发酵过程中,菌体生长曲线、产酸曲线及 DC₁₇ 的平均增长速率示于图 7 中。从产酸曲线看,28—46 小时斜率最大,产酸速率达到 1.81g · L⁻¹ · h⁻¹,而 46—94 小时,产酸速率为 1.10g · L⁻¹ · h⁻¹。

发酵结束后,加碱加热,破乳分层,回收残存 nC₁₇ 后,DC₁₇ 对 nC₁₇ 的转化率为 61.8%,过滤除去菌体 (14g 干菌体/L),合并发酵清液,放置过夜,过滤收集 DC₁₇ 钠盐,将 DC₁₇ 钠盐溶于热水中,加入总体积 0.5% 活性炭,在 80℃ 脱色 30 分钟,抽滤除去活性炭,将脱色清液加热,加入浓 HCl 调 pH 至 3,放置冷却结晶,抽滤得白色湿 DC₁₇ 结晶,在 70℃ 烘干,压碎,得白色粉末状 DC₁₇ 成品,后处理收率 77.6%。经元素分析,样品 C:H:O = 67.90%:10.67%:21.87%,而 DC₁₇ 分子量

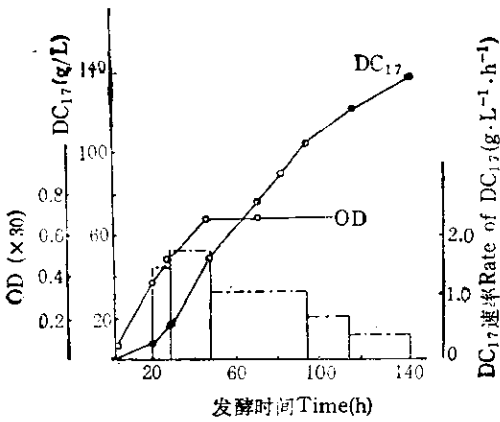


图7 突变株 NP-260 从 nC_{17} 生产 DC_{17} 的速率和产量(16L罐)

Fig. 7 Rates and yields of DC_{17} produced by mutant NP-260 from nC_{17} (16 liter fermenter)

×—× OD; ——— DC_{17} ; - - - - - Rate of DC_{17}

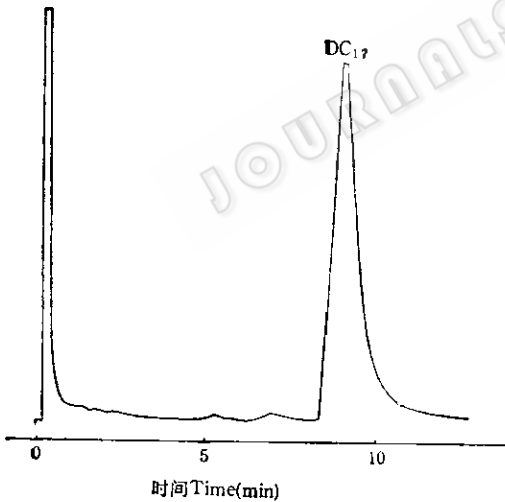


图8 NP-260 由 nC_{17} 发酵生产 DC_{17} 的气相色谱图

Fig. 8 Gas chromatography of producing DC_{17} from nC_{17} of NP-260

是 300, 其中 C:H:O = 68.00%:10.67%:21.33%, 证明样品为 DC_{17} ; 又经气相色谱分析, DC_{17} 纯度为 95.4% (图 8)。

讨 论

大量文献资料表明, 利用石油烃类的微生物, 特别能够同化 C_{15} 以上的烃类而生长, 尤其是同化 nC_{16} 和 nC_{17} 而生长。此类微生物 β -氧化能力强, 很难获得高产量和高纯度的 DC_{16} 和 DC_{17} 。

而热带假丝酵母突变株 NP-260, 经过摇瓶小试和 16L 罐扩试, 证明该菌株具有繁殖生长能力和 ω -氧化能力强, β -氧化能力弱, 产酸速率快, 纯度高的优点, 且在三年多中经多次传代试验, 性能稳定, 没有退化现象, 是一株由 nC_{17} 生产 DC_{17} 的优良生产菌株。

参 考 文 献

- [1] Uchjo, R. et al.: 石油と微生物 11: 14—23, 1974.
- [2] 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.
- [3] 沈永强等: 植物生理学报, 6(1): 29—35, 1980.
- [4] 植村 南海男: 石油と微生物, 33: 436—441, 1985.
- [5] 植村 南海男: 化学工业, 38(5): 48—53, 1987.
- [6] 陈远童等: 生物工程学报, 3(4): 307—308, 1987.
- [7] 陈远童等: 生物工程学报, 4(2): 145—148, 1988.

STUDIES ON MICROBIAL PRODUCTION OF PENTADECANE 1,15-DICARBOXYLIC ACID (DC₁₇) FROM HEPTADECANE (nC₁₇)

Chen Yuantong Pang Yuechuan Hao Xiuzhen Lu Aiyan

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

Mutagenesis of *Candida tropicalis* UP-3-24 with sodium nitrite and selection a mutant NP-260 which yield of DC₁₇ was 20% higher than parent strain UP-3-24 was obtained.

On shaking flask, under optimum condition where the culture medium contained 20%(v/v) nC₁₇, 0.05%(v/v) acryli acid, inorganic salts and growth factors and pH was adjusted to 7.5 with 6 mol/L NaOH at 24 h intervals, the amount of the product accumulated was more than 80 g per litre of the medium for 4 days.

On 16 litre fermenter testing, under the optimum condition where the culture contained total 30%(v/v) nC₁₇, no add other carbon source for the growth pH of the course of fermentation was maintained 7.5—7.7, at 28—30°C, the highest level of DC₁₇ production was obtained after 6 days and the amount of DC₁₇

accumulated was more than 133 g per litre of the mudium. On optimum period of DC₁₇ production, rate of DC₁₇ production, and accumulated was 1.81 g per litre medium per hour. After received residual nC₁₇, the consumption rate of nC₁₇, was about 61.8%. The product from nC₁₇ was analysed by gas-chromatograph, the purity was 95.4%.

The mutant strain NP-260 was still strong and healthy without recovery after subculture for years on malt extract-agar slant, the production of DC₁₇ was also as high as usual.

Key words

Heptadecane; Pentadecanel, 15-dicarboxylic acid; *Candida tropicalis* mutant strain NP-260