

丙烯酸对十六碳二元酸发酵的影响和 16L 罐扩试*

陈远童 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 本文报道丙烯酸对发酵生产十六碳二元酸(DC_{16})的影响,加入 0.1%丙烯酸, DC_{16} 产量提高 20—30%。在 16L 自动控制罐上,在最佳条件下,加入 20%(v/v)正十六烷(nC_{16}),发酵 5 天, DC_{16} 高达 120g/L, nC_{16} 的转化率高达 79%。

关键词 正十六烷,十六碳二元酸,发酵

DC_{16} 是合成名贵香料的重要原料。以它为原料合成的环十五酮(exaltone)和麝香酮(musk ketone)具有纯麝香香味,可以代替天然麝香,配制多种中成药。临床应用试验表明,疗效一样显著^[1];以 DC_{16} 为原料,也可合成环十六酮和环十五内酯,具有稀薄麝香香味。 DC_{16} 在自然界中不存在,化工上难以合成。70 年代初,日本内尾等人多次报道微生物发酵 nC_{16} 生产 DC_{16} 的研究^[2-4]。1978 年,内尾等人^[5]用一株阴沟假丝酵母(*Candida cloacae*)MR-12 从 nC_{16} 发酵生产 DC_{16} ,在 300L 罐上,发酵 3 天, DC_{16} 达到 54g/L,重量收率为 70%,其它的报道^[6-7],都只达到 40g/L 左右。继前文^[8]之后,本文报道用一株热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)突变株 UH-3-9 生产 DC_{16} 的 16L 罐扩试结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)突变株 UH-3-9。

1.2 试剂

正十六烷,纯度 99%以上,北京化工厂进口分装;重蜡(nC_{10} — nC_{18}): nC_{10} 微量, nC_{11} 1.3%, nC_{12} 4.9%, nC_{13} 18.1%, nC_{14} 26.0%, nC_{15} 23.6%, nC_{16} 16.3%, nC_{17} 8.2%, nC_{18} 1.6%,锦西石油化工五厂提供;其它药品为试剂级。

1.3 培养基

1.3.1 麦芽汁固体培养基:10Be'的麦芽汁,2%的水洗洋菜,加热溶解后,灌入大小试管中,0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟,摆成斜面。

1.3.2 液体种子培养基(%): KH_2PO_4 0.8,酵母膏 0.5,玉米浆 0.3,蔗糖 0.5,尿素 0.3,重蜡 5.0,自来水配制,自然 pH,250ml 三角瓶中装 25ml 培养基,0.55kg/cm² 灭菌 30 分钟。

1.3.3 发酵培养基(%): KH_2PO_4 0.8,NaCl 0.1,尿素 0.1,酵母膏 0.2,玉米浆 0.1,

* 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。

本文于 1993 年 4 月 8 日收到。

nC_{16} 15—20, 自来水配制, 用 NaOH 调 pH 至 7.5, 500ml 三角瓶中装 15ml 培养基, $0.55\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 30 分钟。

1.4 种子培养和发酵

把待试菌株从冰箱取出, 活化两代之后, 接在麦芽汁大斜面上, 在 30°C 培养箱中培养两天, 接入液体种子培养基中, 在 $200\text{r}/\text{min}$ 旋转摇床上培养 44 小时, 测定菌体生长光密度 (OD), 按 15—20% 种子量接入发酵培养基中, 进行通气发酵, 每隔 24 小时调一次 pH 至 7.5—8.0。

1.5 二羧酸的提取与测定^[9]。

1.6 菌体测定^[10]。

2 实验结果

2.1 丙烯酸浓度对 UH-3-9 突变株产 DC_{16} 的影响

按照如下丙烯酸浓度 (%) (‰): 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40 和 0.50 进行试验, 发酵 86 小时, 结果如图 1。0.1% 的丙烯酸对 UH-3-9 突变株从 nC_{16} 发酵生产 DC_{16} 有明显的促进作用。

2.2 丙烯酸对不同突变株产 DC_{16} 的影响

选取 5 株产 DC_{16} 的突变株进行丙烯酸试验, 每个菌株号各分成两组, 一组不加丙烯酸, 另一组加入 0.1% 丙烯酸, 比较丙烯酸对每一个突变株产 DC_{16} 的影响, 结果表明, 0.1% 丙烯酸对不同突变株产 DC_{16} 都有良好促进作用, 平均提高 20—30% 的产量 (图 2)。

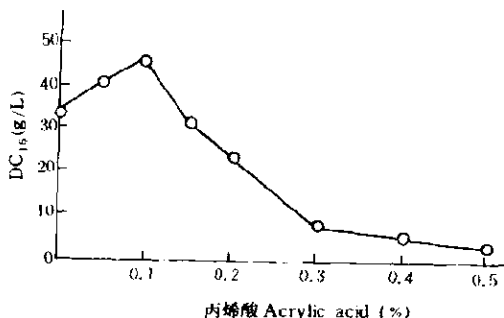


图 1 丙烯酸浓度对 UH-3-9 突变株产 DC_{16} 的影响
Fig. 1 Effect of different concentration of acrylic acid on DC_{16} production of mutant UH-3-9

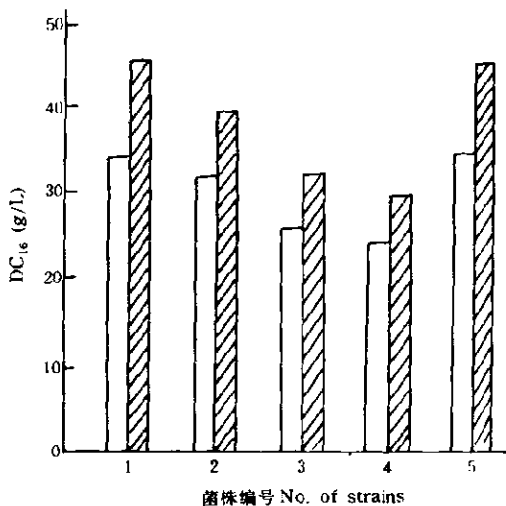


图 2 丙烯酸对不同突变株产 DC_{16} 的影响
Fig. 2 Effect of acrylic acid on DC_{16} production by different mutants

□ 不加丙烯酸 No added acrylic acid;
▨ 加 0.1% 丙烯酸 0.1% acrylic acid.

2.3 16L 自动控制罐扩大试验

综合了摇瓶发酵试验的最佳条件,选用 UH-3-9 突变株作为试验菌株,加入 20%(v/v) nC_{16} 和 15%的培养两天的 UH-3-9 种液,在 29℃通气量 1:1,罐压为 0.70kg/cm²,24 小时前 pH 自然下降,24 小时后 pH 控制在 7.5—8.0,发酵 5—6 天,定期取样测定菌体生长光密度(OD)和发酵液中 DC₁₆的含量。发酵过程的产酸曲线如图 3。

发酵结束后,加热加碱,破乳分层,静置过夜。回收残存 nC_{16} 后,抽滤,得到大颗粒的 DC₁₆ 钠盐结晶(含有菌体)。将结晶溶于热水中,加入 0.5%活性炭于 90℃脱色一小时,趁热抽滤,除去菌体和活性炭,脱色清液加水稀释到 DC₁₆ 含量为 4%左右,加热至 80℃,加 HCl 或 H₂SO₄,酸化至 pH3.5 左右,放置过夜,冷却结晶,抽滤,得白色 DC₁₆ 固体结晶,烘干,得 DC₁₆ 精品。DC₁₆ 纯度为 97.7%。发酵 6 批的结果如表 1。

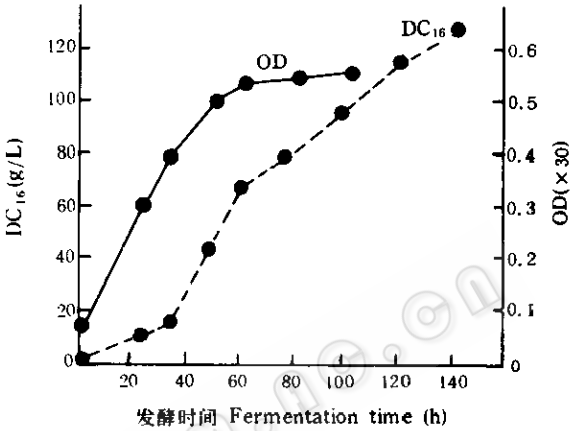


图 3 突变株 UH-3-9 由 nC_{16} 发酵生产 DC₁₆ 产量(16L 罐)
Fig. 3 Yields of DC₁₆ from nC_{16} by mutant UH-3-9(16L fermenter)

表 1 突变株 UH-3-9 生产 DC₁₆

Table 1 Production of DC₁₆ by mutant UH-3-9

发酵批号 No.	1	2	3	4	5	6	平均 Average
发酵时间 Fermentation time(h)	117	121	125	117	140	117	122.8
DC ₁₆ (g/L)	123.4	97.9	92.1	111.0	126.3	123.2	112.3
转化率(%) Conversion rate(%)	79.1	62.8	59.0	63.1	81.0	79.0	70.7

3 讨 论

热带假丝酵母 UH-3-9 突变株,经过摇瓶和 16L 自控罐试验,证明该菌株两端氧化能力强,β-氧化能力弱,是从 nC_{16} 发酵生产 DC₁₆ 的优良生产菌株。我们应用 Thijssse 等人^[11]的方法,把脂肪酸的 β-氧化抑制剂丙烯酸作为二羧酸的 β-氧化抑制剂加入到培养基中,结

果(图 1 和图 2)表明,0.1%的丙烯酸能有效地促进 DC_{16} 的积累量,使 DC_{16} 的产量平均提高 20—30%。适量丙烯酸的加入,抑制了二羧酸的 β -氧化,降低了微生物对 DC_{16} 的分解能力,从而增加了 DC_{16} 的积累量。然而,丙烯酸如何抑制二羧酸的 β -氧化,其机理有待进一步研究。

致谢 本研究工作得到方心芳 教授的指导;得到中国石油化工总公司的资助;庞月川同志帮助二羧酸的气相色谱分析,特此感谢!

参 考 文 献

- [1] 陈远童. 生物工程学报, 1986, 2 (1): 72—74.
- [2] Shiio I, Uchio R. *Agr Biol Chem*, 1972, 36 (3): 426—433.
- [3] Shiio I, Uchio R. *Agr Biol Chem*, 1972, 36 (7): 1169—1175.
- [4] Shiio I, Uchio R. *Agr Biol Chem*, 1972, 36 (8): 1389—1397.
- [5] 内尾良辅. 石油と微生物, 1978, 20: 13—16.
- [6] 高忠翔, 刘祖同. 清华大学学报, 1990, 30 (3): 86—92.
- [7] 植村, 南海男. 特集化学工业, 1987, 38 (5): 48—53.
- [8] 陈远童, 郝秀珍. 生物工程学报, 1988, 4 (2): 145—148.
- [9] 中国科学院微生物所经代谢组. 微生物学报, 1981, 2 (1): 88—95.
- [10] 陈远童, 庞月川, 方心芳. 微生物学通报. 1984, 11 (2): 61—64.
- [11] Thijssse G. J. E. *Biochem Biophys Acta*, 1964, 84: 195.

STUDIES ON MICROBIAL PRODUCTION OF TETRADECANE 1,14-DICARBOXYLIC ACID (DC_{16}) FROM HEXADECANE (nC_{16})

Chen Yuantong Hao Xiuzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The previous paper for conversion of n -hexadecane ($n-C_{16}$) to the corresponding dicarboxylic acid (DC_{16}) by a mutant strain UH-3-9 of *Candida tropicalis* in shaking flask was reported, with 15% (v/v) of nC_{16} , the yield of nC_{16} amounted to 48.2g/L in 96 h. The present report deals with the effect of acrylic acid on nC_{16} fermentation by the same culture. It was found that the addition of 0.1% of this acid increased the production of nC_{16} by 20—30%. In benchtype fermenter of 16L and under the optimum conditions with 20% (v/v) of nC_{16} , pH maintained at 7.5—8.0, the yield of DC_{16} reached 120g/L in 5 days, the corresponding rate of conversion was 79%.

Key words Hexadecane, Tetradecane 1,14-dicarboxylic acid, Fermentation