

十五碳二元酸的发酵研究*

陈远童 郝秀珍 庞月川

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 以热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) T₂₅₋₁₄ 为出发菌株, 经过紫外线和亚硝酸的诱变和筛选, 得到一株从正十五烷 (nC₁₅) 发酵生产十五碳二元酸 (DC₁₅) 的优良突变株 NP-6-126。摇瓶发酵 4d, T₂₅₋₁₄ 产 DC₁₅ 为 35.8g/L, 而 NP-6-126 则达到 73.5g/L, 产酸水平提高一倍以上。气相色谱分析表明, DC₁₅ 的纯度也从 69% 提高到 94%。加入适量青霉素, 对 DC₁₅ 的产生有明显的促进作用。

关键词 正十五烷, 十五碳二元酸, 热带假丝酵母

DC₁₅ 是合成名贵香料环十五酮和 3-甲基环十五酮(即麝香酮)的重要原料。环十五酮和麝香酮都具有纯麝香香味, 可以代替天然麝香配制多种名贵的中成药, 治疗多种疾病。临床应用表明, 其疗效与天然麝香差不多。DC₁₅ 在自然界中不存在, 也还没有经济可行的合成方法。用生物工程方法, 从 nC₁₅ 发酵生产 DC₁₅, 再以 DC₁₅ 为原料, 化学合成麝香酮, 和单纯的化学合成方法相比, 工艺路线简单, 反应步骤减少, 收率高, 成本低, 是目前最佳的合成路线。培养优良的生产 DC₁₅ 菌株, 进行有效的代谢调控, 提高发酵液中 DC₁₅ 的含量, 是微生物科研工作者的奋斗目标。

1979~1980 年沈永强等^[1~4]连续报道发酵生产 DC₁₅ 的研究结果, 他们用一株热带假丝酵母突变株 N-15, 从 nC₁₅ 发酵生产 DC₁₅, 实验室摇瓶发酵 8d, DC₁₅ 产量达到 77.2g/L, 后来用高浓度 (15 × 10⁸/ml) 的休止细胞转化 nC₁₅ 生产 DC₁₅ 的试验, 100h, DC₁₅ 产量达到 109g/L。1985 和 1987 年, 日本植村等人^[5~6]报道用一株热带假丝酵母 M₂₀₃₀, 从 nC₁₅ 生产 DC₁₅, 在 3L 发酵罐中发酵 100~110h, DC₁₅ 产量达到 90g/L。近几年来, 我们进行发酵生产 DC₁₅ 的研究, 实验室摇瓶发酵 4d, DC₁₅ 达到 73.5g/L, 16L 罐扩试, 发酵 7d, DC₁₅ 达到 130g/L, 而在 2500L 罐上, 发酵 6d, DC₁₅ 高达 180.5g/L。本文报道生产菌株的诱变、筛选和部分条件试验。

1 材料和方法

1.1 菌种

以热带假丝酵母 T₂₅₋₁₄ 为出发菌株。

1.2 试剂

正十五烷 (nC₁₅), 纯度 97%, 重蜡 (nC₁₀~nC₁₉), 其组份见前文^[7], 其它药品为试剂级。青霉素购自华北制药厂。

* 本研究属国家“八·五”攻关项目。

缩写用 nC_N 代表正烷烃, DC_N 代表二元酸, 其中 N 为碳原子数。

本文于 1994 年 5 月 20 日收到。

1.3 培养基

1.3.1 诱变培养基: 见前文^[4]。

1.3.2 指示培养基: 在培养皿上放一张略比培养皿小的吸足 nC_{15} 的无菌滤纸, 然后在培养皿内倒入未加碳源的培养基, 制成 2mm 厚平板。

1.3.3 筛选培养基(%): KH_2PO_4 0.8, $NaCl$ 0.1, 蔗糖 0.15, 酵母膏 0.2, 玉米浆 0.1, 尿素 0.1, nC_{15} 10.0, 自来水配制, pH7.5, 250ml 三角瓶中装 15ml, 0.06MPa 灭菌 30min。尿素和 nC_{15} 分别灭菌, 接种时加入。

1.3.4 液体种子培养基(%): KH_2PO_4 0.8, 酵母膏 0.5, 蔗糖 0.5, 玉米浆 0.3, 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, 0.06MPa 灭菌 30min, 尿素和重蜡分别灭菌, 接种前加入。

1.3.5 发酵培养基(%): KH_2PO_4 0.8, $NaCl$ 0.1, 酵母膏 0.2, 玉米浆 0.1, nC_{15} 20.0, 尿素 0.12, 自来水配制, 用 $NaOH$ 调 pH7.5, 500ml 三角瓶中装 15ml 培养基, 0.06MPa 灭菌 30min。尿素和 nC_{15} 分别灭菌, 接种前加入。

1.4 筛选方法

将诱变得到的菌株接入麦芽汁斜面 ($\phi 15 \times 180$ 试管, 每支装量约 6~7ml, 放成斜面上), 30℃ 培养 48h, 刮入筛选培养基中, 在 220r/min 的旋转摇床上 30℃ 发酵 72h, 每 24h 用 6mol/L $NaOH$ 溶液调 pH 至 7.5, 发酵终了时用 6mol/L HCl 调 pH 至 3.0, 用乙醚提取, 用标准 $NaOH$ 溶液滴定, 计算 DC_{17} 的产量。

1.5 二元酸的提取与测定

发酵液用 6mol/L HCl 调 pH 至 3.0, 用一定量乙醚抽提, 放置分层后, 除去水层, 放出乙醚提取液, 除去乙醚, 得白色二元酸固体, 加入 20ml 中性热乙醇, 用标准 $NaOH$ 溶液滴定, 计算二元酸产量。

二元酸纯度用气相色谱分析, 方法见前文^[4]。

1.6 菌体生长测定

方法见前文^[4]。

2 实验结果

2.1 T_{25-11} 菌株的紫外线诱变和筛选

取 10ml T_{25-11} 菌株的菌悬液 (约 4×10^8 个细胞/ml), 放于灭过菌的带有玻璃磁转子的培养皿中, 在功率 15W, 波长 2537 Å 的紫外灯下, 距离 15cm, 分别照射 2~5min。照射时用电磁搅拌器搅动。不同照射时间的处理液用生理盐水稀释成不同细胞浓度, 涂于麦芽汁平板上, 置暗处于 30℃ 培养 48h, 挑出小菌落, 分别划线于含有 nC_{15} 的指示培养基平板上和麦芽汁琼脂平板上, 培养 2~3d, 选出在前者不长或生长较差而在后者上生长好的菌株, 共 164 株。把诱变株分别接入 $\phi 15 \times 180$ 的麦芽汁斜面上, 30℃ 培养 48h 后, 分别刮入含 10% nC_{15} 的筛选培养基中 (1 支斜面/瓶), 发酵 3d, 每天用 6mol/L $NaOH$ 溶液调 pH7.5。经过初筛, 在 164 株诱变株中, 正突变 27 株, 占 16.5%, 负突变 41 株, 占 25%, 总突变率为 41.5%。27 株正突变株, 经过两次复筛, 获得产 DC_{15} 比出发株 T_{25-11} 平均提高 22% 的突变株 UP-3-24, 并以它作为进一步诱变的出发株。

2.2 UP-3-24 菌株的 NaNO_2 诱变和筛选

取一满环在 28°C 培养 40h 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 36h, 取 4ml 培养液, 加入 2ml 0.1mol/L 的 NaNO_2 和 2ml pH4.5 的醋酸缓冲液, 30°C 保温 10min 后, 取 2ml 加入到 10ml 0.07mol/L (pH8.6) 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液中, 终止反应。取 1ml 此处理液, 加入到 10ml 麦芽汁液体培养基中, 30°C 增殖 20h, 稀释成不同浓度涂平板, 30°C 培养 2~3d, 挑出小菌落分别接入含有 nC_{15} 的指示平板和麦芽汁琼脂平板上, 30°C 培养 2~3d, 挑出在 nC_{15} 指示平板上不长或生长较差的菌株 505 株。按照 2.1 节中的筛选方法, 对 505 株的 NaNO_2 诱变株进行初筛, 产 DC_{15} 提高 15% 以上的有 69 株, 占 13.7%, 其中提高 30% 以上的有 36 株, 占 7.1%。对 69 株突变株进行两次复筛, 获得平均提高 20% 以上的 3 株突变株, 其中 NP-6 突变株平均提高 32%。

2.3 NP-6 突变株的自然筛选

取一接种环新培养的 NP-6 菌体, 接入装有 15ml 麦芽汁培养基的 250ml 三角瓶中, 于 30°C 200r/min 的旋转摇床上培养 24h 后, 用无菌水稀释成不同浓度的菌悬液, 涂于麦芽汁琼脂平板上, 于 30°C 培养 48h, 挑出生长快的大菌落 250 株, 按 2.1 节中的筛选方法进行初筛和两次复筛, 获得 3 株产 DC_{15} 比 NP-6 提高 20% 以上的新株, 其中一株 NP-6-126 比 NP-6 平均提高 30.9%, 选作以后的试验菌株。

2.4 T_{25-14} 和三代突变株产 DC_{15} 能力的比较

为了比较原出发菌株 T_{25-14} 和三代突变株 UP-3-24、NP-6 和 NP-6-126 从 nC_{15} 发酵生产 DC_{15} 的能力和 DC_{15} 的纯度(前者表明 ω -氧化能力强弱, 后者表明 β -氧化能力强弱), 把 4 株菌分别接在麦芽汁琼脂斜面上, 30°C 培养 48h 后, 分别转接入液体种子培养基中, 在 220r/min 的旋转摇床上 30°C 培养 48h 后, 用 721 型分光光度计测定菌体生长光密度 OD, 折算成相同种量后, 分别接入发酵培养基中, 每瓶加入 3ml nC_{15} , 每株菌各三瓶平行, 在上述摇床上 30°C 发酵 4d, 每 24h 用 NaOH 调 pH 至 7.5~8.0, 到 48h 时, 各瓶补加 1ml nC_{15} , 发酵结束后, 加 HCl 调 pH 至 3.0, 用相同体积乙醚提取, 取一定量乙醚提取液吹干, 用标准 NaOH 溶液滴定, 计算 DC_{15} 产量。另外取 20ml 乙醚提取液吹干后, 得到二元酸白色固体, 加入 20ml 热水, 调至 pH10, 待二元酸完全溶解后, 加入一定量石油醚提取残存 nC_{15} , 分出石油醚层, 收集水层, 用 HCl 调 pH 至 3.0, 再加入 50ml 乙醚提取 DC_{15} , 取一部分乙醚提取液, 吹去乙醚, 得二元酸结晶, 用气相色谱分析, 测定 DC_{15} 纯度, 其结果见图 1。

2.5 碳源对 NP-6-126 生产 DC_{15} 的影响

在发酵培养基中, 分别加入 2% (W/V) 蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、醋酸钠和 2% (V/V) 的重蜡作为生长碳源, 与不加其它碳源的空白为对照, 进行正十五烷发酵生产 DC_{15} 的试验。当接种时, 分别加入 20% (V/V) nC_{15} , 发酵 4d, 结果表明, 不加其它碳源时, DC_{15} 产量最高, 加入麦芽糖次之。以后试验时, 只加 nC_{15} , 不必加入其它碳源。

2.6 丙烯酸浓度对 NP-6-126 生产 DC_{15} 的影响

当发酵培养基中丙烯酸浓度分别为 0、0.05%、0.10%、0.15% 和 0.20% 时, 加入 20% (V/V) nC_{15} , 发酵 4d, 丙烯酸浓度对 NP-6-126 从 nC_{15} 发酵生产 DC_{15} 的影响如图 2 所

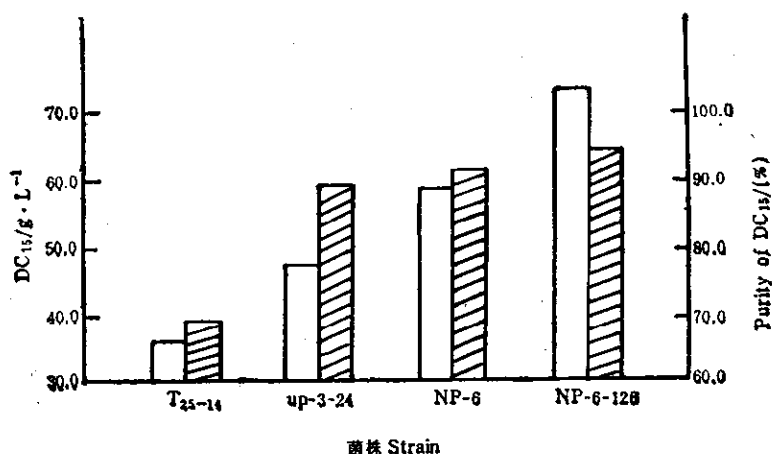


图1 母株和突变株生产 DC₁₅ 的产量和纯度

Fig. 1 Yields and purity of DC₁₅ producing of parent strain and mutants

□ DC₁₅; ▨ DC₁₅ 纯度 Purity of DC₁₅.

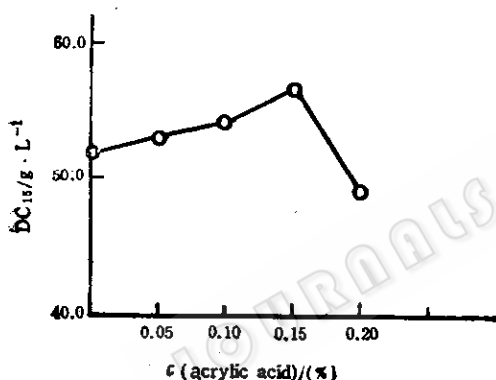


图2 丙烯酸浓度对 NP-6-126 生产 DC₁₅ 的影响

Fig. 2 Effects of different concentration of acrylic acid on producing DC₁₅ of NP-6-126

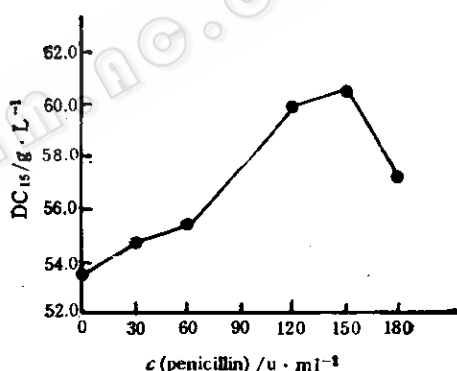


图3 青霉素浓度对 NP-6-126 生产 DC₁₅ 的影响

Fig. 3 Effects of different concentration of penicillin on producing DC₁₅ of NP-6-126

示,丙烯酸浓度为 0.15% 时,对生产 DC₁₅ 有促进作用。

2.7 青霉素浓度对 NP-6-126 生产 DC₁₅ 的影响

在培养基中分别加入不同浓度的青霉素和 20%(V/V)nC₁₅,进行生产 DC₁₅ 的试验,发酵 4d,结果如图 3。加入 120~150u/ml 的青霉素时,对 NP-6-126 突变株从 nC₁₅ 生产 DC₁₅ 有明显的促进作用。

2.8 发酵回收的 nC₁₅ 对生产 DC₁₅ 的影响

发酵回收的残存 nC₁₅,再进行生产 DC₁₅ 的试验,当加入 20% 和 30%(V/V) 回收 nC₁₅ 和加入同量的非回收的 nC₁₅ 进行产酸对比试验时,发酵 4d,结果表明,用回收的 nC₁₅ 时,DC₁₅ 产量更高,分别为 59.1g/L 和 69.4g/L,而用后者时,DC₁₅ 的产量分别只有 49.9g/L 和 59.6g/L,这一结果对工业发酵生产有重要意义。

3 讨论

文献资料表明,利用石油烃类的微生物,嗜好同化 C_{15} 以上的长链正烷烃而生长,此类微生物 β -氧化能力强,难以积累和基质链长相同的二元酸。要想高产 C_{15} 以上的长链二元酸,必需培育出下列特性的优良生产菌株:首先, ω -氧化能力强,即具有高活力的 ω -氧化酶,其次是 β -氧化能力弱,即具有低活力的 β -氧化酶。我们以热带假丝酵母 T_{25-14} 为出发菌株,经过紫外线和亚硝酸的多次反复诱变和定向筛选,获得三代突变株,经过相同条件的发酵试验,总酸量逐渐增加, DC_{15} 在总酸中的含量也逐渐增加(图 1)。从图中可见,总酸量的增加较明显,说明经过诱变,每一代新突变株其 ω -氧化酶活力提高较快,而 DC_{15} 的含量也有所提高,但幅度较小,说明 β -氧化酶活力降低有一定限度。青霉素加入能提高 DC_{15} 产量,其机理有待进一步研究。以回收的 nC_{15} 作为发酵基质生产 DC_{15} ,产酸量更高,可能是在回收的 nC_{15} 中,含有乳化剂,加速油和水的乳化,缩短菌体生长潜伏期,因而提高 DC_{15} 产量。

参 考 文 献

- [1] 沈永强,楼纯菊,徐可仁,等. 植物生理学报,1979,5(2): 161~169.
- [2] 沈永强,楼纯菊,姚佩华,等. 植物生理学报,1979,5(2): 171~179.
- [3] 沈永强,楼纯菊,徐可仁,等. 植物生理学报,1979,5(4): 385~393.
- [4] 沈永强,夏国兴,楼纯菊,等. 植物生理学报,1980,6(1): 29~35.
- [5] 植村南海男. 石油与微生物,1985,33: 436~441.
- [6] 植村南海男. 化学工业,1987,38(5): 48~53.
- [7] 陈远童,郝秀珍. 生物工程学报,1987,3(4): 307~308.
- [8] 陈远童,郝秀珍. 生物工程学报,1988,4(2): 145~148.

STUDIES ON MICROBIAL PRODUCTION OF TRIDECANE 1,13-DICARBOXYLIC ACID (DC_{15}) FROM n -PENTADECANE(nC_{15})

Chen Yuantong Hao Xiuzhen Pang Yuechuan
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract A mutant strain *Candida tropicalis* NP-6-126 producing pentadecanedioic acid (DC_{15}) from pentadecane (nC_{15}) was obtained by mutagenesis of UV radiation and sodium nitrite treatment on *Candida tropicalis* T_{25-14} . The yield of DC_{15} and purity was 35.8g/L and 69% of starting strain T_{25-14} and 73.5g/L and 94% of mutant strain NP-6-126 for 4 days on shaking flask testing respectively.

Key words Pentadecane, Tridecane 1,13-dicarboxylic acid, *Candida tropicalis*