

十三烷 1, 13-二羧酸的发酵研究*

陈远童 庞月川 刘挺 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 热带假丝酵母(*C.tropicalis*)NP-6-126 是经过紫外线和亚硝酸反复诱变筛选培育出来的,它是生产十三烷 1, 13-二羧酸(DC₁₅)的优良生产突变株,尿素和硝酸钾浓度对其产酸有明显影响。尿素浓度在 0.15%~0.21%范围内对产酸有利,尤其是 0.18%最佳,浓度增大,明显抑制 DC₁₅ 的产生和积累;硝酸钾的加入,也明显促进 DC₁₅ 产量的提高,0.6%~0.9%硝酸钾浓度较合适。于 16L 自动控制罐发酵 7d,DC₁₅ 达到 130g/L,放大到 2500L 罐,在最佳条件下,连续 5 批,发酵 6d,DC₁₅ 产量平均达到 176g/L,正十五烷(nC₁₅)转化率平均为 52.5%,后处理总收率平均为 80.6%,DC₁₅ 的纯度平均为 95.83%。

关键词 烷烃发酵,十三烷 1, 13-二羧酸,热带假丝酵母

DC₁₅ 是合成名贵麝香香料——环十五酮和麝香酮的重要原料,后者是天然麝香中具有生理活性的主要有效成分之一,是人造麝香中不可缺少的重要成分,有 300 多种中药需要麝香配伍。

DC₁₅ 只能从蒜头果油提取的脑神经酸经氧化裂解而得,还没有经济可行的工业生产方法,生物工程方法生产 DC₁₅,开辟了 DC₁₅ 的新来源。

1979~1980 年,沈永强等^[1~4]报道他们培育的一株热带假丝酵母变种 N-15,当用高浓度(15×10^8 个/ml)的休止细胞转化正十五烷(nC₁₅)时,100h 产生的 DC₁₅ 高达 109g/L,但是在摇瓶发酵时,190hDC₁₅ 只达到 77.2g/L。1987 年,日本植村南海男^[5]报道用一株热带假丝酵母 M2030 突变株,在 3L 发酵罐发酵 nC₁₅ 生产 DC₁₅,96~113h,DC₁₅ 产量达到 90g/L 左右。为了提高 DC₁₅ 产酸水平,进行工业化生产,我们在原有研究基础上,进行“八五”攻关研究。前文报道^[6]从 nC₁₅ 发酵生产 DC₁₅ 优良生产菌株的诱变筛选和部分条件试验,获得一株优良生产突变株 NP-6-126,摇瓶发酵 96h,DC₁₅ 达到 73.5g/L。本文报道对 NP-6-126 菌株生产 DC₁₅ 的进一步条件试验和扩试的结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

热带假丝酵母(*C.Tropicalis*)突变株 UP-3-24 经亚硝酸诱变筛选培育出来的新突变株 NP-6-126^[6]。

* 本研究属国家“八五”攻关项目。

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 1994 年 9 月 18 日收到。

1.2 试剂

正十五烷(nC_{15}), 纯度 96%~98%, 购自蚌埠化工厂。其它药品为工业纯。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基: 10Be' 的麦芽汁, 2%琼脂粉, 0.06MPa 灭菌 30min, 制成斜面。

1.3.2 种子培养基(%): KH_2PO_4 0.8, 酵母膏 0.5, 玉米浆 0.3, 甘油聚醚 0.05, 蔗糖 0.5, nC_{15} 4.0, 尿素 0.35, 自来水配制, 自然 pH, 0.1MPa 灭菌 30min。

1.3.3 发酵培养基(%): KH_2PO_4 0.8, NaCl 0.1, 酵母膏 0.2, 玉米浆 0.1, KNO_3 0.9, 甘油聚醚 0.06, 尿素 0.18, nC_{15} 20~25, 自来水配制, pH 7.5, 0.1MPa 灭菌 40min。

1.4 二元酸的提取测定

取一定量发酵液, 破乳分层, 取一定量清液, 放入 250ml 分液漏斗中, 调 pH 到 3.0, 用一定量乙醚提取, 放出乙醚层, 吹干, 加入 20ml 中性热乙醇, 用标准 NaOH 溶液滴定, 计算产酸量。

二元酸纯度用气相色谱分析^[7]。

1.5 菌体生长的测定

取 1ml 培养液, 加入 9ml 水, 摇匀后, 取 2ml 加入 4ml 溶媒(正丁醇: 95%乙醇: 氯仿 = 10: 10: 1), 摇匀后, 倒入 1cm 光程比色杯中, 以溶媒为空白对照, 在 721 型分光光度计上, 620nm 波长, 测定 OD。

2 实验结果

2.1 硝酸钾对 NP-6-126 突变株产 DC_{15} 的影响

利用 NP-6-126 突变株由 nC_{15} 发酵生产 DC_{15} 的试验中, 加入不同浓度的硝酸钾和 0.1% 尿素, 发酵 4d, 每隔 24h 用 6mol/L NaOH 调 pH 达到 7.5~8.0, 结果如图 1, 0.9% KNO_3 对产 DC_{15} 最有利, 浓度增大, DC_{15} 产量迅速下降。

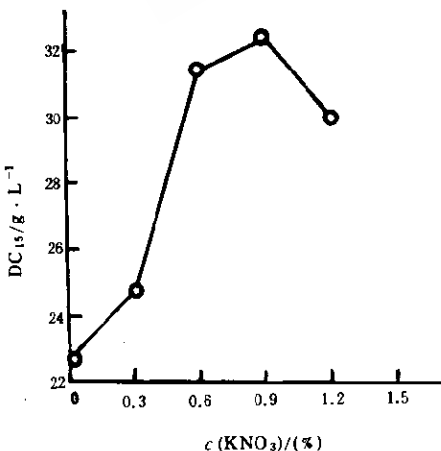


图1 硝酸钾对 NP-6-126 产 DC_{15} 的影响

Fig.1 Effect of KNO_3 on DC_{15} production

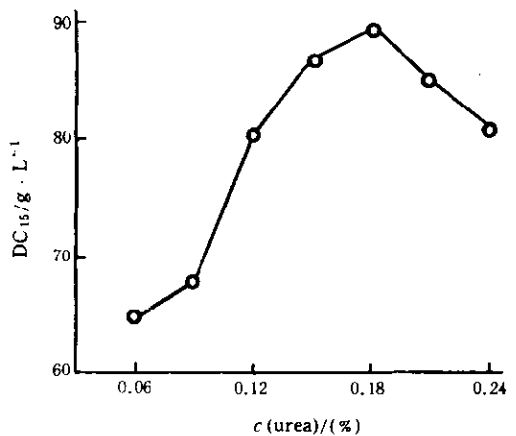


图2 尿素对 NP-6-126 产 DC_{15} 的影响

Fig.2 Effect of urea on DC_{15} production

2.2 尿素对 NP-6-126 突变株产 DC₁₅ 的影响

取不同浓度尿素进行试验,加入 15% nC₁₅, 发酵 4d, 每隔 24h 用 6mol/L NaOH 调一次 pH 7.5~8.0, 比较不同尿素浓度对 NP-6-126 突变株由 nC₁₅ 发酵生产 DC₁₅ 的影响, 结果如图 2。0.18% 尿素浓度对产 DC₁₅ 最有利, 浓度升高, DC₁₅ 产量迅速降低。

2.3 硝酸钠对 NP-6-126 突变株产 DC₁₅ 的影响

利用 NP-6-126 突变株由 nC₁₅ 发酵生产 DC₁₅ 的试验中, 加入不同浓度的硝酸钠, 发酵 4d, 每隔 24h 用 6mol/L NaOH 调 pH 达到 7.5~8.0, 结果如图 3 所示。2.0%~3.0% NaNO₃ 对产 DC₁₅ 较有利。

2.4 16L 自动控制罐扩试

在 16L 自动控制罐中, 装入 8L 发酵培养基, 其中 nC₁₅ 1200ml, 在 0.1MPa 灭菌 30min, 冷却至 32℃ 后, 接入 1300ml 培养 2d 镜检无杂菌的 NP-6-126 种子液, 搅拌速度为 600r/min, 通气量 1:1.2, 罐压为 0.07MPa, 29℃, pH 6.7 开始发酵。24h 后, 搅拌速度提高到 800r/min, 调 pH 至 7.5, 并自控在 7.5, 当发酵到 69、101 和 149h 时, 各补加 500、400 和 300ml nC₁₅, 发酵 165h, 产酸达到 130g/L, 发酵产酸过程如图 4。

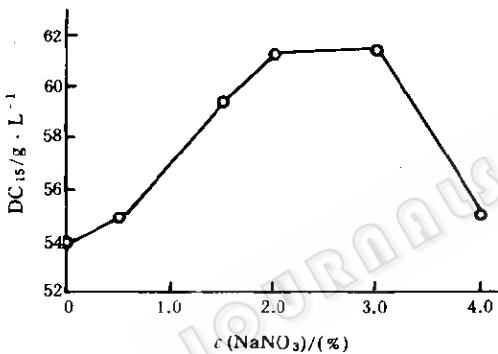


图 3 硝酸钠对 DC₁₅ 生产的影响

Fig.3 Effect of NaNO₃ on DC₁₅ production

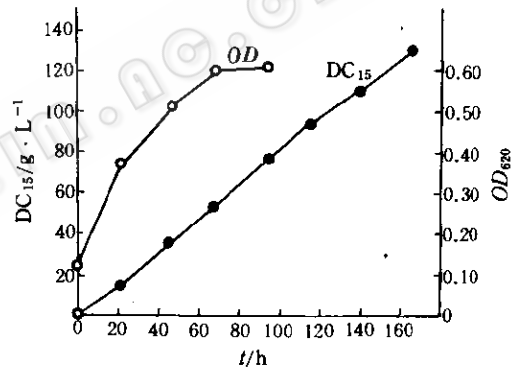


图 4 nC₁₅ 发酵生产 DC₁₅ 的时间过程(16L 罐)

Fig.4 Course of time of DC₁₅ production from nC₁₅ (16L Bioreactor)

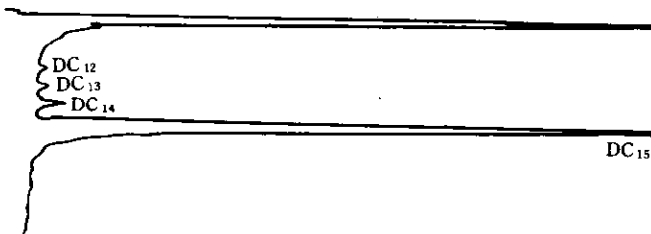


图 5 DC₁₅ 的气相色谱图

Fig.5 Gas chromatography of DC₁₅

2.5 2500L 罐中型试验

综合摇瓶和 16L 自动控制罐扩试的最佳条件, 结合 2500L 通用发酵罐的特点, 利用

NP-6-126 优良生产突变菌株,进行 nC_{15} 发酵生产 DC_{15} 的中型试验,以便确定发酵和后处理的工艺路线。经过连续 5 批的发酵试验,发酵 6d,二元酸产量达到 170~180g/L,平均为 176g/L,用水进行后处理,工艺路线短,方法较简单,所得二元酸产品为白色固体,后处理总收率平均为 80.6%, DC_{15} 纯度平均为 95.83%。中试结果见表 1。

表 1 DC_{15} 中试结果(2500L 罐)Table 1 The yield of DC_{15} in pilot factory (2500L fermentor)

项目 Item	批号 No.					平均 Average
	1	2	3	4	5	
发酵时间 t/h	143	144	144	151	149	146.2
产酸量 Yields of DC_{15} / g · L ⁻¹	177.0	178.0	175.0	169.3	180.5	176.0
平均产酸速率 Average productive rate of DC_{15} / g · L ⁻¹ · h ⁻¹	1.238	1.236	1.215	1.121	1.211	1.204
nC_{15} 转化率 Conversion rate of nC_{15} / (%)	50.7	56.0	52.9	49.2	53.7	52.5
后处理总收率 Total extraction rate / (%)	82.9	85.8	76.0	80.2	77.9	80.6
DC_{15} 纯度 Purity of DC_{15} / (%)	96.80	96.31	94.61	95.11	96.32	95.83

3 讨论

本文探讨了尿素、硝酸钾和硝酸钠对热带假丝酵母突变株 NP-6-126 从 nC_{15} 发酵生产 DC_{15} 的影响,适量的尿素和硝酸钾对 DC_{15} 的生产均有明显的促进作用,但过量时均有明显的抑制作用,使 DC_{15} 的积累量大大降低。

通过 16L 罐扩试和 2500L 罐中试,发酵 6d,产酸量高达 180g/L,表明 NP-6-126 突变株确是一株高产 DC_{15} 的优良生产菌株,其发酵和后处理工艺路线成熟可行,可以放大到更大规模进行工业化生产。

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.特集化学工业,1987,38(5): 48~53.

[6] 陈远童, 郝秀珍, 庞月川. 微生物学报, 1995, 35(6): 433~437.

[7] 中国科学院微生物所经代谢组. 微生物学报, 1981, 2(1): 88~95.

STUDIES ON FERMENTATION OF PENTADECANEDIOIC ACID

Chen Yuantong Pang Yuechuan Liu Ting Hao Xiuzhen

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The excellent mutant strain, *Candida tropicalis* NP-6-126, which produced pentadecanedioic acid, was obtained through treatment with ultra-violet irradiation and nitrite. The production of the acid was affected remarkably by the concentration of urea and potassium nitrate. It was favorable for the production of the acid, when concentration of urea was 0.15% ~ 0.21% and concentration of potassium nitrate was 0.6% ~ 0.9%, and the optimal concentration of urea was 0.18%. However, with the increase of the concentration of urea, the accumulation of DC₁₅ was inhibited greatly. After the fermentation for 7 days in 16L automatic bioreactor, the yield of DC₁₅ attained to 130g/L. After the fermentation for 6 days in 2500L fermentor at optimal condition for 5 batches in succession, the average yield of DC₁₅ attained to 176g/L. The average transformation rate of nC₁₅ to DC₁₅ was about 52.5%, the average recover rate was about 80.6%, the average purity of DC₁₅ was about 95.83%.

Key words Alkane fermentation, Pentadecanedioic acid, *Candida tropicalis*