

微生物发酵生产十三碳二元酸的研究

陈远童 庞月川 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 热带假丝酵母, 突变株, 十三碳二元酸

分类号 TQ920.1 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)03-0279-81

十三碳二元酸(DC₁₃)是化学合成麝香 T 香料和尼龙 1313 工程塑料的重要原料。DC₁₃在自然界中不单独存在,用化学方法难以合成,只能从菜籽油中提出甘油芥酸酯再经臭氧氧化的方法生产,此法受农田和气候限制,产品纯度低^[1]。应用生物工程技术,利用微生物胞内酶特异的氧化能力,在常温常压下,把石油中的正十三烷(nC₁₃)一步转化为 DC₁₃,开辟了 DC₁₃的新来源,为日用香料麝香 T 和尼龙 1313 的合成提供物美价廉的重要原料,具有较好应用前景。国内外科学家都在研究^[2,3],处于领先地位的是日本,他们用一株热带假丝酵母 M₂₀₃₀,在 20t 发酵罐中发酵 5d,DC₁₃产量达 130g/L,纯度为 94%^[4]。国内抚顺石油化工研究院 1992 年报道用一株热带假丝酵母多倍体变异菌株异步发酵生产 DC₁₃,在 3t 罐中发酵 8d,DC₁₃的最高水平为 165g/L,纯度大于 94%。本文报道高产 DC₁₃生产菌株的诱变筛选和 2.5t 罐试验结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

本实验室保存的热带假丝酵母突变株 UH-2-48。

1.2 试剂

正十三烷(nC₁₃)纯度 96.4%,正十五烷(nC₁₅)纯度 99%,重蜡(nC₁₀~nC₁₈混合正烷烃),均由锦西石油化工五厂提供^[5]。其它药品为试剂级。

1.3 培养基

1.3.1 诱变培养基:麦芽汁固体培养基为 10Be'的麦芽汁琼脂固体斜面。无碳源培养基:KH₂PO₄ 2g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.7g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, (NH₄)₂SO₄ 5g, 酵母膏 1g, 琼脂粉 15g, 蒸馏水定容到 1L, 0.1MPa 灭菌 30min。指示培养基:在培养皿上放一张吸饱 nC₁₅的灭菌滤纸,然后倒入无碳源培养基,做成约 2mm 厚的平板。

1.3.2 筛选培养基:KH₂PO₄ 8g, NaCl 1g, 蔗糖 2g, 酵母膏 2g, 玉米浆 1g, 尿素 1g, nC₁₃ 70g, 自来水定容到 1L, pH7.3, 0.06MPa 灭菌 30min。

1.3.3 发酵培养基:KH₂PO₄ 8g, NaCl 1g, 酵母膏 2g, 玉米浆 1g, 蔗糖 20g, KNO₃ 7g, 泡敌 0.65g, 尿素 2g, nC₁₃ 200mL, 用自来水定容到 1L, pH7.5, 0.1MPa 灭菌 40min。

1.4 筛选方法

将待筛菌株接入麦芽汁琼脂斜面, 30℃ 培养 2d, 接入筛选培养基中, 在 200r/min 的旋转摇床上发酵 3d, 每 24h 调 pH 到 7.5~8.0, 发酵终了, 进行提取分析。

1.5 二元酸的提取分析

参照文献[5]提取。二元酸的纯度用气相色谱分析测定。

2 结果

2.1 UH-2-48 的 NaNO₂ 诱变和筛选

取一滴环在 30℃ 培养 36h 的 UH-2-48 菌体接入装有 10mL 诱变培养基的 250mL 三角瓶中, 振荡培养 36h, 取培养液 4mL, 加入 2mL 0.1mol/L、pH4.5 的醋酸缓冲液, 28℃ 保温 10min 后, 取 2mL 加入到 10mL 0.07mol/L pH8.6 的 Na₂HPO₄·12H₂O 的溶液中, 终止反应。取 1mL 处理液加到 10mL 麦芽汁培养基中, 28℃ 增殖 20h, 稀释成不同浓度涂平板, 28℃ 培养 2d, 挑出小菌落分别接入含有 nC₁₃ 指示平板和麦芽汁琼脂平板于 28℃ 培养 2~3d, 挑出在 nC₁₃ 指示平板上不生长或生长弱, 而在麦芽汁琼脂平板上生长好的菌株, 共 975 株, 经过初筛和多次复筛, 获得 5 株由 n C₁₃ 发酵生产 DC₁₃ 的较好突变株, 再经过多次重复试验, 获得两株 P-12-18 和 P-12-242 产 DC₁₃ 比出发菌株 UH-2-48 稳定且二元酸的产率提高 30% 以上的优良生产突变株。

2.2 突变株 P-12-18 和 P-12-242 摇瓶产酸试验

热带假丝酵母突变株 P-12-18 和 P-12-242 菌株在最适条件下, 当 500mL 三角瓶装液量为 15mL, 接种量 20%, nC₁₃ 为 20% 时, 在 200r/min 的旋转摇床上 30℃ 发酵 4d, 每 24h 调 pH 至 8.0 时, DC₁₃ 的产酸水平分别达到 87.47 和 89.84g/L, DC₁₃ 的纯度分别为 95.6% 和 96.5%。

2.3 P-12-242 突变株 2.5t 发酵罐试验

以 P-12-242 突变株为生产菌株, 在 2.5t 发酵罐中进行中型试验, 加入 26% nC₁₃ 和 20% 种液, 在 28~30℃ 同步发酵 n C₁₃ 生产 DC₁₃, 24h 前, pH 自然下降, 24h 后, 将 pH 控制在 7.3~7.5, 发酵 6d 左右(从接种开始到发酵结束), 连续 3 批, 结果如表 1。

表 1 发酵生产 DC₁₃ 中试结果

| 批 号 | 1 | 2 | 3 | 平均 |
|---------------------------------|-------|-------|------|-------|
| 发酵清液中 DC ₁₃ 含量/(g/L) | 158.7 | 184.2 | 205 | 182.6 |
| n C ₁₃ 转化率/% | 80.4 | 88.5 | 94.4 | 87.8 |
| DC ₁₃ 纯度/% | 97.0 | 96.5 | 96.9 | 96.8 |

3 讨论

P-12-242 突变株经过摇瓶试验, 特别是通过 2.5t 罐规模的中试, 证明是一株从 nC₁₃ 发酵生产 DC₁₃ 的优良生产菌株, 产酸速度快, 重复性好。这一试验结果高于日本发酵 5d 产 DC₁₃ 130g/L 文献报道水平。

参 考 文 献

[1] 植 村, 南海男. 化学工业, 1987, 38(5): 48~53.
[2] 中国科学院微生物研究所烃代谢组和发酵车间. 微生物学报, 1979, 19(1): 71~75.
[3] 沈永强, 夏国兴, 楼纯菊等. 植物生理学报, 1980, 6(1): 29~35.
[4] 植 村, 南海男. 石油与微生物, 1985, 33: 436~441.
[5] 陈远童, 郝秀珍. 生物工程学报, 1989, 5(3): 241~245.

STUDIES ON MICROBIAL PRODUCTION OF UNDECANE 1, 11-DICARBOXYLIC ACID FROM N-TRIDECANE

Chen Yuantong Pang Yuechuan Hao Xiuzhen

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract A mutant, *Candida tropicalis* P-12-242, which can produce undecane 1, 11-Dicarboxylic acid(DC_{13}) from N-Tridecane(nC_{13}), was obtained by treating the parent stain UH-2-48 with sodium nitrite. On 2500L fermenter testing, under the optimum condition where the fermentation medium contained total 26% nC_{13} , pH of the course of fermentation was maintained range 7.5~8.0, at 28℃~30℃, the highest level of DC_{13} production was obtained after 6 d, and the average amount of DC_{13} accumulated was 182.6g/L in broth. After received residual nC_{13} , The average consumption rate of DC_{13} from nC_{13} was 87.8%. The purity of the product DC_{13} , which was analyzed by gas chromatography was about 96.8%.

Key words *Candida tropicalis*, Mutant, Undecane 1, 11-dicarboxylic acid

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

顾问 (Advisor) 张树政

主编 (Editor-in-Chief) 李季伦

副主编 (Associate Editors-in-Chief) 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全

编委 (Members of the Board)

王修垣 邓子新 田波 刘志恒 朱庆裴

孙志浩 李焕姿 陈世平 陈永青 杨苏声

周培瑾 范云六 范孝用 钱新民 钱世钧

诸葛健 徐怀恕 翟中和 谭华荣

编辑 (Editors) 戈苏国 刘玉方

重 要 声 明

凡本刊刊出的稿件,除在本刊出版使用外,还要以《光盘版》等多种形式出版使用,作者如不同意,敬请来稿时声明。