

# 微生物发酵生产十一烷1,11二羧酸的研究

陈远童 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) T25-14 经过紫外线和亚硝酸的多次诱变, 获得4株产十一烷1,11二羧酸(DC<sub>11</sub>)较多的突变株, 其中最优的NP-159株以20%(V/V)正十三烷(nC<sub>13</sub>)为碳源摇瓶发酵4天, DC<sub>11</sub>达80g/L左右。在16L罐上, 以30%(V/V)nC<sub>13</sub>发酵6天, DC<sub>11</sub>高达139g/L, 回收残烃后, 对nC<sub>13</sub>的转化率为80%以上。后处理收率为78.9%, DC<sub>11</sub>的纯度为95.3%。

**关键词** 十一烷1,11二羧酸; 热带假丝酵母; 突变株

DC<sub>11</sub>是合成麝香T香料的重要原料, 化工上尚无经济的合成方法。它虽可用从菜籽油中抽提出甘油芥酸酯再经臭氧氧化的方法生产, 但产品纯度低, 只有百分之七十几<sup>[1]</sup>, 利用微生物特异的氧化能力, 在常温常压下, 把nC<sub>13</sub>氧化生成DC<sub>11</sub>的发酵法, 是目前最好的方法。国内外研究者颇多<sup>[2,3]</sup>, 处于领先地位的是日本植村等及其所属公司。他们培育出一株热带假丝酵母M<sub>2030</sub>, 在20吨发酵罐上发酵5天, DC<sub>11</sub>高达130g/L以上<sup>[4]</sup>。从1982年开始以100吨/年的规模进行生产, 1985年以后达到200吨/年<sup>[1]</sup>。国内虽有发酵法生产DC<sub>11</sub>的研究和生产, 但产量低, 发酵5天, DC<sub>11</sub>仅为60—80g/L。为了得到生产DC<sub>11</sub>的高产菌株, 我们进行了菌种诱变筛选和发酵条件的研究。

## 材料与方 法

### (一) 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) T<sub>25-14</sub>, 由T<sub>25-14</sub>诱变的突变株UP-3-24和由UP-3-24诱变的突变株NP-159。

### (二) 试剂

nC<sub>13</sub>和nC<sub>11</sub>纯度分别为97%和99%重蜡(nC<sub>10</sub>—nC<sub>18</sub>混合正烷烃), 锦西石油化工五厂提供<sup>[5]</sup>其他药品为试剂级。

### (三) 培养基

1. 诱变培养基: 麦芽汁固体培养基: 10B<sub>6</sub>的麦芽汁琼脂固体斜面。无碳源培养基(%): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.07, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, 酵母膏0.1, 水洗琼脂2.0, 蒸馏水120℃灭菌30min。

2. 指示培养基: 在培养皿上放一张略比培养皿小的吸饱nC<sub>13</sub>的灭过菌的滤纸, 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8, 蔗糖0.3, 酵母膏0.2, 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三角瓶装30ml培养基, 110℃灭菌30min。

4. 筛选和发酵培养基(%): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

本文于1988年6月27日收到。

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

本文缩写用nC<sub>N</sub>代表正烷烃, DC<sub>N</sub>代表二羧酸, 其中N为碳原子数。

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, 自来水配制, pH调至7.5, 110℃灭菌30min, 尿素和发酵碳源分别灭菌, 接种时加入。种子与发酵培养均在旋转摇床(200r/min)上进行。

#### (四) 筛选方法

同前报[6]。

#### (五) 二元酸的提取与测定

参照文献[5]。

## 实 验 结 果

### (一) $T_{25-14}$ 菌株的紫外线诱变和筛选

取10ml  $T_{25-14}$ 菌悬液(约 $4 \times 10^8$ 个细胞/ml)于灭过菌的带有玻璃磁转子的培养皿中, 在功率15W, 波长2537Å的紫外灯下, 距离15cm, 分别照射2—4min, 照射时用电磁搅拌器搅动, 照射液用生理盐水稀释为不同浓度, 涂于麦芽汁平板上, 放于暗处, 28℃温箱培养48h后, 挑出平板上的小菌落, 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, 在28℃温箱中培养两天, 挑出指示平板上不长或生长较弱而在麦芽汁琼脂平板上生长好的菌落, 经过产酸筛选, 获得一株产酸水平比亲株提高20%的突变株UP-3-24。

### (二) UP-3-24菌株的 $NaNO_2$ 诱变和筛选

取一满环在28℃培养36h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, 取培养液4ml, 加入2ml 0.1mol/L pH4.5的醋酸缓冲液, 27℃保温10min后, 取出2ml加入到10ml 0.07mol/L pH 8.6的 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 溶液中, 终止反应。取1ml处理液加入到

10ml麦芽汁中, 28℃增殖20h, 稀释成不同浓度涂平板, 28℃培养两天, 挑出小菌落分别接入含 $nC_{15}$ 的指示平板和蔗糖琼脂平板上, 28℃培养两天, 挑出在 $nC_{15}$ 指示平板上不长或生长弱, 而在蔗糖琼脂平板上生长好的菌株505株, 经过初筛, 选取102株进行多次复筛, 最后获得两株突变株NP-103和NP-159, 其产酸水平比亲株UP-3-24分别提高20%和30%。

### (三) 突变菌株生产 $DC_{13}$ 能力的比较

我们比较了突变菌株NP-103, NP-159 UH-2-48和UH-3-9<sup>[6]</sup>等4株突变株从 $nC_{13}$ 生产 $DC_{13}$ 的能力, 当按体积比(下同)加入相同光密度的种液20%和 $nC_{13}$ 20%, 经发酵4天时, 结果如表1。NP-159是最佳的生产菌株,  $DC_{13}$ 的纯度为95%以上。以后就选用NP-159为试验和生产菌株。

表 1 不同突变株 $DC_{13}$ 的产量

Table 1 Yields of  $DC_{13}$  from different mutant strains

菌株号 Strain number	UH-3-9	UH-2-48	NP-103	NP-159
$DC_{13}$ (g/L)	58.6	60.5	61.8	72.0

### (四) 突变株 NP-159 利用不同链长正烷烃生产二羧酸的能力

在15ml的发酵培养基中, 分别加入20%的 $C_6$ 到 $C_{18}$ 的各种单一正烷烃和20%在28℃振荡培养两天的种子液, 发酵4天, 每24h用6mol/L NaOH调一次pH至7.5—8.0, 其与基质链长相同的各种二羧酸产量, 如图1所示。NP-159利用 $nC_{13}$ 生产 $DC_{13}$ 的能力最强,  $nC_{15}$ 次之。

### (五) 不同生长碳源对 NP-159 生产 $DC_{13}$ 的影响

我们选用重蜡、蔗糖、麦芽糖、 $nC_{16}$

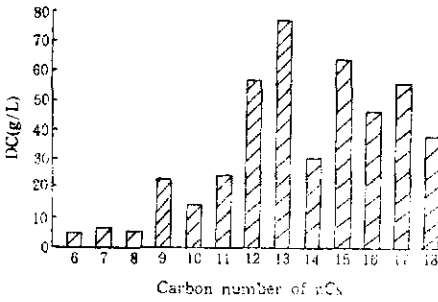


图 1 生长在不同链长正烷烃上的突变株 NP-159 二元酸的产量

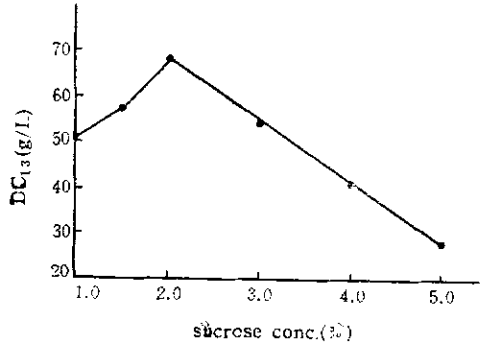


图 2 在不同蔗糖浓度下突变株 NP-159 DC<sub>13</sub> 的产量

Fig. 2 Yields of DC<sub>13</sub> produced by mutant NP-159 in different sucrose concentrations

有 15ml 培养基的 500ml 三角瓶中，nC<sub>13</sub> 的起始浓度在 10—20% 为宜，浓度太大，可能影响通气效果，产酸水平反而降低。

Fig. 1 Yields of dioic acid from mutant NP-159 grown on different chain length of n-alkanes 和醋酸钠 (NaAc) 5 种物质作为发酵的生长碳源，试验其对 NP-159 从 nC<sub>13</sub> 生产 DC<sub>13</sub> 的影响。当分别加入 2% 的上述生长碳源和 20% nC<sub>13</sub>，发酵 4 天时，DC<sub>13</sub> 的产量如表 2 所示。其中以蔗糖为最好，NaAc 次之，重蜡第三。

表 2 在不同生长碳源时突变株 NP-159 DC<sub>13</sub> 的产量  
Table 2 Yields of DC<sub>13</sub> from mutant NP-159 grown on different carbon sources

碳源 Carbon source	重蜡 (nC <sub>10</sub> -nC <sub>18</sub> ) Heavy wax (nC <sub>10</sub> -nC <sub>18</sub> )	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Maltose	nC <sub>13</sub>	NaAc
DC <sub>13</sub> (g/L)	60.1	80.7	39.9	49.4	68.6

(六) 蔗糖浓度对 NP-159 生产 DC<sub>13</sub> 的影响

不同生长碳源试验表明，以蔗糖为生长碳源，DC<sub>13</sub> 产量最高。为此，我们进行了蔗糖浓度分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 和 5.0% 时 NP-159 利用 nC<sub>13</sub> 生产 DC<sub>13</sub> 的试验。如图 2 所示，加入 2% 蔗糖作为生长碳源，DC<sub>13</sub> 产量最高。

(七) 突变株 NP-159 由不同起始浓度的 nC<sub>13</sub> 生产 DC<sub>13</sub>

在发酵培养基中分别加入 10、20 和 30% 的 nC<sub>13</sub>，发酵 4—5 天，测定其不同时间的产酸量 (图 3)。结果表明，在装

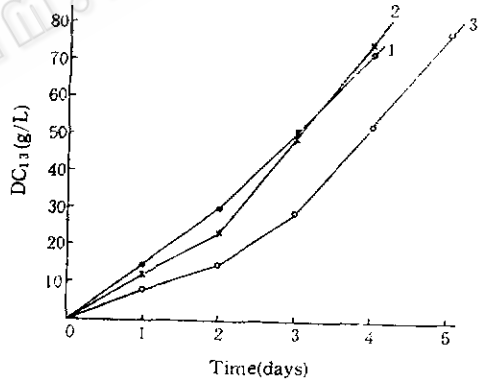


图 3 不同起始浓度 nC<sub>13</sub> 突变株 NP-159 在不同时间 DC<sub>13</sub> 的产量

Fig. 3 Yields of DC<sub>13</sub> Produced by mutant NP-159 in different initial concentrations of n-C<sub>13</sub> and in different fermentative times  
1. 10% nC<sub>13</sub> 2. 20% nC<sub>13</sub> 3. 30% nC<sub>13</sub>

(八) 生长因子 G 对 NP-159 生产 DC<sub>13</sub> 的影响

考察了不同浓度的生长因子 G，0, 10, 20, 30, 40, 50, 100 和 150 μg/L 对 NP-159 从 nC<sub>13</sub> 生产 DC<sub>13</sub> 的影响，以 20% nC<sub>13</sub> 发酵 4 天，结果当浓度为 100 μg/L 时，DC<sub>13</sub> 产量最高。

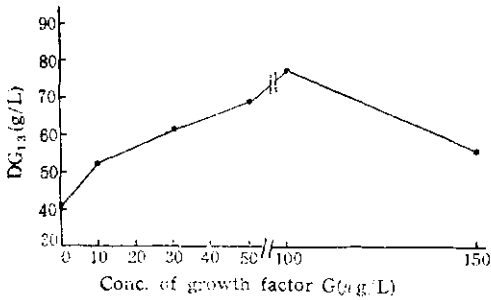


图4 不同生长因子G浓度时突变株NP-159 DC<sub>13</sub>的产量

Fig.4 Yields of DC<sub>13</sub> Produced by mutant NP-159 in different concentrations of growth factor G

### (九) 16L罐扩大试验

综合了摇瓶发酵试验的最佳条件,选用NP-159突变株作为生产菌株,加入30% nC<sub>13</sub>和20%的培养两天的NP-159种液,24h以前, pH自然下降, 24h后, 将pH控制在产酸的最佳条件7.3—7.5, 发酵5—6

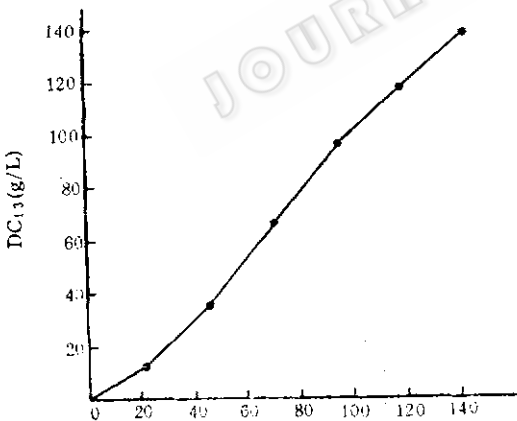


图5 突变株NP-159由nC<sub>13</sub>发酵的DC<sub>13</sub>产量(16L发酵罐)

Fig.5 Yields of DC<sub>13</sub> from nC<sub>13</sub> by mutant NP-159(16 liter fermenter)

天后, 发酵过程的产酸曲线如图5所示。发酵结束后, 加热加碱, 破乳分层, 回收残存 nC<sub>13</sub>后, DC<sub>13</sub>对 nC<sub>13</sub>的转化率在80%左右, 过滤除去菌体, 合并发酵清液, 加入一定量的水, 加入总体积0.3—0.4%的活性炭, 加热至沸, 脱色1h以上, 过滤除去活性炭, 脱色清液加热至80—90°C, 用HCl调pH 2—3, 冷却结晶, 压滤, 得湿的DC<sub>13</sub>结晶, 在70°C左右烘干, 压碎, 得白色粉末状DC<sub>13</sub>成品, 后处理收率在80%左右。经气相色谱分析, DC<sub>13</sub>的纯度在95%左右。

## 讨 论

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)突变菌株NP-159, 经过摇瓶小试和16L罐扩试, 证明该菌株繁殖生长能力和两端氧化nC<sub>13</sub>的能力强, 在两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<sub>13</sub>生产DC<sub>13</sub>的高产优良菌株。通气量大小, 明显地影响二元酸的产生速率, 在摇瓶通气量不变条件下, nC<sub>13</sub>的起始浓度不得超过20%, 否则明显地影响DC<sub>13</sub>产量。在16L罐上, 在适宜的通气条件下, 发酵4和5天, DC<sub>13</sub>分别达到90和120g/L左右, 6天可高达139g/L, 略低于日本发酵5天DC<sub>13</sub>达130g/L的水平。比本实验室过去用突变株U<sub>3</sub>-21从nC<sub>13</sub>生产DC<sub>13</sub>的中试水平(4天, DC<sub>13</sub>为50g/L左右, 转化率50%左右), 无论产酸水平还是对nC<sub>13</sub>的转化率, 都有显著提高。

## 参 考 文 献

- [1] 植村, 南海男: 化学工业, 38(5):48—53, 1987.  
 [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, No.33, 436—441, 1985.  
 [5] 陈远童等: 生物工程学报, 3(4):307—308, 1987.  
 [6] 陈远童等: 生物工程学报, 4(2):145—148, 1988.

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

Chen Yuantong Hao Xiuzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Treatment of mutant, *Candida tropicalis* T<sub>25-14</sub>, with ultraviolet radiation and selection by indication medium containing alkane obtained a mutant UP-3-24 which yield of dioic acid was 20% higher than parent strain. Further treatment of mutant UP-3-24 with sodium nitrite and selection obtained a better mutant NP-159 which yield of dioic acid was 30% higher than parent strain UP-3-24.

The better condition of cultivation for undecane 1,11-dicarboxylic acid (DC<sub>13</sub>) production from n-tridecane (nC<sub>13</sub>) by mutant NP-159 was investigated by using sucrose as carbon source for the growth. On shaking flask, under optimum condition where the culture medium contained 20%(V/V) nC<sub>13</sub>, 2%(W/V) sucrose, inorganic salts and growth factors and pH was adjusted to 7.5 with 6mol/L NaOH at 24 h intervals, the amount of the product accumulated was more than 80g per liter of the medium for 4 days.

On 16 liter fermenter testing, under the optimum condition where the culture medium contained total 30%(V/V)nC<sub>13</sub>, pH of the course of fermentation was maintained range 7.3—7.5, at 28—30°C, the highest level of DC<sub>13</sub> production was obtained after 6 days and the amount of DC<sub>13</sub> accumulated was 139g per liter of the mudium. After received residual nC<sub>13</sub>, the consumption rate of nC<sub>13</sub> was about 80%. The product from nC<sub>13</sub> was analysed by gas-chromatograph the purity was 95.3%.

The mutant strain NP-159 was still strong and healthy without recovery after subculture for years on malt extract-agar slant, the production of DC<sub>13</sub> was also as high as usual. Therefore, mutant strain NP-159 could be confirmed as stable and high producer for the production of DC<sub>13</sub> in industry.

### Key words

Undecane 1,11-dicarboxylic acid, *Candida tropicalis*, mutant strain