

# 发酵生产十六烷二羧酸的研究

陈远童 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) T<sub>25-14</sub> 为出发菌株, 经紫外线多次诱变, 获得生产十六烷二羧酸 (DC<sub>16</sub>) 能力比原株提高25%以上的4株突变株。其中UH-3-9突变株经多次复筛, 产DC<sub>16</sub>能力都比T<sub>25-14</sub>菌株提高50%以上。经摇瓶条件试验, 不加其他生长碳源, 只加15% (V/V) 正十六烷 (nC<sub>16</sub>), 发酵96h, DC<sub>16</sub>为48.2g/L, 转化率41%, 产品纯度95.9%。

**关键词** 热带假丝酵母; 十六烷二羧酸; 环十五烷酮

DC<sub>16</sub> 是合成名贵香料的重要原料。以它为原料合成少一个碳原子的大环酮——环十五烷酮 (即麝香酮) 具有纯麝香香味<sup>[1,2]</sup>。目前DC<sub>16</sub>甚缺, 且难以用化学方法合成。日本报道用阴沟假丝酵母 (*Candida cloacae*) 从nC<sub>16</sub>发酵产生DC<sub>16</sub>的研究<sup>[3-5]</sup>。本文报道生产DC<sub>16</sub>优良生产菌株诱变培育和部分条件试验。

## 材料和方法

### (一) 菌种

热带假丝酵母 (*C. tropicalis*) 1230的突变株 T<sub>25-14</sub><sup>[6]</sup> 和 T<sub>25-14</sub>的突变株 UH-3-9。

### (二) 试剂

nC<sub>16</sub>: 化学纯, 北京化工厂进口分装,

nC<sub>10</sub>—nC<sub>18</sub>: nC<sub>10</sub>微量, nC<sub>11</sub> 1.3%, nC<sub>12</sub> 4.9%, nC<sub>13</sub> 18.1%, nC<sub>14</sub> 26.0%, nC<sub>15</sub> 23.6%, nC<sub>16</sub> 16.3%, nC<sub>17</sub> 8.2%, nC<sub>18</sub> 1.6%, 锦西石油化工五厂提供; 其他药品为试剂级。

### (三) 培养基

1. 筛选和发酵培养基 (%): KH<sub>2</sub>-

PO<sub>4</sub> 0.8, NaCl 0.1, 蔗糖 0.15, 酵母膏 0.1, 玉米浆 0.05, 尿素 0.1, nC<sub>16</sub> 7.0, 自来水配制, pH 7.5, 8磅 15min 灭菌。尿素和 nC<sub>16</sub> 分别灭菌, 接种前加入。

2. 诱变培养基: 麦芽汁固体培养基为 10Be' (波美) 麦芽汁和 2% 的水洗琼脂。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, 蒸馏水配制, 15磅 灭菌 30min。

3. 指示培养基: 在培养皿上, 放一张略比培养皿小的吸足 nC<sub>16</sub> 的无菌滤纸, 然后倒入无碳源培养基, 做成 2mm 厚的平板。

### (四) 筛选方法

将诱变得到的突变小菌落接入麦芽汁琼脂大斜面, 28℃ 培养 2 天, 转入筛选培养基中, 在 200rpm 的旋转摇床上发酵 3 天, 每隔 24h 调一次 pH 至 7.5—8.0, 发酵終了, 用乙醚提取, 用标准 NaOH 溶液滴

本文于 1986 年 11 月 5 日收到。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。

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。

定,比较产酸量。

### (五) 二羧酸的提取与测定

发酵液用6N HCl酸化至pH 2—3,用乙醚抽提,去乙醚后得白色样品。

二羧酸用气液相色谱法测定,方法见前报<sup>[7]</sup>。

### (六) 菌体量的测定

方法见前报<sup>[8]</sup>。

## 实验结果

### (一) T<sub>25-14</sub>菌株的紫外线诱变

取10ml T<sub>25-14</sub>菌株的菌悬液(约4×10<sup>8</sup>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—4 min。照射时用电磁搅拌器搅动。照射2 min,致死率为99.997%,照射4min,致死率为99.99999%。不同照射时间的照射液用生理盐水稀释成不同浓度,涂于麦芽汁平板上,置暗处于28℃培养48h后,挑出平板上的小菌落,分别划线于含nDC<sub>16</sub>的指示培养基平板上和麦芽汁琼脂平板上,培养两天,挑出在前者上不长或生长较差而在后者上生长好的菌株,共172株,进行产DC<sub>16</sub>筛选。

### (二) 产DC<sub>16</sub>突变株的筛选

把上述172株诱变株分别接入麦芽汁大斜面,28℃培养两天后,接入含7% nDC<sub>16</sub>的筛选培养基中(15ml/250ml三角瓶),振荡发酵3天,每天调一次pH至7.5—8.0。经过初筛,172株诱变株中,正突变87株,占50.6%,负突变60株,占34.9%,总突变率为85.5%。

从87株正突变株中挑选26株产DC<sub>16</sub>较多的菌株,进行第一次复筛,再挑选14株进行第二次复筛。经过初筛和两次复筛,获得了产DC<sub>16</sub>比出发株T<sub>25-14</sub>明显提高的

4株突变株(表1),其中UH-3-9突变株最优,DC<sub>16</sub>产量提高了53.5%,60.0%和57.0%,所以选用该突变株为DC<sub>16</sub>的生产菌株,进行部分摇瓶条件试验。

表1 紫外线诱变产DC<sub>16</sub>的突变株

Table 1 Mutants of Producing DC<sub>16</sub> induced by UV

菌株 Strain	OD (×30)	DC <sub>16</sub> (%)	DC <sub>16</sub> 产率 DC <sub>16</sub> ratio of producing (%)
T <sub>25-14</sub>	0.73	1.35	100
UH-3-9	0.54	2.12	157.0
UH-2-48		1.75	129.6
UH-3-23		1.73	128.0
UH-4-15		1.80	133.2

### (三) 接种量对UH-3-9突变株产DC<sub>16</sub>的影响

把在10Be'麦芽汁培养基中培养40h的UH-3-9菌液(稀释45倍,在620nm波长下,菌体生长光密度OD为0.35),按2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0和20.0%接入含10% nDC<sub>16</sub>的发酵培养基中(总体积为20ml/500ml三角瓶),在摇床上发酵4天,其DC<sub>16</sub>含量见图1。结果表明,在此条件下,接种量不得低于12.5%,否则DC<sub>16</sub>产量明显降低。

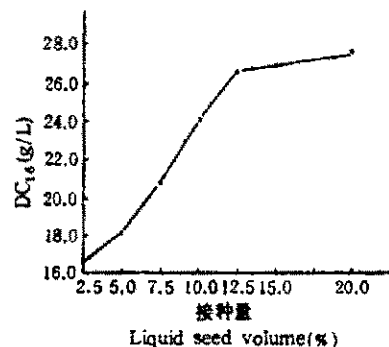


图1 接种量对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响  
Fig.1 Effect of volume of liquid Seed on Producing DC<sub>16</sub> of UH-3-9

### (四) 吐温60对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响

在发酵培养基中，分别加入一定量的吐温60，使其浓度分别为0—0.5%，加入10% (V/V) nC<sub>16</sub>和12.5% 种液，发酵4天，其DC<sub>16</sub>产量如图2所示。结果表明，加入0.05%吐温60，DC<sub>16</sub>产量有所提高，浓度增大，反而不利于产酸，这是否与前文<sup>[8]</sup>报道的乳化剂可能是一种代谢的中间产物有关。加入少量吐温60，促进烃和水的乳化，有利于前期菌体生长，提高DC<sub>16</sub>产量；但吐温浓度增大，反而抑制了作为中间代谢产物的乳化剂产生，因而不利产酸。这个问题，有待进一步研究。

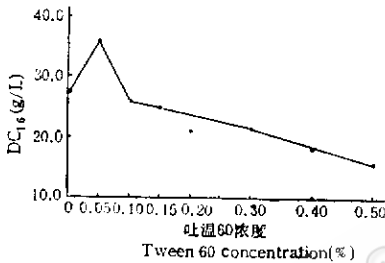


图2 吐温60对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响  
Fig.2 Effect of Tween 60 on producing DC<sub>16</sub> of UH-3-9

(五) 通气量对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响

我们用普通500ml三角瓶和有四个挡板的500ml三角瓶<sup>[9]</sup>，装液量为20ml，进行通气量对产DC<sub>16</sub>影响的试验(表2)。结果表明，四个挡板三角瓶比普通三角瓶明显有利于DC<sub>16</sub>的产生，说明通气量大能提高DC<sub>16</sub>的产量。

表2 不同生长碳源对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响

Table 2 Effects of growth carbon source on producing DC<sub>16</sub> of UH-3-9 (g/L)

试验次数 No.	不加 No add			nC <sub>10</sub> —nC <sub>18</sub> 2.5%			蔗糖 Sucrose 0.4%			nC <sub>10</sub> — nC <sub>18</sub> 2.5% + sucrose 0.2%		
	1	2	平均 average	1	2	平均 average	1	2	平均 average	1	2	平均 average
1	48.5	47.9	48.2	37.5	37.6	37.6	44.0	43.8	43.9	34.9	35.0	35.0
2	50.3	47.1	48.7	27.8	35.6	31.7	42.3	42.4	42.4	27.8	32.2	30.0

表2 通气量对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响

Table 2 Effects of air volume on producing DC<sub>16</sub> of UH-3-9

试验次数 No.	普通三角瓶 Ordinary flask (g/L)			四挡板三角瓶 Fernbach flask with 4 indentation (g/L)		
	1	2	平均 average	1	2	平均 average
1	20.6	20.7	20.7	46.8	42.9	44.9
2	22.3	21.7	22.0	38.7	40.1	39.4

(六) 不同生长碳源对UH-3-9产DC<sub>16</sub>的影响

在含15% (V/V) nC<sub>16</sub>的发酵培养基中(20ml/500ml四挡板三角瓶)，再分别加入nC<sub>10</sub>—nC<sub>18</sub>(重蜡)，蔗糖和重蜡+蔗糖作为菌体生长碳源，发酵4天，产生DC<sub>16</sub>的结果列于表3。其中以不添加重蜡或蔗糖作为生长碳源者产DC<sub>16</sub>最高，加入0.4%蔗糖者次之。DC<sub>16</sub>纯度为95.9% (图3)。

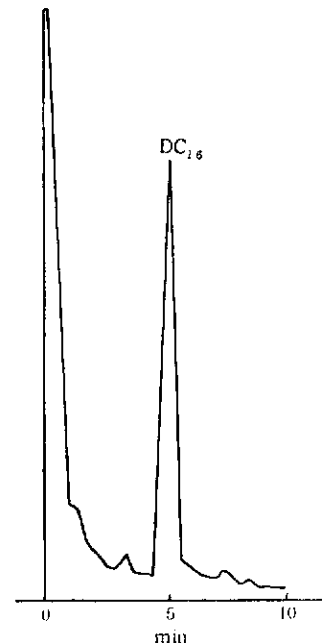


图3 UH-3-9由nC<sub>16</sub>发酵生产DC<sub>16</sub>的气相色谱图

Fig.3 Gas chromatography of producing DC<sub>16</sub> from nC<sub>16</sub> of UH-3-9

## 讨 论

根据Uchio, R.等<sup>[3,4]</sup>报道,从不能同化DC<sub>16</sub>的阴沟假丝酵母(*C. cloacae*) M-1诱变获得的不能同化正烷烃的MR-12突变株,从nC<sub>16</sub>生产DC<sub>16</sub>的能力显著提高,静止细胞培养72h, DC<sub>16</sub>从29.3g/L提高到42.7g/L。M-1和MR-12降解DC<sub>16</sub>的活性明显降低,从而生产DC<sub>16</sub>的能力

明显提高。我们用紫外线诱变的突变株UH-3-9,能同化nC<sub>16</sub>,但同化能力比母株*C. tropicalis* T<sub>25-14</sub>降低35%,而产DC<sub>16</sub>能力提高57%。UH-3-9是生产DC<sub>16</sub>的更优菌株,发酵96h, DC<sub>16</sub>为48.7g/L,比热带假丝酵母(*C. tropicalis*) U<sub>3-21</sub>突变株<sup>[10]</sup>(96h, DC<sub>16</sub>为39g/L)产酸量提高约25%。这是否由于紫外线照射后, $\omega$ -氧化酶活性增强或 $\beta$ -氧化酶活性降低,或两者兼而有之呢?有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 陈远童, 生物工程学报, 2(1):72—74, 1986.
- [2] Uchio, R. and Shio, I.: 石油と微生物, (11):14—23, 1974.
- [3] Shio, I. and Uchio, R.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(3):426—433, 1972.
- [4] Shio, I. and Uchio, R.: *Agr. Biol. Chem.* 36(7):1169—1175, 1972.
- [5] Uchio, R. and Shio, I.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(8):1389—1397, 1972.
- [6] 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, 20(1):88—93, 1980.
- [7] 中国科学院微生物研究所烃代谢组: 微生物学报, 21(1):88—95, 1981.
- [8] 陈远童等: 微生物学通报, 11(2):61—64, 1984.
- [9] Corman, J. et al.: *Applied Microbiology*, 5(5):313—318, 1957.
- [10] 中国科学院微生物研究所烃代谢组: 微生物学报, 19(1):71—75, 1979.

# STUDIES ON PRODUCING HEXADECANE DICARBOXYLIC ACID BY FERMENTATION

Chen Yuantong Hao Xiuzhen

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing)

Four mutants able to produce hexadecane dicarboxylic acid (DC<sub>16</sub>), 25% higher than parental strain, had been obtained by ultra-violet treatment of *Candida tropicalis* T<sub>25-14</sub>. One mutant UH-3-9, produced more than 50% of DC<sub>16</sub> increase over the original strain T<sub>25-14</sub>.

In flask test, after 96h fermentation under optimum conditions, the yield of DC<sub>16</sub> is 48.2g/L with conversion rate of 41% and purity of 95.9% when 15%(v/v) of nC<sub>16</sub> was used as the carbon source.

## Key words

*Candida tropicalis*; hexadecane dicarboxylic acid; exaltone