

# 石油烷烃发酵生产长链二羧酸\*

刘 幸 李夏兰 陈惠端

(华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011)

**摘要** 热带假丝酵母  $LH_{10}$  和  $LH_{12}$ , 在以正十四烷、正十六烷为唯一碳源的培养基中生长, 可产生相应的长链二羧酸.  $LH_{12}$  经  $HNO_2$  诱变选育, 得到 1 株利用正十四烷的突变株  $LH$ . 在正交设计法试验获得的适宜培养基配方中, 发酵产生的  $DC_{14}$  产量为  $28.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**关键词** 发酵, 二元羧酸, 热带假丝酵母, 石油烷烃

**分类号** TQ 921

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 可利用石油正构烷烃, 经双端氧化而产生长链二羧酸<sup>[1~3]</sup>.  $C_{10}$  以上的长链二羧酸是染料、橡胶、药物、塑料、香料等工业的重要原料. 用化学方法生产二羧酸, 存在技术、设备要求高, 能耗大等缺点, 且  $C_{11}$  以上的长链二羧酸也难以用化学方法合理制造. 然而, 利用资源丰富的石油正构烷烃发酵生产长链二羧酸有许多独特的优点<sup>[2,3]</sup>, 可建立优于化学方法的新工艺, 为我国增添新的精细化工产品. 国内对从混合正烷烃生产长链二羧酸<sup>[4,5]</sup>, 从正十二烷和正十三烷分别生产  $DC_{12}$  和  $DC_{13}$ <sup>[6,7]</sup> 等均有报道. 本文利用热带假丝酵母  $LH_{10}$  和  $LH_{12}$ , 进行正十四烷、正十六烷直接发酵生产  $DC_{14}$  和  $DC_{16}$  的试验, 并用  $LH_{12}$  作为亲本株进行诱变选育得到突变株  $LH$ , 从而提高二羧酸的产量.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要原材料

(1) 菌种: 热带假丝酵母  $LH_{10}$  和  $LH_{12}$ , 清华大学刘祖同赠; (2) 麦汁: 泉州啤酒厂和惠安啤酒厂提供; (3) 正十六烷: CP 级, 上海试剂一厂出产; (4) 正十四烷: 瑞典进口分装; (5) 其它试剂均为 CP 级以上商品.

### 1.2 培养基

(1) 斜面与分离平板培养基: 2.5% 琼脂麦汁,  $\text{pH}=6.7$ ; (2) 种子培养基 10 Bx (锤度) 麦汁; (3) 发酵培养基 (%):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.8,  $\text{NaCl}$  0.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, 酵母膏 0.05, 尿素 0.15 (分消), 正烷烃 15.0 (分消), 蒸馏水至 100, 于 98.1 kPa 灭菌 20 min; (3) 诱变指示平板培养基 (%):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.07,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2, 酵母膏 0.05,  $DC_{14}$  (或  $DC_{16}$ ) 1.0, 琼脂 3.0, 蒸馏水至 100, 常规灭菌, 每 10 mL 分装于

\* 本文 1993-04-15 收到

一个培养皿中。

### 1.3 种子培养及发酵

接保存菌种于斜面上,培养 48 h,得活化固体种子。并刮入种子培养液,180~200 r·min<sup>-1</sup>振动培养 24 h,得液体种子。取 3.0 mL 液体种子接入 20.0 mL 发酵培养基并加入 3 mL 碳源,180~200 r·min<sup>-1</sup>摇床培养 96 h。每 24 h 测定一次 pH 值,并加 6 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调 pH 至 7.0,继续培养。培养温度 28~30℃。

### 1.4 产物的分离和分析

(1)产酸测定:发酵产物经乙醚萃取,分离出晶体用重量法称量和容量法滴定,计算出二元酸产率。(2)纸色谱鉴定:新华 1 号中速滤纸,展层剂为乙醇(90%):氨水=(60~90):(10~40),显色剂为甲基红溶液。其饱和时间 20~30 h,展开温度 25~30℃,用上行法展开 1.5~5.0 h。(3)熔点测定:以甘油为介质,用齐列熔点管和显微熔点仪测定。

### 1.5 菌种的诱变与突变株分离

将亲本株细胞用 NaNO<sub>2</sub> 进行诱变处理,由菌落存活数求得不同浓度的致死率。选择致死率 90%左右的小菌落分别点植于指示平板和琼脂平板上培养 2 d,挑出在指示平板生长弱而相应琼脂平板上正常生长的菌落进行产酸筛选。

### 1.6 产酸培养基配方的筛选

用正交试验设计法,对发酵培养基中的尿素,NaCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,酵母膏等 4 个因素的配比进行考察,各因素分别取 3 个水平,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)表组合。其余因素如碳源,温度、转速等保持不变,找出最高产酸率的配方和影响培养结果的主要因素。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株 LH<sub>10</sub>和 LH<sub>12</sub>产酸性能的比较

2.1.1 不同碳源发酵的 pH 变化 以正十四烷和正十六烷为碳源发酵的 pH 变化见图 1,2。

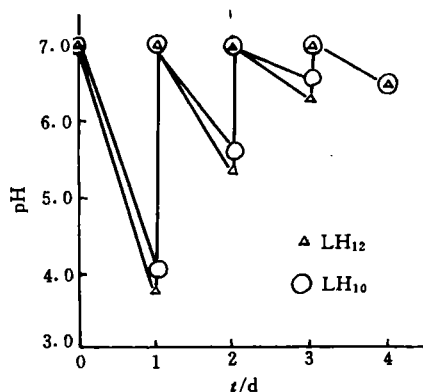


图 1 正十四烷发酵的 pH 变化

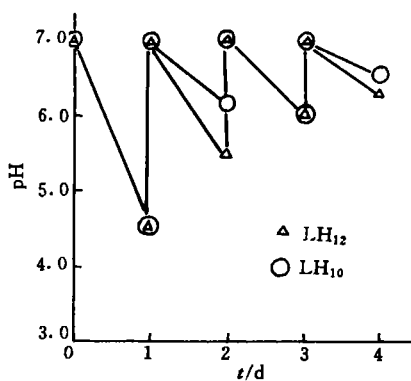


图 2 正十六烷发酵的 pH 变化

2.1.2 二羧酸 DC<sub>14</sub>和 DC<sub>16</sub>产率 LH<sub>10</sub>, LH<sub>12</sub>产生 DC<sub>14</sub>和 DC<sub>16</sub>的产率列于表 1 (表中括号内数据为重量法分析所得结果)。由图 1,2 和表 1 可见, LH<sub>10</sub>, LH<sub>12</sub>以正十四烷或正十六烷为单一碳源,均可产生相应的 DC<sub>14</sub>和 DC<sub>16</sub>。发酵过程 pH 降低规律相似,这两种菌株对正十四烷产生 DC<sub>14</sub>比对正十六烷产生 DC<sub>16</sub>的产率高。分析结果,重量法比容量法偏高。

2.1.3 产物鉴定 (1)纸色谱法:结果见图 3,4. 由图可见,DC<sub>14</sub>和 DC<sub>16</sub>产物均为较纯物质. 其中,图 4 斑点狭长,虽经反复实验,改变展层条件,结果仍然不变.(2)熔点测定:因无标准样品可供色谱对比,用熔点管和显微熔点仪测定 DC<sub>14</sub>和 DC<sub>16</sub>的熔点( $\theta$ )范围,两种方法结果完全一致,如表 2 所示.

由表 2 可见,DC<sub>14</sub>和 DC<sub>16</sub>的熔点与文献值符合性相当好. 若纯度稍差,熔点则明显偏低.

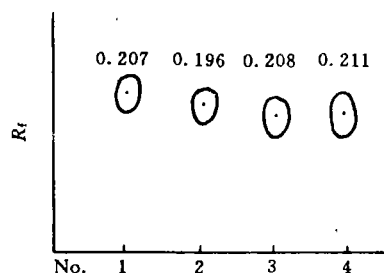


图 3 十四烷二酸的纸色谱图

表 1 二羧酸产率(%)

| 次数 | LH <sub>10</sub> |                  | LH <sub>12</sub> |                  |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|
|    | DC <sub>14</sub> | DC <sub>16</sub> | DC <sub>14</sub> | DC <sub>16</sub> |
| 1  | 1.29(1.80)       | 0.85(0.92)       | 1.71(1.90)       | 0.81(1.25)       |
| 2  | 1.42             | 0.66             | 1.66             | 0.59             |
| 3  | 1.51             | 0.72             | 1.30             | 0.63             |

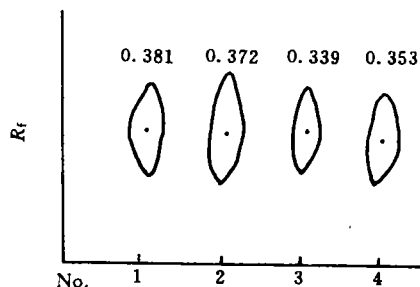


图 4 十六烷二酸的纸色谱图

表 2 产品熔点值

| 样品               | $\theta/^\circ\text{C}$ |             |
|------------------|-------------------------|-------------|
|                  | 实验值                     | 文献值         |
| DC <sub>14</sub> | 124.0~125.5             | 125.0~126.0 |
| DC <sub>16</sub> | 125.5~126.0             | 126.0       |

## 2.2 LH<sub>12</sub>的诱变育种

2.2.1 HNO<sub>2</sub>的诱变作用与突变株的产酸筛选 不同 HNO<sub>2</sub>浓度与不同作用时间处理的 LH<sub>12</sub>致死率浓度为 0.01~0.2 mol · L<sup>-1</sup>,处理时间在 10~30 min 顺次递增. 当浓度增加至 0.1 mol · L<sup>-1</sup>(处理时间为 30 min),以及浓度增加至 0.2 mol · L<sup>-1</sup>, (任何处理时间),菌体全部死亡. 从琼脂平板上挑出致死率大于 90% 的 30 个小菌落进行突变株分离,得到 11 株在指示平板上生长弱而在琼脂平板上生长良好的菌株,取 8 株进行产酸初筛,得 4 株产酸率较高. 经过复筛,其中产 DC<sub>14</sub>的两株,即 0.05 mol · L<sup>-1</sup> HNO<sub>2</sub>(30min) 和 0.05 mol · L<sup>-1</sup> HNO<sub>2</sub>(20 min),其产酸量分别是亲本株的 2.1 和 1.3 倍. 另外,产 DC<sub>16</sub>的两株,产量均不高.

2.2.2 突变株的形态 经 HNO<sub>2</sub>作用的突变株,在琼脂平板上生长的菌落比亲本株的菌落小,外观无明显区别. 在显微镜下观察,突变株的单细胞形态为细长形,亲本株细胞为卵圆形.

## 2.3 发酵培养配方的试验

用初试时 DC<sub>14</sub>产率最高的突变株 LH 进行产酸配方试验,由 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 表示结果 DC<sub>14</sub>最高收得量是 28.70 g · L<sup>-1</sup>. 从极差 R 值的分析,各因素影响大小的排列顺序为尿素>酵母膏>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O>NaCl,即尿素浓度为主要影响因素. 在水平的选择上,尿素和酵母膏还可适当增加浓度,重新组合,以求得更高产率.

## 3 结论

(1) 实验结果表明热带假丝酵母 LH<sub>10</sub>, LH<sub>12</sub>, 可利用正十四烷、正十六烷发酵产生相应的

长链二羧酸  $DC_{14}$ ,  $DC_{16}$ . 其产量,  $LH_{10}$  为  $12.9$  和  $8.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $LH_{12}$  为  $17.1$  和  $8.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 两株菌种的  $DC_{14}$  产量, 都比  $DC_{16}$  高.

(2) 用生长较旺盛、产  $DC_{14}$  较高的  $LH_{12}$  作亲本株进行  $\text{HNO}_2$  诱变选育, 得到突变株  $LH$  (其产  $DC_{14}$  为亲本株的  $1.68$  倍), 产量达  $28.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 产率的提高, 说明经诱变剂作用后的突变株, 对脂肪酸的  $\beta$ -氧化途径大为削弱<sup>[7]</sup>

(3) 正交试验得到适用于  $LH$  突变株产  $DC_{14}$  的发酵培养基(%)配方:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.8$ ,  $\text{NaCl}$   $0.10$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.01$ , 酵母膏  $0.20$ , 尿素  $0.25$ , 正十四烷  $15\%$ ; 培养条件:  $\text{pH}$  为  $7.0$ , 温度  $28 \sim 30^\circ\text{C}$ , 转速  $180 \sim 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 培养时间  $4 \text{ d}$ .  $DC_{14}$  产量  $28.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 适当增加尿素和酵母膏浓度, 可望进一步提高产量.

(4) 产物  $DC_{14}$ ,  $DC_{16}$  经纸色谱和熔点测定结果, 确认质量较纯.

### 参 考 文 献

- 1 易祖华, 余志华. 产二羧酸热带假丝酵母乙酰 CoA 合成酶的研究. 微生物学报, 1988, 28 (3): 265~269
- 2 刘祖同, Sato H G. 热带假丝酵母突变株  $SD_1$ , 利用癸烷产生癸二酸的研究. 石油学报, 1987, 3 (2): 29~37
- 3 植村南海男. 发酵法生产长链二元酸. 化学工业, 1987, 38 (5): 48~53.
- 4 中国科学院微生物所烃代谢组及发酵车间. 正烷烃发酵生产长链混合二羧酸 (I). 微生物学报, 1980, 20 (1): 88~92.
- 5 中国科学院微生物所烃代谢组及发酵车间. 正烷烃发酵生产长链混合二羧酸的研究 (I). 微生物通报, 1980, 7 (1): 13~17
- 6 刘祖同, 夏玉棉, 李冠英等. 癸二酸及癸烷  $1:10$  二羧酸发酵突变株的研究. 遗传, 1982, 4(2): 16~18
- 7 中国科学院微生物所烃代谢组. 微生物的正烷烃代谢 (I). 微生物学报, 1981, 21 (1): 88~94.

## Production of Long-Chain Dicarboxylic Acids by the Fermentation of Petroleum Alkanes

Liu Xing   Li Xialan   Chen Huiduan

(Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou)

**Abstract** By growing the strain *Candida Tropicalis*  $LH_{10}$ ,  $LH_{12}$  on the culture medium with n-tetradecane or n-hexadecane as the sole carbon source, the corresponding long-chain dicarboxylic acids can be produced. The mutation breeding of  $LH_{12}$  with  $\text{HNO}_2$  brings about a mutant  $LH$  which is capable of utilizing n-tetradecane. With a suitable prescription of culture medium, obtained by the test of orthogonal design, the production of  $DC_{14}$  by the fermentation will give a highest yield of  $28.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Keywords** fermentation, dicarboxylic acid, *candida tropicalis*, petroleum alkanes