

十三碳二元羧酸发酵技术的研究*

刘树臣 李淑兰 方向晨

(抚顺石油化工研究院 抚顺 113001)

摘 要:以一株热带假丝酵母菌(*Candida tropicalis*) SP-1 为出发菌株,经紫外线反复诱变获取一株难以同化烷烃的突变株 SP-UV-56,摇瓶培养 5d 平均产酸量达 72g/L,较出发菌株提高了 1.25 倍,并利用突变株 SP-UV-56 在 13.7L 自控罐上扩试,补加醋酸盐发酵,144h 产酸量达 153g/L,比不加醋酸盐发酵提高了 29.7%。采用提高搅拌混合效果和低溶解氧发酵过程控制方法,可有效地提高菌体的产酸能力,在 20m³ 发酵罐中发酵生产十三碳二元羧酸,总培养时间 144h,产酸量可达 172g/L,放罐体积 15.0m³,产量为 2.25t。

关键词:热带假丝酵母菌,十三碳二元羧酸,正十三烷烃,发酵

中图分类号:O623.613 文献标识码:B 文章编号:0001-6209(2000)03-0318-22

十三碳二元羧酸(DCA13)是一种精细化工原料,主要用于合成麝香-T、聚酰胺类服装用热熔胶、高级润滑油、增塑剂和特种工程塑料等。目前利用微生物发酵生产 DCA13 已在国外工业化^[1],在该项技术转向产业化的过程中,基础研究工作开展得较为深入,如菌种的筛选、发酵条件的优化、有关酶系和小分子效应物作用以及小试、中试等研究^[2~8],这些研究在提高发酵水平方面起到了重要作用。本文从实际生产角度出发,研究并确立了提高 DCA13 发酵水平的几种关键技术,并应用这些技术在工业生产中取得良好的发酵结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

热带假丝酵母菌(*Candida tropicalis*) SP-1。

1.2 原料

进口正十三烷($n\text{-C}_{13}$),含量 98.5%。

1.3 培养基

斜面培养基:10Brix 麦芽汁,1.5%~2.0%琼脂,种子和发酵培养基同^[2],其中种子培养基含 $n\text{-C}_{13}$ 5%。

1.4 培养方法

经 30℃~32℃ 培养 2d 的两支麦芽汁斜面菌种分别接入含 560mL 种子培养基的两只 3000mL 摇瓶内,于 30℃、180r/min 摇床上培养 2d,将 1L 种子液接入灭菌后的含 7L 发酵

* 国家科委“九五”攻关课题(96-C03-03-04)

作者简介:刘树臣(1962-),男,吉林省白城市人,抚顺石油化工研究院生物工程研究室副主任,高级工程师,硕士,现在职攻读清华大学博士研究生,主要从事石油发酵研究

收稿日期:1999-01-27,修回日期:1999-08-19

培养基的 13.7L 自控发酵罐内 ,其中含 $n\text{-C}_{13}$ 1.5L ,于 700 r/min、通气量 1vvm 和自然 pH 条件下培养 18h ,然后调节并控制 pH 至 7.7 转入产酸期 ,在 42h、66h 和 90h 各补加 $n\text{-C}_{13}$ 500mL。

1.5 分析方法

- 1.5.1 菌体浓度测量**用浊度法测定。
- 1.5.2 二元羧酸含量测定** 取一定量发酵清液 ,用 H_2SO_4 酸化至 pH3~4 ,加热处理后冷却过滤 ,蒸馏水洗滌沉淀酸至中性 ,以消除无机酸和发酵液中水溶性有机酸对分析结果的干扰 ,将沉淀酸及滤纸放入一定量的无水乙醇中 ,温热溶解 ,酚酞作指示剂 ,标准氢氧化钠溶液滴定。

2 结果和讨论

2.1 高产 DCA13 菌株的筛选

单体长链正烷烃价格较高 ,考虑生产经济性 ,在筛选优良生产菌株时 ,对菌株遗传性能要求如下 :1. 难以利用或同化烷烃生长 ;2. 对产物长链二元羧酸降解能力差 ;3. 在碳水化合物中生长良好、产酸高。以菌株 SP-1 做出发株 ,经紫外线反复诱变筛选分别得到突变株 SP-UV-16 和 SP-UV-56 ,其中后者难以同化烷烃和不能同化长链二元羧酸 ,是一株优良的长链二元羧酸生产菌株 ,不同菌株利用不同碳源在摇瓶中的生长结果见表 1 ,其产酸结果见图 1。通过紫外线诱变获得的突变株 SP-UV-56 摇瓶平均产酸量达 72g/L ,较出发菌株提高了 1.25 倍 ,而且遗传性能稳定 ,是一株高产长链二元羧酸的生产菌株。

表 1 不同菌株利用不同碳源生长结果

Table 1 Growth on the different carbon sources for mutants

Carbon sources	Strain		
	SP-1	SP-UV-16	SP-UV-56
$n\text{-C}_{13}$	++	++	+
DCA13	+	-	-
malt wort	++++	++++	++++

2.2 碳源对 SP-UV-56 生长和产 DCA13 的影响

突变株 SP-UV-56 难以同化烷烃 ,但在葡萄糖和蔗糖碳源中生长良好 ,用后者发酵可以得到更高的产酸量 ,而且油酸转化率也相对较高。图 2 为在通气条件下烷烃、蔗糖—烷烃和蔗糖分别作生物碳源时细胞生长情况以及后两者产酸结果。对蔗糖—烷烃培养 ,培养 18h 菌体浓度为 12.5g/L ,达到了转入产酸期所需的菌体浓度(12g/L) ,但未积累二元羧酸 ;而对蔗糖培养 ,则培养 24h 才能达到所需的菌体浓度 ,说明烷烃的存在促进了细胞对蔗糖的快速利用 ;对烷烃作单一生长碳源培养 ,细胞生长状况极差 ,说明该突变株在供氧充足条件下也难以同化烷烃进行生长。另外 ,培养基中加入烷烃的发酵 ,进入产酸期后能迅速积累二元羧酸 ,培养至 48h 时达 39g/L ,而初始未加入烷烃的发酵 ,产酸初期积累二元羧酸缓慢 ,培养至 48h 时仅为 17g/L ,说明加入烷烃对细胞进入产酸期开始迅速积累二元羧酸有利。

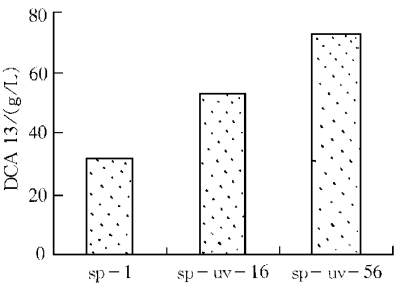


图 1 突变株的产酸变化

Fig. 1 DCA13 yields for different mutant

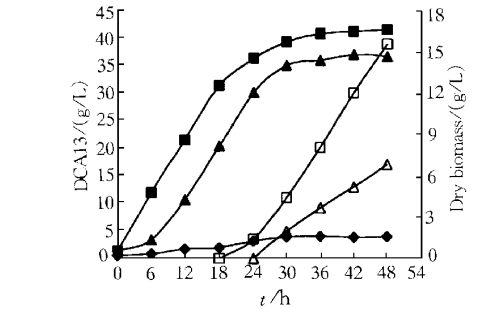


图2 突变株 SP-UV-56 生长和产酸情况

Fig.2 Growth and DCA13 yield for SP-UV-56

- ◆ 5% (v/v) n-C13 growth ;
- 3% sucrose + 10% (v/v) n-C13 DCA13 yield ;
- △ 3% sucrose , 24h added 10% (v/v) n-C13 DCA13 yield ;
- 3% sucrose + 10% (v/v) n-C13 growth ;
- ▲ 3% sucrose 24h added 10% (v/v) n-C13 growth.

2.3 添加醋酸盐发酵

在 13.7L 发酵罐中发酵 ,培养 15h 时补加醋酸盐 ,加入量为 30g ,其结果见图 3。未补加醋酸盐发酵 144h ,产酸量达 118g/L ,产酸期间菌体浓度增至 16.4g/L ,而补加醋酸盐发酵则为 153g/L ,菌体浓度增至 18.4g/L ,产酸量和菌体浓度较前者分别提高了 29.7% 和 12.2% ,比代谢产物生成速率(单位菌体产酸量)分析结果见表 2 ,补加醋酸盐发酵 ,产酸 3d ,单位菌体产酸量有较明显提高 ,平均提高了 21.9% ,产酸 5d 平均提高了 13.2% ,说明醋酸盐促进了菌体浓度的增加和二元羧酸的合成。另外 ,单位菌体产酸量随培养时间延长而下降 ,96h 后更为明显。

表 2 两种发酵方法的比代谢产物生成速率的比较

Item		Cultivation time/h				
		24~48	48~72	72~96	96~120	120~144
Average dry biomass/(g/L)	*	16.75	17.80	18.25	18.45	18.45
	**	13.95	15.80	16.30	16.40	16.45
	*	40.5	34.8	34.2	21.5	12.0
DCA13 increase/(g/L)	**	28.0	26.6	23.5	17.7	15.1
	*	0.101	0.0815	0.0781	0.0486	0.0271
Average qp/(g DCA13·g ⁻¹ dry cell·h ⁻¹)	**	0.0836	0.0701	0.0601	0.0450	0.0382

* Added acetate ; ** Without acetate

2.4 高混合效果和低溶解氧发酵过程控制

对水—气—油—菌体四相体系发酵而言 ,烷烃的分散程度是影响产酸水平的重要因素 ,增强发酵液整体混合效果是提高二元羧酸发酵水平的关键。提高搅拌转速和改进搅拌器结构参数是增强混合效果的有效措施。图 4 和图 5 分别是搅拌转速和搅拌器结构参数 S/D 对产酸的影响 (S 和 D 分别为搅拌桨间距和直径) 。产酸 96h ,搅拌转速由 600r/min 分别提高至 700r/min 和 1000r/min ,产酸量由 98g/L 分别提高到 112g/L 和 118g/L ,但后者产酸速率明显下降 ,考虑到高速搅拌对细胞剪切作用造成后期产酸乏力的不良影

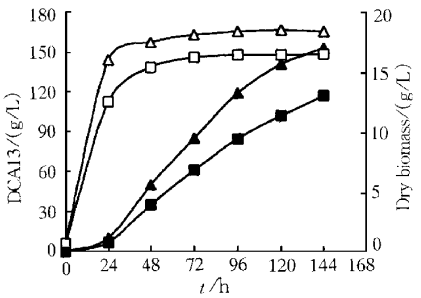


图3 醋酸盐对 DCA13 产酸量的影响

Fig.3 Effect of acetate on DCA13 yield

- ▲ DCA13 , added acetate ;
- DCA13 , without acetate ;
- △ Dry Biomass , added acetate ;
- Dry Biomass , without acetate.

响,700r/min 较为适宜 ;S/D 对产酸有明显影响 ,S/D = 1.68 较为适宜 ,产酸较高 ,达到 136.4g/L。

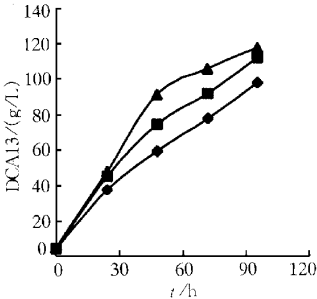


图 4 搅拌转速对产酸的影响

Fig. 4 Effects of the agitation on DCA13 yield

◆ 600r/min ;■ 700r/min ;▲ 1000r/min.

在 S/D 为 1.68、通气量 0.8vvm、搅拌转速 700r/min 和罐压 0.01MPa 条件下 ,产酸期溶解氧 (DO)值低于 5% 连续发酵 5 批次 ,总培养时间 138h 产酸量稳定在 141g/L~148g/L ,证明采用提高搅拌混合效果和低溶解氧发酵过程控制是稳定和 提高二元羧酸产量的有效方法。

应用上述发酵技术 ,在 20m³ 发酵罐中发酵生产十三碳二元羧酸 ,总培养时间 144h ,产酸量达 172g/L ,放罐体积 15.0m³ ,产量为 2.25t ,发酵过程曲线见图 6。

当产酸达到 150g/L 时溶解氧开始明显下降 ,产酸速率也随之下 降 ,说明发酵液粘度明显增加 ,此时取样发现底部有许多固体颗粒出现 ,室温放置 3h 后完全固化 ,证明此时罐内发酵液中十三碳二元羧酸钠盐已达到饱和状态。培养 140h 后继续延长发酵时间追求提高放罐时产酸量是不经济的 ,在正常生产中培养时间应控制在 120h 以内较为经济。

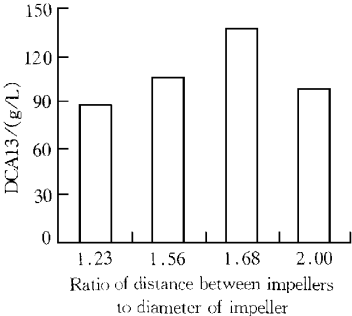


图 5 搅拌桨结构参数 S/D 对产酸的影响

Fig. 5 Effect of S/D on yield

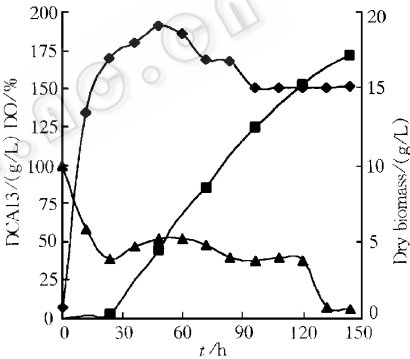


图 6 在 20m³ 发酵罐中生产 DCA13

Fig. 6 Fermentation for DCA13 in 20m³

stirred tank

■ DCA13 ;▲ DO ;◆ Biomass.

参 考 文 献

[1] 植村 南海男 . 石油微生物发酵 ,1985 ,33(5) :436~441.

[2] 沈永强 楼纯菊 徐可仁 ,等 . 植物生理学报 ,1979 ,5(2) :161~170.

[3] 沈永强 楼纯菊 徐可仁 ,等 . 植物生理学报 ,1979 ,5(4) :385~393.

[4] 易祖华 余志华 . 微生物学报 ,1988 ,28(3) :265~269.

[5] 焦瑞身 沈永强 楼纯菊 ,等 . 植物生理学报 ,1982 ,7(2) :175~183.

[6] 高忠翔 刘祖同 . 清华大学学报 ,1990 ,30(3) :86~92.

[7] 陈远童 郝秀珍 . 生物工程学报 ,1989 ,5(3) :241~245.

[8] Liu Shuchen , Li Shulan , Tong Mingyou . Proceedings of APBIOCHEC '97 , Beijing ,1997 ,388~390.

[9] 刘树臣 李淑兰 . 第八届全国生物化学与分子生物学学术会议论文集 . 北京 :化学工业出版社 ,1998 ,289~291.

http://journals. im. ac. cn

STUDY ON FERMENTATION OF 1 ,13-TRIDECANEDIOIC ACID
BY *CANDIDA TROPICALIS* *

Liu Shuchen Li Shulan Fang Xiangchen

(Fushun Research Institute of Petroleum and Petro-chemicals , Fushun 113001)

Abstract : A mutant of *Candida tropicalis* SP-1 , SP-UV-56 , which can produce 1 ,13-tridecanedioic acid or 1 ,11-dicarboxylic acid (DCA13) 1.25 times as much as its parental strain SP-1 , but hardly assimilates nalkane as carbon source for its growth , was obtained by ultra-violet treatments. A fermentation technology with a supplement of acetate at the latter middle of logarithmic growth was developed. Using sucrose as carbon source for its growth and supplying acetate the yield of DCA13 reached 153g/L for 144h incubation in a 13.7L auto-controlled stirred tank , about 29.7% higher than that obtained in the broth without acetate. An effective technique that can maintain higher yield was provided by enhancing mixing of broth and controlling low DO level. With these techniques the DCA13 yield reached 172g/L in a 20m³ stirred tank , and produced 2.25 tons DCA13 in 15.0m³ broth.

Key words : *Candida tropicalis* , 1 ,13-tridecanedioic acid , n-tridecane , Fermentation

* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96 - C03 - 03 - 04)

※ ※ ※ ※ 会 讯 ※ ※ ※ ※

由中国微生物学会主办的“ 迎接 21 世纪微生物学研讨会 ”定于 2000 年 7 月下旬在山东省烟台市召开。会议期间将邀请数名专家进行微生物多样性、现代战争中反细菌战的问题、微生物分子生物学研究进展、细菌基因组学、工业微生物学新能源、微生物与环境保护等方面的专题报告 , 并进行学术交流。

会议具体事项请与中国微生物学会办公室薛春华同志联系(电话 010 - 62554677)