

十二碳二元酸发酵研究

刘树臣 李淑兰 金 平 方向晨

(抚顺石油化工研究院 抚顺 113001)

关键词 : *Candida tropicalis* , 十二碳二元酸 , 发酵

中图分类号 : Q815 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-6209 (2002) 06-0748-03

长链二元酸 (long-chain dicarboxylic acid , DCA) 是指 C_{10} 以上的脂肪族二元羧酸。它们是一类重要的精细化工原料 , 广泛用于大环麝香、工程塑料、耐寒增塑剂、尼龙纤维、热熔胶以及液晶的合成 , 也是医药和农药合成的原料。其中十二碳二元酸 (DCA12) 市场需求量较大 , 主要用于合成高级工程塑料尼龙 1212、服装用尼龙热熔胶和高级涂料等 , 目前由化学法和发酵法生产。由于发酵法其原料来源容易、生产条件温和、产品纯度高等特点 , 深受重视。国内外对发酵法制取 DCA12 的研究较为深入^[1~6] , 1998 年我国已实现了工业化生产^[7]。热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 突变株 SP-UV-56 是一株高产十三碳二元酸 (DCA13) 生产菌^[8] , 已用于工业发酵生产 DCA13。现报道该突变株在 10L 罐发酵生产 DCA12 的结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 突变株 SP-UV-56 为抚顺石油化工研究院保藏。

1.2 原料

正十二烷 ($n-C_{12}$) 纯度 98.5%。

1.3 培养基

斜面培养基、种子培养基和发酵培养基同文献 [8]。

1.4 培养方法

将 30℃ 培养 2d 的斜面菌种分别接入含 560mL 种子培养基的 3 000mL 摇瓶内 , 于 180r/min、30℃ 摇床培养 2d , 再将种子液接入含发酵培养基的 10L Braun BIOTAF E 发酵罐内 , 于 700r/min 搅拌 , 通气量 1vvm 条件下培养。整个发酵过程分为生长期和产酸期 , 生长期 pH5.0 ~ 6.5 , 以菌体增殖为主。菌体浓度达到 12g/L 后 , 用 10mol/L NaOH 溶液调节 pH 值高于 7.0 , 转入产酸期 , 并补加 $n-C_{12}$ 15 000mL , 以后每隔 24h 补加 $n-C_{12}$ 500mL , 共 3 次。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体浓度测定 : 取 1mL 发酵液 , 用溶媒 (乙醇 : 正丁醇 : 氯仿 : 水 = 10 : 10 : 1 : 10) 稀释 10 ~ 50 倍 , 用分光光度计测定 620nm 处的光密度 (OD_{620}) , 由标准曲线计算干细胞浓度。

1.5.2 DCA12 浓度的测定 : 见文献 [8]。

1.5.3 溶解氧的测量 : 用溶解氧电极检测 , 于接种前设定为 100%。

作者简介 : 刘树臣 (1962 -) , 男 , 吉林省白城市人 , 研究室副主任 , 高级工程师 , 现为清华大学博士研究生 , 主要从事石油发酵研究 , e-mail : liushuchen00@mails.tsinghua.edu.cn

收稿日期 : 2001-12-20 , 修回日期 : 2002-03-22

2 结果和讨论

2.1 菌体浓度对产酸的影响

从微生物发酵产物生成动力学角度分析 ,产物生成速度与菌体浓度变化速率以及菌体浓度呈正比例变化 ,然而 ,当菌体浓度过高时可能由于供氧不足等因素导致菌体产酸能力下降。为此 ,本文考察了菌体浓度对产酸的影响 ,六批发酵结果表明 :菌体浓度(C_x)在 17.80g/L ~ 20.36g/L 之间的平均产酸量为 146.0g/L ,而 C_x 在 15.35g/L ~ 16.16g/L 时的平均产酸量为 155.0g/L ,较前者平均产酸量增长了 6.0% ,这说明低菌浓发酵时单位质量菌体的产酸能力或比产酸速率(q_p)有所提高 ,可能与保持一定的供氧水平有关。为此 ,本文分析了在发酵过程中的 C_x 与溶解氧(DO)、 C_p 和 q_p 的关系 ,结果见表 1。当培养基中含有诱导烃 nC_{12} 时菌体生长较为缓慢 ,培养 96h 达到最大值 ,而以 nC_{13} 为诱导烃时培养 48h 达到最大值^[8] ,说明本实验菌株对长链二元酸发酵呈现基质特异性。菌体停止生长后 ,由于流动 NaOH 溶液及烷烃导致了发酵后期的 C_x 的下降。当 C_x 在 18g/L ~ 20g/L 时 , DO 水平在 1.3% ~ 25.4% ,培养 144h 的 C_p 为 142.0g/L ,而 C_x 在 15g/L ~ 17g/L 时 , DO 水平则在 7.7% ~ 30.8% , C_p 则为 154.8g/L ,这表明发酵液的低 DO 水平与 C_x 增加有关 ,还与发酵液粘度的增大有关 ,因为在发酵后期发酵液呈粘稠状液体或膏状液体。另外 ,与同期发酵相比 ,低菌浓发酵的 q_p 高于高菌浓发酵的 q_p ,平均提高了 17.8% ,说明低菌浓发酵时对提高单位质量菌体的产酸能力有利。可见 ,合理控制 C_x 及保证供氧可以有效地提高菌体产酸能力 ,在本实验的通气量和搅拌转速条件下 ,产酸的适宜 C_x 为 15g/L ~ 17g/L。

表 1 菌体浓度与溶解氧、产酸量及比产酸速率的关系

批次		培养时间/h						
		0	24	48	72	96	120	144
2	DO/%	100	37.5	29.1	25.4	10.0	1.5	1.3
	$C_x/(g/L)$	1.26	10.10	13.70	18.26	20.25	18.68	18.59
	$C_p/(g/L)$		4.8	26.3	56.1	97.6	120.6	142.0
	$q_p/(g_{DCA12} \cdot g_{cell}^{-1} \cdot h^{-1})$			0.075	0.078	0.090	0.049	0.048
6	DO/%	100	43.0	33.3	30.8	25.6	7.9	7.7
	$C_x/(g/L)$	0.95	9.5	13.50	16.91	17.09	15.70	15.35
	$C_p/(g/L)$		5.3	31.1	60.8	102.8	131.0	154.8
	$q_p/(g_{DCA12} \cdot g_{cell}^{-1} \cdot h^{-1})$			0.093	0.081	0.103	0.072	0.062

2.2 pH 控制方式对产酸的影响

在长链二元酸发酵中 ,pH 对细胞分泌二元酸以及产物溶解性影响较突出 ,pH 过低或过高都不利于产酸^[6]。为此 ,提出了在产酸期间采用逐步上调 pH 的控制策略 ,以加碱速率变化作为上调 pH 的判断依据 ,考察了产酸期 pH 控制方式对产酸的影响 ,发酵两批次 ,144h , C_p 分别为 165.0g/L 和 166.0 g/L , C_x 分别为 15.68g/L 和 14.76g/L ,发酵过程见图 1。生长期菌体几乎不分泌 DCA12 , C_p 仅为 4.5g/L ,转入产酸期后采用逐步上调 pH 控制方式 ,发酵液中迅速积累 DCA12 ,pH 控制范围为 7.4 ~ 8.4 ,发酵 144h 时 C_p 达到 166.0g/L ,此时发酵液为粘稠的膏状液体 ,证明热带假丝酵母突变株 SP-UV-56 也是一株高产 DCA12 的生产菌。由于在发酵后期发酵液粘度较大 ,培养 132h 后 DO 值下降至 20% 以下 ,发酵结束时仅为 15%。从图 1 中还可以看出 ,培养 72h 时 C_x 和 q_p 同时达到最大值 ,分别为 17.9g/L 和 $0.107g/(g_{cell} \cdot h)^{-1}$,48h ~ 96h 为产酸高峰期 , q_p 在 $0.076g/(g_{cell} \cdot h)^{-1}$ 以上。另外 , q_p 随着菌体的增殖而增加 ,而在菌体停止生长后则下降 ,说明繁殖中的菌体的产酸能力很强。因此 ,如果在产酸期始终保持较低的菌体比生长速率 ,能更有效地提高产酸水平。

2.3 溶解氧与产酸量的关系

发酵液中的 DO 水平与 C_p 的关系见图 2。在产酸期, 批次 a 的 DO 水平在 20% ~ 30% 培养 144h 时 C_p 达到 163.8g/L, 批次 c 的 DO 水平在 20% ~ 50%, C_p 为 150.0g/L, 而批次 b 在发酵 96h 以后 DO 水平呈下降趋势, C_p 为 154.8g/L。统计数据表明 DO 水平在 15% 以上的平均产酸量为 161.2g/L。而 DO 水平在 10% 以下的平均产酸量则为 148.2g/L。对于本实验菌株发酵 DCA12 适宜的 DO 水平在 20% ~ 30% 控制过高的 DO 水平对提高产酸水平作用不明显。

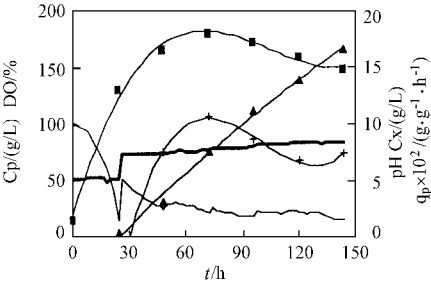


图 1 pH 控制方式对产酸的影响
▲ C_p ; —DO 值; —pH; ■ C_x ; × q_p .

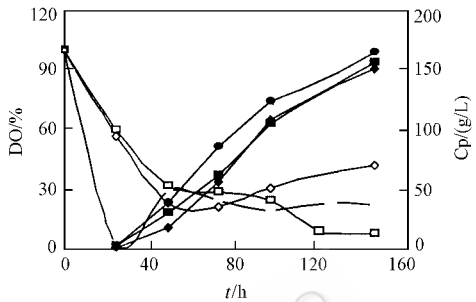


图 2 溶解氧与产酸量的关系
批次 a ○DO 值, ● C_p , 批次 b □DO 值, ■ C_p ;
批次 c ◇DO 值, ◆ C_p .

参 考 文 献

[1] Uemura N. *Hakko to Kogyo*, 1985 **43** (3) :436 ~ 441.
[2] Shiio I, Uchio R. *Agr Biol Chem*, 1971 **35** (13) :2033 ~ 2042.
[3] Uchio R, Shiio I. *Agr Biol Chem*, 1972 **36** (3) :426 ~ 433.
[4] 陈远童, 郝秀玲, 庞月川. *生物工程学报*, 1987 **3** (4) :307 ~ 308.
[5] 高忠翔, 刘祖同. *清华大学学报(自然科学版)*, 1990 **30** (3) :86 ~ 92.
[6] 任 刚, 陈远童. *微生物学报*, 2000 **40** (2) :214 ~ 216.
[7] 陈远童. *微生物学通报*, 1998 **25** (4) :244.
[8] 刘树臣, 李淑兰, 方向晨. *微生物学报*, 2000 **40** (3) :318 ~ 322.

Study on Fermentation of 1, 12-Dodecanedioic Acid

Liu Shuchen Li Shulan Jin Ping Fang Xiangchen

(Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, Fushun 113001, China)

Abstract : The effects of fermentative conditions such as control mode of pH, concentration of cells and dissolved oxygen on fermentation of 1, 12-dodecanedioic acid from n-dodecane by a mutant, *Candida tropicalis* SP-UV-56, were studied. Suitable concentration of cells is 15g/L ~ 17g/L, dissolved oxygen level is preferably kept at 20% ~ 30%. The control mode of pH by gradually going up adjusted with NaOH solution was suggested while pH range is 7.4 ~ 8.4. Under the optimal conditions the DCA12 yield of 166g/L was obtained after 144h cultivation. This shows that the mutant is a high-yield strain for 1, 12-dodecanedioic acid production.

Key words : *Candida tropicalis*, 1, 12-Dodecanedioic acid, Fermentation