

解脂假丝酵母利用正癸烷产生癸二酸的研究

中国科学院林业土壤研究所

沈阳市有机化工厂

(沈 阳)

我们从石油酵母和细菌中,以及采自不同地区的油浸土、植物的花和果实中,经过了广泛筛选,得到能利用正癸烷产生癸二酸的优良菌株酵母 19-2。经鉴定为解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*)。

初步研究了该菌在摇瓶发酵中产生癸二酸的条件,在正癸烷、尿素、磷酸二氢钾、玉米浆和醋酸钠组成的培养基上,可以氧化正癸烷而产生癸二酸。发酵 96 小时左右,投油比 10% (V/V),发酵液中癸二酸含量为 32—40 克/升,对正癸烷收率为 43—55%。

在发酵培养中,用醋酸钠作碳源,菌生长良好。正癸烷不作唯一生长碳源,只由菌体酶催化转化为癸二酸。产酸的最适氮源是尿素,玉米浆对产癸二酸较为有利。在普通 300 毫升三角瓶中,装液量对产癸二酸影响很大。在带有挡板三角瓶中,装量对产癸二酸亦有关系。此外,种子种龄、种子生长的最终 pH、接种量对产癸二酸亦有很大影响。

并做了 500 升罐的扩大试验,产酸稳定,重现性良好。

癸二酸 (DC_{10}) 是一种重要的有机化工原料,在化工方面有较为广泛的用途。它是制造癸二酸二丁酯、癸二酸二辛酯塑料助剂和尼龙 1010、610 的主要原料。此外,也是橡胶软化剂、润滑油添加剂、香料、聚酰胺、醇酸树脂、合成润滑油及涂料等的原料。目前,国内工业生产癸二酸,都是以蓖麻油为主要原料,经过化学裂解制得。由于原料来源于农业油料作物,在扩大生产方面受到了一定限制,远远不能满足生产需要,因而开辟新的原料来源,便显得十分必要了。

从广泛开发利用我国石油烃类的角度出发,结合当前的实际需要,我们开展了石油发酵制取癸二酸的研究,发展微生物的烃类氧化制取长碳链二羧酸的工作。通过利用正癸烷发酵生产癸二酸,为国家提供

社会主义建设急需的化工原料。

本文报道解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*), 即 19-2 菌株 (以下简称 C_{19-2}) 筛选、鉴定, C_{19-2} 变异株摇瓶发酵试验和扩大试验的规律和条件,以及对癸二酸产品的分析鉴定结果。

菌 种 筛 选

使用我所保藏的石油酵母和石油细菌作为筛选的菌源,同时从各油田、炼油厂附近的油浸土、油泥中,以及植物的花和果实采集样品,进行分离筛选。经过广泛筛选发现,能产生癸二酸的主要是酵母。我们又对酵母属重点进行筛选。最后在以正癸烷为原料的发酵比较试验中,选出了 8 株

本文于 1977 年 12 月 10 日收到。

能产癸二酸的酵母。通过纸层析、红外吸收光谱、酸值、熔点等测试结果表明,酵母 19-2 (C_{19-2}) 菌株产酸质地较纯。故对该菌进行了鉴定及发酵条件试验。

C_{19-2} 菌株的鉴定

经鉴定, C_{19-2} 菌株的形态及生理生化特征如下:

形态特征 细胞呈长卵形或呈卵圆形,大小为 $2.5-5 \times 7-20$ 微米,在麦芽汁琼脂平板上, 28°C 下,培养 3 天,菌落呈圆形,直径 1—4 毫米,边缘绒毛状,表面乳头状,背面圆形,色泽为极浅黄色。菌苔性状,边缘不整齐,呈绒毛状,表面辐射状,质地胶粘,颜色呈蜡黄色。

生理生化特征 见表 1。

表 1 C_{19-2} 菌株的主要特征

项 目	膜	菌 丝	子囊孢子	糖发酵	糖同化 (葡萄糖)	脂肪裂解	硝酸盐利用	需要维生素 B_1	牛奶冻化	醇同化 赤鲜醇	甘露醇	微菌利用
试验结果	+	有真菌丝发达。	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

根据上述结果, C_{19-2} 菌株具有较发达的假菌丝,不产生子囊孢子,利用葡萄糖,赤鲜醇,不利用硝酸盐,需要维生素 B_1 ,冻化牛奶,分解油脂,对熊果苷分解弱等特征,按 Lodder 氏分类系统,可定为解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*)。

C_{19-2} 变异菌株的摇瓶发酵试验

一、材料和方法

(一) 菌种

解脂假丝酵母 C_{19-2} 的变异菌株。培养在麦

芽汁 (8° 波美) 斜面上。

(二) 原料

正癸烷 (*n*-Decane), 系沈阳市化工研究所提供。含正癸烷 97%, *n*- C_9 , *n*- C_{11} 无或微量, 芳烃 0.2%, 折光率 (n_D^{20}) 1.411—1.413。

(三) 培养基

培养基成分见表 2。将培养基灭菌 (0.7 公斤/厘米²) 15 分钟。

表 2 培养基成分

成分	种 子		发 酵		
	1	2	A	B	C
NaAc 无水	4.0	6.5	4.5	8.0	9.0
NH_4Ac	3.5		3.5		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.03		0.03		
尿素		0.6			0.6
KH_2PO_4	2.5	1.0	2.5	2.5	0.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5				
玉米浆*	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0
正癸烷*	2.0	2.0	10.0	10.0	10.0
pH	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4

注: 1. 所用药品除 NH_4Ac 为试剂 III 级品外, 皆为工业品。

2. * 号者系按体积 (ml) 计算。

(四) 培养方法

1. 斜面 28°C , 2 天。

2. 摇瓶种子 300 毫升挡板三角瓶装 40 毫升种子培养基, $28-30^\circ\text{C}$, 于旋转式摇床 (转数 120 次/分钟, 偏心距 2.5 厘米) 振荡培养 30—36 小时, 种子培养基最终 pH 8.0。

3. 摇瓶发酵 300 毫升挡板三角瓶装 35 毫升发酵培养基, 接种量 5% (V/V), 于上述摇床培养 4—5 天。发酵结束后, 测定产酸量。

(五) 菌体量的测定

取 1 毫升发酵液过滤, 用水洗涤菌体。洗涤过的菌体, 于 105°C 烘干后, 称重。

(六) 癸二酸的提取和测定方法

发酵结束后, 将发酵液过滤, 加热滤液。在沸腾中, 搅拌下加入 10% H_2SO_4 , 酸化到 pH 为 2—3, 继续搅拌, 得白色粉末状结晶形物, 冷却, 过滤, 冷水洗涤至不带 SO_4^{2-} 根, 烘干后称重。用重量法测

定酸的收量。

二、结 果

(一) 碳源浓度与产酸关系

在培养液中,除正癸烷外,我们试图以别的碳源供给菌体生长利用,而对于加入的正癸烷则希望其经过菌酶催化氧化,积累癸二酸于发酵液中。为此,我们采用含醋酸盐的培养液进行发酵试验。经反复试验表明,此菌株能利用醋酸盐作为其生长所需的碳源,菌体生长良好,并得到增加酸量的良好结果。无水醋酸钠的浓度,以 12 克/330 毫升为宜(表 3)。

表 3 不同醋酸钠浓度对产酸影响

测定项目 醋酸钠浓度 (克/330 毫升)	发酵终了(pH)	酸量(毫克/25 毫升发酵液)
8	6.0	638.0
10	6.0	760.5
12	6.0	839.2
14	7.5	807.9

注: 种子培养基 2, 发酵培养基 C。

(二) 氮源浓度对产酸的影响

对氮源的量级,找出既适宜于繁殖菌体,而又有利于储积癸二酸的用量。尿素浓度以 0.6 克/330 毫升为宜(表 4)。

表 4 氮源浓度对产酸的影响

测定项目 尿素浓度 (克/330 毫升)	酸 量 癸 二 酸 (毫克/25 毫升发酵液)
0.3	658.3
0.6	731.9
1.0	683.6

注: 种子培养基 2, 发酵培养基 C。

(三) 磷酸二氢钾浓度对产酸的影响

在二元酸的发酵培养中,很强调两种磷酸盐成对应用时的良好缓冲作用效果;

用量也比较高。我们用单一的磷酸盐,考察其浓度变化与产酸的关系。试验表明, KH_2PO_4 可满足菌体对磷的需要,并对产酸有促进作用。其浓度以 330 毫升中含 0.6—1.5 克为宜。

表 5 磷酸二氢钾的不同浓度与产酸关系

磷酸二氢钾浓度 (克/330 毫升)	发酵终了 (pH)	酸量(毫克/25 毫升发酵液)
0.3	5.5	647.4
0.6	5.5	655.1
1.5	5.5	697.9
2.0	5.5	610.1

注: 种子培养基 2, 发酵培养基 C。

(四) 玉米浆的增量试验

玉米浆含有有机氮、维生素、生物素等多种有效成分,给癸二酸发酵带来有益作用。不仅能促进菌体生长繁殖,而且有利于提高产酸量。我们对其基础用量(1%,按体积计)的上限范围作了探讨。随着玉米浆用量的增加,产酸量有所增加,助降发酵液 pH 较为有利,但发酵泡沫有所增大,以取 3 毫升、4 毫升/330 毫升为宜。

表 6 玉米浆的增量试验

瓶 号	酸 量		癸二酸(毫克/25 毫升发酵液)		
	增量 (毫升/330 毫升)		对 照		
			3	4	5
1			821.6	848.2	880.8
2			825.1	842.4	881.4
平均			823.3	845.3	881.1

注: 种子培养基 2, 发酵培养基 c。

(五) 通气量与产酸关系

不同装液量的产酸试验表明,在深层发酵过程中,其油层始终漂于液面。在带有四只挡板的三角瓶中,由于挡板的作用,促进了油、水两相的充分分散混合,因而,挡板三角瓶较之普通三角瓶产酸量高。而在挡板三角瓶中装液量的变化亦有所差别。

表7 通气量对变异菌产癸二酸的影响

摇瓶型号	装液量 (毫升)	酸量(毫克/25 毫升发酵液)	
		90小时	114小时
普通三角瓶 (300毫升)	30	304.0	393.3
挡板三角瓶 (300毫升)	30	578.1	565.9
	50	499.8	440.3

注: 种子培养基 1, 发酵培养基 A。

(六) 产酸最适 pH 试验

正癸烷氧化时,在微碱性溶液中,易于形成癸二酸钠盐,积累于发酵液中,提高酸收率。试验在发酵液的 pH 从碱性峰(pH8 以上)改变到 6.7—7.0 时,用 2N NaOH 调节到各个试验量级,用以检试产酸的最适 pH 范围。结果表明,产酸最适 pH 范围在 7.2—7.7 之间。

表8 产酸最适 pH 试验

处理(改变 pH后的 pH)	酸量(毫克/25 毫升发酵液)				
瓶 号	对照	7.2	7.5	7.7	8.0
1	750.8	909.5	856.0	901.2	829.8
2	732.5	842.0	851.0	871.9	785.7
平均	741.6	875.7	853.5	886.5	807.7

注: 种子培养基 2, 发酵培养基 C。

(七) 种子对产酸的影响

通过菌种的斜面培养时间、种子种龄、接种量大小的试验表明,菌种斜面培养时间,宜用 48 小时。种子种龄 30—36 小时,种子液的最终 pH 显示在 8.0 以上的程度。接种量宜用 5%。

(八) 发酵过程

C₁₉₋₂ 变异菌在发酵培养基 A 中的生长, pH 变化和产癸二酸情况,如图 1 所示。整个发酵过程包括下述四个阶段:

1. 24 小时之前,产酸极微,细胞萌发比较迅速,培养液由开始 pH6.4 急剧升高到 8.0。

2. 发酵进入 50—75 小时之间,菌体大

量生长繁殖,呈直线增长。pH 由 8.0 以上,下降到 7.0。

3. 产癸二酸高峰在 100 小时左右,此时菌量下降, pH 继续下降到 7.0 以下。

4. 100 小时以后,产酸量有所下降, pH 的变化不显著,菌量下降。

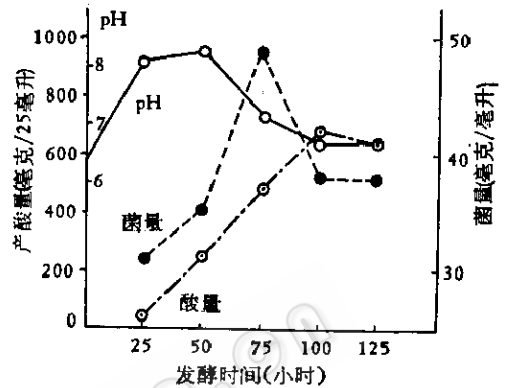


图1 C₁₉₋₂ 变异菌发酵过程

注: 发酵培养基 A, 应用的配比组成: NaAc 6.5 克; NH₄Ac 3.5 克; KH₂PO₄ 2.5 克; 酵母膏 0.15 克; 玉米浆 1 毫升; 自来水 330 毫升; 正癸烷 10% (V/V); pH 6.4; 50 毫升发酵液加吐温 80 1 滴。

(九) 综合试验

综合选出的适宜条件进行的试验,见表 9。

培养基和培养条件

种子培养基: 无水醋酸钠 6.5 克; 磷酸二氢钾 1 克; 尿素 0.6 克; 玉米浆 1 毫升; 自来水 330 毫升; pH6.4。

发酵培养基: 无水醋酸钠 12 克; 磷酸二氢钾 0.6 克; 尿素 0.6 克; 玉米浆 3 毫升; 自来水 330 毫升; pH6.4。

装液量: 35 毫升/300 毫升挡板三角瓶,加吐温 80 1 滴。

培养温度: 29℃。

种子种龄和接种量: 30 小时,种子液最终 pH8.0 以上,接种量 5%。

通过综合条件摇瓶发酵试验,产酸量稳定,获得癸二酸量最高达 40 克/升,对正癸烷收率为 55%。

表 9 摇瓶综合条件发酵试验结果

试验组别 测定项目 培养时间 (小时)	1			2		
	pH	菌体干重 (克/毫升)	酸 量 (毫克/25毫升) 发 酵 液	pH	菌体干重 (克/毫升)	酸 量 (毫克/25毫升) 发 酵 液
0	6.4			6.4		
12	7.0			7.0	0.0338	
24	8.0	0.0284	4.1	8.0	0.0404	9.3
36	8.2	0.0393	115.5	8.2	0.0417	224.8
48	9.0	0.0550	239.1	9.0	0.0575	361.8
60	7.5	0.0558	452.7	7.7	0.0563	513.3
72	7.2	0.0685	516.3	7.5	0.0702	585.4
84	5.5	0.0631	735.9	7.0	0.0668	908.1
96	5.0	0.0660	861.0	5.4	0.0669	1048.0
108	5.0	0.0650	726.3	5.0	0.0765	819.7
120	5.0	0.0509	793.5	5.0	0.0510	825.5

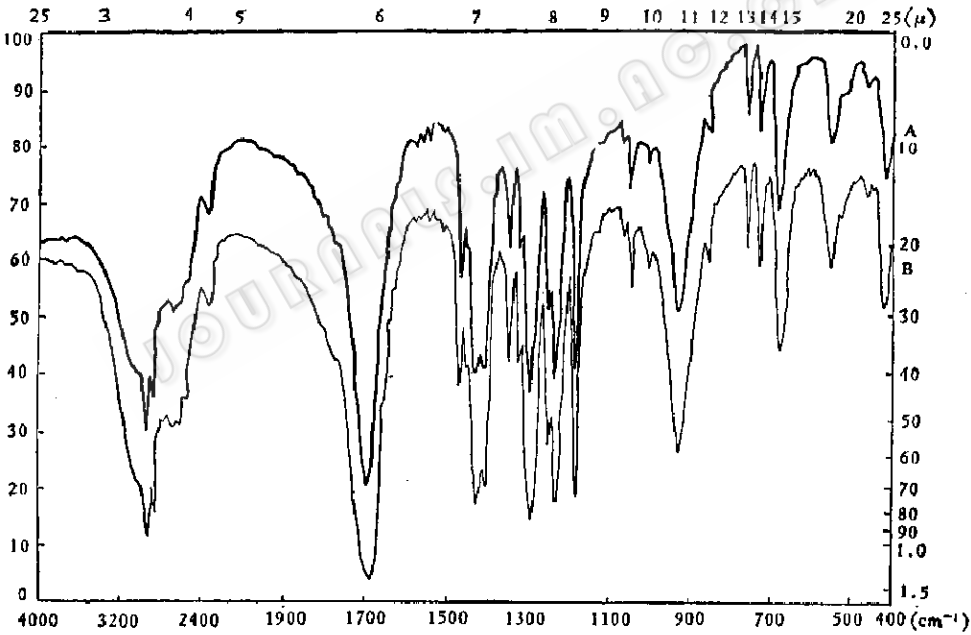


图 2 癸二酸红外吸收光谱
A: 标准癸二酸; B: 发酵样品。

表 10 癸二酸的分析结果

样 品 指标名称 (一级品)	由蓖麻油制得的癸二酸 (沈阳市有机化工厂产)	发酵法制得的癸二酸	
		沈阳市有机化工厂分析结果	黑龙江省尼龙厂分析结果
酸值(毫克 KOH/克)	≥550	550.7	555.6
熔 点 (°C)	129—133	129—132	132—134
灰 分	≤0.2	0.14.	
外观颜色 (甲基橙)	<2	1	合 格

(十) 发酵成品分析

对癸二酸样品做了红外光谱分析, 并对其酸值、熔点等项进行了分析鉴定, 其主要指标均符合企业标准。分析测定结果列于表 10, 图 2。

发酵样品的吸收峰和标准样品相符。

500 升罐扩大试验

根据摇瓶试验中得到的适宜发酵条件, 在 500 升发酵罐中进行扩大试验, 发酵四天, 投油比 10%(V/V) 发酵液中癸二酸含量为 30 克/升, 对正癸烷收率为 40% 左右。其结果见表 11。

表 11 500 升罐发酵试验结果

罐号	批次	投料日期 年、月、日	总投油 (升)	发酵周期 (小时)	发酵终了 pH	产酸量 (克/升)	对正癸烷收率 (%)	发酵最终容积 (升)
10	1	77.8. 6	22	90	6.2	34.0	44.6	210
	2	8.10	22	90	5.8	33.0	44.3	210
	3	8.18	22	98	6.4	30.4	41.8	220
	4	8.24	22	94	6.2	30.4	41.8	220
	5	8.30	22	90	5.8	30.0	41.2	220
	6	9. 3	22	94	6.7	34.8	47.8	220
11	7	8.10	22	90	7.2	30.4	41.8	220
	8	8.15	22	94	5.8	26.4	37.9	230
	9	8.20	22	94	5.7	28.8	38.6	220
	10	8.26	22	90	5.8	28.8	38.6	220
	11	9. 6	22	94	5.6	28.3	40.6	230
平均						30.4	41.7	

注: 种子培养基: 无水 NaAc6.5 克; KH_2PO_4 1 克; 玉米浆 1 毫升; 尿素 0.6 克; 自来水 330 毫升; pH6.2—6.4; 正癸烷 5%(V/V)。

发酵培养基: 无水 NaAc7200 克; KH_2PO_4 360 克; 尿素 360 克; 玉米浆 2400 毫升; 自来水 200 升; pH6.2—6.4; 正癸烷 10%(V/V)。

发酵条件: 一级种子: 摇床培养 24 小时。

二级种子: 50 升罐, 风量 1:2, 搅拌 320 转/分, 接种量 5%, 温度 28—30℃ 培养 30 小时。

发酵培养: 通风量 1:0.5, 搅拌转数 280 转/分, 接种量 10%, 温度 28—30℃。

讨 论

1. 由沈阳市化工研究所从石油馏分中提取的正癸烷, 是 C_{19-2} 变异菌发酵制取癸二酸的优良原料油。所得癸二酸产品较纯, 产品的质量与由蓖麻油生产的癸二酸一致, 符合企业规定标准。

2. C_{19-2} 变异菌是一支比较优良的癸二酸产生菌, 对正癸烷的氧化能力较强, 对营养要求并不苛刻, 培养简单, 易于管理。

3. 经过较为详细的探讨, 在癸二酸发

酵研究中, 共提出两个种子液, 三组发酵培养基。实践证明, 均获得良好产酸结果, 并具有产酸潜力。以尿素为氮源的培养基, 适于 C_{19-2} 变异菌的生长繁殖, 易于氧化正癸烷, 积蓄癸二酸, 是一个较优良的产癸二酸培养基。产酸量稳定, 最高达 40 克/升, 对正癸烷收率为 55%,

4. 在 500 升罐连续试验中, 得到产酸量稳定在 30 克/升, 对正癸烷收率稳定在 40% 左右的试验结果。试验的重现性良好。

5. 对适当降低醋酸盐, 补充其它的有

机营养源,以及采用碱液调节控制发酵 pH 等试验和如何大幅度地增加癸二酸产量问题,有待进一步工作。

参 考 文 献

- [1] Ogata, K., H. Kaneyuti, N. Kato, et al.: *J. Ferment. Technol.*, Vol. 51, No. 4, 1973.
- [2] 内尾良辅, 椎尾勇: 石油と微生物, No. 11, 1974.

STUDIES ON THE FERMENTATION OF SEBACIC ACID FROM N-DECANE BY *CANDIDA LIPOLYTICA*

Institute of Forestry and Pedology, Academia Sinica
Shenyang Organic Chemical Factory
(Shenyang)

A Strain of yeast which can produce sebacic acid from n-decane was selected out from many microorganisms isolated from the oil soils, flowers, and fruits. It was identified as *Candida lipolytica*.

Fermentation conditions for the shake flask production of sebacic acid by *Candida lipolytica* strain C₁₉₋₁ were investigated. After 96 hr. of fermentation in a medium containing n-decane, sodium acetate, urea, potassium dihydrogen phosphate and corn steep liquor, the yields of

sebacic acid were 32—40 g/l (conversion rate 43—55%).

The suitable nitrogen sources is urea. Corn steep liquor is necessary for acid production. The suitable pH range is between 7.2—7.7. Besides, the rate of aeration, the final pH, and the age and amount of inoculum also have great effects on the production.

Fermentation experiments have been conducted in 500 l fermentor and the acid production was stable.