

长链二羧酸发酵的研究

中国科学院微生物研究所烃代谢组及发酵车间

(北 京)

经过筛选诱变,从热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 1230 得到一株能利用正烷烃产生较多长链二羧酸的突变株 U_{3-2} , 该菌株能利用一系列单一正烷烃 C_{10} — C_{18} ¹⁾ 产生与基质链长相应的二羧酸。摇瓶条件试验表明, 静止细胞单一二羧酸的产量, 除 DC_{10} 及 DC_{11} ²⁾ 以外, 为 4.02—6.46%。用气液色谱鉴定, 粗品二羧酸的纯度为 92—98%。因而 U_{3-2} 是一株很有前途的优良生产菌株。

微生物对正烷烃的代谢, 除普遍认为一端甲基氧化生成醇、醛、一羧酸的端基氧化途径外, 还存在 W-氧化形成二羧酸的途径。关于微生物发酵产生二羧酸, Uchio, R. 及 I. Shio^[1] 已有较系统的综述, 此外, 日本科学家也有一些专利^[2-5], 但得到的多为短链二羧酸, 而且产量很低。只有 Shio, I. 及 R. Uchio^[6] 用阴沟假丝酵母 (*Candida cloucae*) 310 的突变株 MR_{-12} 发酵正十六烷产生 DC_{16} 为 56.2 克/升, 产量较高。

长链二羧酸作为重要的化工原料能广泛应用于耐寒性增塑剂、尼龙工程塑料、尼龙纤维、名贵香料、药材、涂料、耐磨涂层及粘合剂等方面。目前除癸二酸能以蓖麻油酸氧化裂解方法制取外, 碳十一以上的长链二羧酸尚未见到用化学方法大量生产, 从而大大限制了其在国民经济中发挥作用。因此, 用微生物发酵生产长链二羧酸来满足工农医药上的需要是一项迫切而又有意义的研究课题。为此目的, 我们进行了单一正烷烃产生长链二羧酸的研究。

材 料 与 方 法

(一) 菌种

从十五个属及未鉴定菌 702 株酵母菌中筛选

出产二羧酸较多的 1230 号菌。该菌按 Lodder^[7] 分类系统鉴定为热带假丝酵母。经两次 N-甲基-N-亚硝基-N'-硝基胍及一次紫外线诱变得产酸比原菌株高的突变株 U_{3-2} 。(菌种的筛选诱变及鉴定另文发表)。

(二) 烷烃

C_{12} , C_{13} , C_{17} : 纯度为 95%。 C_{10} , C_{11} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{18} : 纯度为 99%。长链混合烷烃组份为: C_{10} 微量, C_{11} 1.0%, C_{12} 7.9%, C_{13} 15.5%, C_{14} 19.9%, C_{15} 19.5%, C_{16} 18.8%, C_{17} 12.2%, C_{18} 5.1%, C_{19} 0.9%。

(三) 培养基

种子培养基与发酵培养基的组份列于表 1, 分装后 8 磅灭菌 30 分钟, 烷烃和尿素分别灭菌, 接种前加入培养基。

(四) 种子培养与发酵

取一支 28℃ 培养 30 小时的麦芽汁琼脂小斜面菌种, 接入培养基 A 中, 28℃, 旋转式摇床 (230 转/分) 培养 18 小时作种子液, 此种子液 3 毫升接入培养基 C 中发酵 96 小时, 每 24 小时用 5 N 氢氧化钠调 pH 至 8.0。

(五) 二羧酸的测定与鉴定

发酵液用 HCl 酸化至 pH 2.0, 乙醚抽提, 除去乙醚后在中性乙醇中以 NaOH 滴定。

本文于 1978 年 7 月 20 日收到。

1) C_n 代表正烷烃。

2) DC_n 代表二羧酸。

表 1 培养基的组份

种子培养基		发酵培养基	
A	B (%)	C (%)	D (%)
10 Brix 麦芽汁	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 2.0 KH ₂ PO ₄ 0.2 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 酵母膏 0.1 玉米浆 0.05 尿素 0.15 自来水 长链混合烷 (或 C ₁₄) 3 用 HCl 调至 pH 5—6	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 0.8 KH ₂ PO ₄ 0.08 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 酵母膏 0.05 玉米浆 0.03 尿素 0.15 自来水 烷烃 10 pH7.0	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 0.8 KH ₂ PO ₄ 0.08 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 自来水 烷烃 10 pH 7.0
40毫升/500毫升三角瓶	20毫升/500毫升三角瓶	20毫升/500毫升三角瓶	15毫升/500毫升三角瓶

发酵产物用甲醇-硫酸酯化法生成二羧酸二甲酯,用 SP2305 型色谱仪分析。操作条件: 检测器: 氢火焰离子化检测器;担体: 上海 101 白色担体 60—80 目;固定液: 5%SE 30;柱温: 170—250℃;进样口温度: 240—300℃;氮气: 28 毫升/分;氢气: 12 毫升/分。

(六) 静止细胞的制备

3 毫升麦芽汁种子液接入培养基 B 中培养 48 小时,4000 转/分离心 10 分钟收集细胞,用无菌水洗涤细胞两次,由 360 毫升培养液得到的细胞悬浮液在 15 毫升无菌水中制成悬浮种子液,稀释 500 倍,用 72 型分光光度计在波长 520 毫微米、光程 1 厘米测光密度为 0.330。

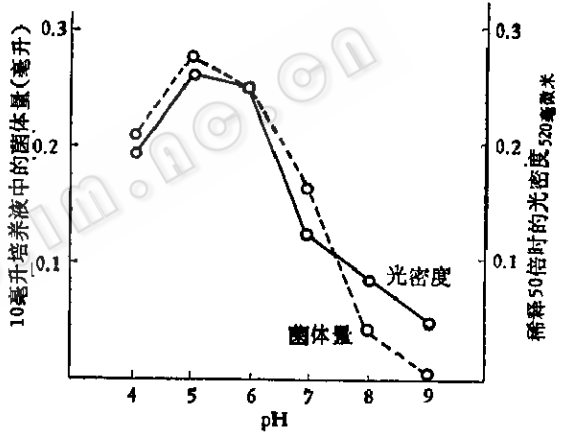


图 1 pH 对菌体生长的影响
——光密度;菌体量

实验结果

一、U₃₋₂₁ 菌株的摇瓶产酸条件

(一) pH 对种子生长的影响

0.5 M 的 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液培养基 (MgSO₄·7H₂O、酵母膏、玉米浆和尿素的含量同培养基 B), pH 分别为 4—9, 20 毫升分装于 500 毫升三角瓶中,接入种子 0.2 毫升,正十六烷 0.6 毫升,28℃ 摇动培养 48 小时。取 10 毫升发酵液,用盐酸调 pH 至 5—6,4000 转/分离心 20 分钟,测菌量(毫升)与光密度,见图 1。实验表明

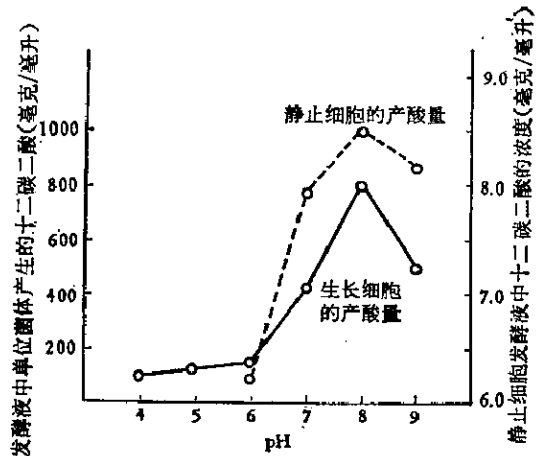


图 2 正十二烷发酵时 pH 对产酸的影响
——生长细胞的产酸量静止细胞的产酸量

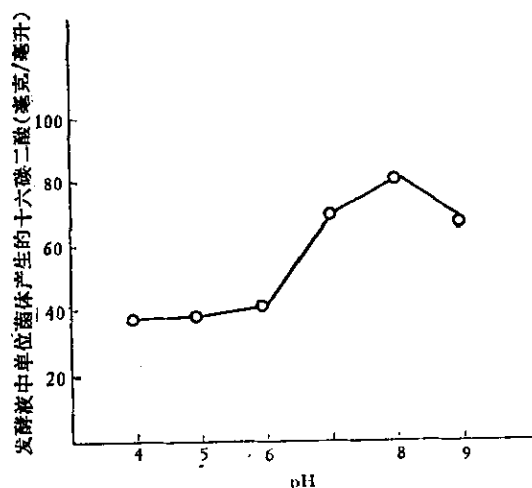


图3 正十六烷发酵时 pH 对产酸的影响

最适生长 pH 为 5.0。

(二) pH 对产酸的影响

1 M 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液培养基 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酵母膏、玉米浆和尿素的含量同培养基 B), pH 分别为 4—9, 20 毫升分装于 500 毫升三角瓶中, 接入麦芽汁种子液 3 毫升, 每瓶加入十二烷或十六烷 10% (V/V), 28℃ 发酵 96 小时, 测得发酵最适 pH 均为 8 (图 2、图 3)。

在用静止细胞进行产酸 pH 试验时, 反应体系中含 4 毫升静止细胞悬浮液, 2 毫升十二烷, 15 毫升 0.5 M 的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液, 缓冲液中含 0.05% 硫酸镁, pH 分别为 6—9。在 28℃ 发酵 72 小时。产酸的最适 pH 与用生长细胞所得的结果相同, 也为 pH8 (图 2)。

(三) 通气量对产酸的影响

按培养基体积比接入 15% 麦芽汁种子液于培养基 C 中, 使总体积分别为 10、20、30、40 毫升。试验表明产酸量随通气量增加而增加 (图 4), 采用通气量更大的四挡挡板瓶, 观察到产酸量比普通三角瓶要高, 说明该菌发酵时供氧量要大。

(四) 磷酸盐浓度对产酸的影响

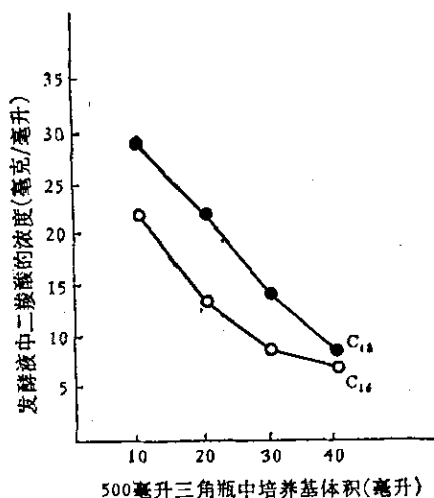


图4 通气量对产酸的影响

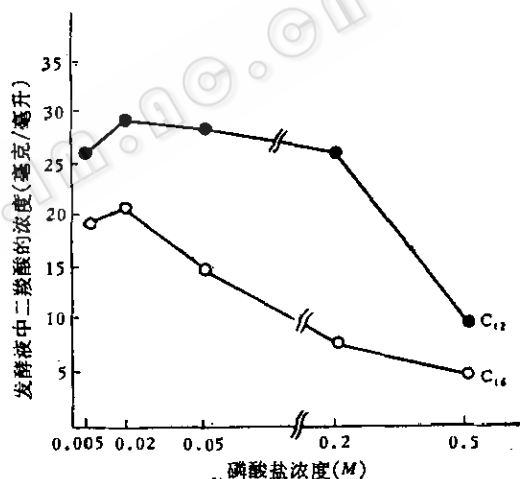


图5 磷酸盐浓度对产酸的影响

3 毫升麦芽汁种子液分别接入 20 毫升 0.005、0.02、0.05、0.2 和 0.5 M 不同磷酸盐浓度的培养基中, 培养基的其他成份同培养基 C, 28℃ 发酵 96 小时, 观察到 0.02 M 的磷酸盐浓度产酸最高 (图 5)。

二、 U_{3-21} 菌株从单一烷烃 (C_{10} — C_{18}) 产生单一二羧酸

综合上述各项最适产酸条件, 用四挡挡板瓶进行了 U_{3-21} 菌株的生长细胞及静

止细胞对一系列单一正烷烃产生相应二羧酸的试验。除 C₁₀ 及 C₁₁ 的产酸量较低外,从 C₁₂ 到 C₁₈ 各正烷烃均能产生产量较高(生长细胞产酸分别为 3.78—8.37%, 静止细胞产酸分别为 4.02—6.46%)、质量较纯的相应二羧酸(表 2 及表 3)。该菌利用正烷烃的能力在 C₁₀ 到 C₁₇ 范围内,随正烷烃的碳链加长而增加。即在长链烷中比短链烷中的生长要好(图 6),但在产酸量方面,则不一定是生长最好的产酸最高。

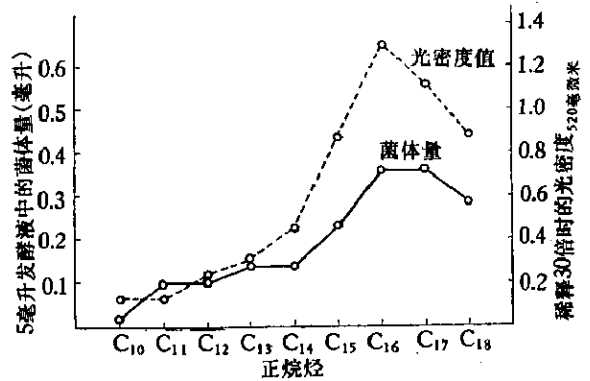


图 6 U₃₋₇₁ 在不同链长正烷烃作碳源时的生长情况

表 2 生长细胞发酵 C₁₀—C₁₈ 产生的二羧酸

碳 源	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
产生的二羧酸% (W/V)	1.86	2.35	4.07	3.38	8.37	4.94	3.90	4.18	3.78
与基质链长相应的二羧酸%	93	94	95	95	96	98	98	95	92

表 3 静止细胞发酵 C₁₀—C₁₈ 产生的二羧酸

碳 源	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
产生的二羧酸% (W/V)	2.84	1.46	5.47	4.95	6.46	5.96	4.27	5.25	4.02

注: 5 毫升静止细胞悬浮液接入 15 毫升培养基 D 中。

三、二羧酸的气液色谱鉴定

U₃₋₂₁ 菌株发酵产生的与基质链长相同的二羧酸,通过气液色谱鉴定与已知标准样品一致。此外,经测定粗制品中与基质链长相同的二羧酸的纯度分别为 92—98% (表 2)。

讨 论

本研究表明,在不同的 pH 条件下,菌体的生成量不一样(见图 1)。发酵过程中,由于二羧酸的积累使发酵体系的 pH 下降,从而促进了菌体的生长。因此要确切的测出该菌的最适产酸 pH,必须尽量排除菌体生长的影响。不然,得到的产酸最

适 pH 将是一种假像(图 7、8),而并非真正的最适产酸 pH。因为所用菌株适于在较低 pH 生长,该处产酸较高是由于有较多菌体做功的缘故。反之,在较高 pH 时,发酵液中总酸量不一定最高,因为该 pH 较不适于菌体的生长,因而只有少量菌体在做功。

我们认为只有用单位体积(或重量)菌体的产酸量来表示,才能准确地反映出该菌在不同 pH 真正的产酸能力(图 2,图 3)。静止细胞能排除菌体生长因素的干扰,因此,又用静止细胞进行了产酸 pH 试验。结果表明,其最适产酸 pH 与用单位体积菌体产酸量测得的最适产酸 pH 一致,从而证实了菌体生长因素会干扰最适产酸 pH 测

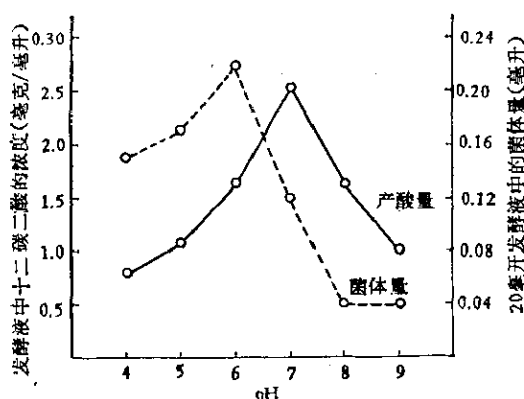


图7 正十二烷发酵时生长对发酵 pH 的影响

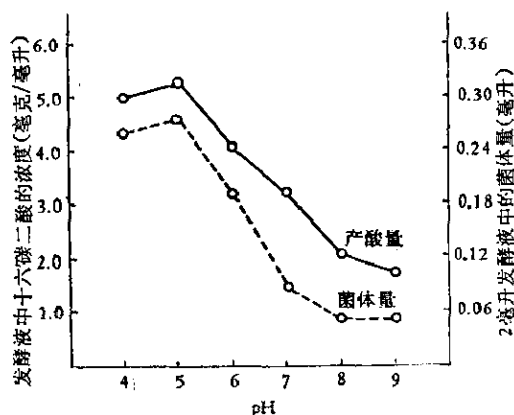


图8 正十六烷发酵时生长对发酵 pH 的影响

定的观点。根据上述菌体生长的最适 pH 和产酸的最适 pH 情况,在生产上种子培养与发酵早期,应将 pH 控制在 5—6 以利菌体生长,发酵一定时间后调 pH 至 8 以利二羧酸的积累。

U_{3-21} 菌株对不同碳链的正烷烃产酸量不同,可能由于基质的特异性所需要的酶系不同。

研究表明静止细胞比生长细胞产酸量一般地要高,生产上如能改革工艺,使之适应于静止细胞发酵的条件,可望提高二羧酸的产量。

参 考 文 献

- [1] Shoji, I. and R. Uchio: 石油と微生物, 1974, No. 11, 14.
- [2] 有马启, 获野重男: 特许公报, 昭 45-24392, 1970.
- [3] 山田浩一: 公开特许, 昭 49-19085, 1974.
- [4] 赤堀四郎, 椎尾勇, 内尾良辅: 特许公报, 昭 50-19630, 1975.
- [5] 古川敏郎等: 公开特许, 昭 52-18885, 1977.
- [6] Uchio, R. and I. Shoji: *Agri Biol Chem.*, 36: 1389, 1972.
- [7] Lodder, J.: *The Yeast. A taxonomic study*, Amsterdam: North Holland Publishing Co., 1970.

STUDIES ON THE FERMENTATION OF LONG-CHAIN DICARBOXYLIC ACIDS

Research Group of Hydrocarbon Metabolism and Fermentation Workshop,
Institute of Microbiology, Academia Sinica

(Beijing)

A mutant U_{3-12} was derived from *Candida tropicalis* No. 1230. Resting cells of strain U_{3-12} produced dicarboxylic acids corresponding with substrate chain length from various individual n-alkanes (C_{10} —

C_{18}) and with high yields of 4.02—6.46%, except DC_{10} and DC_{11} . The crude products were 92—98% in purity. Therefore, the strain U_{3-12} may be a good producer.