

正烷烃发酵生产长链混合二羧酸的研究

II. U_{3-21} 突变株产酸的摇瓶条件试验

中国科学院微生物研究所烃代谢组、发酵车间

(北 京)

我国目前制取工程塑料尼龙 1010 及耐寒农膜增塑剂用的癸二酸,系从蓖麻油酸用化学方法裂解而来,但因蓖麻油供不应求致使生产受到限制。我国石油资源丰富,以微生物发酵混合正烷烃制取长链混合二羧酸来满足生产上的需要能起到代油节油的作用。此外,长链混合二羧酸还能作香料、涂料(可代替用来电镀、喷漆、珐琅等)、橡胶软化剂等的原料,用途广泛。混合正烷烃来源较易,价格便宜,用混合二羧酸制成的产品在某些性能上又有优于单一二羧酸制得的产品。因此,我们在确定了菌种的基础上,进行了混合正烷烃发酵产生长链混合二羧酸摇瓶条件试验的研究,现报道如下。

材 料 和 方 法

一、菌种

U_{3-21} 菌株,见第一报^[1]。

二、试剂和原料

重油组份(%): C_{10} 以下,微量; C_{11} , 1.3; C_{12} , 4.9; C_{13} , 18.1; C_{14} , 26.0; C_{15} , 23.6; C_{16} , 16.3; C_{17} , 8.2; C_{18} , 1.6; C_{19} , 少量。锦西石油化工五厂出品。200# 轻油,含正烷烃 99%,其组份为(%): C_{10} , 8.8; C_{11} , 28.0; C_{12} , 31.4; C_{13} , 26.7; C_{14} , 4.2; 北京东方红炼油厂及南京炼油厂出品,其

它试剂为试剂级。

三、培养基

种子培养基及发酵培养基的组份列于表 1。

表 1 培养基的组份

培养基组份	种子培养基(%)			发酵培养基(%)	
	A	B	C	D	E
麦芽汁	10Brix				
蔗糖		0.3			
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O			2		2
KH ₂ PO ₄		0.8	0.2	1	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O			0.05		0.05
NaCl				0.1	
酵母膏		0.5	0.05	0.1	0.05
玉米浆		0.3	0.03	0.03	0.03
尿素		0.2	0.3	0.05	0.05
自来水					
重油		5	3		
200*轻油				10	10

分装后 8 磅 30 分钟灭菌, 烷烃和尿素分别灭菌后, 接种前加入培养基。

四、培养条件

将在麦芽汁斜面上培养好的 U₃₋₂₁ 菌, 取一接种环置于 500 毫升盛有 20 毫升种子培养基 B 的三角瓶中, 在 28℃ 旋转式摇床(约 200 转/分)摇动培养 36—48 小时作种子液, 然后以 10%(体积/体积)的接种量将此种子液接入 500 毫升盛有 15 毫升发酵培养基 D 中, 按上述培养条件发酵 96 小时。

五、长链混合二羧酸的提取与测定

取一定量的发酵液, 用 6N 盐酸酸化至 pH 1.5—2.0, 用乙醚提取两次, 去乙醚得白色晶体, 将晶体溶于热的 95% 中性乙醇中, 以标定过的 NaOH 滴定, 按混合二羧酸的平均分子量计算产酸量。混合二羧酸的鉴定及组份的含量用气液色谱分析, 分析条件与第一报^[3]相同。

六、菌体量的测定

发酵液以蒸馏水稀释 10 倍, 摇匀后 1 份稀释液与两份溶媒(乙醇: 正丁醇: 氯仿 = 10:

10:1^[2]) 摇匀用 72 型分光光度计, 在 620 毫微米波长, 1 厘米光程比色杯测光密度。

七、静止细胞的制备

麦芽汁斜面上培养好的 U₃₋₂₁ 菌株, 接入 500 毫升盛 100 毫升麦芽汁培养基的三角瓶中, 28℃ 摇动培养 18 小时作种子液, 取此种子液 2 毫升接入 500 毫升盛 20 毫升种子培养基 C 的三角瓶中, 按上述条件培养 48 小时后, 将培养液离心 5 分钟收集细胞供试。

试 验 与 结 果

一、U₃₋₂₁ 菌摇瓶产酸条件

(一) U₃₋₂₁ 菌株在不同 pH 时的生长

用 0.5M 的 KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液配制培养基。每瓶培养基的硫酸镁、酵母膏和玉米浆浓度同发酵培养基 E, 用盐酸及氢氧化钠将其 pH 分别调至 pH 4.0—9.0, 在 500 毫升三角瓶中装 20 毫升, 灭菌后每瓶接入种子 0.2 毫升, 重油 0.6 毫升, 4% 尿素 0.5 毫升, 28℃ 摇动培养 24 小时, 培养液以盐酸调 pH 至 4—5, 稀释 8 倍于 520 毫微米、0.5 厘米光程测光密度, 结果表明种子最适生长 pH 为 5.0。结果见图 1。

(二) pH 对 U₃₋₂₁ 菌株产酸的影响

取上述静止细胞 2.8 克分别接入 pH 为 5.0—9.0 的 15 毫升/500 毫升三角瓶的发酵培养基中(含 0.05% 的 MgSO₄·7H₂O 的 1M Na₂HPO₄-

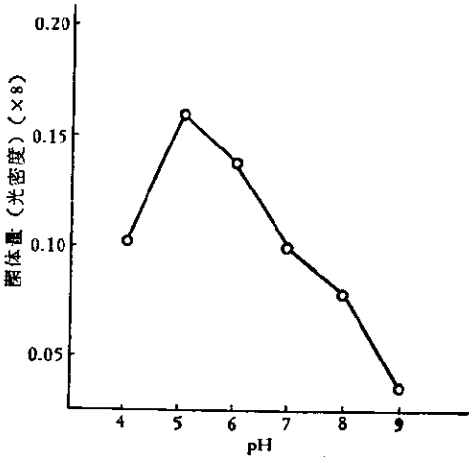


图 1 pH 对 U₃₋₂₁ 菌生长的影响

表 2 用不同的混合正烷烃作碳源时 U_{3-21} 菌的产酸量

碳 源	东炼 200 [#] 轻油	东炼 200 [#] 粗油	南炼 200 [#] 轻油	重 油
混合二羧酸(%)	2.53	2.01	2.23	1.37

KH_2PO_4 缓冲液内), 每瓶加入 200[#] 轻油 2 毫升进行静止细胞发酵 96 小时, 每天用 NaOH 调 pH 两次以控制 pH, 结果表明产酸最适 pH 为 8.0。结果见图 2。

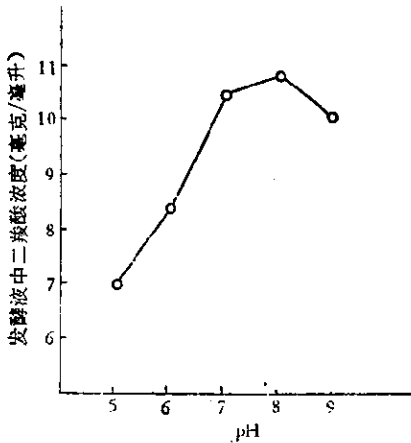


图 2 不同 pH 的静止细胞发酵试验

(三) 不同碳源对 U_{3-21} 菌株产酸的影响

用不同的混合正烷烃作碳源发酵时产酸是不同的。结果见表 2。

实验表明碳链较短的东炼 200[#] 轻油比碳链较长的混合正烷烃产酸量高。用表 2 中四种碳源均能通过 U_{3-21} 菌株发酵产生长链二羧酸。而用东炼 200[#] 轻油组分做碳源, 其各个单个碳数的百分比与产生的二羧酸的各个碳数的百分比的关系见表 3。

表 3 东炼 200[#] 轻油组份和用它发酵所产生二羧酸组份的比较

碳链的碳数	10	11	12	13	14
东炼 200 [#] 轻油组分(%)	8.8	28.0	31.4	26.7	4.2
产生二羧酸的组分(%)	7.2	36.1	37.0	18.6	0.8

(四) 尿素浓度对 U_{3-21} 菌株产酸的影响

我们试验了 0.025—0.2% 不同尿素浓度对产二羧酸量的影响。结果表明 0.1% 的尿素产

酸最高。详见图 3。

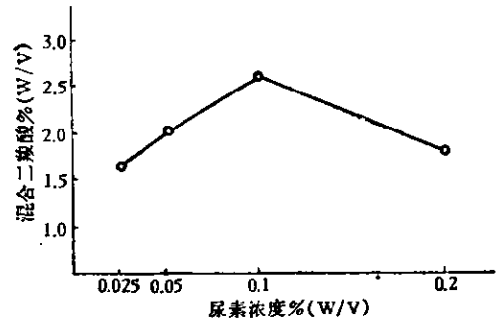


图 3 尿素浓度对产酸的影响

(五) 培养不同时间的种子液对产酸的影响

种子的种龄和健壮程度与酸产量有关, 我们试验了生长 24—74 小时的种子液对产酸的影响, 发现在重油培养基上培养 48 小时的种子较健壮, 而且能满足产酸所需要的菌量, 结果见图 4。

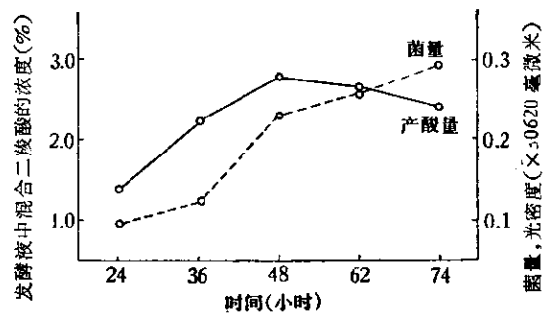


图 4 培养不同时间的种子液对产酸的影响

结果表明培养 48 小时的种子用于发酵产酸最高。

(六) 控制 pH 对产酸的影响

发酵过程中由于产酸而使发酵液的 pH 下降, 因而不利于酸的积累, 所以要控制发酵过程的 pH。实验中采用了不调 pH 及每 12 小时、24 小时控制 pH 为 8.0 的产酸条件, 结果表明

每隔 12 小时调一次 pH 的产酸实验条件产酸最高, 详见表 4。

表 4 控制 pH 对产酸的影响

处 理	混合二羧酸的产量(%)
不 调 pH	1.54
12 小时调一次 pH	3.70
24 小时调一次 pH	3.43

(七) 不同通气量对 U_{3-21} 菌株产酸的影响

我们用 500 毫升三角瓶装入不同量的培养基使总体积分别为 12, 24, 36, 48 毫升, 做不同通气量的比较, 发酵 96 小时, 产酸结果见图 5。

结果表明, 在一定范围内, 二羧酸产量随通气量的增加而增加。挡板摇瓶产酸较普通三角瓶为高。

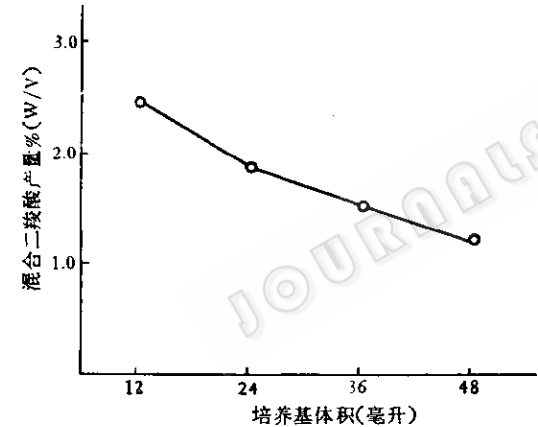


图 5 不同通气量对产酸的影响

(八) U_{3-21} 菌株的发酵时间与产酸的关系

我们测定了 U_{3-21} 菌的 24—144 小时发酵的产酸量, 在碳源为 10%, 种子液为 10% 条件下最高产酸量为 3.3% 左右, 发酵时间为 120 小时。结果见图 6。

结果表明, 发酵 1—4 天产酸量和发酵时间呈线性关系。此外发酵过程中产酸量的消长与菌体生长成正比, 菌体生长旺盛时产酸亦达高峰, 菌体停止生长时, 产酸也随之下降, 结果见图 6。

综上所述, 用普通三角瓶及挡板三角瓶试

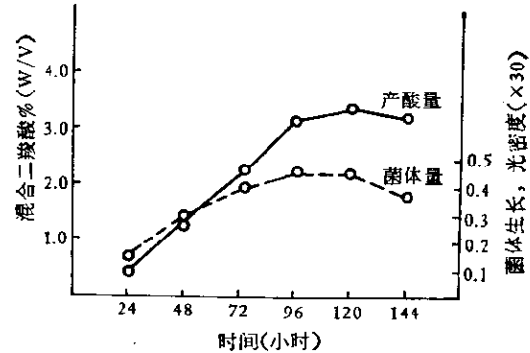


图 6 发酵时间与产酸及菌体量的关系

验产酸量, 普通瓶为 3.70%, 挡板瓶为 4.30%。在相同条件下, 加大接种量, 挡板摇瓶的产酸量为 4.56%。此外在 30 升, 240 升, 1000 升发酵罐上的试验, 其产酸量可达 6%。

二、混合二羧酸的鉴定

发酵产物经去残烃后酯化成二甲酯, 用气液色谱分析为 $DC_{10}-DC_{14}$ (DC 代表二羧酸) 的长链混合二羧酸。用东炼 200# 轻油发酵产生的混合二羧酸, 其中大部分是 $DC_{11}-DC_{13}$, 占长链混合二羧酸总量的 91.7%, $DC_{10}-DC_{14}$ 占总酸的 96.5%。

讨 论

一种有意义的现象是 200# 轻油的组份含量与产生的混合二羧酸组份的含量之间存在着差别(详见表 3)。这种差别首先从 U_{3-21} 菌在各种单一正烷烃上的生长和产酸量的不同来考虑^[3], 混合二羧酸中组份含量可能是由于该菌对各种链长烷烃利用上的基质特异性所决定。此外, 各单一烷烃混合在一起发酵时, 它们之间也可能存在着某种相互的关系, 影响到各组份在混合二羧酸中产量的增多或减少, 从而也影响到混合二羧酸组份的含量, 这些观点有待进一步探讨和证实。

U_{3-21} 菌株产酸稳定, 放大重现性好, 是一株优良菌株。从摇瓶条件实验来分析, 加大接种量和通气量、流加碳源和延长发酵时间, 可能

会进一步提高产酸量。

参 考 文 献

【1】 中国科学院微生物研究所烃代谢组及所发酵车间: 微

生物学报, 20(1): 88—93, 1980。

【2】 Tadaatsu Nakahara. et al.: *J. Fermentative Association*, 26: 413, 1968。

【3】 中国科学院微生物研究所烃代谢组及所发酵车间: 微生物学报, 19(1): 71, 1979。