

癸二酸发酵的研究

余志华

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 从保藏菌种中筛选到一株由正癸烷产生癸二酸较高的酵母菌 L4(*Candida* sp.)。经诱变、摇瓶培养条件试验,该菌的诱变株 L9 能直接利用正癸烷大量产生癸二酸,摇瓶发酵 5 天产癸二酸约 60 g/L。当加入青霉素、链霉素改变细胞透性;加入脂酰 CoA 合成酶抑制剂抑制 β -氧化;加入 NADH 和 Fe^{2+} 辅酶促进羟氧化和 W-氧化作用均能大幅度地提高产量,产率增加 30% 左右。16 立升自动发酵罐生产癸二酸,5 天产量稳定在 71g/L 以上。产品提取率按发酵最终产量和体积计在 85% 以上。成品分析结果,其主要指标符合企业标准。

关键词 假丝酵母;正癸烷;发酵;癸二酸

癸二酸是一种重要的化工原料,用途较为广泛。癸二酸的制造方法有蓖麻油路线法、丁二烯金属钠路线、己二酸单酯电解路线、糖醛乙酰丙酸路线等。这些化学法制造癸二酸常需高温、高压,能耗大,工艺复杂,劳动条件差。随着塑料工业的发展,目前我国以蓖麻油作为原料生产癸二酸受植物资源的限制,产量供不应求。我国石油资源丰富,利用十碳的正癸烷经微生物发酵生产癸二酸是一种优于化学法的简单易行的新工艺。

正癸烷发酵生产癸二酸的研究颇多^[1-7],但成为工业化生产还有困难。我们从本所保藏的能产二羧酸的 21 株原始菌株中筛选到一株产癸二酸较高的酵母菌 L4,经诱变获得一株高产的优良生产菌 L9,能利用癸烷直接发酵,大量生产癸二酸。本文介绍诱变菌 L9 从正癸烷大量生产癸二酸的摇瓶条件试验和 16 立升自动发酵罐的发酵结果,以及对癸二酸的提取和产品分析结果。

材料和方法

(一) 菌种

本所保藏菌株 *Candida* sp. L4*, 及其诱变菌株 L9。

(二) 试剂

正癸烷由上海试剂一厂及天津化学试剂二

厂生产,化学纯。 C_9 — C_{10} 混合正烷烃由锦西石油化工五厂生产。其他试剂均为试剂级。

(三) 培养基

1. 10 巴林的麦芽汁及麦芽汁琼脂培养基。

2. 烷烃种子培养基组分(%): KH_2PO_4 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 酵母膏 0.3, 玉米浆 0.3, 尿素 0.15, C_{9-10} 混合烃 2(V/V), 自来水配制, 自然 pH, 每 30 ml 培养基分装于 500 ml 三角瓶中, 0.55 kg/cm² 灭菌 30 分钟。

3. 发酵培养基组分(%): KH_2PO_4 0.8, NaCl 0.1, 酵母膏 0.1, 玉米浆 0.03, 尿素 0.1, C_{9-10} 混合烃 2(V/V), 正癸烷 15(V/V), 用 5 mol/L NaOH 调 pH 7.0, 以每 15 ml 分装于 250 ml 三角瓶中, 0.55 kg/cm² 灭菌 30 分钟。

(四) 种子培养和发酵

菌种于麦芽汁斜面 28℃ 培养 48 小时后转入麦芽汁或烷烃种子培养基中, 28℃ 摇床培养 40 至 48 小时, 按 15—20% 种量接入发酵培养基中。28℃ 摇床发酵培养 96—120 小时。每天用 6 mol/L NaOH 调 pH 7.5。

(五) 发酵产物的分析

癸二酸的提取和产量分析见文献 [6]。气

本工作得到方心芳先生的指导;夏玉棉、吕爱燕同志曾协助本工作;庞月川同志帮助癸二酸产品的气相色谱分析。特此一并感谢。

* L4 酵母菌待作鉴定。

相色谱分析用日本产品岛津 GC 7A 气相色谱仪。条件：用上海 101 白色担体 60—80 目，10% 聚乙二醇 20,000 固定液，柱温 210℃，N₂：32 ml/min，氢气：0.6 kg/cm²，空气：0.2 kg/cm²。

结 果

(一) 优良菌株的获得

从本所保藏的能产二羧酸的 21 株原始菌中筛选到一株产癸二酸较高的 L4 酵母菌，发酵 4 天产癸二酸 10.44 g/L。以 L4 菌为出发菌株分别进行亚硝酸、氯化锂、羟胺、氯化锂-紫外线复合诱变、亚硝基胍诱变及原生质球诱变，获得一株氯化锂诱变株 L9，产癸二酸达 32.28 g/L，比本所已有的二羧酸生产菌 U¹⁰¹₂₄、D¹⁰¹₂₈ 生产癸二酸分别提高 30% 和 20%。以 200[#] 轻蜡发酵，诱变株 L9 产长链混合二羧酸比以上两株菌都高(表 1)。

表 1 几株生产菌产癸二酸和长链混合二羧酸的产量比较

菌号	正癸烷产生的癸二酸* (g/L)	200 [#] 轻蜡产生的长链混合二羧酸** (g/L)
L9	43.38	35.97
D28	36.00	29.35
U3-21	31.89	26.90

* 三次平均值，** 为 DC10-14

(二) L9 摇瓶发酵试验

1. 发酵时间与产酸的关系：取 2 支 L9 斜面种子接入 15 ml 发酵培养液内，28℃ 摇床振荡培养 7 天，取样测定癸二酸产量和菌体生

长量。从图 1 可以看出 5 天内发酵产酸速率成直线上升，发酵 5 天的产量比 4 天增加 10 g/L，提高产率近 30%。

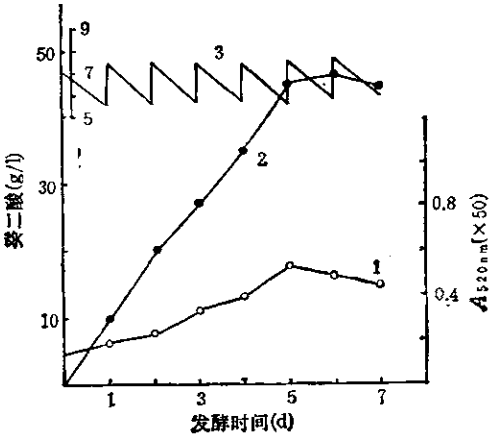


图 1 诱变菌 L9 的癸二酸生产的时间进程

1. 细胞量 A_{520nm}; 2 癸二酸产量; 3. pH 变化

2. 正癸烷浓度对产酸的影响：当发酵培养基中投入正癸烷的浓度为 17.5% 时，癸二酸产量达最高水平，适宜范围为 15—20%。过大的投蜡量并不增加产量(表 2)。合适的 C/N 比为 150:1。以 5% 浓度流加碳源比一次性投入产量提高约 20%(表 3)。

3. 接种量试验：用麦芽汁种子液，分别以 5、10、15、20、25、30% 不同接种量接入摇瓶进行发酵，结果以 5—10% 的接种量为宜，但用斜面菌种接入摇瓶时，如菌量过大，癸二酸产量反而下降。

4. 不同碳源培养的种子对癸二酸的产生的影响：以麦芽汁和长链混合烃(C₈₋₁₉)分别作

表 2 正癸烷浓度对产酸的影响*

正癸烷浓度(%)	3	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	25	30
癸二酸产量 (g/L)	0.9	1.35	2.531	3.054	4.101	5.149	5.934	5.847	4.625	3.927

* 二支斜面接入 15 ml 发酵培养基中 28℃ 发酵 5 天。

表 3 流加碳源时癸二酸产量*

碳源流加时间	0 时	24 时	48 时	72 时	96 时	120 时
碳源流加量(%)	5	5	5	5		
癸二酸产量 (g/L)		8.74	25.65	30.05	43.1	53.59

* 一次性投入碳源时癸二酸产量为 41.86 g/L。

为生长碳源培养种子进行癸二酸发酵试验，发现以烃培养的种子在发酵过程中乳化早，癸二酸产量高(图 2)。

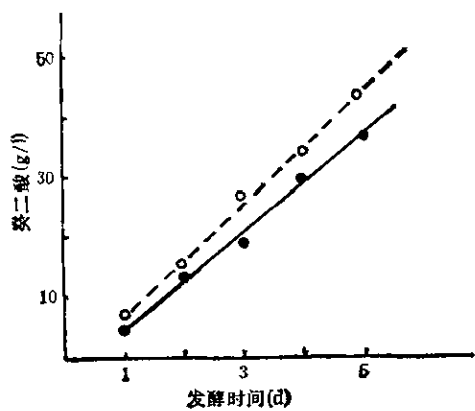


图 2 不同碳源培养的种子生产癸二酸的产量
●-● 麦芽汁种子；○-○ 烃培养种子

5. 通气量试验：以 250 ml、500 ml 三角瓶及 500 ml 四档板的摇瓶分别分装 15 ml、20ml 发酵培养基进行癸二酸的发酵试验，结果以 250 ml 的三角瓶发酵产量最高，但随着容积的增大而通气好，癸二酸产量反而降低。装液量以 15 ml 为宜。癸二酸发酵生产不象其他长链二羧酸通气量愈大愈好。

6. 不同碳源对发酵生产癸二酸的影响：癸二酸发酵过程中，加入不同的生长碳源使细胞

增殖对产酸的影响见表 4。葡萄糖、麦芽汁、NaAc 作为生长碳源加入发酵培养基中反而使癸二酸产量大幅度降低。有意思的是不加生长碳源（对照），它同样能高效率地生产癸二酸。这利于工业生产降低成本。葡萄糖对癸二酸的形成有抑制作用。

7. 酵母膏不同浓度对癸二酸产量的影响：4 ml 烃培养种子液接入 15 ml 发酵培养基发酵结果表明：酵母膏浓度在 0.03—0.2% 范围内，癸二酸产量趋于同一水平，比对照略有提高。酵母膏浓度过大，产酸量减少(表 5)。

8. 表面活性剂对烃发酵的作用：在烃发酵时，加入表面活性剂或机械作用使互不相溶的油水两相起乳化作用，可能利于菌体对烃的利用和发酵。实验结果表明 1% 的甘油聚醚加入发酵培养基中，对癸二酸的生产有一定的促进作用。超声乳化也可提高产量(表 6)。

9. 阻遏和抑制 β -氧化对癸二酸产量的影响：曾有报道向烃氧化过程中添加少量丙烯酸或其他衍生物，可以阻遏 β -氧化过程以积累同碳数的氧化产物^[7]。用诱变株 L9 从正癸烷生产癸二酸过程中，不同时间添加 0.1% 和 0.01% 浓度的丙烯酸，对产酸没有促进作用。如在发酵过程中加入脂酰 CoA 合成酶的某些抑制剂^[8]抑制 β -氧化，结果表明，8-羟基喹啉、2, 4-二

表 4 不同生长碳源对产生癸二酸的影响

生长碳源	2.5% 葡萄糖	4% 麦芽汁	2% 蔗糖	3% NaAc	2%(V/V) 混合烃 (C ₉₋₁₉)	对照
癸二酸产量 (g/L)	28.0	27.18	43.32	34.82	55.21	53.94

表 5 酵母膏浓度对癸二酸产量

酵母膏浓度 (%)	0	0.03	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
癸二酸产量 (g/L)	52.94	55.64	54.97	54.36	54.36	49.70	45.87	40.49

表 6 表面活性剂作用时癸二酸的产量

乳化处理	0.001% 溴代十六烷基三甲烷	1% Tween 80	1% 甘油聚醚	超声处理 10 分钟	超声处理 20 分钟	对照
癸二酸产量 (g/L)	1.17	38.45	50.68	46.60	50.095	46.02

表7 脂酰 CoA 合成酶的抑制剂对癸二酸生产的影响

抑制剂	0.025% NaF	0.6% LiCl	0.34% ZnCl ₂	0.013% 碘乙酸	0.01% 对氯汞苯甲酸	0.2% Tween 80	0.2% 甘油聚醚	0.06% 2,4-二硝基苯酚	0.02% 8-羟基喹啉
癸二酸产量(g/L)	77.69	61.16	69.98	84.69	73.865	70.62	83.3	8.49	5.5
对照* (g/L)	64.5	50.96	56.5	73.39	73.39	56.5	73.4	50.96	50.96

* 对照为不加相应的抑制剂时癸二酸的产量

硝基苯酚对酵母菌 L9 有毒性; NaF、LiCl、ZnCl₂、碘乙酸、Tween 80、甘油聚醚的加入均能提高产量(表 7)。

10. 烷烃氧化酶系的调节^[5]: 烷烃双末端氧化生成二羧酸, 在癸烷发酵过程中加入辅酶 NADH 和辅因子 Fe²⁺, 添加量为 0.23 μmol/ml 发酵液, 进行添加时间试验。结果表明, 不同时间添加此组分均能大幅度提高癸二酸的产

表8 不同时间添加 NADH、Fe²⁺ 对癸二酸产量的影响

NADH、Fe ²⁺ 添加时间 (h)	0	24	48	72	对照
癸二酸产量 (g/L)	73.45	79.1	77.22	78.16	58.3
产量提高(%)	26	35.67	32.45	34.07	

表9 添加青霉素、链霉素对癸二酸生产的影响

硫酸链霉素 (100 万单位/瓶)		注射用青霉素钾 (40 万单位/瓶)	
添加量 (ppm)	癸二酸产量 (g/L)	添加量(单位/ml 发酵液)	癸二酸产量 (g/L)
5	57.45	91	80.98
10	57.45	182	79.1
20	56.5	364	69.69
30	75.9	546	54.67

对照为 58.3 g/l

量, 增加产率在 30% 以上(表 8)。

11. 添加抗生素对癸二酸产量的影响: 许多细菌发酵产品生产中添加链霉素、青霉素、氯霉素等能提高产量^[10,11]。我们对酵母菌正癸烷发酵生产癸二酸中添加青霉素、链霉素, 进行了添加量的试验, 结果见表 9。当发酵开始时加入 0.003% 的链霉素, 癸二酸产量提高 30%。青霉素加入量为 91 单位/ml 发酵液, 可提高产量 35% 以上。但是青霉素添加量再增加, 癸二酸产量却下降。

12. 不同碳链链长单一二羧酸的生产: 诱变菌 L9 能发酵不同碳链的正烷烃产生相应链长的单一二羧酸, 结果见表 10。

13. 诱变菌 L9 对烯烃的发酵: 诱变菌 L9 氧化十二烯-1 产生系列的氧化产物, 见表 11。

14. 诱变菌 L9 对癸烷的利用: 在癸二酸发酵中, 诱变菌 L9 生长很差。我们试验了 L9 菌对不同正烷烃的同化作用(见图 3, 4)。从图中可以看出 L9 菌对壬烷和癸烷的同化能力很弱, 但能很好地同化 C₁₂ 以上的正烷烃和混合烃, 用十六烷作生长碳源, 细胞生长最好。当混合烃加不同量的正癸烷作生长碳源时, 细胞生长受到极大的抑制。随癸烷比例的增大, 细胞

表10 不同碳链的正烷烃生产相应的二羧酸

正烷烃	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
二羧酸	DC ₇	DC ₈	DC ₉	DC ₁₀	DC ₁₁	DC ₁₂	DC ₁₃	DC ₁₄	DC ₁₅	DC ₁₆	DC ₁₇	DC ₁₈
产量 (g/L)	7.16	5.84	34.88	48.4	44.29	72.69	54.84	73.94	53.77	38.4	28.81	53.87

表11 诱变株 L9 氧化十二烯-1产生的氧化产物

十二烯-1	时间 (min)*	1.09	1.38	1.66	2.16	2.66	3.71
	组分 (%)	1.7361	14.311	21.526	24.7038	36.8871	0.8357
总酸量 (g/L)	39.09						

* 为气相色谱分析保留时间

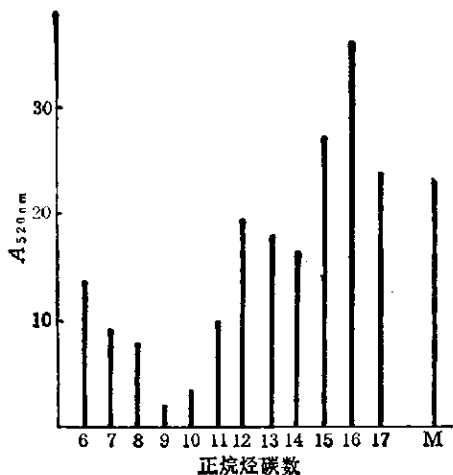


图3 诱变菌 L9 对正烷烃的同化作用

(0.2 ml 烃培养种子液接入 30 ml 生长培养基中, 28℃ 培养 72 小时)

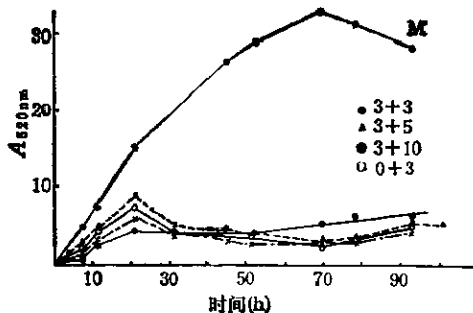


图4 C₉₋₁₂ 混合烃中补加不同量的正烷烃时细胞的生长

生长受抑制更厉害。

(三) 16 立升自动发酵罐生产癸二酸的结果

按材料和方法中的发酵方法在 16 立升自动发酵罐上进行发酵试验,结果见表 12。发酵

表 12 16 立升自动发酵罐生产癸二酸的产量*

批次	总投蜡 %(V/V)	发酵周期 (小时)	产量 (g/L)	发酵周期 (小时)	产量 (g/L)	发酵周期 (小时)	产量 (g/L)
1	15	93	56.5	117	71.57		
2	20	93	56.17	117	71.17	141	78
3	20	93	54.6	141	72.42	158	91
4	16	93	59.77				

* 发酵条件: 装液量 8 L, 风量 5.6 L/min, 搅拌 700—900 r/min, 接种量 20%, 温度 29℃±1。

4 天, 投蜡 15—20% (V/V), 癸二酸产量接近 60 g/L, 发酵 5 天达 71 g/L 以上。

(四) 癸二酸的提取和成品分析

正烷烃发酵产物的提取、结晶较为困难, 我们摸索了癸二酸发酵产品的提取工艺。加热除菌体, 活性炭脱色使发酵液澄清, 在 72 型分光光度计 520 nm 波长下的透光度为 90% 以上。加热进行酸结晶时, 当二羧酸成一钠盐析出后, 再继续加酸使二羧酸完全析出, 用水洗至中性,

即得白色片状的结晶产品。癸二酸的提取率按发酵终了体积和产酸量计算平均达 85% 以上 (表 13)。癸二酸成品分析结果列于表 14。其

表 13 癸二酸的提取结果

批号	含酸量 (g/L)	发酵液体积 (L)	产品干重 (g)	提取率 (%)
1	78	6.5	417	83.06
2	91	7.0	560	88.0
3	58.72	7.5	440	89.5

表 14 癸二酸产品分析结果*

指标名称		外观	含量 (%)	水分 (%)	灰分 (%)	色泽	熔点 (℃)	酸值	纯度**
样品来源	优级品标准	白色粉末或结晶	≥99.5	≤0.3	≤0.06	透明不得有机械杂质 ≤0.1 [#]	131—134.5	>545	
	一级品标准	白色粉末或结晶	≥99.3	≤0.3	≤0.08	1.5 [#]	131—134.5		
	二级品标准	白色粉末或结晶	≥98.5	≤0.6	≤0.2	3.0 [#]	129—134.5		
发酵法制得产品		白色结晶	≥99.63	0.091	≤0.028	1.1 [#]	132.5—133.8	550.8	99.2

* 产品标准及分析结果由河南开封化工三厂提供。** 为气相色谱分析结果, 色谱图略。# 为甲基橙分析法。

产品主要指标符合企业标准。

讨 论

从实验和结果看出, 诱变菌 L9 由正癸烷发酵生产癸二酸无需大的通气量、高搅拌速度和其他生长碳源, 可直接利用癸烷发酵生产癸二酸。这对于工业生产降低成本、节约能源很重要。以葡萄糖作为发酵过程中的生长碳源反而抑制癸二酸的生产。利用烃培养的种子发酵癸烷可提高癸二酸产量。这是由于用烃培养种子时, 经烃的诱导作用在体内先形成了烃诱导的各类酶和乳化剂形成系统, 使发酵提早乳化, 提高产量。发酵过程中加入丙烯酸并未阻遏 β -氧化, 但加入脂酰 CoA 合成酶的某些抑制剂能促进癸二酸的产生, 这些抑制剂能抑制此酶的酶活力, 导致 β -氧化的抑制作用。加入 NADH 和 Fe^{2+} 显著提高产量, 也许是促进了烃氧化酶的作用或是 ω -氧化酶的作用, 或者两者皆有, 需进一步研究。添加抗生素能提高产量, 是否

由于青霉素改变了细胞透性, 需要进一步证明。癸二酸发酵工艺和产品提取工艺简单, 适合工业化生产, 产品质量符合蓖麻油生产的企业标准。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院林业土壤研究所、沈阳有机化工厂: 微生物学报, 19(1): 64—70, 1979.
- [2] Hiroo Kaneyuk et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58(5): 405—410, 1980.
- [3] 殷基崇等: 工业微生物, 6: 1—3, 1982.
- [4] 刘祖同等: 遗传, 4(2): 16—18, 1982.
- [5] 刘祖同, H. G. Sato: 石油学报 (石油加工), 3(2): 29—37, 1987.
- [6] 中国科学院微生物研究所烃代谢组: 微生物学报, 19(1): 71—75, 1979.
- [7] Shell Internationale Research Maat Schappij, N. V.: *Neth. Pat. Appl.*, 302: 203, 1965.
- [8] 余志华、郝秀珍: 微生物学报, 26(4): 333—340, 1986.
- [9] Masahiro, O. et al.: *A. B. C.*, 12: 2725—2730, 1983.
- [10] 大塚一郎等: 特公昭 43-6980.
- [11] 井口喬等: 发酵と代謝, 13: 86, 1966.