

十二碳二元酸的发酵研究

任 刚 陈远童*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)UH-2-48 菌株在单因子实验的基础上经过正交实验后,以正十二烷发酵生成十二碳二元酸的产酸量从 81.7g/L 提高到 108.2g/L。而其二元酸产品的纯度(>97%)满足工业生产的需要。吐温 60 0.10%、尿素 0.12%、维生素 B₂ 150μg/L、青霉素 150μ/mL、丙氨酸 0.50% 的浓度时也对十二碳二元酸产量有促进作用。用一株以 UH-2-48 为母株诱变筛选的新的优良突变株 HP-12 菌株,在最佳条件下,20m³ 罐中发酵 151h,十二碳二元酸的平均产量达 202.1g/L。

关键词 热带假丝酵母,十二碳二元酸,发酵

中图分类号 Q815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0198~05

十二碳二元酸(DC₁₂)是化工上合成高性能工程塑料尼龙 1212、高档服装用尼龙热熔胶和高级涂料等的重要工业原料^[1~3],国际市场相当大。目前,国际上所用的高性能工程塑料尼龙 11 和尼龙 12,都是用化学方法合成的,年产量分别为 5 万吨和 10 万吨左右,我国还不能生产。近几年来,每年进口高性能工程塑料 3000t、高档服装用热熔胶 2000t 和高级涂料 1000t。DC₁₂ 在自然界中不存在,化工上合成既需高温高压和催化,又需防火防毒和防爆设备,而且由于条件苛刻,步骤多,收率低,成本高,环境污染严重,限制了它的商业应用。人们的目光已转向绿色化学,利用生物工程技术来生产化工上难以合成的 DC₁₂,已越来越引起国内外科学家和企业家的兴趣和重视^[1~5]。目前,以正十二烷(nC₁₂)为原料,高忠翔、刘祖同在 6.6L 罐发酵 6d^[6],Picatagio S et al 在 5L 罐发酵 6d^[7],DC₁₂ 产量均达到 140g/L 左右。我们用 UH-2-48 菌株在 3t 发酵罐中,发酵 6d,DC₁₂ 的产量达到 145g/L。为了进一步提高产量,降低生产成本,本文报道了研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验提供的热带假丝酵母(*Candida tropi-*

calis)UH-2-48 和 HP-12 菌株,由诱变筛选获得。

1.2 试剂

正十二烷(nC₁₂)为南京石油化工厂分馏,重蜡为锦西石油化工五厂生产

1.3 麦芽汁斜面

10B₆ 的麦芽汁,1.5% 琼脂粉,0.06MPa 灭菌 30min。

1.4 烷烃种子培养基

KH₂PO₄ 8g,酵母膏 5g,玉米浆 3g,蔗糖 5g,用自来水定容至 1L,自然 pH,0.06MPa 灭菌 30min。尿素 0.3%,分消。重蜡 5.0%,分消,接种时加入。

1.5 发酵和筛选培养基

KH₂PO₄ 8g,NaCl 1g,酵母膏 2g,玉米浆 1g,蔗糖 2g,用自来水定容至 1L,调 pH 到 7.3,装入 15mL/500mL 三角瓶,0.06MPa 灭菌 30min。nC₁₂ 20%(V/V),分消。重蜡 3.3%(V/V),分消。尿素 0.12%,分消,接种时加入。

1.6 正交实验基本培养基

KH₂PO₄ 8g,NaCl 1g,酵母膏 2g,玉米浆 1g,蔗糖 2g,用自来水定容至 1L,调 pH 到 7.3,装入 15mL/500mL 三角瓶,0.06MPa 灭菌 30min。nC₁₂ 20%(V/V),分消。重蜡 3.3%(V/V),分消,接种时加入。

收稿日期:1999-06-30,修回日期:1999-12-27。

基金项目:国家“九五”科技攻关项目(96-C03-03-04)。

* 属于微生物资源前期开发国家重点实验室成员。

1.7 发酵时间

摇瓶单因子实验时,把在种子培养基上培养48h的种子菌液接种到发酵培养基中发酵4d。

1.8 二元酸的提取与测定

发酵終了,在500mL三角瓶中,用6mol/L HCl调pH值至3.0,每瓶加入120mL乙醚,摇动100次,放置30min以上,静置分层,然后,倒出40mL乙醚提取液,倒入100mL烧杯中,在通风橱中吹去乙醚,得到白色固体。把提取得到的二元酸用95%的中性热乙醇溶解,加入一滴酚酞,用标准NaOH溶液滴定,记录消耗的NaOH体积,计算DC₁₂的产量。二元酸的纯度分析是利用气相色谱分析方法进行的。在二元酸样中加入四甲基氢氧化铵和一滴酚酞,用SP2305型色谱仪鉴定,选用氢火焰离子化检测器;上海101白色担体,60~80目,5% SE-30为固定液;柱温为190~230℃;N₂ 28mL/min;H₂ 12mL/min。

2 结果和讨论

2.1 吐温60对十二碳二元酸发酵的影响

微生物在利用烷烃时一般都产生乳化剂。乳化剂降低了烷烃的表面张力及其与水的界面张力,使烷烃以微滴的形式稳定地分散于培养液中,形成乳化液,从而促进了烷烃的利用。我们选取了吐温60进行了研究。吐温60作为一种细胞膜组分脂类的类似物,能破坏细胞膜的结构,另一方面,也能增加细胞膜的通透性,使底物烷烃和产物二元酸能更快地通过细胞膜而加快产酸的进程。因此,找到一个合适的浓度能使二者之间达到平衡:一方面,使菌体的破坏最少,另一方面,能使细胞膜的通透性达到最高值。我们选取吐温60分别为0、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%和0.30%七种浓度进行试验,发现当吐温60的浓度为0.10%时,UH-2-48菌株生产DC₁₂的产量最高(图1)。

2.2 尿素对十二碳二元酸发酵的影响

尿素在二元酸的发酵中是作为一种氮源加入培养液中的,尿素还影响着细胞色素P450及羟基化酶的活力和其它有关酶的活力,尿素还影响细胞的超微结构。中国科学院上海植物生理所曾报道尿素对二元酸发酵的影响^[8]:尿素在低浓度时可以促进二元酸的产量,而在高浓度(>0.2%)时,由于尿素促进了菌体的三羧酸循环和乙醛酸循环增强了菌体的β-氧化能力,使二元酸的积累降低。为了提高DC₁₂的产量,我们进行了尿素浓度的试验,选取0、

0.03%、0.06%、0.09%、0.12%、0.15%和0.18%七种浓度,当nC₁₂为20%时,0.12%尿素浓度最有利于DC₁₂的生成(图2)。

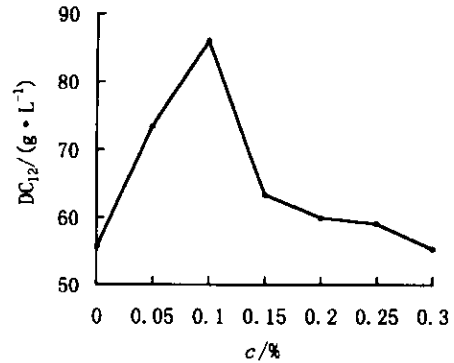


图1 吐温60浓度变化对DC₁₂产量的影响

Fig.1 Effect of Tween 60 concentration on production of DC₁₂

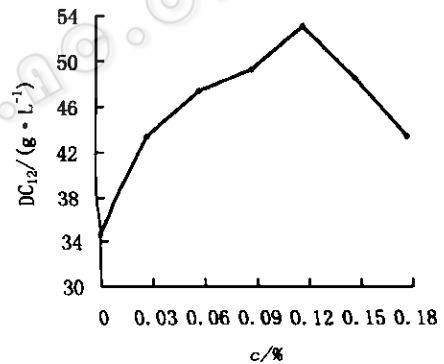


图2 尿素浓度的变化对DC₁₂产量的影响

Fig.2 Effect of urea concentration on production of DC₁₂

2.3 维生素对十二碳二元酸发酵的影响

有人曾报道过维生素能作为一种生长因子促进菌体生长。并且有可能是对三羧酸循环中的酶起作用^[9]。我们经过试验,发现加入不同浓度V_{B2}时,UH-2-48菌株生产DC₁₂的产量都比不加时高,最适V_{B2}浓度为150μg/L(图3)。

2.4 青霉素对十二碳二元酸发酵的影响

微生物发酵正烷烃生长链二元酸是由胞内酶催化完成的,这就存在正烷烃通过细胞膜转入细胞内和产物二元酸通过细胞膜转运出细胞外的过程。提高细胞膜的通透性有可能增加二元酸的产量。为此,我们用UH-2-48菌株对青霉素浓度与DC₁₂产量的关系进行了试验,证明当浓度为150u/mL时,DC₁₂产量最高(见图4)。

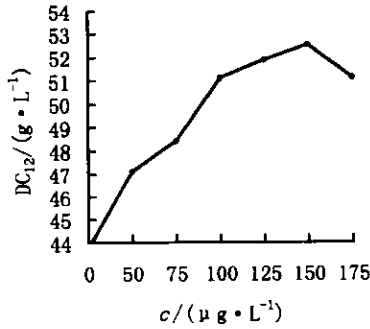


图3 维生素 B₂ 浓度变化对 DC₁₂产量的影响

Fig.3 Effect of vitamin B₂ concentration on production of DC₁₂

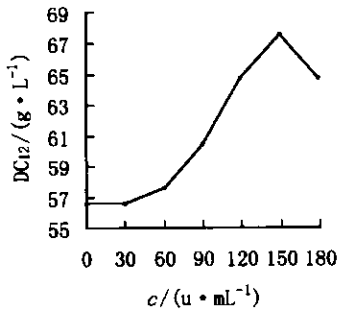


图4 青霉素浓度变化对 DC₁₂产量的影响

Fig.4 Effect of penicillin concentration on production of DC₁₂

2.5 丙氨酸对十二碳二元酸发酵的影响

丙氨酸和尿素一样,对发酵过程中的蔗糖利用、烷烃利用、菌体生长、长链二元酸积累和发酵液 pH 变化有影响,丙氨酸对菌体内三羧酸循环、过氧化氢酶和谷氨酸脱氢酶活力也存在明显的影响^[10]。实验结果表明:丙氨酸能比较明显地促进 UH-2-48 菌株十二碳二元酸的积累,尤其在 0.5% 左右时能较好地促进二元酸的产生(图 5)。

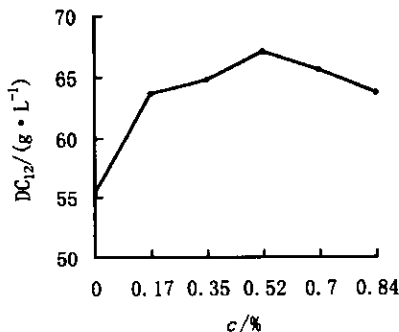


图5 丙氨酸浓度变化对 DC₁₂产量的影响

Fig.5 Effect of alanine concentration on production of DC₁₂

2.6 正交实验对十二碳二元酸发酵的影响

在单因子实验的基础上,用 UH-2-48 菌株进行正交试验。按照单因素的试验结果,本正交试验 [L₁₆(4⁵)] 选取因素及其浓度如表 1 所示。正交试验的设计方案如表 2 所示。本实验发酵时间为 110h。

表 1 正交实验因素及其浓度的选取

Table 1 Selection of factor and the concentration

Factor	Level			
	1	2	3	4
Alanine/%	0.40	0.50	0.60	0.70
Tween 60/%	0.04	0.08	0.12	0.16
Penicillin/(u/L)	120.00	140.00	160.00	180.00
Urea/%	0.10	0.14	0.18	0.22
V _{B2} /(μg/L)	120.00	140.00	160.00	180.00

表 2 5 个因素 4 个水平的正交实验 [L₁₆(4⁵)] 的设计方案

Table 2 Protocol of orthogonal cross [L₁₆(4⁵)]

Factor Number	Alanine /%	Tween60 /%	Penicillin (u/mL)	Urea /%	V _{B2} /(μg/L)
1	A1	T1	P1	U1	V1
2	A1	T2	P2	U2	V2
3	A1	T3	P3	U3	V3
4	A1	T4	P4	U4	V4
5	A2	T1	P2	U3	V4
6	A2	T2	P1	U4	V3
7	A2	T3	P4	U1	V2
8	A2	T4	P3	U2	V1
9	A3	T1	P3	U4	V2
10	A3	T2	P4	U3	V1
11	A3	T3	P1	U2	V4
12	A3	T4	P2	U1	V3
13	A4	T1	P4	U2	V3
14	A4	T2	P3	U1	V4
15	A4	T3	P2	U4	V1
16	A4	T4	P1	U3	V2

从实验结果(图 6)可以看出 9 号是比较好的一个因素配置方案。9 号的平均产量是 108.2g/L。

2.7 UH-2-48 菌株的进一步诱变筛选

UH-2-48 菌株是以 T25-14 为出发株经过两代诱变而获得的从 nC₁₂ 生产 DC₁₂ 的较好菌株。我们在以 UH-2-48 为试验菌株进行代谢调控试验,经过单因子试验之后进行正交试验,同时,又以 UH-2-48

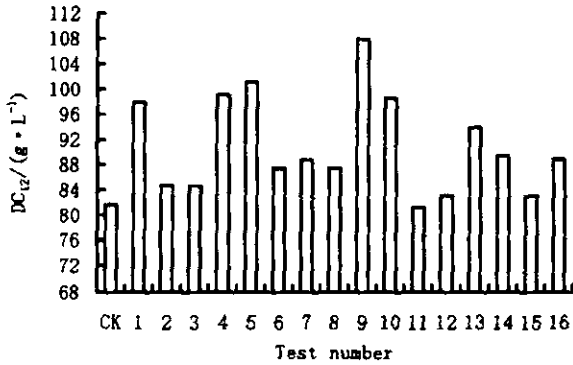


图6 正交试验中各种因素与产量的关系
Fig.6 Relation of factors and production in orthogonal cross $[L_{16}(4^5)]$

为出发菌株,进行进一步的诱变筛选,经过亚硝酸诱变后,挑出531株突变株进行筛选,经过初筛和多次复筛,获得一株新的优良生产菌株HP-12。发酵和筛选按1.5的步骤进行。并对原始菌株T25-14和3代突变株NP-103、UH-2-48和HP-12发酵生产DC₁₂进行比较,发酵4d。HP-12产酸水平为98.4g/L,比UH-2-48产酸水平78g/L,提高26%。结果见图7。

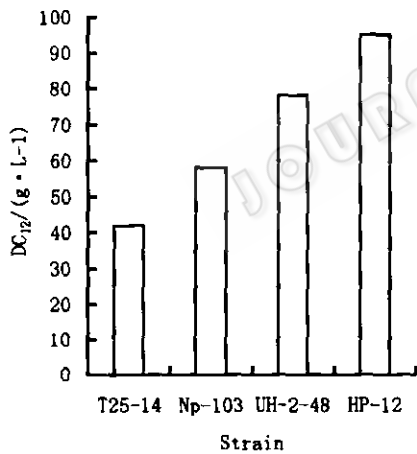


图7 以T25-14为出发菌株的各代诱变菌株生产DC₁₂的产量比较
Fig.7 Comparison of DC₁₂ yield of different mutants derived from T25-14

2.8 十二碳二元酸 20m³ 罐工业生产试验

我们用最新培育的优良生产突变菌株HP-12

在20m³罐规模进行工业生产试验,综合正交试验结果,在最适条件下发酵,nC₁₂采用分批流加方式,其浓度控制在6%以上,罐压1kg/cm²,通气量1:0.5~0.7,罐温28~31℃,从20~48h,pH控制在7.5以下;从48~120h,pH控制在8.0以下;从120h至发酵结束,pH控制在8.5以下时,发酵3批,发酵清液中二元酸产量平均为202g/L(图8为其中一批的产酸过程曲线),nC₁₂转化率平均为84.9%(表3),产品DC₁₂纯度>97%,总酸>98%,水份<0.4%,蛋白质含量<0.2%。DC₁₂用于工业上合成尼龙1212、热熔胶和涂料,各种合成产品的质量指标均优于进口同类产品。

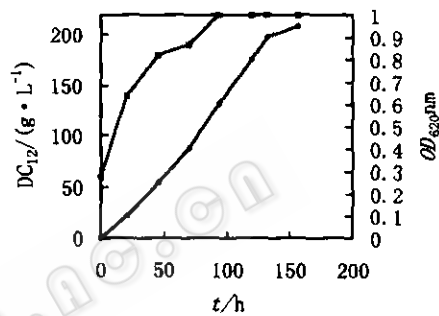


图8 20m³发酵罐产DC₁₂曲线
Fig.8 The curve of producing DC₁₂ in the 20m³ fermentator

—■— OD_{620nm}; —●— DC₁₂/(g·L⁻¹)

表3 发酵生产DC₁₂的工业生产试验结果
Table 3 The results of industrial fermentation of DC₁₂ in the 20m³ fermentator

Batch number	1	2	3	Average
Time/h	151	146	157	151
The yield of acid in supernatant/(g/L)	194.5	202.6	209.0	202.1
Average rate of producing acid/(g/L·h)	1.29	1.39	1.33	1.34
Transform rate of nC ₁₂ /%	74.9	86.8	93.1	84.9

经20m³罐规模工业生产试验表明,HP-12菌株在最适条件下,产酸率高,重复性好,是一株生产DC₁₂的优良菌株。

参 考 文 献

[1] 陈远童,郝秀珍.生物工程学报,1987,3(4):307~308
[2] 陈远童.生物工程学报,1989,5(3):241~245
[3] 陈远童,郝秀珍,庞月川.微生物学报,1995,35(6):433~437

- [4] 陈远童, 庞月川, 刘 挺等. 微生物学报, 1996, 36(1): 37~41
- [5] 陈远童, 郝秀珍. 生物工程学报, 1988, 4(2): 145~148
- [6] 高忠翔, 刘祖同. 清化大学学报, 1990, 30(30): 86~92
- [7] Stephen Picatagio *et al.* *Bio/Technology*, 1992, 10(8): 894~898
- [8] 沈永强, 楼纯菊. 植物生理学报, 1979, 5(4): 385~393
- [9] 中科院微生物所烃代谢组. 微生物学报, 1981, 21(1): 88~95
- [10] 周建龙, 焦瑞身. 植物生理学报, 1988, 28(4): 333~339

Studies on Fermentation of Decane 1,10-dicarboxylic Acid(DC₁₂)

REN Gang CHEN Yuan-Tong

(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract *Candida tropicalis* strain UH-2-48 can increase the production of decane 1,10-dicarboxylic acid(DC₁₂) yield by 30% (from 81.7g/L to 108.2g/L) after regulating the fermentation condition. The purity of the DC₁₂ is above 97%, which can meet the criteria of the succeeding synthesized industrial productions. Emulsifier can not only destroy the structure of the cell membrane in some degree, but also can enhance the permeability of the cell membrane. Furthermore, the structure of the emulsifier itself can also affect its function. Tween 60 (0.10%) can enhance the production of DC₁₂ tremendously. Urea, as the nitrogen resource, can affect the activity of cytochrome P450 enzyme. Some biochemistry and biophysics factors, such as penicillin, vitamin B₂ and alanine, can increase the yield of DC₁₂ during the process of fermentation. Ferment in 20m³ fermentator, under the optimal condition, the average yield of DC₁₂ using the strain HP-12 which derived from UH-2-48, is 202.1g/L.

Key words *Candida tropicalis*, decane 1,10-dicarboxylic acid(DC₁₂), fermentation