

一株从正十二烷生产十二烷二羧酸的高产菌株

陈远童 郝秀珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

长链二羧酸是一类重要的化工原料,它是制造耐寒性增塑剂、工程塑料、树脂、涂料及香料的原料。东亚合成公司发表了工业化生产DC₁₂的生产计划,其目的是用于高级增塑剂、聚合酯和尼龙^[2,3]。由长链二羧酸合成的尼龙热熔胶(即PA粉)是用于服装热熔衬布的高档热熔胶,使用热熔衬后的服装挺括美观,轻盈舒适,曲线好,有弹性,不走型,不起绉。改性尼龙热熔胶试验成功,为DC₁₂开辟了新的广阔的用途。

国内外对nC₁₂发酵生产DC₁₂研究者颇多^[4-7],日本植村等用一株热带假丝酵母M₂₀₃₀,在3L发酵罐上,发酵96—113h,DC₁₂产量为82g/L,对nC₁₂的转化率为30—40%,这是目前已报道的最高水平。本文报道一株从nC₁₂生产DC₁₂的高产突变株在摇瓶和3000L罐试验的结果。

材料和方 法

(一) 菌种

热带假丝酵母(*C. tropicalis*) T₂₅₋₁₄的突变株UH-2-48(以下称5号)。

(二) 试剂

nC₁₁和nC₁₃纯度分别为95%,nC₁₄、nC₁₅和nC₁₈纯度均为99%,英国进口分装,nC₁₂纯度为95%,靖江溶剂厂提供,nC₁₀—nC₁₈混合正烷烃,nC₁₀微量,nC₁₁1.3%,nC₁₂4.9%,nC₁₃18.1%,nC₁₄

26.0%,nC₁₅23.6%,nC₁₈16.3%,nC₁₇8.2%,nC₁₈1.6%,锦西石油化工五厂提供;其他药品为试剂级。

(三) 培养基

1. 种子培养基:10B'麦芽汁琼脂固体斜面;10B'麦芽汁液体培养基,30ml/250ml三角瓶。

2. 发酵培养基(%) : KH₂PO₄ 0.8, NaCl 0.1, 酵母膏0.2, 玉米浆0.1, 蔗糖0.15, 尿素0.1, nC₁₀—nC₁₈混合正烷烃3.0, nC₁₂ 12—16(V/V), 自来水配制, pH7.3—7.5, 15ml/500ml三角瓶, 121℃灭菌30min, 尿素和正烷烃分别灭菌, 接种时加入。

(四) 种子培养和发酵

经28℃培养两天的两支麦芽汁斜面菌种接入一瓶麦芽汁液体培养基中,于220rpm旋转摇床上,28℃培养40h,用此种子菌液,按15—20%种量接入发酵培养基中,振荡发酵4天,每隔24h用6N NaOH调一次pH至7.5—8.0。

(五) 二羧酸的提取与测定

发酵終了,取一定量发酵液,用6N HCl调pH至2—3,用乙醚抽提,去乙醚,得白色二羧酸结晶。

二羧酸的测定见前报^[1]。

本文于1986年11月5日收到。

本研究工 作得到方心芳教授的指导;庞月川同志帮助二羧酸的气相色谱分析,特此感谢。

本文缩写用nC_N代表正烷烃,DC_N代表二羧酸,其中N为碳原子个数。

(六) 菌体量的测定

方法见前报^[1]。OD表示菌体光密度。

实验和结果

(一) 5号突变株从单一烷烃生产单一二羧酸

发酵培养基中分别加入2ml(约13%) nC₁₁, nC₁₂, nC₁₃, nC₁₄, nC₁₅和nC₁₈, 以20%种量接种, 发酵4天, 由表1结果表明, 5号突变株自nC₁₂产酸量最高。

表 1 5号突变株从单一烷烃生产单一二羧酸

正烷烃碳数	11	12	13	14	15	18
二羧酸产量 (g/L)	28.1	63.8	41.6	53.8	37.9	28.6

(二) 不同突变株由nC₁₂发酵生产DC₁₂

用1号、4号和5号三株突变株进行由nC₁₂发酵生产DC₁₂的试验。以16.6% (V/V) nC₁₂, 3% nC₁₀—nC₁₈混合正烷烃, 以相同种量接种, 发酵4天, 结果

表 2 不同突变株从nC₁₂生产DC₁₂ (g/L)

试验次数	1 号 菌 株				4 号 菌 株				5 号 菌 株			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
1	60.0	65.0	56.5	60.5	58.0	56.8	57.0	57.3	72.6	60.7	/	66.6
2	50.0	58.2	56.9	55.0	60.2	47.1	54.0	53.8	68.8	62.5	/	65.7
3	62.6	62.6	61.4	62.2	60.7	64.9	57.1	60.9	72.8	73.3	72.7	72.9

5号突变株是最优的产DC₁₂菌株(表2)。

(三) 5号突变株发酵生产DC₁₂的时间进程

用5号突变株, 在3000L罐上进行了发酵试验。发酵96h, DC₁₂平均产量为78g/L, 转化率80%左右。在最好情况下, 加入280kg纯度为95%的nC₁₂和17.5kg nC₁₀—nC₁₈混合正烷烃, 发酵96h, DC₁₂达84.3g/L, 125h时为104.9g/L, 140h时为112.8g/L(图1), 回收残存nC₁₂60kg, 所以DC₁₂对消耗的nC₁₂的转化率达102.5%, DG₁₂纯度为95%。

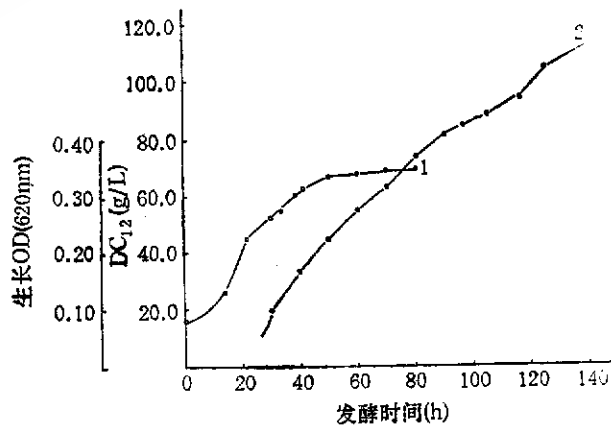


图 1 5号突变株生长和产酸的时间进程

1. 生长OD 2. DC₁₂

参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所经代谢组: 微生物学报, 21(1):88—95, 1981.

[2] 陈远章: 生物工程学报, 2(1):72—74, 1986.

[3] Uchio, R. and Shio, I.: 石油と微生物, (11): 14—23 1974.

[4] 古川敏郎等: 日本公开特许, 昭52—18885, 1977.

[5] 植村等: 发酵と工业, 43(5):436—441, 1985.

[6] 刘祖同等: 遗传, 4(2):16—18, 1982.

[7] 中国科学院微生物研究所经代谢组: 微生物学报, 19(1):71—75, 1979.