

一种测定烷烃发酵液中残烃的方法

陈远童 庞月川 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在烷烃发酵中, 至今未看到较准确地测定发酵液中残烃的方法。为此我们对测定残烃的方法进行了研究。本文报道用有机溶剂提取和气液色谱分析相结合的方法测定发酵液中的残烃的结果。

材 料 和 方 法

一、试剂

200# 轻蜡, 组成见前报^[1]。正己烷, 纯度不低于 99%; 正十六烷, 纯度高于 95%。

二、标准烷烃培养基的配制

准确加入一定量的正十六烷或 200# 轻蜡于 250ml 分液漏斗中, 再加入发酵培养基 10ml, 其组成为(%): KH_2PO_4 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 玉米浆 0.15, 酵母膏 0.25。

三、标准烷烃培养基中正烷烃的提取

在上述标准培养基中, 加入一定量正己烷, 摇动提取后放置分层, 准确吸取 10ml 正己烷溶液, 按其标准正烷烃浓度的稀释倍数加入接近理论浓度的正十五烷为内标物 [如 10ml 含 2% (V/V) 正十六烷培养基, 用 4 倍体积正己烷提取后, 正己烷中正十六烷的理论浓度为原来的 1/4, 故加入 0.5% (V/V) 正十五烷为内标物] 或直接取正己烷溶液, 以正十六烷为外标物, 进行气液色谱分析。

四、发酵液中残烃的提取

取一定量发酵液于分液漏斗中, 加入适当倍数的正己烷, 摇动提取分层后, 直接取一定量正己烷溶液, 进行色谱分析。

五、正烷烃的测定

正己烷提取液, 直接用 SP-2305 全型气液色谱分析。用氢火焰离子化检测器。固定液为 5% SE-30, 柱长 1.5 米, 内径 3 mm。担体为上

海 101 白色担体 (60—80 目)。柱温 225℃, 气体流速: 氮气为 36ml/分, 氢气为 27ml/分, 空气为 270ml/分。

结 果

一、溶剂量对正烷烃提取率的影响

在 5 个 250ml 分液漏斗中, 分别配制 10ml 正十六烷浓度均为 2% (V/V) 的标准烷烃培养基, 各加入 0.5 (5ml)、1 (10ml)、2 (20ml)、3 (30ml) 和 4 倍体积的 (40 ml) 正己烷, 摇动提取后分层, 取上层正己烷溶液, 以正十六烷为外标物, 用气液色谱分析, 比较不同体积正己烷从含 2% (V/V) 正十六烷的标准培养基中提取出来的正十六烷百分含量, 比较其提取收率, 见图 1。

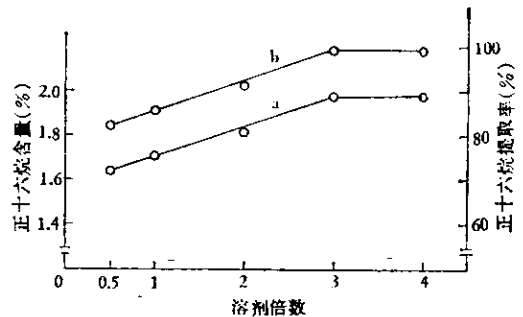


图 1 溶剂量与正烷烃提取收率的关系*

另外, 分别准确吸取 3ml 发酵液 (投入 5% V/V 正十六烷, 发酵 2 天), 放入 5 个试管中, 分别加入 0.5 (1.5ml)、1 (3ml)、2 (6ml)、3 (9ml)、4 倍 (12ml) 的正己烷, 摇动提取分层。但加入 3 倍体积以下正己烷的发酵液全部乳化, 不能

* 图中 a 为溶剂量与测得标准烷烃培养基中正十六烷百分含量关系; b 为溶剂量与标准烷烃培养基中正十六烷提取收率关系。

分层,需先离心(4000rpm) 15分钟。分出正己烷溶液后进行色谱分析,比较不同体积正己烷从发酵液[投入5%(V/V)正十六烷,发酵2天]中提取出来的正十六烷的百分含量,见图2。

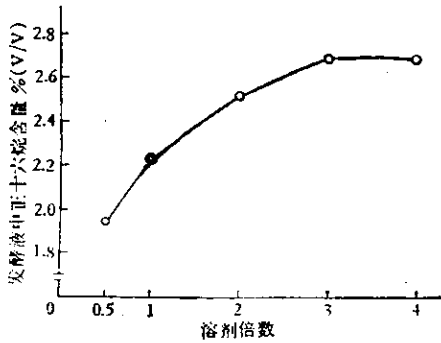


图2 溶剂倍数与发酵液中正十六烷含量的关系

图1、2表明,配制的标准烷烃培养基和发酵液中正烷烃的提取率与正己烷的含量有密切关系。试验说明用四倍体积正己烷提取发酵液中残烃较适宜。

二、标准正烷烃培养基中正十六烷的测定

在10ml正十六烷浓度分别为(%)：0.1、0.5、1.0、3.0、5.0、10(V/V)的标准烷烃培养基,分别加入四倍体积的正己烷提取,提取液加入正十五烷作内标物或以正十六烷为外标物,直接用气液色谱仪分析。结果见表1。

表1 标准正烷烃培养基中正十六烷的测定

| 结果 轻烃浓度(%) | 项目 内标物为 正十五烷 测得正十 六烷结果 (%) | 误差 (%) | 项目 外标物为 正十六烷 测得正十 六烷结果 (%) | 误差 (%) |
|---------------|---|-----------|---|-----------|
| | | | | |
| 0.5 | 0.496 | -0.8 | 0.465 | +7.0 |
| 1.0 | 0.883 | -11.7 | 1.12 | +12.0 |
| 3.0 | 3.14 | +4.8 | 3.04 | +1.3 |
| 5.0 | 5.04 | +0.8 | 5.64 | +12.8 |
| 10.0 | 9.78 | -2.2 | 10.86 | +8.6 |

三、标准混合正烷烃培养基中正烷烃的测定

原材料为200#轻蜡^[1]。配制10ml混合正烷烃浓度分别为(%)：0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、

10.0(V/V)的标准混合正烷烃培养基,分别用四倍体积正己烷提取,取10ml正己烷提取液,加入不同量的正十五烷作为内标物,用气液色谱仪分析,结果见表2。

表2 正烷烃的测定结果

| 结果 轻烃浓度(%) | 项目 各组分浓度 (%) | 轻油总浓度 (%) | 误差 (%) |
|---------------|---|--------------|-----------|
| | | | |
| 1.0 | C ₁₀ 0.147 C ₁₁ 0.274 C ₁₂ 0.260 C ₁₃ 0.233 C ₁₄ 0.019 | 0.933 | -6.7 |
| 2.0 | C ₁₀ 0.234 C ₁₁ 0.484 C ₁₂ 0.538 C ₁₃ 0.484 C ₁₄ 0.053 | 1.79 | -10.5 |
| 3.0 | C ₁₀ 0.362 C ₁₁ 0.747 C ₁₂ 0.838 C ₁₃ 0.736 C ₁₄ 0.078 | 2.76 | -8.0 |
| 5.0 | C ₁₀ 0.678 C ₁₁ 1.412 C ₁₂ 1.584 C ₁₃ 1.394 C ₁₄ 0.113 | 5.18 | +3.6 |
| 10.0 | C ₁₀ 1.261 C ₁₁ 2.585 C ₁₂ 2.899 C ₁₃ 2.668 C ₁₄ 0.271 | 9.68 | -3.2 |

四、发酵液中残烃的测定

在培养基中(%)：(KH₂PO₄0.8, MgSO₄·7H₂O0.05, 玉米浆0.15, 酵母膏0.25、尿素0.2),于8磅30分钟灭菌后加入4%的正十六烷,接入5%在麦芽汁培养基上摇动培养24小时的

讨 论

在所用溶剂体积为发酵液 3 倍以下时, 提取过程中乳化严重, 必须离心才能分层。用溶剂越少, 乳化越严重, 提取收率越低, 误差增大。为了消除发酵液中乳化剂对提取的干扰, 应采用 4 倍体积溶剂提取合适。无论用内标法或外标法, 测定单一正烷烃或混合正烷烃, 其最大误差均在 $\pm 10\%$ 左右。这为测定不同发酵时间的发酵液中正烷烃含量提供了简便可行的方法。

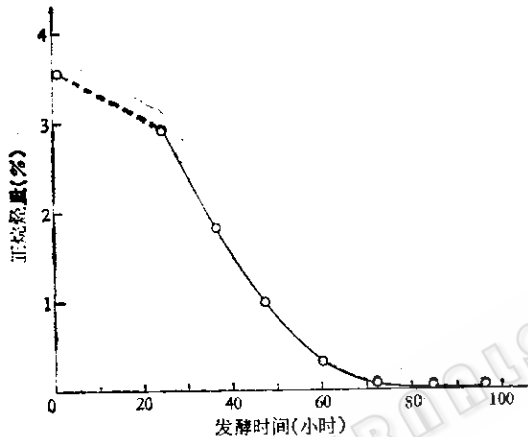


图 3 残烃与发酵时间的关系

U_{3-21} 菌的液体种子, 培养并测定不同时间发酵液中残烃含量, 结果见图 3。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所烃代谢组、发酵车间: 微生物学通报, 7(1): 13—16, 1980。