

· 综 述 ·

## 长链二元酸发酵菌种创制和工艺研究进展

张全<sup>1</sup>, 文志琼<sup>2</sup>, 张霖<sup>1</sup>, 樊亚超<sup>1</sup>, 李福利<sup>2,3</sup>

1 中国石化大连(抚顺)石油化工研究院, 辽宁 大连 116045

2 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

3 山东能源研究院, 山东 青岛 266101

张全, 文志琼, 张霖, 樊亚超, 李福利. 长链二元酸发酵菌种创制和工艺研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4420-4431.  
ZHANG Q, WEN ZQ, ZHANG L, FAN YC, LI FL. Strain engineering and fermentation technology for production of long-chain dicarboxylic acid: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4420-4431.

**摘 要:** 长链二元酸作为合成多种高附加值化学品的原料, 已广泛应用于化工、农业和医药等领域, 目前全球对于长链二元酸的需求呈逐年增长态势。化学法合成长链二元酸对反应条件要求严苛且工艺复杂, 而微生物发酵合成在经济性和难易度等方面具有无可比拟的优势。本文综述了长链二元酸的合成方法, 包括化学合成法和微生物发酵法, 分子工程选育高产菌株的进展以及生物发酵法生产长链二元酸的产业化现状, 并就其存在的问题进行了探讨, 最后对合成生物学创制长链二元酸高产菌株进行了总结和展望。

**关键词:** 假丝酵母; 长链二元酸; 微生物发酵; 菌种选育; 基因工程

## Strain engineering and fermentation technology for production of long-chain dicarboxylic acid: a review

ZHANG Quan<sup>1</sup>, WEN Zhiqiong<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, FAN Yachao<sup>1</sup>, LI Fuli<sup>2,3</sup>

1 Sinopec Dalian Petrochemical Research Institute, Dalian 116045, Liaoning, China

2 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

3 Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, Shandong, China

**Abstract:** Long-chain dicarboxylic acid (DCA), a building block for synthesizing a variety of high value-added chemicals, has been widely used in agriculture, chemical, and pharmaceutical industries.

**Received:** February 24, 2022; **Accepted:** July 18, 2022

**Supported by:** Sino-Petroleum Research Fund (418012-1)

**Corresponding author:** LI Fuli. E-mail: Lifl@qibebt.ac.cn

**基金项目:** 中国石化课题 (418012-1)

The global demand for DCA is increasing in recent years. Compared with chemical synthesis which requires harsh conditions and complicated processes, fermentative production of DCA has many unparalleled advantages, such as low cost and mild reaction conditions. In this review, we summarized the chemical and microbial synthesis methods for DCA and the commercialization status of the fermentation process. Moreover, the advances of using molecular and metabolic engineering to create high-yielding strains for efficient production of DCA were highlighted. Furthermore, the challenges remaining in the microbial fermentation process were also discussed. Finally, the perspectives for developing high titer DCA producing strains by synthetic biology were proposed.

**Keywords:** *Candida*; long-chain dicarboxylic acid; microbial fermentation; strain breeding; gene engineering

长链二元酸 (long-chain dicarboxylic acid, DCA) 是指碳链中含有 10 个以上碳原子,且  $\alpha$ 、 $\omega$  位各有一个羧基的有机二羧酸,其结构通式为  $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  ( $n \geq 8$ ), 缩写式为:  $\text{DC}_n$  ( $n \geq 10$ ), 包括饱和及不饱和二羧酸。作为重要的精细化工产品原料,长链二元酸可以合成高性能尼龙工程塑料、机械等领域用的特种尼龙、日化产品等用的香料、高级油漆和涂料、服装用聚酰胺热熔胶<sup>[1]</sup>和耐寒性增塑剂、树脂、高温电介质、高级润滑油、农药和医药领域<sup>[2]</sup>等一系列高附加值的特殊化学品。朱峰等曾报道全球二元酸下游产品需求量呈逐年增长的态势<sup>[3]</sup>。近年来,现代工业生产对于长链二元酸衍生产品的需求显著增加,长链二元酸具有广泛的应用前景<sup>[4]</sup>。

## 1 长链二元酸的制备方法

自然界中不单独存在长链二元酸。目前,根据其链长的不同,生产方法主要有 3 种,包括催化油脂法、化学合成法和生物发酵法。

### 1.1 催化油脂法

魏延雨<sup>[5]</sup>将蓖麻子油经 NaOH 皂化后生成蓖麻油酸,后在高温 (260–280 °C) 下以苯酚作为稀释剂经 NaOH 裂解后生成癸二酸 (DC10)。从菜籽油中提取出甘油芥酸酯后用臭氧氧化裂

解可制取 DC13; 以蒜头果油为原料提取出的脑神经酸经裂解后可以得到 DC15; 但是,该法合成的产物纯度较低,易受原料影响,规模化生产可能性不大。

### 1.2 化学合成法

该方法制备 DCA 主要有以下几条途径: (1) 正构烷烃的直接氧化: 在反应过程中若烷烃链断裂则得不到对应链长的 DCA, 且产物不单一; (2) 以低碳链的二元酸为原料, 经脂化、还原、溴化、氰化和水解等反应步骤合成: 如以己二酸为原料生产癸二酸; (3) 经二烯烃氧化或其他化学反应制备某些 DCA: 以丁二烯为原料经过 9 个复杂的化学反应步骤合成 DC12; (4) 环状化合物氧化或其他化学反应制备。化学合成法最高只能合成 12 个碳原子的二元酸, 且具有制备工艺复杂、反应条件严苛、副产物多等特点。

### 1.3 微生物发酵法

在常温常压下,以正构烷烃为原料,通过微生物特有的氧化能力,将正构烷烃分子两端的甲基氧化为羧基,转化成相应碳数的二元羧酸<sup>[6]</sup>。生物发酵法可以生产出化学合成法所不能生产的长链二元酸,如 DC13 以上的长链二元酸,极大地拓展了长链二元酸在工业领域的应用<sup>[7]</sup>; 同时,在经济性和合成的难易方面具有无可比拟的优越性<sup>[8-9]</sup>。目前,我国在微生物发

醇生产长链二元酸方面居于世界领先地位。

## 2 微生物发酵产长链二元酸的研究现状

### 2.1 长链二元酸合成途径

烷烃经初级氧化变为相应链长的脂肪酸，这个过程通常发生在内质网或过氧化物酶体中。首先，烷烃被羟化酶复合物氧化为脂肪醇，该复合物涉及细胞色素P450 (cytochrome P450, CYP450，因其在450 nm处有特异吸收峰而得名) 单加氧酶及NADPH依赖型细胞色素P450还原酶 (NADPH-dependent cytochrome P450 reductase, NCP)。在内质网中，脂肪醇被NAD(P)<sup>+</sup>依赖型脂肪醇脱氢酶 (fatty-alcohol dehydrogenase, ADH) 进一步氧化为脂肪醛，而长链脂肪醇氧化为醛则主要在过氧化物酶体由

脂肪酸氧化酶 (fatty acid oxidase, FAO) 催化完成<sup>[10-12]</sup>。NAD(P)<sup>+</sup>依赖性脂肪醛脱氢酶 (fatty-aldehyde dehydrogenase, FALDH) 催化脂肪醛转化为脂肪酸<sup>[13-14]</sup>。

一方面，脂肪酸可以通过内质网的 $\omega$ -氧化途径转化为DCA (图1)。在 $\omega$ -氧化过程中，脂肪酸首先在碳链 $\omega$ 位被 $\omega$ -羟化酶复合物氧化形成相应的 $\omega$ -羟基脂肪酸。 $\omega$ -羟基脂肪酸被ADH或FAO进一步氧化成 $\omega$ -醛基脂肪酸。在不同物种中，这两个酶作用的主次不尽相同。维斯假丝酵母 (*Candida viswanathii*) 中的ADHs在 $\omega$ -羟基的氧化中起主导作用<sup>[15]</sup>。而在解脂耶罗维亚酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 中，则是FAO起主要作用<sup>[16-17]</sup>。最后在脂肪醛脱氢酶 (FALDH) 的作用下被进一步转化为DCA。DCA也可通过 $\beta$ -氧化途径进一步降解。

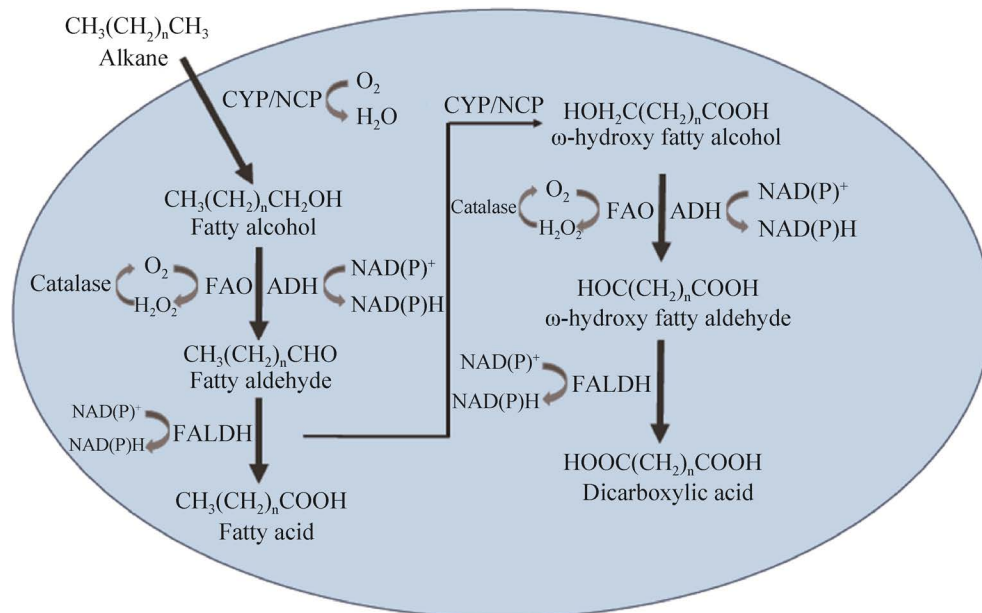


图1 烷烃的 $\omega$ -氧化途径 CYP/NCP: 细胞色素P450氧化酶/NADPH依赖的细胞色素P450还原酶复合物; ADH: 脂肪醇脱氢酶; FAO: 脂肪酸氧化酶; FALDH: 脂肪醛脱氢酶

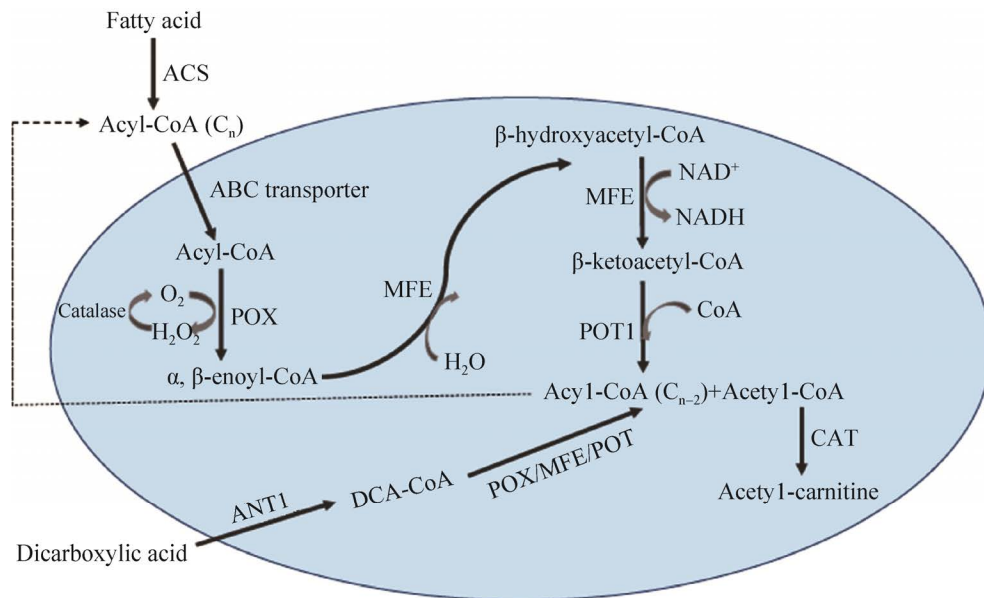
Figure 1  $\omega$ -oxidation of alkane into dicarboxylic acid. CYP/NCP: cytochrome P450 monooxygenase/ADPH-dependent cytochrome P450 reductase complex; ADH: fatty-alcohol dehydrogenase; FAO: fatty acid oxidase; FALDH: fatty-aldehyde dehydrogenase.

另一方面,脂肪酸或二元酸也能通过 $\beta$ -氧化发生降解形成乙酰辅酶A(图2)。 $\beta$ -氧化的初始步骤由过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶(peroxisomal acyl-CoA oxidase, POX)催化为 $\alpha,\beta$ -烯酰辅酶A<sup>[18]</sup>;接着由多功能酶(multi-functional enzyme, MFE)催化,该酶作为烯酰辅酶A水合酶和 $\beta$ -羟酰辅酶A脱氢酶复合物,催化产生 $\beta$ -羟酰辅酶A和 $\beta$ -酮脂酰辅酶A,最后由 $\beta$ -酮脂酰辅酶A硫解酶(peroxisomal thiolase, POT1)分解形成乙酰辅酶A。哺乳动物的 $\beta$ -氧化主要发生在过氧化物酶体和线粒体中,而在一些低等的真菌中此过程主要发生在过氧化物酶体中<sup>[19]</sup>。

## 2.2 产长链二元酸的微生物菌株

1963年, Kester和Foster<sup>[20]</sup>观察到棒状杆菌能将正烷烃分子的两末端添加4个氧原子氧化成饱和二元脂肪酸;随后,在葡萄孢菌和假

单胞杆菌等微生物中也观察到该氧化反应,但形成的二元酸多为短链二元酸且产量很低。1972年, Uchio和Shiio用阴沟假丝酵母菌(*Candida cloucae*) 310变种MR-12,成功发酵生产十四碳二元酸,产量最高可达61 g/L<sup>[21]</sup>。迄今为止,针对长链DCA生产进行研究和代谢工程改造的酵母主要有热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)<sup>[22]</sup>、*Yarrowia lipolytica*<sup>[16]</sup>、*Candida viswanathi*<sup>[23]</sup>、球拟假丝酵母(*Starmerella bombicola*)<sup>[24]</sup>、麦芽糖假丝酵母(*Candida maltosa*)<sup>[25]</sup>以及近年来发现的吉利蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*)<sup>[26]</sup>。目前,用于生物发酵法研究和工业化生产DCA的热带假丝酵母均为经野生型菌株诱变后筛选所得,野生型酵母菌株的产酸水平较弱(表1),因此,对于高产DCA菌株的选育就显得至关重要。



**图2 脂肪酸或二元酸的 $\beta$ -氧化途径** ACS: 脂酰辅酶A合成酶; POX: 酰基辅酶A氧化酶; MFE: 烯酰辅酶A水合酶和 $\beta$ -羟酰辅酶A脱氢酶复合物; POT1:  $\beta$ -酮脂酰辅酶A硫解酶; ANT1: ATP转运蛋白; CAT: 肉碱乙酰转移酶

Figure 2  $\beta$ -oxidation of fatty acid or dicarboxylic acid. ACS: acyl-CoA synthetase; POX: acyl-CoA oxidase (POX); MFE: enoyl-CoA hydratase and 2-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; POT1:  $\beta$ -ketoacyl-CoA thiolase; ANT1: ATP transporter; CAT: carnitine acyltransferase.

**表1** 不同微生物利用烷烃或脂肪酸为底物合成二元酸

Table 1 Production of DCA production from alkanes or fatty acids using different microbial strains

Strains	Substrates	DCA (g/L)	References
<i>S. cerevisiae</i>	Lauric acid (C12)	-	[27]
<i>C. neoformans</i>	Pentadecane (C15)	0.61	[28]
<i>P. aeruginosa</i>	Pentadecane (C15)	0.48	[29]
<i>C. cloacae</i>	Lauric acid (C12)	10.00	[30]
<i>S. bombicola</i>	Octadecane (C18)	5.60	[31]
<i>C. maltosa</i>	Tridecane (C13)	15.00	[32]
<i>Y. lipolytica</i>	Sunflower oil	23.00	[16]
<i>C. viswanathii</i>	Oleic acid (C18)	100.00	[33]
	Dodecane (C12)	230.00	

—: not detected.

## 2.3 高产 DCA 的微生物菌种创制

### 2.3.1 理化诱变

1979年,沈永强等利用热带假丝酵母的多倍体诱变菌株发酵,产物十三碳二元酸的产量达到62 g/L<sup>[34]</sup>。2002年,山东凯赛生物有限公司,经紫外诱变筛选出1株突变的假丝热带酵母菌株,能够以C14为底物发酵生产对应的二元酸,产量达到190 g/L<sup>[35]</sup>;2004年,该公司又经诱变处理筛选到1株突变株,能将C9-C12烷烃或脂肪酸发酵为相应的二元酸<sup>[36]</sup>;陈远童等用化学诱变剂亚硝基胍处理后得到1株突变株,DCA的产量达到192.3 g/L<sup>[37]</sup>;他们还利用化学诱变和紫外诱变相结合的方式筛选到1株 $\omega$ -氧化增强的假丝酵母菌株,DCA的产量达145 g/L<sup>[38]</sup>。

### 2.3.2 基因工程改造

热带假丝酵母能够以烷烃或脂肪酸作为单一碳源代谢合成长链二元酸<sup>[39]</sup>。位于细胞膜或过氧化物酶体膜上的脂肪酸转运蛋白,在长链二元酸合成的过程中起着重要的作用。张利华等<sup>[40]</sup>研究了热带假丝酵母中细胞膜蛋白 Fat1p 和过氧化物酶体膜蛋白 Pxa1p 在 DCA 合成中的

作用:单拷贝或双拷贝敲除 *fat1* 基因后,DCA 的产量分别降低了 65.14%和 88.38%,有意思的是,*pxa1* 双拷贝敲除菌株的 DCA 产量降低了 56.19%,而单拷贝敲除的菌株 DCA 产量却增加了 21.90%,说明 *pxa1* 的单拷贝缺失可能降低了脂肪酸转运至过氧化物酶体的  $\beta$ -氧化,从而使 DCA 的产量增加,但其具体作用机制有待进一步研究。

彭建等通过启动子替换工程,将 *C. tropicalis* 1798 菌株的甘油激酶的内源启动子替换后,重组菌株在以油脂为底物的发酵中长链二元酸 (DC12) 的产量增加了 32.7%<sup>[41]</sup>。王俊卿等<sup>[42]</sup>将细胞色素 P450 和 P450 还原酶基因的启动子替换为组成型启动子后,重组菌株的 DCA 产量达到 11.39 g/L,并且通过分批发酵 DCA 的产量达到 32.84 g/L,相较于野生型,产量提高了 11.4 倍。

根据代谢途径,对于高产 DCA 菌株的基因工程改造主要遵循两条策略:(1) 增强  $\omega$ -氧化途径的基因表达;(2) 阻碍  $\beta$ -氧化途径的基因表达(图 2)。对于基因突变菌株资源的创制,如前所述,一方面通过随机突变的策略来获得高产 DCA 的菌株<sup>[31,39]</sup>;而代谢途径上基因的定向改造用于菌株的遗传修饰则更为常见<sup>[18,23,26,32]</sup>。

$\omega$  氧化途径的增强可以增加 DCA 的产量。 $\omega$ -羟化酶复合物由 CYP52 家族的细胞色素 P450 单加氧酶 (CYP) 和 NADPH 细胞色素 P450 还原酶 (NCP) 组成,该复合物催化的  $\omega$ -氧化反应是第一个也是主要的限速步骤。在同一物种中存在多个 CYP 的同工酶,如 *Y. lipolytica* 有 12 个同工酶<sup>[43]</sup>,*C. maltosa* 有 8 个<sup>[44-45]</sup>,*C. tropicalis* ATCC 750 和 *C. tropicalis* ATCC 20336 有 10 个<sup>[46-48]</sup>,*S. bombicola* 有 3 个同工酶<sup>[49]</sup>,而分别只有 1 个基因编码 NCP<sup>[50]</sup>。研究表明,*cyp* 基因的表达可受到底物的诱导,从而

使得几种与长链DCA合成相关的CYP编码基因被鉴定<sup>[26,45,47-48]</sup>。Werner等在*C. guilliermondii*中过表达P450单加氧酶基因(*cyp52*)后DCA的产量增加<sup>[26]</sup>。Piccataggio等<sup>[25]</sup>研究证实,在 $\beta$ -氧化阻断的*C. viswanathii*菌株H5343或ATCC 20962中增加CYP和NCP的活力可使DCA产量增加。Kogure等<sup>[51]</sup>还观察到在经重复诱变获得的 $\beta$ -氧化受损的*C. maltosa*中,*alk*基因的诱导表达可使DCA产量增加。*C. guilliermondii*中*cyp*基因的过表达增加了长链DCA的产量,而NCP的过表达则不影响DCA产量。 $\omega$ -氧化的第二步由脂肪酸氧化酶(fatty acid oxidase, FAO)催化完成。Eirich等<sup>[52]</sup>在*C. tropicalis*株中鉴定了3个脂肪酸氧化酶(FAO1、FAO2a、FAO2b),并通过研究证实只有*fao1*在DCA的合成中高表达。Gatter等<sup>[16]</sup>在*Y. lipolytica* *pox1-6*缺失菌株中过表达*fao1*的同源基因增加了十二烷酸的产量,表明 $\omega$ -羟基脂肪酸的氧化是DCA合成过程中的限速步骤,因此可以作为代谢工程改造的靶点。

另一方面,过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶(POX)是 $\beta$ -氧化的第一个限速酶,因而可以作为阻断 $\beta$ -氧化和将脂肪酸重定向到 $\omega$ -氧化途径的靶标。POX也存在多个同工酶,在*C. viswanathii* ATCC 20336和*C. guilliermondii*<sup>[27]</sup>中分别有3种同工酶(POX1-3和POX2, 4, 5),*C. maltosa*中有2个(POX1、POX2)<sup>[53]</sup>,*Y. lipolytica*中有6个(POX1-6)<sup>[54]</sup>。在二倍体酵母*C. viswanathii* ATCC 20336中敲除*pox2*和*pox5*及其等位基因可使菌株的DCA产量增加。Werner等<sup>[26]</sup>在*C. guilliermondii*中鉴定了与DCA合成途径相关的基因功能,筛选获得了缺失2个*pox*基因的菌株。结果发现,突变菌株除生长受到抑制外,DCA降解也加快。此外,代谢工程可以应用于POX下游 $\beta$ -氧化途径的其

他关键酶的改造,如MFE;在*Y. lipolytica*中敲除*mfe2*提高了短链DCA(C9)的产量,而长链DCA产量并未增加。Picataggio等<sup>[55]</sup>采用基因工程技术构建了1株 $\beta$ -氧化阻断型菌株H5343,将DC12的产量从95 g/L提高到140 g/L。但Hara等研究表明,在*C. tropicalis*中增加单个 $\beta$ 氧化酶系基因*pox4*的表达并不影响DCA的产量<sup>[32]</sup>。

Kanayama等<sup>[56]</sup>研究表明,*C. tropicalis*中的 $\beta$ -酮酰基-CoA硫解酶III对于长链脂肪酸的 $\beta$ -氧化也是必不可少的。肉碱乙酰转移酶(carnitine-acyltransferase, CAT)将乙酰辅酶A转运到线粒体进入三羧酸循环<sup>[22]</sup>。王俊卿等通过敲除肉碱乙酰基转移酶基因*cat*后,DCA的产量增加到8.27 g/L<sup>[42]</sup>,说明阻断 $\beta$ -氧化途径能够促进DCA的积累。在*C. tropicalis*中,杂合的*cat*缺失菌株中CAT活性降低后不仅提高了烷烃转化率,同时增加了DCA产量。然而,由于能量供应不足,*cat*基因双拷贝缺失的菌株细胞生长受到抑制,也无法积累DCA。

Thevenieau等<sup>[57]</sup>鉴定了*Y. lipolytica*中在疏水基质上生长受到影响的插入突变体,其编码硫氧还蛋白还原酶和过氧化物酶体ATP转运蛋白(ANT1)等基因被破坏。酿酒酵母中的ANT1介导ATP转运到过氧化物酶体,这是酰基将中链脂肪酸催化成相应CoA酯所必需的。*ant1*缺失突变体不能在具有C10链长的烷烃上生长,而该突变几乎不影响菌株在C12-C15链长烷烃上生长,且完全不影响C16链长烷烃的利用;而Koivuranta等<sup>[58]</sup>研究表明在*Y. lipolytica*中*ant1*敲除后壬酸(C9)产量显著提高,同时月桂酸(C12)产量也有相应提高。

### 2.3.3 合成生物学和系统生物学策略

工业微生物菌株的创制是传统的遗传改造和系统生物学的结合。Sathesh-Prabu等<sup>[59]</sup>将



CYP450介导的 $\omega$ -氧化途径在大肠杆菌中异源表达,在发酵20 h时DC12和DC14的产量分别达到41 mg/L和163 mg/L;并且,在发酵时加入血红素前体,DC12和DC14的产量分别增加到了159 mg/L和410 mg/L。Mishra等<sup>[60]</sup>通过全基因组范围的代谢建模鉴定了*C. tropicalis* iCT646中640个独特的基因和945个代谢反应,并且将其与*Y. lipolytica*的代谢网络<sup>[61-62]</sup>进行比较,发现*C. tropicalis*主要集中于脂质代谢,且其体内存在1条详细的 $\omega$ -氧化途径,而这条途径有望为高产DCA菌株的设计提供新的靶点<sup>[60]</sup>。另外,他们还发现,通过基本的代谢流分析,在*C. tropicalis*中大约60%的底物是通过 $\omega$ -氧化,而剩余的底物在经过初级的 $\alpha$ -氧化后被分泌出去或者合成其他的高级脂肪酸,因此可在发酵期通过加入脂肪酸合成抑制剂或者引入抑制脂肪酸合成酶表达的基因从而减少脂肪酸的合成,进而增加DCA的产量<sup>[60]</sup>。

## 2.4 微生物发酵长链二元酸产业化现状

国内外对发酵法生产二元酸的研究已有40多年的历史,有不同的技术路线和方法,目前只有中国、日本、美国和德国开展长链二元酸发酵的产业化。我国的技术处于世界领先地位,产生的长链二元酸不仅能满足国内需求,另有部分可供出口。微生物发酵生产长链二元酸研究的成功和工业化生产,解决了用纯化学方法难以合成的问题,开辟了长链二元酸的新来源,成为生物工程领域产业化的优秀案例。预计到2025年,长链DCA的全球市场将达到3亿美元,但是,其高成本和应用局限性也阻碍了其市场发展前景<sup>[63]</sup>。目前微生物发酵生产长链二元酸,主要针对如下问题开展优化与提升。

### 2.4.1 生产成本

发酵生产DCA的成本随着产业化过程有

所降低,但还有下降空间。DCA发酵的成本主要体现在原料和能耗。烷烃作为发酵底物,不仅价格高,而且消耗量大。从菌株层面,强化菌株的 $\alpha$ - $\omega$ 氧化酶系,同时弱化 $\beta$ -氧化途径可以提高二元酸的产率<sup>[42,59-60]</sup>。在工艺层面,采用低pH发酵可以减少酸碱投入,还能缓解后期废水脱盐的压力<sup>[64]</sup>。液态烷烃破乳处理后加入抑菌剂,然后经过微波灭菌,可以降低常规烷烃灭菌带来的损失,以及杂菌污染问题<sup>[65]</sup>;另外,通过缩短发酵时间、提高产酸量、减少培养基用量和降低通气量也能有效降低能耗和原料单耗,降低生产成本<sup>[66]</sup>。目前在碳达峰、碳中和的背景下,原油价格上涨,烷烃来源的不足,会进一步增加长链二元酸的生产成本。如何以油脂和费托合成油等可再生资源、廉价烷烃原料发酵法生产长链二元酸<sup>[67-68]</sup>,是当前产业化面临的新机遇和挑战。

### 2.4.2 提高菌种产酸水平

长链二元酸微生物发酵生产强度偏低。曹务波等公开了十七碳二元酸的生产方法,在50 m<sup>3</sup>发酵罐中144 h的产酸量为163 g/L,生产效率为1.13 g/(L·h)<sup>[69]</sup>。陈远童等2007年和2008年分别报道了十二碳和混合DCA的生产效率为1.3 g/(L·h)<sup>[37]</sup>和0.92 g/(L·h)<sup>[70]</sup>。通过菌体的膜回流技术实现高密度发酵和烷烃的循环回用,DCA的生产效率可以达到1.6 g/(L·h)<sup>[71]</sup>。微生物的代谢反应复杂,发酵过程中会产生一些多元有机酸等副产物,同时积累许多菌体蛋白,使得发酵过程中起泡现象严重,进而影响发酵。在发酵过程中添加甘油作为消泡剂,在不影响微生物生长的前提下能有效提高发酵效率,增加二元酸的积累<sup>[72]</sup>;另外,在发酵过程中通过补加乳化的十二碳烷烃,产酸效率从0.87 g/(L·h)提高到1.04 g/(L·h)<sup>[73]</sup>。曹务波等以石油副产物轻蜡油为原料,通过菌株 $\omega$ 氧化酶强化、发酵过

程精细调控和串联罐等技术, DC12的产酸水平从140–150 g/L提高到190–220 g/L, DC13产酸水平从130–140 g/L提高到185–200 g/L<sup>[74]</sup>。可见, 二元酸的产酸速率和产酸量还有提升的空间, 持续选育高产DCA的菌种仍然是提高生产效率的主要途径, 合成生物学技术的持续进步有望进一步推动产酸水平的提升。

### 2.4.3 分离提纯工艺

由于长链二元酸发酵采用典型的气-液(水相)-油(烷烃)-固(菌体)四相体系, 发酵液组成成分复杂, 因而产物的分离和提纯需经过复杂的工艺手段。长链二元酸精制方法主要有水相法和溶剂法。羊晓磊于2020年公开1项发明专利, 将固液分离后的发酵液脱色处理后, 再采用酸化结晶的方式得到长链二元酸<sup>[75]</sup>。另外, 将发酵液控制 $\text{pH} \leq 5$ , 将固液混合物离心分离, 再分离上述产物二元酸含量较高的第二固液混合液, 可以得到较高纯度的二元酸<sup>[76]</sup>。采用有机溶剂进行重结晶, 也可以实现二元酸的纯化。报道的有机溶剂有低碳醇类、低碳酸类、酯类、醚类和酮类等, 如乙醇、乙酸、乙醚、乙酸丁酯和丙酮等或它们的混合物。溶剂提取法又分为结晶法、萃取法和色谱法等。结晶法是将发酵的重组分经过降温、溶析等步骤后使得长链二元酸形成结晶从而达到分离的目的。乙酸结晶法<sup>[77]</sup>比较常用, 产品纯度满足聚合级要求, 但是该方法对设备材质的要求较高, 产品中存在乙酸残留, 限制了其应用范围, 而且由于室温时长链二元酸在乙酸中仍有较高的溶解度, 产品回收率偏低, 还需对分离母液进行进一步分离纯化处理<sup>[78]</sup>。萃取精制长链二元酸技术消耗物料量少、溶剂损耗低, 所得到的长链二元酸的纯度高, 总氮含量达到了聚合级要求<sup>[79-80]</sup>。另外, 利用色谱能够对不同长度的二元酸进行简便地分离, 并且去除色素杂

质<sup>[81]</sup>。利用酸醇的酯化反应分离发酵液中的二元酸, 得到的二元酸产物纯度较高<sup>[82]</sup>, 但是酯化法用于分离高沸点的二元酸产物会增加生产成本。因此, 针对不同提取技术中存在的问题进行改进, 持续优化现有技术或开发新的提取工艺、提高设备水平, 也将是长链二元酸产业化向更好发展进程中的重要挑战。

## 3 总结与展望

长链二元酸是合成许多化工产品的重要原料。近些年, 绿色可持续性已经成为化工行业亟待解决的一个重要问题, 微生物发酵合成长链二元酸为其提供了部分解决方案。随着分子生物学和合成生物技术的发展, 可以根据需要进行理性设计, 从而产生具有更优良性能的功能模块。目前, 合成DCA的许多代谢途径涉及人工设计和改造, 因此, 寻求更高产量的DCA所面临的一个挑战便是鉴别DCA合成途径中的关键酶类。合成生物技术的进步为探索更高级的催化元件提供可能; 另一方面, 计算生物学的发展也为我们探索未知的DCA生物合成途径提供了工具。高通量筛选、代谢工程改造以及合成生物学和系统生物学方法的整合进而对菌株进行理性设计等方法为我们设计高产的微生物菌株提供了一个新的出发点, 开展以可再生资源为原料的长链二元酸从头合成成为可能。

## REFERENCES

- [1] 李占朝. 十二碳二元酸的精制工艺研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2009.  
Li ZC. Study on process for purification of 1,12-dodecanedioic acid[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2009 (in Chinese).
- [2] 邵冲. 十二碳二元酸粗品重结晶纯化工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.  
Shao C. Study on recrystallization process for



- purification of crude 1,12-dodecanedioic acid[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [3] 朱峰, 王领民. 长链二元酸下游产品市场前景看好. 中国石化报, 2012-03-27(006).  
Zhu F, Wang LM. Promising market prospects for downstream products of long-chain dibasic acids. China Petrochemical News, 2012-03-27(006) (in Chinese).
- [4] 王茜茜, 戴璐, 介素云, 等. 长链脂肪族二元酸的合成及其在缩聚反应中的应用. 化学进展, 2019, 31(1): 70-82.  
Wang XX, Dai L, Jie SY, et al. Synthesis and application in the polycondensation of long-chain aliphatic dicarboxylic acids. Prog Chem, 2019, 31(1): 70-82 (in Chinese).
- [5] 魏延雨. 生物基尼龙研究进展. 现代塑料加工应用, 2020, 32(2): 59-63.  
Wei YY. Progress in bio-based nylon. Mod Plast Process Appl, 2020, 32(2): 59-63 (in Chinese).
- [6] Hattori K, Suzuki T. Microbial production of d-arabitol by n-alkane-grown *Candida tropicalis*. Agri Biol Chem, 1974, 38(10): 1875-1881.
- [7] 戴端芳, 杨晨, 秦兵兵, 等. 一种长链混合二元酸的精制方法: CN104844440B, 2019-05-31.  
Dai DF, Yang C, Qing BB, et al. Method for refining mixed long chain dicarboxylic acids: CN104844440B, 2019-05-31 (in Chinese).
- [8] 桂秋芬, 姚嘉旻, 蒋洋松, 等. 利用热带假丝酵母发酵生产长链二元酸的研究进展. 化学与生物工程, 2014, 31(1): 17-22.  
Gui QF, Yao JM, Jiang YS, et al. Research progress of production of long chain dicarboxylic acid by fermentation of *Candida Tropicalis*. Chem Bioeng, 2014, 31(1): 17-22 (in Chinese).
- [9] Li WN, Shen XL, Wang J, et al. Engineering microorganisms for the biosynthesis of dicarboxylic acids. Biotechnol Adv, 2021, 48:107710.
- [10] Mauersberger S, Drechsler H, Oehme G, et al. Substrate specificity and stereoselectivity of fatty alcohol oxidase from the yeast *Candida maltosa*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37(1): 66-73.
- [11] Barth G, Künkel W. Alcohol dehydrogenase (ADH) in yeasts. II. NAD<sup>+</sup>-and NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenases in *Saccharomycopsis lipolytica*. Z Allg Mikrobiol, 1979, 19(6): 381-390.
- [12] Iwama R, Kobayashi S, Ohta A, et al. Alcohol dehydrogenases and an alcohol oxidase involved in the assimilation of exogenous fatty alcohols in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res, 2015, 15(3): fov014.
- [13] Ahvazi B, Coulombe R, Delarge M, et al. Crystal structure of the NADP<sup>+</sup>-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. Biochem J, 2000, 349(Pt 3): 853-861.
- [14] Buchhaupt M, Guder J, Sporleder F, et al. Oxidation of fatty aldehydes to fatty acids by *Escherichia coli* cells expressing the *Vibrio harveyi* fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH). World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29(3): 569-575.
- [15] Lu W, Ness JE, Xie W, et al. Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. J Am Chem Soc, 2010, 132(43): 15451-15455.
- [16] Gatter M, Förster A, Bär K, et al. A newly identified fatty alcohol oxidase gene is mainly responsible for the oxidation of long-chain ω-hydroxy fatty acids in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res, 2014, 14(6): 858-872.
- [17] Gabriel F, Accoceberry I, Bessoule JJ, et al. A Fox2-dependent fatty acid β-oxidation pathway coexists both in peroxisomes and mitochondria of the ascomycete yeast *Candida lusitanae*. PLoS One, 2014, 9(12): e114531.
- [18] Cohen G, Fessl F, Traczyk A, et al. Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. Mol Gen Genet, 1985, 200(1): 74-79.
- [19] Feron G, Blin-Perrin C, Krasniewski I, et al. Metabolism of fatty acid in yeast: characterisation of β-oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidiobolus* sp. cultivated on ricinoleic acid methyl ester. FEMS Microbiol Lett, 2005, 250(1): 63-69.
- [20] Kester AS, Foster JW. Diterminal oxidation of long-chain alkanes by bacteria. J Bacteriol, 1963, 85(4): 859-869.
- [21] Uchio R, Shio I. Tetradecane 1,14-dicarboxylic acid production from n-hexadecane by *Candida cloacae*. Agri Biol Chem, 2008, 36(8): 1389-1397.
- [22] Cao Z, Gao H, Liu M, et al. Engineering the acetyl-CoA transportation system of *Candida tropicalis* enhances the production of dicarboxylic acid. Biotechnol J, 2006, 1(1): 68-74.
- [23] Picataggio S, Deanda K, Mielenz J. Determination of *Candida tropicalis* acyl coenzyme A oxidase isozyme function by sequential gene disruption. Mol Cell Biol, 1991, 11(9): 4333-4339.
- [24] De Graeve M, Van De Velde I, Saey L, et al.

- Production of long-chain hydroxy fatty acids by *Starmerella bombicola*. *FEMS Yeast Res*, 2019, 19(7): foz067.
- [25] Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, et al. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology*, 1992, 10(8): 894-898.
- [26] Werner N, Dreyer M, Wagner W, et al. *Candida guilliermondii* as a potential biocatalyst for the production of long-chain  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acids. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(3): 429-438.
- [27] Zimmer T, Kaminski K, Scheller U, et al. *In vivo* reconstitution of highly active *Candida maltosa* cytochrome P450 monooxygenase systems in inducible membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol*, 1995, 14(7): 619-628.
- [28] Chan EC, Kuo J. Biotransformation of dicarboxylic acid by immobilized *Cryptococcus* cells. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 20(8): 585-589.
- [29] Chan EC, Cheng CS, Hsu YH. Continuous production of dicarboxylic acid by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells. *J Ferment Bioeng*, 1997, 83(2): 157-160.
- [30] Green KD, Turner MK, Woodley JM. *Candida cloacae* oxidation of long-chain fatty acids to dioic acids. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27(3-5): 205-211.
- [31] Shiio I, Uchio R. Microbial production of long-chain dicarboxylic acids from n-alkanes: part I. Screening and properties of microorganisms producing dicarboxylic acids. *Agric Biol Chem*, 1971, 35: 2033-2042.
- [32] Hara A, Ueda M, Matsui T, et al. Repression of fatty-acyl-CoA oxidase-encoding gene expression is not necessarily a determinant of high-level production of dicarboxylic acids in industrial dicarboxylic-acid-producing *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(3-4): 478-485.
- [33] Cao W, Wang Y, Luo J, et al. Improving  $\alpha$ ,  $\omega$ -dodecanedioic acid productivity from n-dodecane and hydrolysate of *Candida* cells by membrane integrated repeated batch fermentation. *Bioresour Technol*, 2018, 260: 9-15.
- [34] 沈永强, 楼纯菊, 徐可仁, 等. 石油发酵及转化生产十三烷1:13二羧酸. *科学通报*, 1979, 24(6): 276-277. Shen YQ, Lou CJ, Xu KR, et al. Petroleum fermentation and conversion to produce tridecane 1:13 dicarboxylic acid. *Chin Sci Bull*, 1979, 24(6): 276-277 (in Chinese).
- [35] 陈远童, 衷金生, 刘文凤, 等. 一种利用微生物发酵高产 $\alpha$ 、 $\omega$ -正长链十四碳二元酸的方法: CN1502700, 2004-06-09. Chen YT, Zhong JS, Liu WF, et al. Method for high-yield  $\alpha$ ,  $\omega$ -normal long-chain tetradecane dicarboxylic acid by microbial fermentation: CN1502700, 2004-06-09 (in Chinese).
- [36] 邱勇隼, 李乃强, 胡兵, 等. 一种正长链二元酸的生产方法: CN1292072C, 2006-12-27. Qiu YX, Li NQ, Hu B, et al. Method of normal long-chain dibasic acid production: CN1292072C, 2006-12-27 (in Chinese).
- [37] 陈远童, 郝秀珍, 徐军. 生物合成生产十二碳二元酸的新方法: CN1928100A, 2007-03-14. Chen YT, Hao XZ, Xu J. Method for biosynthetic production of dodecanedioic acid: CN1928100, 2007-03-14 (in Chinese).
- [38] 陈远童, 郝秀珍, 方心芳. 微生物同步发酵生产长链 $\alpha$ 、 $\omega$ -二羧酸的方法: CN1048754C, 2000-01-26. Chen YT, Hao XZ, Fang XF. Method for producing long-chain  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acid by synchronous fermentation of microorganisms: CN1048754C, 2000-01-26 (in Chinese).
- [39] Werner N, Zibek S. Biotechnological production of bio-based long-chain dicarboxylic acids with oleogenic yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(11): 194.
- [40] Zhang LH, Xiu X, Wang ZR, et al. Increasing long-chain dicarboxylic acid production in *Candida tropicalis* by engineering fatty transporters. *Mol Biotechnol*, 2021, 63(6): 544-555.
- [41] 彭健, 苏静, 杨晓慧, 等. 热带假丝酵母高效利用甘油研究. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(2): 38-45. Peng J, Su J, Yang XH, et al. Studies on efficient utilization of glycerol of *Candida tropicalis*. *China Biotechnol*, 2018, 38(2): 38-45 (in Chinese).
- [42] Wang JQ, Peng J, Fan H, et al. Development of *mazF*-based markerless genome editing system and metabolic pathway engineering in *Candida tropicalis* for producing long-chain dicarboxylic acids. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(11): 971-981.
- [43] Iida T, Sumita T, Ohta A, et al. The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new *CYP52* family members. *Yeast*, 2000, 16(12): 1077-1087.
- [44] Ohkuma M, Muraoka S, Tanimoto T, et al. *CYP52* (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida*

- maltosa*: identification and characterization of eight members. DNA Cell Biol, 1995, 14(2): 163-173.
- [45] Zimmer T, Ohkuma M, Ohta A, et al. The CYP52 multigene family of *Candida maltosa* encodes functionally diverse n-alkane-inducible cytochromes P450. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224(3): 784-789.
- [46] Seghezzi W, Meili C, Ruffiner R, et al. Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family CYP52 of *Candida tropicalis*. DNA Cell Biol, 1992, 11(10): 767-780.
- [47] Craft DL, Madduri KM, Eshoo M, et al. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to alpha, omega-dicarboxylic acids. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(10): 5983-5991.
- [48] Eschenfeldt WH, Zhang Y, Samaha H, et al. Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of *Candida tropicalis*. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(10): 5992-5999.
- [49] Huang FC, Peter A, Schwab W. Expression and characterization of CYP52 genes involved in the biosynthesis of sophorolipid and alkane metabolism from *Starmerella bombicola*. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(2): 766-776.
- [50] He F, Chen YT. Cloning and heterologous expression of the NADPH cytochrome P450 oxidoreductase genes from an industrial dicarboxylic acid-producing *Candida tropicalis*. Yeast, 2005, 22(6): 481-491.
- [51] Kogure T, Horiuchi H, Matsuda H, et al. Enhanced induction of cytochromes P450alk that oxidize methyl-ends of n-alkanes and fatty acids in the long-chain dicarboxylic acid-hyperproducing mutant of *Candida maltosa*. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271(1): 106-111.
- [52] Eirich LD, Craft DL, Steinberg L, et al. Cloning and characterization of three fatty alcohol oxidase genes from *Candida tropicalis* strain ATCC 20336. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(8): 4872-4879.
- [53] Masuda Y, Park SM, Ohta A, et al. Cloning and characterization of the POX2 gene in *Candida maltosa*. Gene, 1995, 167(1-2): 157-161.
- [54] Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7779-7789.
- [55] Picataggio S, Deanda K, Eirich DL. Site-specific modification of the *Candida tropicalis* genome: US, 5254466, 1993-10-19.
- [56] Kanayama N, Ueda M, Atomi H, et al. Genetic evaluation of physiological functions of thiolase isoenzymes in the n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. J Bacteriol, 1998, 180(3): 690-698.
- [57] Thevenieau F, Le Dall MT, Nthangeni B, et al. Characterization of *Yarrowia lipolytica* mutants affected in hydrophobic substrate utilization. Fungal Genet Biol, 2007, 44(6): 531-542.
- [58] Koivuranta K, Ruohonen L, Nakari-Setälä T, et al. Enhanced diacid production with genetically modified microorganisms: WO2016162605A1. 2016-10-13.
- [59] Sathesh-Prabu C, Lee SK. Production of long-chain  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acids by engineered *Escherichia coli* from renewable fatty acids and plant oils. J Agric Food Chem, 2015, 63(37): 8199-8208.
- [60] Mishra P, Park GY, Lakshmanan M, et al. Genome-scale metabolic modeling and *in silico* analysis of lipid accumulating yeast *Candida tropicalis* for dicarboxylic acid production. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(9): 1993-2004.
- [61] Pan P, Hua Q. Reconstruction and *in silico* analysis of metabolic network for an oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*. PLoS One, 2012, 7(12): e51535.
- [62] Loira N, Dulermo T, Nicaud JM, et al. A genome-scale metabolic model of the lipid-accumulating yeast *Yarrowia lipolytica*. BMC Syst Biol, 2012, 6: 35.
- [63] Grand View Research. Market estimates & trend analysis: long chain dicarboxylic acid market. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/long-chain-dicarboxylic-acid-market>.
- [64] 徐敏, 杨晨, 秦兵兵, 等. 发酵生产长链二元酸的方法及发酵液、发酵处理液、污水: CN110218746A, 2018-03-01.
- Xu M, Yang C, Qin BB, et al. Method for producing long-chain dibasic acid by fermentation, fermentation liquid, fermentation treatment liquid and sewage: CN110218746A, 2018-03-01 (in Chinese).
- [65] 张霖, 廖莎, 姚新武, 等. 一种液态烷烃的灭菌方法: CN104561147B, 2017-08-22.
- Zhang L, Liao S, Yao XW, et al. Method for sterilization of liquid alkane: CN104561147B, 2017-08-22 (in Chinese).
- [66] 徐敏, 郝英利, 杨晨. 发酵生产长链二元酸的方法及其得到的长链二元酸: CN110218745A, 2018-03-01.
- Xu M, Hao YL, Yang C. Method for producing long-chain dibasic acid by fermentation and long-chain dibasic acid obtained therefrom: CN110218745A,

- 2018-03-01 (in Chinese).
- [67] 汪俊卿, 李楠, 修翔, 等. 一种热带假丝酵母的酰基-CoA 硫脂酶基因及其应用: CN107475269B, 2020-11-24.  
Wang JQ, Li N, Xiu X, et al. An acyl-CoA thiolipase gene and its application in *Candida tropicalis*: CN107475269B, 2020-11-24 (in Chinese).
- [68] 徐敏, 郝英利, 杨晨, 等. 一种发酵底物及其发酵生产长链二元酸的方法: CN111378696A, 2020-07-07.  
Xu M, Hao YL, Yang C, et al. A kind of fermentation substrate and method for producing long-chain dibasic acid by fermentation: CN111378696A, 2020-07-07 (in Chinese).
- [69] 曹务波, 陈远童, 曹荀梅子. 一种发酵转化正十七烷生产十七碳二元酸的方法: CN102115765A, 2011-07-06.  
Cao WB, Chen YT, Cao XMZ. Method of fermenting and transforming n-heptadecane to produce heptadecacarbon dibasic acid: CN102115765A, 2011-07-06 (in Chinese).
- [70] 陈远童, 郝秀珍, 席悦. 生物合成生产混合长链二元酸的新方法: CN101225411A, 2008-07-23.  
Chen YT, Hao XZ, Xi Y. New method for biosynthetic production of mixed long-chain dibasic acids: CN101225411A, 2008-07-23 (in Chinese).
- [71] 万印华, 曹伟锋, 杭晓风, 等. 一种发酵与膜分离耦合生产长链二元酸的方法: CN104862348A, 2015-08-26.  
Wan YH, Cao WF, Hang XF, et al. Method for coupling fermentation and membrane separation to produce long-chain dibasic acid: CN104862348A, 2015-08-26 (in Chinese).
- [72] 张霖, 师文静, 廖莎, 等. 一种生产长链二元酸的发酵方法: CN103805642B, 2015-09-02.  
Zhang L, Shi WJ, Liao S, et al. Method for fermentation of long chain dicarboxylic acid: CN103805642B, 2015-09-02 (in Chinese).
- [73] 张霖, 师文静, 廖莎, 等. 一种生产长链二元酸的方法: CN103805643B, 2016-04-27.  
Zhang L, Shi WJ, Liao S, et al. Method for production of long chain dicarboxylic acid: CN103805643B, 2016-04-27 (in Chinese).
- [74] 曹务波, 陈远童, 王志洲, 等. 生物法生产长链二元酸技术开发与产业化[EB/OL]. [2022-02-20] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=SNAD&dbna> me=SNAD&filename=SNAD000001672465&uniplatf orm=NZKPT&v=TjRX\_0fSS4v8GRLmQGTavxPLkg6yXe9i6BTG5BAleWakfW90b3ypuk9WfTIImYoyjTOPVA-XIqXI%3d.
- [75] 羊晓磊. 一种水相法制备长链二元酸的方法: CN111533651A, 2020-08-14.  
Yang XL. Method for preparing long-chain dibasic acid by aqueous method: CN111533651A, 2020-08-14 (in Chinese).
- [76] 杨晨, 杨玉峰, 秦兵兵, 等. 一种从发酵液中提取长链二元酸的方法: CN113461514A, 2021-10-01.  
Yang C, Yang YF, Qing BB, et al. Method for extracting long-chain dibasic acid from fermentation broth: CN113461514A, 2021-10-01 (in Chinese).
- [77] 修德恒, 万贺飞, 张耿燕. 一种惰性气体保护下的正长链二元酸的精制方法: CN110041193A, 2019-07-23.  
Xiu DH, Wan HF, Zhang GY. Method purification of normal long-chain dibasic acid under the protection of inert gas: CN110041193A, 2019-07-23 (in Chinese).
- [78] 房宁, 王增德, 李永俊, 等. 产率高成本低的长碳链二元羧酸精制提纯方法: CN111099991A, 2020-05-05.  
Fang N, Wang ZD, Li YJ, et al. Method for refining and purifying long carbon chain dicarboxylic acids with high yield and low cost: CN111099991A, 2020-05-05 (in Chinese).
- [79] 高大成, 李晓姝. 一种萃取精制长链二元酸的方法: CN104591997A, 2015-05-06.  
Gao DC, Li XS. Method for extracting and refining long-chain dibasic acid: CN104591997A, 2015-05-06 (in Chinese).
- [80] 魏永忠. 清江石化 1 000 吨/年长链二元酸精制工业试验项目顺利中交. 化工与医药工程, 2017, 38(4): 64.  
Wei YZ. Qingjiang petrochemical's 1 000-ton/year long-chain dibasic acid refining industrial pilot project was successfully handed over. Chem Pharm Eng, 2017, 38(4): 64 (in Chinese).
- [81] 臧慧卿, 雷光, 秦兵兵. 长链二元酸的分离纯化方法: CN102190572A, 2011-09-21.  
Zang HQ, Lei G, Qing BB. Method for separating and purifying long chain dicarboxylic acid: CN102190572A, 2011-09-21 (in Chinese).
- [82] Atsushi N, Shinzo I, Akio H, et al. Method for producing alkyl carboxylates by multi-stage esterification interrupted with a dehydration step: US, 6087527, 2000-07-11.

(本文责编 陈宏宇)