

液体石蜡发酵生产反丁烯二酸

I. 菌种的筛选和鉴定

反丁烯二酸研究小组*

(北 京)

经过筛选,从 3,149 株菌株中得到 8 株能利用液体石蜡产生反丁烯二酸的菌株,其中产酸最高的菌株是 C_{10} , 经鉴定是皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*)。其发酵产物经分离提纯,得到白色结晶;经纸上层析、元素分析、红外光谱分析和熔点测定,证明是反丁烯二酸。

C_{10} 能利用 C_8 — C_{20} 的直链烷烃,利用长链烃比短链烃为好,尤其对 C_{16} 和 C_{17} 的烷烃利用最好,产酸最高。用 C_{15} — C_{18} 的混合正烷烃做碳源能得到较好的结果,菌体生长较快,产酸量较高; C_{10} 能利用葡萄糖,菌体生长旺盛,但不产酸;能利用三羧酸循环中的琥珀酸、反丁烯二酸和苹果酸,并使部分反丁烯二酸转变成苹果酸和琥珀酸,也能把部分苹果酸转变成反丁烯二酸。

反丁烯二酸又名延胡索酸、富马酸,是化工原料之一。它和顺丁烯二酸酐一样,主要用于制作各种不饱和醇酸树脂,在耐热性、形稳性上都比后者制成的树脂好。这种树脂可用于制作玻璃钢和油漆涂料。反丁烯二酸及其盐类也可作为食品加工的调味剂,以及畜产加工食品的抗氧化剂,因此,反丁烯二酸在工业上有着广泛用途。

我们遵照毛主席关于“备战、备荒、为人民”的伟大教导,用液体石蜡代替粮食生产反丁烯二酸,为国家提供社会主义建设需要的化工原料。

材料和方法

一、菌种

分离土样 418 份,分离出菌株 2,685 株,以及本所保藏的菌种 464 株。

二、液体石蜡

工业产品,主要成份为 C_{14} — C_{17} , 比重 0.75。实验用的不同碳数直链烷烃,均为试剂级。

三、培养基和培养条件

1. 培养基(%)

- (1) 分离酵母用培养基: NH_4NO_3 0.4, KH_2PO_4 0.47, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.03, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 酵母膏 0.05, 液蜡 1.5, pH 6.0。
- (2) 分离细菌用培养基: NH_4NO_3 0.4, KH_2PO_4 0.15, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.15, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 酵母膏 0.05, 液蜡 1.5, pH 7.0。
- (3) 产酸比较培养基: NH_4Cl 0.3, KH_2PO_4 0.05, K_2HPO_4 0.05, $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.001, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.0002, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005, $CaCl_2$ 0.001, 酵母膏 0.05, 液蜡 3.8, $CaCO_3$ 2.0, pH 6.0。
- (4) 种子培养基: 尿素 0.3, 液蜡 3.8,

* 由北京葡萄酒厂研究小组和中国科学院微生物研究所的经代谢组、反丁烯二酸研究小组的工人、干部和技术人员三结合组成的科研小组。元素分析和红外光谱测定为中国科学院化学研究所一室代测,特此致谢。
本文 1974 年 8 月 6 日收到。

KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 酵母膏 0.1, pH 5.4。

(5) 发酵培养基: NH_4Cl 0.3, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, CaCO_3 3, 酵母膏 0.05, 液蜡 6.0, pH 6.0。

2. 培养条件

摇瓶为 500 毫升三角瓶, 有普通的和带挡板(瓶底带有四块小方玻璃)的两种。液体石蜡培养基用 8 磅灭菌 15 分钟。用旋转式摇床 (200 转/分), 28℃ 培养。

四、分析方法

发酵液中羧酸的定性测定, 采用把羧酸转化成羟肟酸的方法^[1]。反丁烯二酸的定性测定, 用纸上层析法, 把培养 4 天的发酵液用盐酸酸化后点样; 滤纸为新华 1 号滤纸; 展开剂为正丁醇、甲酸和水, 体积比为 10:3:10, 充分振荡饱和后取有机相。层析后先用紫外检视灯检查吸收斑点, 再用溴甲酚绿溶液显色。反丁烯二酸的定量测定, 用 0.1N KMnO_4 标准溶液滴定发酵液测定含量^[1,3]。菌量的测定, 发酵液用 0.1N HCl 稀释 10 倍(稀释倍数高, 液蜡的影响可以忽略), 用 72 型分光光度计在 620 nm 比浊, 用 A 值表示。

实验与结果

一、菌种的分离和筛选

1. 菌种分离筛选

样品经两次增殖, 进行分离纯化, 用羧酸反应法进行初筛, 用纸层析法进行复筛。

我们采集炼油厂和动植物油厂的浸油土样。在分离过程中发现, 从老炼油厂采集的土样得到的能利用液体石蜡的菌株要多些。

分离时采用二次增殖培养, 使能利用液蜡的微生物大量繁殖。分离酵母时, 用(1)培养基, 必要时也可以在培养基中加入少量的细菌抑制剂, 如链霉素、氯霉素等, 使酵母在数量上占优势。分离细菌时用(2)培养基。

平皿分离时, 分离细菌用普通的牛肉汁培养基; 分离酵母用麦芽汁培养基, 也可

用液蜡培养基。我们比较了牛肉汁培养基和液蜡培养基 [(2) + 琼脂 2%] 的效果, 前者菌落较大, 种类较多, 易挑取, 但选择性较差。后者选择性较强, 出现能利用液蜡的菌株百分率高些, 可以减少工作量, 但菌落小, 挑菌不太方便。

筛选产酸菌株时, 用把羧酸转化成羟肟酸的方法, 直接分析发酵液中是否有羧酸存在, 此法速度快, 测定样品多, 可以大量淘汰不产酸菌株。第二步筛选产生反丁烯二酸菌株时, 用纸层析法。凡是酸点的 R_f 值和标准反丁烯二酸的 R_f 值一致的菌株, 再进行复筛。从 418 份土样中分离出 2,685 株菌和我所保藏的 464 株中得到 8 株能利用液蜡产生反丁烯二酸的菌株。

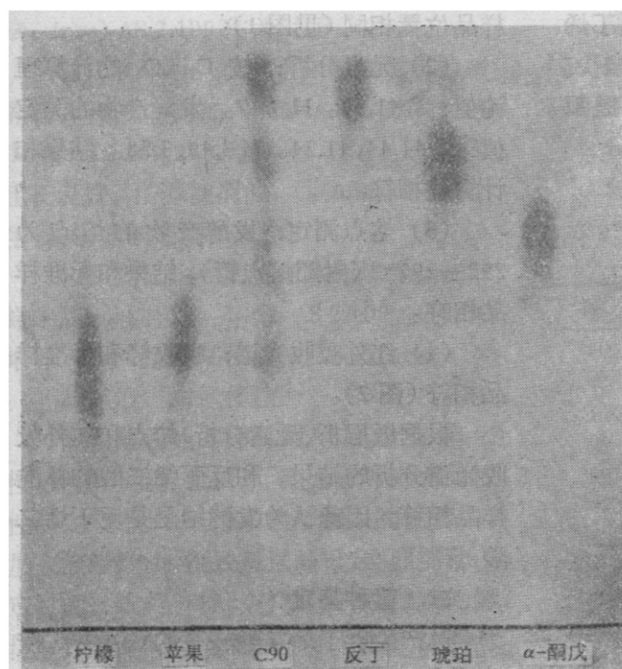
2. 产反丁烯二酸的比较

8 株菌株发酵液产反丁烯二酸比较结果见表 1。 C_{90} 产反丁烯二酸较高, 较稳定; C_{42} 虽然在第 6 天产酸也较高, 但周期较长; C_{96} 第 4 天产酸较高, 但下降很快, 不易掌握。从纸层析的结果看, C_{90} 不仅产生反丁烯二酸, 同时也产生琥珀酸和 α -酮戊二酸, 见图 1。

表 1 8 株菌产反丁烯二酸量的比较

时 间 菌 株	96 小时 (毫克/毫升)	144 小时 (毫克/毫升)
C_{90}	14.8	10.6
C_{98}	11.8	11.8
C_{42}	9.0	13.6
C_{99}	11.4	9.6
C_{96}	13.6	6.6
C_{206}	2.4	9.6
C_{59}	11.2	5.8
C_{21}	4.0	3.6

培养基 (3), 500 毫升三角瓶装 20 毫升培养基。



柠檬 = 柠檬酸
 苹果 = 苹果酸
 C90 = 酵母 C_{90} 的发酵液
 反丁 = 反丁烯二酸
 琥珀 = 琥珀酸
 α -酮戊 = α -酮戊二酸

图1 C_{90} 发酵液纸层析

3. C_{90} 对不同碳源的利用

用液蜡、葡萄糖及三羧酸循环中的几种酸(乌头酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、反丁烯二酸和苹果酸)作碳源利用比较

表2 C_{90} 对不同碳源的利用

碳源(4%)	含菌量(O.D)	反丁含量(%)	其他酸的种类
液蜡	1.10	2.20	琥珀酸、 α -酮戊二酸
葡萄糖	0.88	0	—
乌头酸	0.11	0	乌头酸
柠檬酸	0.14	0	柠檬酸
α -酮戊二酸	0.11	0	α -酮戊二酸
琥珀酸	0.38	0	琥珀酸
反丁烯二酸	0.28	3.16	苹果酸、琥珀酸
苹果酸	0.25	0.36	苹果酸

种子培养基(4), 发酵培养基(5), 500毫升挡板三角瓶装30毫升, 培养72小时, 用发酵液进行测定。

实验。 C_{90} 对液蜡的利用最好, 菌体生长最快, 产反丁烯二酸也最高, 还产生少量的琥珀酸和 α -酮戊二酸。 C_{90} 能利用葡萄糖, 菌体生长旺盛, 但不产酸。对三羧酸循环中的几种酸利用情况不一致, 可利用琥珀酸、反丁烯二酸和苹果酸, 但生长很慢, 菌量少, 并能使反丁烯二酸部分地转变成琥珀酸和苹果酸, 也能使苹果酸部分地转变成反丁烯二酸。但对琥珀酸不起转化作用。 C_{90} 对乌头酸、柠檬酸和 α -酮戊二酸很难利用, 菌体几乎不能生长, 酸的含量也未见任何变化, 结果见表2。这些结果说明 C_{90} 是利用液蜡较强的菌株。

4. C_{90} 对含不同碳原子数的直链烷烃的利用, C_{90} 能利用 C_8 — C_{20} 的直链烷烃, 培养3天, 利用最好的是 C_{16} 和 C_{17} 的烷烃, 产反丁烯二酸最高; 其次是 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 和 C_{18} 的烷烃, 产酸也较高。对 C_8 和 C_{10} 的烷烃利用较难, 菌体很少, 且不能产酸;

C_{19} 和 C_{20} 的烷烃菌体可以生长, 但几乎不产酸, 结果见表3。这说明 C_{90} 利用长链的直链烷烃比短链烷烃的要好。从纸层析的

表3 C_{90} 对含不同碳原子数的直链烷烃的利用

碳源	O. D	反丁烯二酸含量(%)
C_8	0.26	0
C_{10}	0.25	0
C_{12}	0.80	2.12
C_{13}	1.02	1.62
C_{14}	0.85	2.24
C_{16}	1.15	2.64
C_{17}	1.15	2.92
C_{18}	1.18	1.58
C_{19}	1.24	0.085
C_{20}	1.28	0.037

500毫升三角瓶装30毫升, 培养72小时, 培养基同表2, 用发酵液测定。

结果看, C_{16} 和 C_{17} 的烷烃不仅产生反丁烯二酸的量较高, 而且其他杂酸的量也较少。

二、 C_{30} 发酵液中反丁烯二酸的提取和鉴别

1. 反丁烯二酸的提取

发酵液

↓ 加 Na_2SO_4 搅拌, 过滤。

滤液

↓ 浓缩

浓缩液

↓ 加 HCl 酸析, 过滤。

粗制品

↓ 加活性炭脱色, 热过滤。

滤液

↓ 冷却, 结晶, 过滤。

白色结晶产物

2. 反丁烯二酸的鉴别

(1) 纸层析: 层析后显色以前在紫外检视灯(2538 Å)下观察, 与对照样品相同, 都有吸收斑。显色后斑点的 R_f 值与标准

样品位置相同(见图 1)。

(2) 元素分析: 按 $C_4H_4O_4$ 的计算理论值: C 41.39, H 3.47。发酵产物的测定值: C 41.44, 41.24, H 3.49, 3.58。结果和计算值相符。

(3) 熔点测定: 发酵产物的熔点为 292—297°C (封闭熔点管), 结果和标准样品相符。

(4) 红外吸收光谱: 吸收峰和标准样品相符(图 2)。

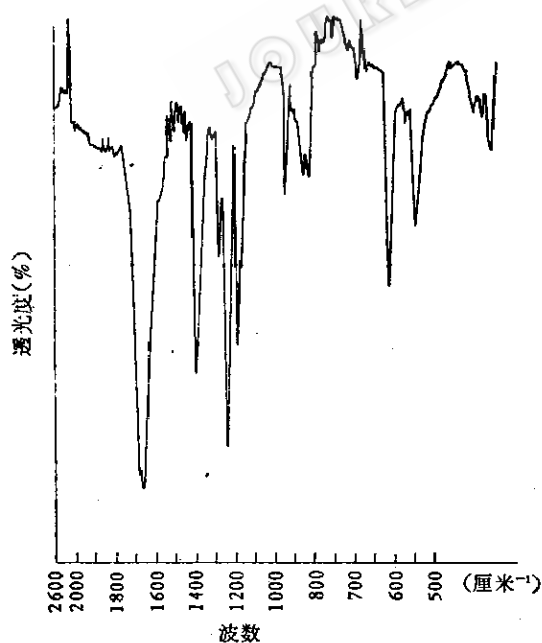
根据纸层析、元素分析, 熔点和红外吸收光谱分析的结果, 和反丁烯二酸的标准样品相符, 因此认为发酵结晶是反丁烯二酸。

三、菌种鉴定

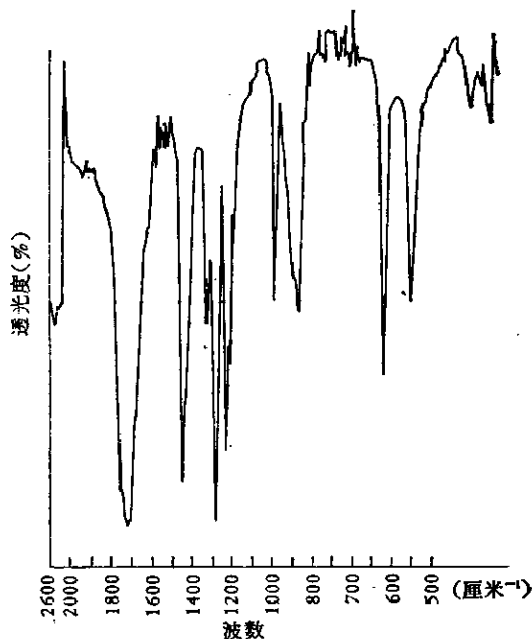
对产生反丁烯二酸较高的 C_{30} 菌株, 按 Lodder^[4] 分类系统进行了鉴定。

1. 烷烃的利用

为了便于比较对烷烃的利用, 选用不能利用烷烃的啤酒酵母 (*Saccharomyces*



2-1 发酵样品



2-2 标准样品

图2 反丁烯二酸红外光谱测定

cerevisiae) AS 2.109 作为对照。

(1) 液体法：在试管中装入无机盐培养基 10 毫升，再加入液蜡 4 滴，分别接入 C₉₀ 和 AS 2.109, 28℃ 培养 48 小时。结果 C₉₀ 生长良好，培养液混浊；而 AS 2.109 则不生长，培养液透明。

(2) 固体法：无机盐琼脂培养基加液蜡 4 滴，分别接种 C₉₀ 和 AS 2.109, 在 28℃ 培养 48 小时，结果和液体法完全一致。

2. 对液蜡的趋化性

能发酵石油的酵母菌对液蜡有趋化性，并能产生乳化剂；而普通酵母则无此特性。在装有 10 毫升中性蒸馏水的试管中，加入液蜡数滴，接入适量酵母，剧烈摇动一定时间，进行镜检。对液蜡有趋化性的酵母 C₉₀，菌体贴附于油滴表面，见图 3。而对液蜡无趋化性的啤酒酵母 AS 2.109，菌体均匀分布。

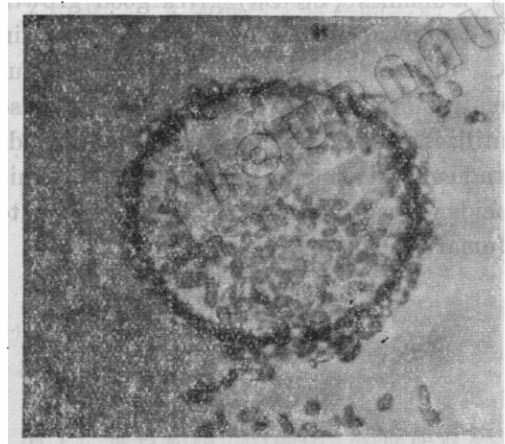


图 3 对液蜡有趋化性的酵母 C₉₀(400×2.5)

有人认为，这种生态上的差异表明，能利用石油的酵母细胞壁具有疏水性能，可通过直接接触而传递烃类，故对液蜡有趋化性。而啤酒酵母的细胞壁可能具有亲水的表面，而没有疏水性能，致使液蜡微滴和细胞不能充分接触，不能把烃类直接传递到细胞内而加以利用。

3. C₉₀ 的形态特征

菌体长形，间有长卵形，多边芽殖，生醭。假菌丝旺盛。菌落白色，圆，扁平，中央稍突起，有细纹，皱褶。无子囊孢子。

4. C₉₀ 的生理特征

对碳源的利用，测定结果如表 4。不

表 4 C₉₀ 对不同碳源的利用

碳 源	生 长	碳 源	生 长
葡萄糖	+	甘 油	—
半乳糖	+	赤藓醇	—
山梨糖	—	阿东醇(核醇)	—
蔗 糖	—	卫茅醇(半乳醇)	—
麦芽糖	—	甘露醇	+
纤维二糖	—	山梨醇(葡萄糖)	—
海藻糖	—	α-甲基糖苷	—
乳 糖	—	柳 醇	—
蜜二糖	—	肌 醇	—
棉子糖	—	乳 酸	+
松三糖	—	柠檬酸	—
菊芋糖	—	乌头酸	—
可溶性淀粉	—	α-酮戊二酸	+
木 糖	+	琥珀酸	+
L-阿戊糖	—	反丁烯二酸	+
D-阿戊糖	—	顺丁烯二酸	+
核 糖	—	酒石酸	—
鼠李糖	—	苹果酸	+
乙 醇	—	葡萄糖酸	—

表 5 C₉₀ 对维生素的需要

维 生 素	生 长
生 物 素	+
B ₁	—
B ₂	—
B ₆	—
B ₁₂	—
肌 醇	—
叶 酸	—
菸 酸	—
泛 酸 钙	+
对氨基苯甲酸	—

能发酵，不能利用硝酸盐。对维生素需要，测定结果如表 5。不冻化和凝固牛奶，不液化明胶，没有油脂酶，不能分解熊果苷，不分解尿素。因此，C₉₀ 定为皱褶

假丝酵母 (*Candida rugosa*)。这和用液体石蜡产生反丁烯二酸的烃反丁烯二酸假丝酵母 (*Candida hydrocarbofumarica*)^[2,3,5,6] 有很大的差别。

参 考 资 料

- [1] Feigl, F.: Spot Tests in Organic Analysis, 6th, London, Elsevier, p. 249, 1960.
- [2] Yamada, K., Furukawa, T. & Nakahara, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**(5):670—675, 1970.

- [3] Furukawa, T., Nakahara, T. & Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**(9):1402—1406, 1970.
- [4] Lodder, J.: *The Yeast; A Taxonomic Study*, p. 1032, 2nd, Amsterdam, North-Holland, 1970.
- [5] 山田 浩一・〇古川, 敏郎・中原 中笃: 日本醸酵工学会大会, p. 46, 昭和 44 度。
- [6] 山田 浩一等: 特许公报, 昭 48—2796, 1973.

FERMENTATIVE PRODUCTION OF FUMARIC ACID FROM LIQUID *n*-PARAFFIN BY *CANDIDA RUGOSA*

I. SCREENING AND IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISMS

JOINT RESEARCH GROUP OF FUMARIC ACID

(Peking)

During the screening of 3,149 strains of microorganisms, eight strains of yeast were found to be capable of producing fumaric acid from liquid *n*-paraffin. Among these strains, the strain C₉₀, which showed the highest yield of fumaric acid in *n*-paraffin medium, was identified as *Candida rugosa*. The product isolated and purified from culture broth is white crystal. The *R_f* value, elements composition, infra-red adsorption spectrum and melting point of this crystal coincided with these of the authentic fumaric acid.

The strain C₉₀ utilizes individual *n*-alkanes of various chain lengths (from C₈—C₂₀) with preference for those of longer chain length (C₁₆—C₁₇). A mixture of *n*-alkanes (C₁₃—C₁₈) gives good growth and higher yields of fumaric acid, strain C₉₀ utilizes glucose for good growth but no fumaric acid was produced. It also utilizes succinic, fumaric and malic acids and converts fumaric to malic and succinic acids, it also partly converts malic to fumaric acid.