

液体石蜡发酵产生反丁烯二酸

II. 反丁烯二酸发酵条件的研究

陈丽琼 田 静 傅妙福 林应锐

陈兴吴 徐纯锡 王世卓

(中国科学院微生物研究所, 北京)

初步研究了 C_{60} 号菌在摇瓶发酵中产生反丁烯二酸(以下简称反丁)的条件。该菌在 6% 液体石蜡(以下简称液蜡)和 5% 试剂级碳酸钙等条件下发酵 74—85 小时产反丁可达 3.8—4.2%, 转化率为 63—70%, 在流加试剂碳酸钙情况下, 发酵 162 小时可达 5.15%, 转化率在 85% 左右。在用工业碳酸钙等情况下, 发酵 72 小时, 产反丁 2.5% 以上。不同碳、氮源对产反丁影响很大。最适碳源是 C_{14-18} 液蜡。最适氮源是尿素, 其次是硫酸铵和氯化铵。

培养基中必须加入磷酸二氢钾、酵母汁和碳酸钙。锌离子对产反丁不利。在普通 500 毫升三角瓶中, 装液量对产反丁影响很大, 但在挡板瓶中, 装量 30—90 毫升, 对产反丁影响不大。此外摇床速度、种龄、接种量对产反丁亦有很大影响。

上一篇文章^[1]报道了液体石蜡发酵生成反丁烯二酸产生菌的筛选、分离和鉴定, 定名为皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*), 以及对主要发酵产物进行测定, 确定为反丁烯二酸。本文报道不同的摇瓶发酵条件对该菌产反丁的影响。

材料和方法

1. 菌种

皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*) 代号 C_{60} , 培养在 10% 麦芽汁 (10° 波美) 斜面上。

2. 液体石蜡

锦西炼油五厂用尿素脱蜡法生产的液体石蜡, 主要成份为 C_{14} — C_{17} 的直链烷烃。北京东方红炼油厂用分子筛脱蜡法生产的重蜡, 主要成份为: C_{11} , 2.06%; C_{12} , 9.47%; C_{13} , 11.17%; C_{14} , 16.36%; C_{15} , 18.00%; C_{16} , 13.24%; C_{17} , 11.45%; C_{18} , 8.84%; C_{19} , 6.21%; C_{20} , 3.27%。北京东方红炼油厂用分子筛脱蜡所产的另一液体石蜡产品, 俗称轻蜡, 其主要成份为

C_{11} — C_{13} , C_{10} , 5.6%; C_{11} , 17.87%; C_{12} , 35.56%; C_{13} , 30.12%; C_{14} , 9.6%; C_{15} , 1.25%。

3. 培养基和培养条件

培养基成份见表 1, 培养基中所含液体石蜡按重量计算。灭菌 (1 公斤/厘米²) 30 分钟。无机氮源分开灭菌。

摇瓶: 采用特制带有三个挡板的 500 毫升三角瓶, 装液量一般为 30 毫升。

表 1 培养基成份

成份	用量 (%)	A 试剂级原料培养基		B 工业级原料培养基	
		种子	发酵	种子	发酵
液体石蜡(锦西产)		4.0	6.0	5.0	6.0
NH_4Cl		0.3	0.3		
$(NH_4)_2SO_4$					0.3
尿素				0.3	
KH_2PO_4		0.05	0.05	0.2	0.05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.05	0.05	0.1	0.05
酵母汁		0.05	0.05	0.1	0.05
$CaCO_3$			3.0		3.0

注: 碳、氮源试验时, 碳氮换成要试验物质。

用旋转式摇床,转速 220 次/分钟,偏心距 2.5 厘米。

培养温度均为 28—30℃,斜面培养 2 天。摇瓶种子种龄 48 小时,接种量 10%。摇瓶发酵 4 天。特殊培养条件另有注明。

4. 测定方法

(1) 菌量: 菌液用 0.1N HCl 稀释 10 倍或 20 倍,然后用国产 72 型分光光度计在 620 毫米波长下测定,以光密度 (OD) 表示之。

(2) pH: 用精密 pH 试纸测定。

(3) 反丁烯二酸定量分析: 高锰酸钾滴定法^[1]。

(4) 不挥发性总酸测定: 取 1 毫升发酵液加 20 毫升蒸馏水,加 1 克试剂碳酸钙,煮沸过滤,浓缩至 5 毫升左右。将此浓缩液滴加至 45 毫升乙醇 (95%) 中。此钙盐沉淀反应在 G₄ 烧结玻璃漏斗中进行。静置抽滤,沉淀物在 100℃ 烘箱中烘 2 小时,最后称重,换算成总酸量。

(5) 液体石蜡成份分析: 气相色谱分析^[1]。

结果和讨论

一、碳源的影响

1. 不同液蜡对产反丁的影响

用皱褶假丝酵母进行烃发酵的结果表明: 用锦西或北京重蜡当作碳源时产反丁高,用北京轻蜡则几乎不产反丁(表 2)。用纯的正烷烃试验,是 C₁₄ 至 C₁₈ 烷烃产反丁

量高^[1]。C₁₄ 至 C₁₈ 恰好是重蜡的主要组份,在轻蜡中则这些组份含量极少。

而 Yamada 等人^[2] 1970 年报道,烃富马酸假丝酵母 (*Candida hydrocarbofumarica* sp.) 用 C₁₂—C₁₄ 为主的轻蜡作为碳源时产反丁量最高,用纯的正烷烃试验证明 C₁₂、C₁₃、C₁₄ 作碳源时产反丁量最高。

表 2 不同碳源对产反丁的影响

碳源	取样时间 (小时)		96	
	72	96	pH	反丁 (%)
锦西重蜡 (C ₁₄ —C ₁₈)	4.4	2.55	4.6	2.28
北京重蜡 (C ₁₄ —C ₁₈)	4.4	2.78	4.4	2.47
北京轻蜡 (C ₁₂ —C ₁₄)	6.7	0.16	6.7	0.32

注: 培养基 B。

2. 液蜡浓度的影响

实验结果(表 3)指出,(1) 液蜡浓度在 3—9% 时,反丁的转化率分别均在 50% 以上,差别不大。(2) 液蜡浓度对产反丁高峰时间影响较大,浓度低时产反丁快,浓度高则慢。

从经济上考虑,用 6% 的液蜡较为适宜,发酵 72 小时,产反丁可达 3.4%,转化率为 57%。

用工业原料进行试验时亦得类似结

表 3 液蜡含量和产反丁的关系

取样时间 (小时)	液蜡含量 (%)	3		6		9	
		反丁 (%)	转化率 (%)	反丁 (%)	转化率 (%)	反丁 (%)	转化率 (%)
24		0	0	0	0	0	
48		1.62	54	1.62	27	1.45	16.1
72		1.14	38	3.40	57	2.60	29.0
96				3.20	53.3	3.68	45
120						4.70	52
140						2.96	32.9

注: 培养基 A, 500 毫升挡板三角瓶装 50 毫升。

果(表 4)。

表 4 液蜡含量和产反丁的关系

液蜡含量 (%)	pH	菌量	反丁 (%)	转化率 (%)
3	6.4	0.135	0.262	8.7
4.5	6.4	0.50	0.99	22.0
6.0	4.4	0.50	2.37	38.5
7.5	4.4	0.65	2.71	35.2

注: 培养基 B, 挡板三角瓶装 50 毫升培养基。

二、氮源的影响

1. 不同氮源的影响

C₉₀ 号菌生长和产反丁的最适氮源为尿素, 其次是硫酸铵, 氯化铵和硝酸铵。磷酸氢铵对菌的生长和产反丁均不利(表 5)。而日本烃富马酸假丝酵母产反丁的最适氮源为磷酸氢铵, 尿素则不利于产反丁^[2]。

表 5 氮源对菌生长和产反丁的影响

氮源		pH	菌量	反丁 (%)
种类	用量			
硫酸铵	3%	4.6	0.57	2.49
磷酸氢二铵		7.0	0.09	0.08
氯化铵		4.6	0.55	2.47
硝酸铵		4.6	0.51	2.18
尿素		4.6	0.57	2.70

注: 培养基 B。

2. 硫酸铵浓度的影响

如表 6 所示, 硫酸铵浓度为 0.3—1.0% 时, 对菌的生长没有影响, 而对产反丁则有影响。浓度为 0.3% 和 0.5% 时产反丁最高。

表 6 不同硫酸铵浓度的影响

硫酸铵用量 (%)	pH	菌量	反丁 (%)
0.1	6.7	—	0.83
0.3	4.4	0.65	2.63
0.5	4.4	0.67	2.74
1.0	4.4	0.68	2.28

注: 培养基 B。

三、磷酸盐与产反丁的关系

供试验的三种磷酸盐中, 对产反丁最有利的是磷酸二氢钾, 其次是磷酸二氢钠, 使用过磷酸钙时不能产反丁(表 7)。

表 7 不同种类磷酸盐比较

磷酸盐(0.05%)	反丁 (%)
磷酸二氢钾	1.13
磷酸二氢钠	0.86
过磷酸钙	0

注: 培养基 A, 普通 500 毫升三角瓶装 30 毫升。

磷酸二氢钾浓度的变化, 对菌体的生长和产反丁影响极大, 其最适浓度为 0.03—0.1% (表 8)。

表 8 磷酸二氢钾浓度试验

磷酸二氢钾浓度 (%)	pH	菌量	反丁 (%)
0.01	6.4	0.42	0.46
0.03	4.4	0.56	1.59
0.05	4.4	0.51	1.59
0.10	4.4	0.57	1.89
0.30	6.4	0.27	0.18

注: 培养基 B。

四、金属盐类的影响

1. 硫酸镁浓度

当培养基用工业原料配制时, 硫酸镁的加入与否以及加入量的多少对于菌体生长和产反丁都无明显影响。镁离子浓度对

表 9 工业原料培养基中 MgSO₄ 浓度对产反丁的影响

MgSO ₄ 浓度 (%)	pH	菌量	反丁 (%)
0	4.6	—	1.59
0.01	4.6	0.50	1.68
0.05	4.4	0.51	1.66
0.10	4.6	0.53	1.68
0.30	4.6	0.41	1.79

注: 培养基 B。

黑根霉菌^[4]和羟富马酸假丝酵母^[2]产反丁也没有影响。

2. 铁、锌离子

表 10 铁、锌离子对产反丁的影响

FeSO ₄ (ppm)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (ppm)	发 酵 液 中		
		pH	菌 量	反丁(%)
0		4.1	0.64	2.77
10		4.1	0.66	2.51
50		4.1	0.64	2.52
100		4.1	0.61	2.56
1000		4.4	0.49	2.53
	10	4.6	0.60	1.35
	50	4.4	0.65	1.36
	100	4.4	0.56	1.30
50	50	4.4	0.51	1.80
100	50	4.6	0.64	1.43
1000	50	5.1	0.68	0.60

注: 培养基 A [其中发酵培养基中 NH₄Cl 换成 (NH₄)₂SO₄]

Foster 等人^[4]强调,用黑根霉产生反丁烯二酸时,锌离子浓度与菌体生长成正比,与产反丁成反比,而铁离子却有相反的作用。Furukawa 等^[5]认为,用酵母发酵烃类产生反丁烯二酸时需要 10—30 ppm 的锌盐,而铁离子则对产反丁有明显的抑制作用,当浓度达到 10 ppm 时即出现严重的抑制作用,认为是锌、铁离子之间有相辅相成作用。从表 10 中可看到,锌盐也不利于 C₉₀ 菌产反丁,但对菌体生长无明显影响;铁盐浓度对菌体生长和产反丁均无明显的影响。

五、生物素对菌体生长和产反丁的影响

在供试的五种物质中,以酵母浸汁和玉米浆为最好,产反丁快而高。硫胺素、维生素 B₁ 次之,泛酸钙最差(表 11)。

表 11 生物素对菌生长和产反丁的影响

试验物质	取样时间 (小时)	48			85		
		pH	菌 量	反丁(%)	pH	菌 量	反丁(%)
硫 胺 素	结果 用量 均为 0.05%	5.4	0.38	0.62	6.2	0.66	3.26
维生素 B ₁		5.8	0.29	0.73	6.7	0.54	3.19
泛 酸 钙		5.8	0.30	1.18	6.4	0.50	1.97
玉 米 浆		4.4	0.58	2.86	4.0	0.80	4.45
酵母浸汁		5.0	0.70	2.87	4.5	0.94	4.20

注: 培养基 A, 挡板三角瓶装 50 毫升。

酵母浸汁浓度变化对产反丁影响也很大,在用工业碳酸钙时产反丁的最适浓度

为 0.03% 和 0.05% (表 12)。

六、中和剂的影响

1. 不同种类中和剂对产反丁的影响

为了不断中和发酵过程中产生的酸类,使菌能在有利的 pH 条件下继续生长,以便积累大量的反丁,选择合适的中和剂是十分必要的。

用流加氢氧化钠溶液或逐渐加入碳酸钙的办法,使发酵液 pH 保持在 5—6 之间

表 12 不同浓度酵母膏的影响

酵母膏(%)	pH	菌 量	反丁(%)
0	6.2	—	0.52
0.01	5.1	0.55	0.83
0.03	4.4	0.59	1.65
0.05	4.4	0.60	1.66
0.1	4.8	0.55	1.00

注: 培养基 B。

表 13 两种中和剂对产反丁的影响

反丁 (%)	发酵时间 (小时)							
	15	25	48	66	88	114	144	162
中和剂*								
CaCO ₃	0	0	0.94	1.45	2.49	3.03	3.73	5.15
NaOH	0	0	0	0	0	0.15	0.18	0.19

* 控制 pH 在 5.0—6.0。

全过程共流加 1N NaOH 3.5 毫升, 培养基 B, 500 毫升挡板三角瓶装 50 毫升。

进行比较试验。结果表明用碳酸钙作中和剂产反丁高, 用氢氧化钠溶液几乎不产反丁(表 13)。

2. 碳酸钙浓度试验

在所用的三种浓度中, 以 3% 较为适宜。在相同的浓度下使用试剂级碳酸钙反丁产率比用工业品碳酸钙高 50% 左右(表 14)。

表 14 碳酸钙的含量对产反丁的影响

碳酸钙(%)		发 酵 液		
工 业	试 剂	pH	菌 量	反丁(%)
2.0		4.1	0.56	1.28
3.0		4.4	0.47	1.78
5.0		4.4	0.38	1.74
	2.0	4.4	0.76	1.50
	3.0	4.1	0.64	2.85
	5.0	4.1	0.55	2.67

注: 基本培养基组份同 B。

七、通气量与产反丁的关系

鉴于培养基中含有不溶性的液蜡和固体的碳酸钙, 是由油、水、固体三相组成, 因此分散程度将影响溶解氧速度, 为此进行了如下试验。

1. 不同类型摇瓶及其装量对产反丁的影响

在普通的 500 毫升三角瓶中, 装量不同对产反丁影响很大。装量 20 毫升的比 50 毫升的反丁产率高 3 倍左右。

在带有三只挡板的 500 毫升三角瓶中, 由于挡板的作用, 有利于油水分散混合, 减少形成油层浮于液面的机会, 因而提高了空气利用率(表 15)。所以在同样装

表 15 不同瓶形不同装量对溶解氧的影响*

瓶 型 (500毫升 三角瓶)	装 量 (毫升)	每25毫升溶液消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ 毫升数	
		加 液 蜡	不 加 液 蜡
普 通	25	5.83	4.77
	50	3.27	5.09
带 挡 板	25	7.61	8.28
	50	7.65	8.38

* 参照化学工业部上海医药工业研究所编著《抗菌素工业分析》, 第 37, 164 页, 化学工业出版社(1960)。为测定溶解氧对 Winkler 法作了一些更改。蒸馏水 25 毫升, 氯化锰溶液 1 毫升, 液蜡 2 毫升加至三角瓶中, 置于摇床上再加入 1 毫升碘化钾-氢氧化钾混合液, 立即摇荡, 3 分钟后迅速加入盐酸溶液, 将三角瓶盖紧静置 40 分钟后, 用标准 Na₂S₂O₃ 滴定, 以淀粉溶液为指示剂。用 Na₂S₂O₃ 消耗量代表溶解氧。

量的条件下, 挡板瓶比普通三角瓶反丁产率高得多。挡板瓶中装量的变化对产反丁影响不大, 装 50 毫升的与装 90 毫升的, 产反丁量基本相同(表 16)。

表 16 不同摇瓶和不同装量对产反丁的影响

摇 瓶	装 液 量 (毫升)	反 丁 (%)	
		4 天	5 天
普通三角瓶	20	1.5	1.38
	50	0.3	0.48
带挡板三角瓶	50	3.06	3.28
	90	2.40	3.24

注: 培养基 A。

2. 摇床转速对产反丁的影响

在相同的发酵培养条件下,用不同转速的摇床进行培养所取得的结果差别很大。在转速180次/分钟的摇床上培养5天比转速为130次/分钟的反丁产量高一倍(表17)。

表 17 摇床转速对产反丁的影响

摇床转速 (次/分)	反丁 (%)	
	4 天	5 天
130	0.7	1.65
180	3.06	3.28

培养基 A, 500 毫升挡板三角瓶装 50 毫升培养基。

八、种子对产反丁的影响

1. 种子培养基对产反丁的影响

对 A, B 两种种子培养基进行了比较。采用种子培养基 B 产反丁快而多(表 18)。

2. 不同种龄对产反丁的影响

用种龄 24、34 和 48 小时作比较试验,发酵 4 天产反丁量相近(表 19),但是种龄 48 小时产反丁速度快些,这可能是由于接种菌量较大。

3. 接种量不同对产反丁的影响

比较五种接种量,结果表明,5% 和 10% 较为合适,发酵周期短,产反丁高,

表 18 不同种子培养基对反丁产量的影响

种子培养基	时间(小时)	48			72			96		
		测定项目			测定项目			测定项目		
		pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)
A		6.7	0.172	0.20	6.0	0.21	0.65	4.6	0.165	1.32
B		6.4	0.176	0.90	4.4	0.275	1.70	4.4	0.155	1.70

表 19 种龄对产反丁的影响

种龄 (小时)	种子生长		发酵 40 小时			发酵 68 小时			发酵 94 小时		
	pH	菌量	pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)
24	4.5	0.055	4.1	0.175	0.65	4.4	0.330	1.89	4.4	0.45	2.13
34	4.0	0.045	4.1	0.165	0.61	4.1	0.305	1.85	4.1	0.45	2.10
48	4.5	0.115	4.4	0.135	1.12	4.1	0.300	1.92	4.4	0.47	2.01

注:培养基 B。

表 20 接种量和产反丁的关系

接种量(%)	时间 (小时)	40			64			88			112		
		项目			项目			项目			项目		
		pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)	pH	菌量	反丁(%)
1		6.2	0.28	0.15	6.4	0.51	0.52	4.4	0.63	1.10	4.4	0.72	1.44
3		6.2	0.48	0.24	6.4	0.55	0.72	4.4	0.74	1.28	4.4	0.61	1.48
5		6.4	0.53	0.40	4.6	0.60	1.60	4.4	0.70	1.60	4.4	0.58	1.52
10		6.4	0.60	0.44	4.4	0.70	1.57	4.4	0.65	1.57	4.4	0.55	1.54
20		6.4	0.68	0.60	4.4	0.54	1.34	4.4	0.67	1.23	4.4	0.53	1.08

注:培养基 B。

20% 的接种量在发酵初期产反丁较快, 但最高产反丁率并无提高, 甚至比接种量 5% 和 10% 时低一点。接种量在 1% 和 3% 时, 到达产反丁高峰的时间较长, 反丁产率也低(表 20)。

九、发酵过程

C_{90} 号菌在发酵培养基 A 中的生长、产反丁曲线见下图。从曲线中可以看到, 整个发酵过程可分为三个时期:

1. 菌大量生长繁殖时期, 约在 24 至 50 小时之间。在此期间菌量呈直线增长, pH 显著下降, 瓶内总酸迅速增加。

2. 产反丁高峰在 75 小时左右, 此时菌量下降, pH 继续下降到 5 以下。

3. 菌第二次生长繁殖, 约在 75—100 小时。这时菌量回升, pH 基本没有变化, 总酸和反丁稍为下降, 100 小时以后菌量下降, 总酸和反丁产量稳定。

综上所述, 初步认为:

1. C_{90} 号菌产反丁的适宜发酵条件: 种子培养基 B, 种龄 24 至 48 小时均可, 接种量宜控制在 5% 至 10% 左右。采用挡板瓶用发酵培养基 A 发酵时产反丁可达 3.8%

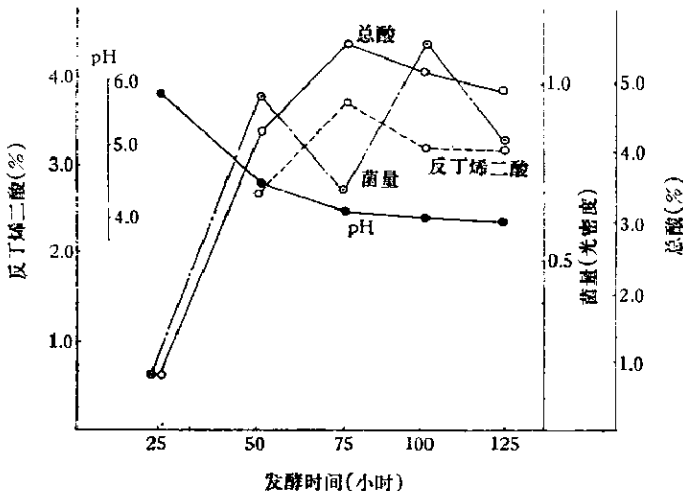
左右。流加试剂级碳酸钙产酸可达 5.15%。用发酵培养基 B 时, 产反丁可达 2.5% 左右。

2. C_{90} 号菌不同于日本烃富马酸假丝酵母^[2]。前者, 发酵周期短仅三天, 以重蜡作碳源, 用尿素作氮源, 铁离子对产反丁影响不大, 锌离子则抑制产反丁; 后者发酵需五天, 以轻蜡作碳源、用氯化铵当氮源, 铁有影响, 低浓度锌有利产反丁。

3. 存在的问题: C_{90} 号菌除了产生反丁烯二酸外, 还产生一定数量的 α -酮戊二酸和丁二酸如何使它只产生反丁烯二酸而不产生其他杂酸有待进一步工作。

参 考 资 料

- [1] 反丁烯二酸研究小组: 微生物学报, 15 (1): 15—20, 1975。
- [2] Yamada, K., Furukawa, T. & Nakahara, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 34(5):670—675, 1970。
- [3] Rhodes, R. A., Moyer, A. J., Smith, M. L. & Kelley, S. E.: *Appl. microbiol.*, 7:74—80, 1959。
- [4] Foster, J. W. & Waksman, A. S.: *J. Am. chem. Soc.*, 61:127—135, 1939。
- [5] Furukawa, T., Nakahara, T. & Yamada, K.: *Agr. Biol. chem.*, 34(9):1402—1406, 1970。



C_{90} 菌发酵过程

注: 发酵培养基 A, 种子培养基 B。

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

II. STUDIES ON THE FERMENTATION CONDITIONS

CHEN LI-QIONG TIAN JING FU MIAO-FU LIN YING-RUI CHEN XING-WU

XU CHUN-XI WANG SHI-ZHUO

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Fermentation conditions for the shake flask production of fumaric acid by *Candida rugosa* strain C₃₀ were investigated. After 74—85 hr. of fermentation in a medium containing 6% n-paraffin and 5% reagent grade CaCO₃, the yields of fumaric acid were 3.8—4.2% (conversion rate 63—70%). It was further increased to 5.15% (conversion rate 85%) by continuous feeding

of CaCO₃, but when using industrial grade CaCO₃, the yield was only 2.5%. The suitable chain length of n-paraffin is C_{14—18}. The suitable nitrogen sources are urea and (NH₄)₂SO₄ and NH₄Cl. Phosphate and yeast extract are necessary for acid production, zinc ion is inhibitory. Besides that, the rate of aeration and the age and amount of inoculum also greatly effect on acid production.