

液体石蜡发酵生产琥珀酸的研究

I. 菌种的筛选和诱变

田 静 傅妙福 徐纯锡 林应锐

王世卓 陈兴吴 徐冠珠 陈丽琼

(中国科学院微生物研究所, 北京)

通过对 703 株酵母菌的筛选, 得到了三株产琥珀酸在 1% 以上的菌株, 对其中的 S_1 , 进行了诱变处理, 从而得到了产琥珀酸最高的 SB-7, 该菌发酵液中琥珀酸含量达 4.43%。

发酵产物经分离提纯, 得到无色结晶物质, 经纸层析, 熔点测定和 1H 250 MHz 核磁共振分析, 证明是琥珀酸。

琥珀酸在工业、农业、医药及食品等方面都有广泛的用途。工业上用于制作粘合剂、涂料、弹性体、润滑剂、尼龙四及增塑剂等原料; 农业上可作植物生长刺激剂, 提高作物产量; 医药上可作多种药物, 是重要的轻工业和化工原料之一。

生产琥珀酸可以用化工方法, 也可以用微生物发酵法。这里介绍的是用微生物发酵生产琥珀酸的方法。我们选用液体石蜡作为原料, 筛选利用液体石蜡生产琥珀酸的酵母菌, 然后进行发酵研究。本文报道了利用液体石蜡发酵生产琥珀酸菌种的筛选和诱变。

材料与 方法

(一) 菌种

从 218 份土样中分离出能利用液体石蜡的酵母菌 686 株, 从本所保藏室得到 17 株, 共 703 株酵母菌。

(二) 培养基和培养条件

1. 培养基

1) 富集培养基组分: 麦芽汁 (10° 波美)

1000 毫升, 自来水 100 毫升, pH 5.2。

2) 种子培养基组分(%): 尿素 0.3; 磷酸二氢钾 0.2; 硫酸镁 0.1; 酵母浸汁 0.1; 液体石蜡 5.0。

3) 发酵培养基组分(%): 氯化铵 0.1; 磷酸二氢钾 0.05; 硫酸镁 0.05; 酵母浸汁 0.05; 玉米浆 0.1; 液体石蜡 6.0; 碳酸钙 3.0。

4) 液体石蜡: 我国锦西炼油五厂生产的馏分, 其主要成分为 C_{14-18} , 比重 0.75。各组分比例如下 (%): C_{10} 以下少量; C_{11} 0.5; C_{12} 3.4; C_{13} 9.7; C_{14} 22.4; C_{15} 23.4; C_{16} 21.0; C_{17} 14.5; C_{18} 3.9; C_{19} 0.8; C_{20} 以上少量。

2. 培养条件

采用 500 毫升带有档板的三角瓶, 培养基以 15 磅 30 分钟灭菌, 用旋转式摇床 (220 转/分, 偏心距 2.5 厘米), 于 28°C 培养。

(三) 菌种的分离、筛选方法

1. 液蜡酵母的分离

将采集的土样接入富集培养基中培养, 促使酵母菌繁殖, 再转入以液体石蜡为唯一碳源的种子培养基中进行二次富集培养, 使能利用液体石蜡的酵母菌大量繁殖, 然后将培养液稀释进行平

本文于 1980 年 3 月 5 日收到。

板分离,分离出的单菌落移入麦芽汁琼脂斜面备用。

2. 琥珀酸产生菌的筛选

把分离出来的液蜡酵母菌接入发酵培养基中,振荡培养3天,发酵液用纸层析法半定量测定,选出产琥珀酸的菌株。

(四) 菌种的诱变

采用⁶⁰钴和亚硝基胍交替处理的方法。⁶⁰钴用20—70万拉得,亚硝基胍用62.5—1000微克/毫升,处理时间为10—20分钟。经过处理的菌液,再进行下面的处理:对经⁶⁰钴照射过的菌液可直接移入种子培养基中培养;而对经亚硝基胍处理的菌液,必须先离心沉降,倾去含亚硝基胍的上清液,菌体再用无菌水洗两次,以除去残存的诱变剂,然后移入种子培养基中培养24小时。此两种处理方法得到的种子培养液,均需接入500毫升挡板三角瓶中发酵,振荡培养4—5天后,先在无菌室取少量发酵液稀释涂平板,然后测定发酵液pH,定量点样进行纸层析,选出层析斑点大于标准样品浓度的发酵液,进行琥珀酸、 α -酮戊二酸和延胡索酸的定量测定,并从相应的平板上分离出单菌落,再进行复筛,其余平板弃去。

(五) 分析方法

1. 发酵液中琥珀酸的定性测定:纸层析法。将发酵液用盐酸酸化,使其pH为1,把发酵液中的琥珀酸钙转成琥珀酸,然后定量点样,上行展开,层析滤纸为新华1或2号,展开剂为正丁醇:甲酸:水=10:3:10。在充分振荡后,取有机相。展开后用溴甲酚绿溶液显色。

2. 发酵液中琥珀酸的定量测定:银盐容量法^[1]。

3. 发酵液中 α -酮戊二酸的定量测定:2,4-二硝基苯肼比色法。取适量经过稀释的发酵液与2,4-二硝基苯肼作用20—30分钟后,加入足量乙酸乙酯抽提,去水层,然后加入足量的5%的碳酸钠,留水层,加碱后用72型分光光度计在490毫微米波长下比色。从标准曲线中查出相应的 α -酮戊二酸含量。

4. 延胡索酸的定量测定:高锰酸钾氧化法^[2,3]。

5. 菌的生长测定:比浊法^[1]。

实验结果

(一) 菌种的分离筛选

我们对703株酵母菌进行产琥珀酸菌株的筛选,结果选出利用液体石蜡产琥珀酸在1%以上,总酸在4%以上的有3株。其产酸情况列于表1。这些菌株是从广东茂名炼油厂的浸油土样中分离得到的。其中产琥珀酸较高的是S₁₉。

表1 三株酵母菌产酸比较

菌株	发酵液中酸的含量(%)			
	琥珀酸	延胡索酸	α -酮戊二酸	总酸
S ₁₉	2.32	1.82	0.8	4.94
C ₁	2.25	1.89	0.8	4.94
A ₁	1.17	2.55	1.0	4.72

(二) 菌种的诱变

为了进一步提高琥珀酸的产量和减少杂酸,我们选择S₁₉为出发菌株进行诱变。对该菌进行物理、化学因子的交替处理,先后共得到8株产琥珀酸较高的突变株,经过多次重复比较,结果见表2。又对其中6株菌进行产琥珀酸和其他杂酸的比较(见表3),结果以SB-7菌产琥珀酸最高,达到4.43%,比出发菌株S₁₉提高了91%,而且杂酸也较少,因此选定该菌进行深入研究。SB-7菌是先后经过⁶⁰钴70万拉得和20万拉得的照射,并且两次照射之间又经过1000和250微克/毫升的亚硝基胍处理得到的。其诱变的详细过程见图1。

经鉴定^[1],SB-7为皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)。

1972年日本报道液体石蜡发酵生产琥珀酸的菌种是*Candida brumptii* IFO-0731^[4],用8%(V/V)的液体石蜡,振荡培养8天,产琥珀酸2.36%^[5]。

1) 由方心芳先生指导,夏玉柳鉴定。

表 2 八株产琥珀酸菌株的比较*

菌株	S-N ₄	S ₇₀₋₁₋₃	S-A ₆	SB-7	S ₂₋₈	S ₁₉₋₉	S-B ₃₂	S-U ₂
实验次数	12	12	13	13	7	7	8	7
最高含量	3.96	4.19	4.24	4.43	3.97	3.67	4.43	3.90
最低含量	2.36	2.26	2.31	3.18	2.68	1.48	3.16	3.28
平均值	3.01	3.38	3.66	3.91	3.51	3.04	3.75	3.55

* 于 28°C 振荡培养三天。

表 3 六株菌同批实验产酸种类比较*

菌株	琥珀酸 (SA)		延胡索酸 (FA)		α-酮戊二酸 (α-K)		总酸 (T)
	SA%	SA/T%	FA%	FA/T%	α-K%	α-K/T%	
S-N ₄	2.46	49.7	1.66	33.6	0.82	16.7	4.94
S ₇₀₋₁₋₃	4.08	63.2	1.19	18.5	1.18	18.3	6.45
S-A ₆	4.24	63.9	1.24	18.8	1.13	17.3	6.61
SB-7	4.43	68.5	0.98	15.2	1.05	16.3	6.46
S-8	3.95	59.5	1.55	23.4	1.15	17.3	6.65
S ₁₉₋₉	3.67	59.0	1.42	22.0	1.19	19.0	6.28

* 于 28°C 振荡培养三天。

SB-7 发酵周期短，产酸能力强，是液体石蜡发酵生产琥珀酸的优良菌株。其发酵条件将在第 II 部分的研究报告中发表。

(三) SB-7 菌发酵液中琥珀酸的提取和鉴定

1. 琥珀酸的提取

加 H₂SO₄ (与培养基中 CaCO₃ 等克分子量)
发酵液 $\xrightarrow{\text{搅拌, 过滤}}$

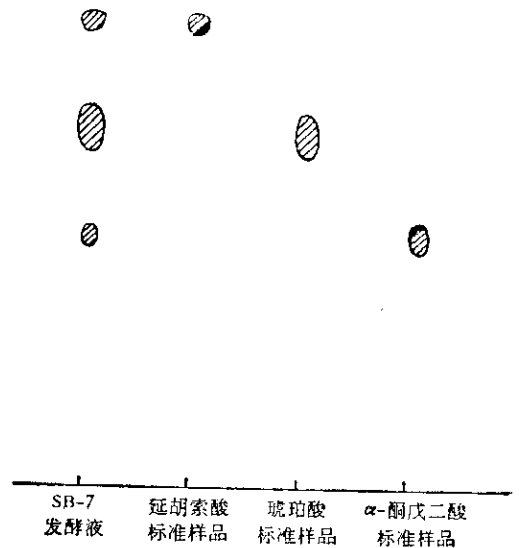


图 2 SB-7 菌发酵液纸层析图谱

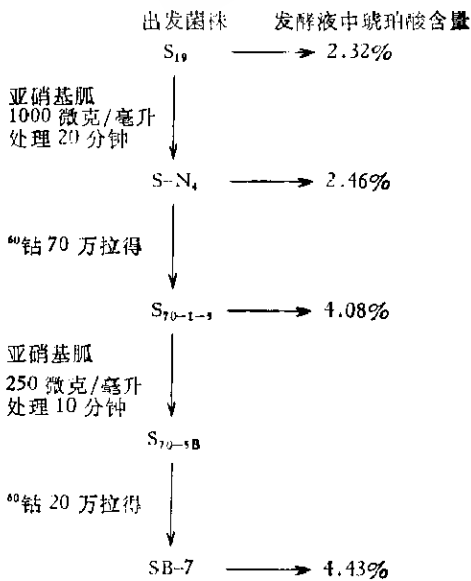


图 1 SB-7 突变株的诱变过程

FERMENTIVE PRODUCTION OF SUCCINIC ACID FROM LIQUID N-PARAFFIN BY *CANDIDA RUGOSA*

I. SCREENING AND INDUCED MUTATION OF THE MICROORGANISMS

Tian Jing Fu Miaofu Xu Chunxi Lin Yingrui Wang Shizhuo
Chen Xingwu Xu Guanzu Chen Liqiong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

During the screening of 703 strains of microorganisms, three strains of yeast were found to be capable of producing succinic acid from liquid n-paraffin, and the yield was more than 1%. The S₁₂ strain was chosen among them as a parent for mutation. The mutant, SB-7 strain, showed the

highest yield (4.43%) of succinic acid in n-paraffin medium. The product isolated and purified from culture broth of SB-7 strain is colorless crystal. The paper chromatographic behavior, melting point and ¹H 250 MHz NMR of this crystal coincided with those of authentic succinic acid.