

液体石蜡发酵生产琥珀酸的研究

II. 摇瓶发酵条件的研究

王世卓 林应锐 徐纯锡 徐冠珠

傅妙福 田静 陈丽琼

(中国科学院微生物研究所, 北京)

对产琥珀酸较优良菌株 *Candida rugosa* SB-7 进行了摇瓶发酵条件的研究, 产生琥珀酸的最适氮源是尿素, 用量以 0.1% 为宜。在发酵过程中必须加入足够量的 CaCO_3 , 以控制发酵液的 pH, 玉米浆也是影响发酵的重要因素。

SB-7 在适宜的条件下, 琥珀酸的最高产量可达 4.45%, 对液蜡的转化率为 74%, 在发酵过程中还可积累少量的延胡索酸和 α -酮戊二酸。

SB-7 在葡萄糖上能生长, 但不产琥珀酸, 对苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸和柠檬酸难以利用, 但能把某些酸转成其他酸, 如能把 α -酮戊二酸部份地转为琥珀酸和延胡索酸, 把大部份的延胡索酸转为苹果酸; 也能把小部份的柠檬酸转为延胡索酸; 对琥珀酸比较稳定, 只有很小量转为 α -酮戊二酸, 因此有利于积累琥珀酸。

前文报道了液体石蜡发酵生产琥珀酸的菌种筛选、诱变以及对主要发酵产物的鉴定^[1]、本文将报道不同的摇瓶发酵条件对产琥珀酸的影响。

材料与方 法

(一) 菌种 SB-7

(二) 培养基

1. 种子培养基组成 (%): 液蜡 3.0; 尿素 0.2; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; 酵母膏 0.1; 自然 pH, 15 磅 30 分钟灭菌。

2. 发酵培养基组成 (%): 液蜡 6—6.75; 尿素 0.1; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05; 酵母膏 0.05; 玉米浆 0.1; CaCO_3 7.0; 自然 pH, 15 磅 30 分钟灭菌, 尿素分开灭菌。

3. 液体石蜡:

重蜡: 同前文^[1]。

轻蜡: 北京东方红炼油厂分子筛工艺生产的, 主要成份 (%): C_{16} 5.6; C_{11} 17.87; C_{12} 35.56;

C_1 30.12; C_4 9.6; C_1 1.25。

(三) 培养条件

种子培养和发酵条件实验均采用带有挡板的 500 毫升的三角瓶, 种子装液量 30 毫升, 发酵装液量 50 毫升, 28°—30°C 振荡培养(摇床转速 220 次/分, 偏心距 2.5 厘米) 3—4 天。

(四) 分析方法

1. 含菌量的测定: 种子液用蒸馏水, 发酵液用 1N 的 HCl 分别稀释 10 倍, 用 72 型分光光度计于 620 毫微米测定其混浊度, 以 O. D. 值表示。

2. pH 的测定: 用上海试剂三厂生产的精密 pH 试纸测定。

3. 延胡索酸的测定: 用高锰酸钾滴定法^[2]测定。

4. α -酮戊二酸的测定: 用 2,4-二硝基苯肼比色法测定^[1]。

5. 琥珀酸的测定: 用银盐容量法^[1]。

本文于 1980 年 3 月 5 日收到。

实验结果

(一) 碳源对 SB-7 的生长和产琥珀酸的影响

1. 重蜡和轻蜡的影响

SB-7 菌对重蜡的利用比轻蜡要好, 菌体生长快, 菌量大, 而且产酸量也高(见表 1), 说明 SB-7 菌利用长链烃的能力比利用短链烃的能力强, 发酵 72 小时, 菌量和产酸量都达到最高。

表 1 SB-7 菌对重蜡和轻蜡的利用情况

发酵时间(小时)	液蜡		重蜡		轻蜡	
	测定项目	含菌量(O. D.)	琥珀酸(%)	含菌量(O. D.)	琥珀酸(%)	
24		0.66	0.09	0.17	0	
48		0.93	1.82	0.49	0.61	
72		0.98	3.04	0.64	2.67	
96		0.74	2.79	0.33	2.44	

培养基: 除液蜡外, 其他成份与发酵培养基相同。

2. SB-7 菌对葡萄糖和某些有机酸的利用情况

SB-7 菌对液蜡利用最好, 生长旺盛, 不仅产生琥珀酸, 同时还产生部份延胡索酸和少量的 α -酮戊二酸。其次也能利用葡萄糖, 菌体生长也比较旺盛, 但在发酵液中未见上述三种酸, 可能 SB-7 菌利用葡萄糖作碳源时的代谢途径和利用液蜡时不同。对苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、柠檬酸和 α -酮戊二酸很难利用, 菌体生长很差, 但在钙盐的状态下, 尽管菌量不大, 培养 3 天后也能把某些酸转成其他酸。如能把 α -酮戊二酸部份转成琥珀酸和延胡索酸, 把大部份的延胡索酸转为苹果酸, 也能把小部份的柠檬酸转为延胡索酸, 而对琥珀酸基本上比较稳定, 只有极少量转为 α -酮戊二酸, 因此, 有利于大量积累琥珀酸。结果见表

表 2 SB-7 菌对葡萄糖和某些有机酸的利用情况*

测定项目 碳源(%)	pH	含菌量 (O. D.)	琥珀酸 (%)	α -酮戊二酸 (%)	延胡索酸 (%)
葡萄糖 (4.0)	6.2	0.75	0	0	0
	6.2	0.74	0	0	0
	6.2	0.83	0	0	0
苹果酸 (4.0)	7.0	0.09	0	0	0
	7.0	0.18	0	0	0
	7.0	0.15	0	0	0
延胡索酸 (4.0)	7.0	0.18	0	0	1.19**
	7.0	0.22	0	0	1.22
	7.0	0.18	0	0	1.34
琥珀酸 (4.0)	7.0	0.36	3.73	0.07	0
	7.0	0.15	3.46	0.06	0
	7.0	0.15	3.86	0	0
柠檬酸 (4.0)	7.0	0.04	0	0	0.09
	7.0	0.15	0	0	0.075
	7.0	0.06	0	0	0.03
α -酮戊二酸 (4.0)	7.0	0.15	0.66	2.16	0.69
	7.0	0.13	0.89	2.55	0.86
	7.0	0.13	0.92	2.47	0.74
液体石蜡 (6.75)	6.7	0.80	3.33	0.93	2.63
	6.7	0.84	3.46	1.05	2.43
	6.7	0.80	3.19	0.93	2.51

* 种子用液蜡培养, 接种量 10%; 发酵培养基: 除碳源外其他成份同培养基 2

** 部分延胡索酸转成苹果酸。

2。

(二) 无机氮源对产琥珀酸的影响

分别用五种不同的无机氮源对菌的生长和产酸进行比较, 结果见表 3。以尿素为氮源时, 菌的生长最好, 产琥珀酸也最高, 其次是氯化铵、硝酸铵和硫酸铵, 硝酸钠最差, 很难利用。菌的生长和产酸都很低。说明 SB-7 菌对硝基氮难以利用, 而尿素是最适氮源。

(三) 液蜡、尿素和碳酸钙三者的不同配比对琥珀酸积累的影响

液蜡、尿素和碳酸钙是 SB-7 发酵生产琥珀酸的主要成份, 为了找到三因子的最

表3 不同氮源的影响

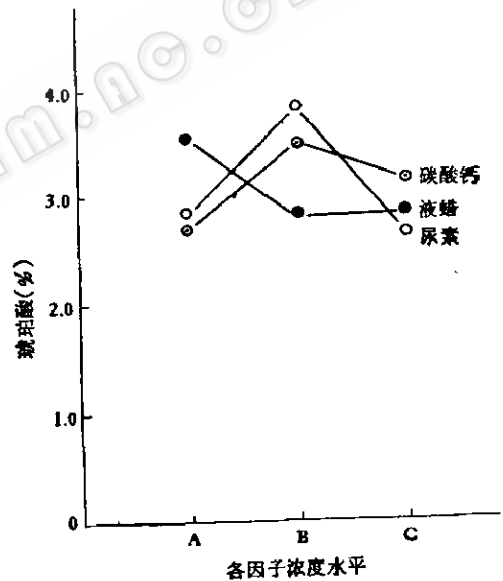
氮源	含菌量 (O. D.)	琥珀酸 (%)
尿素	0.85	3.72
氯化铵	0.81	3.27
硫酸铵	0.77	2.56
硝酸铵	0.76	3.05
硝酸钠	0.42	1.61

表4 液蜡、尿素和碳酸钙不同配比的影响

培养基			发酵液		
液蜡 (%)	尿素 (%)	碳酸钙 (%)	pH	琥珀酸 (%)	琥珀酸/ 液蜡 (%)
6	0.05	5	6.4	3.85	64
			6.4	3.54	59
6	0.1	7	6.4	4.26	71
			6.4	4.45	74
6	0.15	9	6.7	3.01	50
			6.7	3.13	52
7.5	0.05	7	6.7	2.82	37.6
			6.7	2.59	34.5
7.5	0.1	9	6.4	4.43	59
			6.4	4.14	55
7.5	0.15	5	4.1	1.63	21.8
			4.1	1.71	22.8
9.2	0.05	9	6.7	2.40	26
			6.7	2.20	24
9.2	0.1	5	4.4	3.04	33
			4.1	2.86	31
9.2	0.15	7	6.4	3.27	35
			6.6	3.70	40

佳配比, 我们采用正交实验设计法进行实验, 结果如图1和表4所示。尿素用量在0.1%以下、有利于琥珀酸的积累, 当尿素用量高于0.1%时, 琥珀酸的积累受到限制。因此将尿素用量控制在0.1%为宜。液

蜡的用量和碳酸钙的用量密切相关, 液蜡6%、碳酸钙7%时, 琥珀酸的绝对值和转化率都达到最高, 如果提高液蜡的用量至7.5%, 碳酸钙的用量就必须相应提高至9%。否则, 碳酸钙不够, 发酵液的pH下降, 限制了琥珀酸的积累。此时, 虽然琥珀酸的绝对值也高, 但其转化率却低于前者。碳酸钙的用量稍过量, 对酸的积累没有不良影响, 但用量过大则会影响发酵过程中的通气效果; 另外过剩的碳酸钙不仅造成浪费, 且给琥珀酸的提取增添麻烦。因此, 发酵培养基以尿素0.1%, 液蜡6%, 碳酸钙7%为积累琥珀酸的最佳配比, 产琥珀酸最高达4.45%、转化率最高达74%。

图1 液蜡、尿素和CaCO₃三因子对产琥珀酸的影响

注: 培养基成份除液蜡, 尿素, CaCO₃外, 其余成份同发酵培养基2
三因子的浓度如下:

	A	B	C
液蜡 (V/V)	6	7.5	9.2
尿素 (W/V)	0.05	0.10	0.15
CaCO ₃ (W/V)	5	7	9

(四) 试剂级碳酸钙和工业级碳酸钙的比较

在发酵过程中, 碳酸钙是必须的, 培养

基中加入适量碳酸钙能和不断产生的酸形成钙盐,保持培养基处于最适 pH 环境,有利于大量积累琥珀酸,但是不同纯度的碳酸钙对琥珀酸的产生并不完全一样,如表 5 的结果所示。对琥珀酸产率来说,工业级碳酸钙比试剂级碳酸钙要高得多,但对延胡索酸的作用则相反。由于工业级碳酸钙中含有大量镁盐,因此在试剂级钙盐中加入不同量的硫酸镁做实验,结果产率仍然没有提高,估计不是镁盐的作用,而是其他未知因素的影响。

表 5 碳酸钙的影响

测定项目 碳酸钙	pH	含菌量 (O.D.)	延胡索酸 (%)	琥珀酸 (%)
工业级	6.4	0.85	1.64	3.72
试剂级	6.2	0.95	2.49	2.38
试剂级+硫酸镁 0.5%	6.2	0.95	2.59	2.52
试剂级+硫酸镁 1.0%	5.8	0.90	2.22	2.41

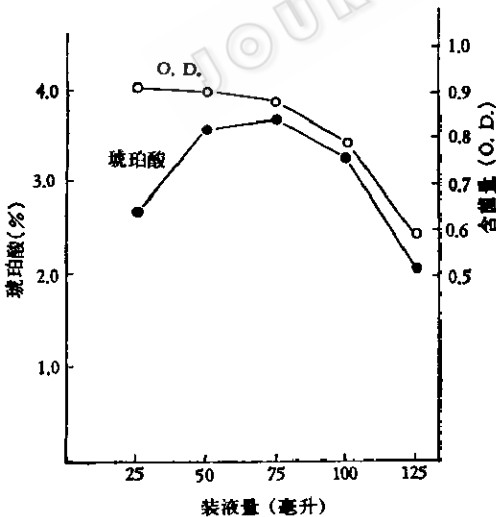


图 2 不同摇瓶装量对产琥珀酸影响

注: 培养基同 2

(五) 通气量对产琥珀酸的影响

在 500 毫升带挡板的三角瓶中, 装入

不同量的培养基进行实验, 结果如图 2 所示。当装液量少于 50 毫升或多于 75 毫升时, 琥珀酸的积累受到限制。最适装液量为 50—75 毫升, 产琥珀酸的水平最高, 这说明琥珀酸的积累需要一定的通气量, 但通气量太小或太大均不利。

(六) 磷酸二氢钾和硫酸镁对产琥珀酸的影响

从表 6 的结果可以看出, 当培养基用工业碳酸钙和自来水配制时, 可以不加镁盐, 因为在此条件下, 培养基中已有足够量的镁盐。但若不加磷盐, 则琥珀酸的产量要低些。磷酸二氢钾的最适用量为 0.05%, 用量过高对琥珀酸的积累不利。

表 6 磷酸二氢钾和硫酸镁的影响

培养基中 (%)		发酵液中 (%)		
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	α -酮戊二酸	延胡索酸	琥珀酸
0.05	0.05	1.81	1.90	3.69
		1.97	1.92	3.59
0	0.05	1.51	2.19	3.23
		2.03	1.86	3.03
0.05	0	1.62	1.89	3.70
		1.98	2.19	3.73
0.1	0.1	1.99	1.79	3.39
		2.28	1.77	3.13

(七) 生长素和维生素对产琥珀酸的影响

1. 玉米浆和酵母膏的影响

从表 7 可看出, 当酵母膏用量为 0.05% 时, 若不加玉米浆则几乎不产酸, 但将酵母膏的浓度提高到 0.1%, 琥珀酸的产量就大大提高。0.05% 酵母膏和 0.1% 的玉米浆是最适产酸条件, 如果把两者的浓度再提高一倍, 对琥珀酸的积累会有不良影响。

表 7 酵母膏、玉米浆的影响

酵母膏 (%)	玉米浆 (%)	pH	琥珀酸 (%)
0	0.20	5.8	3.72
0	0.10	6.6	3.66
0.05	0.10	5.2	3.91
0.05	0	6.8	0.23
0.10	0	6.6	3.74
0.10	0.20	6.8	3.44

2. 维生素对生长和产酸的影响

从表 8 的结果可以看出,当维生素 B₁、B₂ 和 H 混合使用时,或分别省去 B₁ 或 B₂ 时,其产酸水平基本差不多,略低于对照,若省去维生素 H,则产酸明显地下降,因此维生素 H 对琥珀酸的积累比维生素 B₁ 或 B₂ 更重要。

表 8 维生素的影响*

维生素	含菌量 (O. D.)	琥珀酸 (%)
B ₁ + B ₂ + H	1.15	2.32
B ₁ + H	1.08	2.29
B ₂ + H	1.17	2.46
B ₁ + B ₂	0.92	1.21
对 照	1.05	2.71

* 维生素 H: 1.0 毫克/公升;对照:
维生素 B₁: 20 毫克/公升;酵母膏 0.05%;
维生素 B₂: 10 毫克/公升。玉米浆 0.1%。

(八) 金属离子对产琥珀酸的影响

我们试验了 Fe²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ 和 Cu²⁺ 对产琥珀酸的影响,发现加入这四种金属

离子对产酸均没有明显地提高,当在培养基中加入 10 微克/毫升的硫酸亚铁时,琥珀酸的积累略有提高,但当浓度提高到 100 微克/毫升以上时,对产酸有明显的抑制作用,硫酸锰的含量在 10 微克/毫升就有不良影响,用量越大,抑制作用越明显。硫酸锌有些好的影响,但不明显(见表 9),因此培养基中可以不加这些金属离子。

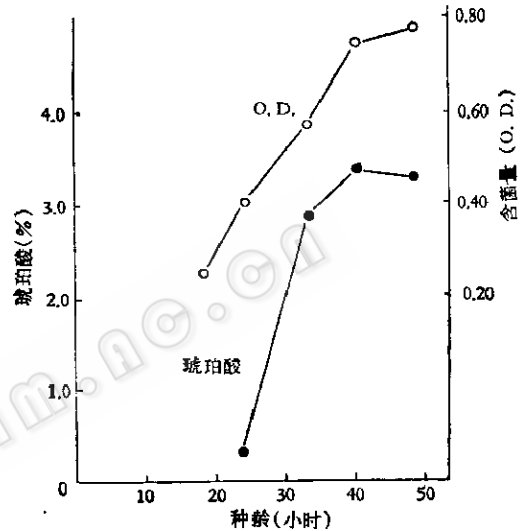


图 3 种龄对产琥珀酸的影响

注: 种子培养基同 1 发酵培养基同 2

(九) 种龄和接种量对产酸的影响

从图 3 和图 4 的结果看出,种龄以 40—48 小时,琥珀酸的产量最高,此时菌体生长已达稳定期的初期,种子接入发酵培养基后能很快分裂繁殖。接种量以 10%

表 9 金属离子的影响*

FeSO ₄ ·7H ₂ O (微克/毫升)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (微克/毫升)	琥珀酸 (%)	MnSO ₄ ·H ₂ O (微克/毫升)	CuSO ₄ ·5H ₂ O (微克/毫升)	琥珀酸 (%)
0		2.49	0		2.45
10		2.61	10		2.25
100		2.19	100		1.87
1000		1.04	1000		1.04
	10	2.16		0.2	2.23
	100	2.05		2.0	2.14
	1000	2.47		20.0	1.38

* 培养基用蒸馏水配制,用试剂级碳酸钙。

最适, 发酵液中琥珀酸的产量最高, 低于 10% 或高于 10% 均不利于琥珀酸的积累。

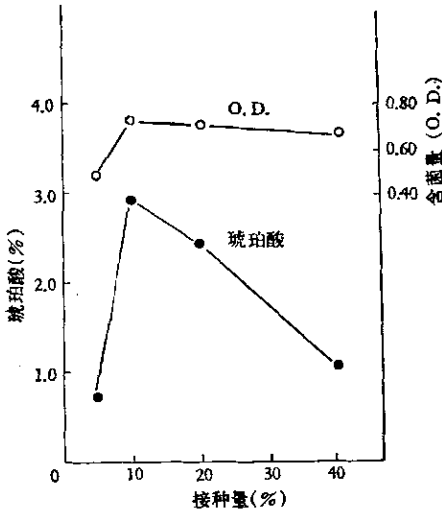


图4 接种量与产琥珀酸关系

注: 种子培养基同1 发酵培养基同2

(十) SB-7 利用液体石蜡产生琥珀酸的过程

在摇瓶发酵条件下, 接种后至 48 小时, 发酵液中菌体浓度一直是上升的, 菌体大量繁殖, 达到最高, 但酸的积累较缓慢, 这一时期主要是菌体生长阶段, 从 48 小时以后, 发酵液中菌体量基本上不再增加, 而各种有机酸开始大量积累, 发酵 68 小时, 琥珀酸的产量达到高峰, 68 小时以后, 随着发酵时间的延长, 琥珀酸、延胡索酸和 α -酮戊二酸基本上不再增加, 而某些酸的互相转化有所变化, 如延胡索酸下降最快, 可能有一部份转为苹果酸, 在发酵过程中, 因为加入了足够量的碳酸钙能自动中和发酵液中的有机酸成为钙盐, 所以发酵过程中,

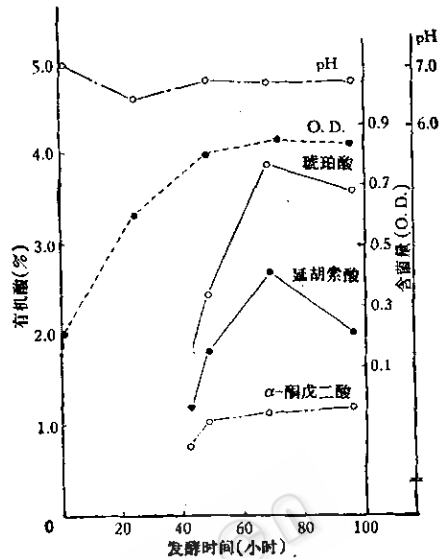


图5 SB-7 菌的发酵过程

发酵液的 pH 基本上是稳定的。

综上所述, SB-7 是一株利用液蜡产生琥珀酸较优良的菌株, 在最适条件下, 琥珀酸的产量最高达 4.45%, 琥珀酸对液蜡的转化率达 74%。另外同时还产生延胡索酸和 α -酮戊二酸, 因此, 总酸量是相当高的。

日本曾报道, 用 *Candida brumptii* IFO-0731 利用液蜡 8% (体积比), 培养 8 天, 琥珀酸的产量为 2.36%。我们用 SB-7 菌产琥珀酸的水平要高得多。

参 考 文 献

- [1] 田静等: 微生物学报, 21(2):229-233, 1981 年。
- [2] 陈丽琼等: 微生物学报, 15(3):197-204, 1975 年。
- [3] Sato M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(10): 1745-1749, 1972.
- [4] Sato M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(11): 1969-1974, 1972.

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

II. SHAKE FLASK FERMENTATION CONDITIONS

Wang Shizhuo Lin Yingrui Xu Chunxi Xu Guanzu

Fu Miaofu Tian Jing Chen Liqiong

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

Fermentation conditions for the shake flask production of succinate by *Candida rugosa* SB-7 were investigated. The suitable nitrogen sources is urea in a concentration of 0.1%. In order to control the pH value of the culture broth, enough CaCO_3 is necessary for producing acid in the fermentative process. Besides that, some organic nutrients such as corn steep liquor are also important.

The highest yield of succinate was 4.45% and the conversion rate was 74% under suitable conditions. During the fermentation process, some fumarate and α -

ketoglutarate were also produced.

Strain SB-7 utilizes glucose for good growth but no succinate was produced. It was unable to utilize malate, fumarate, succinate α -ketoglutarate and citrate for growth but converted some of them into others, fumarate was converted to malate, α -ketoglutarate to succinate and fumarate, citrate to fumarate, but succinate was more stable and converted to α -ketoglutarate to a less extent. Thus the accumulation of succinate in the culture broth was enhanced.