



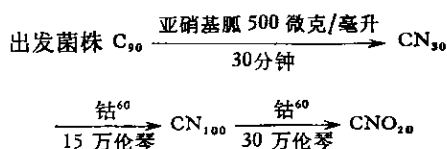
# 提高液体石蜡发酵生产反丁烯二酸产率的试验

无 锡 市 溶 剂 厂  
中国科学院微生物研究所反丁烯二酸组

液体石蜡发酵反丁烯二酸中间试验完成后,为进一步降低生产成本,提高经济效益,我们又做了菌种诱变和原料代用试验。用亚硝基胍和钴<sup>60</sup>交替处理原生产菌种,获得一株代号为 CNO<sub>20</sub> 的优良产酸菌。使用该菌进行发酵,并以石灰石粉代替培养基中添加的工业碳酸钙,取得了良好结果,产酸水平提高一倍,产酸率达 6% 以上,对液体石蜡的转化率最高为 116%。

## 菌种诱变试验

以反丁烯二酸产生菌皱褶假丝酵母 C<sub>90</sub> 为原始菌株,用亚硝基胍和钴<sup>60</sup> 进行处理,其诱变程序如下:



亚硝基胍处理时,首先称取 10 毫克亚硝基胍放入试管,然后加入 0.5 毫升 20% 甲酰胺溶液,待溶解后再加入 4.5 毫升无菌水,即成 2000 微克/毫升的亚硝基胍溶液。然后按 500 微克/毫升的浓度,将亚硝基胍溶液加入出发菌株 C<sub>90</sub> 的孢子悬浮液中,于 30—32℃ 处理 30 分钟,后用无菌水稀释,作平板分离,挑出菌落用表 1 所示的种子培养基和发酵培养基进行摇瓶(往

表 1 筛选突变株用种子与发酵培养基

组 分	液 蜡 % (体积/体积)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (%)	尿 素 (%)	硫 酸 铵 (%)	酵母浸汁 (%)	碳 酸 钙 (%)
种 子 培 养 基*	5	0.2	0.1	0.3		0.05	
发 酵 培 养 基	6	0.05	0.05		0.3	0.05	5

\* 种龄 24 小时,接种量 1%。

复摇床 110 次/分,7 厘米振幅,30—33℃ 培养 90 小时)筛选。

经筛选得到一株反丁烯二酸生产能力较高的菌株 CN<sub>100</sub>,再将该菌制成孢子悬浮液,以 15 万伦琴钴<sup>60</sup> 射线进行处理,并以前述同样方法分离、筛选。选出较优

良的菌株 CN<sub>100</sub>,再以 30 万伦琴钴<sup>60</sup> 射线处理,选出了 CNO<sub>20</sub>。于摇瓶发酵条件下,在发酵培养基中加入 5% 工业碳酸钙时,该菌产酸率较原菌株 C<sub>90</sub><sup>[1]</sup> 高 30%,而在发酵培养基中加入 10% 石灰石粉代替工业碳酸钙时,比 C<sub>90</sub> 菌株产酸率高 80%,结果见表 2。

表 2 CNO<sub>20</sub> 同 C<sub>90</sub> 反丁烯二酸产率比较

反 丁 烯 二 酸 (%) 菌 种	不同钙源 和发酵 时间	工 业 CaCO <sub>3</sub> 5%				石 灰 石 粉 10%		
		61 小时	84 小时	105 小时	120 小时	66 小时	96 小时	116 小时
CNO <sub>20</sub>		1.37	2.18	3.53	4.25	3.23	4.35	6.27
C <sub>90</sub>		1.61	2.03	2.20	3.12	1.85	2.60	3.40

注:种子培养基与发酵培养基基础成分同表 1。反丁烯二酸的测定用高锰酸钾法冷滴定<sup>[2]</sup>。

# 石灰石粉代替碳酸钙的试验

1948 年瑞士人用霉菌以糖质原料发酵反丁烯二酸时曾用过石灰石粉作中和剂,产酸结果与用碳酸钙相同,转化率为 60%<sup>[1]</sup>。我们的试验中,以解脂假丝酵母 CNO<sub>10</sub> 发酵时,使用无锡市石灰厂的天然石灰石粉代替工业碳酸钙,发现对反丁烯二酸的生成有明显的促进作用。石灰石粉在发酵培养基中的用量为 10% 时,产酸最高达 6.45%,对液蜡的转化率为 107%;用量为 7% 时,液蜡的转化率 90—100%;用量为 5% 时,转化率仍在 80% 以上,均比工业碳酸钙效果好(见表 3)。

表 3 石灰石粉代替碳酸钙对反丁烯二酸产率的影响

钙 源 (%)	反 丁 烯 二 酸 (%)		
	72 小时	96 小时	118 小时
石灰石粉 5	2.76	3.32	5.37
石灰石粉 7	3.15, 2.71	4.43, 5.56	5.60, 6.60
石灰石粉 10	3.45	4.56	6.45
石灰石粉 5	1.26, 2.17	2.36, 2.37	3.40, 3.40

注:发酵培养基同表 1 所示,其中氮源硫酸铵改用尿素代替。

为了考察石灰石粉加入发酵培养基后对各种有机酸生成比例的影响,又以纸层析法进行了鉴定,用正丁醇-甲酸-水溶剂系统<sup>[1]</sup>,以 0.08% 溴甲酚绿水溶液显色,层析图谱示如图。由图看出,反丁烯二酸仍居绝对优势, $\alpha$ -酮戊二酸、丁二酸的斑点同使用工业碳

酸钙时的情况相同。又用酸碱滴定法和 2,4-二硝基苯肼法分别测定了总酸和  $\alpha$ -酮戊二酸的实际含量,结果总酸为 8.72%, $\alpha$ -酮戊二酸为 0.64%。

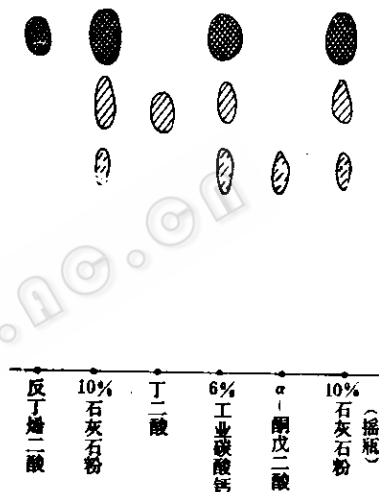


图 石灰石粉代替工业碳酸钙时发酵液层析谱  
(10% 石灰石粉与 6% 工业碳酸钙样品点均系 5000 升罐发酵液)

## 参 考 资 料

- [1] 陈丽琼、田静、傅妙福等: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,微生物学报第 15 卷第三期 197—204 页。
- [2] 反丁烯二酸研究小组:液体石蜡发酵生产反丁烯二酸,I 菌种的筛选和鉴定,微生物学报第 15 卷第一期 15—20 页。
- [3] Hyman R, Fumaric acid fermentation, U. S. 2, 861,922 Nov. 25, 1958.