

利用液体石蜡发酵生产 α -酮戊二酸*

中国科学院微生物研究所工厂发酵车间(北京)

α -酮戊二酸,又名1-氧代戊二酸,是测定肝功能指标谷-丙转氨酶(G. P. T.)的生化试剂。以往国内生产采用有机合成法,但在原料来源和安全生产上存在一定问题。

我们利用解脂假丝酵母2.1207,采用液体石蜡和其它适当条件,发酵生产 α -酮戊二酸,1000升罐发酵产 α -酮戊二酸为3%,经提炼可得符合标准的 α -酮戊二酸产品,提炼总收率在20%左右,按1000升罐发酵生产 α -酮戊二酸,经济上可以过关。

材 料 和 方 法

一、菌种

A₄₂, A₂₀, C₃₇ 能利用石蜡的细菌
2.1207 解脂假丝酵母

二、标准品

以上海合成法生产的 α -酮戊二酸为标准品。

三、液体石蜡

工业产品,主要成份为正构的C₁₂₋₁₇的液体石蜡。比重为0.75左右。

四、培养基和培养条件

(一)培养基

1. A₂₀, A₄₂ 由牛肉汁斜面接入的发酵培养基成份为(%):

NH₄NO₃ 2, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, MnSO₄ 0.002, FeSO₄ · 7H₂O 0.002, 玉米浆 0.02, 石蜡 10(v/v), CaCO₃ 3,自然 pH₀。

2. C₃₇ 由牛肉汁斜面接入的发酵培养基成份为(%):

NH₄Cl 0.3, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.05,

* 元素分析和红外光谱测定系由中国科学院化学研究所代测。

CaCO₃ 3, 酵母膏 0.05, 石蜡 6.0(v/v)。

3. 2.1207 菌由麦芽汁斜面接入的发酵培养基成份为(%):

(NH₂)₂CO 1, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, 玉米浆 0.001, 石蜡 10(v/v), pH 5.0。

(二)培养条件

摇瓶为 200 毫升三角瓶和 500 毫升三角瓶 两种, 前者装量 10 毫升, 后者装量 20 毫升。培养基经 8 磅 20 分钟灭菌, 用旋转式摇床 (220 转/分偏心距 3.5 厘米), 30℃ 培养 36 小时。

五、分析方法

α-酮戊二酸的定性测定, 采用其衍生物的纸上层析。将发酵液加入 2,4-二硝基苯肼形成苯腙, 再将其转入乙酸乙酯中, 用新华一号滤纸点样。展开剂为正丁醇:甲酸:水 = 4:1:2。充分振荡后取有机相。上行展层。

α-酮戊二酸的定量测定: 经定性测定证明发酵液中只有 α-酮戊二酸存在, 而无其它酮酸存在, 国外也有相同的报道。因此我们用 2,4-二硝基苯肼的方法测定发酵液中总酮酸, 实际上是定量的测定发酵液中的 α-酮戊二酸。因为在液体石蜡发酵中, 其它酮酸只有在某些条件下才能有少量。由此主要是丙酮酸, 而丙酮酸极不稳定。所以实际上是不存在的。这已为实验所证实。

实验结果

一、菌种的确定

(一)产 α-酮戊二酸的对比实验

在得到四株经测定有产 α-酮戊二酸能力的菌种以后, 用它们各自的最适条件, 以产酸量为指标, 采用对比的方法, 比较其产酸能力, 结果见图 1。

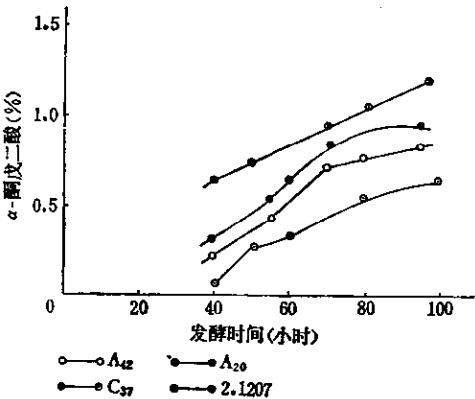


图 1

C₃₇ 产酸较低, 实验室发酵液用滤纸自然过滤较困难。A₄₂、A₂₀ 产酸较 C₃₇ 为高, 但自然过滤较难, 发酵

过程 pH 较高, 所以容易染杂菌。2.1207 菌产酸最高, 滤纸自然过滤, 滤液透明度好, 发酵过程 pH 较低, 发酵易控制, 产酸单一, 在现定条件下, 不积累其它有机酸, 见图 2。

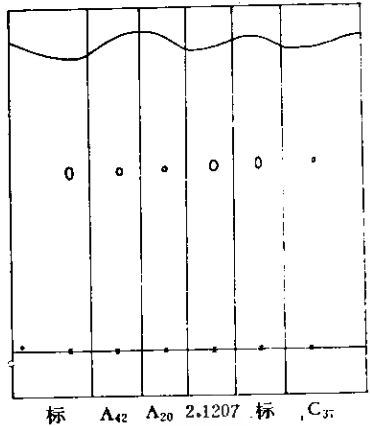


图 2

(二) 2.1207 菌发酵过程中流加 CaCO₃ 的实验

据报道, 发酵过程中流加 CaCO₃, 能提高产酸率。我们根据 2.1207 菌发酵在 48 小时 pH 已下降至 2.5 左右。这时酵母细胞壁加厚, 体积变小。这样我们即在发酵 48 小时和 72 小时各流加 0.5% CaCO₃。实验结果表明: 流加 CaCO₃ 可提高 α-酮戊二酸的产量, 并改进了发酵控制。结果见图 3。

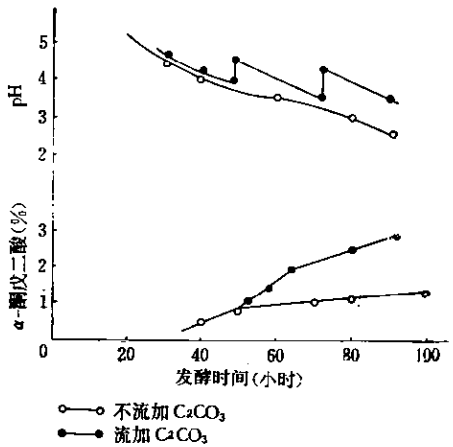


图 3

二、1000 升罐的发酵结果

(一)培养基成分

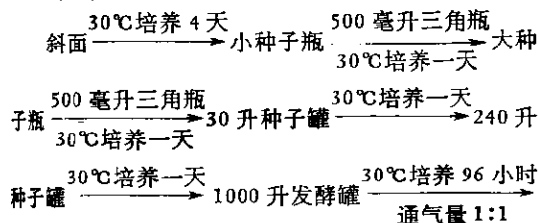
斜面培养基 (%): 尿素 0.3, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, 玉米浆 0.1, 洋菜 2, 液体石蜡 5 滴,

8磅20分钟灭菌。

种子培养基(%)：尿素0.3(分别消毒后加入)， KH_2PO_4 0.2， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1，玉米浆0.1，液体石蜡1(v/v)，8磅20分钟灭菌。

发酵培养基(%)：尿素1(分别消毒后加入)， KH_2PO_4 0.2， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1，玉米浆0.001，液体石蜡10(v/v)，8磅20分钟灭菌。接种量10(v/v)。

(二) 流程



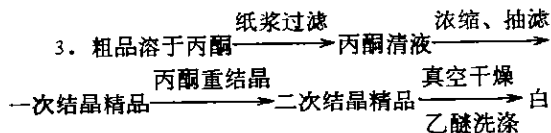
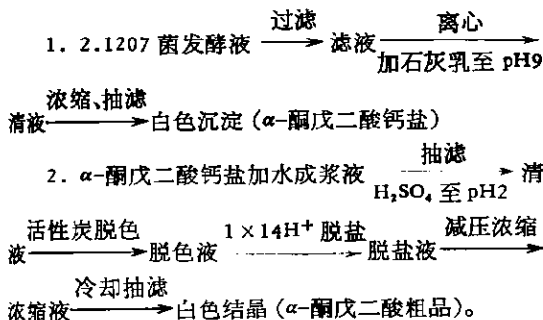
放罐

1000升罐发酵至24小时和48小时，各流加0.5% CaCO_3 ，根据定量测定产酸量不增加时(3%左右)即放罐。

1000升罐发酵结果表明， α -酮戊二酸产量对液体石蜡的转化率为40%左右。

三、 α -酮戊二酸的提取和鉴定

(一) 提取



色结晶成品。

(二) 鉴定

1. 纸上层析

经层析后在紫外灯下(2538 Å)观察，找出吸收斑，显色后斑点Rf值与标准品相同。

2. 元素分析

按 $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_5$ 计算理论值：C:41.07，H:4.14。发酵结晶产物测定值：C:41.00，H:4.25。

3. 红外吸收光谱

吸收峰和标准图谱相比主峰一致。

4. 熔点测定

发酵产物的熔点为112℃—114℃，与标准品一致。结果表明，发酵液中提取的结晶为 α -酮戊二酸。同时也无残留液体石蜡存在。

四、 α -酮戊二酸的应用实验和质量检定标准

发酵法制得的 α -酮戊二酸的应用实验是1972年在首都医院(北京)进行的。以合成法的 α -酮戊二酸作对照，每组实验40个。结果采用统计方法中百分比比较法计算。说明二者差异不显著。

三年来大量应用的结果也证明发酵法得到的 α -酮戊二酸是适用的。

发酵法制得的 α -酮戊二酸的质量检定标准：我们参照有关同类产品的质量标，并根据我们的具体情况，确定发酵法生产的 α -酮戊二酸标准为：

含量	≥99%
熔点范围	108℃—112℃
醇中溶解度	澄明
灼烧残渣	<0.1%