

正烷烃发酵生产柠檬酸及异柠檬酸的研究

I. 解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) PC 711 的分离与鉴定*

上海新型发酵厂和复旦大学生物系石油发酵科研协作组

1. 用土壤增殖培养方法筛得若干株酵母,均能以正烷烃为唯一碳源产生柠檬酸和异柠檬酸。若于培养基中加适量碳酸钙则产总酸值均在 2.5% 以上。
2. 产酸较高的菌株 PC 711,经鉴定是解脂假丝酵母。摇瓶培养 2 天后菌体生长达到高峰,5 天后总酸达到 7—8%,对投油转化率 130% 左右。
3. 发酵液中异柠檬酸分别用纸层析和旋光法进行定性和定量测定,方法简易、有效,适于筛选、条件试验和菌种诱变等工作中应用。
4. 菌体的产酸过程中,柠檬酸与异柠檬酸含量相近,平行上升,而改变培养基氮源等又能形成其它产物。

柠檬酸是生物机体三羧酸循环中的重要中间产物。同时,它在生产上也有较广泛的应用。目前,柠檬酸主要以糖质为原料用黑曲霉发酵制取。

近年来,随着石油发酵研究的发展,日本阿部又三等首先报道了应用正烷烃为唯一碳源生产柠檬酸及异柠檬酸的研究^[1]。美国也进行了类似的工作^[2]。以正烷烃为原料发酵生产柠檬酸,不仅在充分利用丰富的矿产资源,替代糖类物质,扩大原料来源方面具有实际的意义,而且对了解正烷烃在生物体内的转变情况,探索机体的烃代谢规律,也有着理论价值。因之,我们进行了酵母菌发酵正烷烃生产柠檬酸的研究。我们从油田土壤中,分离得到一株产柠檬酸较高的解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica* PC 711),该菌株除能利用正烷烃产生柠檬酸外,也累积异柠檬酸。本文着重报道产柠檬酸的酵母菌株 *Candida lipolytica* PC 711 的筛选和鉴定,发酵产物的分析以及该菌株在摇瓶条件下的生长和

产酸情况。

材料和方法

一、生产柠檬酸的酵母菌的筛选

取油田土样,先经摇瓶增殖培养 3 天,然后用平板划线法分离(平板培养基同增殖培养基,另加琼脂 2.5%),挑取单菌落于油斜面上,培养 2—3 天后,摇瓶发酵选取产柠檬酸的菌株。本文摇瓶培养,装液量为 20 毫升/250 毫升三角瓶或 40 毫升/500 毫升三角瓶。均用往复摇床(振幅 10 厘米,频率 110 次/分钟),温度为 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

二、PC 711 菌株发酵培养

取菌龄 2 天的麦芽斜面,挑取一环接种于种子培养基内,培养 24 小时后,取一毫升菌液接种于发酵培养基振荡培养 4—5 天。

有关培养基成分列如表 1。

三、分析方法

(一) 游离酸测定:取发酵液一毫升,以 0.1429N NaOH 滴定,用酚酞作指示剂,滴定毫

* 在工作中承中国科学院微生物研究所协助,特此致谢。

本文 1973 年 1 月 12 日收到。

表 I 有关培养基成分

成分 (%)	增殖	油料面	种子	发 酵
KH ₂ PO ₄	0.25	0.05	0.05	0.05
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	0.1	0.1	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.001	0.001	—
尿 素	0.15	0.15	0.15	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	0.15	0.15	0.25
酵 母 膏	0.2	0.2	0.2	0.15
重 油* (V/V)	8	5	5	8—10
CaCO ₃	—	—	—	1.5—2.0
琼 脂	—	2.5	—	—
pH	自然	~5	~5	自然
灭 菌 条 件	0.5 公斤/厘米 ² 30 分钟			1 公斤/厘米 ² 20 分钟

* 重油主要成分为 C₁₄—C₁₈ 的正烷烃, 锦西石油五厂出品。

升数为发酵液中含游离酸的百分数(相当于 C₆H₈O₇·H₂O)。发酵液中的总酸值为游离酸加上被碳酸钙中和的酸值。

(二) 柠檬酸的测定: 按纳迪生(Natelson, S.) 等人的五溴丙酮法^[3]。

(三) 异柠檬酸的检出和测定: 为了检查异柠檬酸的存在, 先将发酵液加热处理, 使异柠檬酸转变成异柠檬酸内酯, 然后应用华特曼(Whatman) 1 号纸上行层析。展开剂系统 I 为乙酸乙酯: 苯甲酸甲酯: 甲酸(40:10:5 V/V, 用少量水饱和); 展开剂系统 II 为正丙醇: 按叶油醇: 甲酸(50:50:20 V/V, 用少量水饱和, 隔夜使用)。在系统 I 中, 柠檬酸和异柠檬酸的比移值(Rf) 为 0.24, 异柠檬酸内酯的 Rf 为 0.50; 在系统 II 中, Rf 值则分别为 0.29 和 0.48 (均在 25±1℃)。层析谱见图 1 和图 2。

发酵液中异柠檬酸的定量分析, 应用旋光方法测定比较简便。其中一种方法是直接观察水溶液中异柠檬酸的旋光; 另一种方法是观察异柠檬酸和钼酸铵等物质络合后的旋光^[5]。后一种方法, 络合物的比旋值比异柠檬酸本身的比旋增大达 20 几倍, 虽然给测定上带来了很大方便, 但是其比旋值随溶液中柠檬酸的含量不同而变化, 必须在接近于发酵液成分的情况下制定标准曲线。因此, 本文仍应用直接观察水溶液中异柠檬酸旋光的方法。测定采用 WXG-6 型电磁直读式旋光

仪(系上海光学仪器修理厂出品), 光源中心波长 λ₀ 为 589.3±3 毫微米, 灵敏度 < ±0.005°, 异柠檬酸水溶液**浓度在 12% 以内, 旋光值和浓度呈直线关系, 见图 3。

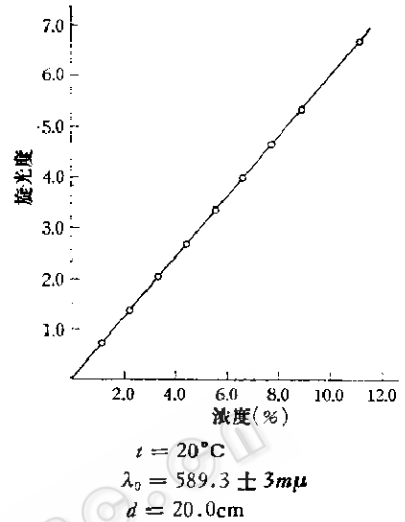


图 3 异柠檬酸水溶液中旋光和浓度的关系

按图 3 标准曲线, 异柠檬酸的比旋

$$[\alpha]_{589.3 \pm 3 \text{ m}\mu}^{20^{\circ}\text{C}} = 30.1^{\circ}$$

实际测定发酵液样品时, 每 30 毫升发酵滤液加入按 1:1 稀释的 H₂SO₄ 0.5 毫升, 静置半小时后过滤, 测定旋光。

(四) 碳水化合物总量的测定: 按摩立士(Morris, D. L.) 等人的蒽酮法^[7]。

(五) 氨基酸总量的测定: 按耶门(Yemm, E. W.) 等人的茚三酮法^[8]。

(六) 菌密度的测定: 发酵液用盐酸酸化, 稀释 10 倍, 按中原等人的方法, 2 毫升稀释液加 4 毫升有机溶媒(正丁醇: 乙醇: 氯仿=10:10:1), 摇匀后, 即在 660 毫微米波长下比浊。

四、菌种鉴定方法

主要根据“酵母分类的研究”^[9]一书, 并参阅其它有关假丝酵母属的鉴定资料^[10-12]。

** 异柠檬酸溶液从异柠檬酸二氢钾制备得到。经过三次重结晶的异柠檬酸二氢钾[异柠檬酸二氢钾按韦克内等人(Vickery, H. B. et al.) 方法^[6]由发酵液制备], 用 732 号强酸性阳离子交换树脂(上海树脂厂出品) 柱去钾。所得异柠檬酸水溶液, 用亚硝酸钴钠法检查无钾, 用盐酸羟胺法检查内酯含量在 1% 以下。

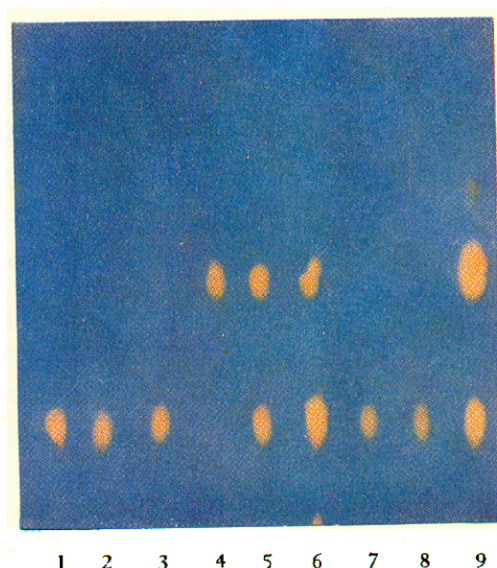


图1 有关物质和试样的层析谱

乙酸乙酯:苯甲酸甲酯:甲酸系统层析6小时,溴甲酚绿显色。

1. 柠檬酸; 2. 异柠檬酸; 3. 柠檬酸和异柠檬酸混合物; 4. 异柠檬酸内酯(仍混有少量异柠檬酸),按威尔逊(Wilson, D. G.)方法^[4]制备。粗内酯样品未用乙酸乙酯抽提,内酯样品用乙酸乙酯抽提一次。5. 柠檬酸和异柠檬酸混合物及内酯; 6. 发酵液通过732号阳离子交换树脂柱的离子交换液(经过热处理); 7. 同上(未经热处理); 8. 发酵液; 9. 粗制内酯。

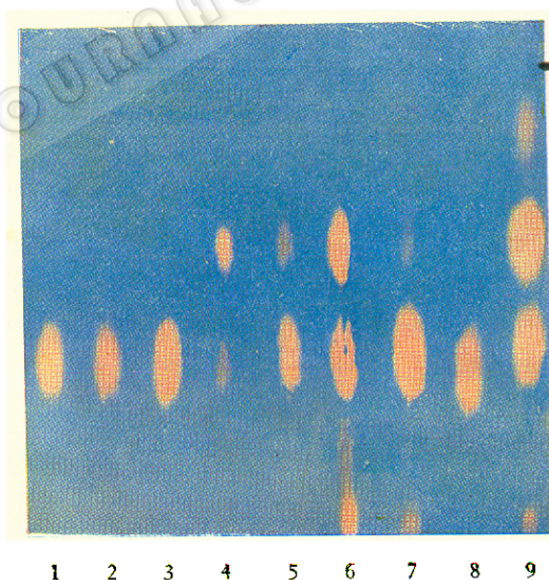


图2 有关物质和试样的层析谱

正丙醇:按叶油醇:甲酸系统层析8小时,溴甲酚绿显色。

(编号同图1)

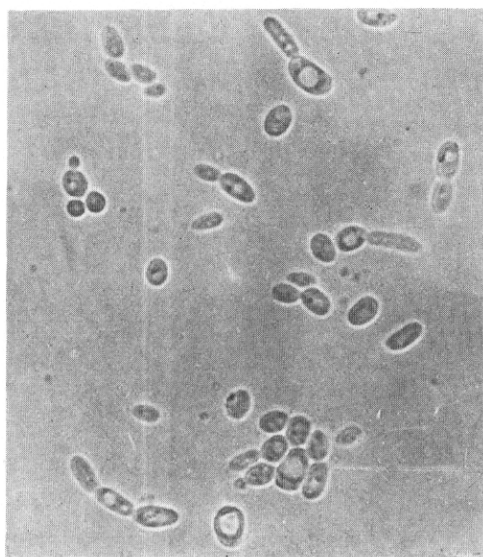


图5 PC 711 酵母菌的细胞形态
($\times 692$)

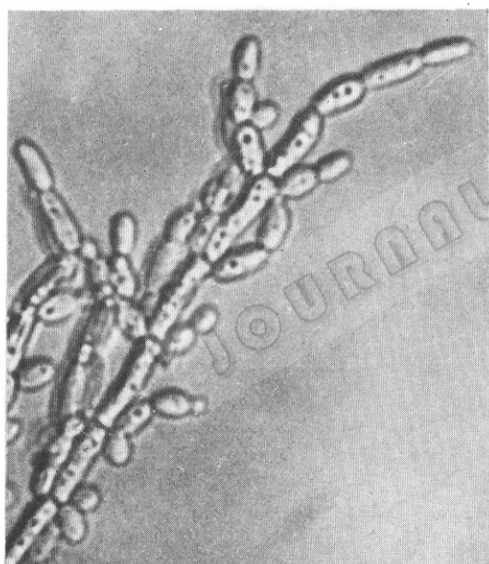


图6 PC 711 酵母菌的假菌丝
($\times 1,850$)

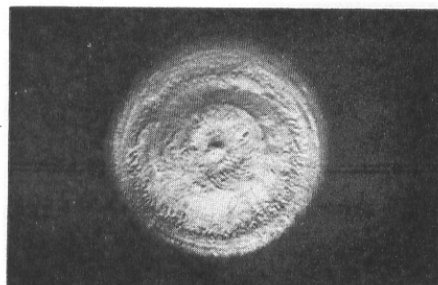


图7 PC 711 酵母菌的巨大菌落
(原大小)

结 果

一、产酸菌株的筛选

从某些油田采土, 分离得到近 150 株酵母菌, 其中有 12 株能产柠檬酸和异柠檬酸, 纸层析中未发现有明显的其它有机酸。它们产酸水平各不相同(表 2)。

表 2 某些酵母菌株产酸情况

菌株编号	总酸值(%)	异柠檬酸 总酸(%)
PC 110	2.9	39
PC 212	2.5	31
PC 355	2.8	32
PC 489	3.1	39
PC 608	3.5	44
PC 711	7.0	43
PC 811	2.6	34
PC 816	2.9	36
PC 823	6.4	44
PC 828	2.9	37
PC 901	2.8	39
PC 915	2.7	27

结果指出, PC 711 菌株总酸值较高, 故将其作为以后工作的供试菌株, 而大多数菌株不论产酸值的高低, 异柠檬酸的含量与柠檬酸的含量相近(表 2)。

PC 711 菌株的发酵液加热处理后进行层析, 在 I、II 两种展开剂系统中, 除原点有微量酸性物质不位移外, 均清楚地呈现出异柠檬酸内酯和柠檬酸与异柠檬酸斑点, 没有发现显著量的其它有机酸斑点。同时, PC 711 菌株发酵液中含糖总量在 0.1% 以下, 生成的氨基酸总量也在 0.1% 以下。

二、PC 711 菌株的生长和产酸情况

PC 711 菌株在发酵培养基中的生长和产酸速度如图 4 所示。

在 24 小时内菌体繁殖, 产酸极微, 55 小时左右, 生长达到高峰, 碳酸钙完全被中和, 游离酸明显上升。产酸过程中, 柠檬酸

和异柠檬酸的增长速度几乎是平行的, 两者最终比例也近于相当。摇瓶发酵至 7 天时, 油酸转化率为 130.4%。

三、PC 711 菌的鉴定结果

(一) 细胞形态和培养特征: 在麦芽培养基中, 细胞呈卵圆、椭圆或长圆形, 其中以椭圆形占多数, 一般大小为 $2.4-6.0 \times 2.8-9.6$ 微米 (图 5)。2—3 天后在麦芽汁表面逐渐形成灰白色、干燥、无光的薄膜, 且沿试管壁上伸, 继续培养后薄膜破碎下沉。在试管底部有细胞堆积的沉淀。在麦芽汁琼脂斜面上直线划线接种, 菌苔呈乳白色带灰, 无光, 表面平滑, 边缘不规则。

(二) 假菌丝: 在马铃薯培养基上载片培养, 细胞多边出芽, 有芽生孢子, 假菌丝较发达 (图 6); 真菌丝较少, 没有分隔。

(三) 巨大菌落: PC 711 酵母菌接种于麦芽汁琼脂平板上, 28°C 下培养 25 天, 菌落直径 2.5—3.0 厘米。边缘乳白带灰, 中央乳黄色, 略呈突起, 表面光滑, 带有细纹, 边缘整齐 (图 7)。

(四) 子囊孢子: 在菜汁琼脂 (100 克菠菜加 100 毫升水煮沸过滤, 取汁加琼脂 2%) 马铃薯块, 石膏块, 格洛特可娃 (Gorodkova), 无氮与无水醋酸钠等六种培养基上^[9,10,11,13], 在 28°C 培养 3—10 天后, 镜检, 无子囊孢子。

(五) 生理生化反应:

1. 糖的发酵试验: 将分别含有 2—3% 的葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖的 10% 豆芽汁培养液, 装入存有杜氏管的试管中, 试验结果证明对以上糖类均无发酵作用。

2. 碳素化合物的同化作用: 对碳素化合物, 包括糖类、醇类、有机酸等的同化作用, 均用生长图形方法进行试验^[9,11]。烃类用液体培养法进行同化试验。结果如下: ①糖的同化作用: 对葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、棉子糖、山梨糖、纤维二糖、鼠李糖、核糖、松二糖、L-阿戊糖、D-阿戊糖、海藻糖、木糖等十六种糖类进行了试验, 结果表明该菌只能同化葡萄糖。②醇的同化作用: 对甘油、山梨醇、 α -甲基葡萄糖苷、卫矛醇、赤藓醇、柳醇、肌醇、阿东醇、甘露醇进行了同化试验, 证明只能同化甘油, 赤藓醇与甘露醇。③有机酸的同化作用: 同化延胡索酸、柠檬酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸、乳酸、异柠檬酸、苹果酸、葡萄糖酸钠 (弱), 而对乌头酸、酒石酸、顺丁烯二酸、丙酮酸钠均无同化作用。④对正烷烃的利用: 接种于分别含 2% 的正烷烃 (C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19}) 及重油 (C_{14} — C_{18}) 的无机盐酵母膏培养液中 (同种子培养基), 在 28°C 振荡

培养 48 小时。结果表明该菌对 C_9 — C_{11} 均不利用, 而能利用 C_{12} — C_{19} , 对重油 C_{14} — C_{18} 利用得最好, 生长旺盛。

进一步将试验菌接种于含 2% 重油的中性水中, 进行对油的亲和力试验。在 28°C 振荡 2 小时后镜检, 观察到酵母细胞附着油滴表面, 说明其对油有亲和力。另外, 试验菌接种于以 2% 重油作为碳源的培养基 (无碳培养基

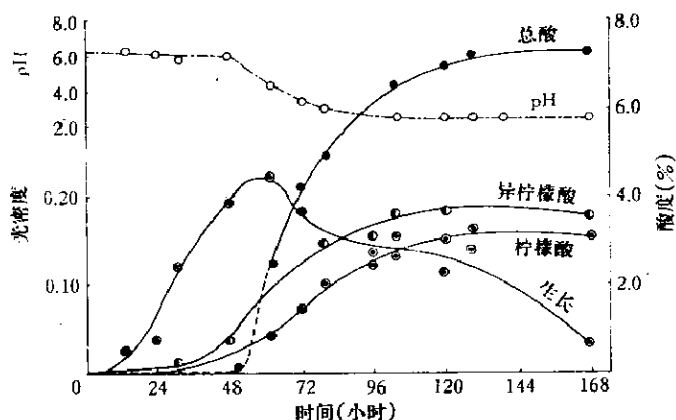


图 4 PC 711 菌株的生长和产酸曲线

加 2% 重油) 中, 28℃ 振荡培养 2 天后, 发酵液混浊如牛奶, 说明其有乳化作用。

- 3. 硝酸盐的利用^[11]: 阴性。
- 4. 脂肪的裂解^[9]: 阳性。
- 5. 熊果苷 (Arbutin) 的裂解^[9,11]: 阳性。
- 6. 牛奶酪化^[9,11]: 阳性。

7. 明胶液化^[11]: 阴性。

8. 维生素的需要: 用生长图形法, 试验了生物素, 维生素 B₁、核黄素、维生素 B₆、维生素 B₁₂、叶酸、菸酸、泛酸钙、对氨基苯甲酸及肌醇等维生素的需要, 证明只需要维生素 B₁。

PC 711 菌株的主要特征列入表 3。

表 3 PC 711 菌株的主要特征

项 目	菌 膜	菌 丝	子囊孢子	糖发酵	糖同化 (葡萄糖)	脂肪 裂解	牛奶 酪化	硝酸盐 利用	维生素 需要 (B ₁)	醇 的 同 化		
										赤藓醇	甘油	甘露醇
试验结果	薄、灰白、干燥、无光	假菌丝较发达, 真菌丝少	-	-	+	+	+	-	+	+	(+)*	(+)

* 为同化较弱。

根据上述结果, PC 711 菌株具有较发达的假菌丝, 不产生子囊孢子, 利用葡萄糖, 赤藓糖, 无酒精发酵, 不利用硝酸盐, 酪化牛奶, 分解油脂等特点。我们认为该菌株属解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*)^[9,10,13,14,15,16]。

讨 论

近几年来, 应用酵母菌发酵正烷烃以获得有机酸的一些研究中, 对生产反丁烯二酸、琥珀酸、α-酮戊二酸、柠檬酸及异柠檬酸的菌种都已从自然界分离得到。从我们筛选情况来看, 至少在我们接触的油田土壤中, 也较容易获得生产柠檬酸及异柠檬酸的酵母菌株。似乎可以认为, 这类酵母菌在油土中存在的比率是比较高的。不仅如此, 这类酵母菌的某些菌株, 在条件合适时, 总酸值可以达到 8% 以上, 油酸转化率在 130% 左右。所产的总酸中, 又毫不例外地混有相当量的异柠檬酸。这些事实, 都是十分耐人寻味的。看来, 它们对正烷烃的利用, 或者与对糖类原料的代谢途径迥然不同, 或者因为酶系活性有差异。

在筛选菌种的过程中, 还能看到, 合适

的筛选培养基是很重要的。特别是添加碳酸钙等中和剂后, 才有可能观察到明显的有机酸累积。但是, 凡是能产柠檬酸及异柠檬酸的菌株, 即使在发酵培养基中不添加中和剂, 还是能用较灵敏的吡啶醋酐法检出少量柠檬酸 (及异柠檬酸) 的形成, 说明了这类菌株本身具有能产柠檬酸及异柠檬酸的內因, 在一定的外因条件下, 例如中和剂存在下, 就累积大量的酸。中和剂的存在, 不仅对发酵形成的有机酸起缓冲作用, 使前期菌体充分生长, 而且又进一步促进了有机酸的产生。有时, 一种菌, 在条件改变时, 发酵产物也可能不同。例如, 利用正烷烃生产甘露醇的解脂假丝酵母 PM 701 菌株, 在发酵培养基中, 用无机氮源硫酸铵代替尿素, 并且添加碳酸钙, 便能发现有有机酸的累积^[13]。和这相仿, 在解脂假丝酵母 PC 711 的发酵培养中, 如果不加中和剂, 并用尿素作为无机氮源, 不仅产酸值减低, 而且有多元醇累积。

解脂假丝酵母利用正烷烃生产柠檬酸的同时, 往往伴随着相当量的异柠檬酸。柠檬酸和异柠檬酸是同分异构体, 性质很相近, 专一性的测定方法不多。采用纸层析

方法,两者一般是较难分离的。因此,为了检查解脂假丝酵母 PC 711 发酵液中异柠檬酸的存在,我们先将发酵液进行热处理,使异柠檬酸转变成内酯,再用纸层析方法分析,则可以清楚地得到和柠檬酸完全分离的两个斑点。这种方法,虽然间接一些,但比较简便,结果也很清楚。在对发酵液中异柠檬酸作定量测定时,我们目前应用旋光方法。这种方法简捷,不论是发酵过程的中间分析,或者是菌种诱变工作,我们认为都是适用的。当然,在应用旋光法之前,必须排除发酵液中其它旋光物质的干扰。这对解脂假丝酵母 PC 711 来说,情况是比较简单的。因为从几个系统(乙酸乙酯、苯甲酸甲酯、甲酸系统;正丙醇、按叶油醇、甲酸系统;正丁醇、甲酸、水系统;正丁醇、乙酸、水系统;正丁醇、吡啶、水系统)的纸层析结果看,发酵液中主要的产物是柠檬酸和异柠檬酸,仅仅在粗内酯样品中及发酵液热处理后,出现少量其它酸性物质,这很可能是处理过程中的矫作物。另外,发酵液中糖类及氨基酸类物质的含量也极低,它们对旋光测定中的影响是可以忽略的。

参 考 资 料

- [1] 阿部又三等: 日本农化会志, **44**: 493—498, 499—504, 1970。
- [2] Chas Pfizer & Co., Inc.: Brit., 1203006, 1970。
- [3] Natelson, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **175**: 745—750, 1940。
- [4] Wilson, D. G.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**: 1571—1580, 1963。
- [5] Krebs, H. A. et al.: *Biochem. J.*, **37**: 334—338, 1943。
- [6] Vickery, H. B. et al.: *Biochem. Prep.*, **7**: 72—79, 1960。
- [7] Morris, D. L.: *Science*, **107**: 254—256, 1948。
- [8] Yemm, E. W. et al.: *The Analyst*, **80**: 209—213, 1955。
- [9] Lodder, J. et al.: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, p. 6—34, 461—466, 550—552, North-Holland Publishing Company Amsterdam, 1952。
- [10] Lodder, J. et al.: *The Yeast, A Taxonomic Study*, p. 900—912, 1970。
- [11] 方心芳: 应用微生物学实验法, 21—47 页, 1962。
- [12] G. 斯密士原著: 工业真菌学纲要(中译本), p. 77, 1964。
- [13] 上海新型发酵厂、复旦大学生物系石油发酵科研协作组: 复旦学报, 1973(出版中)。
- [14] Tsugawa, R. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**: 158—167, 1969。
- [15] Takahashi, J. et al.: *ibid.*, **29**: 292—299, 1965。
- [16] Nakase, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**: 383—398, 1971。

STUDIES ON THE PRODUCTION OF CITRIC ACID AND ISOCITRIC ACID BY FERMENTATION FROM *n*-ALKANES

I. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *CANDIDA LIPOLYTICA* PC 711.

RESEARCH GROUP OF PETROLEUM FERMENTATION

(Shing-shen Fermentation Factory and Biology Department,
Fu-tan University, Shanghai)

A strain of yeast, No. PC711, which showed strong ability to produce citric acid and isocitric acid from alkanes was isolated from oil soil by enrichment method. This strain was identified taxonomically as *Candida lipolytica*.

Using commercial *n*-paraffins (C_{14} — C_{18}) of 6—8% (weight) as the sole carbon source and incubating at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 5 days, *C. lipolytica*

PC 711 was able to accumulate 7—8% citric acid and isocitric acid (total) in the medium. the addition of neutralize agent, for example CaCO_3 , seemed to be necessary.

The qualitative and quantitative determination methods of isocitric acid in the fermentive liquid is discussed in this paper.