

解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) B₇₄

利用正烷烃产生柠檬酸的研究

沈阳市食品发酵研究所柠檬酸组

(沈阳)

解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) B₇₄, 以正烷烃为碳源可以形成柠檬酸和异柠檬酸。在正烷烃、(NH₄)₂SO₄、过磷酸钙、玉米浆和 NaCl 等组成的培养基上, 发酵 4 天, 发酵液中柠檬酸含量达 6.95%。用吡啶显色, 总酸(以柠檬酸计)含量达 13.78%。

将异柠檬酸转化为柠檬酸, 发酵液中柠檬酸含量上升到 12—13%, 柠檬酸占总酸的比例从 40—50% 提高到 80—90%。原料转化率(产酸量与正烷烃量之比)按柠檬酸计达 112%, 总酸转化率达 132.5%, 最高达 184.1%。

柠檬酸是食品、制药等工业的重要原料, 自采用发酵法生产以来, 长期依靠糖质原料, 耗用大量粮食。随着工业生产的发展, 柠檬酸的应用范围不断扩大, 用量逐年增加, 因而开辟新的原料来源便显得十分必要了。

在伟大领袖毛主席关于“备战、备荒、为人民”和“深挖洞、广积粮、不称霸”的战略方针指引下, 我们本着独立自主, 自力更生的精神, 组成了以工人为主体的三结合科研小组, 开展了以正烷烃为原料发酵柠檬酸的研究。在实验中认真学习毛主席哲学思想, 反复进行实践, 从而抓住异柠檬酸转化这个主要矛盾, 对正烷烃发酵柠檬酸进行了试验。利用简单、经济的培养基, 柠檬酸平均产量达 6.95%, 总酸 13.78%。

本文重点报道解脂假丝酵母 B₇₄ 发酵生产柠檬酸以及发酵液中异柠檬酸转化的规律和条件。

材料和方法

一、菌种

解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) B₇₄, 中国科学院微生物研究所提供。

二、原料

正烷烃, 系锦西石油五厂所产重蜡, 组成如表 1, 图 1 为其气相色谱图。

表 1 重蜡中正烷烃组分的相对百分比含量

碳原子数	12	13	14	15	16	17	18
含量(%)	1.4	11.4	18.8	27	18.3	16	6.85

三、培养基(%)

1. 斜面培养基 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5, 葡萄糖 1, 琼脂 2, pH 自然。

2. 种子培养基 (NH₄)₂SO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.1, 玉米浆 0.3, CaCO₃ 0.1, 重蜡 3.0, 罐上加“泡敌”(聚氧丙烯甘油醚) 0.02。

本文于 1975 年 2 月 4 日收到。

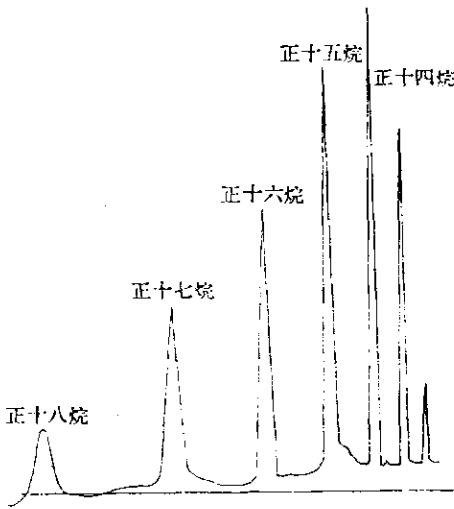


图1 重蜡的气相色谱图

色法进行测定^[1]。简化后的操作,省去加二氧六环,冰箱放置等步骤,在15分钟内比色,不影响测定的准确度。

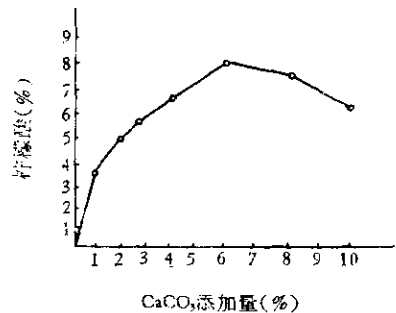
2. 总酸测定 用吡啶比色法^[2], 所得结果按柠檬酸计, 由于异柠檬酸等有机酸与吡啶显色能力都低于柠檬酸, 所以发酵液中实际上所含总酸(纸上层析证明主要是柠檬酸和异柠檬酸)高于所测吡啶显色总酸。正因为如此, 当异柠檬酸转化为柠檬酸时, 总酸量也随之增加。

3. 成品分析 依据1963年版《中华人民共和国药典》规定。

结 果

一、B₇₄ 菌株的发酵条件

1. CaCO₃ 加入量与产酸的关系 从图2可以看出, CaCO₃ 添加量对产酸有显著影响, 以添加6%较为适宜。添加量达8%以上则过多, 影响通气及菌体代谢, 致使产酸下降。

图2 CaCO₃ 添加量与柠檬酸产量的关系

2. 碳源试验 选用了8种石油产品, 结果(表2)表明, B₇₄ 利用正烷烃产生柠檬

3. 发酵培养基 (NH₄)₂SO₄ 0.3, 玉米浆0.3, 轻体 CaCO₃ 6, 重蜡 9, CaHPO₄ · CaSO₄ 0.2, NaCl 0.05, 罐上加“泡敌”0.02。

所用药品皆为工业品。

四、培养方法

1. 斜面 28℃, 4天。

2. 摇瓶种子 500毫升三角瓶装50毫升种子培养基, 28—30℃于往复摇床(转速120转/分, 振幅7毫米)上振荡培养24小时。

3. 摇瓶发酵 500毫升三角瓶装25毫升发酵培养基, 接种2.5毫升种子培养液, 于上述摇床培养6天。

五、异柠檬酸转化

取发酵终了的发酵液, 加工业氨水, 调pH至9.0, 于40—44℃静置保温24—40小时。

六、测定方法

1. 柠檬酸的测定 取发酵液加过量盐酸, 将柠檬酸的钙盐充分溶解, 用经简化的五溴丙酮比

表2 不同碳源产柠檬酸的比较

瓶号	产量 (%)	碳源						
		正十六烷	正十八烷	煤油	轻柴油	重柴油	常三线油	轻蜡
1	7.35	6.15	0.77	0.175	0.25	2.6	1.84	6.65
2	7.65	6.15	1.46	0.37	0.1	2.2	1.43	7.55
平均	7.5	6.15	1.11	0.27	0.175	2.4	1.56	7.10

表 3 不同液蜡量对柠檬酸产量和转化率的影响

液蜡量 (%, W/V)	产量(%)				
	4.5	6	7.5	9	10.5
瓶号					
1	4.2	5.3	7.15	8.9	9.3
2	4.9	5.0	6.95	9.2	9.0
3	3.35	5.3	6.95	7.75	9.15
平均	4.15	5.2	7.0	8.62	9.215
平均转化率(%)	92.2	86.7	93.3	95.8	87.1

酸的专一性较强, 以正 16 烷最好, 重蜡稍次, 轻蜡碳链较短, 在 14 烷以下, 效果不及重蜡, 其它油品正烷烃含量少, 都不理想。

不同液蜡量对产酸也有影响(表 3)。

3. 氮源试验 经比较确定, $(NH_4)_2SO_4$ 做为氮源较合适。图 3 清楚地显示了 $(NH_4)_2SO_4$ 的合适加入量为 0.2% 左右。这是用 $(NH_4)_2HPO_4$ 做磷源的情况下获得的结果, 如用过磷酸钙做磷源, 则用量应提高。

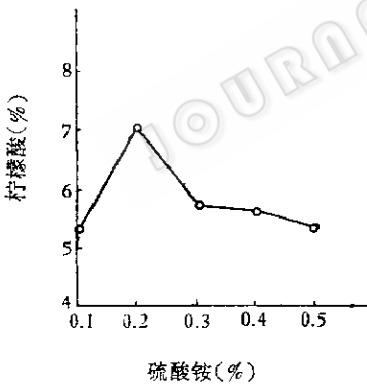


图 3 $(NH_4)_2SO_4$ 加入量与柠檬酸产量的关系

4. 磷源的影响 表 4 表明了磷酸氢二铵 $[(NH_4)_2HPO_4]$ 对产酸有显著促进作用, 加入 0.15% 可提高产量 35% 左右。

$(NH_4)_2HPO_4$ 除能供给一部分氮源外, 主要是满足菌体对磷的要求。我们以过磷酸钙 $(CaHPO_4 \cdot CaSO_4)$ 代替价格昂贵的 $(NH_4)_2HPO_4$, 并适当调整了氮源, 在加入少量 NaCl 的情况下, 取得了同样的效果

(表 5), 从而降低了培养基成本。

表 4 $(NH_4)_2HPO_4$ 对柠檬酸产量的影响

柠檬酸 (%)	瓶号	
	1	2
磷酸氢二铵 (%)		
0	5.9	6.5
0.1	5.75	6.65
0.15	8.0	8.8
0.2	7.45	8.2
0.3	7.35	7.15
0.4	6.55	6.35

表 5 过磷酸钙代替磷酸氢二铵的试验

培养基组成 (%)	分组	
	磷酸氢二铵组	过磷酸钙组
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	0.3
$(NH_4)_2HPO_4$	0.15	
Na_2HPO_4	0.1	
玉米浆	0.3	0.3
$CaCO_3$	6.0	6.0
液蜡 (V/V)	12	12
过磷酸钙		0.2
NaCl		0.05
柠檬酸 (%)	5.9	6.9

5. 发酵温度的选择 实验结果(表 6)表明, B_7 对温度非常敏感。31—32°C 产酸明显下降, 34—35°C 根本不产酸, 28—29°C 效果较好。

6. 风量及搅拌对产酸的影响 B_7 以正烷烃为原料发酵柠檬酸需氧量很大, 并要求有激烈的搅拌(图 4)。图 5 是一次发

表 6 发酵温度对产柠檬酸的影响

柠檬酸 (%) 瓶号	温度(°C)		
	28—29	31—32	34—35
1	7.15	5.70	0
2	8.20	5.90	0
3	8.50	5.75	0
4	8.0	3.75	0

酵特例,在发酵 60 小时左右时,搅拌速度下降 1/3,产酸几乎停止,96 小时恢复原转数,发酵又继续进行,效果十分明显。

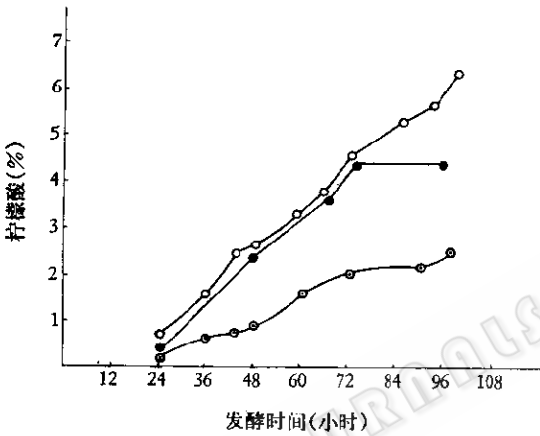


图 4 风量与产酸的关系

风量 ○—○ 1:0.8 ●—● 1:0.6 △—△ 1:0.2

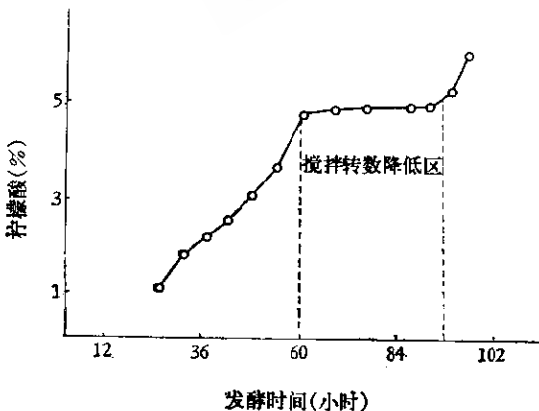


图 5 发酵中搅拌变化对柠檬酸产量的影响

二、B₇₄ 菌株发酵的一般规律

1. 发酵过程中柠檬酸、总酸及 pH 值

的消长 从图 6 可以看出,发酵进入 24 小时后,产酸大幅度上升。24 小时前产酸不多,但 pH 降得很快,一旦 pH 降到 4.5 左右时变化较缓慢(由于补加 CaCO₃,图中反映不明显),到 pH 4 以下又急速下降。所以当发酵液 pH 降到 4 左右为保持发酵继续进行,应当再补加 CaCO₃,不然发酵将在 80 小时左右因 CaCO₃ 不足而停止。

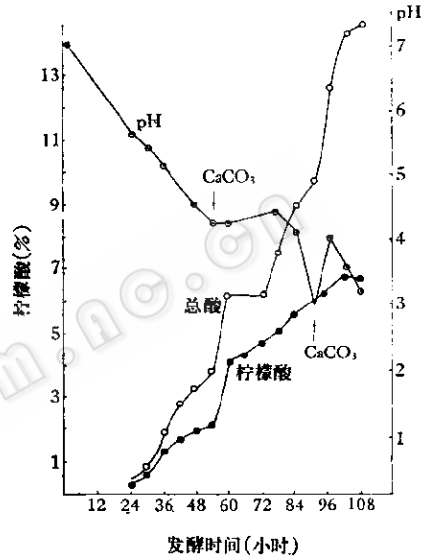


图 6 发酵过程中柠檬酸、总酸、pH 消长曲线

2. 发酵过程中氮、磷消耗情况 从氮、磷的消耗曲线(图 7) 看, B₇₄ 在发酵初期几

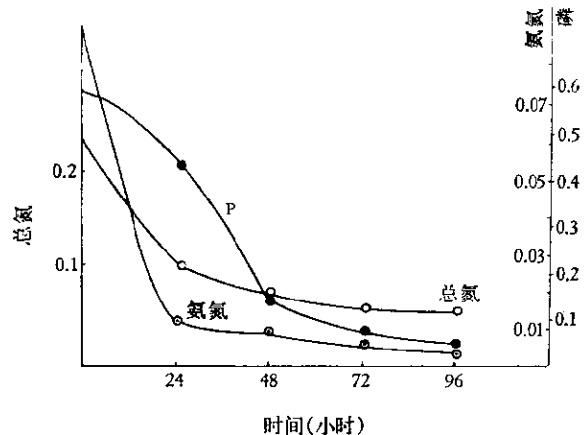


图 7 发酵液中氮、磷消耗曲线
图中所有纵座标单位均为克/100 毫升。

乎消耗了 90% 以上的氮源和磷源,然后进入产酸期,属于第二发酵类型。

3. 产酸效果 依据小试验确定的条件,扩大到罐上发酵,平均周期 96 小时,柠檬酸产量平均 6.95%,最高 8.29%,总酸平均 13.98%,最高达 19.7%。对原料转化率以柠檬酸计平均达 67.08%,最高达 77.4%,以总酸计平均达 132.5%,最高达 184.1%。

三、异柠檬酸的转化

B₇ 利用正烷烃产生柠檬酸的同时,伴有大量的异柠檬酸生成。甚至超过柠檬酸量,不仅浪费了大量原料,而且给提取带来许多困难。能不能解决异柠檬酸的问题是决定正烷烃发酵柠檬酸有没有生产价值的关键。

1. 异柠檬酸转化成柠檬酸的酶系 取 48 小时之发酵液(此发酵液含柠檬酸 3.88%,主要以钙盐形式存在,溶液中游离酸在 0.4% 以下),加 2% NaCl,使发酵液自然分层,取上层酵母,离心,取出菌体加 100 目金钢砂,在研钵中研磨,然后加入少量水,过滤,滤液则为待试细胞抽出物。然后再取发酵结束之发酵液(柠檬酸含量 6.8%,总酸 14.56%),在沸水浴中煮沸 30 分钟,将其中酵母及其所含的酶灭活,作为底物。将底物调 pH9,分装于三组试管中,每管 20 毫升,第一组加入 5 毫升蒸馏水,第二组加入 5 毫升除去酵母的 48 小时发酵清液,第三组加入 5 毫升上述细胞抽出物,于 40℃ 放置 24 小时,然后测定柠檬酸和总酸。

结果(表 7)指出,经细胞抽出物作用的底物柠檬酸含量增加,从而证明 *B₇* 菌体自身含有将异柠檬酸转化为柠檬酸的酶系统,由于清液没有这种转化作用,进一步证明这个酶系统属胞内酶。

表 7 异柠檬酸转化酶系的胞内特征

试验内容	结果 (%)		
	柠檬酸	总酸	柠檬酸占总酸比例
加 5 毫升蒸馏水	5.20	11.01	47.2
加 5 毫升发酵清液	5.20	11.01	47.2
加 5 毫升细胞抽出物	6.0	11.5	52.3

2. 转化的适宜温度 表 8 列举了不同温度下的转化结果,从中看到转化的适宜温度在 40℃ 左右。

表 8 温度对异柠檬酸转化为柠檬酸的影响

温度(℃)	pH	转化时间(小时)	柠檬酸 (%)		柠檬酸提高率%
			转化前	转化后	
32	9	12	2.86	3.54	24
40	9	11	5.8	9.5	63
40	9	24	6.8	13.7	100
45	9	24	6.8	12.5	84
50	9	24	3.88	3.7	—

3. 转化 pH 的选择 从 pH5.5—12 的转化试验证明 pH9 左右转化较好(表 9)。

表 9 pH 对异柠檬酸转化为柠檬酸的影响

pH	温度(℃)	转化时间(小时)	结果 (%)	
			柠檬酸	柠檬酸提高率
4.0	对照	24	5.0	
5.5	40	24	5.03	0.6
8.0	40	24	5.30	6
9.0	40	24	7.52	50.4
12.0	40	24	6.79	35.8

4. 转化速率 在 40℃,pH 9 进行转化试验于 60 小时内间隔取样,结果如图 8。转化高峰在 30—40 小时之间。到达顶峰后如不及时处理,酸又开始下降。

5. 综合试验 将 1800 升含柠檬酸 6.8%,总酸 14.56% 的发酵液在搅拌条件下调 pH9,升温到 40℃,保温 42 小时,搅拌放罐,在放出 200 升时取样,在剩余 200 升时又取样,两次测定柠檬酸含量均为

12.0%，总酸为 12.96%，柠檬酸占总酸 92.3% 转化基本彻底。

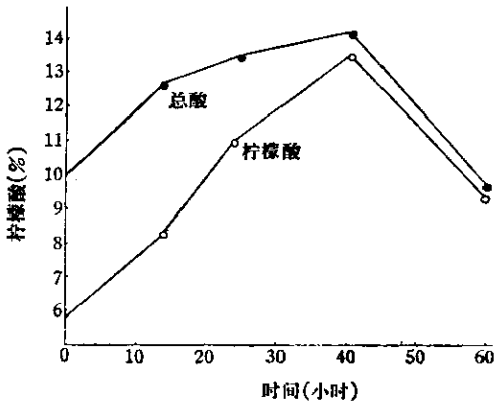


图 8 转化速率曲线

讨 论

一、*B₇₄* 是一支优良的柠檬酸产生菌，对正烷烃氧化能力强，具有对营养要求低、

发酵稳定、工艺简单、管理容易、原料利用率高等优点。

二、国外对异柠檬酸转化为柠檬酸曾进行了研究^[1]，但由于需要加入氯仿、Tris 缓冲液等措施，与工业化生产有一定距离。我们所试验研究的方法，简单实用，多快好省，把正烷烃发酵推向一个新水平。

CaCO_3 的发酵工艺中取得了较好效果。

三、对于异柠檬酸转化的酶系统作了初步的试验，这方面工作的进一步深入研究，对酵母的烃代谢研究以及柠檬酸的发酵生产都是十分有意义的。

参 考 资 料

- [1] Perlman, D. et al.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16:515—516, 1944.
- [2] Saffran, M. and Denstedt, O. F.: *J. Biol. Chem.*, 175:849—855, 1948.
- [3] 铃木: *British Patent*, 1257900, 1971.

STUDIES ON THE FERMENTATION OF CITRIC ACID FROM N-ALKANES BY *CANDIDA LIPOLYTICA B₇₄*

CITRIC ACID RESEARCH GROUP, SHENYANG INSTITUTE OF FOOD AND FERMENTATION

(Shenyang)

Candida lipolytica B₇₄ is capable of producing citric acid and isocitric acid from n-alkanes. By cultivation of this strain in a medium containing n-alkanes, ammonium sulfate, calcium superphosphate, corn steep liquor and sodium chloride for 4 days, the content of citric acid in fermentation broth was 6.95% and the total acid content, determined with pyridine coloration method and calculated as citric acid, was 13.78% in

average.

By conversion of isocitric acid to citric acid by addition of ammonia, the content of citric acid can be raised to 12—13%, then, the content of citric acid was about 80—90% of the total acids. The conversion rate of raw material, counted as citric acid, was 112%, and the conversion was 132.5%, even 184.1%, based on total acids.