

## 解脂假丝酵母 8-2 利用液体石蜡发酵 生产工业用柠檬酸

天津市工业微生物研究所 天津糖精厂 常州味精厂  
(天津) (天津) (常州)

由果园土壤筛选出一株能利用液体石蜡生成柠檬酸的酵母菌, 经鉴定为解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 8-2。

在该菌所产生总酸中约 50% 为柠檬酸。

摇瓶及 500 升发酵罐试验证明, 8-2 菌在含 10—12% 液体石蜡、0.25—0.5% 玉米浆及 6%  $\text{CaCO}_3$  作中和剂的培养基中, 一般能生成 7% 以上的柠檬酸, 最高可达 10.72%。

此种工艺可生产工业用柠檬酸。

柠檬酸除用于食品、医药外, 也是其它很多行业的一个重要原料, 历来多用黑曲霉由糖质原料以发酵法制取。在六十年代末期出现了以石油产品——液体石蜡为原料的柠檬酸生产法<sup>[1]</sup>, 它为节省粮食原料开创了新的途径。这样生产的柠檬酸用于工业。

为贯彻执行伟大领袖毛主席提出的“深挖洞、广积粮、不称霸”, “备战、备荒、为人民”的伟大战略方针, 我们在 1972 年厂所结合组成了石油发酵柠檬酸研究小组, 当年筛选出优秀产酸菌解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 8-2 (以下简称 8-2 菌), 并做了摇瓶发酵试验和扩大试验。本文报道试验结果。

### 菌种筛选

#### (一) 土样及筛选步骤

据有关报道, 石油发酵柠檬酸的优良菌株多属酵母菌。我们也以酵母菌为目标由土壤筛选。土壤取自油田、果园等处。筛选时取一克左右土样, 在 20 毫升第一次增殖培养基中 30℃ 振荡培养 3 天, 取 2 毫

升培养液接种第二次增殖培养基, 以同样条件培养, 然后以划线法在琼脂平板培养基上培养单菌 3—5 天, 挑取形成钙溶解圈的菌落, 转接到斜面备用。

#### (二) 筛选用培养基

培养基成分见表 1。

选用了营养丰富的完全培养基作为第一次增殖培养基: 但以液体石蜡为碳源, 以利同化液体石蜡的微生物充分增殖。为了抑制细菌及霉菌, 调整培养基 pH 为 5.0—5.5, 并在培养液中加 0.125 毫克/毫升氯霉素及 0.01% 联苯。但联苯对霉菌的抑制力在使用浓度下不明显。每个 250 毫升三角瓶装 20 毫升培养基。第二次增殖培养基: 采用合成培养基, 其成分接近发酵培养基, 以促使产柠檬酸菌的增殖。仍以 pH 和加氯霉素抑制杂菌生长。装液量同上。

固体平板培养基含有高浓度的葡萄糖, 并加有碳酸钙。有时成分同表 1 的斜面 1、斜面 2 成分。

本文于 1976 年 1 月 17 日收到。

表 1 筛选用培养基成分

	第一次增殖	第二次增殖	平 板	斜 面 1	斜 面 2	发 酵 1	发 酵 2
液体石蜡	2	4		4	2	.8	10
葡萄糖			20		1		
蛋白胨	0.5						
牛肉膏	0.3						
酵母膏	0.3		0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
NH <sub>4</sub> Cl		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.05		0.05		0.05	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>							0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.05		0.05	0.2	0.05	0.1
MgSO <sub>4</sub>		0.05		0.05	0.1	0.05	0.05
NaCl		0.2					
CaCO <sub>3</sub>			1.0		0.5	1.5	1.5
琼 脂			2.0	2.0	2.0		
pH	5.0—5.5	5.0—5.5	5.0—5.5	5.0—5.5	5.0—5.5	自然约 6.5	自然约 6.5

除液体石蜡按体积%计外，其余均按重量%计，以下同。

斜面培养基：开始采用斜面 1，后通过对比试验选用了斜面 2。酵母在此培养基中比在麦芽汁、米曲汁及其他一些培养基中生长得又多又快。

(三) 产酸试验及其结果

从新鲜斜面取一环菌体接种到装有 20 毫升发酵培养基的 250 毫升或 500 毫升三角瓶中，在 30℃ 的往复摇床(180 次/分、振幅 5.5 厘米)上振荡培养 5—6 天。开始是采用表 1 的发酵 1 配方，后期采用发酵

2 配方。发酵结果是以氢氧化钠滴定总酸来表示。产酸 5% 以上的菌株共 10 株，9 株来源于果园、果库土壤，1 株来源于东北油田土壤。

从我们的筛选结果看，完全不必取油田或油浸土壤作唯一土样来源。一般认为，大多数的酵母菌不在普通土壤内生长，但常在葡萄园和果园土壤内生长。我们选得的利用石油发酵柠檬酸的酵母菌，多数是从果园、果库土壤中分离的。

表 2 菌株来源及产酸量

菌 号	6-1	7	8-2	10	13	21	24	27	29	1004
滴定酸(%)	6.9	6.0	7.4	5.5	6.0	6.9	5.2	5.8	6.1	5.9
菌株来源	葡萄园	苹果园	梨园	果园旁	苹果园	桃园	苹果园	果库	牛栏旁	油田

在所选出的 10 株酵母中，以由天津西郊红光农场梨树园土壤中分离得到的 8-2 菌的产酸水平较高。结果见表 2。

(四) 8-2 菌的鉴定

按饭塚等的方法<sup>[2,3]</sup>进行，并以中国科学院微生物研究所提供的解脂假丝酵母 AS2.1207 菌株为对照。试验表明，8-2 菌应为解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*)。

8-2 菌的摇瓶发酵试验条件

(一) 发酵方法

将在斜面 2 培养基(表 1)上活化 3—5 天的新鲜菌体一环或再经 24 小时液体培养的种子液 2 毫升，接种在装有 20 毫升发酵培养基的 250 毫升三角瓶中，于 29°±1℃ 在往复摇床(180 转/分、振幅 5.5 厘米)上

培养 6 天, 发酵试验用培养基配方见表 3。

表 3 种子及发酵培养基成分

成 分	种 子 (%)	发 酵 (%)
重 蜡	5	12
酵 母 膏	0.1	—
玉 米 浆	—	0.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	0.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.05	0.05
CaCO <sub>3</sub>	1.0	6.0
pH	自然 (约 6.5)	自然 (约 6.5)

(二) 测定方法

- 1. 滴定酸：用氢氧化钠滴定。
- 2. 柠檬酸：用五溴丙酮比色法。
- 3. 总酸：以滴定酸和被碳酸钙中和和酸的总和表示。
- 4. 菌体量：取 1 毫升发酵液用 3N HCl 酸化, 定容 10 毫升, 用 72 型分光光度计测定波长 580 毫微米处的光密度。

(三) 结果

1. 碳源试验：用加有 10% 各种碳源及 1.5% CaCO<sub>3</sub> 的培养基进行发酵试验, 证明以重蜡最好 (图 1)。

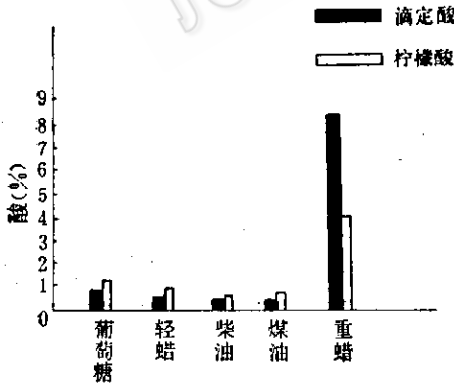


图 1 不同碳源对产酸的影响\*

为了进一步确定重蜡的使用浓度, 又试验了使用不同浓度重蜡时的产酸周期 (图 2), 证明浓度在 6—8% 时产酸水平不如 10—12%, 而 10—14% 之间产酸差异

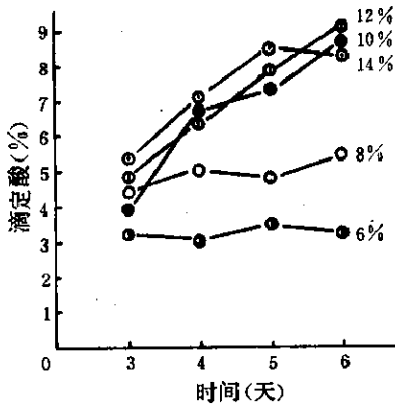


图 2 重蜡浓度与发酵周期

不甚明显。

2. 氮源试验：为了选择适宜氮源, 用表 4 所列各种氮源进行了试验, 结果从产酸水平、工业化要求来看, 以硫酸铵最好。

表 4 不同氮源对产酸的影响

氮 源 种 类	氮源用量 (%)	pH	滴定酸 (%)	柠檬酸 (%)
NH <sub>4</sub> Cl	0.2	3.2	5.9	5.15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	3.2	2.9	7.15
尿 素	0.2	3.1	6.77	6.95
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	3.2	2.81	5.15
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.2	3.5	3.25	4.3
对 照	0	5.0	0.25	0.9

3. 有机营养试验：用表 5 所列各种有机营养物进行产酸试验证明, 玉米浆和酵母膏是较好的有机营养。不加有机氮源则产酸甚少。

表 5 各种有机营养物对产酸的影响

养 养 物	用 量 (%)	滴定酸 (%)	柠檬酸 (%)
麦 麸	0.25	6.8	3.72
酵 母 膏	0.20	8.2	4.95
玉 米 浆	0.50	8.6	5.00
牛 肉 膏	0.10	7.3	4.18
蛋 白 胨	0.20	6.8	3.84
豆饼水解液	0.5	8.1	4.91
对 照	0	4.5	1.85

\* 重蜡是以 C<sub>15-16</sub> 为主的液体石蜡; 轻蜡是以 C<sub>12-13</sub> 为主的液体石蜡。

表 6 磷酸盐种类与产酸

	浓 度 (%)	pH	滴定酸 (%)	柠檬酸 (%)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.2	4.0	2.2	3.90
	0.3	3.3	1.9	3.10
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1	2.8	6.7	4.50
	0.2	3.2	4.35	3.95
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.05	7.0	4.0	3.75
	0.1	3.5	1.8	2.80
对 照	0	4.0	0.7	2.75

4. 磷酸盐试验：用表 6 所列磷酸盐试验，表明以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为好。

5. 中和剂碳酸钙用量试验：用酵母进行柠檬酸发酵时，培养基中须加中和剂碳酸钙。当含 1.5% 碳酸钙时，发酵液中滴定酸含量最高（见图 3）。一般情况下，发酵液的滴定酸含量高，柠檬酸含量也高，但当培养基中碳酸钙浓度较高时，可测出的滴定酸含量虽然降低，柠檬酸含量却并不

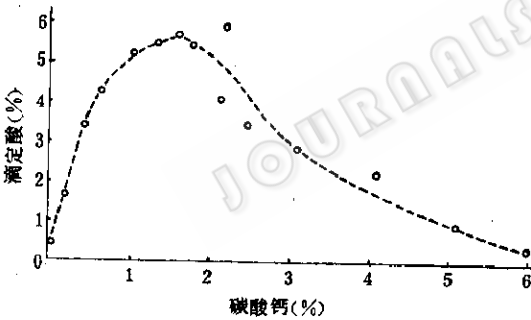


图 3 碳酸钙含量对滴定酸产生的影响

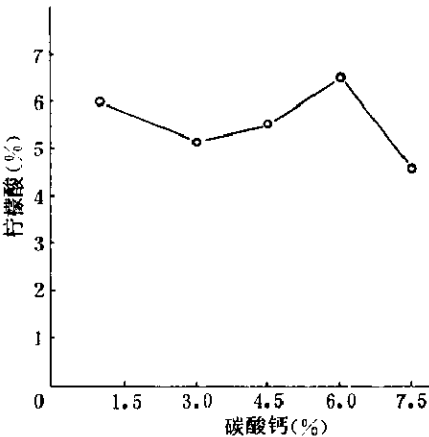


图 4 碳酸钙含量对产酸的影响

少，如图 4 所见，当碳酸钙浓度为 6.0% 时，柠檬酸产量最高。

6. 通风量试验：以不同装液量在不同摇床上的产酸试验表明，装液量宜小，即通

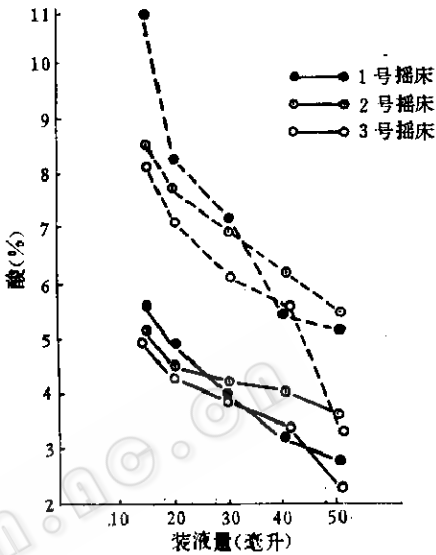


图 5 通气量对产酸的影响

1 号摇床：运转 190 转/分  
2 号摇床：往复 180 转/分，振幅 5.5 厘米  
3 号摇床：往复 120 转/分，振幅 7.0 厘米  
虚线：滴定酸，实线：柠檬酸

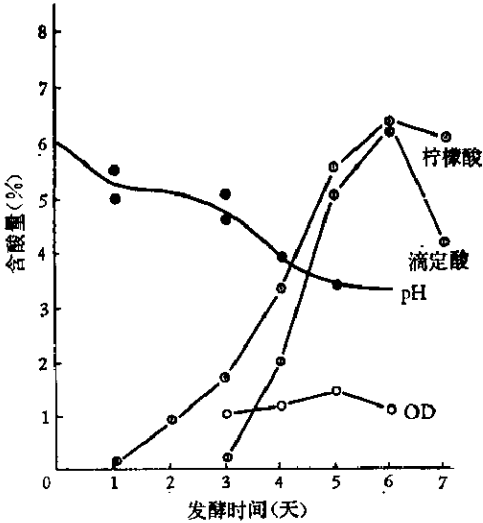


图 6 8-2 菌摇瓶发酵试验

培养基成分：重蜡 12%，玉米浆 0.5%，硫酸铵 0.4%，磷酸二氢钾 0.1%，硫酸镁 0.05%，碳酸钙 6.0%。  
装液量：250 毫升三角瓶装 15 毫升。  
其它条件见发酵方法。

风量要求大,在普通的 250 毫升三角瓶中,装液量不宜超过 20 毫升。但不同摇床之间差异却不大(见图 5)。

7. 综合试验: 按照以上试验所得的适宜条件进行摇瓶发酵试验,其结果如图 6 所示,发酵 6 天柠檬酸产量可达 7.0% 以

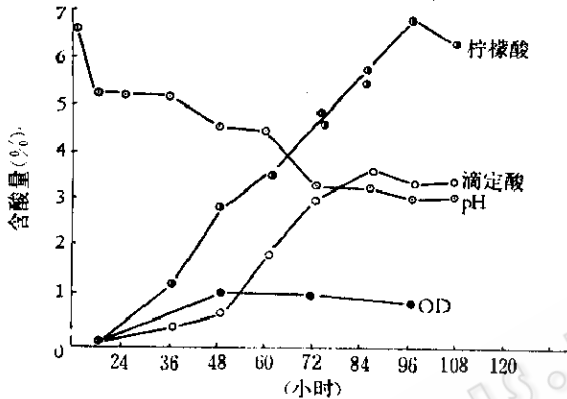


图 7 500 升发酵罐试验结果  
320 转/分 风量 1:05—1:1 (V/V/分)

表 7 500 升发酵罐试验结果\*

批数	总酸 (%)	柠檬酸 (%)	转化率	
			总酸 (%)	柠檬酸 (%)
1	18.3	9.40	156.4	80.3
2	20.5	10.72	175.2	91.6
3	19.5	8.88	166.7	75.9

\* 培养基成分(%): 液体石蜡 11.7, 玉米浆 0.25,  $\text{CaCO}_3$  6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25.  
通风量 1:1.2 (V/V/分) 发酵 6 天。

上。

## 8-2 菌的扩大试验

根据摇瓶试验中得到的适宜发酵条件,在 500 升发酵罐中进行扩大试验,发酵 4 天产 7% 柠檬酸(图 7)。后经常州味精厂进一步调整发酵条件,在 500 升罐中连续三次试验结果,柠檬酸产量进一步提高(见表 7)。

## 讨 论

解脂假丝酵母 8-2 菌株具有很强的利用液体石蜡的能力,利用液体石蜡进行柠檬酸发酵时,柠檬酸占产生的总酸之 50%,在摇瓶试验中可产柠檬酸 7% 以上;500 升发酵罐试验,柠檬酸产量最高可达 10.72%。同时,该菌株用于生产时不易污染杂菌,对营养物的要求不很专一,原料利用率较高,并且生产工艺简单,是一株比较优良的柠檬酸生产菌株。

## 参 考 资 料

- [1] 田渊ら: 日本农芸化学会誌, 43: 154, 1969.
- [2] 飯塚ら: 酵母の分類同定法, 东京大学出版会, p. 144, 1969.
- [3] Lodder, J.: The Yeast, A Taxonomic Study, (2nd and enlarged ed.) North-Holland, Amsterdam, p. 550, 1970.

## PRODUCTION OF INDUSTRIAL GRADE CITRIC ACID FROM *n*-PARAFFIN BY *CANDIDA LIPOLYTICA* 8-2

TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY  
(*Tianjin*)

THE TIANJIN SACCHARIN MANUFACTORY  
(*Tianjin*)

THE CHANGZHOU VE-TSIN (MONOSODIUM-GLUTAMATE) MANUFACTORY  
(*Changzhou*)

A strain of yeast which can produce citric acid from *n*-paraffin was isolated from the soil of orchards, and identified as *Candida lipolytica* 8-2.

The citric acid produced by this strain amounts to 50% of the total acids.

In shaking flasks or 500 l. fermentors with a medium containing 10—12% paraffin, 0.25—0.50% corn steep liquor and 6%  $\text{CaCO}_3$  as neutralizing agent, strain 8-2 accumulates from 7% up to 10.72% citric acid for industrial usage.