微生物学报 21 (4): 482—488, 1981
Acta Microbiologica Sinica

石油油脂酵母及其应用研究

I. 利用油脂酵母发酵正烷烃生产脂肪酸的研究

王大珍 谭蓓英 苏起恒 郑文尧
(中国科学院微生物研究所,北京)
王定昌 姜玉梅
(轻工业部食品工业发酵研究所,北京)
张克文 谢玉荣
(北京葡萄酒厂,北京)

用 C_{13-18} 为主成分的正烷烃为原料,从两千多株菌中,筛选出产脂肪酸量较高的解脂假丝酵母 AS2.1207。改进了影响产酸的条件,脂肪酸产量由 3 毫克/毫升提高至 13—14 毫克/毫升,组分主要为 C_{13-18} 酸,尤以 C_{17-18} 酸含量最大,其次为 C_{16} 酸,C_{16-18} 酸占总酸量的 80% 以上。不饱和酸占总酸的 80%,以 $C_{17:1}$ 含量最高。每次发酵生成的脂肪酸的组分较稳定。这些脂肪酸主要以油脂状态积累于胞内。菌株具有一定的稳定性。

长链脂肪酸,尤其是双键在碳氢链中间位置的长链不饱和脂肪酸,是医药及冶金等工业的必需品。它除由生物合成外,难以用化学法合成。

本文报道用 C_{13-18} 为主成分的正构液蜡为原料,筛选出产脂肪酸量较高的菌种,并研究了发酵条件。

料材与方法

(一) 发酵原料

我们先后用了三批正构液蜡,都来自锦西炼油五厂,是重柴油中脱出的重蜡。经气相色谱分析,是以 C_{13-18} 为主成分的正构混合烷烃,组分亦相近(见表 10)。

(二) 菌种

从两千多株菌中,筛选出 AS2.1207。这株菌是我所石油蛋白组从独山子克拉玛依油矿油黑土中分离得到的。经鉴定为解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*)。经我们试验得知,这株菌同化 C_{11-22} 正构烷烃的能力很强,以脲素为氮源需要微量生长素,培养基简单,生长 pH 范围广,最适温度 28—30℃。在以石油蛋白为目的物培养时,可同时得到约 0.3% 的长链脂肪酸。细胞呈腊肠形、卵形和球形,多边芽殖,单胞体较大,2.74—3.42×3.42 微米。不论单胞或假丝都容易过滤,便于回收。菌体经动物急性毒性试验,结果无毒。

(三) 培养基及培养条件

1.基础培养基组成(%): KH_2PO_4 0.2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.002, 自来水。

2.种子培养基: 在基础培养基中加玉米浆 0.1%,液蜡 3%,脲素 0.3%。

3.发酵培养基: 基础培养基中加液蜡 15%,脲素 1%。

两者 pH 调至 6.3—6.5。接种量 15%。种龄 48 小时。28—30℃ 培养(旋转摇床 190—210 转/分,偏心距 2.5 厘米)。

(四) 长链脂肪酸的提取与组分分析

1.胞内酸的提取: 取一定量的发酵液 3,000 转/分离心 30 分钟,去清液,加等体积的 20%

本文于 1980 年 8 月 6 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

KOH 的酒精液迴流 2 小时；或在离心去清液后，加等体积的 20% KOH 水溶液，120℃ 皂化 30 分钟，冷至 60—70℃ 加等体积的 95% 酒精摇匀。将上述迴流物或加酒精的皂化物趁热加固体石蜡屑少许，冷却。此时，皂化液中的残烃与固体石蜡凝固在一起，可连同酵母渣一起过滤。用 50% 酒精洗滤渣。将洗液与滤液合并，蒸去酒精。用 HCl 酸化至 pH3.0，用乙醚提取二次。用水洗乙醚层，用无水硫酸钠干燥，蒸去乙醚，称重即为长链脂肪酸量。

2.胞外酸的提取：发酵液经 3,000 转/分离心 30 分钟。取定量清液于分液漏斗中，加 HCl 酸化至 pH3.0，用乙醚提取同前。

3.脂肪酸组分分析：将提取出之长链脂肪酸，用硫酸——甲醇法甲酯化后，做气相色谱分析，计算各组分相对百分含量。

4.长链脂肪酸含量间接测定法：取发酵液 10.0 毫升，3,000 转/分离心 30 分钟。去清液后，用中性酒精洗至三角瓶中。在沸水浴中加热煮沸至酵母凝聚成絮状。用 0.1000*N*、KOH 的酒精液热滴定，以酚酞为指示剂，至粉红色不退为止。以滴定毫升数间接表示脂肪酸量的高低。原发酵液缓冲能力大时，离心后水洗菌体，再离心，去洗液，热滴定同前。

（五）菌量测定

绘生长曲线图时，用稀释平板法计数，并测发酵液 O. D. 值，得相对菌量[1]。因 AS2.1207 生成假丝，所以上述两法都有一定误差。因此日常工作中，用 O. D. 值及 10 毫升发酵液 3,000 转/分离心 30 分钟所得湿菌体体积测定相对菌量[1]，此法虽粗放但简便。

（六）定氮

用半微量凯氏定氮法测发酵清液及菌体的氮含量。

（七）测残烃

发酵液加 10 倍体积的已烷振荡，分去水层，蒸去己烷，称重。在气相色谱上做组分分析。

结果及讨论

（一）确定发酵过程中长链脂肪酸提取法及间接测定法

微生物油脂及脂肪酸的提取，是基于先破坏菌体，再用溶剂抽提脂类物。或在破坏菌体的同时，进行皂化，去不皂化物，再提取长链脂肪酸。由于菌体组分复杂，提取方法不同，结果差异很大。从而分析提取方法本身成为研究课题之一。1970 年执行昭文[2,3]比较了几种方法，不论那种方法，手续都比较烦杂。我们比较了执行[2,3]和 C. Ratledge[4] 的方法后，拟订了上述提取方法。其中用固体蜡代替石油醚去不皂化物，操作比较简便。但在摇瓶试验及罐上取样的日常工作中，仍难于经常应用。在日常工作中，要求快速易行，具一定的准确性。

在我们采用的菌株及发酵条件下，生成的长链脂肪酸组分比较稳定，经多次试验，提取值与上述 KOH 滴定值间具一定相关性（见表 1）。所以日常工作中用滴定法间接比较脂肪酸含量，试验中的关键部分，用抽提法测实际含量。

（二）影响长链脂肪酸生成的几个主要因素

1. 通气量对产脂肪酸的影响：在 200 毫升三角瓶中，装入不同量培养基，比较通

表 1　长链脂肪酸滴定值与提取值间的关系

原料蜡批号	2号					3号			
提取值(克/100 毫升发酵液)	0.86	0.87	1.00	1.05	1.30	0.87	0.98	1.04	1.47
0.1000*N* KOH (毫升/10 毫升发酵液)	3.59	3.74	4.25	4.48	5.58	3.94	3.98	4.64	5.81

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

气量对产脂肪酸的影响，结果以 15 毫升装液量较佳。结果如图 1。

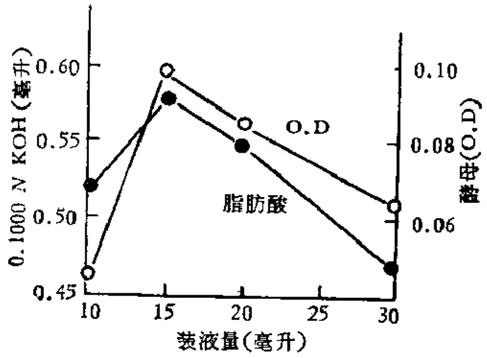

图 1 通气量对产脂肪酸的影响

1 号液蜡 15%，脲素 1%，接种量 2%，发酵 5 天

2. 生长曲线：取发酵旺盛，48 小时的菌液为种子。用稀释平板计数法及测发酵液 O. D. 法，测得生长曲线如图 2。摇瓶发酵的对数生长末期在 48 小时左右。

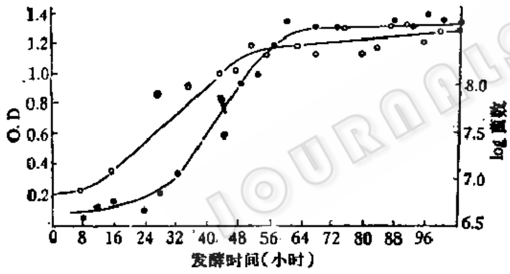

图 2 AS2.1207 生长曲线

●—● O. D. ○—○ log 菌数

3. 碳氮比对产脂肪酸的影响：结果如表 2 所示。烃浓度由 10% 增至 15% 时，虽然 O. D. 数增加少，但积累了较多的脂肪酸。C. Ratledge 报道中采用了 3.8—16.7% 的烃浓度，以 16.7% 时脂肪酸产量最高[4]，我们得到了类似的结果。氮源含量对产脂肪酸的影响见图 3，脲素为 0.5% 时，菌量及脂肪酸量均低。脲素大于 1.2% 时酵母量稍有下降。脲素 1% 时产量最高。

表 2 烃浓度对产脂肪酸的影响

烃浓度(%)(V/V)	0.1000N KOH (毫升)	酵母 (O. D.)
10	1.25	0.035
12	1.25	0.040
15	1.56	0.041

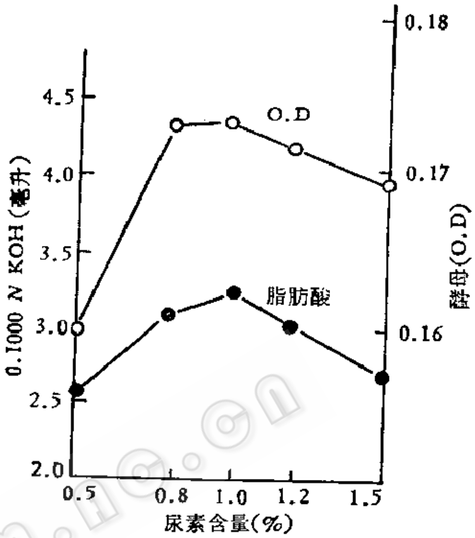

图 3 氮浓度对产脂肪酸的影响

烃 15%，接种量 10%，发酵 4 天

发酵时间与氮消耗情况对产脂肪酸的关系如表 3 及图 4、图 5。烃量 15%，脲素量小于 0.5% 时，第三天脂肪酸量就不再上升。脲素量增至 0.8—1.2%，即碳氮比 27.4—18.3 时，脂肪酸量显著增加，以第四天最高，达 13.8 毫克/毫升。脲素量 0.8%

表 3 氮消耗、脂肪酸的产生与发酵时间的关系*

脲素%	C/N	0 天	2 天	3 天	4 天	5 天
		脂肪酸提取值(毫克/毫升)				
0.25	88	2.9	4.8	4.9	—	4.6
0.50	44	3.7	7.1	6.8	6.5	6.3
0.80	27.4	3.1	7.1	—	13.8	12.0
1.00	22.0	3.1	8.9	10.2	13.5	11.5
1.20	18.3	2.9	9.6	—	12.2	10.6
		发酵清液中 N (毫克/毫升)				
0.80	24.7	3.5	1.16	0.68	0.61	0.68
1.00	22.0	4.1	2.24	0.79	0.68	0.75

* 烃 15%；接种量 15%。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

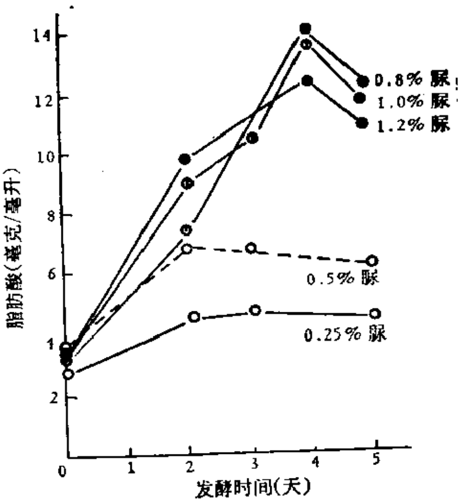

图 4　时间、脲量与产脂肪酸的关系

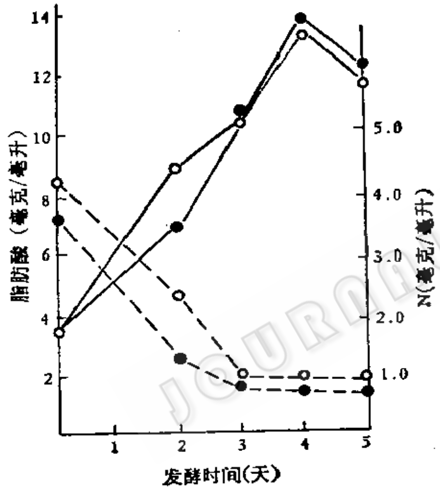

图 5　耗 N、时间与产脂肪酸的关系

●——● 脂肪酸 (0.8 脲)
●- - -● 余 N　(0.8 脲)
○——○ 脂肪酸 (1.0% 脲)
○- - -○ 余 N　(1.0% 脲)

和 1% 时，发酵清液中氮量于第三天几乎耗尽，而产酸量在第四天最高。从生长曲线得知，48 小时前为对数生长期，以后进入稳定期，同时继续积累脂质。

4. 磷酸盐对产脂肪酸的影响：结果如表 4。KH_2PO_4 从 0.2—2.0%，看不出脂肪酸量及 O. D. 值有增加的趋势。所以我们以后的试验中仍用 0.2% KH_2PO_4。

表 4　磷酸盐对产脂肪酸的影响*

KH_2PO_4 (%)	0.1000*N* KOH (毫升)	酵母 (O. D.)
0.2	1.85	0.095
0.6	2.07	0.175
1.0	1.56	0.135
1.5	1.95	0.160
2.0	1.64	0.100

* 烃 15%，脲素 1%，接种量 5%，发酵 5 天。

5. 接种量对产脂肪酸的影响：脂肪酸产量随接种量增加而提高，结果如表 5。接种量加大，脂肪酸及酵母量亦增加，以 15% 为宜。接种量大，可于短时间内获得大量菌体，有利于积累脂肪酸。

表 5　接种量对产脂肪酸的影响*

接种量(%)	0.1000*N* KOH (毫升)	湿酵母体积 (毫升)
5	1.99	0.7
10	3.31	0.8
15	4.25	0.9
20	4.02	0.8

* 烃 15%，脲素 1%，发酵 4 天。

6. 初始 pH 对产脂肪酸的影响：结果如表 6。最适初始 pH6.0—7.5。低于 6.0 或高于 7.5 时，产酸急骤下降。

表 6　初始 pH 对产脂肪酸的影响*

初　始　pH	4	5	6	6.3 (自然)	7.0	7.5	8.0	8.5
0.1000 KOH (毫升)	2.69	2.80	4.02	4.68	4.48	3.94	0.16	不长

* 烃 15%，脲素 1%，接种量 15%，发酵 4 天。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

7. 发酵周期试验：根据上述最适条件，进一步研究了发酵时间与产脂肪酸的关系。结果见表 7。

表 7 发酵时间与产脂肪酸的关系*

时间（天）	脂肪酸提取值（毫克/毫升）		酵母（O. D.）	
	pH 6.3	pH 7.5	pH 6.3	pH 7.5
3	9.0	7.0	0.244	0.200
4	14.0	10.1	0.480	0.220
5	13.0	9.0	0.320	0.216

* 烃 15%，脲素 1%，接种量 15%。

总结以上试验得知：烃浓度为 15%，脲素量 1%，初始 pH6.3，接种量 15%，种龄48小时，发酵 4 天，脂肪酸量可达 13.0—14.0 毫克/毫升。

（三）AS2.1207 产脂肪酸的稳定性试验

将麦芽汁斜面种子于室温保存两个月，比较了产脂肪酸的情况，结果如表 8。在两个月内产脂肪酸量没有递减趋势。所以在工作过程中，麦芽汁斜面种子可保存两个月备用。

表 8 AS2.1207 菌种的保存与产脂肪酸量的关系

时间（天）	脂肪酸提取值（毫克/毫升）	酵母（O. D.）
1	9.10	0.60
2	10.3	0.58
3	17.5	0.69
4	13.2	0.65
5	8.3	0.62
7	13.2	0.80
10	14.1	0.58
11	14.7	0.56
20	13.7	0.51
34	11.3	0.42
39	11.2	0.59
53	9.2	0.22
60	12.8	0.40

但在长期试验工作中，发现产酸不够稳定。经多次传代后，做平板分离，菌落于早期出现绒、皱、平、光四种形态。后来又变成皱折的菌落形态。镜检后得知，是假丝多少不同的反映。绒皱型菌丝多。在同一批试验中，各菌落产脂肪酸在 2.4—9.0 毫克/毫升之间，悬殊较大。其中产脂肪酸高的，菌落呈绒毛型，即菌丝多。在长期工作过程中，产酸趋于不稳定时，进行平板分离，可恢复产酸水平。

（四）胞外长链脂肪酸的测定

做条件试验过程中，进行了胞内外脂肪酸提取试验，以了解胞外脂肪酸积累情况。结果如表 9。由表 9 可以看出脂肪酸主要得自胞内。1971 年岩本[4]、1973 年 O. Volfova 等[5]相继提出了胞外脂问题。但直至 1977 年铃木[6]综述这一问题时，仍指出是未解决的问题。

表 9 胞内外脂肪酸的提取值*

菌体内（克）	发酵清液中（克）	胞内脂肪酸（%）	胞外脂肪酸（%）
1.8	0.25	88	12
1.7	0.3	85	15
1.6	0.2	89	11

* 由 200 毫升发酵液中提取。

（五）长链脂肪酸组分与残烃

用三批正烷烃经 AS2.1207 多次发酵，按前述方法提出之胞内长链脂肪酸，甲酯化后，做气相色谱分析，结果如表 10 及表 11。从表 10、11 得知，同批原料蜡，各次发酵生成的脂肪酸组分很相近。三批原料蜡生成的脂肪酸组分也都是以 C_{17} 及 C_{18} 酸最多，其次是 C_{16} 酸。这三种组分占长链脂肪酸量的 80% 以上。不饱和酸占长链酸总量的 79.6%。其中尤以 $C_{17:1}$ 高达 44.9%，$C_{18:1}$ 达 19%。这一特点用于选矿是很有利的。从组分分布，从不饱和酸所占的比例

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 10　原料蜡与脂肪酸组分

原料批号	C 数	原料液蜡(%)	脂肪酸组分(%)			残烃组分(%)	
1 号	C_{11}	0.4	0.3	—	—		
	C_{12}	1.2	—	0.9	—		
	C_{13}	5.9	0.9	1.0	0.8		
	C_{14}	13.5	1.9	2.7	2.4		
	C_{15}	18.2	7.6	7.8	7.4		
	C_{16}	19.9	13.7	12.4	16.1		
	C_{17}	19.5	36.6	38.4	36.9		
	C_{18}	14.1	39.2	36.7	36.5		
	C_{19}	7.6	—	—	—		
	C_{13-19}	98.7	99.9	99.0	100		
2 号	C_{12}	1.1	—	—	0.5		
	C_{13}	8.3	—	—	0.8		
	C_{14}	19.2	1.1	2.7	2.4		
	C_{15}	20.2	11.1	10.1	7.6		
	C_{16}	22.7	16.6	20.4	11.9		
	C_{17}	16.2	40.7	35.7	38.8		
	C_{18}	8.1	30.5	31.1	38.0		
	C_{19}	2.3	—	—	—		
	C_{13-19}	97.0	100	100	99.5		
3 号	C_{12}	1.7		—*		1.7	1.2
	C_{13}	8.6		—		7.9	7.5
	C_{14}	18.7		1.9		16.8	15.9
	C_{15}	21.7		7.6		21.5	21.4
	C_{16}	21.4		11.0		19.7	16.1
	C_{17}	17.7		54.0		14.4	15.6
	C_{18}	8.1		25.4		6.8	7.6
	C_{19}	2.8		—		2.1	3.0
	C_{13-19}	99.0		100		89.2	87.1

* 这批酵母由 60℃ 减压干燥制得，其中低碳脂肪酸可能有损失。

表 11　AS2.1207 发酵生成之饱和与不饱和脂肪酸组分*

组　分	$C_{14:0}$	$C_{15:0}$	$C_{15:1}$	$C_{16:0}$	$C_{16:1}$	$C_{17:0}$	$C_{17:1}$	$C_{17:2}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$
(%)	1.9	7.1	0.5	1.4	9.6	7.6	44.9	1.6	2.4	19.0	4.0

* 这批酵母由 60℃ 减压干燥制得，其中低碳脂肪酸可能有损失。

以及各次组分的稳定性分析看，试验达到了预期目的。

1968 年 C. Ratledge 报道[3]，用 *Candida* 属酵母发酵以 C_{13} 为主成分的正烷烃，获得胞内外酸的总量为 21 克/升。其中碳链低于 C_{15} 的脂肪酸占 54%。即折合碳链高于 C_{15} 的酸为 9.7 克/升。此后我们未再见到有关产量的其他报道。我们的试

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

验条件与上述报道不完全一致。我们用的是 C_{13-18} 为主成分的正烷烃,用解脂假丝酵母发酵生成胞内脂肪酸量达13—14克/升。主要是 C_{16-18} 的脂肪酸。

从残烃各组分看,基本与原料一致。即在我们实验条件下，AS2.1207 对 C_{12-19} 各烷烃的氧化能力与烃组分的百分比相应。所以残烃可以重复使用。

参 考 文 献

[1] 中原忠篤ら: 石油と微生物, No. 1, 32, 1968。
[2] 执行昭文: 日本农艺化学会誌, **44**: 380, 1970。
[3] 执行昭文: 日本农艺化学会誌, **46**: 27—33, 1972。
[4] C. Ratledge: *Biotechnol. and Bioeng.*, **10**:511, 1968.
[5] 岩本浩明: 石油と微生物, No. 5, 70, 1971.
[6] O. Volfova et al.: *Folia Microbiol.*, **18**:286, 1973.
[7] 铃木武夫: 发酵と工业, **35**: 459, 1977。

STUDIES ON THE PETROLEUM OIL YEASTS AND ITS APPLICATION

I. STUDIES ON THE FATTY ACIDS PRODUCTION FROM NORMAL-ALKANES BY OIL YEAST

Wang Dazhen　Tan Peiying　Su Qiheng Zheng　Wenyao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Wang Dingchang　Jiang Yumei

(*Institute of Food Industrial Fermentation, Ministry of Light Industry, Beijing*)

Zhang Kewen　Xie Yurang

(*Beijing Grape Wine Factory, Beijing*)

After screening of two thousand microbial strains, we obtained *Candida lipolytica* AS 2.1207, which producing higher amount of fatty acids from normal-alkanes containing C_{13-18} hydrocabons mainly. By improvement of the fermentation conditions, the amount of fatty acids increased from 3 mg/ml to 13—14 mg/ml.

The fatty acids consisted chiefly of C_{13-18} acids, in which the most abundant acids C_{17}, C_{18} and C_{16} accounted for over 80% of the total acids, while the percentage of unsaturated acids (mainly $C_{17:1}$) was 80%. The composition of fatty acids in different batchs was relatively constant. The fatty acids stored in the cells were in the form of oil. The potency of the strain was considerably stable.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn