

# 石油油脂酵母及其应用的研究

## II. 同化正烷烃的高脂酵母的选育、发酵及其脂类物在矿石浮选上的应用\*

谭蓓英 郑文尧 毛维颖 官家发 王大珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

王定昌 张慎富

(轻工业部食品工业发酵研究所, 北京)

油酸及其脂类物是萤石、白钨等许多重要矿石的优良浮选剂。而油酸这类不饱和脂肪酸用化学方法很难合成, 目前主要从植物油获得。因此利用微生物发酵石蜡生产油脂并用于矿石浮选, 是开辟浮选剂新来源的途径, 这方面的工

作 Соложенкин 曾有过报道<sup>[1]</sup>。本文报道同化

\* <sup>14</sup>C<sub>6</sub> 照射处理由北京大学赵永和同志协助; 酵母菌同化碳源实验由中国科学院微生物研究所李明霞、唐荣观同志完成; 气相色谱分析由大连油脂化学厂刘景春及中国科学院微生物研究所庞月川同志完成。

正烷烃的高脂酵母菌的选育、发酵条件和脂类物在矿石浮选上的应用。

## 材料和方法

### 一、菌株及其诱变方法

将解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) AS 2.1207 在麦芽汁斜面上活化二天, 接入麦芽汁培养基内。28℃ 振荡培养 22 小时后, 离心并将菌体用生理盐水洗涤, 用 0.1% 琼脂无菌水溶液制成浓度为  $10^7$  细胞/毫升的单孢菌悬液, 每支试管装 4 毫升。诱变选用不同剂量的  $\gamma$ -射线进行照射, 用稀释涂皿法计算存活菌数。

### 二、液体石蜡

用锦西石油五厂的重蜡。经分析为  $C_{11-18}$  的正构烷烃, 其中  $C_{14-18}$  占 85%。

### 三、培养基和培养条件

种子培养基成分(%):  $KH_2PO_4$  0.2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.002, 玉米浆 0.5, 尿素 1.0, 液蜡(体积/体积) 8.0, pH 自然。发酵培养基成分(%):  $KH_2PO_4$  1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1, 玉米浆 0.05, 尿素 1.0, 液蜡(体积/体积): 15.0, pH 自然。尿素用蒸馏水配制, 8 磅 30 分钟单独灭菌, 其他用自来水配制, 15 磅 30 分钟灭菌。菌株用麦芽汁琼脂斜面保存, 活化期为 3—5 天, 种子培养及发酵条件见表 1。

表 1 种子培养及发酵条件

培养条件	种子瓶及摇瓶	种子罐 (30升)	发酵罐 (240升)
接种量(%)	500 毫升摇瓶用一支斜面	6—10	15—20
温度(℃)	28±1	28±1	28±1
压力(公斤/厘米 <sup>2</sup> )	0	0.5	0.5
通气量(体积/体积)	250 毫升摇瓶装液量 20 毫升; 500 毫升的装 50 毫升。	1:0.5	1:0.5
转速(转/分)	220	260—270	230—240
种龄或周期	种龄 2 天; 摇瓶发酵 5 天	40—45 小时	3 天

### 四、脂类物及脂肪酸的测定

1. 脂类物含量的测定: 用氯仿: 甲醇 (2: 1) 在索氏提取器中提取冷冻干燥的酵母粉, 经过 15 小时, 得脂类物及残烃的混合物。去溶剂

称重为  $W_1$ , 再用 10% KOH 的 95% 乙醇液迴流皂化 2 小时, 用乙醚提取不皂化物(主要是残烃), 去溶剂将其称重为  $W_2$ 。脂类物含量为  $W_1 - W_2$ 。

2. 脂肪酸含量及组分的测定: 见文[2]献。

3. 脂肪酸的间接测定: 采用滴定法<sup>[2]</sup>。

### 五、脂肪酸粗皂液的制备

发酵液经板框压滤, 得压榨酵母。加入工业氢氧化钠液体使其终浓度为 4%, 于 121℃ 皂化 30 分钟, 供浮选用。残烃多应在皂化前离心除去。

## 结果与讨论

### 一、菌株的选育

AS2.1207 菌用  $\gamma$ -射线处理, 射线的剂量与酵母存活菌数的对数成直线关系, 见图 1。

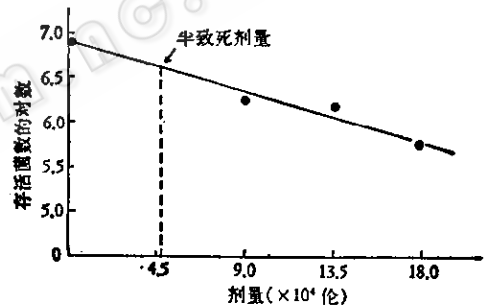


图 1  $\gamma$ -射线剂量与酵母存活数对数的关系

用  $13.5 \times 10^4$  伦的剂量连续照射二次, 获得了优良菌株 AS 2.1399 及 AS 2.1398。多次摇瓶试验结果表明, 脂肪酸平均提高约 51%, 见表 2。

### 二、AS 2.1399 菌株的特征

1. 形态: 原株的菌落外形多皱折, 而诱变株多茸毛(见图 2)。后者菌丝多而粗壮, 细胞大而饱满, 发酵后期细胞内积累大块脂肪体, 见图 3。

2. 同化碳源试验: 原株 AS 2.1207 菌弱同化半乳糖, AS 2.1399 菌株则不能同化半乳糖, 其他结果见表 3。

3. 同化单烃试验: 两株菌都能广泛地利用  $C_{11-24}$  的正烷烃, 但在同化程度上有些差别, 见

表 2 AS 2.1399 和 AS 2.1398 摇瓶发酵产脂肪量

菌株号	批号	滴定值(毫升)				平均
		37	56	57	58	
AS 2.1399		7.5	8.5	6.2	6.6	7.1
AS 2.1207		5.2	6.1	3.8	3.7	4.7

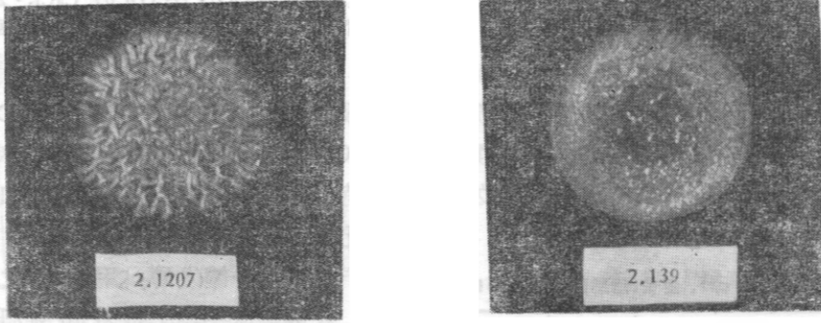


图 2 两株菌菌落形态

表 3 AS 2.1399 和 AS 2.1207 主要分类学特征的比较\*

菌株	同化 KNO <sub>3</sub>	葡萄糖发酵	碳源同化												
			葡萄糖	半乳糖	蔗糖	麦芽糖	乳糖	松三糖	棉子糖	海藻糖	纤维二糖	赤鲜醇	乳酸	琥珀酸	柠檬酸
AS 2.1399	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
AS 2.1207	-	-	+	⊥	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

\* “+”表示同化; “-”表示不同化; “⊥”表示弱同化。

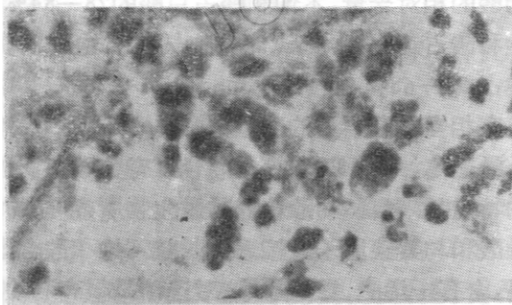


图 3 AS 2.1399 用苏丹黑 B 染色油脂(细胞与菌丝中黑色团块与颗粒为油脂, ×1590)

表 4。

4. 对尿素的同化能力: AS 2.1399 同化尿素的能力较原株明显减弱。(详见发酵试验)其诱变株使用三年未见退化,因此是比较稳定的。

### 三、发酵试验

1. 发酵条件: 在单一因子试验的基础上进

行了尿素等 8 个主要因子的正交试验。选用  $L_{18}(2 \times 3^7)$  正交表。结果表明,有利于脂肪酸积累的较适条件为尿素 1%、周期 5 天、 $KH_2PO_4$  1%、液蜡 15%、玉米浆 0.05%、接种量 20%,初 pH 7.5。在重复正交试验中,曾把磷酸盐水平(%) 0.2、0.6、1.0 改为(%) 0.5、1.0、1.5,结果仍以 1% 最好。原株 AS 2.1207 菌需要磷酸盐仅为 0.2%,并且不能加玉米浆<sup>[2]</sup>。

试验了培养基中 4 种无机盐的影响。选用  $L_9(3^4)$  正交表,每种盐浓度 3 个水平:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0, 0.02%, 0.2%),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0, 0.0005%, 0.002%),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0, 0.0005%, 0.002%),  $NaCl$  (0, 0.1%, 0.5%)。结果表明,在试验范围内对脂肪酸积累无明显影响,因此无机盐在发酵培养基中可以不用。

2. 尿素的影响及脂肪酸发酵过程: 在 30 升

表 4 AS 2.1399 和 AS 2.1207 对单烃同化的比较\*

菌 株	正 烷 烃 碳 原 子 数											
	10	11	12	13	14	16	17	18	19	20	22	24
AS 2.1399	±	±	+++	++	+	++	++	+++	++	++	++	±
AS 2.1207	0	+	++	++	+++	++	++	+++	++	+++	++	±

\* 单烃同化试验用液体法。培养基为(%)：(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 0.01, NaCl 0.01, 酵母膏 0.02, 单烃 1。自来水定容, pH 自然。每支试管装 3 毫升, 振荡培养 1—2 周。同化强弱用菌体生长好坏(“0”到“+++”)表示。

自控发酵罐进行试验。从表 5 结果看, 0.2% 的尿素没有满足生长所需的氮源。0.5% 尿素基本上满足了生长的需要。1% 尿素可维持发酵过程中 pH 中性, 脂肪酸量也明显增加。

表 5 不同浓度尿素对 pH、生长、脂肪酸积累的影响

尿素 (%)	pH			维持 pH 7.5 时最大生长(光密度)	滴定值 (毫升)
	初	对数生长期末期	终		
0.2	5.7	3.0	2—3	1.1	2.4
0.5	6.0	4.0	2—3	1.29	3.4
1.0	6.2	7.0	6.7	1.30	5.2

AS 2.1399 菌的脂肪酸发酵过程见图 4。

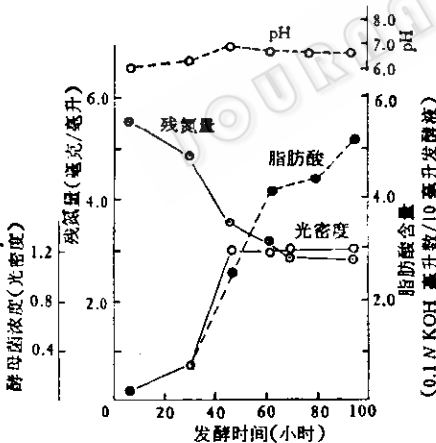


图 4 AS 2.1399 菌的脂肪酸发酵过程\*

图 4 表明, AS 2.1399 菌在发酵过程中, 脂肪酸的积累是在对数生长期之后。尿素尚未用尽, 维持 pH 中性。AS 2.1207 在相同条件下发酵, 尿素很快用尽, 终 pH 降至 3。这说明 AS 2.1399 同化尿素能力较 AS 2.1207 明显减弱, 这是油脂酵母的一个特征。岩本浩明<sup>[3]</sup>有过类

似报道。培养该菌时培养基的 C/N 比为 40, 高 C/N 比也是油脂酵母的培养特征。用尿素维持 pH 中性, 既利于菌体生长和脂肪酸积累, 又比用碱简便而经济。

3. 240 升罐发酵: 用 30 升发酵罐做种子罐。获得菌体平均干重为 50 克/升。细胞含脂类物质达 44.3%。9 批 18 罐次的发酵结果表明, 脂肪酸含量稳定在滴定值 6—8 毫升。实际抽提值最高 21.2 克/升。Retledge<sup>[4]</sup> 曾报道 21 克/升。在发酵清液中脂肪酸很少, 这种情况与岩本浩明、铃木武夫<sup>[5,6]</sup>报道一致。

#### 四、AS 2.1399 产生的脂肪酸

气相色谱分析的结果表明(见图 5), AS 2.1399 产生的脂肪酸是以长链不饱和脂肪酸为主的 C<sub>6-18</sub> 的混合一元酸。用峰面积来表示脂肪酸的相对含量, 不饱和酸占总酸的 78—84%, 饱和酸占 15—21%, C<sub>13-18</sub> 的长链不饱和脂肪酸占 52—68%, 油酸、亚油酸占 21—26%。其中还有相当数量罕见的奇数碳酸(43%), C<sub>17:1</sub> 酸含量最高, 为 18—24%, 而含有奇数碳脂肪酸的特点是来自矿物油培养的微生物所特有的。油酸和与其碳原子数接近的长链不饱和酸含量高, 含有一烯酸、二烯酸, 这对选矿是很有利的。

#### 五、矿石浮选试验

用脂肪酸粗皂液或用从酵母中提取的油脂

\* 试验在 30 升自控发酵罐中进行。接种量 10—12。转速 400 转/分, 罐压 0.4 公斤/厘米<sup>2</sup>, 通气量 1:0.2, 装量 17 升。菌体生长光密度测定方法是: 将 10 毫升发酵液离心去残油后, 重新制成菌悬液, 加 Tween 80 一滴, 混匀取 1 毫升加水 3 毫升, 摇匀, 在 72 型分光光度计上测 O. D. 值, 波长 620 毫微米。用凯氏定氮法测发酵液中的含氮量。

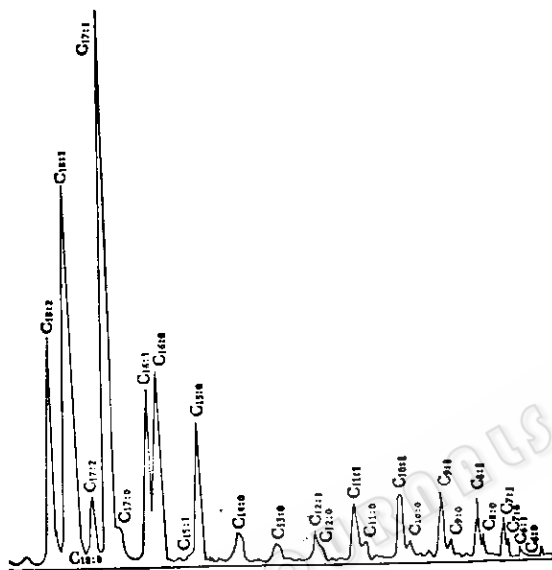


图 5 AS 2.1399 脂肪酸组分气相色谱图

和脂肪酸进行了不同矿石的浮选试验流程见文献[7]。①浮选萤石：用粗皂液在湖南桃林铅锌矿进行日处理量为 2 吨的半工业生产规模试验，获得萤石精矿品位 95% 以上，回收率 80%。

用于湖南潘家冲矿萤石浮选，精矿品位 95%，回收率 80% 两处选矿结果均达到优良浮选药剂油酸的浮选指标<sup>[7]</sup>。②浮选白钨：用提取的脂肪酸浮选汝城白钨小型试验，白钨粗精矿品位  $WU_3$  3.80%，回收率 28.16%，油酸浮选粗精矿品位  $WU_3$  3.35%，回收率 18.61%。前者较用油酸略佳<sup>[7]</sup>。③用提取的油脂进行浮选白云鄂博的稀土、萤石和铁矿石的小型试验，取得了三个 90% 的回收率。这是包头钢铁厂的选别指标。

## 参 考 文 献

- [1] П. М. Соложенкин: *Известные Металлы*, (7): 85—86, 1977.
- [2] 王大珍等: 待发表。
- [3] 岩本浩明、小沢正昭: *発酵協会誌*, **31** (追刊 2): 199—215, 1973.
- [4] Ratledge, C.: *Biotech. and Bioeng.*, **10** (4): 511—513, 1968.
- [5] 岩本浩明: *石油と微生物*, 5: 70—75, 1971.
- [6] 鈴木武夫: *発酵と工業*, **35** (6): 459—472, 1977.
- [7] 湖南冶金研究所: *湖南冶金*, 1977 年第 1 期。