

耐高渗透压甘油酵母菌种的筛选和培养条件

无锡轻工业学院发酵厂、工业发酵教研组

我们用淀粉质原料与耐高渗透压酵母发酵法生产甘油的研究已有报道^[1]。本文主要是叙述有关这一研究的菌种分离、筛选和培养条件试验。

据报道^[2-4]，耐高渗透压酵母在正常生理条件下可以产生多量的甘油或其他多元醇，较之亚硫酸盐法^[5-11]有明显的优点。为此，我们根据环境因素与生理特性之间的一定生态关系，有意识地对产生甘油的耐高渗透压酵母进行了采样分离和筛选。

材料和方法

(一) 采样

采集的样品有甜果、花蜜、蜂蜜、甜汁，常有糖类物质渗透流过和贮积的土壤和有高浓度排泄物流过的排水道淤积物等。

(二) 培养基

除有特殊说明外，所用培养基均添加含总磷量为60—75 微克/毫升的玉米浆和0.2%(重量/体积)尿素，培养开始 pH 值 3.5—4.0。酶法葡萄糖含量：样筛培养基为 40%；发酵培养基为 25%；种子培养基为 10%；斜面培养基为 20%，另加 2% 琼脂。

(三) 灭菌和培养条件

除固体和种子培养基用 0.8 公斤/厘米² 压力蒸气灭菌 20 分钟外，摇瓶培养基只用煮沸灭菌，但所用三角瓶曾经 160℃ 干热灭菌 2 小时。培养温度为 32—35℃，发酵摇瓶接种量为 5—10% (体积/体积)，振荡往复次数为 140 次/分钟，振幅 3.5 厘米。500 毫升三角瓶装液量为 50 毫升，进行开口发酵。

(四) 筛选方法

样筛：将样品放入装有样筛培养基的三角瓶内，35℃ 振荡培养 5 天，用纸上层析法分析发酵液甘油。初筛时，取甘油含量较高的样筛发酵液，在含 40% 糖的固体培养基上进行划线分离，35℃ 培养 2 天，挑取部分单细胞菌落进行斜面培养 2 天，再接入发酵培养基振荡发酵 6 天，同样用纸上层析法分析甘油产生情况，选出优良的发酵液测定其甘油和残糖。复筛时将初筛获得较优的菌株移植到斜面上，35℃ 培养 2 天后，把每一菌株接种于 3—5 个三角瓶发酵培养 6 天，分别用

纸上层析半定量测定甘油含量和产生其它的醇。然后继续进行菌种复筛。

(五) 分析方法

鉴于开口振荡发酵水分蒸发较多，所以在测定 pH 值后补加适量的水使之恢复原有体积。pH 值是用上海试剂厂精密试纸测定。酵母量的测定是用 3000 转/分钟离心 5 分钟测定沉淀的酵母体积。糖量测定用蒽酮法^[9]，发酵液甘油测定用变色酸比色法^[10]，总磷量测定用钼蓝比色法^[9]，总氮量测定用凯氏定氮法^[9]，纸上层析溶剂为正丁醇:乙醇:水=98:5:18。

结果和讨论

(一) 菌种的分离和筛选

要利用耐高渗透压酵母发酵法生产甘油，其关键在于找到甘油产量高的耐高渗透压酵母菌种。经过复筛，产甘油量较高的几株有代表性菌株列于表 1。

表 1 部分筛得菌株特性

菌号	层析情况			残糖* (%)	多元醇 (%)	总糖转化率 (%)
	甘油	阿拉伯糖	赤藓醇			
2512	+++	+	-	1.6	8.6	36.0
2115	++	-	-	1.5	1.9	8.5
70	-	+++	-	1.3	6.5	27.0
61-4	+++	+	-	2.9	9.6	40.0
71-B	+++	-	-	2.5	5.8	25.0
110	++	+	+	3.2	8.5	33.0

* 由于酶法葡萄糖液质量不稳定，残糖一项中包含有相当数量的不可发酵的还原性物质，故表现残糖较高。下面实验也有这种情况，不另说明。

从表 1 可以看到筛得的耐高渗透压酵母中，多数菌株皆能产生甘油和阿拉伯糖醇，少数菌株只产生单一的甘油或阿拉伯糖醇，还有少数菌株能产生甘油、阿拉伯糖醇和赤藓醇。根据多次反复试验，71-B 虽单产甘油，但得率较低，发酵条件较难控制。而从南部地区采集的样品上分离得到的 61-4 菌株甘油得率高，阿拉伯糖醇极少，仅为甘油量的五十分之一左右，发酵结果也稳定，所以对 61-4 菌种作了进一步试验。在含高浓度糖的培养基上对 61-4 菌株进行了多次自然分离和

选择, 结果获得了目前生产上应用较为优良的菌株 61-4-A₀。这个菌株具有便于操作, 发酵又稳定的特点, 在适宜条件下, 其总糖转化率稳定在 45% 以上, 发酵液甘油含量稳定在 10% 以上。

(二) 培养条件的试验

对良好的菌种还应给予适当的外因条件才能充分发挥它的优良性能。通过多种因素的大量试验, 发现影响发酵效果的主要因素是培养基中可以同化的总磷量。因之, 在进行生理条件试验中着重围绕磷的含量进行。

1. 磷的最适量 从图 1 的磷量试验可以看出, 在

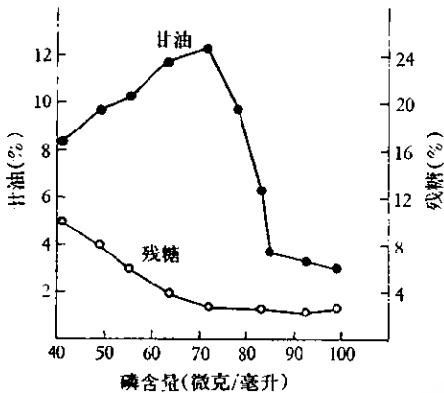


图 1 培养基总磷含量对发酵甘油的影响

糖浓度为 24% 时, 以玉米浆为磷源, 培养基总磷量在 60—75 微克/毫升时糖的转化率最高。这时总糖的转化率为 41—48.5%, 耗糖的转化率为 51—55%。当总磷量在最适量以下时, 发酵速度减缓, 残糖增加, 总糖转化率降低。总磷超过最适量时, 产生浓厚的酯香气体和大量酵母菌体, 总糖转化率大幅度下降。

2. 不同磷源的比较 在以酶法液体葡萄糖作为碳源时, 用有机与无机磷源对甘油发酵的效果见表 2。

表 2 不同磷源的发醇结果

磷源	磷(微克/毫升)	甘油 (%)	残糖 (%)	总糖转化率 (%)	利用糖转化率 (%)
酵母膏	77.3	11.0	5.0	41.0	51.0
玉米浆	81.0	11.0	6.3	41.0	53.0
KH ₂ PO ₄	79.1	11.1	6.1	42.0	53.0

由表 2 可见, 有机磷源与无机磷源对发酵具有相同效果, 也与酵母膏、玉米浆中的其他因素关系不大, 这就再次证明了在用酶法葡萄糖液发酵甘油时, 其关键是总含磷量。然而在用结晶葡萄糖为碳源时, 若不加入少量玉米浆或酵母汁, 而单用无机磷来调节总含磷量, 其发酵效果甚差, 菌体量长得很少。其原因可能是由于酶法葡萄糖液中含有某种未知生长因素。倘若

在结晶葡萄糖培养液中加入 0.1% 玉米浆, 再加入磷酸二氢钾作为磷源, 其发酵结果如图 2, 效果与全用玉米浆为磷源的完全一致。试验结果与张树政等^[11]和 Spencer 等^[5]的结果不同, 但与 Hairs 等^[7]的结果类似。引起这一差异, 我们认为其原因不完全在于所用的酵母菌种不同, 也可能是张树政和 Spencer 所用的基础培养基中含有酵母膏量的总磷量已经过多, 因此外加的无机磷的作用不可能真实代表它对甘油产生的影响。

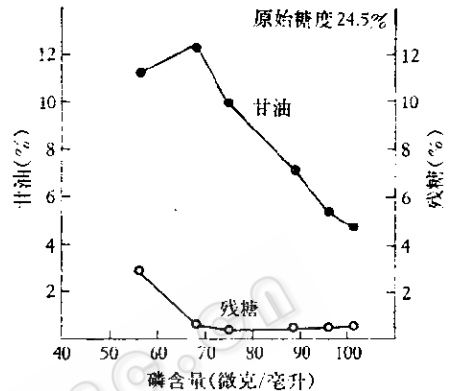


图 2 无机磷加量的发酵情况

3. 培养液中糖的开始浓度与最适磷量的关系 所谓最适磷量是指在一定条件下最宜于发酵甘油的含磷量。从表 3 结果可以看到, 即使其它条件不变, 糖浓度的变化也能相应地引起最适磷量的变化 (表中粗线部分为糖浓度、磷量比较适当时的发酵情况)。即随着糖浓度的增加, 最适磷量有相应增加的趋势。这个结果提示我们, 在进行耐高渗透压酵母生产甘油时, 在工艺操作合理的前提下, 通过各种途径增加培养液糖浓度和磷的含量, 可以获得更为满意的效果。

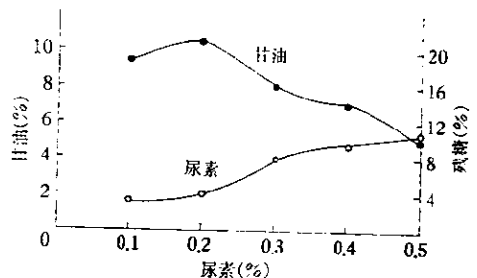


图 3 尿素加量对发酵的影响

4. 尿素用量对发酵的影响 从图 3 看出, 在糖浓度为 24.5%, 总磷含量为 65 微克/毫升时, 加入尿素 0.2% 为宜。多加尿素将导致发酵液中甘油量下降, 残糖量增加。此外, 在试验中还发现, 当培养液含磷量超过最适磷量时, 倘若增加尿素用量, 反而抑制磷对

发酵的不利影响,而得到较好的结果。在我们的试验条件下,当磷量最适时,最适的含氮量为 1.12—1.45

毫克/毫升培养液,即 N/P = 19—25 左右比较适合。

表 3 培养液糖浓度变化与总磷量对发酵效果的影响

糖 浓 度	16.8%				24.2%				30.8%			
	磷 (微克/毫升)				磷 (微克/毫升)				磷 (微克/毫升)			
	51.0	59.8	64.0	75.0	57.4	65.0	73.6	80.0	57.6	66.5	73.6	78.5
发酵液甘油 %	6.2	5.4	4.6	2.2	8.5	9.6	9.8	8.8	9.6	10.2	11.8	13.4
残 糖 %	2.6	2.4	2.4	2.4	6.9	3.8	3.7	3.4	15.3	14.2	10.4	7.2
总糖转化率 %	36.5	31.8	27.6	13.1	35.0	39.8	40.6	36.5	31.2	33.0	38.3	43.5
耗糖转化率 %	43.2	37.0	32.2	15.3	49.0	47.0	48.3	42.3	62.0	62.8	58.0	57.0

5. 起始 pH 对发酵的影响 试验结果列于表 4,从表中可看出,起始 pH 对发酵有影响,但不显著。pH 4.0 左右是适当的。考虑到减少开口发酵时细菌感染,我们在试验中一般采用 pH 3.5—4.0。

表 4 起始 pH 对发酵的影响

pH	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
发酵液甘油量 (%)	8.5	10.0	12.5	10.0	10.5
残 糖 (%)	10.7	7.5	3.8	3.5	4.6
总糖转化率 (%)	34.7	40.0	50.8	48.5	42.7
利用糖转化率 (%)	60.0	52.5	60.0	56.5	53.0

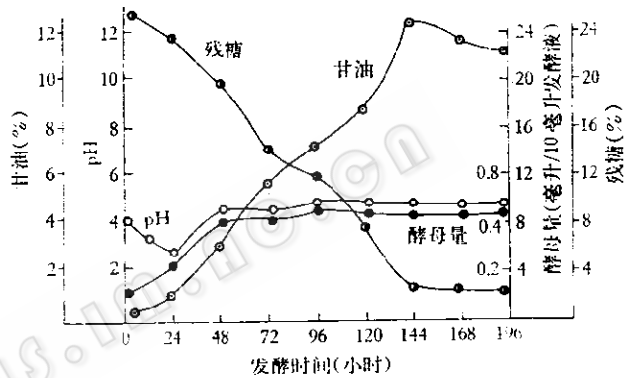


图 4 甘油发酵全过程

(三) 耐高渗透压酵母发酵甘油的全过程

从图 4 了解到,在整个发酵过程中,发酵液中的酵母量是逐渐增加的,但当最初 48 小时内酵母量达到发酵液的 4% 左右时,基本上成为一个动平衡。pH 值虽有微小波动,在发酵整个过程中基本上在 4—5 左右。糖的消耗与甘油的积累则有一个准量关系,一般为耗二度糖,生成一度甘油,而我们的实验结果有时超过 Hajny 等提出的,所谓发酵甘油最高理论转化率为耗糖 50% 的说法。在发酵末期,当残糖量低于 1% 时,这时摇瓶必须停止振荡,否则有可能消耗甘油。从全过程来看,也可设法将开始的酵母增殖阶段予以缩短,例如我们采用车间生产的压榨酵母加大接种量,使培养液中的酵母量开始振荡培养即达到 4%, 结果发酵时间可以相应地缩短 24—36 小时。

参 考 资 料

[1] 无锡轻工业学院,无锡酶制剂厂: 科学通报, 4: 188—

190, 1973.

- [2] 大西博: 日本特许公报, 昭 37—12450, 1962.
 [3] 大西博: 日本特许公报, 昭 39—27497, 1964.
 [4a] Button, D.K., Carver, J. C. & Hajny, G. J.: *J. Appl. Microbiol.*, 14: 292—294, 1966.
 [4b] Hainy, G. J., et al., *J. Appl. Microbiol.*, 8 (1): 5211, 1960.
 [5] Spencer, J. F. T. & Shu, Ping: *Can. J. Microbiol.* 3: 559—567, 1957.
 [6] 张树政、杨廉婉、王惠莲: 微生物学报, 8: 369—376, 1962.
 [7] Hairis, J. E. & Hajny, G. J.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 12: 9—24, 1960.
 [8] 金培松等: 微生物学报, 8: 364—368, 1962.
 [9] 张宽厚: 细菌生理学, 人民卫生出版社, 1962.
 [10] Marguerite Lambert & Neish; *A. C. Can. J. Res.*, 28: 83—89, 1950.
 [11] 张树政、杨廉婉、王惠莲: 微生物学报, 9: 134—139, 1963.