

# 甘蔗糖蜜发酵甘油的试验

四川省轻工业局制糖发酵工业研究所

甘油是国防和民用工业的一种原料,用于生产炸药、塑料、橡胶、食品、药剂、化妆品等。目前,甘油产品主要来自肥皂厂的副产品,不能满足需要。几年来,不少科研单位开展了甘油发酵的研究,取得了较好结果。在毛主席关于“备战、备荒、为人民”的战略方针指引下,我们进行了以甘蔗糖蜜为原料,用耐高渗透压酵母发酵甘油的试验,开展了菌种筛选、诱变及摇瓶发酵条件的研究,并经500升发酵罐扩大试验,使发酵液甘油含量稳定在8—10%,总糖转化率达43%,发酵时间60—70小时,提取收率在50%以上。

## 菌种的筛选

初筛:将采集到的蜜饯、果脯、果酱、蜂蜜、花粉、废糖蜜以及糖厂、酒厂的泥土样品,投入装有50毫升初筛培养基[40%糖蜜(以全糖计)、0.2%尿素, pH 4.5]的500毫升三角瓶中,振荡培养(往复式摇床,振幅4厘米,振速130次/分)5天,用纸层析法测定培养液中的甘油含量。将其含量高者,用总糖为25%的糖蜜固体培养基进行平板分离。置32—35℃培养3—4天。然后,将大的菌落挑入试管斜面,培养4—5天。再分别接入总糖为25%的培养液内,振荡培养6天,仍以纸层析法测甘油产量,选其产甘油能力较强的菌株供复筛。

复筛:将初筛选出的菌株,用由糖蜜(总糖为10%)、尿素(0.3%)组成的pH4.5的一级种子培养基振荡培养48小时。然后以10%的接种量接入到二级种子培养基(成分与一级种子培养基相同)中,于33—35℃,振荡培养18—22小时。再以10%接种量接入到含有糖蜜清汁(以总糖计)20%,尿素0.2%, pH4.5的复筛发酵培养基中,于33—35℃振荡培养3—4天。用过碘酸快速法测定发酵液的甘油含量。选其产甘油性能良好者再以相同条件复筛。

由125个样品分离到酵母菌605株,选出了甘油产量较高的耐渗透压酵母3株,编号为40-235-8, 40-235-16, 19-83-1,甘油产率为5—6%。

## 摇瓶发酵条件试验

### 一、材料和方法

#### (一) 斜面培养基

口服葡萄糖20%,酵母膏0.4%,尿素0.2%,琼

脂1.6—1.7%,自来水配制, pH4.5左右。1公斤/厘米<sup>2</sup>蒸汽灭菌20分钟。

#### (二) 种子培养基

糖蜜清汁(以总糖计)10%,尿素0.3%,自来水配制, pH4.5左右,1公斤/厘米<sup>2</sup>蒸汽灭菌20分钟。

#### (三) 基础发酵培养基

糖蜜清汁(以总糖计)20%,尿素0.2%,自来水配制, pH4.5左右。

#### (四) 发酵条件

摇瓶装液量为容器的1/10,接种量为10%,摇床,振幅4厘米,130次/分;发酵时间3天。

## 二、试验内容及结果

取40-235-8号耐高渗透压酵母作发酵条件试验,结果如下。

#### (一) pH对甘油发酵的影响

用比重1.4的粗硫酸调发酵培养基初pH值分别为3.5, 4.0, 4.5, 5.0,发酵结果见图1。图1表明,pH对甘油发酵有一定影响, pH3.5以下,生成甘油较少, pH4.0—5.0时,甘油含量均在5.0%以上。

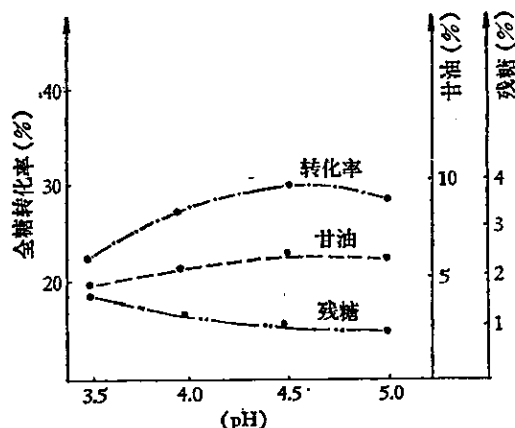


图1 pH对甘油生成的影响

#### (二) 不同氮源对甘油产生的影响

以甘蔗糖蜜发酵甘油,需加入少量氮源。分别采用尿素0.2%,硝酸铵0.53%,硫酸铵0.44%(以含

氮量计三者用量相等)作氮源,进行比较试验,结果如表1,其中尿素作氮源较好。

表1 不同氮源对甘油产量的影响

氮源(%)	发酵结果 甘油产率 (%)	残 糖 (%)	对总糖转化率 (%)
尿 素 0.2	6.54	1.33	32.70
硝酸铵 0.53	5.39	1.06	26.95
硫酸铵 0.44	5.11	1.86	25.50

(三) 尿素用量对甘油发酵的影响

以0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%五种不同尿素添加量进行甘油发酵试验,结果如图2。尿素用量为0.15—0.3%时,甘油产率基本一致,尿素用量至0.15%以下时,甘油产率明显下降。

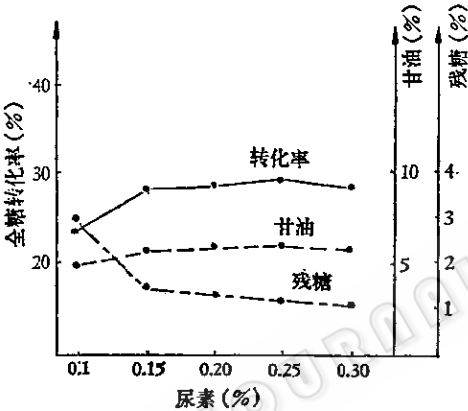


图2 尿素用量对甘油发酵的影响

(四) 发酵液糖浓度对甘油发酵的影响

如表2所示,共进行5种糖浓度试验,结果表明,发酵液糖浓度为16.58和21.5%时,甘油产率较高。糖浓度高于25%时,则总糖转化率和对耗糖转化率均明显降低。我们在扩大实验中,取17—20%糖浓度。

表2 发酵液糖浓度对甘油发酵的影响

试验结果 项 目	糖浓度(%) 16.58	21.50	23.98	25.92	31.39
发酵时间(小时)	92	92	140	164	188
甘油产率(%)	6.08	6.59	6.18	4.61	3.19
残 糖(%)	1.00	1.44	1.63	6.64	11.21
全糖转化率(%)	36.67	30.65	25.77	17.79	10.16
耗用糖转化率(%)	39.02	32.85	27.65	23.91	15.87

这样,发酵时间短,甘油产率高。

(五) 发酵温度对甘油发酵的影响

为了确定甘油发酵的适宜温度,于33℃、35℃及37℃三种温度条件下,进行了比较试验。结果如图3所示,35℃是发酵的适宜温度。

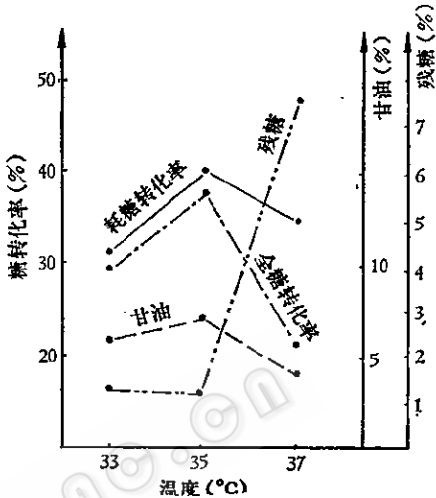


图3 温度对甘油发酵的影响

菌 种 诱 变

为了提高40-235-8菌株发酵生产甘油的能力,选用钴<sup>60</sup>γ射线、紫外线、氮芥等进行物理诱变和化学诱变,取得了较好效果。

一、诱变方法及结果

(一) 紫外线照射

把试管斜面上生长的酵母制成一定浓度的菌悬液,置于两只15瓦紫外灯管(两只平行)下照射,距离20厘米,照射时间分别为1、2、4、6、8分钟。

(二) 紫外线与氮芥复合处理

在菌悬液中先加入10毫升氮芥处理20分钟,用7%碳酸氢钠和6%甘氨酸等量混合物解毒一小时,然后进行紫外线照射,再进行平板分离。

(三) 钴<sup>60</sup>γ射线照射

取斜面菌种直接照射,照射剂量分别为10、15、20、30、40万伦琴,照射后作平板分离。

通过几种因素连续诱变,得到川甘9号菌株,其甘油产率最高达10.70%,全糖转化率达50.35%。川甘9号菌诱变谱系如图4。

40-235-8 (野生型)

↓ 钴<sup>60</sup> γ 射线, 10 万伦琴照射

钴 1-107

↓ 钴<sup>60</sup> γ 射线, 20 万伦琴照射

钴 2-76

↓ 分离

钴 2-76-17

↓ 分离

钴 2-76-45

↓ 钴<sup>60</sup> γ 射线,  
15 万伦琴照射

川甘  
1 号

川甘  
2 号

川甘  
3 号

川甘  
4 号

川甘  
8 号

↓ 分离

川甘 5 号

川甘 6 号

川甘 7 号

↓ 钴<sup>60</sup> γ 射线, 20 万伦琴照射

川甘 9 号

图 4 川甘 9 号甘油产生菌的诱变谱系

## 二、川甘 9 号菌 500 升罐甘油发酵试验结果

使用川甘 9 号菌进行中间发酵试验, 其 500 升罐发酵结果如表 3。

表 3 川甘 9 号菌 500 升罐甘油发酵结果

项目 年度	罐 数	总糖 (%)	尿素 (%)	通气量 (v/v)	初 pH	发酵 时间 (小时)	甘油 产量 (%)	残糖 (%)	全糖转 化率 (%)
1973	7	20.41	0.1	1:0.2	4.45   4.50	65.14	10.00	1.81	44.56
1974	14	19.13	0.1	1:0.2	4.20   4.70	66.15	8.89	2.08	43.62
1975	10	18.92	0.2	1:0.2	4.40   4.60	70.20	8.56	1.39	43.01

注: 表中系平均数据包括有川甘 1 号菌的发酵结果。