



糖蜜原料 发酵生产谷氨酸

I. 糖蜜流加法

上海味精厂 上海市工业微生物研究所

废糖蜜是发酵工业的廉价碳源，一向被用于酒精、丙酮丁醇、酵母和柠檬酸等的发酵生产。考虑到我国味精工业发展的需要，从节约粮食、降低成本出发，我们曾对黄色短杆菌 617 以糖蜜为原料发酵生产谷氨酸进行了一系列的研究。通过大量试验，最后确定采用糖蜜流加法对以糖蜜为原料发酵生产谷氨酸是适宜的。这种流加法，是先于发酵培养基中加入淀粉水解糖 3%，以此为碳源，对谷氨酸产生菌进行前培养，待菌体生长光密度达最大值、谷氨酸生成酶系已完全形成时，再把发酵的主要碳源——糖蜜流加到发酵液中继续进行发酵。

本文报道杂醇油的用量、糖蜜流加时间、糖蜜处理方式、尿素流加数量以及通气量和磷酸盐浓度等对谷氨酸发酵的影响。

实验方法

一、菌种

黄色短杆菌 617，保存于肉汁斜面。

二、培养基

(一) 种子培养基

淀粉水解糖 2% (除注明外均为木薯粉水解液)，玉米浆 1%，黑废液 1%，豆饼水解液 1%，磷酸氢二钾 0.3%，尿素 0.5% (单独灭菌)，pH 7.0—7.2，装液 200 毫升/1000 毫升三角瓶。

(二) 前期培养液

淀粉水解糖 3%，玉米浆、豆饼水解液、黑废液各 0.5%，硫酸镁 0.05%，磷酸氢二钾 0.1%，尿素 1% (单独灭菌)。pH 7.0—7.2，装液 20 毫升/500 毫升三角瓶。

(三) 流加用糖蜜

甘蔗或甜菜废糖蜜，加水稀释一倍作成含总糖 30% 左右糖液，或用石灰或用硫酸处理，也可不经过处理直接使用。

上述培养基一律于 121℃ 高压蒸气灭菌 20 分钟后备用。

三、培养条件

32—34℃，旋转摇床 200 转/分，偏心距 25 毫米，往复式摇床 97 转/分，冲程 76 毫米。除注明外，均用回转摇床培养。

四、分析方法

(一) pH：用精密 pH 试纸测定

(二) 菌体生长光密度

取 2 毫升发酵液，离心去上清液，加水到 10 毫升，搅匀，用 581 型光电比色计测定 660 毫微米之光密度表示菌体生长 (用蒸馏水校正零点)。

(三) 糖份

还原糖用 Lane-Eynon 改良法测定，糖蜜中总糖用以下水解法转化后再行测定：取糖蜜 10 毫升 (或 10 克) 加稀释 5 倍的浓盐酸 10 毫升，水 10 毫升，100℃ 水浴煮沸 5 分钟，用 20% NaOH 中和到微酸性，再稀释 50 倍后，测定还原糖，水解时间 5—10 分钟，结果相同。

(四) 谷氨酸

用大肠杆菌脱羧酶检压法测定。

(五) 生物素

用阿拉伯乳酸杆菌 17-5 作指示菌，以微生物法测定。

实验结果及讨论

一、杂醇油抑制菌体生长与促进谷氨酸生成的效果

向前期培养液中接入种龄为 18 小时的种子 1 毫升,在 34℃ 经一定时间培养后,添加杂醇油 0.05 毫升,再加糖蜜流加液 5 毫升,20% 尿素液 1 毫升,连续培养至 24 小时,当 pH 降到 7.0 以下,再加尿素液 1—1.2 毫升(0.7—0.9%),继续培养到 36 小时结束发酵。结果(表 1)看出,流加糖蜜时,添加杂醇油,对菌体的生长有一定的抑制作用,可促进谷氨酸的生产。还可看出,流加糖蜜的时间对产酸有重要影响,如推迟糖蜜的流加时间,虽不加杂醇油也可抑制菌体生长,并得到较好产酸率。

表 1 杂醇油对菌体生长的抑制和促进谷氨酸产生的效果

前期培养时间(小时)	对 照		杂 醇 油	
	细菌生长光密度	谷氨酸(%)	细菌生长光密度	谷氨酸(%)
8	1.4	1.84	—	2.49
10	1.4	2.50	1.2	3.34
12	1.25	3.0	1.2	3.25
14	1.4	3.1	1.4	2.88

注:流加用糖蜜系甘蔗糖蜜,加水稀释一倍后用 1N HCl,沸水中转化 60 分钟,含糖 27%,含生物素 30 微克/升。

二、杂醇油用量对产谷氨酸的影响

向培养 9 小时的前培养液中,分别加入不同量的杂醇油后,加灭菌尿素溶液 1 毫升,及糖蜜液 5 毫升,继续培养 24 小时再补充尿素液 1 毫升,发酵 36 小时结束,结果(见表 2)说明杂醇油用量以 0.2% 为适宜。

表 2 杂醇油用量对产谷氨酸的影响

杂醇油(%)	发 酵 结 果			
	pH	细菌生长光密度	残糖(%)	谷氨酸(%)
0	7.5	0.67	1.44	2.59
0.1	6.9	0.54	0.83	3.2
0.2	6.8	0.53	1.62	3.94
0.4	6.7	0.51	1.20	3.81

注:流加糖蜜时的细菌生长光密度为 0.3—0.33, pH 7.7—8.0。

三、杂醇油批号对产谷氨酸的影响

试验曾发现,在有几批实验中,添加杂醇油后,产酸反而降低。杂醇油的主要组成为戊醇(60—70%),其次为异丁醇(10—20%),再次为正丙醇(10%以下)以

及微量游离脂肪酸、糠醛、有机酸等等。由于酿造酒精的原料不同,其所产杂醇油的组成也略有不同。为此,选取二批杂醇油,以甜菜糖蜜与甘蔗糖蜜进行对比试验,结果见表 3。

表 3 二批杂醇油的不同效果的比较

糖 蜜	杂 醇 油 (%)	40 小时产谷氨酸 (%)
甘蔗糖蜜	甲批: 0.2	4.1
	乙批: 0.2	3.1
	不加(对照)	4.14
甜菜糖蜜	甲批: 0.2	4.62
	乙批: 0.2	3.82
	不加(对照)	4.81

注:上表前期培养均为 12 小时,加入稀释 1 倍的糖蜜 6 毫升,此时不用杂醇油亦有良好结果。在流加糖蜜 4 小时后添加尿素 0.8%。

表 3 表明杂醇油批次不同,对于产酸有不同效应。本实验中糖蜜是在前期培养 12 小时添加的,不用杂醇油者也得到良好的谷氨酸产率,因此添加杂醇油已无促进作用,但是添加乙批杂醇油,却出现了明显抑制现象。

有意义的是乙批杂醇油对于产酸之抑制影响可因推迟首次流加尿素的时间而减轻,结果如表 4 所示。

表 4 延迟首次流加尿素时间对乙批杂醇油抑制谷氨酸产生的克服

糖蜜流加时间(小时)	乙批杂醇油(%)	尿素流加时间(小时)	发酵时间(小时)	谷氨酸产量(%)
10	0	10	42	4.12
	0	14	42	5.00
	0.2	10	42	2.79
	0.2	14	42	4.78
14	0	14	46	4.58
	0	18	46	4.86
	0.2	14	46	2.43
	0.2	18	46	4.59

注:甜菜糖蜜稀释 1 倍。

四、菌体生长与糖蜜流加时间的关系

将接种后的前期培养基,经 1—14 小时培养,中途测定菌体生长光密度、pH、残糖、谷氨酸含量。试验证明,经 8 小时以上的前期培养后,细菌生长光密度趋于平稳,产酸酶系开始形成。此时起向培养物流加糖蜜,终于发酵结果(表 5)看出,流加糖蜜的时间是本法成败的一个关键。虽然在 8 小时添加糖蜜发酵的结果产酸较差,且适合于流加糖蜜的起始点因糖蜜品种不同而异,但流加糖蜜的时间推迟到 12 小时以后,则都可以达到 4% 以上的产酸量。

表 5 流加糖蜜的时间对产谷氨酸的影响

前培养 时间 (小时)	甜 菜 糖 蜜		甜 菜 糖 蜜 (加杂醇油0.2%)		甘 蔗 糖 蜜	
	终 光 密 度	谷氨酸	终 光 密 度	谷氨酸 (%)	终 光 密 度	谷氨酸 (%)
6	0.52	1.05	0.50	2.14	—	—
8	0.37	2.75	0.35	3.75	0.90	3.70
9	0.36	3.03	0.44	4.02	0.75	4.20
10	0.35	3.60	0.43	3.94	0.77	4.03
12	0.43	4.15	0.42	4.25	0.71	4.57
14	0.35	3.60	0.48	4.30	0.68	4.20

与此对应,用淀粉水解糖为原料,以 617 菌发酵生产谷氨酸时,发酵液中的生物素浓度不可超过 1 微克/升,否则只长菌而不产酸。但是使用糖蜜流加法发酵时,虽然生物素的浓度超过了 100 微克/升,却仍能正常进行发酵,谷氨酸产量不减。

甜菜糖蜜含糖 57%,生物素含量 352 微克/升,稀释一倍后用硫酸处理。甘蔗糖蜜含糖 57%,生物素含量 1000 微克/升以上,稀释一倍后用石灰处理。糖蜜添加量一律为 6 毫升。第 14 小时加灭菌尿素液 1 毫升,24、36 小时又分别加尿素液 1 毫升与 0.25 毫升。

五、前期培养基中糖浓度的影响

使用含糖 1—5% 的前期培养基,接种后培养 10—14 小时,流加含糖 33% 的甜菜糖蜜,继续培养 42—48 小时,结果(表 6)说明前期培养液的糖浓度以 3—

表 6 前期培养基中糖浓度对产酸的影响

前期培养 基糖浓度 (%)	前期培养 时 间 (小时)	谷氨酸 (%)	转化率 (%)	总 糖 (%)	糖蜜糖/总糖 (%)
1	10	2.31	32	7.3	91
	12	2.81	38.5		
	14	0.71			
2	10	3.51	44.2	8.0	83
	12	2.65	33.3		
	14	2.66	33.5		
3	10	4.51	52.4	8.6	77
	12	4.28	49.7		
	14	4.49	52.2		
4	10	3.17	34	9.3	71
	12	4.62	49.7		
	14	4.63	49.8		
5	10	4.88	49	9.93	66.5
	12	5.25	52.6		
	14	4.98	50.2		

注:糖蜜添加量 6 毫升。经 3 小时后流加 20% 尿素溶液 1 毫升,在 17 及 32 小时又流加尿素液 0.5—1.2 毫升。

糖蜜流加液含糖 30%,含生物素 550 微克/升。

5% 为佳,产酸浓度可达 4.5% 左右,对糖收率为 50% 以上。从工业生产考虑,以前期培养液糖浓度取 3% 较为合理,此种情况下糖蜜的添加量占总糖的 77%。

六、糖蜜品种对产酸的影响

废糖蜜因原料和产地不同,其生物素含量不一(表 7),为验证本法的稳定性起见,就 6 批不同糖蜜作了试验,结果(表 8)表明,各批糖蜜包括甘蔗糖蜜、甜菜糖蜜以及精制古巴砂糖的糖蜜,不论其生物素含量多高,均可得到 3.5—5% 的产酸量。对于个别低于 4% 产酸量的糖蜜原料,如调整流加时间或添加杂醇油,或推迟加糖蜜以后的流加尿素的时间,均可得到 4% 以上的产量。因此说明前期生长使用淀粉水解糖液,待菌体生长至最大浓度后流加糖蜜,是一个以糖蜜为原料发酵谷氨酸的有效方法,其优点是:

1. 前期生长由于用限定生物素的淀粉糖液,因此菌体的细胞膜不致过分紧密而影响谷氨酸的分泌。
2. 任何糖蜜,只要流加时间选择得当,都可收到满意结果,无论糖蜜是否经过澄清处理,均可适用,因此颇适合于工业生产。

表 7 糖蜜中生物素含量分析

糖蜜批号	糖蜜来源	糖蜜种类	总糖含量 (%)	生物素 (微克/升)
1	上海酵母厂	甘蔗糖蜜	57.2	1000 以上
2	上海酒精厂	甘蔗糖蜜	60	2340
3	上海酒精厂	甘蔗糖蜜	44	1137
4	泉州	甜菜糖蜜	56.8	352
5	上海酵母厂	甜菜糖蜜	60	1105
6	东北	精制古巴砂糖废蜜	49.06	1105

表 8 各批糖蜜发酵结果的比较(三次平均值)

糖蜜批号	每升发酵 液生物素 (微克/升)	前期培养 时 间 (小时)	结 果	
			细菌生长 光密度	谷氨酸(%)
1 (甘蔗)	100 以上	12	0.54	3.60
		16	0.58	3.50
2 (甘蔗)	233.1	12	0.56	4.44
		16	0.54	4.19
3 (甘蔗)	155	12	0.47	4.8
		16	0.44	4.9
4 (甜菜)	36	12	0.52	3.63
		16	0.50	3.20
5 (甜菜)	110	12	0.45	4.70
		16	0.49	4.29
6 (精制古巴砂糖)	110	12	0.49	4.8
		16	0.49	5.0

上表实验用糖蜜均不处理,一律稀释到含糖30%,灭菌后于每20毫升前期培养液中流加6毫升,在流加同时,添加1毫升20%尿素溶液,24小时再加20%尿素溶液1毫升。

七、糖蜜澄清处理对产酸的影响

以上实验中,所用的糖蜜,都得到了较良好的产酸率。在工厂生产中,由于糖蜜中含有大量灰份(10%左右)及胶质(约2—3%),会使发酵时产生大量泡沫,同时也影响谷氨酸的提炼,因此适当的澄清处理是有益的。

本实验使用了以下二种方法澄清糖蜜:

(一) 硫酸处理法

糖蜜加水稀释1倍,加硫酸调节pH 2.0,于95—100℃保温20分钟,使胶质分解和促进蔗糖转化,并驱除可能存在的有碍于菌体的亚硝酸。然后再用15%石灰乳中和处理,由于生成大量的石膏,以及钙离子的置换作用,可除去大量的钾、钠等金属元素,而得到澄清糖液。

(二) 石灰处理法

糖蜜加水稀释1倍,加15%新鲜石灰乳,调节pH 7.5—7.2,于100℃煮沸30分钟,使胶质破坏,然后以硫酸中和,静置澄清数小时,使得透明糖液。

甜菜糖蜜(生物素含量1105微克/升)及甘蔗糖蜜(生物素含量2300微克/升)用于发酵谷氨酸的试验结果(表9)表明,糖蜜处理对于产酸并无益处,石灰处理反会引起谷氨酸产率降低,这可能是由于糖蜜中一些可被菌体转化为谷氨酸的有机酸被 Ca^{++} 所沉淀之故。

表9 糖蜜处理对产谷氨酸的影响

糖蜜处理方法	糖蜜添加时间	谷 氨 酸 (%)	
		甜菜糖蜜	甘蔗糖蜜
不 处 理	前培养12小时	4.12	4.22
石灰处理	前培养12小时	3.70	3.80
硫酸处理	前培养12小时	3.92	4.19

注:流加糖蜜量6毫升,同时添加杂醇油0.2%,初尿素浓度0.7%,12小时及24小时又各流加尿素0.7%。

八、通气量对产谷氨酸的影响

通气对谷氨酸发酵有重要影响,一般言之,通气不足易产生乳酸与琥珀酸,通气过量则又有产生大量 α -酮戊二酸之倾向,在使用甜菜糖蜜发酵时,对于溶解氧远较蔗糖敏感,只有严密控制适宜通气量,才有良好产酸率。在淀粉原料常规发酵时通气量同培养基中生物素有关,生物素含量高,要求的通气量也相应提高。

在我们所作的发酵试验中,使用500毫升三角瓶盛20毫升培养液,在接种、流加糖蜜与尿素之后,终容量增加到30毫升。因摇床速度不变,实际上是前期通气量大,流加糖蜜后通气量减少,为恰当安排前期培养与流加糖蜜后的通气量我们进行了以下实验:

(一) 流加糖蜜后通气量保持不变,变动前期培养通气量

(二) 前期培养通气量保持恒定,改变流加糖蜜后之通气量

前期通气量对产酸的影响:在500毫升三角瓶中,分别盛入15, 20, 30, 40毫升前期培养液,于33℃摇瓶培养到一定时间,将每瓶中装液体积一律调节到20毫升,流加6毫升糖蜜,及20%尿素液1毫升,在24小时又加尿素1毫升,在48小时结束发酵,用两批糖蜜试验,得到表10所示结果,虽然以通气量较小为好,但不明显。

表10 前期培养通气量对产谷氨酸的影响

装 液 量	谷 氨 酸 (%)	
	泉州甘蔗糖蜜*	精制古巴砂糖糖蜜**
15	3.48	3.8
20	3.16	4.05
30	3.24	4.0
40	3.65	4.3

* 前期培养11小时流加糖蜜。

** 前期培养12小时流加糖蜜。

后期通气量对产谷氨酸的影响:用1000毫升三角瓶装100毫升前期培养液,接种后经20小时培养后,加入用水稀释1倍的灭菌糖蜜90毫升和无菌尿素1.5%,混匀后分装于灭菌的500毫升三角瓶中,每瓶分别为10, 20, 30, 40毫升,继续培养,至第24小时补加尿素溶液一次,至48小时结束发酵。结果(表11)看出,流加糖蜜后的通气量对产谷氨酸影响较大,装液量大即通气量小者,谷氨酸产率较高。

表11 后期通气量对产谷氨酸的影响*

装 液 量 (毫升)	残 糖 (%)	谷 氨 酸 (%)
10	4.62	1.43
20	2.80	1.87
30	1.56	3.03
40	1.56	3.45

* 精制古巴砂糖的糖蜜。

九、磷酸盐浓度对产谷氨酸的影响

磷酸盐同糖酵解作用有关,在前人所作的糖蜜发

酵中磷酸盐用量自 0.05—0.2% 不等, 磷酸盐使用方法有的一次加足, 有的则分次添加比一次添加为好。

本实验中前期培养基组成为淀粉水解糖 3%, 玉米浆、黑废液、豆饼水解液各 0.5%, $MgSO_4$ 0.05%, 添加不同量磷酸氢二钾, 分装 500 毫升三角瓶中, 每瓶 20 毫升, 灭菌后加入无菌的 20% 尿素溶液 1 毫升, 接种后经 12 小时培养, 流加稀释 1 倍的灭菌糖蜜 (漳州甘蔗糖蜜) 5 毫升, 再分别依表 12 所示磷酸氢二钾的试验浓度补入磷酸氢二钾溶液, 40 小时结束发酵, 结果 (表 12) 表明, 磷酸盐对产谷氨酸有重要影响, 其用量以 0.2% 为宜。

总之, 通过以上试验, 确定以糖蜜为原料发酵谷氨酸时可以采取流加糖蜜的工艺路线: 即先于发酵液中加入 3% 的淀粉水解糖作为碳源, 接种后经 12—14 小时的前培养阶段, 再将稀释 1 倍的灭菌糖蜜流加到发酵液中, 使总糖浓度达到 10%, 继续进行发酵, 并根据

表 12 发酵培养基中磷酸盐浓度对产谷氨酸的影响

K_2HPO_4 (%)	谷 氨 酸 (%)
0	0.68
0.10	4.25
0.20	4.47
0.25	4.4
0.30	4.1
0.1 + 0.1	4.3
0.2 + 0.1	4.1
0.25 + 0.05	4.2
0.25 + 0.1	3.9

糖蜜质量情况加杂醇油 0.2% (或者不加), 中途用尿素将 pH 控制在 7 以上, 发酵 40 小时即可结束发酵, 产酸率达 4.5% 左右, 对投糖转化率为 50%。