

耐高渗透压酵母生产甘油及 阿拉伯糖醇的研究*

II. *Hansenula arabitolgenes* Fang 产生 阿拉伯糖醇的条件

張樹政 楊廉婉 王惠蓮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

前文^[1]报导了由含糖高的材料分离出耐高渗透压酵母, 并由其中选出产生多元醇量最高的 275 号酵母, 275 号酵母經方心芳鉴定为新种, 并定名为 *Hansenula arabitolgenes* Fang, 即产阿拉伯糖醇汉逊氏酵母。本文报导此酵母的发酵条件試驗結果。

一、材料及方法

菌种 *Hansenula arabitolgenes* Fang 275。

培养基 除特別标明者外, 通常使用培养基 III, 成分为: 葡萄糖 30%, 酵母汁 2% (按湿重, 含水量 73%), 尿素 0.2%, 15 磅蒸汽压 30 分灭菌。

发酵 通常用 500 毫升锥形瓶, 内装培养基 III 50 毫升, 在旋轉式搖床上进行发酵, 轉速 180 轉/分, 偏心距 1.5 英寸, 温度 30℃。

分析方法 因 275 酵母产生之多元醇以阿拉伯糖醇为主, 仅含少量甘油, 故分析时多以总多元醇代表之, 总多元醇及残糖分析方法同前^[1]。甘油与阿拉伯糖醇分別用紙层析法测定, 展开及显色法与本实验室过去作法相同^[1], 展开后剪洗下来, 用过碘酸氧化加变色酸比色测定^[2], 用已知甘油同样操作后作标准曲线。每次测定均用已知甘油作为校正的标准。乙醇用微量扩散法测定^[3]。甘薯水解液及蔗糖則用蒽酮法测定总糖^[4]。在作搖瓶不同日数发酵的分析时, 同时接种数瓶, 每日取出一瓶作分析, 而不是由同一瓶取样分析。

二、結果及討論

1. 不同菌龄的接种物对发酵的影响

用液体培养 24、48 及 72 小时的菌种作为接种物, 发酵 4 日后分析多元醇及殘糖量。結果見表 1。由表 1 結果可知, 接种物以培养 24 小时的最好。故在以下試驗中均采用 24 小时的菌种。

2. 不同接种量对发酵的影响

液体培养 24 小时的菌种, 按发酵液体积的 2.5%、5%、10% 接种。发酵 1, 2 及 3 日

* 本文主要結果曾在 1960 年 1 月全国生物化学学术會議上提出报告, 摘要見該会資料第 59 号。
本文 1962 年 9 月 7 日收到。

表 1 不同菌龄的接种物对发酵的影响

种培养时间(小时)	24		48		72	
产物含量(%)	多元醇	残 糖	多元醇	残 糖	多元醇	残 糖
	9.04	0.43	7.76	0.40	5.60	0.29

表 2 不同接种量对发酵的影响

含 量 (%) 接种量(%)	1		2		3	
	多元醇	残 糖	多元醇	残 糖	多元醇	残 糖
2.5	1.20	16.86	4.30	8.80	6.65	4.50
5.0	0.90	15.88	4.32	8.66	6.24	5.06
10.0	1.20	16.24	4.48	8.54	7.46	2.34
20.0	2.08	15.72	5.08	8.38	7.32	2.82

后分析多元醇及残糖。结果见表 2。由表 2 结果看来,接种量的影响不大,以 10% 稍好。

3. 不同糖浓度对发酵的影响

耐高渗透压酵母可以发酵相当浓的糖液,为了找出发酵最适浓度,我们用 25%、30%、35% 及 40% 的糖作了发酵试验,每日分析多元醇及残糖,结果见图 1—4。

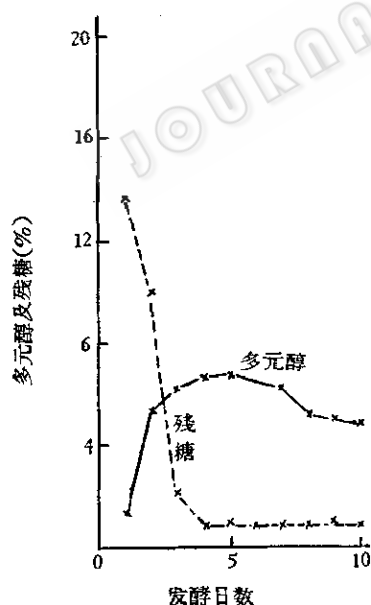


图 1 25% 葡萄糖发酵过程

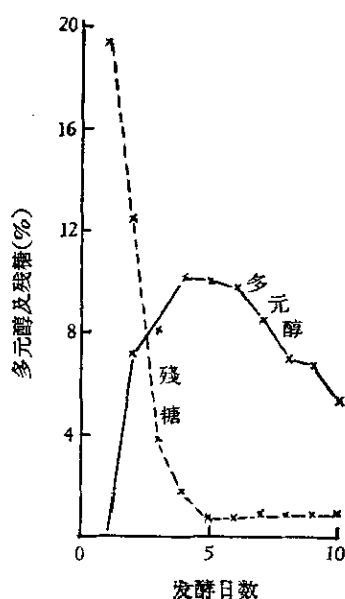


图 2 30% 葡萄糖发酵过程

由图 1—4 可知, 25% 的糖液经 4 日即可发酵完毕, 残糖降至 0.76%, 多元醇含量 6.72%, 对糖收率为 29% (按加入之糖计算), 继续发酵则多元醇降低。30% 的糖液发酵 4 日也接近完成, 多元醇含量 10.16%, 对糖收率为 33.9%。35% 及 40% 的糖液也能正常发酵, 但时间较长, 需 7 日, 多元醇的产量 (分别为 10.64%, 10.80%) 比 30% 者虽稍高一点,

但从对糖收率(分别为 30.4%, 27.0%)看来,则不及 30% 者。因此,糖浓度以 30% 最好。

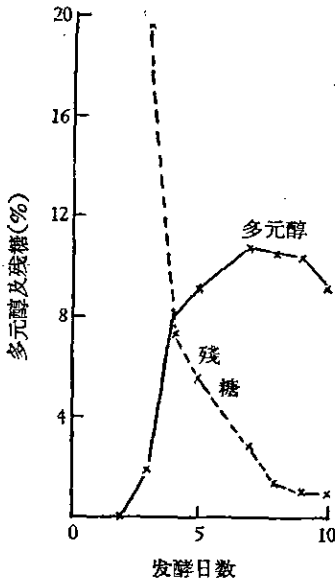


图3 35% 葡萄糖发酵过程

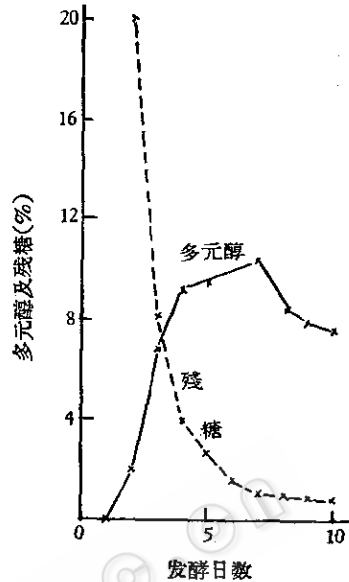


图4 40% 葡萄糖发酵过程

4. 温度的影响

因摇瓶发酵在 1 个恒温室中进行,不便改变温度。故用通气发酵进行温度试验。作了室温(约 20℃ 左右), 30℃ 及 35℃ 的比较。在 1 升的发酵瓶中装培养基 III 400 毫升。通气发酵 3 日。结果见表 3。

表 3 在不同温度通气发酵的比较

温 度 (℃)	甘 油		阿拉伯糖醇		乙 醇		残 糖
	含量(%)	收率(%)	含量(%)	收率(%)	含量(%)	收率(%)	含量(%)
室温(20 左右)	0.50	1.67	2.69	8.97	4.26	14.20	9.3
30	0.83	2.77	3.12	10.40	2.88	9.60	4.4
35	0.66	2.20	4.69	15.63	0.92	3.07	1.9

由表 3 结果可知, 35℃ 发酵快, 残糖低, 阿拉伯糖醇产量高; 30℃ 则残糖较高, 阿拉伯糖醇含量低。可能发酵 3 日是不够的。乙醇产量随温度增高而降低, 这可能与蒸发有很大关系。甘油产量均很低, 30℃ 稍好, 但差别不很明显。由此结果还可看出, 因通气发酵时通气不够充分, 故一般均较摇瓶发酵之多元醇产量低。

5. 不同糖类原料的发酵

用纯葡萄糖发酵固然很好, 但成本较高, 不适于工业生产, 故又用甘薯糖化液(酸糖化)及蔗糖(为用糖蜜发酵作准备)作了发酵试验。本试验是用通气发酵进行的, 在 2 升锥形瓶内加培养基 800 毫升。葡萄糖及蔗糖均为 30%, 甘薯糖化液含糖 18%。含尿素及酵母汁如前。接种量 5%, 在室温(20℃ 左右)通气发酵 4 日。结果见表 4。由表 4 可知, 蔗糖及甘薯糖化液也能正常发酵, 但甘薯糖化液含糖量低, 故阿拉伯糖醇含量低, 以后应设法获得较浓的甘薯糖化液才更有利。

表 4 不同糖类原料的发酵结果

产物量 糖种类	甘 油		阿 拉 伯 糖 醇		乙 醇		残 糖 含量(%)
	含量(%)	收率(%)	含量(%)	收率(%)	含量(%)	收率(%)	
葡萄糖(30%)	0.88	2.93	3.68	12.27	0.23	0.77	0.48
甘薯糖化液(15%)	0.59	3.93	1.80	12.00	0.25	1.66	1.29
蔗糖(30%)	0.46	1.53	2.88	9.60	3.91	13.03	1.83

6. 不同氮源对发酵的影响

用硫酸铵、硝酸铵、天门冬素、蛋白胨及尿素为氮源,每个均用不同的量作试验,由其中选出最适量,再互相比。结果见图 5。

由图 5 可知,各种氮源均可利用,以尿素最好。

7. 酵母汁用量对发酵的影响

添加不同量的酵母汁对发酵有显著的影响,如图 6 所示。酵母汁用量在 0.125%—2% 之间时,多元醇及乙醇产量以及糖之利用随酵母汁用量增加而增加。酵母汁增加至 2.5% 时,多元醇产量下降,糖之利用也稍稍下降。

8. 通气量及磷酸盐含量对发酵的影响

不同通气量是靠改变摇瓶中的液体量来实现的。在 500 毫升锥形瓶中分别加入培养基 25、50、75 及 100 毫升。所有瓶塞用纱布及均匀厚度的棉花做成,尽量求其一致。在此条件下用 Cooper 氏^[5]亚硫酸盐氧化的方法测出氧溶解速度,此实验所用摇床与前不同,转速为 230 转/分。在不同通气量的情况下同时加入不同量的 Na_2HPO_4 使其最终浓度为 0.002—0.016M,培养基中原有的酵母汁所含之磷未计算在内(含磷 0.27%,按酵母湿重计算。酵母含水 73%)。培养 4 日,分析多元醇、酒精、酵母干重及残糖量,结果见表 5。由表 5 结果可知,通气量对发酵有明显的影

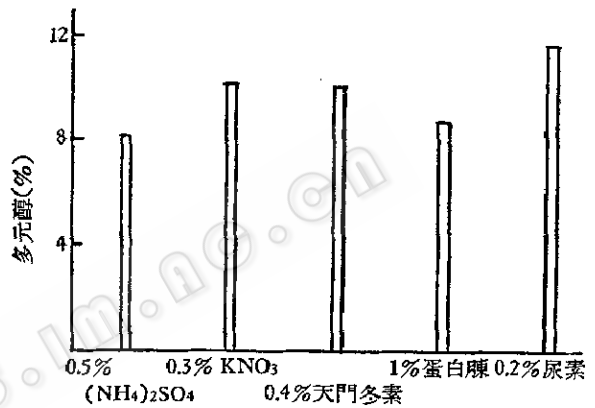


图 5 不同氮源对发酵的影响

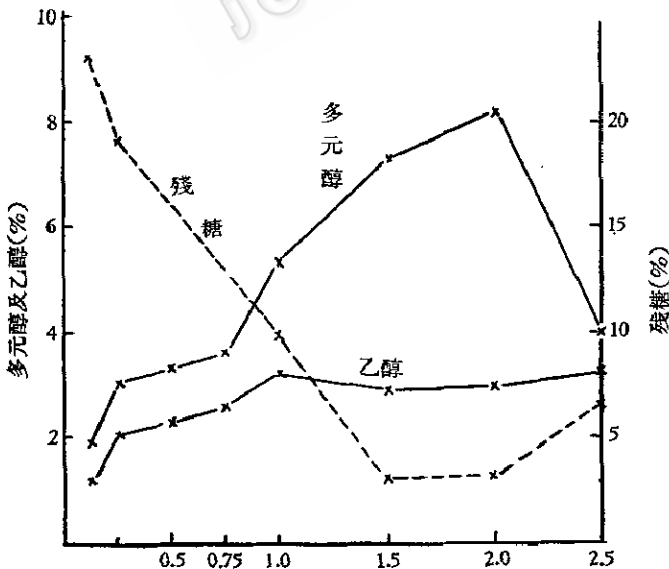


图 6 酵母汁用量% (按湿酵母重计算,含水 73%)

响,不加磷酸盐时,不同通气量对发酵的影响可以更清楚地由图 7 看出来,多元醇含量随通气量之增加而升高,发酵液体积为 50 毫升时达最高,25 毫升者表面看来稍有下降,但

由发酵过程曲线得知,当残糖下降后多元醇亦被利用而逐渐减少,可能在 25 毫升时多元醇又被利用掉,所以较少。乙醇含量则随通气量增加而降低。因设备条件关系,生成之乙醇未能全部收集,通气量大时,乙醇之蒸发也大,这也是造成所观察到的结果的原因之一。但通气量增加抑制乙醇生成(巴斯德效应)是一很普遍的现象,又我们另外进行了乙醇蒸发量的比较,发现蒸发不能引起象观察到的那样大的差别,通气量大时乙醇的生成可能也确实受到抑制。这与 Spencer^[6,7]等结果是一致的。残糖量随通气量之增加而降低,这与 Spencer 等^[6]的结果不同。可能我们的酵母氧化同化作用较强,在通气量大的情况耗糖量大。这与酵母生长情况正相符合。酵母干重随通气量增加而增加。磷酸盐含量对发酵无显著影响。这一点与 Spencer 等^[7]的结果不同。Spencer 等的结论为磷酸盐对多元醇之形成有抑制作用。这可能因所用酵母菌种不同而有不同结果。

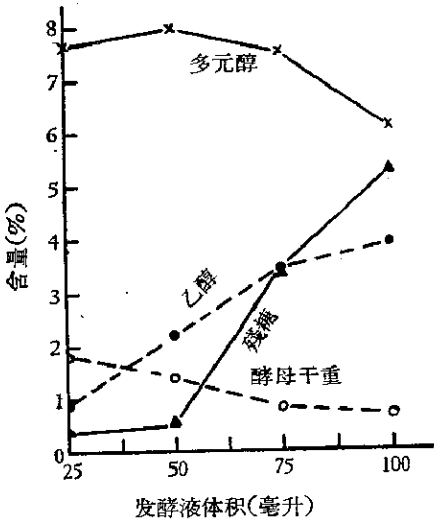


图 7 通气量对发酵的影响(不加磷酸盐)

表 5 通气量及磷酸盐对发酵的影响

发酵液成分分析(毫升)		加入 Na_2HPO_4 (M)	0	0.002	0.004	0.008	0.016
25(76)*	多元醇		7.68	6.16	6.08	6.21	6.01
	乙醇		0.92	0.52	0.35	0.76	0.65
	残糖		0.35	0.43	0.38	0.48	0.63
	酵母		1.83	1.73	1.60	1.65	1.62
50(41)*	多元醇		7.86	8.00	7.69	7.63	7.34
	乙醇		2.18	3.62	2.59	2.70	2.95
	残糖		0.43	1.30	0.88	0.90	0.69
	酵母		1.40	1.20	1.28	1.17	1.17
75(24)*	多元醇		7.63	7.03	7.33	7.49	6.87
	乙醇		3.76	3.53	3.46	3.19	3.34
	残糖		3.22	3.83	3.83	4.23	3.15
	酵母		0.82	0.89	0.82	0.79	0.81
100(16)*	多元醇		6.16	6.29	6.21	6.19	6.35
	乙醇		3.88	4.15	3.61	3.40	3.95
	残糖		5.35	5.68	5.82	5.75	5.32
	酵母		0.71	0.71	0.75	0.67	0.69

* 为氧溶解速度,毫克分子 O_2 /升/小时。

三、摘要

研究了 275 号酵母 (*Hansenula arabitoligenes* Fang) 产生多元醇的条件。在最适情况

下, 30% 的葡萄糖发酵 4 日可产生 10% 左右的多元醇(发酵液中浓度), 收率按加入糖计算为 33%。其中主要是阿拉伯糖醇, 发酵液中甘油浓度仅 1% 左右。

通气量对发酵有很大影响, 通气量增大时, 多元醇产量增加, 乙醇产量减少, 残糖低, 酵母重量增加。磷酸盐对发酵无显著影响。

参 考 文 献

- [1] 张树政、杨廉婉、王惠莲: 微生物学报, 8: 369—376, 1962。
- [2] Neish, A. C.: *Analytical Methods for Bacterial Fermentation*, Saskatoon p. 36, 1952.
- [3] Neish, A. C.: *ibid*, p. 47.
- [4] Neish, A. C.: *ibid*, p. 33.
- [5] Cooper, C. M., Fernström, G. A. and Miller, S. A.: 36: 504—509, 1944.
- [6] Spencer, J. F. T. and Sallans, H. R.: *Can. J. Microbiol.*, 2: 72—79, 1956.
- [7] Spencer, J. F. T., and Shu, Ping: *Can. J. Microbiol.*, 3: 559—67, 1957.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF GLYCEROL AND ARABITOL BY OSMOPHILIC YEASTS

II. ARABITOL PRODUCTION BY *HANSENULA ARABITOGENES* FANG

CHANG SHU-CHENG, YANG LIEN-WAN AND WANG HUI-LIEN

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

Factors affecting polyol production by osmophilic yeast *Hansenula arabitolgenes* Fang no. 275 were studied. Under optimum conditions, about 10% total polyols was produced from a 30% glucose medium after 4 days fermentation. The yield was 33% on the basis of added glucose. Arabitol was the main component and glycerol was only about 1%.

Aeration rates had much influence on the fermentation. More vigorous aeration increased the yields of polyols, the dry weights of yeast and the rate of sugar consumption, but decreased the yield of ethanol.