

嗜甲醇酵母的培养研究

朱相远 刘宝顺 董建忠

(北京市营养源研究所, 北京)

我国蕴藏有丰富的油、气和煤炭资源,皆可用于制造甲醇。而利用能以甲醇为唯一碳源的微生物来生产单细胞蛋白,是开发新的蛋白质资源的一条重要途径。目前,英国等已用细菌生产甲醇蛋白(Methanol-SCP)。1969年,日本学者Ogata^[3]发现酵母也能同化甲醇。由于酵母个体比细菌大,易于回收,核酸含量也比细菌低,日、美等国竞相开发利用酵母生产甲醇蛋白的技术^[2,4,5]本文介绍我们筛选的四株优良嗜

甲醇酵母菌株的培养试验结果。

材料与 方法

(一) 试验菌株

本所微生物室从10458个样品中分离出近千株能同化甲醇的酵母,经试管、摇瓶及2L发酵罐反复试验,筛选出下列4株优良菌株,作为本研究的试验菌株^[1]。

球拟酵母 Y-1015 (*Torulopsis rongsis* Lin

et Wang sp. nov. BF-1015)

球拟酵母 Y-70 (*Torulopsis beihai* Lin et Wang sp. nov. BF-70)

假丝酵母 Y-32 (*Candida* sp. BF-32)

假丝酵母 Y-1019 (*Candida* sp. BF-1019)

(二) 培养基(%)

(NH₄)₂SO₄ 3.0g, KH₂PO₄ 4.0g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4g, CaCl₂ · 2H₂O 10.0mg, FeSO₄ · 7H₂O 10.0mg, ZnSO₄ · 7H₂O 1.0mg, MnCl₂ · 4H₂O 1.0 mg, 维生素混合液 1.0 ml, 酵母膏 0.2g, 甲醇 5—10 ml, 加水到 1000 ml.

维生素混合液: 肌醇 20g, 维生素 B₁ 4g, 维生素 B₂ 4g, 烟酸 4g, 泛酸钙 4g, 对氨基苯甲酸 2g, 生物素 20 mg, 叶酸 20mg, 加无离子水到 1000 ml, 调 pH 至 4.5。甲醇在培养基灭菌后于无菌条件下加入。

(三) 摇瓶培养

往复式摇床, 振荡频率为 110 r/min, 冲程为 6cm, 500ml 摇瓶装液量为 50ml, 30℃ 下培养 36—48 小时。

(四) 温度梯度培养

采用日本产 TN-3 型温度梯度振荡培养器。每支培养管装液量为 5ml。甲醇浓度为 0.5—0.8% (v/v, 下同)。振荡频率为 80r/min, 在 10—45℃ 温度梯度下培养 24—36 小时。测定培养液 A 值, 观察温度对菌体生长的影响。

(五) 发酵罐培养

采用国产 2L 台式发酵罐和日本产 MD-250 型 2.6L 台式发酵罐进行间歇发酵试验。甲醇浓度 0.8%, 搅拌转速 600 r/min, 通气量 1v.v.m。在最适温度及最适 pH 条件下培养 26—32 小时。

采用日本产 MD-250 型 2.6 L 台式连续发酵罐进行连续培养。当菌体生长达到一定 A 值时, 开始连续培养, 通过输入泵调节进料速度, 从而控制稀释率。

(六) 分析

1. 菌体浓度及比增殖速度: 用国产 72 型分光光度计于 610 nm 处测定发酵液 A 值, 以此作为细胞浓度的相对值。

以 A 值对时间 (t) 作生长曲线, 计算世代时间 (Gt) 和比增殖速度 (μ)。

2. 细胞干重和收率: 发酵液用高速离心机在 8000 r/min 下离心 5 分钟, 用蒸馏水洗两次, 105℃ 烘干 24 小时, 计算干重。

根据投入甲醇的量计算收率。

3. pH: 用发酵罐上 pH 计或精密 pH 试纸测定。

4. 甲醇浓度: 用 SP 2305 型气相色谱仪测定。

5. 粗蛋白: 用凯氏定氮法测定样品含氮量, 计算出其粗蛋白含量。

结 果

(一) 不同甲醇浓度对生长的影响

对 Y-1015 菌株进行 8 种不同甲醇浓度 (0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 10.0%) 的摇瓶发酵试验, 于 30℃ 下振荡培养 48 小时, 分五次取样测定 A 值, 观察菌体生长情况。

结果表明: 甲醇浓度为 0.2 和 0.5% 时菌体生长最快, 但当培养液中的甲醇消耗尽时就不再生长。甲醇浓度为 1.0 和 1.5% 时, 菌体生长快, 且菌体浓度大。甲醇浓度为 2.0 和 4.0% 时, 菌体生长速度较慢, 6% 时更慢, 10.0% 时基本不能生长。

(二) 不同培养温度对生长的影响

对四株菌分别进行了温度梯度培养, 以观察温度对生长的影响。试验结果见图 1。表 1 总结了四株菌的可生长温度范围和最适温度。

表 1 试验菌株的最适生长温度和可生长温度范围

菌株	可生长温度范围(℃)	最适生长温度(℃)
Y-1015	20—40	29—33
Y-32	14—35	25—31
Y-70	15—37	27—31
Y-1019	16—32	27—29

(三) 不同起始 pH 对生长的影响

对四株菌进行了 pH 分别为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 的摇瓶发酵试验。于 30℃ 下振荡

培养 35—48 小时, 定时取样测 A 值, 并作出生长曲线。结果见表 2。

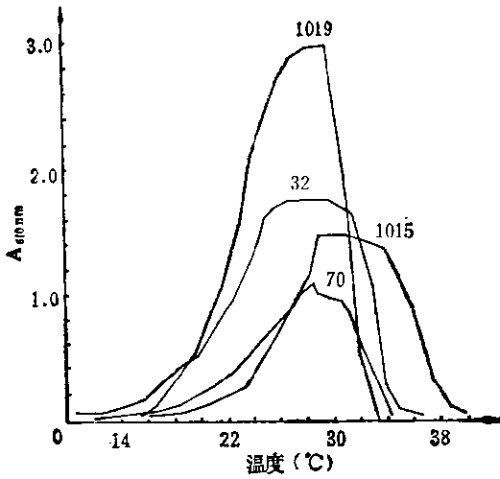


图 1 不同温度对生长的影响

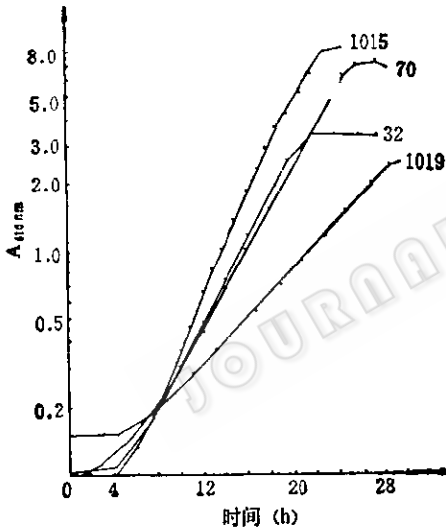


图 2 四株菌的生长曲线

表 2 试验菌株的最适起始 pH

菌株	最适起始 pH
Y-1015	4.0—6.0
Y-32	5.0—7.0
Y-70	5.0—7.0
Y-1019	3.0—5.0

(四) 发酵罐间歇培养试验

对四株菌进行了间歇培养, 定时取样测定发酵液 A 值。作出生长曲线, 计算出世代时间 (Gt), 并按下述公式计算出比增殖速度 (μ):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{\log_2^2}{Gt}$$

结果见图 2 及表 3

发酵结束后, 发酵液中甲醇残留量为 80—90 ppm, 酵母干细胞的粗蛋白含量, Y-1015、Y-32、Y-70、Y-1019 分别为 60.2%、55.3%、57.9% 和 53.4%。

表 3 试验菌株的 Gt 值与 μ 值

菌株	Gt(h)	$\mu(h^{-1})$
Y-1015	3.0	0.231
Y-32	3.2	0.216
Y-70	3.5	0.198
Y-1019	5.6	0.124

(五) 连续发酵研究

对 Y-1015 菌株进行了连续发酵研究。发酵条件为: 温度 32°C(自动控制), pH5.0(自动控制), 搅拌转速 600 r/min, 通气量 1v.v.m, 发酵开始时甲醇浓度为 1%, 发酵过程中, 流加甲醇, 使发酵液中甲醇浓度保持在 0.2—0.5% 左右。

发酵罐接种后, 首先培养 10 小时, 菌体生长进入对数生长期, 第 31 小时 A 值达到 12.0, 开始连续培养。在连续培养的最初 10 小时, 稀释率在 0.2 左右, 菌体浓度下降, A 值由 12.7 降为 5 左右。调节稀释率为 0.14 左右, A 值则稳定在 5—6 之间。

连续培养 145 小时后, 开始进行洗出试验。将稀释率调至 0.25, 经过 16 小时, A 值由 5.625 降到 0.815。

整个试验进行了 192 小时。

(六) 收率

1. Y-1015 菌株: 通过连续发酵试验计算菌体产量对甲醇的收率。

$$Y_{x/s} = \frac{F_{out} \cdot X}{F_{in} \cdot (S_0 - S)}$$

由于: $S_0 > S$

故

$$Y_{x/s} = \frac{F_{out} \cdot X}{F_{in} \cdot S_0}$$

式中: $Y_{x/s}$: 细胞对甲醇的收率(%)

F_{in} : 培养液输入速度(g/h)

F_{out} : 发酵液流出速度(g/h)

S_0 : 输入培养液中甲醇浓度(g/g)

S : 流出发酵液中甲醇浓度(g/g)

X : 流出发酵液中干细胞浓度(g/g)

在连续发酵第 124 小时测定: $F_{in} = 116.5$

$F_{out} = 110.0$, $S_0 = 0.78\%$, $X = 0.272\%$.

故

$$Y_{x/s} = \frac{110 \times 0.272\%}{116.5 \times 0.78\%} = 32.9\%.$$

2. Y-32、Y-70 和 Y-1019 菌株: 利用 MD-250 型 2.6L 台式发酵罐进行间歇发酵试验, 计算出菌体产量对甲醇的收率。

计算结果: Y-32、Y-70、Y-1019 菌株的收率各为 29.9%、22.1% 和 23.9%。

对近千株嗜甲醇酵母筛选结果表明, 上述 4 株菌有可能作为单细胞蛋白的开发资源菌, 尤以 Y-1015 为佳。

参 考 文 献

- [1] 林伯荃、汪锦邦: 《微生物学报》, 21(3): 278—283, 1981.
- [2] 日本三菱瓦斯的甲醇蛋白技术, 《甲醇蛋白—微生物学与生物技术》, 251—263, 科学技术文献出版社, 1982.
- [3] Ogata, O.: *Agr. Biol. Chem.*, 33(10): 1519—1520, 1969.
- [4] Levine, D. W. and C. L. Cooney: *Appl. Microbiol.*, 26(6): 982—990, 1973.
- [5] Urakami Teizi et al.: *J. Ferment. Technol.*, 61(3): 221—231, 1983.