耐高渗透压酵母发酵法生产甘油的研究

无锡轻工业学院 无锡酶制剂厂

甘油是国防、化工、医药、食品的重要原料。随着工业的迅速发展,甘油的需要量日趋增加。在第一次世界大战前,甘油全部是从天然油脂皂化和水解得来。第一次世界大战中开始研究并建立了用亚硫酸盐法糖质原料发酵甘油的工厂。但因发酵和提炼工艺不合理,不经济,战后都停产了。从五十年代后合成甘油工厂才开始陆续建立。六十年代前后,发酵法甘油的研究又开始活跃。除继续对亚硫酸盐法进行研究外^[1],对具有更多优点的耐高渗透压酵母发酵法研究得更为广泛。但据资料记载,主要还停留在实验室研究阶段^[2-7]。根据国家需要,最近二年,我们对淀粉质原料耐高渗透压酵母发酵法生产甘油进行较为系统的研究,并在无锡酶制剂厂进行试验生产。本文简述该研究的概况。

材 料 和 方 法

一、采样 为了分离耐高渗透压酵母,采集的样品有蜜饯、甜果、花蜜、蜂蜜、甜汁,常有糖类物质流经和贮积的土壤和有高浓度排泄物流经的排水道淤积物等。

二、培养基 除特殊标明外,实验室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%(W/V)尿素,初始pH值3.5—4.0。酶法葡萄糖含量:样筛培养基为40%;摇瓶培养基为25%;种子培养基为10%;斜面培养基为20%,另加2%琼脂。发酵罐发酵培养液为20%,并加入使培养液含总磷量为120—130微克/毫升的玉米浆和0.2%(W/V)尿素,初始pH值为4.0。

三、灭菌条件 除固体培养基和种子培养基用0.8公斤/厘米²蒸汽灭菌20分钟外,摇瓶培养基只煮沸灭菌,所用三角瓶先经160℃干热灭菌二小时。发酵罐采用1公斤/厘米²蒸汽实罐灭菌20分钟。

四、培养条件 发酵温度32—35℃,接种量5—10%(V/V),振荡培养往复次数140次/分钟,振幅3.5厘米,500毫升三角瓶装液量为50毫升,开口发酵。3,000升发酵罐搅拌速度235转/分钟,通风量1:0.5—0.8,装液量为罐容积50—60%,也可达70%。

五、菌种分离和筛选 样筛后划线分离。菌落挑入斜面培养二天,接入摇瓶培养5—6天。发酵液离心除去酵母,纸层析粗测甘油含量,择优复筛,并用变色酸比色法定量测定发酵液甘油和残糖含量,直至筛得优良菌株。

六、分析方法 鉴于开口振荡发酵有较多水分蒸发,测定pH值后加水恢复原体积。pH值采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分钟定其酵母沉淀体积。糖量测定用蒽酮法^[8]。发酵液甘油测定用变色酸比色法^[7],成品测定用比重法。总磷用钼蓝比色法^[8]。总氮用凯氏定氮法^[8]。纸层析溶剂系统为正丁醇:乙醇:水=98:5:18。

结 果 和 讨 论

一、菌种筛选 根据耐高渗透压酵母生理

本文1973年6月12日收到。

类型的特点及地区性微生物种类的差异,在我国南方地区采集各种样品四百余种,分离初筛了二千余株各种耐高渗透压酵母,现摘录具代表性菌株的特性列于表1。

表1 部分筛得菌株特性

菌号	纸层析情况			残糖 %	多元醇 %	总糖转 化率 %
	甘油	阿糖醇	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	++++	-	-	2.4	5.8	25.0
110	++	+	+	3.2	8.5	33.0

从表1可以看到,所筛的耐高渗透压酵母多数能产生甘油和阿糖醇,少数只单产阿糖醇或甘油,还有少数能产甘油、阿糖醇和赤藓糖醇。根据多次重复试验,71-B号单产甘油,但得率较低,发酵条件较难控制。而从广东汕头地区采集的蜜饯上分离得到的61-4菌株甘油得率高,阿糖醇极少,发酵结果稳定。故将61-4菌株作进一步试验,并进行了多次自然选择,结果获得了目前生产上应用的较优菌株61-4-A₈。在适当条件下,其总糖转化率稳定在45%以上,发酵液甘油含量稳定在10—13%。

二、影响发酵主要因素的摇瓶试验 通过大量试验,证明在多种因素中,影响发酵效果的主要因素是培养基中的总磷量。从图1可以看出,在摇瓶试验含糖25%时,总磷量

图1 培养基含的总磷量对发酵的影响

(玉米浆为磷源)为60—75微克/毫升时糖的转化率最高,为41—48.5%,以耗糖转化率计,达到51—55%。若总磷量低于最适量,则残糖增加,发酵迟缓,总糖转化率低。若总磷量高于最适量,耗糖加快,产生酯香味和大量酵母菌体,总糖转化率大幅度下降。与最适磷量相差越大,发酵效果就越差。在以酵母膏、玉米浆、无机磷为唯一磷源进行发酵试验时,表明对酶法葡萄糖液为碳源时,发酵效果与磷源无关,而仅与总磷量有关。当起始糖浓度较25%或高或低时,最适磷量即随糖浓度的加大而增高。例如糖浓度为16.8%时,最适磷量是51微克/毫升,而糖浓度为30.8%时,最适磷量则上升为78.5微克/毫升。另外,就是培养液中总氮量有增减时,对最适磷量也有一定影响,N/P一般在19—25较合适。特别要指出的是,通风效果对最适磷量有重要影响。例如在发酵生产中,采用一般搅拌型密闭发酵罐时,最适磷量则为120—130微克/毫升。

三、三千公升发酵罐瓜干直接酶法糖液发酵试验生产

1. 工艺流程(见下页)
2. 发酵全过程概况

图2 三千公升罐发酵全过程概况

从图2可以观察到:在整个发酵过程中,发酵液的酵母量前32小时是逐渐增加的。但当酵母量达到4%左右,就基本成为

一个动平衡。pH 值虽有微小波动,但全过程基本在 4—5 之间。而糖的消耗与甘油的积累则有一个准量关系。一般是耗 2 度糖,生成 1 度甘油,但我们的实验有时超过 Hajny 等提出的发酵甘油最高理论转化率为耗糖的 50% 的推论,当发酵末期残糖量低于 1% 时,这时必须及时放罐,否则有消耗甘油的可能。

在采用典型的通气间歇发酵试验外,我们还进行了回收酵母作大接种量开口发酵及用鼓风机代替压缩机通风的试验,也收到了良好的效果。

3. 甘油成品的提炼

各 工 序 收 率 %					总收率 %	产品质量*
发酵液 过滤	净化	浓缩	蒸馏	脱色 蒸发		
96.9	99.0	96.8	84.6	93.0	71.8	符合部颁甲级 工业甘油标准

* 承苏州肥皂厂协助化验。

上列数据为四批生产数据的平均值。

由于原料不同,酶制剂中的杂质以及发酵过程中代谢产物的形成,导致最终发酵液成分很复杂。特别当发酵液中残糖量增高,就会严重影响成品的总收率和质量,故必须采取相应的净化程序。由于蒸馏后甘油有一定色泽,所以尚需用脱色树脂进行脱色。这些是与其他甘油生产方法不同的。

结 论

经过定向选育获得一株经鉴定为 *Candida* sp. 编号为 61-4-A₈ 的产甘油耐高渗透压酵母。经过三千公升发酵罐多批生产试验,当山芋粉酶法制糖的得率在 54% 以上,发酵液原始糖量为 20% 左右,总磷量为 120—130 微克/毫升,发酵 5—6 天,甘油含量可稳定在 8.5 克/100 毫升,总糖转化率平均达到 41%,提炼总收率平均为 72.2%,每吨甘油耗瓜干 6 吨左右,质量符合甲级工业甘油标准。鉴于发酵操作简单,不易染菌,设备要求不高等特点,发酵和提炼均较稳定。这条工艺路线是可行的。若生产规模适当扩大,进一步选育菌种,改进工艺,注意菌体综合利用,则在经济效益上可以与其他甘油生产方法相比。

参 考 文 献

- [1] Hairis, J. E. & Hajny, G. J., 1960 *J. Biochem. and Microbiol. Technol. Eng.*, **12**, 9—24.
- [2] 大西博, 1962 日本特许公报, 昭 37-12450.
- [3] 大西博, 1962 日本特许公报, 昭 37-3545.
- [4] 大西博, 1964 日本特许公报, 昭 39-27497.
- [5] Button, D. K., Garver, J. C. & Hajny, G. J., 1966 *J. Appl. Microbiol.*, **14**, 292—294.
- [6] 张树政、杨廉婉、王惠莲, 1962 微生物学报, **8**, 369—376.
- [7] Marguerite Lambert & Neish, A. C., 1950 *Can. J. Res.*, **28**, 83—89.
- [8] 张宽厚, 1962 细菌生理学, 人民卫生出版社。