

⑩ 耐高渗透压酵母的甘油发酵研究： 63-67 II GW-11 菌株的发酵条件试验

李杰 林明德 罗先群

TQ923

(广西科学院生物研究所, 南宁 530003)

摘要 甘油是国防和民用工业的一种重要原料, 目前市场供需矛盾突出。耐高渗透压酵母发酵法制取甘油是解决这一供求矛盾的有希望的途径, 而高产菌株选育是该途径的基础。我组1987年从广西自然环境中筛选获得一株产甘油的菌种GW-11。本文是通过对该菌株的培养基组成及培养条件的试验, 以获得最佳发酵条件, 并对其甘油生产性状进行考察。结果表明: 优化发酵条件与原试验条件相比, 该菌发酵甘油产率由原8%提高到14.0%, 对糖转化率由原来的40%提高到46.7%。GW-11是一株具有潜在工业生产价值的耐高渗透压的甘油发酵生产菌株。

关键词 耐高渗透压酵母 甘油 发酵条件 II GW-11 菌株

前言

甘油是国防和民用工业的一种重要原料, 广泛用于炸药、塑料、橡胶、食品、制药、化妆品等多种行业。目前甘油的生产方法主要有三种: 一是从制皂工业的废液中回收甘油法; 二是合成法; 三是用微生物发酵法生产甘油。鉴于近年来合成洗涤剂工业的发展和制皂工业的原料紧缺, 故从制皂工业回收甘油的产量不足, 合成法又因成本、质量的问题, 不宜在制药、食品、化妆品等行业应用。所以, 通过微生物发酵法生产甘油是有望解决这一困难的有效途径。

我组于1987年从广西自然环境中筛选到一株耐高渗透压产甘油的菌株GW-11⁽¹⁾, 并通过一系列试验以摸索出该菌株的最佳培养条件, 考察其甘油的生产性状。

1 材料与方 法

1.1 菌株: GW-11为我组于1987年从广西自然环境中筛选获得的产甘油菌种⁽¹⁾。该菌株在基本培养条件下, 甘油产率为8%, 对糖转化率为40%。

1.2 基础培养条件:

1.2.1 种子培养基:

固体斜面: 葡萄糖20%, 酵母膏0.4%, 尿素0.2%, pH4.5, 琼脂1.5%, 分装斜面试管, 加棉塞, 112℃、20分钟灭菌, 摆放斜面。

液体摇瓶种子培养基: 固体斜面培养基省略琼脂。

1.2.2 发酵培养基: (略)

1.2.3 发酵基本条件:

于 500 ml 三角瓶, 装培养基 50 ml, 八层纱布加牛皮纸包扎, 灭菌、接种、32℃, 200 r/min 旋转式摇床培养 7 天。

1.3 分析方法:

发酵代谢产物定性分析采用纸层析法^[2]; 甘油含量测定采用改良的高碘酸钠快速测定法^[3], 残糖的测定采用蒽酮法^[4]。

2 结果

2.1 种龄、种量的选择:

表 1 培养时间对菌数的增长情况

培养时间 (小时)	4	8	10	12	16	20	24
菌数 (亿)	0.345	2.32	4.31	5.10	5.85	6.04	6.23

表 2 接种量对甘油产率的影响

接种量 (%)	5	10	15
甘油 (%) (7 天结果)	7.9	8.0	8.2

从以上结果看, 种子培养时间在 24 小时内菌数随时间的增长而增长, 10 ~ 12 小时已达到菌数为 5 亿左右, 处于对数生长期后期, 该时间定为种子适宜菌龄。而接种量在 5% ~ 15% 内对甘油产率影响不大, 故选取 10% 为宜。

2.2 温度、装量的选择

表 3 不同温度菌数增长情况

培养时间 (小时)	4	8	12	16	20	24
菌数 (亿)						
30℃	0.53	1.02	1.96	2.63	3.07	3.40
32℃	0.35	2.32	5.31	5.85	6.04	6.23
34℃	0.83	4.30	5.75	6.27	6.50	6.62

表 4 温度、装量对代谢产物的影响

处 理	温 度		装 量	
	32℃	34℃	30ml	60ml
甘油 % (6 天结果)	11.4	8.11	8.6	8.4

从表 3、表 4 结果看, 增加温度, 可加快菌体生长, 增加菌体数目, 而甘油产率反而降低, 可能是糖被消耗于加速生长和呼吸代谢加强之故。从表 4 可见装量在 30 ~ 60ml 无明显差异, 因此发酵宜选用温度为 32℃, 装量为 50ml。

2.3 利用正交试验法对培养基的选择

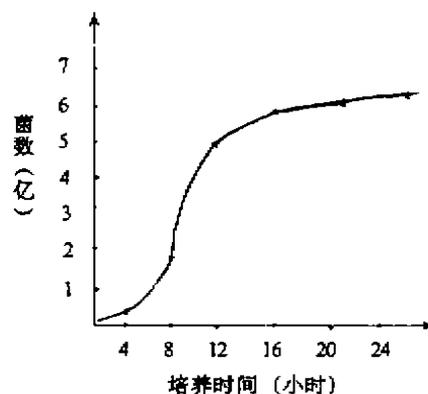


图 1 GW-11 菌体生长曲线

采用四因子三水平的正交表 $L_9(3^4)^{[5]}$, 对碳源用量、氮源的组成及配比, 超始 pH 值进行试验, 以确定各因子对甘油产率的影响。具体设计如下:

表 5 $L_9(3^4)$ 因子水平表 *

因子 \ 水平	1	2	3
A 葡萄糖 (%)	30	23.8	20
B 酵母膏 (%)	0.6	0.48	0.4
C pH 值	5	4.5	4
D 尿素 (%)	0.4	0.28	0.1

*(a) 除试验内容之外的培养基成份同发酵培养基。

(b) 在因子的水平设计安排时先确定高低两限, 中间水平取两限之差 $\times 0.618$ 。

表 6 表头设计和试验结果

表头设计	A	B	C	D	试验结果 (%)				
列号	1	2	3	4	第一次	第二次	第三次	第四次	合计 y_i
1	1	1	1	1	7.6	7.7	9.0	9.6	33.9
2	1	2	2	2	7.3	9.5	9.5	8.1	34.4
3	1	3	3	3	8.8	7.0	9.0	7.7	32.5
4	2	1	2	3	1.6	2.9	2.9	1.6	9.0
5	2	2	3	1	8.0	8.4	8.5	9.0	33.9
6	2	3	1	2	8.1	9.1	8.3	8.9	34.4
7	3	1	3	2	2.5	1.9	5.9	2.7	13.0
8	3	2	1	3	2.6	1.5	4.3	4.7	13.1
9	3	3	2	1	9.7	7.4	7.4	7.2	31.7
I j	100.8	55.9	81.4	99.5	$G = \sum_{i=1}^9 Y_i = 235.9$				
II j	77.3	81.4	75.1	81.8	$CT = G^2/9m = 1545.80 \quad (m=4)$				
III j	57.8	98.6	79.4	54.6	$S_{\text{总}} = \sum Y_i^2/m - CT = 241.17 \quad f=8$				
$R_j^2 = I_j^2 + II_j^2 + III_j^2$	19476.77	19472.73	18570.33	19572.65	$S_{\text{总}} = \sum_{i=1}^{34} Y_i - CT = 273.81 \quad f=35$				
$R_j^2/3m$	1623.06	1622.72	1547.52	1631.05	$S_{\text{总}} = S_{\text{总}} - S_{\text{总}} = 32.64 \quad f=27$				
$S_j = R_j^2/3m - CT$	77.26	76.93	1.73	85.25					

表 7 方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 比	显著性
A	77.26	2	38.63	31.93	*
B	76.93	2	38.47	31.79	*
C	1.73	2	0.87	0.72	
D	85.25	2	42.63	35.23	*
E	32.64	27	1.21		

* $F_{0.05}(2, 27) = 19.5$

2.3.1 数据分析表明:

2.3.1.1 从表 6 的 Si 值的分析可知四因素对甘油发酵产率的影响为: 尿素添加量 > 葡萄糖量 > 酵母膏量 > 起始 pH 值。根据表 7 的 T 测验结果表明前三个因素对甘油产率有显著的影响, 而起始 PH 对甘油产率无明显的影响。

2.3.1.2 从表 6 对于尿素、葡萄糖、酵母膏三因素各水平对甘油产率的影响来看, 甘油产率随试验中尿素和葡萄糖的含量增加而增加, 相反随酵母膏含量的增加而降低, 对后者的原因需作进一步试验探索。

2.3.1.3 从酵母膏含量对甘油产率的影响看, 拟取 0.4% 为好, 但在实际试验中发现酵母膏含量低会带来糖耗减慢、残糖偏高、周期拉长, 综合考虑以选用 0.5% 用量为宜。

2.3.1.4 综合上述各点, 优化的培养基组成为: 葡萄糖 30%, 酵母膏 0.5%, 尿素 0.4%, pH4.5。

2.4 优化后的综合培养条件试验

由以上试验获得之最佳配方的基础上进一步试验, 获得新的适宜配方及培养条件如下: 葡萄糖 30%, 酵母膏 0.5%, 尿素 0.3%, pH4.5。

装量为 50ml 培养基/500ml 三角烧瓶, 种龄为 10 ~ 12 小时, 接种量 10%, 32 °C 摇瓶培养 7 天。结果如下:

表 8 最適配方試驗結果

培养周期 (天)	4	5	6	7
残糖 (%)	14.0	10.4	7.0	5.4
甘油 (%)	9.0	10.5	12.1	14.0
总糖转化率 (%)	30	35	40.3	46.7

从结果看, GW-11 经摇瓶发酵培养 7 天, 甘油产率达 14.0%, 总糖转化率达 46.7%。

3 讨论

Bunker^[6] 在论述高渗酵母多元醇发酵时指出“多元醇的产量随无机磷浓度的增加而减少”。在我们的试验中也看到, 甘油产率与尿素浓度呈正相关, 与酵母膏浓度呈负相关, 且据计算酵母膏浓度增加只引起菌体生长量增加 18%, 但对甘油产率的影响达 76%, 这是否提示了酵母膏对甘油发酵的影响主要不是由有机氮源所引起菌体生长量的变化而产生的, 而在于氮源以外的成份对代谢的影响, 不能不考虑到磷对甘油发酵的影响, 宜作进一步的探索。

耐高渗酵母发酵法生产甘油的研究近年来在国内外得到广泛的注意^[6,7]。但从研究规模看, 仍属小试和中试阶段, 未见有工业化生产的报导; 而从发酵水平看, 甘油产率为 8%~12%, 总糖转化率在 35%~50%。目前我们分离筛选到的菌株 GW-11, 未作任何诱变处理, 仅作一些纯化和发酵条件试验, 甘油产率已达 14.0%, 总糖转化率达 46.7%, 具有相当不错的甘油生产性状, 如对菌种特性、诱变育种、发酵条件再作深入的试验和研究, 是一株有希望成为甘油发酵工业化生产的高产菌株。

4 主要参考文献

- 1 耐高渗透压甘油的酵母菌 GW-11 的分离、选育。
- 2 有机分析, 陈耀祖编著, 1981
- 3 化学分离与测定, 分析化学的理论与实践 (第一部分), 1979, D.G. Peters, T.M. Hayes, G.M. Hieftje 著, 刘书田译。
- 4 食品分析, 轻工业出版社, 1985
- 5 正交试验设计法, 上海科学技术出版社, 1979。
- 6 Bunker, H.J. *Ind. Microbiol.*, 1961 (3): 1-41
- 7 应用微生物, 1988 (3): 7-10

Study on Glycerol Fermentation of Osmotolerant Yeasts: the Fermentive Conditions Test of Strain GW-11

Li Jie Lin Minde Luo Xianqun
(Institute of Biology, Academia Guangxi, China)

Abstract Glycerol is an important raw material of national defence and civil industry. Nowadays, the supply of glycerol is unable to meet the demand. Production of glycerol by osmotolerant yeasts provide a promising method to solve this problem. Selecting of high-yield strains of osmotolerant yeasts are the foundation of this method. Our laboratory obtained a high-yielding strain GW-11 in 1987 from Guangxi. This article introduces the experiment for obtaining the optimal fermentive conditions by cultivating this strain in different media and different cultivating conditions, the glycerol production characteristics of this strain is also observed. The results demonstrated that: compared with the original, the yield rate of glycerol of the strain in the improved fermentation conditions increase to 14.0% from 8.0%, and the conversion rate of saccharide increase to 46.7% from 40.0%. The strain GW-11 has potential value of industrial production of glycerol.

Key words Glycerol, Osmotolerant yeasts, Fermentation.