

# 纤维素酶水解糠醛渣生产酵母

## II. 糠醛渣酶解液培养酵母\*

中国科学院微生物研究所  
北京日用化学二厂 纤维素酶研究小组(北京)

从 82 株不同种属酵母中选得 3 株酵母, 它们能较好地利用纤维素酶水解糠醛渣所产生的糖液。其菌名和编号是假丝酵母(*Candida* sp.) AS 2.121, 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) AS 2.637 和产朊假丝酵母(*Candida utilis*) AS 2.1180。

培养基糖浓度以 1.5% 或 2.0% 较好, 这与原始酶解液的糖浓度及其中糠醛等有毒物质有关。最好将原始酶解液稀释一倍以上使用。另外补加相当于含糖量 7.5% 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5% 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 2.5% 的尿素。起始 pH 以 5 较好。三株菌的最适生长温度略有差异, AS 2.121 为 28—32°C, AS 2.637 为 28—37°C, AS 2.1180 为 30—35°C, 但最适生长温度范围均较广, 在生产上较易控制。在 250 毫升三角瓶中装培养基 50 毫升, 接种酵母后在旋转摇床 (170 转/分) 上, 于 28°C 培养 40—48 小时。

AS 2.121 菌株之菌体产率高且稳定, 常达 50%; AS 2.637 菌株较耐高温, 菌体产率亦可高达 50% 左右; AS 2.1180 菌株在摇瓶培养条件下菌体产率较低, 为 40—45%, 且较不稳定, 可能和培养基 pH 值的控制有关。

纤维素酶的研究国内外报道的很多, 近年来国外也考虑到废纤维素材料的酶糖化和利用<sup>[1]</sup>。利用非粮食原料烃化合物及工业三废生产酵母是个方向, 得到很多国家的重视<sup>[2,3]</sup>。在我国由啤酒生产回收酵母数量很有限, 利用淀粉糖化或糖蜜作为原料生产酵母, 不能满足要求。因此, 我们试图利用纤维素酶水解糠醛废渣获得糖液培养酵母。本工作的目的是选择能够很好地利用该糖液的酵母和适宜的培养条件, 以提供食用和饲料蛋白, 或综合利用提取核酸等。本文报道酵母菌的选择和摇瓶培养条件的研究结果。

### 材料和方法

**菌种** 由本所保藏组供给。

**糖液** 纤维素酶水解糠醛废渣获得的糖

液<sup>[4]</sup>。

**摇瓶培养** 摇瓶培养基是将纤维素酶水解糠醛废渣获得的糖液稀释至 1.5%, 补加含糖量 7.5% 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 含糖量 5% 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和含糖量 2.5% 的尿素, 调至 pH 5。250 毫升三角瓶每瓶装 50 毫升培养基, 15 磅 30 分钟灭菌。将用麦芽汁斜面 28°C 培养三天的培养物, 加无菌水 5 毫升, 制成菌悬液, 每个三角瓶加 1 毫升, 28°C 旋转式摇床 (170 次/分) 培养 40 小时。初筛及试验初期个别试验, 系用表 2 中的 1 号培养基和培养条件。

**产物分析** 50 毫升培养物用 G5 耐酸漏斗过滤, 菌体用蒸馏水洗三次, 酒精洗二次, 105°C 烘干 3 小时称重。通常以 100 毫升培养物的酵母干重表示, 并以培养基的含糖量计算产率。培养滤

本文于 1976 年 2 月 12 日收到。

\* 方心芳同志对本工作提供了宝贵意见, 并协助鉴定了酵母菌。

液用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[1]</sup>测残糖。

**糖的纸层分析** 展开剂是正丁醇:吡啶:水=6:4:3,显色剂是苯胺,二苯胺<sup>[6]</sup>。

**糖醛分析** 糖醛渣 10 克,用 150 毫升乙醚提取,37℃ 水浴蒸馏至干,加水定容至 100 毫升,取 20 毫升用溴化法<sup>[7]</sup>测定糖醛含量。

结 果

(一) 菌种筛选

我们挑选了国内外的啤酒生产菌、面包酵母、以及我所分离出的一些啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)共 40 株。食用、饲料酵母有产阮假丝酵母 8 株,热带假丝酵母 15 株,白地霉(*Geotrichum candidum*) 3 株,东北德巴力氏酵母(*Debaryomyces mandshuricus*) 2 株以及三株最初未定种名的假丝酵母(*Candida* sp.)等共 82 株。对这些菌利用纤维素酶水解糖醛渣所得糖液

的能力进行了比较。经过初筛,由各种属中选出一些产率较高的菌进行了复筛(见表 1)。

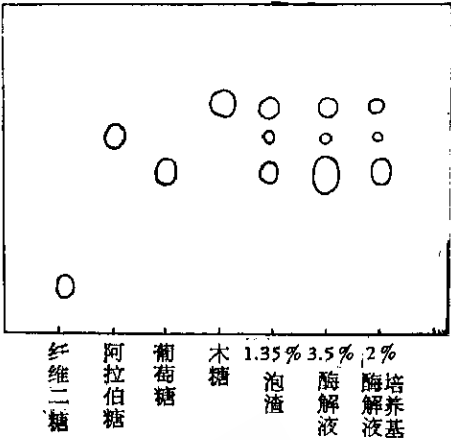


图 1 糖醛渣糖液的纸谱分析结果

根据糖醛渣糖液的纸谱分析(图 1),证明糖醛废渣本身残存的糖,即水浸泡渣所得的糖液含糖量为 1.35—1.75%,其中

表 1 酵母菌在酶解液中生物量的比较

菌号	菌 名	I 号		II 号	
		干物重 (克/100毫升)	产率**(% )	干物重 (克/100毫升)	产率(% )
AS 2.121	<i>Candida</i> sp.	0.91	45.5	0.79	52.6
AS 2.637	<i>Candida tropicaalis</i>	0.82	41.0	0.77	51.4
AS 2.1376	<i>Candida tropicaalis</i>	0.81	40.5	0.70	46.7
AS 2.281	<i>Candida utilis</i>	0.64	32.0	0.63	42.0
AS 2.1180	<i>Candida utilis</i>	0.69	34.5	0.63	42.0
AS 2.33	<i>Debaryomyces mandshuricus</i>	0.79	39.5	0.54	36.0
AS 2.498	<i>Geotrichum candidum</i>	0.71	35.5	0.56	37.4
AS 2.1035	<i>Geotrichum candidum</i>	0.70	35.0	0.64	42.6
AS 2.1042	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.69	34.5	0.49	32.7
AS 2.1190	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.63	31.5	0.44	29.4
AS 2.270	<i>Torulopsis candida</i>	0.91	45.5	0.65	43.4

\* 培养基

I 号

II 号

稀释酶解液 1000 毫升

稀释酶解液 1000 毫升

糖量

20 克

15 克

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

2 克

1.125 克

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 克

0.75 克

尿素

0

0.375 克

28℃ 旋转摇床培养

48 小时

40 小时

\*\*  $\frac{100\text{毫升培养物中酵母干重(克数)}}{100\text{毫升培养基中还原糖含量(克数)}} \times 100 = \text{产率}(\%)$

以葡萄糖为主,还有相当数量的木糖,约占 0.5%,并有极微量的阿拉伯糖。酶解糖液浓度为 3—4%,主要是增加了葡萄糖,其他糖类都是泡渣中带进去的。所以说,由纤维素酶水解糠醛废渣的终产物几乎全是葡萄糖,但实际上糖液中还含有一定数量的五碳糖。因此用能同化五碳糖的菌产率就能提高。此外酶解液中还有某些毒害因子如糠醛等影响某些种属酵母菌的生长。经过筛选,选出产率最高的假丝酵母 AS 2.121 作进一步研究,同时对食用、饲料方面经常被选用的产朊假丝酵母 AS 2.1180 和热带假丝酵母 AS 2.637 进行培养条件的研究。

## (二) 糖浓度对 AS2.121 生长的影响

纤维素酶水解糠醛渣所得之糖液,其含糖浓度一般在 3—4% 之间,这些糖能否被充分利用,除了酵母能利用不同碳源的本能之外,由于受到其他各种因素的影响,糖浓度的高低不仅直接影响到生物量的高低,而且在生产上还得考虑产率的多少。实验结果表明(见表 2),虽然以 3% 糖浓度的生物量最高,但初期生长缓慢,残糖较高,而原料利用率即产率则低。相反,糖液浓度越低,产率越高,0.5% 糖浓度时产率可达 70% 以上,与 Singh<sup>[8]</sup> 在最适通气和搅拌条件下所得之产率相似。但糖浓度太低,单罐利用率较低,因此,我们采用

表 2 糖浓度对 AS 2.121 生长的影响

糖浓度(%)	培养时间(小时)	酵母干重 (克/100毫升)	残糖(%)	培养终了 pH	产率(%)
0.5	24	0.38	0.04	4.7	76.0
1.0	24	0.57	0.08	4.3	57.0
2.0	24	0.46	0.40	4.0	23.0
3.0	24	0.44	1.62	4.2	14.7
4.0	24	0.35	3.19	4.3	8.8
0.5	48	0.38	0	4.8	76.0
1.0	48	0.67	0.02	4.4	67.0
2.0	48	0.90	0.08	4.1	45.0
3.0	48	0.97	0.20	4.1	32.4
4.0	48	0.82	0.46	4.2	20.5
0.5	72	0.32	0	4.8	64.0
1.0	72	0.59	0.03	4.6	59.0
2.0	72	0.99	0.09	4.4	49.5
3.0	72	1.10	0.18	4.1	36.6
4.0	72	1.18	0.28	4.2	29.6

1—2% 的糖浓度,即能得到 50% 左右的产率,又能获得较多的干物质。

## (三) 糠醛对酵母生长的影响

由于不同批次的酶解液糖浓度不同,因此,所配成的糖浓度相同的培养基,其糖液稀释度则不同,因而其中含有的毒害物的浓度就不同。据报道<sup>[9]</sup>糠醛对酵母细胞色素系统有影响。根据我们的实验分析,

糠醛渣中含有 0.8—1% 糠醛。为了解糠醛对酵母生长的影响,我们用碳源同化试验合成培养基<sup>[10]</sup>添加不同量的糠醛,试验了它的毒害范围,试验结果(表 3),AS 2.121 和 AS2.1180 对糠醛有一定耐力,糠醛含量在 0.075% 以下无影响,而当糠醛含量增加时,显然对酵母生长有抑制作用,随糠醛含量的增加,酵母干重逐渐降低,当糠醛含量

达 0.3% 时, 对 AS2.121 几乎全部抑制, 相对百分数只有 5.3%。糠醛对 AS2.637 的影响, 在有极微量的糠醛存在时, 生物量就直线下降, 而后下降则较缓慢。按废渣中含 0.8—1% 糠醛计, 15% 废渣的酶解

液含 0.12—0.15% 的糠醛, 因此, 糖液至少要稀释一倍才能对酵母生长无影响或减少影响。在实际应用时, 我们将酶解液糖浓度稀释至 1.5% 或 2%, 以去除糠醛对酵母的影响。

表 3 糠醛含量对酵母生长的影响

糠醛含量(%)	菌号	AS 2.121		AS 2.637		AS 2.1180	
		酵母干重 (克/100毫升)	相对百分数 (%)	酵母干重 (克/100毫升)	相对百分数 (%)	酵母干重 (克/100毫升)	相对百分数 (%)
0		0.57	100	0.71	100	0.51	100
0.05		0.57	100	0.53	74.6	0.51	100
0.075		0.57	100	0.47	66.2	0.52	102
0.1		0.47	82.5	0.42	59.1	0.43	84.3
0.2		0.28	49.2	0.37	52.1	0.44	86.4
0.3		0.03	5.3	0.30	42.2	0.40	78.5
0.5		0.01	1.8	0.20	29.6	0.06	11.8

(四) pH 对酵母生长的影响

用 NaOH 或 HCl 将培养基灭菌前的 pH 分别调至 3、4、4.5、5、5.5、6、7、8, 灭菌后 pH 低者变化不大, 但 pH7 和 8 者则分别降至 pH6.5 和 6.9。实验结果(图 2)指明, AS2.121 开始 pH 低于 4.5 则产率较低, pH5 以上产率略有增加, 但幅度很小, 因为酶解液 pH 恰好也在 pH5 左右, 所以采用 pH5 较理想而又经济。AS2.637 以 pH4—6

最好, pH 较高者产率略低, 这可能与其培养终了 pH 偏高有关。AS2.1180 也是 pH4 以下产率显著较低, 所以对三个菌株都可采用 pH5 作为起始 pH。若发酵罐培养期间 pH 低于 4 时, 可适当调整 pH。

(五) 温度对酵母生长的影响

为了解各菌的生长温度范围和最适温度, 我们采用麦芽汁斜面划线, 置于不同温度培养三天, 观察菌落生长情况。结果看

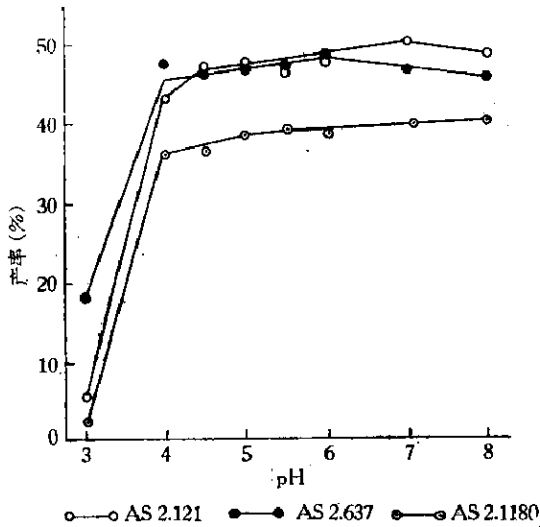


图 2 pH 对酵母生长的影响

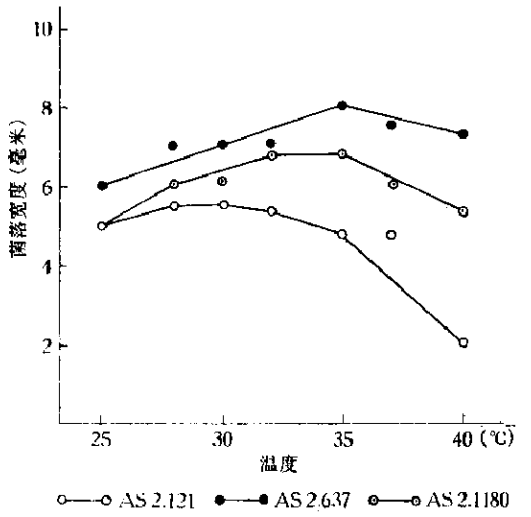


图 3 温度对酵母生长的影响

出,这几株酵母的适宜生长温度范围较广(图3),AS2.121的最适温度为28—32℃,35℃以上不利于菌的生长,37℃时虽然菌落宽度无明显减少,但菌生长很弱,菌落却褶皱;AS2.1180的最适温度为30—35℃,32℃左右生长最旺盛,菌体健壮,超过35℃菌落变得衰弱;AS 2.637的最适温度为28—37℃。

### (六) 酵母生长的动态

AS2.121 分别以 I 号和 II 号两种培养

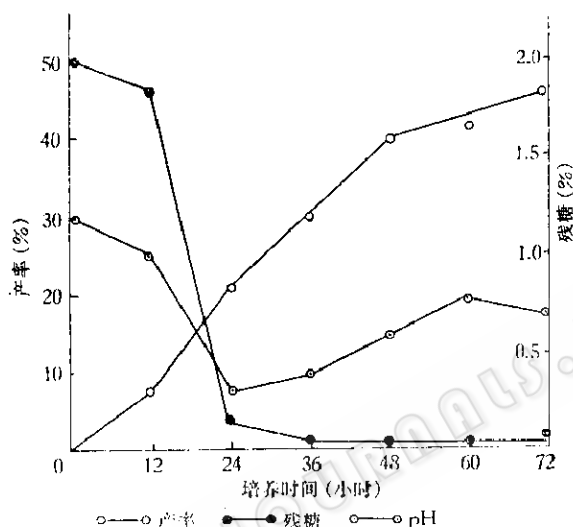


图4 AS2.121 生长动态(I号培养基)

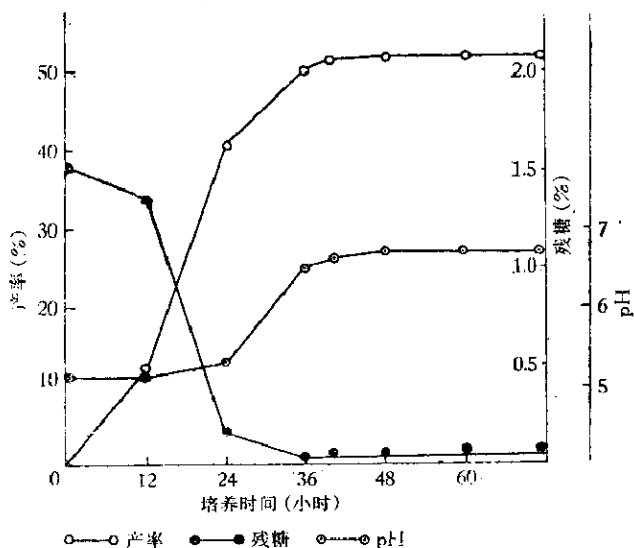


图5 AS2.121 生长动态(II号培养基)

基,培养不同时间取样进行分析。实验结果(图4、5)指出,I号培养基2%糖浓度者生物量达高峰需48小时,II号培养基1.5%糖浓度者只需40小时。一般情况是含糖量迅速下降后,pH回升时,生长已达高峰,I号培养基是用单一的硫酸铵作为氮源,pH先下降达到最低点4左右而又开始回升,pH在4.5左右生长已达高峰。II号培养基用硫酸铵和尿素为混合氮源,pH达6.7左右时生物量达高峰。AS2.1180

和AS2.637在1.5%糖浓度时也是40小时生物量达高峰。AS 2.637延长培养时间,生物量并不下降。AS 2.1180培养时间过长,生物量略有下降(图6、7)。这些规律不仅使我们确定摇瓶培养时间,而且给发酵罐培养提供有利指标,即残糖耗尽后pH回升时,产量即达高峰,可考虑放罐。用单一硫酸铵为氮源时,pH下降快,发酵罐培养期间,若pH下降至4时,中间需要加碱调整pH,而II号培养基用硫酸铵和尿素即生理酸性和生理碱性的混合氮源,菌体旺盛生长期间,pH变化小,中间不需调整pH。

## 讨 论

为了能够充分利用纤维素酶水解糠醛废渣所产生的糖液,根据酵母生理学的特性,我们首先考虑的是能广泛利用各种碳源的白色球拟酵母(*Torulopsis candida*)<sup>[11]</sup>。初筛时,白色球拟酵母AS2.270产率很高,接近50%,但经多次重复试验,发现产率不稳。尤其是在温度试验中发现该菌对温度特别敏感,最适温度偏低为25—28℃,30℃时生长就开始减缓,随着温度越高生长越

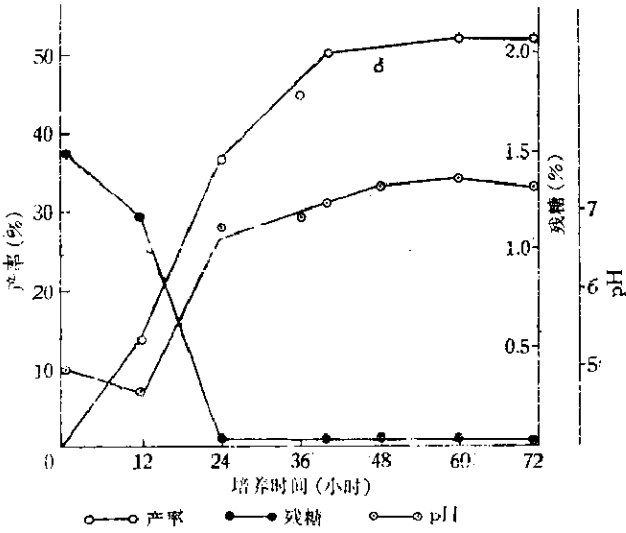


图6 AS2.637 生长动态(II号培养基)

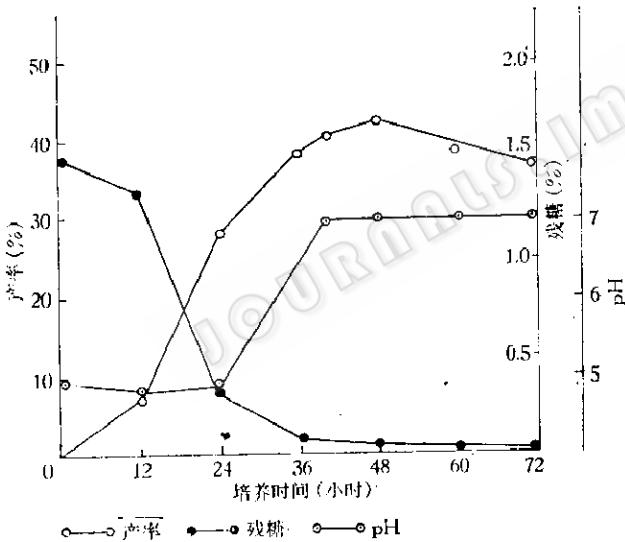


图7 AS2.1180 生长动态(II号培养基)

迟缓, 37℃ 即不生长。所以培养温度略有波动时便会影响产量, 因此这株菌不是理想的生产菌。

与此相反, 初筛中的一株未定种名的假丝酵母 AS2.121, 经多次试验结果稳定, 产率较高, 生长最适温度范围较广, 对糠醛有一定的抵抗性, 因此对酶解液的要求不苛刻, 是一株较有希望被采用的菌种。

在菌种筛选时, 我们曾考虑到, 糠

醛废渣酶解液和亚硫酸废液有些类似, 对后一种原料在美国和日本都用产朊假丝酵母<sup>[12-14]</sup>为生产菌, 在德国几个酵母厂用热带假丝酵母, 所以我们也注意了这两种菌的筛选。根据实验结果, 我们认为热带假丝酵母适合于我们现在的原料, 选出的 AS2.637, 多次试验产率在 50% 左右, 该菌生长泼辣易掌握。而产朊假丝酵母共试验了 8 株产率都不高, 一般为 40% 左右, 其中一株 AS2.1180 有时产率可达 45%, 产量不算太高, 可能是由于摇瓶中 pH 的影响, 有待在发酵罐中继续提高产率。

至于啤酒酵母, 虽然我们筛选的菌株最多有 40 株, 但产率都很低仅 12—38%, 选出的产率较高的啤酒酵母 AS2.1042 和 AS2.1190, 经条件试验, 如加大通气量, 补加玉米浆, 改用混合氮源, 加大糖液稀释度, 延长培养时间, 最高产率也只有 36%, 个别瓶次曾达 39%, 这不仅由于啤酒酵母不能利用泡渣中含有的少量五碳糖有关, 而且受其他原因影响, 如啤酒酵母对糠醛的抗性较差, 发酵过程中产酒等消耗糖, 所以尽管啤酒酵母蛋白质维生素含量高<sup>[15,16]</sup>, 菌体成分好, 但产率低, 对纤维素酶水解糠醛渣的糖液原料是不适合的。

### 参 考 资 料

- [1] Mandels, M. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 1471—1493, 1974.
- [2] 山田浩一: *醱酵协会誌*, 32: 1—10, 1974.
- [3] 七字三郎: *微生物工学の応用*, 共立出版株式会社, 东京, p. 154, 1972.
- [4] 中国科学院微生物研究所纤维素酶研究小组等: *微生物学报*, 17 (2), 1977 年.

- [5] Reese, E. T. and Mandels, M.: *Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. III Cellulose*, (ed. Whistler, R. L.) p. 141, Academic Press, New York and London, 1963.
- [6] Jeanes, A. et al.: *Anal. Chem.*, **23**: 415—420, 1951.
- [7] 江苏省轻化工业厅纤维水解研究所: 植物纤维水解生产, 燃料化学工业出版社, 北京, 第276页, 1974。
- [8] Singh, K. et al.: *Archs. Biochem. Biophys.*, **18**: 181—193, 1948.
- [9] Соболева, Г. А. и др.: *Микробиология*, **42**: 441—444, 1973.
- [10] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组: 《常见与常用真菌》, 科学出版社, 北京, 第270页, 1973。
- [11] Lodder, J.: *The Yeast, A Taxonomic Study*, (2nd and enlarged ed.) North-Holland. Amsterdam, p. 1250, 1970.
- [12] Peppler, H. J.: *The Yeasts, Vol. 3, Yeast Technology*, (ed. Rose, A. H. and Harrison, J. S.) Academic Press, New York and London, p. 421—426, 1970.
- [13] 木原利一郎, 三輪万治: 日本農芸化学会誌, **39**: 5—9, 1965。
- [14] 筒井芳男: 醱酵協会誌, **32**: 278—286, 1974。
- [15] 橋谷義孝: 酵母学, 岩波书店, 東京, p. 501—533, 1967。
- [16] 山田浩一: 近代工業化学, 23卷, 生物工業化学, (福本寿一郎ら編)。朝倉書店, 東京, 第三版, p. 251—302, 1974。

## YEAST PRODUCTION FROM CELLULASE HYDROLYZED FURFURAL INDUSTRIAL WASTE II. CONDITIONS FOR THE CULTIVATION OF YEAST

Cellulase Research Group, Institute of Microbiology, Academia Sinica and  
The Beijing Toilet Chemicals, Second Factory  
(Beijing)

Three yeast strains capable of better using the hydrolysate were screened out of 82 strains representing different genera and species. They are *Candida* sp. AS 2.121, *C. tropicalis* AS 2.637 and *C. utilis* AS 2.1180.

The hydrolysate with original concentration of 3—4% reducing sugar was harmful to the yeast growth due to the presence of some toxic substances (e.g. furfural) at high concentration. So it was essential to dilute the hydrolysate to a concentration of about 1.5—2.0% reducing sugar.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and urea should be added to the hydrolysate in a quan-

tity of 7.5%, 5% and 2.5% of hydrolysate-sugar content respectively. Each of 250 ml. Erlenmeyer's flask was filled with 50 ml. of medium, after inoculation, incubated on rotory shaker (170 r.p.m.) for 40—48 hrs. The optimal temperature was 28—32°C for AS 2.121, 28—37°C for AS 2.637, and 30—35°C for AS 2.1180 respectively. The optimal pH was 5.

Strain AS 2.121 gave the high-stable yield usually up to 50%. AS 2.637 was more thermo-stable and after gave a high yield too about 50%. The unstability of the AS 2.1180 yield (40—45%) may be due to the pH fluctuation in medium during fermentation period.