

醋酸利用酵母之研究

第一報 菌之分離及其培養組成之檢討

朱植人 邱健人 蔡瑞益 陳皇濤*

Utilization of Acetate by Yeast Part I: Isolation of Some Cultural Properties of Acetate Utilization Yeast

C. J. Chu C. J. Chiou T. Y. Tsai H. T. Chen

緒 言

人類之食糧，向來依賴動植物供給較多。但近年來由於人口的急增，耕地面積的無法再擴張，及生產技術進步趕不上人口的壓力，人類已面臨飢餓的邊緣。根據聯合國的調查，世界人口如照目前之繁殖率增加，至公元 2000 年，人口將增加到 64 億。如無新的食糧供給，將缺少 6000 萬噸之蛋白食糧，亦即有三分之一的人口將無食糧可食，而面臨死亡的恐怖。因此開發新蛋白源成爲本世紀科學家必須解決的問題。

在未開發的蛋白質源中，雖然種類甚多，但在質及量合乎人類的要求並不太多。其中以量及質合乎人類的要求的，以酵母蛋白最受人們注目。酵母菌體不但含有極高之蛋白質，且繁殖迅速，加以除農產廢物外，石油化合物、有機醇、有機酸均能利用，故將來可能僅有酵母蛋白可做爲供給人類食糧的來源。

生產酵母之方法很多，但能與農作物相競爭之生產方法並不太多。在近年中，以石油培養酵母之方法最受人重視。唯酵母僅能利用屬於正烷類之碳氫化合物作爲碳源，其價高於農作物，且培養時又需消耗特別多之氧，在培養時有很多不便之處。因此除非不得已，此種酵母生產方法，並非理想之方法。

自石油化學工業及合成工業發達以後，已能很廉價且大量的供給醋酸，且醋酸在其他工業如醋酸纖維工業，醋酸酐及醋酸乙酯製造工業爲一種廢物，故如能利用醋酸培養酵母，不但原料極爲低廉，且取之不盡。再者培養時，所須之氧僅及葡萄糖之三分之一，石油化合物之十分之一，在設備上，不需特殊設計，故爲一種理想之酵母生產方法。

著者等有見於此，先從土壤分離能利用醋酸之酵母菌株，進一步檢討其工業之可能性，茲將實

驗結果報告如下。

實驗方法

一、菌株之分離方法：

首先由全省各地採集山土、園土、田土作為分離菌種之土壤樣品。然後取一定量依普通分離菌種之方法，分離能利用醋酸為碳源之酵母菌種。選離後接入液體培養基，振盪培養，選取繁殖快速而收量佳之菌株。

二、實驗用菌株：

由以上之方法選離出之 CHU-206 號菌株作為實驗菌。

三、培養基組成：

第一次分離時，以 No. 1 之培養基組成之培養基培養。第二次篩選以 No. 2 之培養基培養，實驗培養組成及培養條件，且以 No. 3 為基礎培養基進行實驗。

表一、培養基組成

Table 1. Composition of Culture medium

| | No. 1 | No. 2 | No. 3 |
|--|-------|-------|-------|
| 醋酸鈉 CH ₃ COONa | 1.6 % | 1.6 % | 0.8 % |
| 醋酸 CH ₃ COOH | 1.2 % | 1.2 % | 0.6 % |
| 磷酸氫鉀 KH ₂ PO ₄ | 0.1 % | 0.1 % | 0.1 % |
| 硫酸鎂 Mg SO ₄ · 7 H ₂ O | 0.05% | 0.05% | 0.05% |
| 尿素 Urea | 0.5 % | 0.5 % | 1.0 % |
| 糖蜜 Molasses | 0.5 % | 0.1 % | 0.5 % |
| 洋菜 Agar | 2.0 % | - | - |

四、培養方法：

三角瓶培養時，以 500ml 三角瓶，盛培養液 50ml 接入菌種 10% 後，於 30° C，振幅 7 cm，回轉數 125 r.p.m 之回轉式振盪機振盪培養 48 小時。

五、分析方法：

1. 生育度之測定：將醱酵液適當稀釋後，以 Spectronic 20 之光電比色計，於 610mu，測其光密度 (optical density) 乘以稀釋倍數，以 U. O. D. 表示。或取醱酵液 100ml，經離心沈澱後，於 105~110° 乾燥 2~3 小時，至恒量以乾菌體量表示。

2. 殘酸之測定：取一定量之醱酵液，加 1N H₂SO₄ 使之變成酸性後，用蒸氣蒸餾，以 0.1N NaOH 吸收，再以標準之 0.1N HCl 滴定，求出其醋酸含量。

3. pH 之測定：以 pH 計測定。

實驗結果

一、醋酸利用酵母之篩選：

我們從本省各地採集土壤樣品，共得 127 樣品，經第一次篩選得 CHU-203 等三十一株。經第二次篩選得 CHU-203, 204, 206, 209 及 213 等五株生長較佳。其中以 CHU-206 最佳，生育度達 U.O.D. 6.2 以上，選離的結果如表二。

表二、醋酸利用酵母之篩選

Table 2 Isolation of Acetate Assimilating Yeast

| 菌 株 Strain | 生 育 度 Growth (U.O.D.) |
|---------------|--------------------------|
| CHU-203 | 5.97 |
| CHU-204 | 5.12 |
| CHU-206 | 6.20 |
| CHU-207 | 2.90 |
| CHU-209 | 5.73 |
| CHU-211 | 2.74 |
| CHU-212 | 2.91 |
| CHU-213 | 5.93 |
| CHU-214 | 2.97 |
| CHU-216 | 1.63 |
| CHU-218 | 2.77 |
| CHU-219 | 3.27 |
| CHU-220 | 3.82 |
| CHU-221 | 3.64 |
| CHU-226 | 3.71 |
| CHU-230 | 3.00 |
| CHU-232 | 4.83 |
| CHU-233 | 5.04 |
| CHU-234 | 4.85 |
| CHU-240 | 3.74 |
| CHU-242 | 4.89 |
| CHU-243 | 4.91 |
| CHU-246 | 4.38 |

| | |
|---------|------|
| CHU-247 | 4.14 |
| CHU-248 | 3.62 |
| CHU-249 | 3.56 |
| CHU-261 | 2.13 |
| CHU-274 | 4.23 |
| CHU-285 | 3.47 |
| CHU-286 | 3.71 |
| CHU-287 | 2.23 |
| CHU-289 | 2.58 |

培養四十八小時後於 610m μ 測單位光密度。

Unit optical density at 610m μ after 48 hrs incubation.

二、醋酸鹽種類對於菌體生育之影響：

醋酸雖屬弱酸，但本身具有酸性，故不能做為碳源，必需以其金屬鹽之形態，始能做為培養基。但以醋酸鹽為碳源時，當醋酸被消耗後，常把金屬離子游離於培養液中，以致影響培養液之 pH，影響酵母菌體之生育，故以何種醋酸鹽做為碳源較適合，有加以檢討之必要。如表三所示在所實驗之醋酸鹽中，以醋酸鈉最佳，U.O.D. 達 6.53，其他醋酸鹽生育均不佳。

表三、醋酸鹽種類對於 CHU-206 株生育之影響

Table 3. Comparison of various Acetate for CHU-206 Growth

| 碳源 Carbon sources | 生育度 Cell Growth (U.O.D.) |
|--|-----------------------------|
| 醋酸鈉 CH ₃ COONa | 6.54 |
| 醋酸鉀 CH ₃ COOK | 1.05 |
| 醋酸氨 CH ₃ COO(NH ₄) | 0.72 |
| 醋酸鈣 (CH ₃ COO) ₂ Ca | 0.99 |

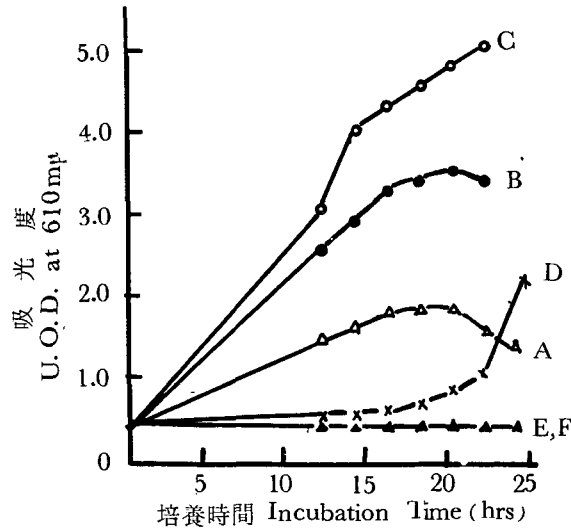
以其他醋酸鹽 (0.02 M) 取代醋酸鈉做為碳源

In place of Sodium Acetate in basal medium salts of various Acetate (0.02 M) were employed as carbon sources.

三、醋酸鈉濃度對於菌體生育之影響：

醋酸鈉屬強鹼弱酸之塩類，溶於水後，很容易解離成鈉離子及醋酸根離子。此類離子在低濃度時對於菌體生育可能沒有影響。但濃度過高恐對菌體有影響，因此以各種不同濃度之醋酸鈉做為碳源實驗結果如圖一。如圖一所示，在所有濃度中，以 C 生育最佳，不但無誘導期，且繁殖亦最佳，單位菌體量也最高。但如濃度增加，即 D 之濃度，則很明顯的可以看到菌體生育受抑制，且生育速

度及收量均不佳。由此可知以醋酸及醋酸鈉為碳源時，初發濃度以各 0.6% 及 0.8% 最適合。



圖一、醋酸鹽濃度對於 CHU-206 生育之影響

Fig. 1 Effect of Acetate Concentration on the Growth of CHU-206

註：

培養基：除醋酸鈉及醋酸外，其他成分均與表一 No. 3 所示相同

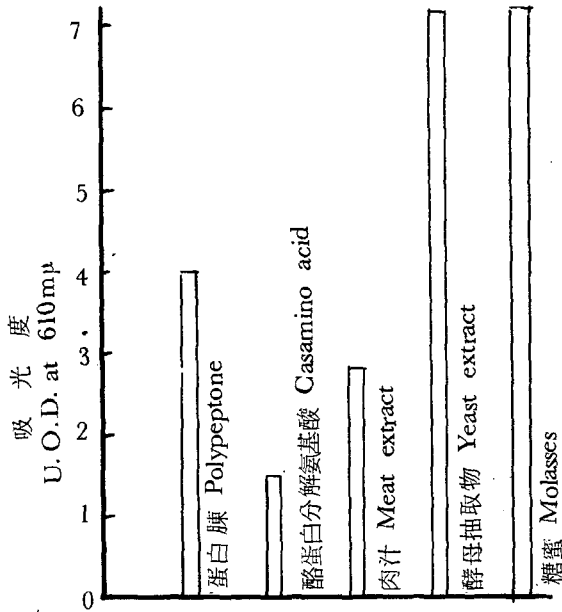
Medium: The other components except Na Acetate and acetic acid concentration were the same as described in Table 1 No. 3

- | | | | | | |
|----|----------------|------|-------|-------------|-------|
| A. | 醋酸鈉 Na Acetate | 0.2% | + 醋 酸 | Acetic acid | 0.15% |
| B. | 醋酸鈉 Na Acetate | 0.4% | + 醋 酸 | Acetic acid | 0.3% |
| C. | 醋酸鈉 Na Acetate | 0.8% | + 醋 酸 | Acetic acid | 0.6% |
| D. | 醋酸鈉 Na Acetate | 1.6% | + 醋 酸 | Acetic acid | 1.2% |
| E. | 醋酸鈉 Na Acetate | 2.4% | + 醋 酸 | Acetic acid | 1.8% |
| F. | 醋酸鈉 Na Acetate | 3.6% | + 醋 酸 | Acetic acid | 2.4% |

四、有機營養源對於菌體生育之影響：

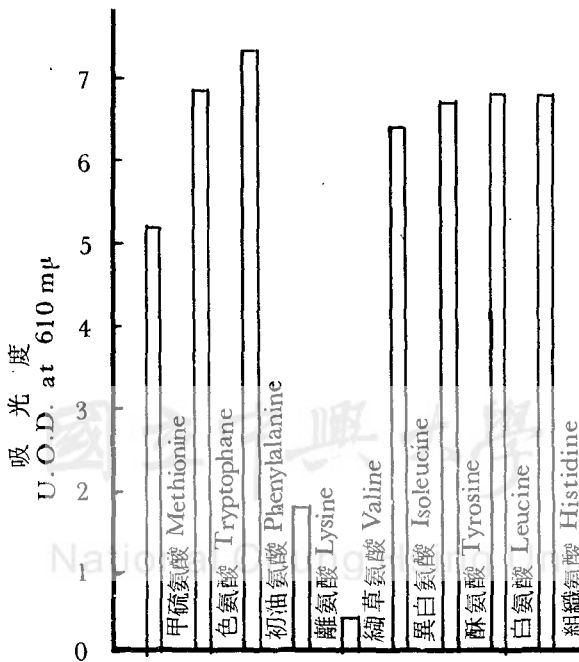
酵母菌體之生育常需維生素或其他營養源做為生育因子 (growth factor) 始能快速生長。故為明瞭 CHU-206 是否對營養有無安定性，先以有機營養源實驗，結果發現如於培養基中。添加酵母抽取物或糖蜜，顯然能促進酵母菌體之生長。其他如肉汁抽取液 (meat extract)，多蛋白煉 (polypeptone)，酪蛋白胺基酸等，則對生長無促進的效果，結果示如圖二。由此可以看見 CHU-206 對某種維生素或胺基酸有要求性。進一步實驗結果發現如以單一胺基酸或維生素為營養源時，胺基酸影響生長較顯著，特別是初油胺酸 (phenylalanine) 效果最佳，其次為組織胺酸 (histidine)，酪胺酸 (tyrosine)，色氨酸 (tryptophane)，白氨酸 (Leucine)，異白氨酸 (Iso-Leucine) 及甲硫胺酸 (methionine) 等胺基酸，僅纈草胺酸 (Valine)，羥丁胺酸及離

胺酸，則不能促進菌體之生長。至於維生素 B_1 ， B_2 ， B_6 ，泛酸 (pantothenic acid) 對苯胺酸 (p-amino benzoic acid)，菸鹼酸 (Nicotinic acid) 及肌醇 (Inositol) 等都不能促進菌體生長，結果示如圖二，圖三及圖四。



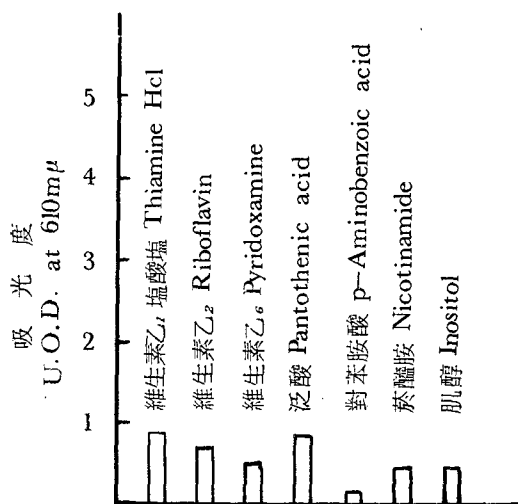
圖二、有機氮源對於菌體生長之影響

Fig. 2 Effect of Various Organic Nitrogen Sources on the Cell Growth



圖三、氨基酸種類對於菌體生長之影響

Fig. 3 Effect of Various Amino Acid on Cell Growth



圖四、維生素對於菌體生長之影響

Fig. 4 Effect of Various Vitamines on Cell Growth

五、糖蜜濃度對於菌體生育之影響：

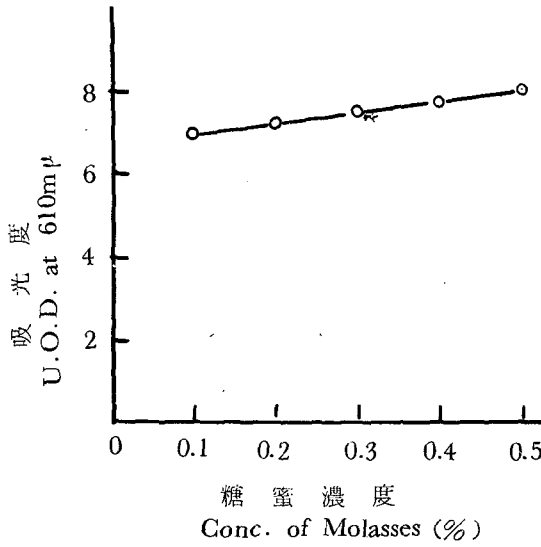
在上一實驗中，已證明糖蜜具有促進菌體生長之功效，但於培養基中，需添加多少，才足夠菌體生長，實有加以檢討之必要。實驗的結果，如圖五所示，糖蜜添加量以 0.1% 即已足夠，如再增加亦無顯著的效果，但從圖上可以看出，菌體之生育量隨糖蜜濃度之增加而增加。

六、尿素濃度對於菌體生育之影響：

在本實驗中，均以醋酸鈉及醋酸為碳源，故培養菌體時，尚須添加氮源始能合成菌體蛋白。但在選菌時，即已用尿素做為氮源，故所選出 CHU-206 已知能利用尿素作為氮源。但於培養基中需加多少尿素始足夠菌體合成菌體蛋白，需加以探討，始不致因缺乏氮源而影響菌體收量，實驗的結果，如圖六所示，尿素濃度以 0.5% 即已足夠，如濃度增加，菌體亦隨之增加，但所增加有限，故由此可見如以醋酸鈉及醋酸各 1.8% 及 1.2% 做為碳源時，氮源以使用 0.5% 尿素即已足夠，如尿素濃度增高，由於有多餘之氮根中和游離之醋酸根，而使培養基之 pH 更適於菌體生長，故生長隨著尿素濃度之增加而略見增加。

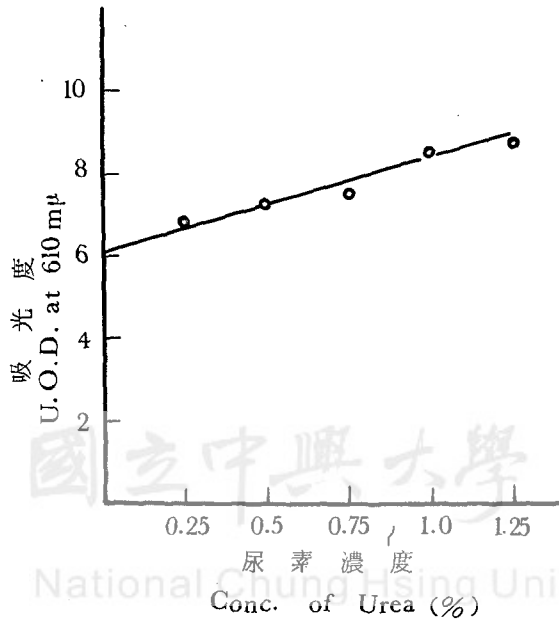
七、CHU-206 株酵母對其他碳源之利用：

酵母菌除了能利用糖類做為碳源外，同時還能利用其他含碳化合物做為碳源。本菌株經實驗的結果，如圖七所示在低級有機酸，除醋酸外，其他有機酸生長均不佳，但在醇類中，乙醇及丙醇均能生長，至於在正烷類中生長亦甚佳。



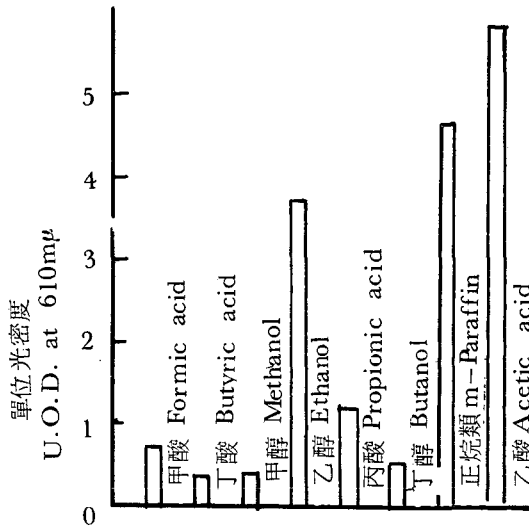
圖五、糖蜜濃度對於菌體生長之影響

Fig. 5 Effect of Molasses Concentrations on Cell Growth



圖六、尿素濃度對於菌體生長之影響

Fig. 6 Effect of Urea Concentration on Cell Growth



圖七、其他有機碳源對於菌體生長之影響

Fig. 7 Effect of Various Carbon Sources on Cell Growth

Medium: 1% of various carbon source was added to the medium No. 3

八、葡萄糖之添加對於菌體生育之影響：

著者等為想知道 CHU - 206 之最高菌體產量，以小型醱酵槽實驗，並於培養過程中，以 50% Acetic acid 調節培養液之 pH，且補充碳源，結果如圖八所示。以醋酸為唯一碳源時，由於殘醋酸較易蓄積，且超過 1%，致影響菌體之生長。但如以基礎培養基，另加 2% 葡萄糖，則殘醋酸之蓄積較少，且其濃度低於 1% 以下，故菌體之收量，可提高至 2% 以上。但如於培養中，除追加葡萄糖外，又加 0.05% 胱胺氨酸 (Cystine)，則殘醋酸更可降低至 0.8% 以下，以致培養時，pH 不致變化過大，使菌體不受醋酸根之影響，而正常生長。故其生長速及菌體收量，優於前二者；且菌體收量高達 2.48%。

由以上之實驗可知，醋酸利用酵母，雖能利用醋酸做為碳源。但如能供給少量葡萄糖，先讓菌體進行解糖代謝，以獲得 ATP (Adenosine Triphosphate)，由運行三碳酸代謝 (Tricarboxylic acid Cycle) 較佳，如培養基中另有充分之含硫化合物，如胱胺氨酸存在，則醋酸更易形成乙醯基輔酵素 A (Acetyl-S-CoA) 之化合物，而進入 T.C.A. 代謝，因此更能促進酵母菌體蛋白之合成，而加速菌之生長及收量。

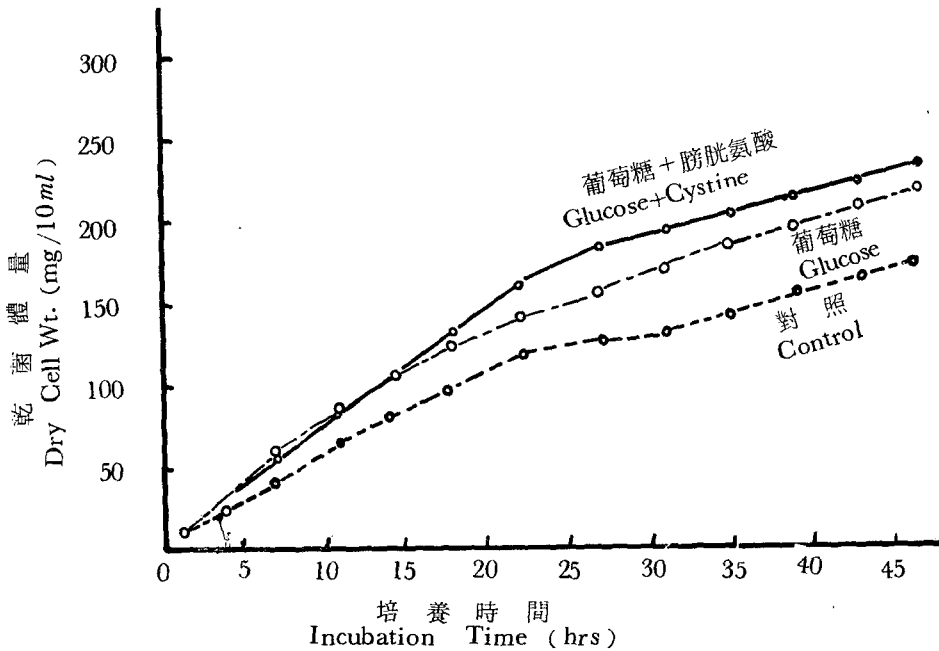
九、菌體成份：

以本實驗所求出最適培養組成培養所得之菌體，經分析後，示如表四。

表四、CHU-206 之菌體成份
Table 4 Cell composition of CHU-206 strain

| | 含量 Component (%) |
|----------------|---------------------|
| 水份 Moisture | 5.8 % |

| | |
|------------------------|--------|
| 粗 蛋 白 Crude protein | 42.8 % |
| 粗 脂 肪 Crude fat | 1.8 % |
| 粗 纖 維 Crude fiber | 4.85 % |
| 灰 分 Ash | 7.2 % |



圖八、葡萄糖、胱氨酸對於菌體收量之影響

Fig. 8 Effect of Glucose, Cystine or Glucose only on Acetac Fermentation.

結 論

從本實驗可知，能利用醋酸作為碳源之酵母菌，在自然界分佈很廣，且種類極多。在分離所得之酵母 CHU-206，如以醋酸钠及醋酸為碳源，則僅需添加糖蜜、尿素及無機鹽等，即能迅速生長。如以培養基中追加少量之葡萄糖，並以醋酸調整 pH，維持 pH 在 5~6 之間，則可縮短培養時間，並提高菌體收量。再者本菌之菌體成份不遜於飼料酵母，故如醋酸纖維工業之廢液培養，則其經濟價值不可被忽略。

摘 要

著者等從土壤分離能利用醋酸為碳源之酵母菌株共三十一株。經第二次篩選的結果，以 CHU-203 ; 204 ; 206 ; 209 ; 213 等五株生長較佳，而以 206 號之菌株之生長最佳。

為進一步提高 206 號株之菌體產量，著者等曾檢討其培養組成，結果發現該株以醋酸鈉及醋酸所組成之培養基培養最佳。其最適生長之濃度各 0.01M，如以醋酸換算約為 1.2%。如於培養基中添加糖蜜，酵母抽取物 (yeast extract)，則生長更佳。但於培養基中加 0.1% 之糖蜜即已足夠。至於培養基中，若以尿素作為氮源，則添加濃度以 1.25% 以上較適合。

大量培養時，如以培養基中添加少量之葡萄糖或膀胱氨酸，不但可縮短培養時間，且可提高收量至 2.5% 以上，且其收率亦可高達理論數字之 40% 以上。

本菌除能利用醋酸作為唯一碳源外，乙醇，正烷類 (n-paraffin) 亦能利用。

參 考 文 獻

- (1) Aiba S., Moritz V., Someya J. and Haung K. L. (1969): Cultivation of Yeast Cells by Using n-alkane as the Sole Carbon Source (I) Batch Culture J. Ferment. Technol., 47, 203.
- (2) Aiba S., Haung K. L., Moritz V. and Someya J. (1969): Cultivation of Yeast Cells by Using n-Alkane as the Sole Carbon Source (II) An Approach to the Mechanism of the Microbial Uptake of n-Alkane. J. Ferment. Technol., 47, 211.
- (3) Akiba T., Ueyama H., Seki M. and Fukimbara T. (1970): Identification of Lower Alcohol Utilizing Bacteria. J. Ferment. technol., 48, 323.
- (4) Itoh M., and Doi S. (1969): Taxonomical Studies on the Aromatic Hydrocarbon Utilizing Yeast. J. Ferment. Technol., 47, 161.
- (5) Ogata K., Nishikawa N., Ohsugi M. and Tochikura T. (1970): Studies on the Production of Yeast (1) A Yeast Utilizing Methanol as a Sole Carbon Source. J. Ferment. Technol., 48, 389.
- (6) Ogata K., Nishikawa N., Ohsugi M. and Tochikura T. (1970): Studies on the Production of Yeast (II) The Cultural Condition of Methanol Assimilating Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. J. Ferment. Technol., 48, 470.
- (7) Ogata K., Nishikawa N. and Ohsugi M. (1970): Studies on the Production of Yeast (III) Acetate Utilization for Yeast Cell Growth as a Sole Carbon Source (1) J. Ferment. Technol., 48, 478.

Studies on Acetate Assimilating Yeast

Part I: Isolation and Some Cultural Properties of Acetate Assimilating Yeast

C. J. Chu C. J. Chiou T. Y. Tsai H. T. Chen*

Summary

In the course of investigation on yeast production and the microbial metabolism acetate, the authors isolated many acetate assimilating yeasts from soil. Among them, the strain CHU-206 showed a vigorous growth on a acetate media.

Using CHU-206, the authors tested some cultural conditions of this assimilating yeast. A rapid growth of CHU-206 was found with 0.8% Na acetate and 0.6% Acetic acid in the medium. The higher the concentrations of Na acetate and Acetic acid of the medium, the longer the lag phase of the organism. This strain grew poorly in a medium containing Ca acetate, NH_4 Acetate or K Acetate.

The effects of various organic nitrogen sources on cell growth were also tested. The addition of yeast extract or molasses promoted the cell growth. Farther more, the cell growth was stimulated by the addition of such amino acid as phenylalanine, histidine, tyrosine, tryptophane, leucine, isoleucine or methionine, but not by the addition of the Vitamine B group. Comparison of the value of various carbon compounds for cell growth has also been made. In addition to acetic acid, ethanol and N-paraffin were also utilized to form yeast protein to some extent, although the yields from these compound were rather low in comparison with that from acetic acid.

The cell growth is accelerated by the addition of 2.5% glucose and 0.05% cystine; 2.5% glucose only, or simply by acetic acide feeding.

When CHU-206 was cultured on a medium containing 0.8% Na Acetate, 0.6% Acetic acid, 2.5% glucose, 0.05% cystine and other salts, and with the addition of acetic acid periodically during the culture to a final acetate concentration of 5% after 50 hours, the cell yield was 24.8 g/l.

國立中興大學

National Chung Hsing University

* Head & associate professor, instructor and students, respectively of Department of Food Science and Engineering, National Chung Hsing University.