第六卷　第五期　　中華民國三十四年四月

黃海

發酵與菌學特輯

（第三十五號）

黃海化學工業研究社編行

文化印書館印

黃　　海

第六卷　第五期　目錄

黃海雙月刊

發酵與菌學特輯

第三十五號

定　價

每　期　五十元
每年六期　三〇〇元

（郵包費在內）

編行者　黃海化學工業研究社

四川五通橋

印刷者　文化印書館

樂山老霄頂三清宮

中華民國三十四年四月

苞　　穀　　酒

白漢熙　檀耀輝　徐翠華

（國立浙江大學農化系）

內容目次

一　引　言

貴州東北山區多產苞穀（玉蜀黍），爲鄉民之輔助食糧，亦爲主要釀酒原料。此間人民飲酒極盛，且苞穀酒糟，爲飼育肥豬之惟一飼料，所以作坊遍鄉間，是農民認爲最有意義之副業。抗戰以來，國產礦質液體燃料缺乏，各地酒精工廠，蓬勃興起，這民間土酒，就變成了大多數酒精廠家命脈之所賴。這可以說是時勢造英雄。雖然民間酒坊，因爲釀造技術的過分粗放，在對原料的利用効率而論，是難免有所損失，可是要我們策花了九牛二虎的力，來把閉塞於山野的苞穀運輸到長途以外的新式工廠，也不能說是上。還不如在鄉間當地釀酒，一方面可以減輕運輸的麻煩，二方面又可以簡化工廠的設備，三方面更可以提高廠方每日酒精之產量。故以事實而論，這是一條合理的途徑，亦所以爲土酒事業興起之原因。也許在戰後，我國的交通建設未達理想的事實以前，這樣子的原料供給方式，將維持到很長久的時間，那麼改良土酒釀造技術，以提高出酒効力，是一個急需解決的問題。筆者有見及此，乃進行此項之試驗，先由觀察而後改良，乃至於推廣。迄至今日，是項工作尚在進行中，茲將已完成之一段，述之于后。

二　苞穀酒釀造原法

作者曾經跑過十家以上酒坊，其釀造方法，大致相彷。惟各人手續上略有出入耳。

(I)設備：在整個操作中，所用之重要設備，有地甑，天甑，底鍋，天鍋，淘桶，

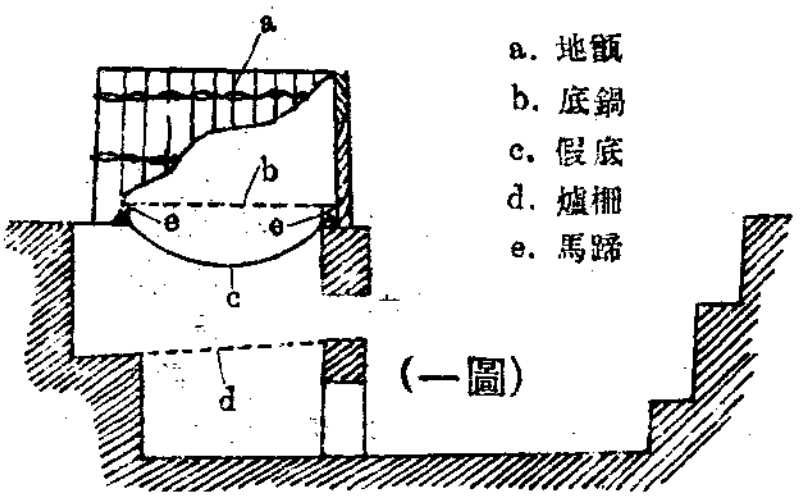
發箱，及零星附帶用具，如晒蓆，舂箕，翻板等等。茲以五斗（每斗約35斤）作爲一單位之普通酒坊，所用設備情形，列述如下：

（1）地甑及蒸灶各一：挖地爲坑，深二尺許，上建一地灶，灶面與地平。灶上按一鐵鍋，徑約90公分，名爲底鍋。鍋上套一木製之甑，甑高56公分，上口大於下口，而下口又較鍋徑大出12公分，故甑置灶面，而非於鍋內。鍋緣與地甑下緣之間，以紙筋桐油石灰，砌成堤狀之環，名爲"馬蹄"，用以擱置假底。假底通常亦爲木製，全套如圖一所示。

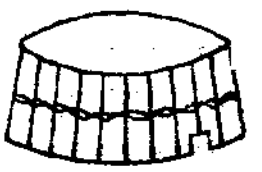
（2）天甑一：爲一木製之甑。上口小于下口，而下口與地甑上口同大。甑高約87公分。下緣有缺口一。缺口之對方內壁，釘有小木樁，用以擱置接酒管。如圖二所示。

（3）接酒管一：如圖三所示，亦爲木製，中央膨大成盤狀。盤徑約17公分。盤之二方，各有一柄，其一中實，他一則挖有小溝。

（4）天鍋一：即冷却水鍋。爲一通常大鐵鍋，鍋徑較諸天甑上口爲大。鍋之外底，則需經通理打光。其法乃先以磨石將底磨光，然後將鍋覆蓋于燃着之稻草上，使其灼熱至200度左右時，乃以布醮桐油，均勻塗布於鍋之外底，桐油立即起覆合作用，形成橡皮狀膜，掩於底面。是後又以冷酒淋其上，以去桐油之味。以此法處理之天鍋，外底十分光滑，而且不生銹，誠妙法也。



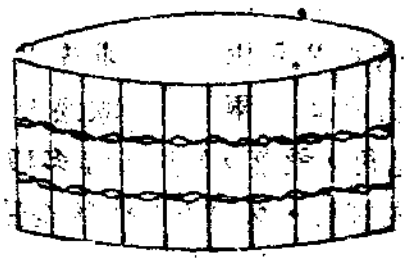
（一圖）


（二圖）

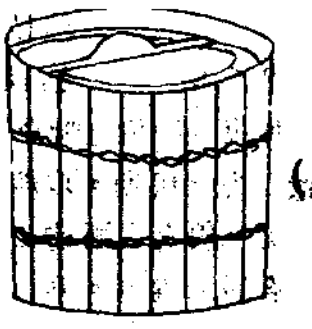

（三圖）

（5）淘桶一：乃一極大之木桶。用以淘洗已煮苞穀，徑120公分，高約55公分，如圖四。

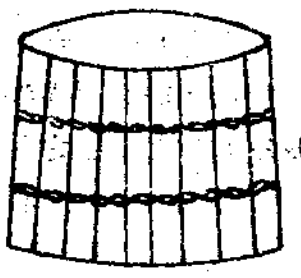
（6）發箱二：用於苞穀糖化，分方圓二種。圓者如飯甑，方者爲木框。上下皆無底，冬日用圓，夏日用方。圓者徑100公分，高56公分。方者則爲47×78×150公分，如圖五之甲乙：



(四圖)

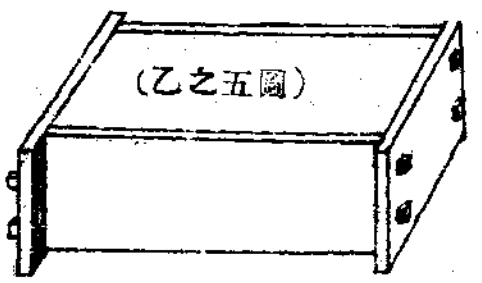


(六圖)



(甲之五圖)

(七圖)



(乙之五圖)

(7)裝桶十：爲發酵桶。形如通常木桶，下有底，上有蓋。蓋較桶口約略小，可陷入桶內，離口約10公分之處。桶徑約100公分，高65公分，如六圖所示：

(8)翻板一：用以和麴，形如七圖所示。

(9)其他零星用具：需備石磨一具，晒蓆一大張，酒缸數個，草簾或棕簾二三枚，竹箕數個，及竹製地甑帽蓋一具。

(II.)製麴：我國釀酒所用之麴，可大別爲二類。在小麴中，除一般之穀類原料外。大都摻以中國草藥。而草藥之恰當與否，又爲影響麴質之重要因子。湄潭苞穀酒麴，特別重視此點，所以加藥物種類繁多，而量亦重。自古相傳，有蜈蚣丹與八寶丹二個單方，最爲通用。每單中藥物不下百餘種。近年來有當地名醫張瑞歧先生，自創一方，包括藥物僅二十八味，而得到結果，有過於往昔。茲摘錄於後，以作是後研究之參考。

張氏苞谷酒藥方單

前胡 3 兩	牙皂 4 兩	蘇荷 2 兩	丁香 1.5 兩
羌活 3 兩	粉草 1 兩	甲珠 1 兩	大香 1 兩
麻王 2.5 兩	獨活 2 兩	均姜 2.5 兩	莊黃 2.5 兩
桃仁 1 兩	半夏 2 兩	良姜 1.5 兩	川烏 2 兩

花粉 4 兩	雲風 2 兩	刁安 1.5 兩	甘松 1 兩
山奈 1 兩	桂枝 2.5 兩	蒼朮 2.5 兩	北辛 2 兩
廣香 2.5 兩	結梗 3 兩	升麻 2 兩	蜈蚣大者一條

外加臨時採集之野草，如辣蓼，水皂角，桑葉，鐵刷帚等多種。

製麴必選暑炎暑伏期。取粳米一老斗，磨成細粉。又將上開藥物全量，經日乾後，亦磨成細粉。更取優良者酒麴二斤，亦碎成粉。三者充分混合後，加淨潔井水。加水之量，以恰能粘合粉末爲度。乃置竹蓆上，以脚踩勻。然後切成 3 ～ 4 公分立方之小塊。乃擇室之清潔者，覆蓆于地，將麴平列其上，上更覆以柏枝，或簾或棉被等物以保溫濕。任其放置36小時後，麴面全白，品溫上昇，乃去覆放冷，謂之"揭汗"。待熱氣消散，更加覆如前。又經 6 ～ 8 小時，麴面白毛長達 1 公分，又去覆蓋之物，使溫濕發散，謂之"收汗"。是後不加覆蓋，任留室內。則見菌絲倒伏，四五天後取出日乾，而貯藏之。

(Ⅲ)釀酒：釀酒工程可分爲蒸煮，和麴，裝桶，及烤酒等五個步驟。

(1)蒸煮：玉米組織堅實，不易煮爛，故是項工作，化時甚長。先於甑中，裝入半甑之水，燒至將沸，乃取苞穀五老斗，倒入其中。將上浮皮殼，勻去後，加蓋追火，繼續蒸煮沸。約經 5 小時後，見八成穀成，已有開裂之勢，乃以竹箕取出，急速倒入預盛冷水之淘桶中。充分淘淨之。其目的據云在淘去粘着之澱粉等泥質物，以免妨害是後汽蒸時蒸汽之上昇。竊以爲這種溫冷急劇變化之處理中，對於包谷皮殼之破裂，以增加是後汽蒸之効能方面，亦不無俾益也。

乃勻去甑中之水，並洗淨鍋底污濁後，重新注入清水於鍋中，按上假底，將已煮苞穀倒入其中，更行汽蒸凡 6 小時。是時苞穀已充分膨大，且個個開裂，以其體積而論，約爲原容量之二倍。

(2)和麴：將蒸煮完了之苞穀，在大晒蓆上，以木耙攤冷至近體溫時(30～40度)，以翻板集爲長方丘形，散佈麴粉，約18兩於頂面，乃以翻板自丘邊層層切翻，凡二次，使麴均勻分佈于每粒苞穀之表面。

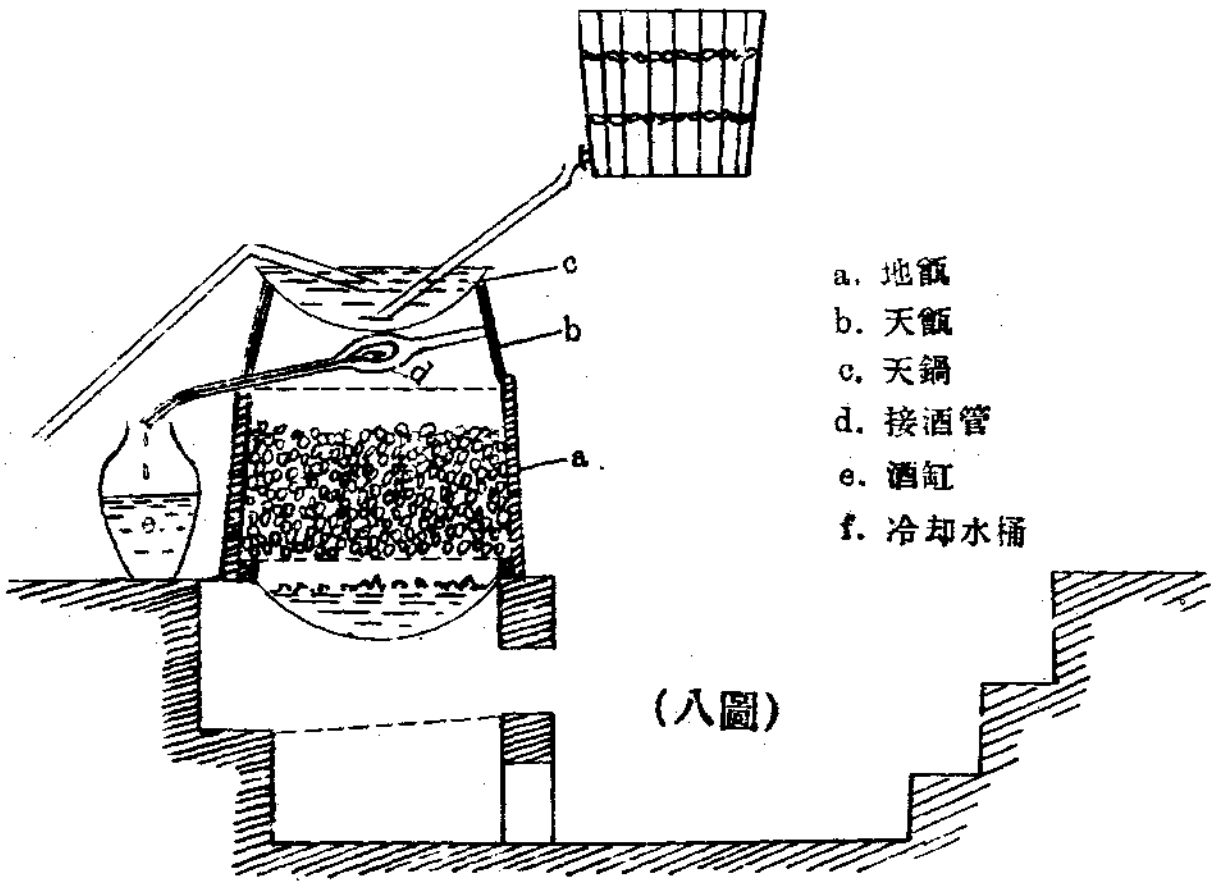
(3)裝箱：於地面舖稻草，厚約5寸，按上一平板，板上置發箱，若於寒冬，則於箱之內壁周緣，更敷草簾，以保暖。乃將已和麴粉之苞穀，倒入其中，頂面又蓋以草簾或棕衣。約經28～36小時後，若以手揑汁，已見清澄，用口嘗味，覺得極甜之時，表示糖化已達完善之程度矣。

(4)裝桶：先於裝桶之底，舖上一層經數日放置之酒糟，是謂"壓糟"，然後將糖化完了之苞穀，由發箱搬至裝桶中，更覆壓糟一層，糟上蓋以草簾，任其放置約經30小時。聞桶中有氣泡破裂之蠶食聲，稱爲"噪桶"。乃去草蓋并注加清冷井水凡60斤，謂之"伏水"。然後加蓋封泥，十日發酵完了。可供烤酒。

(5)烤酒：卽蒸溜也。其器具裝置如第八圖所示，先於地甑中，按上假底，將發酵

完了酒醪之液體部份，所謂酒娘者，先注入底鍋中，或更追加少量清水，然後鋪約2寸許之苞穀醪粒于假底之上，開始上火，待酒氣上升，穿透第一層固體醪時，又追加第二層，直至完了之時，乃按上天甑，裝好接酒管，覆上天鍋，并以濕布及米糠塞住各處接縫，以免酒之逃逸。乃注冷水于天鍋內。鍋內之水有自動更換之裝置，不數分鐘酒氣透頂層苞穀上昇，與天鍋底面相遇，冷凝爲酒。沿底下集心部，而流入接酒管之盤內，乃由管流入接酒之缸中。新出者酒濃度極高，其後漸次下降，時以口嘗流出之酒，至淡而無味時，烤酒即告終了。乃以清淨冷水適量摻入酒中，使起酒花，然後担裝出售。

每次可出酒約55老斤。酒濃42—47%。酒糟可以餵豬，鍋底之水多棄之。



(八圖)

三　主要發酵菌類

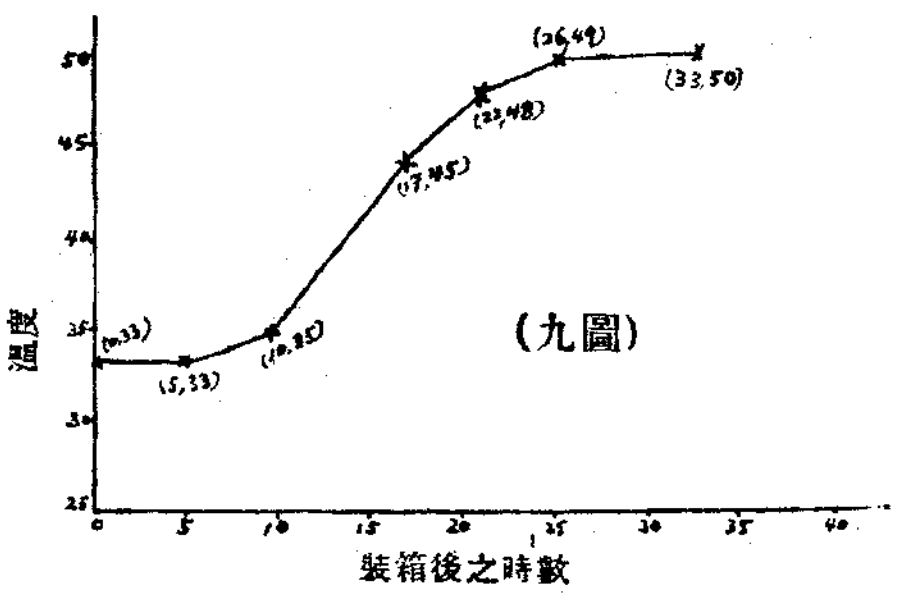
(I)初步觀察：我們雖然可以從酒麴中去尋找發酵菌類。但麴中微菌種類繁多。而且其存在數量之多寡，還不見得能够代表主要菌類。蓋製麴釀酒，環境不同，同時所用於分離之種種條件，往往會捨主從賓。所以我們願意在釀酒期間去尋找主要發酵菌類，而不願以尋常方法從麴中去分離。

作者曾以載物玻片數個，埋入醪中，不時取出鏡檢片上之微生物，同時直接由穀粒表面鈎取樣品，細心觀查整個釀造程序中微生物生長之情形，茲分段述之于后：

(1)糖化時期：苞穀和麴裝箱之時，品溫爲33度，以後5小時品溫爲仍33度，不見任何動靜。10小時後品溫上昇至35度，在苞穀表面已有白點出現。以鏡檢之，似屬 Monilia 之類。菌絲有隔膜，細小，而分生芽胞叢生。17小時后品溫又昇至45度。內心苞穀粒面，白點已經消失，但以鏡檢知仍有是菌之繁殖。惟菌絲倒伏，遭受濕潤，不易爲肉眼所見耳。是時同時發見有另一絲狀菌之生出。其菌絲粗大，而無隔膜。與前者有顯然不同之區分。是時苞穀有微甜而帶香。22小時後，品溫昇至48度，苞穀已有顯著甜味是時菌種粗大的已佔優勢，這表示粗者能耐高溫，而細者已受抑制矣。再檢查酵母細胞，爲數極微。26小時後品溫昇至49度，粗大菌絲尚有增加趨勢，而苞穀已極甘甜。我們相信這粗大菌，爲主要之糖化菌。33小時後，品溫昇至50度，而糖化已達完美之階段矣。以碘液試之，帶有紫色。

從這個觀察，我們相信這耐高溫的粗絲糖化菌，是造成苞穀酒糖化技術上優美之主宰。牠能在50度高溫生長，使醪之品溫不退。一方面可以促進糖化之効率，他方面又可妨止雜菌之侵襲，使糖化能得安全順利進行，誠可欽慕也。

茲將糖化時期品溫改變之情形，繪圖示之如下：



(九圖)

(2)發酵時期，裝桶半小時後，品溫爲43度，20小時後品溫降至45度。此時苞穀酸變，在顯野中可以看到細菌之叢生。此類細菌能耐高溫，在45度可自由生長，也許是乳酸菌類。25小時後，品溫46度，29小時後，品溫44度，35小時後，品溫43度。這表示此有糖化菌發酵已經停止，而酸菌生長也或已至末期。此時苞穀味已極酸，而桶中已有氣泡發生之蠶食聲，桶中酒味甚濃，乃已近封桶之時。以鏡檢之，酵母開始繁殖，而數不衆。

封桶後22小時，又曾取樣觀察，是時品溫僅爲38度，而發酵作用已極旺盛，酒氣濃

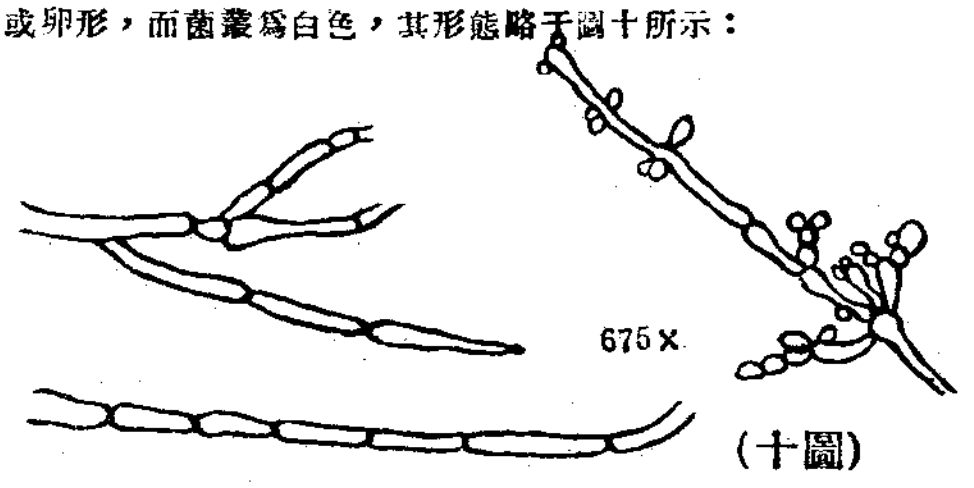
而酸味亦重，酵母數亦有顯著增加，但遠在細菌數量之下。以碘液試之，得淡紫色，表示糖化作用，仍在微弱進行中。

在發酵終了時，醪液現乳濁狀。以鏡檢之，不見穀粉顆粒，而見大量細菌及較少之酵母細胞浮遊所致。

作者曾分析發酵醪液，悉其中含酒精有6—7%，而酸量竟達3—5%（以乳酸計），若以此酸化爲酒精，則其成績大有可觀也。

（II）微菌之分離與形態之檢定：從上述初步觀察結果，知在發酵階段中，除產酸爲害的細菌以及酒化的酵母外，還有兩種絲狀菌分任了這個事業。這二菌以溫度之昇降而相互交替。我們記得在裝桶後17小時之時，此二菌同時發育存在，所以我們的分離工作亦由此處落手。即由此時採取桶心苞穀一顆，先於低倍顯微鏡下找出二菌同時混成之區域，乃以白金絲鈎取稍許，行劃線分離，一晝夜後，二菌確以發育如期，乃各接一管以爲純種。

同樣的觀察與分離工作，作者曾經歷五個以上的酒坊，結果無不一致。這二種絲狀菌的互相消長，似乎已有定律的進行。其中粗者菌絲無隔膜，無性生殖，爲胞子囊胞子，或有匍匐性之氣生菌絲，及假根附屬器（Rhizoid），屬於 Rhizopus sp.。或無是項特性爲 Mucor 之一。細菌絲之細者概屬於 Monilia [1]。蓋其菌絲有隔膜，分生芽胞爲其無性繁殖器官。芽胞爲單細胞。芽胞柄與菌絲并無顯明之化分。分生芽胞（分生子）爲球形或卵形，而菌叢爲白色，其形態略于圖十所示：



（十圖）

（III）微菌之生理試驗：從已往觀察，我們相信這粗絲眞菌，可能是糖化的主人翁。那麼這 Monilia 菌，在這裏究竟擔任了什麼工作，牠對糖化有無幫助，或僅爲無關緊要的配角。爲了解決這疑團，我們做了下列數項之生理試驗。

（1）生長最高溫度之測定：取斜面培養八管，其四種以湘潭某家酒坊之 Monilia 菌，他四種接我們由黔省數十縣酒麴選出之一種玉蜀黍糖化優種 Rhizopus Chedah 3，兩兩配組，在不同溫度下培養，並時時觀察其發育情形，結果示於下表，表中"＋"號數目之多寡表示生長之優劣，而"－"號則表示毫無發育。

表一　二種包穀酒糖化有關菌之最高生育溫度

菌種名稱 \ 溫度 °C	40	45	50	55
Monilia sp.	++	−	−	−
Rh. Chedah3	+++	++	+	−

由表一與圖九我們發見這 Monilia 菌在發箱中僅限於17小時以前，或比較冷涼區域之生長。

(2)發芽速力試驗，取蓋玻片四塊，經火焰殺菌後，各以白金耳醮取熔融之固體培養基一滴，塗抹於玻片之中央，然後分別以下列三種玉蜀黍糖化菌及 Monilia 稀釋液稍許，乃各個蓋覆於已經殺菌之凹形載物片上，並以凡士林封固後，30度保溫培養之。五小時後取出以顯微鏡檢視各菌發芽胞子之數量，以發芽百分率示之如表二：

表二　幾種玉蜀黍糖化菌與 Monilia 菌之發芽速力比較

菌　名	Asp. Oryzae M4a	Monilia sp	Rh. chedah 3	Asp Oryxae 黃平
發芽率	63	88	48	32

這表示Monilia菌發芽生長極爲迅速，似乎對於裝箱初期品溫之保持一節，有所俾益。同時從我們培養的經驗，知是此菌能於發芽十小時內即行產生多量分生子。因之雖然牠沒有耐高溫的特性，而在裝箱初期，牠早已佔領了不少的領土，而且留下了不少的後裔。

(3)糖化力比較試驗：我們再以美國玉蜀黍糖化菌 Asp. Oryxae M_{40} 及 Rh. Chedah3 作爲標準，來測定 Monilia 菌對包穀糖化之能力。乃取玉米粗粉每20克爲一份，裝入六個小三角瓶中，和以等量之水。經充分殺菌後，每二瓶爲一組，各接一菌。保溫培養。並時加搖動。四晝夜後，各瓶均已達老熟程度。乃各加水80公撮，同置60度水鍋中，糖化歷5小時後。濾取其清液，稀釋25倍後。乃取試管七個，其一注入蒸溜水11公撮，以爲標準管。其餘則分別注入1公撮之不同菌種糖化液及10公撮之蒸溜水。然後每管追加1公撮之斐林氏混合液。經震蕩後，同入沸水鍋中，繼沸10分鐘後，取出濾清。乃以水晶柱比色器，讀出相互藍色比例數，（此法乃本系同學管懋賢君所建議由作者改良創用）。藍色之濃淡表示殘留 Cu^{++} 離子量之多寡。以標準管爲 100 計，算出其他各管殘留 Cu^{++} 量之比率。又以 100 減去各數，得差數爲已被還原Cu 量。亦即表示糖化力之強弱。又以 100 表示糖化力最强者，再來推算其餘各組糖化力之相對比數，得結果如下表：

表三　二種優良玉米糖化菌與 Monilia 菌糖化力比較測定

菌　名	Asp. Oryzae	Monilia sp.	Rh. chedah 3	Standard.
比色計中之讀數	18•3	6•0	27•7	5•0
殘留 Cu^{++} 量	27	80	14	100
已被還原之 Cu 量	73	17	86	0
糖化力比例	85	20	100	—

由此可見 Monilia 菌之糖化能力極微，非包穀酒製造上之重要菌無疑焉。由此亦可反證這粗大絲菌，必爲糖化之主人翁。

作者亦曾測得 Monilia 菌對玉米糖化液有酒精發酵性，然亦甚微。

其後又曾以生米粉和水調濕，保溫培養，發見有多數 Monilia 之生出。

至此吾人可以斷言，Monilia 菌，乃來自製麴之生米粉，其對苞穀酒釀造，不發生多大關係。

四　草藥在苞穀酒釀造上之意義

我國釀酒相傳數千年，對于製造之用草藥，一向極爲重視，晚近應用菌學者，亦不無對此發生疑團[2][3]。筆者以爲草藥用于釀造，既有悠久歷史，而且迄今仍普遍應用，其間多少總有不可忽視之意義在，乃作下述試驗，以探究之。

先以Rh. chedah 3製成米糠純種麴，不加任何草藥，按照鄉民原法，用以釀造苞穀酒，惟於裝桶時，以純粹培養酵母醪，適量加入，以行發酵，結果以五斗苞穀，得酒15斤。查失收原因，在於糖化，蓋於發熱出箱，相當於糖化完了之時，苞穀仍淡而無味。

後又依法進行二次試驗，所不同者，在於製麴時，加入張氏混合草藥之半量，結果得酒 30 斤。

其後又增加藥量至應有比例，得酒 50 斤，但未曾加臨時採集之野草。

最後加藥超出原方 ½，得酒 60 斤。

這個結果簡直有出乎意料的收獲，想不到草藥之於釀酒，竟有如此重要之作用編者不同意草藥之如此重要，手術溫度等等不同或爲主因，並且在這裏，我們曾經觀察到，其成績的好壞，多半在於糖化，這種對糖化促進功能之發生緣因，至少可能有二條途，或由於對酵素本身之活化，或在乎刺激菌類生長，以增加酵素之總量，所以我們又分別加以測定之。

取苞穀粉若干，加水五倍，煮成濃粥，每取 70 公分爲一份，入一 100 公撮小三角瓶中，共有四瓶，其一不加任何物質，其二光加草藥 1 公分，其三加 Rh. chedah 8，無藥米糠麴 3 公分，其四除加麴外，更加草藥 1 公分，然後以水稀釋至100 公撮，保

溫60度，糖化6小時，過濾得清液，供酶活力測定還原力，結果如下表四：

表四　草藥對糖化酶活力之影響

處理號數	1	2	3	4	standard
比色計中之讀數	11.0	12.0	27.5	26	[illegible]
殘留Cu⁺⁺量%	89	83	42	38	[illegible]
已被還原之Cu量%	11	17	58	62	[illegible]
因麩面生之還原力	0	0	47	45	[illegible]

可見草藥本身，對糖化酶素，沒有直接促進麩皮之糖化的功能。

又取小三角瓶二個，各裝等量之上蒸麩皮，其一更加入[illegible]之混合藥粉，各經充分殺菌後，接入 Ku. oryzae 3，保溫培養，一週後取出麩皮洗淨後，乾燥稱重，結果如表五所示：

表五　草藥對于微生物生長之影響

處理	加藥	無藥
菌絲重量	0.[illegible]4	[illegible]

由此可見因草藥之添加，能使菌絲發育增加[illegible]。我們知道小麥之蛋白質不完整，幸少缺乏 Tryptophane[illegible]，由此各藥粉性為微菌之有益營養物質，[illegible]中也缺乏種種微菌生長素，如 Factor in potato, factor in peptone[illegible]。因此一般穀粒般須在種子未發芽時含生長素量很多，少生長素。如此推測，還原糖之產生起源糖化酶之生長，一定由于這些因素所致。

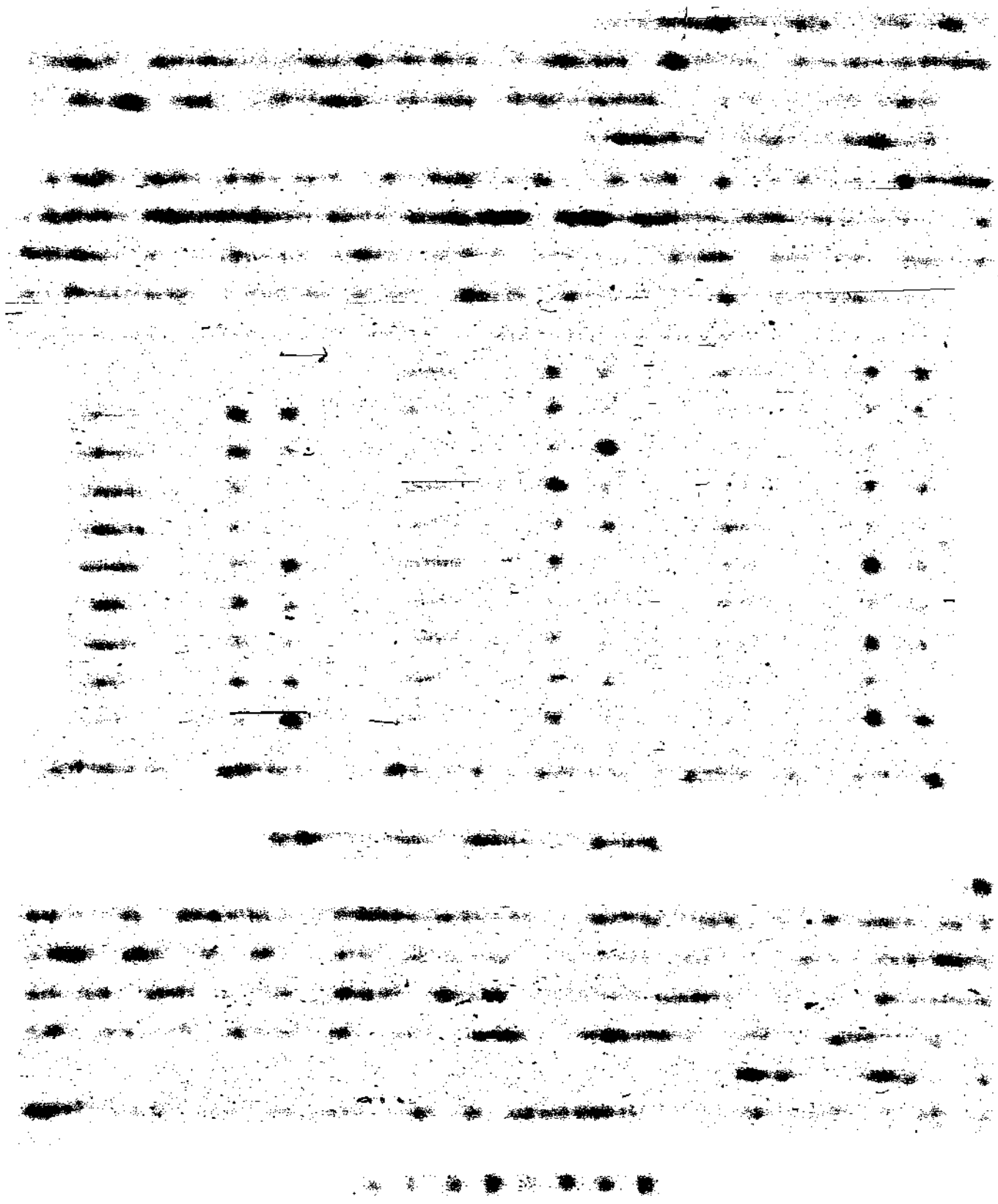
我們未曾對酵母及生酸菌，作輔助生長影響試驗，結果都是正方的結論，由此可見草藥能補玉米營養之不足，使各種菌生長良好。在發酵之製造上，似對糖化酶一節，收效最為宏大。

五　改良試驗

綜觀上述，作者以為土法製麴在發酵之技術，有幾點值得研究改良的一個——是下優良純種菌之引用。第二在於如何減弱（除曲酸）之產生。第三在于動力之[illegible]。茲就初步粗放試驗結果，已證為相當成績者，述之如後。

(1) 優良純種之採用。[illegible]我們[illegible]，在[illegible]環境，應該是不會發生多大問題的。在發酵方面，為消除除曲酸[illegible]上之困難，而且對玉米澱粉之糖化能力，為達這個目的，我們曾收集過廣州市場二十[illegible]，經過種種之分離。結果自黃平巷麴子中發得 Ku. oryzae chodat 3。關于產生[illegible]

[redacted]



[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[redacted]

酵母生長素

方心芳

第一節 生長素發見之前後

(一) 巴斯德到韋爾狄

巴斯德氏[illegible]人類對酵母知識[illegible]後，酵母是否為生物與[illegible]定，其營養問題，歷[illegible]不[illegible]。巴氏[illegible]酵母為生物，且知酵母所需要的養料分三種：糖、含氮化合物及無機物鹽(ash)。含氮化合物叫作用整個之蛋白。換言之，酵母能用蛋白作養料，合成所有需要的含氮物。當時巴氏將10公分的蔗糖，1公分的酵母灰(無機物)及0.1公分的酒石酸鹽，溶于100公分的水中。接種一過針頭大小的酵母。24至36小時，已有氣泡生出，表明酵母已經繁殖。這二次培養液更為混濁，氣泡亦多，液底沉澱白色酵渣。在顯微鏡下觀察此沉渣，知為酵母細胞。膨大，透明且無顆粒，長不都是少壯的酵母。過數日後，細胞生組織回縮老態。分析培養液中蔗糖，知消耗甚多。因此，巴氏認為酵母在無機鹽化合物液中充分生殖。可是巴氏曾用酒麻汁、甜菜汁等培養酵母，不成發酵作用。但酵母繁殖現象與酒同，發酵提早12至24小時開始。不久，Milion氏發表，謂巴氏培養液中糖的減少，酵母消失，乃聚液底中。Duclaux氏(1864)為非議，謂巴氏之說。Mayer氏(1869)也研究酵母之氮素代謝作用，結果與巴氏者相同。

Liebig氏(1871)曾報告試用無機鹽及蛋白質，培養酵母，極不繁殖，無發酵作用。乃以酵母定酵母蛋白質含氮百分之[illegible]。可信此論未為時人所信。

Naegeli氏(1879)，[illegible]酵母於蔗糖及無機鹽中，通入空氣，24小時後得到12倍[illegible]。此酵母比一般的啤酒酵母含油多，含氮物少，且發酵力弱。

[illegible] Delft[illegible]大學教授 Beijerinck氏(1894)指出Schizosaccharomyces octosporus[illegible]，以蔗糖為大多[illegible]養之，繁殖不佳。消化蛋白(Peptone)比較合適，發酵作用中間化合物較好。這試驗指明有些酵母于自礦鹽化合物存在下，不能正常繁殖。

自巴斯德發現用無機鹽溶液培養酵母後，四十年的歷程中沒有之不顯。且用這無機鹽溶液和之合成法，作了許多嘗試的研究，供給出食糧的知識。可是，Liebig氏的報告深深地印在學者的心中，使之不敢嘗試。到1901年 Wildiers 氏再發現[illegible]，[illegible]。

(二) 韋爾狄氏發現生長素

1901年韋爾狄(Wildiers)氏報告，說明酵母心目不得不公認與巴氏[illegible]不[illegible]。以為在無機鹽溶液中，酵母不能正常生殖(最高度的增殖)。

原來韋氏在比國魯文大學，Iule 教授研究室內，專究酵母合成有機磷化合物問題。用無機鹽及蔗糖培養酵母 Saccharomyces cerevisiae I Hansen（近人稱此型酵母爲 Saccharomyces Wildiersii 或 Wildiers' yeast，譯爲韋氏酵母菌）。但將培養液內各種無機鹽成分減至最少量，且接種微量的酵母，探其究竟。接種微量酵母于此無機鹽及蔗糖液中，酵母不繁殖，且液底無沈渣，指明酵母未曾繁殖。可是接種同量的酵母于麥芽汁中，發酵旺盛，沈渣亦多。若接種多量酵母于無機鹽及蔗糖液中，酵母即繁殖發酵。這現象使韋氏不滿原來研究目的，而改究合成液不適于酵母生長之原因。

Wildiers 氏作了許多試驗，使他相信麥芽汁及酵母細胞中含一特別物質，有促進酵母繁殖的效能。因此他用水 200 公撮，蔗糖 20 公分，硫酸鎂、氯化鉀、氯化鈉及磷酸二鈉共 0.05 公分，硫酸鋅 0.01 公分配的合成液，取 125 公撮入小瓶中，殺菌備用。另將上述酵母菌接種麥芽汁內，繁殖後搖勻，用吸管取出，滴入各小瓶中。置小瓶于28度下培養之。一天後小瓶重量，減輕量隨爲糖變成酒，同時產生 CO_2 逸于大氣內的重量。培養5天後，接種2滴酵母的小瓶，重量不減，或減輕很少。而接種5滴者，減輕量在5至5.5公分之間。可是同一情形，先加入酵母三滴，殺菌後再接種二滴的小瓶，5天後二瓶減輕量與一開接種酵母5滴者相同（5～5.5公分）。這指明接種多量酵母，非因生活細胞多且發酵力強，乃因酵母細胞多，吸入某物質富，致酵母生殖旺，發酵力強。麥芽汁內含此物質，接種微量酵母，亦能繁殖發酵。巴斯德曾說，酵母能在無機鹽及蔗糖液中繁殖者，即在接種酵母多，證明此物。韋爾狄氏名此存在于麥芽汁及酵母細胞內之酵母正常生活所必需的東西，爲 Bios，意思生活必需質，吾人譯爲酵母生長素。

酵母生長素是促進酵母繁殖的物質。

關于 Bios 的性質，韋爾狄氏也氏基不少。可惜天不假年，未竟全功。韋氏知Bios 的性質爲：

（1）溶于水

（2）不溶于純酒精及醚中，但溶于80%的酒精液。

（3）不存在于酵母灰中，故非無機物。

（4）5% H_2SO_4 煮半小時，Bios 不失作用。20% H_2SO_4 才能毀滅之。

（5）1% NaOH 煮半小時，Bios 作用消失。

（6）醋酸鉛不能使之沈澱。

（7）可以通過瓷濾器，羊皮紙，故知 Bios 分子不大。

（8）胃汁，消化蛋白及麥芽汁內都含有之。

（三） 生長素之討論

不論韋爾狄氏怎樣抱歉，發現了與巴斯德學說不相符合的事實。無論是守巴斯德學說的固執，還是不能原諒他。奔起反對，乃意中事。或說韋氏觀察錯誤，酵母能在無機

鹽及蔗糖液中正常生長。或說韋氏無機鹽蔗糖液中有毒質，故酵母不生殖。或說外圍條件影響酵母在合成液內繁殖，非 Bios 之故。不過也有不具成見，技術觀察銳利的學者，復證韋爾狄氏報告之正確。

（1）無生長素說

Henry氏(1902)曾用韋氏培養液，分別試驗五種酵母，結果繁殖均佳。Mac Donald氏(1921)等用另一種合成液培養三種酵母，生長優良。故斷定酵母不需外加Bios于合成液後，才能正常生長。Ide (1921) 辯駁他們說：酵母迅速繁殖，須于合成液內加生長素，否則繁殖甚慢。有生長素時，酵母發酵蔗糖力量較無生長素時要大 30 倍。Mac Donald 氏等的結果，概由所用酵母不純所致。我們覺得接種量多，或亦為原因之一。

（2）毒物說

反對韋氏學說最早的，當然應屬于巴斯德學院的人。Ferubach氏(1901) 先起辯論，乃意中事。此公承認韋氏在無機鹽蔗糖液中培養酵母，接種微量，酵母不繁殖的事實。但是他的解釋與韋氏不同。Ferubach 氏以為韋氏所用蔗糖內含一種毒物，能致酵母以死傷，因之繁殖不旺。若接種多量酵母，則酵母死傷一部分，殘餘細胞尚能繁殖。故無所謂生長素之為物的存在。可是他承認合成液只適于黑麴菌，對酵母則不適當云。

德國的 Windisch氏(1902) 更試出水中有銅質。銅與酵母細胞內蛋白質成洗澱物，致酵母于死命。製蔗糖時加入之變色劑 Ultra-marine,也有毒酵母之事實。故Windisch 氏即用 Nägeli 氏之微衡反應（Oligodynamic Reaction）解釋曰：有的毒物1公分溶于數公升水中，能殺死活細胞。這是毒質與細胞質起化學反應所致。另一類毒物，能于數百萬分之一之淡液中殺死細胞。這出于一般化學範疇，即 Nägeli 氏之微衡反應所致。水中微量銅之殺死細胞，即屬此類。Chrzaszcz 氏 (1904) 及 Delbrücke 氏 (1908) 有類似的意見。可是 Bokorny氏(1907) 更有解說。微量無機毒如銅者，能殺死少數細胞。細胞若多，當有超生者。且銅少而分配于多數細胞，致毒性減輕，而不至細胞于死地。有機物存在，先與銅結合而成無毒物。故合成液中加麥芽汁等後，酵母即不被毒而旺盛繁殖也。

此毒物說學派，雖為法德專家領導，來向小國青年學者進攻。結果只有偃旗息鼓，自認敗北。生長素的存在，不因強國名人而消失。雖然，毒物派對微量毒物如銅者與酵母之關係，多有闡明，于酵母學不無供獻。

（3）環境說

Pringsheim 氏 (1906)以為需生長于天然汁液中的酵母，驟然移植于無機鹽蔗糖液中，因環境轉變，不適生存。若接種多量酵母，死亡細胞可能分泌出一種蛋白質物，與後生者以養料。且後者諸漸習慣于合成液中，則繁殖即可加快。可是Ide 氏 (1906)即以試驗結果辯駁之。蓋彼植酵母于合成液中，數週乃至數月後未見酵母習慣于內，迅速生殖。Henneberg氏(1907)連續接種酵母于合成液內，起先生長，後即無繁殖表現。更

足證明酵母不能于短期內，習慣繁殖在無機鹽及蔗糖液中。Mac Donald 氏 (1921)等先說酵母可正常繁殖于合成液內，被 Ide 氏辯倒。又說合成液內加些天然汁液之繁殖加速的原因，非在生長素，乃培養液性質改變所致。如 Fulmer 氏指出粘度之影響是也。Fulmer 氏等 (1921)誠然試出合成液內加膠質如麵精時，促進酵母生長，但怎能抹殺生長素？連 Fulmer 氏也未如此想呢。

Lindner氏(1920) 詳細研究培養液與酵母之關係。他見到 5% 的蔗糖液內，生成由細胞 5 至 6 個組成的芽簇。氧對酵母代謝有大關係。有氧時，細胞含油特多，發芽快，芽簇大。細胞能將其中生成之酒精，變成油脂。故乙醇可爲碳素源養料。明膠尖端之細胞與空氣接觸多，故含油量大。酒精汽也能變爲油脂。酵母能用酒精變爲含油40至50%的生物。但此類細胞失去了發芽作用。此種現象能出現于天然汁與合成液中。若無氧氣，細胞含蛋白質多，空泡大，所生酒精易分泌于細胞之外。細胞內顆粒雖多，但無油脂。總之，有氧細胞繁殖快，無氧細胞生長遲。故 Lindner 氏說，Pasteur 與 Liebig 二氏用合成液培養酵母結果不同者，在通空氣之多少，不在接種量之巨細，更無所謂Bios之存在，只培養方法不同而已。

Lindner氏的話，一部分是對的。氧與酵母繁殖有大關係。茲舉Fernbach氏于1937年國際微菌學會會議中，在酵母代謝組開場白內一節話，作爲本段之評論。他說除生長素外，通空氣也是酵母增殖重要原因之一，且廣汎的應用于酵母製造廠內，Effront 氏法，以通空氣與加新醪維持培養液之成分，則可使澈全變爲酵母體，並無酒精生出。除氧之外，我們相信淺鹼度，可給態氮化合物之濃度等等，都與酵母繁殖以影響。阻害物如酒精與酸等，影響亦大。可是一切的條件俱備，沒有生長素存在，酵母是難達最高生殖率之正常繁殖的。

(4)生長素說

同意韋爾狄氏生長素說最早的，算 Krieger 氏 (1901)，他且指出，含生長素多的液體培養出之酵母，含生長素也多。Amand氏 (1902, 1904)除辯駁法德學者毒物說外，且說酵母能很快的吸收培養液中之生長素，因加酵母于含生長素之液中，搖和濾過，濾液中即無生長素了。並證明 Krieger氏說，酵母細胞含生長素多少，因培養液而異。有的酵母含生長素很多，有的只痕跡耳。

Kossowicz氏(1903)的試驗，與生長素說大有幫助，他測 CO_2，酒精及細胞數，以定酵母 Saccharomyces ellipsoideus Hansen 之生長。先用100公撮韋氏液，接種500個酵母細胞，23至25度下，12天後未生殖，14天後稍生長，但31天生成140百萬個細胞。他換另一種合成液，內加普通商品蔗糖 5%，接種酵母14天後，未見生長，但40天後生成364百萬個。第三次試驗用第二次的合成液，但加純蔗糖。21 天後不生殖，60 天後生成細胞220百萬個。合成液中加 1 至 2 % 的麥芽汁，生長大爲加快。Kossowicz的結果，是商品蔗糖中含有微量之有機性雜質，有促進酵母生殖及發酵作用。但不能說蔗糖以外，

酵母的需要其他有機物才能繁殖，只能說其他有機物有增快生殖的技能。Delvlo氏(1906)有類似的結果：125公撮合成液接種酵母20天後，每日生CO_2量只0•01至0•05公分耳。可是加入少量麥芽汁等，則48小時後，每日生CO_2量達0•1至0•3公分。彼知生長素爲一含氮物，能被氯化汞及氫氧化銀所沈澱。但其他一般的沈澱劑無作用。

Kossowicz氏(1903)知Penicillium glaucum生酵母生長素。可是Martinand氏(1908)說在好培養液如葡萄汁等內，此微有抑制酵母菌生長作用，此說與前(Müller-Thurgau 1892-3及Behreus 1902)後(如Kossowicz 1911年)學者的結果相同。Amand氏(1904)將Mycoderma與Saccharomyces cerevisiae同種植于合成液中，前者有助後者之生長與發酵。Ide氏(1907)說細菌也有影響。Dzierzbicki氏(1909)加腐蝕土于合成液中，有促進酵母生殖作用。Kurono氏(1915)加Oryzamin于Nägeli或Hayduck氏合成液內，爲量0•01至0•1%，促進酵母菌生殖力量甚大云。

其他學者用各種方法證明酵母菌正常生殖，須有生長素存在，且知酵母生長素有Bios I (Inactive Inositol), Bios II A, (Bios III), Bios II B,(Biotin), Bios V, Bios VII, Pantothenic acid等等種。實際上自維生素確定存在後，攻擊韋爾狄氏學說者，已很少了。

第二節　生長素之研究法

研究生長素，須用一種培養基，除生長素外，含其他菌類所需要之一切養料，作爲基礎。加試料生長素于此基礎培養基，接種微菌，適溫下培養一定時間，用各種方法測驗微菌生殖率，與未加生長素之基礎培養液內生殖率比較，以定生長素之作用。所以試驗生長素之要件，一爲基礎培養基，二爲測驗微菌生殖方法。

(一)　基礎培養基

用無機鹽類溶于蒸溜水內，外加蔗糖或葡萄糖。稱無機鹽蔗糖液或葡萄糖液，或合成液。

蔗糖品質上下不一，一般的商品白糖都含有生長素，不可不加注意。Hall氏(1933)等曾試驗美國各種白糖，所含生長素量大相懸殊。且加酒精于糖溶液內，使酒精成80%的濃度，待糖結晶。此種復結晶純化之糖，理應含生長素量較少，因韋爾狄氏指明生長素溶于80%酒精內也。試驗結果，恰合此理，詳見下表。

10% 白糖液內生成酵母細胞比較數

糖樣	原糖	純化糖	糖樣	原糖	純化糖
1	1•0	1•0	7	27	9•5
2	1•0	1•0	8	31	10•0
3	3•0	1•0	9	34•9	1•3
4	11•3	6•6	10	44	3•0
5	22•6	3•0	11	59	12•0
6	24•0	2•6	12	87•8	1•0

我們曾將中國各種糖類，以活性炭處理過之白糖作標準，加以比較試驗。結果，知紅糖與糖蜜內含多量生長素，飴糖次之，一六公司精糖含量較少。一種舶來品結晶蔗糖，含生長素最最少，然較用炭處理之糖仍多 0•7 倍。以炭處理之糖與無機鹽合成液內生成之細胞數作 1，各種商品糖促進酵母生成細胞如下表。

中國糖類所含生長素之比較

加試料量 公分/公合	炭處理糖	飴糖	紅糖	糖蜜	一六精糖	舶來蔗糖
10	1	4•6	—	—	2•0	1•7
0•4	1	—	3•1	3•0	—	—

這些試驗都證明商品蔗糖內含生長素。從前有許多人試不出酵母需要生長素的原因，所用蔗糖，大有關係。巴斯德與李必希的爭執，或因所用蔗糖不同所致。故試驗生長素時，不得不加以注意也。

合成液中無機鹽的成分，關係亦大。如硫酸鎂之有無，影響生長素効用頗巨。茲詳述之，以示無機鹽與生長素之關係。

用 Fulmer 氏合成液 C 及 Clark 氏合成液（Miller 氏研究室用）研究生長素，所得結果不一。二合成液之成分如下：

Fulmer 氏合成液 C 及 Clark 氏合成液之成分

藥品	Fulmer 氏 C 液	Clark 氏液
水	100 公撮	100 公撮
NH_4Cl	0•188 公分	—
$(NH_4)_2So_4$	—	0•834 公分
K_2HPo_4	0•100	—
KH_2Po_4	—	0•417
$CaCl_2$	—	0•071
$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	—	0•208
蔗糖	10•000	10•000

Fulmer 氏(1921)曾試出硫酸鎂對酵母菌生長無効用，故其 C 液中無此物。1936年彼更作研究。于生長素存在下，C 液不如 Clark 氏液，原因在缺乏硫酸鎂。

硫酸鎂與生長素之關係（以種植細胞數作 1，表內數字爲細胞比數）

生長素	Fulmer 氏 C 液		Clark 氏液
	不加硫酸鎂	加硫酸鎂 0•208%	
白試驗	9	9	1
加Bios I 3•2 公絲/公合	8	9	1
Bios II 2 公絲/公合	5 2	1 9 1	2 4 8
Bios I 3•2 公絲/公合 及 Bios II 2 公絲/公合	5 4	2 8 4	2 5 6

上表指出無生長素時，硫酸鎂無促進酵母生長作用，與前(1921)結果同。BiosII或Bios I 及 Bios II 有促進生長作用，且硫酸鎂能擴大其効用之五倍。

硫酸鎂之量極微，即有協助生素作用之效。下表爲加Bios II之C液，充分表明此點。

硫酸鎂之濃度與促進作用

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(Mol)	無 Bios I 時	有 Bios I 時
0	29	34
8×10^{-6}	44	53
8×10^{-5}	150	157
8×10^{-4}	142	147
8×10^{-3}	172	215
8×10^{-2}	192	313

硫酸鎂之協助生長素作用，硫酸根與鎂都有關係。因硫酸鉀與氯化鎂單獨效用均少，但硫酸銨與氯化鎂合用之效力，等于硫酸鎂者。下表指明此點。（所用之液內已加Bios II，）

硫酸根及鎂鹽與生長素作用之關係

添加之藥品 (0.017 Mol)	Fulmer 氏 C 液		以 $(NH_4)_2SO_4$ 代 NH_4Cl 之C液	
	無 Bios I	有 Bios I	無 Bios I	有 Bios I
白試驗	23	34	47	89
$MgSO_4$	161	257	163	228
$MgCl_2$	30	34	146	204
$Mg(NO_3)_2$	27	31	155	210
K_2SO_4	68	80	—	—
$MgCl_2+K_2SO_4$	153	228	—	—

以前研究生長素時用 Fulmer 氏 F 液者不少。Williams 氏 (1927) 說此液有沈澱生出，不適用于重量測驗酵母生殖法。且無硫酸鎂之存在，亦為其缺點。Nielsen 氏液，頗為合用，請示其成分如下表：

Nielsen 氏液及 Fulmer 氏 F 液之成分

藥品	Fulmer 氏 F 液	Nielsen 氏液
蒸溜水	1000 公撮	1000 撮公
氯化銨	1.880 公分	—
硫酸銨	—	0.60 公分
磷酸一鉀	—	1.00
磷酸二鉀	1.00	—
硫酸鎂	—	0.70
氯化鐵	—	0.10
氯化納	—	0.50
氯化鈣	1.00	0.40
沈澱碳酸鈣	0.40	
蔗糖	100.00	100.00
糊精	6.00	—

（待續）

黃海發酵與菌學

第五卷第一期目錄

第五卷第二期目錄

第五卷第三期目錄

第五卷第四期目錄

第五卷第五期目錄

第六卷第五期目錄

黃海發酵與菌學

第四卷第一期

第四卷第二期

第四卷第三期

第四卷第四期

第四卷第五期

第四卷第六期