

白曲霉工程菌 TR12 循环转化酒精废液研究*

向文良 张文学** 乔宗伟 胡承

(四川大学轻纺与食品学院 成都 610065)

摘要: 在含固体残渣 8% 的酒精废液中, 加入尿素 2 g/L、玉米浆 2 mL/L, 经接种白曲霉基因工程菌 TR12 菌株, 在 32℃ 摇床培养 70 h 后, 可获得含糖化酶 246 U/mL 和耐酸性 α -淀粉酶 13.42 U/mL 的转化液。转化液直接循环利用于无蒸煮酒精发酵配料工序, 不仅不影响酒精生产的产量和质量, 而且能有效地减轻环境污染压力, 节约水资源, 降低生产成本。

关键词: 酒精废液, 微生物转化, 转化液回用

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0026-04

Study on the Condition of Cyclic Transformation of Ethanol Distilled Wastewater by Genetic Engineering Strain TR12

XIANG Wen-Liang ZHANG Wen-Xue** QIAO Zong-Wei HU Cheng

(College of Light Engineering and Foodstuff Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract: Five grams of urea and two milliliters of corn syrup were added into 1 liter ethanol distilled wastewater with 8% solid dregs. The activity of acid-resistant α -amylase and glucoamylase produced by inoculated *Aspergillus kawachii* genetic engineering strain TR12 in the transformed liquid reached a level of 13.42U/mL and 246U/mL respectively after fermentation at 32°C by the shaking flask for 70 hours. The transformed liquid was circularly applied to the ethanol ingredient process without cooking room, not only it didn't influence the ethanol output and quality, but also it could efficiently reduce the pollution of ethanol distilled wastewater and the cost of ethanol production.

Key words: The ethanol distilled wastewater, Transformed by microorganism, Re-use of the transformed liquid

酒精厂废液的处理, 一直是制约酒精发酵的障碍之一, 是酒精行业环境保护的一大课题。我国的酒精发酵工业年产酒精约 3.6×10^6 t, 年排放蒸馏废液约 5.4×10^7 t^[1]。这些废水一般经简单处理后, 直接排放到河流, 对环境造成了极大的污染。

鉴于此, 我们从高效节能、降低污染物的目的出发, 利用基因工程技术获得了一株白曲霉 (*Aspergillus kawachii*) 工程菌株 TR12。由于该菌株含有多拷贝耐酸性 α -淀粉酶和糖化酶的融合基因, 在摇瓶培养条件下, 不仅可以直接利用酒精废水中的有机物质生长繁殖, 大幅度降低废水的 COD 和 BOD, 而且更重要的是转化液中大量的糖化酶和耐酸性 α -淀粉酶可望在无蒸煮酒精发酵工艺中得到有效的利用。因此我们在废液的转化条件和循环利用方面开展了一些研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 白曲霉 (*Aspergillus kawachii*) 工程菌株 TR12^[2], 本研究室保存。

* 教育部留学回国人员启动基金 (No.2000-367)

** 联系人 Tel: 028-88962069, E-mail: xwlm7687@sina.com

收稿日期: 2003-08-19, 修回日期: 2003-11-13

1.1.2 酒精废液：由四川绵竹酒精厂提供的木薯酒精蒸馏液，4℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化：从4℃保藏菌种斜面上挑取适量孢子，涂布接种于淀粉培养基^[3]茄子瓶斜面上，在35℃培养4~5 d后，低温保存备用。

1.2.2 种子的培养：在250 mL的三角瓶中加入40 mL种子培养基^[3]和玻璃珠数粒， 1×10^5 Pa灭菌15 min，冷却到32℃左右，按10%比例接入 7×10^4 个/mL孢子悬液，在200 r/min旋转摇床上35℃培养24 h。

1.2.3 发酵培养条件的确定：不同固体残渣含量，不同pH值和添加不同氮源的废液30 mL分装于250 mL的三角瓶中，添加玉米浆2 mL/L和玻璃珠4粒/瓶， 1×10^5 Pa灭菌15 min，冷却后加入10%种子培养液，在200 r/min旋转摇床上32℃培养，选择最佳的废液转化条件。

1.2.4 酒精发酵：采用无蒸煮酒精发酵工艺法^[4]。

1.3 测定方法

1.3.1 转化液酶活力的测定：耐酸性 α -淀粉酶活力测定参照QB1805.1-93工业用 α -淀粉酶制剂的测定方法^[5]，调节0.2 mol/L醋酸缓冲液至pH3.5^[6]。糖化酶活力测定采用QB1805.2-93工业用糖化酶制剂的测定方法^[5]。

1.3.2 酒精度的测定：常规蒸馏后采用比重法测定。

2 结果与讨论

2.1 酒精废液的特性及分析测定

用于微生物转化的木薯酒精废液呈淡褐色，略有酸味，化学测定结果（3次数值平均）如表1所示^[7]。

表1 木薯酒精废液的理化性质

COD _{cr} (mg/L)	BOD ₅ (mg/L)	总氮 (mg/L)	总糖 (mg/L)	氨基氮 (mg/L)
25,400	13,800	1,095	1,553	611
还原糖 (mg/L)	固形物 (V/V)	灰份 (mg/L)	pH值	
325	0.17	600	3.7	

由表1可以看出，木薯酒精废液的BOD₅和COD_{cr}值较大，且废液的BOD₅/COD_{cr}值约为0.54，属于可生化转化类型^[8]。废液中较高浓度的氮、碳化合物为微生物降解或转化提供了可能。

2.2 不同的固体残渣物含量对TR12产酶的影响

将酒精废液调配成固体残渣物含量（体积比）为0%、8%、16%和24%的系列，分别添加2 mL/L的玉米浆，制备成发酵培养基后，接种，发酵72 h。转化液中酶活力的测定结果见图1。

由图1 A和B可知，8%左右的固体残渣物含量是TR12菌转化酒精废液时最为合适的固体残渣物浓度；当固体残渣物含量低于8%，经表观观察，虽然不影响菌丝的良好生长，但营养成分的不足或者不平衡使TR12产酶量不大。当固体残渣物浓度高于8%时，菌丝的正常生长繁殖和产酶都受到影响。

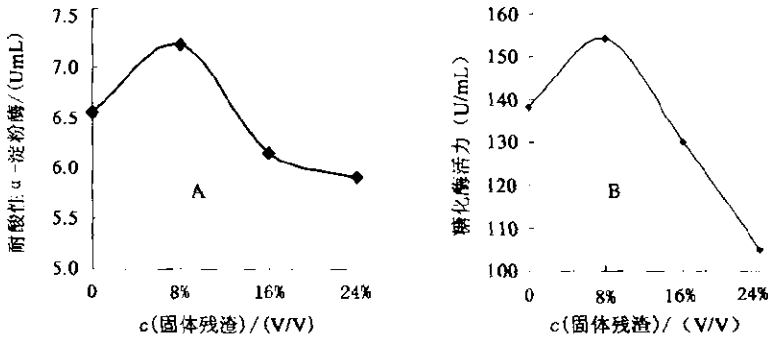


图1 不同浓度的固体残渣物含量对转化液中酶活力的影响

2.3 不同浓度氮源的添加对 TR12 产酶的影响

从酒精废液的营养结构和白曲霉的营养特性出发,考察添加不同浓度的氮源对白曲霉工程菌 TR12 转化酒精废液的影响。实验在 2.2 的最佳条件下,添加浓度 0.0 g/L、2.0 g/L、5.0 g/L、10 g/L 的 NaNO₃、NH₄NO₃ 和尿素 3 个系列。发酵 72 h,分别测定转化液中耐酸性 α-淀粉酶和糖化酶的活力,结果见图 2。由图 2 的 A 和 B 图可以看出:当酒精废液中添加氮源时 TR12 产酶增效明显。在 3 种氮源物质中,以尿素的添加效果最为明显。在尿素添加量 2 g/L 时,转化液中耐酸性 α-淀粉酶活力为 12.01 U/mL、糖化酶活力为 281 U/mL。因此选用添加浓度 2 g/L 的尿素作为添加氮源比较合适。

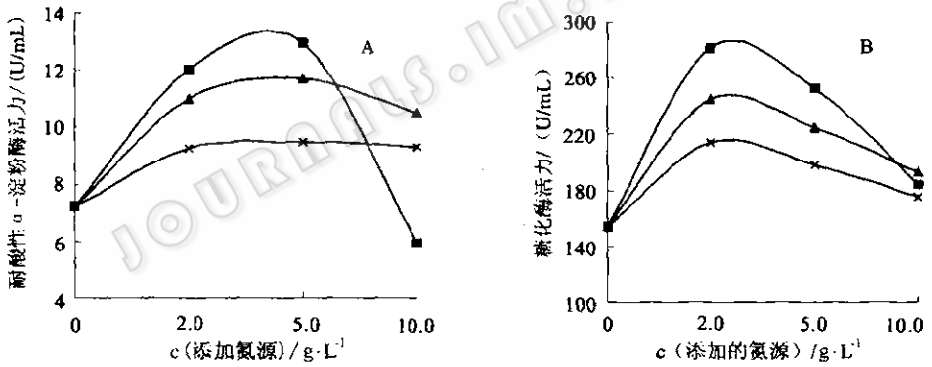


图2 不同的氮源及浓度对转化液中酶活力的影响

■ 尿素, ▲ 硝酸铵, × 硝酸钠

2.4 酒精废液转化的最适初始 pH 值的选择

在上述实验 2.2、实验 2.3 结果的基础上,通过柠檬酸调节 pH3.0、4.0、5.0 3 个不同的酸性发酵环境,测定转化液中耐酸性 α-淀粉酶和糖化酶活力,结果如图 3 所示。

白曲霉生长繁殖的适宜 pH3.0~6.0。实验观察到,TR12 菌丝的生长随初始 pH 的升高而增长迅速。但初始 pH 对 TR12 产耐酸性 α-淀粉酶影响不及对糖化酶影响大。当 pH4.0 时转化液中糖化酶活力最高,耐酸性 α-淀粉酶活力趋于最高值。由于酒精废液的 pH 约为 3.7,适合霉菌的生长,与产酶的最适初始 pH 4.0 也比较接近。当不调节废液的 pH 时,转化液中的耐酸性淀粉酶和糖化酶活力分别为 12.95 U/mL 和 253.6 U/mL,因此在发酵实验中不用调节 pH。

2.5 最适发酵周期

按上述实验 2.2~2.4 的结果进一步对废液转化的最适终止发酵时间进行了考察。

从培养 66 h 开始, 每隔 4 h 测定转化液的酶活力, 其变化情况如图 3。

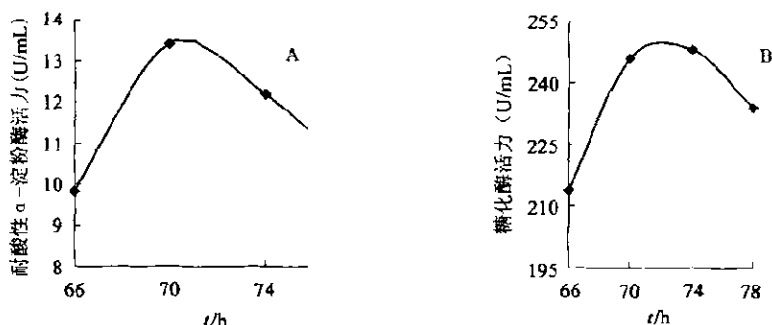


图 3 发酵时间对转化液中酶活力的影响

由图 3 中 A 图和 B 图可以看出, 培养 66 h 后, 随着发酵的进行, 酶活力逐渐增加。当发酵达 70 h, 转化液的耐酸性 α -淀粉酶和糖化酶都达到了最高, 分别为 13.42 U/mL 和 246 U/mL。在 70 h 后, 随着发酵的进行转化液的酶活力也逐渐降低, 同时实验中观察到菌丝也开始自溶, 发酵液开始变成淡黑褐色, 粘度下降。因此可由发酵液的颜色变化判断发酵终点约为 70~72 h。

2.6 转化液回用于无蒸煮酒精发酵工艺

实验分 A、B 两组进行, A 组采用无蒸煮酒精发酵工艺, 参见池振明等^[4]人的方法。B 组采用与 A 组相当酶活单位的普通 α -淀粉酶和糖化酶, 分别在 65℃, pH6.0 液化、60℃, pH4.5 糖化后, 添加酵母发酵。实验结果表明, A 组 3 瓶平均乙醇收率为 49.44 mL/100 g 玉米粉; B 组 3 瓶乙醇平均收率为 50.24 mL/100 g 玉米粉。A 组蒸馏后的废液进入上述的工程菌 TR12 转化和酒精发酵循环, 经过 6 个循环周期, 发现 A 组每次酒精收率的变化在 0.5% 内。由于 A、B 两组的产酒精能力无明显差异, 可见采用工程菌 TR12 转化酒精废水后, 其转化液回用酒精生产是完全可行的。

3 结论

根据以上的实验结果, 在粗滤后含固体残渣物 8% 的木薯酒精废液中, 添加 2 g/L 的尿素和 2 mL/L 的玉米浆后, 经接种 10% 的工程菌 TR12 孢子悬液, 在 200 r/min 摇床上 32℃ 培养 70~72 h 可以使酒精废液得到有效转化。利用转化液生产酒精可以在同一 pH 环境下液化和糖化, 这不仅能确保酒精生产质量, 简化了生产工艺, 降低了生产成本, 而且利用工程菌 TR12 菌株循环转化酒精废液, 还可以实现企业低废排放, 使企业获得良好的经济效益和社会效益。

参考文献

- [1] 陈德兆. 无锡轻工业学院学报, 1994, 13 (2): 119~123.
- [2] 张文学, 木田建次, 森村茂, 等. 酿酒, 2001, 28 (1): 66~70.
- [3] 刘春莉, 张文学, 杨 瑞, 等. 四川大学学报 (工程科学版), 2003, 35 (1): 63~65.
- [4] 池振明, 刘自谔. 生物工程学报, 1994, 10 (2): 130~134.
- [5] 江锡瑞, 段 钢. 新编酶制剂实用技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 383~409.
- [6] Morinura S, Zhang W X, Ichinura T, et al. Journal of the Institute of Brewing, 1999, 105 (3): 309~314
- [7] 胡 承. 四川大学学报 (自然科学版), 2001, 38 (2): 269~273.
- [8] 徐亚同. 上海化工, 2000, 23 (15): 40~42.