

# 利用工业废水培养发酵性丝孢酵母的研究

张 纪 忠

(复旦大学生物系微生物学教研室, 上海)

牟家玲 薛永斐 陈 德 晋

(上海溶剂厂, 上海) (上海药用辅料厂, 上海)

为了开辟新的饲料来源, 我们进行了发酵性丝孢酵母  $C_{59}$  号菌株的研究, 在实验过程中并以白地霉菌株  $C_3$  作为对照, 来探讨发酵性丝孢酵母在工业上应用的可能性。本文主要报道发酵性丝孢酵母的筛选、鉴定、摇瓶发酵条件和 500 升发酵罐的扩大实验结果。

## 材 料 和 方 法

### 一、菌株

从全国有关单位收集到与白地霉比较近似的 50 株菌株。它们分别属于下面四个属: 丝孢酵母属 (*Trichosporon*), 拟内孢霉属 (*Endomycopsis*), 假丝酵母属 (*Candida*), 和地霉属 (*Geotrichum*)。上述菌株分别用上海溶剂厂的丙酮丁醇废水, 上海药用辅料厂的淀粉废水, 上海豆制品厂的废水培养并筛选。

### 二、斜面培养基

1. 麦芽汁琼脂培养基: 用于菌种的保存。
2. 葡萄糖蛋白胨琼脂培养基: 用于扩大试验培养种子。其培养基成分为(重量/体积): 工业葡萄糖 2%, 蛋白胨 1%,  $MgSO_4 \cdot 0.1\%$ ,  $KH_2PO_4 \cdot 0.1\%$ , 琼脂 1.8%, 工业废水 100 毫升, pH5.5。

### 三、摇瓶培养基

摇瓶培养基的成份同葡萄糖蛋白胨琼脂培养基(但不加琼脂)。

### 四、摇瓶培养方法和分析方法

(一) 摇瓶培养的方法和菌体的制备

在 500 毫升三角瓶中装 50 毫升培养液, 灭

菌后, 接入已长好的菌株斜面一支。在 28—30℃, 于往复式摇床上培养 14—16 小时, 做为一级摇瓶发酵种子。摇床振幅为 10 厘米, 频率为 110 次/分钟。再将种子以 5% 的接种量, 接入已消毒的并装有 50 毫升培养液的 500 毫升三角瓶中。在 28—30℃ 培养 14—16 小时后, 用 100 目尼龙绢布过滤发酵液, 挤干滤渣置 95℃ 左右的烘箱中烘 5—6 小时, 直至恒重。计算每 100 毫升发酵液中所含干菌体克数。

(二) 菌体核酸含量的测定和菌种鉴定方法

菌体的核酸含量测定, 包括 RNA 和 DNA, 采用碱水解分析法<sup>[1]</sup>。菌株的鉴定按文献[2,3]进行。

## 试 验 结 果

### 一、菌株的筛选结果

用上述三种工业废水做为原料, 以产干菌体量和核酸含量为指标对 50 株菌进行筛选。并用白地霉  $C_3$  菌株作对照。实验表明, 其中  $C_{59}$  号菌株的干菌体产量和菌体内核酸的含量与  $C_3$  菌株接近。结果见表 1。

结果表明, 同一株菌利用不同的废水, 干菌体产量不同, 核酸含量也有差别。但  $C_3$  和  $C_{59}$  号菌株的干菌体产量和核酸含量均较为接近。

### 二、 $C_{59}$ 号菌株的鉴定

(一) 形态与培养特征

$C_{59}$  号菌株在由葡萄糖、酵母膏、蛋白胨和玉米粉组成的液体培养基上生长时, 真菌丝发达、分隔、并具二分叉, 形成大量二端圆钝的节

表 1 C<sub>99</sub>号菌株和 C<sub>9</sub>号菌株产干菌体量和核酸含量的结果

菌株	原料 测定项目、水平	豆制品厂废水				淀粉废水				丙酮丁醇废水			
		最终 pH	干菌体 量 (克/100 毫升)	RNA (%)	DNA (%)	最终 pH	干菌体 量 (克/100 毫升)	RNA (%)	DNA (%)	最终 pH	干菌体 量 (克/100 毫升)	RNA (%)	DNA (%)
C <sub>9</sub> (对照)		6.7	0.85	6.54	1.02	3.5	1.40	7.90	1.07	6.2	1.04	5.40	1.03
C <sub>99</sub>		6.4	0.82	6.30	1.01	3.5	1.00	7.20	1.40	6.7	1.25	5.40	0.90

孢子,亦能形成少量芽孢子,菌落结构疏松,呈绒毛状。在醋酸钠琼脂、Gorodkova 琼脂、玉米粉琼脂、马铃薯块和石膏块上均未见子囊孢子。

### (二) 生理生化试验

C<sub>99</sub>号菌株能发酵葡萄糖、半乳糖。不发酵蔗糖、麦芽糖、木糖、山梨糖、棉子糖和乳糖。C<sub>9</sub>号菌株同化葡萄糖、半乳糖、山梨糖、木糖、鼠李糖、肝糖、乙醇、赤藓醇、甘油、阿东醇、琥珀酸和柠檬酸。不同化麦芽糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、蜜二糖、松三糖、菊糖、阿拉伯糖、纤维二糖、核糖、棉子糖、肌醇、水杨糖苷、 $\alpha$ -甲基葡萄糖苷。D-阿拉伯糖和 L-阿拉伯糖。

C<sub>99</sub>号菌株不分解杨梅苷 (Arbutin)。不同化硝酸钾。最适生长温度 25—34℃。最高生长温度 36—38℃。

根据以上鉴定结果,该菌株的形态、培养特征和生理生化的特征均与娄德氏 (Lodder.) 所描述的发酵性丝孢酵母的特征相似<sup>[2, 3]</sup>。故将 C<sub>99</sub>号菌株定名为发酵性丝孢酵母 (*Trichosporon fermentans*) C<sub>99</sub>。

### (三) C<sub>99</sub>号菌株摇瓶发酵条件试验结果

1. 不同发酵 pH 对干菌体产量和核酸含量的影响:

以丙酮丁醇废水为原料,不同 pH 的发酵液对 C<sub>99</sub>号菌的菌体量和核酸含量的影响结果见图 1。

从图 1 可看出,C<sub>99</sub>号菌株产干菌体量的最适 pH 为 5.5—6.5,其核酸含量在发酵 pH 6 时最高。

2. 不同发酵时间对干菌体产量和核酸含量的影响:

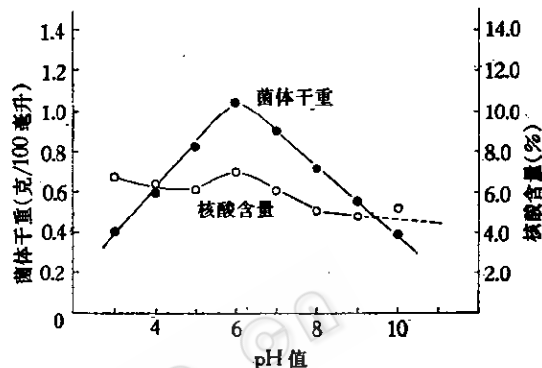


图 1 不同 pH 的发酵液对 C<sub>99</sub>号菌株的干菌体量和核酸含量的影响

C<sub>99</sub>号菌株在不同的发酵时间,其干菌体产量和核酸含量的结果见图 2。

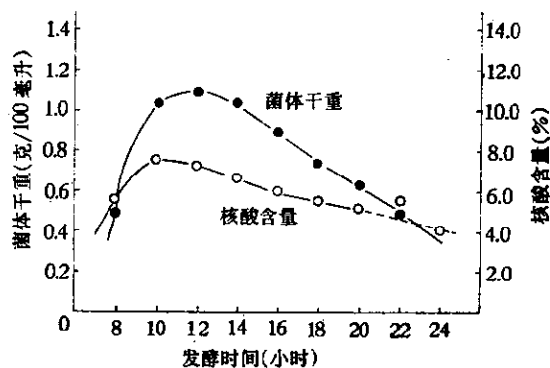


图 2 不同发酵时间对 C<sub>99</sub>号菌株的干菌体产量和核酸含量的影响

图 2 表明,C<sub>99</sub>号菌株最适发酵时间为 10—14 小时。此时干菌体产量最高。而菌体的核酸含量,则在发酵 10 小时左右最高。

3. 不同的发酵温度对 C<sub>99</sub>号菌的干菌体产量的影响:

C<sub>99</sub>号菌株在不同发酵温度对干菌体产量的影响结果见图 3。

表2 不同的通气量对 C<sub>99</sub> 号菌株的干菌体产量和核酸含量的影响

培养基体积 (毫升)	最终 pH	干菌体量 (克/100 毫升)	RNA (%)	DNA (%)	核酸含量总量 (%)
30	7.0	1.70	6.80	1.00	7.80
50	7.0	1.50	6.70	1.04	7.14
80	6.4	1.56	6.50	0.98	7.48
110	6.4	1.20	6.60	1.15	7.75
140	6.4	1.07	6.65	1.10	7.71

表3 C<sub>99</sub> 号菌株在 500 升罐深层培养试验结果

发酵时间 (小时)	发酵 pH	培养温度 (°C)	菌体生长情况	菌体湿重 (克/100 毫升)	菌体干重 (克/100 毫升)	核酸总量 (%)	蛋白质 (%)	其它
0	5.8	33						
4	5.4	30	少量菌体	1.5				
5	5.4	30	菌体较多粗壮	2.5				
6	6.4	33	菌体较多粗壮	2.8				
7	6.8	32	菌体较多粗壮	3.0				
8	7.0	30	菌体较多粗壮	3.2				
10	7.5	30	菌体较多粗壮	4.5	0.85	7.4	51.24	加温 补料 补料
12	6.0	30	菌体稍细并开始有节孢子	3.5	0.70			
14	6.5	30	菌体色淡节孢子多	3.8	0.71			
16	6.5	30	少部分菌体出现自溶	4.0	0.75			
18	7.0	30	少部分菌体出现自溶	3.7	0.70			
20	7.0	30	大部分菌体出现自溶	3.2	0.60			

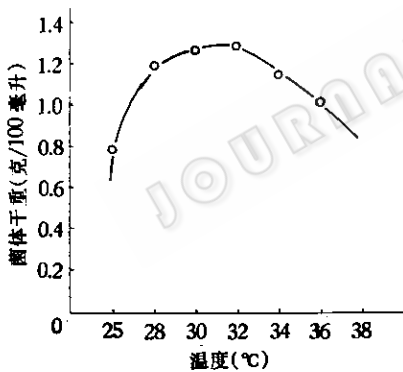


图3 不同发酵温度对 C<sub>99</sub> 号菌株的干菌体产量的影响

图3表明, C<sub>99</sub> 号菌株的最适发酵温度为 28—34°C, 此温度范围内发酵干菌体产量最高。

4. 不同的通气量对 C<sub>99</sub> 号菌株的干菌体产量和核酸含量的影响:

本试验采用 500 毫升三角瓶装不同体积的培养液, 做为不同的通气量的比较。结果见表 2。

表 2 表明, C<sub>99</sub> 号菌株的干菌体产量随通气量的增大而增加。而菌体的核酸含量与通气量

没有完全一致的对应关系。

5. C<sub>99</sub> 号菌株在 500 升发酵罐的试验结果:

C<sub>99</sub> 号菌株在 500 升发酵罐上的试验结果见表 3。

表 3 表明, C<sub>99</sub> 号菌株能利用丙酮丁醇废液中的营养物质, 做为菌体的生长能源。发酵进行 10 小时每 100 毫升培养液可得干菌体 0.85 克, 其核酸总量为 7.4%, 蛋白质含量为 51.24%。

## 讨 论

1. C<sub>99</sub> 号菌株的最适培养时间在 10—14 小时之间。若延长培养时间, 除菌丝形成大量节孢子外, 还会出现菌体的自溶现象, 干菌体产量也随之下降。500 升发酵罐上的扩大试验的趋势, 与摇瓶发酵的结果是一致的。

2. 在发酵过程中, C<sub>99</sub> 号菌株能耐受 36°C 左右的高温。发酵周期一般为 10 小时左右, 而白地霉最高能耐受 32°C 高温, 其发酵周期为 14—16 小时。因此, 发酵性丝孢酵母 C<sub>99</sub> 号菌株较白地霉更具有工业化生产的有利条件。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] David, Glick: *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 1, p. 287. 1957, vol. 6, p. 1. 1958, vol. 14, p. 113. 1966.
- [ 2 ] Lodder, J. et al.: *The yeast. A taxonomic study.*

North Holland publishing, Co., Amsterdam, Holland, 1952, p. 6—34, p. 613—644.

- [ 3 ] Lodder, J. et al.: *The yeast. A taxonomic study.* North Holland publishing, Co., Amsterdam, Holland, 1970. p. 34—107, p. 1309—1352.