

糖蜜酒精废液发酵生产单细胞蛋白的研究

方霭祺 李 萍 万 丛 林
(云南省微生物研究所) (云南建水糖厂)

楼纯菊 周元吉 张 颖
(中科院上海生物工程中心)

摘要 经反复筛选比较,获得 *Candida tropicalis* ct-3 菌株,在糖蜜酒精废液中生长良好,28℃ 通气培养 8—10 小时可获干酵母菌体 20 g/L,且蛋白质含量在 45% 以上,氨基酸、维生素及微量元素等均能符合食用酵母标准,为一株利用废液生产酵母蛋白的优良菌株。

关键词 单细胞蛋白;营养互补融合子;热带假丝酵母

单细胞蛋白(SCP)是借助于工业途径生产人类蛋白质资源的新途径,也是推动畜牧业发展的关键。如能利用废渣废液通过生物合成蛋白质,有化害为利,变废为宝的重大意义。为此,我们以糖蜜酒精废液为原料,进行了优良菌株的选育及工艺条件的探索。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) ct-3 系种内融合子。ct-3 生长旺盛,对多种碳源包括有机酸和醇类有同化能力。ct-1, ct-2, ct-4, ct-5 系同种融合株,其余菌株系从云南土壤和温泉中分离保藏。

(二) 培养基

1. 种子培养基: 5—6 Be' 的麦芽汁, 自然 pH, 9 Be' 的糖蜜稀释液, pH 5.0。
2. 发酵培养基: 甘蔗糖蜜酒精废液, 残糖为 1.4%; 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2% 和 KH_2PO_4 0.15%, pH 4.5。

(三) 发酵条件

1. 往复式摇床, 振幅 8 cm, 频率 100r/min; 培养温度为 28℃。
2. BF-R-1 型 12 升半自动玻璃发酵罐, 装量 6 升, 搅拌速度 200 r/min, 通气量 600—800 L/h。

(四) 分析方法

1. 定糖: 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色定

糖法^[1]。

2. 蛋白质含量的测定：采用凯氏定氮法^[2]。

3. 生物量测定：吸取 10 ml 发酵液于 3500 r/min 离心 15 分钟，弃废液后称湿重，再用 10 ml 蒸馏水冲洗一次，置 105℃ 烘箱烘 5—6 小时，称菌体为干重。

4. 成品氨基酸、维生素的测定：由中国科学院上海生化所和上海食品科学研究所测定。

实验结果

(一) 生产菌株的筛选

对不同来源假丝酵母属菌株进行了比较，结果以 ct-3 菌株生物量及蛋白质较理想（表 1）。

表 1 不同菌株对废水利用比较

菌株编号	生物量 (细胞干重 g/L)	蛋白质含量(%)
ct-1	15.27	39.07
ct-2	19.46	44.22
ct-3	21.26	45.84
ct-4	21.15	45.11
C ₆	11.74	41.90
S ₃	12.34	49.28
26	12.34	50.23
211	19.83	46.46
ct-5	21.35	46.30
A ₃₂	17.00	43.38
C ₃₀	16.46	43.83
I ₃₄	17.25	44.03
A ₆₁	16.18	44.11
A ₄₇	18.81	44.40

(二) ct-3 的生物学特性

ct-3 为种内融合所得的融合子，经鉴定系热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)₉₀ 与其亲株的生物学特性的比较见表 2。ct-3 能利用多种糖、醇和有机酸等作为生长碳源，能在 39℃ 生长并有一定香味，是较适合在糖蜜酒精废液中生长繁殖的一株优良菌株。

(三) 种子培养基选择

为了适合生产需要，采用不同浓度的糖蜜稀释液作种子培养基，结果证明最佳条件是 9.5

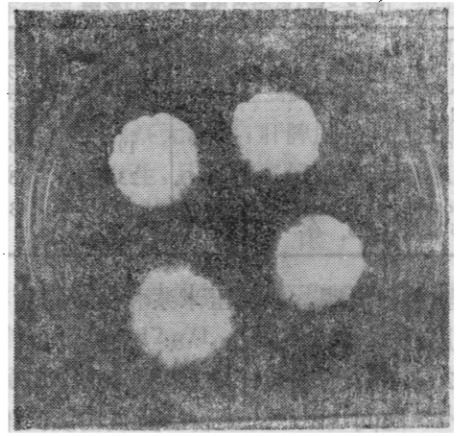


图 1 热带假丝酵母 ct-3 菌株巨大菌落形态

表 2 同种融合子 ct-3 和亲株比较

	融合子	亲株
细胞形态	卵形较大	长卵形较小
菌落形态	皱褶少、大	皱褶多较小
营养型	原养型	缺陷型 Ade ⁻ , his ⁻
糖利用	利用纤维二糖 利用山梨糖	不利用纤维二糖 不利用山梨糖
生长温度	39℃	35℃

Be' 培养 16 小时含活菌数最高。

(四) 种龄选择

用 6 Be' 麦芽汁作种子培养基在 HY-X 型摇床上振荡培养 ct-3 菌株 0—24 小时，生长曲线见图 2，证明最适种子菌龄在 12—18 小时。

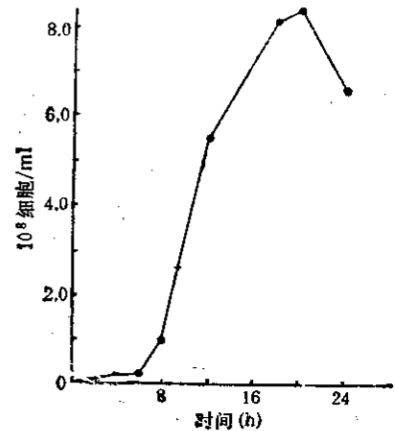


图 2 ct-3 摇瓶生长速率比较

(五) ct-3 合成菌体蛋白最适条件的研究

1. 在废液中添加碳、氮源对菌体生长的影响：在分别添加糖蜜、玉米浆以及无机盐的对

表 3 碳、氮源对菌体生长的影响

发酵条件	生物量 生物量 g/L (干重)	蛋白质含量 %
1.对照	15.68	45.00
2.加 1% 糖蜜	19.36	46.47
3.加 0.2% 玉米浆, 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	23.34	48.85
4.加 1% 糖蜜, 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05% KH_2PO_4	23.00	43.39

比试验结果表明, 添加玉米浆和少量糖蜜有促进作用(表 3)。

2. 不同起始 pH 对菌体生长影响: pH 在 4.5—5.5 之间 ct-3 的生物量及蛋白质变化不大, 均可采用(表 4)。

表 4 不同 pH 对菌体生长影响

pH 值	生物量 (g/L)	蛋白质含量(%)
4.5	22.00	44.59
5.0	23.50	43.48
5.5	22.50	43.00
7.5	25.57	37.30

3. BF-12-1 型 12 升半自动发酵罐 ct-3 生长速率变化情况

用建水糖厂酒精废液进行 12 升罐试验结果见图 3。

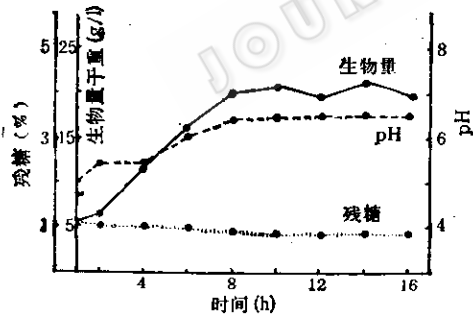


图 3 在 12 升半自动发酵罐内培养 16 小时的发酵动态

图 3 表明经 ct-3 菌株发酵后废液中残糖降低, pH 达到排放标准。菌体干重可达 20g/L。在此基础上进行了添加一定量碳源试验。在废液中增加 1% 糖蜜结果见图 4。

从 12 升罐发酵结果看: 加 1% 糖蜜, 生物量提高不多, 蛋白质含量也在同一水平上(45% 左右)。经 12 升罐和 16 升罐 11 批次试验证明

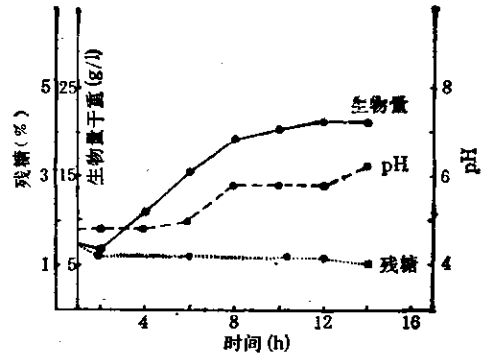
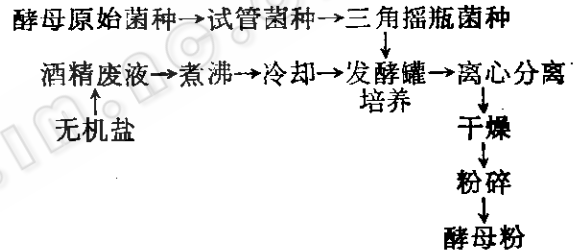


图 4 补加 1% 糖蜜发酵 14 小时的发酵动态

ct-3 菌株在酒精废液中生物量干物质稳定在 20 g/L 左右, 蛋白质含量也稳定在 45% 左右。再次排放液 pH 6.0—6.5 左右。BOD 从原来 5—6 万下降到 1.8 万。COD 从 11.9 万下降到 5.7 万。且工艺路线简单, 易为生产单位接受。其工艺流程如下:



(六) 酒精废液发酵所得菌体蛋白的质量

分析

利用 BF-12-1 型半自动发酵罐所得之 ct-3 菌粉进行各项内在指标的分析见表 5、表 6。

表 5 ct-3 菌粉的质量分析

水份	6.65
蛋白质 (5 批平均)	47.52%
灰份	8.5—9.8
脂肪	1.03
维生素 B ₁	2.7mg/100g 干粉
维生素 B ₂	5.97mg/100g 干粉
维生素 A	4.8mg/100g 干粉

氨基酸分析是采用日立牌 835 氨基酸自动分析仪测定(图 5 吸收峰所示), 除了色氨酸因不加保护剂被破坏之外, 其余 17 种氨基酸俱全。其中赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸含量高于进口鱼粉。

表6 ct-3 菌粉微量元素分析

微量元素	mg/100g 干酵母粉
Fe	30.7
Zn	14.9
Pb	微量
As	<0.5 ppm
Ni	3.5
Mn	2.3
Cu	1.5
K	13.5

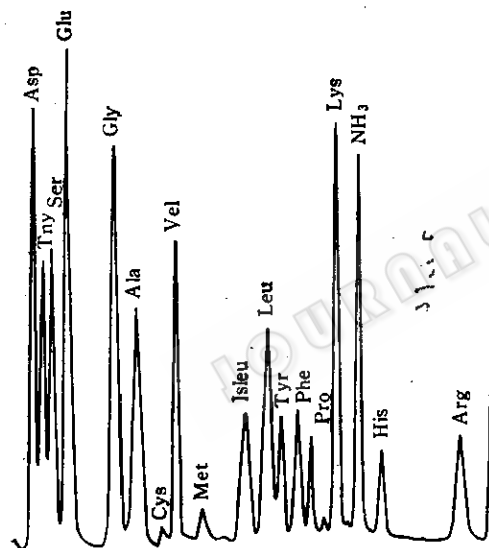


图5 酵母菌粉蛋白氨基酸分析

(七) 毒性试验

Candida tropicalis 菌种虽然国内外普遍

用作饲料蛋白生产菌,为了安全起见,我们进一步做了该菌对小白鼠的毒性试验。用 10^7 ml 菌液连续一周进行腹腔注射和灌胃试验,饲养三周后解剖观察无腹水,肝脾肿大,肾脏中毒及胃炎等情况发生,且小白鼠体重反有增加。

讨 论

据 1985 年法国报道,每升糖蜜酒精废液可得酵母干菌体 12 g/L。国内广东省顺德糖厂也报道过得率为 11g/L。而我们采用同种融合株 *Candida tropicalis* ct-3 每升可获干酵母菌体 20 g/L。蛋白质含量达到食用酵母标准,在 44% 以上,经 ct-3 发酵后的废液其 COD、BOD 下降 50% 以上, pH 达到排放标准。这不仅回收了有用的蛋白质资源,也保护了环境。我们认为该项目研究有应用价值。

参 考 文 献

- [1] Miller, G. L: *Anal. Chem.*, 31: 426, 1959.
- [2] Ballentine, R.: *Methods in Zozymology*, Vol. III., p. 984, 1957.
- [3] Lodder, J: *The Yeast*, p. 1059, second edition North-Holland Publishing company, Amsterdam, Oxford, 1970.
- [4] 高桥穰二: 日本工业技术振兴协会访中交流资料, 1984。
- [5] Berry, D. R: *The Biology of Yeast*, p. 32, Edward Arnold (Publishers) Limited, London, 1982.