

## 谷氨酸发酵废液培育高锌酵母

李爱芬 邓昌亮 魏菊珍

林 稚 兰

肖显华 沈志刚 邓学梅

(北京大学生物系, 北京 100871)

(烟台大学生化系, 烟台 264005)

**摘要** 利用生产味精的废液、糖蜜、适量营养盐, 以啤酒酵母 2016 为菌种, 经摇瓶、2.6 升、30 升发酵罐试验, 干酵母产率达 14 克/升, 平均含锌量 4500ppm。产品的蛋白质、灰分、水分符合规定指标, 产品安全无毒。发酵后废液中 COD 降低 60%。

**关键词** 啤酒酵母; 锌酵母; 味精废液

锌是人体必需的微量元素之一, 具有重要的生理功能。缺锌影响 DNA 复制和蛋白质合成, 严重影响皮肤、骨骼、性器官的正常发育<sup>[1]</sup>。儿童生长发育期、妇女妊娠、哺乳期、外伤、反复失血等, 都易引起缺锌症状及免疫功能下降<sup>[2]</sup>, 据报道 AIOS 病与锌缺乏有关<sup>[3]</sup>。我国学龄前儿童缺锌现象也十分严重。服用硫酸锌常有胃肠不适反应, 重者引起肠出血。酵母可做为锌、铁、硒、锗等系列微量元素强化的良好载体, 既含丰富的氨基酸、维生素, 又可促进胃液分泌, 提高消化力, 可能是一种营养价值较高的蛋白质食品或饲料添加剂。

味精废液是一项数量很可观的资源, 每年约排放 500 万吨<sup>[4]</sup>, 其 BOD、COD 值高, pH 值低, 直接排放严重污染环境, 破坏生态平衡。但含有可被微生物利用的营养盐。本文报告利用谷氨酸发酵废液培育高锌酵母的试验结果。

### 材料和方法

#### (一) 菌种

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 2001、2003、2012、2014、2016, 红酵母 (*Rhodotorula*) 2002, 油脂酵母 (*S. oleaginosus*) 2004, 奇异酵母 (*S. paradoxus*) 2005, 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 2006, 产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 2009, 热带假丝酵母 (*C. tropicalis*)

2008, 乳酸酵母 (*S. lactis*) 2013, 均为本实验室保存菌种。

#### (二) 培养基

斜面: 麦芽汁培养基。

种子培养基: 一级种子: 10 波美麦芽汁。二级种子: 谷氨酸发酵废液滤液添加糖蜜 5—7.5% (33 波美) 或废液滤液加适量  $\text{ZnSO}_4$  等营养盐。

发酵培养基: 同二级种子培养基或谷氨酸发酵废液滤液添加 5—7.5% 糖蜜和适量  $\text{ZnSO}_4$ 。

#### (三) 培养方法

斜面菌种  $\xrightarrow{1 \text{ 环}}$  一级种子培养液 (25ml/250 ml 锥形瓶)  $\xrightarrow[22-24 \text{ 小时}]{30^\circ\text{C}}$  以 10% 接种量接种二级种子培养液 50 ml/500 ml 锥形瓶)  $\xrightarrow[14-16 \text{ 小时}]{30^\circ\text{C}}$  以 1.1% (酵母泥) 或 20% 液体种子接种发酵培养液 (1.5 升/2.6 升罐或 15—18 升/30 升罐) 30℃ 培养 8 小时, 发酵过程检测 pH、菌体产量、还原糖、氨基氮、酵母细胞含锌量。

#### (四) 测定方法

1. 菌体产量: 发酵液经适当稀释在 721 型分光光度计 600nm 测 OD 值; 发酵液经 3000

86 级吴津同学参加部分工作。

g/min 离心 15 分钟, 称沉淀计算菌体湿重; 沉淀物用蒸馏水洗涤三次 105℃ 烘 4 小时后称重, 计算菌体干重。

2. 还原糖测定: 采用斐林快速定糖法。

3. 氨基氮测定: 采用甲醛滴定法。

4. 无机锌测定: 采用 EDTA 滴定法。

5. COD 值: 采用重铬酸钾法测定。

6. 酵母细胞含锌量: 采用原子吸收分光光度计测定(烟台大学分析中心协助)。

7. 粗蛋白质、水分和灰分: 用凯氏定氮法和常规分析法测定(由山东省食品监督检验所复审检测)。

8. 氨基酸分析: 用氨基酸自动分析仪测定(北京大学生物系协助)。

9. 维生素分析: 用紫外分光光度计等测定(烟台大学分析中心、北京营养源研究所协助)。

10. 食品卫生、有害物质分析: 按“食品卫生检验方法理化部份和微生物部份”规定测定(由烟台市卫生防疫站复审检测)。

11. LD<sub>50</sub>、Ames 试验、微核试验、精子畸变试验: 按“食品安全毒理学评价程序”规定方法, 由山东省卫生防疫站测定。

12. 小鼠对高锌酵母锌吸收率测定: 用 Backman 固体闪烁计数器测定小鼠粪便<sup>65</sup>Zn 的放射性, 计算吸收率。

13. 试验采用日本 MD-250 型 2.6 升和 MST-U<sub>1</sub> 型 30 升发酵罐, 温度、搅拌转速、通风、消泡、溶氧、pH 等参数均自动监控。

## 结果和讨论

### (一) 谷氨酸发酵废液处理方法和有效成分分析

为了保持废液中可供酵母利用的碳、氮源和锌盐, 采用三种灭菌方法处理锌盐法提取谷氨酸后的废液。从表 1 看出不同处理方法对废液有效成分影响较大。第三种方法能除去 80% 以上的碳、氮源和锌盐, 可做为环保的措施, 显然不宜培养酵母, 我们试验采用第一种方法。

表 1 各种处理谷氨酸发酵废液有效成分分析

处理方法 含量 g/100ml 分析项目	1		2		3	
	均值	去除率	均值	去除率	均值	去除率
还原糖	1.15±0.03	0%	0.77±0.02	33.13%	0.22±0.03	80.73%
氨基氮	0.65±0.07	0%	0.64±0.04	1.42%	0.017±0.05	97.33%
锌	0.26±0.01	0%	0.23±0.00	13.46%	0.04±0.00	83.46%

注: 1. 废液直接经 5.2×10<sup>4</sup>Pa(8 磅/吋<sup>2</sup>)蒸汽灭菌 20 分钟; 2. 废液煮沸后过滤, 再经 5.2×10<sup>4</sup>Pa 蒸汽灭菌 20 分钟; 3. 废液经 80℃ 加热, 然后静置 16 小时, 用 NaOH 调 pH 至 11, 过滤除去白色 Zn(OH)<sub>2</sub> 沉淀, 上清液再经 5.2×10<sup>4</sup>Pa 蒸汽灭菌 20 分钟。取三种处理办法的滤液测定之。经 t 试验检验, P<0.05 差异显著。以 1 号处理方法为对照, 计算去除率。

表 2 酵母菌株选择

菌株	培养液最终 pH	OD <sub>600nm</sub>	菌株	培养液最终 pH	OD <sub>600nm</sub>
2003	5.23	0.318	2004	5.25	1.340*
2014	5.10	1.350*	2005	5.20	0.225
2016	5.18	1.440*	2006	5.20	0.020
2001	5.20	0.310	2009	5.52	1.330*
2012	5.21	0.068	2008	5.30	0.465
2002	5.21	0.140	2013	5.28	0.530

味精废液初始 pH4.85; \* 菌悬液稀释 16 倍。

(二) 菌种的选择

对 12 株酵母在废液滤液(还原糖 0.99% 氨基氮 0.97%、锌 0.31%)中的生长量进行测定,以啤酒酵母 2016 适应性最强、产量最高(表 2)。

(三) 摇瓶种子培养

种子的质和量是发酵生产的一个关键因素。由表 3 看出一级种子培养基以麦芽汁最好。因酵母细胞数增加而使二级种子产量增加。

(四) 最优发酵培养基配方选择

为了提高啤酒酵母 2016 在发酵废液滤液

表 3 一级种子对二级种子菌体产量影响

培养基(%)	一级种子酵母细胞数 (10 <sup>8</sup> 个/ml)	二级种子菌体产量 (干重 g/100ml)
葡萄糖 2.5, CSL 0.5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1, MgSO <sub>4</sub> 0.1	0.95	1.04
麦芽汁 13.4 波美	4.25	1.51
糖蜜 5, CSL 0.5, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1, MgSO <sub>4</sub> 0.1	1.50	1.05
废液滤液+糖蜜 4	2.10	1.14
废液滤液	1.85	1.14

注: 二级种子培养基, 味精废液滤液, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, 一、二级种子培养基 pH 均为 5.0。

表 4 营养成分对酵母产量、含锌量及锌吸收率影响

参数值 试验号	参数 玉米浆 (%) x <sub>1</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%) x <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub> (%) x <sub>3</sub>	ZnSO <sub>4</sub> mol/L x <sub>4</sub>	y <sub>i</sub> 实测 OD 值 600nm	y <sub>i</sub> 预测 OD 值 600nm	y <sub>est</sub> = y <sub>i</sub> - y <sub>i</sub> 选控值	y <sub>i</sub> 实测 Zn 量 ppm	y <sub>i</sub> 预测 Zn 量 ppm	y <sub>est</sub> = y <sub>i</sub> - y <sub>i</sub> 选控值	Zn 吸收 率(%)
1	0	0	0.5	10 <sup>-1</sup>	0.600	0.544	0.046	5082.65	5070.90	11.75	0.77
2	0.8	0	0	0	0.740	0.709	0.031	3470.47	2930.70	540.77	18.50
3	1.6	0	0.1	10 <sup>-2</sup>	0.770	0.731	0.039	6320.49	6218.80	83.69	9.28
4	0	0.1	0.1	0	0.710	0.709	0.001	623.90	355.00	268.90	3.25
5	0.8	0.1	0.5	10 <sup>-2</sup>	0.745	0.762	-0.017	5854.53	5660.30	194.20	3.43
6	1.6	0.1	0	10 <sup>-1</sup>	0.375	0.363	0.012	6988.58	7064.90	-76.32	0.93
7	0	0.5	0	10 <sup>-2</sup>	0.715	0.731	-0.016	6163.56	6498.30	-334.70	8.40
8	0.8	0.5	0.1	10 <sup>-1</sup>	0.660	0.576	0.084	6418.93	6883.90	-464.90	1.07
9	1.6	0.5	0.5	0	0.710	0.709	0.001	1088.46	985.20	103.30	5.49
10	0	0.1	0.5	10 <sup>-2</sup>	0.720	0.752	-0.032	4403.68	4550.10	-146.40	6.33
11	0.8	0.1	0	10 <sup>-1</sup>	0.248	0.269	-0.021	6831.93	6868.40	-34.50	0.77
12	1.6	0.1	0.1	0	0.720	0.709	0.011	1680.86	2064.80	-383.90	8.20
13	0	0.5	0.1	10 <sup>-1</sup>	0.405	0.482	-0.077	7130.28	6555.30	574.90	1.19
14	0.8	0.5	0.5	0	0.730	0.709	0.021	2625.92	2779.70	-154.80	13.68
15	1.6	0.5	0	10 <sup>-2</sup>	0.725	0.749	-0.024	6121.00	5838.70	282.30	8.94
16	0.8	0	0.1	10 <sup>-2</sup>	0.710	0.721	-0.011	5748.16	5826.90	-78.70	7.82
17	1.6	0	0.5	10 <sup>-1</sup>	0.700	0.743	-0.043	6356.15	6365.30	-9.15	1.05
18	0	0	0	0	0.705	0.709	-0.004	444.23	818.90	-374.70	1.70

注: 表中所列数据为三个试验样品均值, y<sub>i</sub> 为酵母菌产量, 以 600nm OD 值表示, 产量最高者为干重 1.3g/100ml<sup>1</sup>。y<sub>i</sub> 为酵母细胞含 Zn 量, 原子吸收光谱测定, 含 Zn 量最高者为 6988.58ppm、废液滤液本身含 Zn 0.37×10<sup>-1</sup>mol/L, 表中为另外添加的 ZnSO<sub>4</sub> 浓度。酵母细胞 Zn 吸收率按发酵液中实际含 Zn 量被酵母利用折算的。

中的生长量和细胞含锌量,对营养成分配比进行了玉米浆、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$  四因素正交试验[选用  $L_{16}(3^4)$  正交表],并对试验结果的光密度及细胞含锌量进行多元回归分析。从表 4 可看出添加  $1 \times 10^{-2} \text{mol/L ZnSO}_4$  时酵母菌体产量最高(平均干重相当于 12.65 克/升,细胞含锌量 5766 ppm),添加  $1 \times 10^{-1} \text{mol/L ZnSO}_4$  时酵母细胞含锌量虽高,但产量锌吸收率均低(平均干重 10.06 克/升,含锌量 6468 ppm,锌吸收率 0.96%)。考虑到 WHO 规定学龄儿童日补锌限量 10 毫克、日补食用酵母限量 2—4 克标准,废液滤液以添加  $1 \times 10^{-2} \text{mol/L ZnSO}_4$  最为适宜(每天 2 克酵母 10 毫克锌)。

从表 4 各参数值计算出四种营养物对酵母菌体生长量和细胞含锌量的回归方程。四种营养物对酵母菌体生长量回归方程为:

$$y_1 = 0.7091 - 58.9969x_1 + 1.1821x_1x_4 + 5.5145x_2x_4 + 8.6972x_3x_4$$

从公式看出,  $\text{ZnSO}_4$  浓度对酵母菌体产量影响最大,无论  $\text{ZnSO}_4$  浓度平方或  $\text{ZnSO}_4$  浓度与其他营养物浓度积均对酵母菌体产量有显著影响(从对酵母细胞含锌量回归方程分析,  $\text{ZnSO}_4$  浓度对酵母细胞含锌量影响也最大),其次为玉米浆,依次为  $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。

表 5 按公式预测酵母菌体产量

试验批号	实测 OD 值	预测 OD 值	误差值
6	0.753	0.755	-0.002
8	0.726	0.728	-0.002
12	0.683	0.693	-0.010
14	0.730	0.712	+0.018
16	0.760	0.771	-0.011
18	0.733	0.754	-0.021

按此数学模型,通过营养成分控制,对菌体生长量和细胞含锌量进行预测。表 5 所示系经实例验证的酵母菌体产量。

进一步试验发现,  $\text{ZnSO}_4$  浓度高于  $3 \times 10^{-1} \text{mol/L}$  时,抑制芽细胞和母细胞的正常分离,酵母细胞常呈假菌丝状,从而抑制酵母菌的群体生长。

2016 菌株在 30 升罐批量试验结果,发酵过程基本稳定;菌体产量干重 14.03 克/升,细胞含锌量 4500ppm(纯谷氨酸发酵废液添加 5% 糖蜜培育的低锌酵母含锌量平均为 312 ppm),达到预计要求。

利用谷氨酸发酵废液培育高锌酵母,随菌体增殖迅速消耗废液中各种营养物质,还原糖利用率 58% 以上,COD 降低 63%,pH 稍有升高,对环境污染防止亦有积极效益。培育酵母后的废液尚可循环使用,以免除锌的二次污染。

表 6 2016 菌株 30L 罐发酵结果

批号	单位体积干重 g/L	生产效率(干菌重) kg/m <sup>3</sup> /小时	增值数	糖利用率
91-02	13.50	1.31	5.25	71.70
91-03	13.89	1.39	5.62	68.00
91-04	14.57	1.62	5.96	65.30
91-05	13.88	1.54	5.62	51.70
91-06	14.34	1.59	5.87	65.20
均值	14.03	1.49	5.66	64.38

注:表中所述为 5 次发酵结果,若废液滤液中只添加 5% 糖蜜和  $1 \times 10^{-2} \text{mol/L ZnSO}_4$  结果相同。在缺乏糖的废液滤液中,接种量必需保持 10% 以上。

### (五) 成品分析

30 升罐生产的干酵母 5 批混合抽样分析:

1. 理化指标:蛋白质 45.80%、水分 6.60%、灰分 6.00%、含 18 种氨基酸、 $\text{VB}_1$  59.6 mg/kg、 $\text{VB}_2$  29.8mg/kg、 $\text{Vpp}$  271mg/kg、As 0.5mg/kg、Pb 2.8mg/kg,未检出 Hg。

2. 卫生指标:细菌总数 560 个/g,大肠菌群数 3 个/100g,霉菌总数 6.6 个/g。

3. 毒理学评价:  $\text{LD}_{50} > 10\text{g/kg}$ ,属无毒物质,Ames 试验、微核试验、精子畸变试验均为阴性。

结果表明:产品质量达到《中华人民共和国药典》干酵母水平,与美国、法国国家食用酵母标准相当。以 $^{65}\text{Zn}$ 做示踪物研究小鼠对高锌酵母中锌的吸收情况,结果看出:当锌的投喂量相同时,高锌酵母组的吸收率与  $\text{ZnSO}_4$  相当,但无  $\text{ZnSO}_4$  的副作用(锌吸收率:高 $^{65}\text{Zn}$ 酵母组、普通酵母 +  $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{65}\text{ZnSO}_4$  组依次为 45.08%、45.64%、40.95%,  $P > 0.05$ )。进一步证实确为

不具毒性的富锌食品营养添加剂。

### 参 考 文 献

1. Robert E: *Nutrition Review*, 44: 300, 1986.

2. Chen X et. al.: *J. Clin. Nutri.*, 42: 694, 1985.

3. Patierno S R et. al.: *J. Immunology*, 130: 1924  
1983.

4. 石四澍等: 发酵科技通讯, 14(1): 7, 1985.

## PRODUCTION OF ZINC YEAST WITH WASTE LIQUOR OF GLUTAMIC ACID FERMENTATION

Lin Zhilan

(Department of Biology Beijing University, Beijing 100871)

Li Aifen Deng Changling Wei Juzhen Xiao Xianhua

Shen Zhigang Deng Xuemei

(Department of Biochemistry Yantai University, Yantai 264005)

Using waste liquor of producing monosodium glutamate, molasses and proper nutrient as medium, *Saccharomyces cerevisiae* 2016 was separately cultured in flask, 2.6 liter and 30 liter fermenters. Average yield of dry biomass and Zinc content of the yeast cells were about 14 g/L and 4500 ppm respectively. The contents of protein, ash and water of the product were in accordance with the official regulations. COD was decreased the number to 63%

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*; Zinc yeast; Waste liquor of glutamic acid fermentation