

分类号

密级

# 硕士学位论文

题目：单细胞蛋白的菌种选育及其  
动力学研究

英文并列题目：Production of SCP from Distillage  
-- strain selection and dynamics

研究生：范小兵 专业：工业发酵

研究方向：生化工程及再生资源的生物转化

导师：伦世仪 教授、王武 副教授

学位授予日期：                    

年    月    日

无锡轻工业学院

地址：无锡市青山湾

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 目 录

摘要	-----	1
前言	-----	4
材料和方法	-----	7
一. 菌种筛选及鉴定	-----	7
(一) 培养基	-----	7
(二) 筛选方法	-----	8
(三) 菌种鉴定	-----	9
二. SCP 培养动力学研究方法		
(一) SCP 培养方式	-----	11
(二) 动力学参数研究方法	-----	12
三. 细胞组分与酒精废水成分分析	-----	12
试验结果	-----	15
一. 酒精废水酵母的筛选与鉴定		
(一) 酒精废水成分分析	-----	15
(二) 酒精废水酵母的分离	-----	17
(三) 菌株 B31 与 S13 的鉴定	-----	18
二. 理化因素对废水培养 B31 与 S13 的影响	-----	25
(一) 物理因素对 B31 与 S13 生长的影响	-----	25
(二) 化学因素对 B31 与 S13 生长的影响	-----	27

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

---

三. 酒精废水培养动力学	
(一) 分批培养动力学	37
(二) 单级全混流连续培养动力学	39
1. B31与S13在酒精废水中的连续培养	
2. B31与S13在葡萄糖培养基中的连续培养	
3. B31与S13对琥珀酸和异戊醇的平均转化系数	
四. B31与S13的细胞组分测定及急性中毒试验	47
讨论	48
符号说明	53
参考文献	54
致谢	55

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 摘 要

本论文通过常规选育法和恒化态优化法筛选到两株性能优良的假丝酵母。对其形态特征、生理特性、细胞成分、废水中分批培养的最佳工艺条件、培养动力学参数和连续培养过程进行了系统研究。并对徐州酿酒总厂高温蒸煮工艺的废水成分进行了详细检测。

B31是热带假丝酵母，粗蛋白含量为53.0%，脂肪为1.5%，纤维素为15%，灰分9.0%；B31在COD为35088 Ppm的高酸度废水中培养时，终菌浓度为10.72 g/L， $\mu_{max}$ 为 $0.68 \text{ hr}^{-1}$ ；连续培养D取0.25时，菌浓度为8.5 g/L，P达 $2.13 \text{ g Cell/g.hr}$  ( $1.13 \text{ g Protein/g.hr}$ )。B31对葡萄糖的转化系数 $Y_{xs}^{true} = 0.4932 \text{ g/g}^{-1}$ ， $m_s = 0.0204 \text{ g/g.hr}$ ；对琥珀酸与异戊醇的平均转化系数分别为 $0.400 \text{ g/g}^{-1}$ ， $0.768 \text{ g/g}^{-1}$ 。由于废水中异戊醇的含量达到6.28 g/L，导致 $Y_{xs}^{废水}$ 达到 $0.625 \text{ g/g}^{-1}$ 。

S13是产朊假丝酵母。粗蛋白含量为60.1%，脂肪4.8%，纤维素1.0%灰分8.0%。在COD为35088 Ppm的高酸度废水中，终菌浓度9.80 g/L， $\mu_{max} = 0.62 \text{ hr}^{-1}$ ；连续培养D取0.25时，X为8.3 g/L，P达 $2.08 \text{ g Cell/g.hr}$  ( $1.25 \text{ g Protein/g.hr}$ )。S13对葡萄糖的转化系数 $Y_{xs}^{true} = 0.4876 \text{ (g/g}^{-1})$ ， $m_s = 0.0374 \text{ g/g.hr}$ ；对琥珀酸与异戊醇的平均转化系数分别为 $0.328 \text{ g/g}$ ， $0.784 \text{ g/g}$ 。 $Y_{xs}^{废水}$ 达 $0.654 \text{ g/g}$ 。

根据测得的动力学参数与废水组成，推导出废水的 $Y_{O_2}^{B31}$ 为 $1.82 \text{ g/g}$ ， $Y_{O_2}^{S13}$ 为 $1.82 \text{ g/g}^{-1}$

对B31与S13的静态参数与动力学参数进行综合考察，建议采用S13做为连续培养生产菌株。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

---

Production of SCP from Distillage

-- strain selection and dynamics

Two *Candida* strains, B31 and S13, were selected by using traditional selection method and chemostat treatment. Strain B31 was classified as *C. tropicalis* and S13 was classified as *C. utilis*. The optimal temperature and pH for growing these strains were studied and the components of the cells were determined.

The main carbon components (isopentanol, succinate, and reducing sugars analysed in alcohol distillage) can be assimilated by strain B31 and S13. Based on conversion yields on glucose or isopentanol or succinate,  $Y_{x/s}$  and  $Y_{o/x}$  of strain B31 and S13 grown on distillage were estimated. It is suggested that strain S13 should be the better strain used in SCP production in the case.

Growth kinetics of strain B31 and S13 in batch and continuous distillage culture were also analysed.

KEY WORDS:

SCP                      distillage                      selection  
dynamics



# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 前 言

单细胞蛋白 (Single Cell Protein) 这一术语首创于1966年。人们主要用它来描述作为人类与动物蛋白质营养源的微生物干菌体。SCP不仅包括诸如酵母、细菌、单细胞藻类与单细胞微生物,也包括多核的多细胞真菌,所以SCP是菌体蛋白的统称。

以食用和饲用为目的的SCP生产早在本世纪初就开始了。当时西欧主要以糖蜜为原料生产食用和饲用酵母。但是,所生产的SCP的数量在世界总蛋白消耗中占据着很小的一部分比例。直到第一次世界大战爆发,SCP的重要性才逐渐被人们认识到。在第一次世界大战和第二次世界大战期间,德国每年要生产15000吨SCP,作为肉类代制品以补充蛋白质的不足,相当于战前60%的蛋白进口量。到五十年代,世界蛋白质严重缺乏,人类开始研究探寻新型的蛋白质资源。由于SCP生产不受气候、地理环境的限制,而且微生物繁殖快、蛋白质含量高,发酵罐可以向空间纵向发展,单位时间、单位面积所生产的SCP蛋白数量远超过传统种植物的蛋白质数量,家畜的生产能力更不可与之相比。例如:一头乳牛每天约可生产200g蛋白质,而从理论角度而言,在理想的生长条件和相同的时间内,同样重量的微生物能生产蛋白质25吨。所以,在六十年代,SCP被认为是解决人类饥荒的一条有效途径。当时,主要研究以石油中的烃类生产SCP,称为石油蛋白。英国的BP

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

石油公司是研究石油蛋白的先驱，而且也是将气升式发酵罐用于大工业生产的先驱。由于石油蛋白的安全性发生争议，后来又因石油价格上涨，石油蛋白的研究热潮下降了。为了寻求廉价、丰富的原材料，又将目光转向甲醇及再生资源。英国的ICI公司的一个甲醇蛋白的试验厂，年产量达五万吨。但其价格比鱼粉蛋白、大豆蛋白甘蛋白制品的价格要高；而且在天然气、甲醇并不富裕的国家中生产甲醇蛋白是不经济的，也是不现实的。同样利用谷物、甜菜糖蜜甘再生资源直接生产 SCP 也不经济，因为它们可以用来生产其它售价更高的发酵产品。SCP 生产的出路何在呢？八十年代初研究者们认识到 SCP 只有走综合利用的道路。Riz 认为：SCP 作为其它发酵厂的副产品是颇有竞争力的。因为许多食品、发酵行业的废水具有较高的 COD 与 BOD 值；这些废水不仅没有被有效地利用起来，而且正日益严重地污染着水质。因而，以废物、工厂下脚料甘副产品生产 SCP 开始受到重视。目前，SCP 生产量最大的国家是苏联，年产 120 万吨，有 86 个生产厂，所用原料主要是烃类、废糖蜜、造纸废液、木材水解液、农作物秸秆和泥炭水解液等。据苏联微生物工业管理总局局长宣称：苏联在今后若干年内 SCP 年产量要增加到 1100~1200 万吨。一些东欧国家以及古巴、芬兰等国也都有年产万吨级以上的生产厂。

目前，我国也有利用纸浆废水、味精废水、柠檬酸废水生



# 无锡轻工业学院研究生论文纸

产SCP的生产厂家。有效地利用酒精废水生产SCP业已在研制中。每年，我国的酒精行业要排放一千多万吨废醪进入江河，严重地影响了水生生物的生长及人类的身体健康。然而在这些废水中却含有不少微生物可利用的碳源及营养物质。如果能将这些以往还不能充分利用的废醪充分有效地生产SCP，则不仅能缓和饲料蛋白的供需矛盾，而且还能减轻环境污染。但是酒精废水是发酵行业最难处理的废水之一，它虽然COD较高，但碳源组分复杂，而且含有大量的悬浮固形物。用这样的废水培养SCP，不仅要求菌种对底物利用具有广谱性、蛋白含量高、无毒；从生产成本角度而言，还要求其具有：①比生产速度快；②转化系数大；③最适生长温度范围宽；④细胞体量大、易于分离等优点。

本文配合七五攻关项目，通过常规筛选方法和恒化态优化方法筛选出两株性能优良的假丝酵母。观察其是否具有有性繁殖特征，然后根据形态学特征、生理生化反应，进行生物学鉴定和分类。利用间歇和连续培养研究菌株在酒精废水中的生长特性，摸索最佳培养工艺参数，最后对细胞成分进行分析，将静态参数与动态参数相结合对菌株进行评价。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 材料与 方法

### 一. 菌种筛选及鉴定

#### c-1) 培养基

##### 培养基 A

尿素 0.5%  $KH_2PO_4$  0.1% NaCl 0.01%

$MgSO_4$  0.05%  $CaCl_2$  0.01% 酵母膏 0.02%

1 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟

##### 培养基 B

葡萄糖 2%  $KH_2PO_4$  0.1%  $MgSO_4$  0.05%

酵母膏 0.01% 琼脂粉 2%

0.5 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟

##### 培养基 C

葡萄糖 0.5% 蛋白胨 0.5% 酵母膏 0.5%

1 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟

##### 培养基 D

黄玉米粉 12.5g, 搅匀于 300ml 水中, 60°C 热水浴  
保温 1.1 小时, 过滤, 滤液加水至 300ml, 加 2% 融  
琼脂, 融化后趁热用脱脂棉过滤, 分装。

1 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 培养基E

10° Bx 麦芽汁 1000 ml, 加 2% 琼脂  
0.5 g/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟

## 培养基F

70ml 新鲜酒糟水 → 脂脱棉过滤, 分开灭菌  
30ml 水 + 6% 琼脂, 加热融化  
趁热混和, 分装

## 培养基G

新鲜酒糟水, 用脱脂棉过滤, 滤液中的固形物  
在 0.2% 以下, 加入 0.1% 尿素  
0.5 g/cm<sup>2</sup> 灭菌 15 分钟

## (二) 筛选方法

### A. 普通富集培养法

将少量土样投入装有 40 ml 培养基 G 的 250 ml 三角瓶内, 在 37°C, 120 rpm 的条件下培养 24 hr. 然后用稀释涂平板法分离单菌落, 将首批长出的单菌落做好标记, 继续将平板置于 37°C 培养 24 hr. 挑出首批长出且菌落较大的菌株. 再用稀释涂平板法纯化一次。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## B. 半连续富集培养法

将筛选方法 A 中得到的菌株进行摇瓶培养 24 hr. 测  
终菌浓及蛋白质含量。将两者之积较大的菌株以大致相同的  
接种量接入同一装量的三角瓶中。在  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $120\text{rpm}$  的条件下  
培养 8~12 hr. 以 10% 接种量接入 5 瓶接入装有新鲜培养  
基的三角瓶中继续培养。如此重复多次，直至终菌浓稳定。  
然后进行单菌落分离。

## C. 恒化态优化法

在  $34\sim 36^{\circ}\text{C}$ ，风量为  $0.6\text{VM}$  ( $K_{\text{La}} = 180\text{hr}^{-1}$ ) 的条件下，  
在 350 ml 玻璃外循环反应器中先进行间歇培养，待菌浓增  
至最大开始连续。先将  $D$  控制在  $\frac{1}{2}\mu_{\text{max}}$  处培养 4 天，然  
后逐步提高  $D$ ，使之略大于  $\mu_{\text{max}}$ ，培养 2 hr. 在反应器内  
取样进行单菌落分离。

## (三) 菌种鉴定

### A. 不产孢子证明及致死温度的测定

分别将在培养基 C 上培养的营养斜面细胞和在产孢  
<sup>基上培养</sup>一周的细胞在各种温度下处理 15 分钟。在  $32\sim 34^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{rpm}$   
蛋白胨-葡萄糖-酵母膏培养基中振荡培养 24 hr. 测其  
OD 值。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## B. 形态学特征观察

### 1) 假丝情况观察

在加盖片的玉米粉琼脂培养基上培养酵母，于 $34^{\circ}\text{C}$ 培养48hr. 在显微镜下观察假丝生长情况。

### 2) 细胞大小和形状的观察

将菌种接种于培养基C的固体斜面上，于 $34^{\circ}\text{C}$ 培养24hr. 用普通显微镜及测微尺观察细胞形状及大小。

### 3) 菌落形态特征观察

将菌种点种在培养基C上培养一周，分别观察培养一天、三天、一周、一周的菌落大小、颜色及边缘与表面状况。

## C. 生理生化反应

### 1) 碳源利用实验

将不同碳源以1%的量加入培养基A中制成各种平板，以培养基A作为生长情况的空白对照。将不同菌株点种其上，于 $34^{\circ}\text{C}$ 培养48hr. 观察菌株生长情况。

### 2) 氮源利用实验

将不同氮源以0.5%的量加入培养基B中制成各种平板，以培养基B作为生长情况的空白对照。将不同菌株点种其上，于 $34^{\circ}\text{C}$ 培养48hr. 观察菌株生长情况。

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 3) 酒精耐受力测定

将菌株点种在酒精梯度平板上,  $34^{\circ}\text{C}$  培养 48 hr. 观察菌株生长情况。

## 二. SCP 培养动力学研究方法

### c-1) SCP 培养方式

000089

#### 方式 A 三角瓶摇瓶培养

250 ml 三角瓶装液量为 40 ml; 500 ml 三角瓶装液量为 100 ml;  
1000 ml 三角瓶装液量为 180 ml; 接种量为 1%, 于  $34^{\circ}\text{C}$ ,  
120 rpm,  $K_{La} = 88.5 \text{ hr}^{-1}$  的条件下培养。

设备: DXY 独轴旋转式摇床, 无锡查桥轻机厂生产。

#### 方式 B 350ml 玻璃外循环反应器培养

##### B-I 分批培养

反应器装液量为 300 ml, 在  $34 \sim 36^{\circ}\text{C}$ , 风量为 0.6 Wm  
 $K_{La} = 180 \text{ hr}^{-1}$  的条件下培养, 每隔一小时取样。

附属设备: 恒温水浴锅 (江苏常熟医疗器械厂)

气体流量计

风引自液体曲的无菌空气

##### B-II 连续培养

装液量与培养条件同上。

出醪以 HL-3 型恒流泵溢流泵抽, 进醪流量以

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

WLB-78-A型电子微流量控制，温度由恒温水浴锅控制。

方式C 12L液带气内循环反应器培养

反应器内装液量为10L，于 $34 \sim 36^{\circ}\text{C}$ ， $0.3 \text{ vvm}$ ， $k_{La} = 150 \text{ hr}^{-1}$ 的条件下培养

温度由WM2K-01温度指示控制仪控制（上海医用仪表厂制造），气体由无油气体压缩机提供（天津医疗器械二厂制造），气量由LZB-10空气流量计计量。

(二) 动力学参数研究法

1. 延滞时间的确定

参考文献 [5]

2. 最大比生长速率  $\mu_{\text{max}}$ ，半饱和常数  $K_s$  的测定

参考文献 [4]

3.  $Y_{\text{xs}}^{\text{true}}$ ， $M_s$  的测定

参考文献 [10]

(三) 细胞组分与酒精废水成分的分析

1. 细胞浓度

读OD<sub>620nm</sub>法

条件：培养基中的固形物小于0.2%

仪器：72-1分光光度计

# 无锡轻工业学院研究生论文纸

## 细胞干重法

离心一定体积的发酵液，用 0.75% 生理盐水洗涤两次，于 110°C 干燥 12~16 hr. 扣除同样体积发酵液因固形物的干重。换算成每升发酵液的干细胞重量

## 2. 细胞中蛋白质含量的测定

A. 双缩脲法测真蛋白含量 (true protein)

参考文献 [1]

B. 凯氏定氮法测粗蛋白含量 (crude protein)

参考文献 [2]

## 3. 细胞中脂肪、纤维素、总糖、灰分的测定

参考文献 [4]

## 4. 酒精废水中酸度测定

取 1ml 发酵液，加入 20ml pH 7.0 左右的蒸馏水，用 0.1% 酚酞作指示剂，以 0.01N 的标准 NaOH 滴定。所消耗 NaOH 溶液的毫升数，即为酸度。

## 5. 废水的 pH 测定

A. 精密 pH 试纸

pH 3.8~5.4      pH 5.4~9.0

B. pH 计



# 无锡轻工业学院研究生论文纸

---

6. 废水中残糖的分析

参考文献 [2]

7. 化学耗氧量  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  的测定

参考文献 [6]

8. 生化耗氧量  $\text{BOD}_5$ 、 $\text{BOD}_{20}$  的测定

参考文献 [6]

9. 有机酸纸上层析 [2]

10. 醇的气相色谱分析