

分类号

密级

硕士学位论文

题目: 谷氨酸废水单细胞蛋白菌种选育
及其研究

英文并列题目: Selection and Studies on SCP Strains Utilizing
Glutamate Fermentation Effluent

研究生: 堵国成 专业: 发酵工程

研究方向: 工业生化

导师: 唐孝宣、王武

学位授予日期:

一九八九年 十一月 三十日

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
Abstract	2
前言	3
I. 材料与方法	6
一. 酵母细胞及谷氨酸废水成份分析	6
二. 菌种筛选及鉴定	6
三. 酵母单细胞蛋白培养动力学研究	9
四. 降低酵母细胞中核酸含量的方法	10
II. 实验结果	12
一. 谷氨酸废水酵母菌种的选育及鉴定	12
(一) 谷氨酸废水主要成份的分析	12
(二) 谷氨酸废水酵母菌种的选育	12
(三) 酵母菌CT11、CT31的驯化	14
(四) 菌种鉴定	14
二. 酵母培养条件研究	20
(一) 理化因素对CT11、CT31生长的影响	20
(二) 外源添加物质对酵母CT11、CT31生长的影响	24
(三) 废水的不同稀释度对CT11、CT31生长的影响	26
(四) 谷氨酸废水中含不同谷氨酸菌体浓度时对最终总SCP 得率的影响	27

无锡轻工业学院研究生论文纸

(五) 谷氨酸发酵液经酵母培养后成份的变化	28
三. 单细胞蛋白培养动力学研究	31
(一) 分批培养动力学研究	31
(二) CT11小量培养时临界氧浓度 $C_{\text{界}}$ 的确定	
(三) 单级连续培养动力学研究	34
四. 酵母细胞中核酸含量的降低	42
(一) 热脉冲温度试验	42
(二) 热脉冲时间对酵母胞内核酸含量降低的影响	44
(三) 不同保温温度试验	45
(四) 不同保温时间试验	46
(五) 热脉冲法去核酸对菌株CT11的处理效果	47
五. 结论与讨论	48
一. 菌种性能	48
二. 经济概算	50
三. 对用热脉冲法降低酵母核酸含量的评价	53
参考文献	54
致谢	56

无锡轻工业学院研究生论文纸

摘 要

本论文结合味精厂谷氨酸废水综合利用科研项目,根据谷氨酸废水低pH值,高盐子浓度的特点,通过筛选和驯化,选育出两株能在谷氨酸废水中生长快,产率高的假丝酵母株CT11, CT31. 对其形态特征,生理特征等进行了较为系统的研究,经鉴定两株均属于热带假丝酵母,并对这些酵母在谷氨酸废水中分批培养的最佳工艺条件、连续培养动力学、细胞反馈培养研究及降低酵母胞内核酸含量等方面作了一些探讨.

菌株CT11利用废水清液小瓶间歇培养15hr,菌浓干重达18g/L, COD去除率达69%, pH上升至中性,在取稀释率D为0.2 hr⁻¹进行连续培养时,菌浓可达15g/L以上, COD去除率达55%. 用热脉冲法降解酵母胞内核酸对CT11, CT31都有良好的效果,经处理CT11胞内核酸含量从6.70%降至2.34%, CT31胞内核酸含量从6.93%降至2.22%,去除率分别达60.1%和68.0%. 且处理后酵母的蛋白质含量均略有提高.

本文讨论部分中还对上述菌株的工业应用进行了经济概标,进一步证实了它们的实用价值.

关键词: 谷氨酸废水, 动力学
热脉冲过程
生产经济概算.

无锡轻工业学院研究生论文纸

Abstract

Two *Candida* strains CT11 and CT31 which grow well in glutamate fermentation effluent were selected. They both were classified as *C. tropicalis*. The optimal culture conditions such as pH, temperature, and dissolved oxygen for these strains were investigated. Growth kinetics of these strains in batch and continuous culture and cell recycling culture in the effluent were studied. An effective heat-shock process for reducing the nucleic acid content in *Candida* cells was also developed.

The SCP yield reached 18g/l and the average COD reduction in the effluent is about 69% after 15 hours' cultivation with CT11. In continuous culture, the SCP yield reached 15g/l and the average COD reduction in the effluent is about 55% when the dilution rate keeps at 0.2hr^{-1} . The nucleic acid content in CT11 reduced from 6.7% to 2.34% and in CT31 from 6.93% to 2.22% after the heat-shock process.

Finally, the production economics applying these SCP strains to utilize the glutamate fermentation effluent was made.

KEY WORDS:

glutamate fermentation effluent

kinetics heat-shock process

the production economics

无锡轻工业学院研究生论文纸

前言

所谓单细胞蛋白,主要是指细菌、酵母以及藻类等单细胞生物体。单细胞蛋白(简称SCP),具有较高的营养价值,其菌体中蛋白质含量可达40-60%,其中氨基酸组份齐全,且赖氨酸等必需氨基酸含量较高,还具有丰富的维生素,可作为维生素的补给品。表1列出了几种SCP与主要蛋白质食品的蛋白质含量,从表1中可以看出,同大豆粉相比,SCP的蛋白质含量高50%左右,且可利用的蛋白质比大豆高约20%,在有氨基酸添加时,可利用蛋白质甚至可达95%以上^[1]。

表1 几种SCP与主要蛋白质食品的蛋白质含量比较。

品名	蛋白质含量(%)	可利用蛋白的比率(%)
细菌 SCP	80	80 以上
酵母 SCP	60	70-88
自地霉 SCP	46	80 以上
大豆粉	42	60
肉、鱼、奶酪	20-35	65-80-70
谷物	8-14	50-70
鲜鸡蛋	12	94
鲜牛奶	3-4	82

SCP除营养丰富外,还具有开发上的优势。1. 原料广泛,现在已经开发,认为可作为SCP生产原料的原料有:矿物质

无锡轻工业学院研究生论文纸

泥(如泥炭),纤维资源,石油二次产品,废弃资源,2.生产速度快,相对投资少,3.不受生产地区,气候条件的影响.

最常用于食物的微生物是酵母,酵母作为维生素添加剂和增味剂已有很长的历史,作为蛋白质添加剂更为理想,且比细菌更容易从介质中回收.

我国是世界上人均耕地较少的大国,蛋白质资源严重缺乏,据国内有关资料汇总,我国至少短缺1000万吨蛋白饲料,到本世纪末,蛋白质资源将短缺一半.由于我国耕地和草原面积有限,要通过农牧业的途径迅速增加蛋白质的生产是不可能的,因此在目前情况下,研究和开发SCP对发展畜牧业,改善国民的食物构成,提高人民的营养水平是一条重要的途径.我国人口多,粮食产量较低,利用粮食原料生产SCP绝非可行途径.然而我国食品发酵行业的废水具有较高的COD和BOD,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环境,因而以食品发酵行业的下脚料和废物来生产SCP正日益受到重视,以上述废水来培养SCP,变废为宝,既减轻了排污的有机物浓度,又获得了蛋白质饲料,一举两得.

目前,我国年产味精18万吨,产生废液450万吨,如不进行处理而直接排放,将严重地影响水质,造成环境污染.而全部用来进行SCP生产,估计可产饲料蛋白69万吨,能够缓和饲料蛋白短缺的矛盾,具有深远的社会效益和经济价值.

无锡轻工业学院研究生论文纸

味精厂的谷氨酸废液具有有机物浓度高, pH值低, 氯离子含量高特点, 因此必须选择一类酵母, 能耐酸, 耐氯离子, 对有机物的利用性高, 最高比生长速率大, 适用于连续培养, 且应无毒, 具有典型的酵母香味, 可作为理想的动物饲料添加剂。

本论文是协助导师为镇江味精厂进行谷氨酸废液处理项目的一部分, 论文着重于使得所得数据能为以后工厂实际生产SCP提供直接的参考依据, 主要进行了处理谷氨酸废液酵母菌种的选育和驯化, 然后以2升小瓶对培养酵母的动力学参数进行了一系列初步的探讨。为了能进一步开发SCP资源, 使之能作为人类食物的蛋白质添加剂, 还进行了酵母核酸降解的研究, 本论文中的实验结果取得了预期的效果。

无锡轻工业学院研究生论文纸

I. 材料与方法.

一. 酵母细胞及谷氨酸废水成份分析

1. 细胞浓度测定法.

1> 用72-1分光光度计测 OD_{660nm} 法.

2> 细胞干重测定. 离心1ml发酵液. 洗涤=1次. $105^{\circ}C$ 烘干 8hr
至恒重. 称量.

2. 酵母细胞蛋白质含量的测定.

1> 凯氏定氮法 [1]

2> 双缩脲法 [2]

3. 谷氨酸废水 COD 测定 [3]

4. 谷氨酸废水中残糖的分析 [1]

5. 悬浮物、灰分测定.

6. 谷氨酸废水 pH 测定.

精密 pH 试纸. pH 计.

7. 氯离子含量测定

莫尔法 [4]

8. 谷氨酸含量测定

茚三酮法 [5]

9. 氨基酸纸上层析法 [5]

10. 有机酸纸上层析法 [5]

二. 菌种筛选及鉴定.

无锡轻工业学院研究生论文纸

(一) 菌种. SW1, GNO₃, P₃, CT1, CT2, CT3, SG, NO, NO₂, NO₃, CT11, CT31.

(二) 培养基.

培养基A: 葡萄糖 0.5%, 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.5%.

固体培养基加 2% 琼脂. 1 kg/cm². 灭菌 15 分钟.

培养基B: 葡萄糖 2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, 酵母膏 0.01%.

琼脂 2%, 1 kg/cm². 灭菌 15 分钟.

培养基C: 尿素 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, NaCl 0.01%, MgSO₄ 0.05%

CaCl₂ 0.01%, 酵母膏 0.02%, 1 kg/cm². 灭菌 15 分钟.

培养基D: 葡萄糖 0.062%, 胰蛋白胨 0.25%, 硝酸钠·3H₂O 0.5%.

NaCl 0.062%, 琼脂 2%, 1 kg/cm². 灭菌 15 分钟.

培养基E: 玉米粉 12.5g, 搅匀于 300ml 水中. 60°C 热水浴保温

1hr. 过滤, 滤液加水至 300ml. 加 2% 琼脂.

1 kg/cm². 灭菌 15 分钟.

培养基F: 1> 50ml 新鲜谷氨酸废水 脱脂棉过滤.

2> 50ml 水 + 2g 琼脂, 加热融化.

分开灭菌, 趁热混和, 分装.

培养基G: 新鲜废水, 用脱脂棉过滤. 或 5000rpm 离心

5分钟. 冰箱保存备用.

(三) 菌种选育与鉴定方法.

1. 菌种选育.

无锡轻工业学院研究生论文纸

将10种菌分别接种于装有40ml培养基G的250ml三角瓶中, 34℃, 180rpm培养15hr. 然后测其湿干重(x). 选出生长快, 干重大的, 再进行下列驯化.

2. 菌种驯化.

将上述得到的生长快的菌株, 接种于培养基G, 34℃, 180rpm培养, 以后每隔12hr移接一次, 连续移接, 直至其终菌浓基本稳定为止, 将培养液涂培养基下平板, 培养后, 从平板上挑取生长快, 菌落大的菌株.

3. 产孢子性能检验.

将菌种培养至对数生长期, 然后大量涂布于培养基D斜面, 25℃-28℃培养一周, 用孢子染色法检查是否产孢子. 为进一步证明是否产孢子, 将培养基D和培养基F上培养的细胞在55℃处理15分钟, 再进一步培养, 观察其生长与否, 如不生长则为不产孢子.

4. 形态学特征观察

(1) 假丝形成及观察.

在加盖玻片的玉米粉琼脂培养基上培养酵母, 34℃培养48hr, 在显微镜下观察假丝形成情况.

(2) 细胞大小和形状的观察.

将菌种接种于培养基A的固体斜面上, 34℃培养16hr, 用显微镜及测微尺观察细胞形态及测量其大小.

(3) 巨大菌落形态特征观察.

无锡轻工业学院研究生论文纸

将各点种在培养基A上培养,分别观察培养一天,三天,一周,三周的菌落大小,颜色,边缘,厚薄及表面状况。

5. 生理生化特征及名。

(1) 碳源利用试验。

将不同碳源以1%的量加入培养基C中制成各种平板,以培养基C作为生长情况的空白对照,将不同菌株点种其上,于34℃培养48hr,记录菌株生长情况。

(2) 氮源利用试验。

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℃培养48hr,观察菌株生长情况。

(3) 糖发酵试验。

将各种糖以2%的量(本糖为4%)加入酵母含氮培养基中,灭菌,加入艾氏管,接种,34℃培养3-10天,观察产气情况。

(4) 酵母产酸试验。

以5%葡萄糖培养基培养酵母,测定培养前后pH变化情况。

三. 酵母单细胞蛋白培养动力学研究。

(一) 仪回。

2L台式发酵缸,外加蠕动泵控制进出口流量,使之具有恒化器性能。

(二) 培养方法。

无锡轻工业学院研究生论文纸

1. 间歇培养:

将对数生长期种子以10%接种量接入发醇缸中培养, 控制温度 34°C , 空气流量为 $1.3\text{NL}/\text{min}$, 搅拌转速为 750rpm , 每隔1hr取样测定干重(x), COD, pH值.

2. 连续培养.

当上述间歇培养菌浓达到最大时, 开始连续流加, 控制不同的进出料速度, 待稳定后测定干重(x), COD, pH值.

(三) 各参数测定方法.

1. 酵母干重(x), COD值测定见《材料与方法》一.

2. K_{La} 值测定. [7]

(四) 细胞反馈培养研究方法.

按反馈比 $\alpha = 0.25$, 每隔一小时取样离心, 倾去上清液, 按浓缩比为5, 使沉淀菌体悬浮在一定体积的新鲜废水中, 控制流量, 使之在1hr之内均匀地加到发醇缸中, 并每小时测定缸内发醇液的 OD_{660} , pH, 直至稳定状态, 稳定后, 取样测定干重(x), COD, pH值.

四. 降低酵母细胞中核糖含量的方法.

(一) 核糖含量测定方法.

1. 地衣酚法. [1]

2. 紫外分光光度法. [1].

(二) 降低酵母胞内核糖含量的热脉冲法.

无锡轻工业学院研究生论文纸

将酵母培养物离心, 去除上清液, 以蒸馏水 (或缓冲液) 悬浮, 在一定温度下脉冲一段时间, 然后保温一段时间。

(三). 保温后渗透到溶液中核酸和胞内残留核酸的制备。

1. 将上述保温一定时间后的液体, 冰浴冷却, 然后以 12000 rpm, 4°C 离心 20 分钟, 倾出上清液待测。

2. 上述离心后的沉淀加入与反上清液等量的 0.5 N 高氯酸, 混匀, 70°C 水浴保温 20 分钟, 冰浴冷却, 12000 rpm 4°C 离心 20 分钟, 倾出上清液待测。

(四). 细胞中总核酸制备。

将培养物取一定量离心, 洗涤一次, 加入等量的 0.5 N 高氯酸, 混匀, 70°C 水浴保温 20 分钟, 冰浴冷却, 以 12000 rpm, 4°C 离心 20 分钟, 倾出上清液待测。

无锡轻工业学院研究生论文纸

II. 实验结果.

一. 谷氨酸废水酵母菌种的选育及鉴定.

(一) 谷氨酸废水主要成份的分析.

我们知道,谷氨酸发酵液经等电分离谷氨酸后得到的废液成份复杂,其中含有大量的谷氨酸母体,一般菌体干重达1.0-1.2%, pH 值低,一般为3.0左右,氯离子含量高,经分析测定氯离子为 $2.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^4 \text{ mg/L}$,有机物浓度高,其中大部分为谷氨酸,还有少量其它氨基酸和有机酸,残粉为0.5%左右,因此在菌种选育时,必须结合以上特点,要选择一类酵母,使之能耐酸和高氯离子浓度,对有机物的利用性,最终菌浓要大,能适合于连续培养,且蛋白质含量要高,无毒,可作为理想的动物饲料添加剂.

本论文中培养酵母所用废水为味精厂等电分离谷氨酸后的废液,如是需采用废水清液培养,则先离心去除谷氨酸母体.废水成份见表2.

从表2中可以看出,谷氨酸废水中主要能被酵母利用的有谷氨酸和正尾粉,还有少量有机酸,其中谷氨酸既可作为酵母碳源,又可作为氮源.

(二) 谷氨酸废水酵母菌种的选育.

根据以上对废水成份分析可知,其中氯离子含量高, pH 值低,因此必须选择一类酵母,能耐低 pH 值和高 Cl^- 浓度,且生长要快,终菌浓要大.

无锡轻工业学院研究生论文纸

将几株不同的菌种分别接种于废水中培养,一定时间后测定菌浓,选出生长快的作为进一步驯化之用.结果见表3.

从表3可以看出,菌株CT1,CT3终菌浓最大,选出进行驯化。

表2 谷氨酸废水成份分析表.

测定项目	含量
COD(mg/L)(上清液)	50000左右
总氮(mg/L)	2684
总磷(mg/L)	320
总固形物(mg/L)	3.69×10^4
悬浮物(mg/L)	3.19×10^4
谷氨酸(g/dL)	1.2 - 1.5
氯离子(mg/L)	$2.0 \times 10^4 - 2.4 \times 10^4$
灰份(mg/L)	5.95×10^3
还原糖(g/dL)	0.5左右
pH值	3.0±
其它氨基酸 有机酸	亮、甘、缬、天冬氨酸等 草酸、柠檬酸、乳酸等

表3. 几株不同菌在废水中的生长情况.

菌株	SW1	SG	NO	NO ₂	NO ₃	CT1	CT2	CT3	P ₃	GNO ₃
干重(g/L)	5.4	6.1	5.3	5.5	6.6	8.4	6.7	8.3	7.1	7.5
34°C 180rpm. 接种10%. 培养12hr.										

无锡轻工业学院研究生论文纸

(三) 酵母菌CT1、CT3的驯化。

谷氨酸废水中尽管有机物浓度高,即可为微生物生长所需的营养成分丰富,但其不同于其它废水的显著特点就是氯离子含量高, pH值低,使得酵母生长的延滞期长,影响工厂实际生产能力,故有必要对菌种进行驯化,使其对低pH值和高氯离子浓度的耐性增加。

将菌CT1、CT3按“材料与方法”中—(三)—2进行驯化,测定干重(x),结果见表4

表4. 菌株CT1、CT3驯化结果。

次数 接种 g/L	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CT1	8.4	8.8	8.8	9.0	9.5	9.8	10.1	10.2	10.1
CT3	8.3	8.6	8.8	9.2	9.4	9.7	9.8	9.7	9.8

由表4可见,通过不断用高氯离子和低pH值的新鲜废水驯化,使得两株菌的终菌浓均有所提高,这是由于菌株对废水高氯、低pH的适应性增强,使得菌株生长的延滞期缩短所致。经以上驯化得到的菌株分别命名为CT11、CT31。

(四). 菌种鉴定。

1. 不产子囊孢子试验。

根据1983年J. A. Barnett等编的《Yeast: Characteristics and Identification》酵母分类的主要依据有(1)细胞显微形态。(2)有性繁殖方式。(3)生理代谢特征。(4)生理生化反应