

利用甘蔗糖蜜酒精废液生产单细胞蛋白的中间试验研究

方霭祺 李萍 陈有为 邵华 李绍兰 马俊

(云南省微生物研究所, 昆明)

楼纯菊 周元吉

(中国科学院上海生物工程中心, 上海)

万丛林 刘炎辉 顾桂欣

(云南省建水糖厂, 建水)

单细胞蛋白(SCP)作为蛋白饲料在发展畜牧业中的重要作用早已为世人所公认, 而利用非食用资源特别是废弃资源作原料通过微生物的作用以工业方式生产SCP更有变废为宝的重大意义。

云南省有近70家糖厂, 大多附设酒精车间, 每年约有49万立方米的甘蔗糖蜜酒精废液排放到江河、农田, 造成该地区生态环境的严重污染。为此, 自1987年以来, 我们利用云南省建水糖厂酒精车间的废液进行了发酵生产酵母单细胞蛋白的中间试验研究。

材料和方法

(一) 菌种

采用热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)种内融合株 Ct-3 为供试菌株。根据中华人民共和国轻工部QB596-82标准规定^[1], 该酵母菌株系饲料用生产菌株。

(二) 培养基

1. 种子培养基

(1) 试管斜面及茄子瓶斜面用培养基(%): 酵母膏 0.5, 蛋白胨 1, 葡萄糖 2, 琼脂 2, 采用蒸馏水配制, 自然pH。

(2) 一号种子培养基(%): 浓糖蜜6, 尿素 0.2, 工业磷酸0.05, 采用自来水配制, 自然 pH。

(3) 二号种子培养基(%): 浓糖蜜 3, 尿素或工业硫酸铵 0.1, 工业磷酸 0.05, 采用糖蜜酒精废液配制, 用氨水调pH至4.0—4.5。

2. 发酵培养基: 糖蜜酒精废液加0.05%工业磷酸, 用氨水调pH至4.0—4.5。

(三) 发酵生产条件

采用分批发酵生产方式, 接种量均为10%。

1. 种子培养:

(1) 试管斜面和茄子瓶斜面: 接种后, 30℃ ± 1℃ 培养24h。

(2) 三角瓶种子液: 采用往复式摇床在 28℃ ± 2℃ 振荡培养 12—14h, 振幅 8 cm, 频率 100r/min。

(3) 一级种子培养: 在一级种子罐内30℃ ± 2℃ 通气搅拌培养10—12h, 搅拌转速 90r/min, 通气量1:1.5(v/v)。

(4) 二级种子培养: 在二级种子罐内30℃ ± 2℃ 通气搅拌培养 8—10h, 搅拌转速 90r/min, 通气量1:1.5(v/v)。

2. 发酵培养: 在10m³发酵罐内30℃ ± 5℃ 通气搅拌培养8h, 搅拌转速 90r/min, 通气量 1:1(v/v)。

3. 分离浓缩: 采用两台D-424型碟片式酵母分离机将发酵液浓缩至10—12巴林。

4. 干燥粉碎: 采用QZ313双滚筒干燥机进行干燥粉碎, 产品细度 ≥ 80目。

(四) 分析测定方法

本文于1989年10月24日收到。

本文系云南省科委、省经委共同委托研究项目, 已于1989年9月通过省级鉴定。

1. 生物量: 取10ml发酵液于3500r/min离心15min后, 弃去上清液称湿重, 蒸馏水洗两次置105℃烘箱内烘至衡重, 称菌体得生物量(干重)。

2. 糖量(总糖, 还原糖): 3,5-二硝基水杨酸定糖法。^[2]

3. 粗蛋白质: 常量凯氏定氮法。

4. 无机磷: 改良Fiske-subbarow法。

5. 水分: SC69-02水份快速测定仪。

6. 溶氧: HDE-A型氧电极直接测量, 电解质为醋酸。

7. pH: 精密pH试纸测定。

8. 悬浮物: 滤纸法。

9. 化学需氧量(COD): 重铬酸钾法。

10. 生化需氧量(BOD₅): 20℃培养5天所需氧量。溶氧测定用碘量法。

实验结果

(一) 生产菌株的生物学特性

Ct-3系热带假丝酵母的种内融合株, 细胞卵形或椭圆形。一端芽殖, 有大量假菌丝形成, 液体培养物沉降。能同化葡萄糖, 麦芽糖, 蔗糖, 半乳糖, 山梨糖, D-木糖, 纤维二糖和可溶性淀

粉, 还能利用肌醇、丙三醇、乙醇D-山梨糖醇和柠檬酸等作为碳源。

最适生长温度30℃±5℃, 最适pH4—5。该菌株有较好的絮凝性, 在发酵液中沉降迅速。

(二) 最佳发酵培养基配方的选择

采用5L三角瓶装培养基1L, 28℃±2℃往复式摇床振荡培养12h后测生物量, 经过正交试验法获得最佳培养基配方中不用加氮源, 磷酸0.1%, 糖蜜1.0%, pH4.0。

(三) 最适接种量和发酵时间的比较

从发酵液中溶氧的变化和酵母生物量的增长, 可以看出当采用种子液时其最适接种量为7.5—10%(v/v), 而采用离心酵母泥时的最佳接种量则为0.5%。

由发酵液中底物的消耗和酵母生物量的变化可知, 三角瓶培养时间以12—14h为宜, 一级种子培养10—12h, 二级种子和发酵培养为8—10h即可。

(四) 10m³发酵罐连续生产SCP的试验

10m³发酵罐投料5—7m³/罐, 通气搅拌培养8h, 连续生产12批的试验结果(表1)是: 生物量最高达25.32g/L, 平均为18.57g/L。

表2列出生产1吨菌粉的主要技术经济指标。

表1 10m³发酵罐连续生产12批试验结果

批号	发酵液体积(m ³)	生物量(g/L)	糖量(%)				磷量(%)	
			总糖		还原糖		发酵前	发酵后
			发酵前	发酵后	发酵前	发酵后		
1	7	20.17	3.84	1.82	3.09	1.38	489.56	7.51
2	7	17.81	3.03	1.29	2.65	1.15	564.31	6.75
3	7	21.85	3.71	1.67	3.12	1.34	539.90	7.51
4	7	14.34	3.47	1.57	3.03	1.15	488.04	
5	5	16.07	2.01	1.37	1.74	1.17	564.31	28.11
6	5	17.41	1.74	1.26	1.53	0.95	455.24	
7	5	21.56	5.97	1.93	3.62	1.40	452.19	15.14
8	7	16.27	2.93	1.57	2.53	1.24	480.41	9.04
9	7	25.32	4.49	1.84	3.20	1.30		
10	6	16.67	4.74	1.95	3.82	1.44		
11	5	20.47	3.44	1.58	3.15	1.13		
12	5	14.91	2.97	1.53	2.50	1.12		
平均		18.57						

注: 发酵时间均为8h

(五) 产品质量及环境指标的检测

按照轻工部标准QB596-82的要求^[1], 采用随机采样的方法抽测了14个样品的混合样, 结果是: 粗蛋白质44.83%, 水分6.08%, 灰分7.75%。除了粗蛋白质, 水分, 灰分达到国家一级品标准外, 其他指标也均符合。

生产SCP后排放的废水比粗塔废水 COD 平均下降73.49%, BOD₅平均下降75.27%。

表 2 10m³ 发酵罐生产 1 吨菌粉的主要技术经济指标

发酵罐体积	10m ³
发酵罐尺寸(径×高)	2.1m×3.2m (其中锥底0.3m)
投料总体积	73m ³
每罐投料平均体积	6.08m ³
装料率	50—70%
原材料耗用:	
工业磷酸	36.48kg
工业氨水(调pH)	7kg
泡 敌(消沫)	7kg
发酵时间	8h
细胞浓度*	18.57g/L
总电耗**	1536kWh(128kWh×12批)
单位电耗	1.13kWh/kg 菌粉
发酵罐单位体积产率	1.41kg/m ³ ·h

* 18.57g/L×73m³×80%(收率)=1.085吨/12批

** 发酵罐电机10kW×8h=80kWh, 罗茨风机 30 kW, 风量30—40m³, 每 m³ 为 1 kW。每罐平均投料 6.08m³, 按1:1通风量计, 6 m³ 用电 6 kW, 8 h 为 4 kWh。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国轻工业部标准QB596-82酵母及其检验方法。1982年4月1日发布, 1982年7月1日实施。
- [2] Muller, G. L.: *Anal. Chem.*, 31:426, 1959.
- [3] Chen, A. S, et al.: *Anal. Chem.*, 28:1756—1758, 1959.
- [4] 中国科学院数学研究所统计组: 常用数理统计方法, 科学出版社, 北京, p. 75, 1974.
- [5] Reed, G. and Pepler, H. J.: *Yeast Technology*, Avi Publishing Company Inc, 1973.
- [6] Chen, S. L. and Gutmanis, F.: *Biotech. Bioeng.*, 18(10):1455—1482, 1976.

Pilot Plant Production of SCP with Stillage from Molasses Alcohol Fermentation

Fang Aiqi Li Ping Chen Youwei Shao Hua Li Shaolan Ma Jun
(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming)

Lou Chunji Zhou Yuanji
(Shanghai Centre of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai)

Wan Conglin Liu Yanhui Gu Guixin
(Jianshui Factory of Sugar, Yunnan)

Intraspecific fusant Ct-3 from *Candida tropicalis* has been used to produce sing cell protein(SCP) with the stillage from molasses alcohol fermentation. The yeast was cultured for 8 h in 10m³ stirred-tank fermentor, the maximum biomass of dry yeast was 25.32g/L, the average biomass was 18.57g/L, the maximum specific growth rate was 0.39 per hour and the maximum volumetric rate of production was 2.43g per liter hour. The product contains 44.83% protein, 6.08% moisture and 7.25% ash. Its colour was brown-yellow and the quality meets the first class standard QB596-82 issued by National Ministry of Light Industry. The pH of the second waste water compared with the original one has gone up from 3.5 to neutral, and the COD and BOD₅ have cut down by 73.49% and 75.27%, respectively.

Key words

Stillage from molasses alcohol fermentation; SCP; *Candida tropicalis*