

以啤酒洗槽废水为主料产 产朊圆酵母液体发酵的研究

杨英杰¹, 王淑珍¹, 杨家峰¹, 白晨²

(1. 上海师范大学生命与环境学院, 上海 200234; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要: 以啤酒洗槽废水为主料通过单因素优选和正交试验法对产朊圆酵母进行液体发酵培养基的筛选与发酵条件的确定, 经方差分析结果最佳培养基为 2°Be 糖度的啤酒洗槽废水, 豆饼粉 0.5%, 葡萄糖 2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.1%。最佳发酵条件为时间 18h, 温度 28℃, 转数 150r/min, 装量 100mL/250mL 三角瓶, pH 5.0。干菌体积量为 20.12g/L。

关键词: 啤酒洗槽废水; 产朊圆酵母; 液体培养基; 生物积累量

中图分类号: Q646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2003)01-0072-05

0 引言

我国啤酒年产量大, 每年有大量的洗槽废水(3.5×10^7 T) 不经处理直接排入下水道, 不仅造成浪费, 还导致环境污染。产朊圆酵母(*Torula utilis* Henneb) 又称产朊假丝酵母(*Candida utilis*), 产朊球拟酵母(*Torulopsis utilis*), 是典型的高产蛋白质和 B 族维生素的食用酵母^[1]。由于产朊圆酵母没有淀粉酶是典型的糖质原料利用菌, 所以以啤酒洗槽废水为主料添加适量的糖质碳源、氮源和无机盐进行液体发酵积累菌体, 不仅消除污染, 同时获得营养丰富, 口味独特的营养保健食品基料, 以此开发系列功能保健食品。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种

产朊圆酵母(*Torula utilis* Henneb) AS2.120 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心(北京)。

1.1.2 啤酒洗槽废水

取自上海亚太啤酒有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 啤酒洗槽废水成分分析

收稿日期: 2002-10-15

作者简介: 杨英杰(1975-) 男, 上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生; 王淑珍(1941-) 女, 上海师范大学生命与环境科学学院教授。

固形物	恒重法	总氮	凯氏定氮法
还原糖	高锰酸钾滴定法	Mg, Ca	原子吸收法
Fe	菲林法	VB ₁ , VB ₂	荧光比色法
pH	便携式酸度计		

1.2.2 液体发酵培养基的筛选与确定

单因素优选和正交试验法.

1.2.3 液体发酵培养条件的确定

正交试验法.

1.2.4 菌体生物量的测定

产阮圆酵母于 250mL 摇瓶, 装液体量 100mL, 接种量 0.5%, pH5.0, 温度 28℃, 转数 150r/min 的条件下培养 18h^[2-4], 取发酵液于 3000r/min 的转速下, 离心 10min, 弃上清液, 再用无菌水重新悬浮菌体, 在同样离心条件下, 反复 3 次, 沉淀物于 60℃ 烘干至恒重^[5].

1.2.5 产阮圆酵母成分分析

水分	减压干燥法	氨基酸	盐酸水解法, 日立-850 氨基酸自动分析仪
粗蛋白质	凯氏定氮法	粗脂肪	索氏抽提法
碳水化合物	苯酚-硫酸法	灰分	灼烧重量法
VB ₁ , VB ₂	荧光比色法	Ca	原子吸收法
核酸	定磷法		

2 结果与讨论

2.1 啤酒洗槽废水主要成分(表 1)

表 1 啤酒洗槽废水主要成分(g/100mL)

成分	固形物	总氮	还原糖	Mg(μg/mL)	Ca(μg/mL)	VB ₁ (μg/mL)	VB ₂ (μg/mL)	酸度(pH)
含量	3.62	0.41	1.98	0.26	0.20	0.40	6.64	6.20

2.2 培养基氮、碳源的筛选

在产阮圆酵母 250mL 摇瓶, 装液体量 100mL, 接种量 0.5%, pH5.0, 温度 25℃, 转数 150r/min 的条件下摇瓶培养 20h, 进行单因子试验和正交试验.

2.2.1 单因子试验

氮源的筛选 分别用 5 种氮源进行摇瓶试验, 各重复 5 次, 其结果, 最佳氮源为豆饼粉, 对生物量积累的影响如表 2.

表 2 5 种氮源对生物积累量的影响(g/100mL)

氮源	生物量					总和	平均值
豆饼粉	0.201	0.981	0.775	0.959	0.983	3.899	0.780**
豆芽汁	0.246	0.260	0.248	0.206	0.218	1.178	0.236*
尿素	0.008	0.004	0.002	0.016	0.003	0.033	0.007
硫酸铵	0.002	0.007	0.014	0.030	0.017	0.070	0.014
硫酸铵	0.022	0.036	0.029	0.072	0.031	0.190	0.038

* 影响显著($P < 0.05$); ** 影响极显著($P < 0.01$).

碳源的筛选 分别用 3 种碳源进行摇瓶试验, 各重复 5 次, 其结果, 葡萄糖为最佳加强碳源, 对生物

积累量的影响如表3.

表3 3种碳源对生物积累量的影响(g/100mL)

加强碳源	生物量					总和	平均值
葡萄糖	0.870	0.932	1.320	1.024	1.042	5.188	1.038
马铃薯	0.785	0.825	0.575	0.732	0.726	3.641	0.728
玉米粉	0.137	0.414	0.315	0.322	0.256	1.444	0.288

2.2.2 正交试验

以洗槽废水(A)、豆饼粉(B)、葡萄糖(C)3因子进行正交试验和方差分析,见表4~6.

表4 正交试验结果的直观分析

试验号	洗槽废水(A)	豆饼粉(B)	葡萄糖(C)	生物量(g/100mL)
1	1(1°Be)	1(0.5%)	1(1%)	1.06
2	1(1°Be)	2(1%)	2(1.5%)	1.19
3	1(1°Be)	3(1.5%)	3(2%)	1.20
4	2(1.5°Be)	1(0.5%)	2(1.5%)	1.30
5	2(1.5°Be)	2(1%)	3(2%)	1.50
6	2(1.5°Be)	3(1.5%)	1(1%)	1.25
7	3(2°Be)	1(0.5%)	3(2%)	1.65
8	3(2°Be)	2(1%)	1(1%)	1.54
9	3(2°Be)	3(1.5%)	2(1.5%)	1.63
T1	3.45	4.01	3.85	T = 12.32
T2	4.05	4.23	4.12	
T3	4.82	4.33	4.35	
X1	1.25	1.34	1.28	
X2	1.35	1.41	1.37	
X3	1.61	1.44	1.45	
R	0.36	0.10	0.17	

表5 3种营养物的方差分析

营养物	DF	SS	MS	F	F0.05(2,2)	F0.01(2,2)
A	2	0.3144	0.1572	80.6154*	19	99
B	2	0.0084	0.0042	2.1538		
C	2	0.0418	0.0209	10.7176		
Er	2	0.0039	0.00195			

* 差异显著

其结果, B, C 两因素各水平之间对生物积累量无明显差异, A 因素各水平之间具有明显差异, 对 A 因素各水平进行比较, 结果如表6所示.

表6 A因素各水平比较

水平(K/3)	Xi	Xi-1.15	Xi-1.35
A3	1.61	0.46*	0.26
A2	1.35	0.20	
A1	1.15		

* 差异显著

表 6 可见, A 因素各水平的差异程度依次为 A3, A2, A1, 故优选 A3 水平. 综合上述分析结果, 最佳培养基组成为 2Be 的洗槽废水, 豆饼粉 0.5%, 葡萄糖 2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.1%.

2.3 发酵条件的确定

利用上述优选的培养基, 进行温度、时间、通气量 3 因素 3 水平的正交试验.

表 7 正交试验结果的直观分析

试验号	温度(°C)	时间(h)	通气量(mL/250mL 三角瓶)	生物量(g/100mL)
1	1(25)	1(18)	1(100)	1.70
2	1(25)	2(20)	2(80)	1.65
3	1(25)	3(24)	3(50)	1.40
4	2(28)	1(18)	2(80)	2.01
5	2(28)	2(20)	3(50)	1.90
6	2(28)	3(24)	1(100)	1.85
7	3(30)	1(18)	3(50)	1.86
8	3(30)	2(20)	1(100)	1.75
9	3(30)	3(24)	2(80)	1.50
T1	4.75	5.57	5.30	T = 15.62
T2	5.75	5.30	5.16	
T3	5.17	4.75	5.16	
X1	1.58	1.86	1.77	
X2	1.92	1.77	1.72	
X3	1.70	1.58	1.72	
R	0.34	0.28	0.05	

表 5 可见, 温度对生物积累量的影响最大, 时间影响较大, 最佳温度是 28°C, 时间是 18h. 即 4 号组合. 由于通气量对其影响较小, 应取最大的装量 100mL/250mL, 可减少能耗. 在此发酵培养条件下, 可获得产朊圆酵母 20.12g/L(干重).

以啤酒洗槽废水为主料的培养基, 比对照组(PDA 液体培养基)(9.5g/L)获得产朊圆酵母的生物积累量提高一倍多.

2.4 产朊圆酵母(干)的感官特性与主要成分

2.4.1 感官特性

淡黄色粉末, 口感微香甜, 无异味.

2.4.2 主要成分见表 8~9

表 8 产朊圆酵母(干)主要成分

成分	水分	粗蛋白	粗脂肪	碳水化合物	灰分	Ca	核酸	V_{B1} (mg/100g)	V_{B2} (mg/100g)
含量(g/100g)	4.0	50.8	6.9	15.3	9.1	0.9	10.9	2.4	8.3

表 9 产朊圆酵母(干)氨基酸类(%)

氨基酸	Leu	Ile	Val	Thr	Met	Lys	His	Phe	Trp	Arg	Ala	Asp	Glu	Gly	Pro	Ser	Tyr
含量	4.5	3.6	3.8	2.3	0.7	4.2	1.2	2.7	0.8	3.6	2.6	5.6	8.1	2.0	1.9	2.3	1.7

氨基酸总量为 51.6%, 人体必需氨基酸为 24.3%.

3 结 论

过以啤酒洗槽废水为主料对产朊圆酵母液体培养基与最佳液体培养条件的筛选,证明部分食品生产中消除环境污染的措施,采取变废为宝的途径是可行的,为减少啤酒洗槽废水的运输和保存,本产品的开发最好建立在啤酒生产厂内.

参考文献:

- [1] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册[M]. 北京: 科学出版社, 1980. 371-373.
- [2] 张惠文. 产元假丝酵母尿酸酶的快速提取法及产酶最适条件[J]. 微生物学通报, 1997, 18(5): 308-311.
- [3] ERMACOVA S A, et al. Accumulation of pyrophosphate and other energy rich phosphorus compounds under various condition of yeast growth[J]. Arch Microbiol, 1981, 128: 394-397.
- [4] 王立群. 产元假丝酵母原生质体的制备[J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(4): 384-387.
- [5] 白旒谦. 微生物实验技术[M]. 济南: 山东大学出版社, 1987. 42.

Study on Submerged Culture of *Torula Utilis* in Waste Water from Washing Beer Tank

YANG Ying-jie¹, WANG Shu-zhen¹, YANG Jia-feng¹, BAI Chen²

(1. College of Life and Environment Sciences, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234, China;

2. College of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: It was proved by single factor optimization and orthogonal test that the optimum medium for submerged culture of *Torula utilis* were 2°Be waste water from washing beer tank, added 0.5% soybean cake flour, 2% glucose, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.1%, and that the proper submerged culture conditions were 28°C, 18h, 150r/min, pH5.0 and 100ml liquid medium in the 250ml bottle, 20.12g dry yeast per liter liquid medium was gained.

Key words: waste water from washing beer tank; *Torula utilis*; liquid medium; Biomass