

大豆蛋白废水生产单细胞蛋白的菌种选择及其培养条件

付源^{1,2}, 李建政¹, 鲍立新¹, 徐香玲²

1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090
2. 哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150025

[摘要] 针对大豆蛋白生产废水的水质特性, 选择了产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、白地霉 (*Geotrichum candidum* link)、解脂假丝酵母解脂变种 (*Candida lipolytica*) 和扣囊拟内孢霉 (*Endomycopsis fiburiger*) 等 5 种工业生产酵母, 作为以大豆蛋白废水生产单细胞蛋白 (Single Cell Protein, SCP) 的菌种, 并通过摇瓶培养实验, 对其培养生长条件进行了研究。结果表明, 白地霉的最佳培养条件为 C/N 37 (马铃薯-葡萄糖培养基), pH 6.5, 25℃, 180 r/min; 产朊假丝酵母为 C/N 5 (麦氏琼脂培养基), pH 6, 25℃, 180 r/min; 热带假丝酵母为 C/N 37 (马铃薯-葡萄糖培养基), pH 5.5, 25℃, 210 r/min; 解脂假丝酵母为 C/N 37 (马铃薯-葡萄糖培养基), pH 5.5, 25℃, 180 r/min; 扣囊拟内孢霉为 C/N 37 (马铃薯-葡萄糖培养基), pH 6, 25℃, 180 r/min。5 种酵母菌基本都适合生长在含糖量较高, pH 偏酸性, 温度在 25℃ 左右的环境当中, 比较适合利用大豆蛋白废水生产 SCP, 为菌种的复配提供了依据, 为实现利用大豆蛋白废水生产 SCP 奠定了基础。

[关键词] 大豆蛋白废水; 酵母; 单细胞蛋白; 摇瓶发酵

[中图分类号] TQ939.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)11-0009-05

Selection of Yeasts and the Culture Conditions for Single Cell Protein Production from Soy Protein Wastewater by Fermentation

FU Yuan^{1,2}, LI Jianzheng¹, BAO Lixin¹, XU Xiangling²

1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China
2. College of Life and Environment Sciences, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

Abstract: Based on the characteristics of high concentration organic wastewater produced from a soy protein process, a few yeasts and the optimal culture conditions were selected to produce Single Cell Protein (SCP) by soy protein wastewater fermentation. The results of Erlenmeyer flask indicated that *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Geotrichum candidum* link and *Endomycopsis fiburiger* could be used and their optimal culture conditions were, respectively, as follows: Potato Dextrose Agar (PDA) medium, initial pH 6.5, 25℃ and 180 runs per minute (r/min) for *Geotrichum candidum* link; MacConkey medium, initial pH 6, 25℃ and 180 r/min for *Candida utilis*; PDA, initial pH 5.5, 25℃ and 210 r/min for *Candida tropicalis*; PDA, initial pH 5.5, 25℃, 180 r/min for *Candida lipolytica*; PDA, initial pH 6, 25℃ and 180 r/min for *Endomycopsis fiburiger*.

Key Words: soy protein wastewater; yeasts; single cell protein; Erlenmeyer flask fermentation

CLC Number: TQ939.9

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)11-0009-05

大豆是人类植物蛋白和食用油的主要来源之一, 也是世界上产量最多的油料作物。目前世界大豆分离

蛋白的年产量约 40~50 万 t, 增长势头十分强劲。我国 20 世纪 80 年代初开始生产大豆分离蛋白, 并随食品

收稿日期: 2007-01-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2002AA601310)

作者简介: 付源, 女, 哈尔滨工业大学与哈尔滨师范大学联合培养, 硕士研究生, 研究方向为有机工业废水资源化生物技术;

E-mail: fuyuan19830126@163.com

李建政(通讯作者), 男, 哈尔滨市南岗区海河路 202 号哈尔滨工业大学二区市政环境工程学院, 教授, 研究方向为有机工业废水处理与资源化; E-mail: ljz6677@163.com

工业的发展而迅速发展起来^[1]。大豆蛋白加工行业快速发展的同时,其生产过程排放的高浓度有机废水水量也在增加。据统计,每加工 1 t 大豆将排放 2~5 t 乳清废水,废水中可生物降解的有机物浓度生化耗氧量(Biochemical Oxygen Demand, BOD)可高达 10 000 mg/L^[2]。另一方面,大豆蛋白废水含有大量的蛋白质、油脂和总糖等天然有机物,是一种宝贵的生物质资源。当今世界,已对环境与社会经济协调发展、实施可持续发展战略、建设和谐社会形成共识。有效治理工业水污染,同时实现废物资源化,已成为工业废水治理领域的热门研究课题。

大豆蛋白废水具有含有大量的糖、蛋白质和脂肪类有机物,且不含有毒有害物质等特点,是培养和生产单细胞蛋白(SCP)的理想原料。将大豆蛋白生产废水的处理与 SCP 生产回收相结合,不仅可以回收颇具经济价值的 SCP,同时也使废水中水质化学耗氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)浓度得到大幅度降低,从而降低废水处理的难度和费用。本文针对大豆蛋白生产废水的特性,选择了 5 种发酵工业常用酵母菌,并对其生长条件进行了研究,为开发以大豆蛋白废水为原料的 SCP 生产和废水处理综合技术奠定基础。

1 SCP 生产菌种的选择

1.1 大豆蛋白废水的特点

大豆蛋白生产废水含有多种天然有机污染物^[3-6], COD 含量较高,一般为 12 000~20 000 mg/L,其中含油脂 1 700 mg/L 左右、蛋白质 3 800~4 000 mg/L、总糖 7 000~20 000 mg/L、总氮(TN)800~1 700 mg/L、总磷(TP)100~200 mg/L。大豆蛋白生产废水除糖、蛋白质和脂肪的含量较高外,还具有 pH 偏酸性、水温适中等特性,比较适合酵母菌的生长,因此理论上可利用酵母菌对该废水进行综合治理,以达到废物资源化的目的。

1.2 SCP 生产菌种的选择

废水中的主要成分为糖类、蛋白质以及油脂,而不同酵母利用的主要底物差别较大,要最大程度地将废水中各种污染物转化为可回收利用的 SCP,单一菌种难以做到。因此,需要利用多个营养特征不同的菌种进行组合。组合前,必须针对废水成分进行菌种选择并对它们的最佳生长条件进行研究,以便更好地选择合适的菌种,并对生产工艺运行条件进行控制,达到最低成本、最大效益地进行 SCP 生产和废水处理的目的。经过分析,本文选择了 5 个工业上常用的酵母菌,其特点如下^[7]。

1) 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*):降解转化玉米粉和烃类有机物较强,适合利用各种糖类,满足自身生长的需要,是目前世界上生产 SCP 的主要菌种之一。

2) 产脲假丝酵母(*Candida utilis*):可以利用纸浆、蜜糖、土豆淀粉废料和木材水解液,除了可以利用各种

糖原之外,还可以分解纤维素一类的物质,也是目前世界上生产 SCP 的主要菌种之一。

3) 解脂假丝酵母解脂变种(*Candida lipolytica*):分解脂肪和蛋白质的能力都很强,而大豆蛋白废水中油脂及蛋白质含量都比较高,是解脂假丝酵母解脂变种良好的营养基质。

4) 白地霉(*Geotrichum candidum link*):水解蛋白能力强,环境适应能力强,其 SCP 营养丰富。

5) 扣囊拟内孢霉酵母(*Endomycopsis fiburiger*):能有效地利用淀粉和蛋白源作为能源和氮源,对很多其他底物的利用能力也很强。

以上 5 个菌种,可以分别利用大豆蛋白废水中的糖类、蛋白质和脂类等成分,且均能在偏酸性的环境中获得优势生长,比较适合利用大豆蛋白废水生产 SCP。如果能将它们有机地构建成稳定的酵母菌群,使其在废水环境中形成互利共生或协作等有利的关系,将可最大限度地将废水中有机物转化为 SCP,同时也可最大程度地降低废水的 COD 浓度。要达到这一目的,必须首先掌握它们的生长特性和培养条件。

2 实验方法

2.1 菌种来源

C. tropicalis, *C. utilis* 和 *G. candidum link* 由黑龙江省微生物研究所提供;*C. lipolytica* 和 *E. fiburiger* 由中国工业微生物菌种保藏中心提供。

2.2 培养基

根据研究需要,对待测酵母菌的培养分别采用 3 种培养基,即麦芽汁培养基、马铃薯-葡萄糖培养基和麦氏琼脂培养基,这 3 种培养基的碳氮比值(C/N)不同,分别为 37, 21 和 5,可籍此考察不同 C/N 对酵母菌生长的影响。

2.3 正交实验方法

为寻找试验菌种的最佳培养条件,本文设计并进行了正交实验。

2.3.1 实验因素的确定

影响微生物生长的环境因素包括营养物、氧、温度、渗透压、pH 值、水分、化学物质等^[9]。由于大豆蛋白生产废水无有毒有害化学物质,可以排除化学因素影响。本文重点考察了温度、C/N 和初始 pH 值 3 个因素对 5 种酵母菌生长的影响。

2.3.2 实验水平的确定

酵母能在 25~30℃和 pH 4~6 的条件下良好生长,但不同酵母的最佳生长温度和 pH 值存在一定差异,另外,在不同环境中,酵母的最佳生长条件也不同。本文根据普通好氧酵母的最适生长条件范围以及大豆蛋白生产废水的水质特点,对每种因素选取了 3 个水平(见表 1)进行培养实验。并在以上实验因素及其水平确定

的基础上,选取正交表 $L_9(3^4)$ 进行。正交实验方案如表 2 所示。

表 1 实验因素及水平
Table 1 Factors and levels for orthogonal test

因素	C/N	温度/℃	pH 值
水平 1	麦芽汁	25	4
水平 2	马铃薯-葡萄糖	28	5
水平 3	麦氏琼脂	30	6

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验表
Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal test table

实验分组	培养基	温度/℃	pH 值
1	麦芽汁	25	4
2	麦芽汁	28	5
3	麦芽汁	30	6
4	马铃薯-葡萄糖	25	5
5	马铃薯-葡萄糖	28	6
6	马铃薯-葡萄糖	30	4
7	麦氏琼脂	25	6
8	麦氏琼脂	28	4
9	麦氏琼脂	30	5

2.3.3 培养实验

采用摇瓶发酵法。培养基配好之后,装入 250 mL 三角瓶,装入量为 50 mL。用富氧膜平包于瓶口,121℃ 高压灭菌 20 min。将 5 种菌株分别在斜面培养基上传代活化 1 次,采用生理盐水制成菌悬液,以 1/10 接种量分别接入培养基中,将摇瓶置于摇瓶柜中振荡,转速为 140 r/min。每个条件(分组)采用 3 个平行样同时培养,测定值取平均值。培养时间为 40 h。

2.4 单因子的校正实验

在正交实验结果的基础上,本文分别对温度、起始 pH 值和转速进行了单因子校正实验,以更加确切地掌握所选菌种的生长条件。培养温度选择 20℃,22℃,25℃ 和 28℃ 4 个梯度;起始 pH 值选择 5,5.5,6,6.5 和 7 五个梯度;转速选择 140 r/min,180 r/min 和 210 r/min 3 个梯度。实验采用摇瓶发酵法,每个条件下采用 3 个摇瓶平行进行,培养时间仍为 40 h。

2.5 测试方法

培养液中的细胞密度采用比浊法,752 型紫外可见分光光度计于 560 nm 测定吸光度(OD)。以培养前后的 OD 差值作为酵母菌增殖的评价指标。培养液的 pH 值采用 PHS-3C 型精密酸度计测定。

3 实验结果与讨论

3.1 正交实验

C/N、温度及初始 pH 值对 *G. candidum link*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* 和 *E. fiburiger* 生长的正交实验结果如表 3 所示。为确定其最佳生长条件,在此根据如表 3 所示的正交实验结果,分别进行如下统计学分析。

表 4 是对 *G. candidum link* 正交实验结果的统计学分析。从表 4 可以看出,C/N、温度和初始 pH 值 3 种因素对 *G. candidum link* 生长影响的极差值从大到小依次为温度、培养基、pH 值,也就是说对于 *G. candidum link* 生长的影响作用强度,依次为温度>C/N>pH 值。就 C/N 均值来看,水平 2(C/N 37)的数值最大(0.141),说明 *G. candidum link* 在 C/N 为 37 时长势最好;就温度的影响分析,其均值在水平 1(温度 25℃)时最大(0.077),即在 25℃的时候长势最好;pH 均值在水平 3(初始 pH 6)时最大(0.188),说明 *G. candidum link* 在 pH 值为 6 时长势最好。所以,*G. candidum link* 的最佳培养条件为 C/N 37,

表 3 正交实验结果
Table 3 Results of the orthogonal test

实验分组	培养基(C/N)	温度/℃	pH 值	OD 差值				
				<i>G. candidum link</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>E. fiburiger</i>
1	麦芽汁(21)	25	4	0.033	0.033	0.011	0.099	0.003
2	麦芽汁(21)	28	5	0.005	0.006	0.009	0.007	0
3	麦芽汁(21)	30	6	0.003	0.040	0.005	0.003	0.002
4	马铃薯-葡萄糖(37)	25	6	0.212	0.008	0	0	0.009
5	马铃薯-葡萄糖(37)	28	4	0.155	0.142	0.175	0.135	0.148
6	马铃薯-葡萄糖(37)	30	5	0.090	0.082	0	0.019	0.007
7	麦氏琼脂(5)	25	5	0.317	0.382	0.102	0.128	0.006
8	麦氏琼脂(5)	28	6	0.083	0.047	0.063	0	0.003
9	麦氏琼脂(5)	30	4	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001

注: OD 差值为培养 40 h 后的 OD 值与 0 h 时的 OD 值之差。

表 4 白地霉正交实验结果统计学分析
Table 4 Statistical results of the orthogonal test
for *G. candidum link*

	水平 1	水平 2	水平 3	极差
C/N	0.026	0.141	0.054	0.118
温度	0.077	0.065	0.005	0.100
pH 值	0.144	0.041	0.188	0.183

注: C/N、温度、pH 值为进行统计运算后,3 个不同水平得出的算术平均数值。

pH 6, 25℃。

表 5 是对 *C. utilis* 正交实验结果的统计学分析。结果表明, C/N、温度和初始 pH 值 3 种因素对 *C. utilis* 生长的影响作用强度依次为 pH 值>C/N>温度; *C. utilis* 的最适培养条件为 C/N 5, pH 6, 25℃。

表 5 产朊假丝酵母正交实验结果统计学分析
Table 5 Statistical results of the orthogonal test for *C. utilis*

	水平 1	水平 2	水平 3	极差
C/N	0.026	0.141	0.054	0.118
温度	0.077	0.065	0.005	0.100
pH 值	0.144	0.041	0.188	0.183

注: C/N、温度、pH 值为进行统计运算后,3 个不同水平得出的算术平均数值。

对 *C. tropicalis* 的正交实验结果统计学分析 (见表 6) 表明, C/N、温度和初始 pH 值 3 种因素对 *C. tropicalis* 生长的影响作用强度依次为 pH 值>温度>C/N, 其最适培养条件为 C/N 37, pH 6, 28℃。

表 6 热带假丝酵母正交实验结果统计学分析
Table 6 Statistical results of the orthogonal
test for *C. tropicalis*

	水平 1	水平 2	水平 3	极差
C/N	0.026	0.141	0.054	0.118
温度	0.077	0.065	0.005	0.100
pH	0.144	0.041	0.188	0.183

注: C/N、温度、pH 值为进行统计运算后,3 个不同水平得出的算术平均数值。

对 *C. lipolytica* 的正交实验结果统计学分析 (见表 7) 表明, C/N、温度和初始 pH 值 3 种因素对 *C. lipolytica* 生长的影响作用强度依次为 pH 值>温度>C/N, 其最适培养条件为 C/N 37, pH 6, 25℃。

对 *E. fiburiger* 的正交实验结果统计学分析 (见表 8) 表明, C/N、温度和初始 pH 值 3 种因素对 *E. fiburiger* 生长的影响作用强度依次为 C/N>pH 值>温度, 其最适

表 7 解脂假丝酵母正交实验结果统计学分析
Table 7 Statistical results of the orthogonal test
for *C. lipolytica*

	水平 1	水平 2	水平 3	极差
C/N	0.008	0.038	0.025	0.015
温度	0.058	0.082	0.003	0.068
pH 值	0.055	0.002	0.094	0.086

注: C/N、温度、pH 值为进行统计运算后,3 个不同水平得出的算术平均数值。

表 8 扣囊拟内孢霉正交实验结果统计学分析
Table 8 Statistical results of the orthogonal test
for *E. fiburiger*

	水平 1	水平 2	水平 3	极差
C/N	0.002	0.006	0.004	0.053
温度	0.055	0.050	0.003	0.047
pH 值	0.003	0.003	0.052	0.049

注: C/N、温度、pH 值为进行统计运算后,3 个不同水平得出的算术平均数值。

培养条件为 C/N 37, pH 6, 25℃。

3.2 单因子的校正

为了更加精确地掌握 5 个菌种的生长指标, 本文在正交实验的基础上, 进行了温度、摇瓶转速和培养基起始 pH 值等单因子校正实验。

温度校正实验结果 (见表 9) 表明, *G. candidum link*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* 及 *E. fiburiger* 均在培养温度为 25℃ 时获得最大生长量, 反映细胞增长量的 OD 差值分别为 0.324, 0.42, 0.448, 0.383 和 0.336, 低于或高于这一温度, 以上 5 种酵母均不能获得最佳生长。

转速的增加会对菌体的生长带来益处。因为转速的提高会使溶解氧量增加, 有利于好氧菌的生长, 但转速过高, 也有可能因为体系的剪切应力的提高而妨碍菌体的生长。实验结果 (见表 10) 表明, *G. candidum link*, *C. utilis*, *C. lipolytica* 及 *E. fiburiger* 都为 180 r/min, 只有 *C. tropicalis* 为 210 r/min。

如表 11 所示的初始 pH 值校正实验结果表明, 各菌种最佳 pH 值为: *G. candidum link* pH 6.5, *C. utilis* pH 6, *C. tropicalis* pH 5.5, *C. lipolytica* pH 5.5, *E. fiburiger* pH 6。

4 结论

研究结果表明, *C. utilis* 生长的最佳 C/N 为 5 (麦氏琼脂培养基), *G. candidum link*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* 和 *E. fiburiger* 的最佳 C/N 均为 37 (马铃薯-葡萄糖培养基); *G. candidum link*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* 和 *E. fiburiger* 的其他最适生长

表 9 温度校正实验结果
Table 9 Corrected temperature

温度/℃	<i>G. candidum link</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>E. fiburiger</i>
20	0.268	0.308	0.414	0.178	0.002
22	0.279	0.344	0.447	0.139	0.135
25	0.324	0.420	0.448	0.383	0.336
28	0.115	0.250	0.364	0.196	0.169

表 10 转速校正实验结果
Table 10 Corrected rotating speed

转速/r·min ⁻¹	<i>G. candidum link</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>E. fiburiger</i>
140	0.321	0.420	0.448	0.383	0.330
180	0.355	0.493	0.472	0.401	0.400
210	0.328	0.368	0.501	0.324	0.098

表 11 初始 pH 值校正实验结果
Table 11 Results of correcting test for initial pH

初始 pH 值	<i>G. candidum link</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>E. fiburiger</i>
5.0	0.258	0.236	0.424	0.094	0.361
5.5	0.247	0.243	0.447	0.164	0.321
6.0	0.255	0.253	0.423	0.094	0.389
6.5	0.272	0.219	0.389	0.117	0.388 6
7.0	0.240	0.242	0.319	0.071	0.378

条件分别为：pH 6.5,25℃,180 r/min；pH 6, 25℃, 180 r/min；pH 5.5, 25℃, 210 r/min；pH 5.5, 25℃, 180 r/min；pH 6,25℃, 180 r/min。

G. candidum link, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* 和 *E. fiburiger* 均能在含糖较高、偏酸性及 25℃左右的环境中生长良好，而大豆蛋白生产废水的特征恰与这些酵母菌的最佳生长繁殖条件相符，这为实现菌种的复配、尽可能多地将大豆蛋白生产废水中的生物质转化为 SCP、开发大豆蛋白生产废水处理的新型工艺提供了现实的可行性依据。

参考文献 (References)

- [1] 李吕木. 大豆分离蛋白及其制取[J]. 粮食与食品工业, 2004, 12(2): 7-10.
LI Lumu. Soybean protein isolate and its isolation[J]. Cereal and Food Industry, 2004, 12(2): 7-10.
- [2] 伍 军, 艾启俊, 于同泉, 等. 大豆黄浆水处理过程中超滤膜的选择[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 223-225.
WU Jun, AI Qijun, YU Tongquan, *et al.* Membrane choose for ultrafiltrating of soybean whey[J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2003, 18(3): 223-225.
- [3] 祁佩时, 吕斯濠. 超滤法处理大豆蛋白废水及资源回收的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2005, 33(8): 1138-1141.

Q I Peishi, LU Sihao. Soy protein wastewater treatment and resource reclamation with ultrafiltration [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2005, 33(8): 1138-1141.

- [4] 韩丽华. 大豆分离蛋白工艺废水厌氧生物净化的研究[J]. 中国油脂, 1999, 24(4): 67-69.
HAN Lihua. Study on anaerobic purification of waste water from soybean protein isolated [J]. China Oils and Fats, 1999, 24(4): 67-69.
- [5] SU Kuizu, YU Hanqing. Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(8): 2818-2827.
- [6] 赵冬梅, 刘 凌, 张京健. 豆制品生产中高浓度废水的检测与分析[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 68-71.
ZHAO Dongmei, LIU Ling, ZHANG Jingjian. Detection and analysis of the concentrated waste water from soybean processes [J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(1): 68-71.
- [7] 岑沛霖, 蔡 瑾. 工业微生物学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 81-83.
CEN Peilin, CAI Jin. Industrial Microbiology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 81-83.

(责任编辑 王 芷)