

啤酒混合废水发酵菌种筛选及工艺条件的研究

负建民, 张忠明, 吴国锋

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 本文选用了产朊假丝酵母(*Candida uticis*)、脆壁酵母(*Saccharomyces fragilis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)三个菌种进行了啤酒混合废水单细胞蛋白(SCP)发酵条件和菌种筛选试验。结果表明, 对于单菌种发酵, 产朊假丝酵母是能充分利用啤酒混合废水培养单细胞蛋白的较好菌种, 它的生物量和化学需氧量(COD)去除率均为最高, 其最佳培养条件分别为: 接种量为 15% 和 5%, 培养时间为 72h 和 48h, 废水浓度为 1:3 和 1:2。而对于混合菌种协同发酵而言, 生物量和 COD 去除率的优选方案分别为: 菌种均为产朊假丝酵母:酿酒酵母=1:1, 接种量为 10% 和 5%, 培养时间 72h 和 48h。

关键词: 单细胞蛋白(SCP); 菌种筛选; 发酵条件; 啤酒混合废水

Study on Strains Screening for SCP and Fermentation Conditions of Mixed-wastewater from Beer Industry

YUN Jian-min, ZHANG Zhong-ming, WU Guo-feng

(Food Science and Engineering College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Trials of SCP fermentation conditions and strains screening were conducted with three strains: *Candida uticis*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae* by using the mixed-wastewater of brewery. The results showed that for the single strain experiment, *Candida uticis* was the best strain for single cell protein(SCP) fermentation in mixed-wastewater of brewery. Its biomass and chemical oxygen demand(COD) reducing rate were the highest and the suitable project was obtained: strain: *Candida uticis*; inoculating quantity: 15% and 5%; culturing time: 72h and 48h, wastewater density: 1:3 and 1:2 respectively; but for the mixed-strain's test, the suitable project was: *Candida uticis*: *Saccharomyces fragilis* = 1:1; inoculating quantity: 10% and 5%; incubating time: 72h and 24h.

Key words: SCP(single cell protein); screening strain; fermentation conditions; mixed-wastewater of beer industry

中图分类号: TS261.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0152-05

随着食品工业的飞速发展, 食品加工企业废水处理已成为一个亟待解决的问题。如何防止废水对环境污染与危害, 已成为目前环保工作者和食品科技人员研究的一个重要课题^[1~3]。众所周知, 食品加工厂排放的废水中含有较为丰富的有机物, 若处理不当, 将会对环境造成严重污染^[4]。而若利用废水中丰富的有机物作为底物, 通过微生物代谢作用, 既可减轻废水对环境的污染, 也可变废为宝, 具有重要的社会效益和良好的经济效益^[5,6]。为此, 本试验对啤酒混合废水进行有关单细胞蛋白(Single Cell Protein, SCP)发酵菌种筛选及发酵条件的研究, 旨在为啤酒加工业废水生物处理及再利用途径提供一定的理论参考和依据。

在啤酒废水中培养 SCP 发酵菌种的关键是筛选能在

啤酒废水中迅速生长的 SCP 菌种及探明相应的培养条件。因此本试验以产朊假丝酵母、脆壁酵母、酿酒酵母为试验菌种, 试图从中选取啤酒废水快速生长的 SCP 发酵菌种及相应的培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试废水 啤酒混合废水由甘肃农垦啤酒厂提供。

1.1.2 供试菌种 产朊假丝酵母(*Candida uticis*)、脆壁酵母(*Saccharomyces fragilis*)由中国科学院微生物所菌种保藏中心提供。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为甘肃农业大学食品科学与工程学院微生物室保藏菌种。

收稿日期: 2005-01-05

基金项目: 甘肃省教育厅中青年基金资助项目(03-1-42)

作者简介: 负建民(1968-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为微生物发酵工程。

1.1.3 斜面培养基 基马铃薯-葡萄糖-琼脂(PDA 固体)培养基、麦芽汁琼脂培养基。

1.1.4 种子扩大培养基 马铃薯-葡萄糖(PD)液体培养基、麦芽汁液体培养基。

1.1.5 发酵培养基 由甘肃农垦啤酒厂提供的啤酒混合废水按试验需要进行调配, 灭菌后待用。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 COD 仪器

1.2.1.1 回流仪器 带 250ml 锥形瓶的全玻璃回流装置。

1.2.1.2 加热仪器 电热板或变阻电炉。

1.2.2 其它仪器: 凯氏定氮仪、高温杀菌锅(WS2-84-64)、pH 计(PHS-25)、超净工作台(BCM-1000)、恒温振荡器(THZ-22)、恒温培养箱(HG303-4)、分析天平(TG328A)。

1.2.3 试剂

1.2.3.1 COD 测定试剂

重铬酸钾标准溶液, 试亚铁灵指示液, 硫酸亚铁铵标准溶液, 硫酸—硫酸银溶液、硫酸汞、邻菲罗啉。

1.2.3.2 蛋白质测定试剂

盐酸、硫酸钾、硫酸铜溶液、氢氧化钠溶液、硼酸溶液、甲基红—亚甲蓝指示剂。

1.3 方法

1.3.1 培养方法^[7]

菌种活化: 产朊假丝酵母、脆壁酵母用 PDA 固体斜面培养基培养; 酿酒酵母用麦芽汁琼脂斜面培养基培

养。在 28~30℃ 下培养 72h。

种子扩大培养: 产朊假丝酵母、脆壁酵母用麦芽汁液体培养基, 酿酒酵母用马铃薯—葡萄糖液体培养基, 在 28~30℃ 以 160r/min 恒温振荡器中培养 18~24h。

发酵条件: 250ml 三角瓶, 装液量 150ml, 恒温振荡器中培养, 转速为 150~160r/min, 培养温度为 28~30℃。

1.3.2 测定方法^[8,9]

蛋白质测定 半微量凯氏定氮法; pH 值测定 采用 pH 计; 总糖测定 水解滴定法; COD_{Cr} 测定 H₂SO₄—KCr₂O₇ 法; TS 测定 离心干燥恒重法。

2 结果与分析

2.1 试验水样水质特性测定

对啤酒厂混合废水的化学组成及 COD 值进行了测

表 1 供试水样水质特性
Table 1 The characteristics of wastewater samples

| 指标 | 蛋白质(%) | 总糖(%) | COD(mg/L) | TS(g/L) | pH |
|------|--------|-------|-----------|---------|-----------|
| 混合废水 | 4.5 | 3.5 | 5666.1 | 2.43 | 5.47~5.50 |

定, 其结果见表 1。

表 1 结果表明混合废水中含有较高的营养成分, 其 COD 值严重超出国家规定的最终出水标准值(COD 值 < 500mg/L)^[10]。

2.2 单个不同菌种及培养条件对混合废水发酵的 SCP 得率及 COD 去除率的影响

本试验以产朊假丝酵母、脆壁酵母、酿酒酵母作

表 2 啤酒混合废水单菌种发酵培养条件方案和结果分析表
Table 2 The project and results of single microorganism fermentation in mixed-wastewater from brewery

| 试验号 | A 菌种 | B 废水浓度(V:V) | C 接种量(%) | D 培养时间(h) | 试验指标 | |
|-----------------------|----------|-------------|----------|-----------|--|----------|
| | | | | | COD 去除率(%) | 生物量(g/L) |
| 1 | 1 产朊假丝酵母 | 1(1:1) | 1(5) | 1(24) | 64 | 1.880 |
| 2 | 1 产朊假丝酵母 | 2(1:2) | 2(10) | 2(48) | 60.6 | 2.2640 |
| 3 | 1 产朊假丝酵母 | 3(1:3) | 3(15) | 3(72) | 40.4 | 3.1180 |
| 4 | 2 脆壁酵母 | 1(1:1) | 2(10) | 3(72) | 2.1 | 1.0960 |
| 5 | 2 脆壁酵母 | 2(1:2) | 3(15) | 1(24) | 6.6 | 1.1440 |
| 6 | 2 脆壁酵母 | 3(1:3) | 1(5) | 2(48) | 30.2 | 0.7120 |
| 7 | 3 酿酒酵母 | 1(1:1) | 3(15) | 2(48) | 8.9 | 2.0080 |
| 8 | 3 酿酒酵母 | 2(1:2) | 1(5) | 3(72) | 39.2 | 1.8140 |
| 9 | 3 酿酒酵母 | 3(1:3) | 2(10) | 1(24) | 19 | 1.5820 |
| \overline{K}_{COD1} | 55 | 25.0 | 44.5 | 29.9 | 主次因素: A > C > B > D 最优方案: A ₁ B ₂ C ₁ D ₂ | |
| \overline{K}_{COD2} | 13 | 35.5 | 27.2 | 33.2 | | |
| \overline{K}_{COD3} | 22.4 | 19.9 | 18.6 | 27.2 | | |
| R _{COD} | 42 | 10.5 | 25.9 | 6 | 主次因素: A > C > D > B 最优方案: A ₁ B ₃ C ₃ D ₃ | |
| \overline{K}_{SCP1} | 2.4207 | 1.6613 | 1.4687 | 1.5353 | | |
| \overline{K}_{SCP2} | 0.9840 | 1.7407 | 1.6473 | 1.6613 | | |
| \overline{K}_{SCP3} | 1.8013 | 1.8040 | 2.0900 | 2.0093 | | |
| R _{SCP} | 1.4307 | 0.1427 | 0.6213 | 0.4740 | | |

为试验菌种, 将其分别接入混合废水中发酵, 试图从中找出适用菌种, 以便在啤酒混合废水中进行培养, 获得较高的生物量得率, 同时去除较多的 COD。试验所用废水的 COD 含量为 5666.1mg/L, 经不同菌种的培养处理, 按 $L_9(3^4)$ 四因子、三水平正交表设计, 研究菌种、废水浓度、接种量、培养时间等因子对混合废水发酵的 SCP 得率与 COD 去除率的影响^[11], 结果见表 2。

2.2.1 啤酒混合废水单菌种发酵的各因子与水平对 COD 去除率的影响

表 2 结果表明, 试验所选用的三个不同菌种均能在啤酒混合废水中生长, 藉它们不同的代谢作用对混合废水中有机物质不同程度的利用, 其 COD 也得到不同程度的去除。同时也看出不同的菌种是影响 COD 去除率最重要的因子, 菌种间的极差 R_j 达 42%。其中产朊假丝酵母的 COD 去除率最高, 其 \bar{K}_j 值达 55%, 酿酒酵母的 COD 去除率最低, 其 \bar{K}_j 值达 22.4%。就以产朊假丝酵母为菌种的三个试验看, 当废水浓度为 1:1 时, 且以 5% 接种量接入废水中培养 24h 后, 其 COD 去除率最大, 其值为 64%。

菌种的接种量对 COD 的去除作用虽然仅次于菌种类的作用, 但仍是影响 COD 去除率的重要因子。三种不同的菌种当接种量为 5% 时, 其 COD 去除率分别达到最大值, 产朊假丝酵母为 64%, 酿酒酵母为 39.2%, 脆壁酵母为 30.2%, 但当接种量从 5% 提高到 10% 时, COD 去除率反而降低, 如果继续提高接种量至 15% 时, COD 去除率继续降低。

废水浓度对 COD 去除率也有一定的影响, 其 R_j 达 10.5%, 从表 4 结果可以看出, 当废水浓度为 1:2 时, 混合废水 COD 去除率 \bar{K}_j 达最大值 35.5%, 但当废水浓度为 1:3 时, 其 COD 去除率 \bar{K}_j 减小为 29.9%。因此, 一定的废水浓度对微生物充分利用废水中有机物质具有一定的影响。

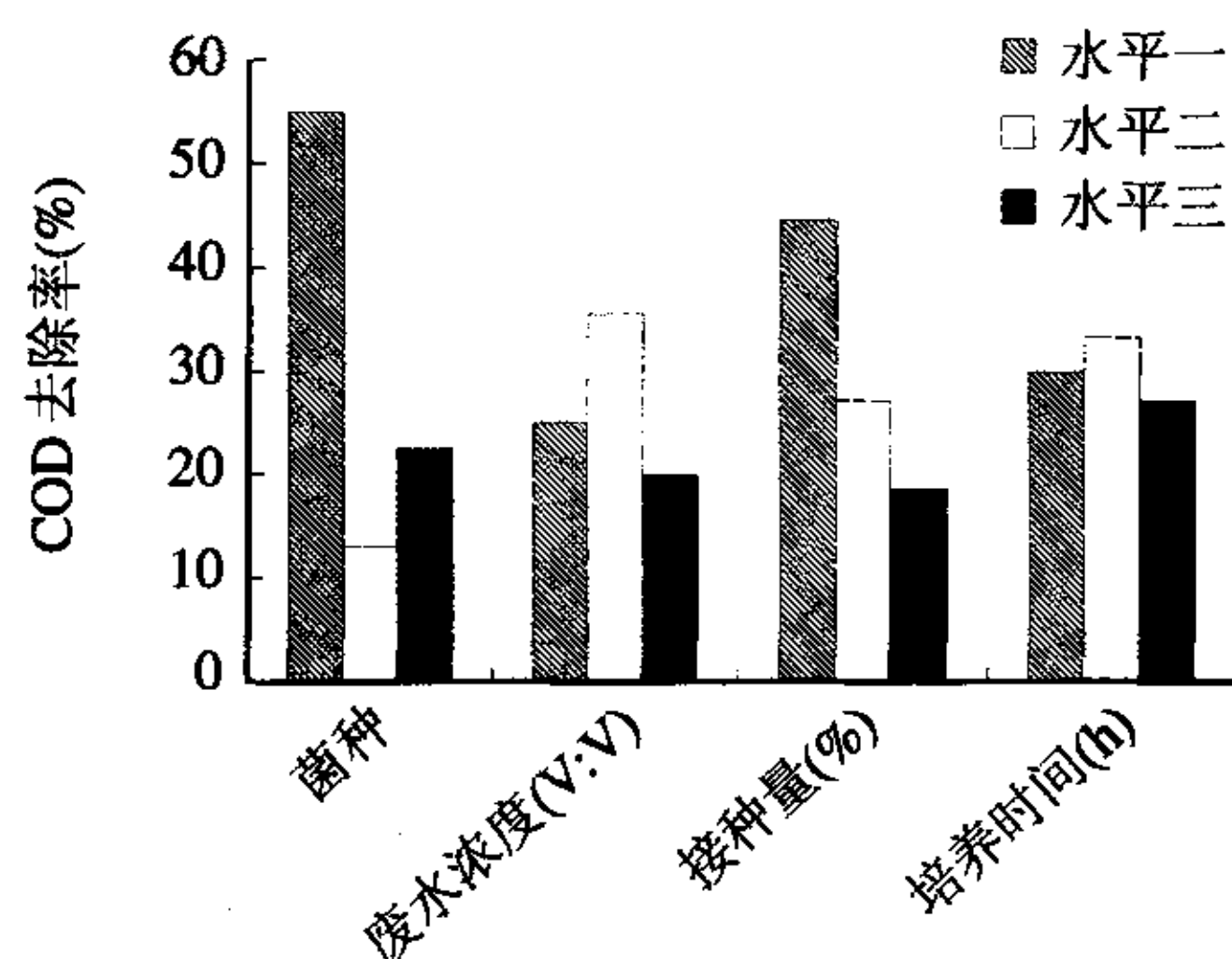


图1 各因子与水平对 COD 去除效果的影响

Fig.1 Effects of factors and levels on COD reducing rate

从图 1 中可以看出, 培养时间对 COD 去除率影响效

果不太明显, 其三个不同水平的 \bar{K}_j 值分别为 $\bar{K}_{COD1}=29.9\%$, $\bar{K}_{COD2}=33.2\%$, $\bar{K}_{COD3}=27.2\%$, 但从最佳选择方案中可看出, 最佳的培养时间为 48h。

2.2.2 混合废水单菌种发酵的各因子与水平对生物量的影响

表 2 结果显示, 试验所设的四个因子对生物量的影响与它们对 COD 去除率的影响基本吻合, 菌种仍然是最重要的因子, 不同菌种的生物量得率有较大差异, 产朊假丝酵母具有最高的生物量得率, 其 \bar{K}_j 值为 2.4207g/L, 脆壁酵母最低, \bar{K}_j 值为 0.9840g/L。因此, 说明产朊假丝酵母能够更充分利用啤酒混合废水中的有机物质, 合成更多的菌体。

不同的接种量对生物量的积累也有较大的影响。结果表明, 随着接种量的增加, 生物量也在增加。当接种量达到 15% 时, 可以获得最高的生物量为 2.0900g/L。

就培养时间而言, 在 24~48h 内, 微生物能够较好的利用啤酒混合废水中的有机物, 使生物量由 1.5353g/L 增加到 1.6613g/L, 但在 48~72h 内, 微生物利用有机物的速率大于在 24~48h 内的利用速率, 生物量增长速率也较快, 从 1.6613g/L 增加到了 2.0900g/L。此结果表明, 微生物对混合废水中有机物的作用需要一定的时间, 当达到一定的培养时间后, 微生物可充分利用废水中的有机物, 合成更多的菌体。

在本试验范围内, 废水浓度与菌体合成量成正相关, 但对菌体的生长影响并不明显。

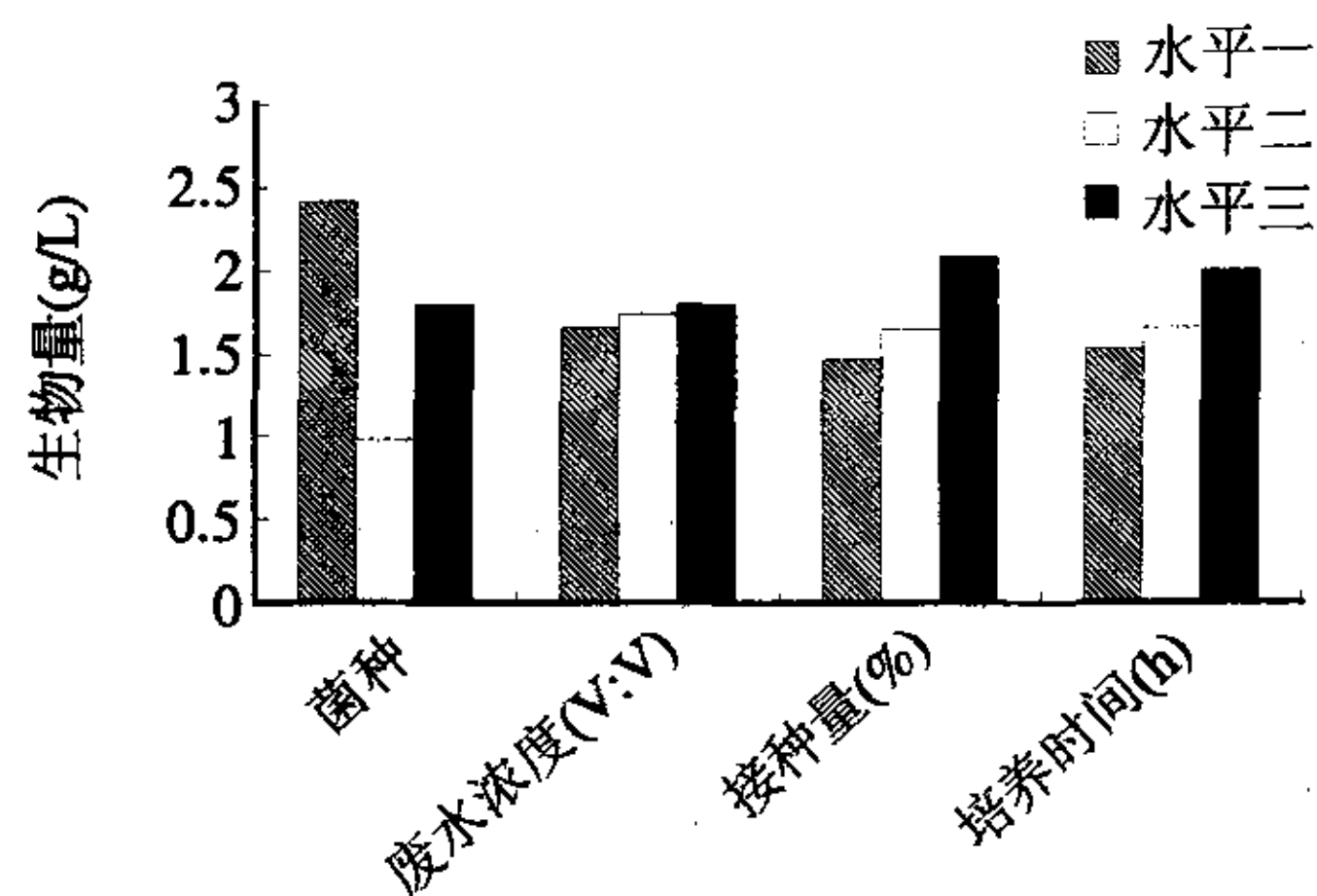


图2 各因子与水平对生物量的影响

Fig.2 Effects of factors and levels on biomass

2.3 不同菌种混合比例及培养条件对废水发酵的 SCP 得率与 COD 去除率的影响

经单个菌种对混合废水的发酵试验得知, 产朊假丝酵母和酿酒酵母对混合废水 COD 去除率影响较大, 因此本试验将这两种菌种以不同比例混合接入废水中, 试图找出适当的混合比例, 以便利用微生物的协同作用, 在更好去除较多 COD 的同时, 获得较高生物量。本试验按 $L_9(3^4)$ 四因子、三水平正交表设计, 研究菌种混合比例、接种量、培养时间对啤酒废水发酵中的 SCP 得率和 COD 去除率的影响, 结果见表 3。

表3 菌种混合比例及培养条件对啤酒混合废水发酵试验方案和结果分析表
Table 3 The project and results of mixed microorganisms fermentation in mixed-wastewater from brewery

| 试验号 | A 菌种混合比例 | B 接种量(%) | C 培养时间(h) | 试验指标 | |
|------------------|---------------------|----------|-----------|---|----------|
| | | | | COD 去除率(%) | 生物量(g/L) |
| 1 | 1(2.120:Y399 = 1:1) | 1(5) | 1(24) | 76.4 | 1.458 |
| 2 | 1(2.120:Y399 = 1:1) | 2(10) | 2(48) | 57.2 | 3.014 |
| 3 | 1(2.120:Y399 = 1:1) | 3(15) | 3(72) | 28 | 3.666 |
| 4 | 2(2.120:Y399 = 2:1) | 1(5) | 2(48) | 48.2 | 1.930 |
| 5 | 2(2.120:Y399 = 2:1) | 2(10) | 3(72) | 14.2 | 2.728 |
| 6 | 2(2.120:Y399 = 2:1) | 3(15) | 1(24) | 8.9 | 0.912 |
| 7 | 3(2.120:Y399 = 1:2) | 1(5) | 3(72) | 12.2 | 1.834 |
| 8 | 3(2.120:Y399 = 1:2) | 2(10) | 1(24) | 15.6 | 0.951 |
| 9 | 3(2.120:Y399 = 1:2) | 3(15) | 2(48) | 20.1 | 0.408 |
| \bar{K}_{COD1} | 53.9 | 45.6 | 33.6 | 主次因素: A > B > C 最优方案: A ₁ B ₁ C ₂ | |
| \bar{K}_{COD2} | 23.8 | 29 | 41.8 | | |
| \bar{K}_{COD3} | 16 | 19 | 18.1 | | |
| R _{COD} | 37.9 | 26.6 | 23.8 | 主次因素: A > C > B 最优方案: A ₁ B ₂ C ₃ | |
| \bar{K}_{SCP1} | 2.713 | 1.741 | 1.107 | | |
| \bar{K}_{SCP2} | 1.857 | 2.231 | 1.784 | | |
| \bar{K}_{SCP3} | 1.064 | 1.662 | 2.743 | | |
| R _{SCP} | 1.649 | 0.569 | 1.636 | | |

表中：2.120：产朊假丝酵母；Y399：酿酒酵母。

2.3.1 啤酒混合废水多菌种发酵的各因子与水平对COD去除率的影响

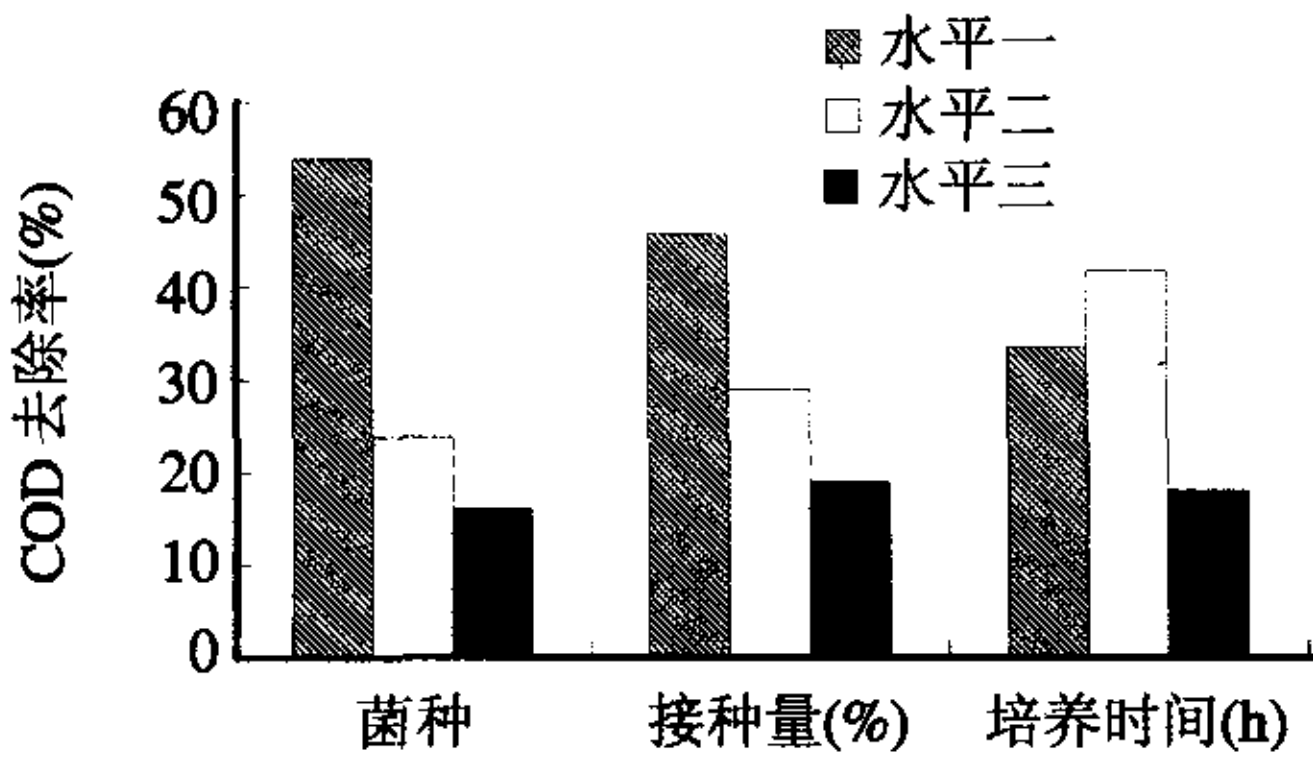


图3 各因子与水平对COD去除率的影响
Fig.3 Effects of factors and levels on COD reducing rate

从表3和图3中可以看出，试验所设三个因子都对COD的去除有一定的作用。从本试验所用的两种菌种混合比例来看，当产朊假丝酵母:酿酒酵母=1:1时，混合废水COD去除率最大， \bar{K}_j 值为53.9%。但当产朊假丝酵母:酿酒酵母=1:2时，其COD去除率最小， \bar{K}_j 值为16%。因此可以看出，不同菌种间的混合比例对混合废水COD去除率有较大的影响。

接种量对COD去除率也有一定影响，当接种量为5%时，其COD去除率最高， \bar{K}_j 值达到45.6%，但随着接种量的增加，COD去除率却反而降低。

培养时间也是重要的影响因子，从表3可以看出，当培养48h时，COD去除率达到最高，但当培养72h时，COD去除率反而降低。由此可见，菌种对啤酒混合废水有机物的利用在48h时已达到高峰。

2.3.2 啤酒混合废水多菌种发酵的各因子与水平对生物

量的影响

从表3及图4可以看出，菌种混合比例是影响生物量的首要因子，当菌种混合比例为1:1时，可获得最大生物量， \bar{K}_j 值为2.713g/L；接种量是第二影响因子，当接种量为10%时，生物量达最高，其 \bar{K}_j 值为2.231g/L，但当接种量由10%增至15%时，生物量反而降低，可能出现菌种的自溶现象；培养时间是第三影响因子，培养时间与生物量成正比的关系，当培养时间为72h时，其生物量达最大值2.743g/L，说明菌种对废水有机物的利用生长繁殖需要一定的时间。

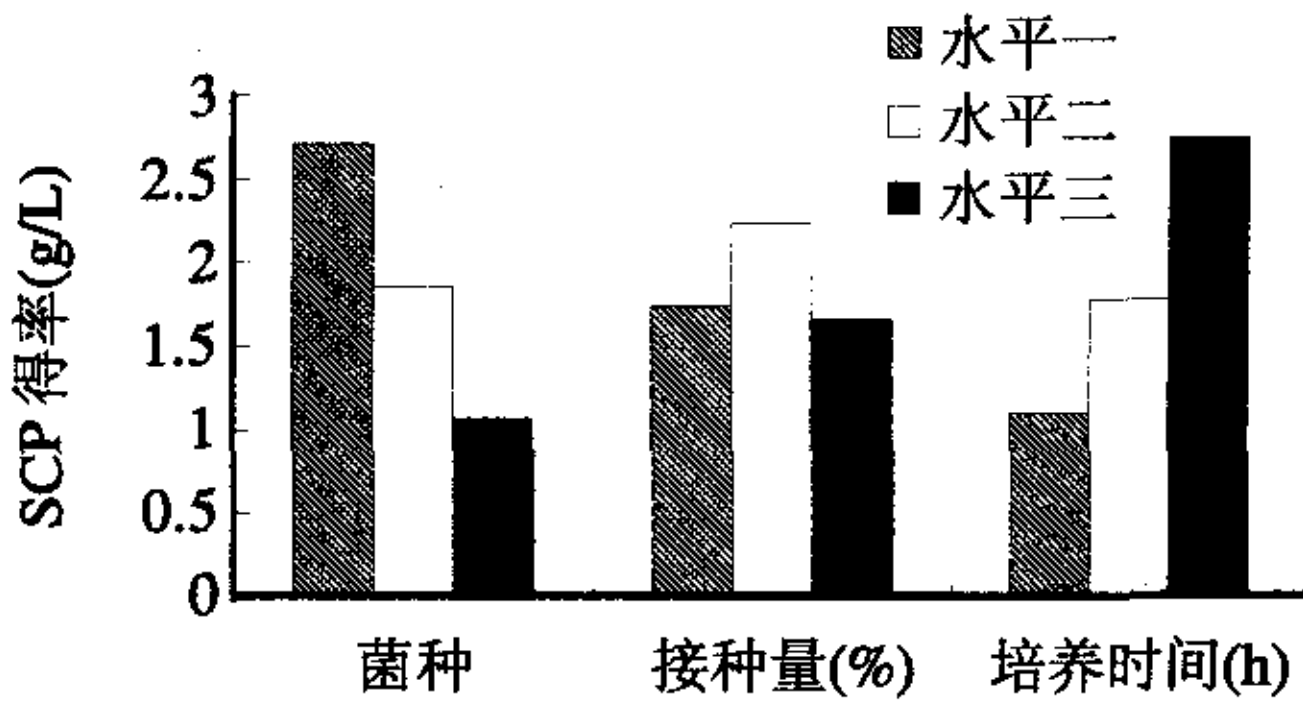


图4 各因子与水平对生物量的影响
Fig.4 Effects of factors and levels on biomass

3 结 论

3.1 在单个菌种对啤酒混合废水的处理试验中，试验所用三个SCP菌种均能在混合废水中生长，其中以产朊假丝酵母为最佳，可获得最高的COD去除率和生物量得率，其余的菌种虽然能在混合废水中生长，但表现并不理想。

3.2 从多个菌种对混合废水的处理试验中可以得出，

酸提取大豆种皮果胶的工艺优化

张庆轩, 杨普江, 杨国华

(中国石油大学化学化工学院应用化学系, 山东 东营 257061)

摘 要: 本文采用酸提取方法对大豆种皮果胶的提取工艺条件进行研究, 考察了温度、pH、料液比、提取时间等因素对果胶收率的影响。确定了酸提取大豆种皮果胶的最佳工艺条件: pH1.5、提取温度为 85℃、提取时间 30min、料液比为 1:8。

关键词: 大豆种皮; 果胶; 酸提取工艺

The Optimum Acid-extraction Conditions of Soy Hull Pectin

ZHANG Qing-xuan, YANG Pu-jiang, YANG Guo-hua

(Department of Applied Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum, Dongying 257061, China)

Abstract: Acid-extraction of pectin from soybean hull was studied. The effects of temperature, pH, ratios of soybean hull to extraction solvent, extraction time on the yields of soybean hull pectin prepared were measured. The results showed that the optimum conditions were: extraction temperature 85℃, pH1.5 and ratios of soybean hull to extraction solvent 1:8, extraction

收稿日期: 2005-01-11

作者简介: 张庆轩(1964-), 男, 副教授, 在职博士, 研究方向为高分子材料的制备与应用。

当菌种混合比例为 1:1 时, 其 COD 去除率和生物量得率均为最高。

3.3 无论采用单菌种发酵还是两菌共酵处理啤酒废水, 菌种和菌种混合比例对 COD 去除率和生物量的影响是最重要的。故在生产实践中, 提高废水处理效果的关键是筛选出适用的生产菌株和菌种混合时适当的混合比例。

3.4 在废水处理菌种筛选中, 虽然要求菌种具有利用废水有机物的能力是重要的, 但不是唯一的, 同样重要的可能还有废水中其它限制菌种利用有机物能力的发挥的因子, 如无机离子浓度等, 对此有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [2] 唐受印, 戴友芝, 刘忠义, 等. 食品工业废水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [3] 车美芹, 汪岁, 朱亮. 有效微生物(EM)处理食品废水的试验研究[J]. 环境科学研究, 2002, 15(3): 53-55.

- [4] 尹源明, 何国庆, 冯澜, 等. 小麦淀粉废水 SCP 发酵菌种的筛选及其发酵条件初探[J]. 中国粮油学报, 1998, 13(1): 36-44.
- [5] 郝瑞霞, 贾胜温. 我国啤酒工业废水治理技术现状及发展趋势[J]. 河北轻化工学院学报, 1998, 19(1): 75-79.
- [6] 杨英杰, 王淑珍, 杨家峰, 等. 以啤酒洗糟废水为主料产阮圆酵母遗体发酵的研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2003, 32(1): 72-76.
- [7] 傅大放, 邹路易, 邹宗柏. 不加催化剂和掩蔽剂的微波密封消解法测定 COD[J]. 中国环境科学, 1998, 18(2): 154-157.
- [8] 张健, 张唯广, 负建民. 啤酒废水 SCP 发酵菌种的筛选及其发酵条件初探[J]. 广州食品工业科技, 2002, 18(2): 26-28.
- [9] 徐怀东, 钟月华, 伍勇, 等. 我国啤酒废水处理工艺进展[J]. 四川环境, 2003, 22(3): 27-32.
- [10] 张自杰, 等. 环境工程手册(水污染防治卷)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996.
- [11] 李科林, 孟范平. 啤酒废水处理与利用技术研究进展[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(1): 18-20.