

摘要

本论文的研究目的是利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母。

饲料酵母是家禽和家畜不可或缺的饲料成分，其中的碳、氮等元素是动植物有机体内细胞的重要组成部分。红麻亚铵法制浆废液可以提供营养元素，其中的对饲料酵母菌体生长有效的成分可以被吸收和利用。

首先，通过添加和未添加废液的培养基对菌体生长影响的实验，得出了亚铵法制浆废液有利于酵母菌体生长的结论；通过正交实验优化出了三种酵母发酵的最佳工艺条件，并选定热带假丝酵母作为红麻亚铵法制浆废液发酵用菌种。

当亚铵法制浆废液的浓度 1.061kg/L、在 250mL 三角摇瓶中装液量 50mL、接种量 10%时，得到的葡萄酒酵母最佳发酵条件：发酵温度为 30℃，发酵时间为 60 小时，pH 4.0。啤酒酵母最佳发酵条件：发酵温度为 30℃，发酵时间为 72 小时，pH 5.0。热带假丝酵母最佳发酵条件：发酵温度 30℃，发酵时间 48 小时，pH 5.0。

在最佳发酵条件下，葡萄酒酵母菌体生物量 2.175g/100mL，啤酒酵母菌体生物量 1.709g/100mL，热带假丝酵母菌体生物量 3.220g/100mL，热带假丝酵母的菌体生物量较大幅度超出啤酒酵母和葡萄酒酵母的菌体生物量。由此确定热带假丝酵母作为利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母的研究用菌种。

热带假丝酵母在添加无机盐的最佳工艺条件下发酵产物的菌体生物量明显高于未添加无机盐的最佳工艺条件下的发酵产物的菌体生物量，可见无机盐的添加对热带假丝酵母利用红麻亚铵法制浆废液发酵具有积极的促进作用，使发酵菌体产量得到提高，得到更好的发酵效果。

在最佳工艺条件下，每生产 1 吨饲料酵母需浓度为 1.060kg/L 的红麻亚铵法制浆废液 30.42 吨。

红麻亚铵法废液经热带假丝酵母发酵后，菌体蛋白质含量达到 43.81%，发酵液粗蛋白含量由原来的 19.34%提高到 34.84%，增加了 15.5 个百分点，营养价值大大提高。可做家畜及家禽的饲料蛋白。

关键词：红麻，亚铵法废液，饲料酵母，热带假丝酵母

本论文为国家重点实验室资助项目（200304）和辽宁省教育厅资助项目（200407）

Abstract

This paper studies the fermentation production of feed yeast using ammonium sulfite waste liquor of kenaf.

Feed yeast is an indispensable feed component to domestic bird and animal. Among the component, carbon and hydrogen are the important component for cell institution for the animal and plant organism. Ammonium sulfite waste liquor of kenaf can provide nutritive element and these effective component can be better absorbed and used.

First, through the study of the media with waste liquor addition and the media without waste liquor addition on the growth of yeast it can be concluded that the media with waste liquor addition is positive for the growth of yeast. It can obtain the optimal conditions of three fermentation of yeast through experiment. Then the candida tropicalis is selected as the yeast for the fermentation of ammonium sulfite waste liquor of kenaf.

The concentration of ammonium sulfite waste liquor is 1.061kg/L under the condition of the total waste liquor 50ml at 250ml triangle bottle, yeast concentration 10%, the optimal fermentation condition of wine yeast can be obtained as follows: fermentation temperature 30°C, fermentation time 60h, pH 4.0. The optimal fermentation condition of beer yeast is: fermentation temperature 30°C, fermentation time 72h, pH 5.0. The optimal fermentation candida tropicalis is : fermentation temperature 30°C, fermentation time 48h, pH 5.0.

Under the optimal fermentation condition, the production of wine yeast is 2.175g/100ml, beer yeast 1.709g/100ml, candida tropicalis 3.220g/100ml. The production of candida tropicalis exceeds largely that of wine yeast and beer yeast. So the candida tropicalis can be the yeast for the production of feed yeast using ammonium sulfite waste liquor of kenaf.

The yeast production of candida tropicalis under the optimal condition of the inorganic salt addition is obviously higher than that of without the inorganic salt addition. So the addition of nutritive salt has a good effect on the ammonium sulfite waste liquor of kenaf fermentation using candida tropicalis. It can improve the production of fermentation yeast and

has the better fermentation effect.

Under the optimal condition, the production of each ton feed yeast needs 30.42 tons ammonium sulfite waste liquor of kenaf whose concentration is 1.060kg/l.

The analysis of the fermented production showed that crude protein reach up to 43.81%, the crude protein of the fermented waste liquor increases from 19.34% to 34.84%. The nutritive value increases greatly. So it can be used as the feed yeast for domestic birds and animals.

Keyword: Kenaf; Ammonium Sulfite Waste liquor; Feed Yeast; Candida Tropicalis

The paper is the project of national key laboratory (200304)and educational office of Liaoning province provide financial aid (200407) .

目 录

□	文 摘	
□	英文文摘	
□	关于硕士学位论文使用授权的说明	
□	第一章绪论	
□	1.1 概述	
□	1.2 红麻亚铵法制浆废液	
□	1.2.1 红麻	
□	1.2.2 亚硫酸铵法制浆	
□	1.2.3 红麻亚铵法制浆废液	
□	1.3 饲料酵母	
□	1.3.1 饲料酵母	
□	1.3.2 应用前景	
□	1.4 我国饲料产业发展现状及趋势	
□	1.4.1 我国饲料产业概况	
□	1.4.2 非常规饲料资源开发利用	
□	1.5 本论文研究方法等优点	
□	1.6 本论文的研究内容	
□	第二章实验材料与方法	
□	2.1 实验材料	
□	2.1.1 红麻原料	
□	2.1.2 亚铵法制浆废液	
□	2.1.3 菌种	
□	2.1.4 实验试剂	
□	2.1.5 仪器与设备	
□	2.2 实验方法	
□	2.2.1 培养基的制备	
□	2.2.2 菌种的培养	
□	2.2.3 菌种的筛选和培养基选定	
□	2.2.4 分析方法	
□	2.2.5 菌体生物量的测定	
□	2.2.6 培养条件的优化	
□	2.2.7 再现性试验	
□	第三章结果与讨论	
□	3.1 发酵培养基的初步研究	
□	3.1.1 未添加废液的培养基菌体生长的结果	
□	3.1.2 添加废液的培养基菌体生长的结果	
□	3.1.3 加与未加废液培养基生长结果比较	
□	3.2 发酵最佳工艺条件的研究	
□	3.2.1 正交实验各因素水平的确定	
□	3.2.2 正交实验结果分析	

□	3.2.3	各因素对菌体生长的影响
□	3.2.4	再现性试验
□	3.3	无机盐对发酵的影响
□	3.3.1	正交实验各因素水平的确定
□	3.3.2	正交实验结果分析
□	3.3.3	各因素对菌体生长的影响
□	3.3.4	添加无机盐的实验结果
□	3.3.5	再现性试验
□	3.4	发酵结果营养价值分析
□		第四章结论
□		参考文献
□		致谢

关于硕士学位论文使用授权的说明

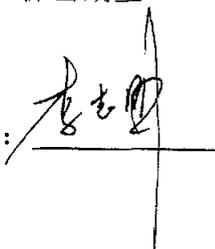
论文题目：红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母

本学位论文作者完全了解大连轻工业学院有关保留、使用学位论文的规定，大连轻工业学院有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

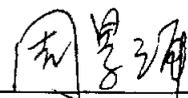
保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

是否保密（否），保密期至 年 月 日为止。

学生签名：



导师签名：



2007 年 7 月 30 日

第一章 绪论

1.1 概述

制约造纸工业发展的两大问题一是原料，二是环保。我国是原材料资源相对短缺的国家，在相当长时间内如何利用非木材仍是一个值得研究的课题^[1]。同时造纸工业必须清洁生产，对于那些不适合进行燃烧法碱回收的非木材原料，应积极寻找综合开发和利用的途径。

微生物饲料在我国有着十分巨大的市场潜力。近些年，我国许多地区由于过渡放牧造成饲草资源紧张，许多地区已严禁放牧，必须进行舍饲，存在着发展畜牧业和饲料匮乏的供需矛盾。因此开发微生物生态饲料在我国具有巨大的市场需求。同时，随着我国高效率、规模化、集约化的畜牧生产体系逐渐形成，也为微生物饲料的推广带来了巨大的商业契机。利用工业废弃物生产微生物饲料符合环境保护需要，微生物不仅可以利用大量的工业废液、废渣生产优质的蛋白饲料，而且利用微生物加工和调制饲料，可以避免酸、碱等化学方法加工饲料对环境造成的二次污染^[2]。

利用工业废液生产微生物饲料的研究是与环境、能源、畜牧业紧密相关的，如果有效利用造纸工业废液，并实现产业化，可形成一个以纤维素资源、纤维素废弃物为原料的新型饲料产业，为解决人类面临的几大难题做出贡献。本课题提出以微生物发酵红麻亚铵废液，生产可以用来饲喂家禽、家畜的生态饲料，对发展我国造纸工业、拉动农业和畜牧业发展，形成农业——工业——畜牧业——农业的生态产业链无疑都具有重大的意义。

目前造纸工业尚缺少一种可以大规模高效率、最大程度降低处理制浆废液成本的有效途径。本课题力图通过微生物发酵技术实现对亚铵制浆废液的低成本处理，尽最大可能实现废弃物内在的经济价值，以使企业获得治理污染、增长效益的双赢效果。

国内外研究机构对制浆废液的综合利用已做过大量的研究，但对于制浆废液生产饲料这一科研领域还很少涉猎。

1.2 红麻亚铵法制浆废液

红麻是自然界生长最快的、很有潜力的造纸纤维原料，过去采用亚铵法制浆生产中高档箱板纸和瓦楞原纸。其制浆废液一部分灌溉农田，一部分生产固体肥料。由于亚铵制浆废液中含有一定量的碳水化合物和氮源物质，备料中还有剩余的麻梢、麻叶等碎末废料，本课题通过微生物发酵生产生态饲料，既可以扩大亚铵废液的利用渠道，又可扩大畜牧业的饲料来源。

1.2.1 红麻

红麻 (Kenaf)，又名洋麻。双子叶锦葵科，木灌属，一年生亚灌木状草本植物，是目前自然界中生长最快的植物，抗旱、抗涝、抗盐碱。从红麻纤维形态来看，皮纤维平均长 2.22mm，长宽比达 108^[3]，红麻含韧皮纤维 20~30%，优于针叶木，是优良的长纤维。去皮芯秆纤维短（平均 0.75mm），类似于阔叶木。可替代芦苇、木材等作为造纸原料，是非常有潜力的造纸原料。集中种植亩产可产全杆 1.5~3 吨。大连轻工业学院在辽宁省朝阳和阜新地区进行大量红麻种植、生物脱胶、纤维改性、制浆造纸等综合利用和开发。

1.2.2 亚硫酸铵法制浆

1.2.2.1 亚硫酸铵法

亚铵法制浆是用中性亚硫酸铵制造纸浆的简称。上世纪 70 年代初，造纸行业为解决碱法制浆、硫酸盐法制浆的污染问题，国内大面积推广了亚铵法制浆技术，主要以稻草、蔗渣、棉杆、芦苇、红麻等为原料，生产印刷、书写、包装用纸和纸板^[4]。国外利用中性亚硫酸盐法制浆，在 1880 年已经发明，但直到 1902 年才开始应用于生产半化学木浆。自 1935 年钠盐基的酸性亚硫酸盐法制浆投产后，钠盐基才得到逐步推广和应用^[5]。

1.2.2.2 亚铵制浆的机理

亚铵法制浆是基于避免纤维素和半纤维素在酸性溶液中水解和碱性溶液中产生剥

皮反应及碱性水解来提高浆的得率。在蒸煮过程中，木素的磺化与溶出的机理与酸性硫酸盐是一致的。脱木素主要的化学反应是木素的磺化，木素与亚铵药液起作用生成木素磺酸盐。磺酸是一种含有磺酸基的有机酸，大多数磺酸或磺酸盐都是溶于水的。因此生成的木素磺酸及其盐类被溶解出来。因此蒸煮液是在中性范围。所以木素的磺化，溶出速度较慢，必须采用比硫酸盐法蒸煮更高的温度。为中和蒸煮过程中半纤维素的去乙酰基反应及纤维素、半纤维素在高温蒸煮时分解产生的有机酸，常加入氨水、尿素等作为亚铵法蒸煮的缓冲剂，使蒸煮终了废液的 pH 值大于 7，以减轻对设备的腐蚀和提高浆的得率^[6]。

亚铵法蒸煮的主要目的就是要使蒸煮药液与纤维原料起化学反应，除去纤维原料中的部分或大部分木素，获得一定质量要求的纸浆。蒸煮过程中脱木素的主要化学反应是木素的磺化反应。木素的磺化反应就是木素与亚铵法蒸煮药液起作用生成木素磺酸的化学反应。木素中有几种可以被磺化的苯醇基，它们被磺化的反应能力不同。

1.2.2.3 亚铵法蒸煮常用的缓冲剂

为了保证蒸煮在中性和弱碱性条件下进行，同时可以使用普通钢质蒸煮器，必须选用适当的缓冲剂以保证蒸煮全过程在碱性条件下进行，并达到最佳的蒸煮效果。而常用的缓冲剂都存在不同的特点：

(1) 氨水

使用氨水作为缓冲剂并不与农业争肥，可使制浆后的废液成为一种无机和有机的混合肥料。但是氨水本身具有较大的刺激性气味，不仅散失浪费而且在操作过程中影响职工身体健康和污染环境。而且氨水在蒸煮过程中易产生假压，在相同的蒸煮压力下，温度下降。同时由于氨水较易气化，在小放汽及喷放过程会流失散逸。

(2) 烧碱

使用烧碱作为缓冲剂价格高，使生产成本提高；且蒸煮废液中含有大量的钠离子，若用于浇灌农田会造成土壤盐碱化。

(3) 氧化镁

氧化镁调节蒸煮液的 pH 值使之稳定在碱性范围内，可以贯穿蒸煮的全过程，对防止设备腐蚀更为可靠。用氧化镁作缓冲剂生产成本小，且废液含有植物需要的镁盐，不含有土壤盐碱化的钠盐，可较好地、安全地用于农肥。成浆色浅、易洗。

(4) 碳酸氢铵

碳酸氢铵易分解产生氨,水解产生 NH_4^+ 和 HCO_3^- 。水解的 pH 值大于 7,理论值为 8.31。碳酸氢铵的缓冲作用较缓和,当蒸煮温度升高时,亚铵不断产生二氧化硫,进行木素的磺化反应,生成木素磺酸,其酸性较强,使 pH 值下降。此时缓冲剂碳酸氢铵分解产生大量的氨和木素磺酸反应生成木素磺酸盐。从而起到了缓冲作用。可保持 pH 值在 7 以上。碳酸氢铵缺点是易分解,在蒸煮过程中形成假压影响蒸煮^[7]。

(5) 尿素

尿素的学名叫碳酰二胺,分子式 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$,白色粒状的结晶体,易溶于水,便于运输,使用方便。辽宁省轻工业研究所和北镇纸厂曾用 2%左右的尿素作缓冲剂蒸煮稻草,经过四个月的生产实践,获得了较好的效果,并得出以其作为缓冲剂有下述优点:在蒸煮时不仅可以起到调整 pH 值的作用,蒸煮后排出的废液,与亚铵—氨水法废液具有基本相似的肥效成分,其蒸煮废液可以直接排入农田作肥料;便于在亚铵法蒸煮过程中进行小放汽,排除蒸球内的假压,提高蒸煮温度,加速蒸煮反应,缩短蒸煮时间,降低粗浆的硬度;改善操作条件,有利于工人的身体健康;更重要的是它可在蒸煮过程中生成一种具有防腐蚀作用的钝化膜,从而为解决亚铵法生产中的防腐问题找到新的途径^[8]。

(6) 氧化钙

氧化钙的价格低廉,可作为缓冲剂,调节终点 pH 值大于 7;但其溶解度低,石灰渣沉积在纸浆纤维上,造成滤水困难,延长洗涤时间,并使纸张强度降低,影响产品质量,排放的废液中含有钙盐对土壤不利。

1.2.2.4 亚硫酸铵法制浆的优点

(1) 扩大化工原料来源,加速造纸工业发展

我国绝大多数小纸厂都是使用烧碱配以少量的硫化碱制浆。烧碱的用途很广,所以其消耗量增加很快。亚铵法与碱法相比,所需的化工原料资源丰富,有多为回收硫酸厂、冶炼厂废气,既解决了这些工厂排放废气中 SO_2 污染大气层,有使废气得到利用,成为一种循环经济,节约了资源。容易解决。所以发展亚铵法制浆对于解决造纸工业的原料来源问题有着重要的意义。

(2) 节约造纸纤维原料

亚铵法制浆在蒸煮中对纤维原料的损害作用较烧碱弱,有利于草类浆提高粗浆得率、节约原料、降低成本^[10]。

(3) 成浆强度较好

在高得率范围内(70%)，亚铵法浆远较同样收获率的碱法浆强度高。在粗浆硬度接近的情况下，亚铵法浆较硫酸盐法浆强度稍高一些。

1.2.2.5 亚铵制浆存在的问题

现阶段亚铵制浆存在的问题是蒸球单位容积浆的产量下降，即装球量低；在相同蒸煮的压力下，蒸煮时间长；较难漂白为高白度浆。

另外，该法对设备腐蚀较碱法严重，属于五级“尚耐腐蚀一类”。以 A₃ 型钢材制造的蒸球，采用铵法蒸煮，每年约腐蚀 0.3~0.5mm，为解决亚铵对蒸球的腐蚀采取了很多措施。如：在蒸球内布置滑钉、控制 pH 值在 7 以上(终点)、小放汽、加蒽醌、轴头注氨水、在螺旋预浸机处加尿素(用量 2%对纤维素量)，还有用烧碱、石灰、碳酸氢铵、氧化镁、磷酸铵等作为亚铵法蒸煮的缓冲剂等都取得了成功的经验^[11]。

1.2.2.6 亚铵法制浆废液的综合利用

由于氨水、尿素本身含有的氮元素可和亚铵一起与纤维原料中的有机物作用，形成有机态氮。同时蒸煮废液中还含有大量的木素磺酸铵等有机质和铵态氮，这样就使得亚铵废液具备了缓释放有机氮肥的特质。

长期以来，氨水是亚铵法制浆的基础化工原料之一。尿素本来就是一种常用的农肥。以氨水和尿素用于制浆并不与农业争肥，还对农业有利，因为制浆后的废液也是一种无机和有机的混合肥料，其中含有氮、磷、钾和有机物，是一种腐植酸有机氮素肥料，具有化肥和有机肥两重性能，也是一种多元素有机肥料。肥效既迅速又能持久，增加土壤透气性，避免土壤硬化、板结，酸碱度不至发生急剧变化，对于土壤中微生物的生长与繁殖都是有利的。亚铵法蒸煮的原废液，一般含有机物质 12.8%~14.68%^[9]，这些有机物之中主要是溶于蒸煮液中的木素磺酸盐和与半纤维素的反应生成物，还有流失的细小纤维等。这些有机物质有利于改良土壤和增加土壤肥力。由于土壤中的微生物作用和物理化学作用，有机质形成腐殖质，从而促进土壤水稳性团粒结构的形成。利用亚铵废液制成农业肥料，既可消除蒸煮废液对环境的污染，又可形成良好的生态循环圈。

近年有学者对亚铵废液的肥效以及直接灌溉农田对环境的影响作了专门的研究。山东农大的贾继文选用山东泰安造纸厂的亚铵制浆废液，研究了废液的肥效和使用后污染物在蔬菜和土壤中的行为。结果表明，适量的废液(0.2g 氮/kg 土)能改善土壤物理性状，增加土壤有机质含量和氮、钾含量；可提高白菜的生物产量及 Vc 含量。而且废液

中的重金属汞含量满足国家标准。汪新民等人通过亚铵法制浆废液直接作农肥施于水稻田的研究,给出了不同施肥方式,连续数天记录和观察田间水和渗透水废液污染物变化情况。实验表明,亚铵废液施入稻田后,其中的污染物一周内可去除60%以上。废液作追肥时初期渗滤水中的污染物浓度较施基肥时高。但经过一段时间,两种施肥方式渗滤水中的污染物浓度下降,浓度差异逐渐减少,直至达到对照田渗滤水中污染物的含量水平。唐海县环境监测站的刘金生、孙兆民研究了造纸废水灌溉稻田对水稻的影响,结果证明亚铵法造纸废水按一定比例与滦河水配比可增产稻谷8~11%^[12]。

采用亚铵法制浆废液直接灌溉农田存在着农业用肥的季节性和企业生产的连续性之间的矛盾,非灌期大量废液不得不排入水系,造成严重的环境污染^[13]。

四川宜宾造纸厂的王仲熙研究了低能耗亚铵法蒸煮制浆与废液回收利用。实行了能源全封闭循环利用,预浸、预煮汽液相多级蒸煮、原料和纸浆实行多段置换洗涤的提取,废液的自热蒸发,余热蒸发,氧化蒸发和废液的固体化,组成的蒸煮回收系统工程^[14]。另外,他还将在亚铵法制浆与废液回收制备多元有机肥料,实现了能量全封闭循环,料片经预浸处理,蒸煮过程不需排放大小气,从蒸煮器中提取高温废液。以废液自热、余热蒸发、氧化废液和废液干固化组成的蒸煮与废液回收工程。解决了亚铵法制浆废液自然资源再生利用的经济技术基础和方法,有助于多种用途利用亚铵法制浆废液,克服废液污染^[15]。

安徽新宇纸业有限公司采用新研制的5体4效卧式管式喷淋蒸发器对麦草亚铵蒸煮废液进行浓缩,至50%—55%的浓度,再根据不同的土壤要求,配以不同的氮、磷、钾生产颗粒有机复合肥。同时,该公司还充分利用切草工段产生的麦糠以及生化污水处理站产生的活性污泥作有机质原料生产复肥。该法实现了秸秆返田,给该公司带来了巨大经济效益。

综上所述,如何综合治理稻草制浆废液成为大规模利用稻草资源制浆造纸的关键问题。而如何合理有效的利用稻草制浆废液一直是人们探讨的问题。

采用亚铵法蒸煮稻草,其蒸煮液富含氮元素,再经氨化氧化处理,可使废液中含有丰富的腐殖质,从而使废液成为缓释放有机氮肥。这样,既可利用廉价的稻草资源制浆,又可以将废液转化为缓释放化肥,消除了蒸煮废液对环境的污染,又形成了良好的生态循环圈,不失为一种大规模综合利用稻草制浆废液的好办法。但是目前可查的国内外相关报道较少,仅Ishibashi和Sanford等人做过相关研究。

1.2.3 红麻亚铵法制浆废液

红麻亚铵法制浆废液虽然可以直接作为肥料施用，但是在农业生产的非用肥季节，大量废液难以贮存，除可用于做固体肥料外，还应寻找其它利用途径。在制浆备料过程中产生的大量废渣，常年堆积无法处理。这些废渣主要是麻叶和麻梢，也必须寻找一条可以再利用的有效途径^[16]。

红麻亚铵废液含有丰富营养成份，包括粗蛋白、还原糖、促进营养物质吸收的表面活性剂木质素磺酸盐以及铁、硫、磷、钙、钾等矿物元素；红麻叶主要成分是粗纤维和粗蛋白，可为牛、羊等牲畜所消化利用，但由于适口性问题，直接饲用的价值不高。若经过微生物发酵生产单细胞蛋白，红麻亚铵废液及红麻叶可大大提高经济价值，还可以满足家禽、家畜饲养的需要。

1.3 饲料酵母

1.3.1 饲料酵母概况

饲料酵母，又称单细胞蛋白(Single cell Protein, 简称SCP)，指用作饲料的酵母单细胞蛋白。单细胞蛋白主要是指细菌、酵母及藻类等单细胞生物体蛋白。这种单细胞生物体营养丰富，富含必需氨基酸，蛋白质含量可达40~80%，生物效价高，相当于酪蛋白的70%左右。表1-1是单细胞蛋白同几种食品蛋白含量和利用率的比较^[17]。国际上公认单细胞蛋白是解决蛋白质来源的一个重要方向。饲料酵母粗蛋白质含量很高，单细胞蛋白饲料在畜牧业被广泛应用。酵母氨基酸的含量也很高，将中国饲料数据库中标准的“啤酒酵母”、“秘鲁鱼粉”及“国产鱼粉”的粗蛋白质、氨基酸含量进行比较表明，“啤酒酵母”的粗蛋白质虽比“秘鲁鱼粉”低12%，但与“国产鱼粉”接近，其必需氨基酸总量达26.10%，高于“国产鱼粉”的22.92%，特别是限制性氨基酸。因此，酵母可作为优质蛋白质源部分或全部替代饲料中的鱼粉。在肉用仔鸡饲养中，以70%的活性酵母替代秘鲁鱼粉，可获得最佳的上市体重、料重比及经济效益。饲料酵母维生素的含量也非常丰富，是鱼粉的30倍以上，尤其富含B族维生素，其中含维生素B₁ 15~18 mg/kg、维生素B₂ 54~68mg/kg、泛酸130~160mg/kg、胆碱600mg/kg、烟酸500~600mg/kg、吡哆醇19~30mg/kg、生物素1.6~3.0mg/kg、叶酸3.4mg/kg、维生素B₁₂ 0.08mg/kg。因此，

酵母可促进畜禽生长，增进食欲，增强抵抗疾病及各种应激(断奶、高温、寒冷、运输等)的能力，并能增加产蛋率及孵化率，提高家禽的繁殖性能^[18]。

生产单细胞蛋白应选择生长速度快，产量高，适宜生长的pH值和温度范围广，遗传性状稳定，营养要求简单，细胞本身蛋白质含量高的酵母^[19]。

表 1-1 单细胞蛋白同几种食品蛋白含量的比较
Table 1-1 The Compare of Single Cell Protein and Several Food Protein

品名	蛋白质含量/%	蛋白质利用率/%
细菌单细胞蛋白	40~80	>80
酵母单细胞蛋白	30~60	70~88
白地酶单细胞蛋白	46	>80
大豆粉	42	60
肉、蛋、奶酪	20~35	65/80/70
谷物	8~14	50~70
鲜鸡蛋	12	94
鲜牛乳	3~4	82

单细胞蛋白除营养丰富外，还具有诸多优势：

(1) 生长速度快，效率高。

(2) 具有多功能性。微生物菌体蛋白含量高，氨基酸组成齐全，还含有丰富的维生素，并且有一些微生物在成长过程中还产生胞外酶等生物活性物质。所以，单细胞蛋白饲料不仅为动物提供了必要的蛋白质方面的营养物质，而且可以防止疾病，提高动物群体的抵抗力，促进动物生长发育。单细胞蛋白也被称为是安全、可靠、无公害的绿色食品 and 家畜的保健食品^[20]，表 1-2 列出了微生物细胞的化学成分^[21]。

表 1-2 微生物细胞的化学成分
Table 1-2 The Chemical Composition of Microbial Cell

菌种	碳水化合物/%	核酸/%	蛋白质/%	脂类/%	灰分/%
酵母菌	35~40	35~60	5~10	2~50	3~9
霉菌	30~60	15~50	1~3	2~50	3~7
细菌	15~30	40~80	15~25	5~30	5~10

(3) 生产过程易控制。由于菌体蛋白是工业化生产，不受气候、土壤和自然灾害的影响，可以连续生产，成功率高^[22]。

(4) 原料来源广泛，价格低廉。除石油天然气外，淀粉及其生产过程的下脚料，废糖蜜，废酒精，酒厂废水，味精厂废水，食品厂生产的下脚料，如动物屠宰的废弃物，果品加工厂的果皮渣，林业废弃物，农产品生产废弃的秸秆类物质，干草树叶等，都可以作为单细胞蛋白生产的原料。

(5) 处理环境污染，实现可持续发展^[23]。为了降低生产成本，单细胞蛋白的生产原料多采用价格低廉的工农业生产的副产品或废弃物下脚料，这样既解决了环境污染问题，又实现了产品的增值，变废为宝，一举两得。因此，近年来，除发展以传统的水土为中心的“绿色农业”和以海洋水域为主的“蓝色农业”外，还大力发展以微生物发酵为主的“白色农业”。据科学测算，借助微生物发酵工程仅利用每年石油总产量的 2% 就能生产出 2500~3000 万吨的单细胞蛋白，可供 20 亿人吃一年^[24]；又如我国每年约产农作物秸秆 4~5 亿吨^[25]。一座年产 10 万吨单细胞蛋白的微生物工厂，能生产出相当于 180 万亩耕地生产的大豆蛋白或 3 亿亩草地饲养的牛羊生产的动物蛋白^[26]。造纸行业是国民经济的支柱行业之一。中国 2004 年纸和纸板生产量 4950 万吨，消费量 5439 万吨。据权威机构预测 2020 年我国纸和纸板消费量为 1000~1100 万吨。中国造纸工业现在仍处于高速发展时期。

我国是造纸大国，但中国林木资源远远不能满足制浆造纸工业的需求。红麻为一年生亚灌木草本植物，具有生长速度快、抗旱、抗涝、抗盐碱等优点，是目前被认为最有潜力可替代木材的造纸原料^[27]。

红麻亚铵废液含有丰富的碳水化合物、氮源物质以及铁、硫、磷、钙、钾等矿物元素，制浆备料的碎末主要成分是粗纤维和蛋白。因此利用红麻亚铵制浆废液及备料碎末，经过微生物发酵可生产单细胞蛋白，既解决了造纸废液污染的问题，又可变废为宝，获得明显的经济效益。

首先对红麻亚铵废液化学成份进行分析，确定适应生长的微生物菌群，从中选择可获得高生物量的生产单细胞蛋白的微生物菌株。利用红麻亚铵废液和红麻叶、梢进行微生物发酵，确定最佳发酵条件，进行批量生产获得单细胞蛋白，同时对发酵所得单细胞蛋白微生物饲料进行营养成分和毒性物质的检测。在符合饲料标准的前提条件下，对微生物饲料进行实地饲喂观察，并对饲喂效果进行综合评估。

采用红麻亚铵制浆废液和红麻叶为原料生产微生物蛋白，尚未见有文献报道，若其研制成功，对于综合利用造纸制浆废液和废渣，发展地区造纸工业，拉动农业和畜牧业，

形成工农业生态产业链具有重大的意义。

菌种培养条件主要包括碳源、氮源、温度、pH 值。亚铵法制浆废液中，含有能为家畜家禽利用的丰富营养成分，并且含有粗蛋白，还原糖，还含有多种动物生长所必需的微量元素。采用亚铵制浆废液做营养源，可利用己糖作为碳源，利用铵盐作为氮源。而红麻叶的主要成分是粗纤维和粗蛋白，也能为牛、羊等牲畜所消化利用。若经过微生物发酵，红麻亚铵法制浆废液、废渣等可以大大提高其饲用价值，并可满足家禽、家畜饲养的多种需要。本课题主要任务是发酵菌株、培养基的筛选及最佳发酵工艺条件的确定^[28]。

本课题的创新之处在于以制浆造纸的废弃物为原料生产发酵饲料，统筹兼顾，将本来弃之不用并且难于处理的造纸废弃物变废为宝，发挥其内在经济效益，缓解当前饲料紧缺之急。若研究进行顺利，还可以实现本课题的产业化，即利用处理废物的资本加工废物，再使其商品化，产生经济效益，为下一次处理废物提供资本。以此类推，只需付出一次资本，就可以良性循环，之后的废物处理不仅不需要再追加投入，而且还会创造更大的经济效益，如果操作得当，还可以为企业制浆造纸生产积累和注入资金，从而使企业成长，进入良性循环。

利用各种不同原料生产单细胞蛋白的研究报告很多，主要有：

(1) 淀粉原料

加拿大有用烟曲霉液体发酵木薯原料(45℃, pH=3.5, 不灭菌 20h)1 升 4% 木薯干可得到 24g 产品，含蛋白 37%^[29]。英国用 2%~5% 的大麦粉中添加无机盐培养米曲霉(pH=3.5, 通气发酵 12~24h)，每千克大麦可得到 0.51kg 的蛋白产品，含蛋白质 39.4%^[30]。瑞典的 Sorigona 公司用肋状拟内孢霉用产阮假丝酵母混菌发酵马铃薯淀粉废水，获得的产品中产阮假丝酵母占 98%，肋状拟内孢霉占 2%，蛋白质平均含量 47%。法国也有用固体发酵法，以木薯为原料，不灭菌固体培养黑曲霉，发酵 30h，蛋白质含量由 2% 提高到 20%。

(2) 糖蜜原料

世界上主要用糖蜜原料生产药用酵母和食用饲料酵母，但目前主要用于生产价值较高的味精、柠檬酸、酒精等，由于价格及市场经济制约，由糖蜜生产饲料酵母在成本上没有竞争力^[31]。

(3) 生产味精的废水

据报道，用味精废水培养假丝酵母，30℃ 下，1:1 通气发酵 12h 达 10g/l 左右，4 吨味精废液可制造 1 吨酵母。

(4) 纤维素原料

纤维素原料是巨大的资源。全世界的绿色植物每年固定的 CO_2 大约为 $3.3 \times 10^{14} \text{kg}$ ，所产的有机物大约是 22×10^9 吨^[32]。有关科研机构研究出用分解纤维素的真菌 (*Chaetomium Cellutyticum*) 通过通气液体发酵，或固体发酵来生产单细胞蛋白^[33]。80年代起，国内也有用桔杆等固体发酵生产蛋白饲料的报道。

(5) 果渣原料及罐头厂废料

据报道，日本以柑橘渣为原料，接入假丝酵母固体培养蛋白质含量上升至 18.5%。也有用酶水解柑橘渣液培养酵母的报道。100kg 柑橘渣可得 45kg 酵母，蛋白质含量达 30%~50%。Block 曾介绍用橙汁、柑橘渣榨出液合成培养基生产蘑菇菌丝体。Labaneiah 等人 1979 年曾报道过用 10 个不同品种的柑橘渣榨出液生产蘑菇，产率为每 100g 还原糖 35~51.5g。Wayne A. Bough 等人曾报道用肉类罐头工业骨胶原副产物作基质，发酵巨大芽孢杆菌生产单细胞蛋白的研究^[37]。

(6) 其它原料

另有报道用泥炭原料、酒精厂废水、豆制品厂废水、石油和甜菜废渣等原料生产单细胞蛋白的报道。

1.3.2 应用前景

畜牧业是人类在改造自然过程中最先发展起来的产业之一，也是人类从完全顺服自然转向征服自然的重要标志。在人与自然以生态危机的形式表现出激烈矛盾冲突的今天，畜牧业因为直接联系和作用于生物圈生态系统，在整个可持续发展战略中具有举足轻重的地位。我国目前用占世界 7% 的耕地养活着占世界 22% 的人口，虽基本解决了温饱问题，但粮食的消费仍是低水平的。而现在我国配合饲料中原粮成分占 70% 以上，年产 5000 万吨饲料就需要 3500 万吨粮食，饲料用粮是一个庞大的数字^[34]。虽然自改革开放以来，特别是二十世纪九十年代以来，我国畜牧业取得了长足的发展，然而与之不相适应的是我国饲料资源相对不足，常规的饲料资源已经远不能满足畜牧业发展的需要，开发非常规饲料资源迫在眉睫。

1.4 我国饲料产业发展现状及趋势

1.4.1 我国饲料产业概况

二十世纪九十年代,是我国饲料加工业的蓬勃发展时期,饲料产量和质量都有很大提高,浓缩料产量从1991年的59万吨增长到1999年的1097万吨,年均增长48.87%,2000年总产量为1249万吨,比上年增长13.9%(见图1-1)

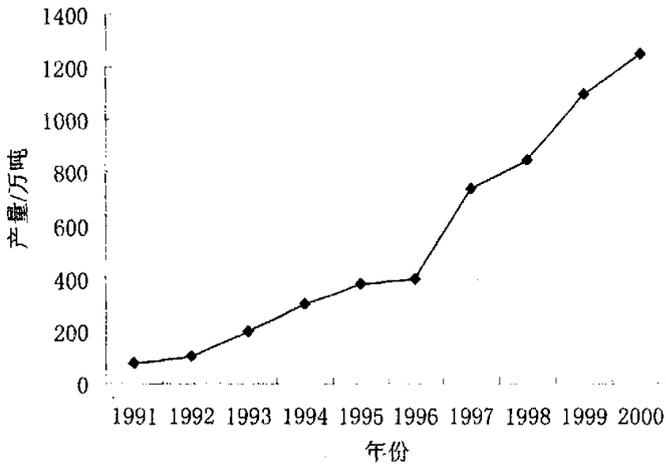


图 1-1 1991 年~2000 年全国浓缩饲料增长图

Figure 1-1 1991~2000 Entire Country Concentrated Feed Increasing Graph

1994~1998 年,配合饲料年均增长 268.2 万吨,增幅 6.3%,1999 与上年持平,2000 年配合饲料总产量为 5912 万吨,比上年增长 6.5%(见图 1-2)

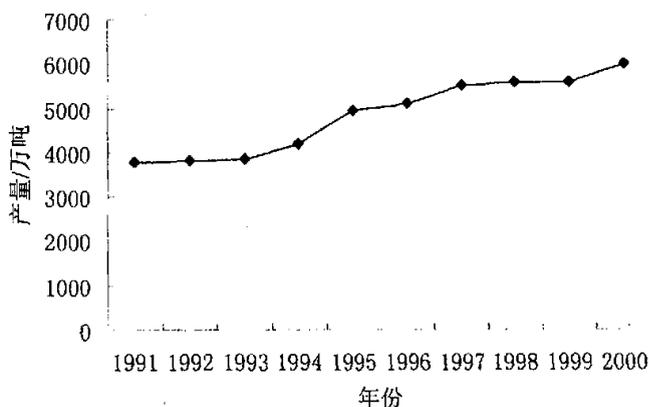


图 1-2 1991 年~2000 年全国配合饲料增长图

Figure 1-2 1991~2000 Entire Country Compound Feed Increasing Graph

添加剂预混料的增长速度也大大超过配合饲料的增长速度,从 1991 年的 30 万吨上升到 1999 年的 223 万吨,年增长 30%,2000 产量为 253 万吨,比上年增长 13.5%(见图 1-3)。而实际上我国工业化饲料所生产的畜禽产品仅占全国畜禽产品总量的 20%,其余 80%的畜禽产品来自广大农村的专业户和散养户^[45]。

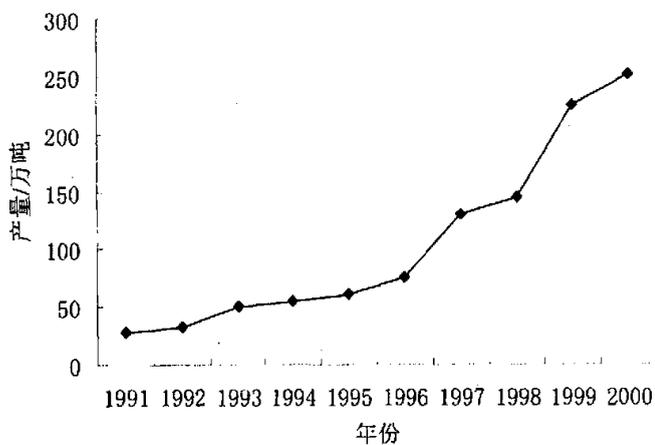


图 1-3 1991 年~2000 年全国添加剂预混合饲料增长图

Figure 1-3 1991~2000 Entire Country Additive Premixing Feed Increasing Graph

2004 年我国饲料工业发展势头强劲，饲料产量、品质及效益得到较大提高。尽管上半年饲料生产出现下滑，但全年仍呈现出持续稳定发展的良好结局。全年工业饲料总产量达到了 9300 万吨，比上年增长 6.8%，其中，配合饲料 6822 万吨，比上年增长 6.1%；浓缩饲料 2080 万吨，比上年增长 6.2%；复合预混料 364 万吨，比上年增长 11.8%。

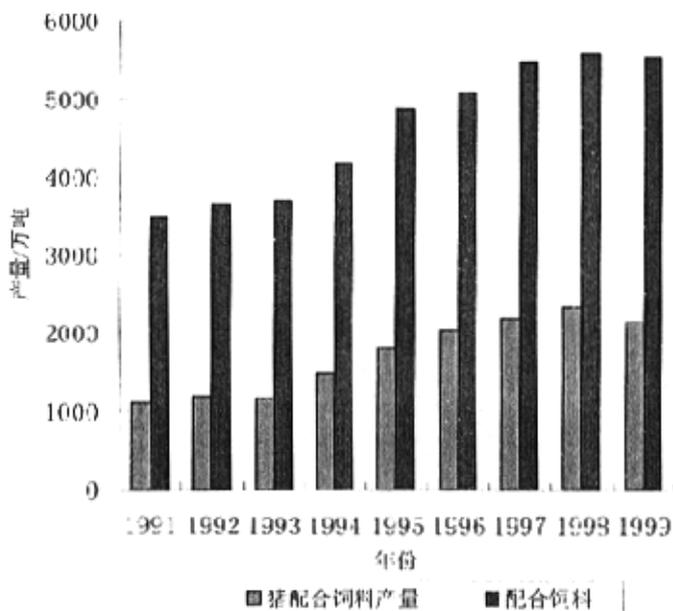


图 1-4 1991 年~1999 年猪配合饲料与配合饲料比较图

Figure 1-4 1991~1999 The Compare Graph of Pig Compound Feed and Compound Feed

从图 1-4 可以看出，猪配合饲料量始终要占到我国配合饲料总量的 30%~40%。相当大的比重。

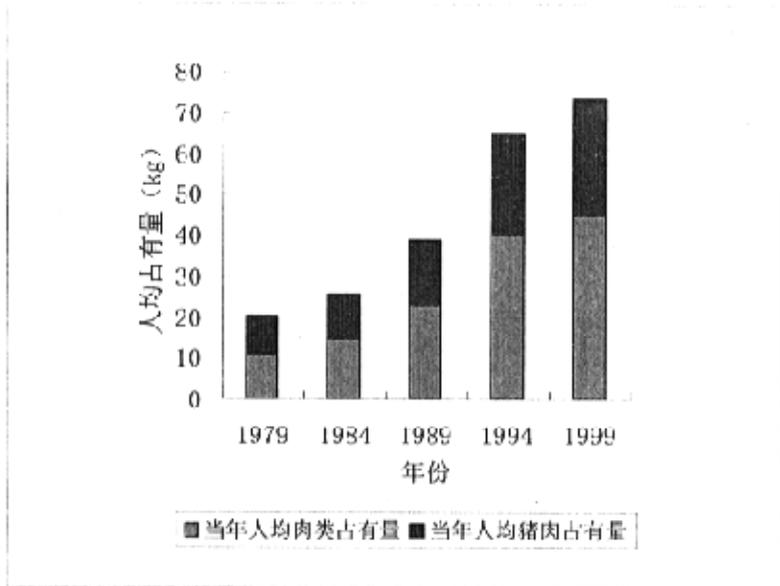


图 1-5 20 年来中国人均肉类与猪肉占有量比较

Figure 1-5 1991~1999 The Compare Graph of the Chinese per Capita Meat and Pork in the 20 Years

由图 1-5 可知, 1999 年世界肉类总产量 22889.58 万吨, 从 1979 年算起, 20 年增长 1.71 倍, 年递增率为 2.73%; 中国肉类总产量是 5946.8 万吨, 占世界 26%, 为世界第一。从 1979 年算起, 20 年增长了 5.76 倍, 年递增率为 9.15%, 可见中国畜牧业发展是世界最快的。中国人喜欢吃猪肉的习惯在过去的 20 年内也体现的相当明显, 虽然, 在我国猪肉消费占肉类总消费量的比例呈下降趋势, 但仍远高于其它肉类, 到 1999 年为止, 仍然占到肉类消费总量的 50% 以上, 猪肉人均占有量也超过世界平均水平。但要实现在 21 世纪中叶达到中等国家发展水平的战略目标, 畜牧业仍面临艰巨的任务。

我国分地区做的 2010 年常规饲料供求平衡结果表明: 作为主要饲料粮的稻谷和玉米, 2010 年时约占当时饲料粮总量的 22%; 作为日粮能量主要来源的玉米, 2010 年缺口将达 11057 万吨; 这将是未来我国畜牧业所面临的一种严峻形势。

另外, 近期公布的中国膳食结构规划和养殖发展规划显示: 根据全国饲料工业办公室的估算, 按照我国人民膳食结构与养殖业的发展规划要求, 2010 年、2020 年所需的能量饲料与蛋白饲料均有较大的缺口, 其中又以蛋白饲料更为紧缺, 2005 年-2010 年

中国饲料蛋白需求缺口较大，2005年可能缺口2000万吨以上；而2010年和2020年蛋白饲料缺口将分别达到3800万吨和4800万吨。人多地少，饲料用粮不足始终是制约我国畜牧业发展的主要因素。作为13亿人口的大国，提高动物性食品供应量，改善人民生活食物构成，必须立足于本国的饲料资源。为了弥补常规饲料资源的缺口，我们必须大力开发非常规饲料资源。

1.4.2 非常规饲料资源开发利用

1.4.2.1 非常规饲料资源的含义、种类及特征

非常规饲料资源系指在传统的动物饲养中未作为主要饲料使用过，或家畜(禽)商品粮中一般不用的饲料^[36]。在我国，非常规饲料资源主要指作物、林业、畜牧业、水产业生产的废弃物及食品加工下脚料。根据这个定义，非常规饲料资源面广、样多、量大，而且一般没有进行科学的、大规模的开发利用。

1.4.2.2 开发利用非常规饲料资源的意义

常规饲料资源已不能满足家畜发展的需要。常规饲料通常指的是饲料粮、糠鼓、豆粕及牧草。饲料粮一般占常规精饲料的80%，它来自于粮食生产，按预测玉米2010年缺口将达11057万吨，而2010年蛋白饲料缺口将达到3800万吨。这里需要指出的是：

- (1) 常规饲料资源不可能100%的开发利用
- (2) 水产和特产动物养殖也需一部分饲料^[37]

(3) 一部分草地以绿化和水土保持为目的而不能放牧或利用。所以，我国常规饲料资源已经远远不能满足畜牧业发展的需要。

1.4.2.3 利用非常规饲料资源的经济意义

非常规饲料资源，有的营养价值较高，如槐树叶、榆树叶、松树针等，其蛋白质含量一般占干物质的25%~29%，是很好的蛋白质补充料。有的量大分布广，如农作物秸秆、秕壳等，并且生产量远高于其相应籽实的产量，利用起来也相当方便，随着籽实的收获也就获得了秸秆。有的是废物利用，如酒精废液、味精废液、畜禽粪便等，酒精废液、味精废液经发酵可生产单细胞蛋白，畜禽粪便中含有许多营养物质。开发利用非常规饲

料资源经济上是可行的^[38]。

1.4.2.4 开发利用非常规饲料资源的社会、生态效益

非常规饲料大部分是一些“弃之有害，用之为宝”的物质资源。例如酒精废液、味精废液、酵母废液等都含有较高的生化需氧量(BOD)，排放厂外，会造成环境污染，如果将这些废液排入江河内，在排放口附近会出现水中生物因缺氧而死亡的现象。但是，它们又都含有数量不同的有机物，其中碳水化合物和蛋白质占有一定的比例，完全可以通过发酵、浓缩或者干燥等方法生产出蛋白饲料。我国年产农作物秸秆、秕壳 6.3 亿吨，目前饲用率约 33%，即有 67% 约 42 亿吨秸秆、秕壳或直接还田做肥料或焚烧掉或弃置于房前屋后。既浪费了资源又污染了环境，同时还会带来其他社会损失。把秸秆、秕壳做饲料用于养畜，畜粪还田，既能获得一定的经济收入，又可使生态环境得以良性循环。目前，国家已经建设了 208 个国家级“秸秆养牛示范县”；许多地方建起了树叶加工厂、酵母蛋白生产厂、矿物质饲料添加剂厂，研制并投产了各式各样的饼类脱毒机、畜禽羽毛及粪便处理机、糟渣废液加工机等。总之，开发利用非常规饲料资源的行动已在全国展开^[39]。

1.5 本论文研究方法及优点

本项目利用红麻亚铵法制浆废液为原料，经过发酵生产饲料酵母。主要工艺流程为：

菌种→扩大培养	}	混合发酵→干燥→粉碎→成分分析、检验
红麻废液		

本项目处理方法与以前的处理方法相比，其优点主要有：

(1) 处理费用低，可行性强。

(2) 变废为宝，一举两得，既解决了污染问题，又为饲料工业的发展开辟了新的饲料资源，特别是在当前饲料资源日见贫乏、主要饲料原料价格居高不下的情况下，其意义更加重大，将会有力地促进饲料工业的发展。

1.6 本论文的研究内容

本论文包括以下几个方面的研究内容：

- (1) 菌种的筛选。
- (2) 发酵培养基的筛选。
- (3) 发酵工艺条件的研究进行 pH、发酵时间和培养温度试验。确定最佳的发酵工艺条件。
- (4) 进行废液浓度、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 浓度对发酵菌体生长影响的研究
- (5) 发酵产物营养含量测定。

第二章 实验材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 红麻原料

实验用红麻产地为辽西地区，贮存期不少于6个月，茎秆高3~4m，粗2~4cm。无腐败，少杂质。

表 2-1 红麻原料的化学成分^[40]

Table 2-1 Chemical Composition of Kenaf Material

	灰份 /%	抽提物/%			Klason 木素/%	酸溶 木素/%	总木素 /%	综纤维 素/%	聚戊 糖/%
		热水	苯醇	1% NaOH					
全秆	2.74	12.07	4.36	34.34	16.27	2.07	18.34	78.41	17.99
秆芯	2.51	15.01	4.45	36.39	19.00	1.73	20.73	77.93	19.67
皮	3.82	9.83	4.19	30.37	8.65	2.16	10.81	79.65	14.07

2.1.2 亚铵法制浆废液

将全秆红麻切成30~50mm长的麻段，置于大塑料袋中平衡水分备用。在ZQS-1型15升电热回转蒸煮锅中进行蒸煮。采用成熟的红麻亚铵制浆工艺制浆，保温结束后将锅内压力放至零后，收集废液。

表 2-2 亚铵法制浆蒸煮工艺条件

Table 2-2 The Optimal Boiling Conditions of Ammonium Sulfito Waste Pulping

工艺条件	数值
最高温度/°C	160
保温时间/h	2.5
液 比	1: 5
(NH ₄) ₂ SO ₃ 用量/%	16
MgO用量/%	5

表 2-3 亚铵法制浆废液性质
Table 2-3 Characteristic of Ammonium Sulfite Waste Liquor

测定项目	测定结果
比重/kg/L	1.06
pH	7.8
固形物含量/%	12.36
全氮含量/%	7.28
铵态氮/%	4.18
还原糖g/L	12.80

2.1.3 菌种

酵母菌是一群单细胞微生物，属真菌类。由于酵母细胞含有丰富的蛋白质、维生素和多种酶，所以又是医药、化工和食品工业的重要原料。例如生产菌体蛋白、核糖核酸、乳糖酶、脂肪酶等。以及利用石油为原料发酵制取柠檬酸、脂肪酸、反丁烯二酸，在农业方面作糖化饲料等^[41]。

热带假丝酵母 [*Candida tropicalis* (Cast.) Berkhout]：由中国微生物菌种保藏中心提供，大连轻工业学院微生物实验室保存。当热带假丝酵母培养在麦芽汁琼脂斜面上时，它的菌落颜色从白色到奶油色，并且无光泽或稍有光泽，表面软而平滑或部分有皱纹。在其经过较长时间的培养后，热带假丝酵母的菌落逐渐变硬，并且呈菌丝状。热带假丝酵母对糖类如葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、蔗糖等均能发酵。热带假丝酵母氧化烃类能力强，可利用煤油，培养在正烷烃 $C_7 \sim C_{21}$ 的培养基中，只同化壬烷。在含 230~290℃石油馏分的培养基中，经 22 小时后，可得到相当于烃类重量 92% 的菌体，故为石油蛋白生产的重要酵母。传统上用于农副产品和工业废料做饲料的发酵菌株。

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen)：由大连轻工业学院微生物实验室保存和提供。啤酒酵母生长在麦芽汁琼脂上的菌落为乳白色，有光泽，平坦，边缘整齐。在加盖片的玉米琼脂上培养，不生假菌丝或有不典型的假菌丝。啤酒酵母能发酵葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、蔗糖及 1/3 棉子糖，不能发酵乳糖和蜜二糖。不同化硝酸盐。啤酒酵母是酿造啤酒典型的上面发酵酵母，除了酿造啤酒、酒精及其他饮料酒外，又可发酵制面包。菌体的维生素、蛋白质含量高，可作食用、药用和饲料酵母。

葡萄酒酵母：由大连轻工业学院微生物实验室保存和提供。

综上所述，利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母的试验，采用这三种既能够提供较为丰富的蛋白质，又曾经被用作饲料发酵菌株的酵母，作为供筛选的菌株，即热带假丝酵母、葡萄酒酵母和啤酒酵母。

2.1.4 实验试剂

- (1) 磷酸二氢钾（分析纯）
- (2) 硫酸镁（分析纯）
- (3) 营养盐溶液： $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ （分析纯）与 KH_2PO_4 （分析纯）的混合溶液，浓度根据实验条件作相应的调整。
- (4) 浓硫酸（96%浓硫酸）
- (5) 硫酸钾（分析纯）
- (6) 硫酸铜（ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ，分析纯）
- (7) 30%氢氧化钠溶液：称取 30 克的氢氧化钠，用水溶解后，将其稀释至 100mL。
- (8) 过氧化氢（30%）
- (9) 0.49%硫酸溶液：量取 3mL 浓硫酸于预先盛有水的容器中，冷后，加水稀释至 1000mL。
- (10) 0.4%氢氧化钠溶液：称取 4.2 克的氢氧化钠（化学纯）溶于新煮沸而已冷却的水中。冷后，加入新煮沸而已冷却的水稀释至 1000mL。
- (11) 0.1%甲基红指示剂：称取 0.1 克的甲基红溶解于 95%乙醇中，再加乙醇稀释至 100mL。此溶液在酸性溶液中无色，在碱性溶液中呈黄色，变色范围为 pH 4.4（红色）~6.2（黄色）。
- (12) 葡萄糖（分析纯）
- (13) 琼脂粉
- (14) 硫酸铵（分析纯）
- (15) 斐林试剂：
斐林甲液：将 69.3 克的硫酸铜（分析纯），溶于 1000mL 的蒸馏水中，留待备用。
斐林乙液：称取 350 克酒石酸钾钠（分析纯）及 100 克氢氧化钠溶于 1000mL 蒸馏水中。

2.1.5 仪器与amp;设备

水浴恒温振荡器	SHA-C	皖天长市实验仪器仪表厂
离心机		上海市安亭科学仪器厂
电热干燥箱	701-2 型	大连干燥箱厂制造
HPS-250		哈尔滨市东明医疗仪器厂
AB204-N 型电子天平		梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 培养基的制备

(1) 麦芽汁的制备

取一定量的大麦芽，将其粉碎后，加 4 倍于麦芽重量的 60℃ 水，在 55~60℃ 将其保温及糖化，不断搅拌，经 3~4 小时后，用纱布进行过滤，除去残渣，滤液经煮沸后再反复用滤纸或脱脂棉过滤一次，即得澄清的麦芽汁，再加水将其稀释成 10° Bx 的麦芽汁。

(2) 培养基的制备

斜面种子培养基（10° Bx 麦芽汁琼脂培养基）：在 100mL 的 10° Bx 麦芽汁中加入 2% 琼脂，融化后分装试管，于 1 kg/cm² 灭菌 30 分钟，备用。

液体发酵培养基：10° Bx 的麦芽汁培养基，自然 pH 值。将糖度为 10° Bx 的麦芽汁 50mL，分装 250mL 三角瓶中，灭菌 30 分钟，留待备用。

碳、氮源液体培养基：1% 葡萄糖，0.1% 硫酸铵。

2.2.2 菌种的培养

不同的微生物菌株适宜生长条件不尽相同，只有在适宜的生长条件下培养微生物，才可能快而多地获得菌体细胞。培养条件是选择生产菌种和确定生产条件的重要依据。为此，对三种试验菌株进行培养条件的测定实验。

(1) 斜面接种

将冰箱中储存的三种酵母菌转接至已经做好的斜面中，放入 28℃ 的培养箱中培养 24~48 小时。

(1) 酵母菌的活化

将长好的酵母菌斜面转接到含有 50mL 10° Bx 麦芽汁的 250mL 三角瓶中，放到恒温摇床上振荡培养 48 小时，备用。

(2) 废液的添加

量取红麻亚铵法制浆废液 10mL 加入到干热灭菌后的 250mL 三角瓶中，然后再加入已经配制好的碳、氮培养基溶液 40mL。在 121℃ 灭菌 20min 后，留待接菌备用。

(3) 发酵

把在液体培养基中培养的酵母菌摇匀，用干热灭菌后的吸管吸取 5ml 的液体转入到已经配好的培养基中，把瓶口用 8 层纱布封好后，再放到恒温摇床上培养。在各个三角瓶中的接种量均为 10%。

2.2.3 菌种的筛选和培养基选定

将培养基分成两组，即添加红麻亚铵废液的和未加红麻亚铵法废液的，用热带假丝酵母、葡萄酒酵母和啤酒酵母分别实验，筛选适宜做发酵实验的菌株，并分析加了亚铵法废液的培养基是否更有利于菌体的生长。

2.2.4 分析方法

2.2.4.1 还原糖的测定

本课题中还原糖的测定采用快速测定水解液及亚硫酸废液还原糖法^[42]。

(1) 分析原理

当斐林溶液遇水解液及亚硫酸盐废液还原糖，生成一氧化铜，将多余的斐林溶液用碘化钾还原，还原后生成的游离碘，可以采用硫代硫酸钠进行滴定，由此可计算还原物的含量。

(2) 实验试剂

斐林甲液——将 69.3 克的硫酸铜溶于 1000mL 蒸馏水中。

斐林乙液——称取 350 克的酒石酸钾钠及 100 克的氢氧化钠溶于 1000mL 的蒸馏水中。

(3) 测定方法

样品液的制备：吸取样品溶液 10mL，置于 100mL 容量瓶内，稀释至刻度，摇匀备用。

斐林溶液强度的测定：吸取甲、乙二液各 5mL 于 250mL 锥形瓶中，在电炉上煮沸，缓缓加入蒸馏水 10mL，再煮沸 3 分钟，冷却至 20~25℃，加入 5mL 20%碘化钾溶液及 5mL 25%硫酸溶液（此时有较多的黄色沉淀生成），立即用 2.482%的硫代硫酸钠标准溶液滴定至溶液呈淡黄色时，加入 2mL 淀粉指示剂，继续用 2.482%的硫代硫酸钠标准溶液滴定至蓝色恰好消失。

正常斐林溶液强度相当于 2.482%的硫代硫酸钠标准溶液 13.4~13.5mL。

(3) 计算方法

还原糖所消耗的 2.482%的硫代硫酸钠量/mL

$$V = V_1 - V_2$$

将 V 乘以 0.32 即为还原糖的值/g/100mL。

式中：V₁——滴定斐林溶液强度时消耗的 2.482%的硫代硫酸钠量/mL

V₂——滴定试样时消耗的 2.482%量/mL

2.2.4.2 粗蛋白的测定^[43]

本论文的目的在于利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母，发酵产物中的饲料酵母的蛋白质含量是酵母成品质量的一个重要指标。

为了准确地分析发酵产物中菌体蛋白质含量，采用凯氏定氮法测量产物中含氮量，再利用粗蛋白与含氮量的系数关系得到最优发酵条件下产物的粗蛋白含量。

(1) 测定步骤

① 试样消化

准确称取 2 克试样，置入 250mL 凯氏定氮瓶中，加 3 克硫酸钾和 1 克硫酸铜，加 20mL 浓硫酸，瓶口安放一只小三角漏斗，于电炉上加热消化。若消化液色泽较难褪去，则冷却后，加 3~5mL 过氧化氢，继续加热，直至消化液清澈透明为止。

冷却，转入 100mL 容量瓶中（瓶中预先加入约 20mL 水），用水充分洗涤凯氏定氮瓶，冷却至室温，再用水定容至刻度，摇匀。

② 加碱蒸馏

吸取 50mL 稀释消化液，置入 500mL 平底烧瓶中，加约 100mL 水和数粒沸石或素瓷（素瓷需预先用酸碱处理或煅烧过），加 60mL 30%氢氧化钠溶液（或在烧瓶上安一分液漏斗加碱），立即盖严，蒸馏约 45 分钟（或蒸出原液体积约 1/3）。

接收瓶中预先准确加入 25 或 50mL 0.1N 硫酸溶液。

③ 滴定

蒸馏完后，用水洗涤冷凝器，取出接受瓶，加 4 滴 0.1% 甲基红指示剂，用 0.1N 氢氧化钠溶液滴定至黄色。

(2) 试验结果计算

$$\text{全氮}(\%) = [(NV)_{\text{H}_2\text{SO}_4} - (NV)_{\text{NaOH}}] \times 0.01401 \times (100/50) \times (1/W) \times 100\%$$

式中 $(NV)_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ ——接收瓶中硫酸溶液的浓度与体积/mL

$(NV)_{\text{NaOH}}$ ——滴定时消耗氢氧化钠溶液的浓度与体积/mL

100/50——稀释倍数

W——试样重量

$$\text{粗蛋白质}/\% = 6.25 \times \text{全氮}/\%$$

式中 6.25——氮与蛋白质的换算系数

2.2.5 菌体生物量的测定

本研究的菌体生物量以菌体干重表示。

离心机转速为 3500r/min，发酵液经离心后备用。取离心所得菌体，用去离子水冲洗后，在 105℃ 烘至恒重，称量菌体重量。

2.2.6 培养条件的优化

(1) 发酵温度对菌体发酵结果的影响 (°C)

探讨最佳发酵温度。

(2) 发酵时间对菌体发酵结果的影响 (h)

探讨最佳发酵时间。

(3) pH 值对菌体发酵结果的影响

探讨最佳 pH。

(4) 无机盐对菌体发酵结果的影响

探讨在不同废液浓度条件下， KH_2PO_4 的添加浓度、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加浓度的最佳添加量。

2.2.7 再现性试验

探索以红麻亚铵法制浆废液为培养基，发酵生产饲料酵母的最佳工艺条件。

第三章 结果与讨论

3.1 发酵培养基的初步研究

选用各种营养物质,经人工配制用来培养微生物的基质,称为培养基。培养基成分和配比合适与否,对微生物生长发育、物质代谢、发酵产物的积累以及生产工艺都有很大的影响。良好的培养基配比可以充分发挥菌种的生物合成能力;相反,若培养基成分、配比或原材料不合适,则菌种生长及发酵的效果就较差。

不同的微生物所需要的培养基成分不同,不同发酵生产所要求的原料也不同,因此应根据具体情况,从微生物对营养要求的特点和生产工艺的要求,选择合适的培养基,使既满足微生物的生长需要,又能获得高产的产品,同时也要符合增产节约、因地制宜的原则。

在液体培养基中,营养物质以溶质状态溶解于其中,使微生物能更充分接触和利用养料,因而也能更好地积累代谢产物。在菌种的筛选过程中,也常用液体培养基进行振荡或静止培养。培养基中的营养物质一般包括碳源、氮源、无机盐等,以满足微生物生长繁殖的需要。若培养基中氮源过多,会引起微生物生长过于旺盛,不利于产物的积累;氮源不足,则菌体生长过慢。碳源供应不足时,容易引起菌体衰老和自溶。

各种微生物生长要求不同 pH 值。一般来说,酵母菌适于微酸性,放线菌和细菌适于中性和微碱性,为此培养基配置好后,若 pH 值不符合要求,必须加以调整。

红麻亚铵法制浆废液中含有碳、氮等适合微生物发酵的营养元素,本实验首先选用未添加废液和添加废液的液体培养基进行发酵生产饲料酵母的研究。

3.1.1 未添加废液的培养基菌体生长的结果

当碳、氮源培养基中未添加废液时,对葡萄酒酵母、啤酒酵母以及热带假丝酵母在 30℃ 下进行发酵,其菌体生物量与发酵时间的关系如表 3-1 和图 3-1 所示。

表 3-1 未加废液的培养基菌体生长的结果

Table 3-1 Microbial Biomass Production from Media without Ammonium Sulfite Waste Liquor

时间/h	葡萄酒酵母/g/100mL	啤酒酵母 /g/100mL	热带假丝酵母 /g/100mL
36 小时	1.123	0.968	1.616
48 小时	1.231	1.014	1.752
72 小时	1.013	0.801	1.602

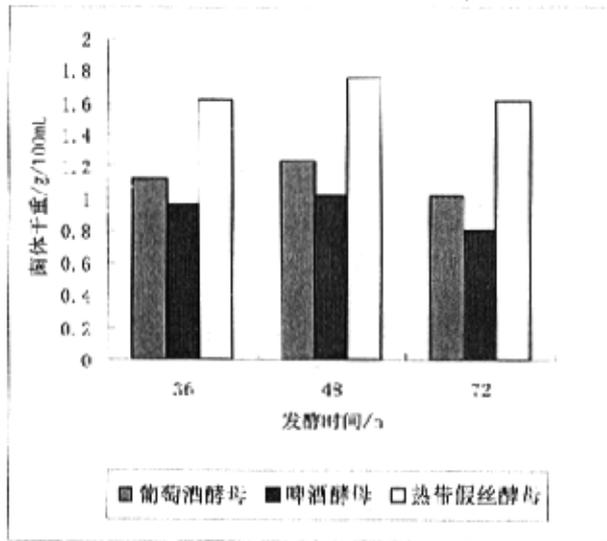


图 3-1 未加废液的培养基菌体生长的结果

Fig. 3-1 Microbial Biomass Production from Media without Ammonium Sulfite Waste liquor

由图 3-1 明显可以看出，发酵过程中菌体生物量大小的排序为：热带假丝酵母>葡萄酒酵母>啤酒酵母，三种酵母菌的菌体生长均在初始阶段稳步上升，在 48 小时左右菌体生物量达到最大值，随着发酵时间的增加菌体生物量逐渐下降。

3.1.2 添加废液的培养基菌体生长的结果

当碳、氮源培养基中添加 10mL 废液后，在与未加添废液的同样发酵条件下，对三

种酵母进行发酵，其结果如表 3-2 和图 3-2 所示。

从图 3-2 中可知，发酵时间在 48 小时菌体生物量取得最大值，虽然三种酵母菌体生物量总体上都有了一定的增长，但热带假丝酵母的菌体生物量仍然居于领先地位。

同样可以看出，发酵过程中不同时间段菌体生物量的排序为：热带假丝酵母>葡萄酒酵母>啤酒酵母，并且三种酵母菌的菌体生长均在初始阶段稳步上升。

表 3-2 添加废液的培养基菌体生长的结果

Table 3-2 Microbic Biomass Production from Media with Ammonium Sulfite Waste Liquor

时间/h	葡萄酒酵母/g/100mL	啤酒酵母	热带假丝酵母
		/g/100mL	/g/100mL
36 小时	1.023	1.086	1.779
48 小时	1.502	1.125	1.901
72 小时	1.121	0.821	1.697

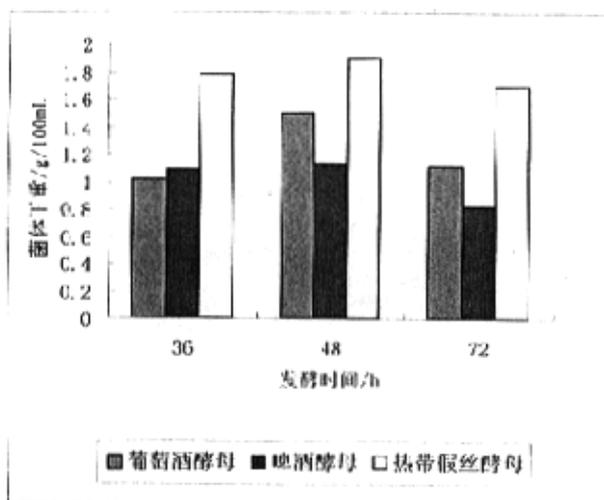


图 3-2 添加废液的培养基菌体生长的结果

Fig. 3-2 Microbic Biomass Production from Media with Ammonium Sulfite Waste Liquor

从图 3-1 和图 3-2 可以看出，菌体经一定时间生长后菌体生物量产量有所下降，原因可能是：由于酵母是好氧发酵，酵母在成熟过程中或在营养不足时，通常会加强细胞成分的分解过程，因此蛋白质渗透到培养基内时间过长，酵母产生自溶而使产量减少。

3.1.3 加与未加废液培养基生长结果比较

比较图 3-1 及图 3-2 可以得出结论: 添加红麻亚铵法制浆废液的培养基发酵后所得的菌体生物量均多于未添加废液的。分析其原因, 可能是因为红麻亚铵法制浆废液为菌体的生长提供了碳源和氮源等发酵所需营养, 使菌体生长的速度和质量都有所增加。因此以后实验的培养基均添加了红麻亚铵法废液。

另一方面, 在同样的培养基条件下, 热带假丝酵母、啤酒酵母、葡萄酒酵母三种菌株的菌体生物量有所不同, 其中菌体生长最好的是热带假丝酵母。

3.2 发酵最佳工艺条件的研究

3.2.1 正交实验各因素水平的确定

实验采用三因素(发酵温度、发酵时间、pH 值)三(发酵温度)、四(发酵时间)、五(pH 值)水平。三因素分别选择 pH 值、发酵时间、发酵温度。酵母菌培养最适温度在 30℃左右, 适合在偏酸性环境中生长^[4], 同时为了便于试验操作, 每隔 12 小时测一次菌体生物量, 因而采用如表 3-3 所示各因素水平进行正交实验, 测定其菌体生物量, 以优选出适合于红麻亚铵法废液的发酵条件。

表 3-3 发酵正交实验因素水平表

Table 3-3 Factors and Levels of Orthogonal Experiment of Fermentation

水平 因素	1	2	3	4	5
A (pH 值)	3	4	5	6	7
B (发酵时间/h)	36	48	60	72	
C (发酵温度/℃)	25	30	35		

3.2.2 正交实验结果分析

按表 3-3 所示的正交实验条件, 排列正交实验表并将实验所得的结果列于表 3-4 中。从表 3-4 正交实验结果中可以看出, 随着各因素水平的变化, 实验所要考察的各项

指标变化均比较大。当pH 4.0~6.0时,温度为30℃时,发酵时间为48小时左右时,发酵效果较好,其菌体生物量也相对较高。

表 3-4 正交实验结果
Table 3-4 Results of Orthogonal Experiment

试验号	A (pH)	C (发酵温度)	B (发酵时间/h)	葡萄酒酵母 /g/100mL	啤酒酵母 /g/100mL	热带假丝酵母 g/100mL
1#	1	1	1	0.805	0.279	1.714
2#	1	1	2	0.359	0.009	1.722
3#	1	1	3	0.679	0.075	1.799
4#	1	1	4	0.764	1.024	1.754
5#	1	2	1	1.602	0.272	1.901
6#	1	2	2	0.919	0.966	1.889
7#	1	2	3	1.595	1.031	1.898
8#	1	2	4	1.018	0.069	1.868
9#	1	3	1	0.619	0.855	1.822
10#	1	3	2	0.671	0.291	1.621
11#	1	3	3	0.717	0.358	1.730
12#	1	3	4	0.705	0.113	1.653
13#	2	1	1	1.219	0.486	1.725
14#	2	1	2	1.189	1.196	1.898
15#	2	1	3	0.679	1.275	1.809
16#	2	1	4	1.490	1.777	1.760
17#	2	2	1	1.321	0.460	1.785
18#	2	2	2	1.580	0.647	2.023
19#	2	2	3	2.175	0.819	1.902
20#	2	2	4	1.932	1.331	1.872
21#	2	3	1	0.529	0.472	1.838
22#	2	3	2	0.776	0.076	1.712
23#	2	3	3	0.678	0.244	1.794

第三章 结果与讨论

24#	2	3	4	0.860	0.251	1.668
25#	3	1	1	1.102	0.465	1.998
26#	3	1	2	1.137	0.102	2.684
27#	3	1	3	1.679	0.533	2.398
28#	3	1	4	1.726	1.732	2.867
29#	3	2	1	0.426	0.331	3.021
30#	3	2	2	1.452	2.092	3.218
31#	3	2	3	2.087	0.873	3.158
32#	3	2	4	1.409	1.709	3.102
33#	3	3	1	0.293	1.211	1.828
34#	3	3	2	0.730	0.505	2.354
35#	3	3	3	0.229	0.881	1.812
36#	3	3	4	0.541	0.082	1.757
37#	4	1	1	0.687	1.103	1.697
38#	4	1	2	0.025	0.771	1.898
39#	4	1	3	1.266	0.700	1.702
40#	4	1	4	1.483	0.797	1.695
41#	4	2	1	1.599	1.343	1.818
42#	4	2	2	0.334	0.222	2.102
43#	4	2	3	1.769	0.720	1.881
44#	4	2	4	0.873	0.949	1.817
45#	4	3	1	0.686	0.581	1.794
46#	4	3	2	0.784	0.618	1.778
47#	4	3	3	0.876	0.795	1.783
48#	4	3	4	0.868	0.333	1.695
49#	5	1	1	0.312	0.146	1.675
50#	5	1	2	1.362	1.628	1.791
51#	5	1	3	1.132	1.803	1.682
52#	5	1	4	0.688	0.702	1.589
53#	5	2	1	0.861	0.789	1.789
54#	5	2	2	1.601	1.245	1.893

55#	5	2	3	2.026	0.861	1.772
56#	5	2	4	1.383	1.089	1.608
57#	5	3	1	0.685	0.170	1.740
58#	5	3	2	0.430	0.823	1.692
59#	5	3	3	1.054	0.100	1.648
60#	5	3	4	1.210	0.153	1.531

得到红麻亚铵法制浆废液发酵的正交实验结果后, 对其作极差分析, 详见表3-5。

表3-5 正交实验极差分析结果

Table 3-5 Result Analysis of Orthogonal Experiment

葡萄酒酵母/g/100mL					
A(pH值)		C(发酵温度)		B(发酵时间)	
I/12	0.813	I/20	0.989	I/15	0.849
II/12	1.202	II/20	1.443	II/15	0.889
III/12	1.034	III/20	0.671	III/15	1.303
IV/12	0.896			IV/15	1.131
V/12	0.787				
R	0.389	R	0.772	R	0.454
优	A ₂	优	C ₂	优	B ₃
主次因素: C(发酵温度)>B(发酵时间)>A(pH值) 较优组合: A ₂ C ₂ B ₃					
啤酒酵母/g/100mL					
A(pH值)		C(发酵温度/°C)		B(发酵时间/h)	
I/12	0.443	I/20	0.832	I/15	0.598
II/12	0.753	II/20	0.891	II/15	0.746
III/12	0.876	III/20	0.446	III/15	0.758
IV/12	0.744			IV/15	0.807
V/12	0.702				
R	0.433	R	0.445	R	0.209
优	A ₃	优	C ₂	优	B ₁
主次因素: 发酵温度>pH值>发酵时间 较优组合: A ₃ C ₂ B ₁					
热带假丝酵母/g/100mL					
A(pH值)		C(发酵温度/°C)		B(发酵时间/h)	
I/12	1.781	I/20	1.893	I/15	1.876
II/12	1.816	II/20	2.116	II/15	2.018
III/12	2.516	III/20	1.763	III/15	1.918

IV/12	1.805			IV/15	1.882
V/12	1.701				
R	0.815	R	0.353	R	0.142
优	A ₃	优	C ₂	优	B ₂

主次因素：pH 值>发酵温度>发酵时间

较优组合：A₃C₂B₂

从表 3-5 中各因素的实验结果产生的极差可知，影响葡萄酒酵母发酵结果的主次因素最显著的是发酵温度，三个因素的影响大小顺序为：发酵温度>发酵时间>pH 值，较优组合为 A₂C₂B₃，即发酵温度为 30℃，发酵时间为 60h，pH 4.0；对啤酒酵母发酵结果影响最显著的是发酵温度，三个因素影响大小的顺序是：发酵温度>pH 值>发酵时间，较优组合为 A₃C₂B₄，即发酵温度为 30℃，发酵时间为 72h，pH 5.0；对热带假丝酵母发酵结果影响的主次因素最显著的是 pH 值，三个因素的影响大小顺序是：pH 值>发酵温度>发酵时间，较优组合为 A₃C₂B₂，最适培养条件为：发酵温度为 30℃，发酵时间为 48h，pH 5.0，在此条件下，菌体生物量最高。由此可以看出各因素中，发酵温度对各指标的影响较大。

3.2.3 各因素对菌体生长的影响

由正交实验极差分析结果，作各因素水平趋势图，并对各因素的影响分析如下。

3.2.3.1 各因素对葡萄酒酵母菌体生长的影响

发酵培养基的初始 pH 值能影响酵母对环境的适应速度和酵母细胞内的 pH 值、进而影响酵母的活性。并且，培养基的 pH 对酵母的生命活动也有显著影响。氢离子浓度能改变细胞原生质膜胶体的电荷，所以，随着氢离子浓度的变化，原生质膜对某些物质和离子的通过性会发生变化，这表明营养物质进入细胞的速度与培养基的 pH 值有关。各种微生物生长需求不同 pH 值；一般说来，酵母菌适于在微酸性环境下生长。

(1) pH 对葡萄酒酵母菌体生长的影响

根据表 3-5 中 pH 值对葡萄酒酵母菌体生长的极差分析结果做图，如图 3-3 所示。

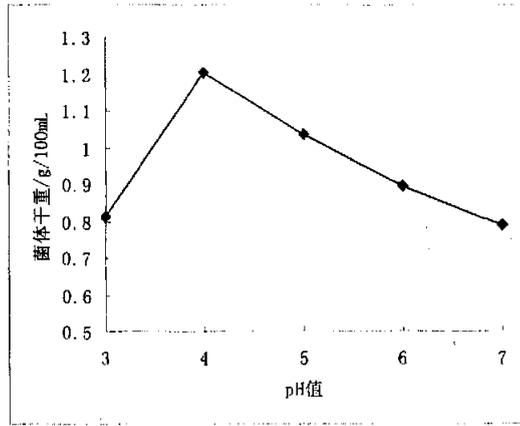


图 3-3 pH 对葡萄酒酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-3 Effects of pH Value on Growth of Wine Yeast

由图 3-3 所示, 当 pH 3.0~4.0 时, 葡萄酒酵母菌体生长速度较快, 并在 pH 4.0 时取得最大值, 但随着 pH 的增大, 菌体生物量有所降低。

(2) 发酵时间对葡萄酒酵母菌体生长的影响

发酵时间对菌体生长的影响体现在随着发酵过程的进行, 菌体生长的速度变化和菌体生物量的增减。当某种微生物接种至培养基上, 一般并不立即开始生长, 而是要经过一段适应时间之后, 才开始生长, 这是由于细胞内各种酶系要有一个适应的过程。菌体在经历一定时间的对环境的适应后, 就以最快的速度进行繁殖。当培养基的营养物质逐渐耗尽后, 再加上某些有毒代谢产物的积累, 以及其它外界因素, 都会使菌体生长受到限制, 菌体生长速度开始减缓, 直到自溶死亡。在营养充足的情况下, 培养时间长则菌体繁殖越多, 蛋白质含量越高; 但当其进入生长衰退期后, 蛋白质含量就降低。所以须确定合适的发酵时间, 即发酵终点。

用表 3-5 中发酵时间对葡萄酒酵母菌体生长的极差分析结果做图, 如图 3-4 所示。

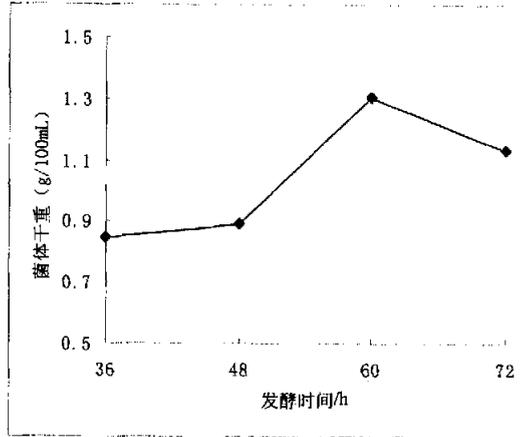


图 3-4 发酵时间对葡萄酒酵母菌体生物量的影响
Fig. 3-4 The Effects of Time on Growth of Wine Yeast

由图 3-4 所示，当发酵时间在 36~48h 范围内时，葡萄酒酵母菌体生长速度较为平缓，在 48~60 小时范围内时，菌体生长较快，并在发酵时间为 60h 时，菌体生物量达到最大值，此后随着发酵时间的增长而出现衰退，由于部分菌体的自溶，菌体生物量逐渐下降，营养物质的耗尽或产生抑制菌体生长的物质。由此得到葡萄酒酵母最佳发酵时间为 60h。

(3) 发酵温度对葡萄酒酵母菌体生长的影响

酵母生存和繁殖的温度范围很宽，但是，其正常的生存和繁殖温度是 29~30℃。在很高或很低的温度下，酵母的生命活动就会削弱或停止。因此温度对酵母的生长影响很大。用表 3-5 中发酵温度对葡萄酒酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图，如图 3-5 所示。

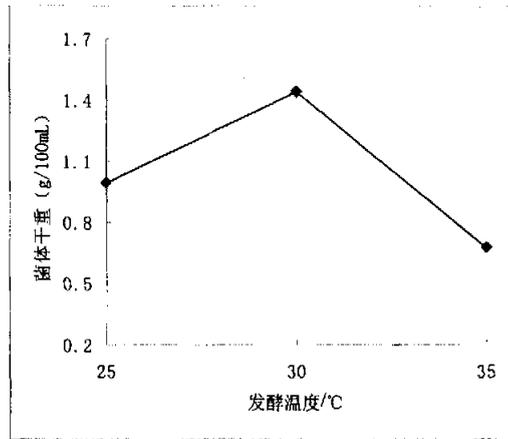


图 3-5 发酵温度对葡萄酒酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-5 Effects of Temperature on Growth of Wine Yeast

由图 3-5 所示，温度对发酵结果有一定的影响，当温度在 25~30℃时，菌体生物量随温度的升高而快速增加，并且在发酵温度为 30℃时，取得菌体生物量的最大值，当温度高于 30℃时，菌体生物量随着温度的升高而急剧下降。

综上所述，可以得出本试验中葡萄酒酵母最佳发酵条件：发酵温度为 30℃，发酵时间为 60 小时，pH 4.0。

3.2.3.2 各因素对啤酒酵母菌体生长的影响

(1) pH 对啤酒酵母菌体生长的影响

用表 3-5 中 pH 值对啤酒酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图，如图 3-6 所示。

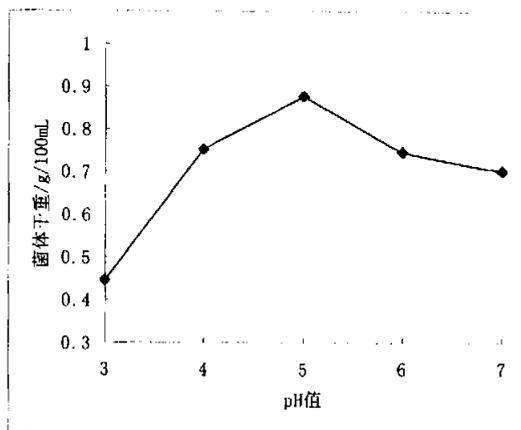


图 3-6 pH 对啤酒酵母菌体生物量的影响
Fig. 3-6 The Effects of pH Value on Growth of Beer Yeast

由图 3-6 所示，当 pH 3.0~4.0 时，葡萄酒酵母菌体生长速度较快，并在 pH 5.0 时取得最大值，但随着 pH 的增大，菌体生物量有所降低。

(2) 发酵时间对啤酒酵母菌体生长的影响

用表 3-5 中发酵时间对啤酒酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图，如图 3-7 所示。

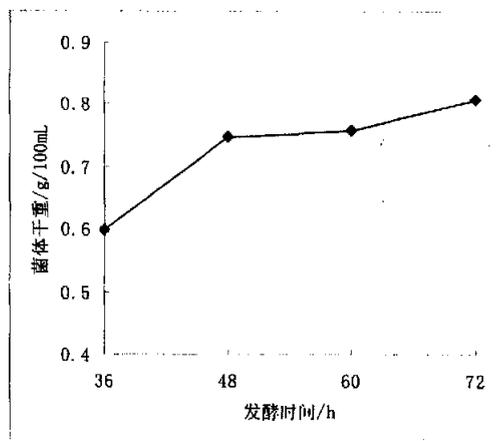


图 3-7 发酵时间对啤酒酵母菌体生物量的影响
Fig. 3-7 The Effects of on Growth of Beer Yeast

由图 3-7 所示, 当发酵时间在 36~48h 范围内时, 啤酒酵母菌体生长速度较慢, 在 48~60 小时范围内时, 菌体生长迟缓, 并在 60h 时仍增长缓慢, 并在 72h 才达到菌体生物量的最大值。由此得到啤酒酵母在所选定的发酵时间试验范围内的最佳发酵时间为 72h。

(3) 发酵温度对啤酒酵母菌体生长的影响

用表 3-5 中发酵温度对啤酒酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-8 所示。

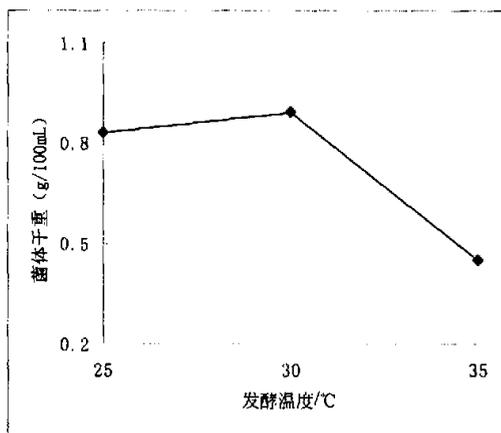


图 3-8 发酵温度对啤酒酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-8 Effects of Temperature on Growth of Beer Yeast

由图 3-8 所示, 发酵温度对发酵结果有较大的影响, 当温度在 25~30℃时, 菌体生物量随温度的升高而增加, 并且当发酵温度为 30℃时, 取得本次试验的菌体生物量的最大值。但随着温度的变化, 当温度高于 30℃时, 菌体生物量随着温度的升高而急剧下降。

综上所述, 可以得出本试验中啤酒酵母最佳发酵条件: 发酵温度为 30℃, 发酵时间为 72 小时, pH 5.0。

3.2.3.3 各因素对热带假丝酵母菌体生长的影响

(1) pH 对热带假丝酵母菌体生长的影响

用表 3-5 中 pH 值对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-9 所示。

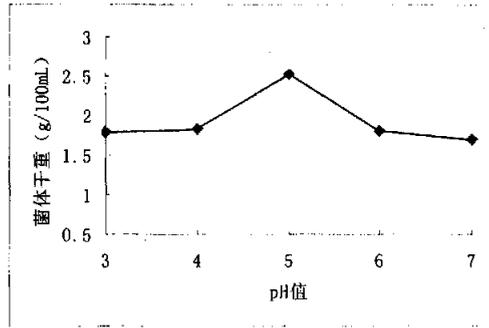


图 3-9 pH 对热带假丝酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-9 The Effects of pH Value on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)*Berkhout*

由图 3-9 所示, 当 pH 3.0~4.0 时, 热带假丝酵母菌体生长速度平稳, 在 pH 4.0~5.0 时, 菌体生物量增长较快, 并在 pH 5.0 时取得最大值, 但随着 pH 的增大, 菌体生物量有所降低, 并在 pH 6.0 时菌体生物量平稳降低, 所以可以得出最适宜热带假丝酵母的 pH 范围是 4.0~6.0, pH 5.0 时菌体生物量最多, 即在初始 pH 4~6 范围时发酵效果较好。这是因为发酵液中的 pH 对酵母发育有很大的影响, 因为 pH 影响到酵母的生理机能, 在酸性培养基中, 水份及其中的营养成分, 容易渗透到细胞原生质内。如酵母在 pH 4.0~4.5 微酸性环境中生长较好。

(2) 发酵时间对热带假丝酵母菌体生长的影响

用表 3-5 中发酵时间对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做图 3-10。

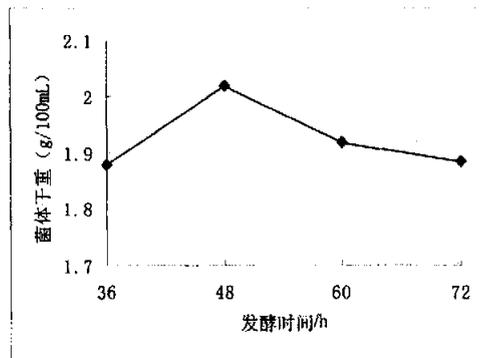


图 3-10 发酵时间对热带假丝酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-10 Effects of Time on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)*Berkhout*

由图 3-10 所示,当发酵时间在 36~48h 范围内时,热带假丝酵母菌体生长速度较为快,并在发酵时间为 48h 时,菌体生物量达到最大值,营养成份被大量消耗,此后随着发酵时间的延长而出现衰退,菌体生物量逐渐下降。

(3) 发酵温度对热带假丝酵母菌体生长的影响

用表 3-5 中发酵温度对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图,如图 3-11 所示。

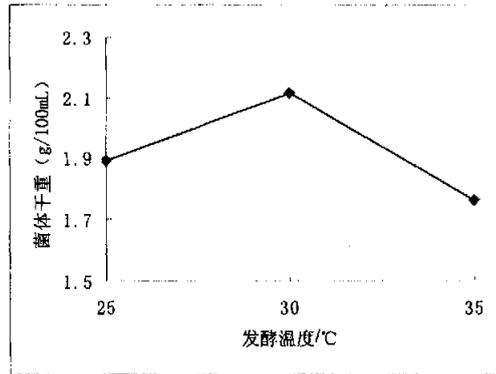


图 3-11 发酵温度对热带假丝酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-11 Effects of Temperature on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-11 所示,发酵温度对发酵结果有非常显著的影响,当温度在 25~30℃ 范围内时,菌体生物量随温度的升高而快速增加,并且在发酵温度为 30℃ 时,达到本试验的菌体生物量的最大值。伴随着温度的变化,当温度高于 30℃ 时,菌体生物量出现了下降趋势,随着温度的升高而急剧降低。这是因为温度对微生物的影响很大,温度不仅决定一种微生物的发育与否,并且决定它是否可能发育。每种微生物的生命活动,都有一定的温度界限,超出这个范围,生命活动就要中断。

综上所述,可以得出本试验中热带假丝酵母最佳发酵条件:发酵温度 30℃,发酵时间 48 小时, pH 5.0。

3.2.3.4 发酵工艺条件的初选结果

通过 pH 值、发酵时间和发酵温度等三个因素对菌体生物量影响的试验与分析,研究了葡萄酒酵母、啤酒酵母和热带假丝酵母利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母

的最佳工艺条件，并对三个因素的交互作用做了正交实验。

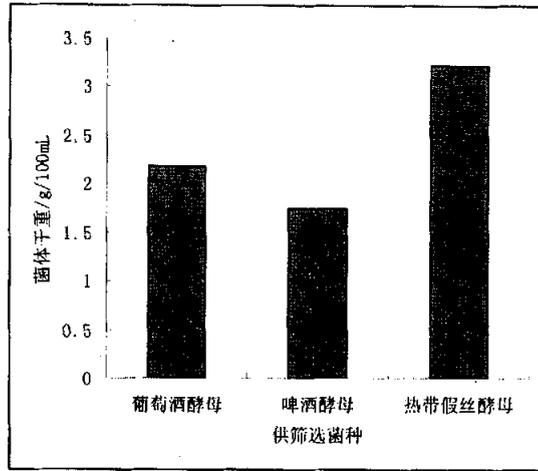


图 3-12 最佳条件下三种酵母菌体生物量的比较

Fig. 3-12 Comparison of Growth of Three Type of Yeast Under the Optimal Condition

由图 3-12 可知，在最佳条件下，热带假丝酵母的菌体生物量显著大于啤酒酵母、葡萄酒酵母的菌体生物量。由此可以得出结论：本实验过程中热带假丝酵母发酵效果最好。从饲料酵母的产量出发，选热带假丝酵母作为本试验研究用菌种。

3.2.4 再现性试验

3.2.4.1 正交实验各因素水平的确定

通过以上试验结果和分析可以得出结论，以热带假丝酵母为发酵菌种，利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母时，发酵温度 30℃，发酵时间 48 小时，pH 5.0 时发酵效果最好，即最佳发酵条件。

本次再现性试验一方面为了检验最佳条件下的发酵效果，另一方面缩小了研究范围，在最佳条件附近取点，以探索更加精确的发酵条件。

试验采用二因素五水平的正交实验，二因素是 pH 值和发酵时间，如表 3-6 所示。采用最佳发酵温度 30℃ 作为本次正交试验的发酵温度。

亚铵法制浆废液的浓度 1.061kg/L，在 250mL 三角摇瓶中装液量为 50mL，接种量为 10%，发酵温度 30℃，每隔 6h 取样，测定热带假丝酵母的菌体生物量。

表 3-6 发酵正交实验因素水平表

水平 因素	1	2	3	4	5
A (pH 值)	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
B (时间/h)	36	42	48	54	60

3.2.4.2 正交实验结果分析

按表 3-6 所示的正交实验条件及所选定的固定条件, 排列正交实验表并将实验所得的结果列于表 3-7 中。从表 3-7 正交实验结果中可以看出, 随着各因素水平的变化, 实验所要考察的各项指标变化均比较大。总体上来看, 当 pH 4.5~5.5 时, 发酵时间为 42~48 小时左右时, 发酵效果较好, 其菌体生物量也相对较高。

表 3-7 正交实验结果

试验号	A (pH 值)	B(时间/h)	菌体干重/g/100mL
1#	1	1	1.984
2#	1	2	2.629
3#	1	3	2.801
4#	1	4	2.958
5#	1	5	2.418
6#	2	1	2.116
7#	2	2	2.831
8#	2	3	3.012
9#	2	4	2.908
10#	2	5	2.131
11#	3	1	2.317
12#	3	2	2.833

13#	3	3	3.220
14#	3	4	2.812
15#	3	5	2.109
16#	4	1	1.998
17#	4	2	2.218
18#	4	3	2.959
19#	4	4	2.198
20#	4	5	1.828
21#	5	1	1.827
22#	5	2	2.008
23#	5	3	2.932
24#	5	4	2.391
25#	5	5	1.835

在得到热带假丝酵母再现性试验的正交实验结果后，对其作极差分析，见表 3—8。

表3—8 正交实验极差分析结果

Table 3-8 Result Analysis of Orthogonal Experiment

热带假丝酵母/g/100mL		
	A(pH 值)	B(发酵温度/°C)
I/5	2.178	2.435
II/5	2.562	2.504
III/5	2.697	2.961
IV/5	2.486	2.653
V/5	2.165	2.434
R	0.532	0.527
优	A ₃	B ₃

主次因素：pH 值> 发酵温度
较优组合：A₃B₃

从表 3—8 中各因素结果产生的极差 R 可知，其影响因素顺序为：pH 值>发酵温度，对热带假丝酵母发酵结果影响最显著的因素是 pH 值，但相差不大。较优组合为 A₃B₃。

3.2.4.3 各因素对菌体生长的影响

(1) pH 对热带假丝酵母菌体生长的影响

用表 3-8 中 pH 值对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-13 所示。

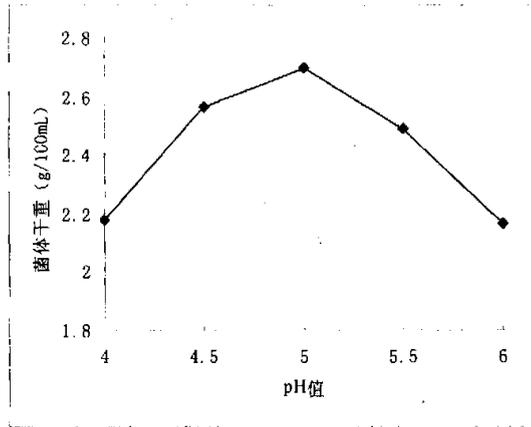


图 3-13 pH 对热带假丝酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-13 Effects of pH Value on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-13 所示, 当 pH 4.0~4.5 时, 热带假丝酵母菌体生长速度, 菌体生物量增长较快, 并且在 pH 5.0 时取得菌体生物量的最大值, 但随着 pH 的增大, 菌体生物量有所降低, 当 pH 值超过 5.0 时菌体生物量有所减少, 所以可以得出最适宜热带假丝酵母发酵的 pH 值范围是 4.0~5.0, 即在初始 pH 4.0~6.0 范围时发酵效果较好, 最佳发酵 pH 5.0。

(2) 发酵时间对菌体生长的影响

用表 3-8 中发酵时间对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-14 所示。

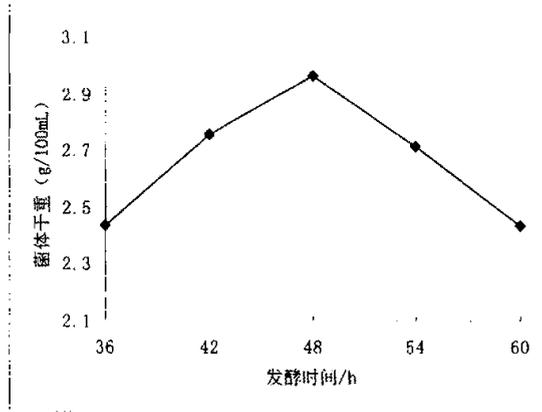


图 3-14 发酵时间对热带假丝酵母菌体生物量的影响

Fig. 3-14 Effects of Time on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-14 所示, 当发酵时间在 36~48h 范围内时, 热带假丝酵母的菌体生长速度较快, 并在发酵时间为 48h 时, 菌体生物量达到最大值, 此后随着发酵时间的增长而出现衰退, 当发酵时间超过 48h 后, 菌体生物量逐渐下降。由此得到的热带假丝酵母的最佳发酵时间为 48h。

3.2.4.4 最佳工艺条件的选定

通过再现性试验, 优化出了以热带假丝酵母为发酵菌种, 利用红麻亚铵法制浆废液发酵的最佳工艺条件。

最佳工艺条件: 发酵废液浓度 1.061kg/L, 在 250mL 三角摇瓶中装液量为 50mL, 接种量 10%, pH 5.0, 发酵时间 48h, 发酵温度 30℃。

在此最佳工艺条件下菌体生物量达到 3.22g/100mL。

3.3 无机盐对发酵的影响

磷是核酸和磷脂的成分, 组成高能磷酸化合物及许多酶的活性基团, 能有效地促进酵母的生长, 对细胞壁的合成具有重要的作用, 还能起到缓冲液的作用。钾也是微生物必需的营养元素。因此改变培养基中的磷酸氢二钾的浓度, 有可能会促进酵母的生长。同样镁离子也是微生物代谢过程的某些酶的激活剂, 影响基质的氧化和蛋白质的合成,

硫也是构成细胞蛋白质的主要成份之一，是含硫氨基酸的组成成份，也是构成一些酶的活性基。本阶段研究的目的，就是找出磷、镁等无机盐的最佳添加量。

3.3.1 正交实验各因素水平的确定

本次试验采用三因素(废液浓度、 KH_2PO_4 添加浓度、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度)三(废液浓度)、四(KH_2PO_4 添加浓度)、五($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度)水平。三因素分别选择废液浓度、 KH_2PO_4 添加浓度、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度。

根据文献对废液浓度以及营养盐添加浓度对菌体生长影响的研究记载^[15]，采用如表3-9所示各因素水平进行正交实验，测定其菌体生物量，以优选出适合于红麻亚铵法废液发酵的废液浓度，以及在不同废液浓度下 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 KH_2PO_4 的最佳添加量。

在250mL三角摇瓶中装液量为50mL，接种量为10%，pH 5.0，发酵时间48h，发酵温度30℃。

表 3-9 发酵正交实验因素水平表
Table 3-9 Factors and Levels of Orthogonal Experiment of Fermentation

因素 \ 水平	水平				
	1	2	3	4	5
A ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g/L}$)	0.1	0.25	0.4	0.55	0.7
B ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{g/L}$)	0.4	0.5	0.6	0.7	
C (废液浓度/kg/L)	1.03	1.06	1.09		

3.3.2 正交实验结果分析

按表3-9所示的正交实验条件及所选定的固定条件，排列正交实验表并将实验所得的结果列于表3-10中。从表3-10正交实验结果中可以看出，随着各因素水平的变化，实验所要考察的各项指标变化均比较大。总体上来看，当废液浓度为1.060kg/L左右， KH_2PO_4 添加浓度为0.5~0.6g/L时， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度为0.25~0.4g/L左右时，

发酵效果较好，其菌体生物量也相对较高。

表 3-10 正交实验结果

Table 3-10 Results of Orthogonal Experiment

试验号	A ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) /g/L	C(废液浓度) /kg/L	B (KH_2PO_4) /g/L	菌体干重 /g/100mL
1#	1	1	1	2.781
2#	1	1	2	2.812
3#	1	1	3	2.952
4#	1	1	4	2.853
5#	1	2	1	3.279
6#	1	2	2	3.309
7#	1	2	3	3.417
8#	1	2	4	3.241
9#	1	3	1	3.022
10#	1	3	2	3.105
11#	1	3	3	3.208
12#	1	3	4	3.162
13#	2	1	1	2.825
14#	2	1	2	2.952
15#	2	1	3	3.084
16#	2	1	3	3.105
17#	2	2	1	3.212
18#	2	2	2	3.272
19#	2	2	3	3.463
20#	2	2	4	3.311
21#	2	3	1	2.905
22#	2	3	2	3.082
23#	2	3	3	3.178
24#	2	3	4	2.805
25#	3	1	1	2.704

26#	3	1	2	2.752
27#	3	1	3	2.862
28#	3	1	4	2.801
29#	3	2	1	3.075
30#	3	2	2	3.124
31#	3	2	3	3.312
32#	3	2	4	3.223
33#	3	3	1	3.003
34#	3	3	2	3.156
35#	3	3	3	3.321
36#	3	3	4	3.122
37#	4	1	1	2.706
38#	4	1	2	2.785
39#	4	1	3	2.902
40#	4	1	4	2.835
41#	4	2	1	3.252
42#	4	2	2	3.319
43#	4	2	3	3.392
44#	4	2	4	3.243
45#	4	3	1	2.205
46#	4	3	2	2.298
47#	4	3	3	2.402
48#	4	3	4	2.354
49#	5	1	1	2.707
50#	5	1	2	2.785
51#	5	1	3	2.898
52#	5	1	4	2.825
53#	5	2	1	3.234
54#	5	2	2	3.326
55#	5	2	3	3.388
56#	5	2	4	3.239

57#	5	3	1	2.206
58#	5	3	2	2.287
59#	5	3	3	2.398
60#	5	3	4	2.325

热带假丝酵母在废液浓度 1.030~1.090kg/L, KH_2PO_4 添加浓度为 0.4~0.7g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度为 0.1~0.7g/L 的发酵条件下进行正交实验, 并对得到的不同浓度废液和不同浓度无机盐添加量条件下菌体发酵的结果, 作极差分析, 详见表 3-11。

表3-11 正交实验极差分析结果

Table 3-11 Result Analysis of Orthogonal Experiment

热带假丝酵母/g/100mL					
A ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g/L}$)		C (废液浓度/kg/L)		B ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{g/L}$)	
I/12	2.981	I/20	2.873	I/15	2.814
II/12	3.163	II/20	3.307	II/15	2.918
III/12	3.038	III/20	2.916	III/15	3.068
IV/12	2.808			IV/15	2.928
V/12	2.712				
R	0.329	R	0.434	R	0.254
优	A_2	优	C_2	优	B_3

主次因素: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g/L} > \text{废液浓度}/\text{kg/L} > \text{KH}_2\text{PO}_4/\text{g/L}$
 较优组合: $A_2 C_2 B_3$

从表 3-11 中各因素结果产生的极差 R 可知, 对发酵结果影响最显著的因素是 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加浓度, 影响大小的顺序为: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加浓度 (g/L) > 废液浓度 (kg/L) > KH_2PO_4 的添加浓度 (g/L), 较优组合为 $A_2 C_2 B_3$ 。

3.3.3 各因素对菌体生长的影响

由正交实验极差分析结果, 作各因素水平趋势图, 并对各因素的影响分析如下。

3.3.3.1 废液浓度对菌体生长的影响

用表 3-11 中废液浓度对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3

-15 所示。

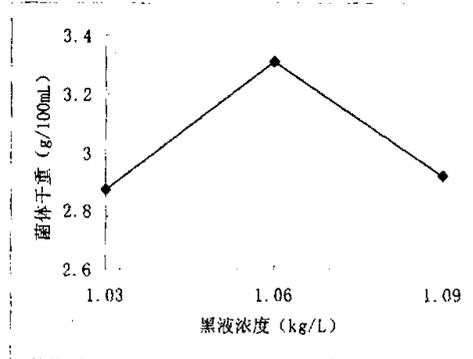


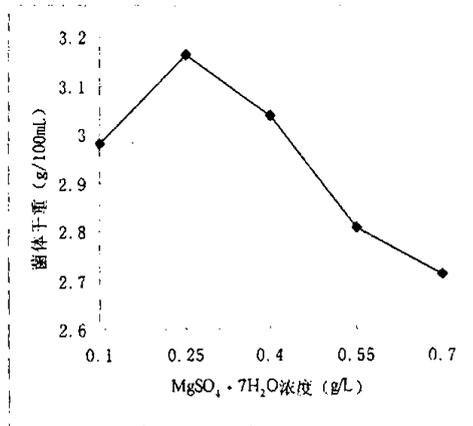
图 3-15 废液浓度对菌体生长的影响

Fig. 3-15 Effects of Ammonium Sulfite Waste liquor concentration on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-15 所示, 在不同废液浓度下分别对菌体生物量做了分析比较, 结果是随着废液浓度的增加, 菌体生物量在废液浓度 1.03~1.060kg/L 范围内随之增多, 并且在废液浓度为 1.060kg/L 时菌体生物量达到最大值。但随着废液浓度的增大, 菌体生物量出现了下降的趋势。当废液浓度超过 1.060kg/L 时, 菌体生物量开始减少。由此可知, 最适宜热带假丝酵母菌体生长的废液浓度为 1.060kg/L 左右。

3.3.3.2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的添加浓度对菌体生长的影响

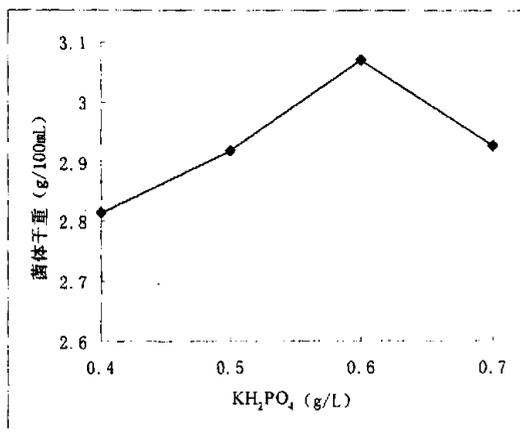
镁离子是微生物代谢过程中某些酶的活性剂。金属离子的激活作用在微生物发酵过程中是一个比较常见的例子, 如 Mg^{2+} 离子对酵母葡萄糖磷酸激酶有激活作用。用表 3-15 中 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的添加浓度对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-16 所示。

图 3-16 MgSO₄ · 7H₂O 浓度对菌体生长的影响Fig. 3-16 Effects of MgSO₄ · 7H₂O Concentration on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-16 所示, 当 MgSO₄ · 7H₂O 的添加浓度在 0.1g/L~0.25g/L 时, 热带假丝酵母在快速生长, 菌体生物量在 MgSO₄ · 7H₂O 的添加浓度为 0.25g/L 时达到最大值。但是菌体生物量并没有随着 MgSO₄ · 7H₂O 的浓度增加而一直保持增长, 而是在 MgSO₄ · 7H₂O 浓度达到 0.25g/L 后出现下降趋势, 即菌体生物量随 MgSO₄ · 7H₂O 浓度增加而有所减少。由此可见, 当 MgSO₄ · 7H₂O 浓度为 0.25g/L 左右时为适宜亚铵法制浆废液发酵的添加浓度。一般地说, 低浓度的盐类(如氯化钠、氯化钾、硫酸镁等)对微生物生长是有益的, 当盐的浓度高时, 则有抑制和杀死微生物的作用, 这主要因为高浓度的盐类会导致细胞脱水, 造成菌体生理上的干燥, 盐类分子量小, 毒性低, 二价阳离子比一价阳离子毒性要大些。

3.3.3.3 KH₂PO₄ 的添加浓度对菌体生长的影响

用表 3-8 中 KH₂PO₄ 的添加浓度对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-17 所示。

图 3-17 KH_2PO_4 浓度对菌体生长的影响Fig. 3-17 Effects of KH_2PO_4 Concentration on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-17 所示, 当 KH_2PO_4 的添加浓度在 0.4g/L~0.6g/L 时, 热带假丝酵母菌体生长速度较快, 并且菌体生物量在 KH_2PO_4 的添加浓度为 0.6g/L 时达到最大值。但是菌体生物量并没有随着 KH_2PO_4 的浓度增加而一直保持增长, 而是在 KH_2PO_4 浓度达到 0.6g/L 后出现下降趋势, 即菌体生物量随 KH_2PO_4 浓度增加而减少。一般来说, 当其盐类浓度太高时, 对微生物生长有抑制作用, 而在较低浓度时能够刺激生长。从以上分析可以得出结论, 当 KH_2PO_4 浓度为 0.6g/L 时菌体生长效果最好, 即 0.6g/L 为其在亚铵法制浆废液发酵试验中的最佳添加浓度。

3.3.4 添加无机盐的实验结果

在 250mL 三角摇瓶中装液量为 50mL, 接种量 10%, pH 5.0, 发酵时间 48h, 发酵温度 30℃, 废液浓度 1.060kg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.25g/L, KH_2PO_4 浓度 0.6g/L, 即为本试验的最佳发酵条件。

3.3.5 再现性实验

3.3.5.1 正交实验各因素水平的确定

本次再现性试验除了检验最佳废液浓度和营养盐添加浓度等条件下的发酵效果外,

还缩小了研究范围，在最佳条件附近取点，以探索更加精确的发酵条件。

本次再现性试验采用二因素五水平的正交实验。二因素分别选择废液浓度和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加浓度，由于根据经验来说^[46]，0.6g/L 是 KH_2PO_4 比较适合的添加浓度，没有再进一步探索更加精确的 KH_2PO_4 的添加浓度，而是选用最佳 KH_2PO_4 添加浓度 0.6g/L 作为本次试验的发酵条件。

采用如表 3-12 所示各因素水平进行正交实验，在 250mL 三角摇瓶中装液量为 50mL，接种量 10%，pH 5.0，发酵温度 30℃，发酵时间 48h， KH_2PO_4 浓度 0.6g/L。

表 3-12 发酵正交实验因素水平表

因素 \ 水平	1	2	3	4	5
	A (废液浓度/kg/L)	1.050	1.055	1.060	1.065
B ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度/g/L)	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35

3.3.5.2 正交实验结果分析

按表 3-12 所示的正交实验条件及所选定的固定条件，排列正交实验表并将实验所得的结果列于表 3-13 中。从表 3-13 正交实验结果中可以看出，随着各因素水平的变化，试验所要研究的各项指标的变化均比较大。

表 3-13 正交实验结果

试验号	A (废液浓度/kg/L)	B ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度 /g/L)	菌体干重 g/100mL
1#	1	1	3.037
2#	1	2	3.158
3#	1	3	3.183
4#	1	4	2.958
5#	1	5	2.768

6#	2	1	3.012
7#	2	2	3.143
8#	2	3	3.362
9#	2	4	3.208
10#	2	5	3.133
11#	3	1	3.268
12#	3	2	3.315
13#	3	3	3.484
14#	3	4	3.154
15#	3	5	3.014
16#	4	1	2.889
17#	4	2	2.958
18#	4	3	3.354
19#	4	4	3.048
20#	4	5	2.953
21#	5	1	2.854
22#	5	2	2.910
23#	5	3	3.215
24#	5	4	2.989
25#	5	5	2.921

热带假丝酵母在废液浓度 1.050~1.070kg/L, KH_2PO_4 添加浓度为 0.6g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度为 0.15~0.35g/L 的发酵条件下进行正交实验, 并对不同浓度废液和不同浓度无机盐添加量条件下的菌体发酵结果作极差分析, 详见表 3-14。

表3-14 正交实验极差分析结果

Table 3-14 Result Analysis of Orthogonal Experiment

热带假丝酵母/g/100mL		
	A (废液浓度/kg/L)	B ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /g/L)
I/5	3.021	3.012
II/5	3.172	3.097
III/5	3.247	3.319
IV/5	3.165	3.071
V/5	2.978	2.958
R	0.269	0.361
优	A ₃	B ₃

主次因素: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /g/L > 废液浓度/kg/L
较优组合: A₃ B₃

从表 3-14 中各因素结果产生的极差 R 可知, 对热带假丝酵母发酵结果影响最显著的因素是 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的添加浓度, 影响发酵因素的顺序是: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L) > 废液浓度 (kg/L), 较优组合为 A₃B₃, 废液浓度 1.060kg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的添加浓度 0.25g/L。

3.3.5.3 各因素对菌体生长的影响

(1) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对菌体生长的影响

用表 3-14 中 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 添加浓度对菌体生长的极差分析结果做图 3-18。

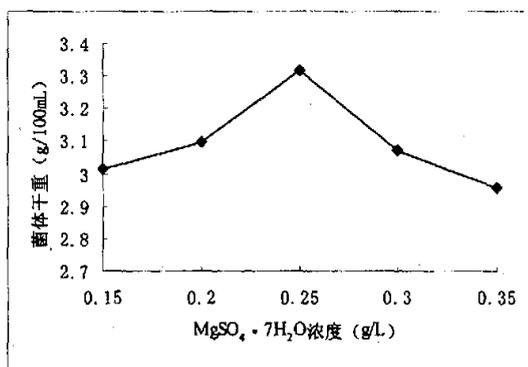


图 3-18 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度对菌体生物量的影响

Fig. 3-18 The Effects of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Concentration on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-18 所示, 当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加浓度在 $0.15\text{g/L} \sim 0.25\text{g/L}$ 时, 热带假丝酵母在快速生长, 并且当菌体生物量在 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加浓度为 0.25g/L 时达到最大值。但是菌体生物量并没有随着 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的浓度增加而一直保持增长, 而是在 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度达到 0.25g/L 后出现下降趋势, 即菌体生物量随 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加而有所减少。由此可见, 利用红麻亚铵法制浆废液进行热带假丝酵母发酵的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 最佳添加浓度为 0.25g/L 。

(2) 废液浓度对菌体生长的影响

用表 3-14 中废液浓度对热带假丝酵母菌体生长的极差分析结果做趋势图, 如图 3-19 所示。

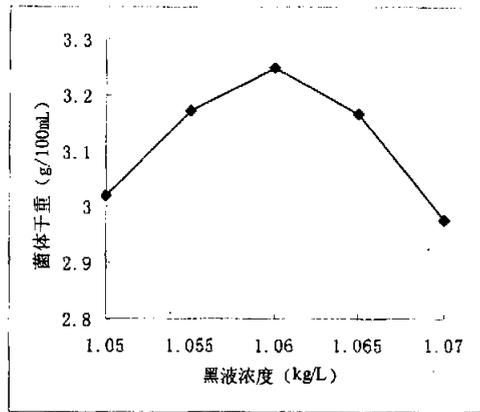


图 3-19 废液浓度对菌体生物量的影响

Fig. 3-19 The Effects of Concentration of Ammonium Sulfite Waste Liquor on Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout

由图 3-19 所示, 在不同废液浓度下分别对菌体生物量做了分析比较, 结果是随着废液浓度的增加, 菌体生物量在废液浓度 $1.050 \sim 1.060\text{kg/L}$ 范围内随之增多, 并且在废液浓度为 1.060kg/L 时菌体生物量达到最大值。但随着废液浓度的增大, 菌体生物量出现了下降的趋势。当废液浓度超过 1.060kg/L 时, 菌体生物量开始减少。由此可知, 最适宜热带假丝酵母利用红麻亚铵法制浆废液发酵的废液浓度为 1.060kg/L 。

3.3.5.4 再现性试验结果讨论

综上所述, 通过再现性试验得到的最佳发酵工艺条件为: 在 250mL 三角摇瓶中装液

量为 50mL，接种量 10%，pH 5.0，发酵时间 48h，发酵温度 30℃，最适宜的废液浓度为 1.060kg/L，最适宜的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 添加浓度为 0.25g/L，最适宜的 KH_2PO_4 添加浓度为 0.6g/L。

在添加无机盐 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 KH_2PO_4 的最佳工艺条件下菌体生物量达到 3.484g/100mL，明显高于未添加无机盐的最佳工艺条件下的菌体生物量 3.220g/100mL，由此可见营养盐的添加对热带假丝酵母利用红麻亚铵法制浆废液发酵具有积极的促进作用，使发酵菌体产量得到提高，得到更好的发酵效果。

3.4 发酵结果营养价值分析

在最优发酵条件下测得红麻亚铵法制浆废液废液和菌体蛋白含量，如表 3-15 所示：

表 3-15 红麻亚铵法制浆废液与菌体蛋白含量

Table 3-15 Content of the Ammonium Sulfite Waste Waste Liquor and Yeast

项目 培养阶段	废液蛋白含量（液体）/% 菌体蛋白含量（固体）/%	
	发酵前	19.34
发酵后	34.84	43.81

由表 3-15 可知，废液粗蛋白含量由发酵前的 19.34% 提高到 34.84%，增加了 15.5 个百分点，营养价值大大提高；发酵产物中菌体中蛋白质的百分含量为：43.81%，可做家畜及家禽的饲料酵母。

将未加废液、添加废液后以及添加无机盐的最佳条件下热带假丝酵母菌体生物量作以比较，如图 3-20 所示。

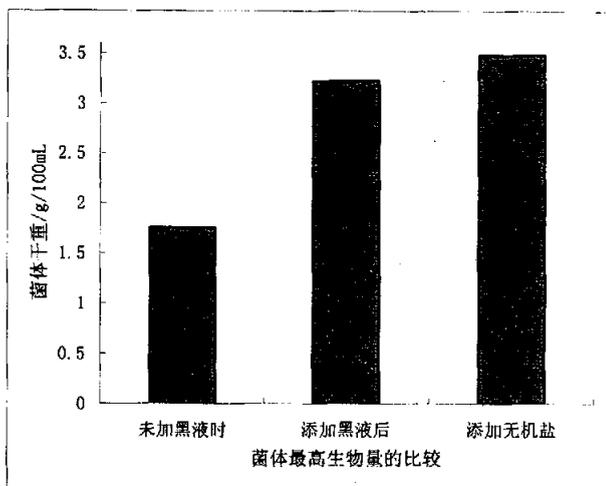


图 3-20 最佳条件下热带假丝酵母菌体生物量的比较

Fig. 3-20 Comparison of Growth of *Candida tropicalis*(Cast.)Berkhout Under the Optimal Condition

由图 3-20 可知,在最佳条件下,未添加废液时的菌体生物量 1.752g/100mL,添加废液时菌体生物量 3.220g/100mL,添加无机盐时菌体生物量达到 3.484g/100mL。添加废液后的菌体生物量高于未添加废液时菌体生物量 45.6%,添加无机盐时菌体生物量高于添加废液却未添加无机盐时菌体生物量 7.6%。由数据可知,添加废液时菌体生物量显著大于未添加废液时的菌体生物量,同时添加无机盐时的菌体生物量要高于添加废液却未添加无机盐时菌体生物量。

由以上分析可以得出结论:本实验过程中添加废液的发酵效果要明显好于未添加废液时的发酵效果,添加无机盐时发酵效果最好。

在最优发酵条件下,饲料酵母产量为 3.484g/100mL,当废液浓度为 1.060kg/L,每生产 1 吨饲料酵母需红麻亚铵法制浆废液量为:

$$\text{所需黑液量 / 吨} = \frac{1 \times 10^5}{3.484} \times 1.060 \times 10^{-3} = 30.42 \text{ 吨}$$

因此,发酵 1 吨饲料酵母需要浓度为 1.060kg/L 的废液 30.42 吨。

第四章 结论

本论文对红麻亚铵法废液发酵过程做了初步的研究,探索了其发酵生产饲料酵母的最佳工艺条件,得出的结论如下:

1. 亚铵法制浆废液的浓度 1.061kg/L, 在 250mL 三角摇瓶中装液量为 50mL, 接种量为 10%, 得到的葡萄酒酵母最佳发酵条件: 发酵温度为 30℃, 发酵时间为 60 小时, pH 4.0。啤酒酵母最佳发酵条件: 发酵温度为 30℃, 发酵时间为 72 小时, pH 5.0。热带假丝酵母最佳发酵条件: 发酵温度 30℃, 发酵时间 48 小时, pH 5.0。
2. 在最佳发酵条件下三种酵母菌体生物量分别为, 葡萄酒酵母 2.175 g/100mL, 啤酒酵母 1.709 g/100mL, 热带假丝酵母 3.220 g/100mL, 热带假丝酵母的菌体生物量较大幅度超出啤酒酵母和葡萄酒酵母的菌体生物量。因此, 把热带假丝酵母作为利用红麻亚铵法制浆废液发酵生产饲料酵母的研究用菌种。
3. 热带假丝酵母在最佳发酵条件下, 最佳废液浓度 1.060kg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 最佳添加浓度为 0.25g/L, KH_2PO_4 的最佳添加浓度为 0.6g/L。
4. 热带假丝酵母在添加无机盐的最佳工艺条件下发酵产物的菌体生物量达到 3.484g/100mL, 明显高于未添加无机盐的最佳工艺条件下的发酵产物的菌体生物量 3.220g/100mL, 由此可见营养盐的添加对热带假丝酵母利用红麻亚铵法制浆废液发酵具有积极的促进作用, 使发酵菌体产量得到提高, 得到更好的发酵效果。
5. 红麻亚铵法废液经热带假丝酵母发酵后, 发酵废液粗蛋白含量由原来的 19.34% 提高到 34.84%, 增加了 15.5 个百分点, 营养价值大大提高, 可做家畜及家禽的饲料蛋白。发酵后菌体蛋白质含量达到 43.81%。因此, 以热带假丝酵母发酵红麻亚铵法废液, 既可以废物利用生产出营养价值较高的饲料蛋白, 又在一定程度上缓解废液给环境带来的污染问题。
6. 在添加无机盐的最佳工艺条件下饲料酵母产量为 3.484g/100mL, 每生产 1 吨饲料酵母需浓度 1.060 kg/L 红麻亚铵法制浆废液 30.42 吨。

参考文献

- [1] 陈国政. 红麻制浆造纸大有可为. 吉林造纸, 1990, 2: 24~25
- [2] 吕晓波. 单细胞蛋白饲料的开发与应用. 黑龙江农业科学, 1995, 6: 38~39
- [3] 于维熙. 从红麻纤维形态看其造纸性能. 纸和造纸, 1991, 6(3): 5~6
- [4] 《亚铵法制浆及其废液的综合利用》编写组编. 亚铵法制浆及其废液的利用. 北京: 轻工业出版社, 1978. 34~35
- [5] Homof V. Elombek B. Journal of Applied polymer Science. 1990, 41(9):2391~2401
- [6] 李淋, 刘秉钺. 稻草亚铵法制浆工艺与制浆废液氧化氨解改性的研究, 大连轻工业学院学报, 2002, 5: 22~23
- [7] H. L. HERGERT. Future of sulfite pulping is tied to integrated mills, market pulp PULP&PAPER, APRIL 1992, 15(3): 93~96
- [8] 罗少初. 尿素法制浆技术的诞生. 天津造纸, 1991, 1: 31~32
- [9] 隆言泉. 制浆造纸工艺(上册). 轻工业出版社, 1980, 170~182
- [10] 《制浆造纸手册》编写组编. 制浆造纸手册. 轻工业出版社, 1986, 129~130
- [11] Weber, Robert, William. Agricultural mulch and row cover. US .Pat, 1992, November17, 24~25
- [12] 贾继文, 孙克君, 等. 亚硫酸铵制浆黑液对土壤性状及白菜产量品质的影响. 农业环境保护[J]. 2001, 20(6): 454~456
- [13] 蒋涛, 王家洪. 亚铵法制浆废液制固体有机复合肥. 北方造纸[J]. 1997, (2): 75~76
- [14] 汪仲熙. 低能耗亚铵法蒸煮制浆与废液回收利用. 浙江造纸[J]. 1996, 2: 44~45
- [15] 汪仲熙. 亚铵法制浆与废液回收制多元素有机肥料. 轻工环保[J] 1996, 19(2): 21~23
- [16] 张德晨, 陈传贵, 张丽. 我国目前单细胞蛋白的生产概况. 饲料资源开发. 2002, 7: 12~13
- [17] J. P. Casey. Pulp and Paper—Chemistry and Technology, 1998, 3(1): 32~36
- [18] 邝仕均, 王菊华, 薛崇昀. 红麻纤维及其造纸基本特性(上). 纸和造纸, 1997, 1: 21~23
- [19] 孙建义, 许梓荣. 利用假丝酵母进行棉仁饼固体发酵的培养基筛选, 浙江农业大学学报, 1998, 24(6): 63~66
- [20] 张莉, 赵子, 孙静. 造纸废液生产单细胞蛋白. 环境导报, 1998, 5: 13~15
- [21] 魏瑶. 单细胞蛋白, 粮油食品. 1998, 3: 41~42
- [22] A. F. Kaldor, et al. Kenaf—a fast growing fiber Source for Papermaking. Tappi J, 1990, 73 (11): 25~27
- [23] A. F. Kaldor, et al. A Strategy for the development of a kenaf—based pulp and paper industry. Tappi J, 1992, 75 (1): 87~88
- [24] 刘全. 猪的矿物饲料. 农家致富, 2003, 2: 23~24
- [25] Ortendo R, Jean L S. Tappi Journal . 1994, 77(3) 234—241
- [26] Banfill P E G. Saunders D C. The relationship between the sorption of organic compounds on cement and the retardation of hydration. Cement and concrete Research. PEG ,

- 1985, 16(3):99~102
- [27] Yoosnf M, Mollsb A, Palitta Pet. Cenment and Concrete Research. Paper Research, 1995, 25(3): 671~682
- [28] Buchholz. Wood chem. Technol. RFJ, 1992, 6 (2): 447~469
- [29] Sarkanen K V. Species variation in lignine . Tappi, 1967, 50 (12) :583~590
- [30] 周治国. 矿物质饲料资源开发前景广阔. 粮食与饲料工业. 1991. 1. 38~39
- [31] G. Beldman, et al. Biotechnol. Bioeng. 1987, 30(5):668-671
- [32] 赵建国, 钟世博, 朱中原. 混种固态发酵大曲酒糟生产蛋白饲料的研究. 粮食与饲料工业, 2001, 7: 25~27
- [33] 丹尼尔. 发酵与酶工艺学. 福州: 福建科学技术出版社, 1983, 980~981
- [34] 天津轻工学院, 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1980, 924~925
- [35] Miller, John. Method for stabilizing aqueous solutions of cationic thermosetting polyamide. Epichlohydrin resins. 1989, 4: 15~17
- [36] Hasegawa, Toshiyuki, Takagishi. Process for producing aqueous solution of cationic thermosetting resin. Paper Making, 1991, 3: 21~22
- [37] 北京大学生物系, 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 1984, 34~35
- [38] 孙玉梅, 董红英. 用啤酒麦糟生产饲料酵母. 辽宁食品发酵, 1995, 7: 31~33
- [39] John. The synthesis of the grafted copolymer of Chitosan. Slagel, 1972, 14~15
- [40] 朱宏伟, 周景辉. 农用环保型麻地膜的试制. 黑龙江造纸, 2002. 4: 3~4
- [41] 无锡轻工业学院, 微生物学. 轻工业出版社, 1983, 81~82
- [42] 北京造纸研究所, 造纸工业化学分析, 轻工业出版社, 1979, 218~219
- [43] 天津轻工业学院, 工业发酵分析, 轻工业出版社, 1984, 24~28
- [44] 无锡轻工业学院, 微生物学, 轻工业出版社, 1983, 80~81
- [45] 曲音波, 亚铵制浆黑液非无菌操作连续发酵生产酵母. 环境科学学报. 1996. 4. 217~218
- [46] 曲音波, 亚铵制浆黑液非无菌操作连续发酵生产酵母. 环境科学学报. 1996. 4. 218~219

致 谢

本论文是在周景辉教授指导下完成的。从选题到审阅，凝聚其大量的心血和汗水，教授深厚的学识底蕴和严谨的治学精神不断地鞭策着我。

在完成论文的过程中，还得到了造纸学科全体教师、生物食品学院部分老师及我的研究生同学们的大力帮助和支持，在此一并表示最衷心的感谢。