



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103642729 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310645592. 8

(22) 申请日 2013. 12. 03

(71) 申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市洪山区李家墩一村一号

(72) 发明人 杨波 胡征 刘志刚

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12R 1/125(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

利用高含盐氨基酸废水发酵生产饲用枯草芽孢杆菌的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用高含盐氨基酸废水发酵生产饲用枯草芽孢杆菌的方法。步骤为：
1. 饲料菌株的驯化培养：通过连续驯化培养的手段，提高菌株对高含盐氨基酸废水的耐受力；
2. 菌株的发酵，在合适的发酵条件下，于发酵罐中通过一定时间的液体通气培养后得到饲用枯草芽孢杆菌菌体。离心收集菌体后于 70℃烘箱内干燥至恒重后称重。经计算每升高含盐氨基酸废水最高可获得 35g 饲用枯草芽孢杆菌菌体。利用本方法，可有效利用废水中含有的氨基酸、微量元素和生长因子，大大降低饲用枯草芽孢杆菌的发酵成本，同时还大为减小了污水处理负荷，达到了综合利用的效果，具有显著的经济与社会效益。

1. 一种利用高盐氨基酸废水发酵生产饲料用枯草芽孢杆菌的方法,其步骤是:

(1) 饲料菌株的连续驯化培养,具体如下:先配制含不同浓度梯度的高含盐氨基酸污水的液体培养基,加 1.5%-2.5% 质量体积比琼脂制成固体培养基;将饲料用枯草芽孢杆菌按常规方法活化后,依次接种到上述不同浓度梯度的固体培养基上进行连续传代培养,培养温度为 15-35℃,逐步提高菌种的耐盐能力;经过两个月的连续培养,最终菌株能在高含盐氨基酸废水占培养基总质量 28-38% 的上述培养基中生长;

(2) 发酵:将步骤(1)驯化的枯草芽孢杆菌菌株按接种量 0.5-5% 接种至以高含盐氨基酸废水为氮源的发酵培养基中,在 15-35℃,转速为 100-300 rpm/min 条件下于发酵罐中进行液体发酵,通气系数为 0.2-0.8,发酵 2 d 后 4000 r/min 离心 10 min 收集菌体后将其置于 70℃ 恒温干燥箱中,干燥至恒重后称重;

所述的高含盐氨基酸废水来自毛发酸法水解生产氨基酸的企业工业生产中产生的废水,全氮含量为 75-150 g/L,氨基酸含量为 150-300 g/L,氯离子含量为 80-180 g/L;

所述的饲料用枯草芽孢杆菌来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心:解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum*) CICC 20037;

所述的含不同浓度梯度的高含盐氨基酸废水的液体培养基,其高含盐氨基酸废水的浓度分别为 125 g/L, 250 g/L, 330 g/L,其他化学基质组分为:碳源:30-90 g/L,磷酸二氢钾:3-15 g/L,酵母粉:0-10 g/L,硫酸镁:0.3-9 g/L,碳酸钙:0-2 g/L,硫酸亚铁:0-4 g/L;培养基 pH 为 7-8;其中,碳源为下述的一种或多种糖类的混合物:葡萄糖;蔗糖;糖蜜;玉米淀粉酶解液;红薯淀粉酶解液或木薯淀粉酶解液;

所述的高含盐氨基酸废水为氮源的发酵培养基,其配方为:高含盐氨基酸污水 125 g/L-330 g/L,碳源:30-90 g/L,磷酸二氢钾:3-15 g/L,酵母粉:0-10 g/L,硫酸镁:0.3-9 g/L,碳酸钙:0-2 g/L,硫酸亚铁:0-4 g/L,培养基 pH 为 6-8;其中,碳源为下述的一种或多种糖类的混合物:葡萄糖;蔗糖;糖蜜;玉米淀粉酶解液;红薯淀粉酶解液或木薯淀粉酶解液。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)的培养温度为 20-35℃,培养基 pH 为 7.2。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)中所述的发酵培养基 pH 为 7.2。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤(2)中的培养温度为 31℃,培养时间为 2 d。

利用高含盐氨基酸废水发酵生产饲料用枯草芽孢杆菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及废水资源的综合利用领域,更具体的说是涉及一种利用高含盐氨基酸废水发酵生产饲料用枯草芽孢杆菌的方法。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织调查,世界上有 70% 的人喝不到安全卫生的饮用水,每天有 2.5 万人死于与污水或恶劣卫生条件相关的疾病;到 2050 年,预计全世界会有大约 70 亿人面临用水短缺。我国有 82% 的人饮用浅井和江河水,其中细菌污染超过卫生标准的占 75%,受到有机物污染的饮水人口约 1.6 亿。其中工业排放的污水是水污染的主要来源。经调查统计,全国每年废水排放量 659.2 亿吨。其中,工业废水排放量 230.9 亿吨,占废水排放总量的 35.0%。实际上,排污水量远远超过这个数,因为许多乡镇企业工业污水排放量难以统计。

[0003] 我国是氨基酸生产大国,大部分生产半胱氨酸的企业采取的生产方法都是毛发酸法水解法,每年产生的高含盐氨基酸废水不仅数量巨大,且污染物浓度高,其 COD 浓度为 50 ~ 80g/L,氨氮浓度为 5 ~ 8g/L,总氮浓度为 120 ~ 150g/L,属典型的高浓度有机、氨氮、高盐分、强酸性废水,处理难度和负担极大,由此造成的环境污染问题已成为制约氨基酸生产行业可持续发展的关键。然而,氨基酸生产中的高浓度废水含又有很多宝贵的资源,如氨基酸、蛋白质等固体物质悬浮物、多种无机盐、有机酸及还原糖等,全氮(N)含量高达 75-150g/L,氨基酸含量高达 150-300g/L。同时该废水中不含难分解的有毒、有害物质。这种含氨基酸废水的大量排放不仅污染了环境还浪费了很多有实用价值的氨基酸。在目前国际经济增幅转缓的大背景下,尝试“节能减排”清洁生产理念将为氨基酸生产企业带来新的机遇,也是发酵工业面临的重大科研课题。

[0004] 目前,对于高含盐氨基酸废水的处理,国内外尚无成熟的可普遍推广的处理工艺。目前所报道的氨基酸废水处理方法主要有电渗析法、超滤法、生化法等,但电渗析和超滤法因投资和运行成本高、维护不便等缺点限制了该方法的推广;而生化法因其投资和运行成本低,技术成熟,不产生二次污染,运行管理方便等优点在有机废水处理中得到世界性的关注。目前这种方法存在的问题是,对中低浓度污水较为合适,但不适合处理高浓度的氨基酸废水。高浓度的氨基酸废水因较高浓度 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和高浓度的盐,会对厌氧及好氧的微生物产生强烈的抑制作用,使生化反应效果较差,处理后的水不易稳定达标排放。若将污水高倍稀释,又大大增加了处理量,同时废水中的优质氨基酸资源都白白浪费掉了。目前也有人采用先对高浓度氨基酸废水进行预处理(浓缩回收其氨基酸成分),然后再用生物技术处理低浓度的混合废水。这种方法是处理氨基酸废水的一种有效方法,既回收了氨基酸,又降低了生物处理的负担。但是整个处理方法上存在浓缩处理过程成本高,耗时费力,资源回收与废水处理相脱节,且有高温蒸发浓缩后有机物容易变质等缺点。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供一种利用高盐氨基酸废水发酵生产饲料用枯草芽孢杆

菌的方法,其工艺简单,成本低廉,将高盐氨基酸废水处理和发酵生产直接结合,免去了一切中间预处理步骤,实现高浓度污水的直接生物利用,在低成本地实现变废为宝的同时还减少了排放,经济效益及社会效益显著。

[0006] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0007] 一种利用高盐氨基酸废水发酵生产饲料用枯草芽孢杆菌的方法,其步骤是:

[0008] (1) 饲料菌株的连续驯化培养,具体如下:先配制含不同浓度梯度的高含盐氨基酸污水的液体培养基,加 1.5%-2.5% (质量体积比) 琼脂制成固体培养基。将饲料用枯草芽孢杆菌按常规方法活化后,依次接种到上述不同浓度梯度的固体培养基上进行连续传代培养(培养温度为 15-35℃),逐步提高菌种的耐盐能力。经过两个月的连续培养,最终菌株能在高含盐氨基酸废水占培养基总质量 28-38% 左右的上述培养基中生长。

[0009] (2) 发酵:将步骤(1) 驯化的枯草芽孢杆菌菌株按接种量 0.5-5% 接种至以高含盐氨基酸废水为氮源的发酵培养基中,在 15-35℃,转速为 100-300rpm/min 条件下于发酵罐中进行液体发酵,通气系数为 0.2-0.8 (每分钟通入发酵液体积 0.2-0.8 倍的过滤空气),发酵 2d 后 4000r/min 离心 10min 收集菌体后将其置于 70℃ 恒温干燥箱中,干燥至恒重后称重。经计算,按此方法每升高含盐氨基酸废水可经生物转化最高可获得 35g 枯草芽孢杆菌菌体。

[0010] 所述的高含盐氨基酸废水来自毛发酸法水解生产氨基酸的企业工业生产中产生的废水,全氮(N) 含量为 75-150g/L,氨基酸含量为 150-300g/L,氯离子含量为 80-180g/L。

[0011] 所述的饲料用枯草芽孢杆菌来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心:解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) CICC20037。

[0012] 所述的含不同浓度梯度的高含盐氨基酸废水的液体培养基,其高含盐氨基酸废水的浓度分别为 125g/L, 250g/L, 330g/L, 其他化学基质组分为:碳源(按葡萄糖计):30-90g/L, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4):3-15g/L, 酵母粉:0-10g/L, 硫酸镁(MgSO_4):0.3-9g/L, 碳酸钙(CaCO_3):0-2g/L, 硫酸亚铁(FeSO_4):0-4g/L。培养基 pH 为 7-8;其中,碳源为下述的一种或多种糖类的混合物:葡萄糖;蔗糖;糖蜜;玉米淀粉酶解液;红薯淀粉酶解液或木薯淀粉酶解液。

[0013] 所述的玉米淀粉酶解液;红薯淀粉酶解液或木薯淀粉酶解液是以常规酶法水解制备而成(或参见:刘亚伟. 玉米淀粉生产及转化技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2003:296.)

[0014] 所述的高含盐氨基酸废水为氮源的发酵培养基,其配方为:高含盐氨基酸污水 125g/L-330g/L, 碳源:30-90g/L, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4):3-15g/L, 酵母粉:0-10g/L, 硫酸镁(MgSO_4):0.3-9g/L, 碳酸钙(CaCO_3):0-2g/L, 硫酸亚铁(FeSO_4):0-4g/L, 培养基 pH 为 6-8;其中,碳源为下述的一种或多种糖类的混合物:葡萄糖;蔗糖;糖蜜;玉米淀粉酶解液;红薯淀粉酶解液或木薯淀粉酶解液。

[0015] 作为优选,步骤(1) 中驯化培养的培养温度为 20-35℃,驯化培养的培养基 pH 为 7.2。

[0016] 作为优选,步骤(2) 中所述的发酵培养基,培养基 pH 为 7.2。

[0017] 作为优选,步骤(2) 中的培养温度为 31℃,培养时间为 2d。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0019] 本发明中的菌株经过连续驯化培养后,能以高浓度高含盐氨基酸废水作为氮源而快速生长,这样就成功地将高含盐氨基酸废水的净化处理和发酵生产直接结合,免去了中间预处理步骤,实现了氨基酸废水的低成本资源化利用,既可以回收大量有用物质,降低发酵生产的成本,同时还减少了污水的排放,具有很强的竞争优势。以武汉某半胱氨酸生产企业为例,其以各种动物毛发为原料生产各种氨基酸,年产生废液约 1 万吨;如废液完全利用,可年发酵生产 350 吨饲料枯草芽孢杆菌,达到 1750 万的年产值,同时还可以减少高 COD 值废水的排放,减轻污水处理装置负荷,生态与经济效益显著。

[0020] 本发明中所得到的耐盐菌株是以传统的饲用枯草芽孢杆菌菌株为出发菌株用传统方法进行驯化培养产生了生理适应性而得到的,没有改变其遗传特征,具有非常好的生物安全性,可直接用于生产。

[0021] 本发明所得的耐盐菌株生活力强,氮源利用效率高,在发酵罐小试规模下,即可达到每升废水原液产出 35g 菌体的生产水平,单从经济上讲就具有很高的应用推广潜力。

[0022] 利用本发明驯化培养的菌株,可将高含盐氨基酸废水处理和发酵生产直接结合,免去了一切中间预处理步骤,实现高浓度污水的直接生物利用,在低成本地实现变废为宝的同时还减少了排放,经济效益及社会效益显著。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例来对本发明进行进一步阐述;但是本发明并不限于这些实施例。

[0024] 以下实施例中使用的微生物,全部为公众可以获得的常规菌种。显然,本领域的技术人员也可以使用其他的假丝酵母菌种来验证本发明的技术方案。所述技术方案,如未特别说明,均为常规技术方案,所用试剂均为本领域常用试剂。

[0025] 实施例 1:饲料用枯草芽孢杆菌菌种的选育。

[0026] 1. 取来自武汉某氨基酸厂,毛发酸法水解生产半胱氨酸后的废液,作为下面所需的高含盐氨基酸废水之用。其成分表如下:

[0027] 表 1 氨基酸废水相关元素含量

[0028]

项目名称	单位	检测结果	方法依据
全氮(N)	%	8.79	GB/T8572-2010
钠(Na)	%	0.52	ICP 法
氯(Cl)	g/L	131.26	Ag Cl 比浊法
铅(Pb)	mg/kg	0.91	ICP 法
砷(As)	mg/kg	0.076	原子荧光法
汞(Hg)	mg/kg	0.014	原子荧光法

铬(Cr)	mg/kg	1.51	ICP 法
镉(Cd)	mg/kg	0.06	ICP 法

[0029] 表 2 氨基酸废水氨基酸成分及含量

[0030]

项目名称	检测结果%
牛磺酸	0.02
天冬氨酸	2.16
苏氨酸	1.58
丝氨酸	3.92
谷氨酸	3.33
甘氨酸	3.18
丙氨酸	1.58
胱氨酸	0.19
缬氨酸	1.50
蛋氨酸	0.10
异亮氨酸	0.56
亮氨酸	0.73
酪氨酸	0.16
苯丙氨酸	1.20
Γ-氨基丁酸	未检出
鸟氨酸	0.03
赖氨酸	0.42
脯氨酸	2.99
组氨酸	0.18

色氨酸	未检出
精氨酸	2.07
羟基脯氨酸	未检出
总和	25.9

[0031]

[0032] 从上表得知,其氨基酸总质量分数达 259g/L,总氮高达 131.26g/L,是典型的高含盐氨基酸废水。

[0033] 2. 配制含高含盐氨基酸废水的液体培养基。分别配制高含盐氨基酸废水浓度为 125g/L, 250g/L, 330g/L (本发明的高含盐氨基酸废水以质量计)不同梯度的液体培养基,其中氨基酸废水为唯一氮源,所述的液体培养基还添加微生物所需的其他化学基质,其组分为:葡萄糖:90g/L, KH_2PO_4 :15g/L, 酵母粉:10g/L, MgSO_4 :9g/L, CaCO_3 :2g/L, FeSO_4 :4g/L, 培养基 pH 为 7.2。并将部分液体培养基加入添加 20g/L 琼脂(按 1000ml 水计算)后转化成固体培养基。

[0034] 3. 将饲料用枯草芽孢杆菌按常规方法分别接入 YEPD 培养基进行活化后,依次接种到含氨基酸废水的浓度分别为 125g/L, 250g/L, 330g/L 的氨基酸废水固体培养基上进行连续传代培养(培养温度为 28℃),达到驯化培养的目的。通过驯化培养,菌株能在高含盐氨基酸废水浓度为 330g/L 的固体培养基上生长。

[0035] 所述的枯草芽孢杆菌购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心:解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) CICC20037。

[0036] 实施例 2:

[0037] 枯草芽孢杆菌在以葡萄糖为碳源、氨基酸废水为氮源的液体培养基中的发酵。

[0038] 1. 配制高含盐氨基酸废水浓度为 200g/L 的液体发酵培养基,其中高含盐氨基酸废水为唯一氮源(其来源、成分与实施例 1 一致),所述的液体发酵培养基还添加微生物所需的其他化学基质,其组分分别为:葡萄糖:50g/L, KH_2PO_4 :9g/L, 酵母粉:6g/L, MgSO_4 :5g/L, CaCO_3 :1.2g/L, FeSO_4 :2.5g/L, 培养基 pH 为 7.2。

[0039] 2. 将从实施例 1 获得的已驯化的枯草芽孢杆菌菌株按 2% 接种量接种至步骤 1 配制的液体发酵培养基中,于发酵罐中在 31℃, 转速为 220rpm/min, 通气系数为 0.5 的条件下液体发酵培养 2d。培养结束后 6000r/min 离心 10min 收集菌体,置于 70℃ 恒温干燥箱中,干燥直至恒重后称重。结果发现,经过换算后,采用上述培养基所进行的发酵,每升废水原液产出 35g 酵母菌体。

[0040] 实施例 3:

[0041] 枯草芽孢杆菌在以玉米淀粉酶解液为碳源、氨基酸废水为氮源的液体培养基中的发酵。

[0042] 1. 配制高含盐氨基酸废水浓度为 200g/L 的液体发酵培养基,其中高含盐氨基酸废水为唯一氮源(其来源、成分与实施例 1 一致),所述的液体发酵培养基还添加微生物所需的其他化学基质,其组分分别为:玉米淀粉酶解液(按照玉米淀粉干重记):50g/L, KH_2PO_4 :

9g/L, 酵母粉 :6g/L, $MgSO_4$:5g/L, $CaCO_3$:1.2g/L, $FeSO_4$:2.5g/L, 培养基 pH 为 7.2。

[0043] 2. 将从实施例 1 获得的已驯化的枯草芽孢杆菌菌株按 5% 接种量接种至步骤 1 配制的液体发酵培养基中, 于发酵罐中在 31℃, 转速为 220rpm/min, 通气系数为 0.5 的条件下液体发酵培养 2d。培养结束后 6000r/min 离心 10min 分别收集菌体, 置于 70℃ 恒温干燥箱中, 干燥直至恒重后称重。结果发现, 经过换算后, 采用上述培养基所进行的发酵, 每升废水原液产出 32g 酵母菌体。

[0044] 所述的玉米淀粉酶解液, 酶法水解的方法参见 :刘亚伟. 玉米淀粉生产及转化技术 [M]. 北京 :化学工业出版社, 2003 :296.

[0045] 尽管对本发明已做出了详细的说明并引证了一些具体实施例, 但是对本领域熟练技术人员来说, 只要不离开本发明的精神和范围可作各种变化或修正是显然的。