



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102212480 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 201110084432. 1

(22) 申请日 2011. 04. 06

(71) 申请人 宁夏大学

地址 750021 宁夏回族自治区银川市西夏区
贺兰山西路 489 号

(72) 发明人 马玉龙 马志强 王敏

(74) 专利代理机构 宁夏专利服务中心 64100

代理人 古玲玉

(51) Int. Cl.

C12N 1/06 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利用四环素药渣的方法,尤其是涉及一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,其特征在于:该方法包括如下步骤:a. 酵母菌种子制备、b. 降解菌种子制备、c. 药渣培养基制备、d. 取步骤 a 制备的酵母菌种子和步骤 b 制备的降解菌种子分别按发酵底物总质量的 1~5% 接种量接入步骤 c 制备的药渣培养基中,经厌氧发酵、酶解、膜滤、浓缩等步骤,可得酵母浸膏;本发明可使四环素生产企业排放的大量废弃药渣得以再利用,延长产业链,提高资源利用率,同时其产品可广泛用于生物发酵、生物工程、生物医药等领域,且工艺简单,成本低廉。

1. 一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,其特征在于:该方法包括如下步骤:

a. 酵母菌种子制备:从啤酒酵母、热带假丝酵母、EM原露保存管中分别挑取一环接入酵母菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为1~5%的接种量接种于酵母菌种子培养基,25~35℃下厌氧培养36~48h,可得生产酵母浸膏的酵母菌种子;

b. 降解菌种子制备:从无丙二酸柠檬酸杆菌保存管中挑取一环接入降解菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为1~5%接种量接种于一级降解菌种子培养基,25~35℃厌氧培养48~72h后,再转接入二级降解菌种子培养基,25~35℃厌氧培养48~72h后,再转接入三级降解菌种子培养基,25~35℃厌氧培养48~72h后,可得降解药渣中残留四环素的降解菌种子;

c. 药渣培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得药渣培养基:四环素药渣8.5~9.5kg,玉米面0.1~0.5kg,酶制剂0.3~0.7kg,(NH₄)₂SO₄ 0.1~0.3kg,适当加水使药渣培养基中水分含量为85~90%;

d. 将上述步骤a制备的酵母菌种子和上述步骤b制备的降解菌种子分别按发酵底物总质量的1~5%接种量接入上述步骤c制备的药渣培养基中,25~35℃厌氧培养20~25d,然后调节pH为6.5~7.0,在55℃水浴中按总液重的0.03%加入酵母抽提酶,水解20~24h,升温到80℃使酶失活,待其冷却后,微滤膜过滤,滤液经减压浓缩控制其水分为30~40%,即为酵母浸膏。

2. 如权利要求1所述的一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,其特征在于:

所述酵母菌复壮培养基,酵母菌种子培养基,降解菌复壮培养基,一级、二级或三级降解菌种子培养基,霉菌复壮培养基,产酶培养基,酶制剂制备方法分别是:

1) 酵母菌复壮培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得酵母菌复壮培养基:蛋白胨10g,酵母浸膏10g,葡萄糖20g,水1000ml;

2) 酵母菌种子培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得酵母菌种子培养基:蛋白胨10g,酵母浸膏5g,葡萄糖5g,水1000ml;

3) 降解菌复壮培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得降解菌复壮培养基:酵母浸膏10g,蛋白胨10g,四环素药渣浸出液1000ml;

4) 一级、二级或三级降解菌种子培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得一级、二级或三级降解菌种子培养基:四环素药渣200g,酵母浸膏10g,蛋白胨20g,葡萄糖20g,水1000ml;

5) 霉菌复壮培养基制备:按下述重量比的原料配制即可得霉菌复壮培养基:取新鲜去皮切碎土豆200g,加1000ml水煮沸20分钟,过滤后滤液用水稀释至1000ml,然后再加入葡萄糖2g即可;

6) 产酶培养基制备:按下述重量比的原料配制即可得产酶培养基:四环素药渣700g,麸皮300g,再适当加水使产酶培养基水分含量为60~65%;

7) 酶制剂制备:将黑曲霉、康宁木霉、绿色木霉分别接入霉菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,分别以5%的接种量接种于产酶培养基,28~35℃好氧培养60~72h后,可得生产酵母浸膏所需的酶制剂。

3. 如权利要求2所述的利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,其特征在于:所述四环素药渣浸出液是按药渣湿重即重量与水即体积的比例为1:1.5配制,其具体步骤为:取四

环素湿药渣 1000g, 加入 1500ml 水, 搅拌均匀后在室温下浸泡 16 ~ 20h, 然后离心, 取滤液再经抽滤弃漂浮的杂质即可。

一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用四环素药渣的方法,尤其是涉及一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法。

背景技术

[0002] 中国是四环素类抗生素生产大国,年产量居世界首位。然而在四环素生产过程中,会产生大量的废弃药渣,这些药渣主要是发酵醪液进行固液分离时形成的菌饼部分,其主要成分是微生物菌丝体、未代谢利用完的有机物、无机盐、少量未分离完的抗生素及其降解产物。长期以来,抗生素药渣多采用简单晾晒或烘干后,作为动物饲料或肥料使用,经济附加值较低。与此同时,药渣中因存在未分离完的抗生素,使其直接作为饲料或肥料使用受到质疑。

[0003] 酵母浸膏是以酵母为原料,利用现代生物技术通过酵母细胞自溶破壁和酵母自身的酶系对酵母细胞质进行水解或以酶制剂进行水解,再经一系列的抽提、浓缩等工序得到的粉状或膏状或液体的产品,营养丰富,富含 18 种以上氨基酸,其中富含谷物中含量不足的赖氨酸、功能性多肽、抗衰老活性因子、膳食纤维和甘露糖,还含有人体不可缺少的核酸、核苷酸和钙,富含 B 族维生素及磷、镁、锰、锌、硒等多种微量元素。酵母浸膏被广泛应用于生物发酵、生物工程、生物医药等领域,具体地说,可广泛用于发酵法生产抗生素、氨基酸、有机酸、酶制剂、生物防腐剂、生物材料、维生素、透明质酸等的培养基配制以及生物工程、生物医药等领域。我国目前生产酵母浸膏的厂家较少,但市场需求量较大。由于酵母浸膏生产原料主要是以小麦等粮食作物为原料,价格偏高,因而造成酵母浸膏的生产成本还处在一个比较高的水平,难以达到实际且实惠的应用。

[0004] 目前还没有一种能利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供一种生产成本低、制备工艺简单独特、使四环素药渣得以高值化利用、有效避免四环素药渣不合理使用对环境造成危害的一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法。

[0006] 本发明通过如下方式实现:

一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,其特征在于:该方法包括如下步骤:

a. 酵母菌种子制备:从啤酒酵母、热带假丝酵母、EM 原露保存管中分别挑取一环接入酵母菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 1~5% 的接种量接种于酵母菌种子培养基,25~35℃ 厌氧培养 36~48h,可得生产酵母浸膏的酵母菌种子;

b. 降解菌种子制备:从无丙二酸柠檬酸杆菌保存管中挑取一环接入降解菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 1~5% 接种量接种于一级降解菌种子培养基,25~35℃ 厌氧培养 48~72h 后,再转接入二级降解菌种子培养基,25~35℃ 厌氧培养 48~72h 后,再转接入三级降解菌种子培养基,25~35℃ 厌氧培养 48~72h 后,可得降解药渣中残留四

环素的降解菌种子；

c. 药渣培养基制备：按下述重量比的原料混合即可得药渣培养基：四环素药渣 8.5~9.5kg, 玉米面 0.1~0.5kg, 酶制剂 0.3~0.7kg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1~0.3kg, 适当加水使药渣培养基中水分含量为 85~90%；

d. 将上述步骤 a 制备的酵母菌种子和上述步骤 b 制备的降解菌种子分别按发酵底物总质量的 1~5% 接种量接入上述步骤 c 制备的药渣培养基中, 25~35℃ 厌氧培养 20~25d, 然后调节 pH 为 6.5~7.0, 在 55℃ 水浴中按总液重的 0.03% 加入酵母抽提酶, 水解 20~24h, 升温到 80℃ 使酶失活, 待其冷却后, 微滤膜过滤, 滤液经减压浓缩控制其水分为 30~40%, 即为酵母浸膏；

所述酵母菌复壮培养基, 酵母菌种子培养基, 降解菌复壮培养基, 一级、二级或三级降解菌种子培养基, 霉菌复壮培养基, 产酶培养基, 酶制剂制备方法分别是：

1) 酵母菌复壮培养基制备：按下述重量比的原料混合即可得酵母菌复壮培养基：蛋白胨 10g, 酵母浸膏 10g, 葡萄糖 20g, 水 1000ml；

2) 酵母菌种子培养基制备：按下述重量比的原料混合即可得酵母菌种子培养基：蛋白胨 10g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 5g, 水 1000ml；

3) 降解菌复壮培养基制备：按下述重量比的原料混合即可得降解菌复壮培养基：酵母浸膏 10g, 蛋白胨 10g, 四环素药渣浸出液 1000ml；

4) 一级、二级或三级降解菌种子培养基制备：按下述重量比的原料混合即可得一级、二级或三级降解菌种子培养基：四环素药渣 200g, 酵母浸膏 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g, 水 1000ml；

5) 霉菌复壮培养基制备：按下述重量比的原料配制即可得霉菌复壮培养基：取新鲜去皮切碎土豆 200g, 加 1000ml 水煮沸 20 分钟, 过滤后滤液用水稀释至 1000ml, 然后再加入葡萄糖 2g 即可；

6) 产酶培养基制备：按下述重量比的原料配制即可得产酶培养基：四环素药渣 700g, 麸皮 300g, 再适当加水使产酶培养基水分含量为 60~65%；

7) 酶制剂制备：将黑曲霉、康宁木霉、绿色木霉分别接入霉菌复壮培养基, 菌株经活化和扩大培养后, 分别以 5% 的接种量接种于产酶培养基, 28~35℃ 好氧培养 60~72h 后, 可得生产酵母浸膏所需的酶制剂；

所述四环素药渣浸出液是按药渣湿重即重量与水即体积的比例为 1:1.5 配制, 其具体步骤为：取四环素湿药渣 1000g, 加入 1500ml 水, 搅拌均匀后在室温下浸泡 16~20h, 然后离心, 取滤液再经抽滤弃漂浮的杂质即可。

[0007] 本发明有如下效果：

1) 蛋白质、氨基酸与核苷酸含量高且种类多：利用本发明提供的方法制得的酵母浸膏具有较高的蛋白质、氨基酸和核苷酸含量, 同时氨基酸种类较多, 不仅适用于生物发酵行业, 而且还适用于生物工程、生物医药等领域。

[0008] 2) 成本低：本发明在原料的选择上主要是以四环素生产过程中产生的废弃药渣为主, 配以少量玉米面、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等为辅料, 不仅来源丰富而且价格低廉。此外, 本发明实现了厌氧发酵工艺条件的优化, 降低了生产酵母浸膏的成本, 增加了投产后的产品竞争力。

[0009] 3) 强调安全性：本发明生产酵母浸膏所使用的发酵原料均不含任何有毒有害物

质,具有安全性和补充营养的特点,对环境无直接或间接的污染作用。

[0010] 4) 本发明针对目前大量四环素药渣治理和再利用现状,以选育优化的啤酒酵母、热带假丝酵母、EM 原露等为酵母浸膏生产菌株,所产生的酵母浸膏中蛋白质、氨基酸与核苷酸含量较高,其中氨基酸种类较多,不仅使四环素废弃药渣得以资源化利用,而且还提高其经济附加值,变废为宝。

[0011] 5) 本发明酵母浸膏中水分含量 30~40%,铵盐含量 3.0~5.0%, pH 6.0~7.5,真蛋白含量 45~55%,氨基酸态氮含量 2.0~3.0%,核苷酸含量 4.0~5.0 μ g/g。

[0012] 6) 采用本发明提供的方法得到的酵母浸膏,可以达到以下指标:

1. 感官指标:棕黄色膏状,有特殊的酵母香味。

[0013] 2. 卫生指标:每千克成品中含:

总菌落,浸膏为阴性。

[0014] 重金属未检出。

[0015] 7) 本发明产品的蛋白氮,氨基酸态氮及核苷酸含量相对稳定,此外,本发明可以有效利用四环素药渣,减少其大量堆放对环境造成的危害。

具体实施方式

[0016] 实施例 1:

一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,该方法包括如下步骤:

a. 酵母菌种子制备:从啤酒酵母、热带假丝酵母、EM 原露保存管中分别挑取一环接入酵母菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 5% 的接种量接种于酵母菌种子培养基, 35 $^{\circ}$ C 下厌氧培养 36h,可得生产酵母浸膏的酵母菌种子;

b. 降解菌种子制备:从无丙二酸柠檬酸杆菌保存管中挑取一环接入降解菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 5% 接种量接种于一级降解菌种子培养基, 35 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48h 后,再转接入二级降解菌种子培养基, 35 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48h 后,再转接入三级降解菌种子培养基, 35 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48h 后,可得降解药渣中残留四环素的降解菌种子;

c. 药渣培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得药渣培养基:四环素药渣 8.5kg,玉米面 0.5kg,酶制剂 0.7kg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3kg,适当加水使药渣培养基中水分含量为 85%;

d. 将上述步骤 a 制备的酵母菌种子和上述步骤 b 制备的降解菌种子分别按发酵底物总质量的 5% 接种量接入上述步骤 c 制备的药渣培养基中, 35 $^{\circ}$ C 厌氧培养 25d,然后调节 pH 为 6.5,在 55 $^{\circ}$ C 水浴中按总液重的 0.03% 加入酵母抽提酶,水解 20h,升温到 80 $^{\circ}$ C 使酶失活,待其冷却后,微滤膜过滤,滤液经减压浓缩控制其水分为 30~40%,即为酵母浸膏。

[0017] 经测定:酵母浸膏中水分含量 37%,铵盐含量 4.9%, pH 6.2,真蛋白含量 48.8%,氨基酸态氮含量 2.1%,核苷酸含量 4.2 μ g/g。经微生物法未检测到酵母浸膏中残留四环素。

[0018] 实施例 2:

一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,该方法包括如下步骤:

a. 酵母菌种子制备:从啤酒酵母、热带假丝酵母、EM 原露保存管中分别挑取一环接入酵母菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 3% 的接种量接种于酵母菌种子培养基, 30 $^{\circ}$ C 下厌氧培养 42h,可得生产酵母浸膏的酵母菌种子;

b. 降解菌种子制备:从无丙二酸柠檬酸杆菌保存管中挑取一环接入降解菌复壮培养

基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 3% 接种量接种于一级降解菌种子培养基, 30℃ 厌氧培养 60h 后,再转接入二级降解菌种子培养基, 30℃ 厌氧培养 60h 后,再转接入三级降解菌种子培养基, 30℃ 厌氧培养 60h 后,可得降解药渣中残留四环素的降解菌种子;

c. 药渣培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得药渣培养基:四环素药渣 9.0kg,玉米面 0.3kg,酶制剂 0.5kg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2kg,适当加水使药渣培养基中水分含量为 88%;

d. 将上述步骤 a 制备的酵母菌种子和上述步骤 b 制备的降解菌种子分别按发酵底物总质量的 3% 接种量接入上述步骤 c 制备的药渣培养基中, 30℃ 厌氧培养 22d,然后调节 pH 为 6.8,在 55℃ 水浴中按总液重的 0.03% 加入酵母抽提酶,水解 22h,升温到 80℃ 使酶失活,待其冷却后,微滤膜过滤,滤液经减压浓缩控制其水分为 30~40%,即为酵母浸膏。

[0019] 经测定:酵母浸膏中水分含量 39%,铵盐含量 4.8%, pH 7.0,真蛋白含量 51.8%,氨基酸态氮含量 2.3%,核苷酸含量 4.2 $\mu\text{g/g}$ 。经微生物法未检测到酵母浸膏中残留四环素。

[0020] 实施例 3:

一种利用四环素药渣生产酵母浸膏的方法,该方法包括如下步骤:

a. 酵母菌种子制备:从啤酒酵母、热带假丝酵母、EM 原露保存管中分别挑取一环接入酵母菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 1% 的接种量接种于酵母菌种子培养基, 25℃ 下厌氧培养 48h,可得生产酵母浸膏的酵母菌种子;

b. 降解菌种子制备:从无丙二酸柠檬酸杆菌保存管中挑取一环接入降解菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,按质量比为 1% 接种量接种于一级降解菌种子培养基, 25℃ 厌氧培养 72h 后,再转接入二级降解菌种子培养基, 25℃ 厌氧培养 72h 后,再转接入三级降解菌种子培养基, 25℃ 厌氧培养 72h 后,可得降解药渣中残留四环素的降解菌种子;

c. 药渣培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得药渣培养基:四环素药渣 9.5kg,玉米面 0.1kg,酶制剂 0.3kg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1kg,适当加水使药渣培养基中水分含量为 90%;

d. 将上述步骤 a 制备的酵母菌种子和上述步骤 b 制备的降解菌种子分别按发酵底物总质量的 1% 接种量接入上述步骤 c 制备的药渣培养基中, 25℃ 厌氧培养 25d,然后调节 pH 为 7.0,在 55℃ 水浴中按总液重的 0.03% 加入酵母抽提酶,水解 24h,升温到 80℃ 使酶失活,待其冷却后,微滤膜过滤,滤液经减压浓缩控制其水分为 30~40%,即为酵母浸膏。

[0021] 经测定:酵母浸膏中水分含量 31%,铵盐含量 3.2%, pH 6.9,真蛋白含量 51.8%,氨基酸态氮含量 2.9%,核苷酸含量 4.7 $\mu\text{g/g}$ 。经微生物法未检测到酵母浸膏中残留四环素。

[0022] 上述酵母菌复壮培养基,酵母菌种子培养基,降解菌复壮培养基,一级、二级或三级降解菌种子培养基,霉菌复壮培养基,产酶培养基,酶制剂制备方法分别是:

1) 酵母菌复壮培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得酵母菌复壮培养基:蛋白胨 10g,酵母浸膏 10g,葡萄糖 20g,水 1000ml。

[0023] 2) 酵母菌种子培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得酵母菌种子培养基:蛋白胨 10g,酵母浸膏 5g,葡萄糖 5g,水 1000ml;

3) 降解菌复壮培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得降解菌复壮培养基:酵母浸膏 10g,蛋白胨 10g,四环素药渣浸出液 1000ml;

4) 一级、二级或三级降解菌种子培养基制备:按下述重量比的原料混合即可得一级、二级或三级降解菌种子培养基:四环素药渣 200g,酵母浸膏 10g,蛋白胨 20g,葡萄糖 20g,水 1000ml;

5) 霉菌复壮培养基制备 :按下述重量比的原料配制即可得霉菌复壮培养基 :取新鲜去皮切碎土豆 200g,加 1000ml 水煮沸 20 分钟,过滤后滤液用水稀释至 1000ml,然后再加入葡萄糖 2g 即可 ;

6) 产酶培养基制备 :按下述重量比的原料配制即可得产酶培养基 :四环素药渣 700g,麸皮 300g,再适当加水使产酶培养基水分含量为 60~65% ;

7) 酶制剂制备 :将黑曲霉、康宁木霉、绿色木霉分别接入霉菌复壮培养基,菌株经活化和扩大培养后,分别以 5% 的接种量接种于产酶培养基,28~35℃ 好氧培养 60~72h 后,可得生产酵母浸膏所需的酶制剂 ;

上述四环素药渣浸出液是按药渣湿重(重量)与水(体积)的比例为 1 :1.5 配制,其具体步骤为 :取四环素湿药渣 1000g,加入 1500ml 水,搅拌均匀后在室温下浸泡 16 ~ 20h,然后离心,取滤液再经抽滤弃漂浮的杂质即可。

[0024] 上述酵母抽提酶是由木瓜蛋白酶和 5' - 磷酸二酯酶复配而成,其中木瓜蛋白酶活力为 900000U/g , 5' - 磷酸二酯酶活力为 120U/g。

[0025] 采用本发明提供的方法得到的酵母浸膏,可以达到以下指标 :

1. 感官指标 :棕黄色膏状,有特殊的酵母香味。

[0026] 2. 卫生指标(每千克成品中含) :

总菌落,浸膏为阴性。

[0027] 重金属未检出。

[0028] 本发明产品的蛋白氮,氨基酸态氮及核苷酸含量相对稳定,此外,本发明可以有效的利用四环素药渣,减少其大量堆放对环境造成的危害。

[0029] 无丙二酸柠檬酸杆菌即 *Citrobacter amalonaticus* NUJF272614 是由申请人从土壤中筛选驯化而得,经 16S rDNA 鉴定为无丙二酸柠檬酸杆菌,在国际 GenBank 上的登录号为 JF272614,目前该菌在宁夏大学微生物保藏中心保藏并存活,其编号为 NUJF272614。

[0030] 酵母浸膏生产中所用菌种是啤酒酵母 : *Saccharomyces Cerevisiae*、热带假丝酵母 : *Candida tropicalis*、EM 原露、无黑曲霉 : *Aspergillus niger*、绿色木霉 : *Trichoderma virid* 和康宁木霉 : *Trichoderma koningii*。