

利用工業廢水木材紙漿廢液…培養 酵母(小球酵母)的研究

國中組生物第二名

彰化縣立國民中學

作 者：黃 美 開 等十六名

指導老師：林 文 政



壹、研究動機：

去年暑假，老師帶我們到市郊郊遊，在鄰近大肚溪，看到台灣化學纖維廠（台化）的一條排水溝裡，每天任其不斷往溪中排入大量的廢水，將使各種水生生物無法生存，進而造成嚴重的水質污染，影響附近居民健康，衛生至鉅。回到學校，白同學問老師可用什麼方法解決此種大量廢水的污染及利用？老師告訴大家：在國外對此種廢液早有回收利用的研究，而我們不但未加利用，反而任其放流於河川或海口附近，直接造成公害，實屬遺憾，又可惜。有鑑於此，我們取台化木材紙漿廠廢液，用物理、化學方

法處理後再經生物方法處理，如此不但可以降低廢液中之 COD（化學氧要求量）以減少公害，又可將廢液轉變成能生產具有價值的單細胞蛋白質資源，實為一舉二得之效。於是我們就地取材利用社會資源，帶回了木材紙漿廢液來培養酵母進行以該種廢液培養酵母生產單細胞蛋白質的實驗。

貳、實驗原理及目的：

酵母菌係單細胞微生物，品種很多其營養體亦即增值體，其構造與一般植物細胞之構造相似，菌體之組成常因養料之供給隨酵母之種類生理等而異，酵母不能利用 CO_2 及 HCO^- 必須攝取有機碳為養料，其中以單醣類之葡萄糖、甘露蜜糖，分解乳糖、果糖最適合，其次為雙醣類之蔗糖、麥芽糖、乳糖、多醣類之澱粉，糊精，纖維素等須先水解為單醣類，方能被酵母利用，五碳醣類可被部分酵母利用。有機氮以蛋白質分解後所生消化蛋白，胺基酸等為酵母之最佳養料，無機氮以銨鹽較易為酵母所利用（如硫酸銨為佳硝酸鹽稍差）無機物主要有磷酸鉀或磷酸銨，可促進酵母緩衝作用及調整 PH 值，鉀能增大酵母細胞，鈣、鎂、鐵能刺激酵母之生活力，因此利用木材紙漿廢液培養酵母需供應氮源，而供給何種氮源才能廉價生產酵母是為主要問題，我們研究本實驗的目的如下：

- (一) 分析木材紙漿廢液中 COD 及亞硫酸含量與經培養酵母後收菌液 COD 含量之比較關係。
- (二) 觀察經不同處理方法之木材紙漿廢液培養基在酸鹼性 PH 值對酵母生長的影響與菌體收成量的關係。
- (三) 觀察處理後木材紙漿廢液培養基添加各種氮源對酵母生長的影響與菌體收成量的關係。
- (四) 觀察經處理後木材紙漿廢液培養基添加無機物（硫酸鎂、磷酸二氫鉀）對酵母生長的影響與菌體收成量的關係。

參、實驗與器材：

- (一) 藥品：硫酸鎂、硝酸鉀、磷酸二氫鉀、硫酸銨、尿素、硝酸銨、葡萄糖、硝酸鈉、氯化鈣、氫氧化鈉、鹽酸、氯化鈉

菸酸，對一胺基苯甲酸，維生素B₁、B₂及B₆、生物素、汎酸，肌醇，高錳酸鉀，硫酸銀，草酸鈉，硫酸。

(二)儀器：燒杯、三角瓶、試管、酒精、本生燈、PH-meter、顯微鏡、離心機、定溫箱、往復式振盪培養器、棉花、高壓蒸氣殺菌器、空氣壓縮機、電動微量天平、廢注射瓶及針濾紙、接種環、光電比色計、電動攪拌器、水浴鍋。

肆、實驗方法：

(一)木材紙漿廢液各種處理方法：

- (1)取廢液400cc分成兩組，其中一組以10%CaO水溶液調整PH=11放置2小時後除去沈澱部分。
- (2)取廢液(300cc)置於500cc三角瓶內煮沸，時間分別為30、50、70、90分鐘等各處理二組，然後以蒸餾水分別補足各處理廢液至原有容量，待冷卻後其中一組分別以10%CaO水溶液調整至PH=11放置2小時後除去沈澱部分。
- (3)取廢液(300cc)置於500cc三角瓶內，以空氣壓縮機通氣，時間分別為30、50、70、90分鐘等各處理二組然後以蒸餾水分別補足各處理廢液至原有容量後，其中一組分別以10%CaO水溶液調整PH=11放置2小時後除去沈澱部分。
- (4)取廢液(300cc)置於500cc三角瓶內煮沸後用空氣壓縮機通氣，時間分別為30、50、70、90分鐘各二組，然後以蒸餾水分別補足各處理廢液至原有容量待冷卻後，其中一組分別以10%CaO水溶液調整PH=11放置2小時後除去沈澱部分。

(二)使用菌種：

據微生物應用工業所載，能利用木材紙漿廢液中所含五碳糖六碳糖之酵母為(小球酵母) *Candida utilis* (*Torula utilis*) 我們所實驗菌種由省立屏東農專分釀的 *Candida utilis* (Henneber) Lodder et Van Rij (*Torula*)。

(三)種菌之培養：

(1) 培養基的配製及培養法：在微量電動天平秤取葡萄糖 20 g 硫酸鎂 0.5 g 磷酸二氫鉀 1 g 氯化鈉 0.1 g 氯化鈣 0.1 g 硫酸銨 5 g 菸酸 0.0004 g 生物素 0.002 g 泼酸 0.0004 g 肌醇 0.002 g，維生素 B₁ 及 B₆ 各 0.0004 g 對一胺基苯甲酸 0.0002 g 維生素 B₂ 0.0002 g 加於 1 公升蒸餾水中經電動攪拌器攪拌溶解後，取 300 cc 添加 2 % 洋菜粉 PH = 5.5 加熱後裝於試管中置於高壓蒸氣機在 1Kg/cm² 120 °C 條件下殺菌 15 分鐘後做成斜面培養基，待冷卻再將收回之小球酵母菌種於無菌箱中移植於斜面培養基上在 30 °C 定溫箱內培養 40 小時，將此培養後，所得斜面培養酵母置於冰箱中（0 ~ 5 °C）保存，以便使用。

(2) 液體通氣培養：將上述培養基以 1N HCl 與 1N NaOH 調整 PH = 5.5 後，裝於廢注射瓶（每瓶裝 400 ml）經高壓蒸氣機 1Kg/cm² 120 °C 條件下殺菌 15 分鐘，於無菌箱內以接種環拈取保存斜面培養基上之小球酵母，再以空氣壓縮機液體通氣培養基，培養順序為昇汞液（0.1%）→ 無菌水 → 酵母培養液直至濃乳白色約 40 小時以光電比色計在波長 660 m μ ，測定其吸光度（1.6）即可接種於殺菌後之紙漿廢液中及紙漿廢液培養基。

四、紙漿廢液培養基之配製：

將(一)之(1)(2)(3)(4)中各種處理之廢液添加硫酸銨 0.5 % 硫酸鎂 0.05 % 磷酸二氫鉀 0.1 % 氯化鈣 0.01 %，食鹽 0.01 % 再以 1N HCl 及 1N NaOH 調整 PH 為 4.5、5、5.5、6、7 等每瓶分裝 40 cc 置於 1Kg/cm² 120 °C 條件下殺菌 15 分鐘等冷卻後再接種小球酵母種菌以決定其生長最適 PH 值。

- (1) 將煮沸後通氣 50 分鐘之廢液配製含氮源濃度為 0.05 %、0.1 %、0.5 %、1 % PH 為 4.5、5、5.5、6、7 之木材紙漿廢液培養基，裝於三角瓶內每瓶 40 cc。
- (2) 將經煮沸後通氣 50 分鐘之廢液配製含無機鹽類，磷酸二氫鉀，硫酸鎂其濃度分別為 0.01 %、0.025 %、0.05 %、

0.1% PH 為 4.5、5、5.5、6、7 之紙漿廢液之培養基，裝於三角瓶內每瓶 40 cc。

(五) 培養法與生長測定法及菌體量之收取法：

- (1) 取經液體通氣培養後酵母，在無菌箱中接種於殺菌後之各種處理廢液中及 PH 與氮源濃度培養基中，每瓶注入 20% (10 cc.) 後置於往復式振盪培養器在 98 次／每分培養，以溫度自動控制器控制溫度為 30 ± 2 °C。
- (2) 經 40 小時後取出，將酵母細胞分散置於洗淨經烘乾的測光管以光電比色計在波長 $660\text{m}\mu$ 下測出其吸光度以表示其生長度。
- (3) 將每瓶經光電比色計測定後之酵母液分置於離心管中以 3000 次／每分離心機經 2 ~ 3 分後取其沉澱菌體於濾紙上過濾，所得酵母菌體於定溫箱中，經烘乾置於天平上稱量之即為每瓶培養後所得酵母菌體量。

(六) 木材紙漿廢液中 COD 之測定法

每次取檢液 10 ml 置於 250 ml 三角瓶中再加蒸餾水至 100 ml，然後添加 10 ml 硫酸（濃硫酸三倍稀釋）及 1 g 硫酸銀再正確添加 $20\text{ml} \frac{N}{40}$ 高錳酸鉀後置於沸騰水浴鍋中加熱 30 分（水浴鍋中之水位應保持高出檢液面）再添加 $20\text{ml} \frac{N}{40}$ 草酸鈉，保持 $60 \sim 80$ °C 間，再以 $\frac{N}{40}$ 高錳酸鉀滴定至淡紅色為終點再依下式算出高錳酸鉀之 P Pm 消耗量。

$$O = (b - a) \times f \times \frac{1000}{V} \times 0.2$$

O : 高錳酸鉀之氧消耗量 (P Pm)

b : 滴定時所耗之全部 $\frac{N}{40}$ 高錳酸鉀 (ml)

$f : \frac{N}{40}$ 高錳酸鉀之力價。

a : 空白試驗所耗用之 $\frac{N}{40}$ 高錳酸鉀 (ml)

V : 檢水 (ml)

(七)木材紙漿廢液中全亞硫酸與游離亞硫酸及結合態亞硫酸之測定法：

(1)全亞硫酸：取檢液 10 ml 添加 1 % 漲粉溶液當指示劑後再

以 $\frac{N}{10}$ 碘溶液滴定至藍色為終點，再依下式算出全亞硫酸之含量：

$$1 \text{ ml } \frac{N}{10} I_2 = 3.2 \times 10^{-3} \text{ g SO}_2 \text{ 設檢液之比重為 1 ,}$$

滴定需要 $\frac{N}{10}$ 碘溶液為 a ml 。

$$\text{則 SO}_2 (\%) = a \times 0.32$$

(2)游離亞硫酸：取檢液 10 ml 添加 1 ~ 2 滴 1 % 酚酞後，再以

$\frac{N}{10}$ 氢氧化鈉滴定至淡紅色保持 1 分鐘不消失程度為終點

再依下式算出游離亞硫酸之含量：

$$1 \text{ ml } \frac{N}{10} Na OH = 3.2 \times 10^{-3} \text{ g SO}_2 \text{ 設檢液之比重為 1}$$

滴定需要 $\frac{N}{10}$ 氢氧化鈉溶液為 a ml 則 $SO_2 (\%) =$

$$a \times 0.32$$

(3)結合態亞硫酸：全亞硫酸含量減去游離亞硫酸含量

(八)連續通氣培養裝置與培養方法：

在室溫時以 10 公升玻璃瓶當作貯存槽（第一槽），槽底側面有洞，以玻璃管接到第二槽（培養槽）蓋上設有流加口，以後均為培養槽，如此即可進行通氣培養，在培養開始前於第一槽

內先添滿廢液培養基 PH = 5.5 另於第二槽添加一公升與第一槽相同組成之培養基後接入 10 % 之種菌，然後開始通氣培養，培養開始之同時將第一槽所貯存之培養基以 2 ml / 每分之流速流加於第二槽培養液中，如此繼續流至第二槽待液面達 1.5 公升之刻度時再以同樣流速流入第三槽，等第三槽中培養液面達至 1.5 公升時再使培養液流入收菌槽中，然後加以離心分離收取菌體。（實驗數據從略）

伍 討論：從略

陸 結論：

生物學是一門實驗且可應用的科學，國中生物學課程的編排即著重由實驗中發現問題，並進一步尋求解答加以應用。科學教育就是藉實驗為手段，以達實際應用的目的，而更重要的，我們需強調的是要培養科學精神及學習科學方法的前提下達成「學以致用」的境界。

大家都知道人類正逐漸面臨四種危機：即(1)能源(2)糧荒(3)公害(4)原料而目前在我國各項經濟建設過程中，謀求糧食的永無匱乏是當前國家最迫切需要解決的一個問題，古云「民以食為天」說起糧食問題，原是一種經濟問題，科技問題，亦屬一種農業、工業的範疇，要解決此一問題，必須尋求蛋白質原料之自給自足，而單細胞蛋白質之工業生產研究實為我國環境可容許下，所有解決方法中最具遠景，最可靠之途徑。

目前本省之紙漿及人造纖維工業相當發達，各工廠所排放廢液，除直接放流河川或沿海附近，而致嚴重污染水源外，並未加以利用至為可惜，在蛋白資源日漸缺乏的今天，如能回收利用此種廢液製造酵母，不但可解決紙漿廠及纖維廠污染水源問題，且可提供廉價之蛋白資源，以減少飼料用蛋白質之進口，如大豆等，而節省大量外匯，在國外已將此種廢液培養酵母開發而應用在食品加工方面（如蛋白質及維生素強化食品，風味強化食品）飼料加工，醫藥方面（如治療白血球症，多發性神經炎，流口沫，口角潰瘍，唇舌炎，皮膚炎，角膜炎）及製造高級調味料。

我們提出衆所周知的酵母，利用木材紙漿廢液培養酵母，僅是開始而已，今後我們想從事更進一步的研究，利用各種農產廢棄物做為醣酵原料，尋找出能促進酵母菌體生長的最經濟和簡易方法，並將培養後之酵母廢水回收來培養黴菌以生產菌體蛋白質和處理酵母廢水，以兼具防治公害之功能，更瞻望未來對農業與工業生產改良方面有所貢獻。

柒、參考資料：

- 1 農業微生物學 魏岳壽、張曙明 P.225 正中書局
- 2 農業微生物學實驗 魏岳壽、張曙明 P.53 正中書局
- 3 紙漿化學與實驗 章惠訓 P.52 正中書局
- 4 微生物應用工業 劉英俊、汪金追 P.92、106 中央圖書出版社
- 5 圖解微生物實驗法 劉英俊、汪金追 P.77 中央圖書出版社
- 6 生物化學實驗 何芳陔、張爲憲、丁一倪 P.40 環球書局
- 7 食品微生物學 林宏一 P.73 德龍出版社
- 8 食品科學 第四卷第一期 P.92、106
- 9 食品工業 第八卷第十一期 P.17 第九卷第四期 P.28
- 10.科學月刊 第七卷第一期 P.27