

固体曲纤维素酶水解糠醛渣及生产酵母的中间试验

北京市日用化学二厂
中国科学院微生物研究所

我们在小试验的基础上^[1],对纤维素酶水解糠醛渣生产酵母进行了中间试验,其结果表明,糠醛渣经纤维素酶水解后的终产物是葡萄糖,酶解液的糖度可稳定在4%以上。用此水解糖作碳源培养酵母,产率可达50—60%(对投糖计),酵母菌蛋白质含量达40—50%,核酸提取量为酵母的4—6%。

纤维素酶的固体培养

一、菌种

木霉菌 3.4290。菌种在土豆、葡萄糖、洋葱斜面,于28℃培养7天,置冰箱中保存备用。

二、种子制备

取10克稻草粉(0.35厘米孔径筛子的筛下物,下同),0.2克硫酸铵,20毫升水,加入500毫升三角瓶内拌匀,1公斤/厘米²蒸汽灭菌30分钟。冷至室温,接入斜面孢子一环,充分拌匀,于28℃培养5天即可使用。

三、制曲

设备:曲房(3×3×4立方米),曲池(110×65×30立方厘米,由水泥和砖砌成)。维持曲房温度28—30℃,湿度90—95%。曲房杀菌用硫磺熏。

曲的培养:取一定量稻草粉,加入硫酸铵水溶液

(硫酸铵用量为稻草粉的2%,加水量为每公斤稻草1.2升)拌匀,自然pH(约6—7)。分装在50×25×5立方厘米的曲盘内,以1公斤/厘米²蒸汽灭菌30分钟,倒入曲池,通风降温至35℃左右,接入1%的三角瓶种子。当中层品温升至32℃时开始通风,至28℃停止通风,培养64小时成曲。

制曲条件的控制:①曲层厚度可控制在14—28厘米,根据实验,这个厚度范围对成曲的酶活力没有影响,但从大生产考虑,用较厚的曲层,利于提高生产效率。②培养基中的含水量应控制在45—62%,不能过高或过低,过高时培养基透气性差,过低时前期生长缓慢。这都会给酶的形成造成不良影响。一般来说,曲层厚度大时,曲的含水量应适当低一些,多数情况下在55%即可,接种量大时,前期生长快,易形成生长优势,可减少杂菌污染,但也要考虑经济效果,避免因接种量过大引起成本提高。③培养温度应控制在28—32℃范围以内,如品温过高,成曲的酶活力就要下降。试验表明,将品温控制在28—32℃,培养64小时,酶活力达到高峰。

曲的酶活力测定:取15克事先用氢氧化钠或氨水调pH至4.5—5的糠醛渣(以玉米芯为原料生产糠醛后的废渣,下同),放进250毫升三角瓶中,再加入5克干曲和0.2%苯甲酸钠水溶液至100毫升,塑料布封瓶口,于50℃温箱中静止酶解两天,过滤。糖液以DNS法测定还原糖^[1],以每克曲水解糠醛渣产生的葡

葡萄糖的克数表示酶活力。

糠醛渣的酶解

按曲：糠醛渣：水=1:3:20 配料，首先将糠醛渣和50—55℃的水放入酶解罐中，以烧碱或浓氨水调 pH 4.5—5，然后加入成曲，搅匀，维持罐温 48—52℃，酶解 48 小时，酶解过程中每 4 小时搅拌一次，并补充蒸发掉的水分。反应终了，酶解液糖浓度达 4% 以上。糖液用 50 厘米直径抽滤罐抽滤，滤渣经水洗后再抽滤，

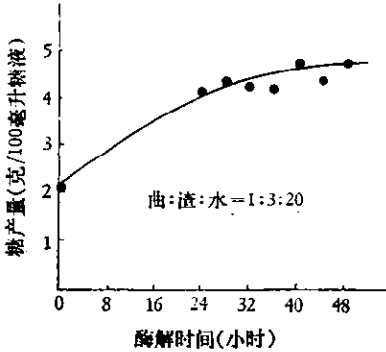


图1 酶解过程中糖浓度变化(小时)

两次所得糖液占原酶解液总量的 85%。

当配料总量中糠醛渣为 30 公斤、曲为 10 公斤、加水至 200 升时，酶解过程中糖浓度的变化如图 1 所示。

酵母的培养

一、菌种

假丝酵母 AS 2.121，热带假丝酵母 AS 2.637，产阮假丝酵母 AS 2.1180。菌种用麦芽汁斜面，28℃ 培养 3 天。

二、培养基配制

糠醛渣酶解液用自来水稀释至糖浓度 1.5%，补

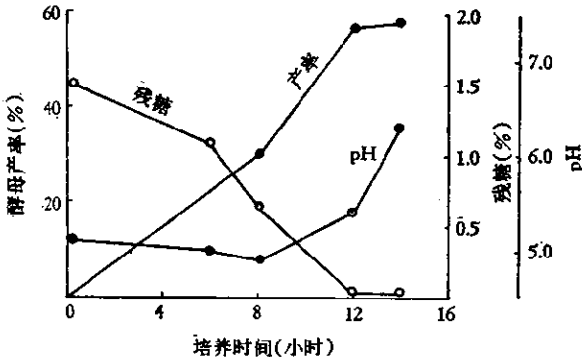


图2 酵母菌 2.121 培养过程中几种指标消长情况

加营养盐，其成份如下：

取上述 1.5% 水解糖液 1000 毫升，加入硫酸铁 1.125 克（为含糖量的 7.5%）、磷酸二氢钾 0.75 克（为含糖量的 5%）、尿素 0.375 克（为含糖量的 2.5%），用 40% 氢氧化钠调 pH 至 5—5.4。

三、摇瓶种子制备

5000 毫升三角瓶，装 750 毫升上述培养液，1 公斤/厘米² 蒸汽灭菌 30 分钟，接种后置回转摇床（200 次/分），振荡培养 24 小时。

四、小罐种子培养

30 升发酵罐装培养基 15 升，0.6 公斤/厘米² 蒸汽灭菌 20 分钟，接入摇瓶种子 750 毫升，维持罐压 0.5 公斤/厘米²，通无菌空气，通气量为 1:1（体积/体积/分），搅拌 220—250 次/分，30±1℃ 保温培养 18 小时。

五、240 升罐扩大培养

240 升发酵罐装培养基 120 升，0.6 公斤/厘米² 蒸汽灭菌 20 分钟，接入上述小罐种子。维持罐压 0.5 公斤/厘米²，搅拌 150—200 次/分，通入无菌空气，通气量为 1:1（体积/体积/分），于 30±1℃ 培养 12—15 小时，培养过程中，用泡敌或豆油消泡（于培养基灭菌前，一次加入）。

酵母培养过程中，酵母产率*、残糖消耗及 pH 的消长情况以酵母 AS 2.121 为例，示如图 2。

六、酵母产率及其蛋白质含量的比较

在 240 升罐扩大培养试验中，比较了假丝酵母 AS 2.121、热带假丝酵母 AS 2.637、产阮假丝酵母 AS 2.1180 的实际产率，结果如表 1 所示。由表 1 看出三株酵母的产率均在 50% 左右。2.121 号菌和 2.637 号菌的平均产率分别达到 59.2% 和 62.6%。

试验过程中还对三株酵母的蛋白质含量作了分析比较。由表 2 看出：用氨水作糠醛渣的中和剂时，三

表1 三株酵母在 240 升罐扩大培养时的产率(%)

产率 %	试验批次	1	2	3	4	平均
菌号						
2.121		49.9	66.8	62.4	57.6	59.2
2.637		69.4	67.0	58.5	55.6	62.6
2.1180		50.4	49.4	59.0	48.2	51.8

培养液酵母干重—
* 酵母产率 = $\frac{\text{培养液接种后干重} - \text{接种前干重}}{\text{接种后培养液含糖量}}$
× 100%。

本试验计算产率时，均系取 50 毫升培养液。

株酵母的蛋白质含量均达 45% 以上, 尤其 2.637 和 2.1180 菌株的蛋白质含量高达 55% 左右。

表 2 三株酵母的蛋白质含量

菌 号	糠 醛 渣 中 和 物	蛋 白 质 含 量 (%)		
		第 一 次	第 二 次	平 均
2.121	氢氧化钠	37.50	36.81	37.16
2.637	氢氧化钠	39.13	36.77	37.95
2.1180	氢氧化钠	47.30	47.66	47.48
2.121	氨 水	46.43	47.43	46.93
2.637	氨 水	53.23	55.87	54.55
2.1180	氨 水	57.03	58.43	57.73

注: 酵母菌体经洗涤, 烘干后磨碎。将 80℃ 烘干的粉末用微量凯氏定氮法测定菌体蛋白质含量。

七、酵母菌体核酸的抽提

根据试验分析, 这三株酵母经 240 升罐扩大培养所得菌体核酸含量均在 10% 以上, 似比啤酒酵母核酸

含量还高。为了提高酵母的应用价值, 降低作为饲料酵母的成本, 可考虑先提取核酸, 然后再用作饲料。

我们将培养物离心洗涤后, 用盐法^[1]提取核酸, 其得率见表 3。

表 3 三种酵母菌体核酸提取量

菌 号	核 酸 含 量 (%)	
	提 取 4 小 时	提 取 8 小 时
2.121	2.86	4.11
2.637	3.10	5.90
2.1180	2.50	4.64

参 考 资 料

- [1] 北京市日用化学二厂、中国科学院微生物所: 微生物学报, 17 (2), 1977。
- [2] 广东省江门甘蔗化工厂: 微生物在医药工业的应用, 52—60 页, 中国工业出版社, 1971。