

纤维素酶水解蔗髓及生产饲料酵母的放大试验

中国科学院成都生物研究所纤维素酶组

四川省资阳糖厂

近几年来,利用纤维素酶水解废纤维素生产单细胞蛋白的研究,引起了许多国家的重视。我们在小型试验的基础上,进行了放大试验。试验的规模为酶解2,000立升罐,培养酵母1,000立升罐。对通风制曲、蔗髓的预处理和酶解及酵母的培养等工艺条件进行了试验,取得了通风曲CMC酶活稳定在120毫克/毫升以上,蔗髓得糖率48—49%,酵母产率(对投糖计)70%左右的效果。该工艺基本稳定,设备简单。酵母成品蛋白质含量45%,必需氨基酸齐全,安全性和经济成本基本过关。

纤维素酶曲的生产

一、菌种与培养

(一) 菌种

绿色木霉4030:由西北水土保持生物土壤研究所提供。

(二) 培养

1. 一级斜面种子

培养基成分为:蔗渣纸浆4克、硫酸铵2克、硝酸钠0.3克、硫酸镁0.05克、磷酸二氢钾0.1克、琼脂2克、1:10麸皮水浸出液100毫升。28—30℃培养4天。

2. 二级饭盒种子

培养基成分为:蔗髓400克、麸皮1,600克、水2,400毫升,自然pH。料拌匀后分装于饭盒,每个饭盒约装料100克。28—30℃培养3天。

二、通风曲的制作

1. 设备:水泥曲池,容积为200×96×46厘米³。曲房温度和湿度用蒸汽散热器控制。杀

菌用硫磺熏。

2. 配料:风干蔗髓42公斤,麸皮18公斤,硫酸铵1.2公斤,过磷酸钙0.6公斤,水120公斤,自然pH。

3. 培养:将上述原料拌匀后,装入蒸锅,常压灭菌,凉至32—34℃接种二级种子,接种量3%,拌匀后倒入曲池进行培养。曲层的厚度可控制在30—35厘米,根据试验,不影响酶的产生。培养基的水分宜在66—69%,即为原料的二倍水。培养温度以28℃为宜。通风的控制依据以品温为准,32℃鼓风,28℃停风。相对湿度在90%以上,曲料结饼后应适当降低至85%左右。最适pH为5。在培养过程中,pH的变化近于V形,当下降至最低再回升时,酶活力随pH上升而上升,当pH趋于平衡(5左右)则酶活力也趋于达到顶峰。培养至产酶的高峰期(60—65小时)即可出曲。

成曲的CMC酶活、滤纸糖酶活、滤纸崩潰酶活和测定方法可参见参考文献[1]。

蔗髓的酶解

一、蔗髓的预处理

称一定量蔗髓(按绝干计100公斤)于2,000立升容积的蒸球内,加水800立升,烧碱8公斤。拌匀后,通蒸汽蒸煮。蒸汽进汽压力2公斤/厘米²,半小时后排汽,再以1公斤/厘米²压力蒸煮10分钟后,第二次排汽。然后控制进汽压力,使球内温度保持在120℃,处理1小时。

经过碱预处理后,蔗髓木质素由18%下降到8%,并降低了纤维素的结晶度和聚合度,从而增加了纤维素对酶的敏感性。

二、酶解

将预处理后的蔗髓加水至 1,600—1,800 立升左右,用硫酸调 pH 至 5 左右,再根据酶活力高低,加入纤维素酶曲 21—25 公斤(以绝干计),泵入酶解罐进行酶解。

在酶解过程中加入 1 支 40 万单位青霉素。罐内温度控制在前 8 小时 45℃,中间 8 小时 48℃,后 8 小时 50℃。160 转/分搅拌,酶解 24 小时后,升温至 60—70℃ 中止酶的反应。用普通离心机(1,200 转/分)分离酶解液,其收率约 70%。在酶解过程中每 4 小时取样,按 DNS 法测还原糖,依此计算蔗髓得糖率和全纤维素转糖率。

三、结果

经多次反复试验表明,在上述条件下蔗髓得糖率可稳定在 48—49%,全纤维素转糖率为 68% 左右,结果见表 1。在我们的试验条件下,用曲量增加到 32%,得糖率还可达到 56%。如用曲量降至 17%,得糖率则仅 39% 左右。

表 1 试验生产蔗髓酶解得糖效果

试验批次	用曲量(%)	C _x 酶用量		得糖率(%)	全纤维素转糖率(%)
		CMC酶活(毫克/毫升)	C _x 总单位(万)		
1	25.0	132.5	3,074	48.74	68.1
2	21.0	160.0	3,232	48.80	68.2
3	24.0	145.5	3,500	48.23	67.4
4	23.8	146.8	3,500	49.91	69.7
平均	23.5	146.2	3,327	48.92	68.35

试验还表明,在 24 小时酶解过程中,前 4 小时糖浓度上升很快,并观察到前 2—4 小时,浓稠的醪液很快液化变稀,其水解速率呈现为

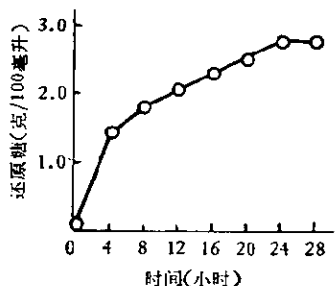


图 1 酶解过程中糖浓度的变化

Michaelis-Menten 衰减曲线^[2]。其糖浓度变化如图 1 所示。

酵母的培养

一、菌种与培养

(一) 菌种

1254 热带假丝酵母(*Mycelial-Type*)由江西食品发酵研究所提供。其斜面菌种培养基为麦芽汁或米曲汁,30℃ 培养 2 天。

(二) 培养

1. 二级、三级摇瓶种子:培养基及培养方法参见文献[1]。

2. 卡氏罐种子:培养基成分同 1,但不加硫酸镁。卡氏罐装量 4,500 毫升,接种量 10%,30℃ 通气培养 16—18 小时。

3. 种子罐菌种:培养基成分(%):蔗髓酶解糖 1,硫酸铵 0.2,尿素 0.3,过磷酸钙 1.5,pH 5.5。100 立升罐装量 80 升,灭菌。接种量 10%,30℃,搅拌通气(风量为 15 米³/小时),培养 12 小时。

二、1,000 立升罐酵母的连续培养

采用单段非循环型连续方式进行连续培养。连续培养的理论早有阐述^[3],为维持连续培养系统的稳定性,用不同的稀释率和不同的流加糖浓度进行试验。在培养过程中每小时取样测定

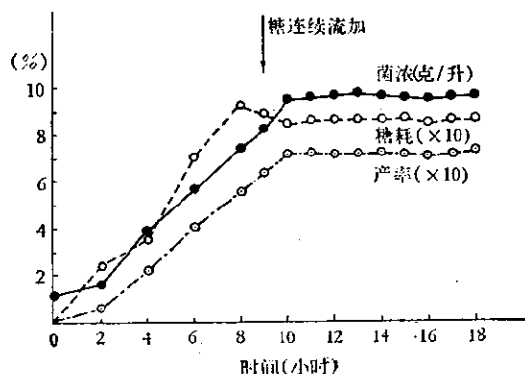


图 2 1254 酵母的连续培养

注:稀释率 $D=0.15/\text{小时}$,流加糖浓度 $S_i=1.35\%$,初糖浓度 $S_0=1.08\%$, $\mu=0.255/\text{小时}$

菌体浓度和残糖。

经多次试验表明,在连续培养中采取稀释率略小于 μ (0.15—0.2/小时),流加糖浓略高于初糖浓度(1.35—1.55%)的工艺条件是较为合适的。当稀释率 $D = 0.15/\text{小时}$,流加糖浓 $S_r = 1.35\%$ 时的结果如图2所示。

三、酵母的分离与干燥

800立升酵母醪,加40克左右工业氯化钙,并加碱调整pH至9—10,此时形成大块絮状物,即可离心,其损失量约10%。

分离出的酵母泥,于60—70℃烘干,粉碎即为成品。

酵母成品的营养成分 和成本估计

一、营养成分

按饲料分析规定的方法测定酵母粉的成分(%)：粗蛋白45.3,粗脂肪9.49,无氮浸出物25.36,粗纤维5.86,灰分13.99。

用KLA-5型氨基酸分析仪测定成品酵母粉必需氨基酸含量(%)：苏氨酸1.01,赖氨酸1.94,缬氨酸1.28,蛋氨酸0.30,苯丙氨酸1.19,

亮氨酸1.31,异亮氨酸0.73,色氨酸在样品酸水解时,全部被破坏。

同时还将该酵母菌体进行小白鼠急性和亚急性中毒试验及猪只喂饲试验,结果均无异常。经有关部门检验,重金属(砷、铅)、黄曲霉毒素 B_1 、3,4-苯并芘的含量均符合规定的准则。

二、成本估计

试验结果表明,五吨蔗髓可生产1吨干酵母粉。将该试验规模扩大,对原辅料、水、电气、人工管理、设备消磨维修等进行预算,其干酵母粉的生产成本大约为1.10元/公斤。

该酵母还可大搞综合利用。CoA的提取率与啤酒酵母的提取率接近。这样,成本还可大大下降。

目前,我们的试验规模还不小,酶解糖浓度也较低;辅助原料用量较大,酵母连续培养时间尚短,这些都有待进一步进行试验。

参 考 文 献

- [1] 四川生物所纤维素酶组:遗传学报,2(2):157—163,1975。
- [2] 雨村明倫、照井堯造:発酵工学雑誌,43(5):275—285,1965。
- [3] 七字三郎:微生物工学の応用,共立出版株式会社,东京,1972。