

利用酿造糟渣制备饲用复合酶制剂

白玉明 段洁* 褚西宁

(山西大学生命科学系, 太原 030006)

摘要 采用多菌种固态发酵酱油渣、醋糟制备饲用复合酶制剂。所用菌种为木霉、扣囊拟内孢霉和丝孢酵母, 培养料配比为酱油渣: 醋糟: 麦麸: 玉米面 = 6: 2: 2: 1。按所选各项条件曲盘培养 42h 后, 物料收率为 82% 左右, 蛋白含量 24.5% 左右; 每克干物质中含有纤维素酶活 2750u, 糖化酶活 1800u, 蛋白酶活 1100u 和 3.5×10^9 个细胞。

关键词 酱油渣, 醋糟, 多菌种固态发酵, 复合酶制剂

微生物在饲料业中的主要用途是生产菌体饲料蛋白或饲用酶制剂。利用加工和酿造糟渣料制备饲料蛋白的报道甚多^[1~4], 但用来制备酶制剂的报道尚少^[5]。我们在利用木霉与酵母菌混合发酵酱油渣、醋糟制备饲料蛋白的试验中发现, 发酵产物中有着较高的酶活性, 这些酶有助于动物消化吸收, 可提高饲料利用率, 为此对这一问题进行了较深入的探讨, 现将初步试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种及其培养方法

1.1.1 菌种: No.1 木霉 (*Trichoderma* sp.), No.2 扣囊拟内孢霉 (*Endomycopsis fibuligera* AS 2.1145), No.3 丝孢酵母 (*Thichospron cuteneum* 2057)。

1.1.2 斜面菌种: GPY 培养基(%): 葡萄糖 1, 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.25, 琼脂 2。自然 pH, 1×10^5 Pa, 30min 灭菌, 28~30℃ 培养 48h。

1.1.3 液体菌种: 液体培养基: GPY 去琼脂。按照 50ml / 250ml 三角瓶分装, 1×10^5 Pa, 30min 灭菌, 每瓶接斜面菌一环, 28~30℃, 往复式摇床 110~120r / min 培养 48h。3 个菌种分别培养后按 No.1 : No.2 : No.3 = 2 : 1.5 : 1.5 (ml / 瓶) 接种发酵瓶。

1.1.4 固体菌种: 麦麸培养基 (BS): 将麦麸中加入等量水拌匀, 自然 pH, 按 10g 湿料

/ 250ml 三角瓶分装, 1×10^5 Pa, 30min 灭菌, 接入斜面菌种, 28~30℃ 培养 48h。3 个菌种等量混合接种发酵料。

1.2 发酵料 (SVD) 组成

酱油渣 60%, 醋糟 20%, 麦麸 10%, 玉米面 10%。加水量为干料: 水 = 1: 0.9 或 1: 1.1。适量添加 NaCl、 K_2HPO_4 、 $(NH_4)_2SO_4$ 和 $MgSO_4$ 等无机营养盐。酱油渣、醋糟取自太原酿造厂当日新料, 80℃ 24h 烘干备用或直接将湿料适度挤压去水后折干计重使用。

1.3 发酵培养方法

三角瓶培养: 除另有说明外一般采用 250ml 三角瓶, 每瓶装入 20g 湿料, 1×10^5 Pa, 30min 灭菌, 无菌培养。每样点设 3 重复。

曲盘培养: 配料后先以 1×10^5 Pa, 30min 或者 100℃, 60min 常压灭菌, 置于干净曲盘中凉至不烫手时将菌种接入并搅匀, 28~30℃ 敞口开放培养。每次投料 1kg 以上, 重复培养, 重复取样。

1.4 分析测定方法

生物量: 用血球计数板显微镜直接计数, 以每 g 干物质中的细胞总数为生物量指标。

总糖: 用 HCl 水解后蒽酮比色测定^[6]。

还原糖: 用 DNS 比色测定^[7]。

* 本系微生物学专业 95 届毕业生
1995-09-04 收稿

纤维素酶活: 参照文献[8]测定。酶活单位定义: 以 CMC 为底物, 在 pH4.6 醋酸缓冲液中 50℃ 条件下, 每 g 干物质中每 min 产生 1 μ g 葡萄糖的酶量。

糖化酶活: 按文献[7]方法测定。

蛋白酶活: 按文献[8]方法测定。

蛋白质含量: 用凯氏定氮法^[9]。蛋白含量按(总氮含量-氨氮含量)×6.25 计算。

2 结果与讨论

2.1 供试菌的产酶水平

将液体菌种和固体菌种分别接种于 BS 中, 经 48h 培养后 3 个供试菌株两种酶的产酶水平均以固体菌种为高(表 1), 故进一步试验均采用固体菌种接种。

表 1 液体和固体菌种接种 BS 后
两种酶的产酶水平比较

菌种	糖化酶(u/g)	纤维素酶(u/g)
No.1	液体 184.3	1555.4
	固体 432.9	3456.0
No.2	液体 439.5	449.5
	固体 1570.7	593.3
No.3	液体 487.5	449.5
	固体 1555.2	995.3

固体菌种接种量 10%, 除另有说明外, 后同

2.2 不同发酵基质对产酶活性的影响

将 3 个供试菌的固体菌种分别接种 BS 和 SVD, 三角瓶培养 48h 后的酶活测定结果表明, 3 个菌株在 SVD 中的酶活均高于 BS(表 2)。

表 2 供试菌株在 BS 和 SVD 中的酶活比较

菌株	培养基	糖化酶(u/g)	纤维素酶(u/g)
No.1	BS	432.9	3458.0
	SVD	696.9	3468.0
No.2	BS	1564.8	600.5
	SVD	1959.9	1162.1
No.3	BS	1500.8	986.8
	SVD	2271.0	1166.0

2.3 接种量、通气量、pH 和灭菌条件对混合发酵产酶的影响

将 3 个供试菌的固体菌种等量混合接种 SVD, 采用三角瓶培养和 $L_9(3^4)$ 正交设计^[10]对上述 4 个因素(表 3)的试验结果表明, 把两种酶活测定值相加按 4 个因素的 3 个位级统计分析后, 各因素的极值依次为 2791.5, 778.1, 1651.2 和 6212.8, 4 个因素对发酵结果影响大小的排列次序为: $D > A > C > B$ 。对该 3 菌株混合发酵系统上述 4 个因素的最佳条件组合应为 A_3, B_3, C_1 和 D_3 。但 B_2 和 B_3 两个位级的值分别为 10237.3 和 10467.3, 彼此间并无明显差异, 且 B 因素的影响又最小, 为方便起见, 我们以接种量 10%, 通气量适中(20g 湿料/250ml 三角瓶), 自然 pH(5.0)和 1×10^5 Pa, 30min 灭菌作为进一步试验的条件。此外, D 因素的影响虽最为显著, 其差异主要存在于不灭菌和灭菌之间, 就 D_2, D_3 两个位级亦即 100℃, 60min 和 1×10^5 Pa, 30min 两种灭菌方法而言, 位级值分别为 12047.9 和 12279.4, 彼此之间也无明显差异。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与位级选择

位级	A. 接种量 (%)	B. 通气量 (g/ml)	C. pH	D. 灭菌条件
1	5.0	20/150	5.0	不灭菌
2	8.0	20/250	4.2	100℃, 60min
3	10.0	20/500	5.5	1×10^5 Pa, 30min

2.4 发酵过程的动态分析

为揭示发酵全过程中各个因素之间的动态变化和相互关系及选择最佳发酵周期, 按前面选定的各项条件, 一次配料接种进行三角瓶培养, 定时随机重复取样进行了分析测定。结果表明(图 1), 随着发酵进行, 总糖含量及物料收率下降, 生物量和酶活上升。物料收率呈平稳下降趋势; 总糖消耗速率则变化较大, 在 4~24h 之间显著大于物料收率下降的速率, 说明所消耗的总糖除有一些被作为能源物质而彻底氧化外, 大部分转变为

中间代谢产物用于菌体合成作用;在 36~40h 以后两条曲线基本趋于平行,标志着所耗总糖基本全部用于供能而彻底氧化。细胞总数在 0~42h 之间呈逐步上升趋势,42h 后突然呈现出爆发式上升趋势。糖化酶活从 8h 起迅速增长,至 36h 左右达到酶活峰值;纤维素酶活从 18h 起才快速增高,至 48h 基本达到酶活峰值。

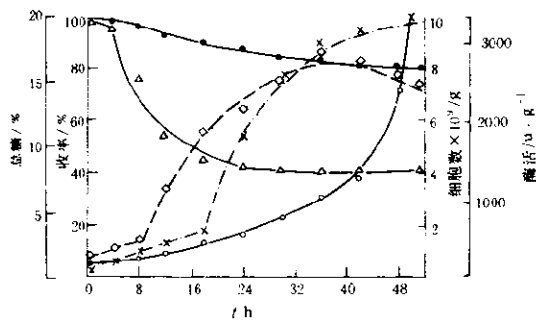


图 1 发酵过程动态曲线

●—●收率,△—△总糖,○—○细胞数,□—□糖化酶,
×—×纤维素酶

在培养过程中,培养料表面由本色而逐步长满菌体到呈现白色,之后逐渐出现一些产孢结构由浅黄至黄再至绿,颜色加深的变化在 36~42h 间极为显著,之后绿色迅速遍及表面,搅动时有孢粉飞起,可见此时细胞计数值的爆发式上升是因木霉分生孢子的成熟而引起的。尽管此时纤维素酶仍上升,但考虑到木霉分生孢子可能给饲料品质带来不良影响,我们选定 40~42h 为最佳发酵周期。

2.5 曲盘培养试验结果

为了适应生产实际的需要,我们按照选定的各项条件,分别以 100℃, 60min 和 1×10⁵Pa, 30min 灭菌的 SVD, 扩大到曲盘中进行了敞口开放培养, 并加测了蛋白酶活(表 4)。结果表明, 所有各项测试指标基本上达到了三

角瓶中无菌培养时的水平, 两种灭菌条件之间也无明显差异。可见, 我们所选定的各项条件及其工艺效果在敞口开放培养时仍是基本稳定的。

表 4 曲盘培养试验结果

项目	1 × 10 ⁵ Pa,	100℃, 60min
	30min 灭菌	灭菌
收率(%)	80.3	82.8
总糖(%)	8.3	8.6
还原糖(mg/g)	21.5	19.0
糖化酶活(u/g)	1840.9	1757.1
纤维素酶活(u/g)	2743.3	2826.4
蛋白酶活(u/g)	1109.8	1090.7
蛋白含量(%)	24.9	24.3
细胞总数(个/g)	3.67 × 10 ⁹	3.40 × 10 ⁹

均按 80℃ 24h 烘干料计

致谢 本系袁静明教授审阅初稿并提出修改意见, 95 届微生物学专业毕业生王瑞霞参与部分实验工作, 谨此致谢。

参 考 文 献

[1] 周人纲,樊志和,李晓芝,等.微生物学通报,1993,20(1): 6~9.

[2] 杨兰,高勇,周立军.微生物学研究与应,1993,2: 9~12.

[3] 马桂荣,张玉臻,孔健.食品与发酵工业,1994,1: 20~23.

[4] 徐立平,高孔荣.食品与发酵工业,1994,2: 63~66.

[5] 孔健,马桂荣,高培基.食品与发酵工业,1992,3: 13~16.

[6] 罗明泉.食品营养成分分析,北京:中国食品工业出版社,1987,50~51.

[7] 袁静明,徐卫东,褚西宁.微生物学报,1990,30(5): 344~350.

[8] 张树政.酶制剂工业(下),北京:科学技术出版社,1984,6~447,608.

[9] 黄大器,李复兴,赵庆达,等.饲料手册(上),北京:北京科学技术出版社,1985,513~517.

[10] 林德光.生物统计的数学原理,沈阳:辽宁人民出版社,1982,335~358.

PRELIMINARY STUDY OF A FEED MULTIENTZYME PREPARATION FROM BREWING WASTES

Bai Yuming Duan Jie Chu Xining

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The preliminary study results of a feed multienzyme preparation from soy waste and vinegar dregs with mixed-culture solid state fermentation were reported. The three strains used are *Trichoderma* sp., *Endomycopsis fibuligera* and *Thichospron cuteneum*. The ratio of the culture medium is that soy waste : vinegar dregs : wheat bran : maize flour = 6 : 2 : 1 : 1. Under the optimal conditions tested, in a gram of the dry material open cultured in leaven tray for 42 hours, there are cellulase 2750 U, glucoamylase 1800 U, proteinase 1100 U and 3.5×10^9 cells. The recovery of the raw material is about 82%, and the protein content 24.5%.

Key words Soy waste, Vinegar dregs, Mixed-culture solid state fermentation, Feed multienzyme preparation