

利用秸秆类物质进行微生物共发酵生产单细胞蛋白

徐坚平 刘均松 孔 维 张世俊 周 慧 李 惟

(吉林大学分子生物学系, 长春 130023)

摘要 本实验采用固液混合共发酵方式, 对绿色木霉和饲料酵母在纤维素材料上共生发酵, 生产单细胞蛋白质的条件进行了研究。研究发现, 在木霉接种 96h 后再接种酵母, 混合培养后, 培养物中蛋白质含量提高到 20—25%, 并可获得 30% 的单细胞蛋白, 产物中蛋白质含量在 53% 以上, 且富含多种酶类、氨基酸及维生素等, 从而提高了纤维素原料的营养价值, 该法使纤维素转化率达 51%。

关键词 单细胞蛋白, 固体发酵, 纤维素

全世界每年大约形成 1000—2000 亿吨植物有机物质, 其中有一半是纤维素质。我国纤维素质更是相当丰富, 仅农业生产中形成的农作物残渣(如稻草、玉米秆、麦秸等), 每年约有 4 亿吨。工业生产中, 我国每年约有数百万吨的纤维素废弃物; 这些废弃物既没有充分得到能量利用, 又污染环境。因此, 利用纤维素材料通过生物转化合成蛋白质, 是一项具有战略意义的研究课题^[1-3]。本研究是以稻草、玉米秸秆类物质为原料, 以固态培养绿色木霉, 液态下糖化后接入酵母的共发酵方式产生单细胞蛋白(SCP), 为提高饲料中的蛋白质以及其他主要成分的含量, 从而提高秸秆类饲料的营养价值奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

1.1.1 绿色木霉 (*Trichoderma reesei*): 生长旺盛, 对多种碳源有同化能力, 保存于纤维素粉

木霉种子液 酵母种子液
↓ ↓
木霉固体培养 → 糖化 — 酵母液体培养 —

斜面上。

1.1.2 产朊假丝酵母 (*Candida utilis* 2.281): 保存于麦芽汁斜面上, 由中科院微生物研究所菌种保藏室提供。

1.1.3 快速酵母: 保存于麦芽汁斜面上, 本室自选。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基:

木霉液体曲(%): 草粉 2, 麸皮 0.2, 蛋白胨 0.1, Mandels 盐^[4] 100 ml, 自然 pH, 培养 3d。

酵母曲: 麦芽汁培养基培养 1d。

1.2.2 发酵培养基(%): 草粉 25, 麸皮 0.03, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.03, Mandels 盐^[4] 72, 自然 pH。

1.3 纤维素原材料处理

把稻草、谷草、玉米秆和玉米芯切成 1cm 长, 加四倍于纤维素材料的水, 126℃, 高压处理 2h 后, 风干备用。

1.4 发酵程序

→ 直接干燥
→ 过滤、滤液干燥 → 终产物

1.5 分析方法

1.5.1 定糖: 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法^[5]。

1.5.2 蛋白质含量的测定: 采用 Folin-酚法^[6]。

1.5.3 产物生物量测定: 过滤除草, 滤液干燥后称重。

1.5.4 纤维素酶活力测定 (FPU 酶活力): 滤

1994-01-03 收稿

纸糖化纤维素酶活力^[4]。

1.5.5 产物中氨基酸的测定：采用日立 835 型氨基酸分析仪。

1.5.6 产物中维生素的测定：采用岛津双光路荧光分析仪。

2 结果与讨论

2.1 木霉固态培养时间对终产物中蛋白质浓度的影响

木霉在静态生长中能产生纤维素酶，并分解纤维素成为葡萄糖、纤维二糖等物质，这些还原糖为微生物共发酵提供营养能源。木霉固态生长的时间与产酶、产还原糖有很大关系，并且直接影响终产品中蛋白质的含量。从实验中发现(图 1) 木霉固态发酵生长 4d 比较适宜，此时正是产酶、产糖的高峰，经水解后溶液中含糖量达到 3.5 mg/ml，适宜接活酵母，并且经酵母共发酵后终产物中有较高的蛋白质含量。

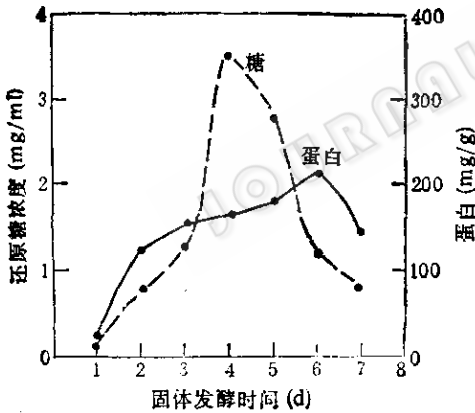


图 1 固体发酵时间与还原糖和蛋白关系曲线
注：稻草在 50℃下糖化 24h，测还原糖，加入酵母再共培养 24h 后，测蛋白

2.2 微生物共发酵时间与蛋白质生成量之间的变化

两种或两种以上微生物共发酵作用，常在发酵期间发生微生物之间相互关系的变化，如从互惠共生作用转变为相互竞争。图 2 是在不通气条件下的共发酵时间与蛋白质的量的对应关系，可以看出 24h 即可达到蛋白质含量的高峰 (219mg/g)。而在通气条件下 (图 3) 8h 即

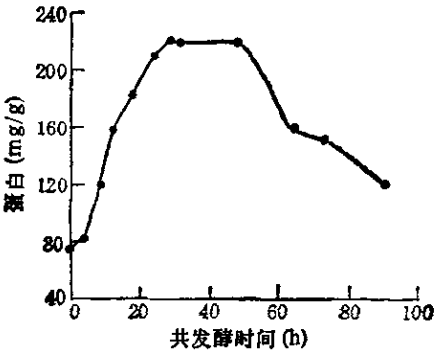


图 2 在共发酵培养酵母过程中稻草中蛋白含量变化曲线(不通氧)

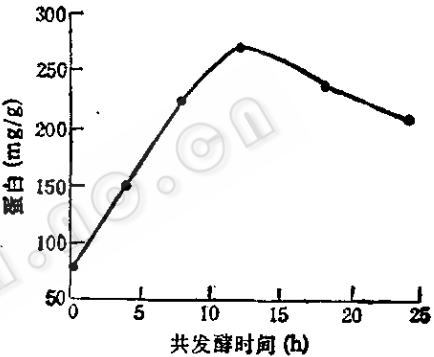


图 3 在共发酵培养酵母过程中稻草中蛋白含量变化曲线(通氧)

可达到 225mg/g，12h 已达到 270mg/g。

2.3 共发酵与单一发酵蛋白质含量的比较

共发酵前后稻草中蛋白质含量(表 1)，从表 1 中可以看出木霉或者酵母在稻草培养基上均能生长并产生一定的菌体。但是，蛋白质含量相对于原料草提高的并不多，其中酵母在稻草培养基上，由于营养源不足使生长受限制，蛋白仅提高了 2.7%，而木霉则能较好地利用纤维素材料，产生菌体量较酵母高些，可达到 12%。而通过二者共生发酵则可大幅度地提高蛋白质的含量，共发酵后的蛋白质含量达到 28%，比

表 1 不同发酵方式发酵后产物中的蛋白含量

发酵方式	酵母单一发酵	木霉单一发酵	木霉酵母共发酵
蛋白含量(%)	6.4	12.3	28.5
蛋白增加量(%)	3.1	9.0	25.2

注：以稻草为原料，原料中蛋白含量经测定为 3.3%

原料中的蛋白质含量提高了6—8倍。

2.4 不同秸秆原料共发酵产单细胞蛋白情况

以几种秸秆原料为底物分别进行发酵前后产物中蛋白质含量的变化(表2)。从表2中可以看出经共发酵后蛋白质的含量均有不同程度的提高。其中,稻草、谷草和玉米经过共发酵后蛋白质含量提高幅度较大,玉米芯则相对较小,而青玉米秆提高的量甚微。可见以普通的农作物秸秆为原料,采用此种共发酵方式完全可以进行有效的生物转化,变废为宝,产生大量的单细胞蛋白,提供具有较高营养价值的饲料。

表2 不同秸秆原料共发酵产单细胞蛋白情况

原料	稻草	谷草	玉米秆	青玉米秆	玉米芯
发酵前(%)	3.8	6.2	5.4	4.3	5.2
发酵后(%)	28	27	24	7	21

2.5 共发酵前后纤维素原料的利用率

稻草共发酵前后的物料平衡及其主要成分变化见表3,从表中可以看出,经过微生物共发酵后,原料中的纤维素及半纤维素都得到了充分的利用。其中纤维素的利用率为44.7%,半纤维素的利用率为61%。全纤维素转化率为51%[全纤维素转化率为100g纤维素(包括半纤维素)转化成还原糖的全纤维素的克数]。另外,其中的木质素也得到了部分的利用,利用率为27%。

表3 固—液发酵中稻草的物料平衡

原料			纤维素			半纤维素			木质素		
Go	G	U	Fo	F	Ui	Fo	F	Ui	Fo	F	Ui
23	17.8	24	33.6	24	44.7	30.2	17	61	18	20	27

注:Go、G为发酵前后全部物质的干重,U=100(Go-G)/Go,Fo、F为所测成分的百分含量,Ui=100(GoFo-GF)/GoFo

2.6 共发酵产物单细胞蛋白的获得及组成分析

共发酵后发酵液中大部分稻草原料已被利用,但是还残余一部分粗稻草棍。经纱布过滤除去粗稻草原料,滤液干燥后即单细胞蛋白产物。此单细胞蛋白产物的收率可达到25—

28%,具有新鲜的酵母味道。以产朊假丝酵母发酵后的蛋白含量比以快速酵母发酵后的蛋白含量要高些,但其味道不如快速酵母。产物中各组份分析见表4—7。产物分析表明SCP产物中各种营养成分齐全,其中平均蛋白质含量为53.8%,最高时可达72%,脂肪和总糖量亦较高。氨基酸分析表明,赖氨酸、蛋氨酸等的含量较普通饲料高许多,还含有多种酶类,是一种较为优良的蛋白饲料。

虽然纤维素分解菌及其酶类在发酵工业上应用已研究多年,但仍然没有单一菌种用于大规模降解纤维素,并能取得经济效益。这是因为:①纤维素酶的合成受到降解物的阻遏,如葡萄糖、纤维二糖、蔗糖和淀粉等皆能抑制此酶的合成。②纤维素酶的催化功能受其酶促反应终产物的反馈抑制,已经证明,葡萄糖可以抑制各种纤维素酶的活性,这种反馈抑制导致酶解液中生成的葡萄糖浓度不高。③纤维素酶在酶促反应液中不稳定,易失活,此酶在工作24h后开始出现部分失活,而混合发酵法可克服纤维素酶生成和存在的种种问题。

在混合菌发酵体系中酶促作用生成的糖很快被发酵微生物利用,结果维持了生物糖浓度,消除了酶合成作用可能受到的降解物阻遏作用,使酶可以不断生成,防止了酶促反应终产物对酶的反馈抑制,使酶以最大速度对底物进行分解,产生最高的糖量。

表4 单细胞蛋白质的组成分析

成份	水分	蛋白质	粗脂肪	总糖	粗纤维	灰分
含量(%)	10	53.8	3.6	10.9	3.6	13

表5 产物中酶含量

酶	纤维素酶	半纤维素酶	淀粉酶	蛋白酶
活力(IU/g)	9.1	32.2	48.4	3.6

混合物发酵目前有三种不同的工艺:①液态菌—菌体系,即两种菌均采用液态发酵^[7,8]。②固态菌—菌体系,即两种菌皆采用固态发酵^[9,10]。③液态酶—菌体系,即先加入酶水解,再进行发酵^[11]。

表 6 氨基酸组成

氨基酸	含量(%)	氨基酸	含量(%)	氨基酸	含量(%)
门冬氨酸	6.279	胱氨酸	0.797	苯丙氨酸	3.546
苏氨酸	2.859	缬氨酸	3.685	赖氨酸	2.763
丝氨酸	2.731	蛋氨酸	0.537	组氨酸	1.111
谷氨酸	7.884	异亮氨酸	2.907	精氨酸	3.589
甘氨酸	4.298	亮氨酸	5.532	脯氨酸	5.764
丙氨酸	3.634	酪氨酸	2.494		

表 7 维生素组成

维生素	B ₁	B ₂	B ₃	Vc	Va	Vd	Ve
含量(mg/ 100g)	4.01	2.30	37.40	微量	20IU	1.4IU	0.58IU

液态菌-菌体系发酵是采用木霉和酵母共同接种或间隔一、二日接种于固体培养基。目前,大都以豆粕、玉米黄粉等粗饲料蛋白原料进行发酵,转化为消化率较高的精饲料蛋白,所用原料成本高。而应用草类物质进行发酵,从实验室发酵情况看,木霉和酵母存在竞争碳源的关系。接种时间和接种量比例的不同都会影响二者的共生,且固体发酵培养基中产还原糖低,不利于酵母的生长,因此,SCP 的生产量低。

固体共发酵为二者的共生创造了便利的条件,木霉和酵母发酵之间以液态糖化过程相间

隔的相继接种,提高了纤维素酶的生成量及活性,充分发挥酶的水解效能。

我们通过微生物共发酵实验,把草类含纤维素较高的低蛋白含量物质转化为 SCP,且收率达到 30—38%,产品中蛋白含量最高达 72%,提高了草类的营养价值,该项研究具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 张树政. 酶制剂工业, 北京: 科学出版社, 1978, 595—619.
- [2] 高培基. 生物工程学报, 1979, 5(1): 6—7.
- [3] 中国科学院成都生物研究所纤维素酶组. 微生物学通报, 1979, 6(3): 13—15.
- [4] Mandels N. Biotechnol Bioeng Symp, 1976, 6: 21.
- [5] Ghose T K. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257—268.
- [6] 张龙翔. 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1985, 165—166.
- [7] 张发群. 微生物学报, 1991, 18(4): 214—217.
- [8] Glancer M. Process Biochemistry, 1989, 24(3): 109—113.
- [9] Tengerdy R D. Biochemical Engineering III, 1983, 469—472.
- [10] Chahal D S. Biotechnol Biong Symp, 1984, 1: 425—433.
- [11] Linden T. Enzyme Microb Technol, 1989, 11(9): 583—589.