

纤维废物再资源化与新蛋白源的开发

——溜曲霉 No.827 对甜菜废粕的利用

薛茂傑 刘德明

(中国科学院环境化学研究所)

梁杉垣 刘志勤

(辽阳化纤工学院)

本文报道首次利用溜曲霉 (*Aspergillus tamaris* No.827) 以甜菜废粕为唯一碳源, 固态发酵法生产富蛋白饲料的基础研究。静置培养 7 天, 每消耗 1 克甜菜废粕可得到 0.39—0.45 克富蛋白产物, 其中粗蛋白含量 34%。在粗蛋白中含有 18 种氨基酸, 其中缬氨酸 5.5%, 亮氨酸 5.4%, 苏氨酸 4.0%, 苯丙氨酸 3.9%, 蛋氨酸 3.1%。这 8 种必需氨基酸的组成含量均超过 FAO 标准。本文讨论了培养基的组成和转化条件以及固态发酵过程的生理生化特性。

长期以来, 逐年增长的全球性蛋白质短缺一直在继续着, 特别是在发展中国家更为突出。据预测, 今后一段时间内, 全世界的蛋白质需要量将增加一倍。因此大规模生产单细胞蛋白 SCP, 不管在经济上存在多大困难, 无疑地将在工业化国家和地区会迅速发展。然而人们更期待着单细胞蛋白工业能对第三世界作出切实贡献。

关于蛋白资源的开发, 近年来都十分注重选择非粮源和低能耗工艺。最现实和最有潜力的原料莫过于以纤维素为主要成份的农业下脚和废物资源^[1]。理由是可使纤维废物再资源化以利生态平衡, 减轻环境污染。

比较生产单细胞蛋白的两种工艺路线: 液态发酵法, 培养基中不溶性纤维干重最多不超过 5% (W/V); 而固态发酵法, 培养基中不溶性纤维物质干重可高达 20—30% (W/V)。所以, 固态发酵工艺具有容积利用率高

和低能耗等优点。针对不流性的纤维废物, 探索固态发酵路线是当前开发蛋白资源的主要方向之一。

利用作者从北京地区筛选的溜曲霉 No.827, 以甜菜废粕为碳源, 研究了固态发酵的物料组成、转化条件和发酵过程的规律性。

材 料 和 方 法

一、菌种和孢子接种物的制备

溜曲霉 (*Aspergillus tamaris* No.827) 系作者从北京地区选出的纤维分解菌。将其保存在含甜菜废粕粉, 20 克/升; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 克/升; Na_2HPO_4 , 1 克/升; KH_2PO_4 , 0.5 克/升的琼脂斜面或察氏斜面中。每六个月转接一次。

孢子接种物系 500 毫升三角瓶装 50 克固态发酵培养基, 孢子接种后, 于 32℃ 保温一周得到培养物。固态培养基的组成为干甜菜废粕 25 克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 克; Na_2HPO_4 , 0.8 克; KH_2PO_4 , 0.2 克; 水, 175 毫升。pH 5.5—6.0, 121℃ 灭菌 40 分钟。

二、基础培养基

在条件试验之前, 使用的基础固态培养基: 甜菜废粕(含水 75—80%) 50 克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 克; Na_2HPO_4 1 克; KH_2PO_4 0.1 克; 盐溶液 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 克; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.56 克; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 克; CoCl_2 2 克; 蒸馏水 1000 毫升) 1 毫升。最好先将各种无机盐研磨成粉状后加入湿甜菜废

粕中搅拌均匀。

三、培养方法

500 毫升三角瓶装固态培养基 50 克, 121℃ 灭菌 40 分钟。孢子接种后, 30—35℃ 发酵一周。在第 1.5 天搅拌一次, 第 4 天搅拌一次, 将长满菌丝的粕块粉碎, 同时测定 pH 变化。发酵初期, 如果失水过多, 则应补水使含水量保持在 80% 左右。发酵后期, 松散的粕块逐渐液化成粘状物, 由于蒸发水份含量不会过多。

四、样品处理与粗蛋白的测定

取固态发酵产物约 10 克, 用 40 毫升蒸馏水洗涤, 离心(2500 转/分)10 分钟, 弃去上清液。如此反复洗涤、离心三次, 最终沉淀物于 70℃ 烘 72 小时, 而后研磨粉碎过 40 目筛, 进行微量凯氏定氮 ($N \times 6.25$)。

五、粗蛋白中氨基酸组份分析^[5]

粉状产物经 6N 盐酸于 110℃ 下水解 24 小时。用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定氨基酸组份。

六、产物中毒性物质检测

富蛋白产物中黄曲霉毒素 B₁、杂色曲霉毒素和苯并(a)芘均用薄层层析法测定^[6-7]。

七、原料与试剂

1. 甜菜废粕 由黑龙江糖业公司提供。所谓甜菜废粕即为甜菜经提取糖份后剩下的废渣。每生产一吨甜菜糖将产生 7 吨左右废粕。干废粕中粗纤维含量约 52%。

2. 其它化学试剂均为化学纯。

结果与讨论

一、氮源的选择

甜菜废粕中碳富氮贫, 要转化成富蛋白饲料, 需外加氮源和其它营养成分。从实用出发, 选做 8 种无机氮源, 它们的用量分别以相当于 4% 的硫酸铵 (指硫酸铵/甜菜废粕) 含氮量计算。图 1 表明溜曲霉 No.827 可利用硫酸铵、硝酸铵等多种氮源。在实际应用时可因地制宜。这里选用硫酸铵做变量试验

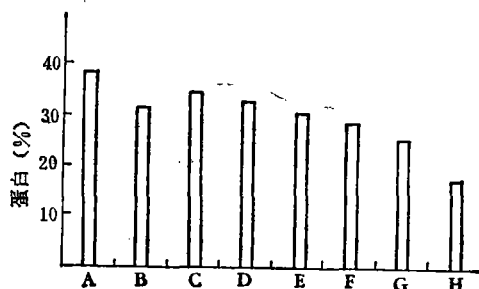


图 1 氮源的选择

A——硫酸铵 B——硝酸铵 C——氯化铵
D——氨水 E——碳酸铵 F——醋酸铵
G——磷酸氢二铵 H——尿素

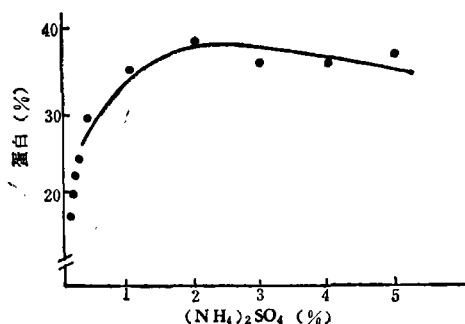


图 2 硫酸铵含量与粗蛋白生成关系

(图 2)。从粗蛋白增长效果来看, 硫酸铵用量(硫酸铵/甜菜废粕)取 1—2% 可满足需要。因为发酵前期, pH 有时可降到 3.5 以下, 要注意控制。通常使 pH 保持在 5—5.5, 利于废粕转化和菌体生长。

二、对甜菜废粕利用的影响因素

溜曲霉 No. 827 利用甜菜废粕合成粗蛋白时, 需要适量的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾 (图 3), 用量分别为 0.4—1.2% 和 0.06—0.20%。

该菌株对 pH 敏感。当 pH 低于 3.5 高于 7.5 时, 生长明显受抑制。在弱酸性条件下, 最利于基质转化和蛋白积累 (图 4)。

保证基质含有足够的水份是溜曲霉 No. 827 利用甜菜废粕的必要条件。如果基质含水低于 70%, 则限制或停止发酵; 如果水份含量超过 90%, 则影响氧的扩散和吸收, 并容易被细菌污染。基质中水份含量通常在 75—80% 较好。

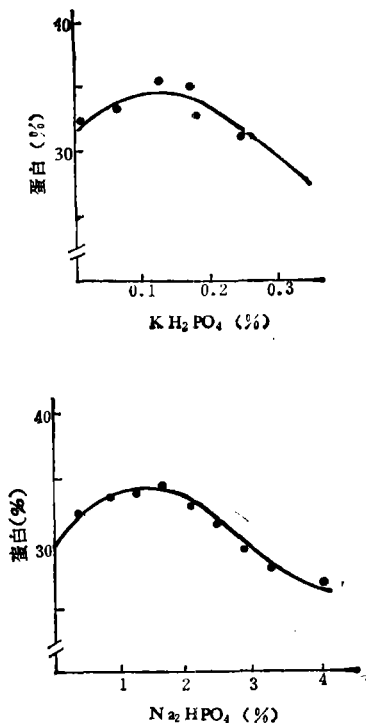


图3 磷酸氢二钠和磷酸二氢钾的影响

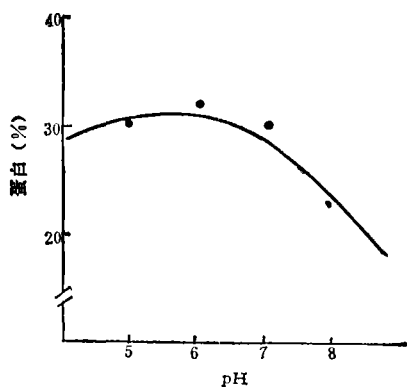


图4 pH 对蛋白生成的影响

一定的容积内,装料量的多少可相对地表明通气之差别。甜菜废粕结构疏松,透气性好,所以500毫升三角瓶装料量可高达100克。这预示着可大大提高设备容积效率的潜力。

培养7—10天的孢子接种物,经粉碎后以不同量接入培养基中,发现1—2% (接种

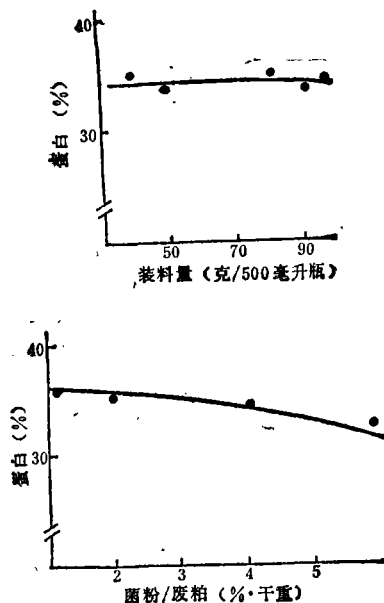


图5 装料量与接种量对蛋白生成的影响

物/废粕)用量已满足需要(图5)。如用3%以上的大接种量,开始时生长较快,但后期较慢,粗蛋白含量并未增加。

适当地搅拌,不仅有助于粕块的粉碎,而且可更新固相与气相接触界面,有利于新鲜空气进入和内部产生的 CO_2 的排出。有助于纤维分解和蛋白生成。

三、稳产结果

综合了影响溜曲霉 No.827 生长的各种因素,确定稳产条件如下:干甜菜粕20克; $(NH_4)_2SO_4$ 1.8克; Na_2HPO_4 0.5克; KH_2PO_4 0.09克;盐溶液0.6毫升;自来水80毫升, pH 5.0—5.5, 500毫升三角瓶装固态培养基70克, 121℃ 灭菌40分钟。用接种量为1.5%的孢子接种物接种,于30—35℃培养7天。连续三批的稳产结果列入表1。终产物中粗蛋白的平均含量34%,产物对原料的平均收率45%即1克干甜菜废粕平均产出0.15克粗蛋白。

四、生长特性

溜曲霉 No. 827 在固态发酵过程中,粗蛋白和残纤维含量以及 pH 变化规律见图6。

表 1 稳产结果

连续批次	一 批			二 批			三 批			平均
序 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
蛋白含量(%·干重)	33	34	35	36	33	35	34	35	33	34
收率(%)(产品/原料)	45	44	43	45	46	45	45	45	45	45

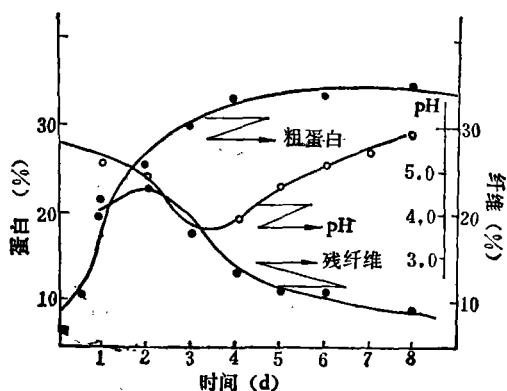


图 6 生长特性曲线

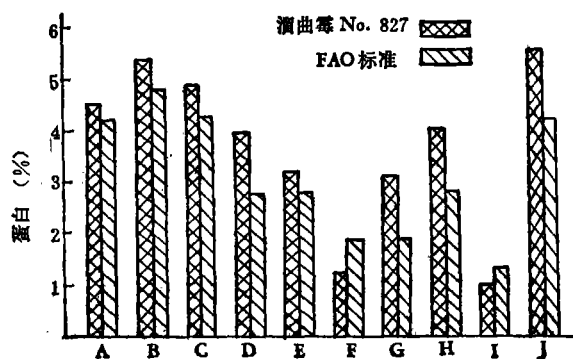


图 7 氨基酸组成与含量比较

A——异亮氨酸 B——亮氨酸 C——赖氨酸
D——苯丙氨酸 E——酪氨酸 F——胱氨酸
G——蛋氨酸 H——苏氨酸 I——色氨酸
J——缬氨酸

从蛋白增长曲线可看出,孢子萌发在 0—0.5 天,对数生长期 0.5—2.0 天,减数生长期 2.0—5.0 天。随着蛋白增长,纤维逐渐被分解利用。但有趣的是在第二天残纤维出现峰值。这表明发酵前期,首先被利用的是半纤维素,然后才是纤维素。过程中,最初三天, pH 从 5.5 一直降到 3.5,然后又逐渐回升。pH 下降

是由于菌体快速生长耗用氮源的结果, pH 回升标志着菌体自溶。

发酵过程产生的基质液化现象也是十分明显的。固态培养基从接种后第二天起开始液化,逐渐变成稠状物。纤维分解、pH 变化和基质液化是菌体增殖和蛋白增长的标志。

五、营养与安全性

微生物代谢是复杂的。作为一种新的富蛋白产物,不但要求营养成分丰富,而且要安全。溜曲霉 No. 827 的固态发酵产品,经黄曲霉毒素 B₁、杂色曲霉毒素和苯并(a)芘的检测,结果均符合标准。由产物的粗蛋白中测出 18 种氨基酸。在 10 种主要氨基酸中有 8 种超过 FAO 标准(图 7)^[8]。

从溜曲霉 No. 827 固态发酵的效果、富蛋白产品的营养价值 and 安全性来看,它有作为动物的蛋白饲料的应用前途。

参 考 文 献

- [1] Rockwell, P. J., *Single Cell Proteins from Cellulose and Hydrocarbons*, pp. 4—15, Noyes Data corporation, Park Ridge, New Jersey, U. S. A. 1976.
- [2] Senoz, J. C. et al., *World Anim. Rev.* 35, 36 (1980).
- [3] Raymond, C. L., *Industry and Environment*, 5 (2), 2 (1982).
- [4] Moo-Young, M., et al., *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 57, 741 (1979).
- [5] Blackburn, S., *Amino Acid Determination, Methods and Techniques*, pp. 7—35, Marcel Dekker, INC. 2nd ed, New York and Basel, 1978.
- [6] 胡文娟等, 卫生研究, 3, 30(1980).
- [7] 北京大学化学系, 中国医学科学院卫生研究所, 环境科学参考资料 1, 14(1977).
- [8] Tannenbaum, S. R., *Single-Cell Protein Vol. II.*, pp. 489—504 The MIT Press., Cambridge, Mass., London, 1975.