

利用稻谷壳水解液培养单细胞蛋白

钱俊青 计伟荣

(浙江工业大学生物与环境工程学院,杭州,310032)

摘要 以树状假丝酵母 1.257 为菌种,稻谷壳酸水解液为碳源,氨水中和水解液产物为氮源,在摇瓶条件下和 10 L 气升式发酵罐上进行发酵工艺条件的研究。结果表明,该菌种在初糖质量浓度 2.5 g/dL,碳氮比 3:1, pH 4.5~5.0 的培养基中培养 48 h 可获得较高的菌体蛋白量,在 10 L 发酵罐中试验,菌体干重为 12.6 mg/mL,蛋白质含量为 62.8%,总糖利用率为 85.7%。

关键词 单细胞蛋白;发酵;水解液;稻谷壳

分类号 TS261.43

0 前言

我国每年的稻壳产量超过 3200 万 t,由于其饲用总消化率仅 3%~8%,故目前绝大部分被废弃或烧掉。而稻壳中含有 50% 左右的多糖物质,利用其培养单细胞蛋白不仅可缓解当前蛋白饲料的匮乏,而且能有效地利用稻壳资源。以稻壳水解液培养单细胞蛋白的工作国内外均有报道^[1~4],但先将稻壳膨化,设备投资及生产成本均较高;而以质量分数 4%~17% 的氢氧化钠水解,多糖降解率低,中和酸用量大。本研究中以体积分数 1% 及 2% 的硫酸直接二级水解粉碎至 80 目的稻壳,以氨水中和水解液作氮源。选用的树状假丝酵母能较好地利用 D-木糖,很好地利用葡萄糖,耐酸性好,不易污染,生长速度较快^[3]。根据作者研究的工艺,每吨稻壳可产干基蛋白含量为 62.8% 的酵母粉 177 kg。

1 材料与方法

1.1 材料

稻谷壳 浙江长兴虹溪粮油公司提供,粗蛋白质质量分数 2.56%,含水量 10.1%。

试验菌种 树状假丝酵母 1.257(*Candida arborea*),浙江工业大学微生物实验室提供

1.2 培养基

1.2.1 试管斜面培养基 10°BX 麦汁,琼脂粉 1.5~2.0 g,121℃ 灭菌 30 min,培养条件为 28℃、24 h。

- 1.2.2 种子液体摇瓶培养基** 5°BX麦汁, 121℃灭菌 30 min, 28℃下培养 24 h.
- 1.2.3 发酵培养基** 稻壳水解液(初糖质量浓度 2.5 g/dL), 尿素 0.6 g/dL, pH为 4.5~5.0, 121℃灭菌 30 min.
- 1.3 方法**
- 1.3.1 稻谷壳水解工艺** 称取粉碎至 80目的稻谷壳(自然水含量)一定量,按适当固液比,加入一定浓度的硫酸溶液,搅匀,回流一定时间,过滤,保留滤液.滤渣 按需再次水解,滤液合并.滤渣以 1∶1清水洗涤,保留作为下次水解用水.总滤液按试验所需加入氨水,并以水稀释至所需的糖浓度.控制 pH在 4.5~5.0.测水解液中还原糖量,计算稻壳水解率.
- 1.3.2 摇瓶试验方法** 在 250 ml的三角瓶中装入一定体积的水解液, 120℃灭菌 20~30 min.冷却后,在无菌情况下挑取菌种一环接入三角瓶中,于 28℃往复式摇床(96 r/min)振荡培养.
- 1.3.3 气升式发酵罐培养** 在 10 L的气升式发酵罐(浙江工业大学自行研制) 121℃实消 20 min后,加入稻壳水解液 9 L左右,利用夹套加热至 121℃维持 20 min进行实消,冷却(边冷却边通风)至 28~30℃利用压差法加入一定质量浓度的尿素溶液,按 10% (体积分数)的接种量接入种液后进行通风培养,控制罐温在 28℃左右.

2 结果与讨论

2.1 稻谷壳水解工艺

在固定水解时间后,影响水解率的有稻壳的粉碎率、H₂SO₄的体积分数及固液比 3个因素.为考察各因素对水解率影响的大小,首先进行正交试验.考虑到稻壳粉碎度要求较高,一般的粮食加工厂较难做到,故粉碎度最高只选了 80目;固液比的选择,考虑到水解液糖质量浓度与以后培养单细胞蛋白初糖质量浓度相适宜,最高选定了 1∶9;为能较明显地考察硫酸体积分数的影响情况,酸体积分数取得比较大,具体见表 1.

表 1 稻壳水解工艺条件正交试验因素水平表

水平	因 素		
	A硫酸体积分数 /%	B粉碎度 /目	C固液比
1	1	40	1∶3
2	3	60	1∶6
3	5	80	1∶9

根据表 1因素水平设计,按 L₉(3⁴)正交试验,水解时间固定为 3 h,以稻壳水解率为考察指标,结果见表 2.

表 2 稻壳水解正交试验结果

试验号	A	B	C	水解率 / %	水解液糖质量浓度 / (g/dL)
	硫酸体积分数 /%	粉碎度 /目	固液比		
1	1	40	1∶3	11.1	3.35
2	1	60	1∶6	16.4	2.56
3	1	80	1∶9	19.4	2.04
4	3	60	1∶3	20.1	6.35
5	3	80	1∶6	26.4	4.23
6	3	40	1∶9	23.8	2.53
7	5	80	1∶3	26.6	8.54
8	5	40	1∶6	22.4	3.56
9	5	60	1∶9	24.6	2.62
K1	46.9	57.3	57.8		
K2	70.3	61.1	65.2		
K3	73.6	72.4	67.8		
极差	26.7	15.1	10.0		

由表 2极差分析可知,稻壳水解影响因素主次顺序为: A B C,其中酸体积分数影响最为显著.

由表 2的试验结果可知,当水解酸体积分数从

1% 提高到 3% 时,水解率平均提高 7.8%;而从 3% 提高到 5% 时,水解率平均仅提高 1.1%。考虑到酸体积分数高需碱中和,造成生产成本提高,故选择水解时硫酸体积分数为 3%。稻壳粉碎度从 40 目提高到 60 目,水解率平均仅提高 1.3%,而从 60 目提高到 80 目,水解率平均提高 3.8%。这说明提高稻壳粉碎度有利于水解。但本研究为使工艺与粮食加工厂生产配套,没有进一步粉碎稻壳,一般情况下将稻壳粉碎至 120~140 目是切实可行的。固液比对稻壳水解的影响较小,考虑到体积大,水解能耗高,固液比确定为 1:3~1:6 之间,按需选定。

正交试验时固定水解时间为 3 h,为进一步确定水解时间,固定酸的体积分数为 3%,固液比 1:6,80 目稻壳水解不同时间,结果见表 3。

表 3 不同水解时间的稻壳水解结果

水解时间 /h	水解率 /%
1	22.
2	24.9
3	26.5
4	26.8
5	26.9

由表 3 可知,水解时间进一步延长,水解率基本不再提高,水解 3 h 仅比 2 h 提高 0.3%,故水解时间确定为 2 h。

在较高的酸体积分数下较长时间加热回流,还原糖有部分将转变为不可发酵的物质。为此,在上述确定的稻壳水解工艺条件基础上,采用分二级水解的工艺,使第一级水解得到的近一半的还原糖在第二级水解时脱离高温环境,减少糖的损失。具体工艺为:稻壳粉碎度不变,第一级水解酸体积分数为 1%,固液比 1:4,回流 1 h 过滤,保留滤液。滤渣再按 1:4 固液比加入水及酸,控制酸体积分数为 2%,回流 1 h,过滤,滤液合并,滤渣以 1:1 清水洗涤,洗涤液作为下次水解用水,总水解时间为 2 h。总固液比增大了,有利于水解率提高,但由于分级水解,能耗未增加,以此工艺水解稻壳,11 次试验,平均水解率为 26.8%。

在上述水解工艺条件下,试验了低压(0.15 MPa)水解稻壳。结果表明:加压有利于稻壳水解,0.15 MPa 下稻壳水解率达 31.6%。

通过随后进行的酵母培养试验知,培养基初糖质量浓度 2.5 g/dL,氨水体积分数 2.1%~2.2% 为最佳。上述 0.15 MPa 的水解液还原糖质量浓度约为 4.5 g/dL,根据硫酸、氨水的用量、体积分数及糖液稀释的倍数,氨水用量 2.1% 时,水解液 pH 为 4.8 左右,无需回收或中和酸,水解液即可用于酵母培养。

2.2 发酵条件探索

2.2.1 种子特性对菌体得率的影响 试验中考察了种子扩培级数、种龄及种液细胞浓度对菌体得率的影响。结果见表 4。培养条件为:水解液初糖质量浓度为 3 g/dL,C/N(碳氮比)为 3,250 mL 摇瓶装量为 50 mL,接种量为 10%,培养 48 h,往复式摇床振荡频率为 96 r/min。

表 4 种子特性对菌体得率的影响

种子扩培级数的影响			种 龄 的 影 响			接种量的影响		
扩培级数	细胞数 / mL ⁻¹	菌体干重 / (mg/mL)	种龄 /h	细胞数 / mL ⁻¹	菌体干重 / (mg/mL)	细胞浓度 / (个/mL)	细胞数 / mL ⁻¹	菌体干重 / (mg/mL)
一	4.3×10 ⁸	10.44	18	8.5×10 ⁸	14.44	1.2×10 ⁸	1.1×10 ⁹	12.78
二	9.5×10 ⁸	12.56	24	1.5×10 ⁹	14.70	2.4×10 ⁸	1.3×10 ⁹	13.30
三	1.4×10 ⁹	12.22	30	1.6×10 ⁹	14.81	3.6×10 ⁹	1.1×10 ⁹	12.98

从表 4 可知,种子扩培级数以采用二级扩培为好。种龄以 24 h 为好。接种液细胞浓度以 2.4×10⁸ 个/mL 左右为好。

2.2.2 稻壳水解液中不同碳氮比及氮源组成对发酵结果的影响 以水解液中还原糖为碳

源,试验了不同碳氮比及氮源的不同组成对发酵结果的影响,水解液初糖质量浓度为 3 g/dL,250 mL 摇瓶装量是 50 mL,发酵周期为 48 h. 结果见表 5.

表 5 稻壳水解液中不同碳氮比及氮源组成对发酵结果的影响

不同碳氮比对发酵的影响			添加尿素对发酵的影响			氨水与尿素不同比例对发酵的影响			
碳源: 氮源	菌体干重 / (mg/mL)	干基粗蛋 白含量 %	指标	空白	加尿素 0.6 g/dL	氨水 (%) : 尿素 (g/dL)	糖利用 率 %	菌体干重 / (mg/mL)	干基粗蛋 白含量 %
2	8.92	56.57	细胞数 /mL ⁻¹	8.0×10 ⁸	1.2×10 ⁹	0.7:1.2	66.8	11.0	42.94
3	11.81	51.30	糖利用率 %	50.2	72.4	1.4:0.9	68.0	10.6	44.42
4	10.74	48.15	干菌重 /(mg/mL)	8.1	12.9	2.1:0.6	75.0	10.7	45.93
5	8.77	43.38	干基粗蛋白 %	39.6	47.3	2.8:0.3	71.0	10.5	45.80

由实验结果可知,合适的碳源与氮源之比为 3:1. 水解液中添加 0.6 g/dL 的尿素,使糖利用率、菌体干重及干基粗蛋白含量均有明显提高. 原因是加入的氮源在稀酸水解液中以 (NH₄)₂SO₄ 形式存在, (NH₄)₂SO₄ 是生理酸性物质,加入尿素后既能增加水解液中的含氮量,又能减轻水解液中由于生理酸性物质存在引起的 pH 波动对细胞生长带来的不利影响. 因此,添加适量的尿素有利于细胞的生长. 当氨水与尿素用量为 2.1% (体积分数)和 0.6 g/dL 时,菌体生长情况较好. 所以工艺上可以选用该比例.

2.3 摇瓶发酵试验

摇瓶发酵采用三因素、三水平的正交试验,在 250 mL 三角瓶中进行,考察水解液初糖质量浓度、发酵周期、摇瓶装量对蛋白产量的影响. 选用正交表 L₉(3⁴),试验结果见表 6.

由极差分析可知,三因素对蛋白产量的影响主次顺序为 A、B、C. 最佳搭配条件为 A₁、B₃、C₂. 对最佳条件进行重复实验验证,结果为:菌体干重 12.8 mg/mL,糖利用率 81.2%,干基粗蛋白含量 56.8%. 由验证结果可知,摇瓶最佳条件为:初糖质量浓度 2.5 g/dL,培养基 250 mL 瓶装量

表 6 正交试验结果

试验号	A	B	C	干基粗蛋白 质量分数 / %
	培养基 装量 /mL	发酵 时间 /h	初糖质量 浓度 /(g/dL)	
1	30	40	2.0	52.7
2	30	44	2.5	51.8
3	30	48	3.0	54.9
4	40	40	2.0	53.8
5	40	44	2.5	55.6
6	40	48	2.5	49.9
7	50	40	2.5	49.9
8	50	44	3.0	48.6
9	50	48	2.0	48.6
K1	159.4	150.4	155.1	
K2	157.4	154.5	157.3	
K3	147.4	159.1	151.6	
极差	12.0	8.7	5.7	

30 mL,发酵时间 48 h,此时相应的尿素添加量是 0.6 g/dL.

2.4 10 L 气升式发酵罐分批发酵试验

气升式发酵罐适合酵母培养,效果优于搅拌罐. 为此,在摇瓶试验的基础上,进行 10 L 气升式发酵罐的放大试验,实验条件为:装料量 9 L,初始 pH 值为 4.6,氨水用量为 2.1% (体积分数),尿素 0.6 g/dL,碳源与氮源之比为 3:1,培养温度 28℃,接种量 10%,水解液初始还原糖质量浓度为 2.5 g/dL,发酵周期为 48 h,改变通风量,发酵结果见表 7.

由表 7 结果可知,通风量确定为前 24 h 以 1.5×10⁻⁴ m³/s,后 24 h 以 1.8×10⁻⁴~2.3×10⁻⁴ m³/s 为好. 在此通风量下,稻壳水解液发酵过程曲线如图 1 所示,连续试验 3 批,所得产物平均干基蛋白质含量达 62.8%,平均菌体干重 12.6 mg/mL,总糖利用率平均为 85.7%.

表 7 不同通风量的 10 L 罐发酵结果

通风量 / (m ³ /s)	菌体干重 / (mg /mL)	干基蛋白质 含量 %	总糖利 用率 %
48 h 均为 1. 8× 10 ⁻⁴ ~ 2. 0× 10 ⁻⁴	12. 9	55. 4	77. 1
前 24 h 为 1. 5× 10 ⁻⁴ 后 24 h 为 1. 8× 10 ⁻⁴ ~ 2. 3× 10 ⁻⁴	12. 5	62. 4	84. 8
48 h 均为 1. 5× 10 ⁻⁴	12. 6	56. 5	74. 6

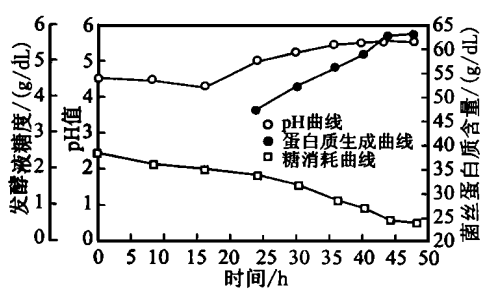


图 1 稻壳水解液 10 L 罐发酵曲线

3 结 论

1) 以稀硫酸二级水解稻谷壳,0. 15 M Pa下水解 2 h, 80目粉碎度的稻壳有 31. 6% 转化为还原糖; 2) 经摇瓶试验,得到的适用于以稻壳水解液为原料、树状假丝酵母生产 SCP 的最佳摇瓶培养条件为: 培养基 250 mL 瓶装量 30 mL,发酵时间 48 h,初糖质量浓度 2. 5 g / dL,添加尿素 0. 6 g /dL, pH 值为 4. 6~ 4. 8; 3) 经 10 L 的气升式发酵罐放大试验,产物的干基粗蛋白含量可达 62. 8% ,菌体干重为 12. 6 mg /mL,总糖利用率为 85. 7% .

参 考 文 献

1 蔡绍真,杜华英,黄伟等. 稻壳蒸煮膨爆机的研究和用稻壳生产单细胞蛋白技术进展. 粮食与饲料工业, 1991, (6) : 7

2 王连华,叶敏. 利用稻壳生产单细胞蛋白初试报告. 辽宁食品与发酵, 1994, (3) : 21~ 26

3 Assem M H, Houssni E S, Mohaned H Y. Bioconversion of Hemicelluloses of Rice Hull Black Liquor into Single-Cell Protein. Chem Tech Biotechnol, 1992, 53: 147~ 152

4 EL-Diwang A I, Shaker H M, Farid M A. Effect of Chemical Treatments on the Saccharification of Rice Hull and Yeast Growth. Argiculture Wastes, 1986, 18: 137~ 143

Studies on the Technology of culture of Single Cell Pratein from the Hydrolysate of Rice Hull

Qian Junqing J Weirong

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

Abstract In this paper, the technology conditions of single cell protein culture was investigated under the shaking flask and in ten-liter air-lift fermentor with the Candida arborea in the culture medium containing rice hull hydrolysate as carbon source and product of hydrolysata with NH₄H₂O neutralization as nictrogeu source. The results showed that the more cell protein was obtained for culture 48 hours in culture medium in which initial content of sugar was 2. 5% and ratio of carbon to nitrogen source was 3: 1 and pH was 4. 5~ 5. 0. The results of test in ten liter fermentor were 12. 6 mg /ml of drycell and 62. 8% of dry substrate protein content and 85. 7% of sugar utilization.

Keywords single cell protein; fermentation; hydrolysate; rice hull

(责任编辑: 秦和平)