

复合菌固态发酵啤酒糟培养基优化的研究*

翁佩芳,吴祖芳

宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用黑曲霉、绿色木霉、热带假丝酵母3株菌株对啤酒糟进行固态发酵转化,通过单菌种初步试验,进一步对复合菌的培养基组成进行四因素、三水平的正交试验,确定较优培养基配方为:麸皮15%, K_2HPO_4 0.5%,尿素2%,硫酸铵1%,NaAC 0.006%,啤酒糟86.5%;由适宜的发酵条件,经29℃,200 r/min发酵5 d得到的产品,具有多种酶活性(以干基计):酸性蛋白酶活力3620 u/g,纤维素酶活力432 u/g和糖化酶活力203 u/g,真蛋白质含量(以干基计)提高12.1%。

关键词: 啤酒糟; 固态发酵; 培养基; 优化

中图分类号: TS262.5; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286 (2003)02-0067-03

Optimization of Medium of Solid-state Fermentation in Brewer's Grains by Complex Strains

WENG Pei-fang and WU Zu-fang

Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A solid-state fermentation process was carried out to convert brewer's grains by complex strains including *Aspergillus niger*, *Trichoderma koningi* and *Candida utilis*. An optimum medium ingredient was determined by primary test of single strain and an orthogonal experiment. As a result, the best medium compositions were as follows: wheat bran 15%, K_2HPO_4 0.5%, urea 2%, NaAC 0.006%, $(NH_4)_2SO_4$ 1% and brewer's grains 86.5%. the product was obtained under the following conditions: 29℃, 200 r/min and 5 d fermentation, with some enzymes activity (dry weight): proteinase 3620 u/g (dry weight), cellulase 432 u/g and saccharifying enzyme 203 u/g, respectively, and the amount of real protein increased by 12.1%.

Key words: brewer's grains; solid-state fermentation; medium; optimization

啤酒糟是啤酒生产的主要副产物,含粗蛋白35%~51%,粗纤维10%~11%^[1],是一种不错的饲料蛋白来源。我国啤酒产量以8%左右的年增长速度在递增,至1999年底,已位居世界第二,啤酒糟产量极为可观,目前国内多数啤酒生产企业将酒糟直接出售用作低级饲料,这种饲料中的非蛋白氮和无机氮不能被饲养动物有效利用,其中的纤维素也阻碍了营养成分的消化吸收,而且啤酒糟水分含量较高,常温贮藏易霉烂、腐败而影响环境或降低其饲用价值;随着养殖业的发展,高质量的饲料短缺成为一个全球性的问题;利用有益菌种发酵转化食品发酵工业生产的下脚料是一种有效的途径,国内有利用黑曲霉、米曲霉等菌种发酵啤酒糟制造高蛋白饲料的研究^[2]。由于霉菌能分泌多种酶系,降解纤维素和淀粉,而酵母菌是获得菌体蛋白较好的菌种,且由霉菌将培养基中的淀粉和纤维素分解为单糖,酵母菌能以这些糖类为营养继续生长繁殖,将其转化为菌体蛋白,产物中蛋白质含量不断增加^[3],故本研究以黑曲霉、热带假丝酵母、绿色木霉多菌种混合对其进行固态协同发酵转化,为使各菌种在发酵基质上生长及产酶良好,故以啤酒糟为主要原料,对单菌种发酵变化及混合菌种发酵培养基组成建立正交试验进行优选^[3],生产出蛋白氮含量高,富含蛋白酶、纤维素酶和糖化酶等复合酶的活性饲料,该产品原料来源丰富,生产成

本低,具有良好的发展前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 原料啤酒糟 浙江金狮啤酒有限公司提供,麸皮:宁波市海天调味食品有限公司提供。

1.1.2 试验菌种与基本培养基 黑曲霉,绿色木霉,热带假丝酵母,由本校微生物实验室保存,YPD培养基,115℃灭菌20 min。

1.1.3 主要仪器 752型紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;HZ-82A型气浴恒温振荡器,江苏省金坛市医疗仪器厂;BP2218型电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;800型离心沉淀器,上海手术器械厂等。

1.2 实验方法

1.2.1 原料和产品分析预处理方法

真蛋白测定 称取固态发酵产物5 g,用40 ml 75%乙醇浸提24 h,充分搅拌,抽滤,残渣再用40 ml 75%乙醇反复洗涤2次,以洗去无机氮和尿素,同时沉淀蛋白质。将沉淀于105℃干燥至恒重,称取20 mg进行消化,测定方法见文献^[4],蛋白质含量以湿基计算。

酶液提取方法 取5 g发酵产物,加入各缓冲溶液15 ml,酸性蛋

收稿日期 2002-12-06

* 宁波市科委资助项目,课题编号0012003。

作者简介: 翁佩芳 (1963-),女,浙江普陀人,副教授 主要从事生物技术在食品工业中的应用及农产品深加工等方面的研究,主持及参加省、市级多项课题研究,发表相关科研论文近20篇。

白酶于40℃、纤维素酶于45℃、糖化酶于30℃浸提1h后,于2500 r/min离心分离25 min,取上层清液备用。

1.2.2 试验菌种种子的制备方法

黑曲霉、绿色木霉 PDA培养基29℃斜面培养72 h后用无菌生理盐水洗下,热带假丝酵母 PDA培养基29℃培养24 h后,用接种环取3~5环至锥形瓶,200 r/min摇瓶培养48 h。

1.2.3 基本培养基的确定和制备

啤酒糟的营养成分并不能完全满足微生物生长繁殖的需要,必须添加适量的碳源和氮源。据报道^[5,6],麸皮是理想的碳源,添加量以15%为宜,硫酸铵、尿素是较好的氮源,且其比例以1:2为宜^[8],KH₂PO₄对提高蛋白转化有一定促进作用^[2],故确定基本培养基添加物组成为:麸皮15%,尿素2%,硫酸铵1%,KH₂PO₄0.5%。

制备:鲜啤酒糟与营养盐按比例混合拌料,分装于锥形瓶,121℃灭菌30 min,冷却备用。

1.2.4 分析方法

蛋白质的测定:微量凯氏定氮法^[7];水分的测定:恒重法^[7];蛋白酶活性的测定:福林酚法^[7];纤维素酶活性测定:滤纸糖化法^[8];糖化酶活性的测定:斐林法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 单菌种发酵试验

由确定的基本培养基,分别按10%(w)量接入单菌种,于29℃,200 r/min摇床培养,观察单菌种长势,其中黑曲霉以酸性蛋白酶、绿色木霉以纤维素酶为考察指标,每天测定酶活力,酵母菌以真蛋白含量为指标,每隔1 d测定真蛋白含量,结果如图1,图2所示。

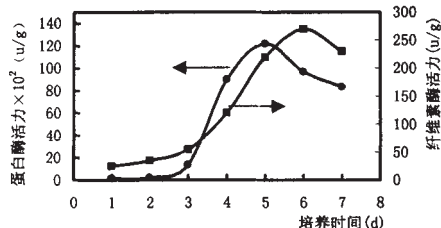


图1 黑曲霉(产酸性蛋白酶)、绿色木霉(产纤维素酶)与培养时间的关系

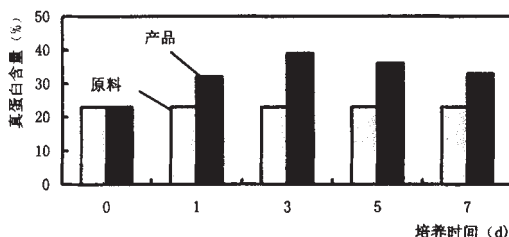


图2 酵母菌培养真蛋白含量的变化

图1结果表明,基本培养基能满足黑曲霉的生长,在培养的第三天,黑曲霉开始产生大量的孢子,生长旺盛,黑曲霉接种后第五天酶活力最高达12200 u/g,而后有所下降。绿色木霉在第三天后纤维素酶活力迅速增加,绿色木霉培养第五天产生明显的绿色色素,且生长旺盛,至第6天纤维素酶活力达到最大(270 u/g)。

由图2可知,酵母菌生长周期短,第三天真蛋白含量达到最大值39%(湿基),比对照原料23%提高69%,同时产生特有的香味,酵母菌经活菌计数达到2×10⁹个/g。由各单菌种试验生长效果及产

酶活力变化情况,确定混合菌种发酵培养基正交实验的接种方式为:先接黑曲霉、绿色木霉,后接酵母,培养时间为6 d。

2.2 混合菌发酵培养基配方正交试验

由单菌种试验可知3种菌在基本培养基中均能生长,但该培养基并不一定是3种菌种混合培养的最佳培养基,改变培养基的营养盐组成,可以得到不同的酶活力和蛋白提高量,据文献报道^[9],NaAC对黑曲霉产纤维素酶有特殊促进作用,也列入因素表,故以麸皮,硫酸铵、尿素,NaAC和KH₂PO₄添加量为因素建立正交实验,因素水平如表1。

表1 培养基配方因素水平表 L ₉ (3 ⁴) (%)					
因素水平	A 麸皮	B 硫酸铵	尿素	C NaAC	D KH ₂ PO ₄
1	10	0.5	1	0.02	—
2	15	1	2	0.04	0.5
3	20	2	4	0.06	1

按上述培养基配方同时接入3种菌,培养6 d后测其酸性蛋白酶、纤维素酶及糖化酶活力,真蛋白量提高,对试验结果进行方差分析如表2所示。

由方差分析得到因素对3种酶活力及其蛋白量提高的影响:麸皮和氮源对酸性蛋白酶有影响但不显著,醋酸钠对酸性蛋白酶的影响不大,KH₂PO₄对其几乎无影响。麸皮对真蛋白含量的提高有影响但不显著,氮源和KH₂PO₄的影响不大,醋酸钠无影响。麸皮添加量对纤维素酶活力有显著影响,KH₂PO₄和氮源有不显著影响。氮源对糖化酶活力的提高有显著影响,麸皮和KH₂PO₄有不显著影响,醋酸钠对其无影响。

由于不同因素对不同酶活力和真蛋白含量的提高影响程度及主次顺序不尽相同,将4项指标按权重系数转化成综合指标评分进行分析(即每个指标的总分定为10分),来确定一较优的培养基配方,得到表2的方差分析结果。

由表2可知,4种因素对综合指标均无显著影响,但由表3可知影响综合评分因子主次顺序为:氮源>醋酸钠>麸皮>磷酸二氢钾,最佳组合为A₂B₂C₃D₂,即麸皮添加量为15%,硫酸铵为1%,尿素为2%,醋酸钠为0.006%,KH₂PO₄为0.5%。

2.3 验证实验

根据确定好的培养基配方,和选择最佳的菌种发酵条件进行

表2 培养基配方正交试验方差分析结果

	方差来源	自由度	离差平方和	F值	显著性
蛋白酶	A 麸皮	2	1679164	1.2	均无显著影响
	B 氮源	2	1656372	1.2	
	C 醋酸钠	2	1459978	1.1	
	D 磷酸二氢钾	2	1370113	作为误差	
真蛋白	A 麸皮	2	21.7	12.1<19	有不显著影响
	B 氮源	2	4.1	2.3<19	有不显著影响
	C 醋酸钠	2	1.8	作为误差	有不显著影响
	D 磷酸二氢钾	2	9.9	5.5<19	
纤维素酶	A 麸皮	2	156896	22.1>19	有显著影响
	B 氮源	2	26817	2.9<19	无显著影响
	C 醋酸钠	2	9245	作为误差	无显著影响
	D 磷酸二氢钾	2	40629	4.39<19	
糖化酶	A 麸皮	2	1849.3	2.5<19	有不显著影响
	B 氮源	2	22034.4	29.6>19	有显著影响
	C 醋酸钠	2	743.9	作为误差	有不显著影响
	D 磷酸二氢钾	2	2430.7	3.3<19	

表3 培养基配方正交试验综合评分方差分析结果				
因素	自由度	离差平方和	F值	显著性
A 麸皮	2	3.21	5.63	均无显著影响
B 氮源	2	4.02	7.18	
C 醋酸钠	2	3.48	6.21	
D 磷酸二氢钾	2	0.57	作为误差	

固体发酵^[9],对发酵转化的产物进行指标分析,得到成品的酸性蛋白酶活力为3620 u/g,纤维素酶活力为432 u/g,糖化酶活力为203 u/g,真蛋白量提高为12.1 %。

3 结论

3.1 单菌种发酵试验表明,以啤酒糟为主要原料,添加1 %硫酸铵,2 %尿素,0.5 %磷酸二氢钾,15 %麸皮能满足黑曲霉、绿色木霉和热带假丝酵母的生长,使黑曲霉和绿色木霉在发酵5 d后达到产酶高峰,热带假丝酵母发酵3 d即可达到较好的菌体生长量。

3.2 根据各菌种产酶能力和蛋白提高量的综合评分,确定复合菌发酵最佳培养基配方为:麸皮15 %,醋酸钠0.006 %,磷酸二氢钾0.5 %,硫酸铵1 %和尿素2 %。

3.3 在最佳培养基的基础之上,结合已优化的发酵条件(如控制培养基初始水分40 %及最佳的菌种配比和接种顺序,培养时间为6 d),进行固态发酵试验,最后得到以啤酒糟为主要原料,添加适当的营养物,具有较高酶活性和菌体蛋白含量的复合酶活性饲料。

(上接第66页)

耙,4 h后开第二耙,控制品温不超过30 ℃,直到品温接近室温,不再升高时,可以停止开耙。后熟45 d。

表2 发酵过程成分变化			
时间(h)	糖分(g/100 ml)	总酸(以琥珀酸计)(g/100 ml)	酒度(% ,v/v)
24	5.4	0.18	1.1
48	1.5	0.23	3.8
72	0.68	0.31	5.6
96	0.14	0.32	8.9
出缸	0.12	0.38	11.3

4 玉米黄酒质量

色泽 橙黄,清亮透明。
香 有黄酒特有香及焦香味。
味 醇香爽口,酸甜协调。
酒度 12 % (v/v)
酸度 0.40 g/100 ml 琥珀酸计)
总糖 11.2 g/100 ml

该复合酶活性饲料的生产扩大试验以及动物饲喂试验和效果评价有待进一步研究。

致谢 食品科学与工程专业2001届周岚芳、刘苏兰两位同学参加了部分试验工作,特此致谢。

参考文献:

[1] 余伯良.发酵饲料生产与应用新技术[M].北京:中国农业出版社,1998.

[2] 蔡俊.啤酒糟发酵生产蛋白饲料的研究[J].粮食与饲料工业,2001,(5) 30-31.

[3] Weuster-Botz D.Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? [J].J.Bioscience and Bioengineering, 2000, (5) 473-483.

[4] 张玉臻,林学政,等.苹果渣皮固态发酵的研究[J].食品与发酵工业,1996, (5) 29-32.

[5] 罗明明.论固体发酵对物料蛋白质含量的提高[J].粮食与饲料工业,1996, (1) 26-28.

[6] 王平,吴晓美,等.啤酒糟EM生物转化的初步研究[J].中南林学院学报,1999, (1) 35-38.

[7] 天津轻工业学院,无锡轻工业学院.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1996.

[8] 郭显章.酶的工业生产技术[M].长春:吉林科学技术出版社,1988.

[9] 吴祖芳,翁佩芳.复合菌固态生物转化啤酒糟发酵条件优化的研究[J].饲料工业,2002,23 (5) 32-34.

5 问题与讨论

5.1 玉米酿造黄酒必须去除胚芽。玉米胚芽内脂肪属半干性植物油,大约由72 %的液态脂肪酸和28 %的固态脂肪酸组成。脱下的胚芽可榨油。国际市场上很受欢迎。

5.2 由于玉米进行脱胚预处理,部分玉米被打碎,浸泡时淀粉损失较大,故我们采取部分浆水回用,效果较好。

5.3 炒米是黄酒酿制的一个工艺部分,主要产生色素和焦香味,用量较大,费时费工。我们采用培养生香酵母和加部分糖料代替,口味有所改变,但效果仍不好,尚需进一步探索和研究。

5.4 由于玉米淀粉颗粒呈不规则形状,堆积非常紧密,除浸泡、蒸饭时采取特定的工艺外,人们在落缸时加入少量淀粉酶,使糖化、发酵能够正常进行。

5.5 黄酒发酵所用麦曲,为保证糖化率和发酵力,过去一般都选中温曲。为解决减少炒米用量、增加黄酒香味问题,我们选用高温曲,特别是仿茅曲,取得了较好的效果。

参考文献:

[1] 华南工学院,等.酒精与白酒工艺学[M].北京:轻工业出版社.1981.

[2] 大连轻工业学院,等.酿造酒工艺学[M].北京:轻工业出版社.1983.

‘茅台’红酒南方市场受青睐

本刊讯 首批‘茅台’牌系列葡萄酒投放市场不久,便得到经销单位和消费者的认可。销售地域已经覆盖四川、广东、浙江、福建、江西、河北等省,在成都、杭州、海口、上海、广州、北京、重庆等地市场反应很好。首批推出的茅台葡萄酒系列产品包括礼盒装的茅台高级解百纳、茅台干红、茅台品丽珠酒庄,还有茅台高级干红(黑标)、茅台高级干红(红标)、茅台高级解百纳干红、茅台横标酒庄干红、茅台竖标酒庄干红等8大品种。其中,茅台高级解百纳干红采用昌黎生产的国际解百纳名贵品种,利用先进的工艺技术,经控温浸渍发酵,橡木桶贮存陈酿而成,其酒体呈深红色,果香浓郁、酒香优雅宜人、入口醇和柔顺,酒体完整、典型性强,是葡萄酒中的精品。(江源)