

利用浓醪酒糟培养单细胞蛋白的研究

丁重阳^{1,3}, 吴天祥², 张 梁^{1,3}, 石贵阳^{1,3}, 章克昌^{1,3}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 贵州大学化学工程学院, 贵州 贵阳 550003; 3. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用玉米原料酒精浓醪发酵产生的酒糟, 对其培养热带假丝酵母生产 SCP 进行了初步的研究。经过优化后的发酵条件为: 酒糟中添加 0.2% CaCl₂ 和 1.0% KH₂PO₄, 起始 pH 为 4.5, 装液量为 30 mL/500 mL 三角瓶; 发酵 26 h, 获得的最高菌浓为 11.3 亿 /mL; 发酵过程中酵母基本消耗完酒糟中的糖, 同时还消耗了酒糟中的有机酸。发酵得到的 SCP 样品中含水分 9.47%, 粗蛋白 47.73%, 真蛋白 45.09%, 取得了较好的效果。

关键词: 热带假丝酵母; 单细胞蛋白; 酒糟; 酒精浓醪发酵

中图分类号: X797; TS262.2; TQ93 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 12- 0095- 04

Study on Single Cell Protein Production from Distiller's Grains with *Candida tropicalis*

DING Zhong-yang^{1,3}, WU Tian-xiang², ZHANG Liang^{1,3}, SHI Gui-yang^{1,3} and ZHANG Ke-chang^{1,3}

(1. Key Lab of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122; 2. Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: Single Cell Protein (SCP) was produced from distiller's grains, which came from high gravity ethanol fermentation of corn, by using *Candida tropicalis* in shake-flasks. The optimum conditions of fermentation were as follows: CaCl₂ 0.2%, KH₂PO₄ 1.0%, initial pH value as 4.5, and the cultivation performed in 500 mL shake flask containing 30 mL medium. Under the above conditions, 1,130 million/mL *C. tropicalis* was obtained. HPLC analysis indicated that *C. tropicalis* consumed almost all the sugar, and organic acids were also consumed. In result, satisfactory results were achieved and the produced SCP samples contained 9.47% water, 47.73% crude protein and 45.09% true protein.

Key words: *Candida tropicalis*; single cell protein; distiller's grains; high gravity ethanol fermentation

单细胞蛋白 (Single Cell Protein, SCP) 是指利用各种基质大规模培养细菌、酵母菌、微藻、光合细菌等而获得的微生物蛋白, 是现代饲料工业和食品工业的重要的蛋白来源^[1-2]。我国 SCP 生产主要从 20 世纪 60 年代开始, 但 80 年代以后才有较大的发展, 主要是利用工农业生产中各种可再生资源生产食用酵母或饲料酵母^[3]。

利用酒糟来生产 SCP 曾是酒精厂处理酒糟的常用方法之一, 但是由于常规酒糟的 SCP 产率低、耗电大、成本高而受到冷落。随着浓醪发酵技术在酒精生产上的广泛应用, 根据浓醪酒糟自身的特点, 利用其生产 SCP 将有可能克服其以往生产中的缺点^[4]。本研究室曾研究了利用瓜干原料酒精浓醪发酵产生的酒糟来生产 SCP, 并取得了较好的效果^[5]。本文利用以玉米为原料酒精浓

醪发酵产生的酒糟, 对其培养热带假丝酵母生产 SCP 进行了初步的研究。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种与材料

热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 由江南大学生物工程学院生物资源研究室筛选保藏。

中温 - 淀粉酶 (20000 u/mL): 无锡杰能科生物工程有限公司生产; 糖化酶 (100000 u/mL): 无锡赛德生物工程有限公司生产; 木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖标准样品: SIGMA 公司生产; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

高效液相色谱仪 1100 (配置示差折射检测器和记

基金项目: 国家科技部“十五”攻关项目资助(2001BA501A01)。

收稿日期: 2007- 09- 06

作者简介: 丁重阳(1975-), 男, 江苏南通人, 博士, 讲师, 主要从事生物资源的研究。

录仪): 美国惠普公司生产; 日立 835 氨基酸快速分析仪: 日本 Hitachi 公司; HYG- 回转式恒温调速摇瓶柜: 上海新星自动化控制设备成套厂; LXJ- 型离心沉淀机: 上海医用分析仪器厂。

1.2 培养基

斜面培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 1.5% ~ 2%, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min。

发酵基本培养基: 酒糟液用糖化酶按酒糟中每克干物质 150 U 处理 40 min 后, 3000 r/min 离心, 取上清液, 起始 pH 4.5, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 酒精发酵

采用脱胚去皮的玉米原料, 粉碎过 40 目筛; 料水比 2:1, 按常规方法液化糖化; 采用安琪活性干酵母, 30 °C 发酵 48 h。发酵结束获得的酒糟的 pH 值为 4.2 ~ 4.5。

1.4 总糖与还原糖的测定

采用 DNS 法。

1.5 蛋白的测定

粗蛋白的测定, 凯式定氮法(GB5511-85); 真蛋白的测定, 按文献[6]的方法测定。

1.6 酒糟及发酵液糖成分分析

HPLC 法, 色谱柱: $\phi 4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$; 固定相: 氨基键合固定相; 流动相: 乙腈: 水 = 80:20, 流速 0.6 mL/min; 柱温: 35 °C。

1.7 样品的氨基酸分析

将样品在 55 °C 下烘干, 取适量预处理后用日立 835 氨基酸快速分析仪检测。

2 结果与分析

2.1 酒糟中可利用糖的分析

在培养过程中, 热带假丝酵母利用的主要碳源为酒糟中的残糖, 因此, 有必要首先对酒糟中的糖分进行分析。通过对酒糟中残总糖和还原糖的测定, 结果见表 1。

表 1 酒糟中还原糖和总糖情况

项目	还原糖(g/L)	总糖(g/L)
酶处理前酒糟	4.2	18.6
酶处理后酒糟	12.1	18.2
离心后酒糟上清液	10.9	14.6

从表 1 可以看出, 经过糖化酶处理后, 还原糖含量大幅度增加, 同时酒糟中的还原糖在离心分离后主要留在上清液中, 有利于热带假丝酵母的培养。

进一步通过 HPLC 分析, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 酒糟中含有少量的甘露糖(10.510 min)和半乳糖(10.585 min), 此外, 还存在着一些双糖和分子量大小不同的糊精, 没有木糖(8.811 min)和阿拉伯糖(9.605 min), 即使存在, 含量也十分少, 无法检测到。

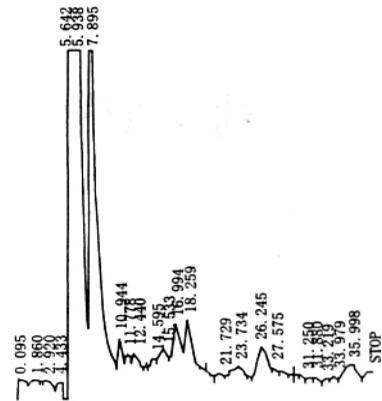


图 1 未用糖化酶处理的酒糟 HPLC 图

图 2 为用糖化酶处理的酒糟 HPLC 图。从图 2 中可以看出, 经过糖化酶的作用, 酒糟中残存的糊精被水解, 酒糟中以葡萄糖(10.950 min)为主, 其他还有一些双糖, 而甘露糖和半乳糖由于含量较少, 其峰大部分被葡萄糖的峰掩盖。

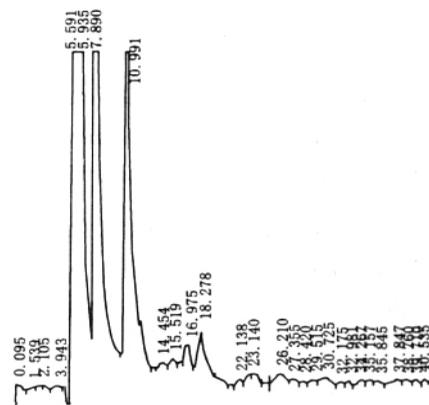


图 2 已被糖化酶处理的酒糟 HPLC 图

2.2 氮源对 SCP 发酵的影响

不同氮源对 SCP 发酵的影响结果见表 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对发酵结果的影响。

表 2 不同氮源对发酵的影响

氮源	最高菌浓(亿/mL)	氮源	最高菌浓(亿/mL)
不添加	7.45	NH_4HCO_3	5.68
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.18	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	5.05
NH_4Cl	4.40	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5.25

由表 2 可知, 添加不同氮源(加量以 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中氮含量为基准)对其生长的影响。结合图 3, 可以看出, 添加氮源后并不利于热带假丝酵母的生长, 发酵结束时的最高菌浓均比不添加氮源的要少。其原因可能在于酒糟滤液中的氮源已满足热带假丝酵母的需要, 额外添加氮源改变了原有的碳氮比, 导致热带假丝酵母的生长受到抑制。

2.3 无机盐对 SCP 发酵的影响

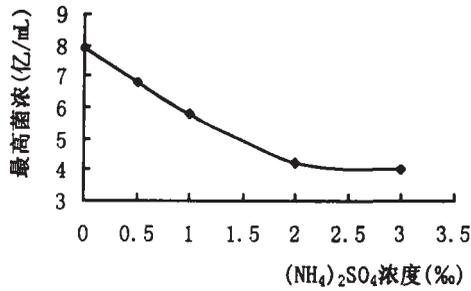


图3 (NH₄)₂SO₄对发酵的影响

无机盐是微生物生长必不可少的营养物质, 其为机体生长提供必需的金属元素。一般微生物生长所需要的无机盐有硫酸盐、磷酸盐、氯化物以及含有钠、钾、镁、铁等金属元素的化合物^[7]。

2.3.1 单一盐分对 SCP 发酵的影响

在前期的研究中对 CaCl₂、MgSO₄、KH₂PO₄ 3 种盐进行了考察。结果表明, 这 3 种盐对发酵均有促进作用, 但各自的最佳添加浓度各不相同, 分别为: 0.4‰、1.6‰和 1.2‰。

进一步考察 CaCl₂、MgSO₄、KH₂PO₄ 在其最佳添加浓度下对发酵的影响, 结果见图 4。

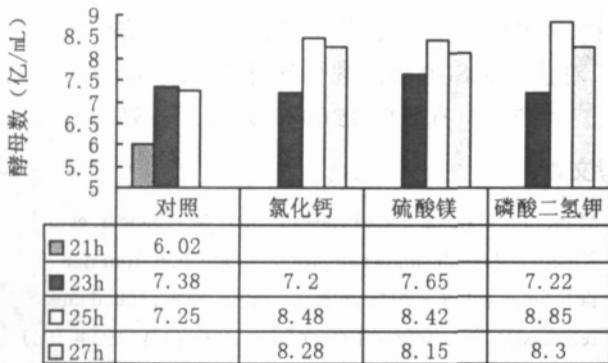


图4 不同无机盐对发酵的影响

从图 4 可以看出, 3 种盐的添加虽然有利于热带假丝酵母的生长和繁殖, 但基本上并不提高其生长速度。其中, KH₂PO₄ 的效果略好于其他 2 种, 发酵 25 h, 菌浓达到 8.85 亿 /mL。

2.3.2 复合盐分对 SCP 发酵的影响

由于热带假丝酵母在培养过程中可能需要一种以上的无机盐。因此, 进一步考察了同时添加 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 以及 KH₂PO₄ 和 CaCl₂ 对发酵的影响 (同时添加 CaCl₂ 与 MgSO₄ 会产生沉淀), 结果见图 5 和图 6。

从图 5 和图 6 可知, 当添加 KH₂PO₄ 和 MgSO₄ 时, 两者的最佳浓度分别为 1.0‰和 1.6‰。而添加 KH₂PO₄ 和 CaCl₂ 时两者的最佳浓度为 1.0‰和 0.2‰, 在此条件下获得的最高菌浓为 9.15 亿 /mL, 高于前者的 8.95 亿 /mL, 同时考虑到 CaCl₂ 的用量要远远少于 MgSO₄,

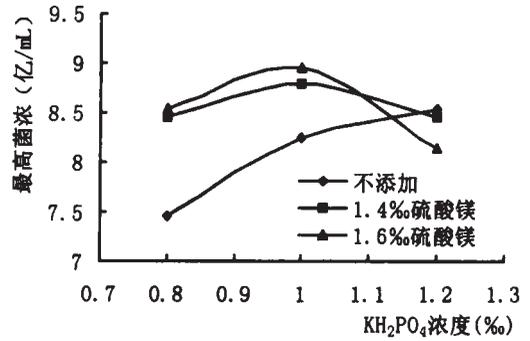


图5 MgSO₄和KH₂PO₄混合添加对发酵的影响

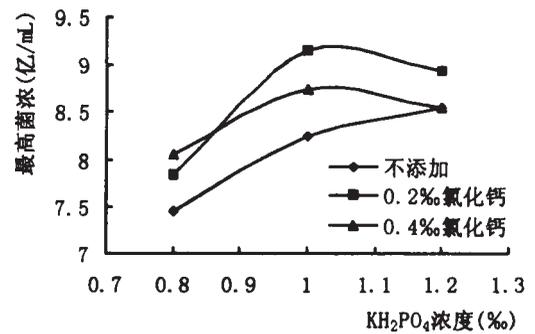


图6 CaCl₂和KH₂PO₄混合添加对发酵的影响

因此, 选择在酒糟中添加 0.2‰CaCl₂ 和 1.0‰KH₂PO₄。

2.4 正交实验

对单因子条件进行考察后, 选取装液量、pH、CaCl₂ 添加量和 KH₂PO₄ 添加量等 4 个因素进行正交实验, 以进一步优化发酵。考察指标为发酵液菌浓、因素及水平设计见表 3, 实验方案和结果见表 4 及图 7。

表3 因素水平表 L₉(3⁴)

因素	水平		
	1	2	3
A(装液量, mL/500mL)	25	30	35
B(pH)	4.0	4.5	5.0
C (CaCl ₂ , ‰)	0.2	0.4	0.6
D(KH ₂ PO ₄ , ‰)	0.8	1.0	1.2

表4 正交实验结果的极差分析 L₉(3⁴)

实验号	A	B	C	D	最高菌浓(亿/mL)
1	1	1	1	1	6.78
2	1	2	2	2	7.70
3	1	3	3	3	7.65
4	2	1	2	3	8.05
5	2	2	3	1	9.90
6	2	3	1	2	10.90
7	3	1	3	2	7.18
8	3	2	1	3	8.40
9	3	3	2	1	9.00
K ₁	22.13	22.01	26.08	25.68	
K ₂	28.85	26.00	24.75	25.78	
K ₃	24.58	27.55	24.73	24.1	
R	6.72	5.54	1.35	1.68	

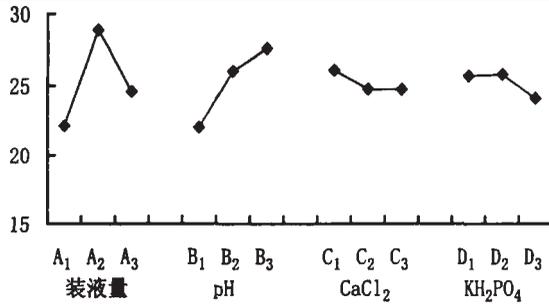


图7 指标与因素的关系

各因素对热带假丝酵母发酵的影响程度为 $A > B > D > C$, 即装液量是菌体生长的主要因素 ($R=6.72$), ABCD 4 个因素最优的组合为 $A_2B_3C_1D_2$, 即装液量为 30 mL/500 mL, pH5.0, $CaCl_2$ 0.2 ‰, KH_2PO_4 1.0 ‰。

但是, 由于 pH4.5 与 pH5.0 之间的极差 ($R=1.55$), 远远小于 pH4.5 与 pH5.0 之间的极差 ($R=5.54$)。此外, 考虑到酒糟综合利用的成本, 故采用 pH4.5 的条件, 即采用 $A_2B_2C_1D_2$ 的组合。在此条件下进行发酵试验, 发酵 26 h 获得的最高菌浓为 11.3 亿 /mL。

2.5 发酵结束后发酵液及 SCP 的分析

发酵结束后, 对发酵液的 pH 和糖进行了测定, 其 pH 为 6.2, 还原糖为 1.8 g/L, 残总糖为 2.2 g/L。这说明在发酵过程中, 热带假丝酵母不但利用了酒糟中的绝大部分糖, 而且还消耗了酒糟中的有机酸, 使 pH 得到回升。利用 HPLC 对发酵液进行分析, 结果见图 8。

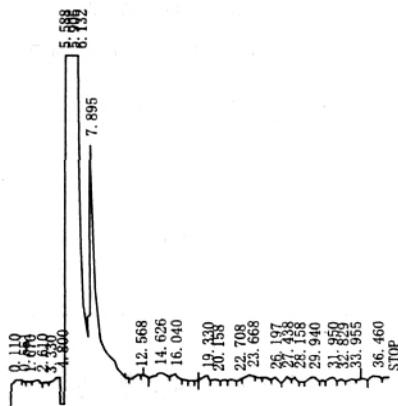


图8 发酵液 HPLC 图

从图 8 可以发现, 图中原有的单糖及双糖的峰大都基本消失, 这进一步证明在发酵过程中酵母消耗完酒糟中的绝大部分糖。

将发酵获得的 SCP 样品进行水分、蛋白质含量的测定和氨基酸成分的分析, 结果见表 5。而从 SCP 的真蛋白和氨基酸组成来看, 其结果良好。

《酿酒科技》全国中文核心期刊

表5 SCP 氨基酸的成分 (%)

项目	指标	项目	指标
水分	9.47	缬氨酸	3.34
粗蛋白	47.73	蛋氨酸	1.31
真蛋白	45.09	异亮氨酸	1.82
天冬氨酸	3.52	亮氨酸	6.96
苏氨酸	2.03	酪氨酸	2.30
丝氨酸	2.70	苯丙氨酸	2.84
谷氨酸	9.54	赖氨酸	1.47
甘氨酸	1.73	组氨酸	1.27
丙氨酸	4.10	精氨酸	1.93
半胱氨酸	0.75	脯氨酸	2.81

3 结论

3.1 经过优化后的发酵条件为: 在酒糟中添加 0.2 ‰ 的 $CaCl_2$ 和 1.0 ‰ 的 KH_2PO_4 , 起始 pH 为 4.5, 装液量为 30 mL/500 mL 三角瓶; 发酵 26 h, 获得的最高菌浓为 11.3 亿 /mL。而在工业化生产中, 由于发酵液中的溶氧水平大大提高, 发酵时间将可以大幅度缩短。

3.2 利用 HPLC 对发酵前后的发酵液进行分析, 结果发现, 图中原有的单糖及双糖的峰大都消失或变得十分小, 在发酵过程中酵母基本消耗完酒糟中的糖。发酵结束后, 发酵液的 pH 回升到 6.2, 酵母不但利用了酒糟中的绝大部分糖, 而且还消耗了酒糟中的有机酸。

3.3 对获得的 SCP 样品进行分析, 其含水量为 9.47 %, 粗蛋白 47.73 %, 真蛋白 45.09 %, 取得了较好的效果。

参考文献:

- [1] M Ibrahim Rajoka, Sohail Hassan Khan, M A Jabbar, et al. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2006, (97): 1934- 1941.
- [2] 陆步诗, 李新社. 曲酒丢糟生产单细胞蛋白的菌种初选[J]. *酿酒科技*, 2006, (7): 25- 27.
- [3] 那日苏, 桂荣, 敖长金, 等. 酵母及其产品在畜牧业中的应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2004, (1): 48- 49.
- [4] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [5] 王玉红, 丁重阳, 章克昌, 等. 以浓醪酒糟为基质的发酵生产单细胞蛋白的工艺条件的优化[J]. *酿酒*, 2002, 29(5): 44- 46.
- [6] M Ibrahim Rajoka, M A Tariq Kiani, Sohail Khan, et al. Production of single cell protein from rice polishings using *Candida utilis*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, (20): 297- 301.
- [7] 吕欣, 段作营, 毛忠贵. 氮源与无机盐对高浓度酒精发酵的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2003, 31(4): 159- 162.