

文章编号:1003-8701(2011)02-0047-04

利用多菌种固态发酵降解玉米秸秆

易安妮,江珊珊,梁恩,吴希阳*

(暨南大学理工学院,广州 510632)

摘要:以玉米秸秆和麦麸为原料,利用具有降解纤维素和半纤维素能力的黑曲霉、地衣芽孢杆菌、酵母、植物乳酸杆菌4种菌混合发酵,降低原材料的纤维素含量,提高玉米秸秆的饲料营养价值。由单因素试验确定各种菌接种时间、发酵时间、无机水含量、温度;由正交试验确定秸秆和麦麸的最佳比例。结果表明:发酵温度37℃、发酵时间6 d、秸秆与麦麸比例为2:1、水的添加量50 mL,粗纤维降解率为26.68%。采用4种菌分批发酵,即先用黑曲霉和芽孢杆菌发酵72 h后,再添加酵母和乳酸杆菌继续发酵,粗纤维下降率为27.95%,蛋白质含量为24.67%。

关键词:玉米秸秆;麦麸;固态发酵;多菌种

中图分类号:S816.6

文献标识码:A

Reduction of Corn Stalk with Solid Fermentation by Multi-Strains

YI An-ni, JIANG Shan-shan, LIANG En, WU Xi-yang

(College of Physics and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Four different microorganisms, *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis*, yeast and *Lactobacillus planetarium* were used for mixed fermentation to reduce the crude fiber from corn stalk in order to improve the nutritional value of the corn stalk. The fermentation conditions were optimized by orthogonal experiments. Results showed that under the condition of inoculation amount of multi-strains (each of *Aspergillus*, *Bacillus*, yeast and *Lactobacillus*) was 2×10^7 CFU, the ratio of corn stalk powder and wheat bran=2:1, temperature at 37℃ for 6 d fermentation, the crude fiber was reduced 26.68%. When *Aspergillus niger* and *Bacillus licheniformis* was mixed at first for 72h fermentation and then mixed with yeast and *Lactobacillus planetarium*, the crude fiber was reduced by 27.95% and the crude protein content increased to 24.67%.

Keywords: Corn stalk; Wheat bran; Solid fermentation; Multi-strains

开辟新原料来源,提高饲料利用率,目前已成为一个世界性的研究课题。我国玉米秸秆产量巨大,但由于秸秆可消化蛋白质含量低,粗纤维含量较高,大多纤维素不能被畜禽类胃肠道消化分解,因此营养价值较低。绝大部分被直接还田或焚烧,资源浪费惊人,且造成环境污染。采取微生物发酵技术对农作物秸秆进行处理,不仅可以解决蛋白饲料资源短缺,还可以提高和改善饲料营养价值,有巨大的经济效益和社会效益。本文采用混合发酵

法,利用正交试验,优化粗蛋白和粗纤维分解率的发酵条件,为在实践中推广提供了依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*)ATCC16404,广东省微生物研究所提供;地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),本实验室分离;梅山面包酵母(baker's yeast),购于超市(编号20100304);植物乳酸杆菌(*Lactobacillus planetarium*)ATCC14917,广东省微生物研究所提供。

1.1.2 原料

收稿日期:2011-01-05

作者简介:易安妮(1987-),女,在读研究生,主要从事微生物发酵的研究。

通讯作者:吴希阳,博士,教授,E-mail: tkentwu@jnu.edu.cn

玉米秸秆市售 ;麦麸市售。

1.1.3 仪器

60 目筛粉碎机、高压灭菌锅、培养箱、二氧化碳培养箱、凯氏定氮仪、真空抽滤仪、酸式滴定管。

1.1.4 培养基和培养液

马丁培养基 :20.0 g 葡萄糖、5.0 g 蛋白胨、1.0 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0 g 酵母浸出物、水 1 000 mL。除葡萄糖外 ,将上述样品混合微温溶解 ,培养基初始 pH 均调为 6.4 ± 0.2 , 121°C 灭菌 15 min。

MRS 培养基 :10.0 g 蛋白胨、10.0 g 牛肉、5.0 g 酵母膏、2.0 g 柠檬酸氢二铵、20.0 g 葡萄糖、5.0 g 乙酸钠、2.0 g 磷酸氢二钾、0.58 g 硫酸镁、0.25 g 硫酸锰、1 mL 吐温-80、1 000 mL 水、2%琼脂粉。培养基初始 pH 均调为 6.0 ± 0.1 , 121°C 灭菌 15 min。

LB 培养基 :10.0 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、5 g NaCl。pH 均调为 7.2 ,2%琼脂、1 000 mL 水 , 121°C 灭菌 15 min。

麦芽汁培养基 :20 g 麦芽汁粉、2%琼脂粉 , 121°C 灭菌 15 min。

1.2 方法

1.2.1 原料处理

秸秆 $60 \sim 80^\circ\text{C}$ 烘箱中 24 h ,搅碎通过 60 目筛。

麦麸 $60 \sim 80^\circ\text{C}$ 烘箱中 24 h ,搅碎通过 60 目筛。

1.2.2 种子培养液制备

1.2.2.1 黑曲霉种子培养液的制备

接种黑曲霉菌种至改良马丁琼脂斜面培养基上 , $23 \sim 28^\circ\text{C}$ 培养 5~7 d ,加入 3~5 mL 生理盐水洗脱孢子。显微镜计数后调整黑曲霉孢子数为 1×10^7 个 /mL ,于 4°C 保存。

1.2.2.2 芽孢杆菌孢子悬液的制备

将芽孢杆菌接种到 LB 培养基上 34°C 培养 48 h ,加入 3~5 mL 生理盐水洗脱芽孢 ,将芽孢悬液用 4 000 r/min 离心 10 min ,弃上清 ,再加入生理盐水 ,洗涤 3 次 ,加入适量溶菌酶 , 37°C 水浴 30 min ,离心 ,弃上清 ,悬浮于生理盐水 ,保存在 4°C 冰箱。

1.2.2.3 乳酸杆菌种子培养液的制备

植物乳酸杆菌接种到 MRS 培养基 ,置于 CO_2 培养箱中 40 h ,接种到 MRS 液体培养基 ,50 r/min 摇床、 37°C 培养 24 h。

1.2.2.4 梅山酵母用生理盐水稀释成工作悬液为 1×10^7 个 /mL。

1.2.3 发酵条件

发酵温度为 37°C ;固体总质量为 20 g ;无机盐 :1.165 g 硫酸镁、1.5 g 硫酸铵。

1.2.4 测定方法

蛋白质含量的测定方法 :凯氏定氮法(夏玉宁等 ,1994) ;粗纤维测定方法 :酸式洗涤法(SP- 10036) ;总糖测定方法 :铁氰化钾滴定法(刘福岭等 ,1987)。

2 单因素试验结果与分析

2.1 培养基含水量的影响

含水量是影响发酵快慢进程的重要因素 ,选择一个适合的水分含量能调节固体培养基中的通气条件 ,有益于微生物的生长繁殖和原料的发酵速度。本试验设计了水的添加量分别是 10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL、70 mL ,用以优化培养基的最佳含水量 ,发酵时间为 6 d ,秸秆与麦麸的比例确定为 2:1 ,发酵结束后测定各组的粗纤维含量。结果见图 1。

图 1 显示 ,培养基含水量为 50 mL 时产物粗

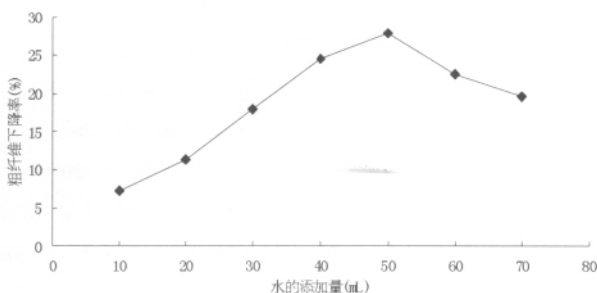


图 1 培养基含水量对发酵产物粗纤维含量的影响

纤维减少量最高(27.89%) ,含水量过低时不利于孢子生长发育而影响甚至是阻碍发酵 ,而含水量过高时 ,物料黏结 ,不利于通气导致有氧呼吸受阻也降低孢子的生长而影响发酵的进程 ,都使粗纤维含量降低较少。因此采用 50 mL 含水量作为最优水的添加量。

2.2 发酵时间对产物粗纤维的影响

发酵时间对秸秆的发酵影响较大 ,因为随着

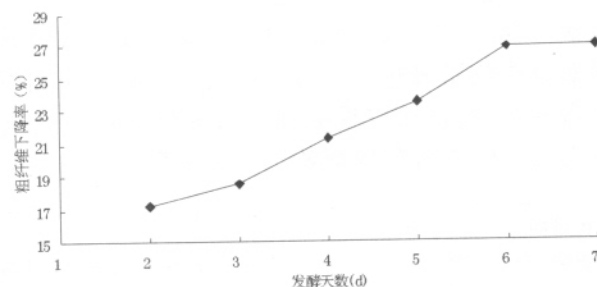


图 2 不同发酵时间对发酵产物粗纤维减少率的影响

时间的推移,孢子会繁殖发育,但是同时代谢产物产生,而且能源也可能消耗,加上成本的影响,所以时间并不是越长越好,而是要找出一个比较适合的点。本试验设计了6个试验组,分别发酵2、3、4、5、6、7 d,秸秆与麦麸的比例确定为2:1,水的添加量确定为50 mL,然后进行粗纤维含量测定,结果如图2所示。

由图2可见,发酵时间6 d时粗纤维减少的最多(26.83%),尽管在第7 d时粗纤维仍然有减少的趋势,但是减幅不大,为缩短周期,节约成本,确定发酵时间为6 d。

2.3 秸秆与麦麸的比例对粗纤维含量的影响

由于玉米秸秆不能提供微生物生长所需要的全部营养,本试验加入麦麸以补充,本试验设计了5个试验组,秸秆与麦麸的比例分别为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,发酵6 d,水的添加量确定为50 mL,然后进行粗纤维含量测定,结果如图3所示。

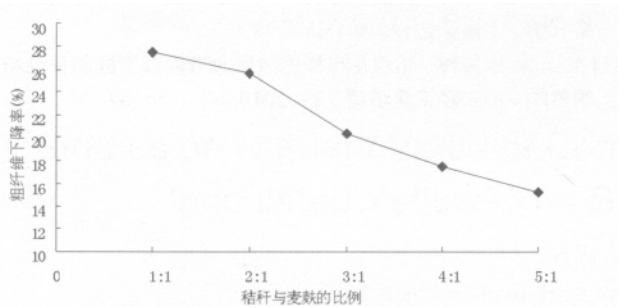


图3 不同秸秆与麦麸比例对粗纤维减少率的影响

如图3可见,当秸秆与麦麸比例为1:1时效果最好(27.54%),在比例为2:1时粗纤维也有很好的下降,出于成本考虑和试验的目的是降解秸秆,选择比例为2:1作为考虑比例。

2.4 不同黑曲霉孢子接种量对粗纤维下降率的影响

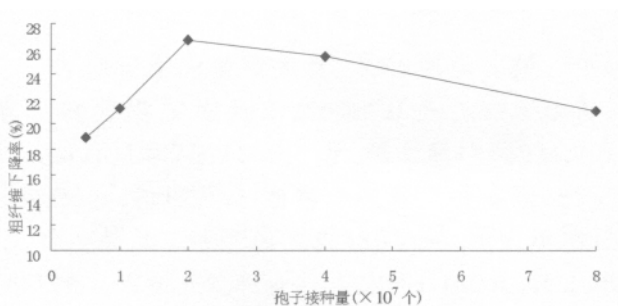


图4 黑曲霉孢子的接种量对粗纤维降解的影响

孢子接种数目的多少直接影响发酵效果,当然,也不是孢子数越多越好,因为过多的孢子,可能会引起对营养物质的竞争,同时会加大成本。本

试验设计了5个试验组,孢子接种量分别是 0.5×10^7 、 1×10^7 、 2×10^7 、 4×10^7 、 8×10^7 个,秸秆与麦麸的比例为2:1,发酵6 d,水的添加量确定为50 mL,然后进行粗纤维含量测定,结果如图4所示。

由图4可见,当孢子在 2×10^7 个时,发酵效果最好,粗纤维的降解率达到最大(26.68%),因此,确定 2×10^7 为最佳的孢子数。

3 正交试验及其结果

从前期单因素试验的结果可以得出最优培养条件为:培养基秸秆与麦麸比例最佳为2:1,最佳的含水量为50 mL,孢子接种量最佳为 2×10^7 个,发酵时间最佳为6 d,在此基础上,优化发酵条件进行正交试验,发酵条件在1.2.3的基础上,含水量为50 mL,孢子添加量为4种菌均为 2×10^7 个,秸秆与麦麸的比例为2:1,先加黑曲霉和芽孢杆菌发酵0 h、24 h、72 h后,再添加梅山面包酵母和植物乳酸杆菌继续发酵,总共6 d,得出结果如表1所示。

表1 发酵前后成品成分常规分析

黑、芽先添加的时间(h)	粗纤维下降率(%)	总蛋白含量(%)	总糖含量(%)
0	16.95	20.03	14.93
24	21.62	22.79	13.79
72	27.95	24.67	14.52

在发酵之前,通过检测可知,总蛋白含量为15.30%,总糖含量为17.60%,由表1可知,发酵之后,固态培养基的蛋白质含量都有很大幅度的增加,最高达到24.67%,而总糖的含量则均有小幅度的下降,最低为13.97%,粗纤维含量下降率也呈梯度出现。

4 结 论

经过对发酵条件的优化,得到培养基组成和培养条件为:培养基中秸秆和麦麸的比例为2:1,水的添加量为50 mL,最佳培养时间为6 d,孢子最佳接种量为 2×10^7 个,按上述的发酵条件发酵,得到了较好的结果,粗纤维含量迅速下降,高达26.68%,这也与廖雪义等在多菌种混合发酵秸秆生产蛋白饲料的研究中的结果相吻合。

混合发酵时,在秸秆与麦麸的比例为2:1时,黑曲霉和芽孢杆菌先添加72 h,粗纤维下降率最大,为27.95%。而同时蛋白质含量也比较高,为24.67%。较之发酵之前有大幅度提高,总糖的含量则有小幅度下降,原因可能是发酵的过程中,消耗了糖。这也和张红莲等在采用阶段处理和多菌

种固态发酵玉米秸秆的研究结果类似,另外,发酵完的产物颜色呈青色偏黑色,有青储饲料的风味。

利用微生物进行发酵分解粗纤维含量高的底物,如李日强等利用不同菌株固态发酵废白酒糟生产饲料,马旭光等利用混菌固态发酵玉米秸秆生产单细胞饲料,吴宝昌等利用枯草芽孢杆菌与黑曲霉混合发酵豆粕生产饲料。本试验则是利用了4种菌同时发酵,除了保证粗纤维的降解之外,还注意蛋白质的提高和风味的改善,以及适口性的提高,使其更加适合作为饲料。但本次试验并没有测定各种氨基酸的含量。

本试验还将进一步优化条件以将粗纤维得到最大的降解和蛋白质最大的提高,以使玉米秸秆真正用于工业化生产饲料,在以后的研究过程中,将在继续致力于降低纤维素提高蛋白质的同时注意风味的提升,进行动物实验,后期将进行动物实验以便使数据和结果更有说服力,这将是以后研究的着眼点。

参考文献:

[1] Sakka, Kazuo, Tetsu Y K, et al. Molecular breeding of cellulytic microbes[J]. Plants and Animals for Biomass Utiliza-

tion, 2000, 90(3): 227- 233 .

- [2] Youssef Bothaina M, Aziz N H. Influence of γ - irradiation on the bioconversion of rice straw by *Trichoderma viride*[J]. Into Single Cell Protein, 1999, 97(386): 171- 183 .
- [3] Peter M G, Zarmea P, Adrian, et al . Resources conservation and recycling biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal [J]. Cells Immobilized in Radiopolymerized Hydrogels, 1999,27(4):309- 332 .
- [4] 张继泉,孙玉英,关凤梅,等. 玉米秸秆纤维素酶解条件的初步研究[J]. 粮食与饲料工业,2002(4):21- 23 .
- [5] 夏玉宁,朱 丹. 饲料质量分析检验[M]. 北京:化学工业出版社,1994 .
- [6] 刘福岭,戴行军. 食品物理与化学分析方法[M]. 北京:轻工业出版社,1987 .
- [7] 廖雪义,代 青,余海忠. 多菌体混合发酵秸秆生产蛋白饲料的研究[J]. 中国饲料,2009(16) :8- 10 ,14 .
- [8] 张红莲,郭爱莲,何 钧,等. 采用阶段处理和多菌种固态发酵玉米秸秆的研究[J]. 西北大学学报,2004,34(6):691- 694 .
- [9] 李日强,张 峰,韩文辉,等. 不同菌株固态发酵废白酒糟生产饲料的研究[J]. 重庆环境科学,2003(11) :63- 64 .
- [10] 马旭光,张宗舟. 混菌固态发酵玉米秸秆生产单细胞蛋白的研究[J]. 中国酿造,2010(1) :26- 28 .
- [11] 吴宝昌,宋俊梅. 枯草芽孢杆菌与黑曲霉混合发酵制备豆粕饲料[J]. 山东轻工业学院学报,2010,24(1) :54- 57 .