

多菌种分步降解玉米秸秆生产蛋白饲料的工艺

陈 合, 余建军^{*}, 舒国伟, 张 强

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 西安 710021)

摘 要: 研究了多菌种分步降解玉米秸秆产蛋白饲料的工艺条件, 选用黄孢原毛平革菌固体发酵去除部分木质素, 接入木霉菌进一步降解木质纤维素, 加入酵母发酵产蛋白饲料。木霉菌最佳接种时间为第10天, 经12d的共发酵, 按秸秆与麸皮配比3.0:1加入麸皮、酵母接种量8%、固液比1:3.0、硫酸铵用量2.5%, 继续共发酵72h, 粗蛋白质量分数可达25.3%。结果表明, 多菌种分步降解产蛋白饲料工艺为玉米秸秆生物利用提供了一种新途径。

关键词: 秸秆, 降解, 工艺, 玉米, 多菌种, 蛋白饲料

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.12.057

中图分类号: S816.34

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2009)-12-0331-04

陈 合, 余建军, 舒国伟, 等. 多菌种分步降解玉米秸秆生产蛋白饲料的工艺[J]. 农业工程学报, 2009, 25(12): 331—334.

Chen he, Yu Jianjun, Shu Guowei, et al. Technology for producing protein feed from corn stover by multi-strain distributional degradation[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(12): 331—334. (in Chinese with English abstract)

0 引 言

秸秆主要由纤维素、半纤维素、木质素组成, 是国内外尚未充分利用的一大饲料资源^[1-2]。纤维素分子是由许多葡萄糖分子经 β -1,4糖苷键结合而成的吡喃葡萄糖单位组成, 在自然界中主要以微纤维组成的结晶型存在, 而纤维素酶易水解非结晶型的, 但难水解结晶型的微纤维^[3]。又由于木质素和半纤维素包裹在纤维素之外, 以屏蔽效应阻遏纤维素酶吸附纤维素分子。这两者构成了秸秆难以被降解利用的主要因素, 若采取化学、物理法处理, 有环境污染、能耗高的问题^[4]。因此, 开发能够直接作用于秸秆的微生物是目前解决问题主要研究方向^[5-7]。由于单菌种酶系不全至今仍没有一种微生物可按传统方法大规模降解秸秆^[8-9], 多菌种混合发酵植物纤维素原料生产蛋白饲料的研究得到广泛重视^[10]。据报道, 白腐菌对木质素有很好的降解效果^[11-13], 而木霉菌、酵母分别是纤维素酶、菌体蛋白主要生产菌种。本文利用黄孢原毛平革菌、绿色木霉、产朊假丝酵母进行三步混合发酵来直接降解秸秆生产饲料蛋白, 欲在菌种搭配选择及多分步发酵上为玉米秸秆生物利用提供一种新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绿色木霉(本实验室分离选育); 黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) (购于中国工业微生物

种保藏管理中心(CICC), 编号为40719); 产朊假丝酵母(*Candida utilis*) (购于CICC, 编号为1807)。

秸秆粉: 将玉米秸秆(咸阳西郊留印村)自然风干(含水率为4.57%)磨成40目的粉末。

1.2 培养液、培养基

1.2.1 绿色木霉微量元素液(1L)

5.0 g 硫酸亚铁、1.6 g 硫酸锰、1.4 g 硫酸锌、2.0 g 氯化钴。

1.2.2 黄孢原毛平革菌基础培养液

基础培养液^[14] (1 L): 0.2 g KH_2PO_4 、0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g CaCl_2 、0.1 g VB1、0.5 g 吐温-80和1 mL 无机盐溶液。

无机盐溶液^[14] (g/L): 0.5 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 H_3BO_3 和0.01 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、3.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

1.3 试验方法

1.3.1 绿色木霉接种时间的确定

取秸秆粉5.0 g, 10%的麸皮浸汁6 mL, 葡萄糖1%, 硫酸铵0.05%, 按固液比1:2加入基础培养液于250 mL三角瓶中, 调pH6.0, 灭菌, 接入黄孢原毛平革菌, 置于培养箱, 30℃, 湿度86%培养^[7]。按设定的不同时间后接入绿色木霉, 并添加1 mL/L微量元素液进行共发酵12 d。固体发酵过程中检测纤维素、半纤维素和木质素的质量分数变化, 以确定绿色木霉较佳的接种时间。

1.3.2 酵母生产蛋白饲料的因素研究

黄孢原毛平革菌和绿色木霉共降解一定时间后, 接入酵母液共发酵生产蛋白饲料: 添加秸秆质量1/3的麸皮、2%硫酸铵、酵母液接种量10%、培养72 h。将以上条件及1.3.1的固液比(1:2)作为固定试验条件, 研究秸秆与麸皮配比、酵母接种量、时间、固液比、氮源的单因素试验, 然后通过四因素三水平正交来确定秸秆与麸皮配

收稿时间: 2009-03-18 修订时间: 2009-06-02

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2007JK01-13-2); 咸阳市科技攻关项目资助(K0311-2)

作者简介: 陈 合(1956—), 男, 陕西武功人, 教授, 研究方向为食品生物技术。西安 陕西科技大学生命科学与工程学院, 710021。

Email: chenhe@sust.edu.cn

※通信作者: 余建军(1983—), 男, 浙江温州人, 研究方向为酶菌共降解玉米秸秆及饲料化工艺研究。西安 陕西科技大学生命科学与工程学院, 710021。Email: 79662980@qq.com

比、酵母接种量、固液比、氮源用量的较佳组合。

1.3.3 理化指标测定方法

木质素、纤维素及半纤维素按 VanSoest 方法检测, 粗蛋白按凯氏定氮法 (GB6432-1986) 检测。

降解率=绿色木霉发酵 12 d 时的某物含量/绿色木霉接种时的某物含量 $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 绿色木霉接种时间的确定

纤维素分解菌与木质素分解菌对秸秆的联合分解能力明显高于任何单一菌株。但是, 双菌作用并不是简单的加和效应^[15]。木霉接种时间对木质纤维素的降解效果, 如图 1 所示。

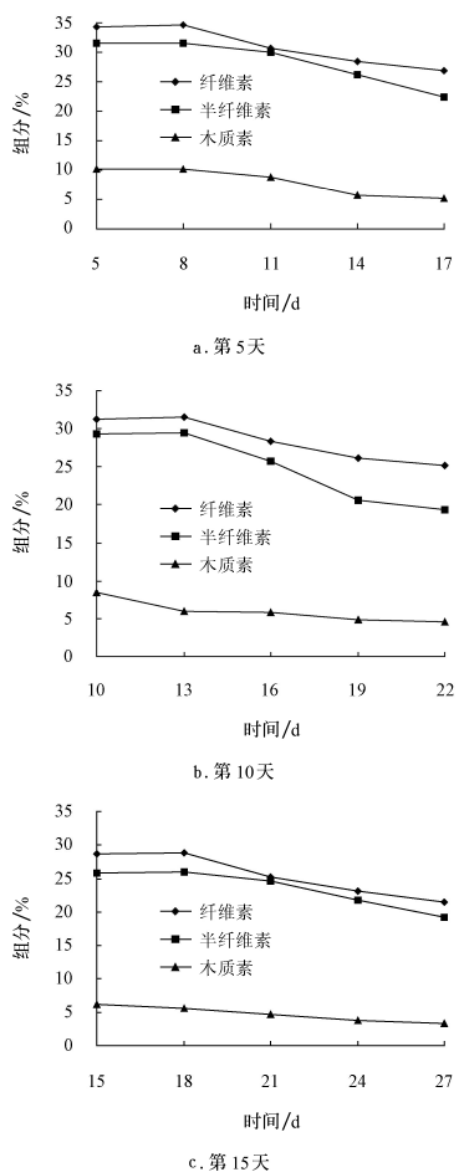


图 1 不同时间接种木霉时木质纤维素质量分数的变化

Fig.1 Variations of lignocellulose content after inoculating *Trichoderma viride* at different time periods

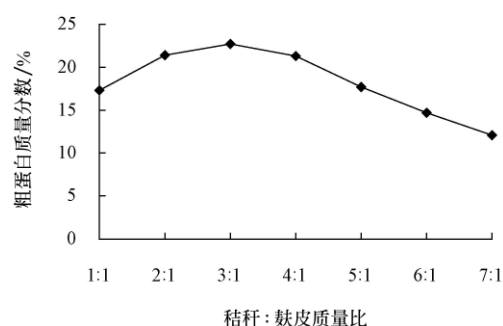
由图 1 可看出: 在 12 d 的共发酵阶段, 纤维素的质量分数分别为 26.9%、25.2%、21.5%, 纤维素的降解率分别为 21.6%、19.2%及 25.1%; 半纤维素质量分数分别为

22.5%、19.3%、19.2%, 半纤维素的降解率分别为 28.8%、34.1%及 25.9%; 木质素的质量分数分别为 5.2%、4.5%、3.3%, 木质素的降解率分别为 49.0%、47.0%及 46.0%。由以上可看出, 接种的时间越长, 各物质质量分数越低, 但降解率的变化却不是如此, 这是因为降解率反映的是酶活力, 酶活力高单位时间产糖就多, 故酵母接种在酶活力高时生长比较好。综合比较各条件的各物质降解率, 纤维素和半纤维素质量分数相近, 且第 10 天接种时的半纤维素降解率相对优势盖过纤维素降解率相对劣势, 而木质素各条件下降解率差不多, 从而确定第 10 天接入绿色木霉进行共降解。

2.2 多菌种共降解玉米秸秆生产蛋白饲料的结果分析

2.2.1 秸秆与麸皮配比对粗蛋白质量分数的影响

按 1.3.2 的方法, 按秸秆: 麸皮不同的质量比 (1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1) 添加麸皮, 考察对粗蛋白质量分数的影响, 结果如图 2。



注: 固液比 1:2, 2%硫酸铵, 酵母接种量 10%, 培养 72 h

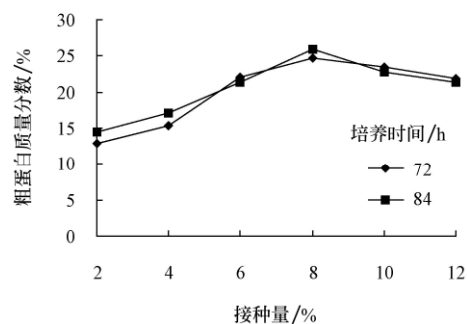
图 2 麸皮添加量对粗蛋白质量分数的影响

Fig.2 Effect of bran content on crude protein content

单纯采用玉米秸秆粉为原料, 其后续发酵的营养得不到充足的供应, 粗蛋白质量分数仅能达到 13%~15%左右。麸皮能为酵母提供必需营养因子, 有利于酵母生长。由图可看出, 秸秆与麸皮配比浓度在 3:1 时, 粗蛋白质量分数达最大值 22.7%。

2.2.2 酵母接种量和培养时间对粗蛋白质量分数的影响

按 1.3.2 的方法, 产阮假丝酵母接种量为 2%、4%、6%、8%、10%、12%, 30℃培养 72 h 或 84 h, 考察接种量和培养时间对粗蛋白质量分数影响, 结果如图 3。



注: 固液比 1:2, 2%硫酸铵, 秸秆与麸皮配比 3:1

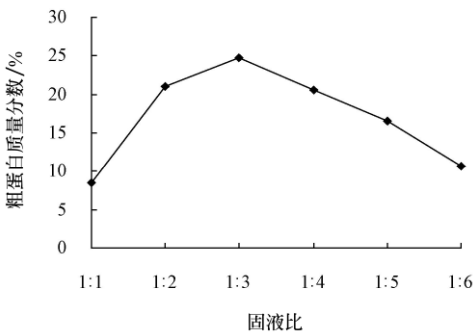
图 3 接种量和培养时间对粗蛋白质量分数的影响

Fig.3 Effect of inoculation content and culture time on crude protein content

可以看出酵母液的接种量对粗蛋白质量分数影响明显。接种量过低时（2%~6%），粗蛋白质量分数不高，延长发酵周期至 84 h 时，粗蛋白质量分数也仅能达到 15%~20%。接种量过大（10%~12%），则会导致培养基中酵母活动旺盛，部分基质的温度升高过快，不利于酵母的进一步生长繁殖。通过不同培养时间看出接种量较小时，可以通过延长培养时间来获得较高的粗蛋白质量分数，但是增幅不大；接种量较大时，延长培养时间反而导致粗蛋白质量分数降低，这可能是部分微生物自溶，小分子蛋白转化成其他微生物的营养底物所致。由图上曲线可知，接种量在 8% 时，培养 72 h 粗蛋白质量分数达 24.7%，培养 84 h 达 26%。故接种量确定为 8%，培养时间 72 h 为佳。

2.2.3 固液比对粗蛋白质量分数的影响

按 1.3.2 的方法，固液比分别为 1：1、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6，考察固液比对粗蛋白质量分数影响，结果如图 4。



注：2%硫酸铵，秸秆与麸皮配比 3：1，接种量 8%，培养 72 h

图 4 固液比对粗蛋白质量分数的影响

Fig.4 Effect of the ratio of substrate to water on crude protein content

加水比过低时，酶不易降解秸秆，营养物不易扩散，对酵母生长不利；加水比过高时，导致物料多孔性降低，空气流通不畅，供氧不足，内部微生物难于生长。由图可知最适加水比为 1：3，粗蛋白质量分数可达 24.8%。

2.2.4 氮源对粗蛋白质量分数的影响

按 1.3.2 的方法，其余条件定为固液比 1：3，秸秆与麸皮配比 3：1，接种量 8%，培养 72 h，采用 2%的硫酸铵、尿素、硝酸铵、酵母浸膏、蛋白胨作为氮源考察氮源对粗蛋白质量分数的影响。结果粗蛋白质量分数分别达到：24.8%、21.8%、22.6%、20.3%、21.3%。由此可知，以硫酸铵为氮源时，粗蛋白质量分数明显高于其他几种氮源；而且使用无机氮源时粗蛋白的平均质量分数也明显高于有机氮源。

2.2.5 多菌种固体发酵条件的优化

选择麸皮用量（A）、酵母接种量（B）、固液比（C）、氮源用量（D）进行四因素三水平正交试验，以粗蛋白质量分数为目标，结果见表 1。

由表 1 可知，各因素影响大小顺序为 A>C>B>D，D 因素对试验结果影响最小，故将其作为误差列进行方差

分析，结果见表 2。

表 1 多菌种发酵条件的正交试验结果与直观分析表

Table 1 Results and visual analysis of orthogonal experiment of fermentation condtions using multi-strain

试验号	A 秸秆：麸皮	B 酵母接种 量/%	C 固液比	D 氮源用 量/%	粗蛋白 质量分 数/%
1	1(2.5：1)	1(7.0)	1(1：2.5)	1(1.5)	20.3
2	1	2(8.0)	2(1：3.0)	2(2.0)	23.6
3	1	3(9.0)	3(1：3.5)	3(2.5)	19.5
4	2(3.0：1)	1	2	3	24.7
5	2	2	3	1	23.4
6	2	3	1	2	21.8
7	3(3.5：1)	1	3	2	18.7
8	3	2	1	3	21.2
9	3	3	2	1	20.9
K ₁	63.4	63.7	63.3	64.6	
K ₂	69.9	68.2	69.2	64.1	
K ₃	60.8	62.2	61.6	65.4	
k ₁	21.333	21.233	21.100	21.533	
k ₂	23.300	22.733	23.067	21.367	
k ₃	20.267	20.733	20.533	21.800	
R	3.033	2.000	2.534	0.433	

表 2 多菌种发酵条件正交试验方差分析表

Table 2 Variance analysis of orthogonal experiment of fermentation condtions using multi-strain

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性	P 值
A	14.647	2	51.035	19	*	<0.05
B	6.5	2	22.648	19	*	<0.05
C	10.607	2	36.958	19	*	<0.05
误差(D)	0.287	2				

通过方差分析可以看出，A、B、C 对试验结果有显著性影响，应选取三者好的水平为 A₂B₂C₂。与氮源用量相比，D 的 R 值也不低，故 D 应选取好的水平 D₃。对方案 A₂B₂C₂D₃ 做 3 组平行验证试验，结果稳定，测得粗蛋白的平均质量分数为 25.3%。故选择 A₂B₂C₂D₃ 方案，即秸秆：麸皮为 3.0：1、酵母接种量 8%、固液比为 1：3.0、硫酸铵用量为 2.5%。

3 结 论

确定了黄孢原毛平革菌、绿色木霉和产朊假丝酵母分步降解玉米秸秆工艺条件：取 40 目秸秆粉 5.0 g，10%的麸皮浸汁 6 mL，葡萄糖 1%，硫酸铵 0.05%，按固液比 1：3.0 加入基础培养液于 250 mL 三角瓶中，调 pH6.0，灭菌，接入黄孢原毛平革菌，置于培养箱，30℃，湿度 86%培养。待发酵第 10 天接入绿色木霉，并添加 1 mL/L 微量元素液进行共发酵 12 d。然后添加秸秆质量 1/3 的麸皮、2.5%硫酸铵、产朊假丝酵母液接种量 8%，继续培养 72 h。粗蛋白质量分数最高可达 25.3%，而处理前秸秆粗蛋白质量分数为 5.70%，是处理前粗蛋白的百分含量 4.44 倍。

多菌种分步降解玉米秸秆具有一定的可行性、实用性, 优于单菌种降解能力。这种工艺为玉米秸秆生物利用提供了一种新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Schingoethe D J, Stegeman G A, Treacher R J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding[J]. American Dairy Science Association, 1999, 82(5): 996—1003.
- [2] Jr K L, Treacher R J, Nauman G A, et al. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows[J]. American Dairy Science Association, 2000, 83(1): 115—122.
- [3] Sheng Z, David B W. Surface residue mutations which change the substrate specificity of *Thermomonospora fusca* endo glucanase E2[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 57(1/2/3): 101—113.
- [4] 黄茜, 黄凤洪, 江木兰, 等. 木质素降解菌的筛选及混合菌发酵降解秸秆的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 66—70.
Huang Qian, Huang Fenghong, Jiang Mulan, et al. The selection of lignin-degrading fungus and the straw fermentation by mixed strains[J]. China Biotechnology, 2008, 28 (2): 60—70. (in Chinese with English abstract)
- [5] 陈敏. 糙皮侧耳和康氏木霉二步混合发酵生产饲料蛋白的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 27—30.
Chen Min. Study on forage protein production by two-step mixed culture fermentation with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma koningii*[J]. Journal of Microbiology, 2002, 22(1): 27—30. (in Chinese with English abstract)
- [6] Lee J W, Kim H Y, Koo B W, et al. Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2008, 106(2): 162—167.
- [7] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007, 108: 41—65.
- [8] Sukumaran R K, Singhanian R R, Mathew G M, et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanolproduction[J]. Renewable Energy, 2009, 34(2): 421—424.
- [9] 林琳, 黄达明, 姜松. 固态发酵蛋白饲料生产工艺的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2005, (7): 83—85.
- [10] 陈合, 张强. 菌酶共降解玉米秸秆的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 270—273.
Chen He, Zhang Qiang. Technology for co-degradation of corn stalk by microorganism and enzyme[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008, 24(3): 270—273. (in Chinese with English abstract)
- [11] 陈合, 张强. 酶菌共降解秸秆应用技术研究[D]. 西安: 生命科学与工程学院, 陕西科技大学, 2007.
Chen He, Zhang Qiang. Study on co-degradation of corn stalk by enzymes and microorganisms[D]. Xi'an: College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [12] Rani P, Kalyani N, Prathiba K. Evaluation of lignocellulosic wastes for production of edible mushrooms[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 151(2/3): 151—159.
- [13] 赵林果, 金耀光, 李强, 等. 白腐菌及黑曲霉所产的纤维素复合酶对稻草秸秆的生物降解[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(3): 71—75.
Zhao Linguo, Jin Yaoguang, Li Qiang, et al. Rice straw degradation with white rot fungi and cellulose multienzyme produced by *aspergillus niger*[J]. China Biotechnology, 2007, 27(3): 71—75. (in Chinese with English abstract)
- [14] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

Technology for producing protein feed from corn stover by multi-strain distributional degradation

Chen he, Yu Jianjun^{*}, Shu Guowei, Zhang Qiang

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: The technology of producing protein feed from distributional degradation of corn stalk by multi-strain was studied. Most of lignin was degraded through solid fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*. Then *Trichoderma viride* was vaccinated for further degradation of lignocellulose. Protein feed was produced by adding *Candida utilis*. The results manifested that the optimal technical conditions were as follows: *Trichoderma viride* inoculation time was the 10th day; fermentation time was 12 days; After the bran was added into stalk by the ratio of 1 : 3.0, the best technical conditions were yeast inoculation 8%; mixture ratio of solid to liquid 1 : 3.0; addition volume of ammonium sulfate 2.5%, continuous fermentation time 72 h. Under the optimal conditions, the content of crude protein was up to 25.3%. The results show that distributional degradation technology of producing protein feed by multi-strain provides a new method for utilization of corn stalk.

Key words: straw, degradation, technology, corn, multi-strain, protein feed