

甜高粱茎秆残渣生料多菌种固态发酵生产蛋白饲料

杨 森¹, 王石垒¹, 张 雷¹, 赵宏军², 谢 慧¹, 王风芹¹, 陈红歌¹, 宋安东^{1*}

(1. 河南农业大学生命科学学院农业部农业微生物工程重点实验室, 郑州 450002;

2. 洛阳市光瑞农业科技有限公司, 洛阳 471100)

摘 要: 为实现甜高粱茎秆残渣生产蛋白饲料的规模化应用, 该研究将黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 和干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 进行优化组合, 添加不同质量分数尿素对甜高粱茎秆残渣进行生料固态发酵生产蛋白饲料。试验通过对比发酵前后粗蛋白、真蛋白、粗灰分和粗脂肪质量分数变化发现: 添加4种菌的复合菌株, 再添加1%尿素发酵8d后能使以甜高粱茎秆残渣为底物的饲料中纤维素由33.00%降低至24.09%, 半纤维素由20.99%降低至17.69%; 粗蛋白质量分数由2.27%提升至7.14%, 真蛋白由2.01%提升至6.41%。该研究简化了甜高粱秸秆残渣规模化生产饲料蛋白的工艺, 为该工艺的推广应用奠定基础。

关键词: 秸秆; 蛋白; 发酵; 饲料; 混合菌株; 生料固态发酵

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.042

中图分类号: S566.5; S963.5; S816.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2015)-15-0309-06

杨 森, 王石垒, 张 雷, 赵宏军, 谢 慧, 王风芹, 陈红歌, 宋安东. 甜高粱茎秆残渣生料多菌种固态发酵生产蛋白饲料[J]. 农业工程学报, 2015, 31(15): 309-314. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.042 http://www.tcsae.org
Yang Sen, Wang Shilei, Zhang Lei, Zhao Hongjun, Xie Hui, Wang Fengqin, Chen Hongge, Song Andong. Producing protein feedstuff by multiple strains solid-state fermentation with raw sweet sorghum stalk residue[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(15): 309-314. (in Chinese with English abstract)
doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.042 http://www.tcsae.org

0 引 言

甜高粱 (*sweet sorghum*) 是普通高粱的一个变种^[1]。甜高粱每公顷能产 60 000~90 000 kg 富含 18%~24%糖分的茎秆^[2], 其糖液可用来制糖、生产燃料乙醇等, 而压榨后的甜高粱茎秆残渣则大多都作为废弃物被处理掉。甜高粱茎秆残渣中仍含有部分脂肪、蛋白质、粗纤维等碳水化合物, 因此甜高粱秸秆残渣可用于制作蛋白饲料^[3]。目前中国畜牧业中饲料粮比例已占到粮食总产量的36%, 预计今后还会有大幅度增长, 人畜争粮争地的矛盾将日益凸显, 因此利用废弃甜高粱残渣为草食性畜禽提供蛋白饲料不仅能大大降低畜牧业饲料成本, 还能有效缓和人畜争粮的突出矛盾^[4-5]。

通过菌株自身酶系来降解木质纤维素是降低饲料生产成本的重要手段之一。里氏木霉的纤维降解酶产量高、组分全, 是生产纤维素酶的常用菌种^[6], 但里氏木霉存在 β -葡萄糖苷酶 (β -D-Glucosidase, β -GA) 活力较低, 导致纤维二糖积累, 降低酶解效率的缺点^[7], 而将黑曲霉与里

氏木霉混合发酵则可弥补里氏木霉 β -GA 酶活力较低下的缺陷^[8]。产朊假丝酵母能以铵态氮和硝态氮为氮源, 在培养基中不需要加入任何生长因子即可利用五碳糖和六碳糖等, 生产出人畜可食用的蛋白质, 并且有研究表明: 尿素在占饲料干物质的1%以下时可替代部分天然蛋白饲料, 不仅能降低饲料成本, 而且能提高肉牛的生长性能, 对于牛肉安全不会造成危害^[9]。干酪乳杆菌的降氮能力较强平均达85.9%^[10], 能增加饲料中氨基态氮的质量分数且品质较高^[11], 可提高蛋白饲料的适口性。目前, 尽管采用生料多菌株固态发酵的方式生产蛋白饲料的研究报道很多, 如陈合等^[12]、负建民等^[13]和孙清等^[14], 但都普遍存在操作复杂、外加氮源比例过大以及未测定真蛋白等问题。因此通过外加尿素, 利用甜高粱茎秆残渣进行多菌株生料固态发酵生产蛋白饲料, 工艺简单, 适于规模化生产, 为缓解蛋白饲料供需紧张提供了一种新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 甜高粱残渣

辽甜三号(洛阳光瑞农业科技公司提供), 粉碎至 ≤ 4 cm。

1.1.2 菌种

产朊假丝酵母 (*C. utilis*)、黑曲霉 (*A. niger*)、里氏木霉 (*T. reesei*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*), 均为实验室自藏菌种。

1.1.3 培养基

PDA (potato dextrose agar, PDA) 培养基、牛肉膏

收稿日期: 2015-04-13 修订日期: 2015-06-19

基金项目: 河南省产学研合作项目 (132107000036); 河南省高校科技创新团队支持计划 (15IRTSTHN014)。

作者简介: 杨森, 男 (汉族), 河南南阳人, 讲师, 博士, 有机固体废弃物资源化利用。郑州 河南农业大学生命科学学院, 450002。

Email: yangsen7676@126.com。

*通信作者: 宋安东, 男 (汉族), 河南益阳人, 教授, 博士, 主要从事农业生物质转化和生物能源技术研究。郑州 河南农业大学生命科学学院, 450002。Email: song1666@126.com。

蛋白胨培养基、MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, MRS) 培养基。

1.2 主要试验仪器

FZ102 型微型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)、LRH-250-G 型光照培养箱 (广东省医疗器械厂)、DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱 (郑州南北仪器设备有限公司)、SHZ-III 型循环水真空泵 (巩义市英峪仪器厂)、XL-1 型箱形高温炉 (鹤壁盛华实验仪器厂)、KDY-08C (B-II) 消化炉 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司)、KDY-08C 凯氏定氮仪 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司)、HH-4 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)、DIONEX P680 高效液相色谱仪 (戴安设备公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 营养成分的测定

水分的测定 (直接干燥法, GB/T 6435-2006)、粗灰分的测定 (GB/T 6438-2007)、粗蛋白的测定 (凯氏定氮法, GB 5009.5-2010)、粗脂肪的测定 (索氏提取法, GB/T 5009.6-2003)、真蛋白的测定^[12] (凯氏定氮法, GB 5009.5-2010)。

1.3.2 纤维素、半纤维素、木质素 (三素) 的测定

称取过 60 目筛的试样 0.5 g (m_0) 移入试管中, 加入 3.00 mL 72% 的浓硫酸, 30℃ 水浴 1 h; 将试管中的水解液转移至 100 mL 的三角瓶中, 使水的总量为 84 mL, 称量其质量。取 10 mL 糖标准回收液于另外的三角瓶中, 于 121℃ 下保温 50 min, 待三角瓶降至室温后称其质量, 加水至灭菌前的质量, 用砂芯漏斗过滤得残渣和滤液。用蒸馏水水洗漏斗中的固体残渣至中性, 105℃, 1 h 烘干滤渣, 将固体残渣转移到已恒质量的坩埚中, 105℃ 烘 3 h, 称取物料质量 (m_1)。将坩埚放入马弗炉中, 先在 250℃ 下保温 20 min 再升温至 550℃ 灼烧 1 h, 放入干燥器中冷却至室温后称物料质量 (m_2); 取 5 mL 滤液, 用 10 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 2.0~2.5, 稀释至 10 mol/L, 用 HPLC 测糖浓度 ($C_{HPLC,X}$) 计算:

$$\text{单糖浓度 } C_X = C_{HPLC,X} \times \text{稀释倍数} / R_{\text{ave, sugar}}$$
$$\text{纤维素 (\%)} = C_{\text{glu}} \times 87 \times 10^{-3} \times 0.90 / m_0 \times 100\%$$
$$\text{半纤维素 (\%)} = (C_{\text{xy1}} + C_{\text{ara}}) \times 87 \times 10^{-3} \times 0.88 / m_0 \times 100\%$$
$$\text{木质素 (\%)} = (m_1 - m_2) / m_0 \times 100\%$$

式中: $R_{\text{ave, sugar}}$: 标准单糖平均回收率=稀酸处理后糖液浓度/稀酸处理前糖液浓度; C_{glu} : 葡萄糖浓度, g/L; C_{xy1} : 木糖浓度, g/L; C_{ara} : 阿拉伯糖浓度, g/L; $C_{\text{xy1}}+C_{\text{ara}}$: 由于玉米、甘蔗、稻谷等草本类植物中, 木糖、阿拉伯糖是形成半纤维素的主要单糖, 因此以木糖和阿拉伯糖之和来计算半纤维素的质量分数^[11]。

1.3.3 种子液制备

将已经活化的 *A. niger* 和 *T. reesei* 2 种菌株分别涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 28℃ 培养 3 d, 待菌丝生长旺盛, 关闭培养箱促进孢子产生, 孢子成熟后刮取相应孢子于无菌水中, 孢子数为 10^8 个/mL 即为所需孢子悬液。将已经活化的 *C. utilis* 菌株涂布于 PDA 培养基, 28℃ 培

养 3 d, 将菌落刮入无菌水中, 活菌数达到 10^{10} 个/mL 即为所需菌悬液。挑取 *L. casei* 活化菌株接种于乳酸细菌培养基, 30℃ 厌氧培养 3 d, 将菌落刮入无菌水中, 活菌数达到 10^{10} 个/mL 即为所需菌悬液, 宋向阳^[15]等利用黑曲霉与里氏木霉产 β -GA 时进行了不同比例的菌种组合, 其酶活提升效果不明显, 因该研究按照易操作的原则选择等比例添加 4 种菌株。

1.3.4 复合菌株的固态发酵

按 10% 的接种量将 1.3.3 中制备的 4 种菌与 25 g 物料、70% 的水和 0 (对照)、1%、3% 的尿素, 搅拌均匀, 装入 500 mL 三角瓶中, 每组 3 个平行, 30℃ 下静置发酵 6 d。

上述试验结果均采用 SPSS 19.0 进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 发酵前甜高粱茎秆残渣理化性质

试验所用甜高粱茎秆残渣经过压榨, 其含水率较新鲜甜高粱^[16-17] (68%~76% 的含水率) 有所降低, 而残渣中的可溶性残糖仍可用于菌株初始阶段的生长使用。

表 1 甜高粱茎秆残渣各理化性质
Table 1 Various physical and chemical properties of sweet sorghum stalk residues

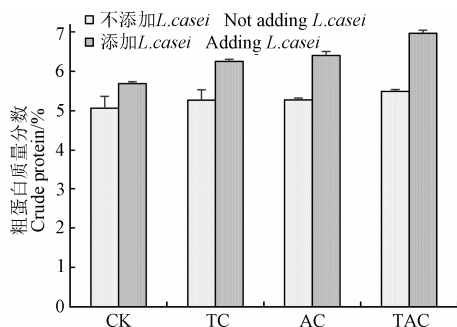
成分 Ingredients	质量分数 Content/%	成分 Ingredients	质量分数 Content/%
总水分 Total water	45.58±0.20	干物质 Dry matter	54.42±0.20
粗灰分 Crude ash	3.41±0.15	粗蛋白 Crude protein	2.27±0.006
粗脂肪 Crude fat	1.83±0.17	纤维二糖 Cellobiose	1.204±0.101
纤维素 Cellulose	33.000±3.880	葡萄糖 Glucose	4.295±0.015
半纤维素 Hemicellulose	20.990±2.274	木糖 Xylose	4.801±0.059
木质素 Xylogen	19.762±2.418	阿拉伯糖 L-arabinose	0.151±0.001

注: 总水分、干物质的质量分数基于湿物料进行计算, 其余成分的测定基于 105℃ 烘干物料进行计算。
Note: Total water and dry matter are based on the wet matter to calculate and the other ingredients are based on the dry matter under the 105℃ to calculate.

2.2 不同菌种组合中粗蛋白含量

将黑曲霉 (*A. niger*)、里氏木霉 (*T. reesei*)、产阮假丝酵母 (*C. utilis*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*) 4 种菌株按不同的组合进行混合发酵培养, 发现其蛋白质含量均有不同程度的提高 (图 1)。在不添加 *L. casei* 的组合中, CK (空白对照)、*T. reesei*、*C. utilis*、*A. niger*、*C. utilis* 和 *A. niger* *T. reesei*、*C. utilis* 中相邻组合中粗蛋白质量分数提升不显著 ($P>0.05$), 粗蛋白质量分数由对照的 5.07% 提升到 *A. niger* *T. reesei*、*C. utilis* 组合中的 5.49%; 在添加 *L. casei* 的组合中, 除 *T. reesei*、*C. utilis* 和 *A. niger* *C. utilis* 组合中粗蛋白质量分数提升为显著 ($P<0.05$) 外, 其余组都极显著 ($P<0.01$)。粗蛋白质量分数由对照的 5.69% 提升到 *A. niger* *T. reesei*、*C. utilis* 组合中的 6.97%; 添加 *L. casei* 与不添加 *L. casei* 的组合相比, 其粗蛋白质量分数的提升都极显著 ($P<0.01$)。与原始物料中 2.27% 的粗蛋白质量分数相比, *A. niger*、*T. reesei*、*C. utilis*、*L. casei*

的组合中粗蛋白提升了 4.70%，表明以这种方式组合起来的菌株其协同作用要优于其他组合形式的菌株。



注：CK：添加与菌液等量无菌水的空白对照；A：黑曲霉；T：里氏木霉；C 产朊假丝酵母；L：干酪乳杆菌。下同。
Note: CK: It is blank control with the same amount of sterile water to replace microbial; A: *Aspergillus niger*; T: *Trichoderma reesei*; C: *Candida utilis*; L: *Lactobacillus casei*. The same as below.

图 1 不同菌株组合粗蛋白含量比较

Fig.1 Comparison of crude protein content under different strains combination

2.3 不同菌株组合中纤维素、半纤维素和木质素含量的变化

发酵结束后对粗蛋白含量提高显著的菌株组合进行了三素含量的测定（图 2），结果表明随着粗蛋白含量的提升物料中纤维素、半纤维素含量呈下降趋势，而木质素含量则呈上升趋势。对照组三素与粗蛋白含量最高的 *A. niger*、*T. reesei*、*C. utilis*、*L. casei* 组合中三素相比：纤维素质量分数由 33.00%降低至 24.09%，具有极显著性差异（ $P < 0.01$ ）；半纤维素质量分数由 20.99%降低至 17.69%，具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）；木质素质量分数由 19.76%提高至 21.77%，具有极显著性差异（ $P < 0.01$ ）。其中三素的总质量分数由 73.75%降低至 63.55%，具有极显著性差异（ $P < 0.01$ ）。

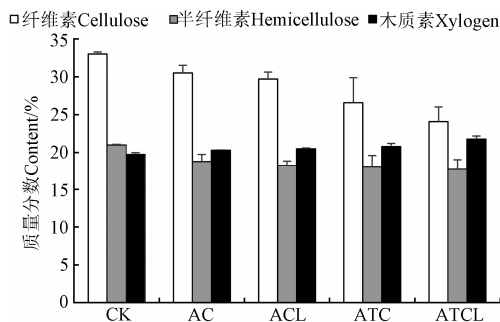


图 2 不同菌株组合中三素含量的变化

Fig.2 Changes of cellulose, hemicellulose and xylogen's content under different strains combination

由于甜高粱茎秆残渣的主要成分为木质纤维素，其结构复杂，难于分解^[18]。有研究表明，利用单菌或单酶对未经处理的纤维素材料进行降解非常困难^[19-20]。因此，在自然状态下彻底降解纤维素，要充分重视多种微生物之间的协同作用。黑曲霉^[8,20-21]和里氏木霉^[7,22]是 2 种已知的总产酶比较丰富的菌种，可以产纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、果胶酶等，并且它们既利用木质纤维素水解转化得到的六碳糖，也利用五碳糖^[20]可以达到对碳源的一种

充分利用。产朊假丝酵母具有较广的营养谱，既可以利用五碳糖，也可以利用六碳糖^[23]。通过对比分析发酵结束后物料的三素质量分数变化发现，其结果符合最初选择目的菌株的设想，即通过组合菌株自身的酶系来降解纤维素、半纤维素是可行的。而木质素升高的原因可能为菌体对木质素的降解能力差导致其相对质量分数的升高。

2.4 不同菌株组合中灰分和粗脂肪的变化

发酵结束后测定了粗蛋白含量最高的 *A. niger*、*T. reesei*、*C. utilis*、*L. casei* 组合中的粗灰分与粗脂肪的含量（图 3）。在粗灰分测定中对比不添加 *L. casei* 和添加 *L. casei* 的组合，发现粗灰分由对照组的 3.41%，分别提高至 4.52% 和 3.82%（图 3a）；在粗脂肪的测定中对比不添加 *L. casei* 和添加 *L. casei* 的组合，粗脂肪由 1.83% 分别提高至 3.25% 和 2.66%（图 3b）。表明 *L. casei* 的添加虽然能大幅度提高饲料中粗蛋白的含量，但 *L. casei* 也可分解饲料中的粗脂肪，降低饲料中粗脂肪的含量^[10]。

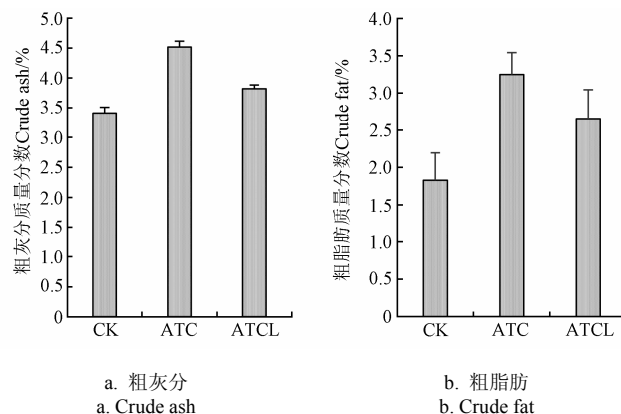


图 3 不同菌株组合中粗灰分与粗脂肪含量的变化

Fig.3 Changes of crude ash and crude fat content under different strains combination

2.5 不同浓度尿素添加量下粗蛋白和真蛋白含量变化

甜高粱茎秆（105℃烘干物料，下同）中原始粗蛋白量较低仅为 2.27%，为提高其发酵结束时粗蛋白含量，特进行了低浓度的尿素添加试验（图 4）。

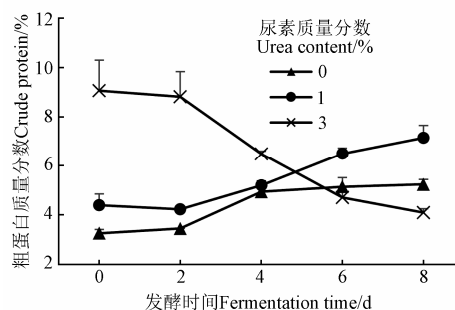


图 4 不同含量尿素添加在不同时间发酵条件下粗蛋白含量的变化

Fig.4 Changes of crude protein under different levels of urea content and different time of fermentation conditions

如图 4 所示：在无尿素添加条件下，发酵 8 d 结束后饲料中粗蛋白质量分数由 3.26% 提高至 5.24%；在 1% 尿素添加量的条件下，发酵 8 d 结束后饲料中粗蛋白质量分

数由 4.39% 提高至 7.14%，其 8 d 发酵结束时粗蛋白质量分数与不添加尿素发酵 8 d 时粗蛋白质量分数相比其结果差异极显著 ($P < 0.01$)；在尿素添加量为 3% 时，随着时间的增加，粗蛋白的含量逐渐下降，其 8 d 发酵结束时粗蛋白含量与不添加尿素发酵开始时粗蛋白含量相比，其粗蛋白含量差异仅显著 ($P < 0.05$)。结果表明：添加 1% 的低浓度的尿素能极显著地提升饲料中粗蛋白含量；添加 3% 的高浓度尿素时，尿素的存在会抑制菌体的生长，大量氨的生成会造成菌体的死亡，无法提高最终饲料中粗蛋白含量，这与郭天财等^[24]的研究结果相同，即低浓度尿素使用有益于微生物数量的提高，高浓度则造成微生物数量的下降。

选择测定未处理原料、不添加尿素和 1% 尿素添加处理在发酵第 8 天时真蛋白含量和粗蛋白含量 (图 5)。未处理原料组中粗蛋白和真蛋白质量分数分别为 2.27% 和 2.01%；未添加尿素组中粗蛋白和真蛋白质量分数分别为 5.24% 和 4.84%；1% 尿素添加组中粗蛋白和真蛋白质量分数分别为 7.14% 和 6.41%。说明 1% 尿素添加组中发酵结束仍有部分非蛋白氮存在，但其真蛋白质量分数仍然比同条件下不添加尿素的组合高出 32.4%，因此通过外加尿素可以成功地将尿素转化为真蛋白，且在 0~1% 的尿素质量分数添加范围内随着尿素含量的增加，真蛋白含量也极显著地增加 ($P < 0.01$)。其原因在于 *A. niger*、*T. reesei*^[25] 是已知的可以直接利用尿素作为氮源，*C. utilis* 既可以利用无机氮源，也可以利用有机氮源^[23]，因此尿素作为一种有机氮源和速效氮源在低浓度下可以直接被 *A. niger*、*T. reesei*、*C. utilis* 所利用。

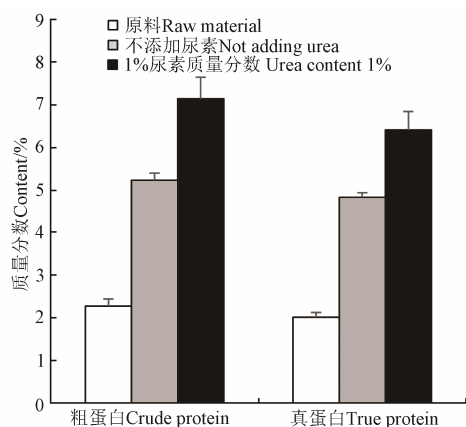


图 5 不同尿素添加条件下粗蛋白和真蛋白的变化

Fig.5 Change of crude protein and true protein under different levels of urea added

3 讨论

有学者研究发现在秸秆发酵生产蛋白饲料的过程中添加大量尿素可在短时间内使粗蛋白由 2.01% 提高到 21.43%^[26]，但是，一般粗蛋白的测定方法受尿素含量影响很大，测定结果中的粗蛋白含量并不一定都是积累的真蛋白。相反，尿素在瘤胃内水解速度过快，进入瘤胃后几分钟即开始分解，0.5 h 氨浓度即可达到峰值^[27]，过剩的氨会进入动物的血液中，轻则影响动物内脏的正常

机能，重则导致动物氨中毒死亡^[28]，这也是将尿素在动物体外利用微生物合成蛋白饲料，以及本试验测定发酵后蛋白饲料中真蛋白含量的重要原因之一。有研究表明，1% 的尿素添加量对肉牛的生长性能有正面效应。

而对于单一饲料营养有限的缺点，将其与具有不同功能的饲料，如豆粕、青贮、精饲料等进行复配也是提高甜高粱茎秆残渣蛋白饲料整体品质的一种方法。一方面是甜高粱茎秆残渣的大量废弃，另一方面是畜牧业对蛋白饲料的巨大缺口，将两者有机结合起来生产蛋白饲料终将积极促进农村和国民经济的发展，其发展前景也十分可观。

4 结论

本文以降低成本、缩短发酵时间、适量补充廉价的尿素等方面为出发点，以废弃物甜高粱茎秆残渣为底物，添加复合菌株、1% 的尿素，生料固态发酵 8 d 来制取蛋白饲料，不仅实现了废弃资源的再利用，还提高它作为饲料的营养价值。通过此方法使饲料中粗蛋白和真蛋白的质量分数比原料中质量分数分别提高了 4.87% 和 4.40%；纤维素和半纤维素的降低率分别为 27.00% 和 15.72%。

【参考文献】

- [1] Ritter K B, McIntyre C L, Godwin I D, et al. An assessment of the genetic relationship between sweet and grain sorghums, with *Sorghum bicolor ssp. Bicolor* (L.) Moench, using AFLP markers[J]. Euphytica, 2007, 157(1/2): 161–176.
- [2] 张志鹏, 杨镇, 朱凯, 等. 可再生能源作物-甜高粱的开发利用[J]. 杂粮作物利用, 2005, 25(5): 334–335.
Zhang Zhipeng, Yang Zen, Zhu Kai, et al. The development and utilization of renewable energy crops - sweet sorghum[J]. Rain Fed Crops, 2005, 25(5): 334–335. (in Chinese with English abstract)
- [3] 赵凯, 马龙彪, 耿贵, 等. 能源作物甜高粱的综合开发与利用[J]. 中国糖料, 2008(3): 67–71.
Zhao Kai, Ma Longbiao, Geng Gui, et al. Comprehensive development and utilization of sweet sorghum energy crops[J]. Sugar Crops of China, 2008(3): 67–71. (in Chinese with English abstract)
- [4] 许云麒, 弓子敬, 李清华. 发展草产业是解决人畜争粮的有效途径[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(8): 70–71.
Xu Yunqi, Gong Zijong, Li Qinghua. The development of farming-stockbreeding interlacing zones are the effective ways to solve human and animal for food[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2011, 32(8): 70–71. (in Chinese with English abstract)
- [5] 竟丽丽, 孙学永, 高正良, 等. 安徽省发展高能作物甜高粱的必要性与可行性分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(13): 7632–7634.
Jing Lili, Sun Xueqing, Gao Zhengliang, et al. Analysis on necessity and feasibility of the development of energy intensive crops-Sweet sorghum in Anhui province[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(13): 7632–7634. (in Chinese with English abstract)

- [6] Suurnakki A, Tenkanen M. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp[J]. Kluwer Academic Publishers, 2000, 7(2): 189—209.
- [7] 曹健, 郭德宪, 曾实, 等. 一株里氏木霉产纤维素酶的条件及酶系的优化[J]. 郑州工程学院学报, 2003, 24(1): 10—14. Cao Jian, Guo Dexian, Zeng Shi, et al. A strain magnitude of *trichoderma viride* produces the conditions of the cellulose enzyme and enzyme system optimization[J]. Journal of Zhengzhou Industry University, 2003, 24(1): 10—14. (in Chinese with English abstract)
- [8] 高星星, 潘丽军, 杨培周, 等. 里氏木霉与黑曲霉混合发酵产纤维素酶的条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 193—198. Gao Xingxing, Pan Lijun, Yang Peizhou, et al. *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* mixed fermentation of cellulase production optimization[J]. Food Science, 2012, 33(19): 193—198. (in Chinese with English abstract)
- [9] 江兰, 孟庆翔. 尿素作为非蛋白氮饲料饲喂肉牛的研究进展[J]. 饲料研究, 2011(8): 62—64. Jiang Lan, Meng Qingxiang. The research progress of urea as non-protein nitrogen feed feeding cattle[J]. Feed Research, 2011(8): 62—64. (in Chinese with English abstract)
- [10] 王震, 许丽娟, 刘标, 等. 培养条件对于酪乳杆菌生长及降氨能力的影响[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(7): 135—137. Wang Zhen, Xu Lijuan, Liu Biao, et al. Culture conditions on the effect of *Lactobacillus casei* growth and ammonia capacity reduction[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(7): 135—137. (in Chinese with English abstract)
- [11] 赵红霞, 詹勇, 许梓荣. 乳酸菌的研究及其应用[J]. 江西饲料, 2003(1): 9—12. Zhao Hongxia, Zhan Yong, Xu Xinrong. The research and application of *Lactic acid bacteria*[J]. Jiangxi Feed, 2003(1): 9—12. (in Chinese with English abstract)
- [12] 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 Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2009, 25(12): 331—334. (in Chinese with English abstract)
- [13] 俞建民, 刘陇生, 安志刚, 等. 马铃薯淀粉渣生料多菌种固态发酵生产蛋白饲料工艺[J]. 农业工程学报, 2010, 26(增刊 2): 399—404. Yun Jianmin, Liu Longsheng, An Zhigang, et al. Technology of single cell protein feed production from raw potato starch residue by multi-strains solid fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(Transactions of the CSAE), 2010, 26(Supp.2): 399—404. (in Chinese with English abstract)
- [14] 孙清, 敖永华. 甜高粱秸秆残渣生产蛋白饲料的研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(1): 61—65. Sun Qing, Ao Yonghua. Sweet sorghum straw residue in the production of protein feed[J]. Scientia Agricultural Sinica, 2001, 34(1): 61—65. (in Chinese with English abstract)
- [15] 史通, 宋向阳, 欧阳嘉, 等. 黑曲霉与里氏木霉混合发酵产 β -葡萄糖苷酶[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(5): 101—105. Shi Tong, Song Xiangyang, Ou Yangjia, et al. *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* mixed fermentation β -glucosidase[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, (in Chinese with English abstract)
- [16] 胡艳丽, 王克然. 饲料中真蛋白的测定[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 28(10): 31—32. Hu Yanli, Wang Keran. The determination of true protein in the feed[J]. Henan Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2007, 28(10): 31—32. (in Chinese with English abstract)
- [17] 康利平, 刘莉, 刘萍, 等. 甜高粱茎秆固态发酵生产燃料乙醇研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(7): 181—184. Kang Liping, Liu Li, Liu Ping, et al. Production of fuel ethanol from sweet sorghum stalks by solid-state fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2008, 24(7): 181—184. (in Chinese with English abstract)
- [18] Vikman M, Karjomaa S, Kapanen A, et al. The influence of lignin content and temperature on the biodegradation of lignocellulose in composting conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 591—598.
- [19] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 51(1): 133—142.
- [20] 朴哲, 崔宗均, 苏宝琳. 高效稳定纤维素分解菌复合系 MCI 的酶活特性[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(1): 59—61. Pu Zhe, Cui Zongjun, Su Baolin. Highly efficient and stable cellulose-decomposing bacteria activity characteristics of the composite system MCI[J]. Journal of China Agricultural University 2003, 8(1): 59—61. (in Chinese with English abstract)
- [21] 李明. 纤维素产葡萄糖异构酶的发酵研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013. Li Ming. Cellulose Production Fermentation of Glucose Isomerase[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [22] 徐勇, 华凤飞, 朱均均, 等. 里氏木霉液体发酵选择性合成果胶酶[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2012, 36(1): 93—96. Xu Yong, Hua Fengfei, Zhu Junjun, et al. *Trichoderma reesei* liquid fermentation selective synthesis of pectinase[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition, 2012, 36(1): 93—96. (in Chinese with English abstract)
- [23] 聂敏, 卫功元, 邵娜, 等. 氮源及碳氮比对产朊假丝酵母合成谷胱甘肽的影响[J]. 生物加工过程, 2010, 8(2): 23—29. Nie Min, Wei Gongyuan, Hao Na, et al. Effect of nitrogen and carbon-nitrogen ratio of *Candida utilis* Glutathione[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(2): 23—29. (in Chinese with English abstract)

- [24] 马冬云, 郭天财, 宋晓, 等. 尿素施用量对小麦根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响[J]. 生态学, 2007, 27(12): 5222—5228.
Ma Dongyun, Guo Tiancai, Song Xiao, et al. Effects of Urea Fertilizer on wheat rhizosphere soil microbial quantity and enzyme activities[J]. Ecology, 2007, 27(12): 5222—5228. (in Chinese with English abstract)
- [25] 田晔. 里氏木霉 FS10-C 强化修复铜污染土壤的研究[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2012.
Tian Ye. Repairing Copper Contaminated Soil *Trichoderma Reesei* FS10-C Strengthen[D]. Huainan: Anhui University of Science & Technology, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [26] 万伶俐, 王晓阳, 魏炳栋, 等. 尿素缓释技术在反刍动物饲料中应用研究进展[J]. 农业与技术, 2007, 27(2): 71—73.
Wan Lingli, Wang Xiaoyang, Wei Bingdong, et al. Urea release technique advances in ruminant feed [J]. Agriculture & Technology, 2007, 27(2): 71—73. (in Chinese with English abstract)
- [27] 何君宏. 牛尿素中毒的诊断与治疗[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014(5): 178.
He Junhong. Diagnosis and treatment of cattle urea poisoning[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Digest, 2014(5): 178. (in Chinese with English abstract)
- [28] 边文祥, 田瑞华, 段开红, 等. 甜高粱秸秆酒糟复合饲料的初步研制[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(1): 37—40.
Bian Wenxiang, Tian Ruihua, Duan Kaihong, et al. Preliminary development of sweet sorghum straw vinasse compound feed[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2010, 31(1): 37—40. (in Chinese with English abstract)

Producing protein feedstuff by multiple strains solid-state fermentation with raw sweet sorghum stalk residue

Yang Sen¹, Wang Shilei¹, Zhang Lei¹, Zhao Hongjun², Xie Hui¹, Wang Fengqin¹, Chen Hongge¹, Song Andong^{1*}

(1. Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Luoyang Guangrui Agricultural Science & Technology Co., Ltd. Henan Luoyang 471100, China)

Abstract: Sweet sorghum is a high-energy crop which has many applications, such as producing sugars and fuel ethanol. The sweet sorghum stalk residues are discarded as waste. However, there are fat, protein, crude fiber and other carbohydrates in stalk residues which can be used to make protein feedstuff. To achieve the rapid promotion and large-scale application of producing protein feedstuff using sweet sorghum stalk residues, the solid state fermentation system was used. First, the physical and chemical parameters of the sweet sorghum stalk residues were determined, the total content of cellulose, hemicellulose and lignin was 73.75% (dry weight, the same below) and the crude protein content was 2.27%. Secondly, the combination of *Aspergillus nige*, *Trichoderma reesei*, *Candida utilis* and *Lactobacillus casei* was optimized. The optimal combination of the strains was selected based on the component change of crude protein, cellulose, hemicellulose, lignin, crude ash and crude fat. The results showed that the fermentation after adding 4 strains was proper. In this condition, the cellulose content decreased by 27.0%, and the hemicellulose content decreased by 15.72%. The crude protein content in the combination added with *Lactobacillus casei* increased by 26.96%, the crude ash content decreased by 15.49% and the crude fat decreased by 18.15%, compared with those without adding *Lactobacillus casei*. Third, based on the optimal combination of the strains, 1% and 3% urea were respectively added in the sweet sorghum stalk residues to confirm the optimal content of urea. It indicated that the contents of crude protein and true protein were significantly improved with the addition of 1% urea. The true protein content was increased by 21.90% compared with that without the addition of urea under the same condition. In conclusion, the crude protein content of sweet sorghum stalk residues increased from 2.27% to 7.14% and its true protein increased from 2.01% to 6.41% after 8 days under the raw solid state fermentation along with inoculating 4 strains and adding 1% urea. This study provides an effective process to produce protein feedstuff from the raw sweet sorghum stalk residues feasibly on a large scale. It is helpful to explore an alternative of protein feedstuff in the animal husbandry industry. On the other hand, this can alleviate the environmental pollution caused by the accumulation of the sweet sorghum stalk residues, and has a very promising future.

Key words: straw; protein; fermentation; feedstuff; mixed strains; solid state fermentation of raw material