

微生物发酵稻草生产饲料蛋白培养条件的研究

陈敏¹ 吴雪昌²

(杭州师范学院生物系 杭州 310012)¹ (浙江大学生命科学院 杭州 310012)²

摘要: 研究了糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 和康氏木霉 (*Trichoderma Koningii*) 发酵稻草生产饲料蛋白的培养条件。在实验室条件下, 培养基的基本组成为稻草 80g, 麸皮 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, 葡萄糖 2g, KH_2PO_4 1g。原料: 水为 1:3, pH5.5~6.0, 接种量 10%, 培养温度 28℃~30℃, 培养周期 10d。产物分析结果表明, 粗蛋白含量达到 22.5%, 粗纤维量为 25.8%。

关键词: 糙皮侧耳, 康氏木霉, 饲料蛋白, 稻草, 培养条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0048-04

STUDY ON CULTURE CONDITIONS OF MICROBE FEEDING PROTEIN WITH STRAW AS FERMENTATION MATERIAL

CHEN Min¹ WU Xue-Chang²

(Department of Biology, Hangzhou Teachers' College, Hangzhou 310012)¹

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012)²

Abstract: The paper discusses *P. ostreatus* and *T. koningii* yield feeding protein with straws as fermentation material. The culture medium in laboratory test was following: straw 80g, bran 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, KH_2PO_4 1g, glucose 2g, material: $\text{H}_2\text{O} = 1:3$, pH5.5~6.0, inoculate amount 10%, culture temperature 28℃~30℃ for 10d. The analysis of the fermented product shows that content of crude protein reached 22.5%, crude fiber reached 25.8%.

Key words: *P. ostreatus*, *T. Koningii*, Feeding protein, Culture condition

木质纤维素是植物秸秆的主要成分, 是地球上数量最大的可再生性能源物质。利用微生物可把木质纤维材料转化为饲料、化工原料等, 具广阔的应用前景。但秸秆中, 由于木质素和纤维素成分紧密结合, 木质素将纤维素紧紧包裹在里面, 从而给纤维性成分的利用造成困难。因此, 目前对秸秆转化的研究重点集中在如何消除木质素对秸秆消化的抑制上^[1]。一般来说, 按常规的秸秆预处理的方法(高压蒸汽处理、膨化、酸碱处理、氨化法等等)可以去掉 50% 左右的木质素并使纤维素成为非结晶态而易于被利用^[2]。但这些方法用于工业化生产时成本太高, 且容易造成再次污染。Zohar Kerem 等认为, 对木质素进行最有效降解的微生物是白腐真菌, 属于担子菌属^[3]。在这类微生物中存在一种木质素过氧化物酶 (Lignin peroxidase), 正是这种酶对木质素的降解起了关键的作用。另据研究表明, 用白腐真菌处理秸秆时, 秸秆不需进行理化预处理^[4]。据此, 我们以糙皮侧耳和康氏木霉为菌种, 以二步固态发酵的形式, 对发酵稻草生产饲料蛋白培养条件进行了研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*)、康氏木霉 (*Trichoderma Konigii*) 本实验室保藏菌种。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: PDA 培养基^[5]。

1.2.2 液体培养基: 平菇液体菌种培养基 (g) ——玉米粉 5.0, 葡萄糖 0.5, 蔗糖 1.0, KH_2PO_4 0.05。自然 pH。1 × 10⁵ Pa 灭菌 30min; 麦芽汁培养基——8°BX 麦芽汁, 自然 pH。1 × 10⁵ Pa 灭菌 30min。

1.2.3 发酵培养基 (g) 稻草粉 80.0, 麸皮 20.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, 葡萄糖 2.0, pH5.5 ~ 6.0。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面菌种培养: 挑取孢子接种到斜面, 28℃恒温培养 72h。

1.3.2 液体菌种培养: 平菇液体菌种——用无菌吸管吸取 5mL 菌丝体悬浮液接入摇瓶, 28℃, 150r/min 振荡培养 3~5d。木霉液体菌种——斜面菌种→活化→接种一环至装有 5mL 麦芽汁的大试管中, 28℃、150r/min 摇床培养 20~24h。

1.4 发酵工艺

采用固体浅层二步发酵的方式。取 250mL 三角瓶, 每瓶装入发酵培养基 10g, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min, 冷却后以 5% 接种量接入侧耳液体菌种, 28℃恒温静止培养 3~5d 后, 再以 10% 接种量接入霉菌菌种, 28℃继续培养。发酵结束后, 用烘箱对发酵产物进行干燥, 温度控制在 60℃左右, 2~3h。当水分下降至 12% 以下时, 即可出料。

1.5 测定方法

水分的测定, 粗蛋白的测定, 粗纤维的测定和粗脂肪的测定均见文献 [6]。

2 结果与分析

2.1 营养性因子对发酵产物粗蛋白含量的影响

2.1.1 主要基质的影响: 设稻草粉: 麸皮分别为 100:0、90:10、80:20、70:30、60:40 五种不同配比, 分别称入 250mL 三角瓶中, 加入无机营养液, 使固液比 1:3, 灭菌冷却后接种。测产物的含水量和粗蛋白量。

实验表明, 随麸皮用量增加, 发酵产物的粗蛋白含量逐渐递增。从培养生长情况看, 发现随麸皮用量增加, 菌株生长繁殖速度加快。因此, 增加麸皮用量不仅可以缩短培养时间, 而且能增加粗蛋白含量。但麸皮用量超过 20% 以后, 粗蛋白的增加幅度减小, 考虑到成本及实际应用, 确定固体发酵培养基中稻草: 麸皮为 8:2 进行以下的研究。

2.1.2 无机氮源的影响: 以麸皮与稻草粉为 2:8, 加入不同的无机氮源, 分别是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 NH_4CONH_2 、 NaNO_3 、 KNO_3 。使无机氮含量为 2.0%, 研究了不同无机氮源对发酵产物粗蛋白含量的影响, 对照为不加无机氮。结果表明, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作无机氮源, 产物的粗蛋白含量比其他 5 种氮源都高, NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 其次, 以尿素或 NaNO_3 、 KNO_3 作氮源时粗蛋白含量低, 菌株生长差。这可

能是由于菌株利用这些无机氮时，使培养物终 pH 中性偏碱之故。

2.2 正交实验优化发酵培养基

在稻草：麸皮为 8:2，培养基固液比为 1:3 的条件下，利用 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验（表 1 所示），考察了 $(NH_4)_2SO_4$ 、 KH_2PO_4 、葡萄糖、通气量对粗蛋白产量的影响。其中通气量以纱布层数控制。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验的因子及水平安排

水平	因子			
	$(NH_4)_2SO_4$	KH_2PO_4	葡萄糖	通气量
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	1.0	0.5	1.0	4层
2	2.0	1.0	2.0	8层
3	3.0	1.5	4.0	12层

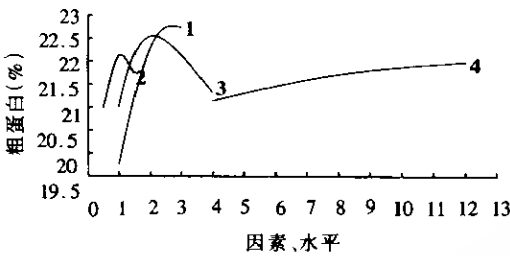


图 1 因素和实验指标的关系图
1 $(NH_4)_2SO_4$ 、2 KH_2PO_4 、3 葡萄糖、4 通气量

结果表明， $(NH_4)_2SO_4$ 的极差最大，其次是葡萄糖和 KH_2PO_4 ，通气量的极差最小，说明 $(NH_4)_2SO_4$ 对粗蛋白产量的影响最大。为直观地反映各因子对指标的影响，作出因子和实验指标的关系如图 1。从图 1 可看出， $(NH_4)_2SO_4$ 极差最大，其图形波动也最大；通气量极差最小，其图形波动最小。各因素的主次顺序为：主→次 A C B D。

为进一步考察各因素对指标的影响，进行了方差分析，见表 2。

从方差分析看， $(NH_4)_2SO_4$ 在 99% 的置信度下对指标的影响高度显著；葡萄糖在 95% 的置信度下对指标的影响显著。此结果与极差值的直观分析一致，因此最佳组合的培养基为： $(NH_4)_2SO_4$ 2% ~ 3%、葡萄糖 2%、 KH_2PO_4 1%。

表 2 正交实验的方差分析

方差来源	自由度	方差平方和	均方差	F	显著性
A	2	33.82	16.91	21.41	**
B	2	4.22	2.11	2.67	
C	2	8.68	4.34	5.49	*
D	2	4.19	2.10	2.66	
误差	24	18.92	0.79		

注： $F_{0.95} = 3.40$ $F_{0.99} = 5.61$

2.3 培养基含水量的影响

固体发酵时，底物的含水量应控制在一个理想的水平。底物中最佳固液比取决于底物的性质、颗粒大小及底物的持水能力。我们试验了固液比分别为 1.0:0.5、1.0:1.0、1.0:1.5、1.0:2.0、1.0:3.0、1.0:4.0 时对发酵蛋白产量的影响。

从结果看，木霉的生长需较高的含水量。固液比为 1:3 (含水量约为 76%) 时，粗蛋白含量最高，但此后呈下降趋势。因为底物水分过多时，使内部产生厌氧环境，不

利于真菌的活动。

2.4 培养基起始 pH 的影响

培养基的起始 pH 用 1N HCl 和 10% NaOH 调节, 测试 6 种培养基酸碱度 (pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 对粗蛋白产量的影响。

结果表明, 培养基的起始 pH 5.5 较适宜, 此时产物粗蛋白含量达 23.5%; 超过 pH 6.0 将对菌种的生长产生较大的影响, 例如 pH 7.5 时, 产物粗蛋白含量只有 19%。

2.5 培养时间的影响

侧耳菌丝长满 1/2 培养基时, 接种木霉菌种, 在 28℃ 恒温静止培养时, 培养时间与粗蛋白产量变化的关系如图 2。

实验说明: 培养物在 24h 前基本没有生长, 在 24~72h 生长迅速。在 72h 后生长又趋缓。

实验还表明, 培养 6d 时产物的粗蛋白含量最高, 达 25.01%。继续培养到 7d 以后, 即使延长培养时间, 粗蛋白产物量也不再增加。因此, 培养时间应控制在 3~6d 之内。

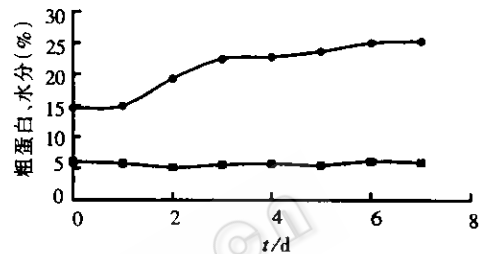


图 2 生长时间与产量的关系

●—粗蛋白, —■—水分

2.6 优化条件下菌株发酵稻草试验及产物分析

以二步固态发酵的方法试验了糙皮侧耳和康氏木霉混合菌株在最优培养条件下发酵稻草产粗蛋白的情况, 并进行了原料和产物的成分分析, 结果如表 3。

表 3 发酵产物及成分分析 (%)

项目	水分	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	灰分
稻草	7.8	4.8	3.6	36.7	4.9
发酵产物	7.6	22.5	3.9	25.8	5.8

3 结论

通过发酵条件试验, 特别是发酵培养基的优化试验, 初步确定了菌株 (糙皮侧耳和康氏木霉) 混合固体发酵稻草生产饲料蛋白的培养条件: 培养基组分为稻草粉 80g、麸皮 20g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g、葡萄糖 2g、 KH_2PO_4 1g; 原料: 水 = 1:3, pH 5.5~6.0, 接种量 10%, 培养温度 28℃~30℃, 培养周期 10d。

本研究结果表明, 选用优良微生物菌种在优化条件下混合固体发酵稻草生产饲料蛋白, 具有原料广泛、生产成本低、经济效益高和生产工艺简单等特点, 既能有效利用资源, 又能治理环境污染, 变废为宝, 因而有重要的社会效益和经济效益。

参考文献

- [1] 陈翠微, 刘长江, 郭文洁, 等. 微生物学通报, 2000, 27 (4): 291~293.
- [2] Gould J M. Biotech Bioeng, 1984, 20 (6): 46~52.
- [3] 卢庆萍, 王启加. 中国饲料, 1999, 2: 7~9.
- [4] 韩建林, 徐振清, 李精鸿, 等. 中国饲料, 1996, 24: 28~29.
- [5] 周德庆. 微生物实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1986.
- [6] 徐王冠. 饲料经营. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1994.