

多菌种固体共发酵生物软化稻壳的研究

杨艳红^{1*} 郑一敏¹ 王伯初² 段传人²

(重庆工学院生物工程学院 重庆 400050)¹

(重庆大学生物工程学院生物力学及组织工程教育部重点实验室 重庆 400044)²

摘要: 用 NaOH 对稻壳预处理, 解除木质素和半纤维素对纤维素的保护作用以及破坏纤维素的晶体结构, 使其更容易被微生物分解利用。据多种微生物共生及代谢特性, 建立由瑞典木霉 AS3.3711、黑曲霉 AS3.316 和啤酒酵母 AS2.399 组成的复合微生物体系。通过正交实验优化出一组具有实践前景的多菌种固体共发酵的技术路线和工艺方法, 较好地实现了复合微生物软化稻壳的目的。实验结果显示, 在发酵温度 30℃, pH4.5 左右条件下, 发酵 7 d 后的最高滤纸酶活力为 5.64 U/g 发酵物, 10d 后的纤维素的降解率为: 28.05%。

关键词: 多菌种, 固体发酵, 软化稻壳

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 04-0014-05

Research on Solid-state Fermentation on Rice Chaff with a Microbial Consortium

YANG Yan-Hong* ZHENG Yi-Min WANG Bo-Chu DUAN Chuan-Ren

(Institute of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050)¹

(State Key Laboratory of Biomechanics and Tissue Engineering, Institute of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044)²

Abstract: A microbial consortium of *Trichoderma reesei* AS3.3711, *Aspergillus niger* AS3.316 and *Saccharomyces cerevisiae* AS2.399 was constructed to decomposed rice chaff on the basis of the characters of each microorganism and the mechanism of cellulases. In this experiment, rice chaff was pretreated with NaOH before fermentation so that the lignin structure of rice chaff was degraded and hemicellulose was dissolved partly, which remove the protection of lignin and hemicellulose on cellulose and demolish its special crystal structure. After pretreatment, rice chaff can be degraded more easily with the microbial consortium. The optimal technical paths and technological methods were achieved for intensifying rice chaff with the microbial consortium perfectly through orthogonal experiment. According to the technological methods, some experiments were done at 30℃ with pH 4.5. It was found that the highest filter paper enzyme activity (FPA) was 5.64U/g and the ratio of cellulose degradation (RCD) was 28.05%.

Key words: Microbial consortium, Solid-state fermentation, Intensifying rice chaff

我国稻壳年产量约 3200 万吨^[1], 资源十分丰富。稻壳除了含半纤维素、木质素、纤维素和 SiO₂ 外, 还含有大量的油脂、蛋白质和丰富的矿物质营养素及维生素等。稻壳作为饲料不经济, 同时也不适合造纸^[2]。将其作为功能食品资源的开发, 具有广阔的前景。但其含粗纤维 30% ~ 45%, 木质素 21% ~ 26%, 及特殊晶体结构, 外壳比较坚硬适口性特差。本文通过对稻壳进行一系列化学和生物相结合的方法达到了软化的目的。

纤维素酶是由内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和纤维二糖酶组成的具有协同作用的复合酶^[3]。包括真菌和细菌在内的许多微生物都可降解木质纤维素, 自然界中, 多种

* 联系人 Tel: 023-68661382, E-mail: yyh@cqit.edu.cn

收稿日期: 2003-08-11, 修回日期: 2003-12-10

微生物相互作用对纤维素进行降解,木头腐烂^[4]就是最好的例子。目前,存在的关键问题是纤维素酶解效率不高,且在纤维素利用过程中产生明显的产物(纤维二糖和葡萄糖)反馈抑制。为解决这一问题,主要考虑两个方面:(1)筛选出抗阻遏物的突变株;(2)在改变纤维素自然结构的同时,构建酶解纤维素的连续反应体系。多菌种混合发酵相对单菌种发酵有很多优势:提高生产效率和微生物生长速度,可利用营养成分比较单一的廉价的农副产品,并且还可以防止发酵污染^[5]。

本文根据各菌的酶系组成特性及酶解机制,把瑞氏木霉、黑曲霉和啤酒酵母组合到一起,充分发挥其协同作用,使稻壳纤维素的分解顺利有效。同时,考虑到发酵过程的影响因素,通过正交实验确定了稻壳预处理过程中所用的最佳 NaOH 的浓度、处理温度及时间和发酵过程中的最适 pH 值、温度、培养基的含水量等。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

瑞氏木霉 AS3.711、黑曲霉 AS3.316 购于北京中国科学院菌种保藏室;啤酒酵母 AS2.399 由渝州大学生物系馈赠。

培养基:土豆葡萄糖培养基(PDA)^[6]、酵母蛋白胨葡萄糖培养基(YPD)^[6]、发酵培养基(稻壳 90 g,麸皮 10 g,蒸馏水 80 mL,土温-80 0.2 g, KH_2PO_4 0.08 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.10 g, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 0.20 g, MnSO_4 0.002 g, MgSO_4 0.20 g)。

1.2 实验步骤

1.2.1 预处理:按正交实验安排对稻壳进行 NaOH 预处理,用清水洗成中性,烘干待用。

1.2.2 菌种活化:把瑞氏木霉和黑曲霉接种到 PDA 斜面培养基上,待到 7 d 全部长成孢子后用无菌水洗下,并用漩涡混合器打散孢子 10 min,计数使孢子浓度为 10^8 / mL,然后接种到发酵培养基中。酵母接种到 YPD 液体培养基中,在 30℃下,150 r/min 的振荡培养箱中培养至对数期后,使菌浓度为 10^{10} / mL 接种到发酵培养基中。

1.2.3 固体发酵:按正交实验称量好已预处理的稻壳和麸皮分别装入罐头瓶,加入配好的无机盐营养液。用纱布和牛皮纸包好,在 1×10^5 Pa 下灭菌 20 min,再按正交实验安排接种发酵,每个实验做 3 个平行实验。

1.3 参数测定

1.3.1 滤纸酶活力(FPA)测定:准确称取发酵物 2 g,加入 20 mL 蒸馏水,在 40℃下,200 r/min 振荡 30 min,再 4,000 r/min 离心 5 min,取上清液作为待测酶液。取 0.5 mL 适当稀释酶液,加入 1 mL pH 为 4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 40 ± 0.2 mg 的滤纸末,50℃下酶解 1 h,再用 DNS 法测定还原糖的量^[7]。滤纸酶活力单位:水解滤纸,每小时产生 1mg 葡萄糖定义为 1 U^[8]。

1.3.2 纤维素降解率测定:中性洗涤纤维素(NDF)包括纤维素、半纤维素、木质素和角质。NDF 的含量测定^[9]:样品先在中性洗涤液中煮沸 1 h,用热的蒸馏水洗去淀粉、蛋白质和矿物质。然后用 α -淀粉酶溶液水解不溶性淀粉,再用热水洗涤后用丙酮除去脂肪和色素等。最后剩下的残留物蒸干即为中性洗涤纤维。纤维降解率则根据以下式子计算:

$$\text{纤维素降解率}\% = \frac{\text{发酵前的 NDF}\% - \text{发酵后的 NDF}\%}{\text{发酵前的 NDF}\%} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 混合发酵条件优化

瑞氏木霉和黑曲霉分别单独发酵或 3 菌混合发酵, 每隔 24 h 测量一次其发酵的滤纸酶活力和纤维降解率, 图 1、2 的结果表明瑞氏木霉的最高酶活力发生在第 5 d, 纤维降解率在第 12 d 后稳定, 而黑曲霉最高酶活力却发生在第 2 d, 纤维降解率在 6 d 后没有变化, 并且瑞氏木霉的酶活力比黑曲霉低。当三种菌混合培养时, 最高酶活力发生延长到了第 7 d, 而纤维降解率则在 10 d 后没有什么变化, 且比两种单菌的高。

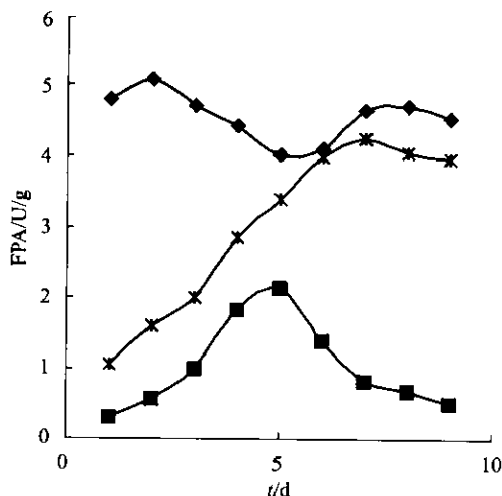


图 1 单菌和复合菌发酵的滤纸酶活 (FPA) 的比较

◆ 黑曲霉单菌发酵, ■ 瑞氏木霉单菌发酵,
—×— 黑曲霉、瑞氏木霉和啤酒酵母混合发酵

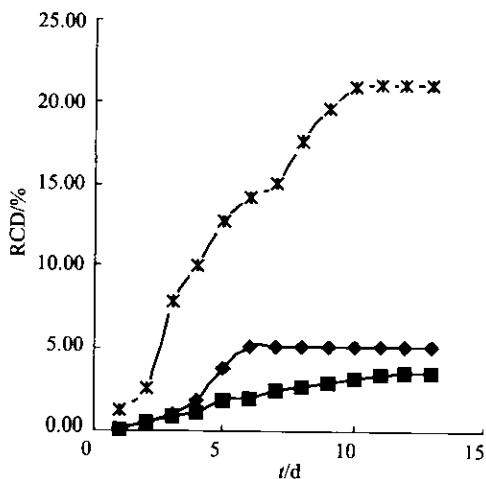


图 2 单菌和复合菌发酵的纤维降解率 (RCD) 的比较

◆ 黑曲霉菌发酵, ■ 瑞氏木霉单菌发酵,
—×— 黑曲霉、瑞氏木霉和啤酒酵母混合发酵

由此可见, 本文所建的微生物系统是相当有效的。由上述结果, 在做正交实验的时候, 可测定发酵第 7 d 时的 FPA 和第 10 d 的纤维降解率作为分析的指标。

2.2 单菌和混菌发酵比较

关于稻壳预处理和固体发酵实验条件的各个因素水平的设置如表 1, 正交实验安排和具体的结果见表 2。由最高酶活力方差分析可看出黑曲霉接种时间对其有高度显著的影响, 发酵温度、pH、瑞氏木霉接种量和酵母接种量有显著影响, 而其他因素的影响不显著。且黑曲霉和瑞氏木霉同时在第一天接种最好, 这可能是因为黑曲霉单独培养时, 其酶活力比瑞氏木霉高, 且生长速度快, 在混菌中, 它对酶活力的高低起绝对主导作用。黑曲霉和瑞氏木霉都利用相同的碳源, 形成竞争, 当黑曲霉接种落后于瑞氏木霉时, 瑞氏木霉已经形成优势菌群, 黑曲霉的生长和产酶速度受到极大影响, 从而影响整个系统的酶活力。黑曲霉接种越晚, 整个系统的酶活力更低。由 R_j 可看出, 各因素对最高 FPA 影响由大到小的顺序依次为: $D > J > C > E, H > F > B > I > G, A$ 。各因素在此条件下的最优组合为: $A_2 B_2 C_3 D_1 E_{1或2} F_{2或3} G_2 H_3 I_2 J_1$ 。由纤维降解率的方差可看出, 黑曲霉的接种时间、NaOH 浓度、发酵 T、培养基含水量对纤维降解率有显著影响; 而

其他因素没有显著影响。由 R_j 的分析知道, 各因素对纤维分解率的影响由大到小的顺序依次为: $C > B$ 、 $G > D$ 、 $I > J > E > F > A > H$ 。此时, 各因素的最优组合为: $A_1B_2C_1D_1E_1F_3G_1H_{1或2}I_2J_1$ 。

表 1 正交表的各因素及其水平的排布

水平量	因素									
	预处理	NaOH	发酵	黑曲霉	发酵	酵母接	培养基	瑞氏木霉	黑曲霉	酵母
	T	浓度	T	接种时间	pH	种时间	含水量	接种量	接种量	接种量
	A (°C)	B (%)	C (°C)	D (d)	E	F (d)	G (%)	H (mL)	I (mL)	J (mL)
1	30	2	25	0	4.5	0	80	1	1	1
2	50	3	35	3	5.0	3	100	2	2	2
3	100	4	30	6	5.5	6	150	3	3	3

注: 上述表中每一个预处理温度对应一个确定的处理时间, 30℃为 24 h, 50℃为 12 h, 100℃为 0.5 h

表 2 正交实验及结果分析

实验 序号	因素										结果					纤维素分解率	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	CK1	CK2	CK3	FPA	(%)		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.37	10.11		
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5.18	11.5		
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0.95	9.29		
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	0.86	12.45		
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	0.76	3.25		
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	1.12	10.11		
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	1.06	7.01		
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	0.82	4.75		
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0.99	5.05		
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0.88	7.11		
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	1.27	9.04		
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1.17	0.00		
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2	5.71	10.57		
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3	5.14	10.45		
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1	1.99	7.78		
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1	1.27	6.78		
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2	1.17	10.18		
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	0.88	7.71		
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1.87	2.61		
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3	1.80	2.11		
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1	2.29	6.99		
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1	1.00	8.82		
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	1.11	9.79		
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3	0.70	10.73		
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3	4.97	10.34		
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1	1.48	9.11		
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2	0.56	5.32		
F	K1j	13.1	16.8	13.6	27.1	18.8	11.7	14.4	11.3	14.2	19.3	14.6	17.6	15.4	注: 各个因素的自由度分 别为 2, 误差自由度为 10; $F_{0.01}(2, 10) = 7.56$.		
P	K2j	19.5	18.2	12.8	12.0	18.7	18.1	18.4	17.3	19.2	18.6	18.4	17.0	17.0			
A	K3j	15.5	12.9	21.7	9.0	10.6	18.3	15.2	19.4	14.6	10.1	15.5	13.7	16.0			
	K平	1.45	1.86	1.51	3.00	2.08	1.30	1.60	1.26	1.58	2.15	1.62	1.96	1.71			
	均值	2.16	2.04	1.42	1.34	2.07	2.02	2.05	1.93	2.14	2.07	2.04	1.89	1.89			
	Rj	0.44	0.60	0.99	2.00	0.90	0.73	0.45	0.90	0.56	1.02	0.42	0.44	0.18	$F_{0.05}(2, 10) = 4.10$		
	Qj	88.9	88.2	91.8	108.2	91.7	89.9	87.8	90.6	88.5	92.6	88	87.4	86.9	$S_{总} = 9.1$		

续表 2

	Sj	2.30	1.60	9.50	21.50	9.70	3.20	1.10	9.40	1.80	9.90	1.30	0.70	0.20	
	Fj	1.27	0.88	5.23	11.83	5.34	1.76	0.61	5.17	0.99	5.45	0.72	0.39	0.11	
显著性		-	-	+	++	+	-	-	+	-	+	-	-	-	
	K1j	73.6	58.8	85.0	84.5	75.8	66.1	82.3	72.5	58.5	79.4	71.4	70.3	76.9	注: 各个因素的自由度分别为 2, 误差自由度为 14;
	K2j	69.6	84.0	66.7	62.2	70.2	67.1	56.8	72.6	81.2	68.7	65.5	67.9	67.1	$F_{0.01}(2, 14) = 6.51$;
	K3j	65.8	66.3	57.3	62.3	63.0	75.9	69.9	63.9	69.3	60.9	72.1	70.8	65.0	$F_{0.05}(2, 14) = 3.74$;
纤维素降解率															$S_{总} = 57$.
	K 平	8.2	6.5	9.4	9.4	8.4	7.3	9.1	8.1	6.5	8.8	7.9	7.8	8.5	
	均值	7.7	9.3	7.4	6.9	7.8	7.5	6.3	8.1	9.0	7.6	7.3	7.5	7.5	
		7.3	7.4	6.3	6.9	7.0	8.4	7.8	7.1	7.7	6.8	8.0	7.9	7.2	
	Rj	0.9	2.8	3.1	2.5	1.4	1.1	2.8	1.0	2.5	2.0	0.7	0.4	1.3	
	Qj	1621	1657	1662	1654	1627	1626	1654	1623	1646	1637	1621	1618	1627	
	Sj	3	39	44	36	9	8	36	5	28	19	3	0	9	
	Fj	0.37	4.79	5.40	4.42	1.11	0.98	4.42	0.61	3.44	2.33	0.37	0.00	1.11	
显著性		-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

注: 以上表格中当 $F_j < F_{0.05}(2, 10)$ 或 $F_{0.05}(2, 14)$ 表此因素对结果不显著用“-”, 当 $F_{0.05}(2, 10)$ 或 $F_{0.05}(2, 14) < F_j < F_{0.01}(2, 10)$ 或 $F_{0.01}(2, 14)$ 表显著用“+”, 当 $F_j > F_{0.01}(2, 10)$ 或 $F_{0.01}(2, 14)$ 表高度显著用“++”

由上可知, NaOH 的浓度, 对 FPA 没有显著的影响, 而对纤维降解率有显著影响。由两者的 R_j 可知, 当浓度太低为 2% 时, 纤维的结构破坏程度不够, 虽对 FPA 无明显影响, 但对于纤维降解率有较大影响。当太高为 4% 时, 可能造成 NaOH 渗透入纤维的内部结晶区, 发酵时, 残留的 NaOH 又慢慢渗出, 使 pH 值升高, 从而影响微生物生长, 降低酶产量, 最终造成纤维降解率较低。这一现象也可以从发酵过程中 pH 值的变化情况和稻壳的外观情况看出。在发酵过程中, 每隔 1 d 测一次 pH 值, 发现预处理 NaOH 浓度为 4% 的 pH 值不断升高, 且有氨气放出, 而 NaOH 浓度为 2% 和 3% 的 pH 却没有什么变化。发酵到第 7d 用手搓发酵样品, 发现 NaOH 浓度为 3% 的比较柔软, 而 2% 和 4% 的仍很糙手, 但比没有用 NaOH 预处理的对照组要好, 综合两个指标, 得到以上十个因素的最佳组合应选为: $A_2B_2C_3D_1E_1F_3G_1H_3I_2J_1$ 。

在选定的最优条件下进行实验验证得到发酵 7 d 后的最高滤纸酶活力为 5.64 U/g, 10 d 后的纤维素的降解率为: 28.05%, 且在外观上看, 稻壳的颗粒状已不太明显, 用手搓时, 其柔软度明显比对照组要好, 达到了比较理想的效果。

致谢 本文是在重庆大学王伯初教授和段传人老师的悉心指导和支持下完成的, 在此特表感谢。

参考文献

- [1] 张声俭. 粮食与饲料工业, 1999, 1: 20~22.
- [2] 吕秀阳, 夏文莉, 迫田章义, 等. 农业工程学报, 2000, 16 (6): 96~98.
- [3] Eriksson K E L, Habu N, Samejima M. Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 1002~1008.
- [4] Bayer E A, Lamed R. Biodegradation, 1992, 3: 171~188.
- [5] Weimer P J. Mixed Cultures in Biotechnology. New York: McGraw-Hill, 1991. 205~232.
- [6] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 48~61.
- [7] 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997. 1~3.
- [8] 余晓斌, 李晓华, 丁建琴. 生物技术, 1997, 7 (4): 13~15.
- [9] 大连轻工业学院, 华南理工大学等编. 食品分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 202~205.