

文章编号:1673-1689(2010)06-0916-05

混合菌株固态发酵玉米皮生产饲料蛋白

孙付保^{1,2}, 陈晓旭^{1,2}, 陈晓萍^{1,2}, 张建华^{1,2}, 张宏建^{1,2}, 毛忠贵^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 以玉米皮为基本碳源, 通过单因素试验和正交试验, 对康宁木霉和假丝酵母混合固态发酵生产饲料蛋白进行了研究。以提高木聚糖酶活和真蛋白含量为主要目的, 优化得到最佳培养条件为: 麸皮 25 g/dL, 玉米皮 75 g/dL, 初始固液比为 1 : 1.5, 酵母接种体积分数为 10%, 30 °C 培养 7 d。在此条件下, 最终得到的产品的木聚糖酶活力为 1 300 IU/g 左右, 真蛋白含量达到 20% 以上。

关键词: 玉米皮; 混菌固态发酵; 木聚糖酶; 饲料蛋白

中图分类号: S 816.35

文献标识码: A

Feed Protein Production from Corn Bran with Mix-Strain Solid-State Fermentation

SUN Fu-bao^{1,2}, CHEN Xiao-xu^{1,2}, CHEN Xiao-ping^{1,2}, ZHANG Jian-hua^{1,2},
ZHANG Hong-jian^{1,2}, MAO Zhong-gui^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study was carried out to explore a feed protein production from the corn bran by mixed- strain solid-state fermentation with *Trichoderma koningii* and *Candida tropicalis*. With the single-factor and orthogonal experimental optimization of the nutritional and environmental conditions for xylanase activity and protein production, the optimal conditions were as follows: wheat bran 25%, solid-liquid ratio 1 : 1.5, pH 5.5. Under the above conditions, the true protein content in the final product achieved > 20% after the fermentation at 30 °C for 7 d, and the xylanase activity reached 1 300 IU/g, which displayed a considerable potential to future practical application.

Key words: corn bran, mixed-strain solid state fermentation, xylanase, feed protein

中国玉米年产量仅次于美国, 居世界第二位, 玉米深加工的副产品, 玉米皮年产量将近 3 000 万 t。近 2 年的年均产量都达到 1.60 亿 t 以上。而作为 t。由于玉米皮比麦麸和米糠含有更丰富的总纤

收稿日期: 2010-03-16

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(20906041)。

作者简介: 孙付保(1975—), 男, 河南南阳人, 工学博士, 讲师, 主要从事可再生资源高值化方面的研究。Email: fubaosun@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 毛忠贵(1954—), 男, 江苏南京人, 工学硕士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物资源高值化及清洁生产方面的研究。Email: maozg@vip.163.com

维^[1],尤其是半纤维素含量较高,所以目前玉米皮的利用是直接作为饲料用于养殖业。但由于其适口性差,且具有复杂的化学组成和多级不均一结构,难以被动物直接消化吸收,使得玉米皮的利用效率低且营养价值不高。同时,在饲料行业,饲料蛋白的缺口依旧非常大,据计算,目前全国各种饼粕、血粉、饲料酵母、羽毛粉和国产鱼粉等加起来也仅能满足70%~80%,还有20%~30%的缺口。而据中国农业科学院饲料研究所的有关专家分析,到2010年和2020年,我国蛋白质饲料供需缺口分别为0.38亿t和0.48亿t^[2]。因此,单靠利用常规的蛋白质饲料已远远不能满足配合饲料生产发展的需要,所以发展微生物饲料蛋白势在必行。

基于此,作者以成本低廉、来源丰富的玉米皮作为原料,在前期实验基础上^[3],尝试利用混合微生物(康宁木霉和热带假丝酵母菌)固态发酵玉米皮生产高饲料蛋白的实验工作。同时,发酵产生的水解酶类也可以作为一种外源性消化性酶,帮助动物利用饲料中原本无法利用或利用率极低的纤维质成分^[3],促进营养物质的消化吸收;消除饲料中的抗营养因子,提高饲料转化率,减少环境污染。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及培养基

1.1.1 实验菌株 康宁木霉(*Trichoderma konigii*) 30167;购于中国农业微生物菌种保藏管理中心;热带假丝酵母(*Candida tropicalis*):江南大学微生物资源平台提供。

1.1.2 培养基

1) 酵母种子培养基:马铃薯200g去皮,切成小块,加水煮沸1h,然后用纱布过滤,加葡萄糖20g,琼脂20g,补水至1000mL,pH自然,4℃冷冻保藏。

2) 混菌固态发酵培养基:麸皮,玉米皮(由山东菱花味精厂提供),玉米皮粉碎为40目,加营养盐液,初始固液比为1:1.5~2,营养液由0.5g/dL硫酸铵、0.05g/dL磷酸二氢钾、0.1g/dL硫酸镁和0.2g/dL乳糖组成,调至pH4~5,于121℃灭菌30min。

1.2 分析测定

1.2.1 粗蛋白质和真蛋白质的测定 采用凯氏定氮法^[4]。其中真蛋白质的测定用5%三氯乙酸溶液按固液比1:10浸泡一定量的发酵产物1h后,用无菌水洗涤至不含硫酸铵,取洗涤后的固体直接消化测定含氮量。

1.2.2 还原糖测定 DNS法见文献^[5]。

1.2.3 酶活的测定方法 粗酶液的制备^[5]:定期取固态发酵样品1g,加入9mL、pH4.8的乙酸缓冲液在40℃浸提1h,其间摇动3~5次。然后于3000r/min离心5min,上清液即为待测的粗酶液^[5]。

酶活单位定义^[6]:在50℃下,以每毫升酶液(或每克绝干发酵样品)每分钟水解底物生成1μmol还原糖所对应的酶活,定义为1个酶活单位(IU)。

1) 滤纸(FPA)酶活的测定:于试管中加pH4.8乙酸缓冲液1.5mL,再加入卷曲的滤纸条(1cm×6cm)一张,50℃预热5min,在试管中加入0.5mL酶液,50℃保温60min,加1.5mL DNS试剂终止反应,沸水浴5min,用冷水冷却,定容至10mL。在540nm处测定吸光值,并从葡萄糖标准曲线查出相应的葡萄糖质量浓度,折算成酶单位。

2) 木聚糖酶活的测定:取1g/dL的木聚糖1.5mL作为底物,加入0.5mL适当稀释的酶液,于50℃下反应30min后,用DNS法测定还原糖,并扣除空白实验测定值。酶活力单位(IU)以每分钟产生1μmol还原糖量计(木糖量计),用IU/g表示。

1.2.4 原料成分测定 范氏法见文献^[11]。

1.3 实验方法与设计

1.3.1 固态发酵过程 混合固态发酵培养基灭菌后,首先接入康宁木霉发酵72h后,再接入热带假丝酵母,进入混合发酵,30℃下混菌培养一定时间后,发酵结束。

1.3.2 试验设计

1) 单因素试验:试验以玉米皮为基础碳源,30℃混菌培养48h,考察不同麸皮添加量、酵母接种量、初始pH值、料水比对发酵产酶和最终蛋白质质量浓度的影响。

2) 正交试验:根据单因素实验,选取麸皮添加量、固液比、pH值3个因素,取三水平设计实验,30℃混菌培养48h,测定滤纸酶活、木聚糖酶活和真蛋白质质量浓度,并且利用软件对实验结果进行极差分析。

3) 延长混菌发酵时间对发酵的影响:在单因素试验和正交试验条件优化的基础上,继续培养发酵至总发酵时间的第7天,测定木聚糖酶活和真蛋白质质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 麸皮添加量对混菌发酵的影响 以玉米皮和麸皮混合物作为实验材料,调节麸皮所占比例为

0、2、5、10、15 g/dL。实验结果见图 1。随着麸皮添加量加大,酶活力和蛋白质质量分数都限制升高,酶活力升高是因为麸皮可作为粗纤维原料诱导物;而对于真蛋白的影响一方面是因为酶活力升高增加了木霉分解底物的能力,从而利于酵母生长;另一方面是因为麸皮本身营养较丰富,容易被酵母利用并提供一部分真蛋白质。

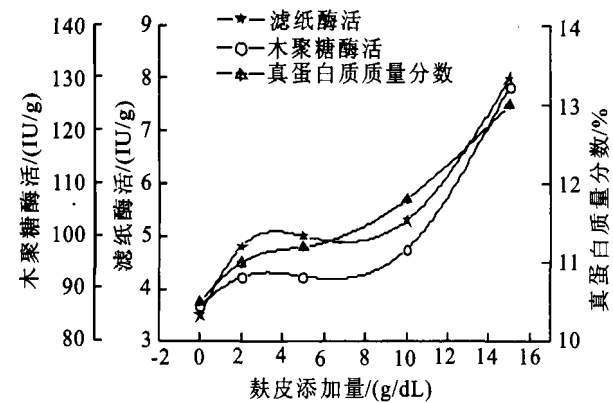


图 1 麸皮添加量对混菌固态发酵产酶和蛋白质产量的影响

Fig. 1 Effects of wheat bran addition on the enzyme and protein production in mixed-strain solid-state fermentation

2.1.2 酵母接种体积分数对混菌发酵的影响 以不同的接种体积分数接入假丝酵母,实验结果见图 2。

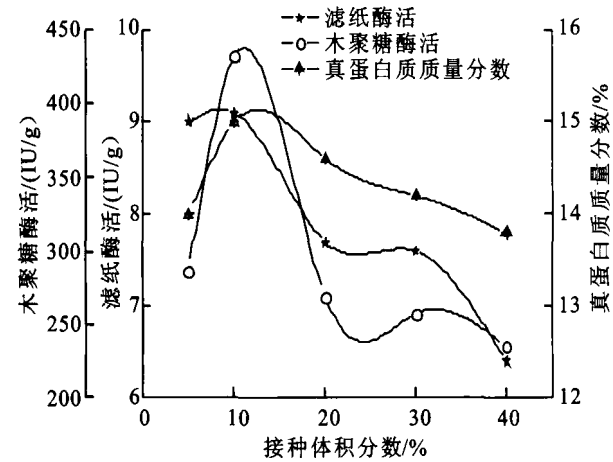


图 2 酵母接种体积分数对混菌固态发酵产酶和产蛋白质的影响

Fig. 2 Effect of the yeast inoculum on the enzyme and protein production in mixed-strain solid-state fermentation

酵母接种体积分数为 10% 时,酶活力和真蛋白值最高,当接种体积分数超过 10% 时,各项指标均有下降趋势,这可能是因为接种体积分数小,酵母菌不能充分利用玉米皮的降解物,一方面造成还原糖质量浓度增大抑制了酶活,另一方面使发酵周期延长,限制了自身的繁殖;接种体积分数大可缩短

发酵周期,但过大的接种体积分数往往会把种子中的某些抑制物质带到发酵阶段,不利于酵母菌的生长繁殖^[11]。

2.1.3 初始 pH 值对混菌发酵的影响 将所加营养盐溶液配成 7 个梯度(pH 4.0~7.0)进行发酵,实验结果见图 3。在 pH 4.5 时,发酵产物中酶活力和蛋白质质量分数同时达到最优值,因此确定培养基的最适宜 pH 值为 4.5。

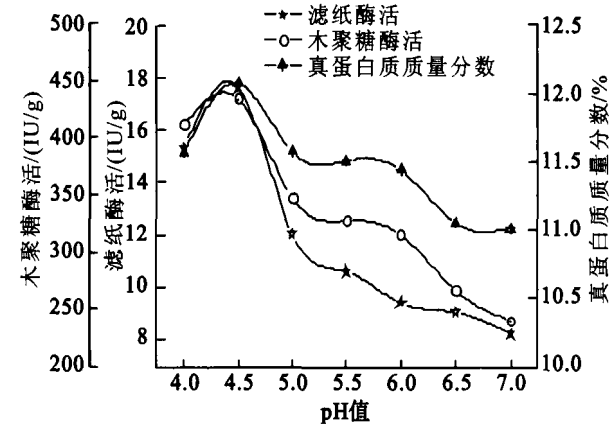


图 3 初始 pH 值对混菌固态发酵产酶和蛋白质产量的影响

Fig. 3 Effects of the initial pH on the enzyme and protein production in mixed-strain solid-state fermentation

2.1.4 料水比对混菌发酵的影响 固态发酵过程中,料水比在细胞生长和酶的合成方面发挥了很重要的作用,固态发酵不同于液态发酵,微生物生长的环境中没有游离水的存在。内部水分含量是生长所必须的,它使菌体渗透到底物内部的能力增强以便于有效地利用营养物质。含水量对纤维素酶产量以及酵母菌的生长均有明显的影响^[7]。由图 4 可以看出,当发酵基质的料水比在 1 : 1.5 时,发酵真蛋白质质量分数达到最大值,为 8.5%。这可能是因为低水分发酵时,底物中的营养物质没有足够的自由水将其扩散到基质的表面,酵母的营养物质供给不足,繁殖受到了限制,产品真蛋白质质量分数增加较少;水分质量分数过高,底物颗粒之间没有足够的空隙率,使得供氧不足,影响酵母的繁殖,产品真蛋白质量分数较低,因此料水比为 1 : 1.5 时为最佳。

2.2 正交实验设计

发酵培养基中的碳氮比对菌体生长和发酵效果影响显著,pH 值和固液比对混菌发酵影响效果较大。因此在单因素的基础上,选择麸皮添加量、固液比和 pH 值共 3 个因素。正交实验因素水平表见表 1,正交实验结果见表 2。

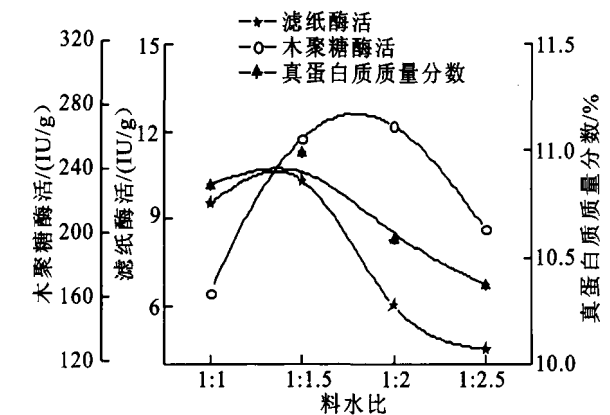


图 4 料水比对混菌发酵产酶和蛋白的影响

Fig. 4 Effect of the solid-liquid ratio on the enzyme and protein production in mixed-strain solid-state fermentation

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factor and level of the $L_9(3^3)$ orthogonal experiment

水平	因素		
	A 麸皮 质量分数/%	B 固液比	C pH 值
1	15	1 : 1.5	4
2	20	1 : 1.8	4.5
3	25	1 : 2	5

表 2 发酵培养基优化正交试验表

Tab. 2 Orthogonal experiment of optimizing the fermentation culture

试验号	A	B	C	滤纸酶活/ (IU/g)	木聚糖酶活/ (IU/g)	真蛋白质 质量分数/%
1	1	1	1	12.0	451.4	13.2
2	1	2	2	12.6	334.7	12.9
3	1	3	3	14.9	214.8	12.4
4	2	1	3	14.2	448.1	15.1
5	2	2	2	17.2	472.4	14.3
6	2	3	1	14.0	129.4	14.3
7	3	1	3	15.9	654.6	15.5
8	3	2	1	11.7	441.7	14.9
9	3	3	2	13.5	290.7	14.5

根据表 3 极差分析可以判定,实验中各因素对发酵效果的影响次序是不同的,对于滤纸酶活而言,其影响次序为 $C>A>B$;对于木聚糖酶活而言,其影响次序为 $B>A>C$;对于真蛋白而言,其影响次序为 $A>C>B$ 。通过极差分析,木聚糖酶活和真蛋白的最优组合是一致的,为 A3B1C3。因玉米皮中半纤维素的质量分数为 58.7%,因此作者选择木聚糖酶活和真蛋白为主要指标。经 3 次实验取平均值,得到验证实验的木聚糖酶活和真蛋白质量分数分别为 717.2 IU/g 和 15.9%。

以玉米皮为发酵原料,通过单因素实验和正交

设计实验对发酵条件进行优化,确定固态发酵玉米皮的最适条件为:麸皮添加质量分数 25%,料水比 1 : 1.5,pH 值为 5;在最适条件下得到发酵玉米皮中真蛋白质量分数为 15.5%,且木聚糖酶活达到 654.6 IU/g。

选择木聚糖酶活和真蛋白质量分数为研究对象,在最优条件下验证木聚糖酶活为 717.2 IU/g,真蛋白质量分数为 15.9%。

表 3 极差分析表

Tab. 3 Extreme value analysis of the orthogonal experiment

K 值	滤纸酶活/ (IU/g)			木聚糖酶活/ (IU/g)			真蛋白质量 分数/%		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
K_1	12.5	14.0	12.6	333.6	518	340.8	12.5	13.8	13.4
K_2	15.2	13.9	13.4	350	416.3	357.8	14.2	13.8	13.9
K_3	13.7	13.5	15.4	462.3	211.6	447.3	14.6	13.7	14.1
R	2.7	0.6	2.8	128.7	306.4	106.4	2.1	0.1	0.7
优水平	A2B1C3			A3B1C3			A3B1C3		

2.3 发酵时间对混菌固态发酵的影响

发酵时间对混菌固态发酵的影响见表 4。在上述优化之后的基础上继续延长发酵时间,可以发现:随着发酵时间延长到 7 d 左右,木聚糖酶活和真蛋白产量都显著增加,分别提到了 1 000 IU/g 和 20%以上。这可能是由于康宁木霉固态发酵过程中接入酵母菌有效缓解或消除其产物抑制,两菌株相互促进从而产生共生的效果。因此今后实验中将延长发酵时间至 7 d 左右。

表 4 发酵时间对混菌固态发酵的影响

Tab. 4 Effect of the on mixed-strain solid-state fermentation

发酵 时间/d	木聚糖酶活/ (IU/g)	真蛋白 质量分数/%
5	974.1	20.5
6	1 187.7	21.4
7	1 376.9	22.0

2.4 发酵后玉米皮成分分析

为了进一步了解混菌固态发酵效果,选取固态发酵前后玉米皮进行其化学组成分析,结果见表 5。

发酵后的基质中残留的木质素约为对照组的 1.8 倍,因为康宁木霉的酶系主要为纤维素酶和半纤维素酶,因此在发酵过程中不会引起木质素的降解,这也间接说明了发酵后的基质浓缩为初始基质的一半,这同实验前后测定的物料损失率一致。这是因为微生物在生长繁殖过程中要消耗一部分原料,实际纤维素和半纤维素的降解率分别为 55%和 67%,高于乔君毅^[8]的研究水平。

表5 混菌固态发酵前后玉米皮组分变化

Tab. 5 Content change of the components in corn bran before and after mixed-strain solid-state fermentation

组成	纤维素 质量分数/%	半纤维素 质量分数/%	木质素 质量分数/%
对照组	18.7	58.7	2.4
发酵后	16.8	36.9	4.5

发酵产物中的饲料蛋白质可能来自于3个方面:发酵前基质中原有蛋白质,新合成蛋白质(非蛋白氮转化成),菌株蛋白质^[9]。同理,由于微生物在呼吸时要消耗一部分原料,导致产物中蛋白质质量分数的表观值增加的现象被称之为“浓缩效应”,也就是计算蛋白质质量分数分母基数变小,蛋白质的相对含量就会增加。然而,从本实验结果尤其发酵前后底物组成变化分析表明,发酵产物里真蛋白质质量分数增加的主要原因是:在混菌固态发酵过程中微生物将发酵基质的非蛋白质部分转化为蛋白质。此外,在蛋白质质量分数增加的同时,混菌发酵也使蛋白质品质得到了改善;产物中还含有一些容易

消化吸收的糖类,不仅增加饲料中的能量营养物质,并且适口性也有很大的改善;酵母通过发酵可产生较多的B族维生素,从而增加发酵饲料中的维生素;发酵过程中菌体产生出一系列的酶物质,这些酶有助于动物对营养物质的消化和吸收,提高饲料利用率和转换率,提高动物健康水平^[9]。

3 结 语

玉米皮为玉米副产物,具有较秸秆类纤维质相对丰富的营养价值,且具有成本低、来源广等特点,是一种生产畜牧饲料的重要发酵碳源。作者通过单因素和发酵条件优化实验,以木聚糖酶活和真蛋白质量分数为主要指标,优化得到最优工艺条件为:麸皮 25 g/dL,玉米皮 75 g/dL,初始固液比为1:1.5,营养液中硫酸铵 0.5 g/dL,磷酸二氢钾 0.05 g/dL,硫酸镁 0.1 g/dL,乳糖 0.2 g/dL,pH 5,30℃培养7 d,最终得到的产品真蛋白质量分数达到20%以上,在此条件下发酵产物中木聚糖酶活力为1 300 IU/g。

参考文献(References):

- [1] 胡叶碧,王璋. 纤维素酶和木聚糖酶对玉米皮膳食纤维组成和功能性的影响[J]. 食品工业科技,2006,27(11): 103-105.
HU Ye-bi, WANG Zhang. The effect of cellulose and xylanase hydrolysis on the composition and functional properties of corn bran dietary fibers[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(11): 103-105. (in Chinese)
- [2] 刘靖,张石蕊. 蛋白质饲料资源的合理利用及开发对策[J]. 饲料工业,2009, 30(5): 43-46.
LIU Jing, ZHANG Shi-rui. The rational use and developing countermeasures of protein feed resources [J]. *Feed Industry*, 2009, 30(5): 43-46. (in Chinese)
- [3] 刘亚力,刘宁. 饲用酶制剂生产技术研究及应用[J]. 动物营养学报,2000,12(4):17-22.
LIU Ya-li, LIU Ning. Production technique and application of feed enzyme preparation[J]. *Acta Zoo Nutrimenta Sinica*, 2000, 12(4): 17-22. (in Chinese)
- [4] 张龙翔,张庭芳,李玲媛. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1983.
- [5] 董义伟,李大平,田崇民,等. 纤维素酶的固态发酵及酶学性质的研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19:393-395,409.
DONG Yi-wei, LI Da-ping, TIAN Chong-min, et al. Studies on the solid-state fermentation and enzyme character of cellulose [J]. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19: 393-395, 409. (in Chinese)
- [6] Mekala N K, Singhania R R, Sukumaran R K, et al. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* rut C30: statistical optimization of process parameters[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, 151: 122-131.
- [7] 梁新红. 微生物降解玉米秸秆生产单细胞蛋白的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [8] 乔君毅,亢晋,张福元,等. 黑曲霉发酵玉米秸秆产纤维素酶的研究[J]. 饲料研究,2008,12:63-66.
QIAO Jun-yi, KANG Jin, ZHANG Fu-yuan, et al. Study on cellulase production by the fermentation of corn straw stalk using *Aspergillus niger* [J]. *Feed Research*, 2008, 12: 63-66. (in Chinese)
- [9] 罗明朗. 论固体发酵对物料蛋白质含量的提高[J]. 粮食与饲料工业, 1996(11): 26-28.
LUO Ming-lang. On the improvement of the protein contents by solid fermentation[J]. *Cereal and Feed Industry*, 1996 (11):26-28. (in Chinese)
- [10] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京:北京农业大学出版社,1993: 58-63.
- [11] 王颖. 柑桔橘皮渣发酵饲料蛋白实验研究[D]. 重庆:重庆工商大学,2007.

(责任编辑:李春丽)