

固态发酵玉米秸秆的菌株组合和发酵条件研究

李江颂, 李日强, 王爱英, 冀伟江

(山西大学环境与资源学院, 太原 030006)

摘要:为了提高玉米秸秆的综合利用效率,降低对环境的污染,保护生态环境,利用正交试验法研究了固态发酵氨化玉米秸秆生产饲料蛋白工艺中菌株组合、发酵温度和发酵时间对发酵产物真蛋白含量的影响。结果表明,发酵温度对发酵产物真蛋白含量具有显著影响($P<0.05$),发酵时间、发酵温度与发酵时间之间的交互作用对发酵产物真蛋白含量具有极显著影响($P<0.01$)。最佳菌株组合为青霉和葱色串孢,最佳发酵条件为发酵温度 25 ℃、发酵时间 5 d。在最佳菌株组合和最佳发酵条件下,玉米秸秆经氨水氨化和固态发酵后真蛋白含量由 2.05% 提高到 29.66%,比原料本身的真蛋白含量提高了 13 倍多;粗蛋白含量由 2.80% 提高到 35.41%,比原料本身的粗蛋白含量高提高了 11 倍多。

关键词:固态发酵;玉米秸秆;饲料蛋白;菌株组合;发酵条件

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)08-1601-05

Combination of the Multiple-strains and the Fermentation Conditions of Solid-state Fermentation of Corn Straw

LI Jiang-song, LI Ri-qiang, WANG Ai-ying, JI Wei-jiang

(School of Environment Science and Resources, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of multiple use of corn straw, and reduce its pollution to environment and protect eco-environment, the effect of the combination of the multiple-strains, the fermentation temperature and the fermentation time of solid-state fermentation of ammoniated corn straw to produce feeding-protein on the pure protein content of the fermented product were studied by using orthogonal design of three factors and three levels. The experiments were performed according to orthogonal design $L_{27}(3^{13})$, in which the different strain combinations(A) were *Penicillium* sp. + *Torula allii*, *Penicillium* sp. + *T. allii* + *Chaetomium atrosporum* and *Penicillium* sp. + *T. allii* + *C. atrosporum* + *Geotrichum candidum*, respectively; the different temperature(B) were at 25 ℃, 30 ℃ and 35 ℃, separately; and the different time(C) were for 3 d, 5 d and 7 d. The dataset were analyzed using analysis of variance, and Duncan's multiple range test. The results indicated that the effect of fermentation temperature on the pure protein content of the fermented product was significant($P<0.05$), and the effect of the fermentation time and the interaction between fermentation temperature and fermentation time on that was very significant($P<0.01$). The optimal combination of multiple-strains were *Penicillium* sp. and *T. allii*, and the temperature of best fermentation conditions were at 25 ℃, the fermentation time for 5 d. Under the optimal combination of multiple-strains and the best fermentation conditions, the pure protein content of the corn straw increased from 2.05% to 29.66% after ammonification and solid-state fermentation, which was more than about 13 times that of non-fermented control. While the crude protein content of the corn straw increased from 2.8% to 35.41%, which was more than about 11 times that of non-fermented control.

Keywords: solid-state fermentation; corn straw; feeding-protein; the combination of the multiple-strains; fermentation condition

农作物秸秆中含有许多有机营养物质,是自然界存在量很大的可再生资源。我国每年秸秆产量达(7.0~

8.0) $\times 10^8$ t^[1],其中,除少部分秸秆被用做牛羊等反刍动物的饲料或还田作肥料外,大部分被焚烧和废弃,既造成资源的巨大浪费,也对环境产生污染。因此,研究利用秸秆生产饲料蛋白,对提高资源利用效率、解决饲料蛋白短缺和环境污染等问题具有重大意义。

近年来,人们分离和筛选出了一些分解秸秆的高效菌株^[2-8],用于发酵秸秆生产饲料蛋白。并对发酵原

收稿日期:2010-03-10

基金项目:山西省科技攻关资助项目(022049)

作者简介:李江颂(1967—),男,实验师,主要从事环境评价及污染治理方面的教学与研究。E-mail:lijsong@sxu.edu.cn

通讯作者:李日强 E-mail:liriqiang@sxu.edu.cn

料的前处理、发酵菌株及菌株组合和发酵的工艺条件等进行了大量的研究^[9-17],但发酵产物的蛋白含量都较低。本研究利用正交试验法考察经氨水氨化后的玉米秸秆固态发酵生产饲料蛋白的不同菌株组合、不同发酵温度和不同发酵时间对发酵产物真蛋白含量的影响,以期得到最好的发酵效果,为提高玉米秸秆的利用效率、降低对环境的污染提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验采用能够分解纤维素和木质素的菌株青霉(*Penicillium* sp.)、暗孢毛壳(*Chaetomium atrosporum*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)和葱色串孢(*Torula allii*)4株菌,均为本实验室保藏菌株。

1.2 培养基

斜面培养基:采用马铃薯培养基;液态种子培养基:将200g去皮马铃薯切块,加水1000mL煮沸30min,然后用纱布过滤,再加入20g蔗糖,溶化后补充水至1000mL,自然pH,每80mL分装到250mL三角瓶中,再加入1%的秸秆粉,0.1MPa灭菌20min;固态发酵培养基:氨化秸秆粉100%,尿素5%,混匀,自然pH,0.1MPa灭菌20min。

1.3 玉米秸秆的氨化

向已干燥的玉米秸秆粉中加入30%(质量分数)的水,混和均匀后装入下口瓶中,再从瓶的底部加入16%(质量分数)的氨水,立即密封下口瓶,放入35℃左右的培养箱中氨化9d,取出后在60℃烘干备用^[17]。

1.4 试验设计与统计分析

试验采用正交试验法,在菌株组合时考虑到分解纤维素的菌株和分解木质素的菌株的搭配因素以及前期试验结果,用3因素3水平(表1),并考虑到各因素间的交互作用,选取L₂₇(3¹³)正交表(表2)进行试验。对试验结果进行方差分析和平均数的Duncan多重比较,所有数据分析采用SPSS 17.0完成。

表1 发酵因素水平表

Table 1 The factors and their levels of the fermentation

因素	水平		
	1	2	3
A:菌株	青霉,葱色串孢	青霉,葱色串孢, 暗孢毛壳	青霉,葱色串孢, 暗孢毛壳,白地霉
B:温度/℃	25	30	35
C:时间/d	3	5	7

1.5 固态发酵

将所选的4株菌活化,分别接种到250mL装有液态种子培养基的三角瓶中,28℃振荡(135 r·min⁻¹)培养36h,按试验设计的菌株组合(表2)以总量为20%的接种量接种于固态发酵培养基中,加入4.4%的微量元素、1:4.5(质量分数)的水,按试验设计的发酵温度和发酵时间(表2)静置发酵培养。

1.6 测定方法

真蛋白的测定:取发酵产物1g(干重)加30mL 75%的乙醇提取1h,充分搅拌后,于4000r·min⁻¹下离心10min,弃去上清液,沉淀于60℃下干燥,而后依据GB/T 6432—1994进行蛋白含量的测定。粗蛋白的测定:按照GB/T 6432—1994进行。

2 结果与分析

2.1 正交试验

发酵产物在60℃下烘干,进行真蛋白的测定,结果见表2。对表2发酵产物真蛋白含量的初步方差分析结果(表3)表明,菌株组合(A)、菌株组合×发酵温度(A×B)和菌株组合×发酵时间(A×C)对发酵产物真蛋白含量皆不具有显著影响($P>0.05$),发酵温度、发酵温度×发酵时间(B×C)对发酵产物真蛋白含量具有显著影响($P<0.05$),发酵时间对发酵产物真蛋白含量具有极显著影响($P<0.01$)。

由于菌株组合×发酵时间(A×C)的离差平方和小于2MS_e(误差项均方),将它的离差平方和及自由度因素合并到误差项,得到最后的方差分析结果(表4)。表4的方差分析结果表明,发酵温度对发酵产物真蛋白含量具有显著影响($P<0.05$),发酵时间、发酵温度×发酵时间(B×C)对发酵产物真蛋白含量具有极显著影响($P<0.01$)。

由发酵温度×发酵时间(B×C)发酵产物真蛋白含量的二元表(表5),应用Duncan的多重比较可以获得发酵温度和发酵时间的最佳搭配为B₁C₂,即发酵温度为25℃,发酵时间为5d。

由于菌株组合各水平之间差异不显著(表3),考虑到实际生产中的成本,固态发酵氨化玉米秸秆生产饲料蛋白的最佳菌株组合和最佳发酵条件为A₁B₁C₂,即菌株组合为青霉和葱色串孢,发酵温度为25℃,发酵时间为5d。

2.2 发酵产物蛋白含量

依据正交试验结果,以总量为20%的接种量接种青霉和葱色串孢于固态发酵培养基中,加入4.4%的

表2 正交设计($L_{27}(3^{13})$)及试验结果($\bar{x} \pm s$)Table 2 Orthogonal design ($L_{27}(3^{13})$) and the results of experiment ($\bar{x} \pm s$)

试验号	1 A	2 B	3 A×B	4 A×B	5 C	6 A×C	7 A×C	8 B×C	9 B×C	10	11	12	13	发酵产物 真蛋白/%
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24.14 ± 0.78
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	29.46 ± 1.02
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	26.87 ± 1.67
4	1	2	2	2	1	1	2	2	2	3	3	3	3	23.59 ± 0.89
5	1	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	1	25.59 ± 0.67
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	22.85 ± 1.89
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	24.47 ± 1.56
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	29.89 ± 0.58
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	24.60 ± 0.87
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	20.80 ± 0.79
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	30.40 ± 1.56
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2	25.96 ± 0.69
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2	24.06 ± 1.98
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3	26.61 ± 1.45
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1	23.01 ± 1.32
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1	24.87 ± 1.45
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2	28.56 ± 1.78
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	22.94 ± 1.23
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	23.07 ± 0.87
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3	29.04 ± 1.56
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1	26.30 ± 1.43
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1	23.83 ± 1.32
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	26.70 ± 1.12
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3	19.86 ± 0.89
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3	22.82 ± 1.53
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1	25.03 ± 1.35
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2	22.62 ± 1.33

表3 发酵产物真蛋白含量的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the pure protein contents of
fermented products

变差来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	8.51	2	4.26	2.66	
B	22.09	2	11.05	6.91	*
C	107.31	2	53.66	33.54	**
A×B	7.78	4	1.95	1.22	
A×C	2.53	4	0.63	0.39	
B×C	29.03	4	7.26	4.54	*
误差	12.79	8	1.60		
合计	190.04	26			

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 下同。

微量元素和1:4.5(质量分数)的水, 25 ℃静止发酵培养5 d, 在60 ℃下烘干, 测定发酵产物的粗蛋白和真蛋白含量, 结果见表6。

表4 发酵产物真蛋白含量的方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for the pure protein contents of
fermented products

变差来源	差方和	自由度	均方	F	显著性
A	8.51	2	4.26	2.66	
B	22.09	2	11.05	6.91	*
C	107.31	2	53.66	33.54	**
A×B	7.78	4	1.95	1.52	
B×C	29.03	4	7.26	5.67	**
误差	15.32	12	1.28		
合计	190.04	26			

从表6可以看出, 采用最佳菌株组合和最佳发酵条件, 玉米秸秆经氨水氨化和固态发酵后真蛋白含量由2.05%提高到29.66%, 比原料本身的真蛋白含量提高了13倍多; 粗蛋白含量由2.80%提高到

表5 BxC(温度×时间)发酵产物真蛋白平均含量

Table 5 The pure protein content of fermented products by interaction BxC(temperature×time)(mean)

发酵温度/℃	发酵产物真蛋白平均含量/%		
	发酵3 d	发酵5 d	发酵7 d
25	22.67	29.63	26.38
30	23.83	26.30	21.90
35	24.05	27.83	23.38

表6 发酵产物粗蛋白和真蛋白含量(平均数)

Table 6 The contents of crude protein and pure protein of fermented products(means)

项目	玉米秸秆	发酵产物	增加
粗蛋白	2.80%	35.41%	1 164.6%
真蛋白	2.05%	29.66%	1 346.8%

35.41%,比原料本身的粗蛋白含量提高了11倍多。

3 讨论

秸秆这种天然纤维性材料具有复杂的立体结构,特别是木质素的屏障作用,使微生物很难将其快速转化。利用氨水对玉米秸秆进行氨化处理,能大幅度提高秸秆的含氮量,部分地改变其天然结构。氨化后的玉米秸秆富集了大量的可发酵性碳源和氮源,有利于微生物的固态发酵,所以本试验在固态发酵之前首先对玉米秸秆进行了氨化处理。

无机盐是微生物生长必不可少的一类营养物质,它们为机体生长提供必需的金属元素。这些金属元素在机体中参与酶的组成、构成酶的最大活性、维持细胞的稳定性、调节与维持细胞的渗透压平衡和控制细胞的氧化还原等。而秸秆中无机盐含量都很低,而且明显缺乏钴、铜、硫、钠、硒和碘等元素,所以在发酵培养基中添加合适浓度的无机盐是必不可少的。

氮源是微生物生长繁殖所必须的营养要素,能够被微生物用作氮源的物质有很多,在实验室或生产上常用的氮源物质有铵盐、硝酸盐和尿素等,对相同添加量的尿素和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 发酵产物的真蛋白含量进行对比分析,加入尿素对秸秆真蛋白含量的提高效果比加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 要好^[16],试验以尿素为氮源物质。

张伟心等^[14]和王德培等^[18]对发酵的起始pH进行了研究,结果分别表明最佳起始pH为5.5和3.0,但对于固态发酵,调节发酵培养基pH的工序较繁琐且增加成本,所以本试验采用自然pH发酵。

为了使微生物更充分利用秸秆中的碳源,并充分将氮源转化为菌体蛋白质,提高秸秆的蛋白含量,试

验采用组合菌株进行固态发酵。同时考虑到分解纤维素的菌株和分解木质素的菌株的搭配因素,将选用的4株菌进行了分组组合形成3个水平,分别为青霉和葱色串孢,青霉、葱色串孢和暗孢毛壳,青霉、葱色串孢、暗孢毛壳和白地霉。方差分析表明,菌株组合各水平之间差异不显著,即暗孢毛壳和白地霉的加入对发酵产物蛋白含量的提高无影响。同时发酵菌采用青霉,不会像木霉那样产生木霉毒素,更有利提高资源的利用效率。

试验结果表明,发酵温度对发酵产物真蛋白含量具有显著影响($P<0.05$),发酵时间、发酵温度与发酵时间之间的交互作用对发酵产物真蛋白含量具有极显著影响($P<0.01$)。说明发酵温度和发酵时间是固态发酵中对发酵产物蛋白含量影响的两个重要因素,并且发酵温度和发酵时间之间存在交互作用,获得发酵温度和发酵时间的最佳搭配对发酵产物蛋白含量的提高是非常重要的。多重比较表明,采用青霉和葱色串孢,在25℃静止发酵培养5d,发酵产物的粗蛋白含量和真蛋白含量都有了极显著提高($P<0.01$)。这充分说明,玉米秸秆经氨水氨化和固态发酵能有效地将部分木质素和纤维素等转化为营养物质,这将大大提高玉米秸秆的综合利用效率,从而扩大畜牧业的饲料来源,减轻玉米秸秆对环境的污染程度。

4 结论

(1)固态发酵氨化玉米秸秆生产饲料蛋白的过程中,发酵温度对发酵产物真蛋白含量具有显著影响($P<0.05$)。发酵时间、发酵温度与发酵时间间的交互作用对发酵产物真蛋白含量具有极显著影响($P<0.01$)。

(2)固态发酵氨化玉米秸秆生产饲料蛋白的最佳菌株组合和最佳发酵条件为A₁B₁C₂,即菌株组合为青霉和葱色串孢,发酵温度为25℃,发酵时间为5d。

(3)采用最佳菌株组合和最佳发酵条件,玉米秸秆经氨水氨化和固态发酵后真蛋白含量由2.05%提高到29.66%,比原料本身的真蛋白含量提高了13倍多。粗蛋白含量由2.80%提高到35.41%,比原料本身的粗蛋白含量提高了11倍多。

参考文献:

- [1] 王革华. 实现秸秆资源化利用的主要途径[J]. 上海环境科学, 2002, 21(11):651-661.
WANG Ge-hua. The main routes of realizing straw resource reuse[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2002, 21(11):651-661.
- [2] 孙力军, 商常发, 钟德山, 等. 高效秸秆发酵剂优良菌种的分离筛选

- 与鉴定[J]. 安徽农业技术师范学院学报, 1999, 13(3):11-13.
- SUN Li-jun, SHANG Chang-fa, ZHONG De-shan, et al. Isolation and identification of good strains of high effective straw fermentation agent[J]. *Journal of Anhui Agrotechnical Teachers College*, 1999, 13(3):11-13.
- [3] 万鲁长, 黄春燕, 于迎春, 等. 作物秸秆发酵转化高效菌株筛选及其初步鉴定[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(4):438-442.
- WAN Lu-chang, HUANG Chun-yan, YU Ying-chun, et al. Selection and identification of high efficiency strains for fermentation transform of crop stubble [J]. *Journal of Shandong Agricultural University*, 2001, 32(4):438-442.
- [4] 陈翠微, 刘长江, 郭文洁, 等. 玉米秸秆发酵剂优良菌种的筛选[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(6):559-561.
- CHEN Cui-wei, LIU Chang-jiang, GUO Wen-jie, et al. Screening of elite strains for maize straw ferment[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2000, 31(6):559-561.
- [5] 李日强, 辛小芸, 刘继青. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育 [J]. 上海环境科学, 2002, 21(1):8-11.
- LI Ri-qiang, XIN Xiao-yun, LIU Ji-qing. Isolation and screening on straw cellulose-decomposing microorganisms[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2002, 21(1):8-11.
- [6] 李日强, 王爱英, 孔令冬. 一株纤维素分解菌的分离选育[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2006, 29(3):317-320.
- LI Ri-qiang, WANG Ai-ying, KONG Ling-dong. Isolation and screening of a cellulose-decomposing fungus strain[J]. *Journal of Shanxi University*, 2006, 29(3):317-320.
- [7] José Dorado, Gonzalo Almendros, Susana Camarero, et al. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25:605-612.
- [8] Hesham M A, Sahar A E. Actinomycetes in rice straw decomposition[J]. *Waste Management*, 2007, 27(6):850-853.
- [9] 杨雪霞, 陈洪章, 李佐虎. 气爆玉米秸秆固态发酵生产饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001(2):27-29.
- YANG Xue-xia, CHEN Hong-zhang, LI Zuo-hu. A study on production of feed from steam explosion pretreated corn straw through solid state fermentation[J]. *Grain and Feed Industry*, 2001(2):27-29.
- [10] Yang X X, Chen H Z, Gao H L, et al. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 78(3):277-280.
- [11] 黄丹莲, 曾光明, 黄国和, 等. 白腐菌固态发酵条件最优化及其降解植物生物质的研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(2):232-237.
- HUANG Dan-lian, ZENG Guang-ming, HUANG Guo-he, et al. Optimum conditions of solid-state fermentation for white-rot fungi and for it's degrading straw[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2):232-237.
- [12] 潘锋, 史小丽, 杨树林, 等. 多菌种混合发酵稻草生产蛋白饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001(8):25-26.
- PAN Feng, SHI Xiao-li, YANG Shu-lin, et al. Studies on the production of protein feed from straw through co-fermentation by multi-strains[J]. *Grain and Feed Industry*, 2001(8):25-26.
- [13] 史小丽, 潘锋, 杨树林. 固态发酵秸秆生产单细胞蛋白的初步研究[J]. 粮食与饲料工业, 2000(12):27-28.
- SHI Xiao-li, PAN Feng, YANG Shu-lin. Studies on solid fermentation of fodder for producing SCP[J]. *Grain and Feed Industry*, 2000(12):27-28.
- [14] 张伟心, 马艳玲, 霍玉鹏. 混合菌发酵玉米秸秆生产菌体蛋白饲料的研究[J]. 饲料研究, 2000(6):5-7.
- ZHANG Wei-xin, MA Yan-ling, HUO Yu-peng. Study on fermentation of corn straw to produce feeding-protein by using the combination of the multiple-strains[J]. *Feed Research*, 2000(6):5-7.
- [15] 杨雪霞, 陈洪章, 李位虎. 玉米秸秆氨化气爆处理及其固态发酵[J]. 过程工程学报, 2001, 1(1):86-89.
- YANG Xue-xia, CHEN Hong-zhang, LI Wei-hu. Steam-explosion of ammoniated corn straw and subsequent solid state fermentation[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2001, 1(1):86-89.
- [16] 李日强, 张峰. 不同菌株固态发酵玉米秸秆生产饲料蛋白的比较研究[J]. 生态学报, 2001, 21(9):1512-1518.
- LI Ri-qiang, ZHANG Feng. Study on the solid-state fermentation of waste straw to produce feeding-protein by using some fungal strains[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(9):1512-1518.
- [17] 李日强, 张峰, 张伟峰. 氨化和固态发酵玉米秸秆生产饲料蛋白的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6):1636-1639.
- LI Ri-qiang, ZHANG Feng, ZHANG Wei-feng. Ammonification and solid-state fermentation of corn straw to produce feeding-protein[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6):1636-1639.
- [18] 王德培, 刘瑛, 夏兰英, 等. 里氏木霉和酵母菌混合发酵玉米秸秆的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 2002(2):1-3.
- WANG De-pei, LIU Ying, XIA Lan-ying, et al. Study on mixed culture fermentation of trichoderma and yeast for hydrolysis of corn straw[J]. *Journal of Tianjin University of Light Industry*, 2002(2):1-3.