

文章编号:1673-1689(2007)04-0077-06

中药渣固态发酵生产蛋白饲料

王兵¹, 王向东¹, 秦岭¹, 叶菁菁¹, 李银波¹, 万正武¹, 谭显东²

(1. 四川大学 建筑与环境学院, 四川 成都 610065; 2. 成都信息工程学院 环境工程系, 四川 成都 610225)

摘要: 利用白腐菌对中药渣进行固态发酵。研究了葡萄糖添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量、初始 pH 值、料水质量比、发酵时间对发酵的影响, 初步确定了中药渣固态发酵的最优工艺条件。结果表明, 中药渣在经过白腐菌 3~5 d 静止发酵后, 发酵产物的真蛋白质量分数可达 19.05%, 比原料本身的真蛋白质量分数高 71.34%, 粗纤维质量分数由 29.14% 降低到 17.42%。由此可见, 该方法可使中药渣得到合理的利用, 其发酵产物可作为蛋白饲料资源。

关键词: 白腐菌; 固态发酵; 中药渣

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Study on the Protein Feedstuff from Herb-medicine Residues by Solid-State Fermentation

WANG Bing¹, WANG Xiang-dong¹, QIN Ling¹, YE Jing-jing¹,

LI Yin-bo¹, WAN Zheng-wu¹, TAN Xian-dong²

(1. College of Architecture and Environment, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Environment Engineering Department, Chengdu University of Information Technology, Chengdu 610225, China)

Abstract: In this study, the white rot fungi was used to deal fermentation production protein feed stuff with herb-medicine residues as substrate by solid-state fermentation. The optimum fermentation conditions were obtained based on. It was found that the protein content in fermentation product was increased to 19.05%, higher 71.31% than that of the herb-medicine residues, but the crude cellulose reduced from 29.14% to 17.42%. So the herb-medicine residues could be reasonable reuse and the fermentation products of herb-medicine residues should be a resource of protein feedstuff after it was used by white rot fungi though solid-state fermentation. The results presented here provide a novel way to produce the protein feed stuff from herb-medicine residues.

Key words: white rot fungus; solid-state fermentation; herb-medicine residues

随着中医药事业的迅速发展, 中成药的生产量逐年攀升。而在中成药的生产加工过程中, 会产生

大量的药渣。中药药渣一般含水量较高, 极易腐败, 会对环境造成严重的污染。但中药渣中尚含有

收稿日期: 2006-12-03.

作者简介: 王兵(1981-), 男, 四川达州人, 环境工程专业硕士研究生. Email: wbyvolvo@163.com

通讯作者: 王向东(1955-), 女, 四川自贡人, 工学硕士, 副教授, 主要从事环境生物工程方面的研究. Email: wxd55

@tom.com

蛋白质、纤维素、多糖等可利用成分^[1],及时对其进行综合利用,不仅可以解决污染问题,还可带来一定的经济效益。

目前,研究者在中药渣的综合利用方面做了许多研究,包括利用中药渣培养食用菌^[2]、用中药渣发酵制肥料^[3]、用中药渣造纸和制备絮凝剂^[4]等,其中利用中药渣进行食用菌栽培已经取得成功并开始推广应用。国内对固态发酵中药渣生产蛋白饲料的研究还未见报道。采用固态发酵方式将中药渣制成蛋白饲料,不仅可以避免中药渣带来的环境污染,还可以使中药渣成为新的蛋白饲料资源,为中药渣的综合利用提供了另外一条途径。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

白腐菌 5.776 (*Phanerochaete chrysosporium*),购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.2 实验原料

试验所用中药渣取自广元市某制药厂,经干燥粉碎后备用。该药渣主要由经煎熬浸取后的野菊花、忍冬、夏枯草组成,其中含有真蛋白 11.12%,粗纤维 29.14%及还原糖 0.35%。

1.3 培养基

PDA 培养基:马铃薯浸取液 1.0 L,葡萄糖 20.0 g,琼脂 15.0 g,pH 自然,于 121 °C 灭菌 20 min。用于菌种培养。

固态发酵培养基:以中药渣为唯一培养基质,添加一定量水分、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及微量元素,配制用于考察葡萄糖添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量、料水质量比、初始 pH、发酵时间对发酵产物真蛋白和粗纤维含量的影响的不同培养基。

1.4 试验方法

将菌种在 PDA 斜面培养基上活化 3 代后,制成一定浓度的孢子悬液,然后接种到固态发酵培养基中,在 35~39 °C 静止培养一定时间后,55~65 °C 烘干,取样测定发酵产物中的真蛋白和粗纤维含量。

1.5 分析方法

1.5.1 真蛋白的测定 发酵产品用 60 mL 75% 的乙醇提取 1 h,充分搅拌后,于 4 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清液,沉淀物于 55~65 °C 下烘干。采用凯氏定氮法(GB6432-86)^[5]测定蛋白质含量,并计算出产品真蛋白增长率。

真蛋白增长率=

$$\frac{(\text{发酵产物真蛋白质量分数}-\text{原样真蛋白质量分数})}{\text{原样真蛋白质量分数}} \times 100\%$$

1.5.2 粗纤维的测定 发酵产物在 55~65 °C 下烘干后,采用酸碱洗涤法(GB6432-86)^[5]测定粗纤维含量,并计算出产品粗纤维降解率。

粗纤维降解率=

$$\frac{(\text{原样粗纤维质量分数}-\text{发酵产物粗纤维质量分数})}{\text{原样粗纤维质量分数}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖添加量对发酵产物真蛋白和粗纤维含量的影响

中药渣中的碳素物质主要以纤维素、半纤维素和木质素形式存在^[6],但纤维素需要被降解为糖类后才能被微生物吸收利用。因此在发酵初期向培养基中添加葡萄糖,可以加快白腐菌的菌体生长速度,促进其对纤维素的降解和利用。本试验中分别向固态发酵培养基中添加 0,1,3,5 g/dL 的葡萄糖。试验结果见图 1。可见,添加一定量的葡萄糖可以有效提高蛋白质的质量分数,但是,随着添加量的增加,粗纤维降解率明显下降,当葡萄糖添加量增加至 5 g/dL 时,粗纤维质量分数为 28.00%,降解率仅为 3.91%。

该结果表明,在中药渣中添加葡萄糖不利于其对纤维素的降解。过多的葡萄糖会抑制纤维素酶的合成,从而影响纤维素的降解。因此,在白腐菌固态发酵中药渣时不需要添加葡萄糖。

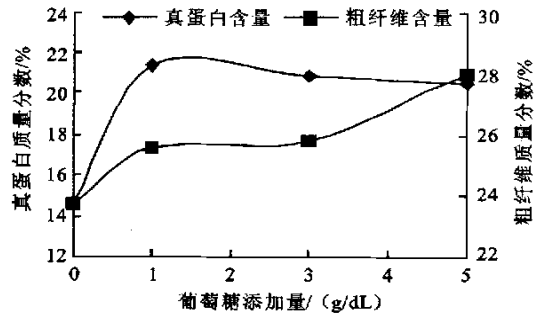


图1 葡萄糖添加量与真蛋白和粗纤维含量的关系

Fig.1 Effect of glucose concentration on the concentration of protein and crude cellulose

2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量对发酵产物真蛋白和粗纤维含量的影响

氮是合成蛋白质的重要元素,中药渣中氮源相对缺乏。可为白腐菌生长提供氮源的物质有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4CONH_2 , NaNO_3 等,其中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 更有利于白腐菌的菌体生长^[7]。按 2, 3, 4, 5, 6 g/dL 向发酵培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。试验结果见图 2。可见, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的添加量对发

酵产物中真蛋白和粗纤维质量分数均有较大的影响。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量低于 3 g/dL 时,发酵产物的真蛋白质量分数较低而粗纤维含量较高;而当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量高于 5% 时,发酵产物的真蛋白仍有少量增长,但粗纤维含量却维持在较高的水平。可见,过多的氮源虽然促进了菌体生长,却影响了纤维素酶的合成,进而影响白腐菌对纤维素的分解。因此利用白腐菌固态发酵中药渣时,应将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量控制在 3~5 g/dL 范围内,在此条件下,发酵产物的真蛋白质量分数可达 17.95~19.62%,增长 61.49%~76.52%,粗纤维质量分数降至 20.52%~20.65%,降解率在 29.14% 以上。

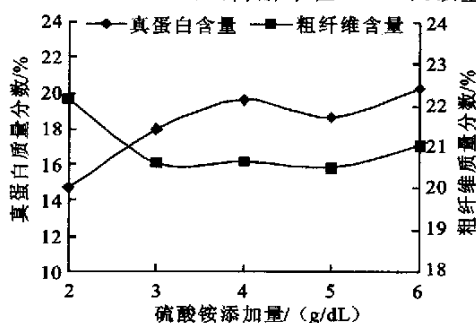


图2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量与真蛋白和粗纤维含量的关系

Fig. 2 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ the concentration of protein and crude cellulose

2.3 初始 pH 值对发酵产物真蛋白和粗纤维含量的影响

大部分的微生物都有一个最适生长的 pH 值范围,培养基的初始 pH 值直接关系到白腐菌的生长。图 3 是发酵培养基初始 pH 值在 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 时发酵产物的真蛋白质量分数和粗纤维质量分数的测定结果。

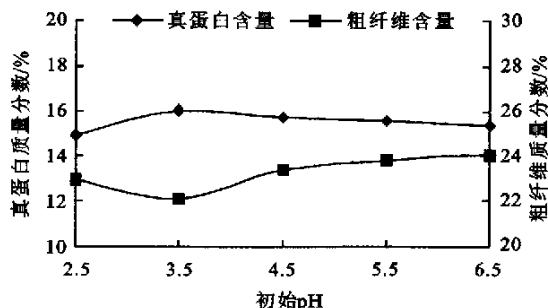


图3 初始 pH 值与真蛋白和粗纤维含量的关系

Fig. 3 Effect of initial pH on the concentration of protein and crude cellulose

从图 3 可见,在初始 pH 值为 3.5 时发酵产物的真蛋白质量分数达到最高,为 16.04%,增长

44.31%;粗纤维质量分数由 29.14% 下降到 22.12%,降解率达到 24.09%;高于和低于该 pH 值时,发酵产物的真蛋白增长率和粗纤维降解率均有所下降。这是由于 pH 值改变了白腐菌生长环境中营养物质的存在状态和白腐菌细胞膜的生理功能,从而影响其对营养物质的吸收,抑制白腐菌菌体的生长,使白腐菌的纤维素酶产生量及酶的活性降低,从而导致真蛋白增长率和纤维素降解率都有所下降。

2.4 培养基料水质量比对发酵产物真蛋白和粗纤维含量的影响

固态发酵过程中,培养基的含水量影响着胞外酶的分泌和转移,氧的传递以及菌体的生长。作者向发酵培养基中添加一定量的水,使料水质量比为 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 试验结果见图 4。

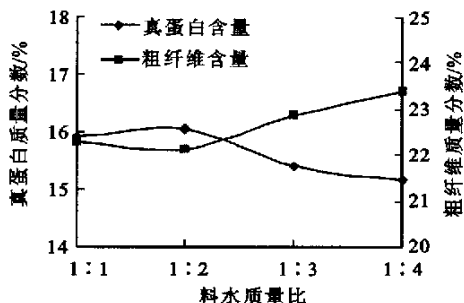


图4 培养基料水质量比与真蛋白和粗纤维含量的关系

Fig. 4 Effect of the ratio of material to liquid on the concentration of protein and crude cellulose

由图 4 可以看出,在料水质量比为 1:2 时,真蛋白增长率和粗纤维降解率达到最高,这时真蛋白质量分数为 16.04%,增长了 44.31%,粗纤维质量分数为 22.12%,降解率达 24.09%。料水质量比低于 1:2 时,物料膨胀程度低,微生物的生长受到抑制。料水质量比高于 1:2 时,过高的含水量导致物料多孔性降低,减少了物料内气体的交换,造成局部缺氧,不利于白腐菌对中药渣的生物降解过程。因此过高或过低的料水质量比都会使发酵产物的真蛋白增长率和粗纤维降解率降低。

2.5 发酵时间对发酵产物真蛋白和粗纤维含量的影响

适当控制发酵时间,不仅可以得到最高的蛋白产率和粗纤维降解率,还可以降低生产成本。发酵时间与真蛋白和粗纤维含量的关系见图 5。

由图 5 可见,发酵时间为 3~5 d 时,真蛋白质量分数可达到 17.59%,粗纤维质量分数最低降到 20.56%。资料显示,在以纤维素为碳源时,白腐菌在生长的前 3 d 为对数期,生物量增长迅速,3 d 后

进入稳定期,菌体增长基本停止,开始产生孢子^[8]。

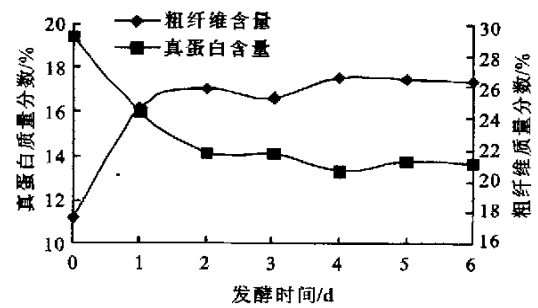


图 5 发酵时间与真蛋白和粗纤维含量的关系

Fig. 5 Effect of fermentation time on the concentration of protein and crude cellulose

这与本试验的结果基本一致,在发酵前期,蛋白质质量分数迅速提高,粗纤维质量分数迅速下降。随后真蛋白增长率和粗纤维降解率都达到最高值。发酵后期培养基上出现大量孢子,这时菌体的活性降低,不再对中药渣中的纤维素等进行转

化,产物的真蛋白质量分数不再提高。因此,中药渣固态发酵的发酵时间应控制在 3~5 d。

2.6 中药渣固态发酵的培养条件优化

选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量、初始 pH、料水质量比、接种量 4 个因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验。实验因素水平见表 1,以真蛋白含量和粗纤维含量为指标,采用双指标分析方法对结果进行分析。实验结果与综合评分^[9]结果见表 2。

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Levels of factors in orthogonal test

水平	因素			
	A 氮的添加量/ (g/dL)	B 初始 pH 值	C 料水 质量比	D 接种量/ 个孢子数
1	3	6.0	1 : 2	2×10^6
2	4	5.0	1 : 1	2×10^7
3	2	4.0	1 : 3	2×10^8

表 2 正交试验结果与综合评分表

Tab. 2 The results of orthogonal test and the mark of comprehensive analysis

试验号	A $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量/(g/dL)	B 初始 pH 值	C 料水 质量比/(g/g)	D 接种量/ 个孢子数	真蛋白 质量分数/%	粗纤维 质量分数/%	综合 评分
1	1	1	1	1	18.03	17.16	26.74
2	1	2	2	2	18.28	17.38	27.02
3	1	3	3	3	18.55	18.48	18.66
4	2	1	2	3	18.34	18.24	18.92
5	2	2	3	1	18.40	18.34	18.53
6	2	3	1	2	18.85	17.44	32.06
7	3	1	3	2	16.77	17.82	7.49
8	3	2	1	3	17.05	18.05	8.01
9	3	3	2	1	17.18	17.68	13.05
K_1	72.43	53.15	66.82	58.32	总分 170.48		
K_2	69.51	53.56	58.99	66.58			
K_3	28.54	63.77	44.68	45.59			
k_1	24.14	17.72	22.27	19.44			
k_2	23.17	17.85	19.66	22.19	总平均分: $170.48/9=18.94$		
k_3	9.51	21.26	14.89	15.20			
R	14.63	3.54	7.38	7.00			

由极差分析结果可知,各因素对发酵产物真蛋白含量和粗纤维含量的影响程度的大小依次为: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量>料水质量比>接种量>初始 pH 值。这表明 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量是固态发酵中药渣生产工艺中最主要的影响因素,这是由于培养基

中的含氮量直接关系着白腐菌菌体蛋白和酶蛋白的合成,因此在生产中应严格控制 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量。同时适当的料水质量比和接种量不但可使发酵产品品质提高,而且还可以节省动力和发酵成本。初始 pH 值对中药渣固态发酵的影响最小,由

于白腐菌可在较宽 pH 值范围内进行生长繁殖^[10]。另外在试验中还发现,中药渣具有较强缓冲能力,能够对培养基中 pH 值的改变起到调节作用。因此在工业化生产中可以不进行 pH 值调节。

由因素水平与 k 作图,得因素水平与 k_i 关系图

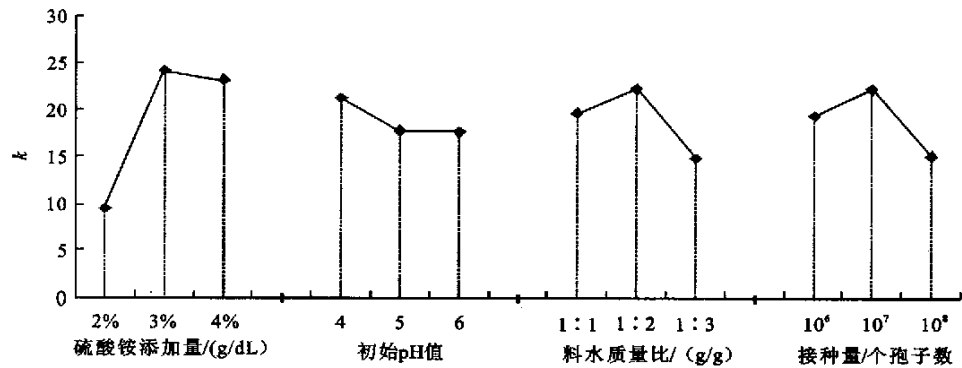


图 6 正交试验直观分析图
Fig. 6 The directly analysis of orthogonal test

2.7 优化条件下的发酵结果与产品的质量分析

在优化条件下,利用白腐真菌对中药渣进行发酵后,其发酵产品呈白色,有曲香味,无霉臭味。其发酵产物的真蛋白含量为 19.05%,增长率为 71.31%;粗纤维含量为 17.42%,降解率达 40.02%。

见图 6,由图 6 可以看出,白腐菌固态发酵中药渣的最优培养条件为 $A_1B_3C_1D_2$,即 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量 3 g/dL,初始 pH 值 4.0,料水质量比 1 : 2,接种量 2×10^7 个孢子。

采用高效液相色谱分析方法进一步对原料和发酵产物的氨基酸组分含量进行测定分析,结果见表 4。中药渣经发酵后,产品中的氨基酸总量为 13.38%,比原料的氨基酸总量提高了 37.80%。可见,白腐真菌发酵中药渣可明显提高真蛋白和氨基酸的质量分数。

表 4 中药渣发酵前后氨基酸质量分数比较
Tab.4 The amino acid content of the fermentation product and the Herb-medicine residues

氨基酸	中药渣原料	发酵产品	氨基酸	中药渣原料	发酵产品
门冬氨酸	1.01	1.42	亮氨酸	1.14	1.54
苏氨酸	0.52	0.76	酪氨酸	0.24	0.32
谷氨酸	0.52	0.74	苯丙氨酸	0.50	0.66
甘氨酸	0.58	0.84	赖氨酸	0.57	0.68
丙氨酸	0.61	0.86	组氨酸	0.19	0.43
胱氨酸	0.11	0.19	精氨酸	0.47	0.53
缬氨酸	0.56	0.82	脯氨酸	0.87	1.16
蛋氨酸	0.11	0.19	氨基酸总量	9.71	13.38
异亮氨酸	0.47	0.63			

实验中,发酵产物的真蛋白质量分数的绝对值提高不多,如何大幅度提高发酵产物的真蛋白质量分数,选育能有效降解不同组分药渣并使之转化为蛋白饲料的优良菌种,将是今后研究工作的重点。

3 结 语

1)利用白腐菌进行中药渣固态发酵生产蛋白饲料可使中药渣纤维素质量分数降低,并且能显著

提高蛋白质和氨基酸的质量分数。由此可见,该方法可使中药渣得到合理的利用,其发酵产物可成为蛋白饲料资源。

2) 白腐菌固态发酵中药渣生产蛋白饲料的发酵条件: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为 3 g/dL, 料水质量比

为 1:2, 发酵周期为 3~5 d, 接种量为 2×10^7 个孢子/10 g 干渣, 发酵温度为 35~39 °C, 初始 pH 4.0。在此条件下发酵, 真蛋白质量分数为 19.05%, 提高了 71.31%; 粗纤维质量分数 17.42%, 降解率达到 40.02%。

参考文献(References):

- [1] 吴纯洁, 王一涛, 雷佩琳. 中药药渣的综合利用与处理[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(1): 59-60.
WU Chun-jie, WANG Yi-tao, LEI Pei-lin. Recovery utilization and treatment of herb-medicine residue[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1998, 23(1): 59-60. (in Chinese)
- [2] 潘继红, 朱升学. 板蓝根药渣制平菇栽培种试验[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(1): 25-26
PAN Ji-hong, ZHU Sheng-xue. An experiment of making pleurotus ostreatus cultivation seed with isatis indigotica for draff[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 1999, 18(1): 25-26. (in Chinese)
- [3] 唐懋华, 成维东. 中药渣基质对蔬菜育苗及产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2005, 4: 81-82
TANG Mao-hua, CHENG Wei-dong. The influence on vegetable grow seedings with herb-medicine residue substrate[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2005, 4: 81-82. (in Chinese)
- [4] 罗鸿. 中药渣絮凝剂处理造纸废水的研究[J]. 四川环境, 1998, 17(3): 24-26.
LUO Hong. Study on pulping wastewater treatment with flocculant made from herb-medicine residue[J]. *Sichuan Environment*, 1998, 17(3): 24-26. (in Chinese)
- [5] 中国饲料工业办公室编. 饲料标准资料汇编[M]. 北京: 中国标准出版社, 1991: 254-285.
- [6] 马逊风, 马宏军, 唐占辉等. 中药渣剩余成分分析及利用途径研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2004, 36(2): 108-111.
MA Xun-feng, MA Hong-jun, TANG Zhan-hu. The analyze of the ingredients left in the herb residue and the study of the reuse of the herb residue[J]. *Journal of Northeast Normal University, Natural Science Edition*, 2004, 36(2): 108-111. (in Chinese)
- [7] 陈敏, 吴雪昌. 微生物发酵稻草生产饲料蛋白培养条件的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 48-51
CHEN Min, WU Xue-chang. Study on culture conditions of microbe feeding protein with straw as fermentation material [J]. *Microbiology*, 2001, 28(6): 48-51. (in Chinese)
- [8] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [9] 白新桂. 数据分析与试验优化设计[M]. 北京: 清华大学出版社, 1986.
- [10] 张晓昱, 王宏勋, 魏玫, 等. 白腐菌对高 pH 值的耐受性及驯化提高[J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(9): 111-113.
ZHANG Xiao-yu, WANG Hong-xun, WEI Mei, et al. The high pH enduring ability and enhancement of white rot fungi by cultured domestically in high pH media[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2002, 30(9): 111-113. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)