

不同菌种以三七渣为基质的发酵过程

谭显东, 段娅宁, 王君君, 羊依金

(成都信息工程学院 资源环境学院, 四川 成都 610225)

摘要: 为了选择合适的菌种用于三七渣固态发酵生产蛋白饲料, 分别进行了黑曲霉、康宁木霉、米曲霉、绿色木霉、白腐菌共 5 种多糖分解菌和产朊假丝酵母、热带假丝酵母、酿酒酵母共 3 种酵母菌以三七渣为基质的发酵过程研究。研究表明, 多糖分解菌对三七渣的代谢能力明显强于酵母菌, 在发酵过程中多糖分解菌发酵培养物的还原糖质量浓度、pH 值、干重变化幅度均大于酵母菌。在所有受试菌种中黑曲霉对三七渣的代谢能力最强, 其发酵培养物中还原糖质量浓度峰值可达 250 mg/g, 经过 5 d 发酵后黑曲霉发酵培养物的干基减重率达 42.6%, 真蛋白质量分数达到 23.92%。

关键词: 三七; 三七渣; 发酵; 饲料

中图分类号: X 705 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)08—0882—05

Study on Fermentation Process of Different Strains Cultured in the Substrate of Notoginseng Residues

TAN Xian-dong, DUAN Ya-ning, WANG Jun-jun, YANG Yi-jin

(College of Resources and Environment, Chengdu University of Information Technology, Chengdu 610225, China)

Abstract: Five species of polysaccharide decomposition fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma viride* and *Trichoderma koningii*) and three species of yeasts (*Candida utilis*, *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*) were cultured respectively in the substrate of notoginseng residues, to select the suitable strains for the production of protein feed. The result indicated that the metabolization capability on notoginseng residues by polysaccharide decomposition fungi was stronger than that by yeasts. During the whole fermentation period, the amplitude of variation of reducing sugar content, pH value and dry weight in the fermentation culture by polysaccharide decomposition fungi is larger than that by yeasts. The metabolization capability of *Aspergillus niger* on notoginseng residues was the strongest in all tested fungi, and the maximum of reducing sugar content in the fermentation culture can reached at 250 mg/g, and the loss ratio of dry weight can reached at 42.6% and the true protein content in the fermentation culture can reached at 23.92% after five-days' fermentation.

Keywords: notoginseng, residues, fermentation, feed

收稿日期: 2012-11-29

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2008SZ0129)。

作者简介: 谭显东(1973—), 男, 重庆人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事污染控制与资源化方面的研究。

E-mail: jacktxd@sina.com

近年来,中成药事业的快速发展导致中药渣废弃物排放量日益增加,2005年全国排放的中药渣量已达3 000万t^[1]。如何合理地处置和利用中药渣是实现中药现代化进程中一个不可回避的重要问题。将中药渣通过固态发酵技术转化为蛋白饲料^[2-7]可以有效地实现药用植物生物量的全利用,在消除环境污染的同时还能养殖业提供一种新型保健饲料,符合国家发展循环经济的产业政策。

微生物固态发酵生物原料生产蛋白饲料的关键在于选择合适的菌种,目前常用的微生物有多糖分解菌和酵母菌这两大类。由于微生物对营养物质的需求具有多样性,再加上不同种类的废弃生物原料其组成和营养成分差异较大,因此采用固态发酵技术生产蛋白饲料的首要任务就是筛选出合适的微生物菌种。研究采用5种多糖分解菌和3种酵母菌为试验菌种,通过菌体发酵过程研究,比较不同菌种对三七渣的利用情况,以此作为菌种选择的依据。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本实验所用的康宁木霉 3.2774 (*Trichoderma koningii* 3.2774)、绿色木霉 (*Trichoderma viride* 3.3711)、白腐菌 5.776 (*Phanerochaete chrysosporium* 5.776)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis* 2.281):由四川大学建筑与环境学院保藏和提供;黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*):由山东农业大学生命科学学院保藏和提供;热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*):由河北科技大学生物工程学院保藏和提供。

1.2 培养基

PDA培养基:在1.0 L马铃薯浸取液中加入20.0 g葡萄糖和15.0 g琼脂,pH保持自然,在121℃灭菌30 min,用于康宁木霉、绿色木霉、白腐菌、黑曲霉、米曲霉的平板培养。

土豆汁液体培养基:在1.0 L土豆汁中加入20.0 g葡萄糖,pH保持自然,于121℃灭菌30 min,用于产朊假丝酵母、热带假丝酵母、酿酒酵母的液体培养。

三七渣固态发酵培养基:在10 g过60目筛的三七渣中加入0.4 g硫酸铵、0.04 g磷酸二氢钾、0.005 g硫酸镁、0.005 g氯化钠,培养基含水量

60%。于121℃灭菌30 min,用于各菌种生长代谢曲线实验研究。

1.3 三七渣

三七渣:由四川省某中成药厂提供,湿物料经烘干、粉碎、过40目筛后置于干燥器中备用。本次实验所用药渣中各主要成分质量分数如下:粗蛋白质12.28%,粗淀粉:33.13%,真蛋白9.97%,还原糖1.37%。若无特别说明,药渣质量均以绝干物料计量。

1.4 实验方法

1.4.1 种子液的制备 霉菌和白腐菌采用PDA平板培养基在30℃下于电热恒温恒湿培养箱内培养3~3.5 d后刮下,将其制成浓度为 2×10^7 个/mL的孢子悬液;酵母菌采用土豆汁液体培养基在30℃下于电热恒温培养箱内培养约16 h,制成浓度为 2×10^7 个/mL的菌悬液。

接种量定义如下:10 g三七渣培养基中接入1 mL该菌悬液,称为10%的接种量,依此类推。

1.4.2 各菌种生长代谢曲线实验 取若干个250 mL的锥形瓶,分别装入10 g三七渣固态发酵培养基,121℃灭菌30 min以上,冷却后,按照10%的接种量,分别接入10%的康宁木霉、绿色木霉、白腐菌、黑曲霉、米曲霉、产朊假丝酵母、热带假丝酵母和酿酒酵母,然后在30℃的恒温恒湿培养箱中培养5 d,每隔12 h取样分析一次,测定发酵培养物的干重、还原糖质量分数和pH值。发酵结束后测量发酵培养物中的粗蛋白和真蛋白质量分数。

1.5 分析方法

1.5.1 粗蛋白的测定 凯氏定氮法^[8]。

1.5.2 真蛋白的测定 发酵样品先进行醇洗预处理去除其中的无机氮^[9],再采用凯氏定氮法测定^[8]。

1.5.3 淀粉的测定 酸水解法^[10]。

1.5.4 还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸法^[11]。

1.5.5 pH的测定 称取1.0 g发酵培养物湿物料连同50 mL蒸馏水一起放入烧杯中,用磁力搅拌器搅拌5 min,然后静置20 min,采用雷磁牌pH 3~3c精密pH计(上海精密科学仪器有限公司)测定上清液的pH值。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养物还原糖质量分数的动态变化

各菌种以三七渣为基质进行固态发酵时其发酵培养物中还原糖质量分数的动态变化曲线分别

见图 1 和图 2。

由图 1 和图 2 可以看出,多糖分解菌对三七渣的糖化能力明显强于酵母菌。

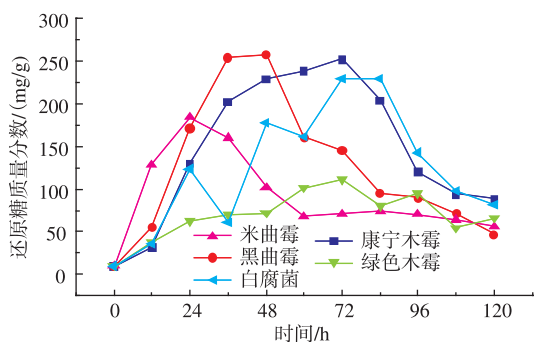


图 1 多糖分解菌发酵培养物还原糖质量分数的动态变化
Fig. 1 Dynamic change of reducing sugar content in the fermentation culture (polysaccharide decomposition fungi)

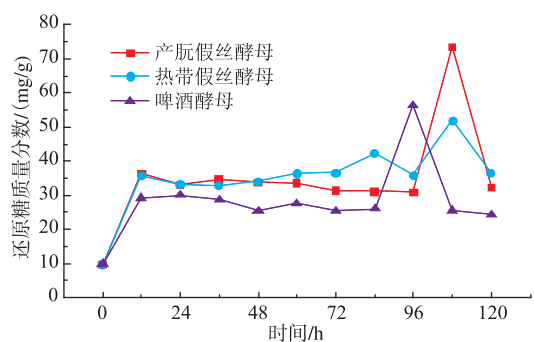


图 2 酵母菌发酵培养物还原糖质量分数的动态变化
Fig. 2 Dynamic change of reducing sugar content in the fermentation culture (yeasts)

在整个发酵过程中,三七渣接种多糖分解菌进行发酵时,还原糖质量分数先升高后降低,变化幅度较大,采用黑曲霉发酵时峰值可以达到 250 mg/g 发酵培养物。微生物的新陈代谢活动包括分解代谢和合成代谢,在发酵前期,多糖分解菌分解代谢产生还原糖的速度大于其合成代谢消耗还原糖的速度,所以还原糖会不断累积,质量分数逐渐升高,在发酵后期,由于菌体数量的增多,其对还原糖的利用速率越来越大,高于还原糖的生成速率,所以还原糖的质量分数会逐渐下降。采用根霉发酵生木薯渣时在发酵初期也观察到与此类似的葡萄糖累积现象^[12]。

三七渣接种酵母菌时,在 0~12 h 期间,发酵培养物干重有比较明显的下降,还原糖质量分数由 10

mg/g 左右上升到 30~40 mg/g,可能是酵母利用三七渣中残存的少量还原糖进行代谢活动;在发酵 12~96 h 期间,随着可利用碳源的减少,酵母菌代谢活动减弱,还原糖的产生和消耗速率基本达到平衡,还原糖质量分数几乎没有变化。但是当发酵进行 96 h 或 108 h 的时候,还原糖的质量分数第二次出现峰值(50~75 mg/g)后迅速下降,回落到先前的水平,这可能是由于某些具有诱导性的代谢物质累积到一定浓度,诱导酵母菌产生了转化酶、丙酮酸脱羧酶、醇脱氢酶等^[13]催化水解了前期发酵过程中产生的某些中间代谢产物,从而导致还原糖质量分数升高,这样产生的少量还原糖被酵母利用后质量分数很快又恢复到先前的水平。而在采用产朊假丝酵母发酵苹果渣生产营养富集基质的研究中,还原糖只随发酵时间的延长而逐渐下降,没有观察到还原糖的累积现象^[14]。

2.2 发酵培养物干重的动态变化

各菌种以三七渣为基质进行固态发酵时其发酵培养物干重的动态变化曲线分别见图 3 和图 4。

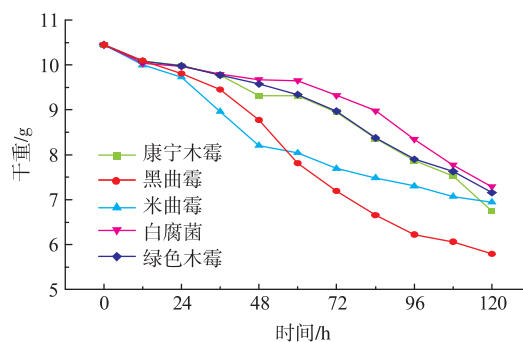


图 3 多糖分解菌发酵培养物干重的动态变化
Fig. 3 Dynamic change of dry weight of fermentation culture (polysaccharide decomposition fungi)

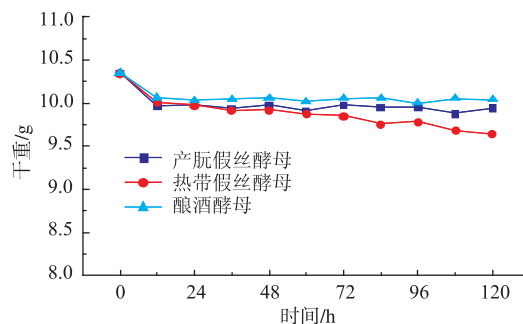


图 4 酵母菌发酵培养物干重的动态变化
Fig. 4 Dynamic change of dry weight in the fermentation culture (yeasts)

由图3和图4可以看出,多糖分解菌发酵培养物的干重变化幅度远远大于酵母菌。在所有受试菌种中,发酵培养物干重变化幅度最大的是黑曲霉,到发酵结束时,其干重小于6.0 g;酵母菌发酵培养物的干重变化较小(最大失重不超过1.0 g)。发酵培养物干重变化幅度越大,说明微生物的代谢活动越强烈,发酵过程中释放的二氧化碳越多。造成这两类菌体的代谢活动产生较大差异的原因在于:多糖分解菌能够大量分泌各种淀粉酶或纤维素酶,用于水解三七渣中的多糖类大分子物质并生成还原糖供其自身利用,呼吸作用很强烈;而酵母菌不能大量产生这些酶类,就只能利用三七渣中残存的少量低碳糖,因此代谢过程自然就不如多糖分解菌活跃。

2.3 发酵培养物 pH 的动态变化

各菌种以三七渣为基质进行固态发酵时其发酵培养物 pH 的动态变化曲线分别见图5和图6。

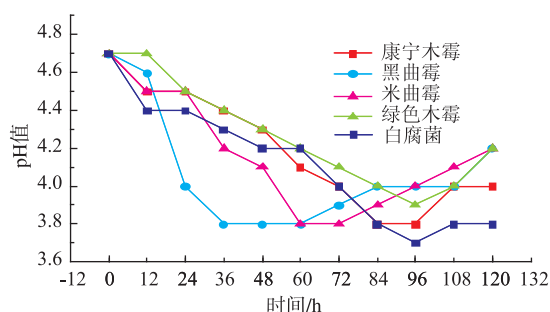


图5 多糖分解菌发酵培养物 pH 的动态变化

Fig. 5 Dynamic change of the fermentation culture pH (polysaccharide decomposition fungi)

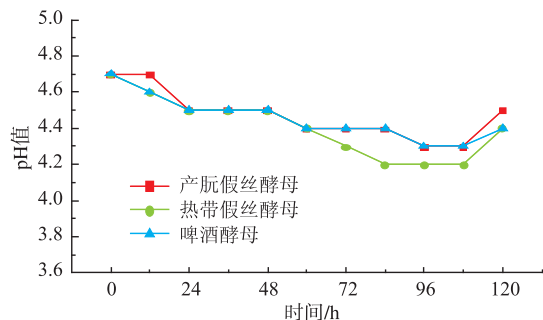


图6 酵母菌发酵培养物 pH 的动态变化

Fig. 6 Dynamic change of the fermentation culture pH (yeasts)

由图5和图6可以看出,与酵母菌相比,多糖

分解菌在三七渣上培养时发酵培养物的 pH 变化较大,尤其是黑曲霉发酵三七渣的时候, pH 下降得最快,在发酵 36 h 后基质的 pH 由 4.7 下降到 3.8。由于微生物在对多糖类物质进行代谢过程中会产生各种有机酸,因此发酵培养物的 pH 会发生变化, pH 的变化幅度也间接反映了发酵过程中微生物代谢活动的强弱。实际上,采用同一种多糖分解菌,针对不同的基质进行固态发酵,在发酵过程中基质 pH 变化趋势也有所不同,这取决于基质是否容易被微生物分解利用。例如,采用黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵棕榈仁饼^[15]、稻糠、小麦麸皮和落花生饲草时, pH 变化趋势与图5相似,但是,采用锯木屑为基质时,发酵过程中 pH 变化幅度就很小^[16]。

2.4 发酵培养物的真蛋白质量分数

经过 5 d 的发酵后,不同菌种发酵培养物中真蛋白质量分数排序如下:

黑曲霉 (23.92%)>白腐菌 (20.44%)>米曲霉 (19.56%)>绿色木霉 (18.38%)>康宁木霉 (17.88%)>产朊假丝酵母>(10.79%)热带假丝酵母 (9.98%)>酿酒酵母 (9.35%)。

由此可以看出,在经历 5 d 的发酵后,不同受试菌种的发酵培养物中真蛋白质量分数差异较大,多糖分解菌的发酵培养物中真蛋白质量分数远远高于酵母菌,这与图1~6中所反映出的不同菌种对三七渣的代谢能力差异相一致。在所有受试菌种中,黑曲霉对三七渣的代谢能力最强,发酵结束时其发酵培养物中真蛋白质量分数最高。

3 结 语

在本次试验条件下,通过不同菌种以三七渣为基质的发酵过程研究,可以得到如下结论:

1) 多糖分解菌对三七渣的代谢能力明显强于酵母菌。在发酵过程中多糖分解菌发酵培养物的还原糖质量分数、干重、pH 值变化幅度均大于酵母菌。

2) 在所有受试菌种中黑曲霉对三七渣的代谢能力最强,其发酵培养物中还原糖质量分数峰值可达 250 mg/g,发酵结束时其发酵培养物干基减重率达 42.6%,发酵培养物中真蛋白质量分数可以达到 23.92%。

参考文献:

- [1] 周达彪,唐懋华. 中药渣农业循环利用模式产业化探讨[J]. 上海蔬菜,2007(6):112-114.
ZHOU Da-biao,TANG Mao-hua. Herb residues recycling mode of agricultural industrialization[J]. *Shanghai Vegetables*,2007(6):112-114.(in Chinese)
- [2] 谭显东,王向东,杨平,等. 康宁木霉固态发酵中药渣制备蛋白饲料[J]. 四川大学学报:工程科学版,2008,40(4):71-76.
TAN Xian-dong,WANG Xiang-dong,YANG Ping,et al. Solid-state fermentation of herb residues to produce protein feedstuff by *Trichoderma koningii*[J]. *Journal of Sichuan University:Engineering Science Edition*,2008,40(4):71-76.(in Chinese)
- [3] 刘凤梅,谭显东,羊依金,等. 三七渣固态发酵生产蛋白饲料[J]. 中国酿造,2011(2):67-70.
LIU Feng-mei,TAN Xian-dong,YANG Yi-jin,et al. Production of protein feedstuff from notoginseng residues by solid-state fermentation[J]. *China Brewing*,2011(2):67-70.(in Chinese)
- [4] 段娅宁,谭显东,羊依金,等. 用于蛋白富集的三七渣培养基制备条件优化[J]. 中国饲料,2012(7):40-42.
DUAN Ya-ning,TAN Xian-dong,YANG Yi-jin,et al. Preparation condition optimization of *Notoginseng residues* culture medium for the enrichment protein[J]. *China Feed*,2012(7):40-42.(in Chinese)
- [5] 秦岭,王向东,潘朝智,等. 多菌种混合发酵生脉饮药渣生产蛋白饲料工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2008(4):122-128.
QIN Ling,WANG Xiang-dong,PAN Chao-zhi,et al. Optimization of process conditions of Shengmai Yin residues to produce protein feed by multi-strains[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*,2008(4):122-128.(in Chinese)
- [6] 王兵,王向东,秦岭,等. 中药渣固态发酵生产蛋白饲料[J]. 食品与生物技术学报,2007(4):77-82.
WANG Bing,WANG Xiang-dong,QIN Ling,et al. Study on the protein feedstuff from herb-medicine residues by solid-state fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*,2007(4):77-82.(in Chinese)
- [7] 杨威. 黄芩药渣固态发酵生产单细胞蛋白[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2006(5):14-17.
YANG Wei. Production of single-cell protein with scutellaaria baicalensis residue by solid fermentation [J]. *Journal of Harbin University of Commerce:Natural Sciences Edition*,2006(5):14-17.(in Chinese)
- [8] 吴国峰,李国全,马永强. 工业发酵分析[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
- [9] 胡艳丽,王克然. 饲料中真蛋白的测定[J]. 河南畜牧兽医,2007,28(10):31-32.
HU Yan-li,WANG Ke-ran. The determination of the true protein in feed [J]. *Henan Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*,2007,28(10):31-32. (in Chinese)
- [10] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.9-2008.食品中淀粉的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [11] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [12] C R Soccol,B Marin,M Raimbault,et al. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,1994,41(3):330-336.
- [13] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:科学出版社,2006.
- [14] Silas Granato Villas-Boas,Elisa Esposito,Margarida Matos de Mendonca. Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,2003,19(5):461-467.(in Chinese)
- [15] Foong C W,Janaun J,Krishnaiah K,et al. Effect of superficial air velocity on solid state fermentation of palm kernel cake in a lab scale fermenter using locally isolated fungal strain[J]. *Industrial Crops and Products*,2009,30(1):114-118.
- [16] Subhosh Chandra M,Buddolla Viswanath,Rajasekhar Reddy B. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*[J]. *Indian Journal of Microbiology*,2007,47(4):323-328.