

三七渣固态发酵生产蛋白饲料的动力学

谭显东, 段娅宁, 王君君, 羊依金, 刘建英

(成都信息工程学院 资源环境学院, 四川 成都 610225)

摘要: 对白腐菌(*Phanerochaete Chrysosporium* 5.776)/产朊假丝酵母(*Candida utilis* 2.281)固态发酵三七渣生产蛋白饲料的过程进行了研究,并建立了菌体生长和淀粉降解动力学模型。结果表明,以发酵培养物干基减重率作为表达菌体浓度的间接参数,菌体生长动力学适合采用对数模型进行描述,发酵培养物最大干基减重率 $X_m=49.68\%$,比生长速率常数 $\mu=0.042\ 90\ \text{h}^{-1}$ 。菌体生长速率在发酵84.8 h后达到最大值。淀粉的降解动力学适合采用指数模型进行描述,发酵过程中淀粉含量降低了26%,降解速率常数为 $0.015\ 9\ \text{h}^{-1}$,淀粉的降解速率随着发酵时间的延长而逐渐变小。

关键词: 三七;三七渣;固态发酵;蛋白饲料;动力学

中图分类号: X 7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)11—1188—06

Study on Kinetics of Solid State Fermentation of Notoginseng Residues for Protein Feed Production

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

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

Abstract: The course of solid state fermentation for protein feed production from notoginseng residues by *Phanerochaete Chrysosporium* 5.776. and *Candida utilis* 2.281 was carried out, and microbial growth and starch degradation kinetic models were established. The result shows that with the dry weight reduction ratio of fermenting medium as the indirect parameter for expressing the microbial concentration, Logistic model is suitable for the microbial growth kinetics, and the maximum dry weight reduction ratio $X_m=49.68\%$, specific growth rate constant $\mu=0.042\ 90\ \text{h}^{-1}$. The microbial growth rate arrives at the peak point after the fermentation of 84.8 hours. Exponential model is suitable for the starch degradation kinetics, and the content of starch decreases with 26 percentages, and the degradation rate constant is $0.015\ 9\ \text{h}^{-1}$. The degradation rate of starch decreases gradually with the time extension.

Keywords: notoginseng, notoginseng residues, solid state fermentation, protein feed, kinetics

收稿日期: 2012-12-18

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,主要从事三废处理及资源化方面的研究。

E-mail: jacktxd@sina.com

三七是一种名贵中药材,中成药厂对其主要成分的利用集中在皂苷上,通常对三七根采用水提醇沉工艺提取三七总皂苷,药渣一般都作为废物抛弃。提取总皂苷后的三七渣中除了含有大量淀粉外,还含有蛋白质、脂肪、维生素、氨基酸、微量元素、脂肪酸等大量营养元素^[1]。为了进一步提高三七渣的营养价值,实现药用植物生物量的全面利用,段娅宁等^[2]以白腐菌和产朊假丝酵母为菌种,通过混菌固态发酵技术将其转化为蛋白饲料,并对培养基的组成进行了优化。为了更深入地了解发酵过程中菌体生长和主要基质的动态变化情况,以便为反应器的放大设计和工业规模生产提供可靠的工艺设计参数。作者进行了白腐菌/产朊假丝酵母混菌发酵三七渣生产蛋白饲料的动力学研究,并建立了菌体生长和淀粉降解动力学模型。

1 材料与方法

1.1 菌种

白腐菌(*Phanerochaete Chrysosporium* 5.776)和产朊假丝酵母(*Candida utilis* 2.281);由四川大学建筑与环境学院保藏和提供。

1.2 培养基

1.2.1 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。121 ℃灭菌 30 min,用于白腐菌的培养。

1.2.2 土豆汁液体培养基 马铃薯浸取液 1.0 L,葡萄糖 20.0 g,pH 自然。121 ℃灭菌 30 min,用于产朊假丝酵母的培养。

1.2.3 固态发酵培养基 在 10.0 g 三七渣中加入 0.50 g 硫酸铵,磷酸二氢钾 0.04 g,硫酸镁 0.005 g,氯化钠 0.005 g,蒸馏水 23 mL,pH 自然。121 ℃灭菌 30 min,用于固态发酵动力学的研究。

1.3 三七渣

三七渣:四川省某中成药厂提供。湿物料经自然晾晒、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:真蛋白 9.97%,淀粉 33.13%,还原糖 2.17%。

1.4 实验方法

1.4.1 种子液的制备 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 3.5 d 后刮下,将其制成浓度为 2×10^7 个/mL 的孢子悬液;产朊假丝酵母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 16~18 h,制成浓度为 2×10^7 个/mL 的菌悬液。

1.4.2 菌体生长动力学实验 取 126 个容量为 250 mL 的锥形瓶,每个锥形瓶中装入含 10.0 g 干三七渣的固态发酵培养基,将其在 121 ℃灭菌 30 min,冷却后同步接入 1.0 mL 白腐菌孢子悬液和 1.0 mL 产朊假丝酵母菌悬液,然后在 30 ℃下恒温培养,培养时间为 10 d。实验开始后每隔 12 h(包含 0 时刻)取出 6 个锥形瓶,在 80 ℃条件下烘干至恒重后取样进行相关参数的分析测试。取出其中 3 个锥形瓶中的发酵培养物作为平行样用于干质量称量、还原糖和淀粉质量分数的测试;另外 3 个锥形瓶中的发酵培养物作为平行样用于真蛋白和生物量的测试。本研究所有试验数据均为 3 个平行样的平均值。

1.4.3 分析方法

1) 样品预处理:将烘干后的发酵培养物样品粉碎,过 40 目筛后用于真蛋白、生物量、还原糖和淀粉质量分数的测定。

2) 真蛋白的测定:先将样品进行醇洗预处理,去除其中的无机氮^[3],再采用凯氏定氮法测定^[4]。

3) 还原糖的测定:采用 3,5—二硝基水杨酸法^[5]。

4) 淀粉的测定:酸水解法^[6]。

1.5 数学模型

1.5.1 菌体生长动力学模型 采用如式(1)所示的对数模型对菌体在发酵过程中的动态变化进行拟合。

$$R = \frac{R_m}{1 + (\frac{R_m}{R_0} - 1)e^{-\mu t}} \quad (1)$$

式中, R 为 t 时刻菌体浓度(%); R_m 为最大菌体浓度(%); R_0 为 0 时刻菌体浓度(%); μ 为比生长速率常数(h^{-1}); t 为发酵时间(h)。

1.5.2 淀粉降解动力学模型 采用式(2)指数模型对淀粉在发酵过程中的动态变化进行拟合。

$$S = (S_0 - S_e)\exp(-kt) - S_e \quad (2)$$

式中, t 为发酵时间(h); S 为 t 时刻发酵培养物(干基,以下相同)中淀粉质量分数(%); S_0 为发酵底物中淀粉质量分数(%); S_e 为发酵结束时发酵培养物中残留的淀粉质量分数(%); k 为淀粉降解速率常数(h^{-1})。

采用 origin8.0 软件对实验数据进行拟合。

2 结果与讨论

2.1 真蛋白质量分数和生物量的动态变化

发酵过程中真蛋白质量分数的动态变化见图 1。

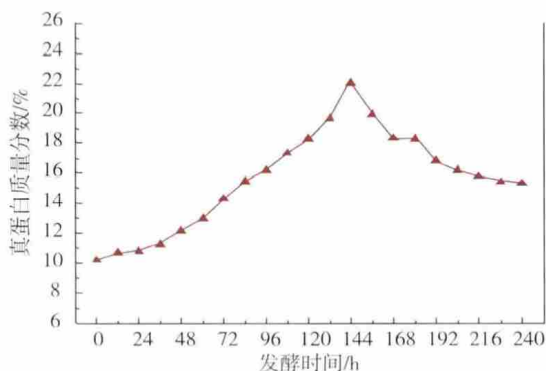


图 1 真蛋白质量分数的动态变化

Fig. 1 Dynamic change of true protein

由图 1 可以看出,发酵培养物中真蛋白质量分数在发酵 144 h 后达到峰值,随后逐渐下降,此时存在较高的还原糖残留,说明可能发生了菌体自溶,蛋白质水解做为替代能源。在以米糠^[7]、蔓越莓^[8]和糖蜜废渣^[9]为基质通过固态发酵进行蛋富集的时候,其蛋白质质量分数的变化趋势与本次研究结果相似。

2.2 淀粉和还原糖的动态变化

发酵过程中淀粉和还原糖的动态变化见图 2。

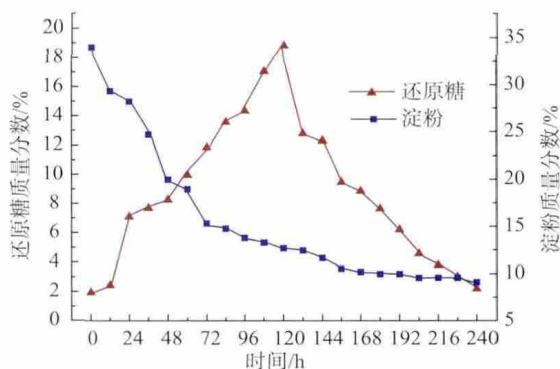


图 2 淀粉和还原糖的动态变化

Fig. 2 Dynamic change of starch and reducing sugar

由图 2 可以看出,发酵培养物中粗淀粉含量一直在不断的下降,整个降解过程可以分为三个阶段:0~72 h 为快速降解阶段;72~168 h 为慢速降解阶段;168~240 h 为基本稳定阶段。还原糖的变化趋势则有所不同,先是不断上升,在发酵 120 h 后达到峰值,然后才不断下降,直到发酵终点。在 0~120 h

期间,淀粉质量分数与还原糖质量分数的变化趋势刚好相反,并且在发酵 72 h 后淀粉降解速率明显减缓,说明还原糖累积到一定浓度会影响淀粉的降解速率,这与还原糖对淀粉酶合成的阻遏作用相关。采用根霉发酵生木薯渣^[10]时在发酵初期也观察到了类似的葡萄糖累积现象;但是在产朊假丝酵母发酵苹果渣的过程中^[11]却没有观察到还原糖的累积现象,原因可能在于该体系中缺乏相应的多糖水解酶。

2.3 干重的动态变化

发酵过程中发酵培养物干重的动态变化见图 3。

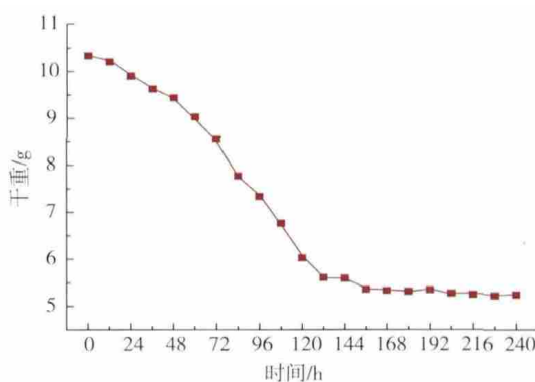


图 3 干重的动态变化

Fig. 3 Dynamic change of dry weight

由图 3 可以看出,发酵培养物干重随着发酵时间的延长而逐渐降低,发酵 156 h 后基本保持稳定。在发酵 0~60 h 期间,干重变化速率较慢,在发酵 60~132 h 期间,发酵干重变化速率明显增大,其原因在于发酵前期生物量较少,微生物新陈代谢活动不够活跃,对基质的消耗速率较低,所以干重变化速率较慢;到了发酵中期,生物量增多,微生物新陈代谢活动十分活跃,对基质的消耗速率也增大,因此干重变化速率增大。

2.4 菌体生长动力学模型

对数模型在固态发酵菌体生长动力学研究中得到了广泛应用^[12],由于在丝状菌固态发酵过程中很难进行生物量的直接测量,因此需要采用某些易于测量的间接指标来描述菌体的生长过程。Mitchell 等^[13]发现,发酵培养物干基减重率和菌体细胞的浓度存在线性关系,这样就可以用宏观的发酵培养物干基减重率来间接地描述菌体生长并指导过程设计和放大^[14-15]。作者尝试采用干基减重率作为表达菌体浓度的间接参数进行菌体生长动力学研究。干基减重率(%)定义如下:

$$\text{干基减重率}/\% = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

式中, m_0 为 0 时刻发酵底物的干基质量 (g); m_t 为 t 时刻发酵培养物的干基质量 (g)。

采用 origin8.0 软件将图 3 中的试验数据带入式(1)中进行非线性拟合, 拟合曲线和相关参数分别见图 4 和表 1。

表 1 菌体生长动力学模型参数表

Table 1 Parameters of microbial growth kinetic model

模型参数			统计参数				
R_m	R_0	μ	卡方检验	校正的决定系数	残差平方和	F	p
49.68	1.249	0.042 90	0.971 0	0.997 3	17.48	9 705	0

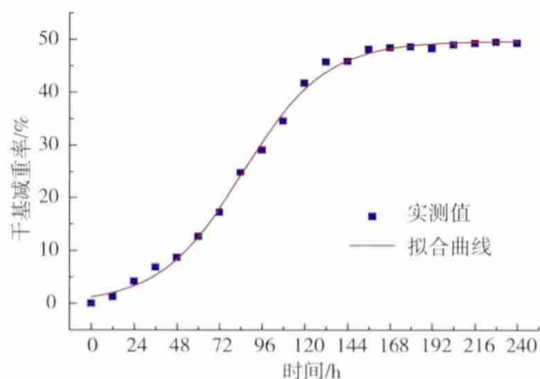


图 4 菌体生长拟合曲线

Fig. 4 Fitting curve of microbial growth

由表 1 和图 4 可以看出, 采用对数模型能很好地拟合菌体生长过程, 符合统计检验的要求。根据上述结果, 可以得到白腐菌/产朊假丝酵母固态发酵三七渣生产蛋白饲料过程中以发酵培养物干基减重率表示的菌体生长动力学方程如下:

$$R = \frac{49.68}{1 + \left(\frac{49.68}{1.249} - 1\right)e^{-0.429 0 t}} \quad (4)$$

利用 origin8.0 软件对图 4 中的拟合曲线进行数值微分, 可以获得菌体生长速率随时间变化的曲线, 结果见图 5。

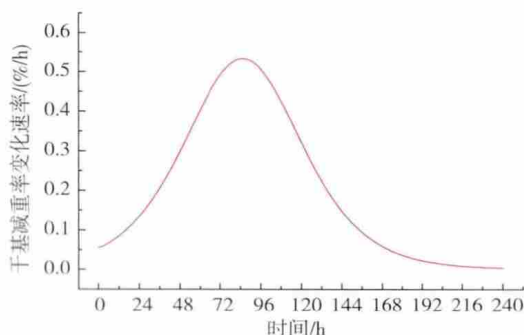


图 5 菌体生长速率的动态变化

Fig. 5 Dynamic change of microbial growth rate

由图 5 可知, 在发酵 84.8 h 后菌体生长速率达到最大值, 先于还原糖质量分数达到峰值。

2.5 淀粉降解动力学模型

目前的研究工作中普遍采用一级反应动力学来描述有机物的好氧降解过程^[16]。对于多糖类物质而言, 已发表的文献中主要采用了指数模型对其降解过程进行拟合^[17-19], 采用 origin8.0 软件将图 2 中的相关试验数据带入式(2)中进行非线性拟合, 拟合曲线和相关参数分别见图 6 和表 2。

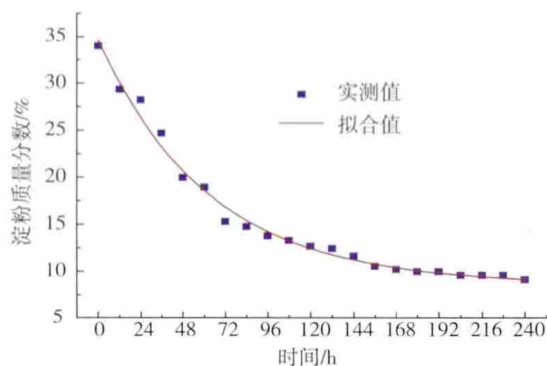


图 6 淀粉降解拟合曲线

Fig. 6 Fitting curve of starch degradation

由表 2 和图 6 可以看出, 采用指数模型能很好地拟合淀粉降解过程, 符合统计检验的要求。根据上述结果, 可以得到白腐菌/产朊假丝酵母固态发酵三七渣生产蛋白饲料过程中淀粉降解动力学方程如下:

$$S = (34.57 - 8.574)e^{-0.015 9 t} + 8.574 \quad (5)$$

采用 origin8.0 软件对图 6 中描述淀粉含量动态变化的拟合曲线进行数值微分, 可以获得淀粉降解速率 (%/h) 随时间变化的曲线, 见图 7。

由图 7 可以看出, 淀粉的降解速率随着发酵时间的延长而逐渐变小。

表 2 淀粉降解动力学模型参数表

Table 2 Parameters of starch degradation model

模型参数					统计参数		
S_0	S_e	k	卡方检验	校正的决定系数	残差平方和	F	p
34.57	8.574	0.015 9	0.622 5	0.988 8	11.21	3 316	0

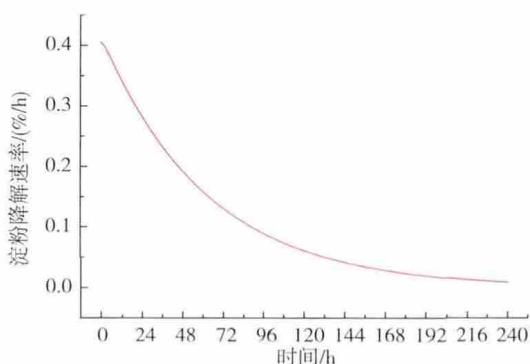


图 7 淀粉降解速率的动态变化

Fig. 7 Dynamic change of starch degradation rate

3 结 语

通过白腐菌(*Phanerochaete Chrysosporium* 5.776)

产阮假丝酵母(*Candida utilis* 2.281)固态发酵三七渣生产蛋白饲料的菌体生长和淀粉降解动力学研究,可以得到如下结论:

1) 以发酵培养物干基减重率作为表达菌体浓度的间接参数,菌体生长动力学适合采用对数模型进行描述,发酵培养物最大干基减重率 $R_m=49.68\%$,比生长速率常数 $\mu=0.042\ 90\ h^{-1}$ 。菌体生长速率在发酵 84.8 h 后达到最大值。

2) 淀粉降解动力学适合采用指数模型进行描述,发酵过程中淀粉含量降低了 26%,降解速率常数为 $0.015\ 9\ h^{-1}$,淀粉的降解速率随着发酵时间的延长而逐渐变小。

参考文献:

- [1] 杨智,傅梅红,杨立新,等. 三七残渣营养成分分析[J]. 人参研究,1994(2):28-29.
YANG Zhi,FU Mei-hong,YANG Lin-xin,et al. Analysis of nutritional components of notoginseng residues [J]. *Ginseng Research*,1994(2):28-29.(in Chinese)
- [2] 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)
- [3] 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):31-32.(in Chinese)
- [4] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2010.
- [5] 俞建瑛,蒋宇,王善利. 生物化学实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [6] 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[M]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [7] 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.
- [8] Zheng Zuoxing,Shetty Kalidas. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production[J]. *Process Biochemistry*,1998,33(3):323-329.
- [9] Shojaosadati S A,Faraidouni R,Madadi-Nouei A,et al. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*[J]. *Resources,Conservation and Recycling*,1999,27:73-87.
- [10] Soccol C R,Marin B,Raimbault M,et al. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,1994,41(3):330-336.
- [11] 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.
- [12] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] Mitchell David A, Greenfield Paul F, Horst W Doelle. An empirical model of growth of *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1991, 72(3): 224-226.
- [14] Wang Ruohang, Shaarani Shalyda Md, Leticia Casas Godoy, et al. Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2010, 47(3): 77-83.
- [15] WENG Xiao-yan, SUN Jian-yi. Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2006, 32(3): 226-232.
- [16] Haug Roger Tim. The practical handbook of compost engineering[M]. Florida: Lewis Publishers, 1993.
- [17] Kulcu R, Yaldiz O. Determination of aeration rate and kinetics of composting some agricultural wastes [J]. **Bioresource Technology**, 2004, 93(1): 49-57.
- [18] 陈活虎, 何晶晶, 邵立明, 等. 生物质分类表征蔬菜废物高温好氧降解特征及其动力学描述[J]. **农业环境科学学报**, 2006, 25 (3): 802-806.
- CHEN Huo-hu, HE Pin-jing, SHAO Li-min, et al. Characteristics and kinetics of aerobic thermophilic decomposing for various biomass compositions of vegetable waste[J]. **Journal of Agro-Environment Science**, 2006, 25(3): 802-806. (in Chinese)
- [19] 李坚斌, 李琳, 郭祀远, 等. 超声辐照马铃薯淀粉糊降解动力学研究[J]. **食品科学** 2007, 28(2): 84-87.
- LI Jian-bin, LI Lin, GUO Si-yuan, et al. Degradation kinetics of potato starch paste under ultrasonic irradiation [J]. **Food Science**, 2007, 28(2): 84-87. (in Chinese)

会议信息

会议名称(中文): 全国农业生物化学与分子生物学第十二次学术研讨会

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学、细胞生物学、遗传与发育生物学、作物学及林木育种、生物学

开始日期: 2013-12-11

所在城市: 广西壮族自治区南宁市

主办单位: 中国生物化学与分子生物学会农业分会、大北农集团生物技术中心和广西生化与分子生物学会

承办单位: 广西大学

主题: 生化分子生物学新技术、新方法、新方法与三色农业科技创新

全文截稿日期: 2013-11-20

联系人: 许雷 13661388818

联系电话: 010-82109695

E-MAIL: acsbmb@163.com

会议网站: <http://www.csbmb.org.cn/news.asp?id=414>

会议背景介绍: 科技创新是提高社会生产力和综合国力的战略支撑, 创新驱动发展已成为我国社会和经济未来发展方向。农业是我国国民经济的基础产业, 但农业科技进步对国民经济的贡献率较低, 以知识创新、技术创新、成果创新和产品创制为基础实现粮食安全、生态安全为特点的农业科技创新意义重大。农业的三色革命是农业科技创新的主要载体, 而现代生物化学与分子生物学是农业三色革命的技术核心。为能在农业科技创新和农业三色革命大潮中有所作为、促进农业生化与分子生物学学科的良性发展、增进同行间的学术交流、搭建研究团队与高新企业间的创新平台、并为各级决策机构制定创新农业技术体系和三色农业革命的发展纲要提供参考, 中国生物化学与分子生物学会农业分会、大北农集团生物技术中心和广西生化与分子生物学会联合召开全国农业生化与分子生物学第十二次学术研讨会暨第三次农业生化与分子生物学创新论坛。