

秸秆发酵生物添加剂发酵工艺参数的优化

谢凤行, 赵玉洁, 周 可, 张峰峰, 李亚玲

(天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192)

摘要:采用单因素试验研究了培养基组成、培养温度、培养基 pH 值和溶解氧等对秸秆发酵生物添加剂生长的影响, 优化了秸秆发酵生物添加剂的发酵参数。通过 5 L 发酵罐上罐试验确定秸秆发酵的最佳培养条件为: 培养基合成, 温度 30 ℃, pH 5.0, 搅拌速度 300 r/min, 通气量 4 L/min, 发酵周期 24~27 h, 酵母菌和乳酸菌的最大菌液浓度分别可达 2.00×10^8 , 2.55×10^9 个/mL。

关键词: 秸秆发酵; 生物添加剂; 工艺参数; 优化

中图分类号: S816.79 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)03-0219-04

Optimization of Fermentation Technical Parameters for Bio-additive of Crop Straws Fermentation

XIE Feng-xing, ZHAO Yu-jie, ZHOU Ke, ZHANG Feng-feng, LI Ya-ling

(Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin 300192, China)

Abstract: The effects of culture component, temperature, pH and dissolved oxygen on the growth of bio-additive of crop straws fermentation were studied by single factor test and the fermentation parameters of the mix strains were optimized. The results got from 5 L fermentation tank tests showed that the optimal culture conditions were compound culture, 30 ℃, pH 5.0, 300 r/min, air flow 4 L/min and fermentation periods 24 - 27 h, and the maximal concentrations of live microzyme and lactobacillus were 2.00×10^8 , 2.55×10^9 individuals/mL in the fermentation liquid, respectively.

Key words: Crop straws fermentation; Bio-additive; Technical parameters; Optimization

我国秸秆的年产量达 6 亿多吨, 占世界秸秆总产量的 30%^[1]。秸秆是重要的生物资源, 但如果这些资源未被充分利用将会造成极大的资源浪费和严重的环境污染。秸秆资源的综合利用主要集中在能源、饲料、肥料和工业造纸原料 4 个方面^[2]。由于秸秆的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素^[3], 未经处理的秸秆作为饲料, 不仅消化率低, 粗蛋白含量低, 而且适口性差, 采食量也不高^[2,4], 如何通过现代生物技术手段提高秸秆的适口性和营养价值成为当今农业科技人员关注的焦点。

秸秆发酵生物添加剂是本课题组自主研发开发的一种复合微生物菌剂(发明专利号: ZL97119176.X)。该菌剂由 6 株酵母菌类和乳酸菌类微生物经科学配伍而成, 具有降解纤维素, 增加秸秆蛋白质的作用, 其发酵菌液在 7~10 d 内能使半黄或干黄的各种农作物秸秆(麦秸、稻草、玉米秸、高粱秸、豆秸、

薯蔓等)变成气味酸香、湿润柔软、适口性好的反刍家畜粗饲料^[5]。由于该菌剂由酵母菌和乳酸菌组成的复合菌剂, 对发酵条件要求较高。本研究对秸秆发酵生物添加剂的发酵条件进行了摸索, 期望通过优化培养条件提高菌液浓度, 进而提高菌液对秸秆的转化效率。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种: 将实验室保存的菌种以 10% 的接种量转接到液体培养基中活化一段时间, 再以同样的接种量转接到新的菌液培养基中, 放置在水浴摇床上振荡培养(30 ℃, 150 r/min), 培养 24 h 作为菌种。

仪器: 5 L 全自动发酵罐(BIOSTATB 德国); 水浴摇床(HZS-H 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 显微镜(XSY-S 重庆光学仪器厂); 超净工作台

收稿日期: 2007-12-18

基金项目: 天津市农业科技成果转化与推广项目(0502080)

作者简介: 谢凤行(1979-), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事微生物发酵研究工作。

(SW-CF2F 吴江市汇通空气净化设备厂);752 紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);PHS-3C 酸度计(上海理达仪器厂)。

培养基:合成培养基(酵母膏 5 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g, KH_2PO_4 2 g,番茄汁 100 mL,蒸馏水 1 000 mL)和自然培养基(葡萄糖 10 g, KH_2PO_4 2 g,豆浆 50 mL,蒸馏水 1 000 mL)。

1.2 方法

1.2.1 培养基对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

根据混合菌种对碳源和氮源的需求设合成培养基和自然培养基 2 个处理,分别上罐试验,温度 30 ,接种量 10 %,转数 300 r/min,每 3 h 取样测菌液 pH 值、酵母菌和乳酸菌的菌数,当菌液浓度开始下降时终止试验。

1.2.2 秸秆发酵生物添加剂最适发酵温度 根据前期试验结果设 25 ,30 2 个发酵温度处理,分别上罐试验。除温度外其他条件都保持一致,接种量 10 %,转数 300 r/min,培养基为合成培养基,每 3 h 取样测菌液 pH 值、酵母菌和乳酸菌的菌数。当 pH 值比较恒定而菌液浓度有所下降时终止试验,通过比较各处理菌液浓度和 pH 值来确定最适温度。

1.2.3 初始 pH 对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

将培养基的初始 pH 分别调为 4.5,5.5,6.5 和 7.5,每个处理 3 个重复。将活化的菌种以 10 %的接种量转接到不同处理的三角瓶中,放入培养箱中静

置培养,培养温度为 30 ,隔一定时间取样一次测菌液的 OD 值、pH 值、酵母菌和乳酸菌的菌数。

1.2.4 秸秆发酵生物添加剂最适 pH 值的确定 试验设 pH 5.0,5.5,6.0 共 3 个处理。用 5.0 L 的发酵罐分别上罐试验,温度 30 ,接种量 10 %,转数 300 r/min,通气量 4 L/min,发酵过程中用酸碱自动蠕动泵控制发酵液 pH 值,每 3 h 取样一次,测酵母菌和乳酸菌浓度,当菌种都进入衰亡期后停止试验。

2 结果与分析

2.1 培养基对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

在自然培养基上混合菌液中的酵母菌和乳酸菌生长都比较缓慢,进入对数生长期的时间延后,致使整个发酵周期长达 33 h,较合成培养基长 9 h,且最终的菌液浓度也较低,酵母菌最大菌液浓度 6.0×10^7 个/mL,为合成培养基的 1/20,乳酸菌最大菌液浓度 1.4×10^9 个/mL,约为合成培养基的 1/3(表 1)。不同菌种都有其适合生长的培养基,酵母菌和乳酸菌都是异养菌,增殖过程中需消耗有机氮源和碳源来满足代谢需要。由于合成培养基的有机质相对较丰富更利于酵母菌和乳酸菌的生长,在条件允许时建议使用合成培养基,但在大规模生产时考虑到成本问题可以使用自然培养基,做固体发酵时还可用豆粕和麸子粉代替豆浆。

表 1 培养基对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

Tab.1 Effects of culture medium on the growth of bio-additive of crop straws fermentation

培养基 Culture medium	发酵周期/h Fermentation period	发酵终点 pH 值 Fermentation terminal pH	酵母菌浓度/(个/mL) Microzyme concentration	乳酸菌浓度/(个/mL) Lactobacillus concentration
合成 Compound	24	3.82	1.20×10^8	4.65×10^9
自然 Nature	33	3.26	6.00×10^7	1.40×10^9

2.2 温度对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

由于酵母菌和乳酸菌最适生长的温度范围不同,如何控制混合菌液的发酵温度将影响菌种的最终质量。从表 2 可以看出温度对混合菌剂的发酵周期和最终的菌液浓度都有明显的影响,而对发酵终点菌液的 pH 值影响不大。当温度控制在 30 时,

其发酵周期为 24 h 较 25 缩短 9 h,酵母菌的最大菌液浓度为 25 的 8 倍,乳酸菌的最大菌液浓度为 25 的 3 倍左右。由此可以看出,温度是影响秸秆发酵生物添加剂菌种质量的一个重要因子,在大规模生产时将温度控制在 30 不仅可以缩短混合菌剂的发酵周期,而且能提高菌液浓度。

表 2 温度对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

Tab.2 Effects of temperature on the growth of bio-additive of crop straws fermentation

温度/ Temperature	发酵周期/h Fermentation period	发酵终点 pH 值 Fermentation terminal pH	酵母菌浓度/(个/mL) Microzyme concentration	乳酸菌浓度/(个/mL) Lactobacillus concentration
25	33	3.89	1.50×10^7	1.51×10^9
30	24	3.82	1.20×10^8	4.65×10^9

2.3 初始 pH 对秸秆发酵生物添加剂生长的影响

酵母菌和乳酸菌都能在较低的 pH 环境下生长,且在增殖过程中都能产酸,因此,培养基的初始 pH 值

会对混合菌液的生长产生一定影响。从表 3 可以看出,不同初始 pH 处理混合菌的 OD 值和菌液浓度先逐渐增加,随后有一个对数增长期,一段时间后开始

降低。发酵菌液 pH 值降低较快,24 h 后稳定在一个相对恒定的范围内,所有处理的 pH 值都降到了 4.0 以下。酵母菌和乳酸菌前 6 h 基本上都处于迟缓期,表现在菌数的增幅较小。酵母菌在初始 pH6.5 和 7.5 的处理下为负增长,这可能是相对较高的 pH 值对酵母菌的生长产生了一定的抑制作用,乳酸菌除在 pH4.5 的处理下表现为负增长外,其他处理均较酵母菌增幅大。从所测的数据来看,两种菌的菌液浓度基本上都是在培养 30 h 达到了最高值,从表 1 可以看

表 3 培养基初始 pH 值对混合菌生长的影响

Tab.3 Effects of initial pH on the growth of mix strains

初始 pH Initial pH		培养时间/h Culture time					
		0	6	24	30	48	56
4.5	OD 值 OD value	0.25	0.26	1.64	1.98	2.22	2.14
	pH 值 pH value	4.50	4.41	3.65	3.60	3.62	3.66
	酵母菌/($\times 10^8$ 个/mL) Microzyme	0.22	0.22	0.40	0.75	0.70	0.45
	乳酸菌/($\times 10^8$ 个/mL) Lactobacillus	0.47	0.25	1.10	8.00	7.50	7.00
5.5	OD 值 OD value	0.25	0.26	1.68	1.95	2.26	2.26
	pH 值 pH value	5.50	5.00	3.72	3.69	3.77	3.73
	酵母菌/($\times 10^8$ 个/mL) Microzyme	0.22	0.35	0.40	0.60	0.55	0.55
	乳酸菌/($\times 10^8$ 个/mL) Lactobacillus	0.47	0.65	6.95	16.50	6.50	6.00
6.5	OD 值 OD value	0.25	0.29	1.71	1.98	2.22	2.22
	pH 值 pH value	6.50	5.48	3.83	3.81	3.90	3.87
	酵母菌/($\times 10^8$ 个/mL) Microzyme	0.22	0.10	0.40	0.50	0.30	0.55
	乳酸菌/($\times 10^8$ 个/mL) Lactobacillus	0.47	0.65	4.80	8.00	6.50	5.50
7.5	OD 值 OD value	0.25	0.33	1.84	2.14	2.37	2.43
	pH 值 pH value	7.50	6.43	4.00	3.90	4.02	4.01
	酵母菌/($\times 10^8$ 个/mL) Microzyme	0.22	0.20	0.30	0.40	0.30	0.50
	乳酸菌/($\times 10^8$ 个/mL) Lactobacillus	0.47	0.95	4.70	8.45	8.45	6.00

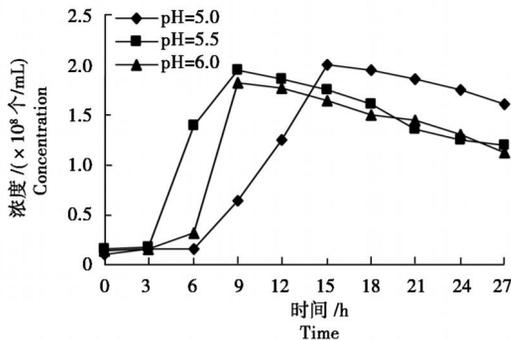


图 1 不同 pH 值酵母菌的生长曲线

Fig.1 The growth curve of microzyme under different pH

2.4 秸秆发酵生物添加剂最适 pH 值的确定

由于乳酸菌和酵母菌在发酵过程中产酸,因此,菌液的 pH 值会随着发酵时间的延长而逐渐降低。从图 1 得知,在 pH 5.0,5.5 和 6.0 处理下酵母菌的最大菌液浓度分别为 2.00×10^8 , 1.95×10^8 , 1.83×10^8 个/mL,处理间差异不明显;而进入稳定期的时间分别为 15,9 和 9 h,说明在 pH 5.0 的环境中酵母菌生长相对比较缓慢。乳酸菌的生长曲线与酵母菌不同(图 2),其生长滞后于酵母菌的生长,基本在酵母菌进入稳定期后乳酸菌才进入对数生长期。不同

出,酵母菌的最大菌液浓度出现在 pH 4.5 的处理,随着培养基初始 pH 值的升高菌液浓度逐渐减少;而乳酸菌浓度的最大值出现在 pH 5.5 的处理,最高值达 16.5×10^8 个/mL,其他 3 个处理的最大值基本上在 8.0×10^8 个/mL 左右。从酵母菌和乳酸菌的总数分析可以得知,培养基初始 pH 为 5.5 比较适合混合菌的生长。由于本试验为摇瓶静置培养,培养基中的溶解氧偏低,酵母菌的生长受到了一定的限制,所有处理酵母菌在混合菌液中所占比例偏低。

pH 处理下乳酸菌生长步调比较一致,约 9 h 后进入对数生长期,都在 24 h 达到稳定期,随后菌液浓度有所回落;但处理间的最终菌液浓度相差较大,pH 5.0,5.5 和 6.0 的最大菌液浓度分别为 25.5×10^8 , 20×10^8 和 17×10^8 个/mL。综合考察酵母菌和乳酸菌的发酵时间和最终的菌液浓度发现,发酵罐培养混合菌液的最适 pH 为 5.0,最佳发酵周期为 24 ~ 27 h。

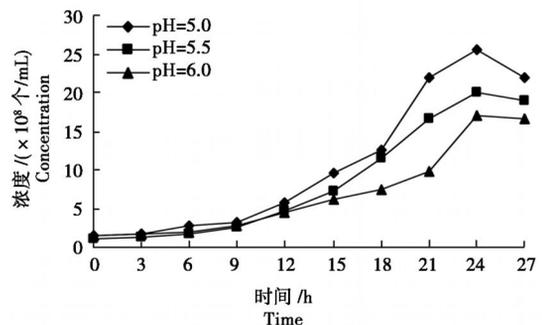


图 2 不同 pH 值乳酸菌的生长曲线

Fig.2 The growth curve of lactobacillus under different pH

酵母菌为好氧微生物,本试验中的乳酸菌为兼性厌氧微生物,在前期培养基中溶解氧较充分时更利于酵母菌的生长。从图 3 ~ 5 可以看出,不同 pH

处理下,发酵液的溶解氧变化趋势基本一致,在刚上罐的9 h内溶氧值基本上没有很大的变化,随后逐渐降低,降到0以后又慢慢上升,发酵液中的溶解氧降到0的时间分别为16,10.5,14 h。溶解氧的降低滞后于酵母菌生长曲线的变化,即在酵母菌进入对数生长期之后好氧量增大,此时发酵液中的溶解氧慢慢降低,当酵母菌进入稳定期一段时间后溶解氧达到最低点,随着酵母菌进入衰亡期溶解氧又迅速回升。培养基中溶解氧的含量与酵母菌的生长存在一定的相关性,因此,可以根据培养基中溶解氧的含量推断出酵母菌所处的阶段。

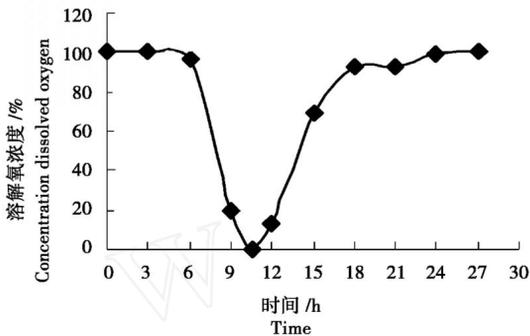


图3 pH5.0时发酵液溶解氧值变化

Fig.3 Change of dissolved oxygen under pH5.0

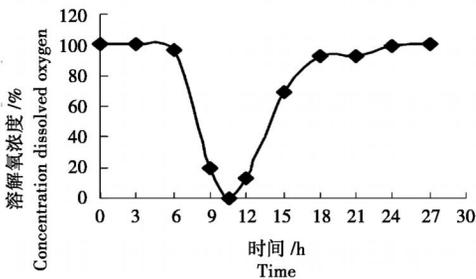


图4 pH5.5时发酵液溶解氧值变化

Fig.4 Change of dissolved oxygen under pH5.5

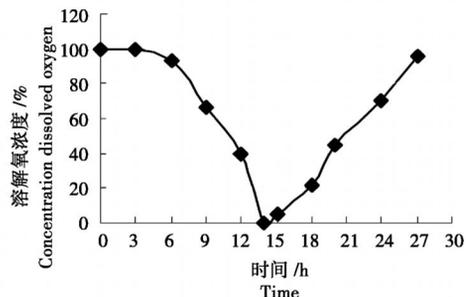


图5 pH6.0时发酵液溶解氧值的变化

Fig.5 Change of dissolved oxygen under pH6.0

3 讨论

利用微生物技术将秸秆转化为食用菌、饲料和肥料,已成为农业利用的热点方向,也是规模消耗转化秸秆的有效途径^[6]。秸秆作为饲料通过牲畜过腹还田,也符合农村循环经济的发展模式,但秸秆的消化率低,一般只有35%~50%,这是限制反刍家畜利用秸秆的首要因素^[7]。本单位经过多年努力研制成功的秸秆发酵生物添加剂不仅能提高秸秆的转化效率,复合菌剂本身的生理代谢产物中含有的多种酶、核酸、有机质、维生素及其他生物活性物质,对促进动物生长,改善动物代谢功能,增加动物抗病能力等方面具有十分重要的作用^[5]。

本研究通过对秸秆发酵生物添加剂的中试发酵工艺参数进行摸索,发现培养基组成、培养温度、pH、溶解氧等都会影响菌液的浓度和发酵时间。通过单因素试验确定混合菌的最佳发酵条件为:合成培养基,温度30℃,搅拌速度300 r/min,通气量4 L/min, pH 5.0,发酵周期24~27 h。在上述优化的条件下发酵,混合菌液一般在24 h就能达到发酵终点,酵母菌和乳酸菌的最大菌液浓度分别可达 2.00×10^8 , 2.55×10^9 个/mL。优化的培养条件缩短了菌液的发酵周期,提高了菌液的浓度,将优化的发酵工艺参数用于指导规模生产,不仅能提高生产效率,同时能有效的保证产品的质量。

参考文献:

- [1] 何康. 中国农业年鉴 2000[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 52.
- [2] 韩鲁佳, 闰巧娟, 刘向阳. 中国农作物秸秆资源及其利用现状[J]. 农业工程学报, 2003, 18(3): 87 - 91.
- [3] 周俊虎, 戚峰, 程军, 等. 秸秆发酵产氢的碱性预处理方法研究[J]. 太阳能学报, 2007, 28(3): 329 - 333.
- [4] 齐胜利, 王芙蓉. 秸秆饲料的营养与加工[J]. 粮食与饲料工业, 1998(12): 28 - 29.
- [5] 陈秀为, 范鬃, 赵恒, 等. 秸秆饲料发酵生物添加剂的研制[J]. 天津农业科学, 1999, 5(4): 5 - 8.
- [6] 万鲁长, 于迎春, 郭惠东, 等. 作物秸秆在农业上高效合理利用技术探讨[C]// 山东微生物学会第五届代表大会暨学术年会论文集. 1999: 193 - 196.
- [7] 张文举, 王加启, 龚月生, 等. 秸秆饲料资源开发利用的研究进展[J]. 国外畜牧科技, 2001, 28(3): 15 - 18.