

醋糟发酵菌种的筛选及其发酵条件研究

张建新, 岳文斌, 丛日晨

(山西农业大学, 太谷 030801)

摘要: 为了充分利用废弃糟渣, 缓解山西省黄土残塬区饲料粮供需矛盾, 减轻土地负担, 促进绿色生态的改善与恢复, 课题组对山西省醋糟资源进行了充分调查, 并对高活性纤维素菌——霉菌、担子菌进行了筛选及其发酵条件研究, 组合配伍研究, 初步确定适合醋糟发酵的优良菌种。

关键词: 醋糟; 发酵菌种; 发酵条件

中图分类号: S816.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2000)04-0085-04

The Screening of the Fermentation Strains of Vinegar Grains and Research on the Fermentation Condition of the Strains

ZHANG Jian-xin, YUE Wen-bin, CONG Ri-chen

(Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, PRC)

Abstract: To make good use of the disposed grains, to lessen the conflict between supply and needs on feeding grains in the gully region on loess plateau of Shanxi province, to reduce the burden of soil, to promote the bettering and restoration of the green ecological balance, the research group have made a full investigation and study on the vinegar grains resource of Shanxi, screened the super active cellulolytic strains including trichodema, basidiomycetes and yeasts, made a study on the fermentation condition and associative effect, and finally screened the fine fungi which are fit for the fermentation of vinegar grains

Key words: vinegar grains; fermentation strains; fermentation condition

山西省农副产品十分丰富, 年产各类秸秆糟渣近1000万t, 其中醋糟300万t。糟渣不经处理适口性差, 营养价值低, 直接饲喂利用效果很差, 如果废弃不仅浪费潜在的饲料资源, 而且造成环境污染。基于此, 课题组以醋糟为底物, 对木霉、曲霉、担子菌进行筛选及产酶条件研究, 旨在优选出适合醋糟的菌种发酵的菌种或组合, 探索一种符合山西实际、切实可行的醋糟发酵方法。

1 材料与方法

1.1 菌种和原料来源

1.1.1 菌种 (1) 木霉 T: 来自中国农科院土肥研

究所。(2) 曲霉 F: 来自山西农业大学微生物实验室。(3) 担子菌 A: 来自山西农业大学微生物实验室。(4) 担子菌 C: 来自中国科学院微生物研究所。(5) 酵母菌 Y: 来自山西省生物研究所。

1.1.2 原料来源及营养含量 醋糟来自隰县某醋厂(营养含量见表1)。

表1 醋糟有效成分含量分析表(风干基础) %

成分	干物质	粗蛋白	真蛋白	粗纤维	粗灰分	钙	磷
	92	11.45	11.41	29.63	14.59	0.42	0.19

1.2 发酵菌种筛选及发酵条件、研究

1.2.1 培养基

(1) 斜面母种培养基: 每100ml水加马铃薯20g, 葡萄糖2g, 磷酸氢二钾0.3g, 硫酸镁0.15g,

* 收稿日期: 2000-10-13

VB 微量, 琼脂 1.5 g, pH= 6.5; 常规方法制备。

(2) 培养皿平板培养基: 每 100 ml 水加醋糟 20 g, 麸皮 10 g, 葡萄糖 2 g, 琼脂 2 g; 常规方法制备。

(3) 原种、生产种培养基(%): 棉籽壳 30, 醋糟 30, 麸皮 25, 玉米粉 12, 硫酸铵 2, 白糖 1, 磷酸氢二钾 0.2, 硫酸镁 0.5, pH= 6.5; 常规方法制备。

(4) 醋糟发酵培养基(%): 醋糟 75, 麸皮 20, 玉米粉 4, 尿素 1, 磷酸氢二钾 0.2, 硫酸镁 0.3, 常规方法制备。

1.2.2 初筛

(1) 供试菌株分别在不同温度、pH 梯度的平板培养基上接种, 从菌落长速、长势初步确定各菌最适生长条件及特性。

(2) 菌种间组合拮抗试验, 旨在选择优良菌种组合。

1.2.3 复筛 以初筛确定的菌株在各自最适温度、pH 条件下转接原种、生产种, 生产种以 10% 接种量在水分梯度为 55%、60%、65%、70% 的醋糟培养基上接种培养, 培养期为 8 d。

(1) 对比长速、长势。

(2) 营养含量测定。

(3) 各菌株酶活力比较。

通过以上测定比较, 确定优良菌种。

1.2.4 最佳配方试验 菌株萌发初期, 需要从培养基中获得可溶性碳/氮源作为菌丝增殖的营养, 合适的营养组成既有利于菌丝体的大量增殖, 加快发酵进程, 又有利于降低原料成本, 对发酵生产至关重要。通过对表 2 中 4 种配方的培养基接种发酵, 从菌丝长速、长势、发酵料营养含量确定最佳培养基配方。

表 2 醋糟发酵培养基配方营养组成 %

配方	醋糟	麸皮	玉米面	尿素	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄
I	75	20	4	0.5	0.2	0.3
II	79	20	-	0.5	0.2	0.3
III	79.5	15	4	1.0	0.2	0.3
IV	83.5	15	-	1.0	0.2	0.3

1.2.5 营养分析与生化测定方法

(1) 营养分析参照杨胜主编的《饲料分析及饲料质量检测技术》。

(2) 生化指标测定。酶液制备: 称取样品 4 g, 用 pH= 6 的磷酸缓冲液定容至 50 ml, 20 浸提 40 min, 3 000 r 离心, 上清液为酶浸提液。

羧甲基纤维素酶的测定(CMC):

0.2 ml 酸缓冲液 (pH= 6.0) + 0.2 ml 0.5% CMC + 0.1 ml 酶液, 40 30 min 后加 1 ml DNS 煮

沸 5 min, 冷却至室温加 2.5 ml 蒸馏水, 测定 550 nm 光密度值, 酶活单位定义为: 在上述反应条件下, 每分钟酶解 CMC 释放 1 μmol 还原糖所需酶量为一个酶活力单位。

1.2.6 试验数据处理方法 由于醋糟经真菌发酵后失重程度不同, 难以比较, 因而按照微生物发酵有关技术资料, 粗纤维降解率与真蛋白提高率要换算成发酵前培养基重量基础上进行比较。

发酵料 CF 或 TP 百分含量 =

$$\frac{\text{发酵料重} \times \text{样品分析 CF 或 TP 百分含量} \times 100\%}{\text{发酵前培养基重量}}$$

CF 降解率或 TP 提高率 =

$$\frac{\text{发酵料 CF 或 TP 百分含量} - \text{对照 CF 或 TP 百分含量} \times 100\%}{\text{发酵料对照中 CF 或 TP 百分含量}}$$

2 结果分析

2.1 初筛结果与分析

(1) 生长情况: 通过长速、长势观察可知, 供试菌株 T、F、A、C、Y, 分别在温度 26、28、25、26~28、25~28, pH 5.5~6.5、5.5~6.5、7.5、6.5~7.5、5.0~6.0 生长良好, 霉菌 T、F 长速快于担子菌 A、C, 但菌丝细弱, 易生子孢子。

(2) 菌种间组合拮抗试验, 结果见表 3。

表 3 菌种 T、F、A、C、Y 组合拮抗程度表

	T	F	A	C	Y
T		⊖	⊕	⊕	⊖
F			⊕	⊕	
A				⊕	
C					

拮抗不明显 ⊖ 拮抗 ⊕ 拮抗

由表 3 可看出纤维素分解菌 T、F、A、C 之间存在拮抗, 不易混合发酵, 纤维素分解菌同有利于提高菌体蛋白的酵母菌 Y 除 T 外, 均不拮抗, 可混合发酵。

2.2 复筛结果与分析

菌株 T、F、A、C、FY、AY、CY 分别制备原种、生产种, 生产种以 10% 接种量在罐头瓶醋糟培养基上接种发酵, 结果如下:

2.2.1 长速、长势 由表 4 统计可得, 在各菌适宜水分、pH、温度下, 最大长速 T > F > FY > C > CY > AY > A, 长势 C、CY > A、AY > T、F、FY; 木霉 T 与曲霉 F 极易形成孢子, 影响发酵料的色泽及适口性。

最适水分条件分别为: C 与 CY 60%、A 与 AY 65%、F 与 FY 65%、T 65%。

表 4 各菌株在醋糟发酵培养基上长速、长势对照表

培养基水分 1%	T	F	A	C	FY	AY	CY
55	7.2+++	6.8+	4.0++	6.1++	6.5+	4.1++	6.4++
60	8.0++	7.6++	4.3+++	7.8+++	6.9++	4.6+++	7.6+++
65	8.8+++	8.2+++	4.7+++	5.8++	8.1+++	4.8+++	4.8+++
70	8.4++	8.1++	1.3+	0-	7.6++	0.9+	0-

注: 表内长速数字为 8 天内菌丝下长深度。菌丝粗壮程度: + (弱)++ (稍壮)+++ (特壮)- (不长)。

表 5 菌种 A、AY、C、CY、F、FY、T 发酵醋糟培养基营养变化

菌株	原料重/g	失重/g	失重率/%	CF/%	CF 降解率/%	TP/%	TP 提高率/%
A	50	6.6	13.2	28.14	10.37	14.59	16.83
AY	50	6.3	12.6	27.98	10.26	14.96	20.62
C	50	6.3	12.6	27.49	11.83	15.88	28.04
CY	50	6.5	13.0	27.75	11.40	16.93	35.88
F	50	7.5	15.0	28.84	10.00	13.64	6.96
FY	50	7.8	15.6	29.05	10.02	13.98	8.85
T	50	7.3	14.6	28.69	10.09	13.64	7.46
CK	50	4.4	8.8	29.88		11.89	

2.2.2 营养测定结果 表 5 的营养分析结果表明: 发酵料粗纤维降解率 C > CY > A > AY > T > FY > F, 真蛋白提高率 CY > C > AY > A > FY > T > F, C 与 CY 发酵料营养价值明显高于其它菌株发酵料。

C 与 CY 在醋糟培养基上生长旺盛, 发酵料营养价值高, 有浓郁的蘑菇香味, CY 稍好于 C。

A 与 AY 长势也好, 发酵料有蘑菇香味, 但长速太慢, 不利于生产。

F、FY、T 长速快, 但菌丝细弱, 易形成孢子或产生不良气味。此外, 菌丝易溶解, 常导致发酵料黏黑发臭。

2.2.3 各菌株纤维素酶活力测定结果比较 木霉 T、曲霉 F、担子菌 C、A 分别培养 4 d、6 d、8 d、10 d 取样, 提取酶液分析。

表 6 菌株 T、F、C、A 纤维素酶活力测定

菌株	T	F	C	A
酶活(μ/ml)	95	84	131	108

从产酶结果分析, 在醋糟培养基上, 菌株 C 产纤维素酶的活力最强。

从初筛、复筛结果综合分析, CY 为发酵醋糟的

表 7 醋糟发酵培养基 I、II、III、IV 发酵 10 d 营养变化对照表

培养基	原料重/g	失重/g	失重率/%	CF/%	CF 降解率/%	TP/%	TP 提高率(%)
I	50	8.6	17.2	26.15	13.25	17.91	36.14
CK I	50	4.8	9.6	27.61		12.05	
II	50	7.4	14.8	27.18	9.61	16.26	26.90
CK II	50	4.4	8.8	28.09		11.97	
III	50	8.2	16.4	26.39	13.00	17.15	35.81
CK III	50	4.0	8.0	27.96		11.64	
IV	50	7.2	14.4	27.97	8.16	15.82	29.91
CK IV	50	4.2	8.4	28.46		11.38	

4 小结与讨论

利用微生物发酵醋糟生产发酵饲料必须选择菌丝蛋白含量高, 能高效降解醋糟粗纤维且生长增殖

最佳菌株。

3 醋糟发酵培养基最佳配方试验结果与分析

利用菌种 CY 在醋糟发酵培养基 I、II、III、IV 上接种发酵, 长速、长势及营养分析结果如下:

醋糟发酵培养基 I、II、III、IV 发酵 10 d 菌丝平均下长深度分别为 8.3 cm、7.4 cm、8.0 cm、6.0 cm, I、III 菌丝非常粗壮, II 与 IV 菌丝也较粗壮, 经方差分析, I 与 III、II 与 IV 菌丝长速差异不显著, I、III 显著快于 II、IV (P < 0.05)。

醋糟发酵培养基 I、II、III、IV 发酵 10 d 营养变化见表 7 营养分析结果表明, 配方 I 与 III 发酵效果最好, 碳氮比合适, 粗纤维降解率分别为 13.25%、13.00% 真蛋白提高率分别为 36.14%、35.81% 但 III 比 I 节约了麸皮, 提高了醋糟的比例, 从而降低了发酵料的成本, 因此, 优选配方 III 为 CY 发酵醋糟的最佳配方。

快的菌株。能分解纤维素的菌种很多, 如细菌(纤维杆菌)、真菌(霉菌、担子菌)、放线菌等, 但研究最多且酶活性较高多为真菌。本试验通过琼脂培养法、固体发酵法、酶活比较法对菌株 A、C、T、F 进行初筛,

复筛,结果表明,担子菌 C 的长速、长势、粗纤维降解率、真蛋白提高率都较高,且与酵母菌 Y 有较好的协调作用。通过最佳配方试验,选用固体发酵培养基 II 为最佳发酵培养基,发酵料纤维降解率为 13.00%、真蛋白提高率为 35.81%。

4.1 醋糟发酵效果感观识别

棕褐色的醋糟经 CY 发酵后结成白色硬块,有蘑菇香味,掰开菌块棱角分明,菌丝粗壮洁白。若发酵不当,发酵料不能结块,或者菌块蓬松,呈褐黄色,有时带有发味。因此,从菌丝洁白粗壮程度、菌块硬度、发酵料色泽、香味几方面即可判断发酵效果。

4.2 醋糟发酵过程中水分、pH、温度对发酵的影响

(1)水分。担子菌 C 发酵醋糟,培养基水分以 62% 为宜,水分太小菌丝稀疏,生长缓慢;水分太大影响透气,下层料厌氧发酵,腐黑变臭,菌丝呈波浪式缓慢延伸;水分适中时菌丝生长旺盛,尖端整齐,呈梳状。

(2)pH 值。担子菌 C 生长最适 pH 为 6.5~7.0,但由于醋糟酸度大,调好 pH 值后,在装料、灭菌过程中 pH 下降幅度较大,再加上发酵后菌丝呼吸代谢分泌有机酸,固体发酵培养基 pH 值以调到

7.5~8.0 为宜。

(3)温度。担子菌 C 最适宜温度为 28~34℃,接近致死温度,在发酵初期,中期菌丝代谢强度逐渐增大,菌丝会散发出一定热量,使料温升高,因此在发酵过程中应注意翻瓶、翻袋、翻堆或控制料层厚度。

4.3 醋糟发酵料失重原因

菌丝分泌酶类分解粗纤维底物时,一种转化为营养物质,一种转化为气体、水分、热能散失,因而发酵料普遍失重。而且培养基含水量不合适时失重更大,培养基含水量太小时,菌丝分解纤维所得物质少部分转化为营养物质供菌丝生长,而大部分转变为代谢水使培养基含水量增加;培养基含水量太大时,菌丝分解基质时消耗培养基中部分水分,分解基质得到的物质除供菌丝生长外,相当一部分转化为气体和热能散失,从而使基质含水量下降。

总之,通过利用微生物发酵醋糟提高其营养价值的研究,我们初步确定了最佳发酵菌种和培养基配方,以及发酵条件与发酵期,但是,要进一步提高其酶活性与酶效率,要进一步在广大农区推广发酵饲料,还需作许多具体的工作。

(上接第 66 页)

行测定,测点分别为离地表 5 cm 和 50 cm 处。

表 4 模拟微区与农田的气候对比

测定时间	测定高度 5cm				测定高度 50cm			
	干球		湿球		干球		湿球	
	微区	农田	微区	农田	微区	农田	干球	湿球
8月30日	24.3	25.2	24.1	24.8	25.1	25.1	24.2	24.1
9月2日	24.4	25.3	24.2	24.4	25.8	25.4	24.0	24.0

测定结果说明(表 4):距地表 5 cm 处,两次测定干球读数,农田比微区高 0.90,湿球读数,农田比微区高 0.2~0.7,距地表 50 cm 处的两次测定,无论干球或湿球读数,微区与农田极为接近。说明微区与农田小气候基本一致,用微区测定的农田棵间蒸发能够代表农田的棵间蒸发量。

3.2 中子微区模拟装置的优点

这套装置的主要优点在于能将农田棵间蒸发从蒸散中分离开,有利于深入研究土壤作物大气系统的水分运动与分配。但在研究农田作物蒸腾时,应与农田蒸散测定同时进行,使试验更为完整。

3.3 农田棵间蒸发测定研究表明

提高降水利用率是发展北方旱地农业的突破口。我国北方降水量偏少,干旱严重,是发展农业生产的主要障碍。然而,在用中子微区模拟装置研究棵间蒸发的过程中发现,农田棵间蒸发损耗土壤水分数量较大。单产量 6750 kg/hm² 的玉米农田,其蒸腾量为 234 mm;玉米棵间蒸发量为 270~280 mm,占玉米农田蒸散量的 53.9%。试验基地常年降水量 510 mm,玉米蒸腾耗水量只占降水量的 45.8%。这一百分比说明作物对降水的利用率比较低,大部分降水还未得到利用,作物产量与蒸腾量呈正相关。要提高玉米产量,就必须提高蒸腾量或降水利用率,而要提高降水利用率,必须减少棵间蒸发,促进作物蒸腾,将蒸发耗水转为蒸腾耗水。为此,应采取措施充分开发降水生产潜能,从而达到提高降水生产率和粮食产量的要求。

参考文献

- 1 信乃谗,等.旱地农田用水状况与调控技术[M].北京:农业出版社,1992
- 2 W. 拉夏尔著.植物生理生态学[M].北京:科学出版社,1980
- 3 晋凡生,等.旱地玉米降水生产潜能及提高途径研究[J].华北农学报,1995,(10):35~40