

# 微生物发酵爆破秸秆生产动物饲料培养基的优化

常娟<sup>1</sup>, 尹清强<sup>1,2\*</sup>, 郑秋红<sup>1</sup>, 姜义宝<sup>1</sup>, 郭红伟<sup>1</sup>, 左瑞雨<sup>1</sup>, 刘俊熙<sup>2</sup>

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 河南省饲料微生物工程技术研究中心, 河南 周口 466000)

**摘要:** 为了促进秸秆饲料资源开发及其在动物饲养中的应用, 对爆破玉米秸秆米曲霉固体发酵生产动物饲料的固体发酵培养基进行优化。以爆破玉米秸秆为主要原料(81%~100%), 以玉米(0、2.5%、5.0%)、麸皮(0、2.5%、5.0%)、豆粕(0、2.5%、5.0%)和营养液(0、2.0%、4.0%)设计四因素三水平正交试验, 固体发酵6 d后, 测定发酵产物纤维素降解率、滤纸酶活性和羧甲基纤维素(CMC)酶活性, 选择最佳发酵培养基。结果表明, 纤维素降解率和滤纸酶活性最高的培养基组合为: 83.5%爆破玉米秸秆、5.0%玉米、2.5%麸皮、5.0%豆粕和4.0%营养液, 其中营养液、豆粕和玉米的不同水平对纤维素的降解率有显著影响( $P < 0.05$ )。CMC酶活性最高的培养基组合为: 86%爆破玉米秸秆、2.5%玉米、2.5%麸皮、5.0%豆粕和4.0%营养液。综合结果表明, 爆破秸秆发酵生产动物饲料的最优培养基组合为: 83.5%爆破秸秆、5.0%玉米、2.5%麸皮、5.0%豆粕和4.0%营养液。

**关键词:** 爆破秸秆; 米曲霉; 固体发酵; 正交试验

中图分类号: S816.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)07-0142-04

## Optimization of Exploded Corn Stover Substrate by Microbial Fermentation for Animal Feed Production

CHANG Juan<sup>1</sup>, YIN Qing-qiang<sup>1,2\*</sup>, ZHENG Qiu-hong<sup>1</sup>, JIANG Yi-bao<sup>1</sup>,

GUO Hong-wei<sup>1</sup>, ZUO Rui-yu<sup>1</sup>, LIU Jun-xi<sup>2</sup>

(1. Department of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Engineering and Technology Research Center of Feed Microbiology, Zhoukou 466000, China)

**Abstract:** The solid fermentation substrate of exploded corn stover fermented by *Aspergillus oryzae* for producing animal feed was optimized. The four-factor and three-level orthogonal experiment of exploded corn stover (81%—100%), corn meal (0%, 2.5% and 5.0%), wheat bran (0%, 2.5% and 5.0%), soybean meal (0%, 2.5% and 5.0%) and nutrient solution (0%, 2.0% and 4.0%) was used in this experiment, and the culture medium was optimized by determining the cellulose degradation, the filter paper cellulose enzyme activity (FPA) and CMCase activity of the fermented product. The result showed that the optimal medium for biodegradation and FPA production of exploded corn stover was 5% corn meal, 2.5% wheat bran, 5.0% soybean meal and 4.0% nutrient solution. The levels of nutrient solution, corn meal, and soybean meal had significant effects on stover degradation ( $P < 0.05$ ). The optimal medium for CMCase production of exploded corn stover was 2.5% corn meal, 2.5% wheat bran, 5.0% soybean meal and 4.0% nutrient solution. This work obtained the best culture medium for producing biological corn stover feed was 83.5% exploded corn stover, 5.0% corn meal, 2.5% wheat bran, 5.0% soybean meal and 4.0% nutrient solution.

**Key words:** exploded corn stover; *Aspergillus oryzae*; solid fermentation; orthogonal experiment

收稿日期: 2012-02-03

基金项目: 郑州市科技创新团队项目(112PCXTD339)

作者简介: 常娟(1978-), 女, 河南社旗人, 讲师, 博士, 主要从事饲料资源的开发利用研究。E-mail: changjuan2000@126.com

\* 通讯作者: 尹清强(1964-), 男, 河南南阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事饲料资源的开发利用研究。

E-mail: QQZ22@yahoo.com.cn

木质纤维素是地球上数量最大的可再生能源物质,据初步统计,全世界每年产量大约为100亿t,其中农作物秸秆的产量为70亿t<sup>[1]</sup>。然而,植物细胞壁中半纤维素和木质素的复杂结构及其对纤维素的包裹作用限制了秸秆资源在畜牧业生产中的大量应用。目前,在工业和饲料生产中实际使用的秸秆大约占总量的30%,其余大部分都被直接燃烧或丢弃,造成了很大的资源浪费和环境污染<sup>[2]</sup>。因此,促进秸秆中纤维成分的降解,合理地利用秸秆资源,对于畜牧业生产和经济发展具有非常重要的意义。

生物处理是一种安全、环境友好、低能耗的传统的秸秆处理方法<sup>[3-4]</sup>。然而,较低的水解效率和较长的反应时间限制了其在实际生产中的应用。为了提高生物处理的效果,必须采取一些物理或化学的预处理方法来软化或破坏木质纤维素的结构。蒸汽爆破是采用饱和水蒸汽加热原料至一定的压力,然后骤然减压至大气压的生物质预处理手段。蒸汽爆破预处理可使原料中大部分半纤维素、少量木质素和纤维素降解而溶出,有利于后续纤维素酶对纤维素的降解,是玉米秸秆预处理的有效方法之一,规模化的生产可以节省能耗和成本<sup>[5]</sup>。许多研究表明,蒸汽爆破处理可以提高动物对谷物秸秆的消化率<sup>[6-8]</sup>。目前,国内外将秸秆爆破技术应用到动物饲料生产方面的研究较少。鉴于此,将秸秆爆破预处理和微生物发酵相结合,并对爆破秸秆微生物发酵生产动物饲料的发酵培养基进行优化,旨在为秸秆饲料资源的开发及其在畜牧业生产中的应用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

玉米秸秆来自于河南鹤壁市郊区,经粉碎机粉碎后,过5mm筛备用。试验所用米曲霉菌种为河南农业大学动物营养与生物技术实验室分离、鉴定和保存。

### 1.2 试验设备

秸秆蒸汽爆破机为LB系列数控立式连续汽爆机(鹤壁正道生物能源公司)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 原料预处理 玉米秸秆在秸秆爆破机中于2.5MPa下维压200s,然后在0.00875s内突然释放压力,进行爆破预处理,处理后的样品自然晾晒干燥备用。

1.3.2 种曲的制备和培养 将分离纯化后的米曲霉菌株接种到PDA培养基中,30℃条件下静止培养3d,然后用无菌加有吐温的生理盐水冲洗平板,轻轻将琼脂平面上的孢子刮下,转移到已经灭菌的

三角瓶中,采用平板计数法计算种曲孢子密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL左右。

1.3.3 试验设计与分组 以爆破玉米秸秆为主要原料(81%~100%,质量分数,下同),以玉米(0、2.5%、5.0%)、麸皮(0、2.5%、5.0%)、豆粕(0、2.5%、5.0%)、营养液(0、2.0%、4.0%)设计四因素三水平试验。共9个处理组,每个处理组设4个重复,并设4个没有接种微生物的对照样品(添加4.0%的空白培养液),正交试验设计见表1。

表1 培养基正交试验各因素和水平

水平	A(玉米)/%	B(麸皮)/%	C(豆粕)/%	D(营养液)/%
1	0	0	0	0
2	2.5	2.5	2.5	2.0
3	5.0	5.0	5.0	4.0

营养液的配比为:尿素25%、葡萄糖25%、磷酸二氢钾12.5%、硫酸镁12.5%、硫酸锰10%、硫酸锌10%、氯化钴5%。

以上培养基用2%的Ca(OH)<sub>2</sub>调整pH值为中性后,121℃高压灭菌15min,按照固液比1:1.5,接种量为4%进行接种,30℃培养6d,测定发酵后产品的纤维素降解率、滤纸酶活性和羧甲基纤维素(CMC)酶活性。

1.3.4 理化指标的测定 发酵后的秸秆样品,在50℃条件下烘干至恒质量,一部分用于测定秸秆中纤维素含量。另取4.0g发酵样品,加入36mL生理盐水浸泡2h后,3000r/min离心10min,取上清液作为粗酶液,测定其滤纸酶活性和CMC酶活性。

秸秆中纤维含量的测定采用范氏(Van Soest)纤维测定方法<sup>[9]</sup>。

滤纸酶活性的测定:取粗酶液和煮沸10min灭活的酶液各0.5mL,加入1.5mL浓度为0.05mol/L、pH值为4.5的柠檬酸缓冲液和50mg滤纸条,于50℃条件下水浴保温1h,然后加入1.5mL的DNS显色液,煮沸5min,以灭活酶组为对照,在波长550nm处测定吸光度。酶活性单位定义为:以水解反应每小时催化底物水解形成1μmol葡萄糖的酶量为1个单位<sup>[10]</sup>。

CMC酶活性的测定:取粗酶液和煮沸10min灭活的酶液各0.5mL,加入1.5mL质量分数为0.51%的CMC柠檬酸缓冲液中,在50℃恒温水浴锅中酶解30min,加入1.5mL DNS显色液终止反应,充分混匀后,沸水浴15min,以灭活酶组为对照,在波长550nm处测定吸光度。

### 1.4 数据统计和分析

试验数据均以“平均值±标准差”(mean±SD)

表示,结果用 SAS 统计软件中 ANOVA 过程进行方差分析,并进行 Duncan 多重比较,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵爆破玉米秸秆中纤维素降解最优培养基的确定

由表 2 可知,玉米、麸皮、豆粕、营养液的最高  $k$  值分别在水平 3、水平 2、水平 3、水平 3。表明秸秆发酵纤维素降解率最高的条件为:爆破玉米秸秆 83.5%、玉米 5.0%、麸皮 2.5%、豆粕 5.0%、营养液 4.0%。营养液的  $R$  值最高,其次为麸皮和豆粕,玉米的  $R$  值最小,表明培养基成分对纤维素降解的影响程度依次为营养液、麸皮、豆粕和玉米,营养液是影响纤维素降解的最主要因素。

表 2 发酵爆破玉米秸秆中纤维素降解培养基优化的正交试验结果

编号	A	B	C	D	纤维素降解率/%
1	1	1	1	1	2.88±0.29
2	1	2	2	2	40.39±2.18
3	1	3	3	3	54.48±2.60
4	2	1	2	3	50.59±3.14
5	2	2	3	1	12.21±4.15
6	2	3	1	2	29.35±0.12
7	3	1	3	2	45.52±3.74
8	3	2	1	3	55.28±8.58
9	3	3	2	1	11.58±2.59
$k_1$	97.75	65.68	87.51	26.67	
$k_2$	92.14	107.88	102.56	115.25	$A_3B_2C_3D_3$
$k_3$	112.38	95.41	112.21	160.35	
$R$	20.24	42.20	24.70	133.68	$R_D > R_B > R_C > R_A$

由表 3 可知,营养液、豆粕和玉米的不同水平对纤维素降解的影响达到了极显著水平 ( $P < 0.01$ ),麸皮添加的不同比例对纤维素的降解无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表 3 纤维素降解培养基优化的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
校正模型	9 877.391 8	10	987.739 2	63.09	<0.000 1**
A	218.253 9	2	109.126 9	6.97	0.006 7**
B	82.485 2	2	41.242 6	2.63	0.102 6
C	310.069 6	2	155.034 8	9.90	0.001 6**
D	9 250.846 8	2	4 625.423 4	295.43	<0.000 1**
误差	250.505 2	16	16.656 6		
总变异	10 127.897 0	26			

注: \* 表示差异显著, \*\* 表示差异极显著。表 5、表 7 同。

### 2.2 发酵爆破玉米秸秆中滤纸酶活性最优培养基的确定

由表 4 可知,玉米、麸皮、豆粕、营养液的最高  $k$  值分别在水平 3、水平 2、水平 3、水平 3。这表明秸秆发酵中,滤纸酶活性优化培养基为:爆破玉米秸秆 8.35%、玉米 5.0%、麸皮 2.5%、豆粕 5.0%、营养液 4.0%。营养液的  $R$  值最高,其次为麸皮和玉米,

豆粕的  $R$  值最小,表明培养基中成分对滤纸酶产生的影响程度依次为营养液、麸皮、玉米和豆粕,营养液是影响滤纸酶产生的最主要因素。

表 4 发酵爆破玉米秸秆中滤纸酶活性产生培养基优化的正交试验结果

编号	A	B	C	D	滤纸酶活性/(U/g)
1	1	1	1	1	27.60±14.22
2	1	2	2	2	68.34±7.06
3	1	3	3	3	114.07±22.87
4	2	1	2	3	73.59±43.47
5	2	2	3	1	88.57±5.54
6	2	3	1	2	49.94±21.87
7	3	1	3	2	50.46±15.35
8	3	2	1	3	135.88±88.66
9	3	3	2	1	69.39±16.78
$k_1$	210.00	189.76	213.42	185.56	
$k_2$	212.10	292.79	211.31	168.74	$A_3B_2C_3D_3$
$k_3$	255.73	233.39	253.10	323.54	
$R$	45.73	103.03	41.79	154.80	$R_D > R_B > R_A > R_C$

由表 5 可知,营养液和麸皮的不同比例对滤纸酶活性的影响达到了显著水平 ( $P < 0.05$ ),玉米和豆粕的不同添加比例对滤纸酶活性的产生无显著的影响 ( $P > 0.05$ )。

表 5 滤纸酶活性产生培养基优化的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
校正模型	33 672.83	10	3 367.28	3.30	0.016 5*
A	1 333.12	2	666.56	0.65	0.534 1
B	10 043.19	2	5 021.59	4.92	0.021 7*
C	1 108.61	2	554.31	0.54	0.591 6
D	14 429.11	2	7 214.55	7.06	0.006 3**
误差	16 346.21	16	1 021.64		
总变异	50 019.04	26			

### 2.3 发酵爆破玉米秸秆中 CMC 酶活性最优培养基的确定

由表 6 可知,玉米、麸皮、豆粕、营养液的最高  $k$  值分别在水平 2、水平 2、水平 3、水平 3。这表明秸秆发酵中,CMC 酶活性优化培养基为:爆破玉米秸秆 86.0%、玉米 2.5%、麸皮 2.5%、豆粕 5.0%、营养液 4.0%。营养液的  $R$  值最高,其次为豆粕和玉米,麸皮

表 6 发酵爆破玉米秸秆中 CMC 酶活性产生培养基优化的正交试验结果

编号	A	B	C	D	CMC 酶活性/(U/g)
1	1	1	1	1	42.71±7.23
2	1	2	2	2	195.81±28.57
3	1	3	3	3	263.05±9.11
4	2	1	2	3	248.15±8.57
5	2	2	3	1	183.10±10.19
6	2	3	1	2	177.85±2.66
7	3	1	3	2	212.02±9.58
8	3	2	1	3	194.71±23.14
9	3	3	2	1	127.47±18.85
$k_1$	501.56	473.97	415.27	353.28	
$k_2$	609.10	573.62	571.43	585.67	$A_2B_2C_3D_3$
$k_3$	534.20	568.36	658.16	705.91	
$R$	107.54	99.65	242.89	352.63	$R_D > R_C > R_A > R_B$

的  $R$  值最小,这表明培养基成分对 CMC 酶活性产生的影响程度依次为营养液、豆粕、玉米和麸皮,营养液是影响 CMC 酶产生的最主要因素。

由表 7 可知,营养液、豆粕、玉米和麸皮的不同比例对 CMC 酶活性的影响均达到了显著水平( $P < 0.05$ )。

表 7 CMC 酶活性产生培养基优化的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
校正模型	103 867.20	10	10 386.72	40.25	$<0.000\ 1^{**}$
A	6 080.08	2	3 040.04	11.78	$0.000\ 7^{**}$
B	3 106.92	2	1 553.46	6.02	$0.011\ 2^{*}$
C	30 302.82	2	15 151.41	58.72	$<0.000\ 1^{**}$
D	64 268.68	2	32 134.34	124.53	$<0.000\ 1^{**}$
误差	4 128.62	16	258.04		
总变异	107 995.83	26			

### 3 讨论

生物发酵是一个复杂的过程,微生物的发酵受培养基组成、温度、时间、预处理等多种因素的影响。在实际生产中,发酵培养基的组成对发酵产品的生产成本有着直接的影响,许多研究表明,培养基的组成对发酵产品的品质起着至关重要的作用<sup>[11]</sup>。一些曲霉能够产生水解纤维素的酶类,并且使发酵产品具有特殊的质地和气味<sup>[12]</sup>,本实验室(河南省饲料微生物工程技术研究中心)前期试验结果表明,米曲霉发酵爆破秸秆生产动物饲料的最适发酵时间为 6 d<sup>[13]</sup>,本试验采用多因素多水平的正交试验对发酵培养基的组成进行优化,可以减少试验组数,有效地优化出试验的结果。

在本次试验中,纤维素的降解率、滤纸酶活性和 CMC 酶活性是发酵产品质量的评价指标。因木质纤维素生物发酵的最终目标是将其中的纤维素成分转化为单糖、多糖、蛋白质和维生素等营养成分,所以最大程度地提高原料中纤维素的降解率是培养基优化的最终目标。动物生产试验表明,酶类产品作为饲料添加剂,可以有效地提高动物的生产性能<sup>[14-16]</sup>,因此,微生物发酵过程中产生的滤纸酶和 CMC 酶类对纤维素的降解和产品的营养价值也有着重要的意义。

本试验中,纤维素降解率最高的组合为  $A_3B_2C_3D_3$ ,滤纸酶和 CMC 酶活性产生最高的组合分别为  $A_3B_2C_3D_3$  和  $A_2B_2C_3D_3$ 。滤纸酶活性产生最高的组合,纤维素的降解率也最高,这可能与滤纸酶活性是反应纤维素酶活性高低的一个综合指标有关。在影响爆破秸秆生物降解的几种因素中,营养液对纤维素的降解、滤纸酶和 CMC 酶的分泌影响程度最大,麸皮对纤维素的降解和滤纸酶的分泌影响程度次之,豆粕对纤维素的降解影响程度大于玉米。玉米、豆粕和营养液的不同添加水平对纤维素降解影响显著,麸

皮和营养液的不同添加水平对滤纸酶的分泌影响显著。综合以上结果,爆破秸秆生物降解的最优培养基组合为  $A_3B_2C_3D_3$ ,即 83.5% 爆破秸秆、5.0% 的玉米、2.5% 的麸皮、5.0% 的豆粕和 4.0% 的营养液,其中营养液、豆粕和玉米的不同水平对纤维素的降解率有显著的影响( $P < 0.05$ )。

### 参考文献:

- [1] Sanchez O J, Cardona C A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks[J]. *Biore-source Technology*, 2008, 99: 5270-5295.
- [2] 高海, 李国东, 刘伟, 等. 农作物秸秆综合利用现状及技术[J]. *现代农业科技*, 2011(18): 290-291.
- [3] 毛建华. 生物质能转换形式及秸秆气化技术[J]. *天津农业科学*, 2006, 12(1): 5-7.
- [4] 袁喜庆. 秸秆生物降解技术的效应[J]. *现代农业科技*, 2011(11): 261.
- [5] Alvira P, Tomas P E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review[J]. *Biore-source Technology*, 2010, 101: 4851-4861.
- [6] Viola A E, Zimbardi A F, Cardinale A M, et al. Processing cereal straws by steam explosion in a pilot plant to enhance digestibility in ruminants[J]. *Biore-source Technology*, 2008, 99: 681-689.
- [7] Liu J X, Orskov E R, Chen X B. Optimization of steam treatment as a method for upgrading rice straw as feeds[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1999, 76: 345-357.
- [8] De Castro F B, Paiva T C B, Arcaro I. Substitution of sugar cane with steam-treated eucalyptus (*Eucalyptus grandis*): Effects on intake and growth rate of dairy heifers[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1995, 52: 93-100.
- [9] Van Soest P J, Rovertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74: 3583-3597.
- [10] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59: 257-268.
- [11] 胡雪竹, 高宛莉, 李玉英, 等. 秸秆厌氧发酵条件优化的研究[J]. *天津农业科学*, 2011, 17(4): 108-112.
- [12] Gao J M, Weng H B, Zhu D H, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solide-state cultivation of corn stover[J]. *Biore-source Technology*, 2008, 99: 7623-7629.
- [13] Chang J, Cheng W, Yin Q Q, et al. Effect of steam explosion and microbial fermentation on cellulose and lignin degradation of corn stover[J]. *Biore-source Technology*, 2012, 104: 587-592.
- [14] Yang W Z, Beauchemin K A, Rode L M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82: 391-403.
- [15] Gado H M, Salem A Z M, Robinson P H. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2009, 154: 36-46.
- [16] Marquardt R R, Brenes A, Zhang Z Q, et al. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 1996, 60: 321-330.