

# 微生物转化玉米秸秆用于饲料生产的研究

孙芹英, 葛春梅, 张 洁\*, 徐娟娟  
(合肥学院 生物与环境工程系, 安徽 合肥 230022)

**摘要:** 为开辟新的饲料资源, 在采用混合酶液对玉米秸秆进行初步酶解的基础上, 进一步接种混合菌进行固态发酵。接种 15 d 测定发现, 秸秆中木质纤维素各成分降解显著, 其中木质素含量由开始的 16.8% 降至 7.3%, 纤维素、半纤维素含量也分别由最初的 27.2%、39.0% 降至 13.4%、16.1%; 同时固体基质中蛋白质、还原糖含量迅猛提升, 分别比对照高出 341% 和 77%。以上结果表明: 玉米秸秆经微生物转化后, 其营养成分大幅增加, 完全可成为动物饲料的重要来源。

**关键词:** 微生物转化; 玉米秸秆; 蛋白饲料; 酶解; 固态发酵

**中图分类号:** S816.6    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2011)06-0149-04

## Study on the Microbial Conversion of Corn Stalks into the Animal Feed

SUN Qir ying, GE Chur mei, ZHANG Jie\*, XU Juar juan

(Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230022, China)

**Abstract:** In order to find a new feed resource, some corn stalks were degraded by mixed enzymes and then c $\bar{o}$  fermentation was carried on these solid media. The results showed that the lignocellulose in stalks was evidently degraded 15 days later. More specifically, the content of lignin was reduced from 16.8% to 7.3%, and the initial content of cellulose was 27.2% while 13.4% was left after fermentation. As for hemicellulose, the figure was changed from 39.0% to 16.1%. Simultaneously, the content of protein and reducing sugar was increased 341% and 77%, respectively. All results showed that the nutrients of corn stalks were obviously increased and the corn stalks could be used as an important source of animal feed.

**Key words:** Microbial conversion; Corn stalks; Protein feed; Enzymolysis; Solid state fermentation

我国人口众多, 耕地少, 粮食产量有限, 而每年饲料用粮约 1 亿 t, 形成了十分严重的“人畜争粮”局面<sup>[1]</sup>, 迫切需要开辟新的饲料资源。与此同时, 农作物秸秆是一种可再生资源, 玉米芯、玉米秸秆在我国具有分布广、数量大、价格低廉等特点。因为缺乏有效的利用途径, 绝大多数秸秆被就地焚烧, 不仅造成了极为严重的环境污染, 也是对生物质资源的严重浪费。因此, 探索对秸秆的有效利用是一项具有战略意义的研究课题<sup>[2]</sup>。

目前, 畜牧业用蛋白质饲料在世界范围内存在资源危机, 迫使许多国家对非蛋白氮的利用给予了高度重视, 其中利用农作物秸秆发酵生产饲料具有广阔的应用前景。农作物秸秆的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素, 而后者作为秸秆细胞壁的主要成分难于被一般微生物分解, 从而限制了秸秆的降解和利用<sup>[3]</sup>。如果木质素能够得到有效降解, 就可以改变秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的嵌合结构, 从而使秸秆转化为易吸收饲料成为可能。

收稿日期: 2010-12-27

基金项目: 安徽省教育厅微生物学重点学科项目; 安徽省教育厅优秀人才基金项目(2009SQR2162); 合肥学院博士基金项目(RC0016)

作者简介: 孙芹英(1973), 女, 安徽肥东人, 实验师, 硕士, 主要从事酶工程研究。E-mail: sunyq@hfu.edu.cn

\* 通讯作者: 张 洁(1960), 女, 浙江海宁人, 教授, 硕士, 主要从事发酵工程研究。E-mail: bst@hfu.edu.cn

近年来,人们在利用微生物发酵秸秆生产饲料蛋白方面做了大量的研究工作<sup>[4,6]</sup>,方法主要有物理法、化学法和生物法,这些方法的主要目的是提高秸秆的适口性和消化利用率。但是,单纯的物理、化学方法没有解决秸秆营养物质含量低的根本问题。生物法即利用微生物将纤维素、半纤维素降解并转化为菌体蛋白的方法,具有污染少、效率高、利于工业化生产等特点。本研究在对玉米秸秆进行初步酶解的基础上,进一步接种混合菌进行固态发酵,考察了木质纤维素各成分的降解情况及基质中蛋白质、还原糖含量的变化,旨在为探讨秸秆发酵生产畜、禽饲料的最佳途径奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种 白地霉 (*Geotrichum candidum*) B、米根霉 (*Rhizopus oryzae*) M, 由合肥学院微生物和环境工程实验室保存; 鸡腿菇 (*Coprinus comatus*) J, 购自合肥市南七食用菌种厂, 经合肥学院微生物和环境工程实验室初步纯化鉴定; 里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) Li, 购自中国菌物保藏中心, 以上菌种均在 4℃ 条件下保藏于综合马铃薯斜面培养基 (CPDA) 中。

1.1.2 主要培养基 CPDA 斜面培养基 (1L 计):

20% 马铃薯汁, 葡萄糖 20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g, 2% 琼脂粉, 115℃ 灭菌 30 min 备用。液体发酵产酶培养基: 玉米芯 (过 0.45 mm 筛) 4 g, 玉米秸秆 (过 0.45 mm 筛) 2 g, 麸皮 (过 0.45 mm 筛) 1 g, 改良的 mandels 盐<sup>[7]</sup> 57.75%, 装液量 120 mL (250 mL 的三角瓶)。固态发酵培养基: 玉米秸秆来自肥西县农户, 经粉碎机加工成 1~2 cm 的碎段, 酶解处理后加入 10% 的玉米淀粉, 按固液比 1:1.5 加入改良的 mandels 盐溶液, 混合均匀, 121℃ 灭菌 40 min 备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 粗酶液的制备 在液体发酵产酶培养基中接种鸡腿菇和里氏木霉, 两菌接种比例为 5:3, 于 26℃、180 r/min、pH 6.0 条件下发酵 5 d。取发酵液置 4℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 用于玉米秸秆的酶解。

1.2.2 秸秆酶解试验 在 100 mL 锥形瓶中放入不同质量的玉米秸秆碎段, 加入粗酶液进行酶解。定期取样, 测定还原糖量。采用  $L_{16}(5^4)$  正交设计确定最佳酶解条件, 试验因素水平见表 1。为了进一步考察各因子对指标的影响, 对正交试验结果进行了完全随机模型方差分析。对酶解前后秸秆中半纤维素、纤维素、木质素和蛋白质的含量也进行了测定。测定的每样品至少做 3 个平行, 结果取其平均值, 标准偏差小于 10% (下同)。

表 1 酶解条件正交试验因素与水平

水平	因素				
	粗酶液用量(A)/mL	底物用量(B)/g	温度(C)/℃	pH 值(D)	时间(E)/h
1	2	4	45	4.0	48
2	4	6	50	4.4	60
3	6	8	55	4.8	72
4	8	10	60	5.2	84

1.2.3 固态发酵试验 玉米秸秆经最佳酶解条件处理后, 配成固态发酵培养基, 按 5% 的接种量接入白地霉和米根霉 (二者比例为 10:1), 置 26℃ 恒温培养箱中培养 15 d, 定期取样测定发酵过程中固体基质各成分含量变化。

1.2.4 测定方法 木质素、纤维素、半纤维素含量测定采用王玉万等的方法<sup>[8]</sup>, 降解率计算参见文献<sup>[9]</sup>, 蛋白质含量采用全自动凯氏定氮仪测定<sup>[10]</sup>。

1.2.5 酶活力测定 漆酶活力的测定采用 ABTS 法<sup>[11]</sup>, 定义每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位; 纤维素酶活力的测定采用 CMG-DNS 法: 测定 520 nm 处吸光度, 并计算生成葡萄糖的质量; 木聚糖酶活力的测定: 取 0.1 mL 适当稀释的粗酶

液, 加入 0.1 mL 2% 桦木木聚糖溶液, 50℃ 保温 15 min, 加入 0.6 mL DNS 溶液, 煮沸 10 min 灭活显色, 定容至 5 mL, 550 nm 波长下测定还原糖量 (以木糖计), 以灭活的酶液作为对照。定义每分钟产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位<sup>[12]</sup>。

1.2.6 还原糖测定 酶解试验样品整瓶取样, 每瓶中加入 50 mL 无菌水; 固态发酵试验中, 将 1 g 固体基质溶于 10 mL 无菌水, 以上样品皆搅拌均匀, 放置 30 min 后取上清液测定还原糖含量。测定采用生物传感器法。

$$\text{酶解得率} = \frac{\text{酶解液中糖含量}}{\text{试样秸秆质量}} \times 100\%$$

$$\text{糖转化率} = \frac{\text{初始糖含量} - \text{终止糖含量}}{\text{初始糖含量}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 秸秆酶解试验结果

在前期的研究中, 已发现鸡腿菇和里氏木霉、白地霉和米根霉组合相容性较好。经测定, 鸡腿菇和里氏木霉混合发酵 5d 所产粗酶液中, 主要含有漆酶、纤维素酶和木聚糖酶, 其中漆酶活力为 3245.4 U/mL, 纤维素酶活力为 96.2 U/mL, 木聚糖酶活力为 161.7 U/mL, 用此混合酶液处理玉米秸秆的正交试验结果见表 2、表 3。方差分析结果(表 2)表明, 试验各因素对还原糖产量的影响都达极显著水平( $P < 0.01$ )。

由表 3 可以看出, 试验各因素的影响大小依次为  $E > A > C > D > B$ , 即酶解时间对还原糖产量的

影响最大, 其次是粗酶液用量, 二者是酶解控制的主要因素; 温度和 pH 的影响较小, 属酶解的次要因素; 底物用量对酶解产糖量影响最小。从酶解得还原糖量来考察各因素水平值, 最佳配方组合为  $E_2A_3C_3D_4B_1$ , 即酶解时间 60h, 粗酶液用量 6mL, 温度 55℃, pH5.2, 底物用量为 4g。在温度由 50℃ 增加到 55℃ 时, 还原糖平均含量减少 0.1442 g/L, 因此, 选用 50℃ 酶解更佳。所以确定粗酶液酶解原材料的最佳配方为: 酶解时间 60h, 粗酶液用量 6mL, 温度 50℃, pH5.2, 底物用量 4g。在选定的条件下, 酶解得率最高达 57.9%, 还原糖含量达 4.625 g/L, 大大提高了秸秆进一步转化为饲料的可行性。

表 2 酶解条件正交试验方差分析结果(完全随机模型)

试验因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	7.3419	3	2.4473	448.5288	0.0001
B	1.5539	3	0.5180	94.9292	0.0001
C	3.6762	3	1.2254	224.5838	0.0001
D	3.2447	3	1.0816	198.2267	0.0001
E	10.0577	3	3.3526	614.4436	0.0001
误差	0.1746	32	0.0055	-	-

表 3 酶解条件正交试验结果

试验号	试验因素					还原糖含量/(g/L)		
	A	B	C	D	E	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>
1	1	1	1	1	1	1.56	1.48	1.40
2	1	2	2	2	2	1.80	1.80	1.94
3	1	3	3	3	3	2.14	2.10	2.12
4	1	4	4	4	4	1.54	1.24	1.36
5	2	1	2	3	4	1.78	1.60	1.73
6	2	2	1	4	3	2.96	2.90	2.94
7	2	3	4	1	2	1.14	1.24	1.18
8	2	4	3	2	1	1.50	1.32	1.43
9	3	1	3	4	2	3.38	3.34	3.32
10	3	2	4	3	1	1.16	1.36	1.29
11	3	3	1	2	4	1.36	1.30	1.34
12	3	4	2	1	3	3.12	3.22	3.16
13	4	1	4	2	3	2.82	2.80	2.81
14	4	2	3	1	4	2.30	2.38	2.24
15	4	3	2	4	1	2.64	2.80	2.69
16	4	4	1	3	2	2.94	2.84	2.98
K <sub>1</sub>	1.7067	2.2900	2.1667	2.0750	1.7192			
K <sub>2</sub>	1.8100	2.0892	2.3967	1.8517	2.2800			
K <sub>3</sub>	2.2742	1.8375	2.2525	2.0033	2.7975			
K <sub>4</sub>	2.6867	2.2608	1.6617	2.5475	1.6808			
R	0.9800	0.4525	0.7350	0.6958	1.1167			

酶解前后玉米秸秆中木质纤维素各成分变化情况如表 4 所示。由表 4 可知, 混合酶液对秸秆木质纤维素成分起到了明显的降解效果。其中木质素降解最为显著, 由原来的 16.8% 降为 10.1%, 降解率达 39.9%; 半纤维素含量由原来的 39.0% 降低到 28.6%, 降解率达 26.7%; 纤维素含量则由 27.2% 降低到 21.3%, 降解率为 21.7%。可能是因为混合酶液中含有高活性的漆酶, 较好地降解了玉米秸秆中木质素成分, 使原本紧密结合的结构变得疏松, 暴露出纤维素和半纤维素, 更利于纤维素酶和木聚糖酶发挥作用, 从而使秸秆中的纤维素和半纤维素成分也得到了

较大程度的降解。测定中同时发现, 酶解前后固体基质中蛋白质含量变化不大, 仅由原来的 5.72% 增加到 6.04%, 说明粗酶液对秸秆蛋白质转化影响较小。

表 4 玉米秸秆木质纤维素酶解降解率 %

测定项目	酶解前含量	酶解后含量	降解率
木质素	16.8	10.1	39.9
半纤维素	39.0	28.6	26.7
纤维素	27.2	21.3	21.7

### 2.2 固态发酵试验结果

将酶解处理后的玉米秸秆制成固态发酵培养

基,接种白地霉和米根霉发酵 15 d,发酵前后固体基质中各成分含量变化如表 5 所示。由表 5 可知,发酵前后蛋白质含量变化明显,原材料即对照中蛋白质含量仅 6.1%,发酵后基质中蛋白质含量达 26.9%。固体基质中蛋白质含量增长明显,究其原因,可能是菌体生长生成的菌丝体蛋白质含量丰富,附着在固体原料上,造成了固体基质中蛋白质含量比原材料大大增加。

表 5 固态发酵前后基质各成分变化 %

测定项目	发酵前含量	发酵后含量	变化率
木质素	10.1	7.3	-27.7
纤维素	21.3	13.4	-37.1
半纤维素	28.6	16.1	-43.7
蛋白质	6.1	26.9	341.0
还原糖	7.4	13.1	77.0

由表 5 还可以看出,基质中木质纤维素成分进一步降解,尤以半纤维素降解幅度最大,降解率达到 43.7%,可能与白地霉主要分泌木聚糖酶,而该酶主要作用于半纤维素有关;纤维素、木质素的降解率也分别达 37.1%和 27.7%。此外,基质中还原糖量也大幅增加,从 7.4% 升至 13.1%,增幅达 77.0%,不仅提高了秸秆作为畜牧饲料的质量,也提高了秸秆的适口性,更利于牲畜的取食。

### 3 结论与讨论

目前,我国农作物秸秆利用还处在起步阶段,缺乏综合高效的成套技术。研究表明,农作物秸秆虽然所含营养成分低、粗纤维含量高(31%~45%)、蛋白质含量少(3%~6%)<sup>[13]</sup>,但是经过适当的加工处理,可有效地将部分木质纤维素降解,转化为糖类等营养物质,从而作为畜牧业饲料的来源。

本试验采用鸡腿菇和里氏木霉混合发酵所产粗酶液降解玉米秸秆中粗纤维,使其含量大大降低。随后接种白地霉和米根霉,进行多菌种混合固态发酵,成功降解了大部分的木质纤维素成分,使木质素含量由开始的 16.8% 降至 7.3%,纤维素由 27.2% 降至 13.4%,半纤维素也由最初的 39.0% 降至 16.1%。同时由于微生物发酵过程菌丝体的生长,发酵后固体基质中蛋白质含量增加近 4 倍,另外还原糖含量也有较大幅度的提高(增幅达 77.0%)。由此可见,玉米秸秆经微生物发酵处理,完全可以转化为营养丰富的牲畜饲料。推广以后,不仅可有效解决蛋白饲料严重不足的问题,缓解人畜争粮,在生物质

资源合理利用,以及减少秸秆焚烧带来的污染等方面也具有重要的现实意义。

本研究仅对玉米秸秆的酶解处理条件进行了优化,后期混合固态发酵的菌种组合及工艺有待进一步研究。此外,为了真正将植物秸秆发酵生产蛋白饲料的工艺推广使用,还应加强以下几方面的研究:(1)扩大植物秸秆的研究范围,对秸秆发酵的前期处理过程继续进行优化试验;(2)对多菌的发酵工艺进行优化,多菌混合发酵的发酵机制也需要深入研究;(3)进行中试试验,为实际应用奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 牛天堂,田良才,李晋川.关于山西玉米产业的可持续发展[J].山西农业科学,2010,38(4):37.
- [2] 魏爱军.秸秆沼气实用技术[J].山西农业科学,2010,38(4):96.
- [3] 王勇,孟晓林.秸秆废弃物的生物学特性及其开发利用[J].山西农业科学,2009,37(12):4446.
- [4] 李海红,同帆,全攀瑞.玉米秸秆发酵生产蛋白饲料的研究[J].西北大学学报:自然科学版,2003,33(6):693-696.
- [5] 李日强,王爱英,葛志安.固态发酵玉米秸秆生产饲料蛋白发酵培养基研究[J].农业环境科学学报,2008,27(6):2484-2488.
- [6] 马旭光,张宗舟.微生物降解农作物秸秆生产 SCP 饲料的研究进展[J].资源开发与市场,2010,26(7):624-626.
- [7] 胡奎娟,吴克,潘仁瑞,等.固态混合发酵提高木聚糖酶和纤维素酶活力的研究[J].菌物学报,2007,26(2):273-278.
- [8] 王玉万,徐文玉.木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量分析程序[J].微生物学通报,1987,14(2):81-84.
- [9] 孙芹英,葛春梅,张洁.白腐菌混合发酵产酶及对秸秆木质纤维素的降解研究[J].工业微生物,2009,39(5):13-17.
- [10] 于见亮,李开雄,卢士玲,等.应用 KDY-9820 凯氏定氮仪测定羊肉中挥发性盐基氮[J].食品研究与开发,2008,29(2):141-143.
- [11] 张敏,肖亚中,蒲春雷,等.白腐真菌 AH 28-2 菌株发酵合成漆酶初步研究[J].微生物学通报,2002,29(3):37-42.
- [12] 葛春梅,徐娟娟,孙芹英,等.里氏木霉和鸡腿菇利用秸秆共发酵产木质降解酶[J].生物工程学报,2009,25(12):2008-2013.
- [13] 高自超,周元军.农作物秸秆综合开发利用技术[J].农产品加工·畜产品,2007(6):39-40.