

发酵凤眼莲的菌种筛选

潘开宇 (信阳农业高等专科学校水产科学系, 河南信阳 464000)

摘要 [目的] 通过菌种筛选探讨发酵凤眼莲的利用价值。[方法] 将5种菌种分别置于PDA、PD、营养琼脂、牛肉汤固定培养基上进行菌种活化培养, 然后通过单个菌种发酵试验和组合菌种平板拮抗试验对菌种进行筛选。[结果] 根据5种菌种在凤眼莲固体培养基上的生长状况, 选择生孢噬纤维菌、产朊假丝酵母和黑曲霉作为发酵菌种, 其菌种组合发酵效果显著优于单一菌种发酵效果。采用3种菌组合在水分65%、pH值7.0和温度28℃的条件下发酵凤眼莲, 产物的粗蛋白含量为47.33%, 比所用培养基的粗蛋白含量提高173.74%, 粗纤维降解率达77.06%, 且有发酵香味, 具有优质蛋白饲料的特性。[结论] 筛选良好的组合菌种对凤眼莲进行发酵, 能有效解决凤眼莲作为饲料存在的高水分、高纤维、低蛋白等问题。

关键词 发酵饲料; 生孢噬纤维菌; 产朊假丝酵母; 黑曲霉; 筛选

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)30-15057-03

Strain Screening of Fermenting *Eichhornia crassipes*

PAN Kai-yu (Department of Aquatic Science, Xinyang Agricultural Higher Junior College, Xinyang, Henan 464000)

Abstract [Objective] The study aimed to discuss the using value of fermenting *Eichhornia crassipes* through strain screening. [Method] 5 kinds of strains were cultured on the solid media of PDA, PD, nutrition agar and brewis resp. for strain activation and then they were screened through the single strain fermentation test and the plate antagonistic test with different strain combinations. [Result] *Sporocytophaga* fiber strain, *Candida utilis* and *Aspergillus niger* were selected as the fermenting strains based on the growth status of 5 kinds of strains on the different solid media of *E. crassipes* and the fermenting effects of different strain combinations were superior to that of single strain. When *E. crassipes* was fermented with the combinations of 3 kinds of strains under the condition as water of 65%, pH of 7.0 and temperature of 28℃, the crude protein content in the product was 47.33%, increasing by 173.74% compared with that in its used medium, the crude fiber degradation rate was 77.06%, with the fermented flavor, which showed the characteristics of high-quality protein feed. [Conclusion] Screening good combined strains to ferment *E. crassipes* could effectively solve the problems such as high water, high fiber and low protein for *E. crassipes* when it was used as feed.

Key words Fermented feed; *Sporocytophaga* fiber strain; *Candida utilis*; *Aspergillus niger*; Screening

凤眼莲俗称水葫芦, 学名凤眼蓝 (*Eichhornia crassipes*), 属雨久花科, 原产于热带美洲。我国引进作为食草牲畜、禽和鱼类的青饲料。近些年来, 由于水体富营养化程度提高, 凤眼莲在我国不少地区的天然水域快速扩散, 生长期阻塞河道、覆盖湖面, 衰亡后腐烂发酵污染水体, 形成严重草害。与此同时, 我国作为农业大国, 养殖产品产量居世界前列, 饲料严重不足已成为我国畜禽养殖业、水产养殖业发展的重要制约因素之一。采用生物技术措施, 将一些非常规饲料加以改造来作为常规饲料的替代品, 是我们国家缓解粮食和饲料之间的矛盾、解决饲料相对缺乏的重要途径。鉴于此, 如果把生物产量较大的凤眼莲作为饲料用于动物生产, 不仅可解决凤眼莲由于快速大面积扩散而带来的种种弊端, 而且可在一定程度上缓解我国快速发展的畜牧及水产业与饲料资源紧张的矛盾, 为凤眼莲的综合利用提供一条新的途径^[1-2]。迄今为止, 我国对发酵饲料的研究结果证明了发酵饲料的广泛应用前景^[3-7]。而国内外对凤眼莲的有效利用还仅限于作为堆肥、青贮饲料^[8]。由于凤眼莲水分含量大, 用作青贮饲料, 保存时间较短, 若青贮的饲料不能在有效期内用完, 势必造成材料的二次浪费。为了探讨发酵凤眼莲的利用价值, 笔者对发酵菌种的筛选进行了一系列的对比试验。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 原料来源及营养成分。凤眼莲从野外水塘捞取, 把采集的凤眼莲剪去根部, 淋水晾干, 直到无水滴下落, 然后将其放在烘箱里60℃烘干, 用粉碎机粉碎待用。发酵前凤眼

莲营养成分: 水分含量65.53%; 水溶性碳水化合物(WSC)4.46%; pH值6.51; 粗纤维含量(CF)43.32%; 粗蛋白(CP)17.29%。

1.1.2 菌种和菌种来源。生孢噬纤维菌(编号为C)、枯草芽孢杆菌, 分解发酵基质的纤维素。由信阳农业高等专科学校生物工程系实验室提供。

产朊假丝酵母(编号为Y): 能提高发酵产物的蛋白质含量。它能以尿素和硝酸盐为氮源, 不需任何生长因子。由信阳农业高等专科学校食品科技系教研室提供。

黑曲霉(编号为T)、木霉: 分解发酵基质的纤维素和提高发酵产物的蛋白质含量。由信阳农业高等专科学校生物工程系实验室提供。

1.1.3 凤眼莲固体发酵培养基。取经粉碎机粉碎的凤眼莲粉10g放入1000ml烧杯中, 另取1g硫酸氨和20g琼脂加入到同一烧杯中, 再向烧杯中加入1000ml蒸馏水, 放在电炉上加热至琼脂全部溶解, 即得凤眼莲的固体发酵培养基。该培养基主要用于菌种在凤眼莲上的生长和筛选。

1.1.4 凤眼莲发酵配方。凤眼莲粉80g, 麸皮15g, (NH₄)₂SO₄ 2g, KH₂PO₄ 0.6g, 将4者混合加水搅匀, 备发酵之用。含水量控制在60%~65%。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化。把保藏的供试菌种从生化培养箱拿出后, 进行菌种的活化, 然后经过几代的反复培养, 取纯菌种和生长指数期的菌种备用。

产朊假丝酵母、黑曲霉、木霉在PDA、PD培养基上分别进行培养, 每种菌设4个重复; 生孢噬纤维菌、枯草芽孢杆菌在营养琼脂、牛肉汤培养基上分别进行培养, 每种菌设4个重复。固体培养温度为28℃, 液体培养温度为30℃, 培养

时间2 d。

1.2.2 菌种筛选。

(1) 单个菌种在凤眼莲培养基上的生长情况研究。把活化的单个纯菌株在凤眼莲固体培养基上接种培养,每菌设置4个重复。培养温度28℃;pH值7.0,培养时间2 d。

(2) 平板拮抗试验。选出长势良好的菌种两两组合,共同接种于同一凤眼莲固体培养基上,观察菌株间互作效应,为发酵提供协同效果较好的菌株组合。

1.2.3 组合菌种发酵条件的确定。为初步确定所选菌株组合的最适发酵条件,将所选菌种组合在不同水分含量和发酵温度的凤眼莲培养基上培养,设计一个2因素3水平的正交试验,从发酵速度、营养变化的对比结果确定最佳菌株组合的最适发酵条件,初步掌握发酵凤眼莲较适的水分含量和发酵温度。设9个处理组,每个处理组设3个重复。



图1 产朊假丝酵母培养结果

Fig.1 Cultivated results of *Candida utilis*



图2 黑曲霉培养结果

Fig.2 Cultivated results of *Aspergillus niger*



图3 生孢噬纤维菌培养结果

Fig.3 Cultivated results of *Sporocytophaga*

~6)可以看出,3种菌的两两组合在凤眼莲培养基上的生长状况都很好,菌种的交叉部分也没有因菌种的不同而产生拮

1.2.4 统计方法。原始数据经Excel初步处理后采用SAS软件(6.0版)进行方差统计分析,各平均数之间用Duncan's法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 单个菌种筛选结果 从产朊假丝酵母、生孢噬纤维菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉和木霉在凤眼莲固体培养基上的生长状况来看,产朊假丝酵母、生孢噬纤维菌和黑曲霉在培养基上的长势最好(图1~3)。产朊假丝酵母、生孢噬纤维菌菌落饱满,乳白色,平滑有光泽,边缘整齐;黑曲霉菌落为铁锈色,菌丝发达;由于生长因子不适于枯草芽孢杆菌和木霉的生长,其在凤眼莲固体培养基上生长的菌落不明显,没有达到预期的效果。因此经过初步筛选,确认产朊假丝酵母、生孢噬纤维菌和黑曲霉可以作为发酵凤眼莲的菌种。

2.2 初筛菌种组合的拮抗试验结果 从拮抗试验结果(图4

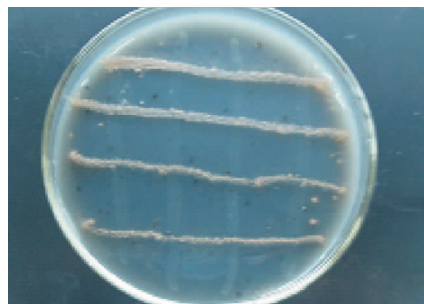


图4 黑曲霉与生孢噬纤维菌组合培养结果

Fig.4 Cultivated results of combination of *Aspergillus niger* and *Sporocytophaga*

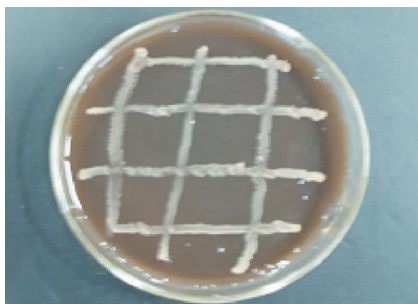


图5 产朊假丝酵母与生孢噬纤维菌组合培养结果

Fig.5 Cultivated results of combination of *Candida utilis* and *Sporocytophaga*

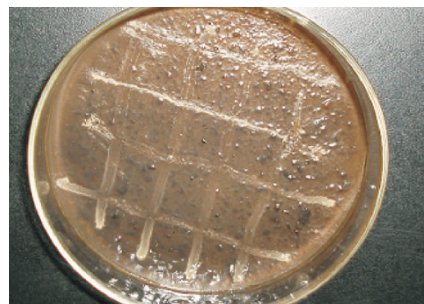


图6 黑曲霉与产朊假丝酵母组合培养结果

Fig.6 Cultivated results of combination of *Aspergillus niger* and *Candida utilis*

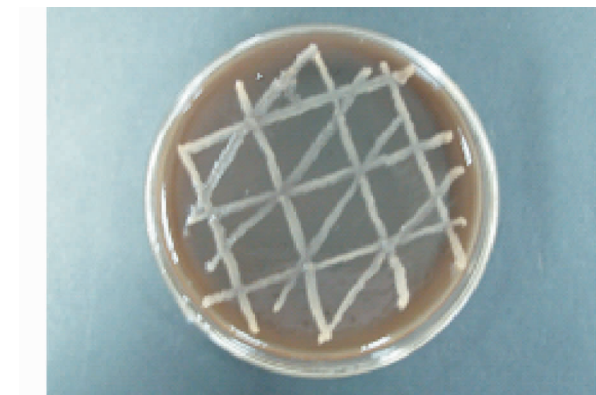


图7 产朊假丝酵母、生孢噬纤维菌和黑曲霉组合培养结果

Fig.7 Cultivated results of combination of *Candida utilis*, *Sporocytophaga*, *Aspergillus niger*

抗作用;从图7也可以看出,3种菌在凤眼莲固体培养基上也未相互产生拮抗作用,生长良好,再次证明利用这3种菌进

行凤眼莲发酵试验是可行的。

2.3 组合菌种发酵结果与分析

2.3.1 组合菌种发酵凤眼莲最适培养基发酵条件。由表1可知,在水分65%、pH值7.0、温度28℃的条件下,发酵效果最好,粗蛋白的提高率为 $(172.69 \pm 3.30)\%$,粗纤维的降解率为 $(77.12 \pm 1.40)\%$ 。水分过多,容易造成发酵产物变质,发生霉变,对发酵后用于合成饲料的制备也不利;水分过少,对微生物合成和分解所产生的酶类有很大影响,进而也影响发酵产物的营养质量。同样,温度过高,对酶的利用不高;温度过低,对有益微生物的生长不利。

2.3.2 营养含量测定结果。由表2可知,发酵料粗纤维降解率菌株CYT组合>C>T>Y,粗蛋白含量提高率菌株CYT组合>Y>T>C,T与CYT组合发酵料营养价值明显高于C

表 1 正交试验营养成分测定结果

Table 1 Determination results of nutritional components in orthogonal test

水平 Level	含水量//%	发酵温度//℃	粗蛋白增加率//%	粗纤维降解率//%
	Water content	Fermentation temperature	Crude protein increase rate	Crude fiber degradation rate
1	55	23	153.64 ± 2.50	68.95 ± 1.20
2	55	28	156.98 ± 3.00	70.54 ± 0.90
3	55	33	152.31 ± 2.80	69.35 ± 1.60
4	65	23	169.77 ± 2.60	75.03 ± 0.80
5	65	28	172.69 ± 3.30	77.12 ± 1.40
6	65	33	165.99 ± 3.20	75.96 ± 1.30
7	75	23	167.56 ± 2.90	69.95 ± 1.30
8	75	28	169.38 ± 3.40	72.01 ± 1.50
9	75	33	166.23 ± 3.00	70.36 ± 0.90

注: $n=3$ 。Note: $n=3$ 。

和 Y, T 与 CYT 组合差异显著, 因此确定 CYT 组合为发酵风眼莲的最佳发酵菌株组合。从菌种的组合发酵与单一的菌种发酵对比来看, 组合菌种有其发酵的优势。组合菌种在同一发酵培养基上不会产生拮抗反应的情况下, 既可发挥各自的特点, 又可共同对同一发酵料产生蛋白源、降解发酵料中的纤维含量。

表 2 菌株 C、Y、T 及 CYT 组合发酵后风眼莲营养含量变化

Table 2 Nutrition content changes of *Eichhornia crassipes* after fermentation of strains C, Y, T and CYT %

菌种 Strain	粗纤维含量	粗纤维降解率	粗蛋白含量	粗蛋白提高率
	Crude fiber content	Crude fiber degradation rate	Crude protein content	Crude protein increasing rate
C	10.40 ± 0.80	75.46 ± 2.80	28.75 ± 1.50	66.28 ± 2.30
T	15.76 ± 1.30	62.76 ± 2.40	40.07 ± 2.10	131.75 ± 3.80
Y	18.56 ± 1.60	56.14 ± 2.00	45.47 ± 2.20	162.98 ± 4.00
CYT 组合	9.71 ± 0.50	77.06 ± 2.80	47.33 ± 2.00	173.74 ± 4.60

注: 以上菌种是在优化条件下发酵。

Note: All above strains are fermented at the optimum conditions.

2.3.3 发酵料的感官评定结果。开启发酵罐, 大多数罐都散发一股醇香味或淡淡的酒香味; 少数的几个发酵罐中可能因杂菌的混入, 有腐败味或臭味, 则为发酵失败。用舌头舔尝有酸甜味为合格料, 如果只甜不酸则为发酵不够; 如果只酸不甜则为含水量过高。从感官来看, 试验的大多数发酵罐都发酵比较成功, 少数的几个由于操作不合格或杂菌的混入, 出现味道不佳的现象。

3 结论与讨论

(1) 利用微生物发酵风眼莲生产发酵饲料必须选择菌丝蛋白含量高, 能高效降解粗纤维且生长增殖快的菌株及菌株

组合。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)和放线菌等, 但研究最多且酶活性较高多为真菌。试验所挑选的几种发酵的菌种, 都是可以直接饲喂的。1998 年美国饲料行业协会(AAFCO)年鉴中共发表了允许使用的直接饲喂的微生物 43 种, 该试验的菌种都包括在其中。

(2) 该试验通过琼脂培养法、风眼莲固体发酵法对 5 种菌种进行筛选, 舍去对风眼莲固体培养基不敏感的 2 种, 即枯草芽孢杆菌和木霉; 通过单个菌种和组合菌种的发酵试验, 结果表明, 生孢噬纤维菌的粗纤维降解率较高, 产脲假丝酵母和黑曲霉能提高蛋白含量; 且 3 种菌之间都有较好的协同作用, 其菌种组合发酵效果显著高于单一菌种发酵效果。生孢噬纤维菌、产脲假丝酵母和黑曲霉组合在水分 65%、pH 值 7.0、温度 28 ℃ 的条件下发酵风眼莲, 产物的粗蛋白含量可达 47.33%, 比所用培养基粗蛋白含量提高 173.74%。粗纤维降解率达 77.06%, 且有发酵香味, 具有优质蛋白饲料的特质。

(3) 用微生物发酵的方法对风眼莲进行合理的利用, 能有效解决风眼莲作为饲料高水分、高纤维、低蛋白等缺点。不仅可以解决风眼莲大量生长对生态环境所造成的威胁, 也可以解决我国蛋白饲料相对缺乏的现状, 达到人与自然的和谐发展。从该试验结果来看, 今后可以考虑从发酵的角度对风眼莲进行开发。该试验是在实验室条件下完成的, 要将风眼莲应用到大规模的生产上, 还要把发酵后的发酵料和其他营养材料配制成合理的配合饲料, 应用到不同的畜禽和不同的鱼类生产。但毋庸置疑的是, 发酵后的风眼莲可作为一主要的植物蛋白添加到饲料配方中。同时, 通过发酵使其作为饲料原料对于解决现今防治风眼莲这个生态难题具有重要意义。

参考文献

- [1] 陈若霞, 王扬军, 古斌权. 水葫芦生物防治和综合治理技术研究[J]. 宁波农业科技, 2005(4): 17-18.
- [2] 洪春来, 魏幼璋, 贾彦博. 水葫芦防治及综合利用的研究进展[J]. 科技通报, 2005, 21(4): 491-496.
- [3] 江永才. 我国发酵饲料的生产现状及未来展望[J]. 饲料广角, 2005(7): 13-15.
- [4] 杨柳燕, 张奕, 肖琳. 固体发酵提高水生植物发酵产物蛋白含量的研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(1): 35-39.
- [5] 陈敏. 发酵稻草生产饲料蛋白优良菌种的筛选[J]. 饲料研究, 1999(9): 32-38.
- [6] 何佳, 田娟, 赵启美. 啤酒糟发酵蛋白饲料优良菌种的筛选[J]. 洛阳农业高等专科学校学报, 1999, 19(4): 29-30.
- [7] 刘军, 朱文优. 菜籽发酵饲料的研制[J]. 生产与科研经验, 2007, 33(1): 69-71.
- [8] 李菊娣, 刘建新, 吴跃明, 等. 添加乳酸菌和酶制剂对水葫芦茎叶青贮发酵品质的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 34(11): 27-30.