

发酵油茶枯饼生产蛋白饲料的混合菌种的筛选

马力^{1,2}, 陈永忠^{1,2}, 彭邵锋^{1,2}, 陈隆升^{1,2}, 王湘南^{1,2}, 王瑞^{1,2}, 唐炜^{1,2}
(¹湖南省林业科学院, 长沙 410004; ²国家林业局油茶研究开发中心, 长沙 410004)

摘要:以油茶枯饼为原料, 筛选生产优质高蛋白饲料的菌种为目的。通过平板点种试验, 选用黑曲霉为指示菌, 又根据刺激圈试验以及三角瓶发酵培养, 获得油茶枯饼生产蛋白饲料的最佳菌种组合, 油茶枯饼发酵后粗蛋白含量为 16.94%, 较未发酵时的 10.82% 提高了 56.56%。试验结果表明, 油茶枯饼生产蛋白饲料的最佳菌种组合为: 地衣芽孢杆菌 10181 : 黑曲霉 : 葡萄汁酵母 1445 : 米曲霉 = 1 : 1 : 1 : 1 时为优选接种比例。

关键词:油茶枯饼; 蛋白饲料; 菌种筛选

中图分类号: Q935

文献标志码: A

论文编号: 2011-0130

Screening of the Multi-strains to Produce Cell Protein Feeds from Oil-tea *Camellia* Cake

Ma Li^{1,2}, Chen Yongzhong^{1,2}, Peng Shaofeng^{1,2}, Chen Longsheng^{1,2},

Wang Xiangnan^{1,2}, Wang Rui^{1,2}, Tang Wei^{1,2}

(¹Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004;

²Camellia Oleifera Research and Development Center of State Forestry Administration, Changsha 410004)

Abstract: The research aim to select strains producing high quality protein feedstuff in oil-tea *Camellia* cake as raw material. The strain of *Aspergillus niger* was selected to be an indicator strain through the dot-in-oculating method. The optimum multi-strains ratio of fermenting multi-strains was selected according to the results from the stimulating circle experiment as well as fermentation experiment in the flask. The protein content of fermenting product under this fermentation condition could reach 16.94%, which was 56.56% higher than the control of 10.82%. Then the optimum multi-strains ratio of fermenting multi-strains was *Bacillus licheniformis*10181 : *Aspergillus niger* : *Saccharomyces uvarum*1445 : *Aspergillus niger* = 1:1:1:1.

Key words: oil-tea *Camellia* cake; feeding-protein; strain screening

0 引言

油茶指山茶属植物中种子含油率较高、且有一定经济栽培价值的一类植物的总称^[1], 与油棕、油橄榄和椰子并称世界四大木本油料树种^[2]。中国现有油茶栽培面积超过 300 万 hm^2 , 年产油茶籽约 96 万 t, 年产枯饼 70 多万 $\text{t}^{[3-6]}$ 。油茶枯饼通过微生物发酵, 可将其糖类、纤维素等主要成分高效转化成蛋白质, 成为高蛋白

饲料的优质原料, 可有效缓解油茶枯饼被废弃掉或廉价出口到国外等问题, 提高油茶副产物的综合利用率^[7-8]。目前中国在利用油茶枯饼发酵方面做得较多的专家为钟海雁、邓桂兰。邓桂兰等^[9-12]开展了利用茶粕生产菌体蛋白饲料的研究, 研究结果表明酵母菌能较好利用茶粕中的营养物质, 并可获得较多的菌体干重。钟海雁等^[13]开展了油茶枯饼固态发酵技术的研

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目“油茶副产物综合利用集成与示范”(2009BADB1B10); 湖南省林业科学院 2009 年度院创新基金项目“多元营养有机油茶饼粕饲料生产关键技术研究”(XLKJ0910)。

第一作者简介: 马力, 女, 1982 年出生, 湖南湘潭人, 研究实习生, 博士, 主要从事油脂加工方面的研究。通信地址: 410004 湖南长沙韶山南路 658 号湖南省林业科学院经济林果研究所, Tel: 0731-85597432, E-mail: supermarry1@163.com。

通讯作者: 陈永忠, 男, 1965 年出生, 广西横县人, 研究员, 博士, 主要从事林木遗传育种与栽培研究。通信地址: 410004 湖南长沙韶山南路 658 号湖南省林业科学院经济林果研究所, Tel: 0731-85578759, E-mail: chen Yongzhong06@163.com。

收稿日期: 2011-01-14, **修回日期:** 2011-04-12。

究, 研究表明黑曲霉、毛霉、117产朊假丝酵母、平菇和紫木耳均能在脱皂油茶枯饼上正常生长, 发酵后, 其蛋白质含量有一定程度的提高。

单一菌种发酵油茶枯饼可提高蛋白产量, 但比混合菌种发酵效果差, 因混合菌种发酵可多个菌种之间互相补偿缺陷, 进行协同发酵^[14-16]。笔者通过指示菌以及配伍菌种的筛选, 优化出蛋白产量高的混合菌种, 达到提高发酵油茶枯饼蛋白产量的目的。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2010年在湖南省林业科学院中心实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 油茶枯饼 湖南农业大学油脂与蛋白质实验室提供。

1.2.2 发酵菌种 黑曲霉、米曲霉、白地霉、地衣芽孢杆菌10181、热带假丝酵母1779、葡萄汁酵母1445、枯草芽孢杆菌, 均由湖南省微生物研究所提供。

1.2.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基; 马铃薯培养基; 平板培养基: 油茶枯饼, 琼脂, pH自然, 105℃灭菌20 min; 三角瓶发酵培养基: 热水脱皂的油茶枯饼16 g, 麦麸1 g, 葡萄糖2 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, 水25 mL, pH自然, 105℃灭菌20 min。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计

(1) 平板点种试验。斜面菌种用无菌水洗下, 30℃摇床振荡培养48 h, 分别接入到油茶枯饼培养基中, 28℃下培养72 h, 观察固体平板上各菌株的生长情况。

(2) 平板点种刺激圈试验。黑曲霉斜面菌种用无菌水洗下, 30℃摇床振荡培养48 h, 分别接入到油茶枯饼培养基中, 再分别点种待选菌, 28℃下培养72 h, 观察固体平板点种各菌株处黑曲霉的生长情况。

(3) 菌种混合比确定试验。由于黑曲霉和米曲为同一属, 因此以地衣芽孢杆菌与黑曲霉为A组, 葡萄汁酵母和米曲霉为B组, 利用二元坐标系固态发酵确定双菌种的接种混合比。

①地衣芽孢杆菌10181与黑曲霉的混合比。地衣芽孢杆菌10181与黑曲霉的接种比分别为5:1、2:1、1:1、1:2、1:5, 将斜面菌种用无菌水洗下, 以10%的比例接入三角瓶发酵培养基中, 28℃生化培养箱培养72 h后, 105℃烘干至恒重, 测定其粗蛋白含量。

②葡萄汁酵母1445与米曲霉的混合比。葡萄汁酵母1445与米曲霉的接种比分别为5:1、2:1、1:1、1:2、1:5, 将斜面菌种用无菌水洗下, 以10%的比例接入三

角瓶发酵培养基中, 28℃生化培养箱培养72 h后, 105℃烘干至恒重, 测定其粗蛋白含量。

③4个菌种的混合比。A组菌与B组菌的接种比分别为5:1、2:1、1:1、1:2、1:5, 将斜面菌种用无菌水洗下, 以10%的比例接入三角瓶发酵培养基中, 28℃生化培养箱培养72 h后, 105℃烘干至恒重, 测定其粗蛋白含量。

(4) 测定方法。粗蛋白按凯氏定氮法测定; 还原糖按菲林试剂滴定法(GB/T 5009.7—2003)测定; 粗纤维按GB 5009.10—1985测定。

1.3.2 精密仪器和药品规格 PYX-280S-B生化培养箱, 广东韶关科力实验仪器有限公司; PYX-300G-B冷冻振荡培养箱, 广东韶关市科力实验仪器有限公司; YX-280D型温控型手提式压力蒸汽灭菌锅, 合肥华泰医疗设备有限公司; SW-CJ-1FD型超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。

2 结果与分析

2.1 指示菌种的筛选

平板点种试验结果如表1所示。在发酵的菌种中, 以白地霉、黑曲霉、地衣芽孢杆菌10181、热带假丝酵母1779、葡萄汁酵母1445在油茶枯饼培养基中长势均较好。通过三角瓶发酵试验(结果见图1), 发酵后的油茶枯饼较发酵之前粗蛋白含量增加, 还原糖和粗纤维含量都有所下降。其中地衣芽孢杆菌10181发酵后的粗蛋白含量最高, 为15.32%, 黑曲霉次之, 为14.95%。由于黑曲霉发酵菌体外观特征明显, 易于观察, 且纤维素含量和可溶性糖的下降程度较地衣芽孢杆菌10181大, 因此决定以黑曲霉为指示菌。

表1 各菌株在油茶枯饼中的生长情况

序号	菌种	菌种生长情况
1	黑曲霉	+++
2	米曲霉	+++
3	白地霉	++
4	地衣芽孢杆菌10181	+++
5	热带假丝酵母1779	+++
6	葡萄汁酵母1445	+++
7	枯草芽孢杆菌	++

注: ++及+++分别表示培养物外观菌体明显可见及菌体生长繁茂。

2.2 配伍菌种的筛选

由表2可知, 地衣芽孢杆菌10181、米曲霉与葡萄汁酵母1445可明显刺激黑曲霉生长, 因此确定这3种菌为配伍菌种。

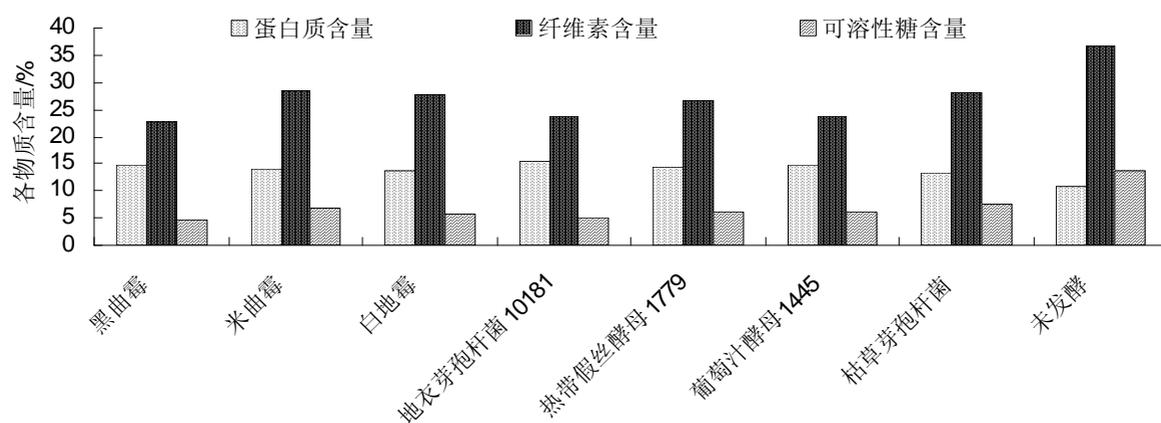


图1 各个菌发酵后粗蛋白、还原糖、粗纤维的含量

表2 不同菌株对黑曲霉的作用

序号	菌种	菌种生长情况
1	地衣芽孢杆菌 10181	+++
2	枯草芽孢杆菌	++
3	葡萄汁酵母 1445	+++
4	热带假丝酵母 1779	++
5	米曲霉	+++

注:++及+++分别表示培养物外观菌体明显可见及菌体生长繁茂。

2.3 菌种相互比例的确定

如图2和图3所示,可知A组和B组双菌种在接种混合比分别为1:1和1:1时粗蛋白含量最高,即1:1为此2组双菌种的较佳接种混合比值。

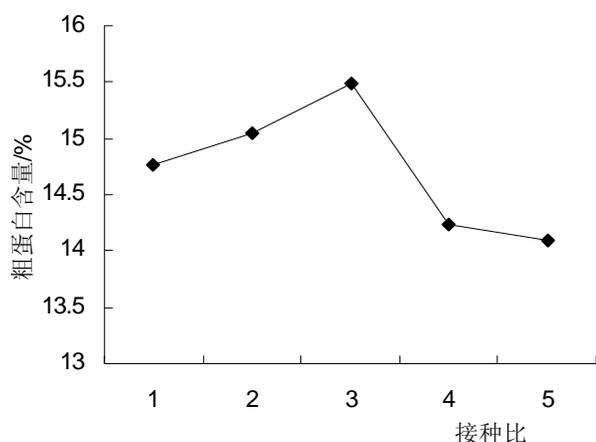


图2 不同比例地衣芽孢杆菌 10181 与黑曲霉产生粗蛋白含量

2.4 4个菌种接种混合比的确定

将地衣芽孢杆菌 10181 和黑曲霉两菌种按 1 的比值作为一个整体,葡萄汁酵母 1445 和米曲霉按 1 的比值作为一个整体,再将 2 个整体相比,其比值作横坐标,粗蛋白含量作为纵坐标在二元坐标系下做 4 个菌

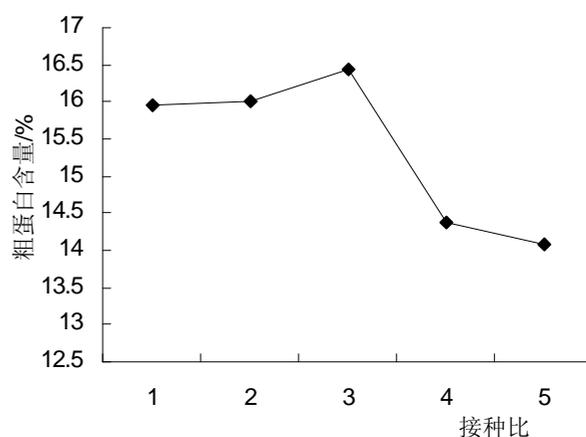


图3 不同比例葡萄汁酵母 1445 与米曲霉产生粗蛋白含量

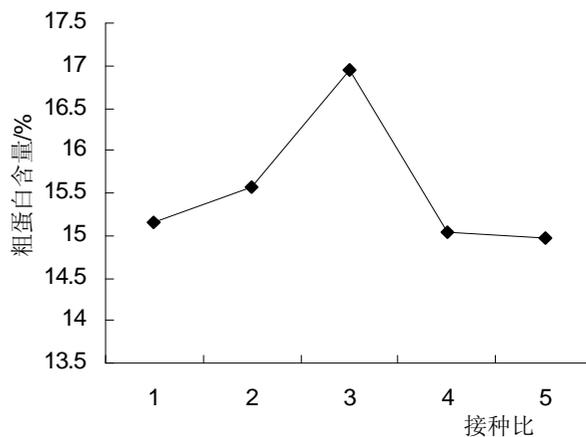


图4 不同比例A组菌株与B组菌株产生粗蛋白含量

种的接种混合比试验。结果如图4所示。可知在比值为1时有最高的粗蛋白含量,即较佳接种混合比为地衣芽孢杆菌 10181:黑曲霉:葡萄汁酵母 1445:米曲霉=1:1:1:1。

3 结论与讨论

通过平板点种试验,选用黑曲霉为指示菌,又根据

刺激圈试验以及三角瓶培养,获得了油茶桔饼发酵产高蛋白的最优菌种组合:黑曲霉、地衣芽孢杆菌10181、葡萄汁酵母1445、米曲霉。发酵比例为地衣芽孢杆菌10181:黑曲霉:葡萄汁酵母1445:米曲霉=1:1:1:1时为最优接种比例。发酵生成的粗蛋白含量为16.94%,较未发酵时的10.82%提高了56.56%,从而达到提高产品的粗蛋白含量的目的。

油茶桔饼通过多菌种的协同发酵较单一菌种发酵,蛋白含量大幅度提高,达16.94%。但该发酵产品,未达到畜禽等饲料的蛋白含量要求,只能作为一种饲料辅剂使用。因此,如何优化菌株及发酵工艺来提高油茶桔饼蛋白含量,使其以成为一种高蛋白饲料原料是下一步的研究重点。

参考文献

- [1] 聂海瑜.油茶籽的综合利用[J].粮油加工,2004(6):39-41.
- [2] 庄瑞林.中国油茶[M].北京:中国林业出版社,1988.
- [3] 钟海雁,谢碧霞.我国油茶加工利用研究现状及方向[J].林业科技开发,2001,15(4):6-8.
- [4] 钟海雁,谢碧霞,王承南.茶油加工研究进展[J].经济林研究,1999(1):44-47
- [5] 陈永忠,王德斌.油茶综合利用浅析[J].湖南林业科技,1997,24(4):15-19.
- [6] 伍晓春,熊筱娟,陈武.油茶饼粕中植物蛋白的提取分析[J].宜春学院学报,2008,30(4):29-30.
- [7] 曾馥平,谭云峰,黄瑞林.油茶籽粕有机脱毒及作猪饲料的有机价值[J].资源开发与保护,1993,9(3):108-109.
- [8] 聂长明,周莹.油茶饼粕的综合利用研究[J].经济林研究,1997,15(1):53-56.
- [9] 邓桂兰.油茶饼粕制备SCP菌种筛选发酵工艺条件研究[J].广西轻工业,2008,24(5):6-8.
- [10] 邓桂兰,魏强华.利用茶粕生产菌体蛋白饲料的研究[J].粮食与食品工业,2008(3):31-33.
- [11] 邓桂兰.混合菌发酵油茶粕生产菌体蛋白饲料的研究[J].粮食与饲料工业,2008(6):29-31.
- [12] 邓桂兰.油茶饼粕发酵条件的研究[J].现代食品科技,2008,24(4):363-365.
- [13] 钟海雁,王承南,黄健屏.油茶桔饼固态发酵技术的研究[J].中南林学院学报,2001,21(1):21-25.
- [14] 王金斌,马海乐,段玉清.豆粕固态发酵生产优质高蛋白饲料的菌种筛选试验[J].安徽农业科学,2008,36(19):8112-8114.
- [15] 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):32-33.
- [16] 殷钟意,王颖,郑旭煦,等.柑桔皮渣发酵高蛋白饲料菌种筛选与工艺研究[J].饲料研究,2009(4):43-46.