

张婷婷, 马 磊. 菌渣固态发酵菌体蛋白饲料的工艺优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 270–272.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.076

# 菌渣固态发酵菌体蛋白饲料的工艺优化

张婷婷, 马 磊

(石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832000)

**摘要:**为了综合利用菌渣废弃物, 采用酵母菌协同固态发酵技术, 探究将食用菌多糖提取废渣转化为蛋白饲料的工艺条件。从不同基质、温度、水料比、发酵时间 4 个方面, 分析影响固态发酵菌渣转化蛋白的因素, 并通过正交试验优化菌渣固态发酵工艺。结果表明, 影响蛋白质含量的主次因素依次为基质配比 > 发酵时间 > 温度 > 水料比; 在酵母菌接种量 13% 条件下, 菌渣与麸皮的适宜质量比 8 : 2、水料比 1 mL : 2.5 g、30 ℃ 下培养 96 h, 此时发酵物的粗蛋白含量可达峰值 18.43%。本研究将废弃菌渣转化高蛋白的方法, 可促进菌渣的再利用, 为高效资源循环使用奠定基础。

**关键词:**菌渣, 固态发酵, 蛋白饲料, 正交设计

**中图分类号:** S816.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0270-02

菌渣废弃物一般富含水分、易腐烂、不易保存, 直接排放污染环境。随着经济的快速发展和人们生活水平日益提高, 畜牧产品需求增大, 致使饲料缺口逐年增加, 出现了供求关系难以平衡的局面<sup>[1]</sup>。因而, 寻求新蛋白源成为饲料科学中的一项重要课题<sup>[2]</sup>。目前, 运用微生物发酵生产蛋白饲料越来越受重视<sup>[3-4]</sup>。本研究探讨不同基质配比、不同温度、不同水料比以及不同培养时间对酵母菌发酵蛋白质含量的影响, 并在单因素试验的基础上, 采用正交试验法对菌渣固态发酵菌体蛋白饲料的工艺进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酵母菌、提取金顶侧耳菌菇多糖后残留菌渣、麸皮、马铃薯浸取液、葡萄糖、琼脂粉、玉米粉、浓硫酸、硫酸钾、硫酸铜、40 % NaOH 溶液、HCl 溶液、混合滴指示剂(0.1% 甲烯蓝 : 0.1% 甲基红 = 1 : 4)。

### 1.2 方法

**1.2.1 基础培养基的制备** 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 自制马铃薯浸取液 1.0 L, 加入琼脂粉 15.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 121 ℃ 灭菌 25 min 后, 取出斜面放置, 冷却备用。

固态发酵培养基: 分别以菌渣、菌渣 + 麸皮、菌渣 + 玉米粉为培养基基质, 添加一定量的水分, 配制成用于考察水料质量比(简称水料比)、发酵温度、发酵时间对发酵产物蛋白含量影响的不同培养基, 于 121 ℃ 灭菌 25 min。

**1.2.2 菌种的活化** 在无菌条件下, 将酵母菌种接种到 PDA 斜面培养基上, 放置恒温箱内, 在 30 ℃ 下恒温培养, 活化 72 h, 得到优质菌种。

收稿日期: 2016-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31272416, 31560310); 石河子大学青年教师与名师结对培养计划(编号: SDJDZ201504)。

作者简介: 张婷婷(1984—), 女, 新疆石河子人, 硕士, 讲师, 主要从事微生物生态研究。E-mail: 120978935@qq.com。

通信作者: 马 磊, 博士, 副教授, 主要从事生物信息学与分子遗传研究。E-mail: mlel@shzu.edu.cn。

**1.2.3 液体种子培养** 在无菌条件下, 用 10 mL 无菌水冲洗斜面培养基上已活化的菌种, 接种至盛有 80 mL 液体种子培养基的三角烧瓶中, 置于摇床中, 在 30 ℃、160 r/min 的条件下振荡培养 72 h。

**1.2.4 固体发酵培养** 在无菌条件下, 将酵母菌以 13% 的接种量接种到已灭菌的固体发酵培养基中, 置于 25~40 ℃ 恒温箱中培养 72 h。待培养结束后, 将培养物置于 50 ℃ 烘箱中烘干, 测粗蛋白质含量。基础对照为未发酵样品, 将试验所用的金顶侧耳菌菇多糖提取后的残渣在 50 ℃ 条件下烘干, 随机称取 0.2 g 未经酵母菌发酵样品, 测定其蛋白质含量。

**1.2.5 粗蛋白质含量的测定** 采用微量凯氏定氮法测定粗蛋白质含量。将发酵好的培养基烘干至恒质量, 称取 0.2 g 烘干后的培养基, 放入干燥的消化管中, 再加入 0.4 g 的混合催化剂后, 加入 20 mL 的浓硫酸。待消化管中液体冷却后, 加入蒸馏水 20 mL, 进行蒸馏, 在接收瓶中加入 2% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50 mL 和 2~3 滴指示剂, 用 0.05 mol/L HCl 滴定接收瓶内的溶液, 滴定溶液由绿色变成淡紫色或灰色时为滴定终点, 记下消耗 HCl 的体积(mL), 计算粗蛋白质含量。

**1.2.6 正交试验设计** 在单因素试验的基础上, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验法对基质配比、温度、水料比以及培养时间这 4 个影响因素进行优化, 每组试验重复 3 次, 正交试验因素水平见表 1。

表 1 正交因素水平表

因素	A: 菌渣 : 麸皮 (g : g)	B: 水料比 (mL : g)	C: 温度 (℃)	D: 发酵时间 (h)
1	10 : 0	1 : 2.0	30	48
2	9 : 1	1 : 2.5	35	72
3	8 : 2	1 : 3.0	40	96

## 2 结果与分析

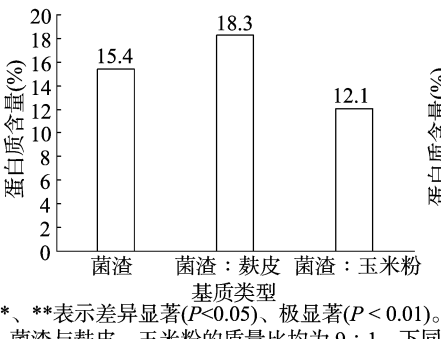
本研究探讨了不同基质配比、不同温度、不同水料比以及不同培养时间对酵母菌发酵蛋白质含量的影响, 并在单因素试验的基础上, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验法对基质配比、温度、水料比以及培养时间 4 个因素进行优化。

2.1 不同基质配比对粗蛋白含量的影响

由图 1 可知,优化后的蛋白含量显著高于未发酵样品的蛋白含量(7.8%)。在 1 mL : 2.5 g 的水料比、13% 接种量、30 ℃ 培养 96 h 条件下,不同基质配比所获蛋白质含量呈现显著差异。当菌渣与麸皮以质量比 9 : 1 的比例混合时,粗蛋白质含量可达最高值(18.3%),与纯菌渣组和质量比 9 : 1 菌渣玉米粉组呈现显著差异。这可能是因为培养基的发酵体系中,麸皮含有较丰富的营养组分,其所含糖分、蛋白质、维生素和矿物质等都是菌种发酵所必需的物质。因此,添加麸皮有利于菌体生长。同时,麸皮质地粗糙,能增强物料通透性,促进菌生长。添加玉米粉的培养基,粗蛋白质含量增加不明显,仅为 12.1%,这可能是由于玉米粉颗粒较细,易使培养基黏性大、结块、通透性差,从而不利于菌体生长。

2.2 不同温度对粗蛋白含量的影响

图 2 显示,在 1 mL : 2.5 g 的水料比、13% 接种量、菌渣和麸皮质量比 9 : 1、培养 96 h 的条件下,不同温度下所获蛋白



\*、\*\*表示差异显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ )。菌渣与麸皮、玉米粉的质量比均为 9 : 1。下同

图1 不同基质配比对粗蛋白含量的影响

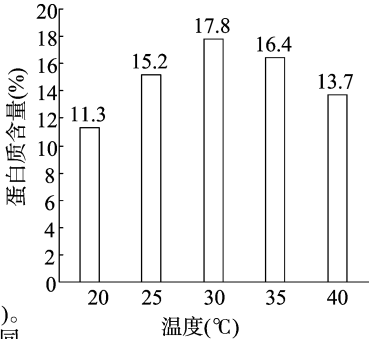


图2 不同温度对粗蛋白含量的影响

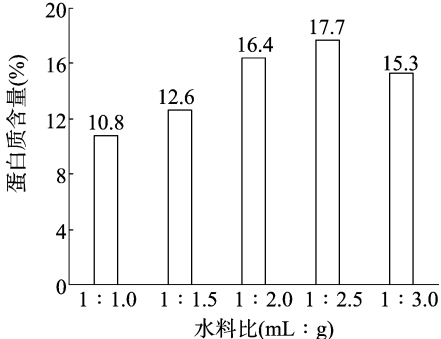


图3 不同水料比对粗蛋白含量的影响

2.4 不同发酵时间对粗蛋白含量的影响

由图 4 可知,在 1 mL : 2.5 g 的水料比、菌渣和麸皮质量比 9 : 1、13% 接种量、30 ℃ 培养条件下,不同发酵时间下蛋白质含量呈现显著差异。发酵初始,粗蛋白含量随时间增加而增长,当发酵 96 h 时粗蛋白含量高达 17.6%;随着发酵时间延长至 120 h,蛋白质含量降低至 15.7%。由此可见,当发酵 24 h 时,菌体没有达到完全生长,随着时间的延续,菌体逐渐成熟。在发酵 96 h 时,菌体生长最佳。发酵 120 h 后,菌体有可能已经完成了生长周期,表现出衰退或死亡的现象,并引起菌体的自溶现象,从而降低粗蛋白含量。

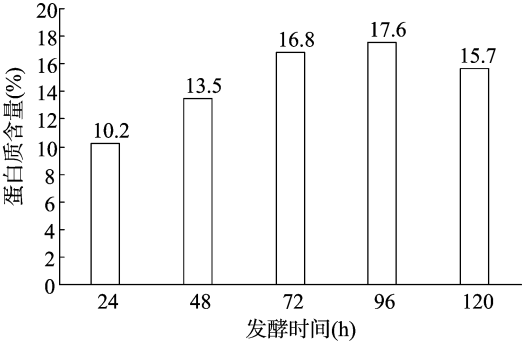


图4 不同发酵时间对粗蛋白含量的影响

2.5 固态发酵条件的正交优化

在单因素试验的基础上,采用  $L_9(3^4)$  正交试验法对基质配比、温度、水料比以及培养时间这 4 个影响因素进行优化,

质含量呈显著差异。蛋白质含量随温度升高而增加,当温度为 30 ℃ 时,蛋白质含量达最高值,30 ℃ 也是酵母菌体较为适宜的生长温度。当温度升至 35 ℃ 时,蛋白质含量开始随温度升高而降低,这可能是由于温度过高,加快了发酵物的水分蒸发,造成了不利于菌体生长的环境,从而降低蛋白质含量。

2.3 不同水料比对粗蛋白含量的影响

菌体的生长需要适宜的水分,固态发酵物料中的含水量是影响蛋白质产量的重要因素之一。由图 3 可知,在菌渣和麸皮质量比 9 : 1、13% 接种量、30 ℃ 培养 96 h 条件下,不同水料比会使蛋白质含量呈显著现差异。水料比为 1 mL : 1.0 g 时,粗蛋白含量最低,仅有 10.8%;当水料比为 1 mL : 2.5 g 时,粗蛋白质含量高达 17.7%;当水料比为 1 mL : 3.0 g 时,粗蛋白量降低至 15.3%。基质水分过多,培养基易黏结,多孔性降低,通透性削弱,基质易变质,杂菌易污染;含水量过低,则会降低培养基的膨胀程度,妨碍菌体利用基质营养,从而而影响菌体生长,导致菌体生长不完全,蛋白质含量低。

结果见表 2。极差分析结果显示,影响粗蛋白含量影响因素主次顺序分别为基质配比 > 发酵时间 > 温度 > 水料比;方差分析结果也显示,基质配比是影响粗蛋白含量的主要因素。固体发酵菌渣蛋白饲料工艺中的最优组合为  $A_3B_2C_1D_3$ ,即在酵母菌接种量 13% 条件下,菌渣 : 麸皮质量比为 8 : 2、水料比 1 mL : 2.5 g、30 ℃ 下培养 96 h,发酵物的粗蛋白含量可达 18.43%。

表 2 发酵工艺正交试验结果

序号	A	B	C	D	粗蛋白质含量(%)
1	1	1	1	1	14.37
2	1	2	2	2	14.72
3	1	3	3	3	15.59
4	2	1	2	3	16.83
5	2	2	3	1	15.64
6	2	3	1	2	15.77
7	3	1	3	2	15.49
8	3	2	1	3	18.49
9	3	3	2	1	16.47
$k_1$	14.89	15.56	16.21	15.49	
$k_2$	16.08	16.28	16.01	15.32	
$k_3$	16.81	15.94	15.57	16.97	
$R$	1.92	0.72	0.64	1.64	

3 结论与讨论

本研究分析了固态发酵菌体蛋白饲料的生产工艺,研究各因素对蛋白质含量影响的主次顺序,并通过正交试验优化

吴磊, 司传领, 陈铭, 等. 荷叶总黄酮对  $H_2O_2$  诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 272–275.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.077

# 荷叶总黄酮对 $H_2O_2$ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

吴磊<sup>1,2</sup>, 司传领<sup>1</sup>, 陈铭<sup>2</sup>, 薛琪<sup>2</sup>, 罗海青<sup>2</sup>, 朱翠玲<sup>2</sup>, 胡卫成<sup>2</sup>, 王毓宁<sup>3</sup>

(1. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457; 2. 淮阴师范学院江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300;

3. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:**为了探讨荷叶总黄酮对  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及机制, 建立以  $H_2O_2$  诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)为氧化应激损伤模型, 通过四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测正常细胞的存活率与损伤程度, 用试剂盒测定不同浓度荷叶总黄酮对  $H_2O_2$  刺激 PC12 细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力、丙二醛(MDA)、蛋白质羰基含量的影响并检测 Caspase-3 活力的变化; Real Time PCR 检测胞浆内 Bcl-2 与 Bax 的基因 mRNA 的表达。结果表明荷叶总黄酮能显著提高  $H_2O_2$  损伤的 PC12 细胞存活率, 显著减少  $H_2O_2$  刺激的 PC12 细胞中 MDA 与蛋白质羰基的生成, 显著提高 CAT 活性, 但对提高 SOD 活性不显著。PC12 细胞损伤可增加凋亡相关蛋白 Bax mRNA 的表达, 加入荷叶总黄酮后有降低作用; 同时  $H_2O_2$  使 Bcl-2 mRNA 的表达降低, 加入荷叶总黄酮后有提高作用。荷叶总黄酮在给药浓度较低的情况下, 对  $H_2O_2$  损伤的 PC12 细胞发挥着明显的保护作用, 其作用机制可能与抑制线粒体途径的细胞凋亡有关。

**关键词:**荷叶总黄酮; 氧化应激; 过氧化氢( $H_2O_2$ ); PC12 细胞; Caspase-3 活力

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0272-04

神经系统疾病(阿尔茨海默病、帕金森病和中风)的病理机制大多是由于氧化应激损伤神经元细胞造成的<sup>[1]</sup>。众所周知, 生物体在维持生命活动时, 会产生必要的氧自由基, 但是过量的氧自由基在体内堆积往往会造成脂质过氧化、蛋白质和 DNA 的氧化, 以及防御系统如 SOD、CAT 和 GPX 等变化, 这就会加速细胞的损伤或死亡。由于脑神经细胞膜通透性较高且富含多种不饱和脂肪酸, 其氧化速率极高, 最终就会引起其抗氧化能力差, 因此脑组织更易遭受自由基的损伤。

收稿日期: 2015-09-17

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(14)4060]。

作者简介: 吴磊(1985—), 男, 山东济宁人, 博士, 主要从事植物活性成分的研究。E-mail: wulei858196@163.com。

通信作者: 王毓宁, 硕士, 副研究员, 主要从事果蔬保鲜与加工技术研究。E-mail: wyn705@163.com。

菌渣固态发酵菌体蛋白饲料工艺。试验结果表明, 影响蛋白质含量的主次因素依次为基质配比、发酵时间、温度、水料比。在酵母菌接种量 13% 条件下, 菌渣: 麸皮质量比为 8:2、水料比 1 mL:2.5 g、30℃ 下培养 96 h, 发酵物的粗蛋白含量可达峰值(18.43%)。

本试验所用菌渣是金顶侧耳菌菇多糖提取后的废料, 具有一定水分, 易腐烂发臭, 不易保存, 如果直接排放会造成环境污染。菌渣含有比较丰富的营养物质<sup>[5]</sup>。试验前测得未经固体发酵的菌渣粗蛋白质含量约为 7.8%, 条件优化后蛋白含量升高到 18.43%。因而, 以菌渣作为发酵的主料, 再添加一些辅料, 采用酵母菌协同固态发酵技术, 可将菌残渣转化为蛋白含量较高的饲料, 能大幅提高饲料的营养价值, 从而建

寻找具有抗氧化应激作用的天然药物对于治疗神经系统疾病具有重要的临床意义<sup>[2-4]</sup>。目前神经元细胞模型的建立大多采用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)损伤模型, 这是因为 PC12 细胞无论在形态、结构和功能上, 都具有与神经元细胞相似的诸多特征, 且能与原代培养的神细胞说明一致的问题<sup>[5]</sup>。

荷叶为睡莲科多年生水生草本植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的叶子。之前的研究表明, 荷叶在食用和药用两方面都具有较广泛的应用, 尤其作为一种减肥茶深受人们的喜爱, 荷叶含有的黄酮类化合物为其主要的有效成分。荷叶总黄酮在生命现象中参与多种细胞活动, 对其研究多集中在荷叶黄酮具有降脂减肥、抗自由基、抗氧化、抑菌、抗病毒、抗衰老等多种生理活性上<sup>[6-10]</sup>, 对其神经系统的保护作用未见报道。本研究以  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞为模型, 研究荷叶总黄酮对 PC12 细胞抗凋亡效果, 探讨荷叶总黄酮在氧化损伤相

立高效的资源循环再利用系统。

## 参考文献:

- [1] 孔平涛. 我国饲料蛋白原料现状与发展需求[J]. 饲料广角, 2003, 23(18): 15–18.
- [2] 李志香, 王一鸣. 废菌渣开发饲料蛋白质替代源的菌种筛选与多菌共同发酵[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(4): 19–22.
- [3] 王淑军, 吕明生, 王永坤. 混菌发酵提高甘薯渣饲用价值的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 40–45.
- [4] 赵凤敏, 李树君, 方宪法, 等. 中心组合设计法优化马铃薯渣固态发酵工艺[J]. 农业机械学报, 2006, 37(8): 45–48.
- [5] 马纯艳, 王升厚. 菌糠单细胞蛋白饲料生产技术的研[J]. 食用菌, 2005, 27(3): 56–58.