

高密度固态培养产阮假丝酵母菌剂的工艺优化

Process optimization of high-density *Candida utilis* feed yeasts by solid state fermentation

徐 速¹ 孙立斌¹ 杨海明¹ 孙 慧² 江连洲¹

XU Su¹ SUN Li-bin¹ YANG Hai-ming¹ SUN Hui² JIANG Lian-zhou¹

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省轻工科学研究院, 黑龙江 哈尔滨 150010)

(1. Food College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2. Heilongjiang Province Light Industry Science Research Institute, Harbin, Heilongjiang 150010, China)

摘要:利用粮油副产物豆粕、稻壳和秸秆混合固态发酵制备饲料级酵母益生菌剂,采用正交试验确定培养基最佳配比,中心组合试验及响应面分析法建立最优发酵条件试验模型。结果表明:豆粕:秸秆:稻壳=5:2:2,40 g 原料添加葡萄糖 4 g、硫酸铵 0.2 g 和 1 倍微量元素组合,接种量 3.5%,原料厚度 1.3 cm,水分添加量:原料=1:1(*m:m*),温度 30.6 °C,发酵时间 28 h,酵母菌活菌数可达 $(2.92 \pm 0.05) \times 10^9$ CFU/g。

关键词: 秸秆; 稻壳; 固态发酵; 产阮假丝酵母; 活菌计数

Abstract: Probiotic feed yeasts were made from the raw materials of defatted soy meal, rice hull and corn straw by solid state fermentation. The culture medium ingredients were optimized by the orthogonal experiment. The model of fermentative condition was developed by the simplex-centroid mixture design and analyzed by the response surface analysis. The results were as follows: defatted soy meal: rice hull: corn straw was in the ratio 5:2:2. Forty grams of the raw materials were added with 4 grams of glucose, 0.2 grams of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 1 $\times$ mono-microelement combination. The inoculum volume was 3.5%. The culture thickness was 1.3 cm. The ratio of water addition to raw materials was 1:1(*m/m*). The fermentation temperature was 30.6 °C and the fermentation period was 28 h. Under the above conditions, living yeast cells was obtained at $(2.92 \pm 0.05) \times 10^9$ CFU/g.

Keywords: rice hull; corn straw; state fermentation; *Candida utilis*; living yeast count

益生菌是指有益于宿主健康的微生物活菌制剂^[1]。随着抗生素滥用和残留问题的出现,益生菌剂的研究受到学术

界广泛关注。已有众多实例证明,益生菌能刺激宿主肠道内有益菌群平衡,抑制肠道中腐败菌生长^[2],促进肠道中有害物质的降解与转化,调节宿主免疫力,增加抗病能力^[3,4],从而提高动物的生产能力和增加养殖动物的经济效益。

产阮假丝酵母是被广泛公认的畜禽动物益生菌,早在 1989 年就被美国 FDA(美国食品和药品管理局)和 AAF-CC(美国饲料官方协会)批准为可直接饲喂动物的安全菌株,2008 年中国农业部也将列入允许饲喂的菌种目录^[1]。酵母发酵饲料含有丰富的蛋白、小肽及氨基酸,增加饲料的营养价值^[4];产阮假丝酵母菌体所含蛋白质和维生素 B 含量均较高,且生长所需营养物质更简单、可利用许多工农业副产物做原料生长繁殖^[5,6],菌体代谢后常常散发出宜人的香气,可增加动物摄食欲望、提高生产能力。

中国每年加工大米、豆油、玉米后剩余大量副产物稻壳、豆粕、秸秆等,其中豆粕常用作替代玉米直接饲喂动物,原料利用率较低^[6];而秸秆、稻壳常常被农民废弃或焚烧,浪费资源污染环境。J. Y. Choi 等^[4]研究了液态发酵益生菌剂和固态发酵益生菌剂对断奶仔猪的影响,发现在提高生产性能和肠道有益微生物菌群、降低肠道有害微生物菌群方面,固态发酵优于液态发酵。固态发酵所制益生菌更利于益生菌的保存和活性的稳定,实际应用价值则更大。目前中国因生产麸皮的企业均在河南、河北、山东、山西等地,故在东北地区利用麸皮生产饲料酵母成本较高,而以秸秆稻壳替代麸皮固态发酵制备酵母菌还未见报道。本研究拟通过正交试验、中心组合试验设计及响应面分析法优化培养条件及培养基成分,为豆粕秸秆稻壳混合制备酵母益生菌剂提供基础数据。同时,也对解决人畜争粮矛盾、减少环境污染、改善农业生态环境具有重要意义。

基金项目: 2013 年黑龙江省科技攻关项目(编号:Gc13B409)

作者简介: 徐速(1968—),女,东北农业大学教授级高级工程师,博士。E-mail:success3320@sina.com

通讯作者: 江连洲

收稿日期: 2014-12-30

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

产阮假丝酵母 2.118:黑龙江省应用微生物研究所菌种保藏中心;

酵母种子培养基: PDA 液体培养基,121 ℃灭菌 20 min;
酵母菌种子液:将已活化的酵母菌斜面菌体一菌环接入 PDA 液体种子培养基,30 ℃摇床 180 r/min 培养 16 h;

1.2 材料

稻壳、豆粕:购自饲料市场,豆粕粉碎过 40 目备用;
秸秆:取自哈市农户自然干燥贮存,粉碎平均长度 1~3 mm。

1.3 试剂与仪器

NaNO₃、K₂HPO₄、KCl、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄:分析纯,天津天力化学有限公司;

粉碎机:HR2168 型,珠海飞利浦家庭电器有限公司;
恒温水浴锅:DK-98-1 型,天津泰斯特仪器有限公司;
生化培养箱:LRH-250 型,上海一恒科技有限公司;
大容量恒温振荡器:TDHZ-2002B 型,太仓市华美生化仪器厂;

超净工作台:ZHJH-1109 型,深圳市朗普电子科技有限公司;

高压灭菌锅:XYRX-20 型,浙江新丰医疗器械有限公司;

电热干燥箱:DHG-9240A 型,上海精宏实验设备有限公司;

真空干燥箱:DZF6090 型,上海精宏实验设备有限公司。

1.4 方法

1.4.1 微量元素溶液的制备

(1) 1×微量元素溶液(*m/V*):准确称取分析纯 NaNO₃ 0.6 g、K₂HPO₄ 0.2 g、KCl 0.1 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、FeSO₄ 0.002 g,分别用少量蒸馏水溶解、合并后定容至 100 mL,即得 NaNO₃ 0.6%、K₂HPO₄ 0.2%、KCl 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.1%、FeSO₄ 0.002%的 1×微量元素溶液,备用。

(2) 2×微量元素溶液(*m/V*):NaNO₃ 1.2%、K₂HPO₄ 0.4%、KCl 0.2%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、FeSO₄ 0.004%;
3×微量元素溶液(*m/V*):NaNO₃ 1.8%、K₂HPO₄ 0.6%、KCl 0.3%、MgSO₄·7H₂O 0.3%、FeSO₄ 0.006%。制备方法同 1.4.1(1)。

1.4.2 秸秆添加量对酵母菌生长的影响 固定每份原料总量 40 g,分别将豆粕:稻壳:秸秆按 5:2:1,5:2:2,5:2:3,5:2:4,5:2:5 比例混匀,再分别向每份原料添加 50 mL 水及 1×微量元素溶液,葡萄糖 1 g,在容器中混匀封口,121 ℃灭菌 15 min,冷却,接种,铺成 2 cm 厚度,30 ℃培

养 24 h,取样,用血球计数器测定酵母菌数。每个样品重复 3 次取平均值。

1.4.3 稻壳添加比例对菌体数目的影响 固定每份原料总量 40 g,分别将豆粕:秸秆:稻壳按 5:2:1,5:2:2,5:2:3,5:2:4,5:2:5 比例混匀,再分别向每份原料添加 50 mL 水及 1×微量元素溶液,1 g 葡萄糖,在容器中混匀封口,余下步骤同 1.4.2。

1.4.4 碳源对酵母菌生长的影响 取原料豆粕、秸秆和稻壳按 5:2:2 混匀,每份 40 g,依次加入葡萄糖 1,2,3,4,5 g,再分别向每份原料添加 50 mL 水及 1×微量元素溶液,混匀,余下步骤同 1.4.2。

1.4.5 氮源对酵母菌生长的影响 取原料豆粕、秸秆和稻壳按 5:2:2 混匀,每份 40 g,向每份原料中依次加入硫酸铵 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 g,或尿素 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 g;再分别向每份原料加入 50 mL 水及 1×微量元素溶液,1 g 葡萄糖,余下步骤同 1.4.2。

1.4.6 固态培养产阮假丝酵母活菌剂的生长曲线 取原料豆粕、秸秆和稻壳按 5:2:2 混匀,每份 40 g,分别向每份原料加入 50 mL 水及 1×微量元素,在容器中混匀封口,121 ℃灭菌 15 min,接种,铺成 2 cm 厚度,30 ℃培养 12 h 后每隔 2 h 取样,用血球计数器测定酵母菌数。每个样品重复 3 次取平均值。

1.4.7 正交试验确定最佳培养基成分 在碳源、氮源单因素试验基础上,对培养基成分中影响酵母菌生长数量的因素葡萄糖、硫酸铵、微量元素营养液添加倍数进行三因素三水平正交试验,以确定最佳培养基成分配比。

1.4.8 中心组合试验设计优化酵母菌固体培养条件 利用 Design-Expert 7.0 软件,采用中心组合设计试验方案建立关于接种量、固体培养基厚度、水分添加量和培养温度四因素变量的二次回归模型,以确定最佳培养条件,试验设计因素水平见表 1。选取接种量、厚度、水分添加量和发酵温度 4 个因素为自变量,以酵母菌的菌数为响应值,以前期单因素试验最佳结果为中心点,根据中心组合设计原理设计试验。取 5 种水平自变量编码,中心点试验重复试验数为 6,试验重复 3 次取平均值,每组试验原料用量 40 g。

表 1 中心组合试验设计因素水平编码表

Table 1 Levels of independent variables of simplex-centroid design

编码	A 接种量/%	B 厚度/cm	C 水分/mL	D 温度/℃
-2	1	0.5	20	22
-1	2	1.0	30	26
0	3	1.5	40	30
1	4	2.0	50	34
2	5	2.5	60	38

1.4.9 酵母菌剂的干制 将最佳培养的酵母菌剂 40 ℃ 真空干燥 8 h 或常压 45 ℃ 干燥 24 h 后,平板计数测定酵母菌活菌数。重复 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 秸秆添加比例对酵母菌生长的影响

在实际操作中,豆粕灭菌后黏度增大,容易结块,不利于氧气的传质。秸秆主要含纤维素、半纤维素、木质素等不易被酵母菌利用的成分,基质中添加适当比例的秸秆既起到机械支撑作用,又可增加培养基通透性和通气量,利于氧气的流通和酵母的增殖。由图 1 可知,虽然随着原料中秸秆比例的增加,酵母菌活菌数呈现下降趋势,但当秸秆比例从 1/8 增加到 4/11 时,酵母菌对数值从 8.4 降到 8.1,活菌数从 $2.6\times 10^8\text{ g}^{-1}$ 降低到 $1.4\times 10^8\text{ g}^{-1}$,仍保持在同一数量级,说明秸秆比例增加对酵母活菌数下降并不成正比,其影响趋势较平缓。结合原料成本与活菌数量综合考虑,选择豆粕:稻壳:秸秆=5:2:2 较适宜。

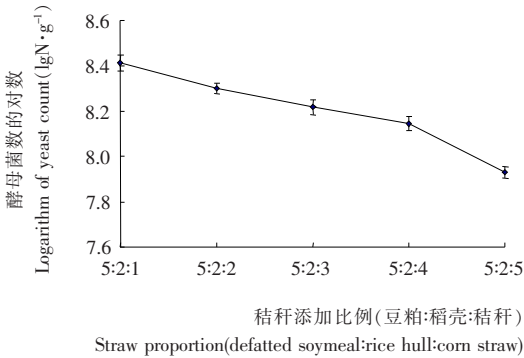


图 1 秸秆添加量对酵母菌生长的影响

Figure 1 Effects of corn straw on the growth of yeast

2.2 稻壳添加比例对菌种的影响

据资料^[7]报道,稻壳含有大量纤维素、木质素、二氧化硅及少量的蛋白质和钙磷元素,如不经处理,应用于饲料将影响动物的消化吸收率。虽然稻壳可利用的营养成分较贫乏,但试验中发现稻壳具有良好的多孔性和吸水性,可作为固态发酵营养物质良好的载体,为固态发酵培养基提供良好的通气性和保湿性。同时试验中还观察到,培养结束时培养基表面湿度增大,分析可能是通过酵母菌的生长代谢产生了水分,增加了湿度所致。推测这将软化稻壳中纤维素等成分,释放更多的可溶性物质,增加培养基中菌体数目,从而增加菌体蛋白含量。由图 2 可知,随着稻壳添加量的增大,酵母菌的生长数量呈现先增加、后降低、然后趋于平稳的走势,即添加比例(豆粕:秸秆:稻壳)从 5:2:1 至 5:2:2 时,酵母菌对数从 8.37 增加到 8.47,酵母菌数量从 $2.3\times 10^8\text{ g}^{-1}$ 增加至 $3\times 10^8\text{ g}^{-1}$;当增至 5:2:3 以上时,酵母菌对数在 8.25~8.33,酵母数保持在 $1.8\times 10^8\sim 2.15\times 10^8\text{ g}^{-1}$ 。综合考虑,选择豆粕:稻壳:秸秆=5:2:2 较为适宜。

2.3 碳源对酵母菌生长的影响

葡萄糖是酵母菌可以直接利用的碳源,在酵母生长代谢中既作为酵母菌细胞骨架,又作为代谢的能源物质。随着市场上淀粉糖生产技术的提高,葡萄糖价格不断下降,可作为酵母菌生长的辅助碳源。由图 3 可知,在原料比例一定的条件下,起初酵母菌的数量随着葡萄糖量的增加而增加,当葡萄糖增加到 4 g 时,酵母菌生长数量达到最高,葡萄糖的添加量继续增高时,酵母菌数量开始下降。推测可能是随着葡萄糖添加量增加,酵母菌生长外环境碳源浓度的增大,导致酵母菌生长的外环境产生更高的渗透压,影响酵母菌细胞代谢的进行,致使酵母菌生长速率减缓,数量下降。因此,选择添加葡萄糖 4 g。

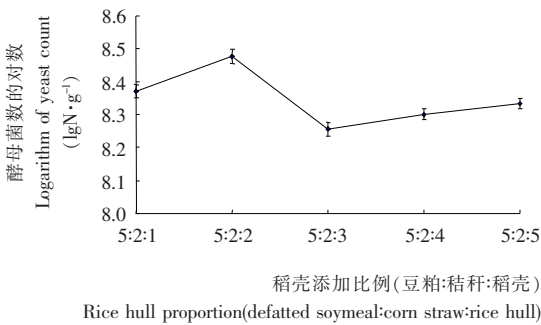


图 2 稻壳添加量对酵母菌生长的影响

Figure 2 Effects of rice hull on the growth of yeast

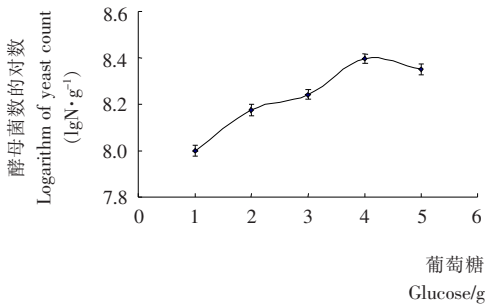


图 3 葡萄糖对酵母菌生长的影响

Figure 3 Effects of glucose on the growth of yeast

2.4 氮源对酵母菌生长的影响

尿素、硫酸铵、蛋白胨是常用的氮源,因蛋白胨的价格较高,而本试验的目的是通过最小的花费获得最大的酵母菌数量,所以选用尿素和硫酸铵做外加的氮源。由图 4 可知,添加硫酸铵的效果为先扬后平,最佳添加量为 0.4 g,酵母菌最大数量 $4.25\times 10^8\text{ g}^{-1}$ 。而添加尿素的效果为先扬后抑,最佳添加量为 0.8 g,酵母菌最大数量 $4.0\times 10^8\text{ g}^{-1}$ 。目前市场上尿素的价格远高于硫酸铵价格,且尿素添加量大于硫酸铵用量,不论是从经济角度还是实际效果来看,选择硫酸铵添加量 0.4 g 更适宜。

2.5 固态培养酵母菌剂的生长曲线

由图 5 可知,当取发酵 12 h 样品检测时,酵母菌开始进入

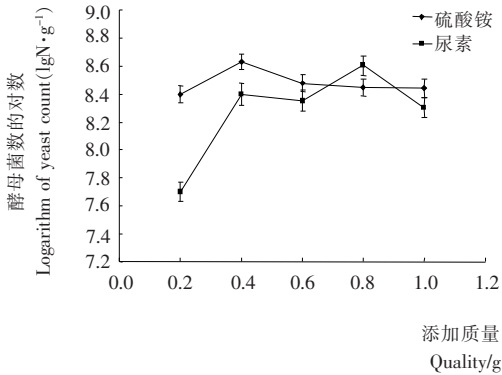


图4 氮源对酵母菌生长的影响

Figure 4 Effects of inorganic nitrogen on the growth of yeast

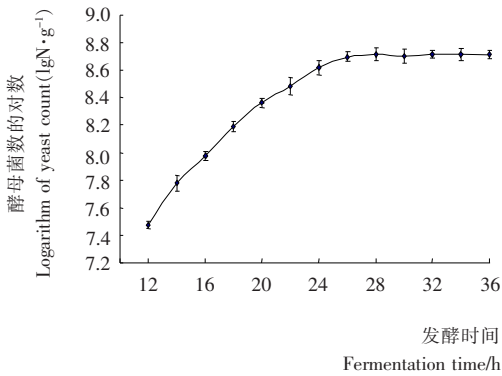


图5 酵母菌固态培养生长曲线

Figure 5 The growth curve of yeast through solid-state ferment

对数生长期。当发酵时间大于 28 h 以后,培养基中的营养成分逐渐消耗,酵母菌的生长达到平稳期。为了生产更多的酵母菌,选择 26~28 h 终止发酵为宜。

2.6 正交试验优化培养基成分结果分析

在单因素试验基础上,通过碳源、氮源和微量元素三因素正交试验进一步优化培养基成分比例,正交试验因素水平取值见表 2,结果见表 3。通过极差分析可知,对酵母菌生长影响因素从大到小依次为葡萄糖>微量元素>硫酸铵。

为了检验直观分析中各因素不同水平差异是否显著,进一步采用 SPSS17.0 对上述影响因素进行单因素方差分析即

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Levels of different variables of orthogonal experiments			
水平	A 葡萄糖/g	B 硫酸铵/g	C 微量元素溶液
1	3	0.2	1×
2	4	0.4	2×
3	5	0.6	3×

表 3 正交试验结果与分析

Table 3 The results and analyses of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	数量/(×10 ⁸ g ⁻¹)
1	1	1	1	3.00±0.16
2	1	2	2	6.50±0.03
3	1	3	3	3.00±0.07
4	2	1	2	6.00±0.13
5	2	2	3	7.00±0.17
6	2	3	1	8.00±0.04
7	3	1	3	2.50±0.13
8	3	2	1	3.00±0.23
9	3	3	2	6.00±0.06
k ₁	4.17	3.83	4.67	
k ₂	7.00	5.50	6.17	
k ₃	3.83	5.67	4.17	
R	3.17	1.84	2.00	

Tukey HSD 多重比较,结果显示葡萄糖水平 1 与水平 3 差异不显著,但二者均与水平 2 差异极显著,硫酸铵和微量元素各水平俩俩之间差异均不显著,故选择葡萄糖添加量 4 g、硫酸铵 0.2 g 和微量元素 1 倍浓度,即 A₂B₁C₁ 为宜。将理论获得的 A₂B₁C₁ 组合重复 3 次实验,酵母菌数平均值(8.10±0.07)×10⁸ g⁻¹,验证了所得组合稳定可靠。

2.7 中心组合试验设计优化酵母菌培养条件

2.7.1 中心组合试验设计及结果分析 按照 1.4.8 进行中心组合试验优化酵母培养条件,结果见表 4。

通过 Design-expert 7.0 对试验数据进行回归数据分析,建立二次回归模型:

$$Y = +12.10 + 0.34A - 0.31B - 0.071C + 0.42D - 0.62AB - 1.13AC + 0.094AD + 0.79BC - 0.13BD + 0.33CD - 0.99A^2 - 1.09B^2 - 1.13C^2 - 1.41D^2 \quad (1)$$

对模型数据进行方差分析,结果见表 5。

由表 5 可知,回归模型的 *F* 值 55.85,“Prob>*F* 值”<0.000 1,说明自变量与响应值的回归关系显著;失拟项的 *F* 值为 2.24、“Prob>*F* 值”0.193 4,说明失拟项与纯误差差异不显著。该模型的决定系数 *R*² 为 0.981 2,调整后的决定系数 *R*_{adj}² 为 0.963 6,变异系数 5.29%。决定系数介于 0 至 1 之间,决定系数越大,说明拟合方程的参考价值越大,模型拟合度越好;变异系数越小表示试验可信度越高^[8]。综上所述,所建模型拟合度良好,可以理论推测因自变量变化而对响应值的影响。

由表 5 中 *F* 值可知,自变量因子贡献率为 D>A>B>C,即培养温度>接种量>厚度>水分添加量,即培养温度对菌种生长的影响最为显著,接种量与厚度次之,水分添加量相对影响较小。模型中自变量之间的交互作用对响应值影响明显的有 AB(接种量与厚度)、AC(接种量与水分)、BC(厚

表 4 中心组合试验设计及结果

Table 4 Simplex-centroid design and response values					
序号	A	B	C	D	酵母菌计数/ ($\times 10^8\text{ g}^{-1}$)
1	0	-2	0	0	8.00 $\pm$ 0.11
2	1	1	1	-1	5.60 $\pm$ 0.16
3	-1	1	1	1	10.00 $\pm$ 0.17
4	-1	1	1	-1	8.60 $\pm$ 0.05
5	0	0	0	0	12.00 $\pm$ 0.10
6	1	1	1	1	7.80 $\pm$ 0.13
7	0	0	0	0	12.40 $\pm$ 0.36
8	0	0	0	0	12.10 $\pm$ 0.10
9	0	0	0	0	11.50 $\pm$ 0.10
10	0	0	0	0	12.30 $\pm$ 0.10
11	0	0	2	0	7.50 $\pm$ 0.04
12	1	1	-1	1	6.50 $\pm$ 0.03
13	-1	-1	1	1	8.20 $\pm$ 0.18
14	-1	-1	-1	-1	6.00 $\pm$ 0.12
15	1	-1	-1	1	11.40 $\pm$ 0.26
16	0	0	0	2	6.90 $\pm$ 0.20
17	-1	-1	1	-1	7.00 $\pm$ 0.17
18	0	0	0	0	12.30 $\pm$ 0.17
19	2	0	0	0	9.00 $\pm$ 0.21
20	0	0	0	-2	6.00 $\pm$ 0.16
21	1	-1	-1	-1	10.10 $\pm$ 0.44
22	-1	1	-1	1	5.60 $\pm$ 0.10
23	-1	-1	-1	1	6.70 $\pm$ 0.15
24	-1	1	-1	-1	5.50 $\pm$ 0.15
25	1	-1	1	1	7.80 $\pm$ 0.18
26	0	0	-2	0	7.60 $\pm$ 0.14
27	0	2	0	0	7.40 $\pm$ 0.04
28	-2	0	0	0	7.20 $\pm$ 0.11
29	1	-1	1	-1	5.80 $\pm$ 0.26
30	1	1	-1	-1	7.10 $\pm$ 0.27

度与水分)、CD(水分与温度),其 3D 响应面交互作用见图 6~9。图 6~9 中的酵母菌数量均随着接种量、厚度、水分、发酵温度呈现不同程度的先增加后降低趋势。固态培养中酵母菌数的增长除了与营养成分相关外,还受氧气、水分、温度、初始菌种数量影响。酵母菌是好氧微生物,增殖需要足够的氧气,培养基厚度过大将影响氧的供应。酵母生长代谢需要一定的水分活度,水分含量越高,水分活度越大,酵母菌越易生长,但过多的水分会粘结固态培养基原料,导致氧气传质受阻,影响酵母菌生长繁殖。酵母菌生长有其最适温度,在最适温度前,随着温度升高,酵母菌生长加快,但当超过最适温度时,则影响到酵母菌自身代谢而呈下降趋势。从图 6~9 可以看出,图中两两因素均存在交互作用,但 A(接种量)与 C(水分)图形最陡,交互作用最明显。

表 5 中心组合试验方差分析表

Table 5 ANOVA for the reduced quadratic mixture models					
来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F
A	2.73	1	2.73	13.87	0.002 0**
B	2.34	1	2.34	11.89	0.003 6**
C	0.12	1	0.12	0.061	0.446 7
D	4.25	1	4.25	21.56	0.000 3**
AB	6.13	1	6.13	31.07	<0.000 1**
AC	20.48	1	20.48	103.85	<0.000 1**
AD	0.14	1	0.14	0.71	0.411 6
BC	10.08	1	10.08	51.13	<0.000 1**
BD	0.28	1	0.28	1.4	0.255 5
CD	1.76	1	1.76	8.9	0.009 3**
A ²	27.14	1	27.14	137.67	<0.000 1**
B ²	32.88	1	32.88	166.74	<0.000 1**
C ²	35.17	1	35.17	178.36	<0.000 1**
D ²	54.32	1	54.32	275.51	<0.000 1**
回归	154.15	14	11.01	55.85	<0.000 1**
残差	2.96	15	0.20		
失拟	2.42	10	0.24	2.24	0.193 4
纯误差	0.54	5	0.11		
总和	157.11	29			

† 决定系数 R^2 为 0.981 2, R^2_{adj} (调整) 为 0.963 6, 变异系数 C.V. % 为 5.29。* *. 差异极显著; *. 差异显著。

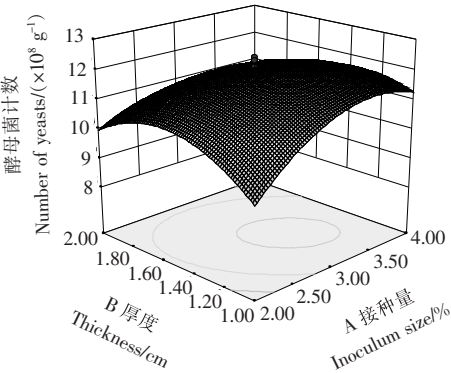


图 6 接种量 A 与厚度 B 交互作用响应面三维图示
Figure 6 Combined effects of inoculum size A and thickness B on yeast count

通过 Design-Expert 7.0 软件优化功能,得到模型的最优工艺参数和预测值:接种量 3.51%,厚度 1.29 cm,水分 36.53 mL,温度 30.58 ℃,酵母菌数理论预测值 $1.227 \times 10^9\text{ g}^{-1}$ 。结合实际情况,最终优化参数为接种量 3.50%,厚度 1.3 cm,水分添加量:原料=1:1($m:m$),温度 30.6 ℃。

2.7.2 验证实验 在最佳培养条件下,重复 5 次固体培养,平板涂布计数酵母菌数量分别为 1.23×10^9 , 1.35×10^9 , 1.10×10^9 , 1.40×10^9 , 1.25×10^9 CFU/g,平均值为 $(1.27 \pm 0.12) \times 10^9$ CFU/g,与模型预测值 1.23×10^9 CFU/g 接近,说明模型拟合性较好,可以用来理论预测培养的酵母活菌数

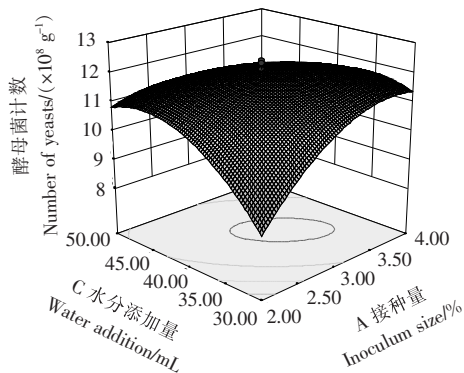


图 7 接种量 A 与水分添加量 C 交互作用响应面三维图示
Figure 7 Combined effects of inoculum size A and water addition C on yeast count

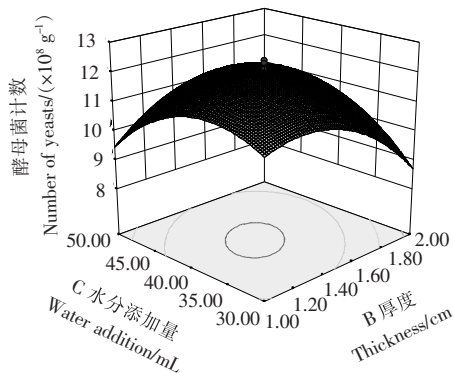


图 8 厚度 B 与水分添加量 C 交互作用响应面三维图示
Figure 8 Combined effects of thickness B and water addition C on yeast count

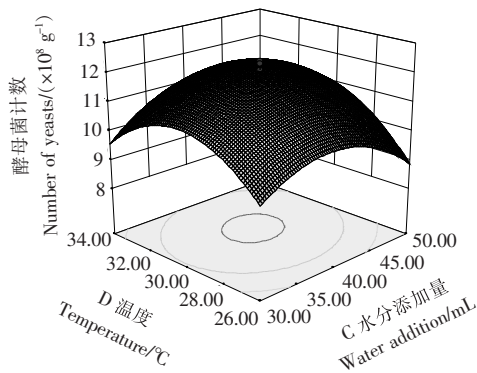


图 9 水分添加量 C 与温度 D 交互作用响应面三维图示
Figure 9 Combined effects of water addition C and temperature D on yeast count

值,该模型真实有效。

2.8 酵母菌剂的干制

按最佳方法固态培养 28 h 酵母菌数折合绝干料均值 $(2.92 \pm 0.05) \times 10^9$ CFU/g。经真空 40 ℃ 干燥 8 h 后测得酵母菌活菌数折合绝干料 $(2.34 \pm 0.03) \times 10^9$ CFU/g,存活率 80%。常压 45 ℃ 干燥 24 h 后测得酵母菌活菌数折合绝干料 $(1.90 \pm 0.03) \times 10^9$ CFU/g,存活率 65%。

3 结论

本试验开展了以秸秆稻壳替代麸皮固态培养产阮假丝

酵母的研究,利用产阮假丝酵母生长条件相对简单的特点^[9],采用中心组合试验设计及响应面分析法优化了酵母菌培养条件,发酵 28 h,酵母活菌计数 $(2.92 \pm 0.05) \times 10^9$ CFU/g 绝干,试验结果表明以秸秆稻壳替代麸皮固态培养产阮假丝酵母效果良好。

目前,以豆粕、麸皮为原料,利用酵母菌或复合菌种固态发酵提高原料蛋白含量的研究居多,而利用豆粕为主要原料制备活性酵母菌剂的报道较少。杨世平等^[10]利用豆粕、麸皮、红糖、酵母膏等培养沼泽生红冬孢酵母,虽然所获酵母活菌数较高,但成本偏高,发酵时间偏长。相比之下,本试验更注重低成本和短时间,且原料更切合北方实际,具有潜在的应用价值。本试验常压干制,适合中小企业的应用;真空干燥,更适宜投资大的企业应用。

Mitchell 等^[11]认为固态发酵中存在传热传质的问题,为此,在小试基础上扩大生产应进一步摸索参数,可通过改善通风等因素,进一步提高供氧能力,以提升酵母活菌数量,摊薄生产成本,制备高效廉价的酵母益生菌剂。

参考文献

- 1 胡学智,王俊. 益生菌饲料的现状、生产和应用效果[J]. 中国微生物生态学杂志,2011,23(9):861~864.
- 2 Melanie Le Bon, Helen E Davies, Caitriona Glynn, et al. Influence of probiotics on gut health in the weaned pig[J]. Livestock Science, 2010(133):179~181.
- 3 Francesca Gaggia, Paola Mattarelli, Bruno Biavati. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010(141):S15~S28.
- 4 Choi J Y, Shinde P L, Ingale S L, et al. Evaluation of multi-microbe probiotics prepared by submerged liquid or solid substrate fermentation and antibiotics in weaning pigs[J]. Livestock Science, 2011(138):144~151.
- 5 M Ibrahim Rajoka, Sohail Hassan Khan, M A Jabbar, et al. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors[J]. Bioresource Technology, 2006(97):1 934~1 941.
- 6 李永凯,毛胜勇,朱伟云. 益生菌发酵饲料研究及应用现状[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(3):90~92.
- 7 陈洪章,徐建. 现代固态发酵原理与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2004:38.
- 8 陶发琴,王明鹏,王卫星,等. 响应面法优化酵母油脂的提取工艺[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(4):51~58.
- 9 Guo Hong-wei, Chang Juan, Yin Qing-qiang, et al. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation[J]. Bioresource Technology, 2013(148):361~365.
- 10 杨世平,刘慧玲,刘付文. 沼泽生红冬孢酵母的固体培养条件[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(3):22~26.
- 11 Gélinas P, Barrette J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation [J]. Bioresource Technology, 2007(98):1 138~1 143.