

# 啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈粕渣 饲料制备工艺的响应面优化

李冰<sup>1</sup>, 贾鸿震<sup>1</sup>, 皮尔·穆罕默德·阿卜杜勒<sup>2</sup>, 于长青<sup>1</sup>, 武刚<sup>3</sup>,  
张晓雪<sup>1</sup>, 魏文慧<sup>1</sup>, 刘小波<sup>1</sup>, 马忠仁<sup>4</sup>, 丁功涛<sup>4</sup>

(1. 甘肃省轻工研究院有限责任公司 分离技术开发中心, 兰州 730000; 2. 马来西亚国立大学 工程与建筑环境学院, 马来西亚 雪兰莪州 43600; 3. 张掖市奥林贝尔生物科技有限公司, 甘肃 张掖 734000; 4. 西北民族大学 生物医学研究中心, 中国-马来西亚国家联合实验室, 兰州 730030)

**摘要:**通过单因素实验和响应面法对啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈粕渣饲料制备工艺进行研究。结果表明:基料制备最佳发酵条件为发酵时间 5 d、棕榈仁渣目数 70 目、菌料比 1:103、发酵温度 30 ℃、含水量 36%, 该条件下基料中总菌落数为  $7.20 \times 10^{10}$  个/g; 发酵产物最佳发酵条件为发酵温度 30 ℃、棕榈果渣与空果串配比 1:2、棕榈果渣及空果粉碎长度 4 cm、配料比 1:10(基料与棕榈果渣和空果串质量比)、含水量 35%、发酵时间 36 d, 该条件下发酵产物营养成分 OD 值为 0.966。对发酵饲料主要成分进行分析, 其粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、含水量分别为 7.20%、7.61%、26.20%、5.20%、0.38%、0.26%、16.20%, 总菌落数为  $9.0 \times 10^7$  个/g。该发酵方法工艺简单, 具有良好的工业化生产前景。

**关键词:**啤酒酵母; 乳酸菌; 棕榈粕渣; 饲料发酵; 响应面法

中图分类号: TS201.3; TS229 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)03-0126-09

## Response surface optimization of preparing palm residues feed by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus*

LI Bing<sup>1</sup>, JIA Hongzhen<sup>1</sup>, PEER Mohamed Abdul<sup>2</sup>, YU Changqing<sup>1</sup>, WU Gang<sup>3</sup>,  
ZHANG Xiaoxue<sup>1</sup>, WEI Wenhui<sup>1</sup>, LIU Xiaobo<sup>1</sup>, MA Zhongren<sup>4</sup>, DING Gongtao<sup>4</sup>

(1. Separation Technology Development Center, Gansu Light Industry Science Research Institute Co., Ltd., Lanzhou 730000, China; 2. Faculty of Engineering and Built Environment, University Kebangsaan Malaysia, Bangi Selangor 43600, Malaysia; 3. Zhangye Olymber Biotechnology Co., Ltd., Zhangye 734000, Gansu, China; 4. China-Malaysia National Joint Laboratory, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

**Abstract:** The single-factor experiment and response surface methodology were used to study the fermentation technology of preparing palm residues feed with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus*. The results showed that the optimal fermentation conditions for the preparation of base material were obtained as

收稿日期: 2019-07-18

基金项目: 科技部科技伙伴计划资助(KY201501005); 甘肃省国际科技合作计划项目(1604WKCA001); 2017年陇原青年创新创业人才(团队)项目(甘组通字[2017]121号)

作者简介: 李冰(1987), 男, 工程师, 硕士, 主要从事资源综合高值化利用研究(E-mail) ice80399835@163.com。

通信作者: 于长青, 正高级工程师(E-mail) 1229619289@qq.com; 皮尔·穆罕默德·阿卜杜勒, 高级讲师, 博士(E-mail) peer@ukm.edu.my。

follows: fermentation time 5 d, palm kernel residues 70 meshes, ratio of bacterial to material 1:103, fermentation temperature 30 ℃ and water content 36%. Under the optimal conditions, the total number of colonies in the base material was  $7.20 \times 10^{10}$  colonies/g. The optimal fermentation conditions of the fermentation products were obtained as follows: fermentation temperature 30 ℃, ratio of palm fruit residues to empty fruit bunches

1:2, crushing length of palm fruit residues and empty fruit bunches 4 cm, ratio of base material mass to the total mass of palm fruit residues and empty fruit bunches 1:10, water content 35% and fermentation time 36 d. Under the optimal conditions, the *OD* value of the nutrient in the fermentation product was 0.966. The crude protein, crude fat, crude fiber, crude ash, calcium, phosphorus and water contents in the fermentation product were 7.20%, 7.61%, 26.20%, 5.20%, 0.38%, 0.26% and 16.20% respectively, and the total number of colonies was  $9.0 \times 10^7$  colonies/g. The fermentation method was simple and had good prospects for industrial production.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus*; palm residues; feed fermentation; response surface methodology

油棕榈 (*Trachycarpus fortunei* (Hook, f.) H. Wendl.) 原产于非洲西部海岸, 后传入马来西亚和印度尼西亚等东南亚各国并被广泛种植。棕榈粕渣是油棕榈果实提油后的副产品, 根据提油工艺时序, 棕榈粕渣由空果串、果渣、仁渣3部分组成。棕榈粕渣价格低廉、资源丰富、无毒副作用, 从能量和蛋白等营养成分看, 是一种开发潜力巨大的饲料资源<sup>[1]</sup>。目前, 棕榈粕渣中的仁渣通过部分替代或添加的形式被广泛应用于家禽饲料和反刍动物饲料, 并且在鸡、鸭、鱼、鹅、猪、牛、羊等动物饲喂实验中展现出良好的经济效益<sup>[2-11]</sup>。棕榈仁渣以其粗蛋白、粗脂肪、能量高的特点在畜禽饲料中日渐广泛应用, 而棕榈空果串和果渣则成了废料, 除了少部分用于肥料使用, 大多数以废弃物的形式被丢弃, 资源浪费严重, 油棕榈资源未能得到充分的综合利用, 同时也存在棕榈仁渣过量添加导致的日粮纤维较高和饲料消化率降低等问题<sup>[12]</sup>。

随着饲料工业的发展, 固态发酵饲料作为一种绿色环保的新型饲料, 越来越受到动物养殖户的青睐。固态发酵饲料主要通过人为控制有益微生物的生长代谢活动, 在提高饲料营养价值(蛋白质、氨基酸、维生素等)水平、增加饲料中益生菌数量的同时减少饲料抗生素应用, 降解饲料中抗营养因子, 使畜禽更容易采食、消化和吸收且无毒害作用, 是未来饲料的发展趋势。固态发酵饲料提高饲料价值主要采用枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、乳酸菌、戊糖片球菌、酵母菌、黑曲霉和米曲霉等<sup>[13-16]</sup>。酵母菌在发酵过程中能够分泌大量水解酶类, 利用发酵底物中的无机氮源和碳水化合物合成微生物蛋白, 有效降解抗营养因子, 同时产生具有生物活性的物质<sup>[17]</sup>。乳酸菌发酵饲料不仅营养价值及利用率高, 而且乳酸含量极其丰富, 拥有独特的气味, 诱食效果良好, 能够增加动物进食量<sup>[18]</sup>。经过微生物复合菌发酵的固态发酵饲料能增加反刍动物瘤胃纤维分解菌(黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌)和乳酸产生菌(嗜

酸乳酸杆菌和牛链球菌)数量, 进而提高饲料消化率<sup>[19]</sup>。

本研究采用啤酒酵母和乳酸菌对棕榈仁渣进行厌氧发酵(基料制备), 以啤酒酵母和乳酸菌发酵制备的发酵基料和棕榈果渣、棕榈空果串为原料进行二次厌氧发酵, 在确定单因素的基础上利用 Box - Behnken 响应面分析法分别对影响基料中总菌落数和发酵产物营养成分 *OD* 值的主要参数进行优化, 确定数学模型及最佳工艺条件, 旨在为棕榈粕渣资源高值化利用及发酵饲料工业化生产提供理论指导及依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

棕榈粕渣为马来西亚国立大学提供, 由 Sime Darby 公司提油后的油棕榈果仁渣、果渣及空果串组成, 其主要成分见表1。

表1 油棕榈提油后的废弃物营养成分 %

原料	粗脂肪	粗蛋白	粗灰分	粗纤维	钙	磷
仁渣	14.60	17.36	4.45	8.40	0.81	0.75
果渣	3.75	5.44	5.60	13.10	0.35	0.23
空果串	3.35	4.35	5.05	47.60	0.43	0.22

饲料发酵菌种为啤酒酵母和乳酸菌, 购自上海炎地农业科技有限公司, 其中啤酒酵母有效菌种数量  $\geq 200$  亿个/g, 乳酸菌有效菌种数量  $\geq 30$  亿个/g。

FL-30B 万能粉碎机, METTLER PM 200 电子天平, LDZH-200KBS 立式高压蒸汽灭菌器, SHP-250 智能生化培养箱, XSM-20 生物显微镜。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基料的制备

棕榈仁渣粉碎后过筛, 精确称取 20.00 g, 置于 650 mL 培养瓶中, 参考预实验, 加入 0.25% 红糖水, 盖上透气盖, 121 °C 灭菌 40 min, 冷却至室温后加入啤酒酵母和乳酸菌的混合菌粉, 盖上密封盖, 放入生化培养箱进行厌氧发酵。

### 1.2.2 发酵产物的制备

棕榈果渣及空果串粉碎后,精确称取 25.00 g, 121 °C 灭菌 40 min 后在 (60 ± 2) °C 条件下干燥 24 h, 冷却备用。精确称取一定量的基料与备用棕榈果渣及空果串充分混合至于真空袋中,加入无菌水,排除空气封口,放入生化培养箱进行厌氧发酵。

### 1.2.3 基料和发酵产物中总菌落数的测定

精密称取基料或发酵产物 0.10 g 至灭菌试管中,吸取 2 mL 无菌水稀释,摇匀,参照 ISO 4833—2003 方法,用血球计数板在显微镜下计算基料和发酵产物中总菌落数<sup>[20]</sup>。

总菌落数 = (啤酒酵母数 + 乳酸菌数) × 稀释体积 / 棕榈粕渣发酵饲料称取质量

### 1.2.4 基料和发酵产物成分分析

参照 GB/T 6432—1994、GB/T 6433—2006、GB/T 6434—2006、GB/T 6438—2007、GB/T 6436—2002、GB/T 6437—2002 和 GB/T 6435—2014 进行基料和发酵产物中粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、含水量的测定。

### 1.2.5 发酵产物营养成分归一化值

以发酵产物的粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、水分含量和总菌落数为指标采用 Hassan 法进行归一化处理,对取值越小越好的因素(粗纤维、粗灰分)和取值越大越好的因素(粗蛋白、粗脂肪、钙、磷、总菌落数)分别进行数学转换求归一值  $d_{\min}$  和  $d_{\max}$ ,各指标归一值求算几何平均数,得总评归一值 OD。公式如下:

$$d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$OD = (d_1 d_2 d_3 \cdots d_k)^{1/k}$$

式中: $d$  为单指标评价值; $Y_i$  为指标中第  $i$  个值; $Y_{\min}$  为指标中最小值; $Y_{\max}$  为指标中最大值; $OD$  为总评归一值; $k$  为指标数。

### 1.2.6 数据统计分析

所有实验平行 3 次,结果以“平均值 ± 标准差”表示。采用 SPSS 19.0 统计软件中的 One-way ANOVA 进行单因素方差分析,Duncan 法进行多重比较;采用 Design-Expert 10.0.4 软件中的  $F$  检验 (tape III) 对数据进行响应面优化分析;采用 Origin 9.4 制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 基料制备实验结果与分析

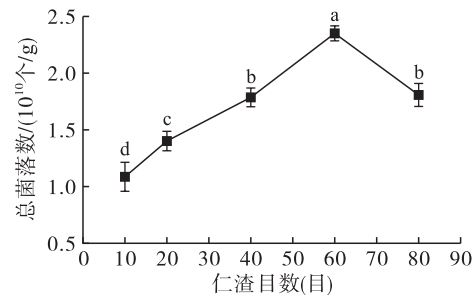
#### 2.1.1 单因素实验

在基料制备过程中,为使啤酒酵母和乳酸菌始

终保持最佳生长状态,固定发酵时间为 5 d,通过 Plactett-Burman 实验选取显著影响基料总菌落数的 4 个因素(仁渣目数、菌料比、发酵温度、含水量)设计单因素实验。

#### 2.1.1.1 仁渣目数的影响

在菌料比(质量比,下同)1:80,发酵温度 28 °C,含水量 30%,棕榈仁渣目数分别为 10、20、40、60、80 目条件下,测定基料中总菌落数,分析仁渣目数对啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈仁渣的影响,结果见图 1。



注:图中相同字母表示总菌落数之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),下同。

图 1 仁渣目数对总菌落数的影响

由图 1 可知,当棕榈仁渣目数在 10~60 目时,基料中总菌落数随着棕榈仁渣目数增大而显著增多 ( $P < 0.05$ ),当棕榈仁渣目数在 60~80 目时,基料中总菌落数随着棕榈仁渣目数增大而显著降低 ( $P < 0.05$ ),这可能是由于当棕榈仁渣目数为 60 目时,啤酒酵母和乳酸菌与棕榈仁渣有效接触面积趋于最大,随后棕榈仁渣因自重影响发生粘黏,有效接触面积减少,啤酒酵母和乳酸菌无法充分利用棕榈仁渣营养物质生长发酵。故棕榈仁渣目数选择 60 目为宜。

#### 2.1.1.2 菌料比的影响

在仁渣目数 60 目,发酵温度 28 °C,含水量 30%,菌料比分别为 1:80、1:90、1:100、1:110、1:120 条件下,测定基料中总菌落数,分析菌料比对啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈仁渣的影响,结果见图 2。

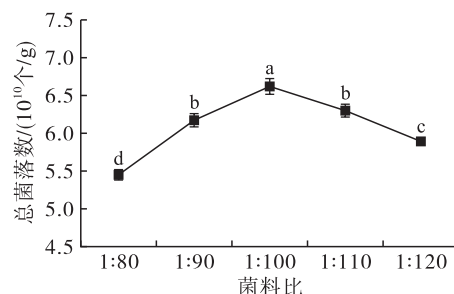


图 2 菌料比对总菌落数的影响

由图 2 可知,当菌料比在 1:80~1:100 时,基料中总菌落数随着菌料比的增大呈显著增加趋势

( $P < 0.05$ ), 继续增大菌料比, 总菌落数显著降低 ( $P < 0.05$ ), 这可能是棕榈仁渣营养物质已被啤酒酵母和乳酸菌分解利用完毕, 微生物细胞停止生长甚至开始死亡所造成的结果。因此, 菌料比选择 1:100 为宜。

#### 2.1.1.3 发酵温度的影响

在仁渣目数 60 目, 菌料比 1:100, 含水量 30%, 发酵温度分别为 24、26、28、30、32 °C 条件下, 测定基料中总菌落数, 分析发酵温度对啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈仁渣的影响, 结果见图 3。

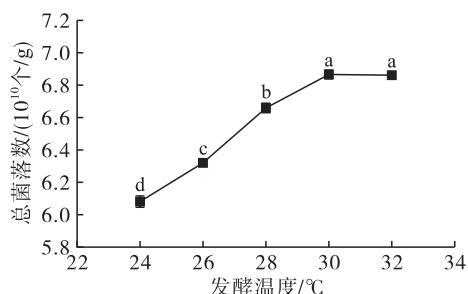


图3 发酵温度对总菌落数的影响

由图 3 可知, 当发酵温度在 24 ~ 30 °C 时, 基料中总菌落数随着发酵温度的上升呈显著增加趋势 ( $P < 0.05$ ), 继续升高发酵温度, 总菌落数略有降低 ( $P > 0.05$ ), 这是因为随着温度的升高酶反应速度加快, 啤酒酵母和乳酸菌细胞生长代谢加快, 当温度高于 30 °C 时酶失活速率大于微生物细胞生长代谢速率, 导致微生物细胞衰老加快。故发酵温度选择 30 °C 为宜。

#### 2.1.1.4 含水量的影响

在仁渣目数 60 目, 菌料比 1:100, 发酵温度 30 °C, 含水量分别为 30%、35%、40%、45%、50% 条件下, 测定基料中总菌落数, 分析含水量对啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈仁渣的影响, 结果见图 4。

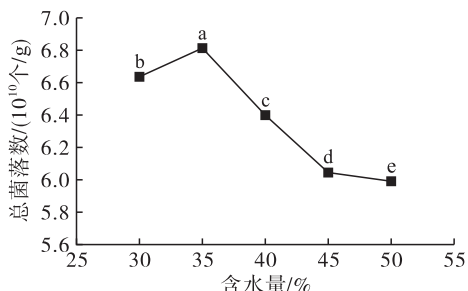


图4 含水量对总菌落数的影响

由图 4 可知, 当含水量由 30% 增至 35% 时, 基料中的总菌落数随着含水量的增大而显著增加 ( $P < 0.05$ ), 随着含水量的继续增加, 总菌落数呈逐渐降低趋势 ( $P < 0.05$ ), 这可能是由于适宜的含水量使得棕榈仁渣的细小颗粒之间存在一定的空隙和

合适的疏松度, 有利于微生物进入, 在增大微生物与棕榈仁渣表面接触面积的同时排出微生物菌体代谢所产生的  $\text{CO}_2$ , 促进微生物菌体生长。故含水量选择 35% 为宜。

#### 2.1.2 响应面优化实验

##### 2.1.2.1 响应面实验设计及结果

在单因素实验基础上, 采用中心组合设计原理, 以仁渣目数(A)、菌料比(B)、发酵温度(C)和含水量(D)为响应变量, 基料中总菌落数为响应值, 采用 Box - Behnken 设计进行四因素三水平的响应面优化实验, 响应面优化实验共设计 29 个实验点。Box - Behnken 实验因素水平见表 2, Box - Behnken 实验设计及结果见表 3。

表2 Box - Behnken 实验因素水平

水平	仁渣目数(目)	菌料比	发酵温度/°C	含水量/%
-1	40	1:90	28	30
0	60	1:100	30	35
1	80	1:110	32	45

表3 Box - Behnken 实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	总菌落数/(10 <sup>10</sup> 个/g)	
					实验值	预测值
1	1	0	-1	0	5.63	5.74
2	1	1	0	0	4.76	4.81
3	1	-1	0	0	2.38	2.35
4	1	0	0	1	7.12	6.88
5	1	0	0	-1	6.55	6.57
6	1	0	1	0	6.46	6.56
7	0	1	0	-1	4.07	3.89
8	0	0	1	-1	5.62	5.50
9	0	0	0	0	7.13	7.35
10	0	1	0	1	4.19	4.09
11	0	-1	1	0	1.34	1.38
12	0	0	0	0	7.20	7.35
13	0	0	0	0	7.47	7.35
14	0	-1	0	1	1.92	2.01
15	0	0	-1	1	5.25	5.23
16	0	0	0	0	7.33	7.35
17	0	-1	0	-1	1.10	1.10
18	0	0	0	0	7.60	7.35
19	0	1	1	0	3.72	3.85
20	0	1	-1	0	2.79	2.99
21	0	0	1	1	5.98	6.02
22	0	-1	-1	0	0.47	0.58
23	0	0	-1	-1	4.83	4.64
24	-1	0	-1	0	5.48	5.29

续表 3

实验号	A	B	C	D	总菌落数/(10 <sup>10</sup> 个/g)	
					实验值	预测值
25	-1	0	1	0	6.31	6.12
26	-1	0	0	-1	5.40	5.88
27	-1	-1	0	0	2.11	1.92
28	-1	0	0	1	6.45	6.67
29	-1	1	0	0	4.45	4.34

利用 Design Expert 10.0.4 软件对表 3 实验数据进行多元回归拟合,得到总菌落数对仁渣目数、菌料比、发酵温度和含水量的二次多项式回归方程:总菌落数 = 7.35 + 0.22A + 1.22B + 0.41C + 0.28D + 0.011AB - 0.002AC - 0.12AD + 0.015BC - 0.18BD - 0.017CD - 0.13A<sup>2</sup> - 3.86B<sup>2</sup> - 1.29C<sup>2</sup> - 0.72D<sup>2</sup>。

该模型的分析结果及模型系数显著性检验见表 4。

表 4 二次多项模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	123.650	14	8.832	154.690	<0.000 1**
A	0.610	1	0.610	10.610	0.005 7**
B	17.900	1	17.900	313.590	<0.000 1**
C	2.060	1	2.060	36.080	<0.000 1**
D	0.930	1	0.930	16.220	0.001 2**
AB	0.001	1	0.001	0.008	0.929 6
AC	0.000	1	0.000	0.000	0.988 5
AD	0.058	1	0.058	1.010	0.332 2
BC	0.001	1	0.001	0.016	0.900 2
BD	0.130	1	0.130	2.190	0.160 6
CD	0.001	1	0.001	0.020	0.888 9
A <sup>2</sup>	0.120	1	0.120	2.040	0.175 6
B <sup>2</sup>	96.640	1	96.640	1 692.560	<0.000 1**
C <sup>2</sup>	10.750	1	10.750	188.350	<0.000 1**
D <sup>2</sup>	3.320	1	3.320	58.130	<0.000 1**
残差	0.800	14	0.057		
失拟项	0.650	10	0.065	1.760	0.308 8
纯误差	0.150	4	0.037		
总离差	124.450	28			

注:\*\* 为极显著( $P < 0.01$ ), \* 为显著( $P < 0.05$ );  $R^2 = 0.993 6$ ,  $R_{Adj}^2 = 0.987 2$ 。

由表 4 可知,二次回归模型  $F$  值为 154.690,  $P < 0.000 1$ ,表明模型极显著。失拟项  $P = 0.308 8 > 0.05$ ,失拟项差异不显著,说明实验数据均可用此回归模型描述,未知因素对实验结果影响很小。模型决定系数  $R^2 = 0.993 6$ ,说明 99.36% 的实验数据变异性均可用此回归模型解释,模型可信度较高,该方程能很好地与实际情况拟合,较好地反映了基料中

总菌落数与仁渣目数、菌料比、发酵温度和含水量之间的关系,因此该回归方程可较好预测总菌落数随各参数的变化规律。校正系数  $R_{Adj}^2 = 0.987 2$ ,说明实验结果有 98.72% 受各因素的影响。综上所述,该模型可用于总菌落数分析和预测。通过表 4 中  $F$  值可判断各自变量对因变量的影响依次为  $B > C > D > A$ ,即菌料比对总菌落数的影响最大( $P < 0.01$ ),其次为发酵温度( $P < 0.01$ )、含水量( $P < 0.01$ )和仁渣目数( $P < 0.01$ )。由回归方程和方差分析可知,二次项中  $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  对总菌落数的影响达极显著水平( $P < 0.01$ )。

### 2.1.2.2 工艺条件的优化

根据 Box - Behnken 实验结果,结合回归模型,预测基料制备的最佳工艺条件为棕榈仁渣目数 75.92 目、菌料比 1:103.14、发酵温度 30.81 °C、含水量 35.53%,此条件下总菌落数为  $7.58 \times 10^{10}$  个/g。

### 2.1.2.3 模型验证

为了验证响应面模型的可预见性,同时为了简化实验操作,将基料制备工艺的最佳发酵条件修正为棕榈仁渣目数 70 目、菌料比 1:103、发酵温度 30 °C、含水量 36%,该条件下进行 3 次平行实验,总菌落数达到  $7.2 \times 10^{10}$  个/g,  $RSD$  为 4.42%,与模型预测值误差为 5.01%。经 SPSS 下 ANOVA 分析,验证实验总菌落数与预测总菌落数差异不显著( $P = 0.056 > 0.05$ )。说明该模型可以有效预测基料制备过程中的总菌落数,优化结果可靠,可用来指导啤酒酵母和乳酸菌对棕榈粕渣的发酵工艺。

## 2.2 发酵产物实验结果与分析

### 2.2.1 单因素实验

在产物发酵过程中,为使发酵产物的营养成分归一值达到最好,固定发酵温度为 30 °C,棕榈果渣与空果串配比为 1:2。通过 Plackett - Burman 实验选取显著影响发酵产物营养成分  $OD$  值的 4 个因素(棕榈果渣及空果串的粉碎长度(以下简称粉碎长度)、基料与棕榈果渣和空果串配料比(以下简称配料比)、含水量、发酵时间)设计单因素实验。

#### 2.2.1.1 粉碎长度的影响

在配料比 1:8(质量比,下同),含水量 30%,发酵时间 30 d,粉碎长度分别为 1、3、5、7、9 cm 条件下,测定发酵产物  $OD$  值,分析粉碎长度对发酵产物营养成分的影响,结果见图 5。

由图 5 可知,当粉碎长度在 1~5 cm 时,发酵产物营养成分  $OD$  值随粉碎长度的增长而呈显著增加趋势( $P < 0.05$ ),继续增长粉碎长度,营养成分  $OD$  值开始显著降低( $P < 0.05$ ),这说明棕榈果渣和空

果串粉碎长度过长,会致使其与基料混合不均匀,从而影响啤酒酵母和乳酸菌对棕榈果渣和空果串的发醇。故粉碎长度选择5 cm为宜。

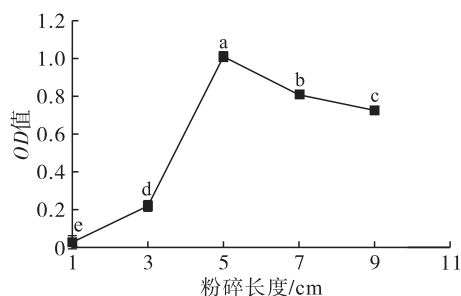


图5 粉碎长度对OD值的影响

### 2.2.1.2 配料比的影响

在粉碎长度5 cm,含水量30%,发酵时间30 d,配料比分别为1:8、1:9、1:10、1:11、1:12条件下,测定发酵产物OD值,分析配料比对发酵产物营养成分的影响,结果见图6。

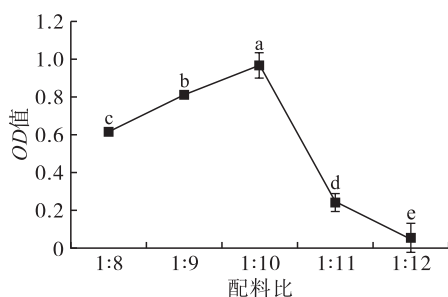


图6 配料比对OD值的影响

由图6可知,当配料比在1:8~1:10时,发酵产物营养成分OD值随配料比的增大而呈显著增加趋势( $P < 0.05$ ),继续增大配料比,营养成分OD值显著降低( $P < 0.05$ ),这说明配料比过小,会导致菌落数剧增过快,从而产生过多的代谢废物,导致菌种容易衰老,不利于发酵产物营养成分的提高,配料比过大,总菌落增长缓慢,培养时间长,使发酵周期延长,导致发酵成本的提升,同时会降低菌种活力,从而使菌种降解底物能力下降,营养成分含量降低。配料比为1:10时,既能保证合理缩短发酵周期,又能得到较高的营养成分含量。故配料比选择1:10为宜。

### 2.2.1.3 含水量的影响

在粉碎长度5 cm,配料比1:10,发酵时间30 d,含水量分别为25%、30%、35%、40%、45%条件下,测定发酵产物OD值,分析含水量对发酵产物营养成分的影响,结果见图7。

由图7可知,当含水量在25%~35%时,发酵产物营养成分OD值随含水量的增大呈显著增加趋势( $P < 0.05$ ),继续加大含水量,发酵产物营养成分

OD值显著降低( $P < 0.05$ ),这可能是由于含水量过低,导致固态介质中营养成分溶解度的下降及较低的基质膨润度,微生物生长受抑制,营养成分转换率降低,而含水量过高,导致基质颗粒间孔隙率的降低、黏性增加,增加了微生物菌体代谢所产生的 $\text{CO}_2$ 的传质阻力,抑制微生物生长发酵。故含水量选择35%为宜。

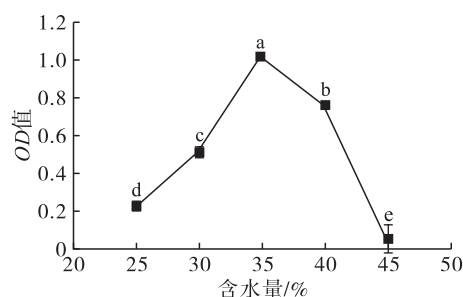


图7 含水量对OD值的影响

### 2.2.1.4 发酵时间的影响

在粉碎长度5 cm,配料比1:10,含水量35%,发酵时间分别为25、30、35、40、45 d条件下,测定发酵产物OD值,分析发酵时间对发酵产物营养成分的影响,结果见图8。

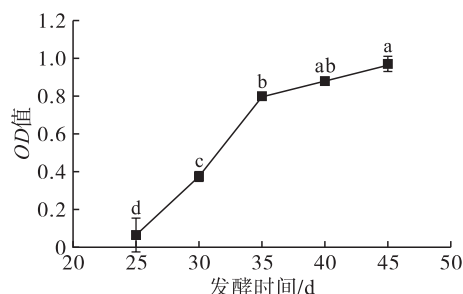


图8 发酵时间对OD值的影响

由图8可知,当发酵时间在25~35 d时,发酵产物营养成分OD值随发酵时间的延长而显著上升( $P < 0.05$ ),继续延长发酵时间,发酵产物营养成分OD值呈平缓上升趋势( $P > 0.05$ ),这是由于发酵过程中,产物营养成分浓度始终在变化,一般高峰生长阶段时间越长,其生产率越高,但到一定时间后生产率提高缓慢。为了获得更多的产物营养成分,时间过短,不足以获得所需的优质发酵产品;时间过长,由于环境已不利于菌体生长,往往会造成菌体消溶,同时增加生产成本。因此,发酵时间选择35 d为宜。

## 2.2.2 响应面优化实验

### 2.2.2.1 响应面实验设计及结果

在单因素实验基础上,采用中心组合设计原理,以粉碎长度( $X_1$ )、配料比( $X_2$ )、含水量( $X_3$ )和发酵时间( $X_4$ )为响应变量,发酵产物营养成分OD值为响应值,采用Box-Behnken设计进行四因素三水平

的响应面优化实验,响应面优化实验共设计 29 个实验点。Box - Behnken 实验因素水平见表 5, Box - Behnken 实验设计及结果见表 6。

利用 Design Expert10.0.4 软件对表 6 实验数据进行多元回归拟合,得到粉碎长度、配料比、含水量和发酵时间的二次多项式回归方程:  $OD$  值 =  $0.95 - 0.025X_1 + 0.17X_2 + 0.026X_3 + 0.049X_4 + 0.001X_1X_2 + 0.026X_1X_3 + 0.024X_1X_4 - 0.021X_2X_3 +$

$$0.002X_2X_4 - 0.005X_3X_4 - 0.019X_1^2 - 0.53X_2^2 - 0.088X_3^2 - 0.18X_4^2。$$

表 5 Box - Behnken 实验因素水平

水平	粉碎长度/cm	配料比	含水量/%	发酵时间/d
-1	3	1:9	30	30
0	5	1:10	35	35
1	7	1:11	40	40

表 6 Box - Behnken 实验设计及结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	含量/%						总菌落数/ ( $10^7$ 个/g)	OD 值	
					粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	粗灰分	钙	磷		实验值	预测值
1	0	0	1	-1	6.57	6.49	27.61	5.28	0.37	0.25	6.56	0.65	0.67
2	1	0	-1	0	6.62	6.58	26.63	5.23	0.37	0.25	6.75	0.72	0.77
3	-1	0	-1	0	6.99	7.24	26.19	5.19	0.38	0.26	8.19	0.87	0.87
4	-1	0	1	0	7.17	7.18	26.45	5.22	0.38	0.26	8.90	0.88	0.87
5	-1	0	0	-1	6.69	6.71	26.09	5.15	0.37	0.25	7.04	0.79	0.75
6	1	0	0	1	6.91	7.18	27.10	5.24	0.38	0.26	7.89	0.79	0.80
7	1	0	0	-1	6.64	6.62	27.48	5.27	0.37	0.25	6.85	0.68	0.65
8	0	0	-1	1	6.69	6.70	26.69	5.24	0.37	0.25	7.02	0.74	0.71
9	-1	0	0	1	6.96	7.10	26.87	5.26	0.38	0.26	8.07	0.80	0.80
10	1	0	1	0	6.96	7.56	26.53	5.23	0.38	0.26	8.06	0.84	0.87
11	0	0	1	1	6.80	6.91	27.08	5.25	0.38	0.25	7.47	0.75	0.75
12	0	0	-1	-1	6.43	6.24	27.55	5.28	0.37	0.25	6.03	0.61	0.60
13	0	1	0	-1	5.77	5.08	28.87	5.39	0.36	0.24	3.49	0.32	0.36
14	0	1	0	1	6.07	5.61	28.32	5.35	0.37	0.24	4.65	0.45	0.46
15	0	1	1	0	6.22	5.88	27.58	5.33	0.37	0.25	5.23	0.53	0.50
16	1	1	0	0	6.41	6.21	27.99	5.33	0.37	0.25	5.95	0.57	0.55
17	0	1	-1	0	6.18	5.81	27.74	5.32	0.37	0.25	5.09	0.51	0.49
18	-1	1	0	0	6.31	6.03	27.08	5.33	0.37	0.25	5.56	0.57	0.59
19	0	-1	1	0	5.48	4.57	29.13	5.41	0.36	0.23	2.40	0.22	0.21
20	1	-1	0	0	5.63	4.84	29.26	5.44	0.36	0.24	2.98	0.24	0.21
21	0	-1	0	1	5.30	4.24	29.91	5.46	0.36	0.23	1.68	0.12	0.12
22	0	-1	0	-1	5.01	3.74	30.31	5.50	0.35	0.23	0.59	0.00	0.03
23	-1	-1	0	0	5.55	4.68	29.46	5.34	0.36	0.24	2.64	0.24	0.26
24	0	-1	-1	0	5.22	4.10	29.50	5.36	0.36	0.23	1.37	0.12	0.12
25	0	0	0	0	7.18	7.57	26.16	5.20	0.38	0.26	8.92	0.92	0.95
26	0	0	0	0	7.24	7.68	25.91	5.20	0.38	0.26	9.16	0.95	0.95
27	0	0	0	0	7.29	7.77	26.06	5.17	0.38	0.26	9.34	0.97	0.95
28	0	0	0	0	7.20	7.61	25.78	5.18	0.38	0.26	9.00	0.95	0.95
29	0	0	0	0	7.33	7.84	25.85	5.19	0.38	0.26	9.50	0.98	0.95

该模型的分析结果及模型系数显著性检验见表 7。

由表 7 可知,二次回归模型  $F$  值为 162.210,  $P < 0.0001$ ,表明模型极显著。失拟项  $P = 0.2341 > 0.05$ ,失拟项差异不显著,说明实验数据均可用此回

归模型描述,未知因素对实验结果影响很小。模型决定系数  $R^2 = 0.9939$ ,说明 99.39% 的实验数据变异性均可用此回归模型解释,模型可信度较高,该方程能很好地与实际情况拟合,较好地反映了发酵产物营养成分  $OD$  值与粉碎长度、配料比、含水量、发

酵时间之间的关系,因此该回归方程可较好预测发酵产物营养成分  $OD$  值随各参数的变化规律。校正系数  $R_{Adj}^2 = 0.9877$ ,说明实验结果有 98.77% 受各因素的影响。综上所述,该模型可用于发酵产物营养成分  $OD$  值分析和预测。通过表 7 中  $F$  值可判断各自变量对因变量的影响依次为  $X_2 > X_4 > X_3 > X_1$ ,即配料比对发酵产物营养成分  $OD$  值的影响最大 ( $P < 0.01$ ),其次为发酵时间 ( $P < 0.01$ )、含水量 ( $P < 0.05$ ) 和粉碎长度 ( $P < 0.05$ )。由回归方程和方差分析可知,二次项中  $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_4^2$  对发酵产物营养成分  $OD$  值的影响达极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

表 7 二次多项模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
模型	2.330	14	0.166	162.210	<0.000 1**
$X_1$	0.007	1	0.007	7.090	0.018 6*
$X_2$	0.340	1	0.340	327.080	<0.000 1**
$X_3$	0.008	1	0.008	7.760	0.014 6*
$X_4$	0.029	1	0.029	28.410	0.000 1**
$X_1X_2$	0.000	1	0.000	0.011	0.916 7
$X_1X_3$	0.003	1	0.003	2.720	0.121 7
$X_1X_4$	0.002	1	0.002	2.320	0.149 6
$X_2X_3$	0.002	1	0.002	1.690	0.215 0
$X_2X_4$	0.000	1	0.000	0.027	0.871 0
$X_3X_4$	0.000	1	0.000	0.120	0.734 0
$X_1^2$	0.002	1	0.002	2.400	0.144 0
$X_2^2$	1.840	1	1.840	1 791.740	<0.000 1**
$X_3^2$	0.050	1	0.050	49.070	<0.000 1**
$X_4^2$	0.210	1	0.210	205.660	<0.000 1**
残差	0.014	14	0.001		
失拟项	0.012	10	0.001	2.190	0.234 1
纯误差	0.002	4	0.001		
总离差	2.350	28			

注:\*\*为极显著 ( $P < 0.01$ ), \*为显著 ( $P < 0.05$ );  $R^2 = 0.9939$ ,  $R_{Adj}^2 = 0.9877$ 。

#### 2.2.2.2 工艺条件的优化

根据 Box - Behnken 实验所得结果,结合回归模型,预测发酵产物制备的最佳工艺条件为粉碎长度 3.94 cm、配料比 1:10.16、含水量 35.23%、发酵时间 35.50 d,此条件下  $OD$  值为 0.976。

#### 2.2.2.3 模型验证

为了验证响应面模型的可预见性,同时为了简化实验操作,将发酵产物制备工艺的最佳发酵条件修正为粉碎长度 4 cm、配料比 1:10、含水量 35%、发酵时间 36 d,该条件下进行 3 次平行实验, $OD$  值为 0.966,  $RSD$  为 1.66%,与模型预测值误差为 1.02%。经 SPSS 下 ANOVA 分析,验证实验  $OD$  值与预测  $OD$

值差异不显著 ( $P = 0.376 > 0.05$ )。说明该模型可以有效预测发酵产物营养成分,优化结果可靠,可用于指导啤酒酵母和乳酸菌对棕榈粕渣饲料的发酵工艺。

#### 2.3 成分分析

优化条件下对基料和发酵产物进行主要成分分析,结果见表 8。

表 8 棕榈粕渣发酵饲料基料和发酵产物主要成分

项目	基料	发酵产物
粗蛋白含量/%	18.63	7.20
粗脂肪含量/%	17.50	7.61
粗纤维含量/%	6.50	26.20
粗灰分含量/%	3.86	5.20
钙含量/%	0.80	0.38
磷含量/%	0.78	0.26
含水量/%	35.12	16.20
总菌落数/(个/g)	$7.2 \times 10^{10}$	$9.0 \times 10^7$

由表 8 可知:棕榈仁渣经啤酒酵母和乳酸菌发酵后,粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、含水量分别为 18.63%、17.50%、6.50%、3.86%、0.80%、0.78%、35.12%,总菌落数为  $7.2 \times 10^{10}$  个/g;发酵产物的粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、含水量分别为 7.20%、7.61%、26.20%、5.20%、0.38%、0.26%、16.20%,总菌落数为  $9.0 \times 10^7$  个/g。

通过发酵产物替代部分传统粗饲料中玉米秸秆后进行肉牛喂养实验,肉牛健康状况良好,饲料消化吸收利用率高,育肥效果显著<sup>[21]</sup>。因此,该研究可为啤酒酵母和乳酸菌应用于棕榈粕渣发酵饲料工业及棕榈粕渣资源高值化利用提供理论指导及依据。

### 3 结论

本文采用啤酒酵母和乳酸菌对棕榈粕渣饲料基料(棕榈仁渣)的发酵条件和以制备的基料、棕榈果渣、棕榈空果串为原料进行二次发酵的发酵条件进行了研究,在单因素实验的基础上,利用 Design Expert 软件,运用 Box - Behnken 实验设计进行响应面分析,分别建立了基料中总菌落数和发酵产物营养成分  $OD$  值与发酵条件各因素间的拟合模型,对工艺条件进行了优化,获得了啤酒酵母和乳酸菌发酵棕榈仁渣的最佳工艺条件为发酵时间 5 d,棕榈仁渣目数 70 目,菌料比 1:103,发酵温度 30℃,含水量 36%;发酵产物的最佳工艺条件为发酵温度 30℃,棕榈果渣与空果串配比 1:2,棕榈果渣及空果串粉碎长度 4 cm,配料比 1:10,含水量 35%,发酵时间 36 d。在最佳工艺条件下,参照国家标准对基料和发酵产物主要成分进行分析,基料的粗蛋白、粗脂



肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、含水量分别为 18.63%、17.50%、6.50%、3.86%、0.80%、0.78%、35.12%，总菌落数为  $7.2 \times 10^{10}$  个/g；发酵产物的粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷、含水量分别为 7.20%、7.61%、26.20%、5.20%、0.38%、0.26%、16.20%，发酵产物营养成分 OD 值为 0.966，总菌落数为  $9.0 \times 10^7$  个/g。验证及分析实验结果说明，该优化工艺方法合理可行。通过发酵产物替代部分传统粗饲料中玉米秸秆后进行肉牛喂养实验，肉牛健康状况良好，饲料消化吸收利用率高，育肥效果显著。

#### 参考文献：

- [1] 曹平, 刘伟, 李颖丽. 肉牛日粮中添加棕榈粕饲养效果的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(10):42-43.
- [2] 李玉鹏, 刘醒醒, 唐德富, 等. 酶解棕榈仁粕肉仔鸡氨基酸营养价值的评定[J]. 中国饲料, 2017(2):29-34.
- [3] 张旭, 蒋桂韬, 王向荣, 等. 临武鸭对添加复合酶棕榈粕和椰子粕的养分、氨基酸和能量的利用率[J]. 动物营养学报, 2016, 28(8):2360-2366.
- [4] 汪华, 王辅臣, 黄峰, 等. 椰子粕、棕榈粕对草鱼生长及饲料利用率的影响[J]. 饲料工业, 2012, 33(12):13-16.
- [5] 孙伟. 三种非常规饲料资源营养价值评定及在四川白鹅日粮中的应用研究[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2015.
- [6] JAWORSKI N W, SHOULDERS J, GONZ LEZ-VEGA J C, et al. Effects of using copra meal, palm kernel expellers, or palm kernel meal in diets for weanling pigs[J]. Prof Anim Sci, 2014, 30(2):243-251.
- [7] HANS H S, ROMMEL C S. 猪饲料中来源于椰子干、棕榈仁和大米行业的高纤维副产物的营养价值评估[J]. 中国饲料, 2015(6):34-38.
- [8] 魏政, 郭凯军, 戴辉, 等. 棕榈仁粕添加水平对农户饲养奶牛泌乳性能和饲料成本的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(3):61-63.
- [9] 赖景涛, 李秀良, 刘瑞鑫. 棕榈仁粕取代等量玉米对泌乳牛和干奶牛的影响[J]. 广西畜牧兽医, 2010, 26(6):329-331.
- [10] RIBEIRO R D X, OLIVEIRA R L, MACOME F M, et al. Meat quality of lambs fed on palm kernel meal, a by-product of biodiesel production[J]. Asian Austr J Anim Sci, 2011, 24(10):1399-1406.
- [11] PINHO B D, RAMOS A F O, LOURENCO D B, et al. Feeding behavior of sheep fed diets with *Elaeis guineensis* palm kernel meal[J]. Semin - Cienc Agrar, 2016, 37(4):2513-2520.
- [12] 石鹏, 王永, 雷新涛, 等. 棕榈仁粕的饲料应用进展[J]. 热带农业科学, 2017, 37(10):89-92.
- [13] 孙合美, 吴德芹, 吴琦琦, 等. 黑曲霉 Asp-1 发酵棕榈粕生产高  $\beta$ -甘露聚糖酶生物饲料[J]. 饲料广角, 2012(15):21-23.
- [14] 王芳, 贾万利, 张浩男, 等. 混合菌发酵对豆粕品质的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2017(4):45-51.
- [15] 孙宏, 李园成, 吴逸飞, 等. 酿酒酵母制备固态发酵饲料的参数优化及品质评价[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(5):107-112.
- [16] 杨玉芬, 乔利, 郑宜超. 发酵温度和水分对豆粕发酵品质的影响[J]. 江西农业大学学报, 2016, 31(6):1097-1100.
- [17] 袁园, 葛莹, 钟佳祎, 等. 酵母菌在动物饲料营养学中的研究进展[J]. 饲料博览, 2018(4):19-22.
- [18] 胡红伟, 段明房, 闫凌鹏, 等. 乳酸菌发酵饲料的优势及其在畜禽养殖中的运用探讨[J]. 饲料博览(技术版), 2018(3):13-15.
- [19] 郭春华, 彭忠利, 罗璠, 等. 复合发酵菌液的反刍动物微生态功能饲料以及制作方法: CN103798503A[P]. 2014-05-21.
- [20] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京:高等教育出版社, 2006.
- [21] 于长青, 李冰, 皮尔·穆罕默德·阿卜杜勒, 等. 棕榈粕渣发酵饲料养殖肉牛应用效果研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(1):52-55.

**《中国油脂》微博已开通, 欢迎广大油友互动交流!**

新浪官方微博: 中国油脂 <http://e.weibo.com/2841983372/profile>