

微生物共发酵提高三七糠饲用价值的研究*

殷月兰¹ 王永坤² 王淑军³ 朱国强² 周继红²

(扬州大学生物科学与技术学院 扬州 225009)¹

(扬州大学畜牧兽医学院 扬州 225009)²

(淮海工学院 连云港 222005)³

摘要: 对白地霉 *Y₉₆₁₀₁* 株、绿色木霉 *Y₉₆₃₀₁* 株、米曲霉 *L₉₆₂₀₁* 株和产朊假丝酵母 *P₉₆₄₀₁* 株混合发酵三七糠生产的单细胞蛋白(SCP)产品的饲用价值进行了研究。混菌发酵三七糠 SCP 的纯蛋白质含量比发酵前提高 130%, 纤维素比发酵前降低 30.7%。小鼠急性毒性试验和微核试验均证明该产品无毒性。鹅的饲养试验表明:三七糠 SCP 产品适口性好、能降低料肉比、促进生长,具有潜在的应用前景。

关键词: 三七糠,单细胞蛋白,混菌培养,动物实验

中图分类号: Q-93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0119-05

STUDIES ON FEEDING VALUE OF HUSK BY MIXED FUNGI CO-FERMENTATION

YIN Yue-Lan, WANG Yong-Kun, WANG Shu-Jun, ZHU Guo-Qiang, ZHOU Ji-Hong

(Yangzhou University, College of Biology & Technology, Yangzhou 225009)¹

(Yangzhou University, College of Animal Husbandry & Veterinary Science, Yangzhou 225009)²

(Huaihai Institute, Lianyungang 222005)³

Abstract: The feeding value of Single Cell Protein was studied by means of applying *Gandidum Link Y₉₆₁₀₁*, *Trichoderma kononingii Y₉₆₃₀₁*, *Asperillus oryzae L₉₆₂₀₁* and *Candidum utilis P₉₆₄₀₁* on the mixture of rice bran and rice hull (the ratio of bran to hull is 3:7) via solid-state fermentation. The results showed that the content of pure protein of product increased by 130% than that of the unfermented mixture, the cellulose decreased by 30.7%. The mice micronucleus trials suggested three doses of product, compared to control, were all no notable difference, so it had no toxic effect. The trials of feeding geese with product showed that it could stimulate

* 江苏省'九五'农业科技攻关重点项目

收稿日期:1998-12-18, 修回日期:1999-05-13

appetite, reduce the ratio of meat to feed, promote growth and the application of the product has potential perspective.

Key words: Husk, Single cell protein, Mixed culture, Animal test

近年来,随着生物工程科学的进步和世界性蛋白资源的紧缺,单细胞蛋白(Single Cell Protein,简称SCP)已成为各国研究的重点课题之一^[1]。SCP是指从细菌、酵母、霉菌、藻类等微生物菌体中获得的蛋白质,它具有原料来源丰富、生长速度快、生产过程易控制、蛋白质含量高、营养功能多等优点。SCP的生产原料基本上分为3类:淀粉质原料、碳氢化合物和各种废弃物。利用淀粉质原料生产SCP存在同人类争粮的问题;利用碳氢化合物生产SCP成本较高且存在氢残余的安全性问题^[2];因此利用廉价原料或各种废弃物开发生产SCP重新引起人们的重视,其中以纤维素碳水化合物生产SCP尤其引起人们的极大关注。但至今纤维素类废渣的生物转化仍未能投入大规模生产。如何选育出高效降解纤维素的菌株、降低成本,仍是困扰发酵生产的主要技术难点。

我们以纤维素含量较高的三七糠为发酵原料,利用混菌发酵技术,可降低三七糠纤维素含量,提高蛋白质含量,平衡氨基酸组成,显著提高了三七糠的饲用价值,具有较好的应用前景。

1 材料

1.1 试验菌株

绿色木霉(*Trichoderma Koningii*) Y₉₆₃₀₁株,从扬州地区采集的腐木样品中分离选育而得;白地霉(*Geotrichum Candidum* Link) Y₉₆₁₀₁株,由白蚁肠道分离选育而得;产朊假丝酵母(*Candida Utilis*) P₉₆₄₀₁株,从猪肠道中分离选育而得;米曲霉(*Asperillus oryzae*) L₉₆₂₀₁株,由淮海工学院食品工程系微生物实验室赠送。以上菌株的鉴定根据张纪忠主编的《微生物分类学》^[3]。

1.2 培养基

固体培养基:5°Be'麦芽汁琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)^[4]。液体培养基:马铃薯蔗糖液

体培养基。三七糠发酵培养基:500mL三角瓶中加入14g三七糠,4.92g麸皮,10mL 6%的尿素溶液,4mL 10%的硫酸铵溶液,2mL 4%的硫酸镁溶液,pH自然。

2 方法

2.1 菌株不同组合对产品粗蛋白含量的影响

分别在三七糠发酵培养基上对4株初选菌株Y₉₆₃₀₁、P₉₆₄₀₁、Y₉₆₁₀₁、L₉₆₂₀₁以不同组合进行单菌或混菌的发酵试验。P₉₆₄₀₁和Y₉₆₁₀₁分别在马铃薯蔗糖液体培养基中振荡培养20h,稀释至 1×10^8 cfu/mL,以备接种;Y₉₆₃₀₁和L₉₆₂₀₁分别在PDA斜面上培养至孢子成熟,移取孢子用灭菌生理盐水稀释至 1×10^8 cfu/mL,以备接种。不同组合总接种量均为4mL,且在多菌株组合中各菌株之间的接种比例均相同。接种后用灭菌玻璃棒进行充分搅拌,于30℃下培养28h,培养过程注意保持培养箱的湿度和观察温度的变化。

2.2 三七糠 SCP 产品营养成分分析

用三七糠发酵培养基进行4株配伍菌株的混菌发酵试验,以未经发酵的同配方培养基作为对照组。对发酵产品和对照组分别测定水分、纯蛋白、粗纤维、粗脂肪含量。对这4个指标的测定分别按国际GB6435-86、GB/T6432-94、GB/T6433-94、GB/T6434-94操作。

2.3 三七糠 SCP 产品中活菌数和产品得率的测定

活菌计数所用培养基为PDA平板;产品得率为:产品干重÷(培养料+菌种重)×100%。

2.4 急性毒性试验

参考金建中^[5]的方法并加以改进。采用20g左右的ICR小白鼠40只,随机分成8组,每组5只。其中3组进行发酵饲料的毒性试验,按5000mg/kg体重、500mg/kg体重和50mg/kg体重各灌服1组小白鼠;其余4组进行4株配伍菌株的毒性试验,将受试菌株按 1×10^8 cfu/只/次

的剂量分别灌服 1 组小白鼠, 每 3d 1 次, 共灌服 4 次, 设豆芽汁灌服作平行对照组。最后 1 次灌服结束后再过 5d 进行剖检, 观察内脏器官有无病理变化, 并做组织切片观察。

2.5 小鼠微核试验

参考王治乔^[6]的方法。试验采用体重为 20~24g 的 ICR 小鼠, 随机分组, 每组 6 只雄鼠, 常规饲养管理。发酵产品剂量为 5000mg/kg 体重、500mg/kg 体重、50mg/kg 体重 3 个剂量组, 以环磷酰胺为阳性对照, 蒸馏水为阴性对照, 1 次灌胃, 24h 后采样, 置备骨髓细胞涂片。计数 1000 个多染红细胞中的微核率。

2.6 动物喂养试验

选体重、日龄相近, 健康的鹅 32 只, 随机分为 2 组。试验组采用稻子与发酵三七糠(用二级麸皮曲种接种于三七糠发酵培养基上得到的产物)以 5:3 的比例饲喂; 对照组除三七糠未经发酵外, 稻子与三七糠配比与试验组相同, 喂养时间均为 30d。饲养结束时按常规进行屠宰, 观察胃、肠、心、肝、肾、脾等主要内脏器官有无病变, 并做组织切片显微观察。

3 结果与讨论

3.1 三七糠成分分析

三七糠主要成分含量分别为(%): 纯蛋白

6.97, 粗纤维 33.16, 粗脂肪 6.32, 粗灰分 13.80。

3.2 菌株不同组合对产品粗蛋白含量的影响

对不同组合的粗蛋白含量测定结果表明: 单株发酵产物粗蛋白含量均较低, 其中粗蛋白含量最高的是 P₉₆₄₀₁ 株, 为 23.25%; 双株混合发酵高于单株发酵的粗蛋白含量, 其中 Y₉₆₃₀₁ 株与 P₉₄₀₁ 株组合粗蛋白含量最高, 为 25.58%; 3 株混合发酵高于双株混合发酵的粗蛋白含量, 其中 Y₉₆₁₀₁ 株、P₉₄₀₁ 株和 Y₉₆₃₀₁ 株组合粗蛋白含量最高, 为 28.92%; 4 株组合粗蛋白含量最高, 为 34.63%。根据以上结果, 确定菌株的最佳组合为: 4 株菌株配伍。

3.3 混合培养与单菌、双菌组合对产品氨基酸组成的影响

采用不接种、只接种酵母菌、只接种霉菌和接种配伍菌株的 4 种方式发酵三七糠, 28h 后分别测定不同处理的 SCP 产品的氨基酸含量。由表 1 的氨基酸含量测定结果可知, 混菌发酵的氨基酸含量显著高于对照组, 约是对照组的两倍, 也显著高于酵母或霉菌单独发酵时的氨基酸含量, 其中混菌发酵产品中蛋氨酸含量是对照组的 2 倍, 是酵母发酵的 1.8 倍, 弥补了酵母发酵时蛋氨酸的不足。

3.4 三七糠 SCP 产品营养成分分析

三七糠 SCP 产品和对照组的主要成分测定

表1 不同发酵饲料氨基酸含量比较(mg/100mg)

氨基酸	对照	酵母	霉菌	混菌	氨基酸	对照	酵母	霉菌	混菌
天冬氨酸	0.810	0.941	1.118	1.705	蛋氨酸	0.077	0.086	0.110	0.155
苏氨酸	0.239	0.343	0.439	0.656	异亮氨酸	0.349	0.446	0.541	0.823
丝氨酸	0.159	0.250	0.360	0.479	亮氨酸	0.659	0.803	0.955	1.386
谷氨酸	1.811	2.149	2.380	2.983	酪氨酸	0.188	0.229	0.248	0.455
甘氨酸	0.547	0.647	0.774	1.061	苯丙氨酸	0.428	0.518	0.591	0.835
丙氨酸	0.568	0.728	0.857	1.159	赖氨酸	0.331	0.428	0.524	0.837
半胱氨酸	0.233	0.265	0.262	0.174	组氨酸	0.356	0.394	0.385	0.545
缬氨酸	0.514	0.663	0.786	1.198	精氨酸	0.601	0.702	0.789	0.989
脯氨酸	0.697	0.777	0.896	0.937	总 和	7.155	8.117	0.635	15.220

结果表明(表 2): 纯蛋白含量比发酵前提高 130%, 粗纤维素含量比发酵前降低 30.7%, 粗脂肪含量降低 45.3%, 明显提高了三七糠的营养价值。

3.5 SCP 产品中活菌数和产品得率的测定

表2 发酵产品主要营养成分分析(%)

成分	水分	纯蛋白	粗纤维	粗脂肪
对照组	8.1	9.24	23.8	5.25
SCP 产品	7.7	22.13	16.4	2.87

产品中活菌数测定结果为 5.2×10^9 个/g,

产品得率为 78%。

3.6 急性毒性试验

4 株菌株及发酵饲料经小白鼠口服及腹腔注射, 各组小白鼠均健活, 无任何不良反应。试验组小白鼠体重均重于对照组, 剖检内脏器官观察, 无眼观病理变化, 取胃、肠、心、肝、脾、肾等器官作病理切片检查, 未见任何显微病理变

化, 表明 4 株菌株及发酵料均无毒性作用。

3.7 小鼠微核试验

试验结果(表 3)表明, 各剂量组小鼠骨髓多染红细胞微核试验均为阴性, 与阴性对照比较无显著差异 ($P > 0.05$), 亦未见骨髓多染红细胞的毒性抑制作用, 说明三七糠 SCP 产品在本试验系统未显示毒理遗传效应。

表3 微核试验结果

组别	剂 量	动物只数(♂)	微核率(%)	与阴性对照比较
1	5000mg/kg体重	6	2.72±1.00	$P>0.05$
2	500mg/kg体重	6	2.67±0.33	$P>0.05$
3	50mg/kg体重	6	2.40±1.00	$P>0.05$
阴性对照	蒸馏水0.2ml/只	6	2.25±0.92	
阳性对照	环磷酸胺50mg/kg体重	6	16.67±9.00	$P>0.01$

3.8 饲养试验

由表 4 可以明显看出, 饲用一定比例发酵料的试验组肉比优于对照组。在饲养过程中, 对照组和试验组的鹅均无发病现象, 试验组

的鹅毛色油亮、身体矫健, 优于对照组。通过解剖观察, 内脏器官没有出现任何眼观病变, 组织切片观察, 未见任何微观病理变化, 表明该发酵料无毒性作用。

表4 饲喂效果比较

项目	动物 只数	平均始重 (kg)	平均末重 (kg)	平均日增重 (kg)	平均耗料 (kg)	肉料比
对 照	16	1.023±0.0185	2.251±0.1395	0.041±0.0845	6	1:4.39
试验组	16	1.082±0.0379	2.865±0.1786	0.059±0.0537	6	1:3.38

分析结果表明混菌固态发酵对三七糠品质的提高是多方面的, 不只限于蛋白质含量的增加。首先, 可改善蛋白质品质, 平衡氨基酸组成。本试验的氨基酸含量测定结果表明, 必需氨基酸含量, 除半胱氨酸略有降低外, 其他几种均有不同程度的提高, 仅蛋氨酸含量就提高 2 倍。其次, 可使难利用的物质发生转化。纤维素的测定结果表明, 纤维素由生料的 23.8% 降低到发酵产品的 16.4%。再次, 改善了适口性。三七糠的存放经历夏天高温环境后具有不良气味, 而经混菌发酵后, 消除了怪味并且赋予弱酸香味的新口感, 提高了适口性。另外, 产生了纤维素酶、蛋白酶、果胶酶等一系列酶系, 这些酶有助于动物对营养物质的消化和吸收, 提高饲料利用率和转化率, 增进动物健康水平。有关 SCP 产品益生功效方面的文献报道已经很多^[7], 今后还需对三七糠 SCP 益生功效进

行进一步研究。

菌种无毒性和无致病性, 是菌种筛选的重要条件之一。我们先后做了小白鼠急性毒性试验、小鼠骨髓多染红细胞微核试验和鹅饲养试验, 结果均表明 SCP 具有安全性。对微生物菌体制品的饲养和食用安全性来说, 人们最关注的是其中存在较多的核酸^[8]。但 SCP 作为饲料喂养畜禽时, 动物体内有代谢核酸的途径, 因此核酸对动物不构成有害威胁。

我国具有丰富的三七糠资源, 但其直接利用价值不高, 如果以其为原料发酵生产三七糠 SCP 产品, 则可部分替代精饲料, 提高饲料的营养价值, 弥补国内蛋白资源不足的现状, 具有较好的经济效益和社会效益。

参 考 文 献

- [1] 郭维烈, 郭庆华著. 新型发酵蛋白饲料. 北京: 科学技术
 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- 术出版社, 1996, 77~78.
- [2] 李廷生. 郑州粮食学院学报, 1994, 15(4): 75~79.
- [3] 张纪忠主编. 微生物分类学. 复旦大学出版社, 1990, 326~327.
- [4] 陈天寿主编. 微生物培养基制造和应用. 北京: 中国农业出版社, 1995, 496~497.
- [5] 金建中. 工业微生物, 1994, 24(4): 1~4.
- [6] 王治乔, 袁伯俊. 新药临床前安全性评价与实践. 北京: 军事医学出版社, 1994, 102~108.
- [7] Dawson K A. Current and Future Role of Yeast Culture in Animal Production. Proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium, 1987, 269~292.
- [8] Lonsane B K. Enzyme Microb. Technol, 1985, 7(6): 258~265.