

利用微生物混合培养物生产沙棘果渣单细胞蛋白

代小江 王礼德 贺锡勤

(水利部中国科学院水库渔业研究所, 武汉 430073)

马辉文

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

摘要 以沙棘果渣作为唯一碳源进行了单细胞蛋白发酵研究。经过筛选, 从 40 多株霉菌、酵母菌和细菌中选育出 My-931 霉菌-酵母混合培养物能迅速地将沙棘果渣转变为单细胞蛋白。在最佳条件下, 沙棘果渣经发酵后, 其发酵产品粗蛋白含量达 44.1%。动物饲喂试验证明此发酵产品安全无毒, 能部分替代鱼粉用作蛋白饲料。

关键词 混合发酵, 沙棘果渣, 单细胞蛋白

沙棘 (*Hippophae Rhamnoides*) 为落叶直立灌木或小乔木, 是一种重要的水土保持树种, 主要生长在欧亚大陆的广大地区。我国的天然沙棘林达 92 万公顷, 居世界首位^[1]。沙棘果的营养十分丰富, 含有多种多样的生化活性物质, 其中各类维生素的含量尤其丰富^[2]。目前沙棘果多被用来榨取果汁生产天然沙棘饮料, 其残渣(即沙棘果渣)除少量作为饲料外, 大部分未得到充分利用。经测定, 沙棘果渣主要由纤维素、半纤维素、果胶质、脂肪、糖类等物质组成, 其蛋白质含量仅 8% 左右。为了充分利用这一自然资源, 将其转变为蛋白质含量丰富的单细胞蛋白, 我们测定了 40 多株微生物(霉菌、酵母菌和细菌)对沙棘果渣的转化能力, 发现由一株黑根霉 (*Rizopus niger*) 和一株管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*) 组成的混合培养物能迅速地把沙棘果渣转变为单细胞蛋白, 其发酵产品粗蛋白含量达 44.1%, 经测定各种必需氨基酸的含量除个别氨基酸外均超过联合国粮农组织 (FAO) 推荐的最佳蛋白质的组成标准。经动物饲喂试验, 证明此发酵产品安全无毒, 能部分替代鱼粉用作蛋白饲料。本文报道其研究结果。

1 材料和方法

1.1 微生物

黑根霉 2514 是从发霉的沙棘果渣中分离出来。管囊酵母由美国农业部北部研究实验室 (NRRL) 赠送, 原始编号为 NRRL-y2460。

1.2 沙棘果渣

分别取自山西五台、辽宁建平和安徽蚌埠, 经晾晒风干后保存。用于单细胞蛋白发酵的沙棘果渣, 用 DM95 型干湿两用电磨机粉碎后, 筛除杂质。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基: 酵母完全培养基^[3], 查氏培养基^[3], 用于菌种保存。

1.3.2 种子培养基: 一级种子: 酵母完全培养基。二级种子 (%): 沙棘果渣 6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02。

1.3.3 发酵培养基 (%): 沙棘果渣 7.5, 无机盐配比按提高后的果渣含量比例做相应的提高。

1.4 培养条件

1.4.1 往复式摇床, 偏心距2cm, 转速 280r/min
 1.4.2 25L 微机自动控制发酵罐 (25L-W), 罐压 0.05MPa, 搅拌器转速 300r/min, 通气比 1:1.1 (V/V · min), 温度、pH、消泡、溶氧、搅拌转速等参数均自动监控。

1.5 培养方法

斜面菌种 → 一级种子培养液 (50ml/500ml 三角瓶) $\xrightarrow{34^{\circ}\text{C}, 24\text{h}}$ 以 2.5% 接种量接种二级种子培养液 (50ml/500ml 三角瓶) $\xrightarrow{34^{\circ}\text{C}, 32-36\text{h}}$ 以 10% 接种量接种发酵培养液 (10L/25L 罐), 34℃ 培养 28—32h。

1.6 分析方法

1.6.1 还原糖采用 Lane 和 Eynon 的热滴定法^[4], 粗蛋白采用微量凯氏定氮法^[5], 粗脂肪采用 Soxhlet 抽提法, 粗纤维采用酸碱洗涤法, 水分采用烘干法, 灰分采用 600℃ 灼烧法^[4]。

1.6.2 蛋白质中氨基酸组成的测定: 将样品用 6mol 盐酸水解 24h, 水解液稀释定容后, 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

1.6.3 微量元素的测定: 将样品用浓硝酸消化过夜, 140℃ 消化 2h, 180℃ 蒸干, 加稀硝酸定容, 用等离子体发射光谱仪测定。

1.7 发酵产品的毒理检验

按照卫生部颁布的“食品毒理安全性评价程序”规定的方法测定。

1.8 饲喂动物试验

用发酵产品代替饲料中的鱼粉饲喂长吻鮠 (*Leiocassis longirostris* Günther) 鱼种, 以常规饲料作对照。饲喂 20d 后, 测定鱼体增重率、生长比速、饲料系数、蛋白质效率比和蛋白质沉积率。

2 结果和讨论

2.1 沙棘果渣的成份分析

从表 1 可以看出, 沙棘果渣含有大量的可被微生物利用的物质, 即脂肪、纤维素和无氮浸出物(糖类、半纤维素、果胶质等)。其中的粗纤维主要来自于沙棘的果核和枝叶, 它们属于木

表 1 沙棘果渣和其发酵产品的主要营养组成

组成(%)	沙棘果渣	发酵产品
粗蛋白	8.3	44.1
粗脂肪	8.9	2.6
粗纤维	14.2	4.2
灰分	8.2	16.0
水分	12.9	5.1
无氮浸出物	46.9	28.0

质纤维素。

沙棘果渣中的粗蛋白占 8.3%, 同一般谷物的蛋白质含量相当, 其必需氨基酸含量较低, 若直接作为单胃动物的饲料, 则营养价值较低。利用微生物的作用, 有可能把其中的非蛋白质的含碳物质转化为微生物的细胞物质——单细胞蛋白。

2.2 菌种筛选

文献报道, 多种微生物的混合培养物具有广阔的遗传及生理潜力^[6,7,12], 不仅有可能将沙棘果渣迅速地转变为单细胞蛋白, 而且产生的单细胞蛋白的氨基酸组成有可能更符合动物的营养需要^[8,9]。一般说来, 大多数丝状真菌具有较强的分解植物多聚物的能力^[10]。因此, 我们将实验室保存的和从霉变的沙棘果渣中分离出来的霉菌分别同数十种酵母菌、细菌组成混合培养物在利用沙棘果渣作为唯一碳源的发酵培养基中进行混合培养, 结果发现由一株黑根霉和一株管囊酵母组成的混合培养物的生长情况最好, 经 48h 振荡培养, OD₆₃₀ 达 1.074, 发酵液经过滤和离心后沉淀的固形物, 其粗蛋白含量为 44.1%, 产率为 33%, 而且发酵过程可以在不灭菌的培养环境中(发酵液、摇瓶和发酵罐均未灭菌处理)进行。用分割法接种的方式连续进行十批发酵, 用显微镜观察到黑根霉和管囊酵母在发酵液中一直维持其明显的生长优势, 发酵液气味芳香, 外来的微生物不能作为污染物发展, 因此, My-931 混合菌株具有抗污染能力并具有良好的稳定性。

2.3 发酵条件的优化

2.3.1 发酵温度: 将黑根霉和管囊酵母的混合培养物接种于三组培养基中, 分别置于 27、34

和 37℃ 的摇床上震荡培养,结果发现发酵过程在 34℃ 下进行,微生物的生长量在 32h 左右达到最大值。

2.3.2 起始 pH: 经测定,发酵培养基的自然起始 pH 值为 3.8。用 KOH 将发酵培养基的起始 pH 值分别调至 5.0 和 7.0 后,接种混合培养物进行培养,结果表明,发酵培养基起始 pH 5.0 最适于混合菌株的生长。

2.3.3 氮源种类: 保持发酵培养基中的总氮含量不变,添加不同氮源物质配制发酵培养基进行培养,结果显示,尽管混合菌株能同化硫酸铵、尿素和二者的混合氮源,但硫酸铵能使发酵液的 pH 稳定在最适范围附近,以硫酸铵做氮源配制的发酵培养基最适于混合菌株的生长。因为硫酸铵是生理酸性氮源,尿素是生理碱性氮源,低 pH 环境有利于混合菌株的生长。

2.3.4 最优发酵培养基的选择: 按 $L_{16}(4^4)$ 正交表^[1]对 $(NH_4)_2SO_4$ 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 五种无机盐的添加量进行正交试验,试验数据分析如下:(1) K 值显示,最适无机盐添加量应为 (%): $(NH_4)_2SO_4$ 0.8, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02。(2) R_{x4} 值显示, $(NH_4)_2SO_4$ 和 KH_2PO_4 为影响发酵的主要因素, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为次要因素, $CaCl_2$ 对发酵基本上无影响,无需添加。(3) KH_2PO_4 为影响发酵液 pH 的关键因素。

2.3.5 发酵废液的循环使用: 研究发现,产品收获后产生的富含蛋白质、微生物细胞和无机盐的废液可作为下一轮发酵的配料用水循环使用。试验结果表明,用发酵废液配制新鲜培养液,能明显促进 My-931 混合菌株的生长,缩短发酵时间。其原因可能是由于废液中不仅含有能使沙棘果渣中的多聚物降解的酶类,还含有从沙棘果渣中溶解出来的多种维生素和生化活性物质^[2],它们促进了微生物的生长。另外,废液中还含有一些 My-931 菌株细胞,这相当于加大了接种量。从将来的工业生产考虑,废水的循环使用还可以消除废水造成的环境污染,降低产品的成本和基建投资。

2.4 25L 微机自动控制发酵罐中发酵动态

从图 1 可见,发酵终点在 30h 附近。

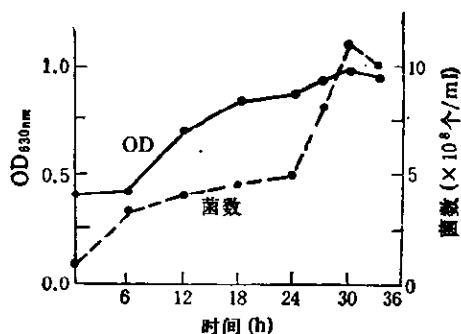


图 1 混合菌株在 25L 发酵罐中的发酵动态

2.5 产品质量分析

2.5.1 将 10 批在最佳条件下的摇瓶发酵产品(每批 20 瓶)混合抽样分析,发酵产品的粗蛋白含量为 44.1%,其氨基酸组成除个别氨基酸外均超过联合国粮农组织 (FAO) 推荐的最佳蛋白质的组成标准(表 2)。

表 2 沙棘果渣发酵产品的氨基酸组成和含量

氨基酸	每 100g 发酵产品中的克数	发酵产品 100g 蛋白质中的克数
Thr	1.75	3.98
Val	2.50	5.68
Met	0.92	2.09
Ile	1.85	4.20
Leu	2.70	6.14
Phe	1.62	3.68
Lys	1.78	4.05
His	0.77	1.75
Arg	2.20	5.00
Asp	3.31	7.52
Ser	1.50	3.41
Glu	4.73	10.75
Gly	1.93	4.39
Ala	2.55	5.80
Tyr	1.45	3.30
Cys	2.42	5.50
Pro	1.21	2.75

2.5.2 毒理学评价: 半数致死量 (LD_{50}) $> 15g/kg$, 属无毒物质。

2.5.3 动物饲喂试验: 饲喂 20d 后长吻鮠鱼种成活率为 100%, 其发酵产品代替鱼粉蛋白的

20%—35% 制成的配合饲料与对照组饲料在各项营养指标上基本一致或高于对照组饲料。结果表明,沙棘果渣单细胞蛋白发酵产品可部分替代鱼粉用作蛋白饲料。该试验结果见文献[15]。

2.6 发酵产品的产率

在最佳发酵条件下获得的发酵液经过滤、离心和干燥处理后,1kg沙棘果渣可获得0.33kg粗蛋白含量为44%的发酵主要产品,该产品大部分为微生物菌体,少量为沙棘果渣被消化后形成的微粒;同时,还获得0.50kg粗蛋白含量为14%的发酵次级产品,此产品大部分为沙棘果渣未被消化的残渣,少量为霉菌菌丝和酵母菌体。二种发酵产品可依其营养价值用于不同的动物饲料中。

参 考 文 献

[1] 余文涌,吴秉礼,于倬德. 沙棘,1989,7(3): 1—5.

[2] 高磊,刘学英. 饲料与畜牧,1990,(6): 4—6.
 [3] 白毓谦,方善康,高东,等. 微生物实验技术. 济南: 山东大学出版社,1987,478—481.
 [4] 无锡轻工业学院,天津轻工业学院. 食品分析. 北京: 轻工业出版社,1990,74—204.
 [5] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社,1985,87—92.
 [6] Youn W Han. Applied Microbiology, 1975, 29 (4): 510—514.
 [7] 王沁,赵学慧. 饲料研究,1992,(4): 2—5.
 [8] Shi-yen Shian, Su-Fuu Lin, Su-Lan Yu, et al. Aquaculture, 1990, 86: 401—407.
 [9] Carl D Webster, Daniah H Yancey, James H Tidwell. Aquaculture, 1992, 103: 141—152.
 [10] Youn W Han. Applied Microbiology, 1978, 23: 119—197.
 [11] 徐吉民. 正交法在医药科研中的应用. 北京: 中国医药科技出版社,1987,11—51.
 [12] 代小江,王礼德,贺锡勤. 水利渔业,1994,74(6): 6—8.
 [13] 代小江,贺锡勤. 水产科技情报,1994,21(3): 127—130.

PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN FROM SEA BUCKTHORN FRUIT WASTE WITH A MIXED MICROBIAL CULTURE

Dai Xiaojiang Wang Lide He Xiqin

(Institute of Reservoir Fisheries, Ministry of Water Resources, Academia Sinica, Wuhan 430073)

Ma Huiwen

(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract This paper reports a study on fermentation of single cell protein from sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*. Linn) fruit waste that was used as only carbon resource. After a series of screening tests, a MY-931 fungi-yeast culture, favourable to convert Sea Buckthorn fruit waste into single cell protein, was obtained from more than forty microbes including fungi, yeast and bacteria. In a typical fermentation, protein content of fermentation product arrived at 44.1%. The fermentation product was safety, non-toxic and could be used as animal protein feed.

Key words Mixed fermentation, sea buckthorn fruit waste, Single cell protein