

研究报告

亮斑扁角水虻幼虫酶解制备蛋白胨工艺优化及蛋白胨性质

马石霞^{1,2}, 刘高强^{1,2}, 冶秀燕², 周筱力⁴, 李新鹏^{1,3}, 刘文钊^{1,2}, 丁功涛^{*1}, 陈士恩^{*2}

1 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, 甘肃 兰州 730030

2 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030

3 西北民族大学化工学院, 甘肃 兰州 730030

4 川化集团有限责任公司, 四川 成都 610000

马石霞, 刘高强, 冶秀燕, 周筱力, 李新鹏, 刘文钊, 丁功涛, 陈士恩. 亮斑扁角水虻幼虫酶解制备蛋白胨工艺优化及蛋白胨性质[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5337-5349.

MA Shixia, LIU Gaoqiang, YE Xiuyan, ZHOU Xiaoli, LI Xinpeng, LIU Wenzhao, DING Gongtao, CHEN Shi'en. Peptone prepared from *Hermetia illucens* larvae: optimization of enzymolysis conditions and characteristics[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5337-5349.

摘要: 【背景】用于餐厨垃圾等有机废弃物处理的亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens*, HI)含有丰富的氨基酸和营养物质, 是一种优质、经济的蛋白来源。【目的】利用亮斑扁角水虻幼虫(*Hermetia illucens* larvae, HIL)制备蛋白胨用于细菌培养, 为亮斑扁角水虻的应用方式提供新的思路。【方法】以亮斑扁角水虻幼虫为原料, 利用单因素试验确定最佳酶解条件, 对比分析 HIL 蛋白胨和市售胰蛋白胨的基本性质和功能性状, 并进行细菌培养、生物化学试验, 利用两种蛋白胨分别培养大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922 模式细菌并通过生长动力学分析评价应用效果。【结果】制备 HIL 蛋白胨的最佳酶解工艺为按 1.3% (质量分数) 添加复合酶(胰酶:碱性蛋白酶质量比为 1:1), 在 pH 7.0、54 °C 条件下反应 4 h, 此时 HIL 的水解度为(19.34±0.15)%。HIL 蛋白胨和市售胰蛋白胨的功能性状和生物化学试验差异不显著($P>0.05$)。大肠杆菌 ATCC 25922 在 HIL 蛋白胨培养基中生长的 X_{\max} 和 λ 分别为 6.44 和 2.45, 在市售胰蛋白胨生长的 X_{\max} 和 λ 分别为 6.14 和 3.19, 差异均不显著($P>0.05$)。【结论】在培养大肠杆菌时, HIL 蛋白胨可以替代胰蛋白胨作为微生物培养基的成分。

关键词: 亮斑扁角水虻幼虫; 蛋白胨; 细菌培养; 生长动力学

资助项目: 西北民族大学生物工程一流学科(81080334)

This work was supported by the Bioengineering First-class Disciplines Grant of Northwest Minzu University for Nationalities (81080334).

*Corresponding authors. E-mail: DING Gongtao, dinggongtao@outlook.com; CHEN Shi'en, chshien@163.com

Received: 2023-05-22; Accepted: 2023-07-08

Peptone prepared from *Hermetia illucens* larvae: optimization of enzymolysis conditions and characteristics

MA Shixia^{1,2}, LIU Gaoqiang^{1,2}, YE Xiuyan², ZHOU Xiaoli⁴, LI Xinpeng^{1,3}, LIU Wenzhao^{1,2}, DING Gongtao^{*1}, CHEN Shi'en^{*2}

1 China-Malaysia National Joint Laboratory, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 Life Science and Engineering College, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

3 College of Chemical Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

4 Sichuan Chemical Works Group Limited, Chengdu 610000, Sichuan, China

Abstract: [Background] *Hermetia illucens* (HI) used for the treatment of organic wastes such as kitchen waste is rich in amino acids and nutrients, serving as a high-quality and economical source of protein. [Objective] To prepare peptone with *H. illucens* larvae (HIL) for bacterial culture and provide a new idea for the application of HI. [Methods] Peptone was prepared from HIL by enzymolysis. The optimal enzymolysis conditions were determined by single factor tests, and the biochemical and functional properties of HIL-derived peptone and commercial tryptone were compared. *Escherichia coli* ATCC25922 was cultured with two peptone products and the growth kinetics was compared. [Results] The optimal conditions for preparing HIL-derived peptone were enzymolysis with the enzyme complex (trypsin:alkaline protease=1:1) added at 1.3% (mass fraction) and at pH 7.0 and 54 °C for 4 h, under which the hydrolysis degree of defatted HIL was (19.34±0.15)%. The functional and biochemical properties showed no significant differences between HIL-derived peptone and commercial tryptone ($P>0.05$). The X_{max} , and λ of *E. coli* ATCC 25922 grown in the medium supplemented with HIL-derived peptone were 6.44 and 2.45, respectively, and those of *E. coli* ATCC 25922 grown in the medium supplemented with commercial tryptone were 6.14 and 3.19, respectively. The X_{max} , and λ showed no significant differences between HIL-derived peptone and commercial tryptone ($P>0.05$). [Conclusion] HIL-derived peptone can replace commercial tryptone as a component of the medium for culturing *E. coli*.

Keywords: *Hermetia illucens* larvae; peptone; bacterial culture; growth kinetics

亮斑扁角水虻又称黑水虻(black soldier fly, BSF), 原产于南美洲的热带草原, 目前分布于45°N 和 40°S 之间的热带和暖温带地区, 在我国主要分布于川、滇、两广和京津冀等地区^[1]。亮斑扁角水虻幼虫常用于处理餐厨垃圾等有机废弃物, 人工饲养情况下, 5 t 餐厨垃圾可生产 1 t *Hermetia illucens* larvae (HIL)鲜虫, 3 t HIL 鲜虫烘干后可生产 1 t HIL 干虫^[2]。HIL 不仅可

以解决餐厨垃圾造成的环境问题, 还能提供蛋白资源^[3-4]。HIL 干虫灰分为 5%–14%, 钙和磷含量分别为 5.0%和 0.6%左右, 而粗蛋白含量能达到 42%–60%^[5-6], 因此常被当作饲料用于养殖业为动物补充蛋白。赖氨酸和蛋氨酸是鱼类生长的限制性氨基酸, 而 HIL 虫体中的精氨酸、赖氨酸和蛋氨酸等必需氨基酸含量与鱼粉相似^[7]。相关研究还指出 HIL 被认为是现有鱼粉的最佳

替代来源, 可被用于改善水产养殖生物的生长和健康状况^[8-9]。此外, HIL 干虫中不饱和脂肪酸如月桂酸、棕榈酸、亚油酸与抗菌肽、月桂酸和几丁质等生物活性物质的存在^[10], 作为动物饲料时在动物健康和免疫调节中也发挥着重要作用^[11-12]。为了提高 HIL 的附加值并充分利用 HIL 具有高蛋白含量的特点, 需要对 HIL 的应用方式进行探索。

蛋白胨(peptone)是富含蛋白质的动植物原料经酸、碱或酶水解后分离纯化获得的一种以肽、胨、肽和氨基酸为主要成分的水溶性混合物^[13]。目前蛋白胨的制备多采用单酶水解, 如王锡念等^[14]利用风味蛋白酶、碱性蛋白酶水解鮫鳔鱼皮, 碱性蛋白酶是内切酶, 其主要酶切位点为 Tyr、Phe 和 Trp^[15-16]。然而风味蛋白酶具有内切酶和外切酶两种特性, 因此酶切位点更多^[14], 效果更好。有报道指出采用复合酶的酶解效果高于单酶, 复合酶酶解包括复合酶分段水解和复合酶组合水解^[17]。胰蛋白胨广泛应用于微生物的培养, 是许多微生物培养基的重要组成部分^[18-19]。目前, 胰蛋白胨中的蛋白主要来源于酪蛋白或新鲜牛肉的水解, 成本较高, 价格昂贵, 而以 HIL 为原料制备蛋白胨的研究鲜有报道。

本研究以 HIL 为原料, 利用复合酶组合水解 HIL, 以期获取 HIL 蛋白胨, 分析对比 HIL 蛋白胨与市售胰蛋白胨的功能性状差异。在本研究中, 分别使用 HIL 蛋白胨和市售胰蛋白胨培养大肠杆菌, 参考文献[20-22]通过监测绘制生长曲线来比较其生长情况, 并通过获取菌株的生长动力学数据评价两种蛋白胨对大肠杆菌生长的影响, 以期 HIL 蛋白胨可替代市售胰蛋白胨进行细菌培养提供数据支撑, 也为替代传统市售胰蛋白胨在细菌培养领域提供科学依据, 同时为 HIL 的应用方式提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

HIL 幼虫购自甘肃国瑞环保科技有限公司, 将 HIL 虫粉脱脂处理^[23]作为后续试验材料。大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922 由西北民族大学生物医学中心保存; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 8099 GDMCC1.180、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphoid* β) GDMCC1.224、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) GDMCC1.441、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*) GDMCC1.236 和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) GDMCC1.544 均购自北京中科光析化工技术研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器

碱性蛋白酶, 山东隆科特生物工程有限公司; 胰蛋白酶、胰酶和木瓜蛋白酶, 南宁东恒华道生物科技有限公司; 氢氧化钠、硼酸、无水碳酸钠、甲醛溶液、浓盐酸、浓硫酸、石油醚、氯化钠、葡萄糖等均为分析纯, 天津市百世化工有限公司; 酵母提取物生化级, OXOID 公司; 琼脂、胰蛋白胨均为生化级, 北京索莱宝科技有限公司。

全自动凯氏定氮仪, FOSS 有限公司; 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司。

1.1.3 培养基

酸性复红蛋白胨培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酸性复红溶液(0.5%) 10.0, 氯化钠 5.0。磷酸盐葡萄糖蛋白胨培养基(g/L): 胰蛋白胨 7.0, 磷酸

氢二钾 5.0, 葡萄糖 5.0。1%蛋白胨培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0。2%蛋白胨琼脂培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 10.0。LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。营养琼脂培养基(g/L): 胰蛋白胨 20.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 10.0, 牛肉膏 3.0。

HIL 蛋白胨培养基: 将胰蛋白胨用含氮量相等的 HIL 蛋白胨代替(胰蛋白胨:HIL 蛋白胨质量比为 1:1.12), 其他操作步骤相同, 制备得到的培养基称为 HIL 蛋白胨培养基, 进行后续试验。

1.2 方法

1.2.1 主要指标的测定

HIL 蛋白质水解度(degree of hydrolysis, DH)的测定: 分别测定蛋白液总氮量与氨基态氮的含量, 并运用公式(1)计算^[24]。总氮含量的测定采用凯氏定氮法(GB 5009.5—2016)^[25]; 使用甲醛滴定法(GB 5009.235—2016)进行氨基态氮的测定^[26]。

$$\text{DH}(\%) = \frac{\text{酶解液中氨基酸态氮}(\text{g}/100\text{g})}{\text{样品中的总氮量}(\text{g}/100\text{g})} \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 单因素试验

称取一定质量的 HIL 虫粉, 加水稀释至溶液体系蛋白含量为 8.0%, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液及 0.1 mol/L 的 HCl 溶液分别调节 4 种蛋白酶水解体系的 pH。水解结束后将水解液于 90–95 °C 水浴 10 min 使蛋白酶失去活性, 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液测定其水解度。使用快速定性滤纸过滤后取上清液, 真空冷冻干燥后过 60 目筛, 得 HIL 蛋白胨。

以水解度为评价指标, 分别测定加酶量、时间、温度和 pH 这 4 个因素对碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胰酶和木瓜蛋白酶水解脱脂 HIL 的影响, 确定各因素的最佳条件, 试验因素设计及水平如表 1 所示。

表 1 单因素试验水平表

Table 1 Single factor test level

名称 Name	水平 Level	因素 Factors			
		加酶量 Enzyme addition (%)	时间 Time (h)	温度 Temperature (°C)	pH
碱性蛋白酶 Alkaline protease	1	0.5	1	40	7.0
	2	0.7	2	45	7.5
	3	0.9	3	50	8.0
	4	1.1	4	55	8.5
	5	1.3	5	60	9.0
胰蛋白酶 Trypsase	1	0.2	1	30	6.5
	2	0.4	2	35	7.0
	3	0.6	3	40	7.5
	4	0.8	4	45	8.0
	5	1.0	5	50	8.5
胰酶 Trypsin	1	0.1	1	40	6.5
	2	0.3	2	45	7.0
	3	0.5	3	50	7.5
	4	0.7	4	55	8.0
	5	0.9	5	60	8.5
木瓜蛋白酶 Papain	1	0.5	1	40	6.0
	2	1.0	2	45	6.5
	3	1.5	3	50	7.0
	4	2.0	4	55	7.5
	5	2.5	5	60	8.0

选择水解度较高、条件差异较小的两种酶进行复合配比, 与单酶水解效果对比分析, 以便进行下一步试验。

1.2.3 HIL 蛋白胨和胰蛋白胨功能性状检测

起泡性和起泡稳定性、乳化性与乳化稳定性、可凝蛋白氮、胨氮和胨氮含量的测定参考文献[13]的方法。

1.2.4 HIL 蛋白胨及胰蛋白胨细菌学试验检测

硫化氢试验、靛基质试验(吲哚)、微生物 V-P 试验(乙酰甲基甲醇试验)、可发酵糖和生长营养试验的测定参考文献[27]的方法。

1.2.5 HIL 蛋白胨和胰蛋白胨对细菌生长效果的影响

细菌最适接种量的测定: 将大肠杆菌 ATCC 25922 种子液分别以 1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 和 5.0% 的接种量接种于 LB 液体培养基和 HIL 蛋白胨液体培养基中, 在 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 后, 于波长 600 nm 处测定吸光度, 确定最适接种量。

细菌生长曲线的测定: 将大肠杆菌 ATCC 25922 种子液以最适接种量分别接种于 LB 液体培养基和 HIL 蛋白胨液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 取样进行平板菌落计数, 以活菌数(CFU/mL)为纵坐标、以时间(h)为横坐标绘制生长曲线。

生长动力学参数的确定: 根据 Verhulst logistical 模型下 Ding 等^[28]的公式(2)确定不同培养基培养菌株的最大生物量浓度 X_{\max} 、最大比生长速率 μ_{\max} 和迟滞期 λ 。

$$X_t = \frac{X_{\max}}{1 + e^{2 + \mu_{\max}(\lambda - t)}} \quad (2)$$

式中, X_t 是时间过程中的生物量浓度(CFU/mL); X_{\max} 为生物量浓度最大值(CFU/mL); μ_{\max} 是最大比生长率(1/h); λ 为生长滞后时间(迟滞期)(h)。使用 OriginPro 2021 软件进行 X_{\max} 、 μ_{\max} 和 λ 的计算。

1.2.6 数据分析软件

试验原始数据用 Excel 整理后, 使用 SPSS 22.0 对数据进行统计处理, 试验结果用平均值±标准差表示; 使用 OriginPro 2021 (9.8.0.200) 进行生长曲线及拟合曲线绘制。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 四种酶添加量对 HIL 水解度的影响

如图 1 所示, 随着加酶量的增加, 4 种酶对

HIL 的水解度均呈现先增加后趋于平缓的趋势。原因可能是在反应开始的初期, 随着加酶量的增加, 反应体系中的游离氨基酸和多肽含量逐渐增加, 水解度逐渐升高; 随着水解反应的继续进行, 酶浓度逐渐达到饱和状态, 且过度的水解会增加反应体系的黏性, 阻碍底物与酶的结合, 导致水解速率降低。碱性蛋白酶、胰酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶的最适加酶量分别是 0.9% (质量分数, 下同)、0.5%、0.6% 和 1.0%, 其对应水解度分别为 7.34%、5.42%、11.88% 和 8.92%。相较于其他 3 种酶, 胰酶的最适加酶量最低且水解度最高。

2.1.2 时间对 4 种酶水解 HIL 水解度的影响

如图 2 所示, 随着时间的延长, 4 种蛋白酶对 HIL 蛋白的水解程度均呈现先升高后趋于平缓的趋势。在底物和加酶量一定的情况下, 随着时间的延长, 底物被逐渐消耗的同时, 酶活性逐渐降低, 反应位点逐渐被酶分子饱和; 中间复合物在经历了初始阶段的积累后达到稳态, 其浓度趋于恒定。碱性蛋白酶和胰蛋白酶在作用 4 h 时, 水解度分别为 8.26% 和 12.45%, 胰酶和木瓜蛋白酶在作用 4 h 时, 水解度分别为 18.66% 和 8.99%, 且碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解速度变化不显著, 胰酶和胰蛋白酶的水解速度变化显著。随着时间的延长, 胰酶的水解度迅速增加, 且当反应时间达到最适时, 其水解度最高, 因此相较于其他 3 种酶, 时间的变化对胰酶催化反应的影响效果更显著。

2.1.3 温度对 4 种酶水解 HIL 水解度的影响

随着温度的升高, 4 种蛋白酶对 HIL 蛋白的水解程度均呈现先上升后下降的趋势(图 3)。酶的催化反应速率受温度变化的双重影响: 一方面, 适当地升高反应体系的温度可增加酶结合基团和催化基团的活性, 从而加快酶水解速度; 另一方面, 随着反应体系温度的持续升高,

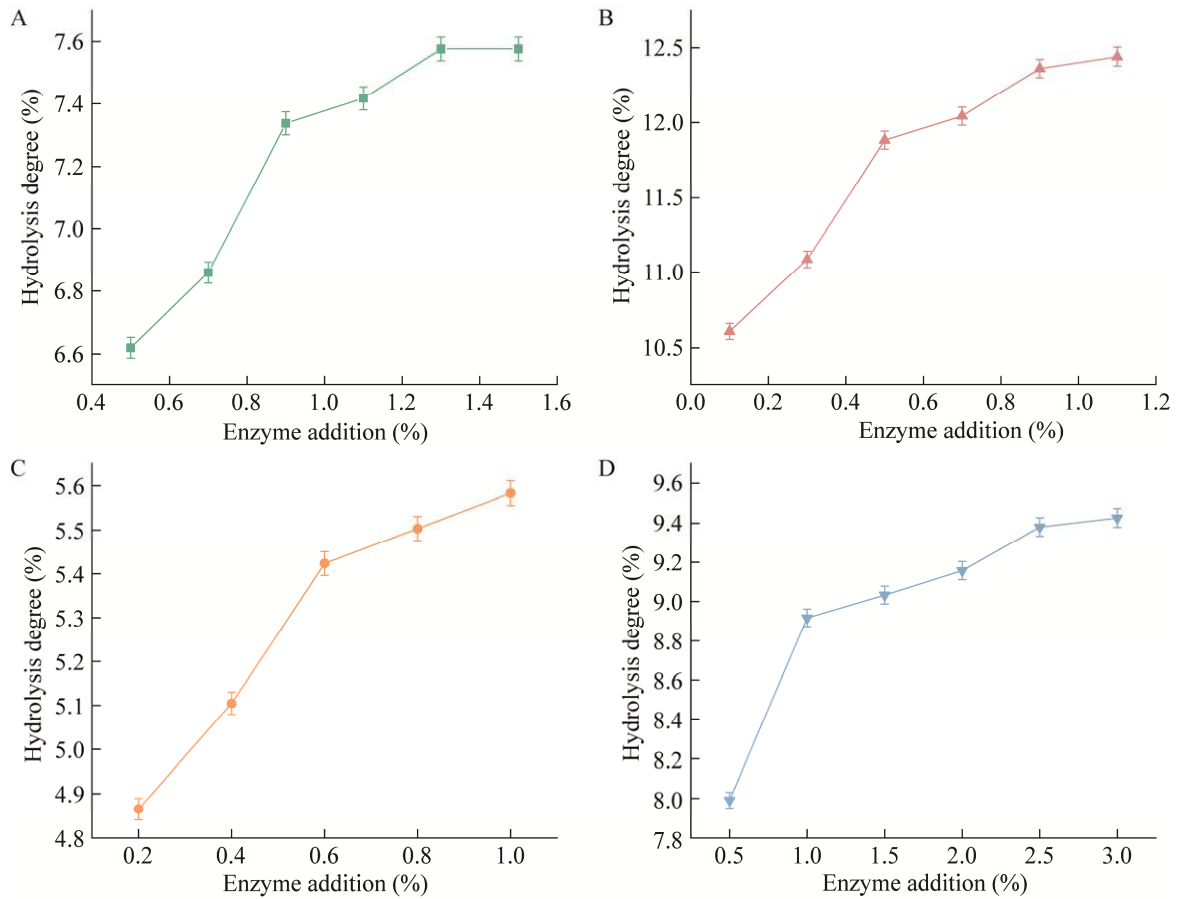


图 1 加酶量对 4 种酶水解度的影响

Figure 1 Effect of enzyme addition on the degree of hydrolysis of the four enzymes. A: Alkaline protease. B: Trypsin. C: Trypsase. D: Papain.

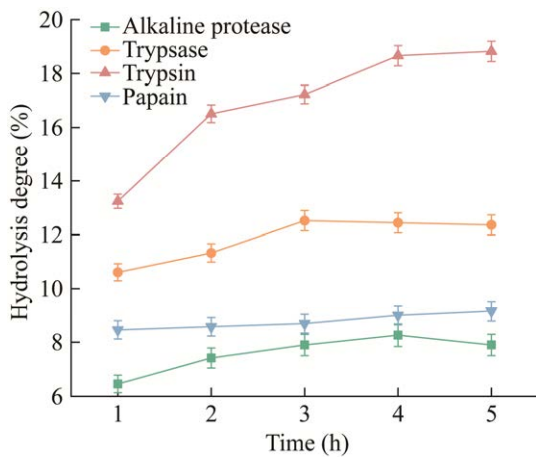


图 2 时间对 4 种酶水解度的影响

Figure 2 Effect of time on the degree of hydrolysis of the four enzymes.

酶分子中的蛋白结构吸收过多的能量, 导致非共价键断裂, 分子结构中次级键解体, 从而使酶变性失活, 导致反应速度减小。当反应体系的温度为 45 °C 时, 胰蛋白酶和胰酶的最大水解度分别为 9.49% 和 19.30%; 当温度为 55 °C 时, 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的最大水解度分别为 8.55% 和 8.75%, 且胰蛋白酶、碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解速度变化不显著, 胰酶的水解速度变化显著。相较于其他 3 种酶, 胰酶对反应体系的温度要求较低, 而其余 3 种酶对反应体系的温度要求较高, 因此从试验结果来看, 胰酶是水解脱脂 HIL 的最佳选择。

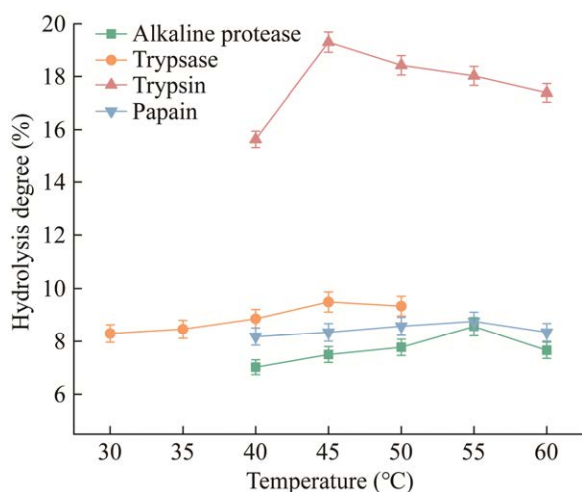


图3 温度对4种酶水解度的影响

Figure 3 Effect of temperature on the degree of hydrolysis of the four enzymes.

2.1.4 pH对4种酶水解HIL水解度的影响

如图4所示,随着pH的变化,4种蛋白酶对HIL蛋白的水解程度均呈现先增加后降低的趋势。蛋白酶催化蛋白发生水解反应时存在一定的最适pH,此时酶催化部位可解离的活性基团达到最充分的解离,酶与底物得到最大程度的结合,水解度达到最大值;而当超过该最适pH时,酶催化中心活性基团的解离受到产物的抑制,水解度逐渐降低。当pH值为7.0时,胰酶和木瓜蛋白酶达到水解度最大值,分别为17.39%和8.75%,当超过该pH值后,水解度迅速降低;当pH值为7.5时,碱性蛋白酶和胰蛋白酶的水解度达最大值,分别是9.25%和11.17%。因此,相较于其他3种酶,胰酶在最适pH值下的水解度最高。除胰蛋白酶之外,碱性蛋白酶、胰酶和木瓜蛋白酶这3种酶的水解速度变化均显著,pH的变化对这3种酶的催化反应效果更加显著。

由单因素试验结果预测最佳水解工艺为:复合酶(胰酶:碱性蛋白酶质量比为1:1)加酶量1.3%(质量分数)、pH 7.0、温度54 °C、作用时间4 h,此时水解度的理论值为20.78%。在该

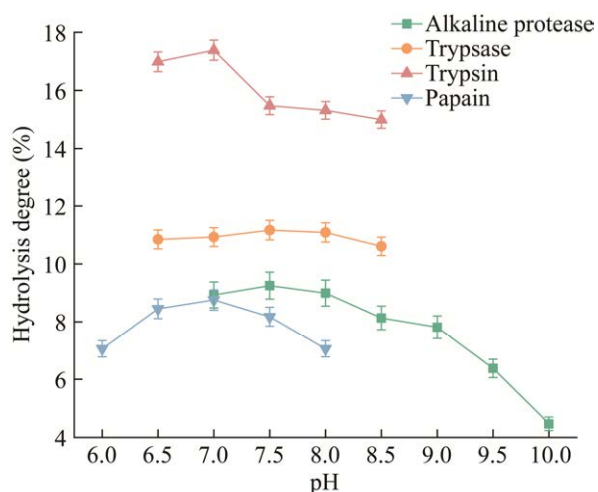


图4 pH对4种酶水解度的影响

Figure 4 Effect of pH value on hydrolysis degree of four enzymes.

条件进行3次验证性试验,得到脱脂HIL的水解度为 $19.34\% \pm 0.15\%$,与理论值的相对误差为6.93%,两者之间的差异不显著($P > 0.05$)。由此可见,本试验所得模型具有较高的可行性和较好的可靠性,可用于试验优化以获得最佳的水解工艺条件。因此确定碱性蛋白酶和胰酶对脱脂HIL的最佳水解工艺为加酶量1.3%(质量分数),pH 7.0、温度54 °C,作用时间4 h。

2.2 HIL蛋白胨和胰蛋白胨功能性状检测

2.2.1 蛋白胨起泡性和起泡稳定性测定结果

由图5可知,随着pH值的升高,图5A中HIL蛋白胨和胰蛋白胨的起泡性呈现先下降后上升的趋势,图5B中HIL蛋白胨和胰蛋白胨的起泡稳定性呈现先上升后下降的趋势。pH值在5.0左右时,两种蛋白胨达到等电点,此时起泡性最低,且起泡稳定性最高。对比两种蛋白胨可以看出,HIL蛋白胨虽然起泡性较高,但短时间所起的泡沫可大量消除,因此其更适合于微生物的培养。

2.2.2 蛋白胨乳化性和乳化稳定性测定结果

由图6A可知,随着pH值的升高,HIL蛋

白朊和胰蛋白朊的乳化性呈现先上升后下降的趋势,图 6B 中 HIL 蛋白朊和胰蛋白朊的乳化稳定性呈现先下降后上升的趋势。pH 在 5.0 左右时,两种蛋白朊达到等电点,此时乳化性最高,且乳化稳定性最低。对比 2 种蛋白朊可以看出,HIL 蛋白朊的乳化性和乳化稳定性均较高,说明 HIL 蛋白朊的分散性良好,高乳化性条件下可以促进油-水性乳状液的能力;同理,

乳化稳定性高也说明其维持乳状液稳定性的能力较强。

2.2.3 功能性状检测结果

如表 2 所示,HIL 蛋白朊和胰蛋白朊的氮和朊氮含量无显著差异($P>0.05$),反映了脱脂 HIL 制备的 HIL 蛋白朊质量与胰蛋白朊的质量基本一致,说明 HIL 蛋白朊可以达到微生物生长标准。

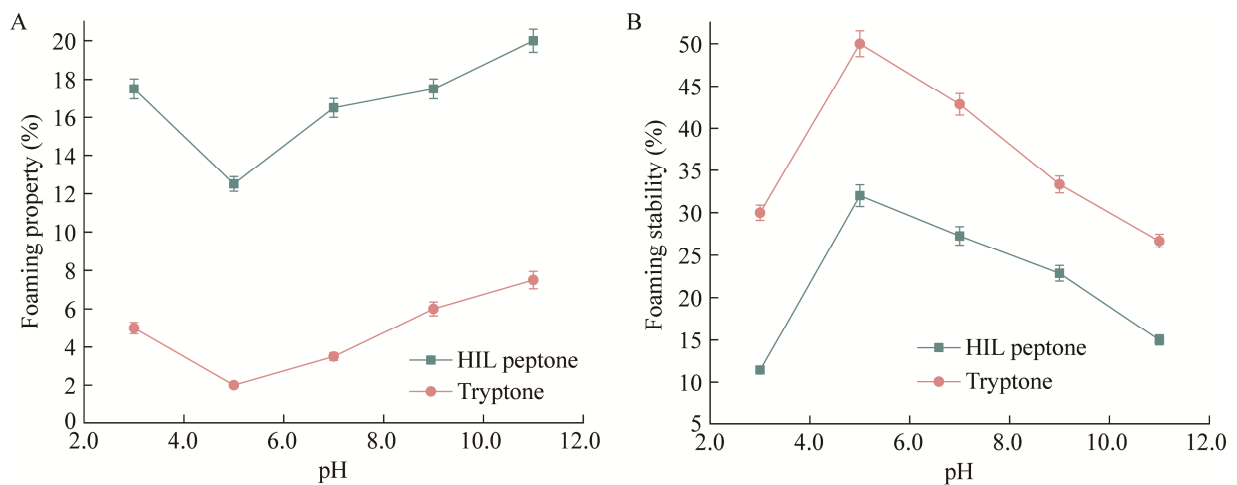


图 5 不同 pH 条件下两种蛋白朊的起泡性(A)和起泡稳定性(B)

Figure 5 Foaming property (A) and foaming stability (B) of two peptones at different pH values.

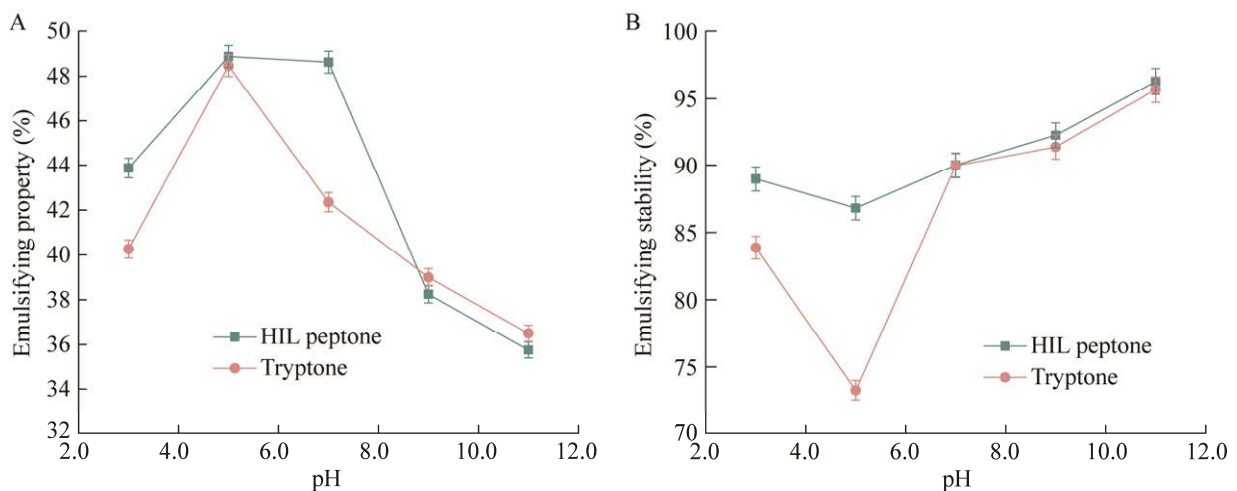


图 6 不同 pH 条件下两种蛋白朊的乳化性(A)和乳化稳定性(B)

Figure 6 Emulsifying property (A) and emulsifying stability (B) of two peptones at different pH values.

表 2 HIL 蛋白胨和胰蛋白胨功能性状检测结果
Table 2 Results of functional properties of HIL peptone and tryptone

项目	HIL 蛋白胨	胰蛋白胨
Item	HIL peptone	Tryptone
可凝蛋白氮	0.33±0.05b	0.43±0.04a
Coagulable protein nitrogen (%)		
胨氮 Nitrogen (%)	0.07±0.00a	0.05±0.00a
胨氮 Peptone nitrogen (%)	0.03±0.01a	0.03±0.01a

同行数据字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Different letters for peer data in the table indicate significant differences ($P < 0.05$), and the same letters indicate non-significant differences ($P > 0.05$).

2.3 HIL 蛋白胨和胰蛋白胨细菌学试验检测结果

如表 3 所示, 微生物在两种蛋白胨培养基上的生物化学试验结果一致。硫化氢试验中, 伤寒沙门氏菌产硫化氢, 呈阳性反应, 即醋酸铅试纸变为黑色, 生成硫化铅, 而志贺氏菌不产硫化氢, 呈阴性反应; 靛基质试验中, 大肠杆菌产靛基质, 呈阳性反应, 即试管内液面呈玫瑰红色, 乙型副伤寒沙门氏菌不产靛基质, 呈阴性反应; V-P 试验中, 产气肠杆菌产乙酰甲

基甲醇, 呈阳性反应, 即试管内液面应呈荧光红色, 大肠杆菌不产乙酰甲基甲醇, 呈阴性反应; 可发酵性糖试验中, 大肠杆菌和乙型副伤寒沙门氏菌不产酸产红, 呈阴性反应; 生长营养试验中, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌落直径均在 1.0 mm 以上, 即该菌株在两种蛋白胨培养基上的生长状况良好。综上所述, HIL 蛋白胨和胰蛋白胨均符合微生物学试验结果, 两种蛋白胨之间基本无差异, 因此可以利用 HIL 蛋白胨代替胰蛋白胨用于微生物的生长, 从而降低微生物的培养成本。

2.4 HIL 蛋白胨和胰蛋白胨对大肠杆菌 ATCC 25922 菌株生长的影响

2.4.1 大肠杆菌 ATCC 25922 最适接种量的测定结果

如图 7 所示, 随着接种量的增加, 大肠杆菌在 HIL 蛋白胨培养基和胰蛋白胨培养基中的生长情况总体呈现先上升后下降的趋势。当接种量在 2.0% (体积分数) 时, 大肠杆菌在 HIL 蛋白胨培养基的菌体浓度达到最大, OD_{600} 为 0.40; 当接种量大于 2.0% (体积分数) 时, 菌体浓度的变化趋势总体呈下降趋势; 当接种量在

表 3 HIL 蛋白胨和胰蛋白胨细菌学试验检测结果

Table 3 Bacteriological test results of HIL peptone and tryptone

项目	培养基	菌株	HIL 蛋白胨	胰蛋白胨
Project	Culture medium	Strain	HIL peptone	Tryptone
Hydrogen sulfide test	1% peptone medium	<i>Salmonella paratyphoid</i> B GDMCC1.224	+	+
		<i>Shigella dysenteriae</i> GDMCC1.236	-	-
Indigo matrix test		<i>Escherichia coli</i> 8099 GDMCC1.180	+	+
		<i>Salmonella paratyphoid</i> B GDMCC1.224	-	-
V-P reaction	Phosphate peptone medium	<i>Enterobacter aerogenes</i> GDMCC1.544	+	+
		<i>Escherichia coli</i> 8099 GDMCC1.180	-	-
Fermented sugar test	Acid fuchsin peptone medium	<i>Escherichia coli</i> 8099 GDMCC1.180	-	-
		<i>Salmonella paratyphoid</i> B GDMCC1.224	-	-
Growth nutrition test	2% peptone agar medium	<i>Escherichia coli</i> 8099 GDMCC1.180	Colony diameter > 1.0 mm, smooth surface	
		<i>Staphylococcus aureus</i> GDMCC1.441	Colony diameter > 1.0 mm, smooth surface	

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

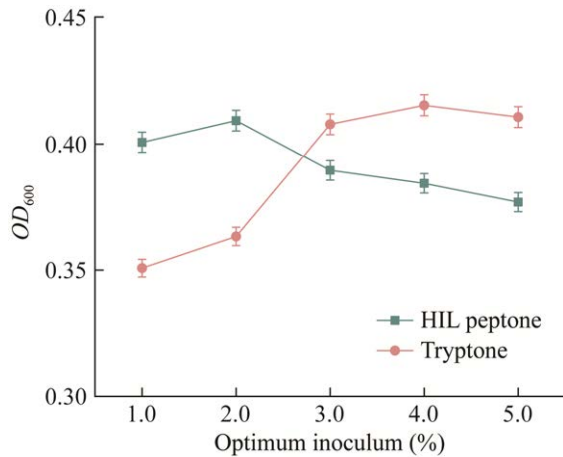


图7 大肠杆菌 ATCC 25922 最适接种量的测定
Figure 7 Determination of the optimum inoculum for *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.0% (体积分数)时, 大肠杆菌在胰蛋白胨培养基中的菌体浓度最大, OD_{600} 为 0.42; 当接种量大于 4.0% (体积分数)时, 菌体浓度开始降低。菌株的生长繁殖速度受接种量的影响, 接种量越小, 菌株的延滞期越长, 反之则越短。然而当接种量过大时, 培养基中的营养成分一定的条件下, 过大的接种量会导致培养基中的营养物质短时间内被迅速消耗, 同时代谢废物大量积累, 从而对菌株生长产生抑制作用, 菌株大量死亡, 菌体浓度迅速降低。

2.4.2 大肠杆菌 ATCC 25922 生长曲线的测定结果

将大肠杆菌 ATCC 25922 的种子液以最适接种量 2.0% (体积分数)接种到 HIL 蛋白胨液体培养基, 以最适接种量 4.0% (体积分数)接种于 LB 液体培养基中。每 2 h 进行生长曲线的测定与计算。根据菌株生长数据计算得到的生长动力学参数如表 4 所示。

如图 8 所示, 大肠杆菌在两种蛋白胨培养基中的生长经历了 3 个阶段: 延滞期、对数生长期和稳定期。在最初的 2 h, 菌株生长较为缓慢, 然后在 2–10 h 之间生长速度加快, 这期间

表 4 根据 Logistic 模型公式计算生成的生长动力学参数结果

Table 4 Results of growth kinetic parameters generated according to the logistic model formulation

生长动力学参数 Growth kinetics parameters	胰蛋白胨 Tryptone	HIL 蛋白胨 HIL peptone
μ_{\max} (h^{-1})	0.65±0.04a	0.93±0.12b
X_{\max} (CFU/mL)	6.44±0.06a	6.14±0.09a
λ (h)	2.45±0.21a	3.19±0.30a
R^2_{adj}	0.996 2	0.989 4

同行数据字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters for peer data in the table indicate significant differences ($P < 0.05$).

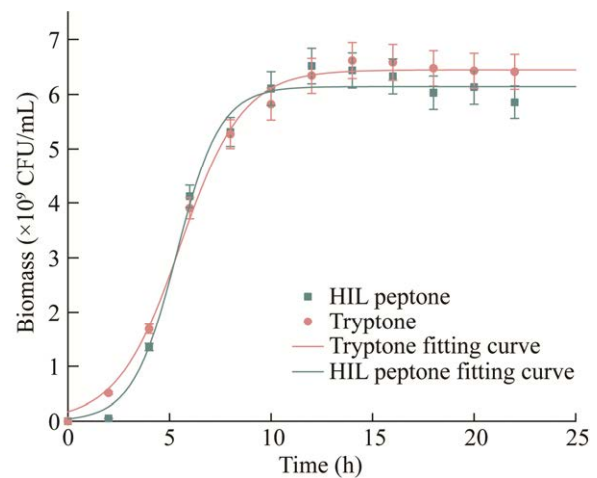


图8 大肠杆菌 ATCC 25922 生长动力学模型拟合值与试验值比较 散点图为试验数据; 折线图根据生长动力学参数采用等式(2)拟合生成

Figure 8 Growth curve and fitting curve of *Escherichia coli* ATCC 25922. The scatter diagram is the experimental data; The line diagram is generated by fitting equation (2) according to the growth kinetic parameters.

菌株的代谢活跃, 细菌以分裂的方式繁殖, 菌液浓度增加, 生长速率达到最大。之后的 10 h, 菌株的生长进入了稳定期, 培养基中的营养成分无法维持菌株的生长, 生长和死亡达到动态平衡。在 HIL 蛋白胨培养基中, 大肠杆菌在 12 h 时的生物量达到了 6.51×10^9 CFU/mL 的

最大值, 而胰蛋白胨培养基中则在 14 h 达到了 6.61×10^9 CFU/mL 的最大生物量。表 4 中 HIL 蛋白胨培养的大肠杆菌的最大生长速率(μ_{\max})为 0.93 h^{-1} , 相较于胰蛋白胨培养的 μ_{\max} (0.65 h^{-1}) 增长 43.07%, 并且这种差异是显著的($P < 0.05$), 但最大生物量(X_{\max})和延迟期(λ)的差异并不显著($P > 0.05$)。总体来看, 大肠杆菌在自制的 HIL 蛋白胨培养基中的最大生长速率略高于在胰蛋白胨培养基, 但在整体的培养过程中, 两者的生长效果相差不大。因此可以得出结论, 由亮斑扁角水虻幼虫粉制备的蛋白胨可以替代胰蛋白胨作为微生物培养基的成分。这一研究结果为微生物培养基的制备提供了新的思路, 也为亮斑扁角水虻幼虫粉的利用提供了新的可能。

3 结论

在这项研究中, 以亮斑扁角水虻幼虫粉为原料, 通过碱性蛋白酶和胰酶(碱性蛋白酶:胰酶质量比为 1:1)的复合酶解工艺, 制备出了 HIL 蛋白胨。利用亮斑扁角水虻幼虫粉(HIL)为原料, 并通过复合酶的水解过程, 我们制备了 HIL 蛋白胨。通过优化水解工艺条件, 即加酶量 1.3% (质量分数)、pH 7.0、温度 $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 、作用时间 4 h, 实现了 $19.34\% \pm 0.15\%$ 的水解度。与传统的胰蛋白胨相比, 试验结果表明, HIL 蛋白胨在功能性状和生物化学性质上无显著差异。在对大肠杆菌 ATCC 25922 的培养试验中, 发现 HIL 蛋白胨培养基的最适接种量为 2.0% (体积分数), 而传统的胰蛋白胨培养基的最适接种量为 4.0% (体积分数)。这一结果表明, HIL 蛋白胨在作为培养基的效能上并不逊色于传统的胰蛋白胨, 甚至在某些方面表现出更优良的性质。同时构建了菌体生长动力学模型, 模拟了菌体在培养过程中的动态变化, 进一步确认了 HIL 蛋白胨作为微生物培养基的潜力。本研究为微生物培

养基的制备提供了新的思路, 也为废弃的亮斑扁角水虻幼虫粉的利用提供了新的可能。HIL 蛋白胨具有成为一种高效、经济的微生物培养基的潜力, 有望替代传统的胰蛋白胨培养基。这将对相关产业的发展和进步产生积极影响, 促进亮斑扁角水虻资源的高值化利用, 从而获得显著的环境、经济和社会效益。未来将继续深化对 HIL 制备蛋白胨的工艺优化, 研究更多种类微生物在 HIL 蛋白胨培养基中的生长特性, 以及 HIL 蛋白胨在其他应用方面的潜力。

REFERENCES

- [1] 纪佳雨, 邓玲聪, 李广东, 李佩玉, 许道军. 黑水虻的资源价值化及其开发应用研究进展[J]. 经济动物学报, 2021, 25(1): 42-50.
JI JY, DENG LC, LI GD, LI PY, XU DJ. Research advance on resource value, exploitation and application of black soldier fly[J]. Journal of Economic Animal, 2021, 25(1): 42-50 (in Chinese).
- [2] 李鑫. 黑水虻生长条件优化及处理餐厨垃圾的效能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2021.
LI X. Optimization of growth conditions of *Hermetia illucens* and study on efficiency of food waste treatment[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2021 (in Chinese).
- [3] SPRANGHERS T, OTTOBONI M, KLOOTWIJK C, OVYN A, DEBOOSERE S, de MEULENAER B, MICHIELS J, EECKHOUT M, de CLERCQ P, de SMET S. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(8): 2594-2600.
- [4] LIU ZY, MINOR M, MOREL PCH, NAJAR-RODRIGUEZ AJ. Bioconversion of three organic wastes by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae[J]. Environmental Entomology, 2018, 47(6): 1609-1617.
- [5] AL-QAZAZ MFA, ISMAIL D, AKIT H, IDRIS LH. Effect of using insect larvae meal as a complete protein source on quality and productivity characteristics of laying hens[J]. Revista Brasileira De Zootecnia, 2016, 45(9): 518-523.

- [6] RUHNKE I, NORMANT C, CAMPBELL DLM, IQBAL Z, LEE C, HINCH GN, ROBERTS J. Impact of on-range choice feeding with black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) on flock performance, egg quality, and range use of free-range laying hens[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(4): 452-460.
- [7] 林启训, 吴珍泉. 水虻幼虫作为鱼饲料的营养评价[J]. *饲料工业*, 1999, 20(4): 39-40.
LIN QX, WU ZQ. Nutritional evaluation of water fly larvae as fish feed[J]. *Feed Industry*, 1999, 20(4): 39-40 (in Chinese).
- [8] MOHAN K, RAJAN DK, MURALISANKAR T, GANESAN A, SATHISHKUMAR P, REVATHI N. Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: a review of past and future needs[J]. *Aquaculture*, 2022, 553: 738095.
- [9] 陈永康, 郑朝中, 章双, 迟淑艳, 董晓慧, 杨奇慧, 刘泓宇, 谭北平, 谢诗玮. 黑水虻幼虫粉对凡纳滨对虾生长、免疫和脂质代谢的影响[J]. *水生生物学报*, 2023, 47(2): 269-278.
CHEN YK, ZHENG CZ, ZHANG S, CHI SY, DONG XH, YANG QH, LIU HY, TAN BP, XIE SW. Dietary black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on growth performance, non-specific immunity and lipid metabolism of *litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(2): 269-278 (in Chinese).
- [10] EWALD N, VIDAKOVIC A, LANGELAND M, KIESSLING A, SAMPELS S, LALANDER C. Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*)-possibilities and limitations for modification through diet[J]. *Waste Management*, 2020, 102: 40-47.
- [11] SECCI G, BOVERA F, NIZZA S, BARONTI N, GASCO L, CONTE G, SERRA A, BONELLI A, PARISI G. Quality of eggs from lohmann brown classic laying hens fed black soldier fly meal as substitute for soya bean[J]. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 2018, 12(10): 2191-2197.
- [12] CULLERE M, WOODS MJ, Van EMMENES L, PIETERSE E, HOFFMAN LC, DALLE ZOTTE A. *Hermetia illucens* larvae reared on different substrates in broiler quail diets: effect on physicochemical and sensory quality of the quail meat[J]. *Animals*, 2019, 9(8): 525.
- [13] 侯力箫. 鸡副产物制备复合蛋白胨及其性质研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2017.
HOU LX. Study on the preparation and properties of compound peptone from chicken by-products[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2017 (in Chinese).
- [14] 王锡念, 徐志善, 孙钦军, 包建强. 超声波辅助酶解提取鮫鳃鱼皮胶原蛋白的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(1): 175-180.
WANG XN, XU ZS, SUN QJ, BAO JQ. Optimization of ultrasonic assisted enzymatic extraction of collagen from fish skin of Lophiiformes[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(1): 175-180 (in Chinese).
- [15] 贾恬. 黄秋葵籽蛋白提取、纯化及特性研究[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2018.
JIA T. Extraction, Purification and characteristics of okra seed protein[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2018 (in Chinese).
- [16] 高海燕, 石丹, 王彩云, 云战友, 李婷. 利用复合酶技术制备乳清蛋白胨的工艺研究[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(2): 97-100.
GAO HY, SHI D, WANG CY, YUN ZY, LI T. Study on the preparation of lactalbumin hydrolysate by composite proteases[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(2): 97-100 (in Chinese).
- [17] 隋伟, 张连富. 酶解虾加工下脚料工艺的研究[J]. *中国调味品*, 2005, 30(12): 54-57, 53.
SUI W, ZHANG LF. Study on the hydrolyzing technology of shrimp offal by proteinase[J]. *China Condiment*, 2005, 12(12): 54-57, 53 (in Chinese).
- [18] FALLAH M, BAHRAM S, JAVADIAN SR. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media[J]. *Food Science & Nutrition*, 2015, 3(2): 153-157.
- [19] CHAPMAN M, MARIANO K, MACREADIE I. Lupin peptone as a replacement for animal-derived peptone in rich culture media for yeast[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 109: 39-40.
- [20] 刘艳红, 李颖, 吕淑霞. 沙门氏菌和大肠杆菌耐药性的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(10): 88-90.
LIU YH, LI Y, LV SX. Research progress on drug resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli*[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(10): 88-90 (in Chinese).
- [21] 栾君笑, 刘志昌, 佟长青, 曲敏, 李伟, 金桥. 酶解法制备鲮鱼骨蛋白胨及其细菌培养试验[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(22): 84-87.

- LUAN JX, LIU ZC, TONG CQ, QU M, LI W, JIN Q. Preparation of peptone from flatfish bone using pepsin and bacterial culture experiment[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(22): 84-87 (in Chinese).
- [22] 孙文敬, 辛晓亚, 郭文杰, 崔凤杰, 方颂平, 朱本国, 冯岳琴, 夏统前. 小麦蛋白胨促进乳酸菌增殖的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(3): 66-72.
- SUN WJ, XIN XY, GUO WJ, CUI FJ, FANG SP, ZHU BG, FENG YQ, XIA TQ. Promoting growth of four lactic acid bacteria by using prepared wheat peptones[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(3): 66-72 (in Chinese).
- [23] 王国霞, 陈冰, 孙育平, 胡俊茹, 彭凯, 吴浩敏, 黄燕华. 脱脂亮斑扁角水虻幼虫粉替代鱼粉对黄颡鱼幼鱼生长性能、营养素沉积率、血清生化指标和消化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2020, 44(6): 987-998.
- WANG GX, CHEN B, SUN YP, HU JR, PENG K, WU HM, HUANG YH. Effects of replacing fish meal with defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal on growth performance, nutrient retention, serum biochemical parameters and digestive enzymes activity of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(6): 987-998 (in Chinese).
- [24] 韩学燕, 李宗文, 杨生忠, 谈有金, 陈虎, 曹效海. 酶法水解牦牛血制备蛋白多肽粉的技术研究[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(17): 115-121.
- HAN XY, LI ZW, YANG SZ, TAN YJ, CHEN H, CAO XH. Hydrolysis of yak blood protein into polypeptide with protease[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(17): 115-121 (in Chinese).
- [25] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standards-Determination of protein in foods GB 5009.5—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).
- [26] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定 GB 5009.235—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standard-Determination of amino acid nitrogen in food GB 5009.235—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).
- [27] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- CHEN TS. Manufacture and Application of Microbial Culture Medium[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995 (in Chinese).
- [28] DING GT, YAAKOB Z, TAKRIFF MS, SALIHON J, ABD RAHAMAN MS. Biomass production and nutrients removal by a newly-isolated microalgal strain *Chlamydomonas* sp in palm oil mill effluent (POME)[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, 41(8): 4888-4895.