

柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料研究*

余文华,李洁芝,张其圣,陈 功

(四川省食品发酵工业研究设计院,四川 成都,611130)

摘 要 以柑橘废渣为原料生产单细胞蛋白饲料,采用 Plackett-Burman 实验设计法分析筛选主要影响因素,然后采用中心组合设计方法考察其交互作用对单细胞蛋白饲料的真蛋白含量的影响规律及相应的响应分析图,并预测最优化发酵条件。实验结果表明:发酵温度、接种量及尿素添加量,且影响程度为尿素>发酵温度>接种量,当发酵温度为 30.1℃,接种量为 14.4%,尿素添加量为 1.8%时,柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料真蛋白含量最大。该工艺有效利用了柑橘废渣,并获得了真蛋白含量较高的单细胞蛋白饲料。

关键词 柑橘废渣,单细胞蛋白饲料,Plackett-Burman 实验设计,中心组合设计,响应面分析

我国是产橘大国^[1],柑橘加工后废渣占果实质量的 25%~50%,且含有丰富的碳水化合物、脂肪、维生素、氨基酸和矿物质等营养成分^[2~4]。但我国对柑橘废渣利用较少,多作为废弃物处理^[5]。以柑橘废渣为原料,利用微生物发酵生产蛋白饲料,对解决我国蛋白饲料资源短缺、提高水果种植及加工效益、减少环境污染均有重要的意义^[7]。近年来,吴厚玖等^[5]对柑橘废渣发酵饲料用菌种,化学成分、喂养效果等进行了初步研究;曾虹燕^[6]、尤希凤^[4]等人主要从柑橘废渣发酵菌种筛选、发酵培养基和发酵工艺上进行了探讨。笔者在前期研究基础之上^[17],利用已筛选的复合菌种,即黑曲霉和产朊假丝酵母,对柑橘废渣发酵生产单细胞蛋白饲料的工艺进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌 种

黑曲霉 3.287,购自四川省工业微生物菌种保藏管理中心(SICC)。

产朊假丝酵母 2.525,购自四川省工业微生物菌种保藏管理中心(SICC)。

1.1.2 培养基^[9]

黑曲霉活化培养基:PDA 培养基;黑曲霉液体种子培养基:淀粉培养基;酵母菌活化培养基:5Be 麦芽汁琼脂培养基;酵母菌液体种子培养基:5Be 麦芽汁液体培养基;柑橘废渣发酵培养基:收集本所中试车间 FMC 柑橘榨汁机榨汁后的皮渣(含种子、囊衣)粉

碎至适当大小,再加入尿素、麸皮等调配均匀后即发酵培养基。

1.1.3 主要仪器

KDN-04A 凯式定氮仪;Nikon 显微镜;恒温培养箱、电热恒温鼓风干燥箱等。

1.2 实验设计与方法

1.2.1 实验设计^[14~16]

采用 Plackett-Burman 设计、中间组合设计。

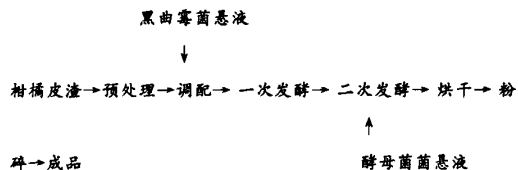
1.2.2 菌悬液制备

黑曲霉菌悬液的制备 将斜面菌种接种于液体淀粉培养基中,在 30℃下,摇瓶培养 4d,镜检细胞数为 10^7 /mL。

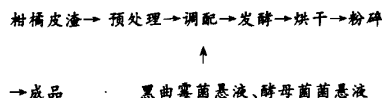
酵母菌悬液的制备 将斜面菌种接入 5Be 麦芽汁液体培养基中,28℃下,摇瓶培养 2d,镜检细胞数为 10^8 /mL。

1.2.3 发酵工艺路线

(1) 双菌株 2 次发酵工艺



(2) 双菌株 1 次发酵工艺



1.2.4 测定指标

真蛋白质的测定:硫酸铜沉淀法^[11~13]。

1.2.5 数据的统计分析

利用 SAS V8 数据统计分析软件对试验结果进行分析。

第一作者:学士,高级工程师(陈功通讯作者)。

* 四川省科技厅重点攻关项目(No. 2006Z06-006-01)

收稿日期:2008-11-30

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 设计结果与分析

研究表明,影响柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料的可能因素包括碳源、氮源、水分含量、发酵周期、发酵

温度、接种量、接种方式(工艺路线)等 10 个因素,选取 N=12 的 Plackett-Burman 设计,每个因素取两个水平,低水平“-”为初始出发条件,“+”为高水平,实验设计及结果见表 1。

表 1 N=12 的 Plackett-Burman 实验方案与结果

试验编号	自变量代码										真蛋白含量/%
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	14.60
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	15.50
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	16.10
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	16.12
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	15.70
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	20.96
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	22.46
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	14.12
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	15.77
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	17.57
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	20.55
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.30

运用 SAS 软件对表 1 的实验设计进行回归分析,并进行方差分析检验(含有字母的以 0 或 1 代替),结果见表 2。从表 2 可以看出较为重要的几个

因素(可信度>90%)为发酵温度、尿素添加量和接种量,可作进一步研究,而其他几个因素可信度均<90%。

表 2 Plackett-Burman 设计各因素水平选择及重要性评价

代码	因素	低水平(-1)	高水平(+1)	t 检验	大于 t 概率	重要性排列
X ₁	初始 pH 值	4	6	-0.63	0.640 1	7
X ₂	尿素添加量/%	1	2	1.79	0.324 6	2
X ₃	麸皮添加量/%	10	15	0.85	0.551 4	4
X ₄	水分含量/%	70	80	-0.10	0.933 5	10
X ₅	发酵周期/d	4	10	-0.68	0.619 3	6
X ₆	发酵温度/℃	20	30	2.70	0.226 0	1
X ₇	接种量/%	10	20	0.98	0.506 2	3
X ₈	工艺路线 ¹⁾	A	B	-0.42	0.746 6	8
X ₉	有无灭菌 ²⁾	YES	NO	0.37	0.774 6	9
X ₁₀	好氧发酵/ 微好氧发酵 ³⁾	A	B	-0.73	0.596 8	5

注:1) A 代表双菌株 1 次发酵工艺,B 代表双菌株 2 次发酵工艺;2) YES 代表发酵培养基需灭菌,NO 代表发酵培养基未用灭菌处理;3) A 代表好氧发酵,B 代表微好氧发酵。

2.2 Box-Behnken 中心组合设计结果与分析

以发酵温度、接种量、尿素添加量作为自变量(X₁,X₂,X₃),以不同条件交互作用下的真蛋白含量作为响应值(Y),实验设计的因素水平见表 3,实验方案与结果见表 4。

表 3 中心组合设计的因素水平表

编码	因素	-1	0	1
X ₁	发酵温度/℃	25	30	35
X ₂	接种量/%	10	15	20
X ₃	尿素添加量/%	1	1.5	2

表 4 中心组合设计的实验方案与结果

实验编号	X ₁	X ₂	X ₃	真蛋白含量/%
1	-1	-1	0	21.39
2	-1	0	-1	19.38
3	-1	0	1	22.46
4	-1	1	0	23.45
5	0	-1	-1	18.40
6	0	-1	1	25.82
7	0	1	-1	20.55
8	0	1	1	25.40
9	1	-1	0	22.83
10	1	0	-1	19.00
11	1	0	1	22.80
12	1	1	0	21.14
13	0	0	0	25.09
14	0	0	0	26.02
15	0	0	0	24.40

利用 SAS 软件对表 4 实验结果进行回归分析, 所得的回归方程为 $Y = 25.17 - 0.04375X_1 + 0.08875X_2 + 1.7975X_3 - 2.3X_1^2 + 0.75X_1X_2 + 0.5425X_1X_3 - 1.2X_2^2 - 0.6425X_2X_3 - 1.427X_3^2$, 回归方程的方差分析结果见表 5。可以看出回归方程的失拟项没有达到显著水平 ($P > 0.05$), 表明回归方程中无失拟项存在, 预测值与实际值拟合效果好; 一次项、二次项达到或超过显著水平, 说明不同因素对单细胞蛋白饲料的真蛋白含量有显著的影响, 而交互作用 (交互项 $P > 0.05$) 对单细胞蛋白饲料的真蛋白含量作用不明显, 因此各实验因子对响应值得影响不是简单的线性关系; 回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9407$, 表明回归方程可较准确地预测不同条件下单细胞蛋白饲料的真蛋白含量。

表 5 响应面回归方程的方差分析结果

方差来源	自由度	平方和	F 值	P 值	显著性
一次项	3	46.50	14.70	0.0065	**
二次项	3	31.83	10.07	0.0147	*
交互项	3	5.30	1.67	0.2862	
失拟项	3	3.95	1.99	0.3515	
纯误差	2	1.32			
总误差	5	5.27			

注: ** 表示极显著水平 ($P < 0.01$); * 表示显著水平 ($P < 0.05$)

对不同条件下单细胞蛋白饲料的真蛋白含量进行方差分析结果见表 6。可以看出, 尿素达到极显著水平 ($P < 0.01$), 表明尿素对于单细胞蛋白饲料的真蛋白含量有极显著影响; 发酵温度达到显著水平 ($P < 0.05$), 表明发酵温度对于单细胞蛋白饲料的真蛋白含量有显著影响; 而接种量未达到显著水平 ($P > 0.05$), 对于单细胞蛋白饲料的真蛋白含量无显著影响。同时 F 值的大小可得各条件对单细胞蛋白饲料的真蛋白含量影响程度依次为: 尿素添加量 > 发酵温度 > 接种量。

表 6 不同条件因子的方差分析

方差来源	自由度	平方和	F 值	P 值	显著性
发酵温度/℃	4	23.28	5.52	0.0445	*
接种量/%	4	7.36	1.75	0.2762	
尿素添加量/%	4	61.81	14.66	0.0057	**

注: ** 表示极显著水平 ($P < 0.01$); * 表示显著水平 ($P < 0.05$)。

图 1~图 3 为响应面分析的响应面图和等高线图, 从图中可直观地看出各因子对响应值的影响变化趋势, 而回归模型确实存在最大值, 分析结果表明, Y 的最大估计值为 25.9, 稳定点 (X_1, X_2, X_3) 的代码值为 (0.0257, -0.1258, 0.6324), 对应的实际值为:

发酵温度 (X_1) = 30.1℃, 接种量 (X_2) = 14.4%,

尿素添加量 (X_3) = 1.8%。

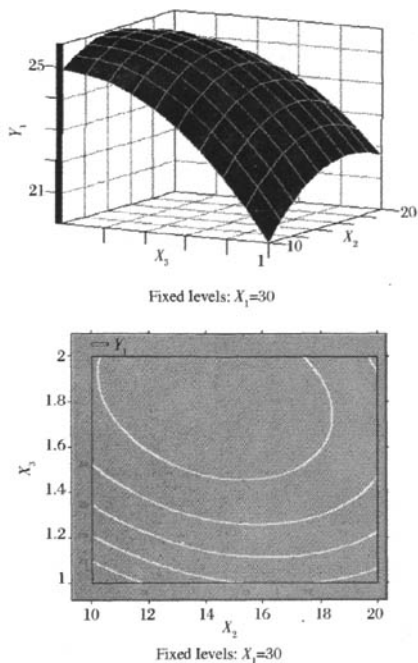


图 1 接种量和尿素添加量交互影响真蛋白含量的响应面图和等高线图

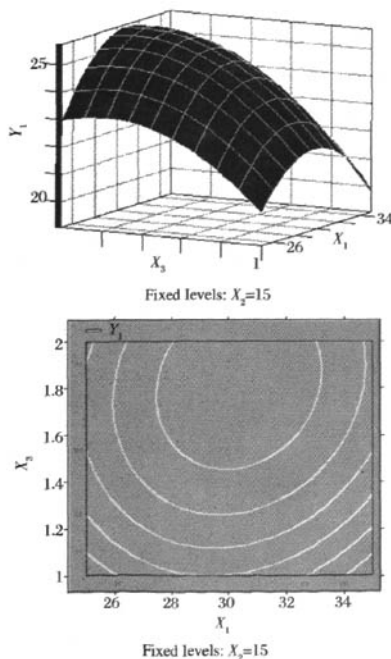


图 2 发酵温度合尿素含量交互影响真蛋白含量的响应面图和等高线图

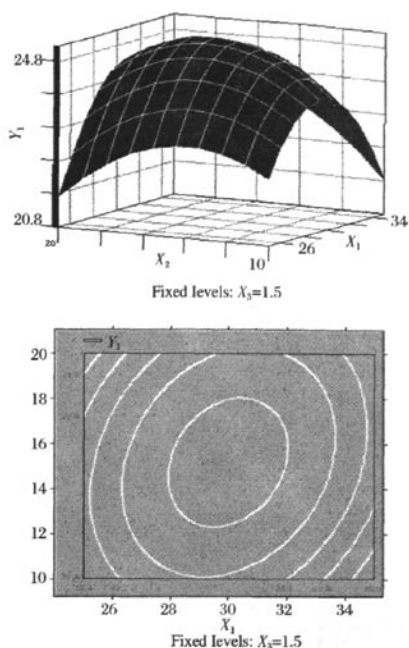


图3 接种量和尿素添加量交互影响真蛋白含量的响应面图和等高线图

2.3 验证试验

按照上述结果进行验证实验,得到实际的单细胞蛋白饲料的真蛋白含量为26.02%,结果与模型预测基本抑制,表明所得模型具有一定的试验指导意义。

3 结论

影响柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料真蛋白含量较为重要的3个因素分别为发酵温度,尿素添加量和接种量,其中尿素的影响达到极显著水平,发酵温度的影响为显著水平,而接种量的影响不显著,其影响程度依次为:尿素>发酵温度>接种量。利用所建立

的响应面回归方程可以较为准确的预测不同条件下柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料真蛋白含量,当发酵温度为30.1℃,接种量为14.4%,尿素添加量为1.8%时,为柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料的最优工艺。论文研究结果为柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料提供了有益的研究是手段和参考思路。

参考文献

- 1 王文娟,汪水平. 柑橘渣的综合利用[J]. 中国饲料,2004,(4):30~33
- 2 吴厚坎,焦必林,王 华,等. 柑桔皮渣发酵饲料中间试验研究[J]. 中国饲料,1997,(17):37~39
- 3 尤希凤,惠明,杨锦才. 柑桔渣微生物发酵生产蛋白饲料的研究[J]. 饲料研究,2000,(12):19~20
- 4 吴厚坎,孙志高,王华. 试论我国柑桔加工业发展方向[J]. 食品与发酵工业,2006,(4):85~89
- 5 曾虹燕. 利用柑桔废料生产高蛋白饲料的研究[J]. 湘潭大学自然科学学报,1994,16(3):76~80
- 6 张继,武光明,王文强,等. 单细胞蛋白饲料研究进展[J]. 饲料工业,2006,27(19):50~52
- 7 沈 萍,范秀容,李广武. 微生物学试验[M]. 北京:高等教育出版社,1999. 214~227
- 8 贺克勇,薛泉宏,司美茹. 苹果渣发酵饲料蛋白质含量的影响因素研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(4):83~87
- 9 王峻峰. 饲料中真蛋白质含量的测定方法[J]. 广东饲料,2004,13(6):37~38
- 10 王文芹,田晓燕,井金峰. 真蛋白质含量的测定[J]. 发酵科技通讯,2005,34(1):37
- 11 麻益良,秦良吉,刘树年. 饲料真蛋白质含量的测定[J]. 山东家禽,1999,(5):17~19
- 12 刘够生,石 磊,于建国,等. 基于响应面的泔水样培养单细胞蛋白培养基的优化[J]. 食品与发酵工业,2003,29(10):15~18
- 13 Akhnazarova S, Kafarov V. Experimental optimization in chemistry and chemical engineering[M]. Moscow: MIR Publishers, 1982
- 14 梅乐和,胡 升,许 静,等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J]. 浙江大学学报(工学版),2004,(10):1355~1360
- 15 余文华,陈功,李洁芝,等. 双菌株发酵柑橘废渣生产单细胞蛋白饲料研究[J]. 四川食品与发酵,2007,(增刊),78~81

Research on the Single Cell Protein Feed by Citrus Waste Residue

Yu Wenhua, Li Jiezhi, Zhang Qisheng, Chen Gong

(Sichuan Academy of Food and Fermentation Industry, Chengdu 611130, China)

ABSTRACT Citrus waste residue was used to produce single cell protein feed. Main influencing factors were selected through Plackett-Burman design. The responsive analysis tables of the main influencing factors were evaluated by central composite design. The results showed that urea content, fermentation temperature, and inoculation were the main influencing factors. The order was Urea content > fermentation temperature > inoculation sorted by the influence. Ultimate protein was detected in the single cell protein feed produced under the temperature 30.1℃, urea 1.8%, and inoculation 14.4%. Single cell protein feed with high content of protein can be obtained by citrus waste residue using such technology.

Key words citrus waste residue, single cell protein, Plackett-Burman experiment design, central composite design, response surface analysis