

夏橙皮渣产单细胞蛋白菌种筛选和发酵条件的优化*

赵 蕾,张克英,丁雪梅,刘雅石,吕 刚

(四川农业大学动物营养研究所,四川省饲料工程中心,四川 雅安 625014)

摘 要 以夏橙加工果汁的下脚料皮渣为原料,筛选生产 SCP(单细胞蛋白)的适宜菌种和发酵条件。试验中共选用了 10 种酵母和霉菌,以发酵产物蛋白质含量为指标,首先进行单菌和混合菌筛选,然后采用 4 因素 3 水平正交试验研究适宜的发酵条件。适宜的菌株配伍为:产朊假丝酵母 1807—黑曲霉 2281—里氏木霉 56765。正交试验结果表明:含水量、发酵时间对发酵后粗或真蛋白质含量均有极显著($P<0.01$)影响,适宜发酵条件为:时间 3~4 d,接种比例 2:1:1 或 3:2:1,接种量 10%左右,含水量 65%;经过发酵,夏橙皮渣粗蛋白质含量为发酵前的 3 倍,由 10%左右增加到 30%以上,真蛋白含量增加 45%左右。

关键词 夏橙皮渣,SCP,假丝酵母,霉菌,菌种筛选,生产工艺

单细胞蛋白(single cell protein, SCP)是指通过培养大量细菌、酵母、真菌或藻类,从中提取出的蛋白质或生物菌体,可作为一种人和动物的蛋白来源添加到人类食品和动物饲料中^[1]。

蛋白质资源短缺是饲料生产中普遍存在的问题,并且随着人口增长,资源消耗加剧,这一矛盾更加突出,急需开发新型蛋白原料以缓解这一矛盾。许多研究者认为,SCP 可作为解决这一问题的的重要途径^[2]。对柑橘果实加工后剩下的新鲜皮渣处理成为许多加工厂亟需解决的问题,柑橘皮渣含大量果胶、纤维素和半纤维素,并且可能作为一种发酵基质^[3]。近年国外将柑橘皮渣作为固态发酵原料生产酶制剂的较多^[4],而用于生产蛋白饲料的较少。本研究的目的是以夏橙皮渣为原料,筛选合适的微生物和适宜发酵条件,为开发生产单细胞蛋白质饲料提供必要参数。

1 材料与方 法

1.1 材 料

新鲜或冻存夏橙皮渣:榨汁后剩余的皮渣,采自四川佳美食品工业有限公司。

麸皮、统糠:采自四川农业大学动物营养研究所试验场。

菌种:购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,共 2 类 10 株,见表 1。

表 1 供试菌种及其主要作用

菌种	主要功能作用	编号
酵母类	假丝酵母 饲料酵母	1254,1807
	白地霉 产甘露醇脱氢酶,饲料酵母	1315,1745
霉菌类	烟曲霉 分解纤维素	2168,2424
	黑曲霉 产果胶酶、葡聚糖酶、植酸酶、柠檬酸等	2281
	木 霉 产纤维素酶、木聚糖酶	13016,13001,56765

培养基包括 PDA 培养基;马铃薯 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%。

纯橘渣培养基。

混合橘渣培养基:橘渣 78%、麸皮 15%、统糠 4%、尿素 2%、硫酸铵 1%。

1.2 试验设计

1.2.1 单株菌筛选

将 10 种菌分别接种于已灭菌的夏橙皮渣培养基,置于 28~30℃ 培养箱,酵母培养 3 d,霉菌培养 4 d。以粗蛋白(CP)和真蛋白(TP)含量为检测指标,在同种微生物之间进行比较,筛选出能较好利用柑橘培养基质的单株菌。

1.2.2 混生菌筛选

在已选出的单菌基础上,根据供试酵母和霉菌的特点,霉菌发酵产生多种有益酶类,可分解原料的果胶和纤维素等,供酵母利用,产生大量单细胞蛋白,按 1 株酵母+2 株霉菌搭配的原则,筛选最优的 3 株混生菌。

1.2.3 发酵条件优化

对所筛选的菌株组合进行条件优化,已知菌株适宜发酵温度 28~30℃,固态发酵基质形成了一个良

第一作者:硕士研究生。

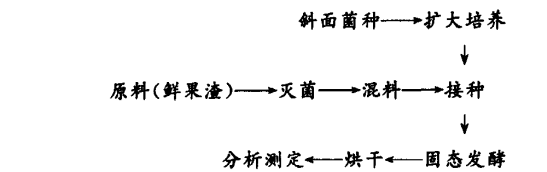
* 四川省科技厅科技攻关项目(05NG003-016)

收稿日期:2008-04-21,改回日期:2008-06-23

好缓冲环境,所以确定对发酵时间(A)、接种比例(B)、接种量(C)和含水量(D)4个条件进行优化,每个条件设3个水平。采用正交试验,按 $L_9(3^4)$ 进行试验设计,以确定发酵条件,试验设计见表2。

表2 正交试验因素水平表			
因素水平	1(下水平)	2(零水平)	3(上水平)
发酵时间/d	3	4	5
接种比例 (酵母菌:霉菌1:霉菌2) ^a	3:2:1	2:1:1	3:1:2
接种量/%	10	15	20
含水量/%	65	70	75

注:1)为筛选得到的2株霉菌。
1.3 发酵工艺路线和试验方法



1.3.1 种子培养
PDA斜面培养,灭菌,冷却后接入菌体,放入28~30℃培养箱,酵母培养3d,霉菌培养4~6d。

1.3.2 活化培养
PDA液体培养,灭菌,冷却后接入菌体,28~30℃恒温培养箱或摇床培养24~40h。

1.3.3 橘渣培养
在已灭菌的橘渣颗粒培养基中接入菌液,28~30℃恒温培养箱培养,每天用无菌玻棒翻动培养物。

1.3.4 干燥方法
真空冷冻干燥;恒温鼓风干燥箱干燥。

1.3.5 粉碎
干燥样粉碎过40目筛待测。

1.4 检测指标
水分、粗灰分、粗脂肪、纤维、发酵前后粗蛋白、真蛋白含量^[5]还原糖含量^[6]。

1.5 数据统计

表4 皮渣原料中接入单株酵母菌发酵前后粗蛋白和真蛋白质量含量/(%DM)									
原料蛋白含量 /(%DM)	接入单株酵母发酵后蛋白含量/(%DM)				发酵后蛋白含量增加量/%				
	1254	1745	1315	1807	1254	1745	1315	1807	
CP	5.59±0.10a	8.53±0.16b	5.55±0.12a	6.65±0.15c	7.86±0.14d	52.6	4.3	25.0	27.9
TP	4.57±0.06a	5.74±0.22b	5.28±0.10c	4.96±0.09d	5.99±0.07e	28.9	19.9	17.3	30.1

注:CP:粗蛋白,TP,真蛋白(表5同)。同一行数字后标注不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 霉菌发酵结果
康宁木霉13016(编号10)生长十分缓慢,在筛选过程剔除。

从表5可知,对霉菌单菌发酵后粗蛋白和真蛋白

采用SPSS11.5软件对数据进行统计分析,结果采用平均数±标准差表示。

2 试验结果及讨论

2.1 皮渣常规成分测定

由表3数据可知,新鲜橘渣水分含量高,达70%以上。干物质中,纤维含量最高,蛋白含量较低。胡海波(2006)^[7]测定柑橘渣常规营养成分:为粗纤维9.02%,CP8.17%,粗灰分3.31%;纤维含量低于本研究,CP含量则较高;杨锦才(2001)^[8]研究表明,柑橘渣蛋白含量4.2%,纤维27.8%,脂质1.2~2%,本研究结果与之相当。

表3 夏橙皮渣常规成分质量百分含量	
成分	含量
水分/%	85.33±0.02
粗灰分/(%DM)	3.22±0.01
酸性洗涤纤维(ADF)/(%DM)	19.03±0.04
中性洗涤纤维(NDF)/(%DM)	22.06±0.04
粗脂肪/(%DM)	0.78±0.01
还原糖/(%DM)	12.32±0.10
粗蛋白质(CP)/(%DM)	5.59±0.02
真蛋白质(TP)/(%DM)	4.57±0.07

注:DM表示干物质基础(表4~表7同)。

2.2 单菌发酵试验

10株供试菌种分别接种到夏橙橘渣,比较发酵前后粗蛋白和真蛋白含量,并结合菌株生长情况筛选出较优单株菌种。

2.2.1 酵母发酵结果和分析

不同酵母单菌对橘渣发酵后的蛋白质含量见表4。可以看出,酵母1254、1315、1807均可显著提高发酵产物的粗蛋白质和真蛋白质含量,从粗蛋白质提高程度看,以1254效果最好,但以真蛋白质来看,则以1807最好。

质含量分析结果表明,5种霉菌均可显著提高2种皮渣发酵产物粗蛋白质和真蛋白质含量。从粗蛋白质提高程度看,以2281和56765较好,从真蛋白质看,13001、2281和56765较好。

表 5 皮渣原料中接入单株霉菌发酵前后粗蛋白和真蛋白质量含量/%DM

原料蛋白含量 /%(DM)	接入单株霉菌发酵后蛋白含量/%(DM)					发酵后蛋白增加量/%				
	2424	13001	2168	2281	56765	2424	13001	2168	2281	56765
CP	5.59±0.10a	6.33±0.07b	7.13±0.03c	6.72±0.04d	8.20±0.04e	7.34±0.03f	12.5	26.7	18.6	45.6
TP	4.30±0.07a	4.85±0.22b	6.49±0.09c	5.78±0.07d	6.56±0.28c	6.69±0.06c	5.47	40.9	25.6	42.5

注：同一行数字后标注不同字母表示差异显著(P<0.05)。

综合考虑蛋白含量和菌株生长情况,在同种菌株进行比较,得到结果:假丝酵母 1807 优于 1254,白地霉 1315 优于 1745,烟曲霉 2168 优于 2424,木霉 56765、13001 优于 13016。

2.3 混合菌发酵试验

按 1 株酵母菌+2 株霉菌搭配进行筛选(见表 6)。

表 6 3 菌联合发酵配伍

处理号	菌株配伍情况	接种比例
1	1807-2168-2281	0.8:2:2
2	1807-13001-2281	0.8:1.6:2
3	1315-2168-2281	1.6:2:2
4	1315-13001-2281	1.6:1.6:2
5	1807-1315-2281	0.8:1.6:2
6	1807-56765-2281	1.6:1.8:2

注:接种比例要求同类型菌株接种量相当,利于发酵后比较。

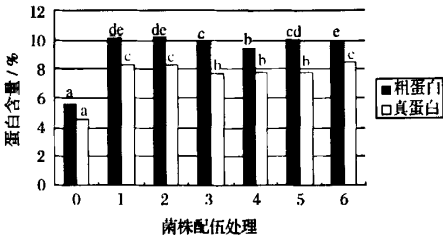


图 1 夏橙皮渣混菌发酵粗蛋白和真蛋白质量含量/DM
(注:0 为皮渣发酵前蛋白含量,相同柱形条上不同字母表示差异显 P<0.05)

由图 1,处理组 1、2、3、5 和 6 的粗蛋白质含量较高,其中 1、2 和 6 处理真蛋白质含量较高,综合考虑菌种特性和生长情况,确定 6 号为较优菌株配伍,即产朊假丝酵母 1807-黑曲霉 2281-李氏木霉 56765,均为农业部允许使用的有益菌种。经此配伍混合发酵后夏橙皮渣粗蛋白、真蛋白含量为 10.22%(DM)、8.45%(DM),比发酵前 5.59%(DM)、4.30%(DM)分别提高了 82.83%、84.90%。

与单菌发酵比较,混菌发酵效果更好。目前在苹果渣、橘渣、玉米渣等原料的研究多采用混菌发酵方式,一般采用酵母和霉菌混合发酵^[9~11]。混合发酵可利用多种菌分泌酶的互补作用,黑曲霉产生的果胶酶、木霉产生的纤维素酶可以分解发酵原料中的多种纤维物质,除了可以保障自身生长外,分解后的营养物质还可促进酵母生长。本研究结果与周炼所筛选的 3 株菌(19807、2281、13016)相比,不同之处是,本实验筛选高产纤维素酶菌株里氏酶 56775,而非 13016。

2.4 发酵条件优化

2.4.1 发酵产物蛋白含量优化(表 7)

由表 7 可知,发酵前夏橙混合培养基粗蛋白含量 10.28%,真蛋白 8.30%;发酵后粗蛋白含量为发酵前的 3 倍,但真蛋白含量提高 10%~45%,程度小于粗蛋白质。

表 7 正交试验发酵产物蛋白含量/%DM

试验号	发酵条件				粗蛋白含量/% (DM 质量)	真蛋白含量/% (DM 质量)
	A(发酵时间)/d	B(接种比例)	C(接种量)/%	D(含水量)/%		
0(发酵前)	—	—	—	—	10.28±0.13a	8.30±0.06a
1	3	3:2:1	10	65	32.99±0.09ef	12.00±0.44fg
2	3	2:1:1	15	70	31.70±0.23bc	9.88±0.48bc
3	3	3:1:2	20	75	32.16±0.21de	8.83±0.22ab
4	4	3:2:1	15	75	31.48±0.09cd	9.66±0.16cd
5	4	2:1:1	20	65	30.97±0.64c	12.46±0.28g
6	4	3:1:2	10	70	30.06±0.46b	11.57±0.23deg
7	5	3:2:1	20	70	33.23±0.15f	11.13±0.13de
8	5	2:1:1	10	75	32.79±0.33ef	10.80±0.24cd
9	5	3:1:2	15	65	34.49±0.32g	10.86±0.76cd
A(时间)/d	3				32.28±0.18A	10.24±0.45A
	4				30.78±0.31B	11.23±0.37B
					33.50±0.26C	10.93±0.25B
	5				32.57±0.24A	10.93±0.33A
B(接种比例 1807:2281:56765)		3:2:1			31.82±0.32B	11.06±0.37A
		2:1:1			32.17±0.59AB	10.42±0.43A
		3:1:2				
C(接种量)/%(v/w)				10	31.89±0.46A	11.46±0.23A

续表 7

试验号	发酵条件				粗蛋白含量/% (DM 质量)	真蛋白含量/% (DM 质量)
	A(发酵时间)/d	B(接种比例)	C(接种量)/%	D(含水量)/%		
D(含水量)/%			15		32.56±0.43B	10.14±0.32B
			20		32.12±0.35AB	10.81±0.47C
				65	32.82±0.49A	11.77±0.34A
				70	31.60±0.44bB	10.86±0.27B
				75	32.15±0.20C	9.77±0.27C

注：未灭菌皮渣混合培养基质量分数(夏橙渣 78%、麸皮 15%、统糠 4%、尿素 2%、硫酸铵 1%)。同一列不同字母(大小写字母分别比较表示差异显著($P<0.05$))。

经分析:4 因素均对发酵结果粗蛋白质含量有显著影响($P<0.05$),其中发酵时间(A)和含水量(D)的影响达到极显著水平($P<0.01$)。接种比例(B)对发酵结果 TP 含量影响不大,其余 3 因素有显著影响($P<0.05$),其中接种量(D)和含水量(D)影响达到极显著水平($P<0.01$)。

综合考虑,确定较优发酵条件:时间 3~4 d,接种比例 2:1:1 或 3:2:1,接种量 10%左右,含水量 65%。

高再兴(2003)^[13]研究采用产朊假丝酵母和黑曲霉发酵苹果渣,得出的适宜工艺条件为接种比例 3:1,尿素 1.5%~2%,接种量 2%。并认为尿素添加量如果>2%会显著增加残留量。接种量和本试验结果差异较大,原因在于未对更高接种量进行研究。张长霞(2004)^[14]研究酵母和黑曲霉混合发酵苹果渣,确定最佳培养条件初始含水量 60%,接种量 10%,接种比例 1:3,发酵周期 84 h,与本试验结果基本一致。杨锦才(2001)^[8]分别对接种比例、接种量、含水量、发酵时间 4 个因素进行了正交试验,得出接种比例 1:1:1,接种量 25%~30%,含水量 49%~52%,发酵时间 4 d,与本研究差异主要在接种量,本试验表明接种量超过 15%蛋白含量有降低趋势。

3 结 论

(1)筛选出较优菌株配伍为产朊假丝酵母、黑曲霉和里氏木霉。

(2)优化的发酵条件:时间 3~4 d,接种比例 2:1:1 或 3:2:1,接种量 10%左右,含水量 65%。

经过发酵,夏橙皮渣粗蛋白质含量为发酵前的 3 倍,由 10%左右增加到 30%以上,真蛋白含量增加 45%左右。

参 考 文 献

1 McNaught A D, Wilkinson A. IUPAC Compendium of

Chemical Terminology (2nd Edition) [M]. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997

2 Pandey A, Soccol C R. Bioconversion of biomass: A case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid state fermentation[J]. Brazilian Arch Biol Tech, 1998, 41 (4): 379~390

3 Diomi Mamma, Elisavet Kourtoglou, Paul Christakopoulos. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry [J]. Bioresource Technol, 2008, 99(7): 2 373~2 383

4 Mark R Wilkins , Wilbur W Widmer , Karel Grohmann, et al. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 1 596~1 601

5 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术(第 2 版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2003. 46~74

6 黄晓钰,刘渭渭. 食品化学综合实验[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2002. 148~150

7 胡海波,张石蕊,易学武,等. 柑橘渣在动物生产中的应用研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(13): 49~51

8 杨锦才. 柑橘渣发酵生产蛋白饲料的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2001

9 常显波,薛泉宏,来航线,等. 鲜苹果渣发酵生产饲料蛋白研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32 (1): 40~46

10 司翔宇,李志西,葛 蕾. 苹果渣发酵生产饲料蛋白质工艺研究[J]. 粮食与饲料工业, 2005, (4): 32~33

11 Sandhu DK, Joshi VK. Solid state fermentation of apple pomace for concomitant production of ethanol and animal feed[J]. Sci Ind Res, 1997, 56: 86~90

12 周炼,王日葵,郭莉,等. 甜橙皮渣发酵蛋白饲料的研制[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5): 51~54

13 高再兴,陈五岭,段东霞,等. 微生物发酵果渣蛋白饲料 I. 发酵工艺条件的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2003, 33(6): 701~704

14 张长霞. 混菌固态发酵苹果渣生产蛋白饲料的研究[D]. 天津:天津科技大学, 2004

Study of Strains Screening and Fermentation Conditions for SCP Produce Using Citrus Byproducts

Zhao Lei, Zhang Keying, Ding Xuemei, Liu Yashi, Lv Gang

(Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Feed Engineering

Research Center of Sichuan Province, Ya an 625014, China)

ABSTRACT A series trials were conducted to identify the suitable microorganisms and fermentation conditions for using the by-products of citrus-processing industry to produce single cell protein(SCP). Compared the crude and the true protein content before and after fermentation, we inoculated single or combination microorganisms into the summer orange by-products. An orthogonal trial was used in the determination of optimal fermentation conditions include culture time, inoculate ratio of strains, inoculation concentration and water content with three levels. Ten different microorganisms were used in the study. The results showed that the suitable combination was *Candida utilis* (1807)-*Aspergillus niger* (2281)-*Trichoderma reesei* (56765). The water content and fermentation time showed significant impact on the protein content ($P < 0.01$). The suitable conditions were: culture time 3~4d with 2:1:1 or 3:2:1 inoculated ratio of the 3 strains, 10% inoculated concentration, and 65% water content for the summer orange with the 3 times more CP content from 10% to 30% and true protein increased by 45% after fermentation.

Key words orange peels, single cell protein, candida, fungi, strains screening, fermentation conditions

行业
动态

西藏青稞提取 β -葡聚糖获得成功

由西藏自治区农科院农业研究所、西藏青稞研究与发展中心等科研单位共同研究合作的项目——“西藏青稞 β -葡聚糖生理功效、提取利用技术及其功能食品开发研究”已通过西藏自治区科技厅的成果鉴定。专家指出,这是我国在世界上首次从青稞中提取 β -葡聚糖获得成功,填补了国内青稞 β -葡聚糖产业化开发的空白。

国内外 β -葡聚糖提取来源主要有酵母、食用菌和燕麦等谷物,这次从青稞中提取 β -葡聚糖并规模生产 β -葡聚糖产品在国内外尚属首次。

β -葡聚糖是一种重要的可溶性膳食纤维,具有降血脂、调节血糖、调节肠道和提高免疫力等保健功能。随着高血压、高血脂、肥胖、糖尿病等“现代文明病”的高发,膳食纤维 β -葡聚糖的需求量日渐旺盛。

选用青稞中提取 β -葡聚糖是因为西藏的青稞品种是世界上 β -葡聚糖含量最高的大麦类群,西藏自治区农科院对75个西藏青稞品种和132个国内其他地方大麦品种的 β -葡聚糖含量进行统一检测后发现,西藏青稞品种 β -葡聚糖含量平均在5.25%,而国内其他地方的大麦品种 β -葡聚糖含量平均仅3.91%,而国外公开发表的471个大麦品种按照同样方法测定 β -葡聚糖含量平均在3.79%,这就证实了西藏青稞品种是世界上 β -葡聚糖含量最高的大麦类群。

西藏自治区农科院农业研究所自1980年代开始对“高 β -葡聚糖青稞育种”课题进行研究,2000年完成了青稞特有营养成分 β -葡聚糖含量普查与开发利用分析,2001年育成了世界上含 β -葡聚糖最高的麦类作物——“藏青25”青稞新品种,其 β -葡聚糖含量高达8.62%。

西藏作为全球唯一大规模集中种植青稞的地区,种植面积占西藏农作物总数的60%。西藏粮食总产从1959年的15万t,增加到去年的93.86万t。由于青稞只能加工成糌粑或酿成青稞酒,每年有大量的青稞无法转化,致使广大农牧民增产不增收。仅2002年,西藏青稞消费剩余量高达6.2万t。青稞中提取 β -葡聚糖获得成功对于提高青稞附加值、加快青稞产业化开发、增加西藏农牧民增收具有重要意义。

目前,依托西藏青稞研究与发展中心的成果,西藏圣伯力生物技术有限公司已投入上百万元资金生产出青稞 β -葡聚糖胶囊、青稞速溶粉等产品。