

## 发酵苹果渣生产蛋白饲料的混合菌种的筛选

陈松<sup>1</sup>, 丁立孝<sup>1,2</sup>, 张莉<sup>3</sup>, 王天龙<sup>4</sup>, 朱英莲<sup>5</sup>

1(青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛, 266109)

2(日照职业技术学院食品工程学院, 山东日照, 276826)

**摘要** 通过平板点种试验, 选用白地霉为指示菌, 又根据刺激圈试验以及三角瓶发酵培养, 获得了苹果渣发酵的最佳菌种组合, 其菌种比例为产朊假丝酵母: 白地霉: 枯草芽孢杆菌: 黑曲霉=0.5:1:1:1时为优选接种比例。苹果渣发酵后粗蛋白含量为15.32%, 较未发酵时7.36%提高了108%。

**关键词** 苹果渣, 蛋白饲料, 菌种筛选

2006年我国苹果总产量达2 500万t, 苹果加工成苹果汁的副产品近300万t, 加上其他水果如梨渣、桃渣、草莓渣等的副产品总量接近1 000万t<sup>[1]</sup>。苹果渣经过改造可使其成为益生菌适宜繁衍的理想培养基, 再接种益生菌进行发酵处理, 最终加工成为单细胞蛋白饲料, 将“废弃物”变成优质饲料产品。这不仅补充蛋白质供应不足, 而且有效地利用了资源, 解决了长期困扰果汁加工企业的环境污染问题<sup>[2~7]</sup>。单细胞蛋白饲料中不仅含有丰富的蛋白质, 还含有脂肪、核酸、碳水化合物、维生素和无机盐, 有较好的香味和性能, 是一种具有较高营养价值的饲料<sup>[8]</sup>。

相关研究多采用双菌种和3个菌种<sup>[9~11]</sup>, 也有极少数采用4个菌种及更多菌种混合发酵<sup>[12,14]</sup>的。由单一菌种发酵虽可以提高蛋白产量, 但是混菌种发酵效果较单菌种发酵要好, 其优势在于多个菌种之间可互相补偿其缺陷, 进行协同共生发酵。本文通过指示菌以及配伍菌种的筛选, 选出蛋白产量高的混合菌种, 达到菌种优化以及提高蛋白产量的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

苹果渣, 由青岛海升果业发展股份有限公司提供鲜渣, 常温晾晒后粉碎, 过40目筛。菌种, 黑曲霉(*Aspergillus niger*), 白地霉(*Ceotrichum candidum*), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*), 产朊假丝酵母(*Candida utilis*), 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 安琪葡萄酒酵母, 均由微生物实验室保

藏。斜面培养基, 马铃薯蔗糖固体培养基, 营养琼脂培养基, 麦芽汁琼脂培养基; 平板培养基, 苹果渣, 琼脂, pH自然, 121℃灭菌30min; 三角瓶发酵培养基, 苹果渣20g, 蒸馏水40mL, pH自然, 121℃灭菌30min。

SPX-250BS-II生化培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; HZ-9610K冷冻振荡培养箱, 太仓市科教器材厂; YXQ-SG41.280型手提式压力蒸汽灭菌锅, 上海华线医用仪器有限公司; SW-CJ-1FD型超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; UDK20凯氏定氮仪, 意大利VELP公司。

### 1.2 测定方法

粗蛋白: 采用半微量凯氏定氮法(GB/T 14771.1993); 还原糖: 采用菲林试剂滴定法(GB/T 5009.7-2003); 粗纤维: GB5009.10-1985。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 平板点种试验

斜面菌种用无菌水洗下, 30℃摇床振荡培养24h, 分别接入到6%苹果渣培养基中, 30℃下培养72h, 观察固体平板上各菌株的生长情况。

#### 1.3.2 平板点种刺激圈试验<sup>[14]</sup>

白地霉斜面菌种用无菌水洗下, 30℃摇床振荡培养24h, 分别接入到6%苹果渣培养基中, 再分别点种待选菌, 30℃下培养72h, 观察固体平板点种各菌株处白地霉的生长情况。

#### 1.3.3 菌种混合比确定试验<sup>[15]</sup>

由于黑曲霉和白地霉为同一属, 因此以产朊假丝酵母和白地霉为A组, 黑曲霉和枯草芽孢杆菌为B组, 利用二元坐标系固态发酵确定双菌种的接种混合比。

#### 1.3.3.1 产朊假丝酵母与白地霉的混合比

产朊假丝酵母与白地霉的接种比分别为0.2:

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2007-09-12, 改回日期: 2007-2007-10-18

1,0.5:1,1:1,2:1,5:1,将斜面菌种用无菌水洗下,以10%的比例接入三角瓶发酵培养基中,30℃生化培养箱培养72h后,65℃烘干至恒重,测定其粗蛋白含量。

### 1.3.3.2 枯草芽孢杆菌与黑曲霉的混合比

枯草芽孢杆菌与黑曲霉的接种比分别为0.2:1,0.5:1,1:1,2:1,5:1,将斜面菌种用无菌水洗下,以10%的比例接入三角瓶发酵培养基中,30℃生化培养箱培养72h后,65℃烘干至恒重,测定其粗蛋白含量。

### 1.3.3.3 四菌种的混合比

A组菌与B组菌的接种比分别为0.2:1,0.5:1,1:1,2:1,5:1,将斜面菌种用无菌水洗下,以10%的比例接入三角瓶发酵培养基中,30℃生化培养箱培养72h后,65℃烘干至恒重,测定其粗蛋白含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 指示菌种的筛选

#### 2.1.1 平板点种试验结果

试验结果如表1所示,各菌在6%和8%苹果渣含量的平板培养基中生长较2%和4%好。由于各菌在6%与8%的平板中的长势相当,考虑到经济情况,选用6%苹果渣含量的平板作为配伍菌筛选的培养基。

在发酵的菌种中,以白地霉和黑曲霉在固体培养基中长势最好。通过三角瓶发酵试验(结果见图1),发酵后的苹果渣较发酵之前粗蛋白含量增加,还原糖和粗纤维含量都有所下降。其中黑曲霉发酵后的粗蛋白含量最高为11.54%,白地霉次之为11.12%。由于黑曲霉发酵最终产品感官效果不如白地霉,而且白地霉发酵后粗纤维和还原糖含量下降程度较黑曲霉大,因此决定以白地霉为指示菌。

表1 在不同苹果渣浓度平板培养基中菌种的生长情况

菌种	2%	4%	6%	8%
枯草芽孢(B. subtilis)	+	+	++	++
黑曲霉(A. Niger)	+	++	+++	+++
啤酒酵母(S. cerevisiae)	-	+	+	++
产朊假丝酵母(C. utilis)	+	+	++	+++
热带假丝酵母(C. tropicalis)	+	+	++	+++
白地霉(G. candidum)	+	++	+++	+++
安琪酵母	-	+	+	+

注:一,+,++及+++分别表示培养物外观无明显变化、菌体开始生长、菌体明显可见及菌体生长繁茂。

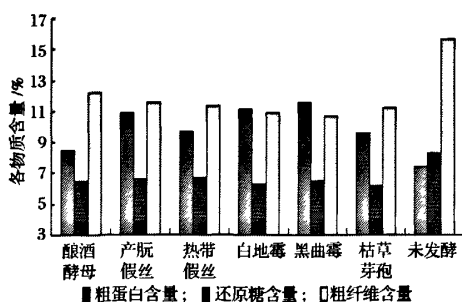


图1 各个菌发酵后粗蛋白、还原糖、粗纤维的含量

### 2.2 配伍菌种的筛选

由表2可知,枯草芽孢杆菌、黑曲霉与产朊假丝酵母可明显刺激白地霉生长,因此确定这三种菌为配伍菌种。

表2 不同菌株对白地霉的作用

菌种	6%苹果渣培养基
枯草芽孢菌(B. subtilis)	+++
黑曲霉(A. niger)	+++
酿酒酵母(S. cerevisiae)	+
产朊假丝酵母(C. utilis)	+++
热带假丝酵母(C. tropicalis)	++

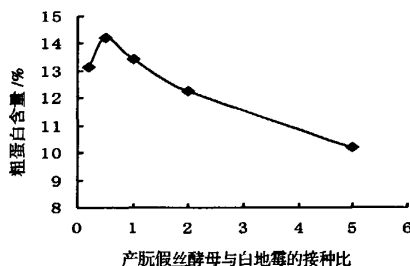


图2 不同比例产朊假丝酵母与白地霉产生粗蛋白含量

### 2.3 菌种相互比例的确定

#### 2.3.1 双菌种最佳接种混合比的确定

如图2和图3所示,可知A组和B组双菌种在接种混合比分别为0.5:1和1:1时粗蛋白含量最高,即0.5和1为此2组双菌种的较佳接种混合比值。

#### 2.3.2 四个菌种接种混合比的确定

将产朊假丝酵母和白地霉两菌种按0.5的比值作为一个整体,枯草芽孢杆菌和黑曲霉按1的比值作为一个整体,再将2整体相比,其比值作为横坐标,粗蛋白含量作为纵坐标在二元坐标系下做4个菌种的接种混合比实验。结果如图4所示,可知在比值为1时有最高的粗蛋白含量,即较佳接种混合比为产朊假丝酵母:白地霉:枯草芽孢杆菌:黑曲霉=0.5:1:1:1。

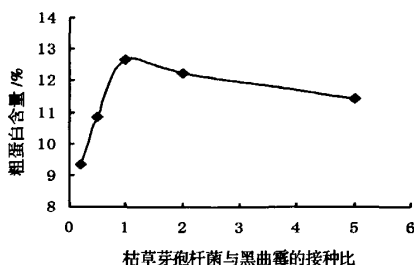


图3 不同比例枯草芽孢杆菌与黑曲霉产生粗蛋白含量

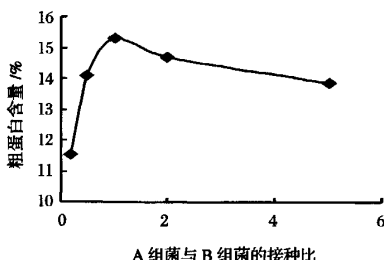


图4 不同比例A组菌与B组菌产生粗蛋白含量

### 3 结论

通过平板点种试验,选用白地霉为指示菌,又根据刺激圈试验以及三角瓶培养,获得了苹果渣发酵产高蛋白的最优菌种组合:白地霉、产朊假丝酵母、枯草芽孢杆菌、黑曲霉;发酵比例为产朊假丝酵母:白地霉:枯草芽孢杆菌:黑曲霉=0.5:1:1:1时为最优接种比例。发酵生成的粗蛋白含量为15.32%,较未发酵时的7.36%提高了108%,从而达到了提高产品的粗蛋白含量的目的,进一步的发酵工艺正在研究之中。

### 参考文献

- 2006年全国苹果总产量将达2500万吨左右价格总水平稳中有降[J]. 果农之友, 2006, (11): 41
- 陈翠微, 刘长江, 郭文浩, 等. 微生物发酵农作物秸秆生产蛋白饲料的研究与应用[J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 291~293
- 蔡俊, 邱临. 啤酒糟发酵生产蛋白饲料影响因子的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2000, (4): 30~31
- Sandhu D K, Joshi V K. Solid-state fermentation of pomace for concomitant production of ethanol and animal feed[J]. Journal of Scientific & Industrial Research, 1997, 56(2): 86~90
- 徐福建. 固态发酵工程研究进展[J]. 生物工程进展, 2002, 22(1): 12~20
- 马志科, 咎林森. 单细胞蛋白开发应用进展[J]. 世界农业, 1997(7): 46
- Joshi Y K, Sandhu D K. Preparation and evaluation of animal feed by product produced by solid-state fermentation of apple pomace[J]. Bioresource Technology, 1997, 56(2-3): 251~255
- 籍宝平, 尤希风, 张博润. 苹果渣发酵生产饲料蛋白的工艺研究[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 30~32
- 吴绵斌, 夏黎明, 虞炳钧, 等. 玉米渣皮双菌种固态发酵生产细胞蛋白的研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1): 24~27
- 侯文华, 李政, 杨力, 等. 复合菌种协同发酵酒糟生产饲料蛋白研究[J]. 环境科学, 1999, 20(3): 65~67
- 赵文慧, 吴绵斌, 刘黎黎, 等. 双菌种固态发酵木糖渣生产饲料蛋白[J]. 饲料工业, 2002, 23(2): 12~13
- 赵启美, 何佳, 李西波, 等. 啤酒糟液固态混合发酵生产蛋白饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001, 6: 21~23
- 尤西凤, 惠明, 杨锦才, 等. 柑橘渣微生物发酵生产蛋白饲料的研究[J]. 饲料研究, 2000, 12(5): 19~20
- 徐抗震, 宋纪蓉, 黄洁, 等. 单细胞蛋白生产最佳接种混合比的研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 37~39

## Screening of the Multi-strains to Produce Single Cell Protein Feeds from Apple Pomace

Chen Song<sup>1</sup>, Ding Lixiao<sup>1,2</sup>, Zhang Li<sup>3</sup>, Wang Tianlong<sup>4</sup>, Zhu Yinglian<sup>5</sup>

1(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

2(College of Food Engineering, Rizhao Polytechnic, Rizhao 276826, China)

**ABSTRACT** The strain of *Ceotrichum candidum* was selected to be an indicator strain through the dot-inoculating method. Then the optimum multi-strains ratio of fermenting multi-strains was *Candida utilis*: *Ceotrichum candidum*: *Bacillus subtilis*: *Aspergillus niger*=0.5:1:1:1, according to the results from the stimulating circle experiment as well as fermentation experiment in the flask. The protein content of fermenting product under this fermentation condition could reach 15.32%, which is 108% higher than the control of 7.36%.

**Key words** apple pomace, feeding-protein, strain screening