

扇贝加工下脚料发酵生产优质蛋白饲料菌种的筛选

谈佳玉

(农业部渔业装备与工程重点开放实验室, 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 国家水产品加工装备研发中心, 上海 200092)

摘要: 以扇贝加工下脚料为原料, 选取酵母菌、植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌和乳酸链球菌 4 个菌种, 采用酵母菌与乳酸菌混合发酵的方法生产优质蛋白饲料。以发酵产物中氨基态氮和粗蛋白含量为指标, 对混合菌种进行筛选, 并确定混合菌种的最佳比例。结果表明: 酵母菌与乳酸菌混合发酵扇贝下脚料可提高其氨基态氮和粗蛋白含量, 其中酵母菌、乳酸链球菌和保加利亚乳杆菌混合发酵效果最好, 最佳菌种比例为 3:1:1, 在此条件下所得发酵产物的氨基态氮含量为 3.52%, 粗蛋白含量为 61.63%。

关键词: 扇贝加工下脚料; 发酵; 蛋白饲料; 酵母菌; 乳酸菌

文章编号: 1673-9078(2012)11-1530-1534

Screening of Producing High Quality Protein Feedstuff Strains from Processed Scallop Disposal by Fermentation

TAN Jia-yu

(Key Laboratory of Fishery Equipment and Engineering, Ministry of Agriculture, Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National R&D Branch Center For Aquatic Product Processing Equipment, Shanghai 200092, China)

Abstract: With processed scallop disposal as raw materials, microzyme, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis* were selected to ferment raw materials for producing the high quality protein feed. The optimal strains combination was screened based on amino nitrogen content and crude protein content, and the best proportion of the species was determined. The results showed that the amino nitrogen content and crude protein content could increase by compound culture of microzyme and Lactobacillus. The compound culture of Microzyme, *Streptococcus lactis* and *Lactobacillus bulgaricus* was found to be the most suitable for the fermentation, and the best proportion of the three species was 3:1:1. In this condition amino nitrogen content and crude protein content were 3.52% and 61.63%, respectively.

Key words: processed scallop disposal; fermentation; protein feedstuff; microzyme; Lactobacillus

扇贝属于软体动物门扇贝科, 是我国主要的海洋经济贝类。随着贝类养殖的迅速发展, 扇贝加工量也越来越大, 在加工贝柱的过程中产生了大量的扇贝下脚料。扇贝加工下脚料含有丰富的蛋白质, 不饱和脂肪酸及牛磺酸、叶酸、微量元素硒、钙等多种生物活性物质^[1]。目前对于扇贝下脚料的加工利用主要有通过酶解制备海鲜调味品与简单加工成饵料, 对扇贝下脚料的微生物发酵研究较少。利用微生物发酵, 将扇贝下脚料转化为优质蛋白饲料, 提高了扇贝加工下脚料的资源利用率, 在一定程度上也可缓解鱼粉饲料资源紧张的问题。微生物发酵饲料还具有以下特点: 发

收稿日期: 2012-06-18

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2012A0904); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48-08B)

作者简介: 谈佳玉(1983-), 女, 硕士, 助理研究员, 从事水产品加工技术研究

酵可明显改变原料的理化性状, 改善其适口性, 提高蛋白质含量, 且使氨基酸含量趋于平衡^[2]; 经益生菌发酵后的蛋白饲料中还含有多种益生菌, 可在动物肠道内建立有益微生物优势种群, 促进体内生态平衡^[3]。

菌种是影响发酵效果的最主要因素, 因此选择合适的菌种是发酵蛋白饲料的关键技术。在1989年时, 美国FDA批准了41种被认为是安全、有效的微生物^[4]。常用的蛋白饲料发酵菌种包括酵母菌、霉菌、芽孢杆菌及乳酸菌, 其中乳酸菌为益生菌, 具有维持肠道生理功能的作用, 同时乳酸菌可产生大量有机酸形成酸性环境, 从而抑制有害微生物的繁殖。菌体蛋白又称微生物蛋白或单细胞蛋白, 是饲料工业的重要蛋白来源^[5]。酵母是生产菌体蛋白的微生物之一, 吴远根等^[6]利用产阮假丝酵母发酵麻疯树饼粕, 发酵后饼粕的粗蛋白含量提高了48.65%, 总氨基酸提高了17.60%, 本实验以扇贝下脚料为原料, 通过单菌发酵及酵母菌和

乳酸菌组合发酵筛选出扇贝下脚料发酵的最佳菌种组合,同时优化菌种的接种比例,为生产优质扇贝下脚料蛋白饲料提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

扇贝下脚料:市购扇贝,实验室加工后得到扇贝下脚料;菌种:乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)购于广东省微生物菌种保藏中心;酵母:安琪酵母股份有限公司;葡萄糖、乙酸钠、柠檬酸二铵、硫酸镁、磷酸氢二钾等均为国产分析纯试剂。

培养基:活化培养基(MRS 固体培养基);种子培养基(MRS 液体培养基)。

1.2 仪器与设备

VS-1300U 超净工作台;LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌器;HR2168 多功能搅拌器;LRH-70 生化培养箱;UDK152 全自动凯氏定氮仪;DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱

1.3 实验方法

1.3.1 发酵种子液的制备

将冻存的植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌和乳酸链球菌接种于 MRS 斜面培养基上活化,37 °C 培养 48 h;再将斜面菌种挑取一环接于 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 48 h;按 8% 接种量将各菌种接种于 20 mL MRS 液体培养基中,37 °C 培养 48 h,得发酵种子液。

1.3.2 干酵母活化^[7]

将 0.2 g 的活性干酵母加入 100 mL 6% 的蔗糖溶液,在 35 °C 培养箱中静置 1.5 h。

1.3.3 发酵试验

扇贝下脚料清水洗净后晾干,放入多功能搅拌器搅碎成糜状,备用。称取一定量的糜状扇贝下脚料于三角瓶中,添加 10% 的葡萄糖,在无菌条件下,接入一定比例的菌种,将底物混合均匀后密封,放入生化

培养箱中进行发酵,发酵产品 60 °C 烘干得到扇贝下脚料蛋白饲料。

1.3.4 单菌发酵

在扇贝下脚料中分别接入 10% 的植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌、乳酸链球菌和酵母菌,pH 自然,30 °C 下发酵 72 h 后,测定产物的粗蛋白含量和氨基态氮含量,分析单菌发酵前后扇贝下脚料的蛋白含量变化。

1.3.5 混菌发酵

在扇贝下脚料中分别接入不同组合的菌种进行混合菌种发酵,酵母菌与乳酸菌比例为 2:1,接种量为 10%,自然 pH 值,30 °C 下发酵 72 h 后,测定产物的粗蛋白含量和氨基态氮含量。所选菌种编号为 1[#]酵母菌、2[#]植物乳杆菌、3[#]乳酸链球菌、4[#]保加利亚乳杆菌,菌种组合分别为:1[#]2[#]酵母菌+植物乳杆菌、1[#]3[#]酵母菌+乳酸链球菌、1[#]4[#]酵母菌+保加利亚乳杆菌、1[#]2[#]3[#]酵母菌+植物乳杆菌+乳酸链球菌、1[#]2[#]4[#]酵母菌+植物乳杆菌+保加利亚乳杆菌、1[#]3[#]4[#]酵母菌+乳酸链球菌+保加利亚乳杆菌。

1.3.6 分析方法

扇贝下脚料发酵产物中粗蛋白含量的测定:凯氏定氮法^[8](氮对蛋白的转换系数为 6.25);氨基态氮含量测定:甲醛滴定法^[9]。

2 结果与分析

2.1 扇贝下脚料基本成分分析

由表 1 可知扇贝下脚料中的主要成分为蛋白质,其含量大约为 52%。

表 1 扇贝下脚料的基本成分

Table 1 The fundamental compositions of processed scallop disposal

成分	粗蛋白/%	粗脂肪/%	水分/%
含量	52.09	6.57	13.28

2.2 单菌种发酵

通过单菌种发酵,测得不同发酵时间产物的氨基态含量和粗蛋白含量,见表 2。

表 2 单菌种发酵后产物氨基态氮含量和粗蛋白含量

Table 2 The content of amino nitrogen and crude protein by single strain fermentation

编号	氨基态氮含量/%			粗蛋白含量/%		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1 [#]	1.26±0.03 ^a	1.41±0.03 ^a	1.84±0.01 ^a	50.71±0.04 ^b	53.08±0.09 ^d	54.60±0.09 ^d
2 [#]	1.36±0.01 ^b	1.62±0.04 ^b	2.12±0.03 ^{ab}	49.90±0.12 ^a	50.98±0.06 ^a	52.21±0.06 ^a
3 [#]	1.37±0.01 ^b	1.65±0.05 ^b	2.06±0.05 ^b	50.73±0.04 ^b	51.61±0.15 ^b	53.01±0.12 ^b
4 [#]	1.38±0.01 ^b	1.73±0.02 ^c	2.15±0.03 ^c	50.88±0.09 ^c	51.97±0.08 ^c	53.17±0.16 ^c

注:字母 a、b、c、d 在同一列中,相同表示差异不显著,不同则表示差异显著(P<0.05)。

从表 2 中可以看出,随着发酵时间的增加,各菌种发酵后产物的氨基态氮含量和粗蛋白含量不断增加,表明实验所选取的四种菌种对扇贝下脚料发酵都具有一定的发酵效果。扇贝下脚料经单一菌种发酵 72 h 后,产物中氨基态氮含量从高到低依次为保加利亚乳杆菌、植物乳杆菌、乳酸链球菌、酵母菌;产物中粗蛋白含量从高到低依次为酵母菌、保加利亚乳杆菌、乳酸链球菌、植物乳杆菌。乳酸菌是能分泌丰富蛋白酶的发酵菌种之一,在发酵过程中主要由蛋白酶系统肽酶(内肽酶、氨基肽酶、二肽酶等)降解寡肽产生游

离氨基酸^[10],因而经乳酸菌发酵后的产物中氨基态氮含量与酵母菌发酵相比差异显著(P<0.05)。酵母菌菌体蛋白含量为 50%~60%,在发酵过程中通过利用底物的营养物质大量繁殖,从而提高发酵产物的粗蛋白含量。

2.3 混菌发酵

将酵母菌与一株乳酸菌、酵母菌与两株乳酸菌及试验所选四种菌种进行混菌发酵试验,测定不同发酵时间产物的氨基态含量和粗蛋白含量,见表 3、4、5。

表 3 双菌种发酵后产物氨基态氮含量和粗蛋白含量

Table 3 The content of amino nitrogen and crude protein by double strains fermentation

编号	氨基态氮含量/%			粗蛋白含量/%		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1#2#	1.84±0.01 ^b	2.33±0.02 ^b	2.71±0.03 ^a	52.87±0.18 ^c	55.03±0.14 ^c	56.80±0.09 ^b
1#3#	1.66±0.02 ^a	2.20±0.03 ^a	2.70±0.02 ^a	51.32±0.13 ^a	53.55±0.07 ^a	55.18±0.11 ^a
1#4#	1.92±0.01 ^c	2.43±0.03 ^c	2.76±0.01 ^b	52.70±0.06 ^b	54.42±0.08 ^b	56.95±0.06 ^b

注:字母 a、b、c 在同一列中,相同表示差异不显著,不同则表示差异显著(P<0.05)。

由表 3 可知,双菌种发酵后产物的氨基态氮含量为 2.70%~2.76%,总氮含量 55.18%~56.95%明显高于单菌种发酵的结果,说明酵母菌与植物乳杆菌、乳酸链球菌和保加利亚乳杆菌之间可能存在共生关系。酵母菌和乳酸菌具有良好的共生基础,酵母菌耐酸,能适应乳酸菌造成的酸性环境;乳酸菌为耐氧菌,在有氧发酵时,酵母菌大量繁殖,但此条件下乳酸菌的生存不受影响;同时两菌种在发酵温度为 30℃时都能大量繁殖,都可以利用葡萄糖进行发酵。酵母菌与乳酸菌之间为互利共生关系,这种共生关系能克服在发

酵过程中中间产物过多对菌种生长产生的不利影响^[11]。在混合发酵时酵母菌能够吸收利用乳酸菌的代谢产物乳酸,从而提高了 pH,促使乳酸菌的增长及代谢^[12]。乳酸菌为营养缺陷性菌株,酵母菌在发酵过程中代谢产生的氨基酸、维生素等营养因子促进了乳酸菌的生长^[13]。扇贝下脚料按三种组合菌种分别发酵 72 h 后,产物中氨基态含量相差较小,但组合 1#3#(酵母菌+乳酸链球菌)与 1#4#(酵母菌+保加利亚乳酸菌)的发酵产物粗蛋白含量较高,都达到 56%,与未发酵的扇贝下脚料相比,大约提高了 5%。

表 4 三菌种发酵后产物氨基态氮含量和粗蛋白含量

Table 4 The content of amino nitrogen and crude protein by three strains fermentation

编号	氨基态氮含量/%			粗蛋白含量/%		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1#2#3#	1.98±0.01 ^a	2.41±0.01 ^a	2.90±0.01 ^a	53.09±0.09 ^a	55.40±0.07 ^a	57.75±0.04 ^a
1#2#4#	2.03±0.02 ^b	2.56±0.02 ^b	3.05±0.04 ^b	55.17±0.04 ^c	57.85±0.07 ^c	59.06±0.04 ^c
1#3#4#	2.00±0.02 ^{ab}	2.42±0.01 ^a	2.94±0.02 ^a	55.01±0.06 ^b	56.96±0.04 ^b	58.68±0.06 ^b

注:字母 a、b、c 在同一列中,相同表示差异不显著,不同则表示差异显著(P<0.05)。

表 5 四菌发酵后产物氨基态氮含量和粗蛋白含量

Table 5 The content of amino nitrogen and crude protein by four strains fermentation

编号	氨基态氮含量/%			粗蛋白含量/%		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1#2#3#4#	2.04±0.02	2.57±0.01	3.06±0.03	55.19±0.02	57.86±0.02	59.07±0.02

从表 4 中可以看出,选取两种乳酸菌与酵母混合发酵扇贝下脚料的效果优于单菌发酵和双菌发酵。其中 1#2#4#(酵母菌+植物乳杆菌+保加利亚乳杆菌)菌种组合的氨基态含量和粗蛋白含量最高,分别为

3.05%和 59.06%,且与另外两组相比差异显著(P<0.05)。与未发酵的扇贝下脚料相比,粗蛋白含量大约提高了 6.97%。

从表 5 中可以看出,四种菌种混合发酵后的氨基

态含量与粗蛋白含量与三菌发酵相比无显著提高, 分析原因可能是产物中 pH 值太低抑制了菌种的生长。

2.4 混合菌种最佳比例的确定

本实验采用 $L_9(3^3)$ 正交试验来优化混合发酵过程中菌种的比例。选取混合菌种发酵中氨基态氮含量较高的菌种组合, 将各菌种设定成不同比例, 接种于扇贝下脚料中, 30 °C 下发酵 72 h, 以产物氨基态氮含量及粗蛋白含量为指标, 根据正交表实验结果来确定混合菌种的最佳比例。正交试验设计如表 1 所示。

表 6 正交因素水平表

Table 6 Factors and levels of the orthogonal design

水平	A (酵母菌添加量/%)	B (植物乳杆菌添加量/%)	C (保加利亚乳杆菌添加量/%)
1	2	1	1
2	4	2	2
3	6	3	3

选取 3 因素 3 水平进行正交实验, 研究酵母菌、植物乳杆菌及保加利亚乳杆菌混合菌种的接种比例和接种量。混合菌种比例的正交实验设计及结果见表 6、表 7。

表 7 正交试验结果

Table 7 Result of the orthogonal experiment

试验号	因素			指标/%	
	A	B	C	氨基态氮含量	粗蛋白含量
1	1	1	1	2.48	55.32
2	1	2	2	2.70	55.78
3	1	3	3	2.29	55.01
4	2	1	2	3.27	58.93
5	2	2	3	3.09	59.21
6	2	3	1	3.11	56.85
7	3	1	3	3.16	61.53
8	3	2	1	3.38	61.96
9	3	3	2	3.49	60.16

由表 8 可知, 三个因素对扇贝下脚料发酵产物中氨基态氮含量的影响顺序为 $C>A>B$, 即保加利亚乳杆

菌添加量>酵母菌添加量>植物乳杆菌添加量, 最佳组合为 $A_3B_2C_2$ 。

表 8 正交实验各项指标分析结果

Table 8 Analysis result of the orthogonal experiment

指标	氨基态氮含量/%			粗蛋白含量/%		
	A	B	C	A	B	C
k_1	7.47	8.91	8.97	55.37	58.59	58.04
k_2	9.47	9.17	9.46	58.33	58.98	58.29
k_3	10.03	8.89	8.54	61.22	57.34	58.58
R	0.85	0.09	0.92	5.85	0.39	0.54

从表 9 方差分析可知酵母菌和保加利亚乳杆菌的添加量对产物氨基态氮含量的影响显著, 植物乳杆菌添加量对氨基态氮含量的影响不显著; 粗蛋白含量的影响顺序为 $A>C>B$, 即酵母菌添加量>保加利亚乳杆菌添加量>植物乳杆菌添加量, 最佳组合为 $A_3B_2C_3$, 从方差分析可知酵母菌添加量对产物粗蛋白含量影响显著, 其它两个因素对其不显著。因此, 综合各指标值得到最佳菌种比例为 $A_3B_2C_2$, 即酵母菌 6%, 植物乳杆菌 2%, 保加利亚乳杆菌 2%, 3 种菌种的接种比例为 3:1:1。

在上述优化条件下进行验证试验, 得到结果如下: 氨基态氮含量为 3.52%, 粗蛋白含量为 61.63%。

2.5 扇贝下脚料发酵前后的品质比较

扇贝下脚料经酵母菌、植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌发酵后, 产物中氨基态氮含量和粗蛋白含量明显提高, 分别为 3.52% 与 61.63%, 同时发酵后扇贝下脚料腥味消失, 且具有发酵香味。以扇贝下脚料为底物, 通过混菌发酵培养大量菌种细胞而获得菌体蛋白含量较高的菌体蛋白饲料^[4], 提高了扇贝下脚料的附加值; 利用乳酸菌和酵母菌在发酵过程中分泌的蛋白酶降解蛋白质, 增加游离氨基酸的含量, 有利于动物对扇贝下脚料饲料的吸收; 扇贝下脚料具有很重的腥味, 微生物发酵法是常用的去腥方法之一, 研究发现酵母菌和乳酸菌对脱腥都具有一定的作用^[15], 利用微生物发酵使扇贝下脚料去腥增香, 改善了饲料的口感。

表 9 正交试验方差分析

Table 9 Analysis of variance of the orthogonal experiment

来源	指标									
	氨基态氮含量/%					粗蛋白含量/%				
	SS	f	S	F	显著性	SS	f	S	F	显著性
A	1.207	2	0.604	464.410	**	51.278	2	25.639	96.698	*
B	0.016	2	0.008	6.256		4.423	2	2.212	8.342	
C	0.141	2	0.071	54.333	*	0.438	2	0.219	0.827	

3 结论

3.1 扇贝下脚料是扇贝加工过程中产生的废弃物,但其蛋白含量较高。本研究通过微生物发酵法生产优质的扇贝下脚料蛋白饲料。通过单菌发酵、二菌发酵和三菌发酵实验确定混菌发酵效果优于单菌发酵,三菌发酵效果优于二菌发酵,其中植物乳杆菌、保加利亚乳杆菌和酵母菌混合发酵的效果最好。混菌发酵实验发现酵母菌和乳酸菌存在有偏利的共生关系。

3.2 通过正交实验优化混菌发酵的菌种比例,即酵母菌、植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌三种菌种的接种比例为3:1:1。在此条件下发酵扇贝下脚料所得产物的氨基态氮含量达到3.52%,粗蛋白含量为61.63%,与未发酵的相比,提到了9.54%,最终得到的扇贝下脚料蛋白饲料蛋白含量高,游离氨基酸含量丰富,无腥臭味,微生物发酵使扇贝下脚料蛋白饲料的品质得到了综合改善。

参考文献

- [1] 郑丽,汪秋宽.扇贝加工废弃物海鲜调味料的加工利用[J].水产科学,2005,1:34-37
- [2] 王朋朋.蛋白酶产生菌的筛选及固态发酵生产优质蛋白原料的研究[D].郑州:河北农业大学,2010
- [3] 陈京华.微生物发酵、外源酶制剂和促摄物质对牙鲆利用豆粕蛋白的影响[D].青岛:中共海洋大学,2006
- [4] Schleck W F. Break out A Food Poisoning of *Listeria Monocytogens* [J]. The New England Journal of Medicine. 1993, 308: 208
- [5] 王小蓉,周建平.油茶籽湿渣发酵生产蛋白饲料的菌种筛选[J].现代食品科技,2011,27(12):1476-1479
- [6] 吴远根,彭湘屏,张晓娟,等.产朊假丝酵母固态发酵麻疯树饼粕产菌体蛋白的研究[J].食品工业科技,2009,30(2): 161-163
- [7] 符楨化,王永华,于铁妹,等.酵母菌与乳酸菌混合发酵制备酸豆浆酒的研究[J].现代食品科技,2008,24(12):1292-1295
- [8] 张水华.食品分析实验[M].北京:化学工业出版社,2009
- [9] 崔敏,傅婕,迟原龙,等.茛菪三酮比色法和甲醛滴定法测定水解胶原的比较[J].中国皮革,2011,40(7):1-4
- [10] 周炜,范宇,陈历俊.发酵乳在发酵和低温储存过程中必须氨基酸变化研究[J].中国食品与营养,2012,4:26-28
- [11] 徐颖宣,徐尔尼,冯乃宪,等.微生物混菌发酵应用研究进展[J].中国酿造,2008,9:1-4
- [12] J A Narvhus, T H Gadaga. The role of interaction between yeasts and lactic acid in African fermented milks: a review [J]. International Journal of Food Microbiology. 2003, 86: 51-60
- [13] A Corsetti, J Rossi, M Gobbetti. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 69: 1-10
- [14] 邓桂兰.油茶饼粕发酵条件的研究[J].现代食品科技,2008, 24(4):363-365
- [15] 高翔,王蕊.Kefir 在低值淡水鱼鱼糜脱腥中的应用[J].食品科学,2011,32(23):152-156