

## 沼液和香蕉秆压榨汁生产单细胞蛋白菌株的筛选\*

米慧芝<sup>1,2</sup>, 潘世优<sup>1</sup>, 韦宇拓<sup>1\*\*</sup>, 黎贞崇<sup>2</sup>, 王青艳<sup>2</sup>, 秦艳<sup>2</sup>, 朱婧<sup>2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007)

**摘要:** 由于全球蛋白质缺乏, 单细胞蛋白(Single cell protein, SCP)作为一种安全的食品添加剂和饲料, 越来越受到人们的重视。尽管 SCP 大规模生产历史已有近百年, 但是对各种优良生产菌株、潜在底物以及最优发酵条件的研究仍然是世界各国研究的热点。基于此, 本研究以沼液和香蕉秆压榨汁为研究对象, 对能利用其生长的菌株进行筛选, 为进一步的单细胞蛋白生产提供参考。实验结果表明: 酵母菌、芽孢杆菌都能利用沼液和香蕉秆压榨汁生长, 但香蕉秆压榨汁不易保存, 因此不宜作为发酵底物; 热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 在沼液中的生长能力强于酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Y49 和毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115; 芽孢杆菌在沼液中的生长无规律, 且易染杂菌, 不适合实际生产应用。因此, 沼液作为热带假丝酵母单细胞蛋白生产的培养基, 不仅能为单细胞蛋白的生产提供原料, 也有利于沼液的妥善处理, 实现经济效益和环境效益的双赢。

**关键词:** 单细胞蛋白 沼液 香蕉压榨汁 热带假丝酵母 菌株筛选

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)04-0417-07

### 0 引言

单细胞蛋白(Single cell protein, SCP)是微生物的干燥细胞, 如真菌、藻类和细菌等, 在人类食物或动物饲料中用作蛋白质补充剂。近年来, 越来越多的廉价原料和工农业废弃物被用来生产 SCP。由于微生物的多样性, SCP 生产的常用底物有农业废弃物(如麦秆、甘蔗渣、稻壳渣、桔皮、玉米芯、葡萄渣、芒果渣、木薯废渣等)、农副产品加工废弃物(酒糟、糖蜜、造纸厂废渣)以及非常规培养基如石油副产品、天然气、乙

醇和甲醇等<sup>[1-4]</sup>。Saejung 等<sup>[5]</sup>使用光合细菌——红假单胞菌 CSK01 处理城市污水并生产单细胞蛋白, 在最佳培养条件下处理 3 d, 所获得的最大单细胞蛋白量为  $6.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Somda 等<sup>[6]</sup>通过添加不同氮源, 利用产脲假丝酵母菌 FJM12 发酵芒果废弃物, 结果表明, 添加酵母提取物作为氮源, 72 h 后可获得最大生物量  $(6.48 \pm 0.03) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且酵母提取物与硫酸铵对提高单细胞蛋白产量具有积极作用。Yadav 等<sup>[7]</sup>在极端发酵条件下, 使用马克斯克鲁维酵母和克鲁斯假丝酵母分批连续好氧发酵乳清蛋白来获取单细胞蛋白, 认为混合培养所获取的生物量最大, 为

\* 广西科学研究与技术开发计划项目(1644901), 广西科技攻关项目(桂科 AB17190534)和中央引导地方科技发展专项“国家非粮生物质能源工程技术研究中心行业技术服务能力建设”项目(桂科 ZY1949015)资助。

#### 【作者简介】

米慧芝(1983—), 女, 助理研究员, 主要从事发酵工程研究。

#### 【\*\*通信作者】

韦宇拓(1971—), 男, 教授, 主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn。

#### 【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20190808.011

米慧芝, 潘世优, 韦宇拓, 等. 沼液和香蕉秆压榨汁生产单细胞蛋白菌株的筛选[J]. 广西科学, 2019, 26(4): 417-423.

MI H Z, PAN S Y, WEI Y T, et al. Screening of single cell protein producing strains by biogas slurry and banana pseudostem juice [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(4): 417-423.

0.38 g · L<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>, 所得单细胞蛋白富含赖氨酸。Abarshi 等<sup>[8]</sup>采用酿酒酵母深层发酵的方法, 使用西瓜皮和菠萝皮生产单细胞蛋白, 结果表明, 采用菠萝皮水解液深层发酵, 所得酿酒酵母的单细胞蛋白产量(9.8%)比西瓜皮水解液高(2.42%); 另外, 两种果皮水解液组合发酵所得的单细胞蛋白产量高于西瓜皮水解液, 但仍然低于菠萝皮水解液。Mensah 等<sup>[9]</sup>以菠萝榨汁后的菠萝渣为底物, 利用酿酒酵母生产单细胞蛋白, 当菠萝渣提取物浓度为 60%(V:V)时, 单细胞蛋白产量最高。Jalasutram 等<sup>[10]</sup>以未消化的家禽舍垃圾和消化的家禽舍垃圾为原料, 利用假丝酵母菌生产单细胞蛋白, 发现未消化的家禽舍垃圾比消化的更适合于假丝酵母菌生产单细胞蛋白。dos Reis 等<sup>[11]</sup>选择 10 株酵母菌好氧发酵处理酒糟并生产单细胞蛋白, 其中酿酒酵母(CCMA0187 和 CCMA0188)、光滑假丝酵母菌(CCMA0193)和近平滑假丝酵母(CCMA0544)的生物量相对较高, 分别为 306 mg · L<sup>-1</sup>、312 mg · L<sup>-1</sup>、388 mg · L<sup>-1</sup> 和 306 mg · L<sup>-1</sup>, 而近平滑假丝酵母的蛋白质含量最高。Magalhães 等<sup>[12]</sup>以甘蔗渣半纤维素水解物为底物, 使用热带假丝酵母 KP276650 生产酵母单细胞蛋白, 发酵 96 h 所得的最终生物量为 16.97 g · L<sup>-1</sup>, 蛋白质含量为 60.05%。Tian 等<sup>[13]</sup>选择 5 种工业酵母菌, 即白地霉(*Geotrichum candidum* link)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、扣囊复膜酵母(*Saccharomyces fibuligera*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 对马铃薯淀粉加工废水进行发酵, 结果表明, 产朊假丝酵母、白地霉和热带假丝酵母共培养是马铃薯淀粉加工废水发酵的最佳组合。

在众多的研究报道中, 单细胞蛋白的发酵底物种类繁多, 而利用沼液(Biogass slurry, BS)和香蕉秆压榨汁(Banana pseudostem juice, BPJ)生产 SCP 的报道研究很少。沼液是沼气发酵的副产物, 其主要成分包括发酵过程中产生的各种无机物、有机物、微量元素等可溶性物质, 以及一些具有特殊活性的生物物质, 营养成分全面, 养分可利用率高, 具有较高的应用价值。香蕉秆为农业废弃物, 含水量极高, 利用其压榨汁生产单细胞蛋白可变废为宝, 进一步延长香蕉产业链。由于单细胞蛋白的生产菌株大多为假丝酵母菌, 因此本研究使用热带假丝酵母以及实验室已有的其他酵母菌、芽孢杆菌为筛选菌株, 以沼液和香蕉秆压榨汁为培养基, 对能利用沼液和香蕉秆压榨汁生长

的微生物进行筛选, 为进一步的单细胞蛋白生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

发酵沼液来自广西大学生命科学与技术学院发酵与酶工程实验室的发酵样品。取发酵后的沼液在 10 000 r/min 下离心 10 min, 至少离心 2 次以充分去除原液中的总悬浮固体并收集上清液, 过滤好的沼液放入-80℃冰箱保存备用。

香蕉秆来自广西大学农学院, 压榨后使用。

### 1.2 菌株

热带假丝酵母 *C. tropicalis* (编号 CICC 31949, 购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心), 酿酒酵母 *S. cerevisiae* Y49 (保藏于广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 由该实验室筛选选育), 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB600, 地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* (后 3 种菌均为模式菌株, 保藏于广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心)。

### 1.3 培养基与试剂

YPD 液体培养基: 10 g/L yeast extract, 20 g/L tryptone, 10 g/L 葡萄糖, 于高压蒸汽灭菌锅中 121℃ 灭菌 20 min (葡萄糖单独在 115℃ 条件下灭菌 15 min, 于超净台混合后使用)。

YPD 固体培养基: YPD 液体培养基配制时加入 15 g/L 琼脂粉, 其余操作相同。

LB 液体培养基: 5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0 后定容, 于高压蒸汽灭菌锅中 121℃ 灭菌 20 min, 备用。

LB 固体培养基: LB 液体培养基配制时加入 15 g/L 琼脂粉, 其余操作相同。

无机盐溶液: 1 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.1 g/L Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g/L ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 g/L MnCl<sub>2</sub>, 1 g/L CaCl<sub>2</sub>。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 种子液培养

(1) 从保存于-80℃冰箱的菌株保藏管中吸取 0.2 mL 菌液加入装有 10 mL 培养基的指形瓶中(酵母菌的培养基为 YPD 液体培养基, 芽孢杆菌的培养基为 LB 液体培养基), 在不同摇床中培养至对数期(酵母菌的培养条件为 30℃, 220 r/min; 芽孢杆菌的

培养条件为 37℃, 220 r/min), 活化菌种。

(2) 将培养好的菌种分别划线至各自的固体培养基继续活化(酵母菌的培养基为 YPD 固体培养基, 芽孢杆菌的培养基为 LB 固体培养基; 培养条件: 酵母菌为 30℃ 培养箱培养, 芽孢杆菌为 37℃ 培养箱培养)。

(3) 挑取平板上的单菌落放入装有 10 mL 培养基的指形瓶中培养, 培养基以及培养方法同步骤(1), 即得种子液。

#### 1.4.2 菌株筛选

控制 1.4.1 节步骤(3)培养好的菌液浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL 左右, 此时酵母菌的  $OD_{600}$  约为 1.0, 芽孢杆菌的  $OD_{540}$  约为 0.6。发酵底物: 沼液(BS)、香蕉秆压榨汁(BPJ)以及两者按体积比 1:1 混合的混合物(Mixture medium, MM)。

(1) 取 10 mL 发酵底物置于指形瓶中, 接入 10% (V:V) 种子液, 按照各自的培养条件放入摇床中培养, 间隔一定时间取样测定吸光度(酵母菌为 8 h, 芽孢杆菌为 4 h, 并随着培养时间的增长, 取样时间间隔适当延长, 以下取样时间相同处理), 绘制生长曲线。每个实验设置 3 个平行。

(2) 取 10 mL 含有葡萄糖与无机盐(葡萄糖终浓度为 20 g/L, 无机盐添加比例 1:10, V:V) 的发酵底物置于指形瓶中, 接入 10% (V:V) 种子液, 按照各自的培养条件放入摇床中培养, 间隔一定时间取样测定吸光度, 绘制生长曲线。每个实验设置 3 个平行。

(3) 取 10 mL 发酵底物置于指形瓶中, 接入 10% (V:V) 种子液, 按照各自的培养条件放入摇床中培养, 培养 36 h 后按照比例加入葡萄糖和无机盐(葡萄糖终浓度为 20 g/L, 无机盐添加比例 1:10, V:V) 继续培养。间隔一定时间取样测定吸光度, 绘制生长曲线。每个实验设置 3 个平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株在不同培养基中的生长情况

从图 1 可以看出, 热带假丝酵母 *C. tropicalis* 和毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 在 YPD 培养基中的生长情况显著优于其他培养基, 酿酒酵母 *S. cerevisiae* Y49 在香蕉秆压榨汁中(BPJ)的生长状态稍微优于 YPD 培养基, 整体上来看 3 种菌株在 YPD 培养基中生长最优, 其次为香蕉秆压榨汁(BPJ)、混合培养基(MM), 生长最差的为沼液培养基(BS)。其可能原因

是 YPD 培养基营养成分全面丰富; 香蕉秆压榨汁的糖分含量高; 沼液的碳氮比低, COD 含量高, 氨氮浓度高, 对细胞有一定的毒害作用。

枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB600、地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* 在沼液、香蕉秆压榨汁、混合培养基和 LB 培养基中的生长变化没有规律, 平行对照误差较大(图 2); 再加上由于沼液、香蕉秆压榨汁、混合培养基等培养基未经过灭菌处理, 芽孢杆菌在发酵过程中易出现杂菌污染现象, 故在实际生产中不宜使用芽孢杆菌。

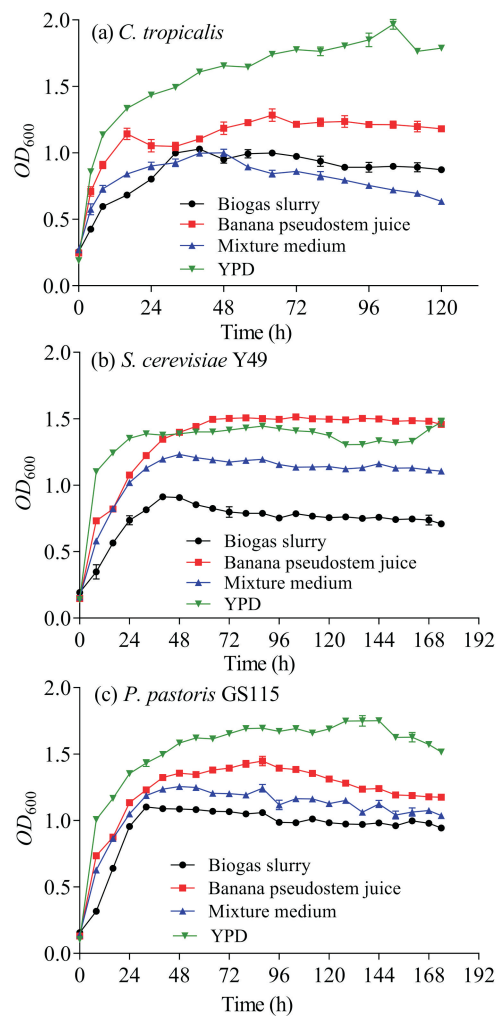


图 1 酵母菌在不同培养基中的生长情况

Fig. 1 Growth of yeast in different medium

### 2.2 酵母菌在沼液中的生长情况

由图 3 可知, *C. tropicalis*、*S. cerevisiae* Y49 和 *P. pastoris* GS115 在沼液中都能生长, 且各菌株的生长趋势基本一致。接种前, 在沼液中加入葡萄糖和无机盐(用“BS+G+I-before”表示), *C. tropicalis*、*S. cerevisiae* Y49 以及 *P. pastoris* GS115 的生长速率、 $OD_{600}$  值皆高于其他两种培养基(图 3b), 未添加

其他物质的沼液(BS)的生长速率最慢、菌体浓度最低(图 3a)。发酵 36 h 后,往沼液中添加终浓度一致

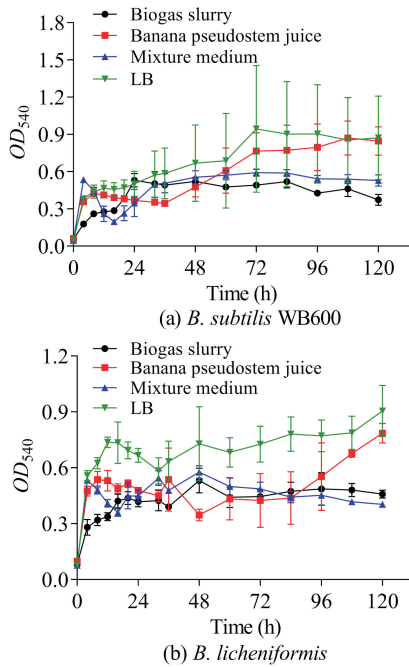


图 2 芽孢杆菌在不同培养基中的生长情况

Fig. 2 Growth of *Bacillus* sp. in different medium

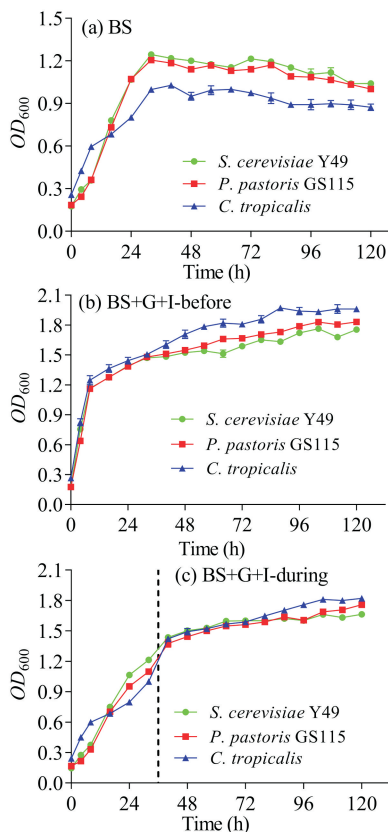


图 3 酵母菌在沼液中的生长情况

Fig. 3 Growth of yeast in biogas slurry

的葡萄糖和无机盐(用“BS+G+I-during”表示),菌株生长加快, $OD_{600}$  值大幅度上涨,其后一直保持上升趋势(图 3c)。在未添加其他物质的沼液中,培养 36 h 时 3 种酵母菌的生长浓度达到最高,继续培养则进入衰亡期,说明外源碳源与氮源的添加,对酵母菌的生长有促进作用。

### 2.3 酵母菌在香蕉秆压榨汁中的生长情况

从图 4 中可以看出,在整个培养过程中,3 种酵母能很好地利用香蕉秆压榨汁(BPJ)以及添加葡萄糖和无机盐的香蕉秆压榨汁(发酵前添加和发酵 36 h 后添加,分别用“BPJ+G+I-before”“BPJ+G+I-during”表示)。在 BPJ 中,Y49、GS115 和 *C. tropicalis* 的生长差异比较显著(图 4a);而在 BPJ+G+I-before 和 BPJ+G+I-during 中,3 种酵母菌的生长差异不显著(图 4b,c)。由于实验期间香蕉秆压榨汁出现染杂菌现象,不易保存,故不宜将其作为发酵培养基。

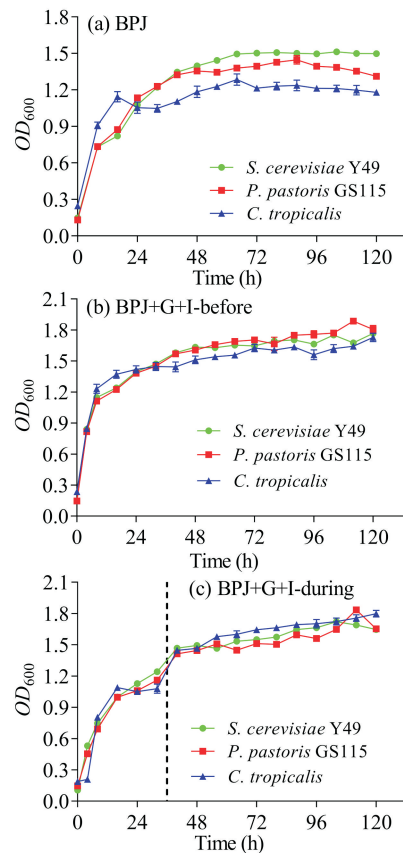


图 4 酵母菌在香蕉秆压榨汁中的生长情况

Fig. 4 Growth of yeast in banana pseudostem juice

### 2.4 酵母菌在混合培养基中的生长情况

将沼液和香蕉秆压榨汁按体积比 1 : 1 混合作为

培养基, 考察 3 种酵母菌的生长情况(图 5)。从图 5 可以看出, MM 中酵母菌的生长变化趋势与在 BPJ 中大体一致, 菌株在添加有葡萄糖和无机盐培养基中的  $OD_{600}$  一直保持增长趋势(图 5b, c), 而未添加其他物质的混合培养基中的菌株到发酵后期则进入衰亡期(图 5a)。

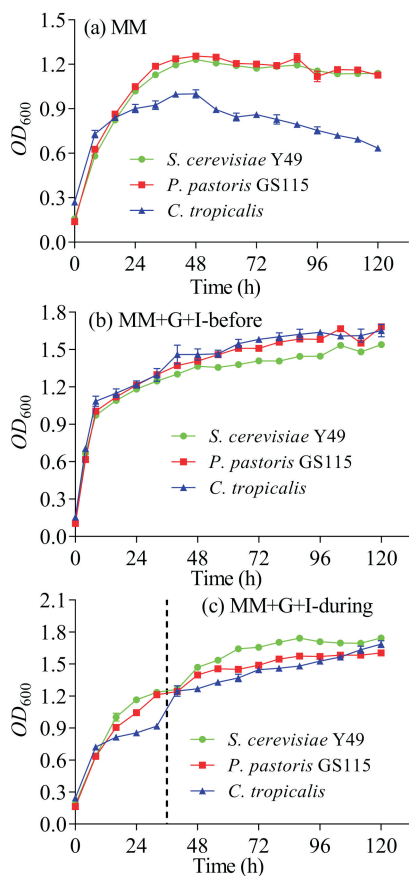


图 5 酵母菌在混合培养基中的生长情况  
Fig. 5 Growth of yeast in mixture medium

## 2.5 酵母菌的菌体干重比较

酵母菌、芽孢杆菌在沼液和香蕉秆压榨汁中都能生长。由于香蕉秆压榨汁在培养时易染杂菌, 生产成本也随之增加, 因此就两者而言, 沼液更适合酵母菌单细胞蛋白的生产。单纯从生长浓度上来看, Y49、GS115 和 *C. tropicalis* 三者沼液中的生产能力不分伯仲, 为找出更适合在沼液中生长的酵母菌, 对菌体干重随时间变化的情况进行研究。虽然 3 种酵母菌生长状态趋于一致, 但 *C. tropicalis* 的菌体干重明显大于其他两种菌, 差异显著(图 6), 因此 *C. tropicalis* 更适合用于沼液发酵产单细胞蛋白。

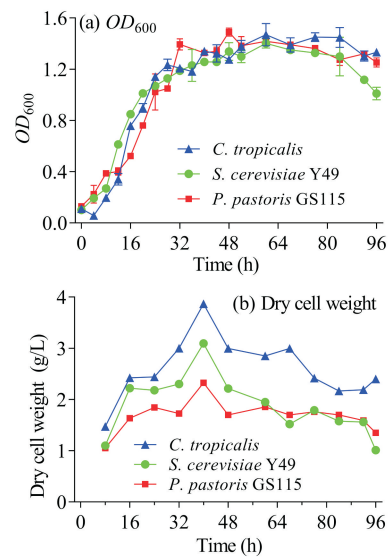


图 6 酵母菌  $OD_{600}$  与细胞干重随时间变化关系

Fig. 6 Relationship between yeast  $OD_{600}$  and dry cell weight over time

## 3 结论

香蕉秆压榨汁易染杂菌, 因此不宜用作单细胞蛋白的发酵底物。从生长状态以及细胞干重来, *C. tropicalis* 更适用于发酵沼液生产单细胞蛋白。外源碳源和氮源的添加有利于酵母菌的生长发育。

*C. tropicalis* 是重要的工业酵母, 除作为工业化生产长链二元酸、木糖醇等化工原料的主要生产菌之外, 也是食品造纸等工业废水的处理中, 利用废弃物生产单细胞蛋白的重要微生物。在本研究中, 热带假丝酵母单细胞蛋白的产量较低, 下一步可研究其他碳源与氮源对热带假丝酵母单细胞蛋白产量的影响, 以实现单细胞蛋白的高产; 或者筛选出更适合的生产菌株以及采用共培养的方式来提高单细胞蛋白的生物量。

## 参考文献

- [1] REIHANI S F S, KHOSRAVI-DARANI K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2019, 37: 34-40.
- [2] UÇKUN KIRAN E, TRZCINSKI A P, LIU Y. Platform chemical production from food wastes using a biorefinery concept [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2015, 90 (8): 1364-1379. <https://doi.org/10.1002/jctb.4551>.
- [3] SUMAN G, NUPUR M, ANURADHA S, et al. Single cell protein production: A review [J]. Int J Curr Micro-

- biol App Sci, 2009, 4(9): 251-269.
- [4] BHALLA T C, SHARMA N N, SHARMA M. Production of metabolites, industrial enzymes, amino acids, organic acids, antibiotics, vitamins and single cell proteins [J]. J Environ Issues, 2011, 6: 34-78.
- [5] SAEJUNG C, THAMMARATANA T. Biomass recovery during municipal wastewater treatment using photosynthetic bacteria and prospect of production of single cell protein for feedstuff [J]. Environmental Technology, 2016, 37(23): 3055-3061. DOI: 10.1080/09593330.2016.1175512.
- [6] SOMDA M K, NIKIEMA M, KEITA I, et al. Production of single cell protein (SCP) and essentials amino acids from *Candida utilis* FMJ12 by solid state fermentation using mango waste supplemented with nitrogen sources [J]. African Journal of Biotechnology, 2018, 17(23): 716-723.
- [7] YADAV J S S, BEZAWADA J, AJILA C M, et al. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey [J]. Bioresource Technology, 2014, 164: 119-127.
- [8] ABARSHI M M, MADA S B, AMIN M I, et al. Effect of nutrient supplementation on single cell protein production from watermelon and pineapple peels [J]. Nigerian Journal of Basic and Applied Science, 2017, 25(1): 130-136. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/njbas.v25i1.17>.
- [9] MENSAH J K M, TWUMASI P. Use of pineapple waste for single cell protein (SCP) production and the effect of substrate concentration on the yield [J]. J Food Biochem, 2017, 40(3): e12478. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12478>.
- [10] JALASUTRAM V, KATARAM S, GANDU B, et al. Single cell protein production from digested and undigested poultry litter by *Candida utilis*: Optimization of process parameters using response surface methodology [J]. Clean Techn Environ Policy, 2013(15): 265-273. DOI 10.1007/s10098-012-0504-3.
- [11] DOS REIS K C, COIMBRA J M, DUARTE W F, et al. Biological treatment of vinasse with yeast and simultaneous production of single-cell protein for feed supplementation [J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2019, 16(2): 763-774.
- [12] MAGALHÃES C E B, SOUZA-NETO M S, ASTOLFI-FILHO S, et al. *Candida tropicalis* able to produce yeast single cell protein using sugarcane bagasse hemi-cellulosic hydrolysate as carbon source [J]. Biotechnology Research and Innovation, 2018, 2(1): 9-21.
- [13] TIAN Y, ZHANG Y, SUN Z, et al. Yeast compound for single-cell protein production by potato starch processing wastewater fermentation [M]// 2nd International Conference on Environmental Science and Engineering (ESE 2017). Lancaster, United States: DESTech Publications, Inc., 2017. DOI: 10.12783/dt-ees/eese2017/14332.

## Screening of Single Cell Protein Producing Strains by Biogas Slurry and Banana Pseudostem Pressed Juice

MI Huizhi<sup>1,2</sup>, PAN Shiyu<sup>1</sup>, WEI Yutuo<sup>1</sup>, LI Zhenchong<sup>2</sup>, WANG Qingyan<sup>2</sup>, QIN Yan<sup>2</sup>, ZHU Jing<sup>2</sup>

(1. College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**Abstract:** Due to the global shortage of protein, single cell protein (SCP) has been paid more and more attention as a safe food additive and feed. Although the history of large-scale production of SCP has been nearly a hundred years, the research on various excellent production strains, potential substrates, and optimal fermentation conditions is still a hotspot in the world. Based on this, this study selected biogas slurry and ba-

nana pseudostem pressed juice as research objects to screen strains which can be used to grow, providing a reference for the production of single cell protein in the future. The results show that both yeast and bacillus can grow in the biogas slurry and banana pseudostem pressed juice, but banana pseudostem pressed juice is not easy to preserve, so it should not be used as a fermentation substrate. The growth capacity of *Candida tropicalis* in biogas slurry is stronger than that of *Saccharomyces cerevisiae* Y49 and *Pichia pastoris* GS115. The growth of bacillus in biogas slurry is irregular and easy to be contaminated, so it is not suitable for practical production. Therefore, biogas slurry can be used as a culture medium for the production of single cell protein of *C. tropicalis*, which not only provides sufficient raw materials for the production of single cell protein, but also facilitates the proper disposal of biogas slurry, so as to achieve a win-win situation of economic and environmental benefits.

**Key words:** single cell protein, biogas slurry, banana pseudostem juice, *Candida tropicalis*, screening of strains

责任编辑: 陆 雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>