

文章编号:1000-0615(2000)05-0458-05

硒酵母的培养及其养虾效果

常仁亮, 韩保平, 顾润润

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

S966.229.3

S963-211

摘要:对五株假丝酵母菌株进行利用淀粉废水和转化硒元素的筛选试验,其中CY-173菌株所得的蛋白质含量和蛋白态硒总量最多。对其进行耐高温试验,在33~45℃范围内,菌株都能生长,但超过40℃生长速度开始减缓,45℃时明显受到抑制。在6L标准发酵罐内进行pH与温度条件试验,pH在3~5之间,菌株生长差异不显著;在33~40℃范围内,菌株都能较好生长,但以37℃的蛋白质含量与蛋白态硒总量为最高。将所得的硒酵母替代部分鱼粉用于养殖中国对虾,结果三组硒酵母饲料(含10%、20%、30%硒酵母)的养殖效果均优于对照饲料,其中10%硒酵母添加量的饲料(含硒 0.6×10^{-6}),其饵料系数最低,为2.56,比对照组的2.95减少了13.3%。

关键词:中国对虾;养殖;硒酵母;假丝酵母菌;饲料蛋白源;培养
中图分类号:S963 文献标识码:A

Culture of selenium yeast and its application of the yeast to shrimp culture

CHANG Ren-liang, HAN Bao-ping, GU Run-run

(East China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Shanghai 200090, China)

Abstract:The selecting experiment on utilizing starch wastewater by five *Candida tropicalis* strains and their transforming of selenium were studied. The results showed that the strain of CY-173 produced more protein and protein-form selenium than the others. The temperature tolerance test proved that the bacteria were able to grow upto 33 - 45 °C. The growth rate slowed down when temperature were above 40 °C and the growth was inhibited at 45 °C. An experiment concerning the effects of pH and temperatures on their growth rate and the amount of protein produced was also carried out in a standard 6-liter tun. The difference of growth rates of the strains was not significant at pH 3 - 5, and they could grow normally at 33 - 40 °C. The amounts of protein and protein-form selenium produced by the strains reached the highest level at 37 °C. Feed with the selenium-rich yeast was used in the culture of *Penaeus chinensis*. The results showed that the three groups fed with the selenium-rich yeast (containing 10%, 20%, 30% selenium yeast) had better effects than the control group, and the group with 10% of the yeast (containing 0.6×10^{-6} selenium) had the lowest feed ratio, 2.56, reducing 13.3% compared with the control group.

Key words: *Penaeus chinensis*; culture; selenium yeast

收稿日期:1999-09-06

资助项目:中国水产科学研究院合同资助项目(96-02-03)

作者简介:常仁亮(1941-),男,副研究员,湖北省武汉市人。主要从事水产动物营养及添加剂研究。Tel:021-65680120

作为饲料蛋白源所采用的单细胞蛋白(SCP),其生产菌株的筛选,是以菌株的生长速度快、蛋白质含量高、对糖的转化率高、培养条件控制参数范围大、操作简便和菌株安全性高等为依据。假丝酵母菌(*Candida tropicalis*)是目前国际上饲料蛋白源生产中应用较广的菌种之一,它繁殖迅速,除了能利用葡萄糖,还能利用五碳糖^[1]、正烷烃和其他生物素碳源^[2-5],可以为淀粉生产解决废弃物问题。另外,它还能将毒性较大的无机态硒转化为安全性高且有生物效用的有机态硒(硒蛋白)。目前认为,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPX)在硒参与的代谢过程中,能有效地调节生物体的营养吸收并有保护细胞膜的功能^[6]。将硒蛋白应用于对虾饲料中,能促进虾体的营养代谢,提高对虾养殖的收益。

1 材料和方法

1.1 硒酵母的培养

1.1.1 菌种

- Y-1 热带假丝酵母,中国科学院上海有机化学研究所保管
Y-17 热带假丝酵母,中国科学院上海有机化学研究所保管
CY-2 热带假丝酵母,中国水产科学研究院东海水产研究所提供
CY-172 以 Y-17 为母株,经诱导驯化而得
CY-173 以 Y-17 为母株,经诱导驯化而得

1.1.2 培养基配方

摇瓶培养基:酶解淀粉黄浆水 1L, NaSeO₃ 0.2g, (NH₄)SO₄ 3g, KH₂PO₄ 25g, Na₂HPO₄ 1.25g, MgSO₄ 0.5g, ZnSO₄ 0.01g, FeSO₄ 0.01g, 酵母膏 1g, pH 6.2(斜面 6.8)。

发酵罐培养基:酶解淀粉黄浆水 1L, 酵母膏 1g, NaSeO₃ 0.2g, (NH₄)SO₄ 1g, MgSO₄ 0.05g, ZnSO₄ 0.05g, FeSO₄ 0.05g, KH₂PO₄ 1g, pH 4.5。

1.1.3 菌种培养、筛选

摇瓶培养基:斜面活化 30~40h 后,接入摇瓶,在旋转式振荡器上,以 33℃培养 22h,取出后分别加 2 滴泡敌,离心(2 500 r·min⁻¹, 10min),沉淀菌体用清水洗涤,再离心再洗涤。烘干至恒重,称重。每批设三个平行。

发酵罐培养基:在 BFⅢ-64 型发酵罐内发酵^[7]。取样测定,从发酵罐取样,吸取搅拌均匀的发酵液 10mL,离心(3 000 r·min⁻¹, 20min),上清液测定残糖,沉淀物用水洗涤离心后于 105℃烘干至恒重,称重。每批设三个平行。

1.1.4 蛋白质分析

用凯氏定氮法。

1.1.5 糖分测定

用斐林氏快速测定法。

1.1.6 氨基酸分析

用 LKB 4400 氨基酸自动分析仪测定。

1.1.7 硒的测定

将酵母细胞超声破碎后,溶解于水中,用硫酸铵将硒蛋白沉淀,以二氨基联苯胺盐酸盐分光光度法,在岛津 U-2 分光光度仪(420nm)上进行测定。

1.2 养殖试验

1.2.1 试验池和用水

试验时间为 7 月 12 日-9 月 20 日,在本所奉贤柘林海水养殖试验场的 2.0m×1.5m×1.2m 水泥池

中进行(有效水体 1.8~2.1m³),用水取自 0.153 3 hm²蓄水池。采用隔天换水 4/5~5/6 和连续充气的方式,海水盐度 5~8,pH8.0~8.3,总氮氮 0.6~0.8mg·L⁻¹,水温 21.0~28.0℃。

1.2.2 试验用虾

中国对虾(*Penaeus chinensis*),取自本所奉贤柘林海海水养殖试验场养虾池。

1.2.3 试验用饲料

对照组饲料采用本所海水养殖室推荐配方。试验用饲料,在推荐配方基础上,将硒酵母取代蛋白源的 10%、20%、30%。

2 结果和讨论

2.1 菌种筛选

利用淀粉废水进行菌种培养生产单细胞蛋白,筛选菌种的主要依据是视其对废液中还原糖(2%)的转化率及蛋白质的生成率。还原糖的转化率可以从菌体干重中反映出来,而蛋白质的生成率以蛋白质含量来反映,两者在理论上应该是一致的。但酶解后的淀粉废水是混浊的乳状液,含 2% 还原糖,经菌种培养,不能全部被转化为菌体蛋白,有 3% 左右的固形物混在菌液之中,使菌体转化率不能正确反映菌体质量,因而以蛋白质含量和蛋白态硒总量作为筛选菌种的依据。

从表 1 可以直观看到,CY-2 菌的菌干重最高,转化率也最高,但蛋白质含量只有 39.25%,为最低,蛋白态硒总量为 46.53μg,处于第三位。Y-1 菌、Y-17 菌和 CY-172 菌的菌干重、转化率、蛋白质含量和蛋白态硒总量都不是最高;CY-173 菌的菌干重和转化率排在第三,但其 43.12% 的蛋白质含量为最高,使 49.15μg 的蛋白态硒总量也居于最高位。可以认为,CY-173 菌株对淀粉废水的利用率最高,对硒的转化率也最高,因而对其进行进一步试验。

2.2 CY-173 菌的耐高温培养

在发酵工业生产中,对数生长期是菌体大量繁殖期,会产生大量发酵热。如果菌体的最佳生长温度与生长抑制温度相差太近,就需耗用大量冷却水使之恒定在较小的温度范围,不仅制冷设备容积相应增大,还给温度控制带来很大难度。因此,选育耐高温酵母菌也一直是酵母研究工作中的重要课题。CY-173 菌的母株 Y-17 菌,其最佳生长温度为 32±1℃,高于 34℃ 时,菌体生长就明显受抑制^[7]。为了得到耐高温酵母菌,我们对 Y-17 菌株进行高温诱导选育,得到 CY-173 诱变菌株,它在较高温度下的生长情况见表 2。

从表 2 可以看到,CY-173 菌株在 33~45℃ 都能生长,但超过 40℃ 以后,生长速度就开始减缓,表现为菌干重、转化率、蛋白质含量和蛋白态硒总量都明显低于其它温度组。45℃ 时则表现为最差,各项指标均处于最低,菌干重、转化率和蛋白态硒总量更是接近最高值的一半,而蛋白质含量有较大幅度降低,表明这一温度下菌株的生长明显受到抑制。而在 35~40℃ 时,蛋白质含量在 42.49%~45.77%,蛋白态硒总量为 50.55~56.52μg,生长状况最佳。这一最佳生长温度比母株的 32℃ 提高 3~8℃,而其受抑温

表 1 5 种菌株的培养结果
Tab.1 Culture results of five yeast strains

菌种	菌干重 (mg)	转化率 (%)	蛋白质含量 (%)	蛋白态硒总量 (μg)
Y-1	114.1	57.03	40.06	45.48
CY-2	118.6	59.30	39.25	46.53
Y-17	111.3	55.65	41.86	46.59
CY-172	110.6	55.30	41.91	46.35
CY-173	114.0	57.00	43.12	49.15

注:淀粉废水中还原糖含量 2%。

表 2 较高温度下 CY-173 菌株在淀粉废水中的培养结果
Tab.2 Culture results of strain CY-173 in wastewater containing starch under high temperature

培养温度 (°C)	菌干重 (mg)	转化率 (%)	蛋白质含量 (%)	蛋白态硒总量 (μg)
33	129.8	64.90	41.23	53.17
35	110.5	55.25	45.77	50.55
37	133.1	66.55	42.49	56.52
40	113.8	56.90	45.44	51.71
42	99.7	48.85	40.64	40.52
45	70.1	35.05	37.67	26.41

注:淀粉废水中还原糖含量 2%。

度为 45℃,比母株的 34℃提高 11℃ 这一温度差便于生产工艺的控制,且可以降低能耗。

2.3 CY-173 菌在 6L 发酵罐内的生产

培养温度和 pH 控制对酵母菌的生长有很大影响。根据摇瓶内 CY-173 菌株的生长情况,在 6L 发酵罐内选择 pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 五种 pH 值和 33℃、35℃、37℃、40℃ 四种温度进行试验。试验数据进行方差分析,分析结果如表 3~7。

从 pH 值的方差分析结果(表 3)来看,CY-173 菌在 5 种 pH 值下的 F 值 0.62 远小于 $F_{0.05}$ 的 3.48,说明 pH 在 3.0~5.0 之间时,菌株的生长差异不显著。但菌体得率随 pH 升高略有增高,从保护设备和提高得率两方面考虑,选择较高的 4.5 较适宜。

表 3 不同 pH 值时 CY-173 菌株得率的方差分析(%)

Tab.3 Variance analysis on gain rate of strain CY-173 under different pH value(%)

次数	pH					Σ
	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	
1	13.46	13.85	14.54	14.81	15.38	
2	14.23	12.82	15.12	13.85	14.36	
3	10.76	13.37	12.13	13.11	13.64	
ε	38.45	40.04	41.79	41.77	43.38	205.43
(ε) ²	1478.4	1603.2	1746.4	1744.73	1881.82	21690.49
ε ²	501.32	534.93	587.16	583.02	628.80	8454.54
方差来源	平方和	自由度	均方	F	临界值	
pH 值	4.25	4	1.06			
误差	17.08	10	1.70	0.62	$F_{0.05} = 3.48$	
总合	21.33	14				

表 4 pH 为 4.5 时 CY-173 菌在不同培养温度下得率的方差分析(%)

Tab.4 Variance analysis on gain rate of strain CY-173 at pH 4.5 under different temperature

次数	温度(℃)				Σ	方差来源	平方和	自由度	均方	F	临界值
	33	35	37	40							
1	14.54	12.31	12.69	14.46		温度	10.91	3	3.64		
2	14.73	11.73	12.07	14.04							
3	13.18	11.52	11.55	11.96		误差	5.99	8	0.75	4.85	$F_{0.05} = 4.04$ $F_{0.01} = 7.59$
ε	42.45	35.56	36.31	40.46	154.78	总合	16.90	11			
(ε) ²	1802	1264.51	1318.42	1637.01	6021.94						
ε ²	602.09	421.84	440.12	549.01	2013.30						

从表 4 看,在 33℃至 40℃范围内,33℃的得率最高,40℃次之,但经方差分析, $F = 4.85$,大于 $F_{0.05}$ 而小于 $F_{0.01}$,可以认为温度对得率有一定影响。

表 5 表明,CY-173 菌生长的温度范围较宽,这与摇瓶试验结果一致。在 37℃时,蛋白质含量与蛋白态硒总量最高。而残糖均在千分之一以下,表明转化基本完全。

2.4 CY-173 的氨基酸分析

CY-173 菌体蛋白经酸水解后进行氨基酸分析,结果(表 6)表明,该菌株氨基酸含量与其它酵母菌大部分一致,但赖氨酸明显高出母株 1.7g,也高出药用酵母和英国酵母;蛋氨酸含量却明显偏低,但仍在饲料酵母的蛋氨酸含量范围之内。

2.5 养殖结果

试验所用饲料配方,以豆粕、鱼粉、麸质粉、麸皮、酵母粉、复合维生素和复合无机盐等组成,酵母粉的添加量不宜超过蛋白源的 25%^[8],在此基础上,分别以 10%、20%和 30%的硒酵母替代鱼粉,

表 5 不同温度下 CY-173 菌株的生长结果

Tab.5 Growth results of strain CY-173 under different temperature

温度(℃)	33	35	37	40
得率(%)	14.15	11.85	12.10	13.49
蛋白质含量(%)	46.22	47.92	56.23	49.58
蛋白态硒总量(μg/g)	654.01	567.85	680.38	668.83
残糖(%)	0.81	0.67	0.68	0.77

表 6 各种酵母菌的氨基酸组成(g·(100g)⁻¹蛋白)

Tab.6 Amino acid composition of different yeast (g·(100g)⁻¹ protein)

氨基酸	CY-173 菌	Y-17 菌	药用酵母	Bp 酵母 ^[4]	饲料酵母 [*]
组氨酸	2.6	1.6	1.8	2.1	0.6~2.4
精氨酸	4.9	7.1	5.5	5.1	2.3~5.6
赖氨酸	8.6	6.9	7.3	7.4	3.9~6.8
亮氨酸	7.3	7.2	7.2	7.4	3.1~7.6
异亮氨酸	5.4	5.0	4.8	5.1	2.5~4.5
缬氨酸	6.5	5.4	5.5	5.9	2.5~5.1
蛋氨酸	1.0	1.9	1.6	1.8	0.4~1.7
苏氨酸	5.1	5.2	5.2		3.7~4.2
苯丙氨酸	4.3	3.3	3.2	4.3	2.2~4.2
酪氨酸	3.8	3.8	3.7	3.6	
丝氨酸	4.6	4.2	4.7	4.9	

注:饲料酵母取自制酒精、制味精及木材水解、纸浆废液生产的酵母。

使其含硒分别为 0.6×10^{-6} 、 1.2×10^{-6} 和 1.8×10^{-6} 。将三种硒酵母饲料与对照饲料一起用于中国对虾的养殖,试验结果如表 7。

表 7 表明,用硒酵母替代部分鱼粉后,直观分析认为,饲料系数都有所降低,说明硒酵母对中国对虾的饲养效果优于鱼粉,但其添加量并不是越多越好,而以 10% 的添加量(含硒 0.6×10^{-6})最为合适,其饵料系数为 2.56,比对照组的 2.95 减少了 13.3%。

表 7 硒酵母饲料对中国对虾的养殖结果

Tab.7 Feeding results of *P. chinensis* fed with se-rich yeast feeds

组别		1	2	3	4
放养	硒酵母的添加比例(%)	10	20	30	0
	尾数	40	40	40	40
	平均体长(cm)	6.62	6.81	6.80	6.73
	平均体重(g)	3.48	3.79	3.77	3.49
	总重(g)T	139.26	151.59	150.92	146.31
收获	尾数	40	37	40	38
	成活率(%)	100	92.5	100	95
	平均体长(cm)	8.71	8.96	8.70	8.72
	平均体重(g)	8.12	8.55	8.00	7.90
	总重(g)	324.8	316.25	320.8	300.2
结果	净增重(g)	185.54	176.03	169.88	161.21
	投饲量(g)	476	476	476	476
	比增重(g)	115.09	109.2	105.4	100
	饵料系数	2.56	2.70	2.80	2.95

参考文献:

1. Lidder J. A Taxonomic Study[A]. The Yeasts[M]. North Holland Publishing Co., Amsterda, Holland, 1970, 531 - 534.
2. 杨镇华. 正烷酵母连续发酵工艺“正烷酵母”鉴定资料[Z]. 1981, 1-5.
3. 加藤畅夫. 海洋の微小生物, 微生物蛋白质和原料甲醇生产技术[Z]. 大阪: 三菱瓦斯化学株式会社, 1977, 203 - 241.
4. Seneg J C. International symposium on single cell proteins[M], 1981, 192 - 202.
5. 何忠效(译). 生化工程与生物技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 1992, 6-9.
6. 张翔华. 硒的生物学功能及富硒食品的开发现状, 微量元素与健康研究——硒专辑, 1994, 18-22.
7. 王大琛. 正烷酵母连续培养工艺研究“正烷酵母”鉴定资料[Z]. 1981
8. 上海市水产局低盐度中国对虾养殖协作组. 低盐度海水中国对虾养殖技术操作规程(试行本)[Z]. 1998, 5-11
9. 国家发明专利 88108854, 多维高蛋白活性饲料酵母[P]. 6-9.

欢迎订阅 2001 年《水产科技情报》杂志

《水产科技情报》杂志创刊于 1973 年,是由上海市水产研究所,上海市水产学会主办的技术类刊物,双月刊,2001 年起改为大 16 开(定价不变),48 页,国内外公开发行。

本刊辟有综述、(水产)增养殖、水产资源、饲料研究、水产品加工、病害防治、渔业环境、渔业经济、水产捕捞等栏目,1999 年增设了水产养殖为主的专题讲座。明年将增辟观赏水族专栏,以满足读者对休闲渔业日益增长的需求。为进一步适应渔业生产的需要,今后将逐步加大对渔业实用生产技术的报道力度,适当报道具有实用价值的科研成果及动态信息。

渔业致富离不开科学技术和科技信息。请读者及时向当地邮局办理 2001 年度订阅手续。如邮局订阅不便或漏订,也可直接汇款至编辑部订阅。本刊邮发代号 4-204,每册定价 4.00 元,全年订费 24.00 元。

本刊承接各类渔业商品广告,涂塑封页,彩色、双色、单色插页,设计独到,制作精良,欢迎中外企业惠顾。

编辑部地址:上海市佳木斯路 265 号,邮政编码:200433,联系人:侯妙福

电话:(021)65483215 × 8024,65489796,传真:(021)65489796