

李 娟, 刘丹梅, 孙书伟, 等. 1 株高蛋白海洋酵母菌的鉴定及营养成分分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 269–270, 296

1 株高蛋白海洋酵母菌的鉴定及营养成分分析

李 娟, 刘丹梅, 孙书伟, 宋 洁, 李 莉, 许燕博

(辽东学院, 辽宁丹东 118003)

摘要:对黄海近海海水和海泥中的酵母菌进行分离筛选, 获得 1 株蛋白含量较高的海洋酵母菌 Yd-15, 并对其进行了鉴定和营养成分分析。通过形态学和生化试验, 鉴定其为红酵母属的海洋胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)。经测定, 该菌株的粗蛋白含量为 49.7%, 碳水化合物为 32.5%, 脂肪含量为 5.6%, 灰分为 7.2%。该菌具有较高的蛋白含量和优良的脂肪酸、氨基酸组成, 是一种极具潜力的水产动物饲料蛋白源。

关键词:海洋酵母菌; 蛋白质; 营养成分

中图分类号: Q917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0269-02

海洋酵母菌是海水中常见的一类真菌, 其具有蛋白含量高、营养成分丰富的特点, 可作为水产动物的饲料蛋白源。作为生物饵料, 海洋酵母菌具有适口性好、生长快、易培养、易贮存、利用率高等特点因而具备较高的应用价值。本试验对筛选获得的 1 株高蛋白海洋酵母菌进行鉴定, 并分析其生化成分和营养价值, 为其今后的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

海洋酵母菌 Yd-15 由黄海近海海域海水样中分离获得。菌株培养采用 YPD 培养基, 配方(质量体积比)为: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 1%, 琼脂 2%, 陈海水 100 mL, 自然 pH 值。菌种接种于 YPD 液体培养基中, 28 ℃, 转速 190 r/min 条件下培养至对数期, 离心收集菌体, 干燥备用。

1.2 方法

1.2.1 形态学观察 (1) 显微形态: 用接种环挑取酵母菌培养物, 置于洁净的载玻片中央, 轻轻涂布, 美蓝染色, 盖上盖玻片, 用 100 倍油镜观察细胞形状、大小以及繁殖方式。(2) 菌落形态: 将新鲜培养的酵母菌接种于 YPD 平板上, 28 ℃ 培养 3 d, 观察菌落的颜色、质地、表面和边缘形状等特征。

1.2.2 生理生化鉴定 对酵母菌进行糖发酵、碳源同化、氮源同化、尿素分解、脲酶试验, 方法参照文献[1]。

1.2.3 营养成分分析 (1) 基础营养成分测定: 粗蛋白质含量测定利用凯氏定氮法; 利用索氏抽提法测定粗脂肪含量; 灰分利用高温炉 600 ℃ 焚烧 15 h 后称量残余物; 碳水化合物含量为样品干质量减去粗蛋白、粗脂肪及灰分含量。(2) 氨基酸组成测定: 氨基酸组成利用 S-433D 型德国 Sykam 全自动氨基酸分析仪进行分析。(3) 脂肪酸含量测定: 称取 80 mg 样品, 加 2 mg 十九酸[CH₃(CH₂)₁₇COOH], 加入 3 mL KOH-

甲醇溶液混匀, 70 ℃ 水浴 0.5 h, 取出冷却至室温, 加 14% 的 BF₃-CH₃OH 溶液 5 mL 混匀, 70 ℃ 水浴 0.5 h, 取出冷却至室温, 加 6 mL 正己烷混匀, 70 ℃ 水浴 0.5 h, 取出冷却至室温。最后加 3.0 mL 饱和 NaCl 溶液, 静置 5 min。取上层 1 mL 于试样瓶中, 进行气相色谱分析, 采用归一化计算法得出各种脂肪酸占总脂肪酸的百分比。色谱柱为石英弹性毛细管柱(0.25 mm×30 m); 程序升温: 160 ℃ 保持 3 min, 5 ℃/min 升温至 220 ℃, 保持 10 min, 进样口温度 250 ℃, 检测温度 280 ℃; 气体: 氮气, 流速 40 mL/min。

2 结果与分析

2.1 Yd-15 的形态特征

该菌细胞呈椭圆形, 直径为 4~5 μm, 出芽生殖。菌落红色, 湿润, 易挑起, 中间突起, 圆形, 边缘整齐, 直径为 3~5 mm (图 1、图 2)。

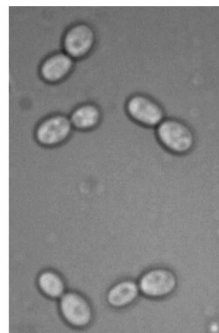


图1 菌株Yd-15的显微形态

2.2 Yd-15 的生化特征

该菌在 28 ℃ 条件下培养 7 d, 对葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、半乳糖和麦芽糖均不发酵。能够同化硝酸钾、亚硝酸钠。能够同化麦芽糖、蔗糖、甘露糖、海藻糖; 不能同化鼠李糖、乳糖、淀粉、蜜二糖。尿素分解阳性。脲酶试验阴性。

经鉴定该菌属于红酵母属, 胶红酵母菌。

2.3 Yd-15 的营养成分

2.3.1 基础营养成分 表 1 结果显示, 该菌粗蛋白质含量为 49.7%, 这与高玲美对高蛋白海洋酵母蛋白含量的研究结果相近^[2]。而陆地酵母菌如面包酵母的蛋白含量仅为 29%^[3],

收稿日期: 2013-05-03

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究一般项目(编号: L2012472); 辽宁省大学生创新训练项目(编号: 201211779009); 辽东学院科研基金自然科学基金项目(编号: 2011016)。

作者简介: 李 娟(1980—), 女, 辽宁朝阳人, 博士, 讲师, 研究方向为农业微生物资源开发与利用。E-mail: smilejuanzili@sina.com。

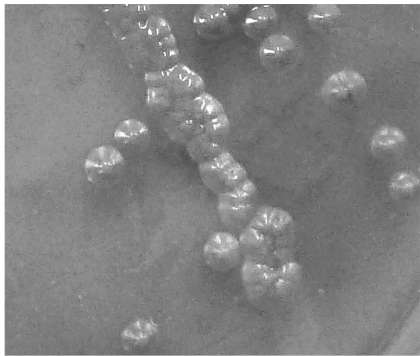


图2 菌株Yd-15的菌落形态

可见,本试验的 Yd - 15 胶红酵母菌株具有较高的蛋白质含量。水产养殖动物的饵料蛋白含量为 30% ~ 56%^[4-5],可见本菌株的蛋白质含量能够满足水产养殖动物对蛋白的需求。

经索氏抽提法测得 Yd - 15 胶红酵母菌株的粗脂肪含量为 5.6%。水产动物对脂肪需要量不多,种间差异也不大,饲料中脂肪适宜含量一般为 6% 左右(3% ~ 16%)^[6-7]。水产动物饲料中脂肪含量一般可以通过添加鱼油或豆油等脂肪源进行补充,因此,粗脂肪含量对胶红酵母作为水产饲料的利用影响较小。

水产养殖动物为变温动物,对碳水化合物的需要量比畜禽类少,并与食性有关。虾蟹类、肉食性鱼类饲料中糖类适宜含量一般低于 30%,其他水产动物饲料中糖类的适宜含量则高于 30%^[8]。本试验测得 Yd - 15 胶红酵母菌株的碳水化合物含量为 32.5%,主要是多糖(酵母菌细胞壁葡聚糖和纤维素等)。其中,葡聚糖具有免疫活性,能够增强海产动物的抵抗力^[9-11];纤维素能促进动物肠道蠕动,有助于其他营养成分的扩散和消化吸收,也有助于粪便的排出。

酵母菌含有磷、钾、铁、镁、钠、锰等多种矿物质元素,这些都是动物生长繁殖及自身免疫过程中所不可缺少的营养元素。目前水产养殖动物对矿物质的需要量多是相对值,尚无确定的标准。本试验中测得 Yd - 15 胶红酵母菌的粗灰分含量为 7.2%,表明其矿物质含量较高。

表 1 Yd - 15 基础营养成分组成

营养成分	含量(%)
粗蛋白质	49.7
粗脂肪	5.6
碳水化合物	32.5
灰分	7.2

2.3.2 脂肪酸组成 从表 2 可以看出,海洋胶红酵母菌株 Yd - 15 富含的脂肪酸为 C18 : 1,其次是 C16 : 0 和 C17 : 1,多不饱和脂肪酸中的亚麻酸(C18 : 3)的含量较低,不含有二十二碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),这与 Brown 等的研究结果一致,即酵母菌缺少这两种多不饱和脂肪酸^[12]。EPA 和 DHA 是海水养殖动物生长所必须的多不饱和脂肪酸。因此,如果将该菌作为水产动物幼体饵料使用时,需要添加一定比例的富含这两种高不饱和脂肪酸的藻类或鱼油^[13]。

2.3.3 氨基酸组成 Yd - 15 胶红酵母菌株氨基酸组成(表 3)表明,Yd - 15 胶红酵母菌株含有鱼类、甲壳类动物生长所需的精氨酸、缬氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙

表 2 Yd - 15 脂肪酸组成

脂肪酸	含量(%)	脂肪酸	含量(%)
C12 : 0	2.15	C18 : 0	8.13
C14 : 0	2.76	C18 : 1	51.36
C16 : 0	17.29	C18 : 2	7.81
C16 : 1	2.48	C18 : 3	2.43
C17 : 0	0.17	C20 : 0	0.27
C17 : 1	13.24	C24 : 0	1.02

氨酸、赖氨酸、组氨酸和色氨酸 10 种必需氨基酸。这与 Rhishipal 等对海洋酵母的研究结果一致^[12,14]。可见此胶红酵母菌株具有较好的氨基酸组成,适宜作为鱼用饲料应用。

表 3 Yd - 15 氨基酸组成

氨基酸	含量(%)	氨基酸	含量(%)
谷氨酸	12.89	亮氨酸	7.58
甘氨酸	7.01	酪氨酸	3.12
丙氨酸	7.45	苯丙氨酸	4.43
天冬氨酸	8.96	蛋氨酸	1.24
苏氨酸	4.70	精氨酸	6.72
丝氨酸	3.76	脯氨酸	3.27
缬氨酸	9.14	赖氨酸	7.04
蛋氨酸	1.61	色氨酸	1.02
异亮氨酸	4.25	组氨酸	1.99

3 结论

通过形态学和生化试验,鉴定此 Yd - 15 菌株为红酵母属的海洋胶红酵母。经过对其营养成分进行分析得知,该菌株具有较高的蛋白含量,且其它基础营养成分及氨基酸组成合理,表明该菌株可作为新型水产饲料蛋白源。但是,该菌脂肪酸中缺乏海水养殖动物所必须的高不饱和脂酸 EPA 和 DHA,用其作为水产饲料时,需要在饲料中添加富含高不饱和脂肪酸的鱼油或藻类。

参考文献:

[1] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. 酵母菌的特征与鉴定手册 [M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1991.

[2] 高玲美. 高蛋白海洋酵母的初步研究 [D]. 青岛:中国海洋大学,2007.

[3] Dunstan G A, Volkman J K, Barrett S M, et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom [J]. Phytochemistry, 1994, 35: 155 - 161.

[4] 王凤雷,李爱杰,梁水才. 甲鱼对蛋白质、脂肪、糖及钙磷的适宜需求量[J]. 中国水产科学,1996,3(2):34 - 40.

[5] Gatesoupe F J. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction and their effects on fish health and development[J]. Aquaculture, 2007, 267: 20 - 30.

[6] 孙鹤田,轩子群,王志忠,等. 中华鳖对蛋白质、脂肪、糖、混合无机盐及氨基酸适宜需要量的研究[C]//李爱杰,王东石. 中国水产学会水产动物营养与饲料研究会议论文集. 北京:海洋出版社,1998:250 - 257.

[7] 涂 滂,黄勇军. 甲鱼配合饲料中蛋白质、脂肪以及糖类适宜含量初探[J]. 水产科技情报,1995,22(1):17 - 20.

- 271.
- [49] 马玮艺, 张彦峰, 姜英男, 等. 不同改良剂对镉污染土壤的化学固定修复的比较研究[J]. 中国科技博览, 2009(32): 136–137.
- [50] 李丽君, 张强, 白光洁, 等. 3 种改良剂对油菜生物量及其吸收重金属的影响[J]. 水土保持学报, 2012, 26(5): 154–159.
- [51] 吕高明, 陈炳睿, 徐超, 等. 两种改良剂对矿区重金属污染土壤中 Pb、Cd、Zn 的固定效果[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(7): 140–144.
- [52] Zhang G, Lin Y, Wang M. Remediation of copper polluted red soils with clay materials[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(3): 461–467.
- [53] 杨秀敏, 胡桂娟. 凹凸棒石修复镉污染的土壤[J]. 黑龙江科技学院学报, 2004, 14(2): 80–82.
- [54] 王林, 徐应明, 梁学峰, 等. 新型杂化材料钝化修复镉铅复合污染土壤的效应与机制研究[J]. 环境科学, 2011, 32(2): 581–588.
- [55] Álvarez – Ayuso eÁ, García – Sánchez A. Sepiolite as a feasible soil additive for the immobilization of cadmium and zinc[J]. Science of the Total Environment, 2003, 305(1/2/3): 1–12.
- [56] 林大松, 刘尧, 徐应明, 等. 海泡石对污染土壤镉、锌有效态的影响及其机制[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2010, 46(3): 346–350.
- [57] 梁学峰, 徐应明, 王林, 等. 天然黏土联合磷肥对农田土壤镉铅污染原位钝化修复效应研究[J]. 环境科学学报, 2011, 31(5): 1011–1018.
- [58] 陈义群, 董元华. 土壤改良剂的研究与应用进展[J]. 生态环境, 2008, 17(3): 1282–1289.
- [59] 陈健, 王润锁, 杨尽. 污泥在土壤改良中的作用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17258–17260.
- [60] Vaca – Paulín R, Esteller – Alberich M V, Lugo – De L J, et al. Effect of sewage sludge or compost on the sorption and distribution of copper and cadmium in soil[J]. Waste Management, 2006, 26(1): 71–81.
- [61] Battaglia A, Calace N, Nardi E, et al. Paper mill sludge – soil mixture; kinetic and thermodynamic tests of cadmium and lead sorption capability[J]. Microchemical Journal, 2003, 75(2): 97–102.
- [62] Singh R P, Agrawal M. Effect of different sewage sludge applications on growth and yield of *Vigna radiata* L. field crop; Metal uptake by plant[J]. Ecological Engineering, 2010, 36(7): 969–972.
- [63] 欧根能, 宁平, 杨月红, 等. 污泥、粉煤灰和石灰改良土壤对小白菜的影响[J]. 武汉理工大学学报, 2010, 32(8): 84–88.
- [64] 苏德纯, 张福锁, Wong J C W. 粉煤灰钝化污泥对土壤理化性质及玉米重金属累积的影响[J]. 中国环境科学, 1997, 17(4): 34–38.
- [65] Wu F L, Lin D Y, Su D C. The effect of planting oilseed rape and compost application on heavy metal forms in soil and Cd and Pb uptake in rice[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(2): 267–274.
- [66] 张学洪, 陈志强, 吕炳南, 等. 污泥农用的重金属安全性试验研究[J]. 中国给水排水, 2000, 16(12): 18–21.
- [67] 李正强, 熊俊芬, 马琼芳, 等. 猪粪和石灰对铅锌尾矿污染土壤中紫花苜蓿生长及重金属吸收特性的影响[J]. 广西农业科学, 2009, 40(9): 1187–1191.
- [68] 付顺, 王珂清, 胡钟胜. 有机肥对烟草响应土壤重金属的影响[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(5): 91–93, 135.
- [69] 依艳丽, 张大庚, 刘珊珊, 等. 水分和有机物料对锌污染土壤改良的耦合效应[J]. 土壤通报, 2010, 41(2): 437–441.
- [70] 王开峰, 彭娜, 王凯荣, 等. 长期施用有机肥对稻田土壤重金属含量及其有效性的影响[J]. 水土保持学报, 2008, 22(1): 105–108.
- [71] 付天杭, 倪丹华, 徐芳杰, 等. 模拟酸雨对施用猪粪的菜园土壤重金属有效性的影响[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(6): 593–598.
- [72] 胡克伟, 关连珠. 改良剂原位修复重金属污染土壤研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2007(4): 1–5.
- [73] 朱雅兰. 重金属污染土壤植物修复的研究进展与应用[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(6): 1495–1499.
- [74] 侯新村, 范希峰, 武菊英, 等. 草本能源植物修复重金属污染土壤的潜力[J]. 中国草地学报, 2012, 34(1): 59–64, 76.
- [75] 夏汉平, 孔国辉, 敖惠修, 等. 4 种草本植物对油页岩矿渣土中铅镉的吸收特性比较试验研究[J]. 农村生态环境, 2000, 16(4): 28–32.
- [76] Zhang X, Xia H, Li Z, et al. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 2063–2066.
- [77] Martínez – Fernández D, Walker D J. The effects of soil amendments on the growth of atriplex halimus and bituminaria bituminosa in heavy metal-contaminated soils[J]. Water, Air & Soil Pollution, 2012, 223(1): 63–72.
- [78] 李磊, 陈宏, 潘家星, 等. 改良剂对红蛋植物修复污染土壤重金属铅和镉效果的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(4): 822–825.
- [79] 孟桂元, 周静, 邬腊梅, 等. 改良剂对苕麻修复镉、铅污染土壤的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(2): 273–277.
- shrimp *Fenneropenaeus indicus* [J]. Aquaculture, 2009, 287: 248–252.
- [12] Brown M R, Barrett S M, Volkman J K, et al. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture[J]. Aquaculture, 1996, 143: 341–360.
- [13] 蔡诗庆, 孙世春. 三株海洋酵母投喂海湾扇贝幼贝效果的研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2005, 35(6): 955–960.
- [14] Rhishipal R, Philip R. Selection of Marine yeasts for the generation of single – cell protein from prawn – shell waste[J]. Bioresource Technology, 1998, 65: 255–256.

(上接第 270 页)

- [8] 刘焕亮. 关于中国水产养殖动物对营养物质需要量的研究[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(3): 187–195.
- [9] 徐琴, 李健, 刘淇, 等. 噬菌弧菌和粘红酵母对中国对虾生长及非特异免疫因子的影响[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 42–47.
- [10] Brattgjerd S, Evensen O, Salmon L A, et al. As evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity[J]. Immunology, 1994, 83: 288–294.
- [11] Sajeevan T P, Philip R, Singh I S. Dose/frequency: A critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white