

权金盼,李玉妹,龙宏艳,等.链霉菌 B221 与地衣芽孢杆菌 NJU-1411-1 固体发酵废弃羊毛角蛋白工艺优化和工业化产品分析[J].江苏农业科学,2019,47(2):153-156.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.038

# 链霉菌 B221 与地衣芽孢杆菌 NJU-1411-1 固体发酵废弃羊毛角蛋白工艺优化和工业化产品分析

权金盼,李玉妹,龙宏艳,冯抗抗,王睿勇

(南京大学生命科学院,江苏南京 210023)

**摘要:**采用地衣芽孢杆菌 NJU-1411-1 和链霉菌 B221,通过固体发酵降解羊毛角蛋白,研究培养基含水量、培养基初始 pH 值、发酵温度、发酵周期等发酵条件的优化。结果表明,2 株菌的最佳固体发酵工艺条件相同,培养基起始含水量为 15 mL/10 g 羊毛粉,培养基最佳起始 pH 值为 8~9,最适发酵温度为 40 ℃,发酵周期为 5 d。工业化发酵产品的氨基酸含量、体外消化率、动物消化率等方面研究结果表明,发酵产品的氨基酸含量为 52.34%;发酵后体外消化率由 67.44% 提高至 82.20%;动物体内消化率达到 85.43%。这些结果表明发酵角蛋白产品作为饲料蛋白添加剂完全可行,可用于替代或部分替代鱼粉、豆粕等蛋白饲料原料。

**关键词:**羊毛角蛋白;微生物降解;固体发酵;工艺优化;工业化产品;动物消化率

**中图分类号:** S182;X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)02-0153-04

在现代农业中,大规模的畜禽养殖产生了大量废弃物,其中包括动物的毛发、蹄、羽毛等。这些废弃物富含角蛋白,粗蛋白含量高达 80% 以上,含有丰富的苏氨酸、色氨酸、组氨酸、胱氨酸等氨基酸,还含有常量元素、微量元素及未知生长因子<sup>[1]</sup>。角蛋白中所含的胱氨酸更是天然蛋白饲料之冠,可以满足一部分动物对胱氨酸的需要,是一种良好的、可替代或部分替代鱼粉的饲料蛋白来源,对它的开发利用具有重要应用前景:一方面可以解决当前饲料工业中蛋白资源不足;另一方面又可解决环境污染问题。

对角蛋白资源的开发利用历来为人们所关注。传统方法主要是利用物理和化学方法将其降解,目前在国内最常用的技术有高温水解法和膨化法,而国外则主要采用高温水解法。但这些方法存在能耗高、环境污染严重、经济效益不高等问题,

同时对氨基酸组成改善也很有限,Wang 等认为,水解处理可在一定程度上提高羽毛粉的消化率,但也使一部分必需氨基酸如赖氨酸、蛋氨酸和色氨酸丢失,并引发一些非营养价值氨基酸的形成<sup>[2-3]</sup>。由于传统方法存在许多不足,利用生物技术途径来解决羽毛角蛋白的分解利用越来越受到关注。其主要优点有:(1)微生物和角蛋白酶可作用于角蛋白改变其结构,从而降低它对动物消化酶的抗性。(2)处理过程中产生的菌体蛋白可以加强角蛋白产品的营养价值。用微生物处理过的角蛋白产品中赖氨酸、蛋氨酸和精氨酸含量比未处理要高,这说明不仅角蛋白可以作为蛋白来源,微生物菌体也可有同样的效果。(3)对环境友好,有利于在无污染条件下发展畜牧业。

笔者所在实验室长期致力于羽毛角蛋白的生物技术应用途径研究,取得了相关研究进展<sup>[4-6]</sup>;同时在与企业合作过程中,发现羊毛废弃物的生物技术利用途径开发值得关注。本研究以羊毛废弃物为原料,开展了角蛋白降解菌固体发酵羊毛废弃物的工艺优化,并与江苏省农业科学院合作,对获得的工业化发酵产品进行了氨基酸含量、可溶性蛋白质含量、体外消化率、动物消化率等方面的性质研究,旨在为利用生物技术方法开发利用羊毛废弃物角蛋白资源奠定基础。

收稿日期:2018-05-15

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2008405);国家自然科学基金(编号:30571354)。

作者简介:权金盼(1992—),女,山东淄博人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail:quanjp@163.com。

通信作者:王睿勇,教授,主要从事应用与环境微生物学研究。E-mail:wangry@nju.edu.cn。

[15]王彦华,王成章,李德锋,等.播种量和品种对紫花苜蓿植株动态变化、产量及品质的影响[J].草业学报,2017,26(2):123-135.

[16]孙万斌,马晖玲,侯向阳,等.20个紫花苜蓿品种在甘肃两个地区的生产性能及营养价值综合评价[J].草业学报,2017,26(3):161-174.

[17]陈萍,咎林森,陈林.不同灌溉量对紫花苜蓿生长和品质的影响[J].家畜生态学报,2011,32(5):43-47.

[18]屈皖华,李志刚,李健.施用有机物料对沙化土壤碳氮含量、酶活性及紫花苜蓿生物量的影响[J].草业科学,2017,34(3):456-464.

[19]毛新平,刘彦,赵国良,等.13个紫花苜蓿品种对滴灌模式的适应性[J].草业科学,2017,34(5):1049-1056.

[20]彭岚清,李欣勇,齐晓,等.紫花苜蓿品种根部特性与持久性和生物量的关系[J].草业学报,2014,23(2):147-153.

[21]霍海丽,王琦,张恩和,等.灌溉和施磷对紫花苜蓿干草产量及营养成分的影响[J].水土保持研究,2014,21(1):117-121,126.

[22]王小山,朱平华,鲍国成,等.盐碱胁迫对紫花苜蓿根、茎和叶重要养分离子平衡的影响[J].江苏农业科学,2013,41(7):190-195.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

链霉菌 B221、地衣芽孢杆菌 NJU-1411-1, 均从畜禽场长年堆积角蛋白废弃物的土壤中经过富集培养和分离筛选获得。

基础培养基(BM): 按文献[6]所述方法配制。

发酵培养基: 不同体积的基本培养基中, 加入 10 g 羊毛粉。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 羊毛角蛋白的固体发酵工艺流程

斜面菌种

↓  
种子液

羊毛粉 + BM → 灭菌 → 接种 → 发酵 → 测定酶活性、水溶性物质含量、可溶性蛋白质含量等指标

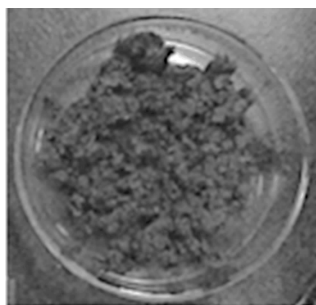
1.2.2 羊毛角蛋白固体发酵主要参数 (1) 培养基起始含水量: 10 g 羊毛粉中加入 BM 体积分别为 9、12、15、18 mL, 固定发酵温度为 40 ℃, 培养基起始 pH 值为 9.0。(2) 发酵温度: 发酵温度分别为 20、30、40、50 ℃, 固定 10 g 羊毛中加入 BM 体积为 15 mL, 培养基起始 pH 值为 9.0。(3) 培养基起始 pH 值: 培养基起始 pH 值分别为 6、7、8、9 和 10, 固定发酵温度为 40 ℃, 10 g 羊毛中加入 BM 体积为 15 mL。(4) 发酵周期: 在上述发酵参数优化条件下进行固体发酵, 每隔 24 h 取样 1 次, 测定角蛋白酶活性、可溶性蛋白质含量和水溶性物质含量。

工业化产品在山东合作厂家采用自制的 4 t 固体发酵罐完成, 共获得发酵产品 30 t。

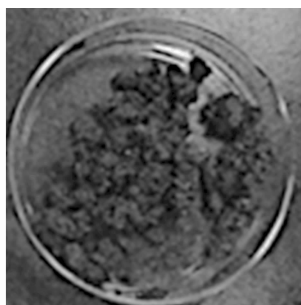
### 1.3 测定方法

1.3.1 角蛋白酶活性、可溶性蛋白质含量和水溶性物质含量 按文献[6]所述方法进行测定。

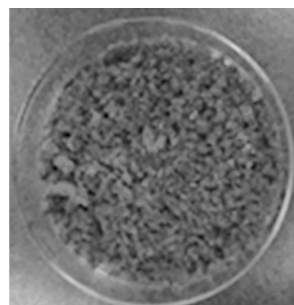
#### 1.3.2 工业化产品分析



A. NJU-1411-1



B. B221



C. 对照

图1 羊毛固体发酵过程产物形态

## 2.2 主要发酵参数对羊毛固体发酵过程的影响

2.2.1 培养基起始含水量对固体发酵的影响 固体发酵过程中, 培养基含水量是非常重要的参数, 是决定固体发酵能否成功的关键因素之一<sup>[9]</sup>。水活度与物料的含水量密切相关, 对于微生物而言, 过高的含水量会降低溶氧, 从而抑制生长; 过低的含水量则不能满足生长的需求。在固体发酵过程中, 包被在固体基质表面的水膜溶解了微生物需要的无机盐和代

1.3.2.1 氨基酸含量测定 将发酵羊毛粉用盐酸处理得到氨基酸水解液, 然后用高效液相色谱检测。

1.3.2.2 体外消化率的测定 参照文献[7]所述方法进行。

1.3.2.3 动物消化率的测定 (1) 试验设计。选取 90 kg 左右健康苏种猪 6 头, 分 2 次试验, 第 1 次试验饲喂 1 号日粮, 预饲期 6 d, 试验期 4 d; 第 2 次试验饲喂 2 号日粮, 预饲期 6 d, 试验期 4 d。猪只个体单笼饲养, 每日早 8:00、晚 16:00 时加料, 进行定量饲喂, 试验结束统计每头猪采食量。(2) 试验日粮。1 号日粮: 参照 NRC(1998) 猪营养需要配制, 豆粕含量为 18%。2 号日粮: 采用发酵产品替换 1 号日粮中的豆粕、豆油等组分, 添加量约为 20%。(3) 粪尿样收集。全天 24 h 及时全量收集粪、尿, 记录粪质量及尿液体积, 并进行烘干处理。每天收集的鲜粪按四分法缩减至约 500 g, 加入浓度为 10% 的硫酸溶液 50 mL, 于 65 ℃ 下烘干 48 h, 取出装入自封袋保存备用。尿样用量筒称量并记录每头猪每天的全部产尿量。按原尿体积的 10% 取样, 并按尿样体积的 5% 加入 10% 浓硫酸固氮, 最后将 5 d 的尿液混匀备用。试验结束后称样品总质量, 将所收集的每头猪风干粪样粉碎均匀混合, 按四分法缩减至约 100 g, 粉碎, 全部通过 1 mm 尼龙筛, 装入样品瓶中, 备用。将每头供试猪收集的尿样分别置于玻璃容器中, 混合均匀后取其中 200 mL 样品备用。(4) 蛋白质的表观消化率的测定。用凯氏定氮法测定饲料和粪、尿中粗蛋白的含量, 具体方法参考文献[8]。按下式计算蛋白质表观消化率:

蛋白质表观消化率 = (食入料质量 × 料中蛋白质含量 - 粪质量 × 粪中蛋白质含量) / 食入料质量 × 料中蛋白质含量 × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 羊毛固体发酵过程中产物形态变化

对羊毛的微生物降解产物进行观察发现, 羊毛形态变化明显, 如图 1 所示。未接菌种的 CK 组几乎没有变化(图 1-C), 而接菌的羊毛发酵物颜色发黑, 体积减少, 有明显的液化现象(图 1-A、图 1-B)。

谢产物, 同时为微生物的生长提供了所需的潮湿环境。另外, 基质含水量还影响着培养系统中的氧气供应、气体流动等, 是关系到发酵成败的主要制约因素。从图 2 可以看出, 对于 B221 和 NJU-1411-1, 当培养基起始含水量为 15 mL/10 g 羊毛粉时, 角蛋白酶活性、固体发酵产物水溶性物质含量和可溶性蛋白质含量最高。当加入的 BM 培养液为 9 mL 或 18 mL 时, 酶活性、水溶性物质含量和可溶性蛋白质含量较

低,可能是因为含水量过低时,生物热及通风造成水分损失,微生物生长受到限制,直接影响终产物的产量;当培养基含水量过高时,培养基有效孔隙变少,使得氧气供应不足。因而培

养基含水量过高或过低均不利于固体发酵的顺利进行。目前尚无理想的理论模型来预测固体发酵的最佳含水量,必须通过试验来确定。

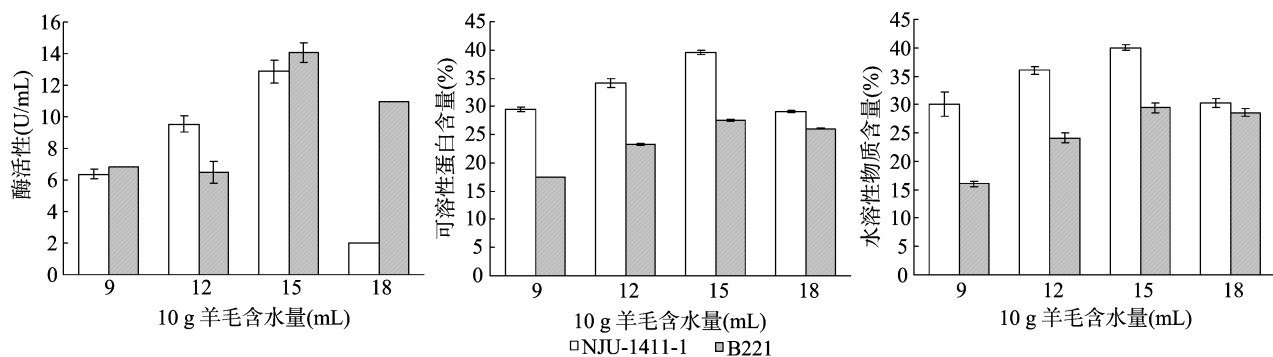


图2 培养基起始含水量对角蛋白酶活性、可溶性蛋白质含量和水溶性物质含量的影响

2.2.2 培养基起始 pH 值对固体发酵的影响 pH 值也是影响微生物生长代谢的重要因素之一,但由于固态物料的含水量偏低,常见液态发酵中的 pH 值检测手段难以应用,所以固体发酵时通常把初始 pH 值调到所需要的数值,发酵过程一般不再检测和控制。从图 3 可以看出,当 pH 值为 9 时,B221 和 NJU-1411-1 的角蛋白酶活达到最大;pH 值为 8 时,发酵

物中可溶性蛋白质含量和水溶性物质含量为最大,但与 pH 值为 9 时差异不大。在相同 pH 值条件下,NJU-1411-1 的发酵物可溶性蛋白质含量比 B221 的高,pH 值为 8 时 NJU-1411-1 的发酵物可溶性蛋白质含量为 39.17%,B221 则为 28.77%;所以若从提高产物可溶性蛋白质含量的角度出发,NJU-1411-1 更适合于羊毛角蛋白的固体发酵生产。

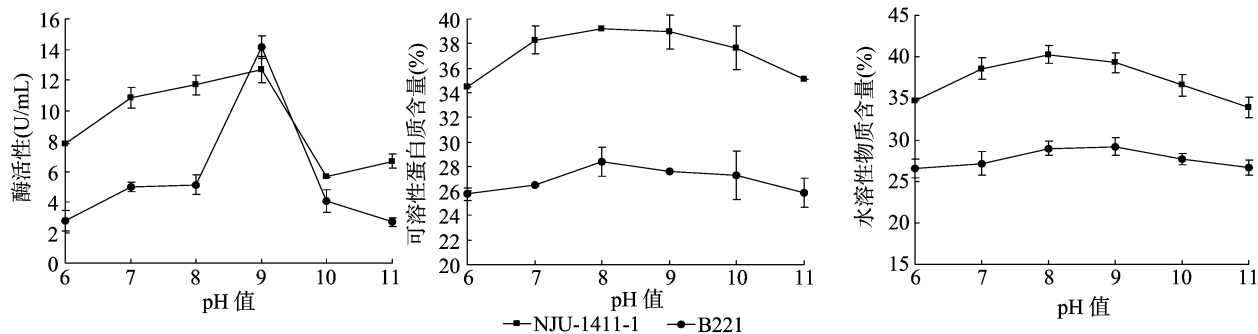


图3 培养基起始 pH 值对角蛋白酶活性、可溶性蛋白质含量和水溶性物质含量的影响

2.2.3 发酵温度对固体发酵的影响 温度是影响微生物生长的重要因素,温度会影响酶的活性,促进或抑制一些特殊代谢产物的生成,温度过高甚至导致细胞死亡,从而直接关系到发酵过程的正常进行以及最终产品的生成。由图 4 可以看出,当温度为 20℃ 时,角蛋白酶活、发酵产物中水溶性物质和可溶性蛋白质含量均较低,微生物对角蛋白的降解也很微弱;

随着温度的升高,水溶性物质和可溶性蛋白质含量迅速增加,温度为 40℃ 达到最高,这说明 B221 和 NJU-1411-1 产生的角蛋白酶耐热,最适发酵温度为 40℃。从温度实验结果分析,B221 和 NJU-1411-1 都具有一定的耐热性,这为以后进一步进行工业化生产和实际应用奠定了良好基础。

2.2.3 发酵周期的确定 根据上述固体发酵参数的研究结

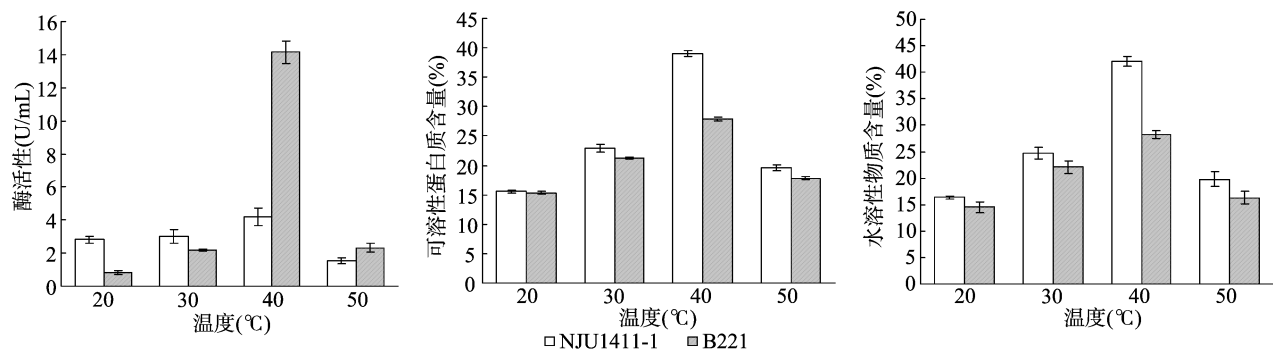


图4 发酵温度对角蛋白酶活性、可溶性蛋白质含量和水溶性物质含量的影响

果,对于 B221 和 NJU-1411-1,均在 250 mL 三角瓶加入羊毛粉 10 g、BM 培养基 15 mL,在培养基初始 pH 值为 8、培养温度为 40 ℃ 培养的培养条件下进行发酵周期研究。研究结果表明,发酵 3 d 时角蛋白酶活性达到最大值,NJU-1411-1 为 24.67 U/mL,B221 为 7.61 U/mL;随着发酵时间延长,角蛋白酶活性逐步降低,可能是因为 3 d 以后微生物的生长进入衰落期,角蛋白酶的分泌减少;发酵前 5 d,水溶性物质和可溶性蛋白质含量都在不断提高,但 5 d 之后趋于平缓,B221 从第 5 天到第 6 天可溶性蛋白质含量只提高了 2.07%,而 NJU-1411-1 甚至有所降低。因此从提高可溶性蛋白质含量的目的出发,确定发酵周期为 5 d。

### 2.3 工业化产品的可行性分析

根据以上发酵参数,在山东稍门骨粉厂,于 2014 年 6—9 月完成了产品发酵,并对获得的产品开展了产品性质分析,进一步证明了发酵产品具有良好的替代或半替代鱼粉等蛋白资源的可能性。

**2.3.1 发酵产品的氨基酸组成** 发酵产品的氨基酸含量为 52.34%,较原料有所下降,这可能是因为是在发酵过程中,角蛋白大分子不仅被降解为小肽或氨基酸,还可进一步分解为氨气或其他含氮气体并挥发掉,实际生产过程中也在发酵罐里可以闻到很重的氨味,所以羽毛粉的氨基酸总量会减少。从氨基酸组成来看,两者没有明显差异。

**2.3.2 发酵产品的体外消化率** 经过发酵后体外消化率由 67.44% 提高至 82.20%,这可能是因为通过发酵,角蛋白大分子被降解成为了一些小肽和氨基酸分子,提高了可溶性蛋白质含量,从而有助于角蛋白的消化。张洋采用地衣芽孢杆菌 FBK-1 进行角蛋白液体发酵产生角蛋白酶粗酶液,并研究了粗酶液的性质,发现羽毛粉加入角蛋白酶粗酶液,并在 121 ℃ 处理 1 h 后羽毛粉的胃酶消化率为 78%,消化率提高不是很明显<sup>[11]</sup>;李宝林等通过对羽毛粉高温高压水解法与酶解法的研究,表明高温高压水解法体外消化率为 32.92%,酶解法体外消化率为 66.33%;然后用肉仔鸡对酶解羽毛粉氨基酸表观消化率进行测定,结果为 77.02%<sup>[12]</sup>。本试验采用微生物固体发酵,产品的体外消化率有了较大提高。可以推测,在利用角蛋白资源方面,微生物发酵方法与纯粹的角蛋白酶降解法相比,不仅节约成本,而且产品的性质也可以有更好的改善和提高。

**2.3.3 发酵产品的动物消化率** 试验结果表明,发酵产品的动物体内消化率为 85.43%。李晓燕等研究了酶解羽毛粉替代日粮鱼粉对生长猪蛋白质消化率的影响,对照组采用 3% 进口鱼粉添加日粮,处理 I、处理 II 分别用酶解羽毛粉按 50%、100% 蛋白比例替代对照组日粮中含等量蛋白质的鱼粉,结果表明对照组蛋白消化率为 76.50%,处理 I 和处理 II 分别为 75.83% 和 74.68%,处理 I 和处理 II 蛋白质消化率与对照组相比均下降,但各组间差异不显著<sup>[13]</sup>。在本试验中,猪日粮的发酵羽毛粉添加量较大(为饲料总量的 20%),虽然对饲料适口性有一定影响,但在猪体内的蛋白消化率依然能保持在较高水平,达到 85.43%,这为产品的规模化生产和应用奠定了良好的基础。

## 3 结论

对于地衣芽孢杆菌 NJU-1411-1 和链霉菌 B221,羊毛角蛋白最佳固体发酵工艺条件基本相同,培养基起始含水量为 15 mL/10 g 羊毛粉;培养基最佳起始 pH 值为 8~9;最适发酵温度为 40 ℃;发酵周期为 5 d。

本研究检测了发酵产品的氨基酸含量、体外消化率和动物体内消化率。结果表明,发酵产品的氨基酸含量为 52.34%;发酵后体外消化率由 67.44% 提高至 82.20%;在动物体内具有良好的消化率,达到 85.43%。发酵角蛋白产品作为饲料蛋白添加剂完全可行,可用于替代或部分替代鱼粉、豆粕等一些价格较高的蛋白饲料原料。

### 参考文献:

- [1] Marshall R C, Orwin D F, Gillespie J M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin[J]. Electron Microscopy Reviews, 1991, 4(1): 47-83.
- [2] Wang X, Parsons C M. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals[J]. Poultry Science, 1997, 76(3): 491-496.
- [3] Latshaw J D, Musharaf N, Retrum R. Processing of feather meal to maximize its nutritional value for poultry[J]. Animal Feed Science and Technology, 1994, 47(3/4): 179-188.
- [4] 朱晓飞, 张 玲, 赵平芝, 等. 链霉菌 B221 的角蛋白降解机制初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 18-22.
- [5] 聂庆霖, 史玉峰, 王 玲, 等. 地衣芽孢杆菌 nju-1411-1 降解羽毛角蛋白过程中含硫化合物的变化[J]. 江苏农业科学, 2010, 38(4): 258-261.
- [6] 罗 蕾, 史玉峰, 崔丹丹, 等. 4 种含硫化合物对链霉菌 B221 固体发酵羽毛角蛋白过程的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 310-313.
- [7] Boisen S, Fernandez J A. Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses[J]. Animal Feed Science and Technology, 1995, 51(1): 29-43.
- [8] 谯仕彦, 李德发, 杨 胜. 不同加工处理的大豆蛋白日粮对仔猪断奶后腹泻影响的研究[J]. 动物营养学报, 1995, 7(4): 1-6.
- [9] 董荣斌, 张 玲, 朱晓飞, 等. 耐热链霉菌 B221 降解羽毛角蛋白的固体发酵条件研究[J]. 江苏农业科学, 2007(6): 249-251, 267.
- [10] Pandey A, Socool C R, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products [J]. Process Biochemistry, 2000, 35(10): 1153-1169.
- [11] 张 洋. 一种新型角蛋白酶的发酵、理化性质及应用研究[D]. 福州: 福州大学, 2005: 35-49.
- [12] 李宝林, 张维金, 崔德成. 酶解羽毛粉加工方法的研究及在饲料中的使用[C]//中国家禽科学研究进展——第十四届全国禽科学学术讨论会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 790-794.
- [13] 李晓燕, 喻 洋, 肖英平, 等. 酶解羽毛粉的体外蛋白质消化率及其在生长猪日粮中的应用效果[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(15): 33-36.