

研究报告



高氨氮利用酵母菌的筛选及相关酶活性

凌晓¹ 郭刚² 陈雷² 高文俊¹ 赵雅茹¹ 许庆方^{*1}

1 山西农业大学草业学院 山西 晋中 030801

2 山西农业大学动物科学学院 山西 晋中 030801

摘要:【背景】蛋白饲料的缺乏,促进了蛋白含量高、安全性能好的酵母类单细胞蛋白的研究与应用。【目的】筛选氨氮利用能力强的菌株,为单细胞蛋白的发酵提供优良菌株。【方法】从土壤、奶制品、水果采集样品分离酵母菌,根据形态学和分子生物学鉴定菌株,然后以硫酸铵为唯一氮源培养基,测定菌落大小、菌体干重、蛋白质含量,复筛氨氮利用率高的酵母菌,并对复筛菌株氨同化相关酶活性进行测定。【结果】经过形态学、分子生物学鉴定和氨氮利用能力评价,获得3株高氨氮利用的酵母菌,分别是胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*)。通过比较3株酵母菌的谷氨酸脱氢酶、谷氨酸合成酶、谷氨酰胺合成酶活性,酿酒酵母的3种酶活性最高,其次是胶红酵母。【结论】从奶酪和西瓜中分离的胶红酵母N5和酿酒酵母J1具有较强的氨氮利用能力以及酶活性,可为单细胞蛋白发酵提供优良菌株。

关键词: 酵母菌, 氨氮, 酶活性, 单细胞蛋白

High ammonia nitrogen utilization yeast strains and their related enzyme activities

LING Xiao¹ GUO Gang² CHEN Lei² GAO Wen-Jun¹ ZHAO Ya-Ru¹
XU Qing-Fang^{*1}

1 College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

2 College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

Abstract: [Background] The lack of protein feed has promoted the research and application of yeast single-cell protein with high protein content and good safety performance. [Objective] In order to screen strains with strong ammonia nitrogen utilization ability, provide excellent strains for single-cell protein fermentation. [Methods] Yeasts were isolated and identified from the soil, dairy products and fruits based on morphology and molecular biology. Then, with ammonium sulfate as the sole nitrogen source medium, the bacterial colony size, cell dry weight and protein content were determined, and the yeasts with high ammonia nitrogen utilization rate were rescreened. The enzyme activities related to ammonia assimilation of the rescreening strains were determined. [Results] By morphological, molecular biological

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0502103-2); Jinzhong Science and Technology Innovation Carrier and Platform Construction Project (P192003)

***Corresponding author:** E-mail: xuqfsxau@126.com

Received: 29-05-2020; **Accepted:** 04-09-2020; **Published online:** 25-09-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0502103-2); 晋中市科技创新载体与平台建设项目(P192003)

***通信作者:** E-mail: xuqfsxau@126.com

收稿日期: 2020-05-29; **接受日期:** 2020-09-04; **网络首发日期:** 2020-09-25

identification and ammonia nitrogen utilization ability evaluation, three strains of high ammonia nitrogen utilization were obtained, they were *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *S. cerevisiae* has the highest activities of glutamate dehydrogenase, glutamate synthetase, and glutamine synthetase, followed by *R. mucilaginosa*. **[Conclusion]** *R. mucilaginosa* N5 and *S. cerevisiae* J1 isolated from cheese and watermelon have strong ammonia nitrogen utilization ability and enzyme activities, and can provide excellent strains for single cell protein fermentation.

Keywords: Yeast, Ammonia nitrogen, Enzyme activities, Single cell protein

随着世界人口的持续增长, 预计到 2050 年全球人口将达到 100 亿^[1], 目前对地球有限资源的人为压力以及随之而来的气候显著变化, 引起了人们对当代农业饲料/食物链弹性的严重关注^[2]。肉类、鱼类、禽肉和禽蛋是人类最重要的蛋白质来源, 饲养这些动物都需要牧场或土地来生产饲草作物。在牧场或土地资源有限时, 有必要研究可用于饲喂动物、生态友好的替代蛋白^[3]。20 世纪 70 年代初期, 人们就开始寻求可替代的饲料和食物来源来持续地供养不断增长的人口^[4]。最终研发出用微生物在适宜的培养基质条件下快速生长繁殖而获得的大量单细胞蛋白(single cell protein, SCP), 并把这些 SCP 用于动物的饲养试验中, 但是由于发酵技术还很不完善^[5], SCP 在动物饲料市场中的应用受到 20 世纪 80 年代末期大豆和鱼粉等常规饲料蛋白质来源低价销售的限制。近年来, 围绕 SCP 的研究与开发在科学和工业领域都重新获得动力。鱼粉价格的急剧上涨, 大豆等可做蛋白饲料的作物种植面积无法大规模提升, 甚至还在下降^[6]。目前 SCP 产品在必需氨基酸特征和总体营养价值方面可与鱼粉媲美^[7]。除水产养殖外, SCP 产品已经在陆生动物的饲养试验中大获成功, 包括反刍动物、猪和鸡等主要牲畜, 拓宽了其市场应用。

SCP 具有多种优势: 微生物产生时间短, 细胞中蛋白含量高, 脂肪、碳水化合物、核酸、维生素和矿物质含量丰富, 而且富含某些必需氨基酸, 如赖氨酸和蛋氨酸, 这些氨基酸在大多数动植物食品中都含量有限^[8]。SCP 的生产可以根据培养条件或遗传修饰生成特征氨基酸, 而且不受

气候条件制约连续发酵^[4]。目前, 细菌、酵母、霉菌和藻类这 4 种类型的微生物发酵都可以用作饲料蛋白质, 其中酵母菌的研究最为深入, 也是市场普遍接受的微生物, 其含有大量的蛋白质和 B 族维生素^[9]。此外, 许多研究表明营养酵母可以预防动物的重要疾病, 调节代谢平衡并提高动物对饲料的利用效率^[10-11]。所有这些功能使营养酵母成为饲料中有前途的 SCP。酵母 SCP 通过替代豆粕和鱼粉等昂贵的常规饲料, 可以缓解蛋白质饲料来源短缺的问题^[12]。另外, 微生物也可以将农业和工业废料进行生物转化为富含蛋白质的饲料, 不仅可以降低生产成本, 还可以减少环境的污染。氮是酵母菌生长所需要的关键营养元素, 而氨同化是酵母菌将无机氮转化有机氮的一个重要过程。本研究通过形态学和分子生物学鉴定及专性培养, 筛选出高氨氮利用酵母菌株, 探讨酵母菌氨同化过程中谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)、谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)这 3 种相关酶活性的规律, 为酵母菌发酵生产 SCP 提供优良菌种, 同时为增强酵母菌氮素利用率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样品来源: 从山西农业大学 8 号楼海棠果树下采集土壤 500 g; 奶酪(内蒙古华琳食品有限责任公司)、奶豆腐(内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗特产)、酸奶(内蒙古伊利实业集团股份有限公司)以及菠萝、西瓜、葡萄从市场购买。

孟加拉红培养基(g/L): 蛋白胨 5.00, 葡萄糖 10.00, K_2HPO_4 1.00, $MgSO_4$ 0.50, 琼脂 15.00, 孟加拉红 0.03, 氯霉素 0.10。酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基(YPD) (g/L): 胨 10.00, 酵母浸出粉 5.00, 葡萄糖 20.00, 琼脂 14.00。硫酸铵为唯一氮源固体培养基(g/L): $(NH_4)_2SO_4$ 2.00, 葡萄糖 5.00, $MgSO_4$ 0.50, K_2HPO_4 1.00, NaCl 0.50, $FeSO_4$ 0.01, 琼脂 15.00 (液体培养基去掉琼脂)。

GDH 活性检测试剂盒、GOGAT 活性检测试剂盒和 GS 活性检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。光学数码显微镜, 南京江南永新光学有限公司; 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 江阴滨江医疗设备有限公司。

1.2 高氨氮利用酵母菌的筛选和鉴定

1.2.1 高氨氮利用酵母菌的初筛

在孟加拉红培养基中, 采用稀释涂布平板法, 于 28 °C 条件下从采集的样品中分离出酵母菌, 取菌落长势良好的培养基, 挑取单菌落进行划线, 接种于 YPD 平板培养基中纯化, 28 °C 倒置培养 24 h。纯化培养后, 选取单菌落接种于配制的硫酸铵为唯一氮源的固体培养基中, 28 °C 避光倒置培养 5 d, 观察是否有菌落生长以及菌落的大小, 筛选出菌落大的菌株作为初代菌种。将初筛的菌种用液体石蜡保存于 4 °C 冰箱。

1.2.2 高氨氮利用酵母菌的复筛

将初筛的菌种从加入液体石蜡的试管中取出, 并接种到 YPD 固体培养基上, 在 28 °C 条件下培养 24 h 活化。将活化的酵母菌接种到 YPD 液体培养基中, 在 28 °C、120 r/min 条件下培养 24 h, 以 5% 的接种量转接到装有 50 mL 配制的以硫酸铵为唯一氮源培养基的 100 mL 三角瓶中, 在 28 °C、120 r/min 条件下培养 5 d, 取出后放置 4 °C 冰箱保存, 用于测定菌体干重^[13]、蛋白质含量^[14]以及氨氮含量^[15]。

1.2.3 酵母菌的形态学及分子生物学鉴定

形态学鉴定: 将筛选的菌株接种在 YPD 固体

培养基上, 28 °C 培养 3 d, 观察菌落的颜色、质地、表面和边缘形状等特征。挑取单菌落进行美蓝染色, 用 100 倍油镜观察细胞形状、大小以及繁殖方式。

分子生物学鉴定: 筛选的酵母菌株进行编号, 在 YPD 琼脂培养基斜面培养后, 送至南昌科畅生物技术有限公司进行分析鉴定, 然后将测序结果上传到 NCBI 数据库进行比对, 运用 BLAST 程序包进行序列相似性比较, 确定其最可能的种名^[16-19]。将鉴定后菌株的基因序列和模式菌株序列导入 MEGA 7.0 软件进行系统发育分析 (phylogenetic analysis), 再运用邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树。

1.3 酵母菌氨同化相关酶活性的测定

分别用以硫酸铵为唯一氮源的液体培养基对 3 种酵母菌进行发酵培养, 将灭菌后培养基分装入 50 mL 锥形瓶中, 用无菌封瓶膜密封。培养条件为 28 °C、120 r/min, 培养 1、2、3、4、5 d, 同时设置 3 个平行, 每天取一次样, 放置实验室 4 °C 冰箱保存, 用于测酶活^[20]。

粗酶液的提取: 取 2 mL 酵母菌培养液于离心管中, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清, 加入 1 mL 提取液, 超声波破碎酵母菌 (冰浴, 功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次); 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置于冰上待测酶活性^[21]。

谷氨酸脱氢酶、谷氨酸合成酶及的谷氨酰胺合成酶的测定分别使用 GDH 活性检测试剂盒、GOGAT 活性检测试剂盒和 GS 活性检测试剂盒进行检测。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的筛选

2.1.1 高氨氮利用酵母菌的初筛

将采集的样品初次分离后, 在孟加拉红培养基长出较多菌落, 挑选出菌落形态差异较大的单菌落在 YPD 培养基再次划线纯化, 得到了 13 株酵

母菌, 将这 13 株酵母菌接种在以硫酸铵为唯一氮源的培养基上进行初筛, 菌落大小如表 1 所示, 其中有 8 株菌的菌落大小大于 2 mm, 1 株酵母菌不能生长。

2.1.2 高氨氮利用酵母菌的复筛

将初筛后的酵母菌进行复筛, 结果见表 2。GBL1 的菌体干重最多, N5 的氨氮利用率最多, N5、J1、GBL1 的蛋白质含量在 50%以上, 其中 J1 的蛋白质含量最高, 达到 62.22%。筛选出这 3 株酵母菌进行氨同化相关酶活性的测定。

2.2 酵母菌的鉴定

2.2.1 形态特征

观察 3 株酵母菌在 YPD 固体培养基中的菌落

表 1 菌种初筛情况

Table 1 Initial screening of strains

菌株来源 Strain origin	编号 No.	菌落 Colony
奶豆腐 Milk tofu	N1	+
奶豆腐 Milk tofu	N2	+
奶豆腐 Milk tofu	N3	+
奶豆腐 Milk tofu	N4	++
奶酪 Cheese	N5	++
奶酪 Cheese	N6	+
奶酪 Cheese	N7	++
西瓜 Watermelon	G1	++
西瓜 Watermelon	J1	++
海棠土 Begonia soil	T1	++
菠萝 Pineapple	GBL1	++
菠萝 Pineapple	GBL2	++
菠萝 Pineapple	GBL3	-

注: +: 出现菌落; ++: 菌落平均直径超过 2 mm; -: 无菌落出现。
Note: +: The presence of colonies; ++: The average diameter of the colonies exceeds 2 mm; -: No colonies appeared.

表 2 菌种复筛情况

Table 2 Second screening of strains

编号 No.	菌体干重 Cell dry weight (mg/mL)	蛋白质含量 Protein content (%)	氨氮利用率 Ammonia nitrogen utilization rate (%)
N4	1.10	37.27	44.16
N5	0.75	54.67	88.44
N7	0.85	49.09	31.57
G1	0.69	59.86	24.68
J1	0.65	62.22	45.93
T1	1.05	38.44	27.03
GBL1	1.19	34.58	35.35
GBL2	0.84	49.06	27.51

形态。N5: 菌落呈圆形, 橙黄色, 球形突起, 表面光滑, 不透明, 黄油状, 边缘整齐; J1: 菌落呈圆形, 奶白色, 球形突起, 表面光滑, 不透明, 奶油状, 边缘整齐; GBL1: 菌落呈圆形, 乳白色, 球形突起, 表面光滑, 不透明, 奶油状, 边缘不整齐(图 1)。光学显微镜下观察菌体都是出芽生殖, N5、J1 都是椭圆形, GBL1 呈短棒状还有菌丝(图 2)。

2.2.2 酵母菌的分子生物学鉴定

使用 MEGA 7.0 软件对复筛后的 3 株菌进行亲缘分析并构建系统发育树(图 3)。由系统发育树可知: N5 是胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*), J1 是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), GBL1 是戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*)。将 N5、J1、GBL1 所获序列提交至 GenBank, 获得登录号分别为 MT550663、MT550662、MT550664。

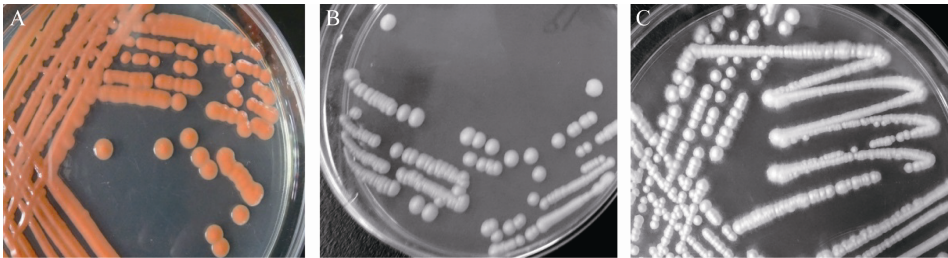


图 1 3 株酵母菌的菌落形态

Figure 1 The colonial morphology of 3 yeasts

Note: A: N5; B: J1; C: GBL1.

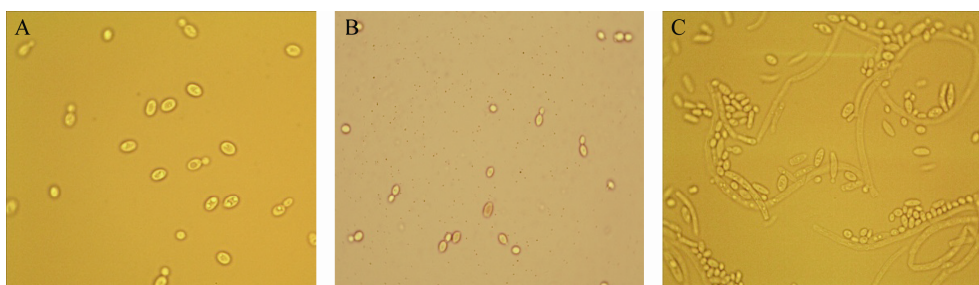


图 2 形态学鉴定结果(1 000×)

Figure 2 Results of morphological identification (1 000×)

Note: A: N5; B: J1; C: GBL1.

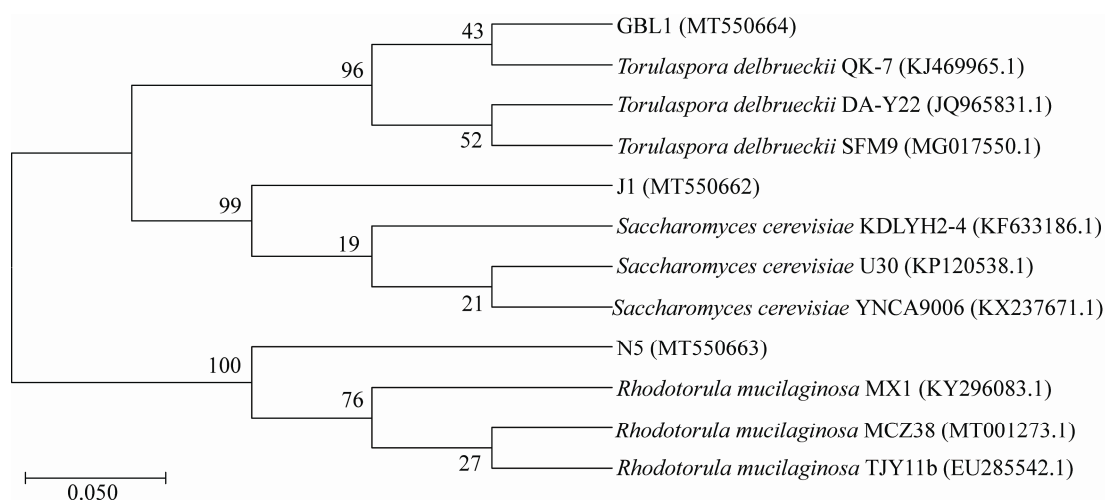


图 3 3 株酵母菌 26S rRNA 基因 D1/D2 区域序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of 26S rRNA gene D1/D2 region sequence of three yeast strains

2.3 酵母菌氨同化相关酶活性的测定

2.3.1 谷氨酸脱氢酶活性

3 株酵母菌发酵 5 d 的 GDH 活性变化趋势相同, 呈先升高后降低的趋势。酿酒酵母 5 d 的酶活均高于其他 2 株酵母菌, 在第 3 天显著高于其他 2 株酵母菌, 达到 18.97 U/mL ($P<0.05$), 在第 1 天和第 5 天显著高于戴尔有孢圆酵母, 分别达到 10.50 U/mL 和 9.32 U/mL ($P<0.05$); 胶红酵母 5 d 的发酵酶活均高于戴尔有孢圆酵母, 但是没有显著差异; 戴尔有孢圆酵母的发酵酶活较低于其他 2 株酵母(图 4)。

2.3.2 谷氨酸合成酶活性

如图 5 所示, 3 株酵母菌发酵 5 d 的 GOGAT 活性变化趋势相同, 呈先升高后降低, 在第 3 天的

时候又开始上升。酿酒酵母 5 d 的酶活均高于其他 2 株酵母菌, 在第 2 天和第 4 天显著高于其他 2 株酵母菌, 分别达到 13.30 U/mL 和 6.765 U/mL ($P<0.05$)。胶红酵母在 5 d 的发酵酶活均高于戴尔有孢圆酵母, 在第 4 天发酵酶活差异显著, 达到 4.93 U/mL ($P<0.05$)。戴尔有孢圆酵母的发酵酶活较低于其他 2 株酵母。

2.3.3 谷氨酰胺合成酶活性

3 株酵母 5 d 发酵的 GS 活性变化趋势相同, 都是先升高后降低, 在第 3 天发酵的酶活又开始增长。酿酒酵母发酵 5 d 的酶活都高于其他 2 株酵母, 在第 2 天发酵酶活显著高于戴尔有孢圆酵母, 达到 0.85 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ ($P<0.05$), 在第 4 和第 5 天与其他

2 株酵母菌差异显著, 分别达到 $0.47 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 和 $0.54 \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ ($P<0.05$)。胶红酵母的发酵酶活高于戴尔有孢圆酵母, 但差异不显著。戴尔有孢圆酵母的发酵酶活低于其他 2 株酵母(图 6)。

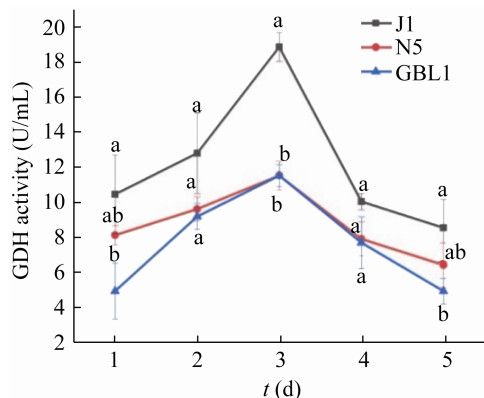


图 4 不同发酵时间谷氨酸脱氢酶活性

Figure 4 Glutamate dehydrogenase activity at different fermentation times

注: 字母 a、b、c、d 表示同一时间不同菌株发酵的显著差异 ($P<0.05$); J1: 酿酒酵母; N5: 胶红酵母; GBL1: 戴尔有孢圆酵母。

Note: The letter a, b, c, d indicates a significant difference in the different strains ferment at the same time ($P<0.05$); J1: *Saccharomyces cerevisiae*; N5: *Rhodotorula mucilaginosa*; GBL1: *Torulaspora delbrueckii*.

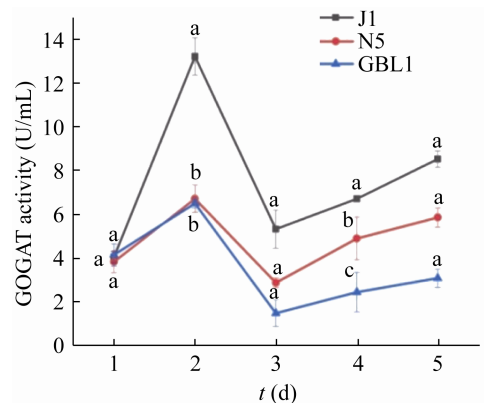


图 5 不同发酵时间谷氨酸合成酶活性

Figure 5 Glutamate synthase activity at different fermentation times

注: 字母 a、b、c、d 表示同一时间不同菌株发酵的显著差异 ($P<0.05$); J1: 酿酒酵母; N5: 胶红酵母; GBL1: 戴尔有孢圆酵母。

Note: The letter a, b, c, d indicates a significant difference in the different strains ferment at the same time ($P<0.05$); J1: *Saccharomyces cerevisiae*; N5: *Rhodotorula mucilaginosa*; GBL1: *Torulaspora delbrueckii*.

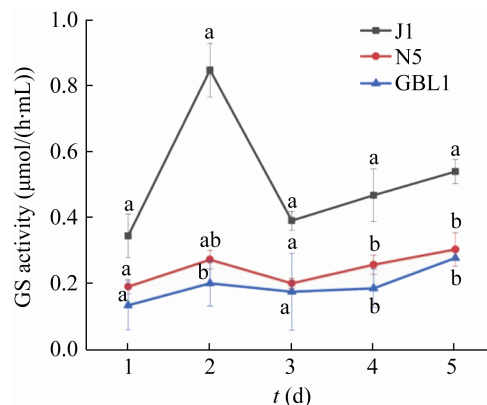


图 6 不同发酵时间谷氨酰胺合成酶活性

Figure 6 Glutamine synthetase activity at different fermentation times

注: 字母 a、b、c、d 表示同一时间不同菌株发酵的显著差异 ($P<0.05$); J1: 酿酒酵母; N5: 胶红酵母; GBL1: 戴尔有孢圆酵母。

Note: The letter a, b, c, d indicates a significant difference in the different strains ferment at the same time ($P<0.05$); J1: *Saccharomyces cerevisiae*; N5: *Rhodotorula mucilaginosa*; GBL1: *Torulaspora delbrueckii*.

3 讨论与结论

酵母菌自身具有将无机氮转化成有机氮的同化能力。ter Schure 等^[22]将酿酒酵母在以硫酸铵为唯一氮源的培养系统中发酵, 增加氨氮的浓度时其生物量得到提高。Minkevich 等^[23]在以氯化铵为唯一氮源的培养基中接种产朊假丝酵母(*Candida utilis*)进行发酵, 100 h 之后氨氮浓度减少, 生物量提高。本研究从土壤、奶制品以及水果中筛选出 13 株酵母菌, 其中有一株从菠萝分离出的酵母菌无法在以硫酸铵为唯一氮源的培养基中生存。酵母菌具有较高的氨氮利用能力以及蛋白质含量。马霞飞等^[24]从多株酵母菌筛选出 2 株非蛋白氮利用能力较强的酿酒酵母菌株, 这 2 株酵母菌的蛋白质含量达到 37.41%和 39.77%。曾德霞^[25]以氨基酸废液作为氮源, 对氨基酸废液中的氨氮进行转化, 筛选出酿酒酵母, 氨氮转化率为 28.1%, 粗蛋白含量为 12.89%。曹玉飞^[26]以硫酸铵为唯一氮源的培养基, 筛选出的酿酒酵母其氨氮利用率为 1.53%–70.9%。本研究筛选的 J1 蛋白质含量最高达到 62.22%, N5 的蛋白质含量为

54.67%, N5 的氨氮利用率最高达到 88.44%, 其次是 J1 氨氮利用率为 45.93%。

酵母菌氨同化过程中主要有 2 条途径: GDH 途径和 GS/GOGAT 途径, 参与的关键酶有 GDH、GS 和 GOGAT^[27]。不同酵母的氨同化酶活性不同, Valenzuela 等^[28]发现从乳酸克鲁维斯酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 中提取的 GDH 活性比在酿酒酵母中发现的低 20%, GS 和 GOGAT 活性与酿酒酵母相似。本研究筛选出的这 3 株酵母, 其中 J1 的 GDH 活性高于其他 2 株酵母, N5 和 GBL1 的 GDH 活性相似; N5、J1 和 GBL1 的 GS 和 GOGAT 活性不同, 其中 J1 的这 2 种酶活性最高。酿酒酵母和胶红酵母可作为优良菌株应用在饲料中, 它们具有丰富的营养物质和生长因子, 可满足水产动物机体所需要的营养需求, 从而促进动物的健康生长和发育^[29-30]。Cruz 等^[31]在断奶仔猪日常饮食中添加产脲假丝酵母, 发现酵母菌可以替代断奶仔猪日常饮食中主要蛋白质来源的 40% CP, 同时断奶仔猪保持正常生长且消化功能得到改善。Chen 等^[32]在罗非鱼的饲料中添加 1% 胶红酵母时, 提高了罗非鱼的生长性能、营养成分以及免疫反应和抗氧化能力。Nasiri 等^[33]在荷斯坦奶牛的日粮中添加酿酒酵母活酵母, 有益于乳汁生产和乳汁成分, 并增强了奶牛的免疫调节系统。酿酒酵母和胶红酵母都已在饲料中应用, 且酿酒酵母已被收录在饲料添加剂品种目录(2013)^[34]中。

本研究通过初筛和复筛以及氨同化酶活的测定, 筛选出胶红酵母 N5 和酿酒酵母 J1, 它们具有较强的氨氮利用能力以及酶活性, 并且这 2 株酵母菌的蛋白质含量较高, 可为酵母类单细胞蛋白饲料的发酵提供优良的菌株。

REFERENCES

- [1] Ezeh AC, Bongaarts J, Mberu B. Global population trends and policy options[J]. Lancet, 2012, 380(9837): 142-148
- [2] Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, et al. Food security: The challenge of feeding 9 billion people[J]. Science, 2010, 327(5967): 812-818
- [3] Somda MK, 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
- [4] Kieliszek M, Kot AM, Bzducha-Wróbel A, et al. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review[J]. Fungal Biology Reviews, 2017, 31(4): 185-198
- [5] Magalhães CEB, Souza-Neto MS, Astolfi-Filho S, et al. *Candida tropicalis* able to produce yeast single cell protein using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as carbon source[J]. Biotechnology Research & Innovation, 2018, 2(1): 19-21
- [6] Hezarjaribi M, Ardestani F, Ghorbani HR. Single cell protein production by *Saccharomyces cerevisiae* using an optimized culture medium composition in a batch submerged bioprocess[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 179(8): 1336-1345
- [7] Øverland M, Tauson AH, Shearer K, et al. Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals[J]. Archives of Animal Nutrition, 2010, 64(3): 171-189
- [8] Santos EO, Michelon M, Gallas JA, et al. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass[J]. International Journal of Food Engineering, 2013, 9(4): 413-420
- [9] Spalvins K, Zihare L, Blumberga D. Single cell protein production from waste biomass: comparison of various industrial by-products[J]. Energy Procedia, 2018, 147: 409-418
- [10] Shurson GC. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods[J]. Animal Feed Science and Technology, 2018, 235: 60-76
- [11] Dias JDL, Silva RB, Fernandes T, et al. Yeast culture increased plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and feed efficiency of dairy cows in a hot environment[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(7): 5924-5936
- [12] Chen MX, Li Q, Zhang Y, et al. Xylo-oligosaccharides enriched yeast protein feed production from reed sawdust[J]. Bioresource Technology, 2018, 270: 738-741
- [13] Du LX, Lu FP. Microbiology Experiment Technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 353 (in Chinese) 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 353
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [15] Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. Analytical Chemistry, 1967, 39(8): 971-974
- [16] Guo XF, De J, Long QW, et al. Spatial dynamics of yeast community and its relationship with environmental factors

- in Lhalu Wetland, Tibet[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(7): 1167-1181 (in Chinese)
- 郭小芳, 德吉, 龙琦炜, 等. 西藏拉鲁湿地水体酵母菌多样性及其与理化因子相关性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(7): 1167-1181
- [17] Bai M, Wang J, Qing MJ, et al. Occurrence and dominance of yeast in naturally fermented congee in Inner Mongolia of China[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(9): 1299-1304 (in Chinese)
- 白梅, 王娟, 卿蔓君, 等. 内蒙古西部区酸粥中酵母菌的分离鉴定及优势菌分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(9): 1299-1304
- [18] Tang MQ, You MS. Isolation and identification of a glyphosate-resistant yeasty strain (ZM-1) and its optimal growth and degradation traits[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(9): 1402-1409 (in Chinese)
- 汤鸣强, 尤民生. 抗草甘膦酵母菌 ZM-1 的分离鉴定及其生长降解特性[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(9): 1402-1409
- [19] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(4): 331-371
- [20] Hristozova T, Gotcheva V, Tzvetkova B, et al. Effect of furfural on nitrogen assimilating enzymes of the lactose utilizing yeasts *Candida blankii* 35 and *Candida pseudotropicalis* 11[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2008, 43(3): 284-288
- [21] Groat RG, Vance CP. Root and nodule enzymes of ammonia assimilation in two plant-conditioned symbiotically ineffective genotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Plant Physiology*, 1982, 69(3): 614-618
- [22] ter Schure EG, Silljé HH, Verkleij AJ, et al. The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(22): 6672-6675
- [23] Minkevich IG, Sobotka M, Vraná D, et al. Continuous growth of *Candida utilis* under periodic change of growth-limiting substrate[J]. *Folia Microbiologica*, 1990, 35(3): 251-265
- [24] Ma XF, Guo YL, Zhang TY. High non-protein nitrogen utilization capacity yeast screening and mutagenesis[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(10): 2724-2732 (in Chinese)
- 马霞飞, 郭艳丽, 张铁鹰. 高非蛋白氮利用能力酵母菌的筛选与诱变[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(10): 2724-2732
- [25] Zeng DX. Studying the utilization of yeast and bacteria in amino acid mother liquor[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2016 (in Chinese)
- 曾德霞. 酵母菌及细菌对氨基酸母液的利用研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2016
- [26] Cao YF. Screening and study on fermenting conditions of thermotolerant and high ammonia assimilation rate yeast strains[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2014 (in Chinese)
- 曹玉飞. 耐高温酵母菌高氨氮同化率菌株的筛选和发酵条件研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2014
- [27] Sieg AG, Trotter PJ. Differential contribution of the proline and glutamine pathways to glutamate biosynthesis and nitrogen assimilation in yeast lacking glutamate dehydrogenase[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(9/10): 709-716
- [28] Valenzuela L, Guzman-León S, Coria R, et al. A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the petit-negative yeast *Kluyveromyces lactis* uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis[J]. *Microbiology*, 1995, 141(10): 2443-2447
- [29] Bhatt RS, Sahoo A. Effect of adding formaldehyde treated protein alone and with *Saccharomyces cerevisiae* in diet on plane of nutrition, growth performance, rumen fermentation and microbial protein synthesis of finisher lambs[J]. *Small Ruminant Research*, 2019, 171: 42-48
- [30] Kand D, Raharjo IB, Castro-Montoya J, et al. The effects of rumen nitrogen balance on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis vary with dietary carbohydrate and nitrogen sources[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 241: 184-197
- [31] Cruz A, Håkenåsen IM, Skugor A, et al. *Candida utilis* yeast as a protein source for weaned piglets: Effects on growth performance and digestive function[J]. *Livestock Science*, 2019, 226: 31-39
- [32] Chen XQ, Zhao W, Xie SW, et al. Effects of dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) on growth performance, immune response, antioxidant capacity and histomorphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 90: 30-39
- [33] Nasiri AH, Towhidi A, Shakeri M, et al. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on milk production, insulin sensitivity and immune response in transition dairy cows during hot season[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 251: 112-123
- [34] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Catalogue of Feed Additives (2013)[EB]. (2013-12-30). http://jiuban.moa.gov.cn/fwllm/zxbs/xzxk/bszl/201104/t20110415_1969961.htm (in Chinese)
- 中华人民共和国农业部. 饲料添加剂品种目录(2013)[EB]. (2013-12-30). http://jiuban.moa.gov.cn/fwllm/zxbs/xzxk/bszl/201104/t20110415_1969961.htm