

## 羽毛粉降解菌的分离及特性

罗文<sup>①</sup> 周世宁 钟英长

(中山大学生物学系, 广州 510275)

**摘要** 本文报道一株能降解羽毛粉角蛋白的霉菌, 初步鉴定为串孢属菌 (*Catenularia* sp.). 该菌株可在 pH5--9 范围的培养基上生长, 可产生胞外蛋白酶和淀粉酶。以每 100g 羽毛粉中添加淀粉 2g、CaCl<sub>2</sub> 0.5g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2g 和水 100ml, 自然 pH, 置 28℃ 分别发酵 3 天和 5 天, 使两个羽毛粉样品的体外消化率由原来的 23.60% 和 28.32%, 分别提高至 56.94% 和 65.73%。发酵羽毛粉的可溶性得到改善, 游离氨基酸总量比发酵前大幅度地增加。

**关键词** 羽毛粉; 微生物降解; 霉菌

禽类羽毛中含 80% 以上粗蛋白, 但主要为不溶性的角蛋白, 不能被动物消化和吸收。在作为饲料蛋白前, 必须经过水解成为可消化的羽毛粉, 其中最常用的是高压蒸煮水解法, 这样处理后其消化率和可溶性虽有所改善, 但与鱼粉或肉骨粉相比, 仍有很大差距<sup>[1]</sup>。消化率低是羽毛粉蛋白在饲料应用上受限制的主要原因之一。某些细菌、链霉菌和真菌可产生蛋白酶分解二硫键并降解角蛋白<sup>[2-4]</sup>。利用微生物降解羽毛粉角蛋白可提高其消化率和可溶性, 改善羽毛粉的品质。本文报道自土壤分离的一株羽毛粉降解菌, 对其特点和在固态发酵中降解羽毛粉的效果进行了研究。

### 材料和方法

#### (一) 材料

1. 羽毛粉: 南宁肉类联合加工厂产品。
2. 胃蛋白酶: 美国 Serva 公司出品, 分析纯, 活力 1:3000。
3. 分离培养基(%): 羽毛粉 10, 蔗糖 2, 琼脂 2, 自然 pH。
4. 发酵培养基: 每 100g 羽毛粉中添加 2g 淀粉, 适量的无机盐和水, 500ml 三角瓶装羽毛粉培养料 200g。
5. 淀粉利用培养基(%): 淀粉 0.5, NaNO<sub>3</sub> 0.3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, KCl 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, 琼脂 2, 自然 pH。

6. 酪蛋白平板: 酪蛋白 0.15g, 琼脂 1.5g, 用 100ml pH7.4 硼酸缓冲液配制。凝固后用 9mm 打孔器打孔。

#### (二) 方法

1. 淀粉利用试验: 将菌接种于淀粉利用培养基上, 置 28℃ 培养 48 小时, 加碘液显色后分别观测菌落和淀粉水解圈的直径。

2. 平板法测定蛋白酶活力: 以 10ml 0.15mol/L NaCl 浸泡 5g 发酵羽毛粉样品, 过滤并离心, 取上清液注入酪蛋白平板孔内至满, 置 28℃ 保温 12 小时, 观测水解圈直径。

3. 蛋白质测定: 凯氏定氮法、双缩脲法和紫外吸收法<sup>[5]</sup>。

4. 氨基酸测定: 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪进行。

5. 体外胃蛋白酶消化率测定: 参照美国 AOAC 方法<sup>[6]</sup>, 有所改动: 酶浓度为 0.007%, 现用现配: 采用水平往复式摇床, 摇速为 80--100r/min。消化率计算为:

$$\frac{\text{样品总蛋白 (mg)} - \text{消化后残渣总蛋白 (mg)}}{\text{样品总蛋白 (mg)}} \times 100\%$$

6. 可消化氮与可溶性氮的分析: 经胃蛋白酶消化后, 可测定可消化氮含量。

可消化氮 = 样品总氮 - 酶消化后残渣总氮  
不加胃蛋白酶而只加 0.075mol/L HCl, 则可测定可溶性氮含量 (即空白消化)。

① 现在单位: 广东省食品工业办公室  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

可溶性氮=样品总氮-空白消化后残渣总氮  
注：换算成蛋白含量应乘以系数6.25。

### 结果和讨论

#### (一) 菌种的分离筛选

用分离培养基从土壤样品中分离得到12株霉菌，编号后将它们分别接入发酵培养基中，28℃发酵3天，根据发酵羽毛粉被胃蛋白酶消化的程度来比较各菌株的降解能力。若消化后羽毛粉的残渣中粗蛋白含量减少或者上清液中粗蛋白含量增加较多，则反映该菌对羽毛粉降解力较强。结果显示，N<sub>1</sub>和N<sub>9</sub>菌株的发酵产物，可消化蛋白含量分别比对照（未发酵羽毛粉）高25.14%和37.42%，其它菌株则较差。表明这两株菌具有较强的羽毛粉降解能力。

在进行淀粉利用试验时，N<sub>1</sub>菌菌落周围无明显淀粉水解圈，而N<sub>9</sub>菌可产生胞外淀粉酶，水解圈直径为21mm，与菌落直径之比为1.5。因此，筛选出能以淀粉为碳源的N<sub>9</sub>菌作为羽毛粉发酵试验的菌种。

根据魏景超《真菌鉴定手册》的描述<sup>[7]</sup>和N<sub>9</sub>菌的形态特征，初步将其鉴定为串孢属菌种(*Catenularia* sp.)。

#### (二) N<sub>9</sub>菌的一些生理特点

1. 生长的pH范围：将N<sub>9</sub>菌分别接种于不同pH的马铃薯斜面上，28℃培养48小时。在pH4-9范围内，除pH4斜面未长菌外，其余各斜面均有生长，并逐渐形成褐色孢子；72小时pH4斜面才出现少量生长点，表明该菌不适宜在pH4或以下环境生长。这种较广的pH范围有利于羽毛粉发酵，因为在发酵过程中，富含氮源的底物可能会使培养基pH值升高，而该菌能够适应这种变化。另外，还可以省去固态发酵培养基配制时调节pH的工序。

2. 发酵过程中蛋白酶的活性：在不同发酵时间取样，用平板法测定其中蛋白酶的活性。发酵72小时左右显示出蛋白酶的活性最高(图1)，这个时期培养物上菌丝生长良好，是产生蛋白

酶(系)降解羽毛粉最活跃的时期。至120小时仍有较强的酶活性。

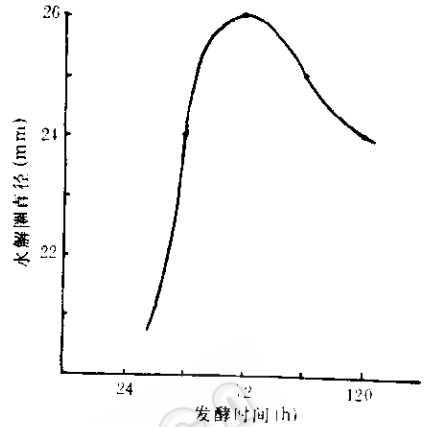


图1 发酵过程中蛋白酶的活性变化

#### (三) 固态发酵的条件试验

以体外消化率为指标，正交试验的结果表明以淀粉或蔗糖作碳源、pH5.5或自然pH差异均不显著；添加(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>效果欠佳，可能是它对N<sub>9</sub>菌蛋白酶生成不利，从而影响了羽毛粉被降解。影响固态发酵的主要因素为：发酵时间、水分、CaCl<sub>2</sub>和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(图2)。以羽毛粉100g加淀粉2g、水100ml、CaCl<sub>2</sub>0.5g和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.2g等为培养基，28℃发酵5天时所得到的发酵羽毛粉的体外消化率最高。

#### (四) 发酵羽毛粉的品质变化

1. 体外消化率：以两批次购入的羽毛粉为原料，接种N<sub>9</sub>菌分别发酵3天和5天，结果表明，产物的消化率都比发酵前有明显提高(表1)。

表1 羽毛粉发酵前后消化率的比较

样 品	发酵前消化率 (%)	发酵后消化率 (%)	消化率差值 (%)
* 羽毛粉 I	23.60	56.94	33.34
** 羽毛粉 II	28.52	65.73	37.21

\* 发酵3天, \*\* 发酵5天

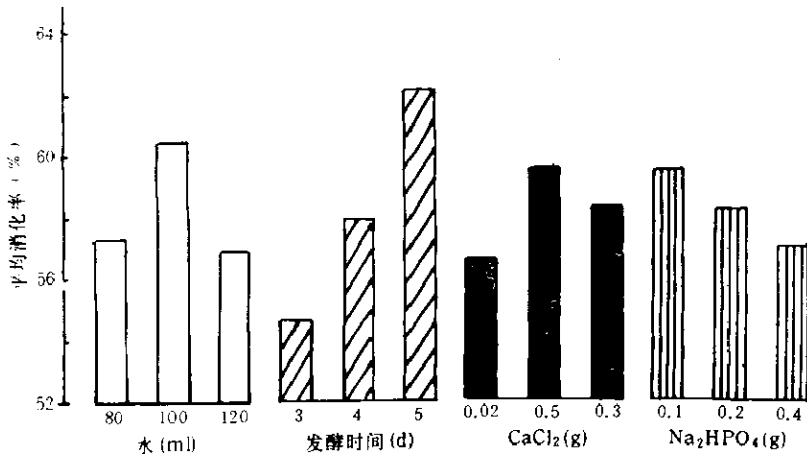


图2 各主要因素对发酵羽毛粉消化率的影响

2. 可溶性氮和可消化氮: 分别用0.075mol/L HCl 和0.007%胃蛋白酶溶液处理羽毛粉, 来测定其可溶性氮和可消化氮的组成与变化。以

羽毛粉 I 样品为原料经发酵后试验表明, 其中的可溶性氮为对照 (未发酵羽毛粉) 的2.93倍; 可消化氮为对照的2.56倍 (表2)。

表2 发酵前后可溶性氮和可消化氮含量比较

处理项目	0.075mol/L HCl		0.007%胃蛋白酶	
	发酵羽毛粉	对 照	发酵羽毛粉	对 照
样 品				
样品重量(mg)	1001.5	1000.2	1001.6	1004.7
残渣重量(mg)	594.1	851.6	489.7	807.0
可溶性或可消化氮(mg)	51.5	17.6	72.6	28.3

为了区分溶液中新增的氮中所含的蛋白质(或肽)与其它含氮化合物, 采用双缩脲法和紫外吸收法进行分析。结果显示: 发酵羽毛粉在0.075mol/L HCl 或0.007%胃蛋白酶溶液中新增的氮以蛋白质(或肽)为主, 即可溶性蛋白质和可消化蛋白质 (表3); 紫外吸收法分析结果同样说明了这点, 而且 A<sub>280</sub>/A<sub>260</sub> 值小于对照, 推测发酵羽毛粉中含有核酸或碱基类的含氮物质 (表4)。

表3 发酵前后可溶性蛋白和可消化蛋白的 OD<sub>540</sub> 值

处理项目	0.075mol/L HCl		0.007%胃蛋白酶	
	发酵羽毛粉	对 照	发酵羽毛粉	对 照
OD <sub>540</sub> 值	0.113	0.046	0.194	0.092

表4 发酵前后样品的紫外吸收测定结果

处理项目	0.075mol/L HCl		0.007%胃蛋白酶	
	发酵羽毛粉	对 照	发酵羽毛粉	对 照
A <sub>280</sub> 值	0.536	0.212	0.795	0.341
A <sub>260</sub> 值	0.556	0.208	0.819	0.328
A <sub>280</sub> /A <sub>260</sub> 比值	0.964	1.019	0.971	1.040

此外, 氨基酸分析表明, 发酵羽毛粉中游离氨基酸含量大幅度增加, 从发酵前的0.076%激增至5.92%, 是发酵前的77.89倍 (表5)。

这些品质变化, 说明 N<sub>9</sub> 菌的发酵导致了羽毛粉角蛋白的分解, 使其更易为动物所消化与吸收。

表5 羽毛粉中17种游离氨基酸分析结果

氨基酸名称	氨基酸含量(mg/g)		氨基酸名称	氨基酸含量(mg/g)	
	发酵前	发酵后		发酵前	发酵后
Asp	0.0547	1.4097	Ile	0.0258	2.7734
Thr	0.0433	4.8334	Leu	0.0663	4.8964
Ser	0.0574	8.0251	Tyr	0.0661	3.9085
Glu	0.0724	4.2592	Phe	0.0949	6.9021
Pro	0.0231	0.2702	Lys	0.0236	0.9401
Gly	0.0269	6.2695	His	微量	微量
Ala	0.0488	3.2593	Arg	0.0555	2.7889
Cys	0.0246	1.7029			
Val	0.0582	6.1729	总计	0.7630	59.1687
Met	0.0214	0.7301	含量(%)	0.076	5.92

3. 氨基酸组成:对发酵前后羽毛粉的氨基酸组成进行了分析,从表6可知,发酵后氨基酸总量下降3.08%,其中甘氨酸、丝氨酸等10种氨基酸减少,原来含量较少的重要氨基酸,如赖氨酸、组氨酸等又略有增加。这反映了 *N<sub>9</sub>* 菌在利用羽毛粉时,通过代谢合成了自身所需的一些氨基酸以及一些核酸类物质,与 Elmayergi 等研究的结果相似<sup>[3]</sup>。

酸、组氨酸等又略有增加。这反映了 *N<sub>9</sub>* 菌在利用羽毛粉时,通过代谢合成了自身所需的一些氨基酸以及一些核酸类物质,与 Elmayergi 等研究的结果相似<sup>[3]</sup>。

表6 羽毛粉中17种氨基酸的分析结果

氨基酸名称	氨基酸含量(mg/g)		氨基酸名称	氨基酸含量(mg/g)	
	发酵前	发酵后		发酵前	发酵后
Asp	61.662	65.388	Ile	36.701	33.611
Thr	33.245	31.482	Leu	75.203	65.825
Ser	69.008	61.056	Tyr	33.673	34.664
Glu	85.743	86.609	Phe	41.407	39.880
Pro	93.000	90.731	Lys	14.395	16.318
Gly	82.291	78.982	His	4.353	5.944
Ala	42.559	36.021	Arg	53.086	54.088
Cys	19.177	20.948			
Val	67.693	61.044	总计	819.960	789.154
Met	6.764	6.563	含量(%)	82.00	78.92

以上的初步研究表明, *N<sub>9</sub>* 菌是一株具较强羽毛粉降解力的菌株。由于微生物发酵条件温和,可避免造成羽毛粉中大量氨基酸的破坏,因此, *N<sub>9</sub>* 菌在发酵生产优质羽毛粉饲料蛋白方面有潜在的应用价值。

## 参 考 文 献

1. Johnston J et al. : *Poultry Sci.*, **58**: 919-927, 1979.
2. Williams C M et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1509-1515, 1990.
3. Elmayergi H H et al. : *Canadian J. Microbiol.*, **17**: 1067

-1072, 1971.

4. Frey D: *Mycologia.* **57**: 202-216, 1965.
5. 北京大学生物系生物化学教研室: 生物化学实验指导, 第71-96页, 人民教育出版社, 北京, 1979年.
6. Association of Official Analytical Chemists: *Official Methods of Analysis*, 12th edn., Washington, D. C., p. 133-135, 1975.
7. 魏景超: 真菌鉴定手册, 第534-540页, 上海科技出版社, 上海, 1979年.

(1992-07-02收稿)