

# 4320 菌体蛋白饲料中双菌作用机制的研究

郭维烈, 郭庆华, 谢小保, 许 虹

(广东省微生物研究所)

**摘 要:** 该文报导新发现的利用粗淀粉料及渣粕类原料不灭菌固体发酵生产 4320 菌体蛋白饲料时所用的两个菌株—优良黑曲霉选株 No. 303 和白地霉菌 As 2 361 间的关系是一种偏利生关系, 在利用这种关系进行混菌固体发酵生产 4320 菌体蛋白饲料时, 发现有类似杂交现象的“菌丛”, 通过试验, 证明“菌丛”是这两个菌间偏利生关系的特殊表现。通过对偏利生作用因子的研究表明, No. 303 的菌株分泌的柠檬酸、酶等都是直接或间接或是综合作用的偏利生因子。特别是 No. 303 分泌的柠檬酸及由蛋白酶分解的谷氨酸等能明显刺激 As 2 361 生长。通过正交试验得知, 它们是两个最大的作用因子。

**关键词:** 菌体蛋白; 作用机制; 偏利生

**中图分类号:** S38

**文献标识码:** A

**文章编号:** 100226819(2002)0120122204

4320 菌体蛋白饲料的生产研究系针对我国蛋白资源紧缺, 粗淀粉及其渣料相对丰富的实际情况, 为减少鱼粉进口及代替豆饼原料, 由广东省科委委托广东省微生物研究所研究成功的一种生物产品, 4320 是双菌混生的产品, 它利用从自然界分离的黑曲霉菌株 No. 021 为出发菌株, 通过各种手段获得优良突变株 No. 303 (选育论文另报), 再与白地霉菌 As 2 361 配伍生产, 工艺简单, 成本低, 无毒性 and 致畸性。4320 原料来源广泛, 如薯类、糠麸、渣粕类等, 而且原料不需灭菌, 并能成功地把淀粉质渣料转化为紧缺的蛋白质。为了深入了解上述两菌间的实质关系, 以便对 4320 菌体蛋白饲料的研究、生产、应用和发展提供科学依据, 开展了 4320 双菌作用机制的研究。

## 1 材料和方法

1) 菌株来源: Sp. niger 303 为本所 4320 研究组选育的突变菌株, As 2 361 为白地霉菌株。

2) 培养基: 马铃薯蔗糖培养基 (PSA), 察氏培养基, 常规。麸皮培养基: 麸皮 水 = 1 1。

3) 用管碟法研究不同浓度的单菌发酵滤液、酶制剂、柠檬酸、氨基酸或其混合液在单菌或混菌生长中的作用。

4) 用菌丝定量法研究双菌间的相互作用。

5) 用正交试验法研究双菌间作用和关键因子。

6) 用融合子试验法、异核体试验法、阻断扩散

培养法、培养观察法和显微镜观察法等方法研究“菌丛”生成原因。

## 2 结果和讨论

### 2.1 双菌间关系的研究

#### 2.1.1 两菌间的偏利生关系

1) 白地霉不能利用淀粉和蔗糖, 在 PSA 斜面上生长不良。在 PSA 平皿上点种 No. 303 菌, 培养后, 从远离菌落的地方, 打出琼脂柱贴在 PSA × 白地霉平皿上, 适温培养后, 发现空白琼脂柱周围长出更白色生长圈。说明系 No. 303 菌分泌物扩散到皿内培养基所致。支持这一说法的另一种试验是在 PSA 琼脂柱上点种 No. 303, 待发育成熟后贴入 PSA × 白地霉平板, 或在 PSA × 白地霉平板上点种 No. 303, 通过适温培养, 能看到比第一种试验更明显的生长圈。这一方面说明 No. 303 的分泌物扩散的程度与菌落的距离成反比例, 另一方面也可能是其分泌物不是全部会扩散的。在 No. 303 菌落周围存在多种且浓度较大的分泌物, 促使白地霉菌迅猛生长。根据试验, 预测两菌间可能存在偏利生关系。

#### 2.1.2 菌丝体定量法试验

1) No. 303 菌株对白地霉的影响 采用 PSA 液体培养基, 接种 No. 303, 适温培养 24 h 后滤去菌丝和孢子, 取滤液涂于 PSA 平皿上培养, 确认没有 No. 303 菌生长。取此滤液 10 mL 加进 50 mL PSA 液体中, 接入白地霉菌种液 1 mL, 培养 28 h, 用定量滤纸过滤、洗涤、烘干后去除定量滤纸质量, 实测菌丝质量后进行比较, 如表 1。

从表中可看出, 以普通水 + 10 mL No. 303 滤液接种白地霉和以 PSA 液体接种白地霉的结果是近似的。这一方面说明白地霉几乎无法利用淀粉和

收稿日期: 2001204228 修订日期: 2001210211

基金项目: 广东省委书记资助课题

作者简介: 郭维烈, 研究员, 从事微生物生态育种、工艺研究工作, 出版专著 4 部, 发表论译文 70 多篇, 获 7 项发明专利或成果; 广州先烈中路 100 号 广东省微生物研究所, 510070

蔗糖; 另一方面说明单靠 No. 303 菌的刺激物质而无生长基础时白地霉生长效果不佳; 同时也说明 10 mL No. 303 滤液中的残存营养成分对白地霉的生长作用是微乎其微的。只有在 PSA 液体中加入 10 mL No. 303 滤液同时接入白地霉时, 菌丝量才剧增。上面已经证明 No. 303 滤液是不长菌的, 所以可以肯定是 No. 303 菌代谢产物明显的刺激白地霉迅速生长。

表 1 No. 303 菌株刺激白地霉生长菌丝质量试验结果<sup>3</sup> (液体培养基: PSA 50mL 瓶)

Table 1 The result of growth experiment of strain As 2 361 stimulated by strain No. 303

处理	重复次数	No. 303 滤液用量mL · 瓶 <sup>-1</sup>	白地霉接种量mL · 瓶 <sup>-1</sup>	菌丝+ 滤纸干质量mg · 瓶 <sup>-1</sup>	菌丝质量mg · 瓶 <sup>-1</sup>
第一种	3	10	1	915	179
第二种	3	0	1	814	78
第三种 <sup>3 3</sup>	3	10	1	800	64

3 取同批定量滤纸 3 张, 烘干后称量, 平均每张 736 mg; 3 3 以水代 PSA 液体。

2) 白地霉对 No. 303 菌的影响 做这个试验时, 首先必须使滤液中没有白地霉菌丝或节孢子, 否则无法进行。由于白地霉发酵滤液过滤时, 其菌丝能通过滤纸, 经 80 处理 10 min 后, 涂皿培养不见长菌。当按 No. 303 菌刺激白地霉生长的方法进行试验时, 可清楚看出以普通水代替 PSA 液体加入 10 mL 白地霉发酵滤液再接入 No. 303 菌种后, 仅得每瓶 30 mg 的 No. 303 菌丝球, 而用 PSA 液体仅接 No. 303 菌时可获得每瓶 128 mg 的菌丝球, 两者相加为每瓶 158 mg。这与用 PSA 液体加入 10 mL 白地霉发酵滤液再接入 No. 303 菌培养的第一种情况获得每瓶 157. 4 mg 的结果是基本吻合的。

上述结果证明白地霉菌和黑曲霉 No. 303 菌株混生时, 白地霉菌从中受益, 而 No. 303 菌株则不受影响, 这是符合偏利生关系定义的。

2. 1. 3 培养观察试验

固体培养观察: 当用麸皮培养基培养时, 24 h 内可看出单独接种白地霉和 No. 303 菌株的培养瓶与两者混合培养的结果有明显的差异, No. 303+ 白地霉接种瓶菌丝呈浓厚白色, 肉眼极易辨别。

2. 1. 4 有关菌丛的研究

在试验中多次发现, 在灭菌液体培养基中接种白地霉和 No. 303 菌株, 培养液通过稀释涂皿适温培养后发现菌丝末端长出一些不同于白地霉和 No. 303 菌态的白色菌丛。黑曲霉和白地霉是不同属的微生物, 在常规情况下是不可能产生融合杂交的。而这种具杂交性质的“菌丛”现象又如何解释呢? 使人产生如下猜测, 为此做了如下试验:

1) 是否融合子试验 融合子一般是稳定的, 而且其菌落颜色应不同于亲本。但当从刚形成的菌丛末端细心挑取菌丝磨碎稀释涂皿培养时, 其菌落特征与白地霉完全一样, 在显微镜下观察也看出白地霉菌丝和节孢子的典型形态并没看到和 No. 303 和白地霉不同颜色菌落出现。因此菌丛不可能是融合

子形成的。  
2) 是否异核体试验 文献<sup>[1]</sup>报导: 在霉菌和放线菌杂交育种中, 在一定条件下从两个菌落接触处能产生一丛丛的菌丝, 这就是异核体菌丛, 这种异核体菌丛的最大特点是能产生原来两个亲本颜色的孢子, 我们曾在培养后期在产生少许孢子的菌丛上挑取孢子进行稀释涂皿培养, 结果看到的菌落均为 No. 303 的典型菌落形态, 没有发现白地霉菌落。更没有出现不同于两亲本形态的第三种菌落, 说明菌丛孢子不是融合子也不是异核体。

3) 基内菌丝观察 挑取菌丛基内菌丝做片在显微镜下观察, 发现白地霉菌丝和 No. 303 菌丝交织在一起。这现象使我们推测菌丛形成过程可能是这样: No. 303 菌分泌代谢产物刺激白地霉生长, 使其混生在一起的白地霉菌长得更快更好, 从而形成了“菌丛”, 而没有与其混在一起的白地霉菌, 仅从培养基的扩散作用获得较少量的 No. 303 菌分泌物, 从而长势较差, 两者相衬托使“菌丛”形象突出。试验得知, 菌丛数随 No. 303 接种孢子数的增加而增加, 菌体也显著增加。事实阐明: No. 303 菌株与其混生的白地霉所形成的菌丛是这两个菌株间偏利生关系的特殊表现, 它的数量可直接反映其偏利生的程度。

2. 1. 5 阻断扩散培养试验

在 PSA 平皿上, 划线接种 No. 303 菌和白地霉培养后, 发现两菌交界处能形成菌丛, 而且发现两菌相距愈近, 菌丛长得愈厚。但是, 若在两菌中间用消毒刀去除培养琼脂, 阻断两菌间代谢物质的渗透, 则无论两菌距离多近或培养时间多长, 都无法形成菌丛。试验证明: 菌丛确是 No. 303 菌代谢产物刺激白地霉生长所致。这是典型的偏利生关系的表现。

2. 1. 6 显微镜观察试验

取培养成熟的 No. 303 菌株和白地霉, 再按一定比例制成双菌混合菌种液。在凹形载玻上滴入一

滴溶化了 PSA 空白培养基,使表面平滑,分别在 PSA 培养基一边接上 No. 303、白地霉、No. 303+ 白地霉三种不同的菌悬液,培养 10 h 后每隔 2 h 在显微镜下观察菌丝生长情况。结果发现:白地霉菌单独接种者菌丝细长;No. 303 菌出现典型的霉菌菌丝生长特征,高倍放大时可看到足细胞;而在 No. 303+ 白地霉混菌接种玻片上,可看到白地霉菌丝多且粗壮,视野中很难找到 No. 303 菌丝。说明 No. 303 菌对白地霉有明显的刺激生长作用。

通过上述多项试验结果,都证明白地霉和优良黑曲霉选拔株 No. 303 一起生长时,白地霉因 No. 303 的存在或活性而得利, No. 303 则没从白地霉得到相应的利益或害处,使它们之间的偏利生关系得以确立。

## 2 2 偏利生因子的研究

### 2 2 1 有机酸对偏利生的影响

在 PSA 平皿中点种 No. 303 菌株,形成菌落后检测菌落外培养基的 pH 值,发现 pH 从点种前的 7.0 降到 2.5~3.0。上述酸性物质按五溴丙酮法平板制酸圈测定几乎系柠檬酸<sup>[2]</sup>。用管碟法在 PSA × 白地霉平板上检测柠檬酸不同浓度对白地霉的作用,结果见 0.5% 柠檬酸就可以明显刺激白地霉生长。这一现象耐人寻味,因为 0.5% 柠檬酸液的 pH 都在 3.5 以下,而一般白地霉在 pH 5 时就已生长不良了。现在它不但能忍耐 pH 3.5 的柠檬酸液,而且还旺盛生长,这说明柠檬酸对白地霉的繁殖有积极作用。在 PSA 平皿上,白地霉由于无法利用淀粉和蔗糖而长势极弱,一定浓度(0.5%)的柠檬酸液照理也无法使淀粉等多糖转成葡萄糖供白地霉吸收。可能的解释就是白地霉直接利用柠檬酸为碳源,或者是白地霉利用了柠檬酸使其 TCA 循环反应加速,或柠檬酸使白地霉产生一种新的利用碳源的功能。实验还表明,当柠檬酸浓度过大时,则对白地霉产生抑制作用,10% 浓度的柠檬酸液产生透明抑制圈。

在液体发酵时,柠檬酸的刺激浓度和平板检测不大一样,这是由于液体发酵时柠檬酸分布较均匀的缘故。试验知,0.05% 的柠檬酸就已明显刺激白地霉生长了。这一点在生产上是有应用价值的。当 No. 303 和白地霉混生时, No. 303 分泌的柠檬酸加速了白地霉的生长,使偏利生作用更突出。而且 No. 303 菌的这种作用还使培养过程酸性增大,有利于抑制细菌生长,这对 4320 生料固体发酵工艺的创立很重要。另外,此特性还对柠檬酸厂处理污染环境的废渣废水提供了理论根据。这已被我们应用该原理生产 4320—848 菌体蛋白饲料的成功所证实<sup>[3]</sup>。

### 2 2 2 氨基酸对偏利生的影响

白地霉是不会分泌蛋白酶的,而 No. 303 菌株和 No. 303+ 白地霉发酵物都含有蛋白酶,而且以酸性蛋白酶为主。在这种酶的作用下,培养物中的蛋白质会被酶解成小分子的肽、胨、酰胺类及游离氨基酸等,发酵物经氨基酸分析仪测定含有 17 种氨基酸,其中谷氨酸含量很高。经管碟法(PSA × 白地霉)平板检测知,对白地霉菌促进生长强度为亮氨酸> 异亮氨酸> 天门冬氨酸> 脯氨酸> 丙氨酸> 天门冬酰胺> 精氨酸。氨基酸刺激白地霉生长在不含淀粉原料的察氏培养基 × 白地霉平板上也能表现出来,这说明刺激作用与淀粉分解无关。而在这种培养基平板上,柠檬酸却无法使白地霉长出刺激圈,说明氨基酸与柠檬酸的刺激机制不同。两者的共同点是:都无需象糖化酶那样分解淀粉成葡萄糖后才能促进白地霉生长,而是各有各的刺激条件和效果。

在所有能刺激白地霉生长的氨基酸中,虽然亮氨酸和异亮氨酸效果极好,但从成本和货源考虑,谷氨酸、谷氨酸钠(食用味精)其货源充足、价格便宜,后者的刺激作用不亚于谷氨酸,0.05% 浓度的谷氨酸钠能使菌体增加 14%,0.1% 浓度能增加 46%,不论从成本还是工艺方面考虑都是可以接受的。

### 2 2 3 酶对偏利生的影响

No. 303 和 No. 303+ 白地霉都含有糖化酶、蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶,而白地霉单独培养物则不含这些酶。白地霉几乎无法利用淀粉等多糖<sup>[4]</sup>,所以它在淀粉原料中发育不良。而 No. 303 和白地霉混合时,由于 No. 303 分泌的酶分解淀粉等基质,为白地霉的发育生长创造条件,促进它的繁殖。这也是偏利生菌株间生长情况的表现。

### 2 2 4 各种因子对偏利生的综合影响

在 No. 303 菌和白地霉混生过程中,存在各种刺激因素,它们可分别在某一阶段表现出不同的刺激能力,但都不可能单独存在。从试验知, No. 303 菌株分泌的柠檬酸、糖化酶、 $\alpha$ -淀粉酶及蛋白酶对白地霉菌都有直接或间接的刺激作用。其中由蛋白酶酶解的氨基酸中,有实用价值的是谷氨酸。而谷氨酸钠和谷氨酸的刺激作用基本相似。为了使研究结果和生产实践紧密联系,为了了解各种主要刺激生长因素的综合作用效果,本试验模拟 No. 303 菌和白地霉配伍生长的实际,以正交法设  $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、柠檬酸、谷氨酸钠四个因素的综合试验。每个因素选三个水平,各个因素的三个水平都是根据前面试验结果选出的,见表 2,表 3。

表 2 因素水平

Table 2 Factors and levels				%
因素	A $\alpha$ 淀粉酶	糖化酶	柠檬酸	谷氨酸钠
1	0.02	0.01	0.05	0.05
2	0.04	0.02	0.10	0.10
3	0.08	0.04	0.20	0.20

注: 1% A $\alpha$ 淀粉酶相当于 350 u $\alpha$ mL; 1% 糖化酶相当于 630 u $\alpha$ mL。

表 3 正交试验数据及结果

Table 3 The results of the orthogonal experiments					
编号	A $\alpha$ 淀粉酶	糖化酶	柠檬酸	谷氨酸钠	菌体干重 $\alpha$ mg
1	1	1	1	1	76.6
2	1	2	2	2	93.4
3	1	3	3	3	127.3
4	2	1	2	3	114.9
5	2	2	3	1	109.8
6	2	3	1	2	98.6
7	3	1	3	2	125.0
8	3	2	1	3	105.6
9	3	3	2	1	107.7
K <sub>1</sub>	297.3	316.5	280.9	294.1	
K <sub>2</sub>	323.3	308.8	316.0	317.0	
K <sub>3</sub>	338.3	333.3	262.1	347.8	
k <sub>1</sub>	99.1	105.5	93.6	98.0	
k <sub>2</sub>	107.8	102.9	105.3	105.7	
k <sub>3</sub>	112.8	111.2	120.9	115.9	
R	13.7	8.3	27.3	17.9	

从正交试验可知, 柠檬酸的影响最大, 其次是谷氨酸钠。No. 303 菌在和白地霉混生过程中, 已经能

够供给足够的上述刺激因素刺激白地霉迅猛生长, 使短时间发酵获得很好的效果, 这也是 4320 菌体蛋白饲料生产技术的优点所在。从另一个角度看, 这种利用一个菌株分泌多种因子促进另一个菌株迅猛生长的偏利生混菌发酵技术, 比起人为添加各种刺激因素进行单菌发酵的做法要妙得多和经济得多。

另一方面, 上述研究中还有一个新发现: 4320 配伍菌株间主要偏利生因子是柠檬酸和谷氨酸, 而不是糖化酶等酶类, 这和以往报导的利用淀粉原料生产 SCP 时的主要作用因子是糖化酶等酶类的结论是截然不同的。

4320 菌体蛋白饲料是 No. 303 菌与白地霉菌 As 2.361 混生产品, 制造工艺简单、成本低、无毒性和致畸性。4320 原料来源广, 原料不需灭菌, 能有效地把淀粉质渣料转化成紧缺的蛋白质, 且可有效地防止环境污染, 因此应用前景良好。

[参 考 文 献]

[1] 刘颐屏等. 抗菌素产生菌杂交育种[M]. 北京: 化学工业出版社, 1980. 152~ 210

[2] 郭维烈等. 一种筛选产有机酸菌种新方法的研究[J]. 食品与发酵工业, 1984, 3: 64~ 68

[3] 郭维烈等. 用柠檬酸等工业废渣生产蛋白饲料的研究[J]. 畜牧与兽医, 1991, 5: 196~ 198

[4] 中国科学院微生物所编. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 160~ 162

Meng Qingyan<sup>1</sup>, Wang Hongyan<sup>2</sup>, Wang Zhaoqian<sup>3</sup> (1. *Institute of Remote Sensing Applications, China Academy of Sciences, 9718# N a 3 D atun Road, Beijing 100101, China;* 2. *Resources and Environment College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;* 3. *Agriculture Ecology Research Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

**Abstract:** The K cycle of rubber-tea-chicken ecological agricultural model, a typical tropical agroforestry system in Wenchang municipality of Hainan Province was studied with quantitative experiment and qualitative analysis, compared with rubber and rubber-tea. The results showed that the K cycling rate, K output and K surplus in soil of rubber-tea-chicken agroforestry system were all the highest, being 59%, 134.5 kg/ha and 168.2 kg/ha, respectively. The ratio of K output to K input of chicken subsystem was 91% and the ratio of K output to K input in chicken products was only 23%. Amount of cycling K inside chicken garden is the highest, being 414.9 kg/ha, the K cycling structure of rubber-tea-chicken agroforestry system is more reasonable structure, and its K cycling was the most active.

**Key words:** agroforestry system; ecological agricultural model; K cycle; rubber-tea-chicken

## · Agro-product Treatment Technology and Processing Engineering ·

### Compound Preservative Technology and Vacuum Package for Beef ..... (118)

Jia Yingmin, Wang Ling, Ma Ai'jin, Zhang Zide, Chen Zhizhou (*Institute of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China*)

**Abstract:** The preservative and color protective agents used for beef preservation were studied and screened out. The compound preservative formula was studied by the experiments for combining the preservative and color protective agents. It was combined with vacuum package and the vacuum compound preservative bags were prepared for beef preservation. The bags were used in beef vacuum package for preservation. The preserved period reached 35 days with good quality indexes.

**Key words:** beef; vacuum package; compound preservation

### Interaction Mechanism of Two Strains in Production of Microbiological Protein (MBP) 4320 for Feed Use ..... (122)

Guo Weilie, Guo Qinghua, Xie Xiaobao, Xu Hong (*Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China*)

**Abstract:** This paper reports for the first time that the MBP fermentation is based on the relationship between the two selected good strains of *Candida utilis* 2361 and *Aspergillus niger* No. 303, which is commensalism. The floras, like the appearance of hybridization formed by *C. utilis* 2361 when it is co-cultivated with No. 303 in 4320 MBP fermentation, are proved to be a specific feature of commensalism through Fusant Test, Heterocaryon Test, Substrate Mycelia Observation, Diffusion Block Test and Microscopic Examination. The quantity of floras directly reflects the extent of commensalism and the quality of MBP 4320 as well, which is of great application value. Effective factors in commensalism are citric acid, protease, glucanase, and amylase produced by No. 303, and they function directly, indirectly and cooperatively. Among the factors, amino acids, especially Glu, catalyzed by protease from No. 303 and citric acid produced by No. 303 can stimulate growth of *C. utilis* 2361 strikingly. They are the two newly found top commensal factors in producing MBP from starch materials, which is discovered through orthogonal test and is completely different from other reports that the main factors in producing SCP with starch materials are such enzymes as glucanase.

**Key words:** microbiological protein; interaction mechanism; commensalism

### Application of Maltogenase and B-Enzyme to the Production of Maltose Syrup ..... (126)

Zhou Jianqin<sup>1</sup>, Luo Faxing<sup>2</sup> (1. *Department of Biology and Food, Hefei University of Technology, Hefei 230069, China;* 2. *College of Food Engineering and Biology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China*)

**Abstract:** The effect of liquefaction degree on saccharification of Maltogenase and B-enzyme and the effect of raising dosage of saccharifying enzymes on the maltose content are studied in this paper. The combination of Maltogenase, B-enzyme is also studied. Based on the above experiments, the liquefaction degree has a profound effect on saccharification; the combination of Maltogenase, B-enzyme is found to be able to increase maltose content effectively.