

# 酪丁酸梭菌发酵废弃虾壳产新型单细胞蛋白饲料的研究

杨智晗<sup>1</sup>, 杨蕾<sup>1</sup>, 陈盈利<sup>1</sup>, 朱丽英<sup>2</sup>, 朱政明<sup>3</sup>, 江凌<sup>\*3,4</sup>

(1. 南京工业大学 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816; 2. 南京工业大学 化学与分子工程学院, 江苏 南京 211816; 3. 南京工业大学 食品与轻工学院, 江苏 南京 211816; 4. 南京工业大学 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816)

**摘要:** 本研究旨在利用废弃虾壳粉末作为酪丁酸梭菌营养基底生产单细胞蛋白的氮源, 探究了不同虾壳粉添加量对菌株生长和生产短链脂肪酸(乙酸、丁酸)的影响, 测定了酪丁酸梭菌发酵虾壳粉得到的单细胞蛋白饲料的粗蛋白、粗纤维、粗脂肪质量分数以及氨基酸组成, 综合评价了蛋白饲料的营养价值。结果表明, 在葡萄糖与虾壳粉碳氮质量比为 8:1.75 时, 生长性能最优且能够生产 1.68 g/L 的乙酸与 3.45 g/L 的丁酸。发酵虾壳粉后粗蛋白质量分数较虾壳粉原料提高了 7%, 粗脂肪、粗纤维质量分数也分别增加了 117% 和 92%, 同时灰分质量分数降低了 13%。此外, 饲料含有的氨基酸种类丰富, 且与原料相比 16 种氨基酸中 12 种都相应增加。最后, 结合发酵前后营养成分和其中短链脂肪酸的变化来看, 酪丁酸梭菌发酵虾壳粉生产的单细胞蛋白饲料营养价值丰富, 生产过程绿色, 成本低廉, 是一种有潜力的新型蛋白饲料。

**关键词:** 酪丁酸梭菌; 短链脂肪酸; 单细胞蛋白饲料; 虾壳粉

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2023)02-0025-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.02.004

## Production of Novel Single Cell Protein Feed Using *Clostridium tyrobutyricum* Fed on Discarded Shrimp Shells

YANG Zhihan<sup>1</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>, CHEN Yingli<sup>1</sup>, ZHU Liying<sup>2</sup>, ZHU Zhengming<sup>3</sup>, JIANG Ling<sup>\*3,4</sup>

(1. School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. School of Chemical and Molecular Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 3. School of Food and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 4. State Key Laboratory of Chemical Engineering of Materials, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

**Abstract:** This study aimed to use the waste shrimp shell meal as a nitrogen source for the production of single cell protein from *Clostridium tyrobutyricum*. We investigated the effects of different amount of shrimp shell meal on the growth and production of short-chain fatty acids (acetic

收稿日期: 2022-06-21

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年基金项目(31922070); 国家自然科学基金山东联合基金重点支持项目(U2106228); 国家自然科学基金青年基金项目(22008114); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20200684); 江苏省先进生物制造创新中心资助项目(XTC2205)。

\* 通信作者: 江凌(1982—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程与酶工程方面的研究。E-mail: jiangling@njtech.edu.cn

acid and butyric acid) of the strain, and determined the content of crude protein, crude fiber, crude fat and the composition of amino acid in the single-cell protein obtained by fermentation of shrimp shell meal by *Clostridium tyrobutyricum* to comprehensively evaluated the nutritional value of the protein feed. The results showed that the best growth performance was achieved at a carbon to nitrogen ratio of 8:1.75 between glucose and shrimp shell meal, which produced 1.68 g/L of acetic acid and 3.45 g/L of butyric acid. After the fermentation of shrimp shell meal, the content of crude protein, crude fat and crude fiber increased by 7%, 117% and 92%, respectively, while the content of ash decreased by 13%, compared with those of shrimp shell meal. In addition, the feed contained a rich variety of amino acids, and 12 of the 16 amino acids were increased accordingly compared to the raw material. Finally, combined with the gain of nutritional composition before and after fermentation and the increase of short-chain fatty acids among them, the single-cell protein feed produced by *Clostridium tyrobutyricum* fermentation of shrimp shell meal is rich in nutritional value, green in production and cheap in cost, which is a novel potential protein feed.

**Keywords:** *Clostridium tyrobutyricum*, short-chain fatty acids, single-cell protein feed, shrimp shell powder

随着全球人口的增长和地区经济发展水平的提高,人们对动物衍生产品的品质要求与需求量急剧增加<sup>[1]</sup>。目前养殖业原料的缺乏影响行业稳定发展,特别是蛋白质资源短缺是我国养殖业“卡脖子”的问题<sup>[2]</sup>。微生物发酵合成单细胞蛋白(SCP)是利用非致病性微生物在适宜的条件下培养,将营养物质在其自身生命周期下转化为菌体蛋白质<sup>[3]</sup>。早在苏联时期,蛋白质饲料已经代替鱼粉实现了工业化量产<sup>[4]</sup>。与传统动植物蛋白质合成相比,SCP的效率往往能够达到上千倍,同时SCP富含氨基酸、碳水化合物、维生素等,营养价值高<sup>[5]</sup>。此外,SCP的生产可以利用许多廉价易得的农耕废弃物以及工业废气,可以有效降低温室气体二氧化碳的排放,促进农业稳定可持续发展<sup>[6-7]</sup>。

用于SCP生产的微生物选择需要考虑其安全性、实用性、生产效率以及培养条件<sup>[8-9]</sup>,基于上述要求,细菌因其生长快、蛋白质含量高,已经成为SCP的重要宿主资源<sup>[1]</sup>。其中,酪酸梭菌作为一种新型益生菌,在2009年被农业部批准作为饲料添加剂(新饲证字(2009)01号),其主要产物丁酸(钠)已被农业部列入饲料添加剂品种目录(农业部公告(2006)658号)。作者所在实验室保藏的与酪酸梭菌高度同源的酪丁酸梭菌,其比酪酸梭菌的丁酸生产能力更加出众,经安全性评价被认定为益生菌<sup>[10]</sup>且在肠道治疗方面有了实际的应用<sup>[11]</sup>,所以是更好的生产

SCP的底盘细胞。但是目前关于酪酸梭菌SCP的绿色生产研究较少,且很难满足实际大规模生产的需求,主要问题是:1)营养基质来源局限,并且是以高成本的酵母粉、蛋白胨等作为氮源;2)蛋白质营养功能单一,缺少更广的应用潜力。基于上述的问题,寻找工农业废弃物作为SCP生产的原料<sup>[12-13]</sup>以及结合菌株自身发酵生产的益生元可以实现绿色生产优质SCP<sup>[14]</sup>。

废弃虾蟹壳资源分布广泛,全球每年有800~1 000万t虾蟹壳垃圾产生,废弃虾蟹壳的综合利用存在巨大问题<sup>[15]</sup>。有效利用虾蟹壳作为生产SCP的原料不仅可以实现绿色生产SCP,同时又可以实现废弃虾蟹壳综合利用。基于此,作者以酪丁酸梭菌为宿主,探究其利用废弃虾壳绿色生产SCP的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 菌株与主要试剂** 菌株:本研究所用的菌株来源于作者所在实验室,从发生了酸变的奶酪中分离保藏的酪丁酸梭菌L319;蛋白胨、酵母粉:购自美国Oxoid公司;NaCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、无水乙酸钠、可溶性淀粉:购自国药集团化学公司;半胱氨酸盐酸盐:购自上海源叶生物科技有限公司。

**1.1.2 主要仪器** YQX-II 厌氧培养箱:上海跃进仪器有限公司;LC-15C 型高效液相色谱:日本岛津;SP-752 型分光光度计:上海光谱;FD-1A-50 型真空冷冻干燥机:江苏天翎仪器有限公司。

**1.1.3 培养基** 梭菌强化培养基 RCM (组分 g/L):葡萄糖 5, NaCl 5, 蛋白胨 10, 牛肉粉 10, 酵母粉 3, 无水乙酸钠 3, 可溶性淀粉 1, 半胱氨酸盐酸盐 0.5; pH 值为 6.8±0.2, 固体培养基添加 1.5 g/dL 的琼脂粉<sup>[16]</sup>。发酵培养基 CGM (组分 g/L):酵母粉 5, 蛋白胨 5, NaCl 5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03, 葡萄糖 20; pH 值为 6.0±0.2<sup>[17]</sup>。虾壳粉发酵培养基 (组分 g/L):NaCl 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03, 葡萄糖 20; pH 值为 6.0±0.2。废弃的虾壳经收集后研磨、过 100 目筛子备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 酪丁酸梭菌在虾壳粉发酵培养基中的生长优化** 利用虾壳粉作为培养基氮源替换或分别替换 RCM 培养基中的蛋白胨、酵母粉以及 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 无机氮源,经 108 ℃高温灭菌 30 min 后备用。挑取平板上新鲜转化的单菌落接种到 5 mL RCM 液体培养基 (10 mL 离心管) 中于 37 ℃、厌氧静置培养 10~12 h。然后将活化好的种子液以 2% 的接种体积分数转接到新鲜配制的虾壳粉发酵培养基,定时进行 OD<sub>600</sub> 的测定以及葡萄糖、发酵产物的测定,通过不同的虾壳粉培养基的生长情况,最终确定最优的虾壳粉培养基成分。

**1.2.2 酪丁酸梭菌在 2 L 发酵罐上的发酵培养** 将种子液按 5% 的接种体积分数接入 1 L 发酵培养基中 (2 L 发酵罐),在 37 ℃厌氧静置培养 60 h,定时进行取样、产物的测定以及葡萄糖消耗的测定。

**1.2.3 短链脂肪酸的测定** 发酵液中葡萄糖、乙酸和丁酸产量用 HPLC 检测。以 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液为流动相,流量 0.6 mL/min,柱温 65 ℃,色谱柱为 Aminex HPX-87H 离子柱 (美国 Bio-Rad, 9 mm×300 mm×7.8 mm)<sup>[18]</sup>。

**1.2.4 单细胞蛋白饲料的处理** 发酵液经 5 000 r/min 离心后收集沉淀,平摊于 100 mm×100 mm 玻璃培养皿中,用保鲜膜覆盖后于冷冻干燥机进行冻干处理,冻干后研磨至粉末备用。

**1.2.5 单细胞蛋白的营养成分测定** 单细胞蛋白饲料中的氮质量浓度测定采用凯氏定氮法,参考国

标 GB/T 6432—2018。具体步骤为:称取 0.4 g 硫酸铜、6 g 硫酸钾和 20 mL 硫酸加入样品。首先调节温度至 200 ℃炭化样品直到泡沫停止产生,随后调整温度到 450 ℃,加热至液体呈透明蓝绿色后稳定 1 h,待液体冷却后取下。加水加碱后蒸馏并用硼酸收集溢出的氨气,最后用强酸溶液标定,记录消耗的体积量并计算氮质量浓度<sup>[19]</sup>。

粗脂肪测定采用索氏提取法,参考国标 GB/T 6433—2006。具体步骤为:样品置于滤纸筒中记录总质量  $M_1$ ,干燥金属杯后记录质量  $M_0$ 。滤纸筒放入固定好的金属架,在金属杯中加入石油醚,将滤纸浸没,浸提 90 min。抬高金属架后使滤纸筒与石油醚分离,调整温度进行脂肪循环抽提,回流提取 4 h。回收提取液并蒸干金属杯中残余的石油醚,在 105 ℃下干燥 1 h,记录质量  $M_2$ <sup>[20]</sup>。

$$\omega(\text{粗脂肪}) = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100.$$

灰分的测定参考国标 GB/T 6438—2007。具体步骤为:称取样品于高温灼烧过的坩埚中,记录质量  $M_1$ 。随后将盛有样品的坩埚置于高温炉中加热,保持过程通气,直到样品完全炭化至无烟,立即转移至马弗炉中 550 ℃下灼烧约 6 h,直至样品完全灰化且无可见炭粒。随后置于干燥器中,待降温并干燥后记录质量  $M_2$ ,灰分质量  $M = M_1 - M_2$ 。

粗纤维测定参考国标 GB/T 6434—2006。具体步骤为:先准备一个滤袋,预先在 105 ℃下干燥 2 h,记录质量为  $M_0$ 。称量样品质量  $M_1$ ,将样品放置于滤袋中密封。先后用 0.13 mol/L 的硫酸溶液和 0.23 mol/L 的氢氧化钾溶液在微沸状态下消煮样品,每次消煮后用蒸馏水清洗至中性。随后将装有样品的滤袋浸没于石油醚脱脂 90 min,再在 105 ℃下干燥 4 h,冷却至室温后记录质量为  $M_2$ 。随后,参考灰分的测定方法将滤袋和装有样品的滤袋进行灼烧,分别记录灰分质量为  $M_4$  和  $M_3$ 。

$$\omega(\text{粗纤维}) = \frac{(M_1 - M_0) - ((M_3 - M_4))}{M_1} \times 100$$

氨基酸测定参考国标 GB/T 18246—2019,具体步骤为:称取的试样先在盐酸中水解,冷冻成固体后真空干燥 24 h。溶解后过滤到旋转蒸发器中,60 ℃下真空蒸发至恒质量。再加入 5 mL 柠檬酸钠缓冲溶液复溶,摇匀后离心,得到的上清液在氨基酸自动分析仪中测定<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 虾壳粉发酵培养基的优化

首先以 RCM 培养基为基础进行氮源替换(23 g/L 虾壳粉),考察菌株直接利用未处理的虾壳粉生长的情况。图 1 显示,在有机氮源(蛋白胨、酵母粉、牛肉粉)都替换成虾壳粉后,菌株可以直接生长,但是相较于替换前的培养基下降明显,最大 OD<sub>600</sub> 下降了 61%。这可能是由于未经处理的虾壳粉的氮源需要先经菌株分泌的蛋白酶进行处理,然后菌株才能利用,所以菌株生长受限,一直处于较低的 OD<sub>600</sub>。此外,由于 RCM 中的成分比较复杂,除离子外还有无水乙酸钠、可溶性淀粉等可能影响培养基中的碳氮比组成,从而导致菌株生长较差。

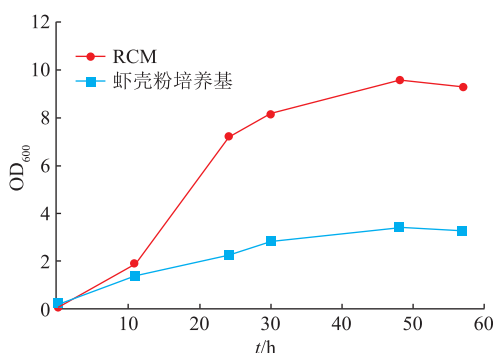


图 1 酪丁酸梭菌利用虾壳粉的生长性能

Fig. 1 Growth properties of *C. tyrobutyricum* using shrimp shell powder

针对上述的实验现象,作者选择了成分更为简单的 CGM 为培养基,用虾壳粉替换培养基中的蛋白胨、酵母膏、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行优化。在葡萄糖质量浓度不变(20 g/L)的情况下,改变虾壳粉的添加量(10、15、25、40 g/L),结果见图 2。当培养基中用 25 g/L 的虾壳粉替换原来氮源后,菌株生长最好,最大 OD<sub>600</sub> 能够达到 5.7,生长最差的是添加 40 g/L 的虾壳粉,原因可能是虾壳粉作为氮源,过高的质量浓度破坏了培养基碳氮比的平衡,同时虾壳粉是成分复杂的混合物,其中一些物质的高质量浓度积累可能阻碍了菌株对底物的利用或者对菌株细胞产生了毒害。因此后续实验以 CGM 培养基为基础,氮源替换为 25 g/L 虾壳粉的培养基来进行相关实验。

### 2.2 酪丁酸梭菌在虾壳粉发酵培养基中的发酵性能分析

由于酪丁酸梭菌是一种高产丁酸的菌株,丁酸

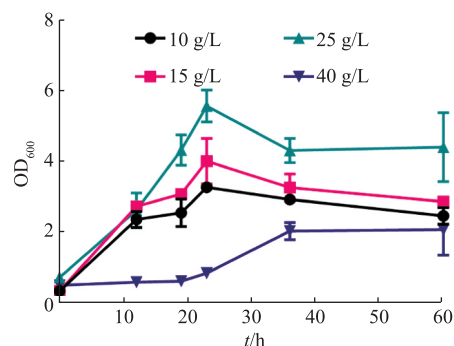


图 2 酪丁酸梭菌利用不同质量浓度虾壳粉的生长优化

Fig. 2 Optimization of *C. tyrobutyricum* growth using shrimp shell powder with different concentrations

又是一种被认为对动物肠道健康有着重要作用的益生元<sup>[11]</sup>,因此研究了在添加虾壳粉的培养基中菌株发酵生产短链脂肪酸的性能。采用 2 L 的发酵罐进行菌株发酵,以优化后的含有 25 g/L 的虾壳粉培养基作为发酵原料,发酵结果见图 3。葡萄糖(20 g/L)在 36 h 左右被耗尽,随后丁酸与乙酸的产量快速上升,分别达到 3.4 g/L 和 1.6 g/L,短链脂肪酸的得率达到 0.25 g/g。但是相较于 CGM 发酵培养基,丁酸的产量由 6.0 g/L 下降到 3.4 g/L,这与直接用虾壳粉培养基生长的最大 OD<sub>600</sub> 显著下降的结果相符合<sup>[18]</sup>。但是从葡萄糖消耗来看,在 40 h 内,20 g/L 的葡萄糖被完全消耗(0.5 g/(L·h)),这与用 CGM 培养基的情况相当,说明替换为虾壳粉后的菌株对葡萄糖的利用能力并没有下降,但是葡萄糖转为短链脂肪酸的得率由 0.35 g/g 显著下降到 0.25 g/g。分析可能是菌株在虾壳粉培养基中摄取的葡萄糖多用于蛋白酶的生产,通过蛋白酶水解虾壳粉获得氮源维持自身的生长,但是酶解的效率较低限制了代谢流向短链脂肪酸的生产。

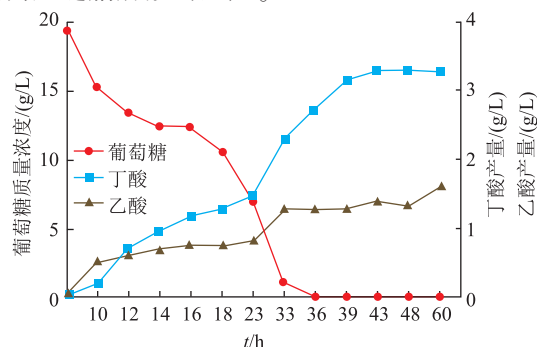


图 3 酪丁酸梭菌利用虾壳粉培养基的发酵性能

Fig. 3 Fermentation properties of *C. tyrobutyricum* using shrimp shell powder medium

### 2.3 单细胞蛋白饲料的营养成分测定

通过对酪丁酸梭菌利用虾壳粉发酵的性能研究,发现菌株可以直接利用废弃虾壳粉作为氮源生长,但是性能比使用商品化的氮源(如蛋白胨、酵母膏)下降明显,因此测定虾壳粉以及菌株发酵后的虾壳粉-酪丁酸梭菌混合饲料的主要组成成分,探究菌株利用廉价的虾壳粉做单细胞蛋白饲料的潜力,测定结果见表1。虾壳粉中的粗蛋白质量分数达到7.06%,高于一般的乳制品(6.38%)以及大豆蛋白制品(6.25%)<sup>[22]</sup>。此外,经酪丁酸梭菌发酵得到的混

合物氮质量分数提高到7.55%,粗脂肪、粗纤维质量分数也分别增加了117%和92%,同时灰分的质量分数降低了13%。此外,由于添加了酪丁酸梭菌,混合饲料中增加了短链脂肪酸,丁酸与乙酸的产量分别达到了3.45 g/L与1.68 g/L。其中,已经证实短链脂肪酸对动物肠道的健康起着重要的作用<sup>[23]</sup>,添加酪丁酸梭菌不仅能够提高饲料中的氮质量分数,同时又提供了供给肠道细胞能量的丁酸(盐),显著增加了单细胞蛋白饲料的营养价值。

表1 单细胞蛋白的成分

Table 1 Composition of single-cell proteins feed

| 饲料种类      | 氮质量分数/% | 粗脂肪质量分数/% | 粗纤维质量分数/% | 灰分质量分数/% | 乙酸产量/(g/L) | 丁酸产量/(g/L) |
|-----------|---------|-----------|-----------|----------|------------|------------|
| 虾壳粉       | 7.06    | 1.84      | 9.35      | 33.20    | —          | —          |
| 虾壳粉+酪丁酸梭菌 | 7.55    | 4.00      | 17.96     | 28.88    | 1.68       | 3.45       |

### 2.4 单细胞蛋白饲料的氨基酸质量分数测定

饲料中的氨基酸的添加不仅能为动物生长提供氮源,同时又平衡宿主需要的氨基酸,是评价单细胞蛋白饲料的重要营养指标<sup>[14]</sup>。作者研究了虾壳粉与酪丁酸发酵虾壳粉2种饲料的氨基酸测定,结果见表2~3。利用虾壳粉-酪丁酸梭菌生产的蛋白饲

料中含有必需氨基酸中的6种且其它氨基酸种类覆盖广泛,质量分数都在1%及以上(除蛋氨酸与半胱氨酸),与中国饲料数据库中推荐的质量分数相当。因此,本研究得到的蛋白饲料能够对动物机体内的氨基酸进行补充平衡。

表2 单细胞蛋白的必需氨基酸质量分数

Table 2 Mass ratio of essential amino acids in single-cell proteins

| 饲料种类      | 蛋氨酸质量分数/% | 苏氨酸质量分数/% | 缬氨酸质量分数/% | 亮氨酸质量分数/% | 异亮氨酸质量分数/% | 苯丙氨酸质量分数/% |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| 虾壳粉       | 0.7       | 1.3       | 1.4       | 2.0       | 1.2        | 1.4        |
| 虾壳粉+酪丁酸梭菌 | 0.8       | 1.5       | 1.6       | 2.3       | 1.5        | 1.7        |

表3 单细胞蛋白的非必需氨基酸质量分数

Table 3 Mass ratio of remaining amino acids in single-cell proteins

| 氨基酸种类      | 虾壳粉 | 虾壳粉+酪丁酸梭菌 | 氨基酸种类      | 虾壳粉 | 虾壳粉+酪丁酸梭菌 |
|------------|-----|-----------|------------|-----|-----------|
| 天冬氨酸质量分数/% | 3.0 | 3.4       | 半胱氨酸质量分数/% | 0.3 | 0.2       |
| 丝氨酸质量分数/%  | 1.4 | 1.5       | 酪氨酸质量分数/%  | 1.1 | 1.4       |
| 谷氨酸质量分数/%  | 4.0 | 4.2       | 组氨酸质量分数/%  | 3.5 | 6.3       |
| 脯氨酸质量分数/%  | 1.3 | 1.3       | 精氨酸质量分数/%  | 2.2 | 1.8       |
| 甘氨酸质量分数/%  | 1.9 | 1.5       | 赖氨酸质量分数/%  | 1.9 | 2.0       |
| 丙氨酸质量分数/%  | 1.7 | 1.7       |            |     |           |

## 3 结 语

作者以酪丁酸梭菌作为底盘细胞,利用废弃虾壳粉作为营养基底,通过优化虾壳粉的添加量实现了*Clostridium tyrobutyricum*利用未经前处理的废弃

虾壳粉生产单细胞蛋白,同时对单细胞蛋白的营养成分进行了评价。结果表明,酪丁酸梭菌利用废弃虾壳粉生产的单细胞蛋白在具有较高的粗蛋白的同时还有短链脂肪酸的营养补充,同时含有丰富的氨基酸种类,可以平衡动物机体的氨基酸摄取。这

种单细胞蛋白不仅营养丰富且益于肠道健康,具备 成为一种新型单细胞蛋白饲料的潜力。

## 参考文献:

- [1] BRATOSIN B C, DARJAN S, VODNAR D C. Single cell protein: a potential substitute in human and animal nutrition [J]. *Sustainability*, 2021, 13(16): 1-24.
- [2] 李兆丰, 孔昊存, 刘延峰, 等. 未来食品: 机遇与挑战[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(4): 1-13.
- [3] JONES S W, KARPOL A, FRIEDMAN S, et al. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 61: 189-197.
- [4] 孙付保, 陈晓旭, 陈晓萍, 等. 混合菌株固态发酵玉米皮生产饲料蛋白[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(6): 916-920.
- [5] CHAKRABORTY A, PAUL B N, BHATTACHARYYA D K, et al. Evaluation of fungal single cell protein as aqua feed on carcass analysis and growth performance of *Cirrhinus reba fingerlings* [J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(8): 3140-3153.
- [6] GERVASI T, PELLIZZERI V, CALABRESE G, et al. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Natural Product Research*, 2018, 32(6): 648-653.
- [7] MARCELLIN E, ANGENENT L T, NIELSEN L K, et al. Recycling carbon for sustainable protein production using gas fermentation [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 76: 102723.
- [8] LAPENA D, KOSA G, HANSEN L D, et al. Production and characterization of yeasts grown on media composed of spruce-derived sugars and protein hydrolysates from chicken by-products [J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 19-33.
- [9] LAPENA D, OLSEN P M, ARNTZEN M O, et al. Spruce sugars and poultry hydrolysate as growth medium in repeated fed-batch fermentation processes for production of yeast biomass [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(4): 723-736.
- [10] YANG Z, AMAL F E, YANG L, et al. Functional Characterization of *Clostridium tyrobutyricum* L319: A promising next-generation probiotic for short-chain fatty acid production [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13.
- [11] XIAO Z, LIU L, JIN Y, et al. *Clostridium tyrobutyricum* protects against LPS-induced colonic inflammation via IL-22 signaling in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 215.
- [12] OZYURT M, DEVECI U D. Conversion of agricultural and industrial wastes for single cell protein production and pollution potential reduction: A review [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2004, 13(8): 693-699.
- [13] VETHATHIRRI R S, SANTILLAN E, WUERTZ S. Microbial community-based protein production from wastewater for animal feed applications [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125723.
- [14] SALZE G P, TIBBETTS S M. Apparent digestibility coefficients of proximate nutrients and essential amino acids from a single-cell protein meal derived from *Methylobacterium extorquens* for pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(12): 6818-6823.
- [15] NOCENTINI M, PANETTIERI M, GARCIA DE CASTRO BARRAGAN J M, et al. Recycling pyrolyzed organic waste from plant nurseries, rice production and shrimp industry as peat substitute in potting substrates [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 277: 111436.
- [16] SUO Y, LUO S, ZHANG Y, et al. Enhanced butyric acid tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(8): 1145-1156.
- [17] SUO Y, FU H, REN M, et al. Enhanced butyric acid production in *Clostridium tyrobutyricum* by overexpression of rate-limiting enzymes in the Embden-Meyerhof-Parnas pathway [J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 272-273: 14-21.
- [18] LIU T, JIANG C, ZHU L, et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@chitosan microspheres coating as cytoprotective exoskeletons for the enhanced production of butyric acid with *Clostridium tyrobutyricum* under acid stress [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 449-462.
- [19] 喻东, 李先永, 梁丛丛, 等. 生物发酵雏鸡鸡粪生产饲料及其应用效果 [J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 37(6): 666-671.
- [20] ZHOU Y, CHEN Y, SHEN Y. Single cell protein-feed: Taking orange waste as raw material for fermentation [A]. *Proceedings of the International Conference on Advanced Materials and Energy Sustainability (AMES)* [C]. Wuhan: AMES, 2017.
- [21] 朱选, 曹俊明, 许丰孟, 等. 饲料中添加赖氨酸及蛋氨酸对罗非鱼生长的影响 [J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(4): 466-473.
- [22] CHIRWA E M, LEBITSO M T. Protein from preprocessed waste activated sludge as a nutritional supplement in chicken feed [J]. *Water Science & Technology*, 2014, 69(7): 1419-1425.
- [23] MEI F F, DUAN Z W, CHEN M X, et al. Effect of a high-collagen peptide diet on the gut microbiota and short-chain fatty acid metabolism [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 75: 104278.