

芽孢菌固态发酵降解豆粕工艺研究

陈济琛, 陈名洪, 蔡海松, 林新坚

(福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350013)

摘要:以工业副产物脱脂豆粕粉为原料,通过芽孢菌发酵将其水解得到大豆肽是对资源的有效利用。以水解度为指标,筛选到降解豆粕能力较强的芽孢菌4株,编号CHD12、CHD16、CHD21和CHD27;以大豆肽含量作为固态发酵产物的评价指标,从4株芽孢菌出发,得到适宜固态发酵降解豆粕的菌株组合(CHD16+CHD27);通过两个(L_93^4)正交试验对该组合的固态发酵工艺进行优化,结果为其产物的大豆肽含量达23.9%,比优化前所得产物的大豆肽含量(14.1%)提高69.5%,比未经发酵处理的培养基中大豆肽含量(4.14%)提高约4.8倍,大豆肽得率达60%。

关键词:发酵豆粕;水解度;菌株筛选;大豆肽含量;发酵条件优化

中图分类号:TQ936.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)05-0850-04

Solid-state Fermentation Conditions of the *Bacillus* Degrading Soybean Meal

CHEN Ji-chen, CHEN Ming-hong, CAI Hai-song, LIN Xin-jian

(The Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China)

Abstract: As industry by-product, Defatted soybean meal prepared for soybean peptide by *Bacillus* fermenting was one kind of effective utilization of resource. The index the degree of hydrolysis (DH) was used to screen strains, and 4 strains with greater activity of degrading soybean meal were yielded, numbered CHD12, CHD16, CHD21 and CHD27; The index content of soybean peptide was used to evaluate the product of fermentation, and the combination strains (CHD16 + CHD27), which were suitable for degradation of soybean meal through solid-state fermentation, were selected from the 4 *Bacillus* strains; The fermentation process was optimized through two orthogonal tests of (L_93^4) and the results were that the content of soybean peptide in the product was 23.9%, which was 69.5% more than that in the product under the process before optimized (14.1%), and 4.8 times more than that in the medium before fermented (4.14%), and the peptide recovery ratio was 60%.

Key words: Fermented soybean meal; DH (degree of hydrolysis); Screening strain; Content of soybean peptide; Optimization of fermentation conditions

豆粕为大豆榨油的副产物,蛋白质含量丰富,氨基酸分布合理,是动物日粮中常用的植物性蛋白饲料^[1]。限制动物对植物蛋白利用的主要因素有营养价值以及抗营养因子。豆粕经发酵处理后不仅可以提高豆粕的营养价值,而且可以去除或降低豆粕中抗营养因子^[2]。Hoffmann^[3]利用细菌发酵豆粕,试验发现豆粕中胰蛋白酶抑制因子得到降解和失活;陈斌^[4]利用细菌发酵豆粕,发现豆粕营养价值以及蛋白消化率显著提高。为了进一步改善豆粕的营养功能和加工特性,提高豆粕蛋白的附加价值,大豆肽的开发研究已成为发酵豆粕行业中热门课题^[5]。大豆肽克服了大豆蛋白质在营养学上的弱

点,是大豆蛋白最佳营养模式^[6]。

国内外在发酵豆粕生产新产品方面有一定进展,利用微生物固态发酵豆粕生产大豆肽的研究国内更是鲜见报道。研究经过初筛和复筛,获得适宜水解豆粕的芽孢菌组合;利用该芽孢菌组合进行固态发酵制备大豆肽,最终生产出具有多种功能优质的豆粕蛋白饲料。这对生产和研发优质植物蛋白饲料具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 试验菌种 芽孢菌由福建省农业科学院土

收稿日期:2008-05-21

基金项目:福建省科技重点资助项目(200610009)。

作者简介:陈济琛(1964-),男,研究员,从事农业微生物与食用菌研究。E-mail:chenjichen2001@163.com。

通讯作者:林新坚,研究员。E-mail:xinjianlin@163.com。

壤肥料研究所微生物室分离筛选并保存。

1.1.2 原料 豆粕由福建华龙饲料有限公司提供,成分为 C% 32.14%, N% 48.13%。

1.2 主要仪器和试剂

紫外可见分光光度计(UV-2800AH 型,尤尼柯仪器有限公司);凯氏定氮仪(KDN-2C 型,上海纤检仪器有限公司);水合茚三酮试剂:取 0.6 g 茚三酮置于烧杯中,加 15 mL 正丙醇,令其溶解,再加 30 mL 正丁醇,60 mL 乙二醇,最后加入 9 mL pH5.4, 0.2 mol·L⁻¹的醋酸盐缓冲液。

1.3 培养基

1.3.1 液体种子培养基(g·1000 mL⁻¹蒸馏水)

牛肉膏 5 g, 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, pH7.0^[7]。

1.3.2 芽孢菌初筛培养基(g·100 mL⁻¹蒸馏水)

豆粕 10 g, NaCl 0.5 g, pH 自然, 121℃ 灭菌 20 min^[8]。

1.3.3 芽孢菌复筛培养基 豆粕 10 g, 麸皮 5 g, 蔗糖 0.3 g, 拌料水 10.5 mL, pH 自然, 121℃ 灭菌 20 min 该培养基也作为固态发酵基础培养基^[9]。

1.4 试验方法

1.4.1 固态发酵降解豆粕菌株筛选 从高产蛋白酶的菌株中初筛得到对豆粕蛋白水解度较高的菌株,通过菌株搭配获得适宜固态发酵降解豆粕的发酵菌株组合。

初筛:采用水解度(DH%)作评价指标筛选菌株^[10]。将保存的菌株经斜面活化 18 h 后刮取一菌环接入 100 mL 液体种子培养基,在温度 40℃,摇床转速 200 r·min⁻¹条件下培养 24 h,分别吸取 1 mL 种子培养液,接种于 100 mL 初筛培养基,在温度 40℃,摇床转速 120 r·min⁻¹条件下发酵,分别于 24 h 和 48 h 测定发酵液水解度。水解度是水解程度的表示方法,通常定义为被水解的肽键数占原料中总肽键数的百分比。其测定方法参考文献^[11]。

复筛:采用大豆肽含量作评价指标筛选菌株^[12-13]。将初筛获得的菌株经斜面活化 18 h 后刮取一菌环接入 100 mL 液体种子培养基,在温度 40℃,摇床转速 200 r·min⁻¹条件下培养 22 h 后,以 8% 接种量(即 2 mL 种子液;若两菌混合,各取 1 mL)接入复筛培养基,在 40℃ 培养箱中发酵 48 h,测定产物中大豆肽含量。

1.4.2 固态混合发酵工艺优化 将所选菌种组合中的菌株经液体种子培养基活化 22 h 后以 8% 的接

种量接入固态发酵基础培养基,以发酵产物的大豆肽含量作评价指标,采用两个 L₉(3⁴) 正交表分别对发酵条件(包括灭菌时间、培养方式、温度和时间)和发酵培养基成分(包括原料豆粕与麸皮比例、拌料水含量、蔗糖的添加量和培养基 pH)进行优化,确定固态混合发酵降解豆粕的最佳工艺。

1.4.3 大豆肽含量测定 发酵产物前处理^[14]:发酵产物取出,100℃ 烘干 2 h,粉碎并过 40 目筛,取 5 g,置 100 mL 容量瓶,加 70 mL 的蒸馏水,摇匀后定容至 100 mL,于振荡器上振荡 3 h,加 10 mL 三氯醋酸(15%)溶液,定容 50 mL,摇匀,静置 3 min,用滤纸过滤。

发酵产物中酸溶性蛋白质含量的测定用凯氏定氮法^[15];游离氨基酸含量的测定采用茚三酮显色法^[16];大豆肽含量测定:酸溶性蛋白质含量减游离氨基酸含量即为大豆肽含量^[12]。

2 结果与分析

2.1 降解豆粕菌株筛选

2.1.1 初筛 将保存的 8 株高产蛋白酶菌株 CHD12、CHD14、CHD16、CHD17、CHD20、CHD21、CHD27 和 CHD30 进行初筛,结果见图 1。水解豆粕的表现较好的菌株有 CHD27、CHD21、CHD16、CHD12。发酵 24 h 后其水解度都达到 12% 以上,并且在发酵 48 h 后水解度也都达到 35% 左右,这说明它们产酶多而且快,并能较好地水解豆粕。

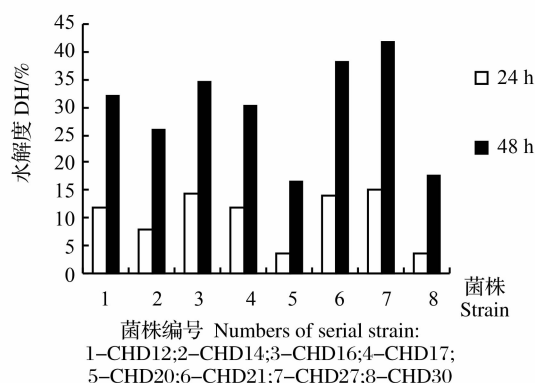


图1 芽孢菌在初筛培养基上水解情况

Fig. 1 Hydrolysis conditions of the bacillus strains on primary screening medium

2.1.2 复筛 将初筛得到的 4 株菌株 CHD12、CHD16、CHD21 和 CHD27,通过两两组合得到 6 个处理,加上 4 个单菌处理,共设 10 个发酵菌株处理进行复筛试验。结果见图 2。处理 9 发酵效果最

好,其大豆肽含量最高,酸溶性蛋白含量也最高;而且比组合中的对照菌株单独发酵(即处理2和处理4)的发酵效果都好。因此选择处理9组合来混合发酵降解豆粕。

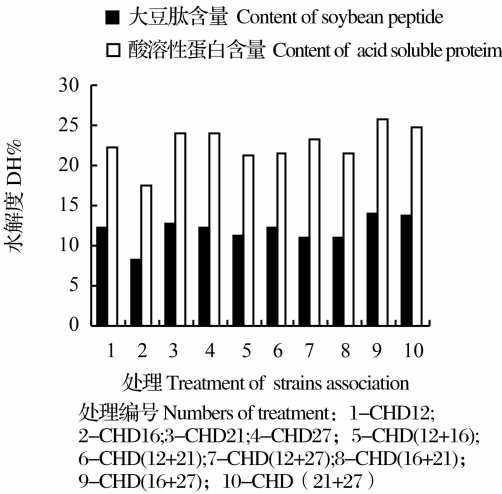


图2 各发酵菌株处理在复筛培养基上发酵产物的大豆肽含量

Fig. 2 Content of soybean peptide in the product of strains-treatments fermenting on minute screening medium

2.2 固态发酵工艺优化

2.2.1 发酵条件优化 $L_9(3^4)$ 发酵条件正交试验设计,见表1。结果见表2,最优方案为 $A_3C_1D_3B_1$ 。其中培养时间(D)对结果影响较小,考虑到发酵周期对生产成本的影响,培养时间(D)宜选第二水平,也就是发酵48 h。最终确定的方案为 $A_3C_1D_2B_1$,结果证明该方案所得产物的实际大豆肽含量达25.02%,比正交试验设置中最好的处理 $A_3B_2C_1D_3$ (大豆肽含量达24.46%)还好,达到了优化的目的。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平 Level	因素 Factors			
	灭菌时间 A	培养方式 B	培养温度 C	培养时间 D
	Sterilization time/min	Culture method	Culture temperation/℃	Culture time/d
1	0	纱布(4层)	30	1
		封口(GB)		
2	10	牛皮纸封口(KB)	35	2
3	20	前1/2时间纱布,	40	3
		后1/2牛皮纸(FB)		

2.2.2 发酵培养优化 菌株CHD16和CHD27经液体发酵21 h后,分别(各1 mL)接入发酵培养基进行发酵,正交试验设计见表3。发酵结果见表4。由表可知,正交试验得到的最优方案为 $A_3D_2B_3C_2$,

经证明该方案所得产物的实际大豆肽含量23.9%,比正交试验设置中的最好处理 $A_3B_3C_2D_1$ 的大豆肽含量(23.1%)高。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计和结果分析

Table 2 $L_9(3^4)$ Orthogonal experimental design and results analysis					
编号 No.	(A) 灭菌时间 Sterilization time	(B) 培养方式 Culture method	(C) 培养温度 Culture temperation	(D) 培养时间 Culture time	大豆肽含量 Content of soybean peptide/%
1	1	1	1	1	16.85
2	1	2	2	2	16.22
3	1	3	3	3	16.29
4	2	1	2	3	23.02
5	2	2	3	1	19.65
6	2	3	1	2	22.84
7	3	1	3	2	22.4
8	3	2	1	3	24.46
9	3	3	2	1	19.21
K_1	49.36	62.27	70.15	55.71	T = 237.5
K_2	65.51	60.33	64.45	61.46	
K_3	66.07	58.34	58.34	63.77	
R	5.57	1.31	3.93	2.69	

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Table 3 Table of orthogonal test including 4 factors and 3 levels				
水平 Level	因素 Factors			
	(A) 豆粕:麸皮 Ratio of soybean meal and wheat bran meal	(B) 蔗糖浓度 Content of sucrose	(C) 料水比 Ratio of raw material and H ₂ O	(D) pH
1	1:1	1%	1:0.5	6
2	2:1	2%	1:0.6	7
3	4:1	3%	1:0.7	8

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计和结果分析

Table 4 $L_9(3^4)$ Orthogonal experimental design and results analysis					
试验号 No.	(A) 豆粕:麸皮 Ratio of soybean meal and wheat bran meal	(B) 蔗糖浓度 Content of sucrose	(C) 料水比 Ratio of raw material and H ₂ O	(D) pH	大豆肽含量 Content of soybean peptide/%
1	1	1	1	1	17.4
2	1	2	2	2	19.6
3	1	3	3	3	18.2
4	2	1	2	3	20.9
5	2	2	3	1	21.2
6	2	3	1	2	22.2
7	3	1	3	2	22.8
8	3	2	1	3	21.9
9	3	3	2	1	23.1
K_1	55.2	61.1	61.5	61.7	T = 239.5
K_2	64.3	62.7	63.6	64.6	
K_3	67.8	63.5	62.2	61	
R	4.2	0.8	0.7	1.2	

3 结论与讨论

以水解度为指标,筛选得到降解豆粕能力较强的4株芽孢菌株CHD12、CHD16、CHD21和CHD27;以大豆肽含量为指标,从4株芽孢菌组合中得到适宜于固态发酵降解豆粕的菌株组合(CHD16+CHD27)。

通过两个(L_93^4)正交试验对该发酵菌株组合固态发酵工艺优化,结果为:豆粕12 g,麸皮3 g,水9 mL,蔗糖0.45 g,pH自然,灭菌时间20 min,培养温度30℃,发酵时间48 h。其产物的大豆肽含量达23.9%,比优化前发酵所得产物的大豆肽含量(14.1%)提高69.5%,比未经发酵处理的豆粕大豆肽含量(4.14%)提高约4.8倍,大豆肽得率达60%。

通过微生物发酵工艺来提高豆粕的饲用价值,正在引起更多的关注。从众多微生物菌种中筛选发酵菌株是该工艺出发点,却鲜见报道。合理的发酵菌株筛选模式的建立具有重要意义,而筛选指标的考量是关键步骤。随着发酵时间延长水解度变化呈接近线性上升趋势^[17]。测定两点(24 h和48 h)的水解度可以反映各菌株在发酵48 h过程中对豆粕的水解情况,因此水解度指标能较好反映菌株降解豆粕的能力^[18]。蛋白质水解度的其中一种测定方法是在水解液中加入三氯乙酸溶液使大分子蛋白质沉淀,而小分子的酸溶性蛋白量占水解液总蛋白量的百分比就是该酶解液的水解度^[19]。因此水解度与酸溶性蛋白含量之间有正相关性。而大豆肽含量等于水解液中酸溶性蛋白含量再减去游离氨基酸含量,因此大豆肽含量指标与水解度指标存在联系,并进一步反映水解液中小分子大豆肽的含量。大豆肽含量也是大豆肽粉行业标准中评价大豆肽粉产品质量的指标,因此可以选定大豆肽含量作为发酵菌株的复筛指标及其发酵工艺优化过程的产物评价指标。

参考文献

- [1] 王春林,陈喜斌,余炎湖,等.大豆抗营养因子及其处理方法[J].饲料工业,2003,21(9):12-14. (Wang C L, Chen X B, Yu Y H, et al. The anti-nutritional factors in soybean and the their processing methods[J]. Feed Industry, 2003, 21(9): 12-14.)
- [2] 张璐,李静,申屠基康,等.限制水生动物对植物蛋白利用的原因及对策[J].渔业现代,2004(3):41-43. (Zhang L, Li J, Shentu J K, et al. Causes of aquatic animals restrictions on the use of

plant protein and their countermeasures[J]. Fishery Modernization, 2004(3):41-43.)

- [3] Hoffmann E, Stephan M, Klaus B. The fermentation of soybean meal by rumen microbes in vitro reveals different kinetic features for the inactivation and degradation of trypsin inhibitor protein[J]. Animal Feed Science Technology, 2003, 106:189-197.
- [4] 陈斌.微生物发酵对豆粕中抗营养因子及营养价值的影响[D].杭州:浙江大学,2004. (Chen B. The impact of microbial fermentation on the anti-nutritional factors and nutritional value of soybean meal[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.)
- [5] 刘大川,钟方旭.大豆肽的功能特性研究[J].中国油脂,1998,23(3):10-14. (Liu D C, Zhong F X. Study on functional properties of soybean peptides[J]. China Oils and Fats, 1998, 23(3): 10-14.)
- [6] 邓勇,刘文亮.我国软饮料的发展趋势[J].中国农业大学学报,1996,1(4):102-105. (Deng Y, Liu W L. Trends of development of beverage in China[J]. Journal of China Agricultural University, 1996, 1(4):102-105.)
- [7] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994:170-171. (Zhu G J, Wang Z X. Technical manual of industrial microbiology experiment[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1994:170-171.)
- [8] 邵伟,熊泽,何晓文.发酵大豆多肽及其功能研究[J].中国酿造,2006(6):23-25. (Shao W, Xiong Z, He X W. Study on fermented soybean polypeptide and its function[J]. China Brewing, 2006(6):23-25.)
- [9] 蔡皓,余晓斌.多菌种发酵生物活性蛋白饲料的发酵研究[J].粮食与饲料工业,2000(6):32-36. (Cai H, Yu X B. Studies on bioactive protein feed stuff fermented by manifold strains[J]. Cereal and Feed Industry, 2000(6):32-36.)
- [10] 于长青,赵学明,姚琨,等.高产蛋白酶芽孢杆菌的选育及其在大豆活性肽制备中应用[J].中国农业大学学报,2005,10(1):34-37. (Yu C Q, Zhao X M, Yao K, et al. Mutagenesis of high yield protease spore-forming and its application in soy-peptide preparation[J]. Journal of China Agricultural University, 2005, 10(1):34-37.)
- [11] 余勃,陆兆新.微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J].食品科学,2005,26(4):104-107. (Yu B, Lu Z X. Determination of degree of hydrolysis of soybean peptides produced by microorganism fermentation[J]. Food Science, 2005, 26(4): 104-107.)
- [12] QB/T 2653-2004. 中华人民共和国轻工业行业标准[S].北京:中华人民共和国国家标准,2005:70-72. (QB/T 2653-2004. Light industry standards of the People's Republic of China[S]. Beijing: National Standards of the People's Republic of China, 2005:70-72.)
- [13] 李小东,陈朝晖,寇裕民,等.大豆蛋白肽的测定方法[J].大豆通报,2004(1):25. (Li X D, Chen C H, Kou Y M, et al. Determination method of soybean peptide[J]. Soybean Bulletin, 2004(1):25.)

以看出,各蛋白的主要峰均为4个,分别在5.91、10.50、12.00和12.60 min处,根据标准蛋白分子量分布曲线,可以推知它们的相对分子质量大于6 700 000,39 000,5 000和2 000。在5.91 min处为粒径较大的聚集体部分,未加氨处理时含量为0.38%,随着加氨量的增加聚集体的含量也是逐渐增加至70.9%。其余的3个峰为7S和11S的亚基和多肽链。未加氨的蛋白几乎都是亚基和多肽链。随着加氨量的增加,亚基等其它组分的绝对含量下降。

3 结论

大豆蛋白的功能性是指在食品加工、制取、配制、烹调、贮藏及销售过程中所表现出来的理化性质的总称。采用氨处理醇法大豆浓缩蛋白可以提高其溶解性、凝胶性、乳化性等功能性指标。氨处理对大豆浓缩蛋白的表面疏水性和分子量分布有影响,大豆蛋白的表面疏水性指数,随着加氨量的增加而增加,大豆蛋白中的聚集体随着加氨量的增加而增加,氨处理对巯基和二硫键影响不大。

参考文献

- [1] 张梅,周瑞宝,马智刚. 功能性大豆浓缩蛋白性能测定及应用研究[J]. 粮食与油脂,2004(4):21-23. (Zhang M, Zhou R B, Ma Z G. Properties and application of functional soy protein concentrate[J]. Cereals and Oils,2004(4):21-23.)
- [2] 张梅,周瑞宝,米宏伟,等. 醇法大豆浓缩蛋白物理改性研究[J]. 粮食与油脂,2003(8):3-5. (Zhang M, Zhou R B, Mi H W, et al. Physical modification of alcohol leaching soy protein concentrate[J]. Cereals and Oils,2003(8):3-5.)

(上接第853页)

- [14] 罗钦,陈人弼,宋永康. 鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法[J]. 福建农业学报,2005,20(4):285-288. (Luo Q, Chen R B, Song Y k. Determination method of oligopeptides and free amino acids in fish meal[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2005,20(4):285-288.)
- [15] GB/T6432-1994. 饲料工业标准汇编[S]. 北京:中华人民共和国国家标准,2002:70-72. (GB/T6432-1994. Feed industry standards compilation[S]. Beijing:National Standards of the People's Republic of China, 2002:70-72.)
- [16] 王文平. 植物样品中游离氨基酸总量测定方法的改进[J]. 北京农学院学报,1998,13(3):10-13. (Wang W P. Improving the method for determining the total dissociative amino acid in fresh plant tissue[J]. Journal of Beijing Agricultural College,1998,13

- [3] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000. (Wang J Z, Fan M. Protein technical manuals[M]. Beijing: Science Press,2000.)
- [4] 王洪晶. 脂肪氧合酶对大豆分离蛋白凝胶性质影响研究[D]. 无锡:江南大学食品学院,2006. (Wang H J. Study on enzymatic properties and inhibition mechanism of lipoxygenase[D]. School of Food Science and Technology, Jiangnan University,2006.)
- [5] 华欲飞,Steve W Cui, Qi Wang,等. 不同大豆分离蛋白凝胶的流变学性质[J]. 中国粮油学报,2003,18(6):43-48. (Hua Y F, Steve W Cui, Qi Wang, et al. Rheological properties of different soy protein isolate gels[J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2003,18(6):43-48.)
- [6] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,1959,82:70-77.
- [7] Boatright W L, Hettiarachchy N S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society,1995,72(12):1439-1444.
- [8] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal of Food Science,1974,39:49-51.
- [9] 江志伟,沈蓓英,潘秋琴. 蛋白质加工技术[M]. 北京:化工工业出版社,2002. (Jiang Z W, Shen P Y, Pan Q Q. Protein process technology[M]. Beijing:Chemical Publishing Company,2002.)
- [10] 孟橘,石姗姗,张骊. 醇法大豆浓缩蛋白改性工艺条件的研究[J]. 中国油脂,2006,31(11):73. (Meng J, Shi S S, Zhang L. Study on modification technics condition[J]. China Oils,2006,31(11):73.)
- [11] 王金胜. 基础生物化学[M]. 北京:中国林业出版社,2003:47-49. (Wang J S. Basical biochemistry[M]. Beijing:China Forestry Publishing Company,2003:47-49.)
- [12] 王洪晶,华欲飞. 大豆分离蛋白凝胶研究进展[J]. 粮食与油脂,2005(2):3-5. (Wang H J, Hua Y F. Research advance in soybean protein isolate gel[J]. Cereals and Oils,2005(2):3-5.)

(3):10-13.)

- [17] 万琦,陆兆新,吕凤霞,等. 枯草芽孢杆菌生产大豆多肽溶液的加工功能特性研究[J]. 食品科学,2003,24(11):99-102. (Wan Y, Lu Z X, Lü F X, et al. Functional properties of soybean peptide solution produced by bacillus subtilis[J]. Food Science, 2003,24(11):99-102.)
- [18] 刘唤明,邓楚津. 发酵法生产大豆肽的研究[J]. 饲料工业,2006,27(19):4-5. (Liu H M, Deng C J. Studies on soybean peptides produced by microorganism fermentation[J]. Feed Industry, 2006,27(19):4-5.)
- [19] 万琦. 微生物法生产脱苦大豆功能性多肽的研究[D]. 南京:南京农业大学,2003. (Wan Q. Studies on the functional debittering soybean peptide produced by microorganization fermentation[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2003.)