

固态发酵高温豆粕制备多肽饲料的最优发酵工艺条件研究

刘晓艳¹, 于纯淼¹, 国立东¹, 杨国力², 杨庆余²

(1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以高温豆粕为原料,研究了枯草芽孢杆菌固态发酵法制备多肽饲料的最优发酵工艺。首先对影响固态发酵多肽得率的培养基组成进行了研究,采用正交试验确定了最佳的固态发酵培养基为:豆麸比2:1,加水量110%,加蜜量4%。然后对影响固态发酵中多肽得率的发酵工艺参数进行了研究,采用响应面分析法(RSA)确定最佳发酵工艺条件为:接种量15%,发酵温度32℃,发酵时间73 h,在此条件下多肽得率为46.29%。

关键词:高温豆粕;多肽;枯草芽孢杆菌;固态发酵

中图分类号:TS201

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)02-0285-05

Optimization on Solid State Fermentation Conditions of Producing Polypeptide Feed from High-temperature Soybean Meal

LIU Xiao-yan¹, YU Chun-miao¹, GUO Li-dong¹, YANG Guo-li², YANG Qing-yu²

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150030; 2. Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, College of Food Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: The optimal solid state fermentation conditions of polypeptide production feed with *Bacillus subtilis* from high-temperature soybean meal were studied in this paper. The effects of medium composition on the yield of polypeptide were studied respectively. The orthogonal experiment was designed to obtain optimal fermentation medium, which were soybean meal:wheat meal 2:1, adding 110% water and 4% molasses. The effects of fermentation factors on the yield of polypeptide were studied, respectively. The optimal solid state fermentation conditions obtained from response surface methodology were inoculated with 15% of *Bacillus subtilis* and fermented at 34℃ for 72 h, the production rate of soybean polypeptides could reach 46.29%.

Key words: High-temperature soybean meal; Polypeptide; *Bacillus subtilis*; Solid-state fermentation

高温变性豆粕是大豆提油后经高温脱溶后得到的产品,其蛋白质含量约占40%~45%,但是经过高温处理后,蛋白质变性严重,很难食用。豆粕是目前畜牧养殖业使用量很大的一种优质蛋白源。大豆多肽是经过蛋白酶水解处理后得到的由3~6个氨基酸组成的小分子肽,其分子量一般为1 000 Da。大豆多肽具有溶解度好、粘度低、能抑制蛋白质凝胶和促进微生物发酵、降低血脂、抗疲劳,与蛋白质相比更容易消化吸收的理化特性及功能特性^[1-3]。多肽饲料是通过化学或生物方法将本来不适合动物利用的蛋白原料分解,制成的含有大量多肽的饲料产品。目前,生产多肽饲料的方法主要有酸解法、酶解法、微生物发酵法。酸解法通过强酸、强碱的作用分解大分子蛋白为小分子肽,由于强酸强碱具有腐蚀性,该法会带来大量的污染;酶解法利用酶定向分解的特性将大分子蛋白分解为小分子肽,但酶解法生产的多肽苦味较重,适口性差^[4-6];微生

物发酵法是利用微生物的生化反应将蛋白转化为肽。目前,饲用小肽主要采用微生物发酵法和酶解法进行生产,从本质上讲,微生物发酵法和酶解法生产饲用小肽都是通过蛋白酶的酶解内剪切作用而产生的。微生物发酵法生产小肽是利用米曲霉、乳酸菌、芽孢杆菌等能分泌蛋白酶的菌种,让所有菌种分泌的蛋白酶在微环境下酶解蛋白质产生小肽蛋白,其肽产物的分子量分布大多在3 000 Da以上,分子量较大,属于多肽范畴,产品中的肽含量和可溶物含量也有一定的限制,其产品中的小肽以营养性小肽为主^[7]。目前,微生物发酵法豆粕饲料的文献在国内报道较多。刘超等^[8]以米曲霉菌和酵母菌为出发菌株,通过培养基的优化和混合固态发酵工艺的研究,获得一条富含小肽的新型蛋白饲料生产工艺。莫重文等^[9]采用米曲霉(A3.042)和啤酒酵母混合菌株固态发酵法生产发酵豆粕,优化发酵条件后,发酵豆粕中粗蛋白含量可达49.10%,

收稿日期:2011-03-02

基金项目:黑龙江省科技攻关资助项目(GB08B401-03)。

第一作者简介:刘晓艳(1962-),女,副教授,从事农产品深加工研究。E-mail: liuxy1031@126.com。

比原料中增加 12.1%。王金斌等^[10]对影响混菌种发酵豆粕生产高蛋白饲料的发酵条件进行了研究,结果基质粗蛋白由 31.75% 上升到 49.27%,粗蛋白增加率为 55.18%。戚伟等^[11]利用枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母菌混合发酵生产富肽蛋白饲料,使得酸可溶性氮含量达到 33.61%。但以高温豆粕为主要原料,添加糖蜜,采用枯草芽孢杆菌为菌种固态发酵豆粕制备多肽饲料的研究鲜有报道。

该文以高温豆粕为主要原料,添加麸皮和糖蜜,采用枯草芽孢杆菌为固态发酵菌种,以多肽得率为检测指标,优化固态发酵豆粕制备多肽饲料的发酵工艺条件。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂 高温豆粕:齐齐哈尔大明油脂厂;小麦麸皮:市购;结晶葡萄糖蜜:嘉吉生化有限公司;其它试剂均为化学分析纯。

1.1.2 主要仪器 722S 可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;隔水式恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂;DSX-280A 型不锈钢手提式灭菌器:上海申安医疗器械厂;SVS-1300 型净化工作台:上海跃进医疗器械厂;LG10-2.4 型高速离心机:北京医用离心机厂。

1.1.3 菌种 枯草芽孢杆菌:实验室保存。

1.1.4 培养基 斜面培养基: NaNO_3 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Na_2HPO_4 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 9.0、豆粕粉(60 目) $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、20 g 琼脂。

液体种子培养基: NaNO_3 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Na_2HPO_4 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 9.0、豆粕粉(60 目) $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 固态发酵培养基的优化 按一定比例称取 20 g 原料(豆粕和麸皮)装入 250 mL 三角瓶中,并调整其含水率,在 121°C , 20 min 灭菌后取出,使其自然冷却,当温度降至 30°C 左右时,接入制备好的液体种子,于恒温培养箱中培养。

首先分别对影响多肽得率的加蜜量、豆麸比和加水量 3 个因素进行单因素试验,在单因素试验的基础上,对影响多肽得率的主要因素进行 $L_9(3^3)$ 正交试验,以确定最佳的固态发酵培养基。

1.2.2 固态发酵条件的优化 在固态发酵培养基优化试验的基础上,按一定比例称取 20 g 原料(豆粕和麸皮)装入 250 mL 三角瓶中,并调整其含水率,在 121°C , 20 min 灭菌后取出,使其自然冷却,当温度降至 30°C 左右时,接入制备好的液体种子,于

恒温培养箱中培养。首先分别对影响多肽得率的接种量、发酵时间和发酵温度进行单因素试验,在单因素的基础上,采用响应面分析法对上述 3 个因素进行研究,考察各因素及其相互作用对多肽得率的影响,并确定最佳发酵条件。

1.3 检测方法

1.3.1 发酵产物水提液制备 称取发酵后的样品 5.0 g(精确至 0.0001 g),加入蒸馏水 200 mL,在 25°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下水浴振荡 2 h,然后,于 25°C 、 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,过滤,滤液加入 3 倍体积的三氯乙酸,静置 30 min,于 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的离心机中离心 20 min,得到的上清液即为发酵产物水提液。

1.3.2 多肽含量测定 采用三氯乙酸可溶性氮(Trichloroacetic Acid Nitrogen Solubility Index, TCANSI)含量来反映多肽含量。

1.3.3 多肽得率计算 多肽得率(%) = 样品中多肽含量/样品中蛋白质含量 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 最佳发酵培养基的确定

2.1.1 加蜜量对多肽得率的影响 接入 10% 的菌种,按照 6:1 的比例加入豆粕和麸皮,添加 120% (相对于干基)的水,分别加入 0.2%、4%、6% 的糖蜜,在 37°C 的恒温培养箱培养 72 h。结果见图 1。

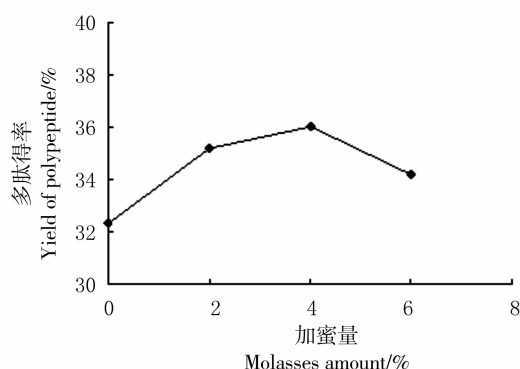


图 1 加蜜量对多肽得率的影响

Fig. 1 Effect of molasses addition on yield of soybean polypeptide

由图 1 可知,随着加蜜量的增加,多肽得率先增加后降低的趋势,当加蜜量达到 4% 时,多肽得率最大。表明加蜜量在 4% 时,枯草芽孢杆菌产蛋白酶最高,对培养基中的蛋白质利用率最高,糖蜜量过多或过少,都会影响多肽的产量。

2.1.2 豆麸比对多肽得率的影响 接入 10% 的菌种,分别按照 2:1、4:1、6:1、8:1 的比例加入豆粕和麸皮,添加 120% (相对于干基)的水,加入 4% 的糖蜜,在 37°C 的恒温培养箱培养 72 h。结果见图 2。

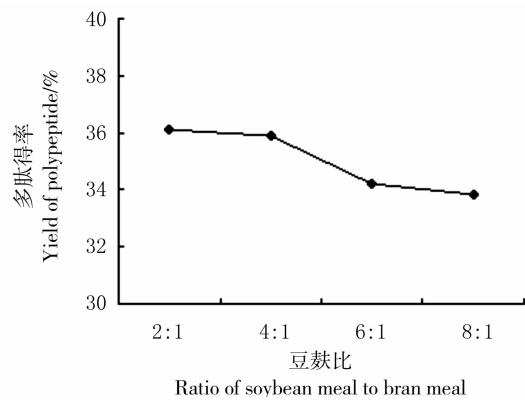


图2 豆麸比对多肽得率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of soybean meal and wheat bran meal on yield of soybean polypeptide

由图2可知,随着豆麸比的增加,多肽得率呈逐渐下降的趋势,当豆麸比在2:1时,多肽得率最大。表明豆麸比过大可能会影响多肽的产量,因为培养基中麸皮减少,通风透气不良,对于枯草芽孢杆菌的生长产生严重影响,蛋白酶量减少,进而影响多肽得率。

2.1.3 加水量对多肽得率的影响 接入10%的菌种,按照6:1的比例加入豆粕和麸皮,分别添加90%、100%、110%、120%、140%(相对于干基)的水,加入4%的糖蜜,在37℃恒温培养箱培养72 h。结果见图3。

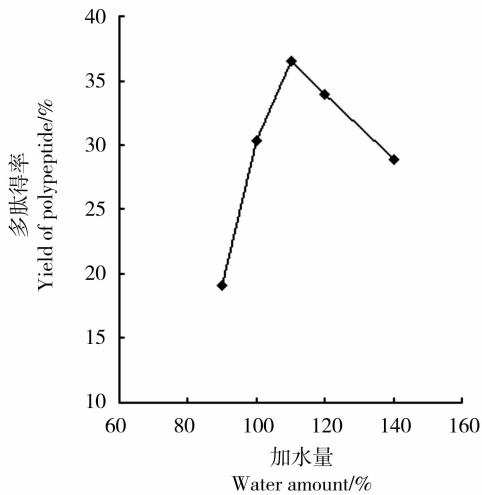


图3 加水量对多肽得率的影响

Fig. 3 Effect of water addition on yield of soybean polypeptide

由图3可知,随着加水量的增大,多肽得率呈先升高后降低的趋势,当加水量达到110%时,多肽得率最大。表明培养基中水分过少,会严重影响枯草芽孢杆菌的生长,进而影响多肽得率;培养基中水分过多,会造成培养基成团,严重影响培养基的通风效果,最终影响枯草芽孢杆菌的生长。

2.1.4 正交试验优化最佳发酵培养基 在以上单

因素试验的基础上,对影响多肽得率的培养基组成的3个主要因素(豆麸比、加水量、加蜜量)进行 $L_9(3^3)$ 正交试验,设计水平因素及结果见表1、表2。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test			
水平 Levels	因素 Factors		
	加蜜量 A Molasses addition/%	加水量 B Water addition /%	豆麸比 C Ratio of soybean meal and wheat bran meal
1	2	110	2:1
2	4	120	4:1
3	6	130	6:1

表2 正交试验结果分析

Table 2 Orthogonal experimental design and results				
试验号 No.	A	B	C	多肽得率 Yield of soybean polypeptide/%
1	1	1	1	32.48
2	1	2	2	27.62
3	1	3	3	25.19
4	2	1	2	32.47
5	2	2	3	28.31
6	2	3	1	38.02
7	3	1	3	33.65
8	3	2	1	37.27
9	3	3	2	27.79
K ₁	28.54	32.87	35.92	
K ₂	32.93	31.07	29.29	
K ₃	32.90	30.33	29.05	
R	4.39	2.54	6.87	

由表2可知,各因素的最佳水平为 $A_2B_1C_1$,即加蜜量4%,加水量110%,豆麸比2:1;R值大小分别为 $C > A > B$,即加蜜量对多肽得率的影响最大,其次是加水量,豆麸比的影响最小。

2.2 最佳发酵条件的确定

2.2.1 接种量对多肽得率的影响 分别接入10%、15%、20%、25%的菌种,按照2:1的比例加入豆粕和麸皮,添加110%(相对于干基)的水分,添加4%的糖蜜,在37℃的恒温培养箱培养72 h。由图4可知,随着接种量的增加,多肽得率增大。当接种量达到20%时,多肽得率最大,随后呈下降趋势。这说明接种量在20%时,枯草芽孢杆菌产生的蛋白酶对发酵物的作用处于同期最佳水平。

2.2.2 发酵温度对多肽得率的影响 接入10%的菌种,按照2:1的比例加入豆粕和麸皮,添加110%(相对于干基)的水分,添加4%的糖蜜,分别在28℃、31℃、34℃、37℃的恒温培养箱培养72 h。结果见图5。

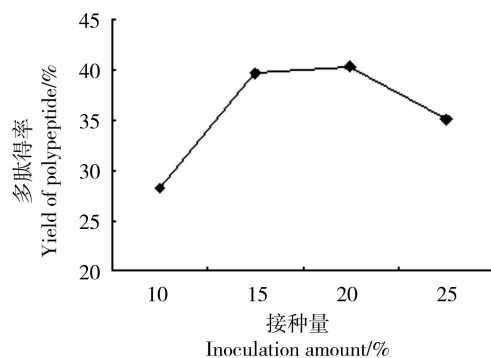


图4 接种量对多肽得率的影响

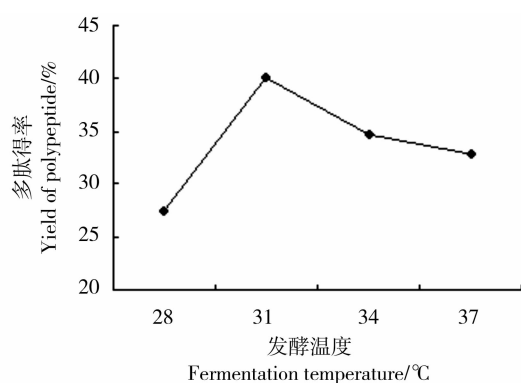
Fig. 4 Effect of *Bacillus subtilis* inoculation amount on yield of soybean polypeptide

图5 发酵温度对多肽得率的影响

Fig. 5 Effect of fermentation temperature on yield of soybean polypeptide

由图5可知,多肽得率随发酵温度的增加呈先升高后降低的趋势,在31℃时多肽得率最高。说明温度越高,反而影响枯草芽孢杆菌的生长,进而微生物对豆粕蛋白的作用减弱,多肽产量下降。

2.2.3 发酵时间对多肽得率的影响 接入10%的菌种,按照2:1的比例加入豆粕和麸皮,添加110% (相对于干基) 的水分,添加4%的糖蜜,在37℃的恒温培养箱分别培养36、48、60、72、84、96 h。结果见图6。

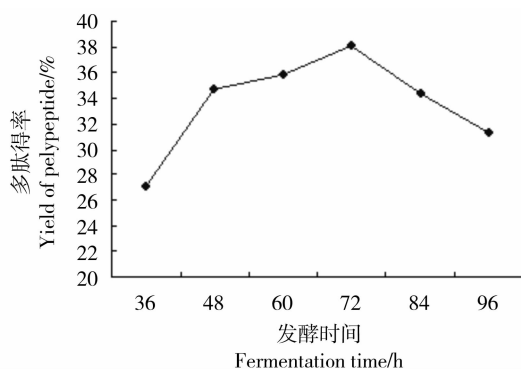


图6 发酵时间对多肽得率的影响

Fig. 6 Effect of fermentation period on yield of soybean polypeptide

由图6可以看出,随发酵时间的延长,多肽得

率呈缓慢增加的趋势,在72 h时达到最高值,但进一步增加发酵时间,多肽得率呈下降趋势。这是因为随着时间的增加,按照微生物一步生长曲线,在72 h之后,枯草芽孢杆菌的菌种活力下降,次级代谢产物增多,微生物生长环境恶劣,从而影响蛋白酶的活力,多肽产量下降。

2.2.4 响应面法优化最佳发酵条件试验 在以上单因素试验的基础上,采取 Design-Expert version 7 软件,应用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[12],以发酵时间,发酵温度,接种量进行三因素三水平的试验设计,多肽得率为响应值。试验因素及水平结果见表3、表4。

表3 RSA 试验因素水平编码表

Table 3 The factors and level of encoding table

水平 Levels	因素 Factors		
	发酵时间 X ₁	发酵温度 X ₂	接种量 X ₃
	Fermentation time/h	Fermentation temperature/°C	Inoculation amount/%
-1	60	31	10
0	72	34	17.5
1	84	37	25

以发酵时间,发酵温度,接种量作如下变换: $X_1 = (t - 72)/12$, $X_2 = (T - 34)/3$, $X_3 = (z - 17.5)/7.5$, 以多肽得率为响应值(Y),试验设计及数据分析见表4(其中15个试验中,1~12是析因试验,13~15是中心试验,用来估计试验误差)。

表4 RSA 试验设计及数据分析表

Table 4 RSA experimental program and experimental result

试验号 No.	X ₁	X ₂	X ₃	Y/%
1	-1	-1	0	46.57
2	-1	1	0	34.51
3	1	-1	0	38.84
4	1	1	0	39.22
5	0	-1	-1	35.45
6	0	-1	1	39.97
7	0	1	-1	37.14
8	0	1	1	38.27
9	-1	0	-1	36.39
10	1	0	-1	34.13
11	-1	0	1	35.82
12	1	0	1	34.69
13	0	0	0	46.20
14	0	0	0	46.57
15	0	0	0	45.58

经 Design-Expert version 7 软件对试验数据分析后发现用二阶多项式回归模型较优,以多肽得率为

响应值回归方程如下:

$$Y = 45.18 - 0.55X_1 - 1.21X_2 + 0.70X_3 + 2.61X_1X_2 + 0.28X_1X_3 - 0.85X_2X_3 - 4.17X_1^2 - 1.72X_2^2 - 5.75X_3^2$$

表 5 回归与方差分析表

Table 5 Regression and analysis of variance results

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	Prob > F
Model	226.06	9	25.12	6.39	0.0274
X ₁	2.43	1	2.43	0.62	0.4671
X ₂	11.74	1	11.74	2.99	0.1445
X ₃	3.98	1	3.98	1.01	0.3605
X ₁ X ₂	27.25	1	27.25	6.94	0.0463
X ₁ X ₃	0.32	1	0.23	0.081	0.7870
X ₂ X ₃	2.87	1	2.87	0.73	0.4315
X ₁ ²	64.23	1	64.23	16.35	0.0099
X ₂ ²	10.93	1	10.93	2.78	0.1561
X ₃ ²	122.01	1	122.01	31.06	0.0026
残差 Suplus	19.40	5	3.93		
失拟性 Lack of fit	16.40	3	5.47	3.37	0.2373
总差 Total	245.70	14			

由表 5 可知,此模型的负相关系数 R^2 为 0.9201,响应面回归模型达到显著水平 ($P = 0.0274 < 0.0500$),模型失拟性不显著 ($P = 0.2373 > 0.1000$)。说明该模型拟合程度好,试验误差小,可以用此模型对枯草芽孢杆菌固态发酵豆粕生产多肽的发酵条件进行分析和预测。在所选试验条件下,对多肽得率影响的大小顺序依次为发酵温度 > 发酵时间 > 接种量。

通过对以上方程和响应面进行分析,预测枯草芽孢杆菌固态发酵豆粕生产多肽的最佳发酵条件为:接种量 15.1%,发酵温度 32.04℃,发酵时间 73.08 h,响应值为 46.75%。为检验可靠性,采取上述最佳发酵条件进行验证试验,多肽得率为 46.29%,与理论值的误差为 0.98%。

3 结论

采用枯草芽孢杆菌固态发酵豆粕制备多肽饲料最佳培养基是:加蜜量 4%,加水量 110%,豆麸比 2:1。以此优化培养基发酵制备多肽饲料最佳条件为:接种量 15%,发酵温度 32℃,发酵时间 73 h。在

此条件下的多肽得率可达 46.29%。

参考文献

[1] 胡可心,陈光,孙旸.大豆肽的功能特性的研究[J].酿酒,2004(6):33-34. (Hu K X, Chen G, Sun Y. Research of the physiology activity of soy peptide[J]. Liquor Making, 2004(6):33-34.)

[2] Pandjaitan N, Hettiarachchy N, Ju Z Y. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with beta-glucosidase [J]. Journal of Food Science, 2000, 65:403-407.

[3] Tan T W, Zhang M, Wang B W, et al. Screening of high lipase producing *Candid* sp. and production of lipase by fermentation [J]. Process Biochemistry, 2003, 39:459-465.

[4] 李清丽,王卫国.双酶复合水解谷朊粉制备小肽的工艺条件研究[J].饲料工业,2007,28(11):17-18. (Li Q L, Wang W G. Study on preparation technology of peptide from gluten by double enzymes[J]. Feed Industry, 2007, 28(11):17-18.)

[5] 关海宁,徐桂花,刁小琴.酶法生产脱脂豆粕小肽工艺条件的研究[J].粮油加工,2006(12):55-56. (Guan H N, Xu G H, Diao X Q. Study on preparation technology of peptide from defatted soybean meal by enzyme[J]. Cereals and Oils Processing, 2006(12):55-56.)

[6] 李玉珍,林亲录,肖怀秋,等.大豆多肽特性及其应用研究现状[J].中国食品添加剂,2005(6):91-94. (Li Y Z, Lin Q L, Xiao H Q, et al. Properties and application research state of soybean peptides[J]. China Food Additives, 2005(6):91-94.)

[7] 李亮.饲用小肽产品的生产工艺[J].中国牧业通讯,2007(12):7-11. (Li L. Preparation technology of peptide for feeding [J]. China Animal Husbandry Bulletin, 2007(12):7-11.)

[8] 刘超,李学如,柳乐,等.固态发酵生产新型蛋白饲料工艺研究[J].粮食与饲料工业,2006(9):29-31. (Liu C, Li X R, Liu L et al. Studies on technology for producing new protein in feeds by solid state fermentation [J]. Cereals and Feed Industry, 2006(9):29-31.)

[9] 莫重文,黄岗.固态发酵法生产发酵豆粕的研究[J].中国油脂,2007(7):38-40. (Mo C W, Huang G. Production of fermented soybean meal by solid state fermentation[J]. China Oils, 2007(7):38-40.)

[10] 王金斌,马海乐,段玉清,等.混菌固态发酵豆粕生产优质高蛋白饲料研究[J].中国粮油学报,2009,24(2):120-124. (Wang J B, Ma H L, Duan Y Q, et al. Producing high quality protein feedstuff from soybean meal by mixed culture solid-state fermentation [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(2):120-124.)

[11] 威伟,赵树欣,李艳敏,等.混菌发酵生产富肽蛋白饲料工艺条件的研究[J].饲料工业,2007,28(17):6-9. (Qi W, Zhao S X, Li Y M, et al. Investigation on the technological condition of production protein feed rich in peptide by mix bacter ia fermentation [J]. Feed Industry, 2007, 28(17):6-9.)

[12] Box G E P, Behnken D W. Some new three level designs for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960, 2:455-467.