

## 二元复合菌固态发酵豆粕制备大豆肽的研究

钱森和<sup>1</sup>, 厉荣玉<sup>2</sup>, 魏明<sup>1</sup>, 薛正莲<sup>1</sup>

(1. 安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽省微生物发酵工程技术研究中心, 安徽 芜湖 241000; 2. 皖南医学院, 安徽 芜湖 241001)

**摘要:**以普通饲料豆粕为原料, 选用枯草芽孢杆菌、啤酒酵母和黑曲霉作为发酵菌种, 以发酵产物中的可溶性蛋白(包括游离氨基酸和小肽)为测定指标, 对影响固态发酵豆粕制备大豆肽的主要因素, 包括不同的二元组合菌种、菌种比例、菌种接种量、发酵时间、基质水分含量、发酵温度进行了单因素研究; 并运用响应面法对最优组合菌种固态发酵大豆肽的条件进行了优化。结果表明: 选用枯草芽孢杆菌和黑曲霉混合菌固态发酵豆粕, 大豆肽含量最高; 其优化条件为: 接种量 27.95% 和 52.71%, 发酵温度 35.92℃, 基质含水量 52.71%, 枯草芽孢杆菌与黑曲霉的菌种比例 2:1, 发酵时间 48 h, 在此优化条件下的大豆肽含量为 8.73%。

**关键词:** 固态发酵; 复合菌; 豆粕; 大豆肽; 响应面分析

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)01-0131-05

## Preparation of Soybean Peptide from Soybean Meal by Solid-Stated Fermented with Binary Compound Strains

QIAN Sen-he<sup>1</sup>, LI Rong-yu<sup>2</sup>, WEI Ming<sup>1</sup>, XUE Zheng-lian<sup>1</sup>

(1. Microorganism Fermentation Engineering and Technology Research Center, Department of Biochemistry, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000; 2. Wannan Medical College, Wuhu 24001, Anhui, China)

**Abstract:** Taking *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* strains as material, and soluble protein (including amino acids and small peptides) were extracted from soybean meal by solid-stated fermentation with binary compound strains. Meanwhile, the solid-stated fermentation conditions that including the combination of dual strains, strain ratio, substrate water content, inoculation concentration, fermentation time, and fermentation temperature were studied by single factor experiment, and the optimum fermentation conditions for the optimal compound strains had been researched by RSA method. The results showed that using *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* compound strains, the content of soybean peptide was the highest. The optimum fermentation conditions were inoculum 27.95%, fermentation temperature 35.92℃, substrate water content 52.71%, strain ratio between *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* was 2:1, and fermentation time 48 hours. The soybean peptide volume was 8.73% in the optimum conditions.

**Key words:** Solid-stated fermentation; Compound strain; Soybean meal; Soybean peptide; Response surface analysis

豆粕是目前畜禽最重要的植物性蛋白源, 其粗蛋白含量高达 43%~48%, 并有较平衡的氨基酸组成, 尤其是其它植物性饲料易缺的赖氨酸, 其含量高达 2.5%~2.8%<sup>[1-2]</sup>。但大豆蛋白质分子结构复杂, 分子量较大, 从而导致消化率和生物学效价不高; 同时豆粕中还存在多种抗营养因子, 极大地影响了豆粕的饲用价值<sup>[3]</sup>。通过生物转化处理可有效地降低去除豆粕中的各种抗营养因子, 同时使豆粕中的蛋白质分解成大量的植物小肽, 即大豆肽<sup>[4]</sup>。大豆肽是大豆蛋白质经过控制性的水解、精制得到的一类活性肽, 通常是由 3~6 个氨基酸组成的低分子量肽。这种无抗原的植物小肽吸收率

高, 可作为许多高档经济动物的优良蛋白质来源<sup>[5]</sup>。常见的大豆肽的生物转化方法有酶解豆粕和发酵豆粕。酶解豆粕主要用于大豆肽的液态生产, 它存在一定的限制因素, 主要表现在蛋白质水解过程中产生的苦味、臭味无法完全抑制, 尤其是大规模生产中, 降低和脱除水解过程中的苦味和臭味需要很高的成本<sup>[6]</sup>。固态发酵不仅可以应用于液态生产不能实现的过程, 而且可以弥补液态生产的不足与缺陷。应用现代固体发酵技术实现规模化生产成本往往比液态法要低, 更重要的是豆粕经固态发酵可有效提高蛋白质的生物转化率<sup>[7]</sup>。

目前国内外微生物发酵豆粕生产大豆肽的发

收稿日期: 2010-10-13

基金项目: 安徽省高校省级科学研究资助项目(KJ2010B285)。

第一作者简介: 钱森和(1978-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术教学和科研工作。E-mail: qiansenhe@163.com。

酵方式主要集中于单一菌种的发酵和发酵菌株的筛选,而复合菌株的协同发酵研究甚少,并且该方面的研究是豆粕固态发酵中的一个难点<sup>[8-9]</sup>。因此,笔者以普通豆粕为原料,采用枯草芽孢杆菌、黑曲霉和啤酒酵母的二元复合菌进行固态发酵,通过单因素试验及其中心组合设计试验研究不同因素对豆粕发酵对大豆肽含量的影响,以期获得高大豆肽含量的发酵产品,从而提高大豆生产的附加值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

原料:豆粕、麸皮,购于芜湖市大蓉坊希望饲料有限公司。其中豆粕含水量为13.3%,粗蛋白含量为44.21%,小肽含量1.45%(干基)。

菌种:黑曲霉(*Aspergillus niger*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)均为安徽工程大学生物技术专业实验室保藏菌种。试验中用H、K和P分别表示黑曲霉、枯草芽孢杆菌和啤酒酵母菌种,利用KH、PH和KP表示该3种菌种组合。

培养基:马铃薯蔗糖培养基(简称PDA),用于黑曲霉和啤酒酵母的分离平板及斜面、啤酒酵母的液体种子培养;牛肉膏蛋白胨培养基(简称LB),用于枯草芽孢杆菌分离平板及斜面、枯草芽孢杆菌的液体种子培养<sup>[10]</sup>。基础发酵培养基:45 g 豆粕 + 5 g 麸皮 + 0.15 g  $\text{MgSO}_4$ ,其含水量为50%。

主要检测试剂:茚三酮溶液( $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、氨基酸贮备溶液( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、氨基酸标准使用液( $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

### 1.2 试验方法

1.2.1 发酵菌液的制备 将枯草芽孢杆菌、啤酒酵母分别接入各菌种的液体培养基中,枯草芽孢杆菌于30℃振荡培养48 h,啤酒酵母菌于28℃静置培养48 h;并以培养好的菌液为菌种,按2%接种量接到各菌种发酵种子液培养基中扩大培养24 h,制成发酵种子液(注:黑曲霉不进行液体发酵,而是采用洗孢子的方式制备菌液)。

1.2.2 发酵液中大豆肽的提取 大豆肽浸提:在发酵样品中加150 mL的蒸馏水,在80℃水浴中分3次浸泡提取,每次大约40 min左右,然后将样品进行过滤分离,废渣再加水继续浸泡提取过滤分离,提取3次,最后合并滤液加水至350 mL,即可得到样品的大豆肽粗提取液<sup>[11]</sup>。

沉淀:取3 mL滤液于离心管内,另加3 mL 20% TCA 摇匀静置15 min。

离心:将静置液于5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心

15 min,离心后取上清液于另一离心管中保存待测。

1.2.3 大豆肽的测定 标准曲线绘制:精确吸取0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0和8.0 mL 甘氨酸标准溶液分别置于9个试管中;并分别加2.0 mL 茚三酮显色剂溶液,再加蒸馏水稀释至10 mL,摇匀。然后置于沸水浴中加热20 min,产生蓝紫色后,流水冷却至室温,于570 nm处测定吸光度,并绘制甘氨酸溶液标准曲线<sup>[12]</sup>。其方程为 $Y = 0.0457X + 0.0371$  ( $R^2 = 0.9921$ )。

发酵液中大豆多肽含量的测定:取1.0 mL样品保存液于试管中,调节pH至5~7,然后向试管内加入2.0 mL 茚三酮溶液,再于沸水浴加热20 min,冷却后于570 nm下测定吸光度,根据标准曲线方程计算大豆多肽含量<sup>[13]</sup>。该试验大豆肽含量的计算公式为: $H\% = A * n * 3 * 2 * 350 / 45000000 \times 100\%$  (H%:大豆肽含量;A:所测OD值通过曲线方程求得的大豆肽浓度;n:稀释倍数)。

1.2.4 单因子试验设计 将基础发酵培养基灭菌后,按2:1,1:1和1:2接种比例分别接入KH、PH和KP3种组合菌种,接种量为20%,置于30℃的摇床中培养48 h后,测定发酵样品大豆肽含量;得到的最佳菌种组合及其接种的菌种比例,用于接种量、发酵时间、基质初始含水量以及发酵温度对豆粕发酵大豆肽含量影响的研究,具体设计见表1。

表1 单因素试验水平表

Table 1 The level of single-factor experiment

水平 Level	影响因素 Factors			
	接种量 Inoculum /%	发酵时间 Fermentation time/h	含水量 Water content /%	发酵温度 Fermentation temperature/℃
1	15	24	45	26
2	20	36	50	30
3	25	48	55	34
4	30	60	60	38

1.2.5 中心组合试验设计 根据单因素试验的结果,选取3个影响较大的因素,采用SAS8.2统计软件设计中心组合试验,并对试验数据进行回归分析,从而得出最优菌种组合的最优发酵条件<sup>[14-15]</sup>。

1.2.6 验证试验 综合分析单因素试验和Box-Behnken中心组合试验结果,验证最优组合菌种在最优发酵条件下的大豆肽含量与回归模型最大理论大豆肽含量的拟合度。

## 2 结果与分析

### 2.1 组合菌种的接种比例对豆粕发酵产生大豆肽的影响

图1为不同组合菌种的接种比例对豆粕发酵

产生大豆肽的影响。从中可以看出,组合菌种中,接种比例不同,发酵产物中大豆肽含量存在一定的差异。对于 KH 组合菌种,当枯草芽孢杆菌与黑曲霉的接种比例为 2:1 时,大豆肽含量最高,发酵后基质上能够看到黑曲霉生长的孢子和菌丝体,并且基质有结块现象;对于 PH 组合菌种,当啤酒酵母与黑曲霉的接种比例为 1:1 时,大豆肽含量最高,且发酵后基质上同样能够看到黑曲霉生长的孢子和菌丝体,基质有结块现象,并有曲香产生;对于 KP 组合菌种,当枯草芽孢杆菌与啤酒酵母的接种比例为 2:1 时,大豆肽含量最高,发酵后产物略有结块现象,其表面有一层白色菌体,并有曲香产生。另外,从图 1 中还可以看出,二元组合菌发酵豆粕产生大豆肽的含量均明显高于单菌;3 种单菌中以枯草芽孢杆菌产生的大豆肽含量最高,而黑曲霉发酵产生大豆肽的能力较差。

比较 3 种组合菌种,可知 KH 菌种组合发酵豆粕生产的大豆肽含量高于 PH 和 KP 菌种组合。因此,选用 KH 组合菌种,并按照 2:1 接种比例的进行下列优化试验。

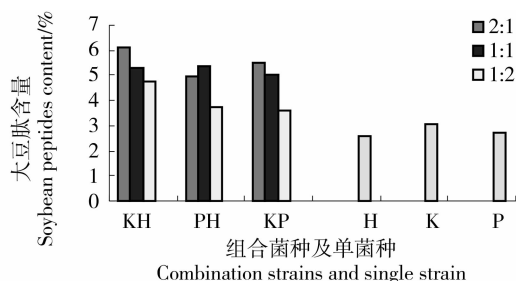


图 1 不同组合菌种的接种比例对豆粕发酵产生大豆肽的影响

Fig. 1 Effect of strain ratio of combination strains on soybean peptides content

## 2.2 接种量对大豆肽含量的影响

图 2 为接种量对豆粕发酵产品中大豆肽含量的影响。随着接种量的增加,发酵产品中大豆肽含量先增加后降低。当接种量为 25% 左右时,发酵产品中大豆肽含量达最大值,继续增加接种量,大豆肽含量反而下降。可能原因是由于接种量过大,致使菌体生长速度加快,从而消耗大量的营养物质。因此,产品中大豆肽的含量呈现下降趋势。

## 2.3 发酵时间对大豆肽含量的影响

图 3 为发酵时间对豆粕发酵产品中大豆肽含量的影响。在发酵初期,随着发酵时间的延长,产品中大豆肽含量逐渐增加,当发酵时间为 48 h 左右时,产品中大豆肽含量最高。继续延长发酵时间,反而会使大豆肽含量减少。可能原因是随着发酵时间的延长,微生物会发生自溶现象;另外,前期提供的 C、N 源已经耗尽,因而菌体生长所需营养需靠

大豆肽提供,从而导致大豆肽含量下降。因此,在实际的生产中,发酵周期不宜过长。

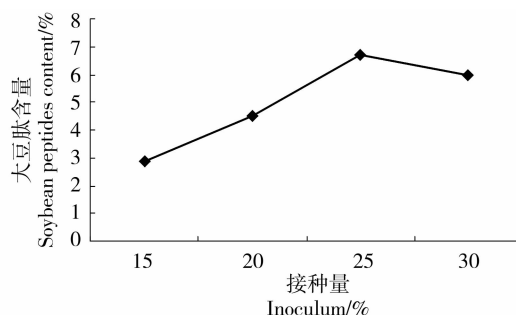


图 2 接种量对大豆肽含量的影响

Fig. 2 Effect of inoculum on soybean peptides content

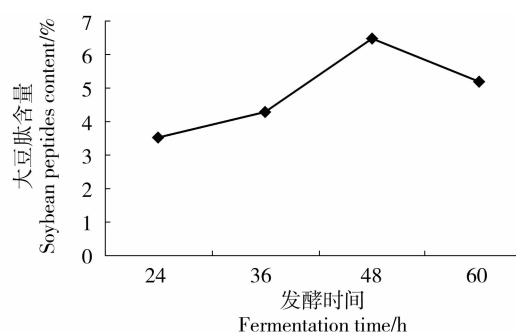


图 3 发酵时间对大豆肽含量的影响

Fig. 3 Effect of fermentation time on soybean peptides content

## 2.4 基质含水量对大豆肽含量的影响

固态发酵过程中,只有适度的水分才能催化蛋白酶的活力,从而使发酵产品中大豆肽含量达到最高值。图 4 为基质含水量对豆粕发酵产品中大豆肽含量的影响。可以看出,在发酵初期,随着含水量的增加,产品中大豆肽含量逐渐增加,当含水量为 55% 左右时,产品中大豆肽含量最高,之后又有降低趋势,说明 55% 含水量的培养基质适宜微生物生长繁殖。

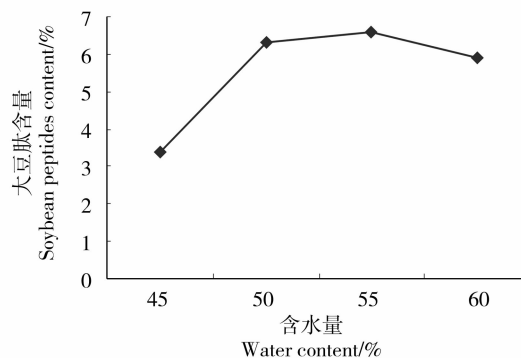


图 4 含水量对大豆肽含量的影响

Fig. 4 Effect of water content on soybean peptides content

## 2.5 发酵温度对大豆肽含量的影响

细菌的最适生长温度高于真菌的最适生长温度,因此,混菌发酵的最适温度并不一定就是各单菌各自生长的最适温度。由图 5 可以看出,随着发酵温度的增加,大豆肽含量也不断增加,当温度为 34℃ 时,大豆肽含量达到最大值,继续增加温度,大豆肽含量反而减少。

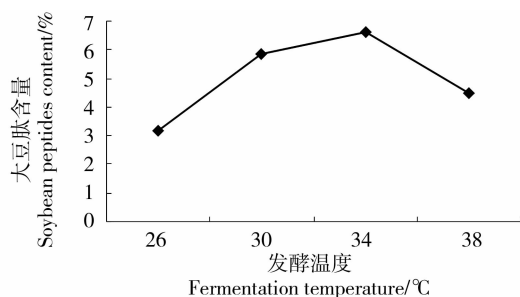


图 5 发酵温度对大豆肽含量的影响

Fig. 5 Effect of fermentation temperature on soybean peptides content

## 2.6 Box-Behnken 中心组合设计及其结果分析

根据以上单因素试验结果,确定接种量、发酵温度、含水量为 3 个对大豆肽含量影响较大的因素,进行三因素三水平共 15 个试验点 Box-Behnken 中心组合设计试验,其因素水平选取见表 2,试验方案与结果见表 3。

表 2 响应面试验因素与水平

Table 2 Factors and levels in response surface design

变量因子 Variable factors	代号 Code	水平 Level		
		-1	0	1
接种量 Inoculum/%	$X_1$	22	25	28
温度 Temperature/°C	$X_2$	30	34	38
含水量 Water content/%	$X_3$	50	55	60

表 3 响应面分析试验结果

Table 3 Response surface design matrix and experimental results of soybean peptides content

编号 No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Y 大豆肽含量 Soybean peptides content/%
1	-1	-1	0	5.411 084
2	-1	1	0	4.103 811
3	1	-1	0	3.588 331
4	1	1	0	7.079 753
5	0	-1	-1	3.210 503
6	0	-1	1	2.965 429
7	0	1	-1	7.253 036
8	0	1	1	4.177 329
9	-1	0	-1	6.585 203
10	1	0	-1	6.971 197
11	-1	0	1	6.254 351
12	1	0	1	6.291 115
13	0	0	0	7.539 933
14	0	0	0	8.017 576
15	0	0	0	8.429 097

表 4 为 KH 组合菌种豆粕发酵大豆肽含量的回归模型方差分析表。从中可以看出,响应面模型总体  $P < 0.01$ ,说明该模型达到极显著水平;模型的复相关系数  $R^2 = 0.9501$ ,说明该回归方程可以准确地预测不同发酵条件对大豆肽含量值的影响;方程的一次项和二次项均达到显著和极显著水平,说明发酵条件对大豆肽值有显著影响;方程的交互项也达到极显著水平,说明各发酵条件之间相互影响显著,有较强的交互性。以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分别表示接种量、发酵温度、含水量 3 个变量,以  $Y$  表示响应值(大豆肽含量),经回归分析, $Y$  与  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  的关系可用方程:  $Y_1 = 7.995535 + 0.196993X_1 + 0.929823X_2 - 0.541465X_3 - 0.412949X_1X_1 + 1.199674X_1X_2 - 0.087308X_1X_3 - 2.536841X_2X_2 - 0.707658X_2X_3 - 1.05712X_3X_3$  表示。由表 4 中方差分析可以看出,该模型的失拟项  $P = 0.246 > 0.05$ ,差异不显著,表明该方程对试验结果拟合良好。

表 4 回归模型方差分析表

Table 4 Analysis of variance for created regression equation

变异来源 Source of variation	自由度 DF	平方和 SS	$R^2$	$F$	$Pr > F$	显著性 Significance
总回归 Total model	9	43.97592	0.9501	10.59	0.0091	**
线性项 Linear	3	9.572486	0.2068	6.91	0.0314	*
二次项 Quadratic	3	26.61295	0.575	19.22	0.0036	**
交互项 Corss product	3	7.790481	0.1683	5.63	0.0465	*
失拟项 Lack of fit	3	1.911945	0.637315	3.22	0.2460	
纯误差 Pure error	2	0.396034	0.198017			
总误差 Total erroorr	5	2.30798	0.461596			

图 6 为 KH 组合菌种的豆粕发酵大豆肽含量响应面分析图。从中可以看出,影响大豆肽含量的各因素按影响大小排依次为发酵温度 > 含水量 > 接

种量,其具体表现为  $X_2$  (发酵温度) 曲线最陡,  $X_3$  (含水量) 次之,而  $X_1$  (接种量) 曲线变化最为缓慢。

对上述回归方程取一阶偏导数等于零,得响应

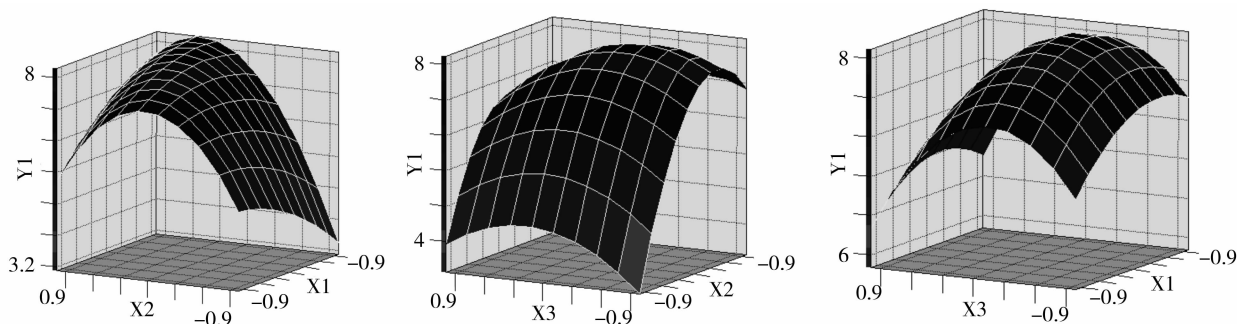


图6 大豆肽含量响应面分析图

Fig. 6 Response surface plot showing the pairwise interaction effects among three variables on soybean peptides content

值最大时,其最优点( $X_1, X_2, X_3$ )对应的代码为(0.98348, 0.47958, -0.45724),其实际值为(27.95%, 35.92℃, 52.71%),此时大豆肽含量的最大理论估计值为8.44%。

## 2.7 验证试验

根据优化得出的最佳试验条件,进行验证试验,重复5次,大豆肽含量平均值为8.73%;此试验值与预测值8.44%接近,因此,该模型可以较好的反映出大豆肽最佳发酵条件。

## 3 结论

通过单因素试验以及 Box-Behnken 中心组合设计响应面法,建立了 KH 菌种组合3个影响因素与响应值(大豆肽含量)相互作用的数学模型。其最优发酵条件接种量为27.95%,枯草芽孢杆菌与黑曲霉的接种比例为2:1,发酵温度为35.92℃,含水量为52.71%,发酵时间为48 h;在此优化条件下发酵豆粕实际产生大豆肽含量为8.73%,比由原料的1.45%提高了6.02倍。

## 参考文献

- [1] 肖玲, 龚月生. 热处理对豆粕品质的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2000(4):23-25. (Xiao L, Gong Y S. Effect of heat treatment on nutritional quality of soybean meal[J]. Cereal and Feed Industry, 2000(4):23-25.)
- [2] 陈宇光, 李丽立, 张彬, 等. 小肽的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2004(4):62-64. (Chen Y G, Li L L, Zhang B, et al. The research progress of small peptide[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2004(4):62-64.)
- [3] 李善仁, 蔡海松, 林新坚, 等. 豆粕发酵制备大豆肽菌株的筛选[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(1):86-89. (Li S R, Cai H S, Lin X J, et al. Strains screening for soybean cake fermentation to prepare soybean peptides[J]. Journal of Microbiology, 2009, 29(1):86-89.)
- [4] 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, 32(7):38-40. (Mo C W, Hang G. Production of fermented soybean meal by solid state fermentation[J]. China Oils and Fats, 2007, 32(7):38-40.)
- [5] 卫琳, 宋俊梅, 宁维颖. 米曲霉固态发酵豆粕制备大豆肽的研究[J]. 粮食加工, 2009, 34(1):34-36. (Wei L, Song J M,

Ning W Y. Studies on fermentation conditions of soybean peptide by aspergillus oryzae preparation by solid fermentation[J]. Grain Processing, 2009, 34(1):34-36.)

- [6] 卫琳, 宋俊梅, 黄永峰. 固态发酵豆粕在饲料中的研究应用[J]. 饲料与畜牧, 2008(8):12-13. (Wei L, Song J M, Huang Y F. Application of solid-state fermentation of soybean meal in feed[J]. Feed and Husbandry, 2008(8):12-13.)
- [7] Ellen M H, Stephan M, Klaus B. The fermentation of soybean meal by rumen microbes in vitro reveals different kinetic features for the inactivation and the degradation of trypsin inhibitor protein[J]. Animal Feed Science and Technology, 2003, 106:189-197.
- [8] Kodera Tomohiro, Asano Minao, Miwa Tetsuya, et al. Production of low-bitter peptides [P]. Patent Abstract of Japan, 2000, 3.
- [9] Feng J, Liu X, Xu Z R, et al. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2007, 52:1845-1850.
- [10] 惠明, 孟可, 田青, 等. 复合菌株固态发酵豆粕的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2009, 30(4):60-64. (Hui M, Meng K, Tian Q, et al. Study on soybean meal solid-state fermentation by the compound strains[J]. Journal of Henan University of Technology(Natural Science Edition), 2009, 30(4):60-64.)
- [11] 付弘赞. 微生物固态发酵豆粕的研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2009. (Fu H B. Study on solid-state fermentation of Soybean Meal[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009.)
- [12] 沈同, 王镜岩. 生物化学(上册)[M]. 北京:高等教育出版社, 1989:114. (Shen T, Wang J Y. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 1989:114.)
- [13] 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.)
- [14] 王文娟, 潘海涛, 于磊娟. 豆粕发酵制备大豆肽的研究[J]. 粮食加工, 2007, 32(2):55-56. (Wang W J, Pang H T, Yu L J. Study on producing soybean peptides by fermenting with soybean cake[J]. Grain Processing, 2007, 32(2):55-56)
- [15] 王文娟. 发酵法制备大豆多肽[D]. 济南:山东轻工业学院, 2007. (Wang W J. Study on soybean peptides prepared by fermentation[D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2007.)