

响应面法优化啤酒糟培养基生产蛋白饲料的研究

吴明霞,陈锡雄,阮少江

(宁德师范学院 生物工程系,福建 宁德 352100)

摘要:选取啤酒糟量、麸皮量和硫酸铵量为因子,用响应面法对生产蛋白饲料的培养基进行优化。在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 中心组合方法进行三因素三水平试验。结果表明,最佳工艺条件为啤酒糟 88.5%、麸皮 7.5%、硫酸铵 1%。在此条件下得到的真蛋白含量为 37.64%。

关键词:响应面法;啤酒糟;培养基;优化

中图分类号:TS262.5

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)05-0842-04

Optimization of Microbial Media of Brewer Spent Grains of Protein Feed by Response Surface Methodology

WU Ming-xia, CHEN Xi-xiong, RUAN Shao-jiang

(Department of Biological Engineering, Ningde Normal University, Ningde 352100, Fujian, China)

Abstract: To optimize culture medium of the production of protein feed, the effect of the amount of wheat bran, lees and ammonium sulfate weight were studied with Box-Behnken design. The optimum extraction conditions were obtained as follows: brewer spent grains 88.5%, wheat bran 7.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%. Under the optimal conditions, the true protein content was 37.64%, which agreed well with predictive value, indicating the optimized process was feasible.

Key words: Response surface methodology (RSM); Brewer spent grains; Fermentation medium; Optimization

随着啤酒工业迅速发展,啤酒糟作为啤酒生产的主要副产物其产量也在增加。啤酒糟中固形物含量一般为 15%~25%,水分含量高,极易腐败变质,但干糟中粗蛋白含量高达 35%~51%,若加以开发利用可成为一种很好的饲料蛋白来源。目前国内多数啤酒生产企业将啤酒糟直接出售用作饲料,这种饲料中的非蛋白氮和无机氮不能被饲养动物有效利用,纤维素也阻碍了营养成分的吸收,由于含水量较高,很难贮藏,一旦滞销很容易霉烂、腐败而影响环境^[1]。利用固态发酵生物转化啤酒糟可以将其成分改性,很多研究表明利用发酵方法可以有效提高啤酒糟蛋白质含量。

响应面优化法,即响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM),是一种适用性强的试验设计方法^[2],不仅包括试验设计、建模、因子效应评估以及寻求因子水平最佳操作条件等功能,而且具有数据统计处理功能,显示出了其它试验方法如正交试验、因子试验等方法所不具备的优点,该法不但具备试验次数少,周期短、精度高等优点^[3],而且可以建立连续变量曲面模型;同时,对影响试验指标的各因子水平及其交互作用进行优化和评价,可快速有效地确定多因子系统的最佳条件^[4]。本研究以啤酒糟为培养基生产高含量蛋白饲料,在单因素

试验的基础上,通过响应面法对培养基进行优化,以期利用酒糟生产蛋白饲料提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

啤酒糟:镇江天目湖啤酒有限公司,干糟中真蛋白含量约为 28%;麸皮:牡丹江面粉责任公司,粉碎后过 40 目筛;枯草芽孢杆菌、酵母:宁德师范学院生物工程系实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 原料处理 称取啤酒糟 200~300 g 放置 105℃烘箱中 15 min,迅速降温 65℃,烘干 5~6 h,取出后置干燥器冷却 0.5 h,得到风干样品。用微型粉碎机粉碎,混匀后保存于样品袋中备用。

1.2.2 摇瓶发酵液的配制 用生理盐水调整混菌(枯草芽孢杆菌:酵母=1:2)数量 1×10^6 个·mL⁻¹,接种胰化蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g, pH 7.0,摇床 150 r·min⁻¹,30℃培养 24 h。

1.2.3 固态发酵培养基配制 配制固体酒糟麸皮发酵培养基啤酒糟 88%、麸皮量 7%,硫酸铵 1%,尿素 2%,含水量 1:0.8(固态培养基干物质:水,质量比,下同),自然 pH 值;搅拌,使混合液均匀于 121℃,20 min 灭菌。

收稿日期:2012-05-25

基金项目:宁德师范学院“服务海西建设”项目(2010H308)。

第一作者简介:吴明霞(1979-),女,硕士,讲师,研究方向为微生物代谢调控。E-mail:wuming0224@163.com。

1.2.4 酒糟量的优化 接种量 20%,混菌比例为枯草芽孢杆菌:酵母 = 1:2,固态酒糟麸皮发酵培养基中啤酒糟添加量分别为 82%、84%、86%、88%、90%,麸皮 8%,硫酸铵 1%,尿素 2%,转速 100 r·min⁻¹,含水量 1:0.8,发酵温度 30℃ 下培养 48 h。

1.2.5 麸皮量的优化 接种量 20%,混菌比例为枯草芽孢杆菌:酵母 = 1:2,固态酒糟麸皮发酵培养基中啤酒糟 88%,麸皮添加量分别为 5%、6%、7%、8%、9%,硫酸铵 1%,尿素 2%,转速 100 r·min⁻¹,含水量 1:0.8,发酵温度 30℃ 下培养 48 h。

1.2.6 硫酸铵量的优化 接种量 20%,混菌比例为枯草芽孢杆菌:酵母 = 1:2,固态酒糟麸皮发酵培养基中啤酒糟 88%,麸皮 8%,硫酸铵添加量分别为

0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%,尿素 2%,转速 100 r·min⁻¹,含水量 1:0.8,发酵温度 30℃ 下培养 48 h。

1.2.7 尿素量的优化 接种量 20%,混菌比例为枯草芽孢杆菌:酵母 = 1:2,固态酒糟豆粕发酵培养基中啤酒糟 88%,麸皮 8%,硫酸铵 1%,尿素添加量分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%,转速 100 r·min⁻¹,含水量 1:0.8,发酵温度 30℃ 下培养 48 h。

1.2.8 真蛋白含量测定 真蛋白含量的测定参照王俊峰^[5]的方法。

1.2.9 响应面设计 在前期单因素试验的基础上,重点考察啤酒糟量、麸皮量、硫酸铵量 3 个因素对真蛋白含量的影响并用响应面法进行优化,以真蛋白含量为响应值,试验因素编码及水平见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of RSM analysis

因素 Factor/%	水平 Level		
	-1	0	1
A 啤酒糟量 The amount of Brewer spent grains	86	88	90
B 麸皮量 The amount of wheat bran	6	7	8
C 硫酸铵量 The amount of Ammonium sulfate	0.5	1	1.5

1.3 数据分析

采用 Design Expert 7.0 软件进行数据分析。

2 结果和分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酒糟量的优化 如图 1 可知,随酒糟含量的增加,真蛋白含量呈现先升高后降低的趋势,酒糟的适宜添加量为 88%。

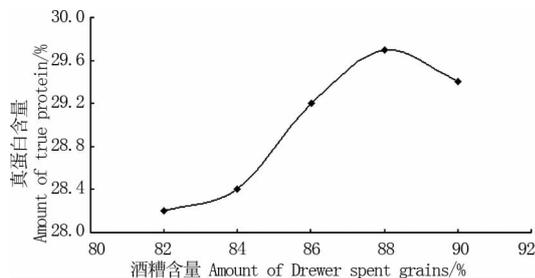


图 1 酒糟量对发酵的影响

Fig. 1 Effect of the amount of brewer spent grains on fermentation

2.1.2 麸皮量的优化 如图 2 可知,随酒糟含量的增加,真蛋白含量呈现先升高后降低的趋势,麸皮的适宜量为 7%。

2.1.3 尿素含量的优化 由图 3 可知,随酒糟含量的增加,真蛋白含量呈现先升高后降低的趋势,尿素的适宜量为 2.0%。

2.1.4 硫酸铵含量的优化 由图 4 可知,随酒糟含量的增加,真蛋白含量呈现先升高后降低的趋势,硫酸铵的适宜量为 1.0%。

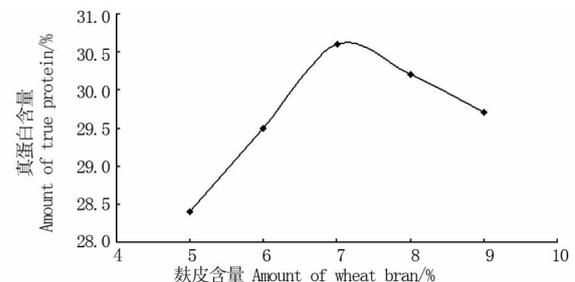


图 2 麸皮量对发酵的影响

Fig. 2 Effect of the amount of wheat bran on fermentation

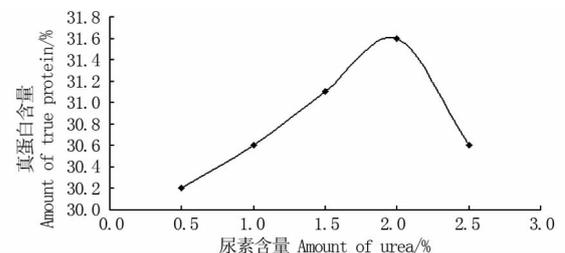


图 3 尿素含量对发酵的影响

Fig. 3 Effect of the amount of urea on fermentation

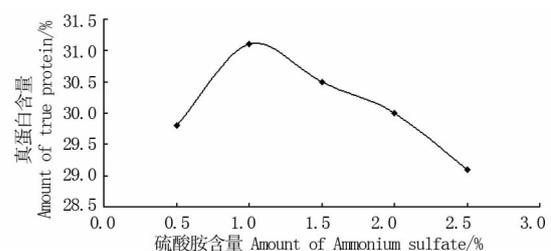


图 4 硫酸铵量对发酵的影响

Fig. 4 Effect of the amount of Ammonium sulfate on fermentation

2.2 响应面法优化发酵培养基

时,真蛋白含量最高,分别为 38.28%、36.01%、

2.2.1 响应面分析方案及试验结果

啤酒糟量、麸皮量、硫酸铵量分别为 88%、7% 和 1%

由表 2 可知, 36.33%、37.14% 和 36.65%。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平及设计方案和结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号 Test number	A 啤酒糟量 Drewer spent grains/%	B 麸皮量 Wheat bran/%	C 硫酸铵量 Ammonium sulfate/%	Y 真蛋白含量 Amount of true protein/%
1	0	0	0	38.28
2	0	-1	1	29.52
3	0	1	1	34.70
4	0	0	0	36.01
5	1	1	0	33.46
6	0	0	0	36.33
7	1	-1	0	28.24
8	0	0	0	37.14
9	1	0	1	32.25
10	0	0	0	36.65
11	-1	-1	0	25.48
12	0	-1	-1	24.76
13	0	1	-1	30.54
14	-1	1	0	29.74
15	1	0	-1	31.44
16	-1	0	-1	27.20
17	-1	0	1	29.56

2.2.2 模型的建立及显著性检验 利用 Design-Expert 7.0 软件对表 2 中试验数据进行二次多项式逐步回归拟合^[6],得到的数学模型:

$$Y = 36.88 + 1.68A + 2.56B + 1.51C + 0.24AB - 0.39AC - 0.15BC - 3.71A^2 - 3.94B^2 - 3.06C^2$$

模型的可靠性可从方差分析及相关系数来考

察(表 3)。结果表明所建立的二次多项式具有显著性;失拟性不显著。

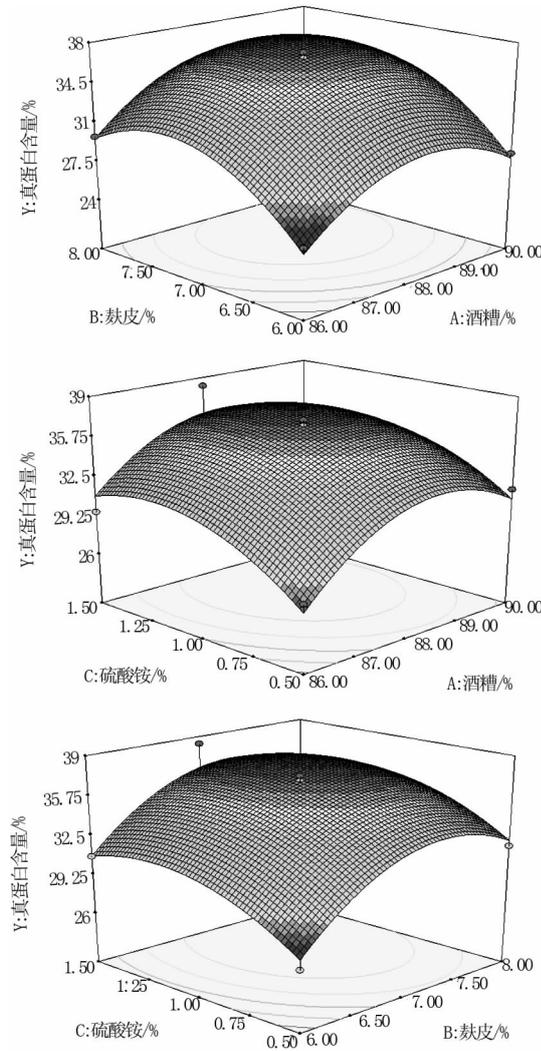
模型方程回归系数及其显著性检验见表 3。结果表明一次项 A、B 和 C 均极显著;二次项 A²、B²和 C²同样极显著;交互项 AB、AC 和 BC 不显著。

表 3 回归统计分析结果

Table 3 Regression analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F	P
A	22.48	1	22.48	20.78	0.0026
B	52.22	1	52.22	48.28	0.0002
C	8.27	1	18.27	16.89	0.0045
AB	0.23	1	0.23	0.21	0.6584
AC	0.60	1	0.60	0.56	0.4804
BC	0.090	1	0.090	0.083	0.7814
A ²	57.95	1	57.95	53.57	0.0002
B ²	65.44	1	65.44	60.50	0.0001
C ²	9.42	1	39.42	36.44	0.0005
模型 Residual	7.57	7	1.08		
失拟 Lack of fit	4.43	3	1.48	1.88	0.2737
纯误差 Pure error	3.14	4	0.78		
总和 Sum total	283.13	16			

2.2.3 响应曲面分析和优化 通过模型方程所作的响应曲面图,可直观地描述各因素对响应值的影响和各个因素间的交互作用。由图 5 可知,混菌固态发酵酒糟培养基最佳条件为酒糟 88.45%、麸皮量 7.33%、硫酸铵量 1.11%,在此条件下真蛋白量达 37.66%。



A: Amount of brewer spent grain
B: Amount of wheat bran
C: Amount of ammonium sulfate
Y: Amount of true protein

图 5 响应曲面图

Fig. 5 3D-surface of Response surface methodology

为检验 RSM 法的可靠性,采用上述最佳方案进行混菌固态发酵酒糟试验,同时考虑实际操作的情况,将培养基优化方案修正为酒糟 88.5%、麸皮量 7.5%、硫酸铵量 1%。实际测得的真蛋白含量为 37.64%,与理论预测值基本吻合。

3 结论

通过响应面法分析得出混菌固态发酵酒糟生产蛋白饲料的最佳工艺条件为啤酒糟 88.5%、麸皮 7.5%、硫酸铵 1%,在此条件下得到的真蛋白含量为 37.64%。

参考文献

- [1] 王颖,马海乐. 混菌固态发酵啤酒糟生产蛋白饲料的研究[J]. 饲料工业,2010,31(17):26-28. (Wang Y, Ma H L. Research on production of protein feeds tuff from brewer spent grain by mixed culture solid-state fermentation[J]. Feed Industry Magazine, 2010 (17):26-28.)
- [2] 季宏飞,许杨,李燕萍. 采用响应面法优化红曲霉固态发酵产红曲色素培养条件研究[J]. 食品科技,2008(8):9-13. (Ji H F, Xu Y, Li Y P. Optimization of cultivation condition for monascus pigments by solid fermentation of monascus[J]. Food Science and Technology, 2008(8):9-13.)
- [3] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报,2001,22(3):91-94. (Mu Y D. Response surface methodology and its application in food industry[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Technology, 2001,22(3):91-94.)
- [4] 刘志祥,曾超珍. 响应面法在发酵培养基优化中的应用[J]. 北方园艺,2009(2):127-129. (Liu Z X, Zeng C Z. The utilization of response surface methodology in solid fermentation culture medium[J]. Northern Horticulture, 2009(2):127-129.)
- [5] 王俊峰. 饲料中真蛋白质含量的测定方法[J]. 广东饲料,2004(6):37-38. (Wang J F. The determination method of real protein in feed[J]. Guangdong Feed, 2004(6):37-38.)
- [6] 赵志水,蒲彬,贺玉凤,等. 响应面法优化新疆红枣总黄酮乙醇提取工艺[J]. 中国酿造,2012(1):88-90. (Zhang Z S, Pu B, He Y F, et al. Optimization of ethanol extraction process of total flavonoids from Xinjiang jujube by response surface methodology[J]. China Brewing, 2012(1):88-90.)