

油料蛋白

基于混合粕生产蛋白寡肽的研究

叶美金¹, 杨玉敏², 冯 鸿¹, 刘松青¹, 伍 勇¹, 张华玲¹, 唐 敏¹, 刘艳玉¹

(1. 成都师范学院 化学与生命科学学院, 成都 611130; 2. 四川省农业科学院 土壤肥料研究所, 成都 610066)

摘要:以豆粕、米糠、麦麸混合粕为主要原料, 采用多种菌(枯草芽孢杆菌+根霉菌+乳酸杆菌)菌种协同发酵提高混合粕的饲用价值。以蛋白寡肽含量为指标, 通过单因素实验和正交实验对发酵条件进行优化。确定最佳的固态发酵条件为: 发酵温度 37℃, 发酵初始 pH 6.8, 接种量 4%, 发酵时间 60 h。在最佳条件下, 发酵产物中蛋白寡肽含量由发酵前的 4.0% 提高到 12.9%, 其饲用价值明显提高。

关键词:混合粕; 固态发酵; 混合菌; 蛋白寡肽

中图分类号: TS229; TQ645.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)09-0049-04

Production of protein oligopeptide from mixed meal

YE Meijin¹, YANG Yumin², FENG Hong¹, LIU Songqing¹, WU Yong¹,
ZHANG Hualing¹, TANG Min¹, LIU Yanyu¹(1. College of Chemistry and Life Sciences, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China;
2. Soil and Fertilizer Institute, Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066, China)

Abstract: The feeding value of the mixed meal was enhanced using soybean meal, rice bran and wheat bran as the main raw materials, and *Bacillus subtilis*, *Bacillus Rhizome* and *Lactobacillus lactobacillus* as the fermentation bacterias. The fermentation parameters were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment with protein oligopeptide content as indicator. The results showed that the optimal fermentation conditions were obtained as follows: fermentation temperature 37℃, initial pH 6.8, inoculation amount 4%, fermentation time 60 h. Under the optimal conditions, the protein oligopeptide content improved from 4.0% to 12.9%, and the feeding value increased obviously.

Key words: mixed meal; solid-state fermentation; mixed bacteria; protein oligopeptide

目前, 粕作为油脂加工副产物, 其数量很大, 是生产饲料的主要原料, 由于粕的蛋白肽链过长, 不容易被肠道吸收, 所以其利用率并不高^[1-3]。在当前养殖业迅速发展的背景下, 蛋白饲料的原料来源不足、利用率不高以及原料自身特性的缺陷等制约着养殖业的发展, 如以豆粕作为主要的发酵基质, 由于其蛋白肽链过长, 不易被吸收, 另外其含有大量的抗

营养因子^[4-5]。目前国内外采用微生物发酵的方式来提高原料的利用率和质量, 而发酵得到的蛋白寡肽具有改善饲料品质、改善养殖环境、提高日增重、改善动物健康等特点^[6-8]。

目前固态发酵原料已开始由单一原料向混合原料发展。钟世荣等^[9]利用优良菌株进行固态发酵, 克服了单独发酵酱油渣时营养不全面的问题, 有利于基质间各种营养物质的互补和有益菌的生长繁殖。另外, 发酵方式已由单菌发酵向混菌发酵发展, 混菌发酵过程中, 不同微生物间具有互补性和协同性, 使酶促反应更加全面, 整体发挥正组合效应^[10-11]。

我国是水稻和小麦生产大国, 米糠和麸皮的产量较大。米糠和麦麸主要成分是纤维素, 还有少量粗蛋白质, 在发酵过程中, 纤维素提供碳源且不粘

收稿日期: 2018-05-01; 修回日期: 2018-07-27

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究资助项目(2017JY0286); 四川省教育厅自然科学基金项目(18ZB0103)

作者简介: 叶美金(1984), 女, 讲师, 博士, 研究方向为植物资源与应用(E-mail)091048@cdnu.edu.cn。

通信作者: 杨玉敏, 副研究员, 博士(E-mail) yangym12@163.com。

结,有利于微生物发酵。微生物发酵豆粕的研究较为普遍,但利用豆粕、米糠和麦麸进行发酵的研究报道较少^[12-13]。

固体发酵采用的微生物主要有酵母、枯草芽孢杆菌、根霉菌、乳酸杆菌、黑曲霉等。发酵菌种的配伍是一个比较复杂的过程,根据大量的文献^[14-16],本研究选用枯草芽孢杆菌、根霉菌、乳酸杆菌为菌种,以豆粕、米糠和麦麸的混合料作为原料,通过混菌发酵提高发酵产物蛋白寡肽含量,以期提高混合粕饲用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

混合粕:购于湖南森大饲料股份有限公司,为豆粕、米糠和麦麸的混合物,粗蛋白质含量 30.0%,蛋白寡肽含量 4.0%,水分 40%;发酵菌种:枯草芽孢杆菌(孢子数量 1.0×10^{11} 个/g)、根霉菌(孢子数量 1.0×10^9 个/g)、乳酸杆菌(孢子数量 2.0×10^9 个/g),均来自湖南森大饲料股份有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

万能粉碎机, LG10 - 2.4A 型高速离心机, SPX - 250B III 生化培养箱, THZ - 98AB 恒温振荡器,超净工作台。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵菌种种子液制备

分别称取相同质量的枯草芽孢杆菌、根霉菌、乳酸杆菌,然后进行充分混合,用生理盐水配制成浓度为 10 g/100 mL 的种子液,整个过程在无菌环境下进行。使用前 30 °C 活化 30 min。

1.2.2 发酵实验

称取一定质量的混合粕,用一定 pH 蒸馏水调节水分含量至 45%,称取 50 g 调节水分后的混合粕于 250 mL 三角瓶中,在 121 °C 湿热灭菌 30 min,冷却后接种一定量的活化的发酵菌种种子液,在一定温度下恒温发酵一定时间。

1.2.3 分析方法

粗蛋白质含量测定,参照 GB 5009.5—2016,氮换算为蛋白质的系数为 6.25;粗脂肪、粗纤维含量测定,参照张丽英^[17]方法;氨基酸测定,参照 GB 5009.124—2016;蛋白寡肽测定,参照张昆^[18]方法。

2 结果与讨论

2.1 混合粕发酵的单因素实验

2.1.1 发酵温度对蛋白寡肽含量的影响

固定发酵初始 pH 6.8、种子液接种量 4% (以混合粕质量为基础,下同)和发酵时间 60 h,将发酵体系分别置于 25、28、31、34、37 °C 的培养箱中培养,测

定发酵后蛋白寡肽含量,以确定最适发酵温度。不同发酵温度对蛋白寡肽含量的影响如图 1 所示。

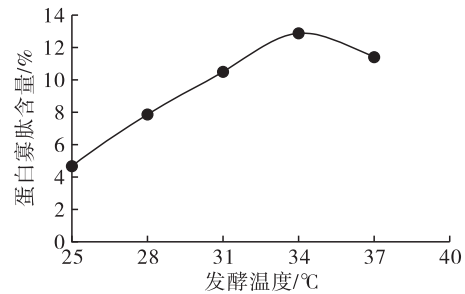


图 1 不同发酵温度对蛋白寡肽含量的影响

在发酵过程中,温度的高低主要与发酵过程中酶的反应速率、培养基中的溶氧量和传递速率等相关,进而影响菌体生长。在一定范围内,菌体的生长量随着温度的升高而逐渐增大,当达到峰值时,随着温度的增加菌体数量反而减少。由图 1 可知,在 34 °C 时发酵产物中蛋白寡肽含量最高。因此,确定 34 °C 为最适发酵温度。

2.1.2 发酵初始 pH 对蛋白寡肽含量的影响

固定发酵温度 34 °C、种子液接种量 4% 和发酵时间 60 h,将发酵体系 pH 分别调节至 6.0、6.4、6.8、7.2、7.6 作为发酵初始 pH,置于培养箱中培养,测定发酵后蛋白寡肽含量,以确定最适发酵初始 pH。不同发酵初始 pH 对蛋白寡肽含量的影响如图 2 所示。

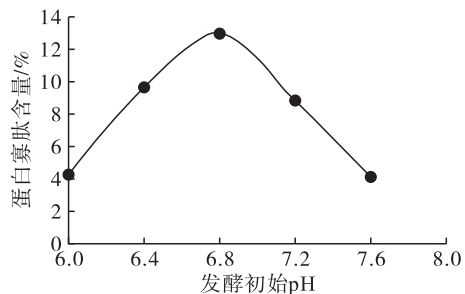


图 2 不同发酵初始 pH 对蛋白寡肽含量的影响

在发酵过程中,pH 能够影响培养基中营养成分的离子化程度,进而导致微生物对营养物质的吸收能力降低。在一定范围内菌体的生长量随着 pH 的升高而逐渐增大,当达到峰值时,又随着 pH 的增加而减少。由图 2 可知,发酵初始 pH 过低或过高均不利于菌体生长,pH 为 6.8 时蛋白寡肽含量最高。因此,以 pH 6.8 作为最适初始发酵 pH。

2.1.3 接种量对蛋白寡肽含量影响

固定发酵温度 34 °C、发酵初始 pH 6.8 和发酵时间 60 h,分别将 1%、2%、3%、4%、5% 的发酵菌种种子液接入到三角瓶中的发酵基质中,置于培养箱中培养,测定发酵后蛋白寡肽含量,以确定最适接

种量。不同接种量对蛋白寡肽含量的影响如图3所示。

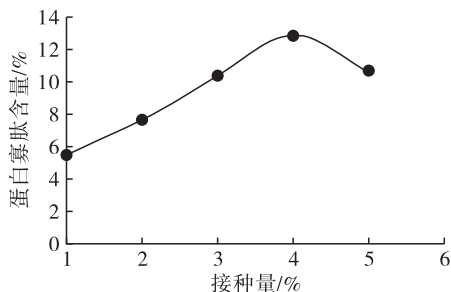


图3 不同接种量对蛋白寡肽含量的影响

菌体在发酵过程中会产生蛋白酶,可将蛋白质水解成小分子肽类及氨基酸。接种量过少达不到理想效果,而接种过量造成成本增加。由图3可知,当接种量为4%时,发酵产物蛋白寡肽含量达到最大值,继续加大接种量蛋白寡肽含量反而呈下降趋势,这说明接种量逐渐达到饱和状态,继续加大接种量可能因为发酵过程中菌体分泌过量的蛋白酶将某些小肽进一步水解成游离的氨基酸,所以发酵产物蛋白寡肽含量有下降趋势。因此,选择4%作为最佳的接种量。

2.1.4 发酵时间对蛋白寡肽含量的影响

固定发酵温度 34℃、发酵初始 pH 6.8 和接种量 4%,将发酵体系置于培养箱中培养,测定发酵后蛋白寡肽含量,以确定最适发酵时间。不同发酵时间对蛋白寡肽含量的影响如图4所示。

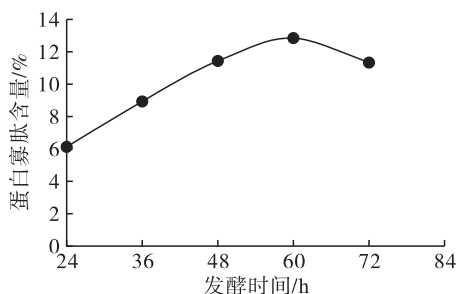


图4 不同发酵时间对蛋白寡肽含量的影响

发酵时间是影响发酵效果的重要因素之一。发酵时间过短,可能会导致菌体分泌蛋白酶量不足而影响发酵效果;发酵时间过长,生成的小肽又将被进一步水解成游离氨基酸,另外发酵周期长易感染其他杂菌,造成资源浪费和成本增加。由图4可知,60 h内随着发酵时间的延长,发酵产物中蛋白寡肽含量逐渐增大,60 h时蛋白寡肽含量达到最大值,继续发酵蛋白寡肽含量呈下降的态势。可能由于发酵后期培养基中的营养物质大量被消耗,营养物质缺乏,微生物消耗产生的蛋白寡肽^[11]。因此,确定60 h为最佳发酵时间。

2.2 混合粕发酵的正交实验优化

根据单因素实验结果,以接种量(A)、发酵初始 pH(B)、发酵温度(C)和发酵时间(D)为实验变量,以蛋白寡肽含量为考察指标,进行四因素三水平正交实验,正交实验因素水平见表1,正交实验设计及结果见表2。

表1 正交实验因素水平

| 水平 | 接种量/% | 发酵初始 pH | 发酵温度/℃ | 发酵时间/h |
|----|-------|---------|--------|--------|
| 1 | 3 | 6.4 | 31 | 48 |
| 2 | 4 | 6.8 | 34 | 60 |
| 3 | 5 | 7.2 | 37 | 72 |

表2 正交实验设计及结果

| 实验号 | A | B | C | D | 蛋白寡肽含量/% |
|-------|-----|------|-----|-----|----------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6.8 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 10.3 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 7.6 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 9.2 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 10.5 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 8.0 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 9.6 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 10.9 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 6.3 |
| k_1 | 8.2 | 8.5 | 8.6 | 7.9 | |
| k_2 | 9.2 | 10.6 | 8.6 | 9.3 | |
| k_3 | 8.9 | 7.3 | 9.2 | 9.2 | |
| R | 1.0 | 3.3 | 0.6 | 1.4 | |

由表2可知,各因素对蛋白寡肽含量的影响大小次序为:发酵初始 pH > 发酵时间 > 接种量 > 发酵温度;混合粕固态发酵最佳方案为 $A_2B_2C_3D_2$,即复合菌接种量为4%,初始发酵 pH 为 6.8,发酵温度为 37℃,发酵时间为 60 h。对正交实验得到的最佳工艺条件进行3次验证实验,蛋白寡肽含量分别为 12.9%、12.9%和 13.0%,平均为 12.9%。

2.3 发酵产物的营养价值

混合粕固态发酵前后的蛋白寡肽、粗纤维和粗脂肪的含量变化见表3,部分氨基酸含量变化见表4。

由表3可知,混合粕发酵前后的营养物质发生了一定的变化,同发酵前相比,发酵后蛋白寡肽含量提高了 222.5%,粗纤维含量下降了 26.2%,粗脂肪含量提高了 2.9%。

表3 混合粕固态发酵前后的营养成分 %

| 项目 | 发酵前含量 | 发酵后含量 | 提高率 |
|------|-------|-------|-------|
| 蛋白寡肽 | 4.0 | 12.9 | 222.5 |
| 粗纤维 | 18.7 | 13.8 | -26.2 |
| 粗脂肪 | 6.9 | 7.1 | 2.9 |

表4 发酵前后部分氨基酸含量的变化 %

| 项目 | 发酵前 | 发酵后 | 提高率 |
|------|------|------|-------|
| 赖氨酸 | 1.31 | 1.77 | 35.11 |
| 甲硫氨酸 | 0.44 | 0.52 | 18.18 |
| 苏氨酸 | 1.27 | 1.74 | 37.01 |
| 缬氨酸 | 2.14 | 2.53 | 18.22 |
| 亮氨酸 | 2.04 | 2.64 | 29.41 |
| 异亮氨酸 | 0.88 | 1.16 | 31.82 |
| 苯丙氨酸 | 1.61 | 1.98 | 22.98 |
| 天冬氨酸 | 2.54 | 3.09 | 21.65 |
| 谷氨酸 | 6.86 | 7.21 | 5.10 |
| 甘氨酸 | 0.86 | 1.12 | 30.23 |
| 脯氨酸 | 2.84 | 3.33 | 17.25 |
| 谷氨酸 | 7.25 | 7.69 | 6.07 |
| 丝氨酸 | 1.36 | 1.55 | 13.97 |
| 酪氨酸 | 0.87 | 1.02 | 17.24 |
| 组氨酸 | 1.74 | 1.86 | 6.90 |
| 精氨酸 | 2.04 | 2.06 | 0.98 |

氨基酸组成及含量是判定发酵饲料质量的重要指标之一,必需氨基酸如赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸直接影响畜禽对其他氨基酸的吸收利用。由表4可知,发酵后所有氨基酸含量都有一定的提高,特别是赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸等必需氨基酸相较于发酵前明显提高,有利于畜禽的吸收利用,混合粕饲用价值明显提高。

3 结论

以混合粕为原料,枯草芽孢杆菌+根霉菌+乳酸杆菌为发酵菌种,采用固态发酵法提高其中的蛋白寡肽含量以提高其饲用价值。通过单因素实验确定了接种量、发酵温度、初始发酵pH、发酵时间对蛋白寡肽含量影响的最佳条件,并通过正交实验确定了影响蛋白寡肽含量的因素主次顺序为:发酵初始pH>发酵时间>接种量>发酵温度。通过验证实验得到混合粕固态发酵最佳工艺条件为复合菌接种量4%,发酵温度37℃、初始发酵pH6.8、发酵时间60h。在最佳条件下,蛋白寡肽含量为12.9%。对发酵前后蛋白寡肽、粗纤维、粗脂肪含量以及氨基酸组成的对比分析表明,发酵后混合粕饲用价值明显提高。

参考文献:

- [1] 宋文龙,丛丽娜,王红英. 枯草芽孢杆菌发酵条件的优化及微生态制剂的研制[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 206-209.
- [2] 王哲奇,安晓萍,王伟伟,等. 混菌固态发酵豆粕制备

- 多肽饲料培养基的优化[J]. 粮食与饲料工业, 2013(4): 48-51.
- [3] 曲以之. 对三株益生菌的生物拮抗性和发酵工艺条件的研究[D]. 辽宁 大连:大连医科大学, 2012.
- [4] 杨建英,李元晓. 发酵豆粕的生产工艺及优点[J]. 中国饲料, 2012(18):12-14.
- [5] 李斌. 发酵豆粕的工艺研究与开发[D]. 济南:山东大学, 2010.
- [6] YIN Q Q, WANG P P, CHANG J, et al. Study on isolation of protease - producing microbes and production of high - quality protein stuffs by solid - state fermentation [C]//2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering. Nanjing: IEEE, 2011: 8542-8547.
- [7] PERES C M, PERES C, HERNÁNDEZ - MENDOZA A, et al. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - with an emphasis on table olives[J]. Trends Food Sci Tech, 2012, 26(1): 31-42.
- [8] MOUSAVI Z E, MOUSAVI S M, RAZAVI S H, et al. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria[J]. World J Microb Biot, 2011, 27(1):123-128.
- [9] 钟世荣,余伯良,林琦. 菜籽饼粕与酱油渣混合发酵生产蛋白饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2001(8): 27-29.
- [10] 韩丙倩,管军军,杨国浩,等. 一步法混菌固态发酵豆粕的工艺研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(1):19-22.
- [11] 孙林,李吕木,张邦辉,等. 多菌种固态发酵去除菜籽粕中的植酸[J]. 中国油脂, 2008, 33(8):60-63.
- [12] 王雪梅. 用冬虫夏草菌株液体发酵米糠麸皮全料的比较研究[D]. 江苏 镇江:江苏大学, 2016.
- [13] 王贻莲,扈进冬,赵吉兴,等. 麦麸米糠混合发酵生产红曲色素条件的研究[J]. 山东科学, 2015, 28(6): 121-126.
- [14] 刘剑飞. 高活性发酵豆粕生产菌株筛选及其最佳发酵条件的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2011.
- [15] 杜亚菲,吴远根,吴洁,等. 枯草芽孢杆菌固态发酵麻疯树废弃饼粕产蛋白酶初步研究[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(11):83-85.
- [16] 张吉鹏. 多菌种组合固态发酵技术及其在生产功能大豆寡肽蛋白饲料上的应用[J]. 中国饲料添加剂, 2011(2):20-25.
- [17] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2003:313-318.
- [18] 张昆. 菌酶协同固态发酵杂粕生产蛋白饲料的研究[D]. 武汉:武汉工业学院, 2012.