

## 菌酶协同改善花生粕的饲用品质

周佳慧<sup>1,2</sup>, 李晓敏<sup>1,2</sup>, 蔡国林<sup>1,2</sup>, 孙海彦<sup>3</sup>, 陆健<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省热带微生物资源重点实验室, 海口 571101)

**摘要:**花生粕是重要的蛋白饲料原料,但由于其氨基酸不平衡,特别是精氨酸与赖氨酸比例严重失衡(精氨酸与赖氨酸含量比值在3~4,理想的精氨酸与赖氨酸含量比值为1.0),限制了其在动物养殖中的应用。研究了复合酶预处理结合乳酸菌发酵花生粕对其品质的改善。结果表明:经菌酶协同处理后,花生粕粗蛋白质含量由46.4%提高至50.6%,大分子蛋白明显降解为小分子蛋白,酸溶蛋白质含量由2.3%提高至17.8%,多肽含量由1.6%提高至15.7%,蛋氨酸和赖氨酸含量分别提高了77.1%和42.0%,精氨酸降解率为18.7%,精氨酸与赖氨酸含量比值从3.7降低至2.1,总酸含量由0.6%提高到4.7%,其中乳酸含量由0.64 mg/g提高至14.63 mg/g。菌酶协同处理后的花生粕抗氧化性明显增强,其中每克菌酶协同处理后的花生粕对羟自由基的清除能力与171.6 mg V<sub>C</sub>相当,比花生粕(与47.6 mg V<sub>C</sub>相当)提高了2.6倍。

**关键词:**花生粕;氨基酸平衡;菌酶协同发酵;精氨酸降解

中图分类号:TS229;TQ929

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)09-0092-07

## Synergistic of enzymes and fermentation to improve the feed quality of peanut meal

ZHOU Jiahui<sup>1,2</sup>, LI Xiaomin<sup>1,2</sup>, CAI Guolin<sup>1,2</sup>, SUN Haiyan<sup>3</sup>, LU Jian<sup>1,2</sup>

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 3. Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract:** Peanut meal is an important raw material of protein feedstuff. However, due to the unbalanced ratios of amino acids, especially ratio of arginine to lysine (the ratio of arginine to lysine is 3-4, the ideal ratio of arginine to lysine is 1.0), so its application in animal breeding has been limited. The improvement of the quality of peanut meal by combining compound enzyme pretreatment with lactic acid bacteria fermentation was studied. The results showed that after the synergistic treatment with lactic acid bacteria and enzymes, the crude protein content of peanut meal increased from 46.4% to 50.6%, the protein was significantly degraded, the acid-soluble protein content increased from 2.3% to 17.8%, and the content of polypeptides increased from 1.6% to 15.7%. At the same time, the contents of methionine and lysine increased by 77.1% and 42.0%, respectively, and the degradation rate of arginine was 18.7%, causing the ratio of arginine to lysine reduced from 3.7 to 2.1. In addition, the total acid content increased from 0.6% to 4.7%, in which the content of lactic acid increased from 0.64 mg/g to 14.63 mg/g. The anti-

oxidation was significantly enhanced, with the hydroxyl radicals scavenging power equivalent to 171.6 mg vitamin C, which was 2.6 times higher than that of peanut meal (equivalent to 47.6 mg vitamin C).

**Key words:** peanut meal; amino acid balance;

收稿日期:2020-12-03;修回日期:2021-06-21

作者简介:周佳慧(1996),女,硕士研究生,研究方向为饲料原料的生物技术处理(E-mail)2634015283@qq.com。

通信作者:陆健,教授,博士生导师(E-mail)jlu@jiangnan.edu.cn;蔡国林,副研究员,硕士生导师(E-mail)glcai@jiangnan.edu.cn。

synergistic fermentation with bacteria and enzymes; arginine degradation

花生粕是花生经压榨制油后的副产物,含有丰富的营养物质,其中蛋白质含量高达40%~50%,氨基酸种类齐全,是一种潜在的优质蛋白饲料<sup>[1]</sup>。但是花生粕中氨基酸不平衡问题限制了其在动物养殖中的应用,如花生粕中精氨酸(Arg)与赖氨酸(Lys)比值(Arg/Lys)高达3.0~4.0,而理想的Arg/Lys约为1.0。精氨酸的过量摄入会导致动物体内氨基酸拮抗作用的产生,抑制动物限制性氨基酸(赖氨酸)的吸收,使其从尿液中大量流失,阻碍动物的正常生长繁殖<sup>[2]</sup>。与优质的蛋白饲料原料鱼粉(Arg/Lys=0.8)和豆粕(Arg/Lys=1.1)相比,花生粕的Arg/Lys过大,且蛋氨酸(Met)含量过低,仅为0.5%,过低的蛋氨酸可导致畜禽生长缓慢、发育不良,这是导致花生粕蛋白质品质不佳的重要因素。此外,花生粕中的蛋白质多为大分子蛋白,多肽、小肽和氨基酸等易被消化吸收的含氮物质含量少,造成其蛋白质消化利用率低<sup>[3]</sup>。

目前,对于花生粕的研究主要集中在通过生物技术降低其中黄曲霉毒素或是提高其各项营养指标,但并没有针对性地解决花生粕氨基酸不平衡问题。蔡国林等<sup>[4]</sup>采用卡式酵母JD-15和马克斯克鲁维酵母JD-16发酵花生粕,明显提高了赖氨酸和蛋氨酸的含量,但精氨酸含量无显著改变。任晓静<sup>[5]</sup>利用*Lactobacillus casei* R-07结合酶制剂固态发酵花生粕,发现赖氨酸含量由1.51%提高至1.76%,但Arg/Lys仍超过3.0。侯德宝等<sup>[6]</sup>利用3种微生物发酵结合复合酶制剂处理花生粕,得到的产物赖氨酸含量由1.48%提高至1.73%,蛋氨酸含量由0.50%提高至0.59%,但精氨酸含量变化并未提及。目前的研究虽然一定程度上提高了花生粕中动物限制性氨基酸(如赖氨酸、蛋氨酸)含量,但是并没有降低其过高的精氨酸含量,氨基酸拮抗反应仍然影响家畜的正常生长代谢。

目前,菌酶协同发酵植物粕已经成为我国发酵饲料的主要研究方向,本研究尝试利用酶解技术释放小分子肽和游离氨基酸(特别是定向释放游离精氨酸),通过纤维素酶破坏花生粕细胞的纤维素外壁,降低花生粕对蛋白酶的抗性,从而提高花生粕蛋白的酶解率,再通过植酸酶降解影响微生物生长的抗营养因子植酸,最后通过具有高精氨酸释放能力、高蛋白水解能力的酸性蛋白酶酶解花生粕蛋白,释放大游离精氨酸和小肽,然后利用前期从黄酒中筛选出一株能降解精氨酸且不产生生物胺等有害

物质的乳酸菌发酵处理花生粕,通过乳酸菌有效降解过量精氨酸的同时,将其他氨基酸转化为蛋氨酸和赖氨酸等动物限制性氨基酸,达到平衡花生粕氨基酸的目的,促进乳酸及乳酸盐等有益代谢产物的积累,提高花生粕饲料的营养价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

花生粕(水分含量为9.8%),山东鲁花集团有限公司;纤维素酶(酶活30 000 U/g),白银赛诺生物科技有限公司;植酸酶(酶活5 000 U/g),武汉新华扬生物股份有限公司;酸性蛋白酶(酶活50 000 U/g),潍坊康地恩生物科技有限公司;甲醛、氢氧化钠、浓硫酸、三氯乙酸、Tris、盐酸、甲醇、磷酸二氢钾、铁氰化钾、DPPH、无水乙醇、硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸、卵磷脂、2-硫代巴比妥酸、三氯化铁,国药集团化学试剂有限公司。短乳杆菌2-34,由本实验室前期自黄酒样品中分离,具有快速利用精氨酸的能力且不产生生物胺。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 4种方法处理花生粕

各方法按照以下步骤进行:①未处理:直接粉碎后的花生粕原料;②仅酶解处理:17.5 g花生粕加入250 mL蒸馏水,搅拌均匀,先加入3 000 U纤维素酶和500 U植酸酶,50℃酶解1 h,沸水浴灭酶10 min,补足蒸馏水至250 mL,再以酸性蛋白酶最佳酶解条件(通过单因素实验确定加酶量56 000 U,酶解温度50℃,酶解pH 3.0,酶解时间4 h)进行二次酶解,灭酶,经冷冻干燥并粉碎得到酶解花生粕;③菌酶协同处理:酶解步骤同上,灭酶后,调节pH 5.5,将酶解液转移至500 mL锥形瓶,121℃灭菌20 min,冷却后接种二级活化的短乳杆菌2-34( $1.0 \times 10^9$  CFU/mL),接种量5%,发酵时间48 h,发酵结束后冷冻干燥并粉碎得到酶解发酵花生粕;④仅发酵处理:17.5 g花生粕加入250 mL蒸馏水,调节pH 5.5,转移至500 mL锥形瓶,121℃灭菌20 min,冷却后接种二级活化的短乳杆菌2-34( $1.0 \times 10^9$  CFU/mL),接种量5%,发酵时间48 h,发酵结束后冷冻干燥并粉碎得到发酵花生粕。

#### 1.2.2 指标测定

##### 1.2.2.1 粗蛋白质和酸溶蛋白质含量测定

按照GB 5009.5—2016方法测定粗蛋白质含量;按照GB/T 22492—2008方法测定酸溶蛋白质含量。

### 1.2.2.2 氨基酸含量、多肽含量和多肽的相对分子质量分布测定

按照 GB 5009.124—2016 方法测定游离及水解氨基酸组成及含量;按照 GB/T 22492—2008 方法计算多肽含量,多肽含量 = 酸溶蛋白质含量 - 游离氨基酸含量;按照 GB/T 22492—2008 方法测定多肽的相对分子质量分布。

### 1.2.2.3 SDS - PAGE 分析

分别取 4 种方法处理的花生粕(60 目)各 1.00 g,用 0.03 mol/L Tris - HCl 缓冲液(pH 8.0)10.00 mL 振荡提取 2 h,然后于  $5\ 000 \times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min,取上清,再于  $10\ 000 \times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 5 min,吸取上清, $4\ ^\circ\text{C}$  冰箱保存。SDS - PAGE 分析,考马斯亮蓝 R250 染色<sup>[7]</sup>。

### 1.2.2.4 总酸和有机酸含量测定

参照文献[8],采用 0.1 mol/L NaOH 滴定法测定样品中总酸的含量(以乳酸计)。取 1.00 g 处理的花生粕样品于 50 mL 离心管,加入 10 mL 蒸馏水于摇床 200 r/min 振荡 1 h,于  $4\ 000 \times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 15 min,取上清,再于  $10\ 000 \times g$  离心 5 min,取上清经  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜过滤后置于液相瓶中待液相色谱检测,测定条件参照文献[9]。计算各样品中苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丁二酸、富马酸、丙酸、丁酸的含量。

### 1.2.2.5 还原力测定

取 4 种方法处理的样品各 1.0 g,分别与 10 mL 蒸馏水于 100 r/min 混合振荡 30 min,适当稀释,各取 1 mL 稀释样液与 2.5 mL 磷酸缓冲液、2.5 mL 1% 铁氰化钾混合。混合溶液于  $50\ ^\circ\text{C}$  恒温 20 min,迅速冷却,加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸,离心,取上清 2.5 mL,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁,反应 10 min,在波长 700 nm 处测吸光度(A)。以蒸馏水作对照。吸光度越高,说明混合溶液的还原性越强<sup>[10]</sup>。所有测定重复 3 次。

### 1.2.2.6 DPPH 自由基清除能力测定

取 4 种方法处理的样品各 1.0 g,分别与 10 mL 蒸馏水于 100 r/min 混合振荡 30 min,适当稀释,各取 2 mL 稀释样液于 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH - 无水乙醇溶液中,混合均匀,黑暗处放置 30 min,517 nm 处测定吸光度( $A_0$ );2 mL 样品稀释液与 2 mL 95% 乙醇溶液混合,测定吸光度( $A_1$ );2 mL 95% 的乙醇溶液与 2 mL DPPH - 无水乙醇溶液混合,测定吸光度( $A_2$ )<sup>[11]</sup>。按下式计算 DPPH 自由基清除率( $Y_1$ )。

$$Y_1 = \left(1 - \frac{A_0 - A_1}{A_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.2.2.7 羟自由基清除能力测定

参照文献[12],作部分修改。取 4 种方法处理的样品各 1.0 g,分别与 10 mL 蒸馏水于 100 r/min 混合振荡 30 min,适当稀释,各取 1 mL 稀释样液、1 mL 硫酸亚铁溶液(9 mmol/L,用前稀释 2 倍)、1 mL 0.30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液、1 mL 水杨酸 - 乙醇溶液(9 mmol/L,用前稀释 2 倍)混合, $37\ ^\circ\text{C}$  静置 0.5 h,510 nm 处测定吸光度( $A_{\text{样}}$ );将样液换成蒸馏水,其他条件不变,测定吸光度( $A_{\text{空}}$ );样液、硫酸亚铁、水杨酸添加量不变,不加显色剂  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,测定吸光度(A)。按下式计算羟自由基清除率( $Y_2$ )。

$$Y_2 = \left(1 - \frac{A_{\text{样}} - A}{A_{\text{空}}}\right) \times 100\% \quad (2)$$

### 1.2.2.8 抗脂质体过氧化能力测定

取 0.38 g 卵磷脂、100 mL PBS 缓冲液(0.1 mol/L,pH 7.40)冰浴搅拌,制备成乳白色悬浊液<sup>[13]</sup>。取 0.2 mL 悬浊液、1 mL 样品液(取 4 种方法处理的样品各 1.0 g,分别与 10 mL 蒸馏水于 100 r/min 混合振荡 30 min,未稀释)、1 mL  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  溶液(20 mmol/L),PBS 补足 3 mL;空白管将样品液替换为缓冲液,其他条件不变。溶液混合均匀后置于  $37\ ^\circ\text{C}$  水浴 1 h,取出后加入 2 mL TCA - TBA - HCl 混合液,混匀, $95\ ^\circ\text{C}$  水浴 15 min,迅速冷却,于  $3\ 000 \times g$  离心 10 min,取上清,于 532 nm 处测定样液吸光度( $A_{\text{样}}$ )和空白吸光度( $A_{\text{空}}$ )<sup>[14]</sup>。按下式计算脂质体过氧化物抑制率( $Y_3$ )。

$$Y_3 = \left(1 - \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{空}}}\right) \times 100\% \quad (3)$$

### 1.2.2.9 超氧阴离子自由基清除能力测定

参照文献[15],对溶液浓度作相应调整。取 2 950  $\mu\text{L}$  Tris - HCl 缓冲液(50 mmol/L,pH 8.20)于石英比色皿中,加入 50  $\mu\text{L}$  邻苯三酚溶液(30 mmol/L),颠倒混合,计时 5 min,每隔 30 s 读数 1 次 325 nm 处吸光度(A),作为空白对照, $\Delta A_{\text{空}} = A_{300} - A_{30}$ 。样品溶液:取 500  $\mu\text{L}$  样液(取 4 种方法处理的样品各 1.0 g,分别与 10 mL 蒸馏水于 100 r/min 混合振荡 30 min,未稀释)与 2 450  $\mu\text{L}$  Tris - HCl 缓冲液(50 mmol/L,pH 8.20)于比色皿,再加入 50  $\mu\text{L}$  30 mmol/L 邻苯三酚溶液,混匀,计时 5 min,每隔 30 s 读数 1 次 325 nm 处吸光度(A),为样品组, $\Delta A_{\text{样}} = A_{300} - A_{30}$ 。按下式计算超氧阴离子自由基清除率( $Y_4$ )。

$$Y_4 = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{样}}}{\Delta A_{\text{空}}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 花生粕处理前后粗蛋白质和酸溶蛋白质含量的变化

不同处理方式对花生粕粗蛋白质和酸溶蛋白质含量的影响如图1所示。

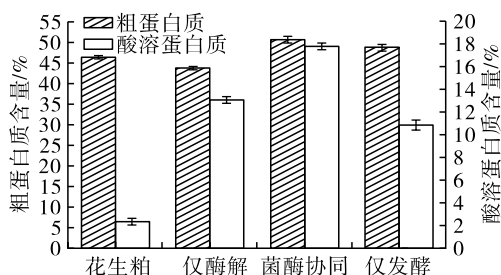


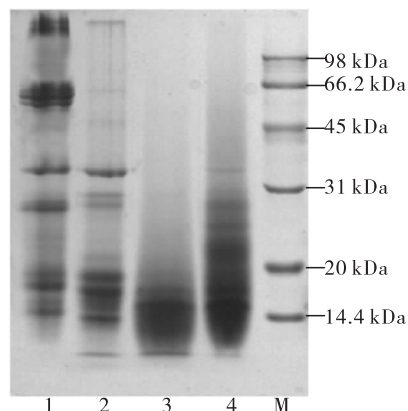
图1 不同处理方式对花生粕粗蛋白质和酸溶蛋白质含量的影响

由图1可知,与花生粕(粗蛋白质含量46.4%)相比,经菌酶协同处理(粗蛋白质含量50.6%)和仅发酵处理(粗蛋白质含量48.8%)的花生粕粗蛋白质含量分别增加了4.2个百分点和2.4个百分点。这可能是因为乳酸菌发酵花生粕的过程中,微生物自身代谢作用使得有机物被彻底氧化成 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ ,干燥后的发酵花生粕中碳、氢和氧均产生损失,其含有的氮就相对浓缩了,从而提高了发酵花生粕中粗蛋白质的含量。

酸溶蛋白质包括多肽类和游离氨基酸,是一类小分子含氮物质,这类物质更易被动物机体吸收利用,提高消化率,增加机体免疫力。由图1可知,花生粕经过菌酶协同处理后的产物酸溶蛋白质含量最高,达到17.8%,相比于花生粕(酸溶蛋白质含量2.3%)提高了15.5个百分点。王梅等<sup>[16]</sup>利用乳酸菌、酵母菌及复合蛋白酶对豆粕进行协同发酵,所得产物的酸溶蛋白质含量最高仅为10.8%;吴慧<sup>[17]</sup>筛选出的干酪乳杆菌GL-3发酵豆粕的酸溶蛋白质含量仅为8.6%。本实验中花生粕酸溶蛋白质与粗蛋白质含量分别为2.3%和46.4%,菌酶协同处理的花生粕的酸溶蛋白质与粗蛋白质含量分别为17.8%和50.6%,酸溶蛋白质占粗蛋白质含量由5.0%提高至35.2%,比单纯酶解(30.0%)高5.2个百分点,这可能是因为微生物在酶解工艺的基础上分泌蛋白酶,进一步降解了大分子蛋白,增加了多肽类物质的含量与种类,如乳酸菌Lac-K<sup>[18]</sup>、乳酸乳球菌A-18和戊糖片球菌C-11<sup>[19]</sup>都可以分泌蛋白酶。

### 2.2 花生粕处理前后蛋白分布的变化

不同方式处理后花生粕蛋白的SDS-PAGE分析如图2所示。



注:M: Marker;1.花生粕;2.仅酶解;3.菌酶协同;4.仅发酵。

图2 不同处理方式对花生粕蛋白分布的影响

由图2可知:酶解作用使得花生粕45 kDa以上的大分子蛋白基本被分解为14.4~20 kDa的小分子蛋白,20~45 kDa之间的蛋白未能分解;微生物发酵作用使得花生粕31 kDa以上的蛋白均被降解到31 kDa以下,但是蛋白分子过于分散,并不集中;而经过菌酶协同处理的花生粕,超过20 kDa的大分子蛋白已经被完全降解,降解物主要集中在14.4 kDa,降解效果良好。蔡国林<sup>[4]</sup>、侯德宝<sup>[6]</sup>等利用混合微生物发酵结合复合酶制剂处理花生粕,发现大分子蛋白明显降解为小分子蛋白。

### 2.3 花生粕处理前后多肽含量及多肽相对分子质量分布的变化

不同处理方式对花生粕多肽含量的影响如图3所示。

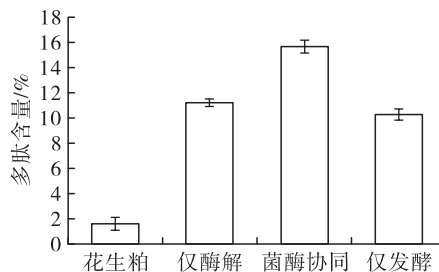


图3 不同处理方式对花生粕多肽含量的影响

由图3可以看出,与仅酶解花生粕和仅发酵花生粕相比,利用酶与乳酸菌协同处理的花生粕其多肽含量最高,多肽含量由原来的1.6%提高至15.7%。李慧娟等<sup>[20]</sup>通过枯草芽孢杆菌和植物乳杆菌混合发酵豆粕,得到小肽转化率为10.64%;毛银等<sup>[8]</sup>利用中性蛋白酶与植物乳杆菌协同发酵豆粕,所得小肽含量为10.7%。由此可见,本实验采用的酸性蛋白酶与短乳杆菌对于花生粕蛋白有很好

的降解能力。与仅酶解花生粕(多肽含量 11.1%)相比,仅发酵花生粕的多肽含量偏低(10.3%),可能是因为微生物代谢产生的蛋白酶量不足以完全水解花生粕蛋白<sup>[8]</sup>。酶解法与发酵法相结合避免了单独酶解产生苦味物质以及微生物单独发酵产酶不足的问题,进一步将大分子蛋白转化为营养丰富的肽类物质。

进一步对 4 种方法处理花生粕的多肽相对分子质量分布进行测定,结果见表 1。

表 1 不同处理方式对花生粕多肽相对分子质量分布的影响

相对分子质量/Da	多肽含量/%			
	花生粕	仅酶解	菌酶协同	仅发酵
> 15 000	36.34	16.78	0	0
10 000 ~ 15 000	0	0	1.81	19.24
5 000 ~ 10 000	5.70	5.84	6.36	15.36
3 000 ~ 5 000	2.27	4.44	7.28	8.41
2 000 ~ 3 000	1.11	4.34	5.40	3.76
1 000 ~ 2 000	1.36	7.01	8.43	3.97
500 ~ 1 000	1.74	9.63	9.52	3.54
100 ~ 500	10.76	23.13	28.53	11.35
< 100	40.72	28.83	32.67	34.38

由表 1 可知,花生粕中相对分子质量超过 5 kDa 的大分子多肽占多肽总量的 42.04%,经过仅酶解处理、菌酶协同处理、仅发酵处理的花生粕,超过 5 kDa 的多肽含量均有所降低,其中菌酶协同处理对花生粕多肽的相对分子质量改变最大,超过 5 kDa 大分子多肽含量降低至 8.17%。相对分子质量在 3 ~ 5 kDa 的多肽在菌酶协同处理与仅发酵处理的花生粕中含量相差不大,而相对分子质量在 1 ~ 3 kDa 的多肽在菌酶协同处理与仅发酵处理的花生粕中含量相差较大,分别为 13.83%、7.73%。花生粕中小于 1 kDa 的小分子多肽含量为 53.22%,酶解处理后小分子多肽含量升高为 61.59%,再经过乳酸菌发酵后,小分子多肽含量进一步增加至 70.72%,仅发酵的花生粕小分子多肽含量最少,为 49.27%。相对于其他两种方法,菌酶协同处理使得花生粕大分子蛋白逐渐转变为小分子多肽,更有利于生产高营养型蛋白饲料。

#### 2.4 花生粕处理前后氨基酸的变化

花生粕处理前后,不同处理方式对花生粕氨基酸组成的影响如表 2 所示。

由表 2 可知:以花生粕作为对照,酶解使得花生粕中部分 Arg 游离出来,而短乳杆菌 2-34 基本能够降解存在于溶液中的所有 Arg(>90%);与仅发酵的花生粕相比,经过酶解的花生粕中游离 Met 及

Lys 含量明显更高,其中经过菌酶协同处理的花生粕所游离出的 Met 与 Lys 含量最高。

表 2 不同处理方式对花生粕氨基酸含量的影响 %

氨基酸类型	处理方式	Arg	Lys	Met
游离氨基酸	花生粕	0.34	0.02	0.00
	仅酶解	0.86	0.08	0.03
	菌酶协同	0.03	0.15	0.05
	仅发酵	0.02	0.04	0.01
水解氨基酸	花生粕	5.29	1.43	0.48
	仅酶解	5.31	1.55	0.47
	菌酶协同	4.30	2.03	0.85
	仅发酵	5.19	1.58	0.55

菌酶协同处理花生粕中部分 Arg 被酶解成游离状态,再经过乳酸菌吸收利用,最终可能转化为 Met、Lys 或其他物质;而仅酶解或仅发酵花生粕的氨基酸之间连接的肽键不能被打开,水解力度不足以释放处于紧密结合状态的 Arg。相对于 Arg 含量的改变,经过乳酸菌发酵的花生粕中 Lys 和 Met 含量增加幅度更明显,经过菌酶协同处理后,花生粕的水解 Arg 由 5.29% 降低至 4.30%,降解率为 18.7%,水解 Met 的含量由 0.48% 增加至 0.85%,水解 Lys 的含量由 1.43% 增加至 2.03%,Met 和 Lys 含量分别增加了 77.1% 和 42.0%,Arg/Lys 由原来的 3.7 降低为 2.1,这表明该乳酸菌可能具有较强的氨基酸转化能力。

#### 2.5 花生粕处理前后总酸及有机酸含量的变化

不同处理方式对花生粕总酸及 pH 的影响见图 4。

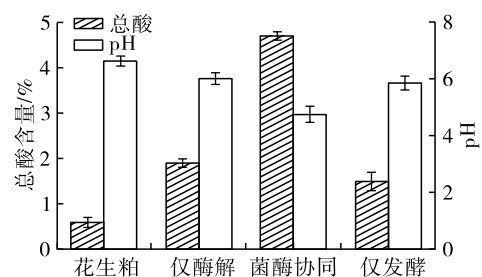


图 4 不同处理方式对花生粕总酸及 pH 的影响

由图 4 可知,pH 随总酸含量的升高而降低。经过酸性蛋白酶的酶解,酶解产物总酸含量由 0.6% 提高至 1.9%,这可能是因为酶解使花生粕释放出了酸性氨基酸,如赖氨酸、精氨酸和组氨酸<sup>[21]</sup>。通过菌酶协同处理后,发酵产物总酸含量最高,达到 4.7%。侯德宝等<sup>[6]</sup>通过菌酶混合发酵花生粕,总酸含量由 0.7% 提高至 2.8%。任晓静<sup>[5]</sup>筛选出的脱毒、产酸能力强的干酪乳杆菌 R-07 使花生粕总酸含量达到 3.3%。在饲料工业中添加有机酸可以



有效提高高龄动物对营养物质的消化率,减少营养障碍<sup>[22]</sup>。

不同处理方式对花生粕有机酸含量的影响见表3。

表3 不同处理方式对花生粕有机酸含量的影响 mg/g

有机酸	花生粕	仅酶解	菌酶协同	仅发酵
苹果酸	0.61 ± 0.01	1.02 ± 0.10	0.96 ± 0.01	0.24 ± 0.00
乳酸	0.64 ± 0.47	1.31 ± 0.00	14.63 ± 0.15	1.55 ± 0.01
乙酸	1.25 ± 0.01	1.14 ± 0.01	14.42 ± 0.02	4.82 ± 0.01
柠檬酸	1.45 ± 0.00	1.57 ± 0.01	12.82 ± 0.02	6.53 ± 0.11
丁二酸	1.14 ± 0.00	0.71 ± 0.02	0.88 ± 0.02	1.58 ± 0.08
富马酸	0.02 ± 0.00	0.17 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.16 ± 0.02
丙酸	0.12 ± 0.00	0.43 ± 0.02	2.29 ± 0.01	1.17 ± 0.01
丁酸	0.33 ± 0.00	0.91 ± 0.01	0.51 ± 0.38	0.37 ± 0.03

由表3可知,菌酶协同处理花生粕可大大促进乳酸(14.63 mg/g)、乙酸(14.42 mg/g)和柠檬酸(12.82 mg/g)的合成,与毛银等<sup>[23]</sup>筛选出的植物乳杆菌发酵豆粕产酸能力相比,本实验乳酸菌发酵花生粕产生的总酸及有机酸含量更高、产酸能力更强。柠檬酸、乳酸等有机酸一方面能够产生芳香气味,改善饲料适口性,另一方面能够刺激味蕾,增加唾液分泌,增强食欲,促进牲畜的采食,加快生长<sup>[23]</sup>。与单一有机酸相比,复合有机酸更有利于降低动物肠道pH、抑制有害菌的生长、提高消化酶活性。何荣香等<sup>[24]</sup>通过饲喂断奶仔猪含有复合有机酸的饮水和饲料,发现仔猪腹泻率降低,免疫球蛋白含量增加,消化道黏膜免疫效应因子增加。与菌酶协同处理的花生粕相比,仅用乳酸菌发酵的花生粕产酸量并不高,这可能是因为乳酸菌自身产酶量少,不能有效打开花生粕中淀粉与蛋白质的交联状态,导致微生物生长速率降低,代谢能力减弱,产酸量减少<sup>[25]</sup>。

## 2.6 花生粕处理前后抗氧化能力的变化

不同处理方式对花生粕抗氧化性的影响如图5所示。

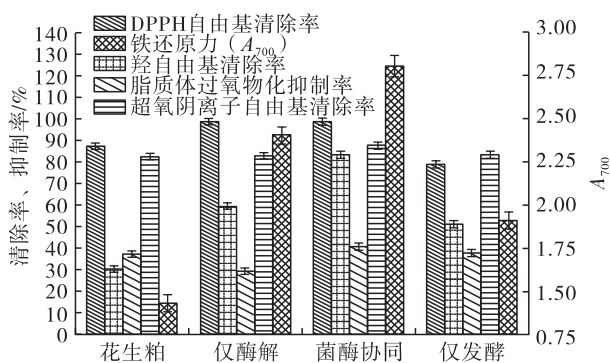


图5 不同处理方式对花生粕抗氧化能力的影响

由图5可知,与其他方法相比,菌酶协同处理花

生粕对DPPH自由基(清除率98.7%)、羟自由基(清除率83.3%)及超氧阴离子自由基(清除率87.9%)的清除能力均最强,对铁离子还原力(2.81)和脂质体过氧化的抑制能力(抑制率40.5%)也最强。这可能是因为在蛋白酶水解释放花生粕中抗氧化肽的基础上,乳酸菌进一步发酵,产生了更多的抗氧化性物质,这表明相较于仅酶解或仅发酵处理,菌酶协同处理更能够提高产物的整体抗氧化性。比较花生粕与仅酶解、菌酶协同和仅发酵花生粕对脂质体过氧化物的抑制率,发现后3种处理方式对于脂质体过氧化的抑制能力都不强,这可能是由于花生粕含有少量油脂,自身存在脂肪氧化现象,因此对于脂质体的抑制作用较弱。以不同浓度 $V_C$ 同法制作DPPH自由基清除率、铁还原力、羟自由基及超氧阴离子自由基清除率标准曲线(略),计算出经菌酶协同处理的花生粕,每克干物质的抗氧化能力分别相当于0.9、145.1、171.6、5.0 mg  $V_C$ ,表明该酶解发酵产物对羟自由基具有极强的清除能力。与花生粕相比,菌酶协同处理花生粕每克干物质对DPPH自由基的清除率、铁还原力、羟自由基的清除率和超氧阴离子自由基的清除率分别提高了0.11、1.2、2.6、0.09倍(均换算成 $V_C$ 进行计算)。将抗氧化性增强的饲料饲喂给动物,有利于减少体内自由基,提高动物免疫力,使肉质更加紧实鲜美、绿色健康<sup>[26]</sup>。

## 3 结论

通过先酶解后发酵的生物技术法处理花生粕,比较4种方法对花生粕中粗蛋白质、酸溶蛋白质、多肽含量、多肽相对分子质量、氨基酸组成、总酸、常见有机酸及抗氧化性的影响。结果表明,经过菌酶协同处理的花生粕整体品质得到了极大的改善。花生粕酸溶蛋白质与粗蛋白质含量分别为2.3%和46.4%,经过菌酶协同处理的花生粕酸溶蛋白质与粗蛋白质含量分别为17.8%和50.6%,酸溶蛋白质占粗蛋白质含量由5.0%提高至35.2%,水解氨基酸中的Arg由5.29%降低至4.30%,Met由0.48%提高至0.85%,Lys由1.43%提高至2.03%,Met和Lys含量分别增加了77.1%和42.0%,Arg/Lys由原来的3.7降低为2.1,花生粕氨基酸不平衡问题得到明显缓解。总酸含量由0.6%提高到4.7%,其中乳酸含量由0.64 mg/g提高到14.63 mg/g,有益代谢产物乳酸的增加有利于减少大肠杆菌、沙门氏菌等腐败细菌的滋生,延长储存期。菌酶协同处理花生粕的抗氧化性明显增强,其中每克菌酶协同处

理花生粕对羟自由基的清除率与 171.6 mg V<sub>C</sub> 相当,比花生粕(47.6 mg V<sub>C</sub>)提高了 2.6 倍。

#### 参考文献:

- [1] 王玮. 混合菌种发酵花生粕制备多糖和抗氧化肽的工艺研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2014.
- [2] 张再明, 杨琳, 侯水生. 动物营养中赖氨酸与精氨酸相互作用关系的研究进展[J]. 饲料广角, 2010(21): 26-28.
- [3] 梅娜, 周文明, 胡晓玉, 等. 花生粕营养成分分析[J]. 西北农业学报, 2007(3): 96-99.
- [4] 蔡国林, 郑兵兵, 王刚, 等. 微生物发酵提高花生粕营养价值的初步研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(5): 31-34.
- [5] 任晓静. 微生物发酵提高花生粕品质的初步研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2013.
- [6] 侯德宝, 蔡国林, 朱德伟, 等. 生物技术法处理对花生粕饲用品质影响的研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(6): 93-96.
- [7] 李妍, 松长青, 周本宏. 安石榴昔的抗菌活性筛选及对金黄色葡萄球菌的作用机制研究[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1492-1497.
- [8] 毛银, 陆春波, 李国辉, 等. 菌酶协同发酵豆粕工艺的优化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(14): 108-114.
- [9] ZHAO M, HUANG D X, ZHANG X J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate - degradation pathway [J]. *Metabolic Eng*, 2018, 47: 254-262.
- [10] 魏明秀. 微生物发酵花生粕制备功能性短肽的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2013.
- [11] 刘红梅. 花生抗氧化肽的制备及其功能特性的研究[D]. 山东 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [12] 吴杨洋, 周妍汝, 刘春燕, 等. 灵芝多糖提取工艺优化及抗氧化活性的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4636-4642.
- [13] 张丽芬, 韩娅婷, 邵佩兰, 等. 红枣可溶性膳食纤维的抗脂质过氧化作用[J]. 北方园艺, 2017(21): 50-56.
- [14] 马永强, 杨秋慧, 王鑫, 等. 超声波-乙醇法提取树莓酮及抗脂质过氧化研究[J]. 包装工程, 2020, 41(5): 23-30.
- [15] 王娟. 饲用乳酸菌的筛选及其抑菌功能物质的初步研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2016.
- [16] 王梅, 谢全喜, 侯楠楠, 等. 三种益生菌发酵剂固态发酵对豆粕营养品质的影响[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 115-119.
- [17] 吴慧. 乳酸菌固态发酵植物饼粕饲料的研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2016.
- [18] 程旺开. 产蛋白酶乳酸菌的筛选及发酵豆奶产酶条件优化[J]. 芜湖职业技术学院学报, 2018, 20(1): 1-5.
- [19] 李丹阳, 李宇辉, 高云云, 等. 新疆哈萨克族风干肉中产蛋白酶乳酸菌的筛选及酶学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 57-63.
- [20] 李慧娟, 孙云鹏, 丁鹏程, 等. 混合菌固态发酵豆粕制备大豆活性肽[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 121-126.
- [21] 魏新颜, 苏国万, 孙为正. 鸡肉蛋白钙离子螯合肽酶解工艺的优化研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 168-173, 330.
- [22] 卢艳敏, 刘海鹏. 有机酸在饲料中的应用[J]. 现代农村科技, 2018(2): 73-75.
- [23] 毛银, 邹宗胜, 邓禹. 1 株植物乳杆菌发酵豆粕产有机酸的研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 43-48.
- [24] 何荣香, 吴媛媛, 韩延明, 等. 复合有机酸对断奶仔猪生长性能、血清生化指标、营养物质表观消化率的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(7): 3118-3126.
- [25] 刘江英. 多菌种联合发酵饲料的优化及其对肉鸡抗沙门氏菌感染能力的影响[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2018.
- [26] 王宪举. 饲喂黄芪对藏羊生长、生理代谢和肉品质的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.

#### · 公益广告 ·



# 节能减排，提质增效！

《中国油脂》宣