

微生物复合发酵对豆粕营养品质的影响

李锡阁^{1,2} 周成翀^{1,2} 吴志新^{1,2,3} 王辉¹ 罗燕儿² 陈孝煊^{1,2,3}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 武汉 430070;
3. 水产养殖国家级实验教学示范中心(华中农业大学), 武汉 430070

摘要 从4种具有优良发酵豆粕能力的微生物(枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、米根霉、产黄青霉)中筛选最优发酵菌株组合,以粗蛋白含量和大豆肽含量为评价标准,对发酵工艺条件进行优化,并对豆粕固态发酵前后的营养物质含量和抗营养因子变化进行分析。结果显示:枯草芽孢杆菌 B-8 和米根霉 M-1 为最优发酵菌株组合。复合发酵最佳发酵工艺条件为:枯草芽孢杆菌和米根霉同时接入到豆粕中,两菌株接种比例 2:1,发酵总接种量 10%,发酵温度 40℃,料水比 1.0:1.4(质量比),发酵时间 96 h。豆粕经复合发酵后,发酵产物中大豆肽、粗蛋白、粗灰分、粗脂肪含量较发酵前均得到显著提升,水分含量显著下降,大分子蛋白质基本降解为 10 ku 以下的小分子,大豆球蛋白、β-伴大豆球蛋白和胰蛋白酶抑制因子含量显著低于未发酵豆粕。结果表明,豆粕经复合发酵后营养成分显著增加,抗营养因子含量显著降低,营养品质得到改善。

关键词 豆粕; 复合发酵; 工艺优化; 大豆肽; 营养品质

中图分类号 TQ 920.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0123-09

随着中国经济的不断发展,人们对水产品的需求日益增长。为满足国民对水产品日益增长的需求,我国水产养殖行业发展迅速,规模越来越大,对动物性蛋白原料的需求也愈加旺盛^[1]。但是我国鱼粉、虾粉、骨粉等动物性蛋白原料生产规模小,长期处于进口状态^[2],导致鱼粉价格不断上涨。因此,目前开发一种价格低廉、营养均衡的植物蛋白源替代鱼粉非常迫切。

豆粕是主要的饲料原料之一,其蛋白质含量为 40%~50%,脂肪为 1%~2%,碳水化合物为 10%~15%^[3],相比于其他植物性蛋白源而言,豆粕来源广,价格低,营养较均衡。然而豆粕中存在多种抗营养因子如大豆抗原蛋白^[4](包括大豆球蛋白和β-伴大豆球蛋白等)、胰蛋白酶抑制因子^[5]等,会降低饲料利用率,抑制动物生长性能甚至导致疾病。

采取微生物固态发酵豆粕是降解豆粕抗营养因子与改善营养质量的可行方法^[6]。发酵过程中微生物可将豆粕中大分子蛋白质降解为活性大豆肽及游离氨基酸^[7-8],除去多种抗营养因子,平衡豆粕氨基酸,提高其消化利用率^[9]。近年来有研究发现多菌

种联合发酵豆粕可以利用微生物之间互补的关系,产生优于单菌发酵的效果^[10]。在豆粕固态发酵过程中,菌种不同,工艺参数不同,都会影响产品质量。本研究从4株具有优良发酵能力的微生物(枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、米根霉、产黄青霉)中筛选出最优菌株组合,对发酵工艺条件进行优化,并对发酵前后营养物质和抗营养因子含量变化进行测定,以期获得利用豆粕的更好的方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与菌种

豆粕:由湖北海大饲料有限公司提供。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* B-8)、米根霉(*Rhizopus oryzae* M-1)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Y-3)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* M-2);为笔者所在实验室分离筛选所得。

1.2 培养基

PDA 培养基:葡萄糖 20.0 g,马铃薯浸出粉 6.0 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,自然 pH;若为固体培养基,还需加入 20.0 g 琼脂。121℃灭菌 20 min。

收稿日期:2019-02-18

基金项目:湖北省技术创新专项(2018ABA103)

李锡阁,硕士研究生。研究方向:水产动物营养。E-mail: 81602981@qq.com

通信作者:陈孝煊,教授。研究方向:水产微生物学。E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

LB培养基:胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 5.0 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH (7±0.2);若为固体培养基,还需加入 20.0 g 琼脂。121 ℃灭菌 20 min。

1.3 试验方法

1)种子液的制备。用接种环挑取平板上已活化的枯草芽孢杆菌和酿酒酵母单菌落分别接入盛有 15 mL LB 液体培养基和 PDA 液体培养基的 30 mL 锥形瓶中。将枯草芽孢杆菌、酵母菌分别置于 37、32 ℃恒温摇床 180 r/min 培养 24 h。24 h 后分别取 1 mL 菌液转入装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,培养至各菌株稳定期。用接种环挑取平板上活化的米根霉和产黄青霉单菌落分别接入到 PDA 斜面培养基上,32 ℃下培养 72 h,待孢子长满后用 10 mL 0.1%吐温 80 水反复冲洗,收集孢子于离心管中。在无菌条件下将各菌株培养液适当稀释,对枯草芽孢杆菌和酿酒酵母种子液采用平板菌落计数,对米根霉和产黄青霉孢子液采用显微计数。各菌株种子液活菌数调整为 1.0×10^8 cfu/mL。

2)固态发酵方法。取 30 g 豆粕经粉碎,过 0.85 mm 孔径筛后,放入 250 mL 锥形瓶中,121 ℃高压灭菌 15 min,在 60 ℃下烘干 24 h,冷却至室温后使用。在灭菌豆粕中添加无菌水,接种种子液,搅拌均匀后密封,一定温度下进行固态发酵(湿度为 50%~70%)。豆粕发酵后,在 60 ℃下烘干 48 h,经高速粉碎机粉碎,过 0.25 mm 孔径筛后于 -20 ℃保存。每组试验重复 3 次。

3)确定复合发酵菌株组合。将 4 种菌株的种子液以不同比例同时接入到豆粕中,总接种量为豆粕质量的 10%,料水比 1.0:1.0(质量比),在 32 ℃下固态发酵 72 h,4 种复合发酵菌株组合的比例见表 1。优化发酵工艺均以发酵产物中粗蛋白含量和大豆肽含量为评价指标。

4)发酵菌株组合的接种比例。将枯草芽孢杆菌和根霉的种子液以不同比例同时接种到豆粕中,总接种量为豆粕质量的 10%,料水比 1.0:1.0(质量比),在 32 ℃下固态发酵 72 h,枯草芽孢杆菌和米根霉的种子液不同接种比例见表 2。

5)发酵菌株组合的接种顺序。将枯草芽孢杆菌和米根霉的种子液按体积比 2:1 以不同接种顺序接种到豆粕中,总接种量为豆粕质量的 10%,料水比 1.0:1.0(质量比),在 32 ℃下固态发酵

72 h,枯草芽孢杆菌和米根霉的种子液不同的接种顺序如表 3 所示。

表 1 不同比例的 4 种复合发酵菌株组合

Table 1 Combinations of four complex fermentation strains with different proportions

组别 Group	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	米根霉 <i>R. oryzae</i>	产黄青霉 <i>P. chrysogenum</i>
1	1	1	0	0
2	1	0	1	0
3	1	0	0	1
4	1	1	1	0
5	1	1	0	1
6	1	0	1	1
7	1	1	1	1

注:1 代表组合中存在该菌株,0 代表组合不存在该菌株。

Note:1 represented the presence of this strain in the combination,and 0 represented the absence of this strain in the combination.

表 2 复合发酵豆粕菌株组合不同的接种比例

Table 2 Combined fermentation of strains with different inoculation ratios

组别 Group	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	米根霉 <i>R. oryzae</i>
1	1	1
2	2	1
3	3	1
4	1	2
5	1	3

注:组 1 为枯草芽孢杆菌:米根霉(V/V)=1:1,其他类推。

Note:Group 1 was K:P(V/V)=1:1,and so on.

表 3 复合发酵豆粕菌株组合不同的接种顺序

Table 3 Combined fermentation of strains with different vaccination sequences

组别 Group	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	米根霉 <i>R. oryzae</i>
1	0	0
2	0	24
3	0	48
4	24	0
5	48	0

注:0 代表发酵 0 h 时接种;24 代表发酵 24 h 时接种;48 代表发酵 48 h 时接种。Note:0 represented inoculation at 0 h after fermentation;24 means inoculation after 24 hours of fermentation;48 means inoculation after 48 hours of fermentation.

6)发酵条件(总接种量、发酵温度、料水比、发酵时间)的优化。通过对比分析笔者之前的单菌发酵实验结果,选取对发酵豆粕营养成分有较大影响的 4 个因素按 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,其中包

括枯草芽孢杆菌和米根霉复合发酵的总接种量、料水比、发酵时间、发酵温度,每个水平设置 3 个重复。以发酵产物中粗蛋白含量和大豆肽含量为指标,确

定复合发酵豆粕最佳的发酵条件。优化复合发酵豆粕的发酵条件(总接种量、发酵温度、料水比、发酵时间)的正交试验设计如表 4 所示。

表 4 优化复合发酵豆粕发酵条件的正交试验设计

Table 4 Orthogonal experimental design for optimization of fermentation conditions

水平 Levels	接种量/% Inoculation quantity (A)	料水比 Feed : water (B)	发酵时间/h Fermentation time (C)	发酵温度/℃ Fermentation temperature (D)
1	6	1.0 : 1.0(1)	72	32
2	10	1.0 : 1.4(2)	96	36
3	14	1.0 : 1.7(3)	120	40

7)验证试验。称取 30 g 灭菌豆粕放入 250 mL 锥形瓶中,加入已灭菌的蒸馏水,在最佳发酵条件下进行固态发酵,对发酵豆粕(fermented soybean meal)与未发酵豆粕(unfermented soybean meal)主要的营养成分和抗营养因子水平进行对比分析,以验证复合发酵豆粕的效果。

8)豆粕营养成分测定。水分:依据国家标准 GB 5009.3—2016,采用直接干燥法测定水分含量;灰分测定:依据国家标准 GB 5009.4—2016,采用高温灼烧法测定灰分含量;粗蛋白:依据国家标准 GB 5009.5—2010,采用微量凯氏定氮法测定蛋白质含量;粗脂肪:依据国家标准 GB/T 6433—2006,采用索氏抽提法测定粗脂肪含量。

9)大豆肽含量测定。通过 Folin-酚法测定一系列已知浓度的牛血清蛋白溶液,制作标准曲线。准确称取 1 g(精确至 0.01 g)豆粕样品,定容于 10 mL 15%三氯乙酸溶液中,180 r/min 振荡 10 min 后静置 5 min,提取其中的酸溶性蛋白,然后过滤取滤液;准确取 1 mL 稀释 50 倍后的滤液于试管中,于 650 nm 下测定吸光度,计算大豆肽含量。

10)抗原蛋白的定性分析。根据蔡冬梅等^[11]的方法,通过 SDS-PAGE 对抗原蛋白进行定性分析,称取未发酵豆粕、灭菌豆粕和发酵豆粕各 1.0 g,分别加入 20 mL 0.03 mol/L 的 PSQ 提取液(0.035 mol/L PBS(含磷酸氢二钠 10.91 g/L,磷酸二氢钠 0.71 g/L,氯化钠 9 g/L,pH 值 7.6),添加 1.5% SDS、0.1 mol/L 巯基乙醇),于室温下振荡浸提 1 h 后,4 000 r/min 下离心 20 min,取上清 40 μ L 加入 10 μ L 的 5 倍样品缓冲液,沸水浴 5 min 后,取 10 μ L 上样液,加入电泳孔中,200 V 电压恒压电泳 40

min。电泳完毕后将胶取下,用考马斯亮蓝染色液染色 1 h,用脱色液脱色摇床脱色,于凝胶成像系统进行成像处理,其图像利用 Quantity One 软件进行分析。

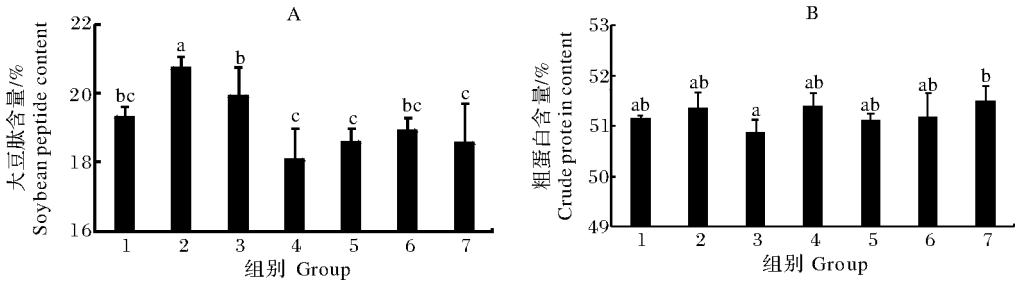
11)大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、胰蛋白酶抑制因子的测定。通过酶联免疫吸附双抗体夹心法(ELISA)对大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、胰蛋白酶抑制因子测定。在预先包被不同抗原蛋白捕获抗体的包被微孔中,依次加入标本、标准品、HRC 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色,TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的抗原蛋白呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),计算样品浓度。

12)数据处理。通过 SPSS 22.0 for Windows 对试验数据进行统计分析。其中正交试验数据采用一般线性模型单变量进行极差与方差分析,由于重复取样,无空列提供一次误差,所以将重复取样误差作为试验误差来检验显著性。其他采用单因素方差分析,若差异显著,则用 Duncan's 检验法进行多重比较,结果以“平均值 \pm 标准差”表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 确定复合发酵菌株组合

不同菌株组合发酵豆粕中大豆肽和粗蛋白含量结果如图 1 所示,第 2 组(枯草芽孢杆菌和米根霉)组合发酵豆粕大豆肽含量最高,为 21.37%,显著大于其他菌株组合;粗蛋白含量为 51.36%,次于组 7(51.50%)($P > 0.05$)。故选取枯草芽孢杆菌和米根霉作为复合发酵菌株组合进行后续研究。



图中数据标不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。处理组合见表 1。Values with different letter superscripts meant significant difference ($P < 0.05$), the following figure was the same. Treatment combination is shown in table 1.

图 1 不同菌株组合发酵的豆粕大豆肽(A)和粗蛋白(B)含量

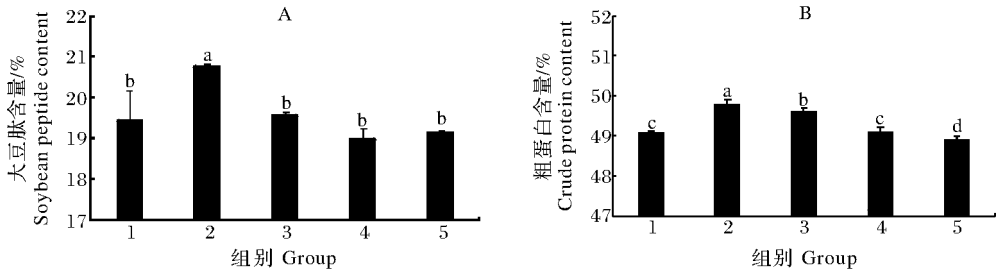
Fig.1 Peptide(A) and crude protein(B) content of soybean meal fermented by different strains

2.2 复合发酵豆粕菌株组合的接种比例

菌株不同的接种比例对发酵豆粕的影响结果如图 2 所示。当枯草芽孢杆菌和米根霉的种子液比例为 2:1 时,发酵产物中的大豆肽含量和粗蛋白含量最高,分别为 20.74% 和 49.78% ($P < 0.05$)。

2.3 复合发酵豆粕菌株组合的接种顺序

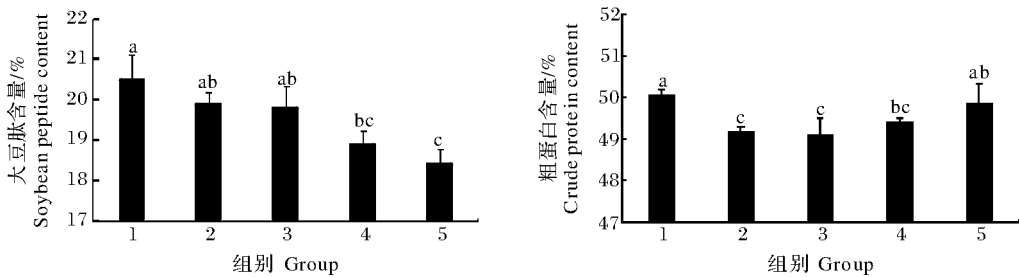
菌株的接种顺序对发酵豆粕的影响结果如图 3 所示。同时接种枯草芽孢杆菌和米根霉时,发酵产物中的大豆肽含量和粗蛋白含量均为最大值,显著高于其他组,分别为 20.46% 和 50.05% ($P < 0.05$)。



处理组合见表 2。Treatment combination is shown in table 2.

图 2 菌株组合间的接种比例对发酵豆粕的影响

Fig.2 Effects of inoculation proportion between strains on fermented soybean meal



处理组合见表 3。Treatment combination is shown in table 3.

图 3 菌株组合的接种顺序对发酵豆粕的影响

Fig.3 Effect of inoculation sequence of strain combinations on fermented soybean meal

2.4 复合发酵豆粕的发酵条件(总接种量、发酵温度、料水比、发酵时间)

以大豆肽含量变化为指标,不同发酵条件的正交试验结果见表 5。从表 5 可以看出,4 个因素对大豆肽影响程度为 $D > B > A > C$,即发酵温度对大豆肽含量影响最大,其次为料水比;方差分析结果显示 4 个因素对发酵产物的大豆肽含量均为极显著性影

响($P < 0.01$) (表 6),且温度对发酵过程影响最显著,最佳发酵条件为 $D_3 B_2 A_2 C_3$ 。粗蛋白含量极差分析发现影响程度为 $D > A > B > C$,即发酵温度对发酵产物粗蛋白含量产出影响最大,其次为发酵总接种量(表 7);方差分析结果表明,发酵总接种量、料水比、发酵温度对发酵产物的粗蛋白含量具有显著影响,其中发酵温度和发酵总接种量极显著影响

表 5 不同发酵条件下发酵豆粕大豆肽含量的正交试验结果

Table 5 Orthogonal experimental results of soybean peptide content in soybean meal under different fermentation conditions

试验号 Test No.	因素 Factors				大豆肽含量/% Soybean peptide content			
	接种量/% Inoculation quantity (A)	料水比 Feed : water (B)	发酵时间/h Fermentation time(C)	发酵温度/℃ Fermentation temperature(D)	I	II	III	和 Sum
1	6(1)	1.0 : 1.0(1)	72(1)	32(1)	18.88	18.71	18.78	56.37
2	6(1)	1.0 : 1.4(2)	96(2)	36(2)	16.49	16.29	16.34	49.12
3	6(1)	1.0 : 1.7(3)	120(3)	40(3)	17.78	17.06	16.92	51.76
4	10(2)	1.0 : 1.0(1)	96(2)	40(3)	19.34	19.56	19.85	58.75
5	10(2)	1.0 : 1.4(2)	120(3)	32(1)	19.60	20.65	19.91	60.16
6	10(2)	1.0 : 1.7(3)	72(1)	36(2)	15.24	14.76	14.64	44.64
7	14(3)	1.0 : 1.0(1)	120(3)	36(2)	15.48	15.33	15.59	46.40
8	14(3)	1.0 : 1.4(2)	72(1)	40(3)	20.58	21.57	19.68	61.83
9	14(3)	1.0 : 1.7(3)	96(2)	32(1)	14.93	15.61	15.80	46.34
K_1	157.23	161.51	162.82	162.85				
K_2	163.54	171.09	154.19	140.14				
K_3	154.55	142.72	158.31	172.33				
k_1	52.41	53.84	54.27	54.28				
k_2	54.51	57.03	51.40	46.71				
k_3	51.52	47.57	52.77	57.44				
R	3.00	9.45	2.88	10.73				
最佳组合 Best collaboration					$D_3B_2A_2C_3$			

表 6 大豆肽含量方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of soybean peptide content

方差来源 Source of variation	A	B	C	D	误差 Error
离差平方和 Sum of squares of deviations	4.740	46.268	4.136	60.787	3.632
自由度 Freedom	2.000	2.000	2.000	2.000	18.000
均方 Mean square	2.370	23.134	2.068	30.394	0.202
F 值 F-value	11.745	114.651	10.248	150.631	
F 临界值 F critical-value		$F_{0.01}(2,18)=6.013$		$F_{0.05}(2,18)=3.555$	

表 7 不同发酵条件下发酵豆粕粗蛋白含量的正交试验结果

Table 7 Orthogonal experimental results of crude protein content in soybean meal under different fermentation conditions

试验号 Test No.	因素 Factors				粗蛋白含量/% Crude protein content			
	接种量/% Inoculation quantity(A)	料水比 Feed : water (B)	发酵时间/h Fermentation time(C)	发酵温度/℃ Fermentation temperature(D)	I	II	III	和 Sum
1	6(1)	1.0 : 1.0(1)	72(1)	32(1)	50.24	48.34	49.45	148.03
2	6(1)	1.0 : 1.4(2)	96(2)	36(2)	51.66	52.17	51.60	155.43
3	6(1)	1.0 : 1.7(3)	120(3)	40(3)	52.08	51.87	51.51	155.46
4	10(2)	1.0 : 1.0(1)	96(2)	40(3)	52.71	51.56	52.32	156.59
5	10(2)	1.0 : 1.4(2)	120(3)	32(1)	50.46	50.31	50.67	151.44
6	10(2)	1.0 : 1.7(3)	72(1)	36(2)	51.63	51.96	51.55	155.14
7	14(3)	1.0 : 1.0(1)	120(3)	36(2)	50.14	50.09	49.12	149.35
8	14(3)	1.0 : 1.4(2)	72(1)	40(3)	51.08	50.66	50.99	152.73

续表 7 Continued Table 7

试验号 Test No.	因素 Factors				粗蛋白含量/% Crude protein content			
	接种量/% Inoculation quantity(A)	料水比 Feed : water (B)	发酵时间/h Fermentation time(C)	发酵温度/℃ Fermentation temperature(D)	I	II	III	和 Sum
9	14(3)	1.0 : 1.7(3)	96(2)	32(1)	48.85	48.99	49.63	147.47
K_1	458.91	453.97	455.91	446.95				
K_2	463.17	459.59	459.49	459.91				
K_3	449.55	458.07	456.24	464.77				
k_1	152.97	151.32	151.97	148.98				
k_2	154.39	153.20	153.16	153.30				
k_3	149.85	152.69	152.08	154.92				
R	4.54	1.87	1.19	5.94				
最佳组合 Best collaboration					$D_3 A_2 B_2 C_3$			

表 8 粗蛋白含量方差分析结果

Table 8 Results of variance analysis results of crude protein content

方差来源 Source of variation	A	B	C	D	误差 Error
离差平方和 Sum of squares	10.789	1.877	0.868	18.873	4.129
自由度 Freedom	2.000	2.000	2.000	2.000	18.000
均方 Mean square	5.395	0.938	0.434	9.437	0.229
F 值 F-value	23.517	4.090	1.893	41.136	
F 临界值 F critical-value	$F_{0.01}(2,18)=6.013$		$F_{0.05}(2,18)=3.555$		

了发酵过程($P < 0.01$)(详见表 8),最佳发酵条件为 $D_3 A_2 B_2 C_3$ 。综合分析结果可知,复合发酵豆粕最佳发酵条件是发酵温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、总接种量 10% 、料水比 $1.0 : 1.4$ 、发酵时间 96 h 。

2.5 复合发酵豆粕中营养成分的变化

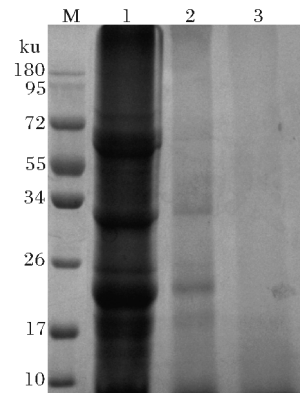
1) 常规营养成分含量。在最佳发酵条件下复合发酵豆粕,发酵产物粗蛋白质、大豆肽、粗灰分、粗脂肪含量显著提高($P < 0.05$),水分含量显著降低($P < 0.05$)。详见表 9。

2) 抗营养因子的变化。未发酵豆粕中大豆抗原蛋白分子质量分布在 $20 \sim 60\text{ ku}$;经过灭菌后的豆粕,大豆蛋白分子质量主要在 $20 \sim 30\text{ ku}$;发酵后豆粕中大豆抗原蛋白分子质量全部在 10 ku 以下(图 4)。发酵后豆粕中胰蛋白酶抑制因子、大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白含量显著降低($P < 0.05$),详见表 10。

表 9 发酵前后豆粕常规营养成分的变化

Table 9 Changes of nutritional ingredient in soybean meal before and after fermentation %

指标 Indicators	未发酵豆粕 Unfermented soybean meal	发酵豆粕 Fermented soybean meal
水分 Moisture	$10.521 \pm 0.022b$	$7.285 \pm 1.309a$
粗灰分 Crude ash	$7.404 \pm 0.003a$	$8.958 \pm 0.265b$
粗脂肪 Crude fat	$5.176 \pm 0.460a$	$6.066 \pm 0.409b$
粗蛋白 Crude protein	$47.762 \pm 0.056a$	$52.31 \pm 0.188b$
大豆肽 Soybean peptide	$1.377 \pm 0.038a$	$20.352 \pm 0.089b$



M: 蛋白分子质量标准; 1: 未发酵豆粕; 2: 灭菌豆粕; 3: 发酵豆粕。M: Protein marker; 1: Unfermented soybean meal; 2: Sterilized soybean meal; 3: Fermented soybean meal.

图 4 豆粕的蛋白质 SDS-PAGE 图

Fig.4 The protein profiles of soybean meal by SDS-PAGE

表 10 发酵前后豆粕抗原蛋白含量的变化
Table 10 Changes of antigen protein content in soybean meal before and after fermentation

检测指标 Measurement indicators	未发酵豆粕 Unfermented soybean meal	发酵豆粕 Fermented soybean meal
胰蛋白酶抑制因子/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Trypsin inhibitors	90.833 \pm 2.729b	60.792 \pm 3.796a
β -伴大豆球蛋白/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) β -Conglycinin	1.169 \pm 0.067b	0.815 \pm 0.025a
大豆球蛋白/ (mg/mL) Soybean globulin	5.063 \pm 0.276b	2.885 \pm 0.255a

3 讨论

3.1 复合发酵条件的优化

枯草芽孢杆菌的许多菌株是有益菌^[12],在发酵过程中可以分泌大量的蛋白酶,降解豆粕中绝大多数的抗原蛋白^[13-14]。米根霉是固态发酵的传统微生物,也是 FDA 认证的安全菌株。米根霉可以降解纤维素和半纤维素,产生的富马酸可以提高豆粕的营养质量,同时还可以分泌淀粉酶和蛋白酶,生成的菌体多糖也是膳食纤维的良好来源^[15]。有研究发现芽孢杆菌和米根霉均可提高豆粕抗氧化能力,米根霉降解低聚糖效果较好,而芽孢杆菌降解抗原蛋白和胰蛋白酶抑制因子效果较好^[16]。在复合发酵的过程中米根霉可以利用菌丝在缺乏自由水的固态基质上良好生长,同时将豆粕中的大分子营养物质降解,为枯草芽孢杆菌提供可直接利用的碳、氮源^[10],通过这 2 种菌复合发酵豆粕可以得到更理想的发酵效果。

本试验中,优先接入米根霉 48 h 的发酵产物大豆肽含量显著性低于其他组,但是其粗蛋白含量仅次于同时接种 2 种菌的发酵组,其原因可能是在发酵过程中米根霉除了可以分解利用豆粕中蛋白质、脂肪等成分,为其他微生物提供生长所必需的营养成分外,米根霉菌丝可以作为菌体蛋白成为一种有价值的副产物,增加发酵产物中粗蛋白含量。有研究表明,与米根霉的作用不同,枯草芽孢杆菌主要是将豆粕中大分子蛋白降解为大豆肽和游离氨基酸^[17]。

有关发酵豆粕最佳温度的研究结果不一。袁正武等^[18]认为固态发酵豆粕温度保持在 30~42℃

时,发酵豆粕的理化指标最优,小肽含量能达到 20%以上,本研究结果与其相符。刘洋等^[19]采用枯草芽孢杆菌液态发酵豆粕,在接种量为 10%、pH 值 5.40℃ 发酵 48 h 的条件下,豆粕的水解率可达 78.80%。在固态发酵和液态发酵中发酵温度都是影响发酵结果的关键因素。不同微生物在不同温度下生长代谢水平不同,本研究使用的枯草芽孢杆菌和米根霉在 40℃ 下产酶能力最强。

料水比影响着培养系统气体流动和微生物的生长代谢。有研究发现在适宜的发 酵温度、时间和接种量条件下,料水比不论高低(1.0:1.0~1.0:1.4)粗蛋白含量和 大豆肽含量较稳定^[20]。本研究中使用的枯草芽孢杆菌和米根霉更适应高水环境,在水分活度较高的发酵基质中才能正常生长。

发酵时间可以影响菌株的生长量和产出酶的活性。刘晓艳等^[21]将枯草芽孢杆菌、米曲霉和酿酒酵母混合固态发酵豆粕,在最佳工艺条件下发酵 96 h,多肽产率最高。本研究中发酵时间 96 h 时发酵效果最佳,但是发酵时间对于发酵效果影响并不显著。廖斌等^[22]发现枯草芽孢杆菌液态发酵豆粕,发酵时间 24 h 时,大豆肽转化率可达 31.51%。固态发酵相比于液态发酵生产周期长,在实际生产应用中,发酵时间过长可能会导致染杂菌、生产成本提高等问题,所以如何减少发酵时间、提高工艺水平,是今后研究的重点。

3.2 复合发酵后对豆粕中营养成分的影响

微生物发酵豆粕后大豆肽和粗蛋白含量均是评价发酵豆粕营养品质的重要指标。豆粕经过发酵后,酶解产生的大豆多肽不仅具有与大豆蛋白质相同的氨基酸组成,并且具有易吸收、耗能低、不饱和等特点^[8]。杨彩艳^[23]利用枯草芽孢杆菌与黑曲霉液态发酵豆粕,在最佳条件下大豆肽转化率高 达 77.59%。液态发酵的培养基是液体形式,传质均匀,发酵较为彻底,可以更好地提高大豆肽的转化率,本研究显示该株枯草芽孢杆菌也具有 良好的产酶能力,固态发酵后大豆肽含量显著提高,对该菌株的液态发酵能力将开展进一步的比较。

豆粕经复合发酵后,粗蛋白含量显著提高,这是因为在发酵过程中微生物的呼吸作用消耗了部分有机物料(释放出 CO₂ 和 H₂O),使产物总量减少,出现了蛋白的“浓缩效应”^[24],同时微生物的菌体蛋白是重要且有意义的蛋白质来源^[25]。吝常华等^[26]研究显示解淀粉芽孢杆菌、植物乳杆菌和酿酒酵母 3

个菌种在最适发酵条件下混菌固态发酵豆粕,发酵产物中小肽、粗蛋白、粗灰分含量较发酵前均得到显著提高,大分子蛋白质被降解,大豆球蛋白含量显著降低,本研究结果与此一致。

发酵豆粕重要的价值还在于去除了大部分抗营养因子,大分子蛋白质被降解为小分子蛋白质,植物细胞壁被酶解破裂,有助于动物机体对营养物质的消化吸收^[27]。豆粕中主要的抗营养因子如大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和胰蛋白酶抑制因子等^[28],会导致饲料利用率下降,机体生长性能减缓,并且有一定的致敏性^[4]。本研究从 SDS-PAGE 电泳图中发现豆粕经过发酵后大分子蛋白质大部分被降解,通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测发现大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白和胰蛋白酶抑制因子含量都显著降低。Seo 等^[13]发现豆粕经枯草芽孢杆菌固态发酵后, β -伴大豆球蛋白和胰蛋白酶抑制因子大部分被降解,豆粕营养品质得到了提高。程友飞^[29]研究发现豆粕经枯草芽孢杆菌、干酪乳杆菌和酵母菌混菌固态发酵后,过敏原蛋白部分降解,豆粕的致敏性降低。黄颖^[30]利用多菌种固态和液态发酵豆粕对比发酵效果,其中植物乳杆菌液态发酵产物大豆总致敏原降解率最高,达 80.94%,其中 β -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白的降解率分别为 91.43%和 75.00%,并且发现不同的发酵方式对微生物降解致敏原的能力影响巨大。多种微生物复合发酵豆粕可以更好地将豆粕的大分子蛋白质降解为小肽、氨基酸等小分子物质,减少抗营养因子,优化了豆粕的营养质量,提高了发酵豆粕营养价值。

参 考 文 献

- [1] 张连慧,熊小辉,惠菊,等.发酵豆粕及其在动物养殖行业中的应用研究进展[J].中国油脂,2017,42(3):108-112.
- [2] HARDY R W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal[J]. Aquaculture research, 2010, 41(5): 770-776.
- [3] 陈斌.微生物发酵对豆粕中抗营养因子及营养价值的影响[D].杭州:浙江大学,2005.
- [4] WANG T, QIN G X, SUN Z W, et al. Advances of research on glycinin and β -conglycinin: a review of two major soybean allergenic proteins[J]. Critical reviews in food science & nutrition, 2014, 54(7): 850-862.
- [5] PEREZ-MALDONADO R A, MANNION P F, FARRELL D J. Effects of heat treatment on the nutritional value of raw soybean selected for low trypsin inhibitor activity[J]. British poultry science, 2003, 44(2): 299-308.
- [6] SARKAR P K, JONES L J, CRAVEN G S, et al. Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food[J]. Food chemistry, 1997, 59(1): 69-75.
- [7] HONG K. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals[J]. Journal of medicinal food, 2004, 7(4): 430-435.
- [8] 余勃,陆兆新.发酵豆粕生产大豆多肽研究[J].食品科学, 2007, 28(2): 189-192.
- [9] 邓露芳,范学珊,王加启.固体发酵豆粕菜粕和棉粕的复合菌筛选[J].中国畜牧兽医, 2012, 39(4): 102-104.
- [10] 刘海燕,邱玉朗,魏炳栋,等.微生物发酵豆粕研究进展[J].动物营养学报, 2012, 24(1): 35-40.
- [11] 蔡冬梅,郭吉元,杨海鹏,等.发酵豆粕抗原蛋白的客观评价方法[J].饲料工业, 2013, 34(15): 31-34.
- [12] 陈国营,詹凯,朱由彩,等.枯草芽孢杆菌及其发酵豆粕对蛋鸡肠道菌群和粪便中 N、S 含量的影响[J].中国家禽, 2012, 34(6): 10-15.
- [13] SEO S H, CHO S J. Changes in allergenic and antinutritional protein profiles of soybean meal during solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* [J]. LWT-food science and technology, 2016, 70: 208-212.
- [14] DAI C, MA H, HE R, et al. Improvement of nutritional value and bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* [J]. LWT-food science and technology, 2017, 86: 1-7.
- [15] 周帅,王宏勋,吴疆鄂,等.玉米皮药用真菌发酵综合利用初步研究[J].食品工业科技, 2006, 27(4): 52-54.
- [16] 李永凯,毛胜勇,朱伟云.益生菌发酵饲料研究及应用现状[J].畜牧与兽医, 2009, 41(3): 90-93.
- [17] 张艳萍,李雪平,尹望.不同微生物发酵对豆粕营养品质影响的研究[J].饲料研究, 2017(1): 19-20.
- [18] 袁正武,陈凤鸣,陈清华.发酵工艺参数对发酵豆粕营养成分的影响[J].中国畜牧兽医, 2015, 42(8): 2066-2073.
- [19] 刘洋,金承范,刘嘉,等.枯草芽孢杆菌液态发酵豆粕工艺优化研究[J].饲料与畜牧, 2013(12): 8-10.
- [20] 张佳斌,张雪芳,李利君,等.不同益生菌固态发酵豆粕的工艺研究[J].集美大学学报(自然科学版), 2018, 23(3): 178-186.
- [21] 刘晓艳,杨国力,国立东,等.混菌固态发酵法生产大豆多肽饲料的研究[J].饲料工业, 2012, 33(6): 51-56.
- [22] 廖斌,贾佳,李鑫,等.液体发酵制备大豆肽工艺研究[J].中国酿造, 2012, 31(2): 121-124.
- [23] 杨彩艳.液态发酵豆粕制备大豆肽发酵条件的优化[D].淄博:山东轻工业学院, 2010.
- [24] 张红,褚西宁.固体发酵饲料酵母对非蛋白氮转化能力的研究[J].饲料工业, 1996(2): 17-19.
- [25] 史玉宁,赵鹏娟,陈如水,等.复合菌种对发酵豆粕营养成分的影响研究[J].安徽农业科学, 2014(3): 790-791.
- [26] 吝常华,刘国华,常文环,等.豆粕微生物固态发酵工艺优化及其营养物质含量变化[J].动物营养学报, 2018(7): 2749-2762.
- [27] 樊春光,尹清强,王鹏,等.发酵豆粕的生产现状及产品质量评定研究[J].江西农业学报, 2012, 24(7): 156-159.

- [28] XIANG P, BAIRD L M, JUNG R, et al. P39, a novel soybean protein allergen, belongs to a plant-specific protein family and is present in protein storage vacuoles[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56(6): 2266-2272.
- [29] 程友飞. 微生物固态发酵豆粕及其致敏性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [30] 黄颖. 微生物发酵法降解大豆致敏原的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.

Effect of microbial compound fermentation on nutritional quality of soybean meal

LI Xige^{1,2} ZHOU Chengchong^{1,2} WU Zhixin^{1,2,3}
WANG Hui¹ LUO Yaner² CHEN Xiaoxuan^{1,2,3}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;
2. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China ;
3. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education (Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070, China

Abstract In this study, the optimum fermentation strain was selected from four strains with excellent ability of fermenting soybean meal (*Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*), and crude protein content and soybean peptide content were taken as evaluation criteria to optimize the fermentation process conditions. The nutrient content and the changes of anti-nutrition factors were analyzed before and after solid-state fermentation of soybean meal. The results showed that *B. subtilis* B-8 and *R. oryzae* M-1 were the optimal combination of fermented strains. The optimum fermentation process conditions of compound fermentation were: *B. subtilis* and *R. oryzae* were simultaneously introduced into soybean meal, the inoculation ratio of two strains was 2 : 1, the total inoculum of fermentation was 10%, the fermentation temperature was 40 °C, the ratio of feed to water was 1.0 : 1.4, and the fermentation time was 96 hours. After compound fermentation of soybean meal, the content of soybean peptide, crude protein, crude ash and crude fat in the fermentation product was significantly higher than that before fermentation ($P < 0.05$), the moisture content decreased significantly ($P < 0.05$), the macromolecular protein was basically degraded below 10 ku, and glycinin, β -conglycinin and trypsin inhibitor was significantly lower than that of unfermented soybean meal ($P < 0.05$). The above results indicated that the nutrient composition of soybean meal increased significantly and the anti-nutritional factors decreased significantly after the compound fermentation, which means that the nutritional quality of soybean meal was improved a lot.

Keywords soybean meal; compound fermentation; process optimization; soybean peptide; nutritional quality

(责任编辑:边书京)