

复合菌株发酵猪血粉的条件研究*

付祖姣 陈宇 莫湘涛 肖家见 夏立秋**

(湖南师范大学生命科学学院微生物学系 长沙 410081)

摘要: 利用筛选出的2株高产蛋白酶的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株 AS100、AS102 作猪血粉发酵的主发酵菌株, 配以1株酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 Y113 和1株细菌 (*Bacillus* sp.) 菌株 Asp007 为辅助菌株, 研究了这四株菌的产酶性能, 同时确定了它们在发酵血粉过程中的一系列参数。通过猪血粉发酵, 获得了一种高蛋白发酵饲料, 其香味浓郁, 蛋白质含量高达69%, 且富含游离氨基酸, VitD₃、烟酸等维生素及 Fe 等无机元素, 可作为禽畜高蛋白源或饲料添加剂。

关键词: 米曲霉, 猪血粉, 发酵条件

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0028-05

STUDY ON CONDITIONS OF SWINE BLOOD MEAL FERMENTATION WITH COMPOUND STRAINS

FU Zu-Jiao CHEN Yu MO Xiang-Tao XIAO Jia-Jian XIA Li-Qiu

(Department of Microbiology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: Two high protease producing strains, which are designated *Aspergillus oryzae* AS100 and AS102, were screened and applied as main fermentation strains of swine blood meal. A *Saccharomyces cerevisiae* Y113 and a *Bacillus* Asp007 were also used as assistant fermentation strains. The enzyme production abilities were studied, and a series of parameters of the fermentation technology were determined. Through swine blood meal fermentation, a high-protein fermented feed was produced, which is strong soy flavor and was rich in protein (69%), free amino acid, vitamin such as VitD₃ and niacin and organic elements such as Fe. It is a kind of high-protein feed for animals and it could be used as feedstuff additive.

Key words: *Aspergillus oryzae*, Swine blood meal, Fermentation condition

猪血是一种廉价的高蛋白质资源, 但因猪血蛋白质分子量太大, 血粉血腥味较重, 故利用很少。目前, 国内已有研究报道用米曲霉发酵血粉^[1,2], 但因选用的发酵菌种的产酶能力不高, 而且缺乏注重多种酶的综合利用, 使得血粉降解不佳、饲料蛋白含量偏低, 不利于发酵血粉的大规模利用。本项研究利用本室筛选的高产蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶的米曲霉, 并辅以细菌和酵母菌来发酵猪血粉及其配料, 并摸索了种曲制备和猪血粉发酵的条件, 从而生产出蛋白含量高、消化率高、适口性好的发酵血粉饲料。这种微生物发酵法为血粉的利用创造了一种很好的途径, 可望既为饲料行业提供宝贵的蛋白质资源, 又能解决猪血废弃物带来的环保问题。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株 AS100 (CCTCC NO: M203022)、AS102 (CCTCC

* 国家技术创新基金资助项目 (NO.00C26214300645)

** 联系人 E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-11, 修回日期: 2003-01-15

NO: M203023), 酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 Y113 (CCTCC NO: M203024), 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 菌株 Asp007 (CCTCC NO: M203025) 均由湖南师范大学酶工程研究室筛选并提供, 中国菌种保藏中心保藏。

1.2 培养基

摇瓶发酵培养基为玉米粉 4.0g, 豆饼粉 3.0g, 麸皮 2.5g, Na_2HPO_4 0.4g, KH_2PO_4 0.03g, 定容至 1L, pH 5.5。种曲原始培养基为米糠与水混合。血粉发酵培养基为猪血粉、辅料(大豆粕等)与水混合。

1.3 菌株产酶性能检测

将培养好的种曲用 0.02mol/L、pH7.2 的磷酸缓冲液浸提 2hr, 过滤, 收集滤液, 测定种曲的中性蛋白酶 (Folin 法^[3], 每分钟水解酪蛋白产生 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸的酶量为 1U)、淀粉酶 (消色法 D^[3], 每分钟水解 $1\mu\text{g}$ 淀粉产生糊精的酶量为 1 U)、糖化酶 (次碘酸钠法^[3], 每分钟水解淀粉产生 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖的酶量为 1 U)、纤维素酶 (DNS 显色法^[4], 每分钟水解羧甲基纤维素钠产生 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖的酶量为 1 U)、植酸酶 (钒-钼酸铵法^[5], 每分钟水解植酸钠产生 $1\mu\text{g}$ 无机磷的酶量为 1 U)、果胶酶 (次亚碘酸钠法^[6], 每分钟水解果胶产生 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖的酶量为 1 U) 的酶活力。

1.4 菌种制备

先用斜面活化发酵菌株, 然后分别选用不同的固体培养基(米糠、麸皮等)、不同的含水量来进行种曲培养, 30℃培养 108h, 确定综合产酶能力强的种曲的制备条件。

1.5 血粉发酵

将培养好的种曲接入无菌水中, 加入一定量的蔗糖, 30℃, 150 r/min, 于摇床上活化 2h, 然后加入尿素(种曲、蔗糖、尿素的比例为 1:10:1), 溶解, 与血粉及其发酵配料混匀, 30℃开始发酵, 逐渐升温, 发酵 48h。其工艺流程如下: 种曲制备→菌种活化→配料→接种→发酵→烘干→成品理化性质检测(营养、卫生指标等)→包装。

2 结果与分析

2.1 发酵菌株产复合酶的情况

将四株出发菌株分别接入摇瓶发酵培养基中, 30℃, 190r/min, 培养 108h, 10,000 r/min 离心 25min, 取上清, 测定多种酶的活力, 如表 1 所示。

表 1 发酵菌株产酶能力的比较

| 菌株 | 酶活力 (U/mL) | | | | | |
|--------|------------|--------|--------|------|--------|------|
| | 中性蛋白酶 | 糖化酶 | 淀粉酶 | 纤维素酶 | 植酸酶 | 果胶酶 |
| AS100 | 2921.4 | 2113.3 | 2800 | 1.76 | 1.3813 | 0.32 |
| AS102 | 1249 | 1331.7 | 1331.7 | 1.40 | 0.4150 | 0.51 |
| Y113 | 284 | 2421.7 | - | - | - | 0.87 |
| Asp007 | 1255 | 未测 | 未测 | 未测 | 未测 | 未测 |

注: - 表示没有检测出酶活性

由表 1 可看出, AS100、AS102 是蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶的高产菌株, 在血粉发酵中起主要作用。Y113、Asp007 的综合产酶能力较弱, 但它们的发酵可为产品增添许多副产物, 能改善血粉的营养和适口性, 故将这两株菌作为辅助菌株来发酵血粉。

2.2 血粉发酵条件研究

2.2.1 菌种培养基的选择: 在 30℃ 培养 108h, 测定菌种在多种培养基中的中性蛋白酶、淀粉酶和糖化酶活力 (表 2), 米糠培养基最适合产蛋白酶, 麸皮有助于糖化酶、淀粉酶的产生, 混合培养基的淀粉酶活力最高。但因血粉发酵的主要目的是降解蛋白质, 故选用米糠培养基作为血粉发酵菌株的种曲培养基。

表 2 种曲培养基对菌株产酶的影响

| 培养基 | 酶活力 (U/g) | | |
|-----|-----------|-------------------|-------------------|
| | 中性蛋白酶 | 糖化酶 | 淀粉酶 |
| 米糠 | 10067 | 1.2×10^4 | 1.3×10^5 |
| 麸皮 | 2078 | 1.7×10^4 | 2.7×10^5 |
| 豆饼粉 | 6771 | 1.1×10^4 | 5.1×10^5 |
| 混合 | 7164 | 2.1×10^4 | 3.2×10^5 |

2.2.2 水分对种曲制备的影响: 菌株在不同含水量的培养基中有不同的生长状况, 水分不仅通过影响菌丝生长及孢子扩散, 进而影响整个培养基中的孢子数量, 而菌株产酶能力又与孢子数量密切相关。由表 3 可以看出, 种曲制备的最佳水分含量是 20% ~ 25%, 此条件下, 菌株生长快, 产酶能力强。

表 3 培养基中含水量对菌株生长和酶活的影响

| 含水量 | 摇瓶形态 | 中性蛋白酶活力 (U/g) |
|-------|---------------|---------------|
| 16.7% | 菌株生长较慢 | 3213 |
| 20% | 菌株生长快 | 6735 |
| 25% | 菌株生长快 | 8740 |
| 33.3% | 菌株生长缓慢, 且酸味很浓 | 3046 |

2.2.3 血粉发酵培养基的组成: 主要成分是猪血粉, 辅料选用米糠、大豆粕、菜籽粕、羽毛粉, 其部分营养成分可见表 4。猪血粉虽然富含必需氨基酸, 但是比例不均衡, 甲硫氨酸和异亮氨酸的含量相对较少, 加入羽毛粉等后, 不仅可维持发酵血粉蛋白质的高含量, 而且还可

表 4 发酵培养基中各原料的部分营养对比

| 原料 | 粗蛋白 (%) | Lys (%) | Met (%) | Ile (%) | Leu (%) |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|
| 猪血粉 | 82.8 | 6.67 | 0.74 | 0.75 | 8.38 |
| 米糠 | 12.8 | 0.74 | 0.25 | 0.63 | 1.00 |
| 大豆粕 | 44.9 | 2.81 | 0.56 | 2.00 | 3.20 |
| 菜籽粕 | 38.6 | 1.30 | 0.63 | 1.29 | 2.34 |
| 羽毛粉 | 77.9 | 1.65 | 0.59 | 4.21 | 6.78 |

表 5 发酵培养基的含水量对发酵效果的影响

| 原料: 水分 | 血粉发酵效果 |
|--------|------------------|
| 5:1 | 浅褐色, 无甚香味 |
| 4:1 | 红褐色, 有酱香味 |
| 3:1 | 红褐色, 有酱香味 |
| 2:1 | 有红色血丝状物质, 且有胺酸臭味 |

补充血粉在营养上的不平衡。且米糠等孔性载体的加入可为菌株的生长和发酵提供一个透气性好、供氧充分的环境, 有利于菌株的生长、产酶和猪血粉酶解。

2.2.4 血粉发酵培养基的含水量: 血粉发酵过程中, 水分过多, 造成内部的厌氧环境, 导致很多杂菌 (如厌氧菌) 的生长, 使得发酵血粉呈酸败味。若水分过少, 则不利于发酵菌株的生长、繁殖, 从而影响发酵效果。经试验证明 (表 5), 最佳的原料与水分比是 4:1 ~ 3:1, 此时菌株能很好地生长, 杂菌较少, 发酵产品呈酱香味, 发酵效果较好。

2.2.5 发酵温度的控制: 微生物发酵血粉的发酵分为 3 个时期: 前期主要是菌体生长, 最适温度 32℃ ~ 38℃, 维持 8h, 可看到白色菌丝蔓延; 发酵中期, 温度控制在 38℃ ~ 50℃, 且逐渐升温, 并维持 18h 左右, 蛋白酶、植酸酶、糖化酶、纤维素酶依次达到作用的最适温度并起作用, 猪血粉血腥味逐渐变淡; 发酵后期, 温度升至 50℃ ~ 60℃, 维持 6 ~ 8h, 直至发酵完毕, 此时淀粉酶发生降解作用, 同时菌株开始产酯类等副产物, 血粉酱香味逐渐加浓。

2.3 发酵产品各项理化指标

2.3.1 发酵血粉营养分析: 经采用米曲霉等高产菌株发酵出的血粉饲料, 总蛋白含量

(表6)比同类产品^[1,7]要高很多。发酵前后,游离氨基酸的变化比较大,发酵产品比发酵培养基提高了72.5%。对不同样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示,血粉发酵培养基经过混菌发酵,蛋白组成发生了改变,蛋白质分子量明显降低,多肽、氨基酸等小分子聚合物明显比发酵培养基和原产品多,说明血粉中大量蛋白质被酶解。而且,经过发酵,粗脂肪、粗纤维、灰分的含量在原有基础上均有所降低,而磷、钙的含量却有所增加。因血粉发酵中有植酸酶的作用,使有效磷、钙的含量大增。

2.3.2 微量元素、维生素及氨基酸含量分析:发酵血粉饲料经湖南省产品质量监督检验所检验,各营养指标如表7、8所示。该饲料营养丰富,尤其是Fe、Mg、VD3和烟酸的含量丰富。氨基酸的组成有所改变,必需氨基酸由原来的36%提高到38.9%,亮氨酸与异亮氨酸、赖氨酸与甲硫氨酸的比例均有所下降,明显改善了血粉氨基酸的平衡性。

2.3.3 卫生指标:血粉发酵培养基的主要成分是灭过菌的猪血粉,发酵菌株是常用的饲料用菌株种类。发酵血粉经湖南省产品质量监督检验所检测,不含黄曲霉毒素B1和沙门氏菌,符合国家饲料卫生标准,安全性可靠。

表6 发酵血粉的营养成分分析

| 营养成分含量(%) | 发酵培养基 | 原产品 | 本产品 |
|-----------|-------|-------|--------|
| 水分 | 12 | 11 | 2.2 |
| 粗蛋白 | 71.04 | 54.98 | 69.0 |
| 氨基氮 | 0.40 | 0.44 | 0.69 |
| 总游离氨基酸 | 2.5 | 2.75 | 4.3125 |
| 粗纤维 | | 5.45 | 5.4 |
| 粗脂肪 | | 3.746 | 0.80 |
| 灰分 | | 9 | 8.0 |
| Ca | | 0.5 | 0.67 |
| P | | 0.6 | 0.68 |

表7 发酵血粉的维生素和无机元素含量

| 维生素 | 含量 | 无机元素 | 含量 |
|--------------------------|-------|------------|-------|
| V ₃₁ (mg/kg) | 45 | Mg (g/kg) | 2.4 |
| V ₁₂ (mg/kg) | 18 | Fe (mg/kg) | 516.1 |
| V ₂₆ (mg/kg) | 58 | Zn (mg/kg) | 60.6 |
| V _{B12} (mg/kg) | 27 | Se (mg/kg) | 28 |
| V ₁₈ (IU/kg) | 14640 | Cu (mg/kg) | 9.5 |
| V ₂ (mg/kg) | 54 | K (g/kg) | 10.2 |
| 烟酸 (mg/kg) | 261 | Na (mg/kg) | 4.5 |
| 泛酸 (mg/kg) | 44 | Mn (mg/kg) | 50.7 |
| 叶酸 (mg/kg) | 32 | | |

表8 发酵血粉氨基酸含量

| 氨基酸 | 含量(%) | 氨基酸 | 含量(%) |
|--------------|-------|------------------|-------|
| 天冬氨酸 Asp/Asn | 8.04 | 缬氨酸 Val | 3.84 |
| 苏氨酸 Thr | 2.47 | 甲硫氨酸 Met | 0.58 |
| 丝氨酸 Ser | 4.02 | 异亮氨酸 Ile | 1.04 |
| 谷氨酸 Glu/Gln | 9.58 | 亮氨酸 Leu | 8.47 |
| 脯氨酸 Pro | 2.98 | 酪氨酸 Trp | 1.33 |
| 甘氨酸 Gly | 3.02 | 苯丙氨酸 Phe | 3.41 |
| 丙氨酸 Ala | 4.81 | 总氨基酸 | 60.61 |
| 赖氨酸 Lys | 3.75 | Total amino acid | |
| 组氨酸 His | 3.27 | | |

3 讨论

该发酵血粉是利用米曲霉等多株菌混合发酵猪血粉及配料而制得,菌种高产蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶和果胶酶,这组优化菌株的综合产酶能力远高于本试验对照中用于生产发酵血粉的菌种。所选用的发酵培养基是根据营养互补性原则和菌体对孔性载体的需要来设计配比的,由猪血粉、大豆粕、菜籽粕、米糠、羽毛粉组成。在发酵过程中,选育的发酵菌株一方面分泌大量的酶,不仅可将血粉与辅料中大量的大分子蛋白质降解成小分子蛋白质、多肽和游离氨基酸,还可降解羽毛粉等原料中的淀粉和纤维素等物质,而且发酵菌株产生的植酸酶还可将原料中与植酸结合的钙、磷等无机离子以游离形式释放出来,使发酵培养基中的无效营养变成有效营养,大大提高了猪血粉

中营养成分的消化吸收率。另一方面,菌株还会积累很多的发酵副产物,如促生长因子,可促进家禽畜的生长,提高动物的抗逆防病能力、性功能和繁殖能力;酵母菌经过发酵还会产生一些酯类物质,可改善血粉的味道,提高发酵血粉的适口性。实验获得的发酵血粉饲料蛋白质含量丰富(69%),超过秘鲁鱼粉(64.5%),而且富含维生素和无机离子,其消化率和适口性在原血粉的基础上有明显的改善,是一种新型的高蛋白饲料,可以成为配合饲料的重要组成成分或作为饲料添加剂,也可作为日趋紧张的鱼粉的替代品。

参 考 文 献

- [1] 徐子伟,汤志宏,林纯洁,等. 饲料工业, 1996, 17 (8): 13~15.
- [2] 张 军,王爱军. 饲料工业, 1997, 18 (8): 21~22.
- [3] 郭 勇主编. 酶工程. 北京:中国轻工业出版社. 1999, 308~315.
- [4] 张 海,冯成利,房兴莉. 标准化报道, 1995, 16 (4): 37~38.
- [5] 张若寒. 中国饲料, 1997, 5: 30-32.
- [6] 张树政主编. 酶制剂工业(下册). 北京:科学出版社, 1989. 652~653.
- [7] 刘仲敏,何伯安,曹友生,等. 微生物学通报, 1995, 22 (6): 351~354.