

王伟,王世英,朱宝成.液体发酵法发酵豆粕产蛋白酶条件的优化[J].江苏农业科学,2014,42(8):273-275.

液体发酵法发酵豆粕产蛋白酶条件的优化

王伟,王世英,朱宝成

(河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001)

摘要:为了提高 B-15 菌株发酵豆粕产蛋白酶能力,采用单因素法对 B-15 菌株发酵培养基所需的碳源、氮源、无机盐进行筛选,采用正交试验对 B-15 菌株的发酵培养基组成及发酵培养条件进行优化,最终确定最适发酵培养基组成为葡萄糖为 2%、豆粕浓度为 12%、KCl 为 0.01%、MgSO₄ 为 0.05%。通过发酵工艺条件参数的正交优化试验得出发酵培养基的最佳工艺参数为:发酵时间为 48 h,装瓶量为 50 mL,种龄为 14 h,pH 值为 6.5。在此条件下 B-15 菌株发酵产蛋白酶活力为 125.05 U/mL,与基础发酵培养基相比,提高了 11.9%。

关键词:液体发酵;发酵条件;正交优化;蛋白酶活力

中图分类号: TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0273-03

大豆肽是一种比大豆蛋白质更为优质、新型的大豆蛋白酶改性产品,广泛应用于发酵、制药、食品、化妆品、饲料及植物营养剂等行业^[1-3]。大豆肽易消化吸收,能迅速供给机体能量,无蛋白变性,无豆腥味,液体黏性小和受热不凝固等,并具有降低血清胆固醇^[4]、降低血压、抗疲劳^[5]、抗氧化^[6]等许多生物功能,因此大豆肽成为研究热点。目前,大豆肽多采用酶解法和微生物发酵法生产^[7],微生物发酵法把蛋白酶的发酵生产和大豆肽的酶解生产有机结合在一起,降低了大豆肽功能的生产成本,克服了酶水解法制备大豆肽产品的苦味大和口感差等缺点^[8]。目前,利用微生物发酵法生产大豆肽被认为是较先进有效方法,应用前景较好。本试验以蛋白酶活力为指标,通过单因素和正交试验对产蛋白酶芽孢杆菌 B-15 发酵处理豆粕的产酶培养基组成、发酵工艺条件进行了优化,以确定最佳的豆粕发酵产酶工艺,为大豆肽的大规模液态发酵生产奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 细菌菌株:解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) B-15,由河北农业大学生命科学学院制药工程实验室分离并保存。

1.1.2 培养基 NA 培养基、NB 培养基的配制详见文献[9]。种子培养基即 NB 培养基;基础发酵培养基:豆粕 10%、Na₂HPO₄ 0.84%、KH₂PO₄ 0.032%、CaCl₂ 0.17%、混匀后调 pH 值 6.0~6.5。

1.1.3 试剂 福林-酚试剂;0.55 mol/L 碳酸钠溶液、10%三氯醋酸溶液、0.02 mol/L pH 值 7.5 磷酸缓冲液、1%酪蛋白溶液、100 μg/mL 标准酪氨酸溶液,所用试剂皆为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的培养与发酵

1.2.1.1 摇瓶种子曲线(生长曲线)及种子培养 将斜面培养的菌株接种于 NB 培养基中,250 mL 三角瓶中的装瓶量为 75 mL(250 mL,下同),在 37 ℃下 180 r/min 振荡培养,在零时开始取样,以后每隔 1 h 或 2 h 取样 1 次,直至培养 24 h 为止,以未接菌的培养基作空白调零,用分光光度计在 600 nm 下测 D,以发酵时间为 x 轴、以 D 为 y 轴作曲线,绘制生长曲线。将斜面培养的菌株接种于 NB 培养基中,装瓶量为 75 mL,180 r/min 摇床培养,培养时间由生长曲线确定,得到种子液。

1.2.1.2 发酵培养 对培养基成分采用以下的培养条件进行优化:将种子液以 2% 的接种量接入 75 mL/250 mL 三角瓶发酵培养基中,于 37 ℃、180 r/min 下振荡培养 48 h,将发酵液在 5 000 r/min 条件下离心 10 min,弃去沉淀,收集上清液,进行蛋白酶活力测定。

1.2.2 单因素试验

1.2.2.1 不同碳源 分别以 2% 的蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、可溶性淀粉、玉米淀粉、D-果糖等 7 种碳源进行 B-15 菌株产酶活力比较试验,配制 7 种碳源不同的发酵培养基,均加入 10% 氮源豆粕,0.84% Na₂HPO₄,0.032% KH₂PO₄,0.17% CaCl₂,混匀后调 pH 值 6.0~6.5,筛选出最适碳源。

1.2.2.2 不同氮源浓度 配制豆粕浓度分别为 2%、5%、8%、11%、14% 的培养基发酵培养,进行 B-15 菌株产酶活力比较试验,均加入 2% 最适碳源,0.84% Na₂HPO₄、0.032% KH₂PO₄、0.17% CaCl₂,混匀后调 pH 值 6.0~6.5,筛选出最适氮源浓度。

1.2.2.3 不同无机盐 以浓度为 0.05% 的 CaCl₂、MgSO₄、FeSO₄、MnCl₂、KCl、NaCl、ZnCl₂ 等 7 种供试无机盐进行 B-15 菌株产酶活力比较试验,配制 7 种无机盐不同的发酵培养基,均加入 2% 最适碳源,最适氮源浓度的豆粕,0.84% Na₂HPO₄、0.032% KH₂PO₄,混匀后调 pH 值 6.0~6.5,筛选出最适 2 种无机盐。

1.2.3 正交试验

1.2.3.1 培养基组分 在培养基各组分初步筛选的基础上,

收稿日期:2013-10-09

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:11225525)。

作者简介:王伟(1983—),女,河北邢台人,硕士,讲师,主要从事应用微生物学研究。E-mail:dawnwei0207@126.com。

通信作者:朱宝成,教授,博士生导师,主要从事农业微生物学研究。

Tel:(0312)7528258;E-mail:zhu2222@126.com。

研究培养基成分的不同对比对酶活力的影响。选用 $L_{16}(4^4)$ 设计方案设计 4 因素 4 水平正交试验(表 1),根据上述试验确定的最适碳源、氮源、无机盐配制不同组成的培养基,测定发酵菌株产酶活力。综合正交试验结果,初步确定最佳组合,得出 B-15 菌株产酶的最佳培养基组成。

表 1 B-15 菌株产酶培养基组成正交试验因素水平

水平	A:碳源	B:氮源	C:无机盐 I (%)	D:无机盐 II (%)
1	1	8	0.01	0.01
2	2	10	0.05	0.05
3	3	12	0.10	0.10
4	4	14	0.20	0.20

1.2.3.2 培养条件 在确定培养基组分配比的基础上,根据所得结果配制培养基,研究发酵过程中的发酵时间、装液量、pH 值、种龄等 4 个因素对菌株产酶活力的影响。B-15 菌株产酶选用 $L_{16}(4^4)$ 设计方案设计 4 因素 4 水平正交试验(表 2),综合正交试验结果初步确定最佳组合,从而得出 B-15 菌株产酶的最佳发酵工艺条件。

表 2 B-15 菌株产酶发酵工艺条件正交试验因素水平

水平	A:发酵时间 (h)	B:装瓶量 (mL/250 mL)	C:种龄 (h)	D:pH 值
1	24	50	10	6.0
2	36	75	12	6.5
3	48	100	14	7.0
4	60	125	16	7.5

1.2.4 蛋白酶活性的测定^[10] 采用福林-酚法测定酶活。

2 结果与分析

2.1 最适接种时间的确定

本试验采用比浊法,测定种子液中的菌体浓度以找出对数末期,此时即为发酵液最佳接种时间,结果如图 1 所示。

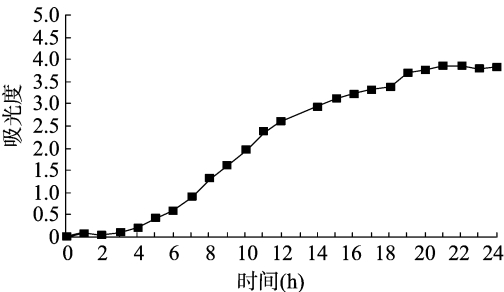


图 1 B-15 菌株生长曲线

2.2 单因素试验

2.2.1 最适碳源 分别以蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、D-果糖、玉米淀粉、可溶性淀粉等 7 种碳源进行发酵产酶条件筛选,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,发酵培养基碳源为葡萄糖时,产酶活力最高,为 93.01 U/mL,因此最终确定葡萄糖为最适碳源。

2.2.2 最适氮源 确定葡萄糖为最适碳源后,分别取 2%、5%、8%、11%、14% 等豆粕浓度进行发酵产酶条件筛选,结果

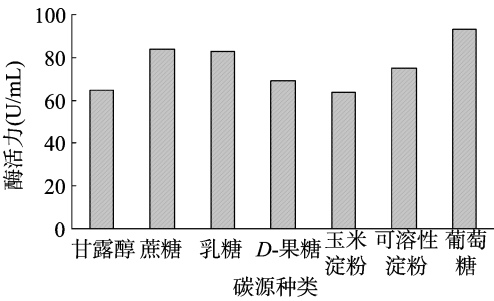


图 2 不同碳源对 B-15 菌株酶活的影响

如图 3 所示。从图 3 可以看出,发酵培养基氮源浓度为 11% 时,产酶活力最高,因此最佳氮源浓度为 11%。

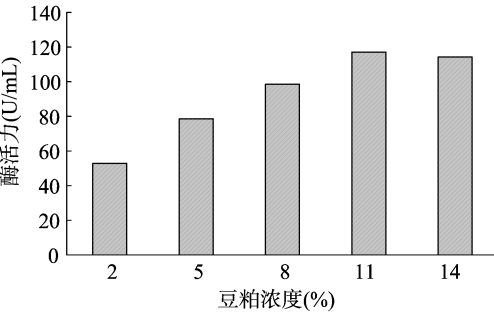


图 3 不同豆粕浓度对 B-15 菌株酶活的影响

2.2.3 最适无机盐 无机盐是微生物生长的必需物质,参与微生物细胞的各种组分,能调节微生物细胞的渗透压、pH 值和氧化还原电位。无机盐对微生物的生长不可或缺,选择合适的无机盐对 B-15 菌株发酵产蛋白酶尤为重要。分别以 $CaCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、 KCl 、 $NaCl$ 、 $ZnCl_2$ 等 7 种无机盐进行发酵产酶条件筛选,结果见图 4。从图 4 可以看出,发酵培养基无机盐为 KCl 和 $MgSO_4$ 时,酶活力最高,因此确定最佳无机盐 I 为 KCl ,无机盐 II 为 $MgSO_4$ 。

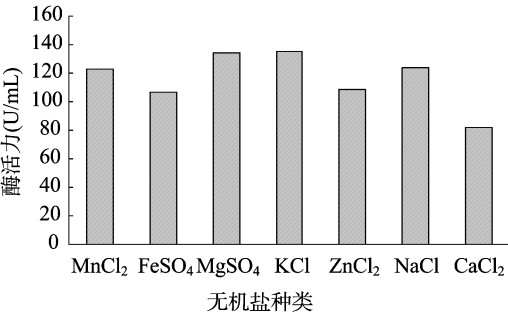


图 4 不同无机盐对 B-15 菌株酶活的影响

综上所述,通过单因素试验对碳源、氮源浓度及无机盐进行优化,筛选得到最适发酵培养基组成,即碳源为蔗糖、氮源浓度为 11%、无机盐为 KCl 和 $MgSO_4$ 。

2.3 正交试验

2.3.1 培养基组成 通过碳源、氮源及无机盐的 3 个单因素试验后,筛选得到发酵培养基组成:碳源为葡萄糖,氮源浓度为 11%,无机盐 I 为 KCl ,无机盐 II 为 $MgSO_4$ 。发酵培养基成分优化的正交试验就是在确定以上发酵培养基成分的基础上进行的不同碳源、氮源及无机盐浓度的组合正交试验,结果如表 3 所示。从表 3 可以看出, $A_4B_1C_2D_4$ 的培养基组合为最佳组合,即葡萄糖为 4%,豆粕浓度为 8%, KCl 为 0.05%,

MgSO₄ 为 0.2%。由 *R* 可以看出 $R_A > R_B > R_D > R_C$, 即碳源和氮源浓度对发酵豆粕产酶活力影响较大。由于试验设计的组合并没有出现理论得出的 A₄B₁C₂D₄ 的培养基组合。因此将其与试验中酶活力最高的 11 号组合进行比较试验, 结果发现 11 号组合酶活力较高, 为 103.11 U/mL。最终确定最佳的培养基组合: 葡萄糖为 2%, 豆粕浓度为 12%, KCl 为 0.01%, MgSO₄ 为 0.05%。

表 3 培养基组成正交试验结果

序号	A:碳源 (%)	B:氮源 (%)	C:无机盐 I (%)	D:无机盐 II (%)	酶活 (U/mL)
1	0.5	8	0.01	0.01	73.40
2	0.5	10	0.05	0.05	73.79
3	0.5	12	0.01	0.10	100.19
4	0.5	14	0.20	0.20	92.62
5	1	8	0.05	0.10	63.88
6	1	10	0.01	0.20	85.24
7	1	12	0.20	0.01	83.69
8	1	14	0.10	0.05	90.10
9	2	8	0.10	0.20	78.45
10	2	10	0.20	0.10	85.63
11	2	12	0.01	0.05	103.11
12	2	14	0.05	0.01	101.94
13	4	8	0.20	0.05	94.76
14	4	10	0.10	0.01	95.15
15	4	12	0.05	0.20	88.74
16	4	14	0.01	0.10	101.17
<i>k</i> ₁	85.000	77.623	90.730	88.545	
<i>k</i> ₂	80.727	84.954	82.088	90.440	
<i>k</i> ₃	92.284	93.933	90.972	87.719	
<i>k</i> ₄	94.955	96.457	89.176	86.263	
<i>R</i>	14.228	18.834	8.884	4.177	

2.3.2 培养条件 在培养基成分及浓度组合确定后进行发酵工艺参数优化的正交试验, 即不同的发酵时间、装瓶量、种龄和 pH 值的正交组合试验进行考察, 结果见表 4。表 4 表明, 最佳的发酵工艺参数的组合为 A₄B₁C₁D₂, 即发酵时间为 60 h, 种龄为 10 h, 装瓶量为 50 mL, pH 值为 6.5。通过 *R* 可以看出, $R_C > R_A > R_B > R_D$, 发酵时间和装瓶量对发酵豆粕产酶活力影响较大。试验设计组合中没有出现理论得出的 A₄B₁C₁D₂ 的培养基组合, 因此将其与试验中酶活力最高的 11 号组合进行比较试验, 结果 11 号组合的酶活力最高, 最终确定最佳发酵工艺组合: 发酵时间为 48 h, 装瓶量为 50 mL, 种龄为 14 h, pH 值为 6.5。

3 结论与讨论

豆粕是我国主要的蛋白质饲料之一, 含粗蛋白质约 43%, 必需氨基酸含量高、组成合理, 且含有许多能产生生物效应的活性物质; 但是与鱼粉等优质动物源性蛋白相比, 豆粕由于经过高温处理, 蛋白存在着不同程度的变性, 溶解性较差。发酵豆粕能够降解大分子蛋白为小肽, 富含有益菌, 发酵后不影响氨基酸组成, 消化率较高, 富含多种生物活性因子, 适口性好, 成为提高豆粕利用率的重要途径。微生物发酵处理豆粕等植物蛋白应用前景广阔, 虽然目前已有产品问世, 但对产品的品质控制、发酵工艺参数控制以及规模化生产方面良莠不齐, 须进一步研究^[11]。

本试验通过单因素和正交试验得到 B-15 菌株产大豆

表 4 发酵条件正交试验方案及结果

序号	A:时间 (h)	B:种龄 (h)	C:装瓶量 (mL/250 mL)	D:pH 值	酶活力 (U/mL)
1	24	10	50	6.0	90.29
2	24	12	75	6.5	83.30
3	24	14	100	7.0	67.38
4	24	16	125	7.5	58.64
5	36	10	75	7.0	110.10
6	36	12	50	7.5	93.20
7	36	14	125	6.0	74.37
8	36	16	100	6.5	86.02
9	48	10	100	7.5	86.02
10	48	12	125	7.0	102.72
11	48	14	50	6.5	125.05
12	48	16	75	6.0	115.92
13	60	10	125	6.5	102.91
14	60	12	100	6.0	100.58
15	60	14	75	7.5	122.14
16	60	16	50	7.0	100.58
<i>k</i> ₁	74.903	97.330	102.280	95.290	
<i>k</i> ₂	90.922	94.950	107.865	99.320	
<i>k</i> ₃	107.428	97.235	85.000	95.195	
<i>k</i> ₄	106.552	90.290	84.660	90.000	
<i>R</i>	32.525	7.040	23.205	9.320	

肽发酵培养基最佳组成, 即葡萄糖为 2%, 豆粕浓度为 12%, KCl 为 0.01%, MgSO₄ 为 0.05%。通过对其进行发酵工艺条件参数的正交优化试验得出发酵培养基的最佳工艺参数, 即发酵时间为 48 h, 装瓶量为 50 mL, 种龄为 14 h, pH 值为 6.5。在此条件下, B-15 菌株发酵产蛋白酶活力为 125.05 U/mL, 与基础发酵培养基相比提高了 11.9%, 研究结果为进一步利用豆粕提供了理论依据。

参考文献:

[1] 豆康宁, 董彬, 王银满. 大豆蛋白活性肽的生物功能与应用前景[J]. 粮食加工, 2007, 32(2): 52-54.

[2] 邓成萍, 张惠, 魏秀英. 大豆低聚肽的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(增刊): 236-240.

[3] 王静, 郝再彬. 大豆肽的特性和功能及研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2004(5): 32-36.

[4] 宋俊梅, 曲静然, 徐少萍. 大豆肽的研究进展(待续)[J]. 山东轻工业学院学报, 2002, 16(3): 1-3.

[5] 郑哲君, 李晓莉, 王朔. 抗疲劳功能食品的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 31(2): 4-7.

[6] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. Agric and Food Chem, 1995, 43(5): 574-578.

[7] 方海红, 胡好远, 黄红英, 等. 微生物碱性蛋白酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 57-59.

[8] 邓勇, 吴煜欢. 微生物蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究[J]. 食品科学, 1999, 20(6): 42-45.

[9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 351.

[10] Iemura Y, Yamada T, Takahashi T, et al. Properties of the peptides liberated from rice protein in sokujo-moto[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(3): 276-280.

[11] 李志忠, 袁惠君, 张丙云, 等. 大豆多肽的功能与开发研究[J]. 甘肃科技, 2006, 22(4): 179-181.