

# 枯草芽孢杆菌发酵猪血蛋白肽工艺初步研究

范远景, 庞伟, 史鸿云, 冯铨祥, 余丽明, 刘盛扬, 陈嘉可

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥230009; 2. 广东省中山食品进出口公司, 广东中山528400)

**摘要** [目的] 为了进行枯草芽孢杆菌发酵猪血蛋白肽工艺参数优化研究。[方法] 采用产蛋白酶能力较强的枯草芽孢杆菌发酵猪血粉, 制备猪血多肽, 考察发酵温度、通气量、摇瓶转速、pH值、接种量、发酵时间对蛋白质利用率的影响, 通过单因素和正交优化试验确定发酵猪血蛋白肽的最佳条件, 并对发酵前后血粉的品质和感官进行分析。[结果] 结果表明, 枯草芽孢杆菌发酵猪血粉制备猪血多肽的最佳工艺参数: 温度为30℃、转速为160 r/min、pH值为7.5、接种量为6%、发酵时间为50 h。[结论] 该研究为采用微生物发酵猪血粉制备高营养的动物蛋白饲料和提取功能性多肽提供了试验依据。

**关键词** 枯草芽孢杆菌; 猪血粉; 水解度

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-07184-03

## Preliminary Study on Fermentation Technology of Swine Blood Protein Peptide with *Bacillus subtilis*

FAN Yuan-jing et al. (College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

**Abstract** [Objective] The study was to optimize the technical parameters for swine blood protein peptide fermentation with *Bacillus subtilis*. [Method] Swine blood meals were fermented with *Bacillus subtilis* for the preparation of peptides. To study the effects of protein utilization conditions such as the inoculation amount, pH value, ventilation volume, fermentation temperature and fermentation time. The optimum conditions were researched through a single factor experiment and orthogonal experiment. Changes in sensory qualities before and post fermentation were analyzed. [Result] The best suitable fermentation conditions were as follows: temperature of 30℃, rotating speed of 160 r/min, pH value of 7.5, inoculating quantity of 6%, fermenting time of 50 h. [Conclusion] The experimental results provided the basis for the fermentation process of animal protein feed and functional polypeptide.

**Key words** *Bacillus subtilis*; Swine blood meal; Degree of hydrolysis

我国猪血资源非常丰富, 每年由屠宰生猪而产生的副产物猪血总量约150万t, 但是国内对猪血深加工或综合利用的研究进展缓慢, 资源利用率低, 既浪费了宝贵的生物资源又造成严重的环境污染。猪血粉营养丰富, 蛋白质含量高达80%以上, 是一种极其宝贵的蛋白质资源<sup>[1-2]</sup>。目前, 利用不同蛋白资源开发功能多肽已成为研究热点, 但是国内多集中在利用化学、酶解或微生物发酵方法从猪血中提取血红素、凝血酶以及食用蛋白粉方面的研究, 对于猪血蛋白肽的研究较少。因此, 笔者以猪血粉为蛋白源, 以高产酶活力的枯草芽孢杆菌为发酵菌株, 考察发酵温度、通气量(摇瓶转速)、pH值、接种量、发酵时间对蛋白质利用率的影响研究, 并通过正交优化试验确定了发酵猪血蛋白肽的最佳工艺条件, 这对开发我国畜禽废弃物, 尤其是血液, 缓解蛋白饲料需求紧张, 丰富国内生化医药和功能性食品的种类以及优化生态环境和繁荣地区经济等都具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种。**枯草芽孢杆菌 GZM1.135, 由广东省微生物保藏中心提供。

**1.1.2 培养基。**细菌种子培养基: 可溶性淀粉10.0 g、蛋白胨10.0 g、十二水磷酸氢二钠4.0 g, 磷酸二氢钾0.3 g, 碳酸钠0.1 g, 蒸馏水1000 ml, pH值7.2, 0.10 MPa 灭菌20 min。猪血粉发酵培养基: 取适量猪血粉(过60目筛)配制成一定浓度, 调到适当pH值, 0.10 MPa 灭菌20 min。

**1.1.3 试剂。**猪血粉, 安徽兴皖牧业有限公司;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、硼酸、三氯乙酸、可溶性淀粉、蛋白胨均为国产分析纯。

**1.1.4 仪器。**电子天平(Chaus Corp. Fine Brook, NJ, USA)、电热恒温培养箱(上海跃进医疗仪器厂)、SHA-C水浴恒温振荡器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 种子培养基的制备。**在250 ml锥形瓶中, 装入50 ml细菌种子培养基, 接种一环已活化的枯草芽孢杆菌菌种, 30℃培养48 h。

**1.2.2 蛋白质含量的测定。**采用GB/T 14771-1993<sup>[3]</sup>方法; 氨基态氮含量的测定采用SB/T 10318-1999<sup>[4]</sup>方法; 可溶性氮含量测定采用三氯乙酸(TCA)法<sup>[6]</sup>; 水解度测定采用檀志芬等<sup>[7-9]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

**2.1 接种量对发酵液水解度的影响** 枯草芽孢杆菌分别按不同的接种量接种到猪血粉发酵培养基中, 自然pH值, 30℃, 160 r/min条件下发酵48 h, 测定可溶性氮含量及水解度, 结果见图1。在接种量为1%~4%范围内, 接种量为4%时最高, 且在这个范围内呈上升趋势, 随后, 随着接种量的增加可溶性氮含量及水解度反而下降。

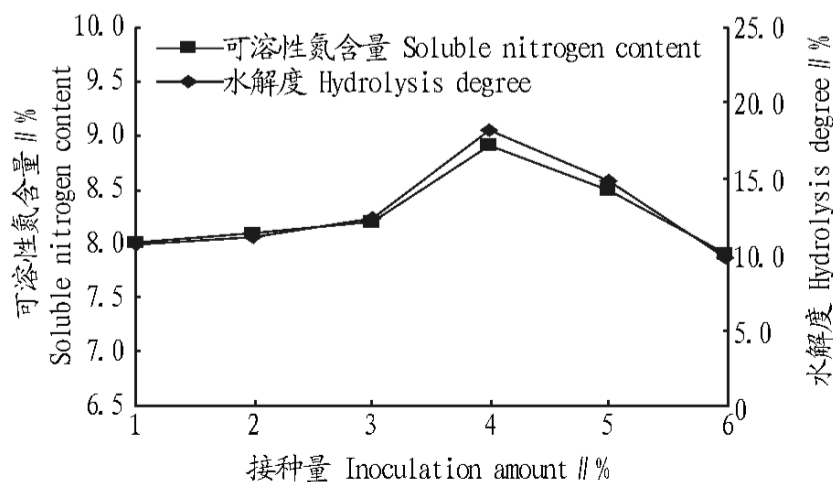


图1 接种量对水解度的影响

Fig.1 Effects of inoculation amount on the hydrolysis degree

**2.2 pH值对发酵液水解度的影响** 枯草芽孢杆菌接种

**作者简介** 范远景(1958-), 男, 安徽合肥人, 博士, 副教授, 从事食品营养与安全研究。

收稿日期 2009-03-05

4%于不同pH值的猪血粉发酵培养基中,30,160 r/min条件下发酵48 h,测定可溶性氮含量及水解度,结果见图2。在pH值为6.5~7.5范围内,在pH值为7.5时达到最大值,且在这个范围内呈上升趋势,pH值为9.0时明显下降,这可能与蛋白酶的最适pH值条件有关。

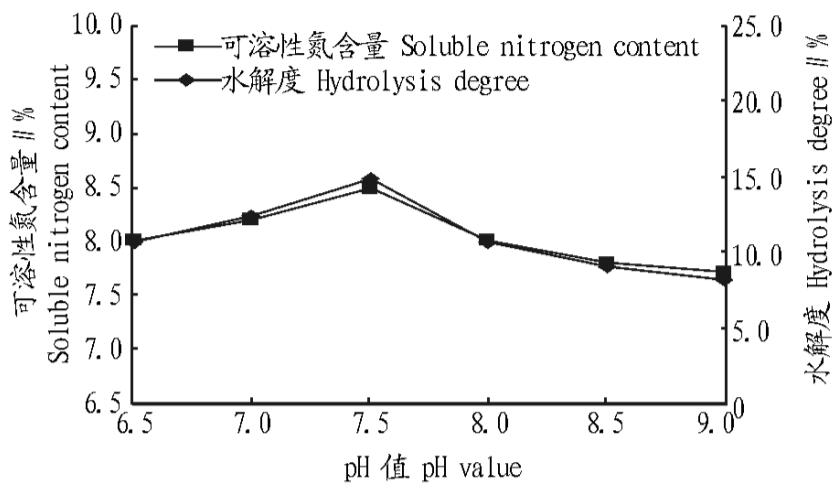


图2 pH值对水解度的影响

Fig. 2 Effects of pH value on the hydrolysis degree

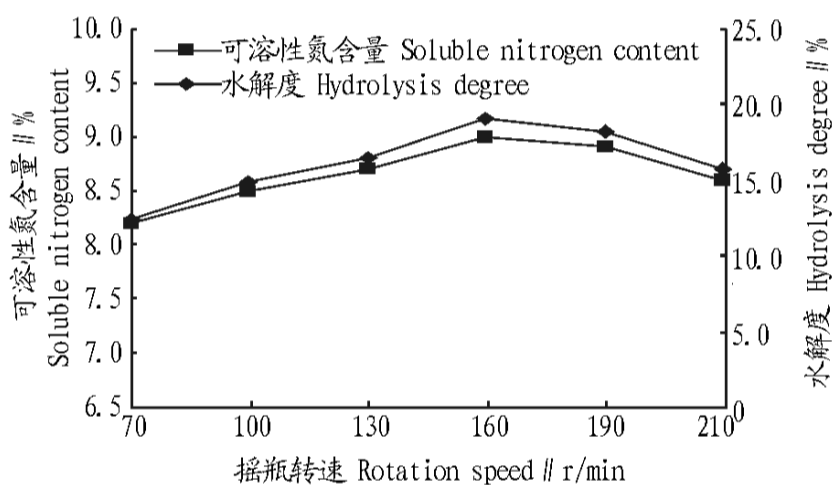


图3 转速对水解度的影响

Fig. 3 Effects of rotation speed on the hydrolysis degree

2.3 通气量对发酵液水解度的影响 枯草芽孢杆菌接种4%于猪血粉发酵培养基中,设置不同的摇瓶转速,30发酵48 h,测定可溶性氮含量及水解度,结果见图3。在70~160 r/min范围内,转速为160 r/min时达最大值,且在这个范围内呈上升趋势,210 r/min条件下可溶性氮含量及水解度明显下降。

2.4 温度对发酵液水解度的影响 枯草芽孢杆菌接种4%于猪血粉发酵培养基中,设置不同的发酵温度,160 r/min条件下发酵48 h,测定可溶性氮含量及水解度,结果见图4。在24~30℃范围内,30℃时达最大值,且在这个范围内呈上升趋势,40℃时水解度明显下降,且小于24℃时的水解度。这是因为适当地加热使蛋白质结构疏松,暴露出更多的酶作用位点,同时酶活性也达到最佳状态;但当温度超过最适温度后,酶蛋白部分变性,反应速度下降<sup>[10]</sup>。

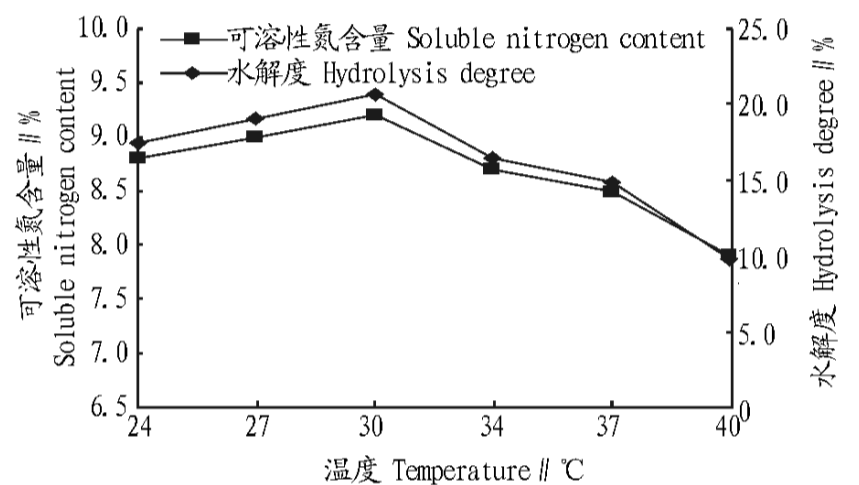


图4 温度对水解度的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the hydrolysis degree

2.5 时间对发酵液水解度的影响 枯草芽孢杆菌接种4%于猪血粉发酵培养基中,设置不同的发酵时间,30,160 r/min条件下发酵,测定可溶性氮含量及水解度,结果见图5。

表1  $L_{16}(4^5)$  正交试验方案及结果

Table 1 The scheme and result of  $L_{16}(4^5)$  orthogonal test

试验号 Est No.	A 温度 Temperature	B 转速 r/min Rotation speed	C pH值 pH value	D 接种量 % Inoculation amount	E 发酵时间 h Fermentation time	水解度 % Degree of hydrolysis
1	1(28)	1(140)	1(7.0)	1(3)	1(46)	11.5
2	1	2(160)	2(7.5)	2(4)	2(48)	14.8
3	1	3(180)	3(8.0)	3(5)	3(50)	14.0
4	1	4(200)	4(8.5)	4(6)	4(52)	13.1
5	2(30)	1	2	3	4	28.2
6	2	2	1	4	3	30.6
7	2	3	4	1	2	15.7
8	2	4	3	2	1	16.5
9	3(32)	1	3	4	2	10.7
10	3	2	4	3	1	9.0
11	3	3	1	2	4	8.2
12	3	4	2	1	3	8.2
13	4(34)	1	4	2	3	20.4
14	4	2	3	1	4	19.9
15	4	3	2	4	1	16.5
16	4	4	1	3	2	13.2
R	13.8	5.8	2.3	3.9	4.9	
最优水平 Optimum level		$A_2B_2C_2D_4E_3$				

在发酵时间为36~48 h 范围内,发酵48 h 达到最大值,且在这个范围内呈上升趋势,随后,随着接种量的增加水解度反而下降。这主要是因为枯草芽孢杆菌产蛋白酶具有专一性,随着水解时间延长,蛋白酶可水解的肽键逐渐减少,同时蛋白酶的活力以半衰期方式下降<sup>[11]</sup>。

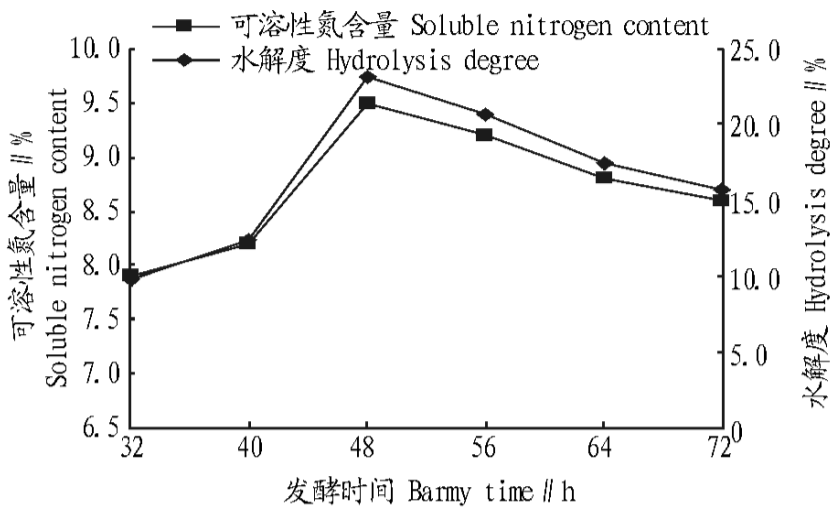


图5 发酵时间对水解度的影响

Fig.5 Effects of fermentation time on the hydrolysis degree

**2.6 正交试验** 单因素试验的基础上利用SPSS 进行正交组合设计,试验结果见表1。结果表明,  $A_2B_2C_1D_4E_3$  组合发酵产物的水解度最大,通过极差分析可知,  $A_2B_2C_2D_4E_3$  应是发酵猪血粉制备猪血多肽的最优工艺参数组合。最后,在此条件下发酵血粉时,所得发酵液的水解度为32.3%,因此可以得出结论:温度为30、转速为160 r/min、pH 值为7.5、接种量为6%、培养时间为50 h 时是最优的发酵组合。

**2.7 血粉发酵前后的比较** 从表2 可以看出,经枯草芽孢杆菌发酵后,猪血粉的蛋白质含量下降了24.05%,可溶性蛋白含量上升了53.77%,氨基酸态氮含量增加了4.44 倍。由表3 可知,发酵后的血粉呈现暗红色,且具有较浓的醇香味。

表2 猪血粉发酵前后的品质

Table 2 The quality of swine blood meal before and after fermentation

	ng/g		
猪血粉	氨基酸氮	可溶性氮	粗蛋白质
Swine blood meal	Amino nitrogen	Soluble nitrogen	Gude protein
发酵前	1.8 ±0.1	1.6 ±2.5	866.2 ±9.4
Before fermentation			
发酵后	9.8 ±0.1	16.3 ±1.6	657.9 ±16.7
After fermentation			

### 3 结论与讨论

(1) 从正交试验结果可知,第6 号管试验即  $A_2B_2C_1D_4E_3$

(上接第7181 页)

#### 参考文献

- [3] 刑福国,王海霞,韩春超,等.鸡腿蘑多糖免疫功能的初步研究[J].食品科学,2003,24(6):139-141.
- [4] 杨宁波,张建民.鸡腿菇营养成分及应用价值[J].特种经济动植物,2000(5):31-32.

表3 猪血粉发酵前后感官评定<sup>[12]</sup>

Table 3 Sensory evaluation of swine blood meal before and after fermentation

猪血粉	颜色	气味
Swine blood meal	Color	Odor
发酵前	黑褐	血腥味较浓,刺激性气味较浓
Before fermentation		
发酵后	暗红	血腥味浓,醇香味较浓,刺激性气味较淡
After fermentation		

组合发酵产物的水解度最大,通过极差分析可知,  $A_2B_2C_2D_4E_3$  应是发酵猪血粉制备猪血多肽的最优工艺参数组合,最后,用此条件发酵血粉时,所得发酵液的水解度为32.3%,因此可以得出结论:温度为30、转速为160 r/min、pH 值为7.5、接种量为6%、培养时间为50 h 时是最优的发酵组合。

(2) 经枯草芽孢杆菌发酵后,猪血粉的蛋白质含量下降,但是氨基酸态氮、可溶蛋白含量均提高,说明枯草芽孢杆菌在发酵过程中分泌蛋白酶,将大分子量蛋白质降解成氨基酸和小分子量的肽类。发酵后的血粉和发酵液的醇香味较浓,刺激性气味较淡。

#### 参考文献

- [1] 钟耀广,南庆贤.国内外畜血研究动态[J].中国农业科技导报,2003,5(3):26-29.
- [2] 余伯良.微生物饲料生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1996:37-38.
- [3] 国家技术监督局.食品中蛋白质的测定方法(GB/T 14771-1993)[S].北京:中国标准出版社,1993.
- [4] 中国食品产业网.氨基酸态氮含量测定 ZBX 66038-87[EB/OL].(2003-09-12) www.foodqs.com.
- [5] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:67.
- [6] 何东平,张世宏,姚理,等.脱脂米糠饼制备米糠多肽的研究[J].粮食与饲料工业,2004(12):25-27.
- [7] 檀志芬,生庆海,邱泉若,等.蛋白质水解度的测定方法[J].食品工业科技,2005(7):174-175.
- [8] 熊振平.酶工程[M].北京:化学工业出版社,1989:125-127.
- [9] ADLER N S S E N J. Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. London:Elsevier, 1986:9-24.
- [10] 赵国华,陈宗道.蛋白质水解物苦味研究进展[J].粮食与油脂,2000(1):28-30.
- [11] 许永红.蛋白质酶法水解物苦味的控制[J].食品工业科技,1997(3):50-51.
- [12] 张水华,徐树来,王永华.食品感官分析与实验[M].北京:化学工业出版社,2006.

- [5] 朱戎,陈向,东兰进.药用真菌液体发酵研究进展[J].中药材,2003,26(1):55-57.
- [6] 刘艳芳,杨焱,张劲松,等.鸡腿蘑菌株筛选及深层发酵培养基的优化[J].食品与生物技术学报,2005,24(2):14-17.
- [7] 李正鹏,林毅,蔡永萍,等.白灵菇液体发酵工艺[J].生物学杂志,2006,23(1):28-30.