

## 利用大豆浓缩蛋白乳清制备水苏糖的发酵条件

张闪闪,汪立平,王锡昌

(上海水产大学食品学院,上海 200090)

**摘要:**利用酵母对大豆浓缩蛋白乳清进行发酵处理制备水苏糖。在确定最佳起始发酵液的糖度为 31.8Brix 后,对温度、pH、接种量、装液量等工艺条件进行了单因素试验及正交试验,结果表明最佳发酵条件为:温度 32℃,pH 5.5,接种量 8%,在此发酵条件下利用酵母对大豆浓缩蛋白乳清进行发酵处理 48 h,水苏糖的纯度达到了 90%,保留率为 68%。

**关键词:**大豆浓缩蛋白乳清;酵母;水苏糖;发酵条件

## Optimization of Fermentation Conditions of Stachyose Preparation Using Whey of Soy Protein Concentrate

ZHANG Shan-shan, WANG Li-ping, and WANG Xi-chang

(School of Food Science and Technology, Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In this paper, we have studied the preparation of stachyose using yeast fermenting the whey of soy protein concentrate. The initial fermentation concentration of whey was 31.8Brix, the fermentation conditions including pH, temperature, inoculum, amount of broth in flask were also studied, according to the results of single factors experiments and orthogonal design, the optimal conditions of fermentation were 32℃, pH 5.5, inoculum 8%. Under optimized fermentation conditions, the purity of stachyose reached 90%, and its retention rate was 68% after 48 h fermentation.

**Key words:** Whey of soy protein concentrate; Yeast; Stachyose preparation; Fermentation conditions

随着大豆加工业的发展,大豆浓缩蛋白乳清的排放量日渐增长,给环境带来了严重的污染。因此,对大豆浓缩蛋白乳清进行回收处理已经成为亟待解决的问题。大豆浓缩蛋白乳清中所含的水苏糖及棉子糖是具有功能性的糖类,它们能够调节肠道菌群结构,提高机体免疫力(刘祥等,2003;乔为仓和张涛,2005;徐超斗等,2005)。据报道大豆浓缩蛋白乳清中水苏糖的含量高达 9.1%,棉子糖 2.7%,蔗糖 17.4%,还含有 13.3%的杂质蛋白质(郑建仙,2004),因此大豆浓缩蛋白乳清是一种制备功能性大豆低聚糖非常好的原料来源,由于棉子糖的含量不高,因此本试验将水苏糖作为制备的主要研究对象。乳清中蔗糖的含量高,影响了水苏糖发挥其自身的功能性特点,并且限制了其在众多领域中的应用。由于这三种糖结构相似,难以分离提纯,如果能找到一种去除蔗糖的方法,那么对于大豆加工业将

具有非常重要的意义。

制备水苏糖的常规方法有色谱柱分离法,酶改性法,膜分离法以及新兴的微生物发酵法(岳振锋和陈小霞,2001)。色谱柱分离法成本高产量有限;酶改性法所生产的产品纯度不高;膜分离法不仅产品纯度低并且存在膜污染的问题;微生物发酵法是利用微生物生长繁殖选择性消耗糖作为生长源的特点对发酵液进行处理从而使功能性糖类纯度提高,同时还能以杂质蛋白作为氮源除去蛋白质,达到进一步纯化的目的,其产物乙醇又可以回收利用于大豆浓缩蛋白的生产,因此,是一种非常具有潜力并且绿色无污染(袁其朋等,2001)的制备方法,但是现有研究的发酵起始糖度很低并且发酵条件未得到进一步的优化,阻碍了此法的工业化进程。

本文利用实验室内保藏的一株酵母菌对大豆浓缩蛋白乳清进行了发酵处理,通过对大豆浓缩蛋白

收稿日期(Received):2007-11-19;接受日期(Accepted):2007-12-19

基金项目:上海市重点学科建设资助项目(T1102)

作者简介:张闪闪(1982-),女,在读硕士生,研究方向主要为食品科学。E-mail:shiny0707@163.com

通讯作者(Corresponding author):汪立平,博士。E-mail:lpwang@shfu.edu.cn

乳清的浓度进行调整,获得一个适宜的较高的发酵糖度,在此糖度水平下,对 pH、温度、接种量、装液量等工艺条件进行了优化研究,以期为水苏糖进一步的工业化生产研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

酵母:上海水产大学食品生物技术教研室保藏。

### 1.2 培养基

种子培养基(Barnett et al., 1991);改良的葡萄糖蛋白胨培养基:酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 蔗糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 121℃ 灭菌 20 min。发酵培养基:某豆制品公司提供的大豆浓缩蛋白乳清。

### 1.3 基本发酵方法及分析方法

将发酵液分装入试管中,30℃ 发酵,每隔 8 h 取样进行外观糖度的跟踪测定,当 8 h 以内外观糖下降幅度小于 0.5 Brix 时,取前一个时间点样品进行 HPLC 分析,并计算该时间点样品的水苏糖纯度,以水苏糖的纯度作为优化发酵条件的指标。

发酵液外观糖的测定(Lachat and Ma, 2004):取大豆浓缩蛋白乳清适当稀释,用手持式糖度计进行测定。蔗糖、棉籽糖、水苏糖含量的测定:高效液相色谱法(郝岩平等, 2003;夏海涛等, 2006)。

水苏糖的纯度 = 发酵后的水苏糖含量 / (发酵后水苏糖含量 + 发酵后蔗糖含量 + 发酵后棉子糖含量) × 100%。

### 1.4 发酵条件的优化

1.4.1 发酵液最佳发酵浓度的确定 取乳清原液及适当稀释的乳清液(见表 1)按 1.3 的方法进行发酵试验,通过比较发酵后水苏糖纯度确定发酵液的最佳起始浓度。每个处理两个重复,取平均值。

表 1 不同起始浓度的发酵液

Table 1 The different initial concentrations of fermentation broth

编号 No	大豆浓缩蛋白乳清体积 Volume of whey/%	水体积 Volume of water/%
1	100	-
2	50	50
3	33.3	66.7
4	25	75
5	20	80

1.4.2 单因素试验 根据 1.4.1 确定最适发酵糖度确定后,以最适发酵糖度进行温度、pH、接种量、装液量的单因素试验,每个单因素设计 5 个水平(见表 2)。每个处理两个重复,取平均值。

表 2 单因素水平表

Table 2 Factors and levels of single factor test

编号 No	温度 Temperature/℃	pH	接种量 Inoculum/%	装液量 Amount of broth in flask/mL
1	25	3.5	2	20
2	28	4.5	4	30
3	30	5.5	6	40
4	32	6.5	8	50
5	35	7.5	10	60

1.4.3 正交试验 正交试验采用最佳起始糖度的发酵液,根据单因素试验的结果设计正交试验的因素及水平,每个处理两个重复,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵液最佳发酵浓度的确定

将乳清原液按表 1 适当稀释成不同浓度进行发酵,发酵过程中外观糖的变化见图 1。1、2、3、4、5 号发酵液 8 h 以内外观糖下降幅度小于 0.5 Brix 的时间点分别为 120、48、32、24、16 h,各发酵液对应时间点的 HPLC 结果见表 3。综合图 1 和表 3 可以看出,在不同的发酵液浓度下,酵母的降糖速度有很大差别,以大豆乳清原液作为原料进行发酵,发酵 120 h 后,水苏糖的纯度也仅有 40.18%,发酵时间过长,纯度较低,因此发酵效果并不理想;2 号发酵液中水苏糖的纯度较高,此时发酵时间仅为 48 h,且相对于 3、4、5 号发酵液来说,其发酵起始糖度较高,考虑工业成本,选用越高的发酵液浓度则工业成本就会越低。因此确定了 2 号发酵液(即大豆浓缩蛋白乳清与水的体积比为 1:1)为该酵母的最适起始发酵液浓度。

表 3 不同浓度发酵液的水苏糖的纯度

Table 3 The purity of stachyose at different concentrations of fermentation broth

编号 No	水苏糖的纯度 Purity of stachyose/%
1	40.18
2	87.80
3	81.53
4	84.64
5	86.35

### 2.2 最适发酵糖度下,最适 pH、温度、接种量、装液量的确定

2.2.1 最适温度的确定 根据酵母的生长特点,温度单因素试验设计了 5 个水平(见表 2),根据 1.3

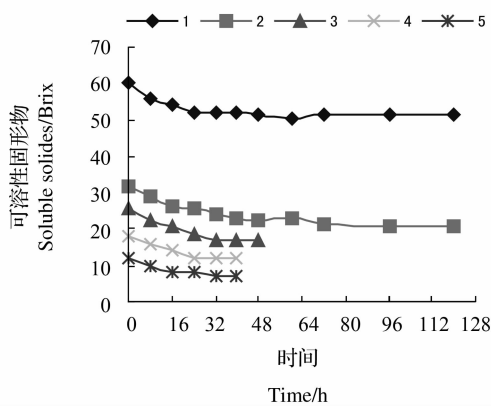


图1 不同浓度发酵液的可溶性固形物的变化  
Fig. 1 Changes of the content of soluble solids at different concentrations of broth

的基本发酵方法对不同温度下的发酵液进行 HPLC 检测(见图 2),明显看到 2 号酵母在 28、30 和 32℃ 下水苏糖的纯度在 84% 左右,此时发酵时间均为 40 h。而在 25℃ 和 35℃ 下分别发酵 56 h 得到的水苏糖的纯度仅为 62.83% 和 42.53%。

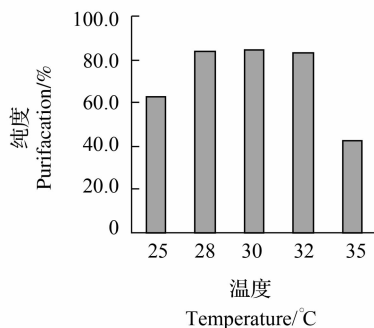


图2 不同温度发酵后的水苏糖纯度  
Fig. 2 The purity of stachyose of the broth at different temperatures

2.2.2 最适 pH 值的确定 根据酵母的生长特点,设计了 5 个不同的 pH 值水平(见表 2),其中 5.5 是大豆浓缩蛋白乳清的自然 pH,按照 1.3 的基本发酵方法对不同温度下的发酵液进行 HPLC 测定比较(图 3),2 号酵母在自然 pH 值 5.5 下发酵得到的水苏糖纯度最高达到 84.43%,此时发酵时间为 40 h;当发酵 pH 值达到 7.5 时,发酵 48 h 水苏糖的纯度也仅为 64.03%。

2.2.3 最适接种量的确定 设计了 5 个不同的接种量,按照 1.3 的基本发酵方法测定 HPLC,从图 4 中可以看到当接种量为 6% 其水苏糖的纯度最高约为 84.42%,此时发酵时间为 48 h。

2.2.4 最适装液量的确定 采用 250 mL 的摇瓶

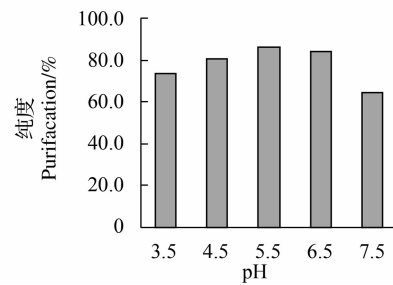


图3 不同 pH 下发酵后水苏糖的纯度  
Fig. 3 The purity of stachyose of the broth at different pH

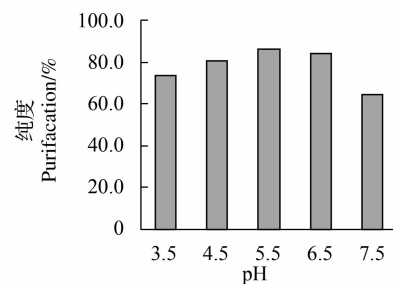


图4 以不同接种量发酵后水苏糖的纯度  
Fig. 4 The purity of stachyose of the broth with different inoculum sizes

进行装液量试验,由于酵母在生长过程中产生  $\text{CO}_2$ ,装液量不易过多,转速不能太大,因此分别装入 20、30、40、50、60 mL 进行培养,摇床转速为  $120 \text{ r min}^{-1}$ 。但是发酵 16 h 后发现水苏糖的保留率仅为 20%,发酵速度过快,发酵过程难以控制,使得水苏糖的得率过低,因此在进一步的试验中采取静置培养,正交试验中将不考虑装液量对发酵效果的影响。

### 2.3 正交试验

正交试验的因素水平通过 2.2 单因素试验的结果设计,首先,在单因素试验中,28~30℃ 发酵效果较好,因此设计了 28℃、30℃、32℃ 3 个水平,在 pH 单因素试验中,当发酵液为其自然 pH 值时,发酵效果最好,因此设定了 4.5、5.5、6.63 个水平。接种量的单因素试验中,6% 表现了最佳的发酵效果,因此选择了 4%、6%、8% 为正交试验中接种量的 3 个水平。表 4 为按照 1.3 进行 HPLC 测定的分析结果。

从表 4 极差数值(R)可以看出,影响因素的主次顺序为:接种量 > pH > 温度;根据各水平的水苏糖纯度之和,最佳发酵条件为接种量 8%,pH 5.5,温度 32℃。进一步研究发现,在最佳发酵条件下发酵 48 h 水苏糖纯度达到 90%,水苏糖的保留率为 68%。

表4  $L_9(3^3)$  正交试验结果  
Table 4 Result of orthogonal design

编号 No	因素 Factors			水苏糖纯度 Purification of stachyose/%
	温度 Temperature/°C	pH	接种量 Inoculum/%	
1	1(28)	1(4.5)	1(4)	58.22
2	1	2(5.5)	2(6)	82.56
3	1	3(6.5)	3(8)	80.93
4	2(30)	1	2	80.55
5	2	2	3	85.99
6	2	3	1	80.07
7	3(32)	1	3	81.64
8	3	2	1	83.87
9	3	3	2	81.66
K1	221.71	226.25	222.16	
K2	246.61	252.42	250.58	
K3	247.17	248.47	254.4	
R	25.46	26.17	32.24	

### 3 讨论

发酵液中的糖是酵母生长所需要的碳源,发酵液中含糖量的多少直接影响到酵母的生长繁殖,因此必须首先确定酵母生长的最适发酵糖度。一般酵母在1%~2%的低糖度时生长速度最快(Lachat et al., 2004),在确定最佳发酵糖度的试验中通过对发酵液的梯度稀释后进行发酵,最终得到一个较高的起始发酵糖度为31.8 Brix,与报道相比(袁其朋等, 2001),发酵起始糖度提高了2~3倍,发酵糖度的提高使得生产成本降低。

在31.8Brix的发酵液下进行温度、pH、接种量、装液量的单因素试验,确定了正交试验的因素及水平,正交试验和单因素试验的结果基本相符。最后通过在最佳的发酵条件下进行验证试验,发酵48 h得到的发酵液中水苏糖的纯度提升到90%,并且水苏糖的保留率在68%以上。此法不仅绿色环保无污染,而且成本低廉,操作简单,生产周期短,产品纯度高于市售水平,因此它是一种有望用于工业化生产的具有广阔前景的生产方法。

### 4 结论

利用酵母对大豆浓缩蛋白乳清进行发酵以制备水苏糖,通过调节大豆浓缩蛋白乳清液浓度获得最适发酵起始糖度31.8Brix,同时通过单因素和正交试验确定本实验室保藏菌种在温度为32℃, pH为

5.5,接种量为8%的发酵条件下发酵48 h左右,使功能性糖类—水苏糖的纯度提高至90%,保留率在68%以上。

### References

- Barnett J A, Payne R W, and Yarrow D, eds. Hu R Q. trans. 1991. Yeasts characteristics and identification. China Ocean University Press, China, Qingdao, pp. 56 (巴尼特 J A, 佩恩 R. W, 亚罗 D. 主编; 胡瑞卿. 主译. 1991. 酵母菌的特征与鉴定手册. 中国海洋大学出版社, 中国, 青岛, pp. 56)
- Hao Y P, Yang X R, and Jiang J D. 2003. Determination of soybean oligosaccharide in food by HPLC. China Beet & Sugar, 3(1): 8-11 (郝岩平, 杨秀茹, 姜金斗. 2003. HPLC 法测定食品中大豆低聚糖的含量. 中国甜菜糖业, 3(1): 8-11)
- Lachat C, Ma Z R, eds. 2004. Cider making technology. China Light Industry Press, China, Beijing, pp. 95 (莱金特 C, 马兆瑞. 主编. 2004. 苹果酒酿造技术. 中国轻工业出版社, 中国, 北京, pp. 49-53, 95)
- Liu X, Yu Q, Pei X F, Liu H C, and Xu X. 2003. A study on the modulation functions of Shansong soybean oligosaccharide on the structure of instinal flora. Chinese Journal of Microecology. 15(1): 10 (刘祥, 余倩, 裴晓芳, 刘衡川, 许欣. 2003. 大豆低聚糖对肠道菌群结构调节的研究. 中国微生态学杂志, 15(1): 10)
- Qiao W C, and Zhang T. 2005. Development and use of functional oligosaccharides. The Beverage Industry, 8(2): 4-7 (乔为仓, 张涛. 2005. 功能性低聚糖的开发与应用. 饮料工业, 8(2): 4-7)
- Xia H T, Liu Y F, and Chen H W. 2006. Analysis of soybean oligosaccharides by HPLC with ELS detector. Chinese Journal of Applied Chemistry, 23(4): 462-464 (夏海涛, 刘玉芬, 陈红卫. 2006. 蒸发光散射检测器 HPLC 法测定大豆低聚糖. 应用化学, 23(4): 462-464)
- Xu C D, Liang A J, Zhu Y, and Tao S Y. 2005. Immunopotentiating effect of soybean oligosaccharides. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 21(1): 37-39 (徐超斗, 梁爱君, 祝业, 陶胜源. 2005. 大豆低聚糖对免疫功能的促进作用. 解放军药学报, 21(1): 37-39)
- Yuan Q P, Ma R Y, and Zhang X. 2001. Purification of soya oligosaccharide by fermentation. Microbiology, 28(6): 56-59 (袁其朋, 马润宇, 张鑫. 2001. 发酵法精制大豆低聚糖的研究. 微生物学通报, 28(6): 56-59)
- Yuen Z F, Chen X X, Peng Z Y, and Zhao M M. 2001. An introduction to purification of functional oligosaccharide. Journal of Zhengzhou Grain College, 22(1): 89-91 (岳振锋, 陈小霞, 彭志英, 赵谋明. 2001. 功能性低聚糖分离纯化方法概述. 郑州工程学院学报, 22(1): 89-91)
- Zheng J X, ed. 2004. Functional oligosaccharides. Chemical Industry Press, China, Beijing, pp. 313 (郑建仙, 著. 2004. 功能性低聚糖. 化学工业出版社, 中国, 北京, pp. 313)