

## 纳豆菌发酵对豆粕脲酶活性的影响

张丽靖, 齐莉莉, 杨 郁

(浙江大学宁波理工学院分子设计与营养工程市重点实验室, 浙江 宁波 315100)

**摘要:**微生物发酵可一定程度降低豆粕抗营养因子活性, 提高豆粕作为蛋白源的利用率。采用2株纳豆菌发酵研究豆粕中脲酶的失活情况。首先测定了其生长曲线, 用以指导其发酵条件的优化研究。研究了水/豆粕比例、培养温度、pH、接种量等发酵参数对脲酶活性的影响, 结果表明: 降低脲酶活性的最优发酵条件为: 水/豆粕比例为5:1, pH4.5、温度30℃、接种量5%、种龄为8 h, 发酵60 h, 豆粕脲酶活性降低93%。

**关键词:**纳豆菌; 豆粕; 脲酶活性; 钝化

**中图分类号:**S963.13<sup>+</sup>4

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2008)04-0669-03

## Effect of Fermented *Bacillus natto* on Urease Activity of Soymeal

ZHANG Li-jing, QI Li-li, YANG Yu

(Key Laboratory for Molecular Design and Nutrition Engineering of Ningbo City, Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100, Zhejiang, China)

**Abstract:** Microorganism fermentation could decrease the activity of soymeal antinutrition factors in certain extent, and increase the use efficiency of protein sources. This paper studied the inactivation of urease by fermentation of two strains of *Bacillus natto*. The growth curves of *Bacillus natto* were set out and instructed to optimize its fermentation conditions. Effect of fermentation parameters, such as the ratio of water and soymeal, culturing temperature, and inoculating amount, on urease activity was investigated. The results indicated that the optimized fermentation conditions were soybean meal as basic material, the ratio of water and material 5:1, pH 4.5, the original temperature 30℃, the inoculating amount 5%, the ages of inoculums 8 h and the cycle of fermentation 72 h. Under the optimized condition, 93% urease activity of soymeal was inactivated.

**Key words:** *Bacillus natto*; Urease activity; Soymeal; Inactivation

豆粕的粗蛋白质含量为43%~48%, 氨基酸组成较合理, 是畜禽较重要的植物性蛋白源。但是, 豆粕中还存在多种抗营养因子如胰蛋白酶抑制剂(TI)和脲酶、大豆寡糖等<sup>[1]</sup>, 极大影响豆粕的饲用价值, 其中, 胰蛋白酶抑制剂(TI)和脲酶是豆粕中主要的抗营养因子, 实践中一般以脲酶的测定来反映大豆及其制品的加工程度<sup>[2]</sup>。80~100℃的干热处理豆粕对脲酶活性几乎无影响, 湿热处理作用则较明显, 128℃ 5 min下即失活<sup>[3-4]</sup>。热处理虽然一定程度上可以降低豆粕脲酶活性, 但热加工处理工艺复杂, 能源消耗大, 而且加热不够不能起到钝化效果, 过度则会破坏饲料中的氨基酸和维生素, 从而降低饲料的饲用效率和价值。采用微生物发酵方法则相对成本较低、且无化学残留, 应用较安全。纳豆菌为日本传统食品纳豆的发酵菌种, 对畜禽安全无害, 且具有分解蛋白质、碳水化合物等大分子物质的能

力, 可作为绿色饲料添加剂的益生菌。试验研究了纳豆菌混合发酵豆粕对其脲酶活性的影响, 优化其发酵条件, 旨在尽可能地不影响豆粕营养价值的情况下钝化脲酶, 提高豆粕作为饲料蛋白源的利用价值。

### 1 材料与方法

#### 1.2 材料

菌种: 纳豆菌(*Bacillus natto*) N8和N15为本实验室分离菌种。

种子培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[5]</sup>。发酵基础培养基: 豆粕5g/100 mL三角瓶, 料水比1:1, pH自然。

生豆粕: 由浙江义乌华统饲料公司提供。

#### 1.2 方法

1.2.1 纳豆菌生长曲线的测定 种子培养24 h后,

收稿日期: 2008-01-07

基金项目: 宁波市农业与社会发展攻关资助项目(2005C100103)。

作者简介: 张丽靖(1979-), 女, 讲师, 现主要从事微生物发酵与制剂研究。E-mail: zlj@nit.zju.edu.cn。

取 2.5 mL 的种子液至 50 mL 液体培养液的三角瓶中,于 37 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 的摇床里振荡培养 48 h。隔一定时间取出 0.5 mL 菌液,稀释一定倍数涂布平板培养,24 h 后观察统计活细菌细胞数(个·mL<sup>-1</sup>)。再以培养时间为横坐标,菌体总数为纵坐标绘制生长曲线。

**1.2.2 不同条件对豆粕发酵的影响** 纳豆菌 N8、N15 各挑取一环到种子培养液中于 28 °C 活化培养 24 h,再接入到下述发酵条件的发酵培养基进行试验,发酵基础条件为:pH 自然,接种量 5%,料水比 1:5,28 °C 下发酵 24 h。试验中只改变相应的考察条件,其他参数不变。

发酵后把样品平铺在平板,在 67 °C 烘箱 10 h 烘干,置于研钵中研磨粉碎待脲酶活性测定用。

**初始 pH:** 用缓冲液把豆粕培养基起始 pH 值分别调为 2.5,4.5,7.0,9.0 及 pH 值自然。

**不同接种量:** 将种子液分别以 1%、3%、5%、8%、10% 的接种量接入到豆粕培养基。

**不同含水量:** 配制豆粕培养基料水比分别为 1:3,1:5,1:6,1:8,1:10 的豆粕培养基。

**温度:** 发酵温度分别设为 20 °C、25 °C、28 °C、30 °C、37 °C、40 °C。

**不同发酵周期:** 发酵终止时间为 24 h,36 h,48 h,60 h,72 h。

**1.2.3 测定方法** 豆粕中脲酶活性的测定采用滴定-pH 法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 纳豆菌的生长曲线

从图 1 中可以看出,纳豆菌 N8 和 N15 的生长

大致可以分为 4 个时期,即适应期、对数期、稳定期、衰亡期。菌 N8 在 3~8 h 为对数期,细胞数目以几何级数增加,8~24 h 为稳定期,之后进入衰亡期。N15 的适应期不是特别明显,在 12 h 进入稳定期,时间较短,继而马上进入到衰亡期。

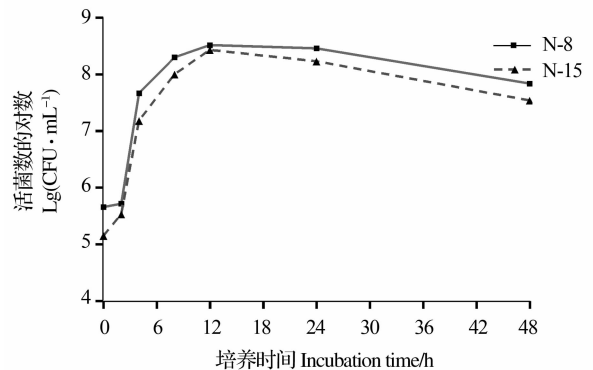


图 1 纳豆菌 N8、N15 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Bacillus natto* N8, N15

### 2.2 不同发酵条件对豆粕钝化效果的影响

**2.2.1 培养条件** 种子液接种量、水/豆粕比例、发酵初始 pH 及发酵温度对豆粕脲酶活性的影响见图 2。从图 2(A) 看出,接种量较小时,脲酶活性随接种量的增大而降低;当接种量为 3% 的时候,脲酶活性是最低的,随着接种量的增大又升高,最合适的接种量为 3%。水/豆粕比例影响着培养基系统中的氧气供应、气体流动等<sup>[3]</sup>,它与发酵效果有着直接的关系。不同水添加比例的结果见图 2(B),水/豆粕比例为 5:1 的时候对脲酶的钝化效果最好。pH 对发酵后豆粕脲酶活性的影响见图 2(C),当 pH 为

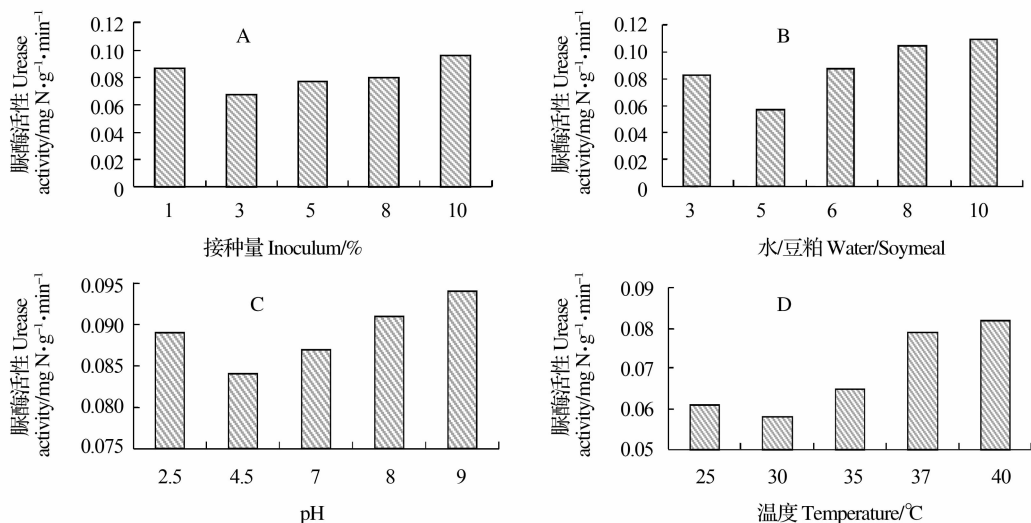


图 2 不同条件发酵对豆粕脲酶活性的影响

Fig. 2 The effect on urease activity of soymeal in different fermentation conditions

4.5 的时候,脲酶活性是最低的,为  $0.084 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。发酵温度不仅影响菌体的生长状况,也影响到纳豆菌对豆粕的钝化效果,当发酵温度为  $30^\circ\text{C}$  时,豆粕中脲酶活性最低,见图 2(D)。

2.2.2 种龄 种龄关系到菌体接入到发酵培养基后的适应期长短,继而可能影响到发酵豆粕的钝化效果,种龄对豆粕钝化影响见图 3。种龄为 8 h 的纳豆菌接入到豆粕培养基中,脲酶的钝化效果最明显。由前述的生长曲线可知,8 h 种龄的纳豆菌 N8 和 N15 均是处在对数期,可能是缩短了其接入到豆粕中的适应期,另一方面处于对数期的菌体生长旺盛、代谢活力强,最终导致钝化豆粕效果较好。

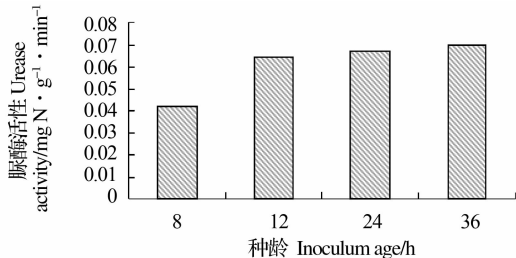


图 3 纳豆菌种龄对脲酶活性的影响

Fig. 3 The effect of inoculum age of *Bacillus natto* on urease activity

2.2.3 发酵周期 不同发酵周期对豆粕发酵的影响见图 4。可以从图上看,随着发酵时间的延长,豆粕的脲酶活性呈下降的趋势,但发酵时间超过 60 h 之后,脲酶活性反而出现升高的趋势。这可能是由于发酵时间过长,豆粕其他一些成分的变化引起脲酶活性又有所升高,还有待于进一步研究。因而以 60 h 作为豆粕的最佳发酵周期。

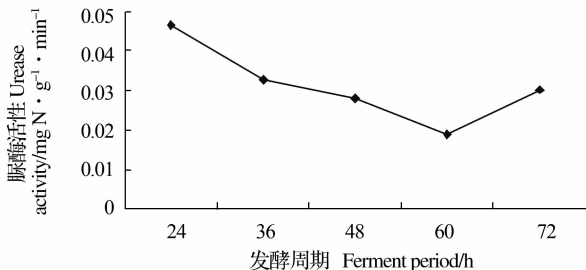


图 4 发酵周期对脲酶活性的影响

Fig. 4 The effect of fermentation period on urease activity

### 2.3 发酵前后脲酶活性的比较

综合上述各试验,确定豆粕发酵的最佳发酵条件为:接种量为 3%,水/豆粕比例为 5:1,初始 pH 为 4.5,发酵温度为  $30^\circ\text{C}$ ,种龄为 8 h,发酵周期为 60 h。按上述的发酵条件参数对豆粕进行发酵,同时设不接种种的对照处理,最后测得豆粕发酵后脲酶

活性为  $0.021 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,而对照的未发酵豆粕的测量值为  $0.3 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,豆粕钝化效果较好,失活率达到 93%。

## 3 结论与讨论

豆粕中的胰蛋白酶抑制剂和脲酶等抗营养因子大大降低了其作为蛋白原料的消化利用率,与物理、化学钝化豆粕抗营养因子方法相比,微生物发酵可较有效去除豆粕抗营养因子且处理生豆粕成本低;无化学残留;增加了益生菌,有利于动物肠道菌群的平衡;发酵过程中分解产生多种有机酸及小分子肽,使营养物质更易被动物吸收,可大大提高其饲喂价值和动物利用率<sup>[7]</sup>。

姚晓红等<sup>[1]</sup>报道了微生物发酵对胰蛋白酶钝化效果的研究,酵母菌和乳酸菌混合发酵豆粕 72 h,可完全降解除去豆粕中胰蛋白酶抑制剂,但无脲酶活性的数据。利用纳豆菌混合发酵豆粕 60 h,其脲酶活性比对照下降了 93%,钝化效果显著。但纳豆菌发酵对豆粕多种抗营养因子的钝化效果以及发酵豆粕的营养成分影响及提高动物生长性能方面还有待于进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 姚晓红,吴逸飞,汤江武,等. 微生物混合发酵去除生豆粕中胰蛋白酶抑制剂的研究[J]. 饲料工业,2005,26(15):14-16. (Yao X H, Wu Y F, Tang J W, et al. Study on resolve the trypsin inhibitor by using mixed culture of microorganism[J]. Feed Industry, 2005,26(15):14-16.)
- [2] Qin G, ter Elst E R, Bosch M W, et al. Thermal processing of whole soya beans: Studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets[J]. Animal Feed Science and Technology, 1996,57(4):313-324.
- [3] 钟华宜,李铁军,印遇龙,等. 热处理对大豆及豆饼抗营养因子和营养价值的影响[J]. 动物营养学报,1998,10(1):12-19. (Zhong H Y, Li T J, Yin Y L, et al. Effect of heat treatment on anti-nutritive factors and nutritive value of soybean and soybean meal[J]. Acta Zoonutrimenta Sinca, 1998,10(1):12-19.)
- [4] 陈远绍. 豆浆晶生产过程中加热工序使脲酶失活情况的研究[J]. 食品科学,1993,12:48-50. (Chen Y S. Study on the he deactivate status of urease of soybean milk powder by heating process[J]. Food Science, 1993,12:48-50.)
- [5] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999:214. (Shen P, Fan X R, Li G W. Microbiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999:214.)
- [6] 李德发. 大豆抗营养因子[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003:355-356. (Li D F. Soybean anti-nutrition factors[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2003:355-356.)
- [7] Lonsane B K. Scale up strategies for solid state fermentation systems Process[J]. Biochemistry, 1992,27:259-273.