

文章编号: 1674 - 5566(2015)01 - 079 - 06

二元复合菌不同菌种对比对固态发酵豆粕营养价值的影响

高斐斐, 陈再忠, 高建忠, 王 磊, 黄志坚

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 在混菌发酵条件下, 研究枯草芽孢杆菌和啤酒酵母不同添加比例对豆粕营养价值的影响, 观察发酵前后豆粕蛋白和水溶性总肽含量、氨基酸和蛋白质结构组成以及植酸含量的变化。试验按照菌种配比不同设为 4 组, 分别是: $V(\text{枯草芽孢杆菌}): V(\text{啤酒酵母}) = 1:1$ (I 组), $2:1$ (II 组), $1:2$ (III 组) 和未发酵试验组, 每组 3 个重复。结果表明: (1) 与未发酵试验组相比, 3 个发酵试验组的蛋白含量出现显著增加 ($P < 0.05$), 以试验组 I 增加率最高, 为 14.09%, 而 3 个发酵试验组间差异不显著 ($P > 0.05$); (2) 发酵后豆粕蛋白质分子量变小, 水溶性总肽含量随枯草芽孢杆菌添加比例的增加而显著上升, 而植酸含量则显著下降 ($P < 0.05$), 以试验组 II 变化最大, 水溶性总肽增加了 678.47%, 植酸降低了 38.81%; (3) 与未发酵试验组相比, 游离氨基酸总量增加, 试验组 II 增加率最高, 为 256.0%, 其中以 Ile、Leu 和 Phe 含量增加最多。总之, 当以枯草芽孢杆菌为优势菌种进行固态发酵时, 豆粕的营养价值得到较高改善。

研究亮点: 本文从粗蛋白含量、水溶性总肽含量、氨基酸组成以及蛋白质结构组成多个角度系统阐述了不同菌种对比对固态发酵豆粕营养价值的影响, 为今后豆粕的相关研究提供了一定的理论依据。此外, 本文的研究结果说明固态发酵不仅可以降低抗营养因子含量, 还能改善其营养价值, 为植物蛋白资源的有效利用奠定了基础。

关键词: 啤酒酵母; 枯草芽孢杆菌; 固态发酵; 豆粕

中图分类号: S 963.3

文献标志码: A

豆粕是配合饲料重要的植物性蛋白源, 蛋白含量高达 43%, 氨基酸组成相对平衡, 被认为是优质的鱼粉替代蛋白源。但是豆粕中存在的影 响动物生长和生理机能的抗营养因子^[1-2], 限制了其替代鱼粉的可行性及其在饲料中的饲用价值。例如, 植酸在生理 pH 条件下可以与矿物质和蛋白结合, 抑制营养物质的吸收利用。因此, 降低豆粕抗营养因子含量, 改善其营养价值成为饲料行业研究的热点。固态发酵不仅可以有效降解植酸类抗营养因子, 还能通过酶解作用实现大分子蛋白转化成小肽, 改善营养价值, 提高豆粕的饲喂效价^[3-5]。研究表明, 混菌固态发酵效果优于单菌发酵^[6-8]。目前, 利用混菌固态发酵豆粕已进行了大量的研究, 主要从抗营养因子含

量降低和蛋白质含量改善上展开^[9]。但是关于菌种配比比例的研究则较少, 且品质改善比较单一, 重点主要放在豆粕蛋白质含量的提高上, 然而随着饲料行业的快速发展, 蛋白质指标已远远不能满足生产的需求, 因此, 为降低抗营养因子含量和改善豆粕的营养价值, 混菌发酵具有进一步研究的必要性, 尤其是氨基酸和肽类指标的研究。

本试验以脱脂豆粕为原料, 首先通过单菌固态发酵豆粕从枯草芽孢杆菌、啤酒酵母和植物乳杆菌 3 种菌株中筛选优质发酵菌种, 其次利用筛选菌种进行混菌固态发酵, 研究不同菌种添加比例对豆粕粗蛋白含量、氨基酸组成和水溶性总肽含量的影响, 以期今后豆粕资源的深层开发利

收稿日期: 2014-02-10 修回日期: 2014-06-25

基金项目: 共磷实业(深圳)有限公司基金项目(D-8006-12-0050); 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心(ZF1206); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 高斐斐(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为观赏鱼繁殖生物学。E-mail: gff.qingniao@163.com

通信作者: 陈再忠, E-mail: chenzz@shou.edu.cn

用提供科学依据,同时也为我国新型生物蛋白饲料的开发奠定坚实的基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料

脱脂豆粕购自统一嘉吉,粗蛋白质含量为44%,粉碎粒度过60目筛网;麸皮购自深圳南海粮食工业有限公司。

1.1.2 菌种

试验用菌种包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。其中植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心,啤酒酵母为本实验室保藏菌种。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液制备

用无菌生理盐水将平板上的菌落冲洗下来,收集到三角烧瓶中,加入数粒玻璃珠,置于摇床上震荡30 min,使菌落尽量保持离散状态,最后得到混和均匀的菌悬液。

1.2.2 固态发酵

按脱脂豆粕:麸皮=9:1比例称取一定量的物料混合物,加入适量水分,高压蒸汽灭菌锅121℃灭菌30 min。冷却至室温,加入适宜含量的菌悬液,混匀后放入30℃恒温培养箱中培养72 h,取样,烘干,制成风干样品,检测粗蛋白和水溶性总肽含量,氨基酸和蛋白质结构组成以及植酸含量。

1.2.3 试验设计

菌种筛选试验:按照不同菌种分为4个处理,分别为未发酵试验组、枯草芽孢杆菌试验组、啤酒酵母试验组、植物乳酸菌试验组,每组3个重复;菌种配比试验:按照菌种比例不同分设4个处理,分别为未发酵组、I组[V(啤酒酵母):V(枯草芽孢杆菌)=1:1]、II组[V(啤酒酵母):V(枯草芽孢杆菌)=1:2]、III组[V(啤酒酵母):V(枯草芽孢杆菌)=2:1],每组3个重复。

1.3 检测指标

1.3.1 粗蛋白、氨基酸、寡肽含量检测

粗蛋白含量测定按国标(GB/T 6432—1994)

半微量凯式定氮法测定。

氨基酸采用S-433D全自动氨基酸分析仪检测,水解氨基酸前处理按国标(GB/T18246—2000)饲料中氨基酸的测定方法进行,游离氨基酸前处理过程如下:称取一定量的样品,加入3 mL 3%的磺基水杨酸,3000 r/min离心30 min,吸取1 mL上清液于离心管中,加入等体积的3%磺基水杨酸,混匀离心(10 000 r/min,20 min),上清液用0.45 μm滤膜过滤至样品瓶中,上机测定。

水溶性总肽含量检测采用双缩脲法^[10]。植酸含量检测采用三氯化铁比色法^[11]。

1.3.2 蛋白质结构组成检测

蛋白质分子组成检测采用三甲基甘氨酸-十二烷基四乙酸二钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(Tricine-SDS-PAGE)。参照SCHAGGER的方法^[12],浓缩胶、间隙胶和分离胶的浓度分别是4%、10%、16%。蛋白上样量为10 μL,20 mA恒流5~6 h,考马斯亮蓝染色。根据电泳图谱分析大分子蛋白降解情况。蛋白质标准品含有120 ku、85 ku、50 ku、35 ku、25 ku、20 ku 6种成分。

1.4 数据统计与分析

试验数据用平均值±标准差表示,采用SPSS 17.0统计软件中的单因子方差分析(one-way ANOVA),结合Duncan氏法进行多重比较检验, $P < 0.05$ 作为差异显著标志。

2 结果

2.1 单菌固态发酵筛选优质发酵菌种

饲料原料优劣的一项重要评判指标即粗蛋白含量,本试验以粗蛋白含量为依据来考察3种不同菌种单菌固态发酵的效果。由表1可知,与未发酵豆粕相比,枯草芽孢杆菌试验组和啤酒酵母试验组的粗蛋白含量显著增加,其中以啤酒酵母菌试验组含量最高,而植物乳杆菌试验组无显著增加。

2.2 混菌固态发酵对豆粕营养成分的影响

2.2.1 不同菌种配比对豆粕粗蛋白、水溶性总肽和植酸含量的影响

由表2可见,与未发酵试验组相比,3个发酵试验组的粗蛋白含量显著增加,其中以试验组I的增加量最高,为14.09%,但3个发酵试验组间差异不显著。

表 1 不同菌种单菌发酵对固态发酵豆粕粗蛋白含量的影响(干物质基础)

Tab. 1 Effect of solid state fermentation of different strains on crude protein content (dry matter) %

项目 item	试验组 experimental group			
	未发酵 unfermented	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	植物乳酸菌 <i>L. plantarum</i>
粗蛋白 crude protein	44.42 ± 0.59 ^a	49.08 ± 1.25 ^b	50.54 ± 3.16 ^b	47.90 ± 2.84 ^{ab}

注:同行数据肩标相同字母或未标字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

Note: Values with same superscripts or without superscript in the same row indicate no significant difference at $P > 0.05$, and values with different superscripts indicate significant differences at $P < 0.05$. The same as in the tables below.

表 2 不同菌种比例固态发酵对豆粕营养成分的影响(干物质基础)

Tab. 2 Effects of different strain inoculating proportions on common nutrients of soybean meal (dry matter)

项目 item	试验组 experimental group			
	未发酵组 unfermented	I	II	III
粗蛋白/(%) crude protein	43.35 ± 0.14 ^a	49.46 ± 0.17 ^b	48.49 ± 0.71 ^b	48.41 ± 0.28 ^b
水溶性总肽/(%) peptide	1.31 ± 0.10 ^a	10.08 ± 0.80 ^b	10.20 ± 0.38 ^b	9.45 ± 0.29 ^b
植酸/(mg/g) phytic acid	40.40 ± 0.73 ^c	26.30 ± 0.98 ^b	24.72 ± 0.87 ^a	26.58 ± 0.24 ^b

由表 2 可见,随着枯草芽孢杆菌添加比例的升高,水溶性总肽含量升高,以试验组 II 最多,增加率为 677.29%。与未发酵豆粕相比,发酵后豆粕水溶性总肽含量显著增加,但是不同菌种配比试验组间差异不显著。

植酸是一种重要的抗营养因子,能与蛋白质结合,降低其溶解性,影响蛋白的生理功能^[13]。此外,植酸对矿物元素的吸收也有一定的负面影响。由表 2 可知,发酵豆粕的植酸含量显著低于未发酵试验组,且随枯草芽孢杆菌添加比例的增加,植酸含量呈下降趋势,试验组 II 降低最多,由

40.40 mg/g 降低到 24.72 mg/g,这说明不同菌种对比对豆粕植酸有显著的影响。

2.2.2 不同菌种对比对豆粕氨基酸含量的影响

发酵前后,水解氨基酸和游离氨基酸(FAA)组成分析结果见表 3。由表 3 可知,氨基酸总量和氨基酸组成在发酵前后没有差异。FAA 总量随枯草芽孢杆菌添加比例的增加而增加,试验组 II 的 FAA 总量由 0.44% 增加到 1.56%,增加率达 678.47%。除 Arg 和 Asp 外,其他氨基酸含量均有不同程度的增加,其中以 Ile、Leu 和 Phe 增加较高。

表 3 发酵前后豆粕中氨基酸组成变化(干物质基础)

Tab. 3 Changes of amino acids of soybean meal after fermentation (DM basis) %

项目 item	水解氨基酸 hydrolytic amino acid				游离氨基酸 free amino acid			
	未发酵 unfermented	I	II	III	未发酵 unfermented	I	II	III
天冬氨酸 ASP	4.95 ± 0.08	4.65 ± 0.05	5.10 ± 1.11	4.86 ± 0.27	0.045 ± 0.001 ^d	0.010 ± 0.002 ^a	0.022 ± 0.000 ^c	0.014 ± 0.001 ^b
苏氨酸 THR	1.73 ± 0.03	1.63 ± 0.08	1.79 ± 0.33	1.76 ± 0.09	0.0049 ± 0.000 ^a	0.027 ± 0.005 ^c	0.037 ± 0.000 ^d	0.019 ± 0.000 ^b
丝氨酸 SER	2.22 ± 0.02	2.07 ± 0.10	2.30 ± 0.44	2.30 ± 0.11	0.0083 ± 0.001 ^{ab}	0.011 ± 0.005 ^b	0.014 ± 0.003 ^b	0.003 ± 0.000 ^a
谷氨酸 GLU	8.38 ± 0.19	8.06 ± 0.29	8.57 ± 1.61	7.94 ± 0.42	0.11 ± 0.004 ^{bc}	0.082 ± 0.018 ^b	0.12 ± 0.034 ^c	0.055 ± 0.002 ^a
甘氨酸 GLY	2.01 ± 0.02	1.87 ± 0.05	2.05 ± 0.38	1.96 ± 0.11	0.012 ± 0.001 ^b	0.018 ± 0.001 ^c	0.034 ± 0.000 ^d	0.0023 ± 0.000 ^a
丙氨酸 ALA	1.99 ± 0.05	1.92 ± 0.07	2.04 ± 0.40	2.00 ± 0.09	0.04 ± 0.002 ^{ab}	0.064 ± 0.020 ^b	0.12 ± 0.001 ^c	0.02 ± 0.024 ^a
半胱氨酸 CYS	0.62 ± 0.08	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.08	0.68 ± 0.02	0.00 ± 0.00 ^a	0.0016 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.0026 ± 0.00 ^c
缬氨酸 VAL	2.23 ± 0.05	2.10 ± 0.08	2.26 ± 0.42	2.14 ± 0.10	0.047 ± 0.001 ^a	0.16 ± 0.009 ^{cd}	0.19 ± 0.039 ^d	0.14 ± 0.022 ^b
甲硫氨酸 MET	0.35 ± 0.05	0.43 ± 0.09	0.43 ± 0.04	0.41 ± 0.02	0.0052 ± 0.001 ^a	0.013 ± 0.004 ^b	0.012 ± 0.001 ^b	0.0054 ± 0.000 ^a
异亮氨酸 ILE	1.98 ± 0.03	1.86 ± 0.15	1.98 ± 0.37	1.95 ± 0.10	0.0083 ± 0.000 ^a	0.10 ± 0.004 ^b	0.15 ± 0.007 ^c	0.10 ± 0.005 ^b
亮氨酸 LEU	3.44 ± 0.01	3.22 ± 0.21	3.45 ± 0.64	3.40 ± 0.17	0.0092 ± 0.000 ^a	0.22 ± 0.012 ^b	0.32 ± 0.012 ^c	0.21 ± 0.003 ^b
酪氨酸 TYR	1.75 ± 0.16	1.54 ± 0.06	1.66 ± 0.31	1.56 ± 0.08	0.015 ± 0.004 ^a	0.097 ± 0.003 ^b	0.14 ± 0.010 ^c	0.09 ± 0.002 ^b
苯丙氨酸 PHE	2.49 ± 0.71	1.95 ± 0.10	2.10 ± 0.38	2.01 ± 0.13	0.0077 ± 0.005 ^a	0.17 ± 0.010 ^b	0.22 ± 0.009 ^c	0.16 ± 0.004 ^b
组氨酸 HIS	1.94 ± 0.04	1.91 ± 0.08	1.97 ± 0.33	1.90 ± 0.08	0.013 ± 0.001 ^a	0.031 ± 0.002 ^b	0.039 ± 0.007 ^c	0.033 ± 0.003 ^{bc}
赖氨酸 LYS	2.28 ± 0.06	2.16 ± 0.06	2.31 ± 0.42	2.33 ± 0.13	0.016 ± 0.001 ^a	0.055 ± 0.003 ^b	0.088 ± 0.002 ^c	0.055 ± 0.002 ^b
精氨酸 ARG	2.79 ± 0.14	2.55 ± 0.13	2.80 ± 0.53	2.82 ± 0.14	0.10 ± 0.003 ^b	0.028 ± 0.009 ^a	0.048 ± 0.003 ^a	0.033 ± 0.020 ^a
水解氨基酸总量 /游离氨基酸总量	41.17 ± 1.08	38.59 ± 1.56	41.48 ± 7.80	40.03 ± 1.98	0.44 ± 0.012 ^a	1.08 ± 0.084 ^c	1.56 ± 0.002 ^d	0.93 ± 0.030 ^b

2.2.3 不同菌种对比对豆粕蛋白质结构组成的影响

从图 1 可知,豆粕由多种不同分子量的蛋白组成。与未发酵豆粕相比,豆粕经过发酵后,大分子的蛋白基本上被降解,分子量均小于 25 ku,其中以 V (啤酒酵母):V (枯草芽孢杆菌) = 1:2 试验组颜色最浅。

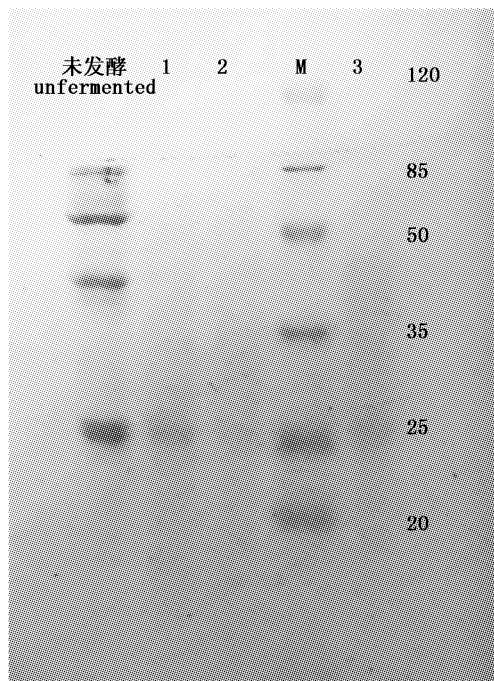


图 1 不同菌种配比试验组间发酵豆粕蛋白质结构组成变化

Fig. 1 Changes of molecular weight of protein between different experimental groups

1. V (啤酒酵母菌):V (枯草芽孢杆菌) = 1:1; 2. V (啤酒酵母菌):V (枯草芽孢杆菌) = 1:2; 3. V (啤酒酵母菌):V (枯草芽孢杆菌) = 2:1; M. 蛋白标准品。

1. *B. subtilis*/*S. cerevisiae* = 1:1; 2. *B. subtilis*/*S. cerevisiae* = 1:2; 3. *B. subtilis*/*S. cerevisiae* = 2:1; M. Marker.

3 讨论

3.1 不同菌种配比固态发酵豆粕常规营养成分变化规律

固态发酵可以改善发酵底物营养价值,粗蛋白、水溶性总肽以及 FAA 含量升高,主要是由于微生物产生功能性酶的作用。本研究发现,随着枯草芽孢杆菌添加比例升高,固态发酵豆粕的水溶性总肽和游离氨基酸含量升高,但是粗蛋白含量和水解总氨基酸含量随菌种配比改变无显著性变化。本试验结果与蔡国林等研究发现一致,

蛋白质含量从 46.2% 提高到 49.7%,氨基酸组成和含量也有一定的变化和提高^[14]。此外,吴胜华等^[15]、钱森和等^[16] 研究报道也指出枯草芽孢杆菌在混菌中表现优秀,可以作为发酵豆粕的主要菌种。因此,混菌固态发酵可以改善豆粕的营养价值,并且枯草芽孢杆菌添加比例越高,对底物的改善作用越好。究其原因,首先,在混菌发酵条件下,枯草芽孢杆菌可能具有竞争优势,对豆粕的利用能力较强;其次,与酵母菌相比,枯草芽孢杆菌延缓期较短,可以快速进入生理活性状态,利用发酵底物转化其中的大分子物质,提高豆粕的营养价值。

固态发酵可以降低豆粕中抗营养因子含量,提高豆粕的利用价值。本试验发现,发酵豆粕的植酸含量显著低于未发酵豆粕,且随枯草芽孢杆菌添加比例的增加,植酸含量呈下降趋势,下降率最高为 38.82%。EGOUNLEY 和 AWORH^[17] 利用少孢根霉发酵 3 种豆类植物的研究表明,3 种豆类植物经发酵后,植酸含量分别下降 30.7%、32.6% 和 29.1%,本试验结果与其相似。固态发酵可以有效降低植酸含量,这主要与枯草芽孢杆菌和啤酒酵母菌分泌的植酸酶有关^[18-19],植酸酶能使饲料中的植物有机磷得到有效的利用,减少植酸的抗营养作用。

3.2 不同菌种对比对豆粕蛋白组成的影响

动物对蛋白质和氨基酸的消化利用率是评判饲料蛋白质品质的主要标准,这与蛋白化学结构密切相关。蛋白质化学结构受多种因素影响,例如原料的品种、生产加工工艺^[20]等。研究表明,豆粕的蛋白质含量一般在 43% 以上,主要由伴球蛋白和球蛋白组成,还有一部分血细胞凝集素以及胰蛋白酶抑制因子等^[21],且必需氨基酸含量均较丰富,除甲硫氨酸略低外。本研究中水解氨基酸含量与朱元招等^[22] 及中国饲料成分及营养价值表(2009 版)报道相近,但 Arg, Lys 和 Met 含量相对较低。研究发现,动物容易吸收那些蛋白质分子量小和氨基酸组成平衡的饲料。从蛋白质 SDS-PAGE 电泳图可知,豆粕由多条分子量不同的条带组成,而发酵豆粕的大分子蛋白被降解,分子量主要集中在 25 ku 左右,表明发酵改变了豆粕的蛋白质结构,与 AMADOU 等^[23]、陈洁梅等^[24] 研究发现一致。此外,与未发酵豆粕相比,发酵豆粕氨基酸含量没有明显变化,但是 FAA 含

量明显增加,以试验组 II FAA 含量最高,其中又以 Leu、Ile 和 Phe 增加较多,分别提高了 1645.8%、3246.7%、2810.4%,说明固态发酵改变了豆粕的蛋白质结构,大分子蛋白基本被降解,生成多肽和游离氨基酸。所以,发酵豆粕更容易被动物吸收和利用。

4 结论

本试验研究发现,与未发酵豆粕相比,当啤酒酵母菌:枯草芽孢杆菌 = 1:2 时,豆粕中大分子蛋白基本上被完全降解,粗蛋白、水溶性总肽和 FAA 总量增加,分别增加了 11.9%、677.3% 和 256.0%,而植酸含量降低了 38.81%。

共鳞实业(深圳)有限公司提供原材料和试验场所,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 吴莉芳,秦贵信,朱丹,等. 大豆中主要抗营养因子对鱼类的影响[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 450-452.
WU L F, QIN G X, ZHU D, et al. Effects of main antinutritional facts in soybean on fish[J]. Soybean science, 2006, 25(4):450-452.
- [2] HART S D, BHARADWAJ A S, BROWN P B. Soybean lectins and trypsin inhibitors, but not oligosaccharides or the interactions of factors, impact weight gain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2010, 306 (1/4): 310-314.
- [3] 胡婷,陆文清,王翔,等. 豆粕中抗营养因子及其消除方法[J]. 饲料与畜牧, 2008(10): 29-31.
HU T, LU W Q, WANG X, et al. Antinutritional factors in soybean meal and its elimination methods [J]. Feed and Husbandry, 2008(10): 29-31.
- [4] COUTO S R, SANROMÁN M Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 76 (3): 291-302.
- [5] GRAMINHA E, GONCALVES A, PIROTA R, et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition[J]. Animal Feed Science and Technology, 2008, 144 (1): 1-22.
- [6] 戚薇,唐翔宇,王建玲,等. 益生菌发酵豆粕制备生物活性饲料的研究[J]. 饲料工业, 2008, 29(5): 15-19.
QI W, TANG X Y, WANG J L, et al. Study on bio-active feed of fermented soybean meal by probiotics [J]. Feed Industry, 2008, 29(5): 15-19.
- [7] 涂璇,薛泉宏,司美茹,等. 多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 30-34.
TU X, XUE Q H, SI M R, et al. Effects of mixed poly-fermentation on cellulase activity[J]. Industry Microbiology, 2004, 34(1): 30-34.
- [8] 孙林,李吕木,张邦辉,等. 多菌种固态发酵菜籽粕的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(1): 85-89.
SUN L, LI L M, ZHANG B H, et al. Solid state fermentation of rapeseed meal with multi-strains [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(1): 85-89.
- [9] GAO Y L, WANG C S, ZHU Q H, et al. Optimization of Solid-State Fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for Trypsin Inhibitor Degradation in Soybean Meal[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12 (5): 869-876.
- [10] 罗钦,陈人弼,宋永康. 发酵鱼粉中寡肽检测技术研究[J]. 福建农业学报, 2008, 23(3): 327-330.
LUO Q, CHEN R B, SONG Y K. Determination of oligopeptide content in fermented fishmeal [J]. Fujian Journal of Agricultural Science, 2008, 23(3):327-330.
- [11] 傅启高,李慧荃. 三氯化铁比色法测定植酸含量的研究[J]. 营养学报, 1997, 19(2): 216-220.
FU Q G, LI H Q. Study on ferric chloride colorimetric method for phytate determination soy bean and its products [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 1997, 19(2): 216-220.
- [12] SCHAGGER H. Tricine SDS-PAGE [J]. Nature Protocols, 2006, 1 (1): 16-22.
- [13] 徐奇友,许红,马建章. 大豆中营养因子和抗营养因子研究进展[J]. 中国油脂, 2006, 31(11): 17-20.
XU Q Y, XU H, MA J Z. Study progress on nutritional and antinutritional factors in soy [J]. China Oils and Fats, 2006, 31(11): 17-20.
- [14] 蔡国林,杨旭,曹钰,等. 微生物发酵对豆粕营养价值的影响[J]. 中国油脂, 2008, 33(10): 21-24.
CAI G L, YANG X, CAO Y, et al. Effect of fermentation on the nutritional value of soybean meal [J]. China Oils and Fats, 2008, 31(10): 21-24.
- [15] 吴胜华,李吕木,张邦辉,等. 多菌种固态发酵豆粕生产小肽饲料[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 113-115.
WU S H, LI L M, ZHANG B H, et al. Studies on oligopeptides feedstuff by solid stated fermented with manifold strains [J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34 (10): 113-115.
- [16] 钱森和,厉荣玉,魏明,等. 二元复合菌固态发酵豆粕制备大豆肽的研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 131-135.
QIAN S H, LI R Y, WEI M, et al. Preparation of soybean peptide from soybean meal by solid-state fermented with binary compound strains [J]. Soybean Science, 2011, 30 (1): 131-135.
- [17] EGOUNLETY M, AWORH O. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of

- soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms) [J]. *Journal of Food Engineering*, 2003, 56 (2): 249 - 254.
- [18] 惠明, 窦丽娜, 田青, 等. 枯草芽孢杆菌的应用研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36 (27): 11623 - 11624, 11627.
HUI M, DOU L N, TIAN Q, et al. Advances in application research of *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36 (27): 11623 - 11624, 11327.
- [19] 刘静, 刘聚祥. 酵母菌的营养特性及在畜牧业中的应用 [J]. *动物医学进展*, 2007, 28 (5): 98 - 100.
LIU J, LIU J X. Nutritional properties of saccharomycete and advance in husbandry [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28 (5): 98 - 100.
- [20] 王桂芹, 李子平, 孙丽, 等. 不同加工处理大豆制品对鲤鱼鱼种生产性能的影响 [J]. *华南农业大学学报*, 2010, 31 (002): 95 - 99.
WANG G Q, LI Z P, SUN L, et al. Effects of variously processed soybeans meal on production performance of *Cyprinus carpio* juveniles [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2010, 31 (2): 95 - 99.
- [21] 田琨. 大豆蛋白的结构表征及应用研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
TIAN K. Structure characterization and application of soy protein [D]. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [22] 朱元招, 王凤来, 尹靖东. 抗草甘膦大豆及豆粕营养成分和抗营养因子研究 [J]. *营养学报*, 2010 (2): 178 - 182.
ZHU Y Z, WANG F L, YI J D. Study on the nutritional composition and antinutrition factors of transgenic glyphosate-tolerant soybeans and soybean meal [J]. *Acta Nutrimenta Science*, 2010 (2): 178 - 182.
- [23] AMADOU I, LE G W, SHI Y H, et al. Optimized lactobacillus plantarum lp6 solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis improve some nutritional attributes of soybean protein meal [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2011, 35 (6): 1686 - 1694.
- [24] 陈洁梅, 熊娟, 常磊, 等. 芽孢杆菌在豆粕固态发酵中的应用研究 [J]. *饲料工业*, 2011, 32 (9): 15 - 19.
CHEN J M, XIONG J, CHANG L, et al. Application of *Bacillus* in solid state fermentation of soybean meal [J]. *Feed Industry*, 2011, 32 (9): 15 - 19.

Effect of strain proportion in the mixed solid state fermentation on nutrition value of soybean meal

GAO Feifei, CHEN Zaizhong, GAO Jianzhong, WANG Lei, HUANG Zhijian
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The studies were conducted to evaluate crude protein, bioactive peptides, phytic acid and amino acid composition of SBM by solid state fermentation with combined bacteria. According to single bacteria supplemented, four groups were designed to obtain suitable strains for subsequent trials, i. e. unfermented group, *Bacillus subtilis* group, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* group. The results showed that crude protein content of *S. cerevisiae* group was improved to 50.54%. Based on different volume ratios of *B. subtilis* to *S. cerevisiae*, four groups were designed as 1:1 (group I), 2:1 (group II), 1:2 (group III) and unfermented group. Crude protein content was significantly improved after solid fermentation ($P < 0.05$), and increased by 14.09% in group I, while no significance was found between three fermentation groups ($P > 0.05$). Compared with unfermented soybean meal, molecular weight of proteins of fermented soybean meal got smaller. With the proportion of *B. subtilis* increased, the content of small peptide was improved significantly, meanwhile phytic acid decreased remarkably ($P < 0.05$). The content of peptide in group II was increased by 678.47% and phytic acid decreased by 38.81%. Free amino acids increased by 256.0% mainly in Ile, Leu and Phe after fermentation. The results indicate that solid state fermentation with *B. subtilis* as dominant bacteria can improve the nutrient value of soybean meal.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*; solid state fermentation; soybean meal