

酵母菌发酵劣质鱼粉的工艺参数研究

吴超, 韩信, 程茂基*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 鱼粉在养殖业中的应用越来越广泛, 但是劣质鱼粉的营养价值较低, 通过有益微生物发酵可以提高劣质鱼粉中蛋白质的含量。以劣质鱼粉为研究对象, 通过酵母菌不同发酵条件发酵劣质鱼粉, 研究发酵后营养成分的变化。结果表明, 影响酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的4个因素依次是发酵时间 > 发酵温度 > 接种量 > 料水比; 摸索出发酵条件的最佳组合为发酵时间 48 h、发酵温度 30℃、接种量 2%、料水比 1:0.9; 最佳发酵条件发酵劣质鱼粉后, 其粗蛋白和酸溶蛋白的含量明显提高。

关键词: 酵母菌; 发酵条件; 劣质鱼粉; 酸溶蛋白

中图分类号: S816.48

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0228-05

Technological parameters for yeast fermentation of inferior-quality fishmeal

WU Chao, HAN Xin, CHENG Maoji

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Fishmeal is widely used in the aquaculture industry, but inferior-quality fishmeal has relatively low nutritional value. Beneficial fermentation can increase protein content in inferior-quality fishmeal. In this paper, nutrient contents in inferior-quality fishmeal were analyzed after they were fermented under different conditions. The result showed that fermentation time, fermentation temperature, inoculum size, and the material/water ratio affected acid-soluble protein content in yeast fermented poor-quality fishmeal. The optimal fermentation conditions were fermentation for 48 h at 30℃ with 2% inoculum size in a material/water ratio of 1:0.9. Under such conditions, both crude protein and acid-soluble protein in poor-quality fishmeal were significantly increased after fermentation.

Key words: yeast; fermentation conditions; poor-quality fishmeal; acid-soluble proteins

鱼粉是我国水产饲料中蛋白质的主要来源, 它的蛋白质含量通常都在 60%以上, 富含各种氨基酸^[1], 同时还含有鱼类生长繁殖所需要的维生素、脂肪酸、矿物质以及可被消化的各种能量成分, 鱼粉的适口性佳^[2]。我国人口众多, 又属于大规模发展养殖业的发展中国家, 鱼粉一般都是作为优质的蛋白饲料, 它可以平衡蛋白质、矿物质和氨基酸以及微量元素^[3], 所以需求量会越来越大, 同时鱼粉在水产饲料业的发展中也占据着非常重要的位置, 尤其是其质量对养殖动物能够起关键性的促进生长作用^[4]。在鱼粉的使用量方面, 需要根据鱼粉的生

物功能来确定^[5], 如果使用了劣质鱼粉或参杂的鱼粉, 不但不能达到营养价值和养殖效率, 还将导致经济损失^[6]。

鱼粉中的蛋白质是动物饲料中不可缺少的优质蛋白质, 随着生物科技的发展, 越来越多的以鱼粉为基础的鱼粉发酵产物不但具有营养作用, 而且可以提高动物的免疫力, 同时还具有改善动物胃肠道菌群结构的功能^[7]。所以, 鱼粉发酵产物的功能因子很有可能应用于人类保健, 进而改善人的免疫力、辅助治疗糖尿病和高血压等^[8]。微生物发酵就是一种深度研究的手段, 微生物发酵饲料即在人工控制

收稿日期: 2014-04-24

基金项目: 安徽省农业成果转化项目(12040302077)资助。

作者简介: 吴超, 硕士。E-mail: wc3865073@163.com

* 通信作者: 程茂基, 博士, 教授。E-mail: cmj681212@sohu.com

的条件下, 通过有益微生物在饲料原料中生长繁殖以及新陈代谢, 将饲料原料中不易被动物消化吸收或对动物有毒有害的物质分解、转化, 而产生易被动物消化吸收的无毒无害的中间代谢产物和富含有益菌体以及消化酶等的饲料^[9]。

鱼粉营养价值评价的一种重要指标就是粗蛋白的含量, 当然, 使用粗蛋白对鱼粉的质量进行评价的时候还必须结合其他的指标^[10]。劣质鱼粉发酵过程中大分子蛋白被蛋白酶等消化酶降解产生小分子蛋白, 而酸溶蛋白含量可以作为检测发酵劣质鱼粉中小分子蛋白含量的指标^[11]。本试验以劣质鱼粉为研究对象, 使用酸溶蛋白含量为指标, 研究酵母菌发酵劣质鱼粉后营养价值的变化, 寻求酵母菌发酵劣质鱼粉的最佳条件。

1 材料与方 法

1.1 菌种及培养基

试验菌种酵母菌 ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 由本实验室提供。试验培养基参照孙林等^[6]的培养方法, 配制的方法如下: 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL。培养基在使用之前进行 121°C 的灭菌, 灭菌 20 min。

1.2 主要仪器

SW-CJ-1B μ 净化工作台 (江苏净化设备有限公司); YXQ-SG46-280S 手提式压力蒸汽灭菌锅 (上海博讯实业有限公司); ZHWY211B 恒温培养箱 (上海支承分析仪器公司); HZQ-F160A 全温振荡培养箱 (上海一恒科技有限公司); FA1004 电子天平 (上海天平仪器厂); DHG-9053A 烘箱 (上海一恒科技有限公司); TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科技仪器厂)。

1.3 试验原料

劣质鱼粉, 在合肥市场上购买, 检测蛋白质含量^[12] (中华人民共和国国家标准 GB/T19164-2003) 低于 50% (3 级品标准) 的为劣质鱼粉, 本实验使用的劣质鱼粉粗蛋白含量为 44.23%。

1.4 试验方法

将 80 g 劣质鱼粉装入自封袋中 (自封袋开口, 好氧发酵), 置于振荡培养箱中, 试验设置 4 组。发酵温度 30°C , 接种量 (种子液: 培养液) 2%, 料水比 1:1, 研究发酵时间 24、36、48、60、72 和 80 h 对劣质鱼粉酸溶蛋白含量的影响; 发酵时间 60 h, 接种量 2%, 料水比 1:1, 研究发酵温度 27°C 、 28°C 、 29°C 、 30°C 、 31°C 和 32°C 对劣质鱼粉酸溶蛋白含量的影响; 发酵时间 60 h, 发酵温度 30°C , 料水

比 1:1, 研究接种量 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 和 3.5% 对劣质鱼粉酸溶蛋白含量的影响; 发酵时间 60 h, 发酵温度 30°C , 接种量 2%, 研究料水比 1:0.6、1:0.7、1:0.8、1:0.9、1:1 和 1:1.1 对劣质鱼粉酸溶蛋白的影响。

在单因素试验基础上, 根据各因素对劣质鱼粉酸溶蛋白的影响, 设计四因素、三水平正交试验 $L_9(3^4)$, 对发酵条件进行正交试验优化, 确定酵母菌发酵劣质鱼粉的最佳发酵条件。在确定酵母菌发酵劣质鱼粉的最佳条件后, 再用最佳试验组合条件进行试验验证, 研究劣质鱼粉在发酵前后营养价值的变化。

1.5 性状测定

酸溶蛋白含量测定: 参照大豆肽粉标准^[13] (QB/T2653-2004) 中酸溶蛋白质含量的测定。具体方法为: 称取样品 2.00 g 加入 15% TCA (三氯乙酸) 溶液 10 mL, 混合均匀, 静置 5 min。将溶液定量转移, 在 $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min 后, 取全部上清液, 按饲料粗蛋白标准^[12] (GB/T6432-1994) 规定的方法测定上清液可溶蛋白质。蛋白质换算系数为 6.25, 测定结果根据样品的干燥失重, 折算为干重。

粗蛋白: 参照饲料粗蛋白标准^[12] (GB/T6432-1994) 中的方法; 灰分: 参照饲料粗灰分标准^[12] (GB/T6438-1994) 中的方法; 水分: 参照饲料水分标准^[12] (GB/T6435-1994) 中的方法; 胰蛋白酶抑制剂: 参照大豆制品胰蛋白酶抑制剂活性标准^[12] (GB/T21498-2008) 中的方法。

1.6 数据分析

试验数据用平均数 \pm 标准差表示, 使用 SAS9.1 中单因素方差分析不同发酵时间、不同发酵温度、不同接种量和不同料水比对劣质鱼粉酸溶蛋白含量的影响, 用 Duncan 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 酵母菌在不同发酵条件下对劣质鱼粉酸溶蛋白含量的影响

2.1.1 不同发酵时间对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响由图 1 可见, 酵母菌发酵劣质鱼粉酸溶蛋白的含量, 在 24 h 到 48 h 之间随发酵时间的增加快速的上升, 在发酵 48 h 时达到最大值 9.43%; 在 48 h 到 84 h 之间呈缓慢下降的趋势。

2.1.2 不同发酵温度对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响从图 2 可知, 在 27°C 到 30°C 之间, 随发酵温度的上升, 酵母菌发酵劣质鱼粉中的酸溶蛋白含量也随之

迅速上升; 30℃的时候酸溶蛋白含量达最大值为 8.91%; 在 30℃到 32℃之间又随温度的升高而急剧下降。

2.1.3 不同接种量对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响
从图 3 可以看出, 酵母菌发酵劣质鱼粉中的酸溶蛋白含量随着接种量的增加呈现先急剧升高后平稳下降的趋势, 酵母菌接种量在 2%的时候酸溶蛋白含量达到最高值 8.73%。

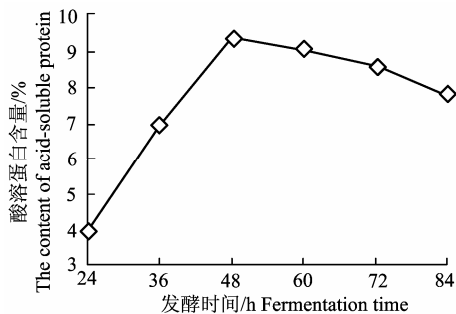


图 1 不同发酵时间对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响

Figure 1 The effects of different time on poor-quality fishmeal with yeast fermentation

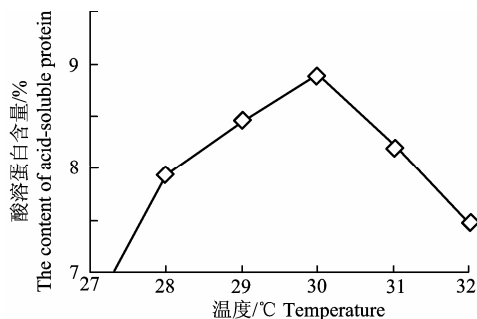


图 2 不同发酵温度对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响

Figure 2 The effects of different temperature on poor-quality fishmeal with yeast fermentation

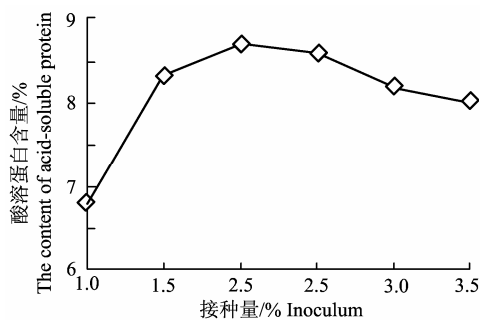


图 3 不同接种量对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响

Figure 3 The effects of different inoculum sizes on poor-quality fishmeal with yeast fermentation

2.1.4 不同料水比对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响
从图 4 可以看出, 料水比在 1:0.6 到 1:0.9 时, 劣质鱼粉发酵料中酸溶蛋白的含量急剧增加, 在 1:0.9

时达到最大值为 8.85%, 料水比在 1:0.9 到 1:1.1 的时候酸溶蛋白的含量也在平稳下降。

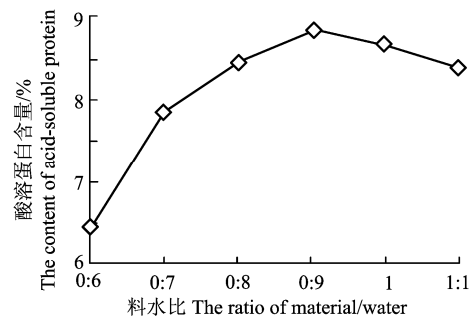


图 4 不同料水比对酵母菌发酵劣质鱼粉的影响

Figure 4 The effects of different material/water ratios on poor-quality fishmeal with yeast fermentation

2.2 酵母菌发酵劣质鱼粉发酵条件正交试验优化结果及分析

由表 1 可以看出, 影响酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的 4 个因素, 它们的主次顺序依次是: 发酵时间 > 发酵温度 > 接种量 > 料水比, 理论最佳试验组合条件是发酵时间为 48 h, 发酵温度为 30℃, 接种量为 2%, 料水比为 1:0.9 的组合。由表 2 可知, 发酵时间对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量有极显著的影响 ($P < 0.01$), F 值为 8.65, 发酵温度和接种量对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量也有显著的影响 ($P < 0.05$), F 值分别为 5.72 和 6.02, 料水比对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的影响不显著 ($P > 0.05$), F 值为 3.45。

2.3 最佳发酵组合发酵劣质鱼粉前后营养价值变化

从前面的试验可以得出酵母菌发酵劣质鱼粉的最佳条件组合, 而在正交试验中未包括理论上最佳的试验组合条件即发酵时间 48 h、发酵温度 30℃、接种量 2%、料水比 1:0.9, 所以为了对理论最佳实验组合条件进行实验验证, 用最佳实验组合条件酵母菌发酵劣质鱼粉, 实验前后劣质鱼粉的营养价值变化如表 3。实验后测得发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的平均值为 9.45%, 含量高于正交试验中所有试验组合测得的值, 所以最佳发酵组合为发酵时间 48 h, 发酵温度 30℃, 接种量 2%, 料水比 1:0.9。在此条件下发酵, 发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量从发酵前的 1.78% 上升到 9.45%, 粗蛋白含量由 44.23 上升到 46.32%, 胰蛋白酶抑制剂从 3.6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 降到 1.1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 水分和灰分在实验前后变化不大。

3 讨论

鱼粉对于我国养殖业来说非常重要, 而对于鱼

粉的研究大多都停留在化学成分的分析上^[14]。关于使用各种物质来替代鱼粉在生产饲料中的作用有很多报道, 但关于劣质鱼粉的研究较少, 也鲜有相关报道。关于有益微生物发酵劣质鱼粉的研究几乎没

有, 但是对于劣质鱼粉的研究有着非常重要的意义, 不仅能够提高鱼粉为水产养殖业带来的巨大经济效益, 而且还能够提高鱼粉营养价值, 保证鱼粉质量。

表 1 酵母菌发酵劣质鱼粉 $L_9(3^4)$ 正交试验结果分析

Table 1 The orthogonal experiment results of yeast fermentation of inferior-quality fishmeal

处理 Treatment	时间 Time	温度 Temperature	接种量 Inoculum size	料水比 Ratio of material to water	酸溶蛋白含量/% Acid-soluble protein content
1	36	29	1.5	1:0.8	7.82
2	36	30	2.0	1:0.9	8.94
3	36	31	2.5	1:1	8.56
4	48	29	2.0	1:1	8.87
5	48	30	2.5	1:0.8	9.03
6	48	31	1.5	1:0.9	8.86
7	60	29	2.5	1:0.9	8.54
8	60	30	1.5	1:1	8.65
9	60	31	2.0	1:0.8	8.54
K_1	8.440	8.410	8.443	8.463	
K_2	8.920	8.873	8.783	8.780	
K_3	8.577	8.650	8.710	8.693	
R	0.480	0.463	0.340	0.317	

表 2 酵母菌发酵劣质鱼粉 $L_9(3^4)$ 正交试验方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal experiment of yeast fermentation of inferior-quality fishmeal

方差来源 Source	自由度 DF	离均差平方和 SS	方差 MS	F F value	P Pr>F
时间 Time	2	0.6690	0.3218	8.65	0.0084
温度 Temperature	2	0.4232	0.2239	5.72	0.0352
接种量 Inoculum	2	0.4319	0.2258	6.02	0.0329
料水比 Ratio of material to water	2	0.2416	0.1139	3.45	0.0745

表 3 酵母菌发酵劣质鱼粉试验前后营养价值指标对照

Table 3 Nutrient composition in poor-quality fishmeal before and after fermentation

项目 Item	未发酵劣质鱼粉 Poor-quality fishmeal without fermentation	最佳组合发酵劣质鱼粉 Change of the poor-quality fishmeal after yeast fermentation at optimal condition
水分/% Moisture content	9.22	9.39
粗蛋白/% Crude protein content	44.23	46.32
酸溶蛋白/% Acid-soluble protein content	1.78	9.45
灰分/% Ash	5.1	5.5
胰蛋白酶抑制剂/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Trypsin inhibitor content	3.6	1.1

3.1 不同发酵时间对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的影响

酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量出现先上升后下降的变化, 原因可能是在发酵的开始阶段, 劣质鱼粉发酵料中营养物质比较多, 能够满足酵母菌的快速生长, 并生成很多菌体蛋白后分泌一些消化酶类, 使发酵料中酸溶蛋白的含量急剧增加; 随着发酵时间的延长, 酸溶蛋白含量下降, 可能是劣

质鱼粉中的好氧杂菌也开始慢慢生长繁殖, 杂菌将之前酵母菌降解生成的酸溶蛋白中的游离氨基酸等降解生成氨等被挥发出去, 所以会出现随着发酵时间的延长酸溶蛋白含量却平稳下降的现象。

3.2 不同发酵温度对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的影响

发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的降低, 可能的原因是从低温到高温发酵的过程中, 发酵温度低于

或高于酵母菌在劣质鱼粉中的生长最适温度而对酵母菌的生长不利。温度低时酵母菌的生长就会很缓慢,相应产生的消化酶类也会减少,所以酸溶蛋白的含量也就比较低;如果温度高于酵母菌生长的最适温度,酵母菌会快速的生长繁殖,菌体会加速老化,这也不利于菌体蛋白和消化酶类的产生,从而影响酸溶蛋白的含量。

3.3 不同接种量对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的影响

酵母菌接种量较低时,劣质鱼粉发酵料中较丰富的营养物质能够满足酵母菌快速生长繁殖的需要;而当接种量超过一定量(2%)时,劣质鱼粉发酵料中酵母菌等菌类浓度达到了饱和的状态,酵母菌在生长的过程中会相互竞争仅有的营养物质,这样就会不利于酵母菌的生长繁殖,所以才会导致酸溶蛋白含量平稳下降。

3.4 不同料水比对酵母菌发酵劣质鱼粉中酸溶蛋白含量的影响

水是微生物菌类生长所必需的营养物质,料水比较低时,发酵料中水分含量的比例就低,这样就不能满足酵母菌正常的生长繁殖需要,酵母菌的生长就会受到一定的抑制,从而影响消化酶类的分泌以及对劣质鱼粉中大分子物质的分解;同样,由于酵母菌发酵劣质鱼粉是好氧发酵,料水比升高,就会影响发酵料中的透气性,使发酵料中氧气的浓度下降,这样也就抑制了酵母菌的快速生长繁殖。

本试验从酵母菌发酵劣质鱼粉的条件入手,摸索出了酵母菌发酵劣质鱼粉的最佳组合。通过4组研究实验发现最佳发酵时间为48 h、发酵温度为30℃、接种量为2%、料水比为1:0.9。在最佳组合下发酵劣质鱼粉可以最大限度的提高其营养价值,特别是蛋白质含量的提高,研究发现在最佳组合发酵劣质鱼粉后粗蛋白和酸溶蛋白的含量都有了一定程

度的提高。本文还研究出4个发酵条件对于酵母菌发酵劣质鱼粉的影响程度大小依次为发酵时间>发酵温度>接种量>料水比。本试验结果将对劣质鱼粉的使用提供有效途径,为下一步劣质鱼粉研究提供指导作用,但是本研究只是对劣质鱼粉利用的一个方面,今后还可以研究优化劣质鱼粉的其他用途。

参考文献:

- [1] 曹霞,曹瑾玲. 鱼粉的研究现状及展望[J]. 农产品加工: 创新版, 2011(4): 69-75.
- [2] 吴维辉,何绮霞. 鱼粉的质量现况和分析[J]. 广东饲料, 2010(6): 19.
- [3] 陈洁,黄佩佩,宋茹. 枯草芽孢杆菌发酵鱼蛋白制备抗氧化型发酵液工艺的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2011, 30(3): 254-258.
- [4] 卢珍华. 枯草芽孢杆菌发酵鱼粉产蛋白酶及其酶解效果[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2012, 17(4): 265-268.
- [5] 李国立,邝哲师,叶明强,等. 生物鱼粉对吉富罗非鱼生长的影响[J]. 广东饲料, 2008(8): 21-22.
- [6] 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.
- [7] 张桂国,苏玮玮,刘法孝. 鱼粉营养品质的综合评定方法[J]. 中国饲料添加剂, 2006(11): 47-51.
- [8] 唐煜. 鱼粉质量及品质判定的研究[J]. 饲料广角, 2007(19): 22-24.
- [9] 王宪文,谷素霞,王丽荣,等. 影响鱼粉质量的因素及其鉴定[J]. 中国饲料, 2009(4): 40-43.
- [10] 高艳云,陆宝盛. 掺假鱼粉的鉴别及检测[J]. 现代畜牧兽医, 2010(4): 50-51.
- [11] 陈翠莲,黄承德,张英东,等. 影响发酵豆粕质量的因素及其鉴定指标方法[J]. 饲料与畜牧, 2010(3): 41-45.
- [12] GB/T19164-2003 鱼粉. 国家质量监督检验检疫总局, 2003-12-01.
- [13] QB/T2653-2004, 大豆肽粉. 国家发展和改革委员会, 2005-01-01.
- [14] 叶元土. 鱼粉的质量控制及其在淡水鱼饲料中的应用[J]. 饲料工业, 2007, 28(8): 1-6.