

混菌固态发酵生产菜籽肽工艺条件优化

鞠兴荣^{1,2}, 王雪峰¹, 何荣^{1,2}, 王立峰², 袁建¹

(1.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省粮油品质控制及深加工技术重点实验室, 江苏 南京 210003;

2.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以肽得率、氮溶解指数和硫苷降解率为指标, 通过单因素试验初步得到枯草芽孢杆菌与雅致放射毛霉混菌固态发酵生产菜籽肽的发酵条件, 再根据 Box-Behnken 中心组合试验设计, 在单因素试验的基础上, 采用响应面分析法进一步优化混菌发酵条件, 确定最佳工艺条件为: 枯草芽孢杆菌与雅致放射毛霉同时接种, 两菌接种体积比 4:1、发酵温度 32.1℃、发酵时间 4.64d, 此条件下菜籽肽得率为 9.85%, 硫苷降解率为 67.83%。

关键词: 混菌固态发酵; 菜籽肽; 工艺条件; 响应面分析法

Optimization of Rapeseed Peptide Production by Mixed Solid-State Fermentation

JU Xing-rong^{1,2}, WANG Xue-feng¹, HE Rong^{1,2}, WANG Li-feng², YUAN Jian¹

(1. Key Laboratory of Grain and Oils Quality Control and Deep-Utilizing Technology of Jiangsu Province, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Based on peptide yield, nitrogen solubility index (NSI) and glucosinolate degradation rate, the production conditions for rapeseed peptide by mixed solid-state fermentation using *Bacillus subtilis* and *Actinomucor elegans* preliminarily determined by one-factor-at-a-time method and further optimized by response surface analysis coupled with Box-Behnken design. The optimal fermentation conditions were 4:1 of *Bacillus subtilis*-to-*Actinomucor elegans* ratio, 32.1 °C of fermentation temperature, 4.64 d of fermentation time, resulting in a peptide yield of 9.85% and a glucosinolate degradation rate of 67.83%.

Key words: mixed solid-state fermentation; rapeseed peptide; process conditions; response surface methodology

中图分类号: TQ936.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0231-06

菜籽蛋白是一种丰富、优质的植物蛋白资源, 但却没有像大豆蛋白那样得到广泛的应用, 主要原因有两个: 一是菜籽蛋白中含有少量硫苷、植酸、单宁等多种抗营养因子, 降低了菜籽蛋白的生物利用率。其中, 硫苷作为主要的抗营养因子, 在酸、碱溶液中或者酶溶液中会发生分解, 其分解产物能造成动物甲状腺、肝脏、肾脏等器官的损害^[1-3], 对动物的繁殖机能也会产生不同程度的影响; 二是菜籽蛋白的研究力度还远比不上大豆蛋白。近年来, 国内外学者逐渐对菜籽蛋白进行了相关研究, 如菜籽粕的脱毒^[4]、菜籽蛋白的分离纯化^[5-6]、菜籽多肽的制备及其生物活性研究^[7-8]等, 这些技术的应用主要是为了解决菜籽蛋白本身营养价值高而利用率低的问题, 为进一步开发、利用菜籽蛋白奠定了基础。

近年来, 发酵技术在大豆肽的生产中得到了广泛应用, 其中, 混菌发酵技术的应用也逐渐得到了推广^[9-10]。混菌发酵生产菜籽肽的研究在我国鲜见报道, 但混菌发酵脱毒菜籽粕的研究较多, 且大量研究表明其脱毒效果明显^[11-12]。因此, 如果将混菌发酵技术有效应用在菜籽肽的生产和菜籽粕的脱毒上, 将为菜籽蛋白的高效利用提供一条新的途径。本实验在枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌固态发酵生产菜籽肽培养基条件优化的基础上, 进一步探讨接种顺序、接种比例、发酵温度以及发酵时间对混菌发酵效果的影响, 应用单因素试验和响应面分析法对混菌固态发酵的发酵条件进行优化, 得到了混菌固态发酵生产菜籽肽的最佳发酵工艺条件, 以期菜籽肽的工业化生产提供依据。

收稿日期: 2011-12-17

基金项目: 国家农业成果转化资金项目(2009C10045); 江苏省农业科技自主创新基金项目(cx(10)444; cx(10)234); 江苏省自然科学基金项目(BK2010573)

作者简介: 鞠兴荣(1957—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品营养及功能性成分研究与开发。E-mail: xingrongju@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

菜籽粕(粗蛋白质含量 38.47%、水分含量 11.46%、硫苷含量 $52.38 \mu\text{mol/g}$) 南京隆盛植物油脂有限公司; Gly-Gly-Tyr-Arg 美国 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 菌种与培养基

1.2.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)10160、雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*) 40252 中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2.2 培养基

1.2.2.1 种子培养基

枯草芽孢杆菌采用营养琼脂培养基: 牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、蒸馏水 1000mL、琼脂 20g, pH7.2, 121℃ 灭菌 20min, 不加琼脂作液体培养基使用; 雅致放射毛霉采用 PDA 培养基: 马铃薯 300g、葡萄糖 20g、琼脂 15g、蒸馏水 1000mL。

1.2.2.2 发酵培养基

发酵培养基成分按混菌固态发酵生产菜籽肽培养基条件优化结果进行配比: 菜籽粕 9.5g、麸皮 0.5g、加水 13.5g、葡萄糖添加量为固液总质量的 0.50%、 KH_2PO_4 添加量为固液总质量的 0.36%。

1.3 仪器与设备

立式电热压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; 超净工作台 苏净集团安泰公司; 722N 紫外-可见分光光度计 上海精密科学仪器厂; GL-20B 型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 隔水式电热恒温培养箱 上海市跃进医疗器械一厂; 全温立式振荡培养箱 太仓市实验设备厂; PQX 型多段可编程培养箱 宁波东南仪器有限公司; ALpHA2-4 型真空冷冻干燥机 德国 Christ 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌悬液制备

枯草芽孢杆菌经斜面活化后刮取两环接入 100mL 液体种子培养基, 8 层纱布封口后, 在 37℃、120r/min 条件下摇瓶培养 24h。雅致放射毛霉接种于斜面培养基上, 于 28℃ 恒温培养 5d。从枯草芽孢杆菌种子培养基和雅致放射毛霉斜面培养基中分别取一定量的细菌和孢子于无菌水中, 调节菌体浓度为 $1 \times 10^7 \text{CFU/mL}$ 。无菌水中事先加入葡萄糖和 KH_2PO_4 (分别以发酵培养基为基准, 按添加量添加), 调节 pH 值至 6.5, 即可得到发酵剂。

1.4.2 发酵培养

混菌组合中的菌种不分先后, 同时把制备好的菌悬液以 $1 \times 10^7 \text{CFU/mL}$ 的接种量接入已灭菌的固态发酵培养基中, 在一定的温度和湿度条件下恒温培养, 定时搅拌通气, 培养一定时间后取样测定。

1.4.3 发酵培养基的处理

发酵后的固态基质, 一部分取样后加蒸馏水定容至 150mL, 搅拌 30min, 2~4℃ 条件下 $4000 \times g$ 离心 20min, 测定其上清液体积, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤上清液, 除去不溶物和细菌, 备用。另一部分取样后冷冻干燥、粉碎, 用于样品中硫苷含量的测定。

1.4.4 肽含量标准曲线的制作

用 5g/100mL 三氯乙酸(TCA)配制不同质量浓度的 Gly-Gly-Tyr-Arg 标准溶液, 按照多肽含量测定方法对样品显色, 于波长 540nm 处测定其 OD 值。以多肽质量浓度为横坐标(x , mg/mL), $\text{OD}_{540\text{nm}}$ 值为纵坐标(y), 制作 Gly-Gly-Tyr-Arg 标准曲线, 得到回归方程 $y = 0.0259x + 0.0034$, $R^2 = 0.9993$ 。

1.4.5 指标测定

1.4.5.1 细菌数量测定

采用血球板计数法测定^[13]。

1.4.5.2 氮溶解指数测定

参照文献[14]所述方法进行测定。氮溶解指数按公式(1)计算。

$$\text{氮溶解指数}/\% = \frac{\text{处理液中氮含量}/(\text{mg/mL}) \times \text{处理液总体积}/\text{mL}}{\text{样品中氮含量}/\text{mg}} \times 100 \quad (1)$$

1.4.5.3 多肽含量测定

参照文献[15]所述方法, 取 5mL 处理液, 加入等体积 10% TCA, 静置 30min, 2~4℃、 $4000 \times g$ 离心 20min, 取 2mL 上清液, 加 8mL 双缩脲试剂, 25℃ 静置 30min, 测 $\text{OD}_{540\text{nm}}$ 值。肽得率按公式(2)计算。

$$\text{肽得率}/\% = \frac{\text{待测液中肽含量}/(\text{mg/mL}) \times \text{总体积}/\text{mL}}{\text{样品总量}/\text{mg}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.5.4 硫苷含量测定

参照文献[16]所述方法进行测定。硫苷降解率按公式(3)计算。

$$\text{硫苷降解率}/\% = \frac{\text{原料中硫苷含量} - \text{发酵后基质中硫苷含量}}{\text{原料中硫苷含量}} \times 100 \quad (3)$$

1.4.6 发酵条件优化试验设计

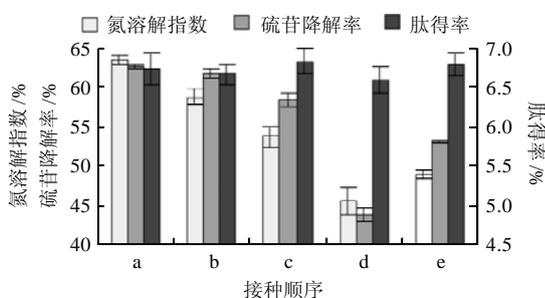
在枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌固态发酵生产

菜籽肽培养基条件优化的基础上, 首先确定混菌发酵的接种顺序, 再分别对接种比例、发酵温度和发酵时间3个因素进行单因素试验, 确定其最佳因素水平。根据单因素试验结果, 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计进行响应面法优化分析, 得出菜籽肽混菌发酵的最佳发酵工艺条件。

2 结果与分析

2.1 混菌发酵接种顺序的确定

枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉按体积比 1:1 的接种比例, 采用同时接种、先接入枯草芽孢杆菌 12h 和 24h 后接入雅致放射毛霉、先接入雅致放射毛霉 12h 和 24h 后接入枯草芽孢杆菌的方法进行接种, 30℃ 条件下发酵培养 3d, 考察不同接种顺序对发酵指标的影响, 结果见图 1。



a.同时接种; b.枯草芽孢杆菌 12h+ 雅致放射毛霉; c.枯草芽孢杆菌 24h+ 雅致放射毛霉; d.雅致放射毛霉 12h+ 枯草芽孢杆菌; e.雅致放射毛霉 24h+ 枯草芽孢杆菌。

图 1 不同接种时间对发酵指标的影响

Fig.1 Effect of different inoculation patterns on fermentation indexes

由图 1 可知, 同时接种比分时间段接种的发酵效果要好, 其中, 除硫苷降解率变化不明显外, 肽得率和氮溶解指数的变化比较明显, 两个指标均处于最大值, 这可能是由于先接入的菌种在发酵过程中占有优势地位, 当再接入其他菌种时会产生竞争, 影响了自身生长产酶^[9], 因此确定接种顺序为同时接种。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 混菌不同接种比例对发酵指标的影响

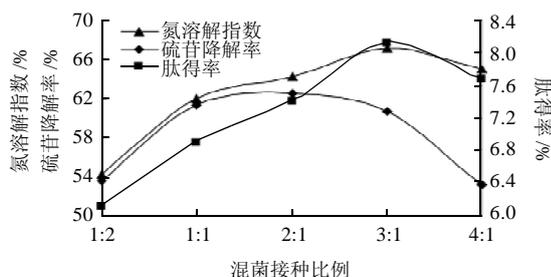


图 2 混菌不同接种体积比对发酵指标的影响

Fig.2 Effect of inoculation ratio of *Bacillus subtilis* to *Actinomucor elegans* on fermentation indexes

将枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉按不同接种体积比 (分别为 1:2、1:1、2:1、3:1、4:1) 同时接入到发酵培养基中, 30℃ 条件下发酵培养 3d, 考察混菌不同接种体积比对发酵指标的影响, 结果见图 2。3 个指标都呈现先上升后下降的变化趋势, 其中, 肽得率和氮溶解指数变化相对比较同步, 都随着枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉接种体积比的增加而增大, 且在接种体积比为 3:1 时达到最大值, 这表明: 随着接种比例的增加, 两种菌的生长具有互利性, 能够产生更多的蛋白酶水解菜籽蛋白并生成菜籽多肽。然而, 硫苷降解率在接种体积比为 2:1 时达到峰值, 之后随着接种比例的增加而降低, 说明接种比例的增加并不一直有利于这两种菌产生更多的芥子酶系, 但相对肽得率和氮溶解指数, 硫苷降解率在接种体积比为 1:1~3:1 之间变化并不明显。综合考虑枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌发酵较佳的接种体积比为 3:1。

2.2.2 不同发酵温度对发酵指标的影响

枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉按接种体积比 3:1, 同时接入到发酵培养基中, 分别在 20、25、30、35、40℃ 条件下发酵培养 3d, 考察不同发酵温度对发酵指标的影响, 结果见图 3。

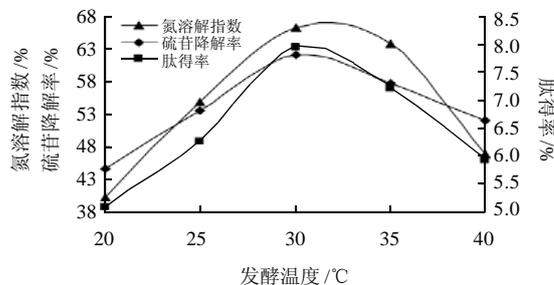


图 3 不同发酵温度对发酵指标的影响

Fig.3 Effect of fermentation temperature on fermentation indexes

温度的变化对枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉两种菌的生长、产酶及酶的活性有着直接的影响。由图 3 可知, 温度过低或过高均不利于这两种菌的混合发酵, 温度过低, 菌体生长不佳, 产酶量较少; 温度过高, 会抑制其生长, 甚至导致其死亡。随着发酵温度的增高, 3 个指标均呈现先上升后下降的趋势, 在 30~33℃ 之间发酵效果较好, 并在 30℃ 各项发酵指标都达到最大值。因此, 选取 30℃ 作为混菌发酵的最佳温度。

2.2.3 不同发酵时间对发酵指标的影响

枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉按接种体积比 3:1, 同时接入到发酵培养基中, 在 30℃ 条件下分别发酵培养

2、3、4、5、6d, 考察不同发酵时间对发酵指标的影响, 结果见图4。

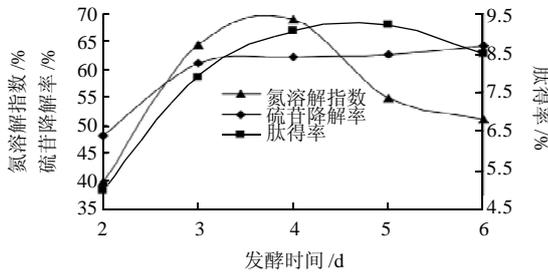


图4 不同发酵时间对发酵指标的影响

Fig.4 Effect of fermentation duration on fermentation indexes

发酵时间会对菜籽粕中菜籽蛋白的水解程度、菜籽肽的生成量以及硫苷的降解效果产生一定的影响。发酵时间过短, 菌体不能得到充分生长, 产酶不足, 菜籽蛋白的水解程度较低, 多肽生成量少, 硫苷的降解效果也较差; 发酵周期过长, 菌体会消耗过多营养物质或出现衰亡, 导致菜籽蛋白水解程度降低, 多肽生成量减少, 生产成本增加。由图4可知, 发酵时间对发酵指标具有显著性影响。随着发酵时间的延长, 肽得率逐渐增加, 在4~5d达到最大值并趋于稳定; 氮溶解指数呈现先上升后下降的变化趋势, 在3~4d达到较高值, 随后出现较大幅度的下降, 其原因可能是微生物生长利用了其中的无机氮; 硫苷降解率在发酵第3天后趋于稳定, 表明发酵时间的延长并没有对硫苷的降解效果产生多大的影响。研究还发现, 在发酵5~6d期间, 发酵基质的颜色逐渐加深, 并出现较为浓烈的氨味。因此, 确定混菌发酵的较佳时间为4d。

2.3 响应面分析法优化混菌发酵条件

2.3.1 响应面分析法分析试验结果

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 综合单因素试验结果, 选取混菌接种体积比、发酵温度和发酵时间对枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌发酵影响较大的这3个因素, 以发酵产物的菜籽肽得率为响应值, 设计了三因素三水平的响应面分析试验。各因素及水平编码如表1所示。

表1 Box-Behnken 中心组合试验设计因素水平及编码
Table 1 Coded levels of the variables tested in Box-Behnken design

因素	编码及水平		
	-1	0	1
X ₁ 枯草芽孢杆菌与雅致放射毛霉接种体积比	2:1	3:1	4:1
X ₂ 发酵温度/°C	25	30	35
X ₃ 发酵时间/d	3	4	5

注: 编码值与真实值之间的关系: $X_1=(x_1-3)/1$, $X_2=(x_2-30)/5$, $X_3=(x_3-4)/1$ 。

为了最优拟合二次多项回归方程各项系数, 依据统计学试验设计要求, 对影响菜籽肽得率的混菌发酵关键内在因素进行了15组试验, 其中1~12为析因试验, 13~15为中心试验, 用以估计试验误差, 试验设计及结果见表2。

表2 Box-Behnken 试验设计及发酵产物的菜籽肽得率测定结果
Table 2 Box-Behnken design and measured and predicted values of rapeseed peptide yield

试验号	X ₁ 混菌接种体积比	X ₂ 发酵温度	X ₃ 发酵时间	Y 菜籽肽得率/%	
				实际值	预测值
1	-1	-1	0	6.56	6.72
2	1	-1	0	7.37	7.36
3	-1	1	0	8.96	8.97
4	1	1	0	9.27	9.11
5	-1	0	-1	7.68	7.67
6	1	0	-1	8.00	8.16
7	-1	0	1	9.47	9.31
8	1	0	1	9.59	9.60
9	0	-1	-1	6.05	5.90
10	0	1	-1	7.38	7.38
11	0	-1	1	6.91	6.91
12	0	1	1	9.30	9.45
13	0	0	0	9.49	9.35
14	0	0	0	9.38	9.35
15	0	0	0	9.17	9.35

2.3.2 模型的建立与显著性检验

利用 Design Expert 软件对表2中的试验数据进行多元回归拟合, 选择对响应值显著的各项, 可得混菌接种体积比、发酵温度及发酵时间与菜籽肽得率间的二次多项回归方程:

$$Y = 9.35 + 0.19X_1 + 1.00X_2 + 0.77X_3 - 0.12X_1X_2 - 0.050X_1X_3 + 0.27X_2X_3 - 0.016X_1^2 - 1.29X_2^2 - 0.65X_3^2$$

对回归方程进行方差分析和显著性检验, 结果见表3、4。

表3 菜籽肽得率二次多项式拟合模型方差分析结果
Table 3 ANOVA results for the fitted quadratic polynomial model for rapeseed peptide yield

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	20.76	9	2.31	58.33	0.0002
失拟项	0.14	3	0.048	1.83	0.3729
误差项	0.053	2	0.026		
总和	20.96	14			
相关系数 $R^2=0.9906$		$R^2_{Adj}=0.9736$			
变异系数 2.39%					

注: $P < 0.05$, 差异显著; $P < 0.01$, 差异极显著。下同。

由表3回归方程方差分析可知, 二次多项式拟合模型具有高度的显著性($P = 0.0002 < 0.01$), P 值越小, 其

因素影响越显著; 失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著($P = 0.3729 > 0.05$), 说明该模型的拟合检验显著; Y 的变异系数较低(2.39%), 说明实验操作具有一定的可信度; 模型校正决定系数为 0.9736, 差异显著, 表明该模型拟合优度好, 预测值与实测值之间具有高度相关性(相关系数 $R^2 = 0.9906$), 发酵产物的菜籽肽得率仅有 2.64% 的总变异度不能由该模型解释, 所以此模型可应用于菜籽肽发酵实验的理论预测。

表 4 菜籽肽得率回归方程系数显著性检验结果
Table 4 Significance test of regression coefficients for rapeseed peptide yield

系数项	回归系数	标准误差	F 值	P 值
截距	9.35	0.11		
X_1	0.19	0.070	7.69	0.0392
X_2	1.00	0.070	203.32	< 0.0001
X_3	0.77	0.070	119.95	0.0001
X_1X_2	-0.12	0.099	1.58	0.2642
X_1X_3	-0.050	0.099	0.25	0.6364
X_2X_3	0.27	0.099	7.10	0.0446
X_1^2	-0.016	0.10	0.023	0.8844
X_2^2	-1.29	0.10	155.58	< 0.0001
X_3^2	-0.65	0.10	38.95	0.0015

注: $P < 0.01$, 差异极显著。

对二次多项回归方程的回归系数显著性检验表明(表 4), 在 $\alpha = 0.01$ 水平上, 因素 X_2 、 X_3 对菜籽肽得率的线性效应高度显著, 因素 X_2^2 、 X_3^2 对菜籽肽得率的曲面效应高度显著, 说明发酵温度、发酵时间皆对菜籽肽得率的影响高度显著; 在 $\alpha = 0.05$ 水平上, 因素 X_1 对菜籽肽得率的线性效应显著, 因素 X_2X_3 的交互作用显著, 说明发酵温度与发酵时间之间的交互作用对菜籽肽得率有显著性影响, 而混菌接种体积比对菜籽肽得率的线性影响显著。通过显著性检验可以看出, 各因素对菜籽肽得率的影响不是简单的线性关系, 在本实验范围内, 混菌发酵过程中各因素对菜籽肽得率的影响大小依次为发酵温度、发酵时间和混菌接种体积比。

2.3.3 菜籽肽得率的响应面分析与优化

通过二次多项回归方程所作响应曲面图及其等高线图, 可以直观地反映出发酵条件对菜籽肽得率的影响。等高线图还可揭示出各因素之间交互作用的显著性。当固定枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉接种体积比为 4:1 时, 发酵温度与发酵时间对菜籽肽得率影响交互作用的等高线图和响应曲面图如图 5 所示。此两因素之间的交互作用显著, 这是因为等高线的形状能够反映出两因素之间交互效应的强弱大小, 圆形表示两因素交互作用不显著, 椭圆形则表示两因素交互作用显著^[17]。另外,

在本实验水平范围内, 随着发酵时间的延长, 肽得率先增大后减小; 随着发酵温度的增大, 肽得率逐渐增大, 并且在发酵温度为 32℃ 附近达到理论最大点。当发酵时间在 4.3~5.0d, 发酵温度在 31~33℃ 时, 菜籽肽得率可达 9.80% 以上。

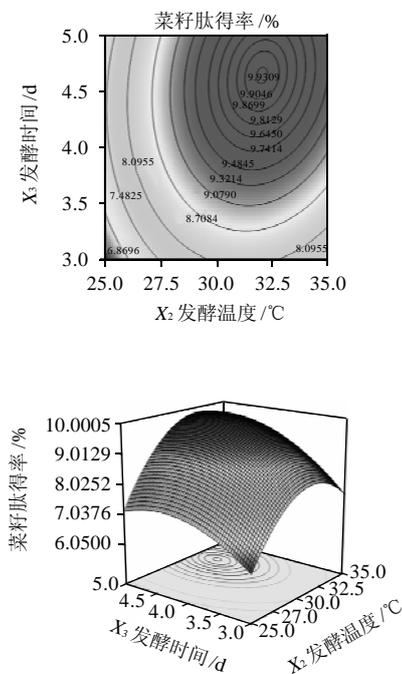


图 5 发酵温度和发酵时间交互影响菜籽肽得率的曲面图及其等高线图

Fig.5 Response surface plot and contour plot of rapeseed peptide yield versus fermentation temperature and fermentation time

为了进一步求得各因素的最佳条件组合, 对回归方程求一阶偏导数, 当响应值 Y 有最大值时可求得各因素的水平: $X_1 = 1.00$ 、 $X_2 = 0.64$ 、 $X_3 = 0.41$, 转换后得到最佳发酵条件为: 混菌接种体积比 4:1、发酵温度 32.1℃、发酵时间 4.64d(111h), 在此条件下预测混菌发酵后, 发酵产物的菜籽肽得率模型预测值可达到 9.93%。

2.3.4 模型验证性实验

为了检验模型预测的有效性, 根据 Box-Behnken 中心组合试验和二次多项回归方程分析结果, 在菜籽肽得率最高时的发酵条件下, 进行发酵重复实验, 此条件下实际所得菜籽肽得率为 9.85%, 这与模型预测值(9.93%)仅相差 0.81%, 十分接近, 可见该模型能够较好地预测实际的发酵情况, 由此表明响应面分析法应用于发酵条件的优化是可行有效的。该优化条件下所得发酵产物的菜籽肽得率在培养基条件优化的基础上相对提高了 43.8%, 比优化前^[18]相对提高了 98.6%, 发酵条件优化效果较好。另外, 在该优化条件下测得实际的硫

苷降解率为 67.83%，也要高于培养基条件优化后的 62.09% 和优化前的 60.87%，说明发酵条件优化后，菜籽粕中的硫苷降解效果比优化前得到一定程度的改善。

3 结 论

本实验以肽得率、氮溶解指数和硫苷降解率为评价指标，研究了枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌固态发酵生产菜籽肽的发酵条件，并以发酵产物的菜籽肽得率为响应值，应用响应面分析法优化了菜籽肽的发酵工艺。通过单因素试验，确定接种比例、发酵温度和发酵时间对菜籽肽得率有显著影响，在此基础上，根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理，采用三因素三水平的响应面分析试验，对试验结果进行分析比较，确定了最佳发酵条件。

综合枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌固态发酵生产菜籽肽培养基条件优化结果和发酵条件优化结果，最终得到最佳发酵工艺条件为：以菜籽粕和麸皮为基质，菜籽粕添加量为 95%，麸皮为 5%，基质与加水量质量比为 1:1.35，葡萄糖与 KH_2PO_4 的添加量分别为固液总质量的 0.50% 和 0.36%，在以上优化培养基条件下调节、初始 pH6.5、枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉同时接种、接种体积 4:1、发酵温度 32.1℃、发酵时间 4.64d (111h)。在此工艺条件下，发酵产物的菜籽肽得率实际可达 9.85%，比优化前相对提高了 98.6%，发酵效果较为明显。同时测得该工艺条件下发酵产物的硫苷降解率为 67.83%，也要高于优化前的 60.87%，这表明优化后菜籽粕中的硫苷降解效果比优化前得到一定程度的改善。

通过优化枯草芽孢杆菌和雅致放射毛霉混菌固态发酵生产菜籽肽的工艺条件得到较佳的发酵工艺条件参数，在该条件下经发酵所得的发酵产品不仅具有较高含量的菜籽蛋白肽，而且其硫苷含量要远低于饲用菜籽粕的国家标准，可以作为饲料添加剂应用于饲料工业中，这为菜籽蛋白资源的利用提供了参考。

参 考 文 献：

- [1] 何国菊. 菜籽饼粕综合利用研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2004.
- [2] BUREL C, BOUJARD T, KAUSHIK S J, et al. Effects of rapeseed meal glucosinolates on thyroid metabolism and feed utilization in rainbow trout[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 124(3): 343-358.
- [3] TRIPATHIM K, MISHRA A S. Glucosinolates in animal nutrition: a review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 132(1/2): 1-27.
- [4] 陈娟, 刘军, 张云鹏, 等. 微生物降解菜籽粕中抗营养因子的研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2010(7): 40-42.
- [5] BEROT S, COMPOINT J P, LARRE C, et al. Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.)[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 818: 35-42.
- [6] 郑美瑜, 陈剑兵, 陆胜民, 等. 菜籽蛋白的提取和纯化[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(8): 267-270.
- [7] MARCZAK E D, USUI H, FUJITA H, et al. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed[J]. *Peptides*, 2003, 24: 791-798.
- [8] YUST M M, PEDROCHE J, MEGIAS C, et al. Rapeseed protein hydrolysates: a source of HIV protease peptide inhibitors[J]. *Food Chemistry*, 2004, 87: 387-392.
- [9] 李善仁, 林新坚, 蔡海松, 等. 混菌发酵豆粕制备大豆肽的研究[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(12): 52-56.
- [10] 姜曼, 宋俊梅. 双菌种固态发酵豆粕生产大豆肽的研究[J]. *粮食加工*, 2010, 35(3): 61-63.
- [11] 张宗周. 菜籽饼脱毒微生物的筛选、分离、纯化与复配[J]. *农林科技*, 2005, 34(3): 48-49.
- [12] 叶龙祥, 牛兴亮. 菜籽粕混菌发酵脱毒研究[J]. *粮食与食品工业*, 2010, 17(4): 41-44.
- [13] 张玲. 微生物实验指导[M]. 北京: 北京交通大学出版社, 2007: 54-56.
- [14] GB/T 5511—1985 粮食、油料检验粗蛋白质测定法[S].
- [15] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. *食品科学*, 2005, 26(7): 169-171.
- [16] 汪正华, 魏晶石, 沈俭. 对菜籽饼中硫代葡萄糖苷有高效降解作用的菌种筛选研究[J]. *微生物学杂志*, 2000, 3(1): 57-59.
- [17] 袁建, 何荣, 鞠兴荣, 等. 固态发酵生产菜籽肽培养基条件优化[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 448-452.
- [18] 鞠兴荣, 王雪峰, 王立峰, 等. 混菌固态发酵菜籽粕制备菜籽肽的菌种筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 104-108.