

米曲霉发酵豆渣酶解液的研究

李琳, 李海梅, 何胜华, 马莺*

(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江, 哈尔滨 150090)

摘要: **目的** 对豆渣进行酶解发酵, 提高豆渣的利用率。**方法** 新鲜豆渣经过蛋白酶和纤维素酶协同部分水解后, 再利用米曲霉进行发酵, 生产食品添加剂。**结果** 正交实验确立的最优发酵条件为发酵温度为 30 ℃, 接种量为 4%, 在转速为 130 r/min 的摇床中发酵 48 h。豆渣中 52.87% 的固形物变为可溶性成分, 约 51.8% 的蛋白质变为多肽。产物中主要含有多糖、可溶纤维和分子量在 5000 Da 以下的肽类。

关键词: 豆渣; 米曲霉; 发酵; 酶解

Study on fermentation of enzymatic hydrolysate of soybean dregs by *Aspergillus oryzae*

LI Lin, LI Hai-Mei, HE Sheng-Hua, MA Ying*

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

ABSTRACT: Objective To improve the utilization rate of nutrient matter in soybean dregs by enzymatic hydrolysis and fermentation. **Methods** After the synergetic hydrolysis by protease and cellulase, soybean dregs were then fermented with *Aspergillus oryzae* to produce functional food additive. **Results** The fermentation conditions were optimized by orthogonal experiment and obtained as follows: fermentation temperature of 30 ℃, seeds amount of 4%, rotational speed of 130 r/min and fermentation time of 48 h. It was found that about 52.8% dry substance of soybean dregs were converted into water-soluble matter and 51.8% protein was changed to polypeptide. The products consisted of polysaccharose, soluble fiber, and peptide of molecular weight less than 5000 Da.

KEY WORDS: soybean dregs; *Aspergillus oryzae*; fermentation; enzymatic hydrolysate

1 前言

豆渣是大豆分离蛋白、豆腐等大豆制品加工中的主要副产物, 约占全豆干重的 15%~20%。豆渣中含有约 60%~70% 的碳水化合物及粗纤维和 15%~20% 的蛋白质, 以及多种微量元素和矿物质^[1]。豆渣纤维含量高, 纤维颗粒大, 口感粗糙, 含有抗胰蛋白酶、皂素和血凝素等抗营养因子, 不易被人体消化吸收, 加上其令人难以接受的豆腥味, 长期以来豆渣大多

被用作饲料^[2,3]。随着食品科学的发展, 人们从营养学的角度对其有了新的认识, 其开发利用受到了极大的重视。

选择性蛋白酶或者微生物发酵法处理豆渣可以制备多种性能的膳食活性肽^[4,5], 如降血压肽、降胆固醇活性肽、抗氧化肽、免疫调节肽、促进矿物质吸收的低分子肽(2~9 个氨基酸)和中等链长(20 个氨基酸左右)的活性肽^[6,7]。通过微生物和酶的降解可把豆渣中的膳食纤维微粒化, 其中部分不溶性膳食纤维

基金项目: 黑龙江省“十一五”科技攻关项目(GA09B401-7)

*通讯作者: 马莺, 教授, 博导, 研究方向: 食品化学。 E-mail: maying@hit.edu.cn

降解为水溶性多糖,增加可食纤维量,消除豆渣的粗涩感以及豆腥味,有效地改善大豆膳食纤维的功能性和应用价值^[8,9]。

大豆膳食纤维和大豆活性肽都是重要的食品工业原料和食品补充剂^[10,11]。近年来,随着市场对功能性食品添加剂需求量的增大,利用豆渣开发功能性食品添加剂的研究逐渐增多,但以豆渣酶解液进行液态发酵生产功能性产品的研究尚未见报道。为此,笔者拟采用蛋白酶和纤维素酶协同水解后的豆渣混合液作为霉菌发酵的底物,研究确定霉菌发酵的适宜条件,为后续工业化生产提供技术保障。

2 材料与方法

2.1 材料

豆渣(哈高科大豆食品有限责任公司提供);菌种(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院微生物室保存的米曲霉菌,沪酿3.042)。

酶:Alcalase 2.4 L FG(活力 2.6×10^5 U/mL,诺维信中国公司);纤维素分解酶(工业应用,滤纸酶活2000 u/g,诺维信中国公司)。

种子培养基:察氏培养基(硝酸钠3 g;磷酸氢二钾1 g;硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)0.5 g;氯化钾0.5 g;硫酸亚铁0.01 g;蔗糖30 g;琼脂20 g;蒸馏水1000 mL),120 °C下灭菌20 min。

2.2 试验仪器

紫外可见分光光度计(754PC,上海光谱仪器有限公司);电子天平(FA1104,上海精密仪器公司);数显恒温水浴锅(HH-6,常州国华电器有限公司);电热鼓风干燥箱(101-1A,天津市泰斯特仪器有限公司);精密PH计(PHS-3C,上海雷磁仪器厂);葡聚糖凝胶Sephadex (G-25, Pharmacia, 进口分装);核酸蛋白检测仪(HD21C-A,上海康华生化仪器制造厂)。

2.3 试验方法

2.3.1 分析方法

豆渣水分含量的测定参照 GB/T5009.3-2003;灰分含量的测定参照 GB/T5009.4-2003;蛋白质含量的测定参照 GB/T5009.5-2003;脂肪含量的测定参照 GB/T5009.6-2003;淀粉含量 GB/T5009.9-2003。

发酵液中肽分子量分布的测定采用凝胶过滤层析法:取一定量的发酵清液用蒸馏水稀释成约含

10 mg/mL 大豆肽的溶液,过葡聚糖凝胶柱(Sephadex G-25, 1.5×68 cm),柱末端与核酸蛋白检测仪、记录仪相联,检测波长为 $\lambda=254$ nm,记录仪记录吸光值对洗脱时间的曲线。洗脱液为蒸馏水,流速控制在0.3 mL/min,温度为室温,加样量为1 mL。以胰岛素为标品,按上述条件上样,测定标品分子量分布曲线,根据此曲线粗略测定大豆肽的分子量分布。

2.3.2 发酵原料的制备

采用碱性蛋白酶和纤维素酶协同水解豆渣,制备发酵基料。将湿豆渣与水以1:4(m:m)的比例混合,调节豆渣液PH 7.0,添加碱性蛋白酶0.02 g/g干豆渣,同时加入豆渣干重1.5%的纤维素酶,55 °C水解4 h后,可用作发酵培养基制备豆渣发酵活性成分。

2.3.3 菌种活化

挑取保藏于冰箱中的米曲霉斜面菌种,在30 °C培养箱中培养72 h。

2.3.4 液体种子的制备

培养基为察氏培养基,不加琼脂,然后分装到1000 mL三角瓶中,装液量为250 mL,121 °C灭菌20 min。培养条件:温度28 °C~30 °C,时间10~12 h,培养液中菌体达到 2×10^8 CFU/mL,即可作为发酵的米曲霉种子。

2.3.5 发酵方法

(1) 制备一定水解度的豆渣液。考虑到后续产品的分离和纯化等问题,发酵液培养基制备时,不添加其它营养物质。

(2) 灭菌。配制好的水解液分装,湿热灭菌,温度121 °C,压力0.1 MPa,时间20 min。

(3) 冷却后接菌。灭菌后的酶解液降温至25 °C~28 °C,按一定比例的酶解液总量接入菌种并摇匀。

(4) 发酵。接入菌种后的混合液进行发酵培养,控制发酵温度和发酵时间。

以发酵液中可溶性产物得率评价发酵效果。

2.3.6 发酵产物得率的测定

发酵液经两层纱布过滤,得到菌丝体和未分解的豆渣,滤渣经蒸馏水冲洗数次,合并滤液,记录滤液总重。取一定量滤液,采用干燥法测定滤液中固形物含量。另外单独采用干燥法测定发酵液中固形物量。

$$\text{发酵产物得率}(\%) = \frac{\text{上清液总清} \times \text{上清液固形物含量}}{\text{发酵液固形物质量}} \times 100$$

2.4 发酵条件

2.4.1 接种量对发酵效果的影响

将米曲霉活化后的菌悬液的孢子浓度调整为 $10^6\sim 10^7$ 个/mL,分别按液体培养基体积的2%、4%、6%、8%、10%接种到发酵培养基中,在30℃条件下,130 r/min摇床培养2 d,121℃灭菌20 min后,测定发酵产物得率,以此确定最佳接种量。

2.4.2 温度对发酵效果的影响

按4%的接种量,将接种后的发酵培养基,在20、25、30、35、40℃条件下,130 r/min摇床培养2 d后,121℃灭菌20 min,测定发酵产物得率,确定发酵的最佳温度。

2.4.3 时间对发酵效果的影响

按4%的接种量,将接种后的豆渣发酵培养基在30℃,130 r/min摇床培养12、24、36、48、60、72、84、96 h后,121℃灭菌20 min,测定发酵产物得率,确定发酵的最佳时间。

2.4.4 发酵条件的优化

发酵底物为部分酶解的豆渣,不添加任何营养成分,设计三因素(发酵时间、接种量、发酵温度)三水平的正交实验以优化发酵工艺,采用 $L_9(3^3)$ 正交表,见表1。

表1 发酵条件正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels for orthogonal testing of fermentation conditions

水平	因素		
	A 发酵时间(h)	B 接种量(%)	C 发酵温度(℃)
1	24	2	25
2	48	4	30
3	72	6	35

3 结果与讨论

对实验所用的豆渣进行成分分析,结果见表2。从豆渣成分表可以看出,其主要成分是纤维和蛋白质,二者占干物质85%以上。

表2 豆渣成分

Table 2 Ingredient of soybean dregs

含量(%)	湿豆渣	干豆渣
水分	89.34	
蛋白质	1.29	12.09
脂肪	0.73	6.89
淀粉	0.36	3.39
灰分	0.51	4.77
总膳食纤维	7.79	73.06

3.1 接种量的研究

不同接种量对发酵效果的影响如图1所示。

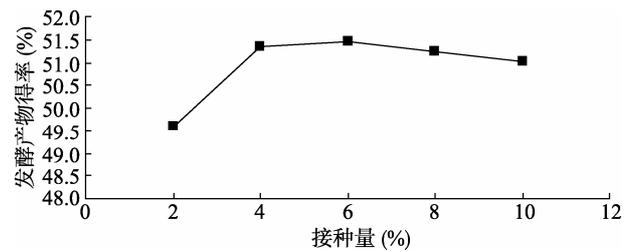


图1 接种量与可溶性发酵产物得率关系

Fig. 1 Effect of inoculation amount on the yield of the soluble fermentation products

试验结果表明,实验菌株最适接种量为4%。当接种量在2%~4%时。随着接种量的增加,发酵液中可溶性产物产量增加,当接种量在4%~10%之间时,豆渣酶解液发酵后可溶性产物得率下降,其主要原因是在发酵后期,大部分可溶性成分被菌体吸收利用变成菌丝体,因此可溶性成分减少。

3.2 发酵温度的研究

在20℃~40℃范围内进行发酵温度影响试验,发酵后测定发酵液中可溶性产物得率,具体结果见图2。

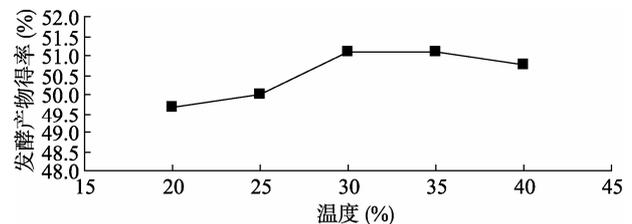


图2 发酵温度与发酵产物得率关系

Fig. 2 Effect of temperature on the yield of the soluble fermentation products

从图2可以看出,在较低的温度20℃和25℃时,发酵液中可溶性产物得率较低,可见菌体在低温条件下生长和代谢状况不佳。

在30℃培养时,豆渣发酵液中可溶性产物得率达到峰值,为51.1%。当培养温度超过30℃,豆渣发酵液中可溶性产物得率开始下降。

发酵温度是影响微生物机体重要因素之一,微生物生长一般都有最适生长温度,温度的改变影响生物体许多生化反应的进行,进而影响它们的活动。控制好温度才能使菌体生长和代谢产物的合成顺利

进行。同时, 微生物的最适生长温度并不一定是代谢产物积累的最佳温度。本试验的结果表明, 菌株在 30 °C 培养时, 酶活力很高, 产物得率高, 培养温度过高或过低, 都影响产物的得率。发酵温度低, 菌体生长较慢, 代谢高峰期出现晚, 产品含量不高; 发酵温度高, 菌体生长旺盛, 菌体过早衰老, 代谢高峰出现较早, 所以产品含量也低。

3.3 发酵时间的研究

发酵产物得率随时间的变化如图 3 所示。

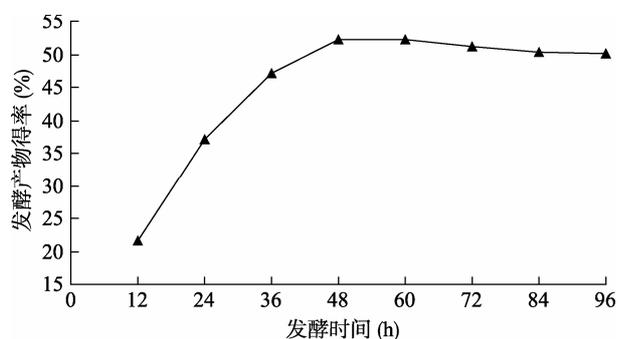


图 3 发酵时间与发酵产物得率关系

Fig. 3 Effect of time on the yield of the soluble fermentation products

由图 3 可知, 豆渣酶解液在发酵初期, 产物的含量提高较少, 是因为菌株自身处于适应环境、生长发育阶段, 不能够产生大量的代谢产物, 或者是由于酶系发育不全, 还不能对豆渣中的蛋白质和纤维素大量分解, 所以将豆渣中不溶性成分转化为可溶性成分的作用不明显。随着发酵时间的延长和酶活力的增加, 可溶性成分含量逐渐提高, 在第 48 h 达到最大值。在此之后, 由于可供菌体利用的营养成分变化以及菌体的老化, 其分解能力下降。另外, 大部分可溶性成分被菌体吸收利用变成菌丝体, 因此可溶性成分减少。

3.4 发酵条件确定

优化发酵条件的正交试验结果见表 3。

通过对发酵实验正交结果的分析, 可以看出, 极差 $R_A > R_B > R_C$, 即 3 个发酵条件因素对发酵液中可溶性产物产率的影响主次顺序为: 发酵时间、接种量和发酵温度。最佳发酵条件为 $A_2B_2C_2$, 即发酵时间 48 h, 接种量 4%, 发酵温度 25 °C。在此条件下再做验证实验, 结果表明, 发酵液中可溶性产物产率可达 52.87%。

表 3 发酵条件正交试验结果
Table 3 The result of orthogonal test of fermentation conditions

实验号	因素			产物得率(%)
	A	B	C	
1	1	1	3	51.80
2	2	1	1	51.91
3	3	1	2	51.82
4	1	2	2	52.37
5	2	2	3	52.47
6	3	2	1	51.70
7	1	3	1	52.18
8	2	3	2	52.14
9	3	3	3	51.86
K1	6.35	5.54	5.79	
K2	6.52	6.54	6.33	
K3	5.37	6.17	6.13	
R	1.15	1.00	0.54	

3.5 发酵液分析检测

米曲霉发酵 48 h 后, 发酵液中总蛋白质含量为 0.254% (对发酵液), 分离清液中蛋白质含量为 0.155% (对清液), 因此, 原料豆渣中的蛋白质有 51.8% 转化为可溶性肽。

发酵液中的主要活性成分为大豆肽, 对胰岛素标准品及大豆肽的分子量分布进行分析, 结果如图 4、图 5 所示。

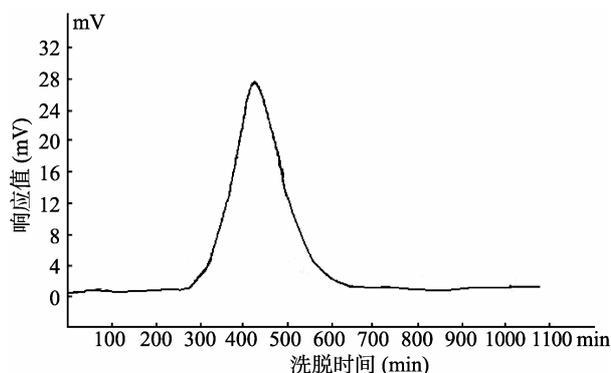


图 4 胰岛素标准品分子量分布曲线

Fig. 4 Molecular weight distribution profile of insulin standard sample

由图 4、图 5 可见, 豆渣先经蛋白酶和纤维素酶协同部分水解再用米曲霉发酵, 发酵液可溶性产物中肽分子的分布是连续的, 即产物中存在着各种大小不等的肽分子, 说明豆渣中蛋白质的酶促反应水解过程是连续进行的, 故此肽分子呈现连续分布。通

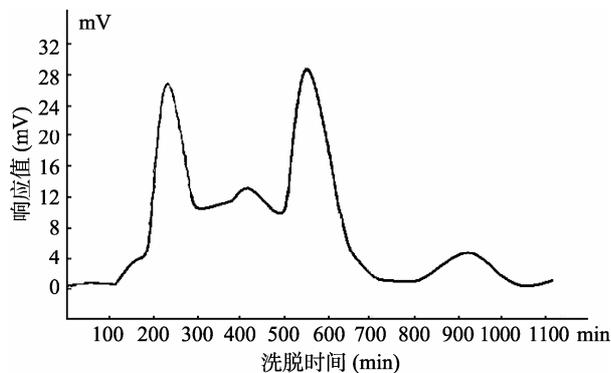


图5 大豆肽分子量分布曲线

Fig. 5 Molecular weight distribution profile of soybean peptide

过对比胰岛素标准品图谱可以看出,大多数肽的分子量为5000 Da以下,水解物中低肽分子占相当大的比例,而水解的大豆蛋白或大肽分子只占少数。

4 结论

将湿豆渣和水按1:4(m/m)的比例室温下混合均匀,加入到酶解器中,调节pH和温度,同时加入碱性蛋白酶和纤维素酶,水解一定时间,灭酶终止反应。将此水解液用米曲霉发酵,在最佳发酵条件下发酵液中可溶性成分占豆渣中固形物总量的52.87%。产物中主要含有多糖、可溶纤维和肽类,肽类的分子量在5000 Da以下,此产物的生物性功能将在后续的工作中继续研究。

参考文献

- [1] 李里特. 大豆加工与利用(第一版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 384-385.
 [2] 张延坤. 关于豆渣的综合开发利用[J]. 天津农业科学, 1994,

(4): 23.

- [3] O'Toole DK. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production [J]. J Agr Food Chem, 1999, 47(2): 363-371.
 [4] 丁玉萍, 王雪丽, 王学英. 利用豆渣生产水解植物蛋白[J]. 食品工业科技, 1997, (4): 24-25.
 [5] 周德红. 酶法水解豆渣制备水解蛋白工艺[J]. 南昌大学学报(工科版), 2005, 27(2): 74-77.
 [6] 李磊, 陈均志. 中性蛋白酶与碱性蛋白酶双酶法水解大豆蛋白的研究[J]. 西北轻工业学报, 2002, (1): 35-38.
 [7] Ganappathy V. The Absorption of Active Peptide in Intestinal Tract of Human [J]. Biochem Pharmacol, 1980, 29(5): 713-718.
 [8] 王景会, 曹龙奎, 马毓霞. 豆渣制取高活性膳食纤维的研究[J]. 吉林农业科学, 2004, 29(3): 53-57.
 [9] 姜竹茂, 陈新美. 从豆渣中制取可溶性膳食纤维的研究[J]. 中国粮油学报, 2001(6): 52-55.
 [10] 马毓霞, 王勇, 高阳, 等. 大豆膳食纤维多功能活化研究[J]. 粮油食品科技, 2005(5): 35-36.
 [11] Furuta H, Takahashi T, Tobe J, *et al.* Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(12): 2300-2305.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



李琳, 副教授, 研究方向: 食品加工。
E-mail: mrlilin@hit.edu.cn



马莺, 教授, 博导, 研究方向: 食品化学。
E-mail: maying@hit.edu.cn