

混菌发酵对紫苏粕小肽含量的影响

田海娟^{1,2}, 覃明月², 谢黎明², 张传智^{1,2}, 朱 珠^{1,2}

(1. 吉林工商学院 粮油食品深加工吉林省高校重点实验室, 吉林 长春 130507;

2. 吉林工商学院 粮食学院, 吉林 长春 130507)

摘要:以紫苏籽粕为原料,利用乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌进行混菌发酵。通过控制菌种比、接种量、料水比,以发酵后的小肽含量为指标,优化发酵工艺。结果表明,乳酸克鲁维酵母与凝结芽孢杆菌比例为1:1,接种量为12%,料水比为1:2.5 g/mL,33℃发酵2 d,此时小肽的浓度达到4.07 mg/mL,较未发酵时提高26.40%。

关键词:混菌发酵;紫苏籽粕;小肽

中图分类号:TQ 920.6; TS 205.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2018)04-0055-04

Study on the effect of mixed fermentation on the content of small peptide of *perilla* seed meal

TIAN Hai - juan^{1,2}, QIN Ming - yue², XIE Li - ming², ZHANG Chuan - zhi^{1,2}, ZHU Zhu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Grain and Oil Deep Processing of Jilin Province, Jilin Business and Technology

College, Changchun Jilin 130507; 2. School of Food Engineering, Jilin Business and

Technology College, Changchun Jilin 130507)

Abstract: *Perilla* seed meal was used as raw material, which was mixed fermented by *lactic acid kluyveromyces* and *bacillus coagulans*. The process of fermentation was optimized through controlling bacteria ratio, inoculation amount, ratio of solid to water, with the content of small peptides as the index. The results showed that when the ratio of *lactic acid kluyveromyces* to *bacillus coagulans* was 1:1, inoculation amount was 12%, ratio of solid to water was 1:2.5 g/mL, fermented at 33℃ for 2 d, the concentration of small peptides reached to 4.07 mg/mL, which was increased by 26.40% compared with that before fermentation.

Keywords: mixed fermentation; *perilla* seed meal; small peptide

紫苏[*Perillafrutescens*]是中国传统药食两用植物^[1]。我国是紫苏种植大国,在辽宁、山东、浙江等地种植广泛。印度、朝鲜、日本等国家,种植、食用紫苏也有悠久历史。目前,在美国、加拿大等地出现了商业性的紫苏种植区。在紫苏出口行业中,中国占有主要地位,我国每年可产出5~6万t的紫苏,几乎全都以紫苏油的形式进行对外出口^[2]。紫苏油中约含有80%不饱和脂肪酸,作为保健食品中不饱和脂肪酸的主要来源^[3]。提油后剩下的饼粕除少量的紫苏籽粕被用作面包、挤压蛋白等产品的原料外^[4-7],大部分紫苏籽粕被

作为饲料进行低值利用。刘大川、余华峰等人研究表明,紫苏籽粕中含残油0.46%、蛋白质50.50%、单宁1.70%、植酸6.01%^[4],属于高蛋白原料^[8]。

乳酸克鲁维酵母菌是克鲁维酵母下属的一种酵母菌,是马克思克鲁维酵母菌的一个变种。乳酸克鲁维酵母菌的研究开始于上世纪50年代末,该酵母菌种大部分从奶酪、马奶酒等奶制品中分离而来,乳酸克鲁维酵母菌被中国卫生部及美国食品与药品管理局(FDA)确定为可以用于食品中并能达到食品安全要求,且不需要消除特殊副产物的可食用菌种。乳酸克鲁维酵母菌作为一种工程菌,通过构建分泌重组蛋白的方法,已被成功应用于工业化生产蛋白^[9],乳酸克鲁维酵母可以利

收稿日期:2018-02-27

基金项目:2017年吉林省重点科技成果转化项目(20170307023NY)

作者简介:田海娟,1980年出生,女,副教授。

用生长的碳源范围很广,一些其他酵母菌不易利用的碳源,乳酸克鲁维酵母菌也可以利用,例如2,3-丁二醇、三梨酸、纤维二糖等,并且在实验室培养的条件与其他酿酒酵母培养条件相似。本实验采用乳酸克鲁维酵母菌与凝结枯草芽孢杆菌对紫苏籽粕进行混菌发酵,以营养因子小肽为指标,通过监测发酵过程中小肽含量的变化,优化发酵工艺,为紫苏综合利用提供基础数据支持,以加快紫苏籽粕生物改造工业化进程。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 实验菌种

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*):粮油食品深加工重点实验室保存菌种;标准菌株乳酸克鲁维酵母菌(*Kluyveromyceslactis* ATCC 12426):购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.2 原料与试剂

紫苏油粕:吉林工商学院实验室自制;牛肉膏、蛋白胨(生物试剂):天津市北辰方正试剂厂;氯化钠、葡萄糖(分析纯):天津市北辰方正试剂厂;MRS培养基:广东省环凯微生物有限公司;LB培养基:北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;萘酚(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;双缩脲法蛋白含量测定试剂盒:北京索莱宝科技有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、浓硫酸(分析纯):北京化工厂。

1.1.3 仪器与设备

BSC-1300IIA2超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司;TS2231020高压灭菌锅:上海东亚压力容器制造有限公司;SHZ-B水浴振荡器:上海博讯实业有限公司;Agilent Cary 60紫外-可见分光光度计:美国安捷伦科技公司;VC20真空干燥箱:北京博励行仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸克鲁维酵母菌和凝结芽孢杆菌的活化

将乳酸克鲁维酵母菌冻干粉在无菌环境条件下活化后,准确吸取0.5 mL的乳酸克鲁维酵母菌

加入到含50 mL MRS培养基的三角瓶中,30 ℃条件下培养18 h,将其作为一代菌液。取少量凝结芽孢杆菌粉于含有50 mL LB培养基的三角瓶中。将接菌的三角瓶振荡均匀,于37 ℃条件下培养18 h,将其作为一代菌液。分别吸取1%的一代菌液于各自的培养基中,培养条件同上,作为二代菌液,依据GB 4789.2—94《菌落总数检验方法》,采用平板计数琼脂培养基(PCA)来测定细菌的总数;依据GB 4789.15—2010《食品微生物学检验霉菌和酵母计数》,采用孟加拉红琼脂培养基测定霉菌的生长总数。乳酸克鲁维酵母菌二代菌悬液浓度为 3.16×10^7 CFU/mL,凝结芽孢杆菌粉二代菌悬液浓度为 2.85×10^7 CFU/mL。

1.2.2 原料处理

紫苏籽经超临界CO₂技术(压力:25 MPa,温度:40 ℃,流量:20 L/h,萃取90 min)萃取紫苏籽油后剩下的即为紫苏籽粕,冷冻保藏。称取紫苏籽粕放入蓝盖瓶中,于121 ℃条件下灭菌20 min,经冷却后,备用。

1.2.3 单因素与正交实验设计

乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌的比例为1:3,接种量为16%,紫苏籽粕与水的比例分别为1.0:1.0、1.0:1.5、1.0:2.0、1.0:2.5 g/mL,发酵紫苏籽粕。

实验选取料水比为1.0:2.0 g/mL,接种量为16%,乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌的比例分别为1:1、1:2、1:3、1:4、2:1、3:1,发酵紫苏籽粕。

乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌的比例为1:3,料水比为1.0:2.0 g/mL,接种量分别为0%、8%、12%、16%、20%、24%,发酵紫苏籽粕。

单因素发酵实验均在33 ℃条件下发酵2 d,121 ℃条件下杀菌20 min,并于40 ℃条件下进行真空干燥,将其用研钵磨碎,检测小肽含量。根据单因素实验结果,设计正交实验。

1.2.4 小肽的检测方法

称取发酵后样品,按一定料水比,加入蒸馏水,搅拌均匀。用NaOH溶液(1 mol/L)调节至

pH 值为 9.0, 摇匀。35 ℃ 水浴 40 min 后, 于 5 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集上清液。用 HCl 溶液 (1 mol/L) 调整溶液 pH 值为 4.4, 于 5 000 r/min 条件下再次离心 50 min, 取沉淀, 将其置于平皿中。于 40 ℃ 条件下真空烘干, 干燥完成之后, 将其用研钵磨成粉状, 封闭于干燥器中, 备用。称取一定量待测样品, 加水稀释至 1 mL, 于波长 540 nm 处进行测定。

1.3 数据分析与处理

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示, $n = 3$ 。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 菌种比例对发酵紫苏籽粕中小肽的影响

根据实验设定的条件, 不同菌种比例发酵对紫苏籽粕中小肽含量的变化规律如图 1 所示。从图中可以看出菌种比对小肽含量有所影响, 当乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌的比例为 1:2 时, 小肽含量增加至最高值 4.173 6 mg/mL, 随着乳酸克鲁维酵母菌比例的提高, 小肽含量持续降低, 当乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌的比例为 2:1 时, 小肽含量最低 (2.747 9 mg/mL)。因此选择菌种比例 1:1、1:2、1:3 作为正交实验的 3 个水平。

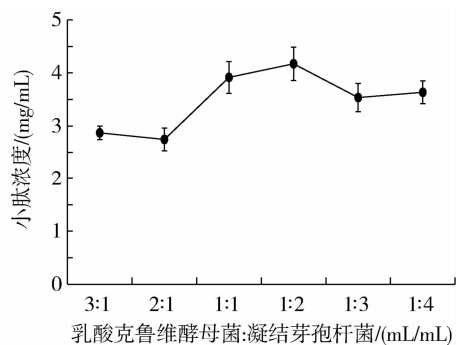


图 1 菌种比对发酵紫苏籽粕中小肽含量的影响

2.1.2 料水比对发酵紫苏籽粕中小肽的影响

根据实验设定的条件, 不同料水比发酵对紫苏籽粕中小肽含量的变化规律如图 2 所示。从图中可以看出料水比对小肽的含量影响较为明显, 当料水比为 1:2 时小肽含量达到最高值 3.760 3

mg/mL, 当料水比继续降低, 小肽含量明显下降, 这可能是因为水比例越大, 稀释效应越强, 导致微生物进行生命活动可利用的营养物质浓度下降, 微生物代谢减慢, 进而小肽含量下降。因此, 选择料水比 1:1.5、1:2、1:2.5 g/mL 作为正交实验的 3 个水平。

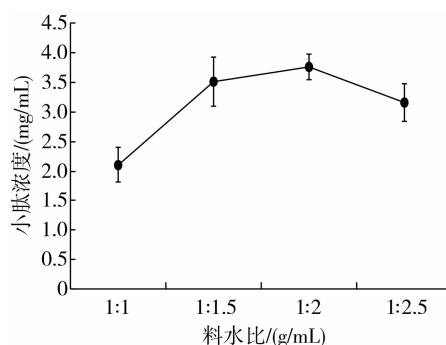


图 2 料水比对发酵紫苏籽粕中小肽含量的影响

2.1.3 接种量对发酵紫苏籽粕中小肽的影响

根据实验设定的条件, 以不同的接种量发酵紫苏籽粕, 紫苏粕中小肽含量的变化规律如图 3 所示。从图中可以看出接种量对小肽含量有所影响, 一定范围内, 小肽含量随着接种量的增大而提高, 当接种量为 12% 时, 小肽浓度最高 (4.198 3 mg/mL), 当接种量继续提高, 发酵紫苏粕小肽含量下降, 推测原因可能是接种的微生物量比较大, 在紫苏粕基质上菌过量富集, 导致代谢减慢, 表现小肽量降低。当接种量为 24% 时, 发酵紫苏粕中小肽含量为 3.491 7 mg/mL, 与未接种的紫苏粕中小肽含量接近。因此, 选择接种量为 8%、12%、16% 作为正交实验因素的 3 个水平。

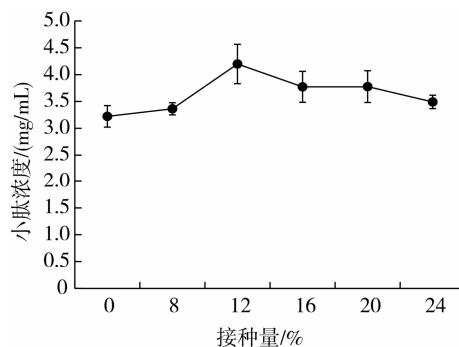


图 3 接种量对发酵紫苏籽粕中小肽含量的影响

2.2 正交优化实验结果

根据单因素实验结果,选取对紫苏籽粕小肽影响较大的3个因素,分别为菌种比、料水比、接种量,采用 $L_9(3^3)$ 正交进行实验设计。正交实验因素与水平见表1,正交实验结果见表2。

表1 正交实验因素与水平

水平	A 料水比	B 菌种比	C 接种量/%
1	1:1.5	1:1	8
2	1:2	1:2	12
3	1:2.5	1:3	16

表2 正交实验结果与分析

实验号	A	B	C	空白	小肽含量/ (mg/mL)
1	1	1	1	1	2.77
2	1	2	2	2	3.47
3	1	3	3	3	2.28
4	2	1	2	3	3.45
5	2	2	3	1	2.59
6	2	3	1	2	2.40
7	3	1	3	2	3.64
8	3	2	1	3	2.82
9	3	3	2	1	4.03
K_1	8.52	9.86	7.99	9.39	
K_2	8.44	8.88	10.95	9.51	
K_3	10.49	8.71	8.51	8.55	因素主次顺序 CAB
k_1	2.84	3.29	2.66	3.13	最优组合 $A_3B_1C_2$
k_2	2.81	2.96	3.65	3.17	
k_3	3.50	2.90	2.84	2.85	
R	0.69	0.39	0.82	0.32	

由表2可以得出,对混菌固态发酵紫苏饼粕小肽含量影响最大的因素是接种量,其次是料水比和菌种比,通过极差分析得到最优组合为 $A_3B_1C_2$,即在乳酸克鲁维酵母与凝结芽孢杆菌比例为

1:1,料水比为1:2.5 g/mL,接种量为12%,33℃的条件下发酵2 d,为最优发酵条件。验证实验结果得出,此条件下小肽含量达到4.07 mg/mL,实验测定该条件下未发酵紫苏粕中小肽含量为3.22 mg/mL,最优发酵条件下紫苏粕中小肽含量提高了26.40%。

3 结论

本文采用乳酸克鲁维酵母菌与凝结芽孢杆菌对紫苏籽粕进行混菌发酵,以营养因子小肽为指标,通过监测发酵过程中小肽含量的变化,确定混菌发酵的条件。结果表明:经过混菌发酵后,紫苏籽粕的小肽含量在不同的接种量、菌种比、料水比条件下均发生了明显的变化,在乳酸克鲁维酵母与凝结芽孢杆菌比例为1:1,料水比为1:2.5 g/mL,接种量为12%的条件下,33℃发酵2 d,小肽的含量达到最高值4.07 mg/mL,小肽含量提高率为26.40%。

参考文献:

[1]黄明发,郭莉,郑炯,等.紫苏的研究发展[J].中国食品添加剂,2007(4):85-89.
 [2]谢君,潘存霞,范中胜,等.紫苏籽提取物在肉仔鸡日粮中使用效果研究[J].饲料工业,2011,32(5):10-12.
 [3]路洁静,任文彬.紫苏的研究概况[J].农产品加工学刊,2009(6):33-34.
 [4]李钰,吴卫,苏华,等.响应面法优化紫苏籽粕超声辅助提取原花青素工艺[J].食品科学,2014,35(4):50-54.
 [5]张传智,田海娟,张艳,等.紫苏面包粉的制备及其粉质特性分析[J].食品与机械,2016,32(4):223-225.
 [6]田海娟,朱珠,张传智,等.紫苏叶超微粉对面团特性及面包品质的影响[J].食品与机械,2016,32(1):188-191.
 [7]田海娟,张传智,姚招娣.紫苏油粕高水分组织化蛋白产品的工艺研究[J].食品研究与开发,2013,34(13):69-72.
 [8]王楠,冯志彪.两种油料蛋白制备及其功能性研究[J].中国油脂,2012,37(3):18-22.
 [9]李晨曦.重组亚油酸异构酶在乳酸克鲁维酵母中表达条件的优化及微囊化[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2016. 