

对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白的工艺研究

黄志诚¹, 刘唤明^{2*}, 夏杏洲², 陈康健³

(1. 北海群林生物工程有限公司, 广西北海 536000; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省现代农业科技创新中心, 广东湛江 524088; 3. 广东省水产品深加工及副产物高值化利用工程技术研究中心, 湛江恒兴水产科技有限公司, 广东湛江 510300)

摘要 [目的] 研究对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白的工艺。[方法] 以对虾蒸煮废水和豆粕为主要原料, 以水解度为指标, 在单因素试验的基础上, 利用正交试验优化发酵饲料蛋白的发酵工艺。[结果] 最佳发酵工艺如下: 对虾蒸煮废水与豆粕的比例为 0.8:1, 接种量为 0.2%, 蛋白酶添加量为 0.03%, 纤维素酶添加量为 0.03%。在此条件下, 发酵后产品的水解度达 26.88%。[结论] 研究结果可为对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白提供技术支持。

关键词 对虾蒸煮废水; 水解度; 发酵饲料蛋白

中图分类号 TS209 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)16-0085-03

Study on the Preparation Process of Fermented Feed Protein by Mixed Fermentation of Shrimp's Cooking Wastewater and Soybean Cake

HUANG Zhi-cheng¹, LIU Huan-ming², XIA Xing-zhou² et al (1. Beihai Qunlin Biotechnology Limited Company, Beihai, Guangxi 536000; 2. Aquatic Product Processing and Safety Key Lab of Guangdong Province, Guangdong Modern Agricultural Science and Technology Innovation Center, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To study the preparation technology of fermented feed protein by mixed fermentation of shrimp's cooking wastewater and soybean cake. [Method] Taking shrimp's cooking wastewater and soybean as raw material, using degree of hydrolysis as research index, the fermentation process of fermented feed protein was optimized by orthogonal design based on single factor test. [Result] The optimum fermentation process was as follows: the ratio of shrimp's cooking wastewater to soybean cake of 0.8:1, the inoculation amount of 0.2%, the addition amount of protease of 0.03%, the addition amount of cellulase of 0.03%. Under the above fermentation conditions, the hydrolysis degree of fermented products was up to 26.88%. [Conclusion] The research results could provide technical support for preparing fermented feed protein by mixed fermentation of shrimp's cooking wastewater and soybean cake.

Key words Shrimp's cooking wastewater; Degree of hydrolysis; Fermented feed protein

我国自 2002 年以来对虾产量一直居全球首位。目前我国对虾加工产品仍以冷冻虾仁为主, 但近年来, 连头熟虾、熟去头虾和熟凤尾虾等系列熟虾休闲食品在市場中的比例越来越大。熟虾在加工过程中需要进行蒸煮。与传统的对虾加工废水不同, 这些对虾蒸煮废水的蛋白含量和 COD 含量高, 难以对其进行处理。目前, 绝大多数的水产品加工厂的的对虾蒸煮废水直接排放, 这不仅造成了许多物质的浪费, 而且还会带来严重的环保问题。

发酵豆粕是以优质豆粕为主要原料, 在多菌种混合发酵下将豆粕中的多种抗营养因子去除, 同时其在发酵过程中产生大量益生菌、乳酸等物质, 是一种优质的多功能饲料蛋白。研究表明, 在不影响喂养效果的情况下, 发酵豆粕能部分代替饲料配方中进口优质鱼粉和乳清粉^[1-5], 显著降低饲料生产成本。笔者将对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白, 直接将对虾蒸煮废水变废为宝, 这不仅低成本地解决了对虾蒸煮废水的环保问题, 而且会进一步提高发酵豆粕的营养品质。笔者对用对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白的工艺进行研究, 旨在为对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要原料与试剂。对虾蒸煮废水: 熟虾加工过程的蒸

煮废水, 由湛江恒兴水产科技有限公司提供, 将运回的废水(初始蛋白含量约 3%)置于 -20℃ 冰箱中保藏备用。脱脂豆粕购于中纺粮油有限公司, 将其粉碎后过 60 目筛备用。复合发酵菌种包含枯草芽孢杆菌($\geq 2 \times 10^{10}$ CFU/g)、酵母菌($\geq 1 \times 10^9$ CFU/g)和乳酸菌($\geq 1 \times 10^9$ CFU/g), 由北海群林生物工程有限公司生产。

茼三酮, 分析纯, 购自汕头市西陇化工有限公司; 甘氨酸, 分析纯, 购自山东佰仟化工有限公司; 中性蛋白酶, 由南宁庞博生物工程有限公司生产, 酶活力为 200 000 U/g; 纤维素酶, 由黑龙江肇东市日成酶制剂有限公司生产, 酶活力为 50 000 U/g。

1.1.2 主要仪器与设备。 MJX-160B-Z 恒温培养箱, 为上海博迅实业有限公司产品; UV-210PC 分光光度计, 为上海森超贸易有限公司产品; GZX-9070MB 电热恒温鼓风干燥箱, 为上海博迅实业有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 发酵饲料蛋白的制备。 将对虾蒸煮废水和豆粕按 0.6:1~1.1:1 的比例混合, 接入复合发酵菌种混匀, 装入 300 mL 的发酵瓶中, 于 37℃ 下恒温培养 72 h 后, 取出在 50℃ 下烘干、粉碎至 80 目。

1.2.2 发酵豆粕的制备。 将水和豆粕按 0.8:1 的比例混合, 接入 0.1% 复合发酵菌种混匀, 装入 300 L 的发酵瓶中, 于 37℃ 下恒温培养 72 h 后, 取出在 50℃ 下烘干、粉碎至 80 目。

1.2.3 水解度的测定。 发酵后产品水解度的测定采用茼三酮显色法^[6]。

基金项目 广东省科技计划项目(2016A090922015, 2013A090100014); 湛江市科技计划项目(2015A01004)。

作者简介 黄志诚(1979—), 男, 湖北南漳人, 硕士, 从事发酵工程研究。* 通讯作者, 副教授, 硕士, 从事水产品加工研究。

收稿日期 2018-02-27

1.2.4 常规营养成分的测定。粗蛋白的测定按 GB/T 6432—1994 的方法^[7]进行;氨基酸的测定按 GB/T 18246—2000 的方法^[8]进行;水分的测定按 GB/T 6435—2014 的方法^[9]进行。

1.2.5 单因素试验优化发酵工艺。①对虾蒸煮废水与豆粕的比例。称取 100 g 豆粕,分别加入 60、70、80、90、100 和 110 mL 对虾蒸煮废水,再接种 0.1% 的复合菌种,于 37 ℃ 培养箱中培养 72 h 后测定发酵后产品的水解度。②接种量的优化。称取 100 g 豆粕和 80 mL 对虾蒸煮废水 5 份,分别接种 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 和 0.5% 的复合菌种,于 37 ℃ 培养箱中培养 72 h 后测定发酵后产品的水解度。③中性蛋白酶添加量的优化。称取 100 g 豆粕和 80 mL 对虾蒸煮废水 6 份,分别接种 0.1% 的复合菌种,再分别加入 0、0.01%、0.02%、0.03%、0.04% 和 0.05% 的中性蛋白酶,于 37 ℃ 培养箱中培养 72 h 后测定发酵后产品的水解度。④纤维素酶添加量的优化。称取 100 g 豆粕和 80 mL 对虾蒸煮废水各 6 份,均接种 0.1% 的复合菌种,再分别加入 0、0.01%、0.02%、0.03%、0.04% 和 0.05% 的纤维素酶,于 37 ℃ 培养箱中培养 72 h 后测定发酵后产品的水解度。

1.2.6 正交试验优化发酵工艺。在单因素试验的基础上,选取接种量、蛋白酶添加量和纤维素酶添加量进行正交试验。正交试验因素和水平如表 1 所示。

表 1 正交试验因素和水平

Table 1 Factor and level of orthogonal test %			
水平 Level	因素 Factor		
	接种量(A) Inoculation amount	蛋白酶添加量(B) Adding amount of protease	纤维素酶添加量(C) Adding amount of cellulase
1	0.1	0.02	0.01
2	0.2	0.03	0.02
3	0.3	0.04	0.03

2 结果与分析

2.1 对虾蒸煮废水与豆粕的比例对发酵产品水解度的影响 从图 1 可以看出,当对虾蒸煮废水含量为 80 g,即对虾蒸煮废水与豆粕的比例为 0.8:1 时,发酵后产品的水解度达到最大值(13.16%)。随着对虾蒸煮废水比例的增加,发酵培养基的含水量不断增加,这既不利于微生物的生长,又不利于实际生产操作,因此选择对虾蒸煮废水与豆粕的比例为 0.8:1。

2.2 接种量对发酵产品水解度的影响 从图 2 可以看出,随着菌种接种量的增加,发酵产品的水解度先升高后降低。当接种量为 0.3% 时,发酵产品的水解度达到最大值,为 14.82%。

2.3 蛋白酶添加量对发酵产品水解度的影响 由图 3 可知,添加蛋白酶可显著增加发酵产品的水解度,但当蛋白酶添加量大于 0.04% 时,发酵产品水解度的增加变得不明显。

2.4 纤维素酶添加量对发酵产品水解度的影响 由图 4 可知,添加纤维素酶可增加发酵产品的水解度。当纤维素酶的添加量大于 0.02% 时,发酵产品的水解度基本没有增加。这

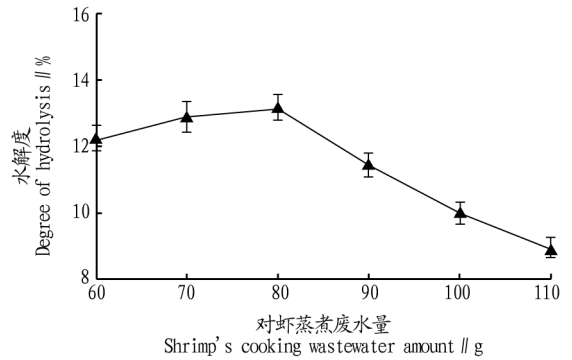


图 1 对虾蒸煮废水量对发酵产品水解度的影响

Fig.1 Effects of shrimp's cooking wastewater amount on the hydrolysis degree of fermented products

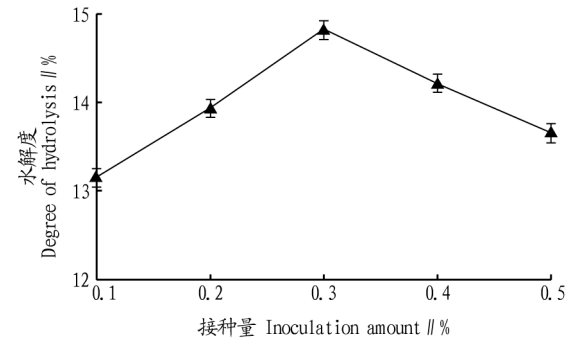


图 2 接种量对发酵产品水解度的影响

Fig.2 Effects of inoculation amount on the hydrolysis degree of fermented amount

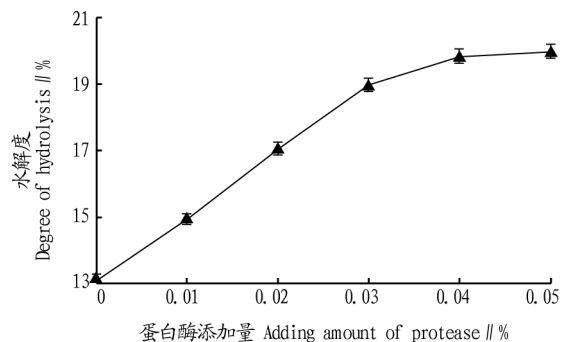


图 3 蛋白酶添加量对发酵产品水解度的影响

Fig.3 Effects of adding amount of protease on the hydrolysis degree of fermented amount

可能是因为纤维素酶可破坏豆粕细胞壁,这有利于豆粕中蛋白和蛋白酶的接触,从而增加发酵产品的水解度。这与刘唤明等^[10]研究结果相一致。

2.5 正交试验优化发酵工艺 在单因素试验的基础上,利用正交试验对发酵工艺进行了优化,结果见表 2。由表 2 可知,各因素的最佳水平为 $A_2B_2C_3$,即接种量为 0.2%,蛋白酶添加量为 0.03%,纤维素酶添加量为 0.03%。在以上条件下,发酵后产品的水解度高达 26.88%;从 R 值的大小可以看出,蛋白酶添加量的影响最大,其次是纤维素酶添加量,而接种量的影响最小。

2.6 发酵产品的蛋白质和氨基酸含量与发酵豆粕的比较 对正交优化后的发酵产品进行蛋白质含量测定及氨基

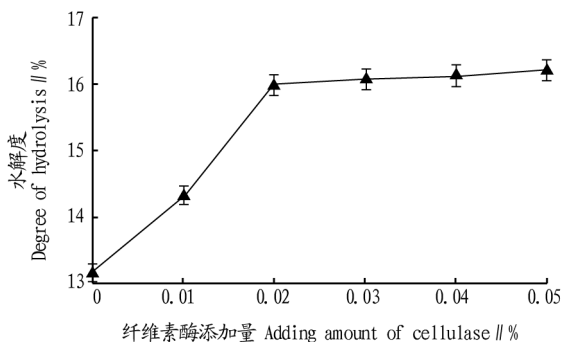


图4 纤维素酶添加量对发酵产品水解度的影响

Fig.4 Effects of adding amount of cellulase on the hydrolysis degree of fermented amount

酸分析,并将其发酵豆粕进行对比,结果见表3。由表3可知,与发酵豆粕相比,发酵饲料蛋白的蛋白质含量从49.42%提高到52.01%,氨基酸总量由47.45%提高到48.19%,且每种氨基酸的含量都有所提高。由此可见,对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备的发酵饲料蛋白进一步提高了发酵豆粕的

营养品质。

表2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test

试验号 Test No.	因素 Factor			水解度 Degree of hydrolysis / %
	A	B	C	
1	1	1	1	21.22
2	1	2	2	25.08
3	1	3	3	25.93
4	2	1	2	23.68
5	2	2	3	26.88
6	2	3	1	24.25
7	3	1	3	24.13
8	3	2	1	24.52
9	3	3	2	21.59
K_1	24.077	23.010	23.330	
K_2	24.937	25.493	23.450	
K_3	23.413	23.923	25.647	
R	1.524	2.483	2.317	

表3 发酵饲料蛋白与发酵豆粕的蛋白质和氨基酸含量比较

Table 3 The comparison of protein and amino acids between fermented feed protein and fermented soybean

种类 Kinds	蛋白质含量 Protein content	含水量 Water content	氨基酸含量 Content of amino acids								
			天冬氨酸 Asp	丝氨酸 Ser	谷氨酸 Glu	甘氨酸 Gly	组氨酸 His	精氨酸 Arg	苏氨酸 Thr	丙氨酸 Ala	脯氨酸 Pro
发酵豆粕 Fermented soybean	49.42	7.98	5.61	2.21	8.95	2.24	1.58	3.25	1.90	2.31	2.66
发酵饲料蛋白 Fermented feed protein	50.01	7.94	5.65	2.25	9.02	2.27	1.61	3.29	1.93	2.35	2.70

种类 Kinds	氨基酸含量 Content of amino acids								
	胱氨酸 Cys	酪氨酸 Try	缬氨酸 Val	蛋氨酸 Met	赖氨酸 Lys	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	苯丙氨酸 Phe	总计 Total
发酵豆粕 Fermented soybean	0.41	1.47	2.60	0.46	3.02	2.40	3.90	2.48	47.45
发酵饲料蛋白 Fermented feed protein	0.45	1.51	2.65	0.53	3.10	2.43	3.92	2.53	48.19

3 结论

通过单因素试验和正交试验优化,确定了对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备发酵饲料蛋白的最佳工艺为:对虾蒸煮废水与豆粕的比例为0.8:1,接种量为0.2%,蛋白酶添加量为0.03%,纤维素酶添加量为0.03%。在此工艺条件下,发酵后产品的水解度达26.88%。

与发酵豆粕相比,该研究中的发酵饲料蛋白的蛋白质含量由49.42%提高到52.01%,氨基酸总量由47.45%提高到48.19%,且每种氨基酸的含量都有所提高。对虾蒸煮废水和豆粕混合发酵制备的发酵饲料蛋白进一步提高了发酵豆粕的营养品质。

参考文献

- [1] 杨耐德,符广才.凡纳滨对虾饲料中发酵豆粕替代鱼粉的研究[J].饲料工业,2008,29(10):24-26.
- [2] 程成荣,刘永坚.杂交罗非鱼饲料中发酵豆粕替代鱼粉的研究[J].广东饲料,2004,13(2):26-27.
- [3] 刘春雪,李绍章,杨雪海,等.不同梯度发酵豆粕对断奶仔猪生产性能的影响[J].中国饲料,2006(10):14-16.
- [4] 潘木水,付畅国,周凤珍.断奶仔猪日粮中发酵豆粕替代代乳粉的研究[J].广东饲料,2005,14(4):30-31.
- [5] 罗智,刘永坚,麦康森,等.石斑鱼配合饲料中发酵豆粕和豆粕部分替代白鱼粉的研究[J].水产学报,2004,28(2):175-181.
- [6] 赵新淮,冯志彪.大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J].东北农业大学学报,1995,26(2):178-181.
- [7] 马东霞.饲料中粗蛋白测定方法:GB/T 6432—1994[S].北京:中国标准出版社,1994.

钾肥利用率为20.0%。

表1 不同处理小麦产量和肥料增产效应

Table 1 Yield and fertilizer increase effect of different treatments

处理 Treatments	籽粒产量 Grain yield//kg/hm ²	比无肥增产率 Increased production rate than no fertilizer//%	化肥贡献率 Contribution rate of chemical fertilizer//%	化肥农学效率 Agriculture efficiency of fertilizer//kg/kg	茎叶产量 Wheat stem and leaf yield//kg/hm ²
①	5 636	30.97	—	氮肥 7.68	8 504
②	5 906	37.23	—	磷肥 7.81	9 805
③	5 753	33.61	—	钾肥 9.83	9 370
④	6 933	61.09	37.7	化肥 6.37	9 889
⑤	4 303	—	—	—	7 903

表2 氮肥利用率

Table 2 Nitrogen use efficiency

处理 Treatments	籽粒 Grain		茎叶 Stem and leaf		经济产量氮吸收量 Nitrogen- absorptive amount//g/kg	施氮量 Nitrogen application amount//kg/hm ²	氮肥利用率 Nitrogen use efficiency %
	产量 Yield kg/hm ²	全氮含量 Total nitrogen content//%	产量 Yield kg/hm ²	全氮含量 Total nitrogen content//%			
④	6 933	2.48	9 889	0.68	34.5	165	31.5
①	5 636	2.40	8 504	0.61	33.2	—	—
④比①增加	1 297	—	1 385	—	—	—	—

表3 磷肥利用率

Table 3 Phosphate use efficiency

处理 Treatments	籽粒 Grain		茎叶 Stem and leaf		经济产量磷吸收量 Phosphorus absorptive amount//g/kg	施磷量 Phosphate applied amount//kg/hm ²	磷肥利用率 Phosphate use efficiency %
	产量 Yield kg/hm ²	全P含量 Total phosphorus content//%	产量 Yield kg/hm ²	全P含量 Total phosphorus content//%			
④	6 933	0.81	9 889	0.79	19.4	126	16.6
②	5 906	0.74	6 540	0.71	19.2	—	—
④比②增加	1 027	—	—	—	—	—	—

表4 钾肥利用率

Table 4 Potassium use efficiency

处理 Treatments	籽粒 Grain		茎叶 Stem and leaf		经济产量钾吸收量 Potassium absorptive amount//g/kg	施钾量 Potassium applied amount//kg/hm ²	钾肥利用率 Potassium use efficiency %
	产量 Yield kg/hm ²	全K含量 Total potassium content//%	产量 Yield kg/hm ²	全K含量 Total potassium content//%			
④	6 933	0.26	9 889	1.02	1.72	117	20.0
③	5 753	0.26	9 775	0.86	1.66	—	—
④比③增加	1 180	—	—	—	—	—	—

3 结论

该试验结果表明,诸城地区高产地力水平氮肥利用率为31.5%,磷肥利用率为16.6%,钾肥利用率为20.0%,化肥贡献率为37.7%。但钾肥利用率与常规有一定差距,还需进一步试验验证。

参考文献

- [1] 陈新平,张福锁.通过“3414”试验建立测土配方施肥技术指标体系[J].中国农技推广,2006,22(4):36-39.
- [2] 初明光,王激清,马文奇,等.山东省粮食作物的化肥施用状况分析[J].中国土壤与肥料,2006(2):12-15.

- [3] 杜建平,朱岁层,袁伟,等.3414肥效试验在小麦生产上的应用技术[J].陕西农业科学,2009,55(6):12-14.
- [4] 周忠新,于振文,许卫霞,等.氮磷钾用量及配比对小麦产量、蛋白质含量和肥料利用率的影响[J].山东农业科学,2006(3):42-44.
- [5] 杨萍果,周进财,张定一.氮肥施用量对冬小麦产量和品质的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2002,22(3):206-208.
- [6] 谭和芳,谢金学,汪吉东,等.氮磷钾不同配比对小麦产量及肥料利用率的影响[J].江苏农业学报,2008,24(3):279-283.
- [7] 滕树川,杨朝勇,王再勇,等.氮磷钾配比及用量不同对小麦产量的影响[J].中国农学通报,2004,20(5):159-161.
- [8] 王松桂,陈敏,陈立萍.线性统计模型:线性回归与方差分析[M].北京:高等教育出版社,1999:6-11.

(上接第87页)

- [8] 常碧影,张瑜,阎惠文,等.饲料中氨基酸的测定:GB/T 18246—2000[S].北京:中国标准出版社,2000.

- [9] 孟凡胜,张苏,栗胜兰,等.饲料中水分的测定:GB/T 6435—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [10] 刘映明,薛晓宁.加酶提高发酵豆粕蛋白质水解度的研究[J].安徽农业科学,2010,38(10):5141-5142,5231.