研究论文

响应面法优化水飞蓟粕固态发酵培养基的研究

李 峰[1]， 张 敏[2]， 邹艳敏[1]， 李 芳[2]，
朱伯乐[3]， 赵 婷[2]， 吴向阳[3]， 仰榴青[*2]
（1. 江苏大学 药学院，江苏 镇江 212013；2. 江苏大学 化学化工学院，江苏 镇江 212013；3. 江苏大学 环境学院，江苏 镇江 212013）

摘要：以粗蛋白质质量分数为考察指标，利用单因素和 Box-Behnken 响应面分析试验，研究固态发酵水飞蓟粕生产蛋白质饲料的最佳培养基条件。优化得到的最佳培养基组成：水飞蓟粕：麸皮：玉米粉（质量比）为 8∶1.5∶0.5，添加质量分数 1.11%葡萄糖、1.40%尿素和 0.56%磷酸二氢钾。发酵样品粗蛋白质质量分数达 38.43%，粗蛋白质体外消化率为 88.92%，较未发酵水飞蓟粕粗蛋白质体外消化率（70.12%）提高 18.80%。

关键词：水飞蓟粕；固态发酵；响应面分析法；体外消化率
中图分类号：TS 201.3　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)01—0094—06

Optimization of Medium of Milk Thistle Meal by Solid-State Fermentation Using Response Surface Methodology

LI Feng[1]， *ZHANG Min*[2]， *ZOU Yan-min*[1]， *LI Fang*[2]，
ZHU Bo-le[3]， *ZHAO Ting*[2]， *WU Xiang-yang*[3]， *YANG Liu-qing*[*2]
（1. School of Pharmacy，Jiangsu University，Zhenjiang 212013，China；2. School of Chemistry and Chemical Engineering，Jiangsu University，Zhenjiang 212013，China；3. School of Environment，Jiangsu University，Zhenjiang 212013，China）

Abstract：Based on the index of crude protein content，the optimum medium of protein feed of milk thistle meal by solid-state fermentation was determined by using single factor experiment and the Box-Behnken response surface analysis. The optimized compositions of medium were as follows（w/w）：mass ratio of milk thistle meal，wheat bran and corn flour in the basic materials was 8∶1.5∶0.5；glucose，urea and phosphate monobasic potassium were accounted for 1.11%，1.40% and 0.56%，respectively. Under these conditions，crude protein content of fermented sample was reached 38.43%. In vitro digestibility of the fermented product was measured under the optimum conditions. The result showed that in vitro digestibility of crude protein of fermented product was 88.92%，which was decreased by 18.80% compared to that of unfermented milk thistle meal（70.12%）. from

收稿日期：2012-05-18
基金项目：镇江市科技计划项目（NY2011027）。
* **通信作者**：仰榴青（1965—），女，江苏丹阳人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事农业资源的高效利用研究。
E-mail：yangliuqing@ujs.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the 3.47 mg/kg to 1.45 mg/kg. These results demonstrated that the hygiene quality and preservation period of the Skipjack Tuna product have been improved.

Keywords: milk thistle meal, solid-state fermentation, response surface methodology, in vitro digestibility

水飞蓟(*Sliybum maruianum* (*L.*) *Gaertn.*)又名水飞雉、乳雉子,一至两年生草本植物[1-2]。其有效成分水飞蓟素具有清除自由基、抗脂质过氧化、抗肝纤维化、抗肿瘤和降血脂等生理活性[3]。近年来,随着水飞蓟素需求量的增加,水飞蓟粕残渣也随之增多。水飞蓟粕主要由蛋白质、粗纤维、多酚和黄酮类化合物等组成[4],其中蛋白质质量分数为22%~25%[5]。但目前一般作为废物丢弃,既浪费资源,又污染环境。如水飞蓟粕直接作为动物饲料使用,存在消化性和适口性差的问题。因此,作者采用霉菌和酵母菌组成的混菌剂对水飞蓟粕进行固态发酵,并优化固态发酵培养基组成,以期得到蛋白质含量高、适口性好的生物蛋白饲料,为水飞蓟粕的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水飞蓟粕:江苏中兴药业有限公司;麸皮、玉米粉:市售(所有原料粉碎后过40目筛);黑曲霉40226(*Aspergillus niger*)和热带假丝酵母1254(*Candida tropicalis*):中国工业微生物菌种保藏中心提供;斜面培养基:黑曲霉:马铃薯葡萄糖琼脂培养基;热带假丝酵母:麦芽汁琼脂培养基;液体种子培养基:黑曲霉:沙氏葡萄糖液体培养基;热带假丝酵母:麦芽汁培养基。

1.2 方法

1.2.1 *菌种活化* 将菌种接种于斜面培养基上,28 ℃培养72 h,置于4 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 *液体种子培养* 用接种环从真菌斜面取孢子一环,接入装有50 mL种子培养基的250 mL三角瓶中,120 r/min、28 ℃震荡培养48 h。

1.2.3 *固态发酵* 固态发酵培养基混合均匀,接种培养基干重10%的黑曲霉和热带假丝酵母混菌剂,调节含水量为60%,28 ℃培养72 h,45 ℃烘干,测定粗蛋白质质量分数。

1.3 单因素试验[6]

1.3.1 *物料组成对混菌固态发酵的影响* 以粗蛋白质质量分数为指标,分别考察了不同物料组成对混菌固态发酵的影响。其中水飞蓟粕:麸皮:玉米粉(质量比)分别选取5:3:2、6:3:1、7:2:1、8:1.5:0.5、9:0.5:0.5 5个水平。

1.3.2 *碳源及其添加量对固态发酵的影响* 在固态发酵基础培养基中加入不同碳源,考察碳源对固态发酵的影响。其中,碳源分别为葡萄糖、蔗糖和麦芽糖,添加量均为质量分数0%、0.5%、1%、2%、3%。

1.3.3 *无机氮源及其添加量对固态发酵的影响* 在固态发酵基础培养基中加入不同氮源,考察氮源对固态发酵的影响。其中,氮源分别为尿素、硝酸铵和硫酸铵,添加量均为质量分数0%、1%、1.5%、2%、2.5%。

1.3.4 *无机盐及其添加量对固态发酵的影响* 在固态发酵基础培养基中加入不同无机盐,考察无机盐对固态发酵的影响。其中,无机盐为磷酸二氢钾、氯化钙和硫酸镁,添加量均为质量分数0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%。

1.4 响应面设计

根据单因素试验结果和Box-Behnken中心组合设计原理,选取葡萄糖、尿素和磷酸二氢钾3个对粗蛋白质质量分数影响较大的因素为自变量,以发酵后产品粗蛋白含量为响应值,设计3因素3水平的响应面分析试验,对固态发酵营养因子进行优化;并进行验证试验,每次设3个平行。试验因素与水平见表1。

表1 响应面分析因素与水平

Table 1 Coded levels and factors of response surface analysis

编码水平	因素		
	葡萄糖 X_1/%	尿素 X_2/%	磷酸二氢钾 X_3/%
1	1.5	2.0	0.4
0	1.0	1.5	0.6
-1	0.5	1.0	0.8

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 分析方法

粗蛋白质质量分数测定:粗蛋白质测定采用半微量凯氏定氮法,参照国标GB/T 6432-94 饲料中粗蛋白质测定方法, 用于比较发酵前后的蛋白质氮量;粗蛋白质体外消化率测定:粗蛋白质体外消化率测定参照王卫国等[8]的方法。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 *物料组成* 由图 1 可知,当固态发酵培养基中含水飞蓟粕比例为 80%时,蛋白质提高量相对较高,水飞蓟粕所占比例少发酵基质粗蛋白质质量分数低,随着发酵基质中水飞蓟粕比例的升高,发酵样品粗蛋白质质量分数增大,但超过 90%后反而下降,这可能是由于水飞蓟粕含量过多,培养基过于黏稠,不利于溶氧和传质,影响菌体生长和产酶,导致发酵产品粗蛋白质质量分数降低。最终选定固态发酵培养基中基础物料水飞蓟粕:麸皮:玉米粉(质量比)为 8:1.5:0.5。

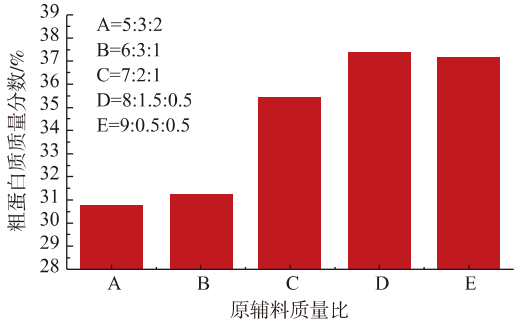


图 1 不同原辅料配比对粗蛋白质质量分数的影响

Fig. 1 Effects of different ratio of raw and auxiliary materials on crude protein content

2.1.2 *碳源及其添加量对固态发酵的影响* 碳源是微生物的重要营养物质,其主要作用是构成微生物细胞的碳架和供给微生物生长繁殖所需的能源。由图 2 可知,3 种碳源对水飞蓟粕粗蛋白质质量分数均有提高,其中葡萄糖为碳源时,粗蛋白质提高量高于蔗糖和麦芽糖, 且葡萄糖添加质量分数为 1%时,发酵产品粗蛋白质质量分数提高最多。最终选择葡萄糖作为固态发酵培养基的外加碳源。

2.1.3 *无机氮源及其添加量对固态发酵的影响* 由图 3 可知,3 种氮源对水飞蓟粕粗蛋白质质量分数均有提高,其中,尿素为氮源时,发酵产品粗蛋白质质量分数提高程度优于硝酸铵和硫酸铵,且尿素添加质量分数为 1.5%时,发酵产品粗蛋白质质量分数提高最大。再增加尿素含量,粗蛋白质质量分数略有减少,这是因为尿素为非蛋白氮,相对分子质量较小,溶液渗透压较高,含量过高时抑制菌体生长,影响粗蛋白质质量分数的增加。最终选择尿素作为固态发酵培养基的外加氮源。

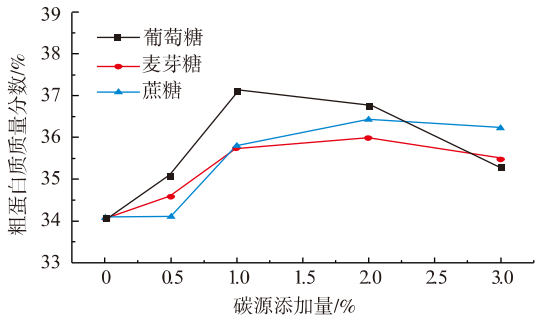


图 2 不同碳源对粗蛋白质质量分数的影响

Fig. 2 Effects of different carbon resources on crude protein content

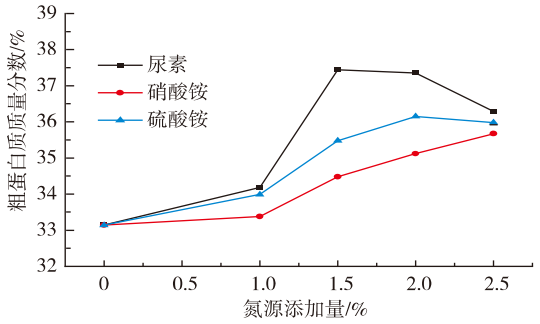


图 3 不同氮源对粗蛋白质质量分数的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen resources on crude protein content

2.1.4 *无机盐及其添加量对固态发酵的影响* 无机盐是微生物生长繁殖必不可少的营养物质,是发酵过程中的生长刺激因子,对菌体的生长具有重要意义。由图 4 可知,3 种无机盐对发酵产品粗蛋白质质量分数均有所提高,其中磷酸二氢钾的促进作用最明显,且添加质量分数为 0.6%时,粗蛋白质质量分数最大。最终选择磷酸二氢钾作为固态发酵培养基的外加无机盐。

2.2 响应面分析

根据 3 因素 3 水平的响应面试验设计,共设有 17 个试验点,其中 12 个为析因点,5 个为零点以估计误差。试验设计和结果见表 2。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

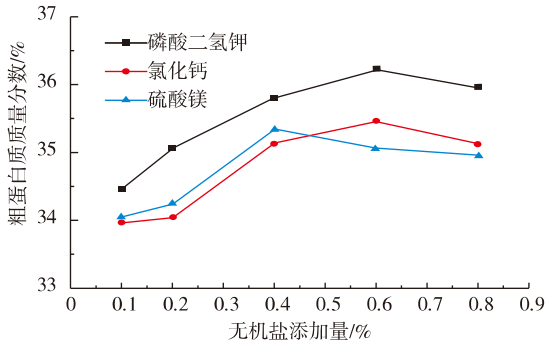


图 4 不同无机盐对粗蛋白质质量分数的影响

Fig. 4 Effects of different inorganic salt resources on crude protein content

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface analysis

试验号	编码水平			粗蛋白质质量分数/%
	X_1	X_2	X_3	
1	0	0	0	38.57
2	0	1	−1	34.19
3	−1	0	0	36.34
4	−1	−1	−1	33.67
5	1	0	−1	36.52
6	0	0	0	38.49
7	0	−1	−1	37.12
8	0	1	1	35.47
9	0	0	0	37.89
10	0	0	0	38.65
11	1	0	1	37.35
12	0	0	0	38.98
13	1	−1	0	36.37
14	0	−1	1	35.28
15	1	1	0	33.98
16	−1	0	1	34.99
17	−1	1	0	32.65

根据试验结果，利用 Design Expert 7.0 软件对试验数据(表 2)进行回归拟合，得到多项式响应面回归模型：

$$Y=38.52+0.82X_1-0.77X_2-0.13X_3-0.34X_1X_2+0.55X_1X_3+0.78X_2X_3-1.78X_1^2-2.57X_2^2-0.43X_3^2$$

对所得模型进行方差分析，结果见表 3。由表 3 可知，总模型 $P<0.000\ 1$，表明该模型高度显著，失拟项不显著($P=0.595\ 6>0.05$)，表明模型选择正确。相关系数 $R^2=0.984\ 1$，表明预测值与实测值之间具有较好的相关性，校正相关系数 $R^2_{Adj}=0.963\ 6$，说明响应面 96.36%的变化可以由此模型解释，拟合程度较好，实验误差小，可用来分析和预测固态发酵培养基最佳营养因子水平。而且，由表 3 中所测系数及对应的 P 值表明，方程的一次项显著，其中 X_1、X_2 项极显著；二次项极显著，其中 X_{12}、X_{22} 项极显著，X_{32} 项显著；交互项中除 X_1 和 X_2 交互作用不显著外，其他交互项的影响也是显著的，说明因素之间的交互作用很明显，因此可以用此回归方程代替各组试验对试验结果进行分析。

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the response surface quadratic model

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	59.55	9	6.62	48.12	<0.000 1**
X_1	5.40	1	5.40	39.24	0.000 4**
X_2	4.73	1	4.73	34.38	0.000 6**
X_3	0.15	1	0.15	1.06	0.337 4
X_1X_2	0.47	1	0.47	3.41	0.107 2
X_1X_3	1.19	1	1,19	8.64	0.021 7*
X_2X_3	2.43	1	2.43	17.70	0.004 0**
X_1^2	13.37	1	13.37	97.21	<0.000 1**
X_2^2	27.74	1	27.74	201.73	<0.000 1**
X_3^2	0.79	1	0.79	5.77	0.047 3*
残差	0.96	7	0.14		
失拟项	0.33	3	0.11	0.71	0.595 6
纯误差	57.25	4	0.16		
总方差	5 893.18	16			
		$R^2=0.984\ 1$	$R^2_{Adj}=0.963\ 6$		

注：*P < 0. 05，**P < 0. 01

利用 Design Expert7.0 软件对回归模型进行响应面分析得到各响应面 3D 分析图，见图 5。从图 5 可以看出，各因素对提高水飞蓟粕粗蛋白含量的影响顺序为：葡萄糖(X_1)>尿素(X_2)>磷酸二氢钾(X_3)，其中磷酸二氢钾对试验影响不显著。通过对模型的拟合分析以及单因素试验结果，预测出最佳培养基组成为：水飞蓟粕:麸皮:玉米粉(质量比)为 8:1.5:0.5，添加质量分数 1.11%葡萄糖、1.40%尿素和 0.56%磷酸二氢钾。响应面模型在此条件下预测的发酵产物粗蛋白质质量分数为 38.70%。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

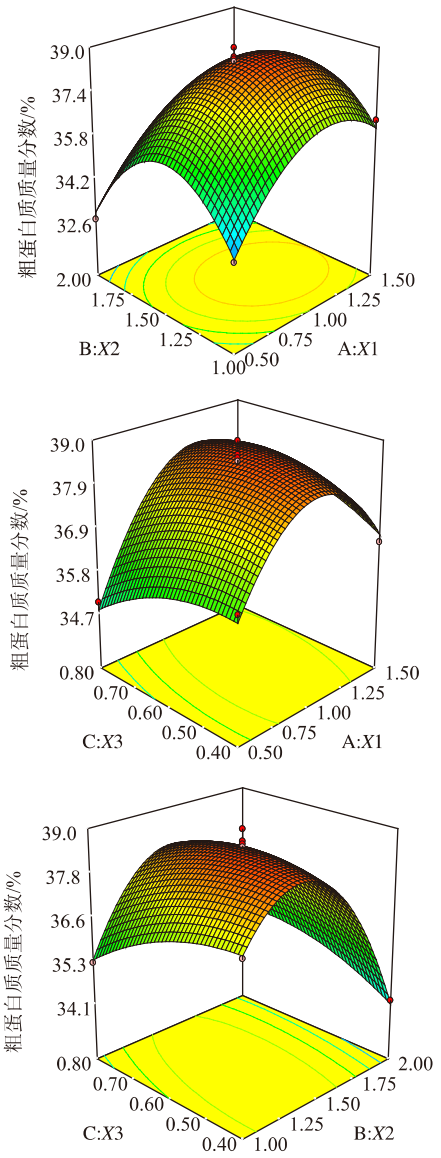


图 5　葡萄糖(X_1)、尿素(X_2)和磷酸二氢钾(X_3)对粗蛋白质质量分数影响的响应面分析图

Fig. 5　Response surface plot for the effects of glucose (X_1), urea (X_2) and potassium dihydrogen phosphate (X_3) on crude protein content

2.3　验证试验

按照响应面优化得到的最佳培养基条件，进行验证试验，所得发酵后水飞蓟粕粗蛋白质质量分数为38.43%，与理论预测值相差 0.27%，说明该模型能较好地预测发酵情况。

2.4　体外消化率测定

样品中蛋白质的体外消化率采用胃蛋白酶-胰蛋白酶两步消化法测定，发酵后水飞蓟粕粗蛋白体外消化率为 88.92%，较未发酵水飞蓟粕粗蛋白体外消化率(70.12%)有显著提高，说明水飞蓟粕蛋白质在发酵过程中被水解为小分子蛋白或多肽，甚至氨基酸，更易被消化吸收，因而营养价值得到提高。顾赛红等[9]利用黑曲霉 PES 固态发酵使棉籽粕粗蛋白体外消化率提高 13.11%。该结果与文献报道一致，混菌固态发酵能够明显的提高水飞蓟粕蛋白质的体外消化率。

3　结　语

固态发酵培养基的最佳组成：水飞蓟粕:麸皮:玉米粉(质量比)为 8:1.5:0.5，添加质量分数 1.11%葡萄糖、1.4%尿素和 0.56%磷酸二氢钾，发酵水飞蓟粕粗蛋白质质量分数和体外消化率分别可达 38.43%和 88.92%。该工艺稳定可行，为水飞蓟粕固态发酵生产蛋白质饲料提供了一定的理论依据。

参考文献：

[1] 董岩，孔春燕. 水飞蓟有效成分的提取研究[J]. 中成药，2010，32(7)：1225-1228.
DONG yan，KONG Chun-yan. Study on extraction of active ingredients of milk thistle [J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**，2010，32(7)：1225-1228.(in Chinese)

[2] M Angeles Sánchez-Sampedro，Rafael Peláez，Purificación Corchete. An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of Silybum marianum (L.)Gaernt[J]. **Carbohydrate Polymers**，2008，71(4)：634-639.

[3] 刘洪玲. 水飞蓟素的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药，2008，23-25.
LIU Hong-ling. Progress of chemical composition and pharmacological effects of Silymarin [J]. **Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy**，2008，23-25.(in Chinese)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[4] 孙艳辉,董英. 水飞蓟粕总黄酮提取工艺的优化[J]. 粮油加工,2008(1):75-77.
SUN Yan-hui,DONG Ying. Extraction process optimization of total flavonoids of milk thistle meal [J]. **Cereals and Oils Processing**,2008(1):75-77.(in Chinese)
[5] 孙艳辉,董英,齐丽丽. 超声辅助提取水飞蓟粕蛋白[J]. 粮油加工,2007(4):58-60.
SUN Yan-hui,DONG Ying,QI Li-li. Ultrasonic assisted extraction of protein of milk thistle meal [J]. **Cereals and Oils Processing**,2007(4):58-60.(in Chinese)
[6] 王卫国,邓金明,廖再生. 饲料粉碎粒度与蛋白质消化率的体外消化试验研究[J]. 粮食与饲料工业,2000(11):16-19.
WANG Wei-guo,DENG Jin-ming,LIAO Zai-sheng. A trial study on the relationship between particle size of feed ingredients and digestibility of protein in vitro method[J]. **Cereal & Feed Industry**,2000(11):16-19.(in Chinese)
[7] 顾赛红,孙建义,李卫芬. 黑曲霉 PES 固体发酵对棉籽粕营养价值的影响[J]. 中国粮油学报,2003,18(1):70-73.
GU Sai-hong,SUN Jian-yi,LI Wei-fang. The nutritional value of cottonseed meal fermented by A niger [J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,2003,18(1):70-73.(in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 国际生物物理学会第 57 届年会
会议名称(英文): Biophysical Society 57th Annual Meeting
所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学,生物技术与生物工程
开始日期: 2013-02-02 **结束日期:** 2013-02-06
所在国家: 美国 **具体地点:** Pennsylvania Convention Center
主办单位: Biophysical Society
联系人: Biophysical Society **联系电话:** 240-290-5600
会议网站: http://www.biophysics.org/Meetings/AnnualMeeting/tabid/85/Default.aspx
会议背景介绍: The Annual Meeting is held each year in February or March. With over 6,000 attendees, the meeting is the largest gathering of biophysicists around the world. More than 3,500 abstracts are submitted each year, which are programmed into poster and platform sessions.

The meeting includes Symposia, Workshops, Minisymposia, Subgroup programs, and the National Lecture, as well as Educational Exhibits, Exhibitor Presentations, and Committee Events.

会议名称(中文): 动物营养学国家重点实验室 2013 年学术年会
所属学科: 动物食品科学
开始日期: 2013-01-18 **结束日期:** 2013-01-20
所在城市: 北京市 东城区 **具体地点:** 北京世纪金源大饭店
主办单位: 动物营养学国家重点实验室
联系人: 吴莹莹
联系电话: 010-62816076 13810190305 **传真:** 010-62819432
E-MAIL: sklan2011@163.com
会议网站: http://www.caas.net.cn/caasnew/ggfw/kyxx/67431.shtml
会议背景介绍: 为促进动物营养与饲料科学领域国内外学术交流,发挥动物营养学国家重点实验室和农业部动物营养与饲料学学科群重点实验室的"基地和窗口作用",增进研究机构之间的交流与合作,动物营养学国家重点实验室定于 2013 年 1 月 18~20 日在北京世纪金源大饭店召开"动物营养学国家重点实验室 2013 年学术年会(SKLAN 2013)"。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net