混菌固态发酵辣木粕的营养价值和功能特性

邢君梅， 张重权， 王有琼， 马李一*
（中国林业科学研究院 高原林业研究所，云南 昆明 650224）

摘要： 辣木粕（moringa seed meal，MSM）是辣木籽榨完油后的剩余物，多菌种固态发酵（multi-strain solid state fermentation，MSSF）具有良好的稳定性，能够提高 MSM 的营养价值和功能特性，使其具有制备抗氧化肽和活性高蛋白质食品的潜力。作者采用 4 株菌种对 MSM 进行平板点种初筛和混菌发酵复筛，筛选出最适发酵菌种。通过单因素和响应面实验优化了发酵条件，分析了发酵辣木粕（fermented moringa seed meal，FMSM）的理化特性、营养价值和功能特性。结果表明，米曲霉和地衣芽孢杆菌组合为最佳发酵菌种。最优发酵条件为：发酵时间 5.22 d、料液质量体积比 1 g:1.56 mL、pH 7.52、温度 30 ℃、接种体积分数 9%，获得最大预测值水解度（degree of hydrolysis，DH）为 29.60%。与 MSM 相比，FMSM 营养素如粗蛋白、多肽和总氨基酸的质量分数显著增加，而粗纤维（CF）、单宁和植酸的质量分数显著降低。扫描电子显微镜（SEM）分析发现，MSSF 破坏了 MSM 的表面结构，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）发现大分子蛋白质均被降解。通过对 DPPH·清除率、$ABTS^{+}$·清除率、还原能力的测定，表明 MSSF 能够显著提高辣木粕的抗氧化活性。

关键词： 辣木粕；固态发酵；混菌发酵；营养成分；理化性质；抗氧化活性
中图分类号：TS 201　**文章编号：**1673-1689(2024)05-0026-11　**DOI：**10.12441/spyswjs.20211227002

Exploring the Nutritional Value and Functional Characteristics of Moringa Seed Meal by Mixed Bacteria Solid-State Fermentation

XING Junmei， *ZHANG Zhongquan*， *WANG Youqiong*， *MA Liyi**
(Plateau Forestry Research Institute, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China)

Abstract: Moringa seed meal (MSM) is the residual product after oil extraction from *Moringa oleifera* seed. Multi-strain solid-state fermentation (MSSF) has good stability and can improve the nutritional value and functional characteristics of MSM, making it potential for the preparation of antioxidant peptides and active high-protein foods. In this study, four microbial strains were used for the primary screening of MSM through plate diffusion assay and the secondary screening through mixed-culture fermentation, in order to screened out the most suitable fermentation microbial strains. The fermentation conditions were optimized through single-factor experiment and response surface experiment, the physicochemical characteristics, nutritional value, and functional characteristics of fermented moringa seed meal (FMSM) were analyzed. The results showed that the combination of

收稿日期： 2021-12-27　**修回日期：** 2022-03-28
基金项目： 国家“十三五”重点研发计划项目（2017YFD060130602）。
* **通信作者：** 马李一（1963—），男，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要从事林产品生物资源与利用研究。E-mail: maliyi@126.com

Aspergillus oryzae and *Bacillus licheniformis* was the best fermentation strain. The optimal fermentation conditions were a fermentation time of 5.22 d, a solid-liquid ratio of 1 g:1.56 mL, a pH of 7.52, a temperature of 30 ℃, and an inoculum volume of 9%, yielding a maximum predicted degree of hydrolysis (DH) of 29.60%. Notably, compared to unfermented MSM, FMSM showed a significant increase in the content of nutrients such as crude protein, peptides, and total amino acids, while the content of crude fiber (CF), tannins, and phytic acid significantly reduced. Observation and analysis using scanning electron microscope(SEM) showed that MSSF destroyed the surface structure of MSM. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) demonstrated the degradation of macromolecular proteins. By assessing the clearance rates of DPPH·, $ABTS^{+}$·, and reducing power, it was demonstrated that MSSF could greatly improve the antioxidant activity of moringa seed meal.

Keywords: moringa seed meal, solid-state fermentation, mixed-bacteria fermentation, nutritional components, physicochemical properties, antioxidant activity

辣木(*Moringa oleifera* Lam.)是辣木科辣木属植物,每年每公顷产 24 t 辣木籽[1]。辣木籽营养价值极高,其中总糖质量分数为 6.90%~9.50%,蛋白质质量分数为 36.20%~38.70%,脂肪质量分数为 33.80%~38.20%,钾质量分数为 0.52%~0.62%,钙质量分数为 0.10%~0.14%[2]。辣木籽常用来提取辣木油,提完油之后会剩余大量的辣木粕,辣木粕中蛋白质质量分数(32.00%~62.80%)高于辣木籽中蛋白质质量分数(18.60%~37.20%),有望成为植物蛋白质的重要补充来源[3-4]。然而,辣木粕由于抗营养因子的存在、适口性差、消化不良、不利于消化吸收的大分子蛋白质等因素限制了其应用。

为了有效利用辣木粕,研究者采用酶水解、化学方法和微生物发酵等方法制备功能性活性多肽来提高其营养价值,其中酶水解法成本较高,化学方法容易破坏其活性,且容易造成环境污染[5],因此微生物发酵技术被认为是最适合的方法。微生物中丰富的酶系不仅可以提高蛋白质的吸收率和营养价值,还可以改善风味,提高其生物活性[6]。固态发酵是一种微生物在固体和潮湿的基质上生长的过程,这些基质作为营养物的来源,可促进微生物的生长。与液态发酵相比,固态发酵具有操作简单易控制、适合真菌生长等优点[7]。研究表明,混菌发酵通常优于单菌发酵,混菌发酵菌种能产生复合蛋白酶,更有利于蛋白质的降解[8]。目前国内外很多针对核桃饼粕、花生粕、菜籽粕、棉籽粕、豆粕等多种植物饼粕进行多菌种固态发酵的研究,发现固态发酵能够降低植酸、单宁、硫苷、棉酚等抗营养因子的含量,并增加蛋白质、氨基酸、多肽的含量,提高其营养价值,可制备具有降血压、解酒、抗氧化活性的功能食品[9-12],但目前有关辣木粕固态发酵的报道较少[13-14]。作者开发了米曲霉和地衣芽孢杆菌混合发酵辣木粕的新工艺,能够提高辣木粕的抗氧化活性;研究了发酵产物的营养物质和抗营养因子(氨基酸、粗纤维、水分、植酸、单宁等)的变化;发酵产物的蛋白质消化性能;发酵产物的微观结构以及蛋白质相对分子质量的变化。

作者以米曲霉、黑曲霉、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌固态发酵辣木粕。以水解度和 DPPH·清除率为指标,挑选合适发酵菌种,优化发酵条件,并对发酵产物的理化性质、营养成分、抗氧化活性进行分析,为制备辣木粕抗氧化肽以及高蛋白质食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣木籽:产自云南元阳;枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、米曲霉、黑曲霉:中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);牛血清蛋白、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2 气联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS):美国 Sigma 公司;过硫酸钾、三氯化铁、铁氰化钾、三氯乙酸、氢氧化钠、无水乙醇等:均为分析纯,国药集团。

1.2 仪器与设备

紫外分光光度计：上海菁华科技仪器有限公司；氨基酸分析仪：英国 Biochrom 公司；纤维素测定仪、全自动凯氏定氮仪：美国 FOSS 公司；SEM MIRA4：泰思肯(中国)有限公司；全自动高压灭菌锅：SANYO 仪器设备公司；台式离心机：贝克曼库尔特公司；全自动酶标仪 CERES900：美国赛默飞公司；数显恒温水浴锅：北京永光明医疗仪器厂。

1.3 菌种培养基制备

枯草芽孢杆菌培养基：蛋白胨 5.0 g，牛肉浸取物 3.0 g，NaCl 5.0 g，琼脂 15.0 g，蒸馏水 1.0 L，调至 pH 7.0；地衣芽孢杆菌培养基：牛肉膏 10.0 g，蛋白胨 10.0 g，葡萄糖 10.0 g，NaCl 5.0 g，琼脂 15.0~20.0 g，蒸馏水 1.0 L，调至 pH 7.0；黑曲霉培养基：质量分数 5%麦芽汁培养基；米曲霉培养基：PDA 培养基。

1.4 菌悬液的制备

取已培养好的各菌种，加入适量的无菌水，洗脱孢子并制成孢子悬液，用无菌水调整孢子浓度为 3×10^8 CFU/mL。将菌悬液接种至液体培养基，培养至对数生长期，再次调节至孢子浓度为3×10^8 CFU/mL，作为发酵培养液备用。

1.5 平板点种初筛

称取辣木粕 500 g，琼脂 15 g，加入 1 L 蒸馏水，121 ℃灭菌 20 min，制得辣木粕平板。将枯草芽孢杆菌+黑曲霉、地衣芽孢杆菌+黑曲霉、枯草芽孢杆菌+米曲霉、地衣芽孢杆菌+米曲霉、黑曲霉+米曲霉、枯草芽孢杆菌+地衣芽孢杆菌等 6 个菌种组合按照对称点接入平板，在 30 ℃恒温培养箱中发酵 5 d，观察菌种生长状态。

1.6 混菌发酵筛选

取适量辣木粕于锥形瓶中，加入 4 倍体积的蒸馏水，用 8 层纱布封口，灭菌后按体积比 1:1 接入不同菌种组合，恒温培养箱中培养 5 d。取出发酵产物加入适量蒸馏水，20 ℃超声 2 h，然后在 4 ℃、8 000 r/min 离心 20 min，上清液定容至 50 mL。将上清液煮沸 10 min 灭酶，制得发酵产物液备用，测定蛋白质水解度(DH)和 DPPH·清除率。将发酵后的 MSM 在 50 ℃的恒温干燥箱中干燥 24 h，粉碎制备 FMSM 干燥粉备用，测定其他指标。

1.7 发酵条件优化

1.7.1 单因素实验 采用控制变量法，以蒸馏水为溶剂，固定料液质量体积比 1 g:4 mL、发酵时间 5 d、pH 7.5、发酵温度 30 ℃、接种体积分数 10%作为单因素实验条件，以 DH 和 DPPH·清除率为测定指标，进一步考察发酵时间(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d)，料液质量体积比(1 g:1.0 mL、1 g:1.5 mL、1 g:2.0 mL、1 g:2.5 mL、1 g:3.0 mL、1 g:3.5 mL、1 g:4.0 mL)，pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)，发酵温度(24、27、30、33、36 ℃)，接种体积分数(5%、7%、9%、11%、13%、15%、17%)等因素对发酵效果的影响。

1.7.2 响应面实验 根据单因素实验结果，设计 Box-Behnken 响应面实验，因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 响应面实验设计

Table 1 Box -Behnken response surface experimental design

水平	因素		
	A 发酵时间/d	*B* pH	*C* 料液质量体积比
−1	4	7.0	1 g:1.0 mL
0	5	7.5	1 g:1.5 mL
1	6	8.0	1 g:2.0 mL

1.8 分析方法

1.8.1 发酵前后指标的测定 茚三酮比色法[15]测定产物的水解度，根据标准曲线：$y=2.569\ 9x-0.525\ 4$，拟合系数 $R^2=0.999\ 8$，将发酵产物稀释至质量浓度为 0.25~0.50 mg/mL，计算 DH；采用双缩脲法测多肽[16]，称取 0.20 g 发酵产物，加入 8 mL 质量分数10%的 TCA，超声提取 30 min，离心制备上清液备用，根据标准曲线 $y=0.014\ 7x+0.005\ 6$，$R^2=0.997\ 5$，稀释样品至 3~9 mg/mL，计算多肽得率；根据 GB 5009.124—2016 采用氨基酸分析仪进行氨基酸分析；根据 GB 5009.5—2016 采用全自动凯氏定氮仪进行粗蛋白质测定；根据 GB 5009.3—2016 采用水分测定仪进行水分的测定；根据 GB 5009.4—2016 进行灰分的测定；根据 GB 5009.88—2014 采用纤维素测定仪进行粗纤维的测定；根据DB 12/T 847—2018 进行总糖和还原糖的测定，通过标准曲线 $y=0.683\ 4x-0.289\ 6$，$R^2=0.995\ 2$，计算总糖和还原糖的质量分数；根据 GB 5009.153—2016 进行植酸测定，通过标准曲线 $y=-0.564\ 9x+0.226\ 7$，$R^2=0.998\ 8$，计算得到植酸的质量分数；根据 GB/T 27985—2011 测定单宁，通过标准曲线 $y=0.112\ 4x-0.002\ 4$，$R^2=0.995\ 8$，计算单宁的质量分数。蛋白质消化率根据 Shi 等[17]的方法测定。

1.8.2 抗氧化活性的测定 称取 0.20 g FMSM,加入 8 mL 甲醇,超声 30 min,离心得到上清液备用。测定多肽质量浓度后,以梯度稀释法测定抗氧化活性。还原能力的测定参照田旭静[18]的方法,$ABTS^{+}\cdot$的清除能力的测定参照文献[19],DPPH·的清除能力的测定参照文献[20]。

1.8.3 扫描电镜观察显微结构 扫描电镜的样品置于铝短柱上,并涂上金。用场发射扫描电子显微镜在 400 倍、1 500 倍和 4 000 倍观察标本,并在 25 kV 高真空模式下拍摄显微照片。

1.8.4 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量 采用 SDS-PAGE 对 MSM 和 FMSM 中的蛋白质相对分子质量进行测定,参照文献[21]并稍加修改。称取 0.1 g 样品悬浮于 1.5 mL 蛋白质裂解液(含 0.1 g/dL 十二烷基硫酸钠、5 mmol/L 二硫苏糖醇和 5 μg/mL 蛋白酶抑制剂)。提取 40 min 后,在 4 ℃、8 000 r/min 离心 15 min,上清液用丙酮进行沉淀,然后进行冷冻干燥。将约 20 μg 蛋白质加载到 12 g/dL SDS-PAGE 分离胶、5 g/dL 的浓缩胶上,80 V 电压分离 20 min,120 V 电压分离 1 h。电泳结束后,用考马斯亮蓝 G250 对凝胶过夜染色,并用脱色液脱色,最后拍照。

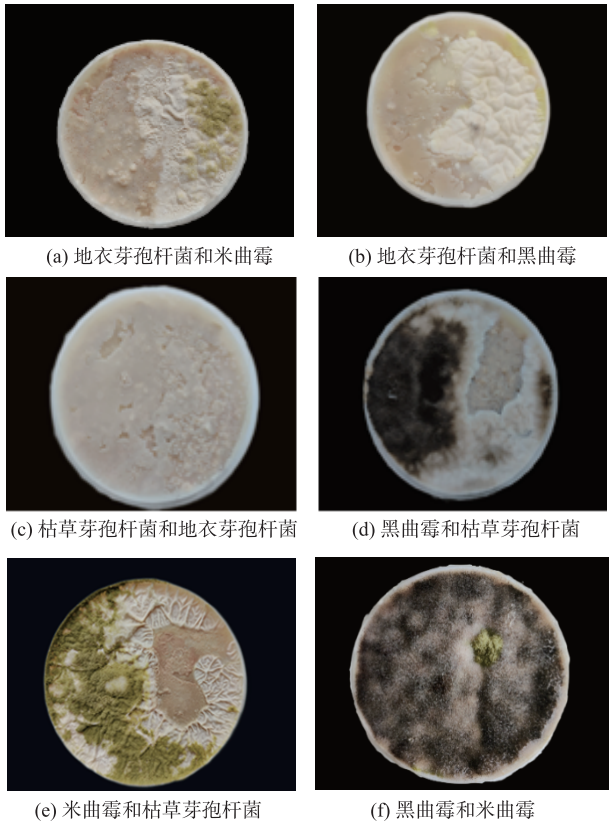
1.9 数据处理以及分析

实验数据是 3 组平行实验的均值±标准差,采用 SPSS 软件进行数据分析计算及 OriginPro8 绘图。

2 结果与分析

2.1 平板点种初筛

在 30 ℃培养条件下,观察菌种在辣木粕平板上的生长情况,发现不同的菌落组合呈现不同的生长形态,见图 1。菌落的形态特征见表 2,大致可分为两类:Ⅰ类为 2 种菌种均能良好生长,且菌落扩展延伸较快,在 2 个菌落相接处紧密接触在一起;Ⅱ类为组合中的一种生长相对较慢,逐渐被另一种不断扩大的菌落所包围。由图 1 和表 2 可知,地衣芽孢杆菌与黑曲霉、米曲霉、枯草芽孢杆菌之间均没有强的拮抗作用,在一起能共存,呈现出较好的相容性;枯草芽孢杆菌与 2 种霉菌之间存在较强的拮抗作用,不能共存;米曲霉和黑曲霉之间有较强的拮抗作用,不能共存。因此,选取能相容的 3 组菌种组合进行混菌发酵筛选实验。



(a) 地衣芽孢杆菌和米曲霉 (b) 地衣芽孢杆菌和黑曲霉

(c) 枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌 (d) 黑曲霉和枯草芽孢杆菌

(e) 米曲霉和枯草芽孢杆菌 (f) 黑曲霉和米曲霉

图 1 平板混合培养特征

Fig. 1 Characteristics of plate diffusion assay cultured by mixed

表 2 菌种相容性比较

Table 2 Comparison of strain compatibility

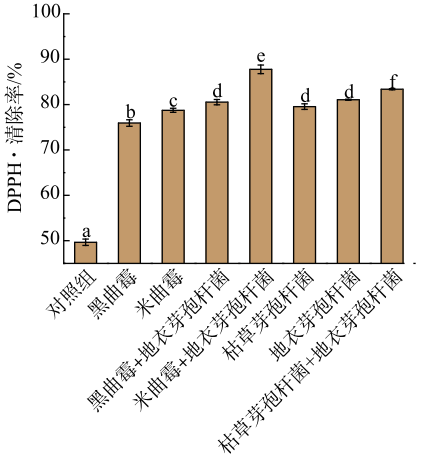
点种组合	相容性	所属类型
地衣芽孢杆菌+米曲霉	**	Ⅱ
地衣芽孢杆菌+黑曲霉	**	Ⅱ
枯草芽孢杆菌+地衣芽孢杆菌	**	Ⅱ
米曲霉+枯草芽孢杆菌	*	Ⅰ
黑曲霉+枯草芽孢杆菌	*	Ⅰ
黑曲霉+米曲霉	*	Ⅰ

注:** 为相容,* 为不相容。

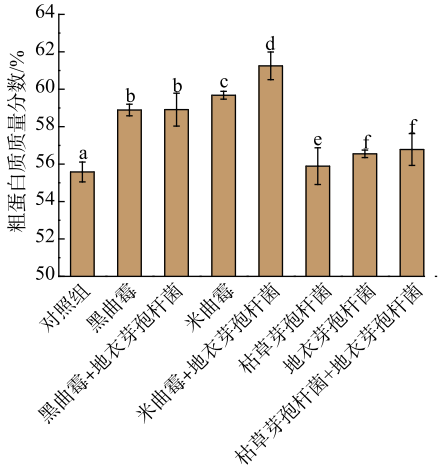
2.2 混菌发酵筛选实验

选取 2.1 中筛选的 3 组混菌以及单菌株进行固态发酵。由图 2 可知,菌种发酵效果均比对照组明显。混菌发酵效果显著优于单菌发酵,其中米曲霉和地衣芽孢杆菌组合发酵效果最好,发酵产物呈现焦糖色,其 DH、DPPH·清除率、粗蛋白质质量分数、多肽质量分数分别为 17.56%、89.01%、61.25%、9.25%。米曲霉属于真菌,呈黄绿色,产蛋白酶能力较强,主要产中性蛋白酶,发酵过程中能产生大量

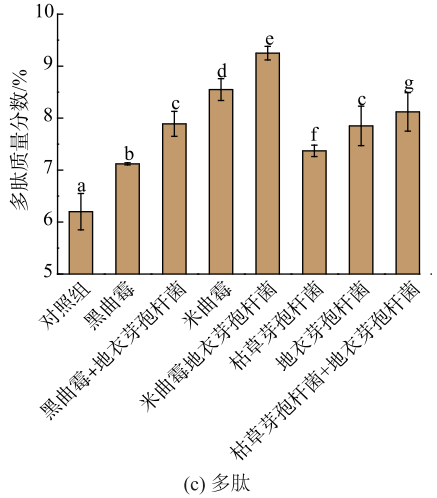
的菌体蛋白。地衣芽孢杆菌为好氧自养型,菌落大,呈暗白色,主要产碱性蛋白酶。两者混合发酵时,产生的复合蛋白酶有利于促进大分子蛋白质的降解,蛋白质水解度达到最高,得到较多的粗蛋白质和多肽,有较强的抗氧化活性,发酵 MSM 效果最佳。



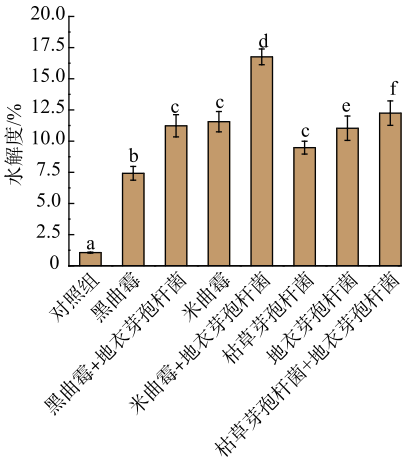
(a) DPPH·



(b) 粗蛋白质



(c) 多肽



(d) 水解度

相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异(P<0.05)。

图 2 不同菌种组合发酵对 DPPH·清除率、粗蛋白质、多肽和水解度的影响

Fig. 2 Effects of different strain combinations on DPPH· clearance rate, crude protein, polypeptide and DH

2.3 单因素实验

由图 3(a)可知,DH 和 DPPH·清除率在发酵 0~5 d 时呈线性增加,5 d 之后变化趋于平缓,无显著性变化(P>0.05)。其原因是 MSM 与菌种在 5 d 时已将底物中大部分的营养物质消耗且菌种进入衰退期。因此选择 5 d 为 MSM 的最佳发酵时间,其 DH 为 21.64%,DPPH·清除率 93.06%。

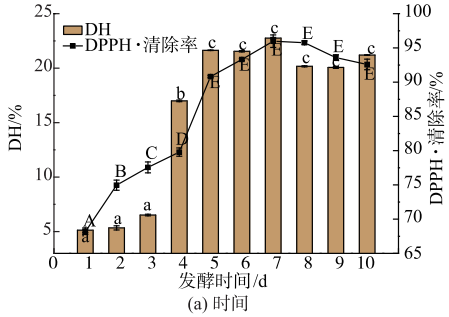
由图 3(b)可知,料液质量体积比在 1 g:1.0 mL 至 1 g:1.5 mL 时,DH 和 DPPH·清除率逐渐增大,在 1 g:1.5 mL 至 1 g:4.5 mL 时逐渐减少,在 1 g:1.5 mL 时最大,主要原因是真菌和细菌对水分的要求不同。通常,真菌生长需要水分质量分数为 30%~60%,而细菌的生长和分生则需要水分质量分数为 60%[22]。基质中水分质量分数过低,培养基中营养物质不能充分溶解进而影响微生物对其吸收利用;而基质水分质量分数过大则导致培养基孔隙率降低,会造成缺氧,同样影响微生物的生长代谢[23]。因此选择 1 g:1.5 mL 为最适发酵料液比,其 DH 为 24.10%,DPPH·清除率 94.54%。

由图 3(c)可知,DH 和 DPPH·清除率在 pH 6.0~7.5 时逐渐增加,pH 7.5~8.5 时逐渐减小,在 pH 7.5 时最大。其原因是过酸或者过碱都会使影响菌种代谢和产蛋白酶的能力,因此只有在每个菌种的最适 pH 才能达到较好生长以及发酵效果。因此选

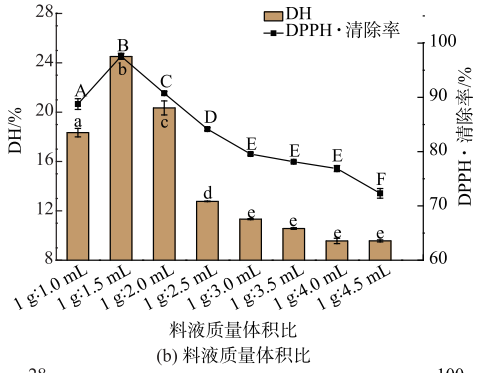
择 7.5 为 MSM 最适发酵 pH,其 DH 为 24.82%,DPPH·清除率 95.45%。

由图 3(d)可知,DH 和 DPPH·清除率在24~30 ℃逐渐增大,30~36 ℃逐渐减小,30 ℃最大。其原因在于温度是影响微生物存活和生长的重要因素之一,培养温度过高或过低都不利于菌株的生长,进而影响到发酵效果。因此选取 30 ℃为发酵温度,其 DH 为 26.76%,DPPH·清除率 96.31%。

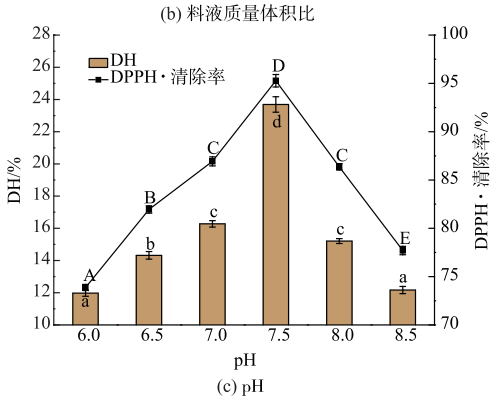
由图 3(e)可知,DH 和 DPPH·清除率在接种体积分数 3%~9%时逐渐增大,在接种体积分数 9%之后无显著性变化(P>0.05)。其原因是接种体积分数的增加可以缩短菌种的生长周期,但接种体积分数过大会导致培养基的营养物质过快消耗,同时引起溶氧不足,会影响菌种产酶和蛋白质的降解[24]。因此选择 9%为 MSM 的最适接种体积分数,其 DH 为 27.96%,DPPH·清除率 95.88%。



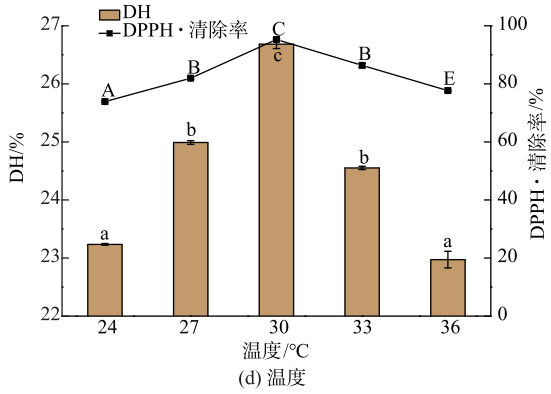
(a) 时间



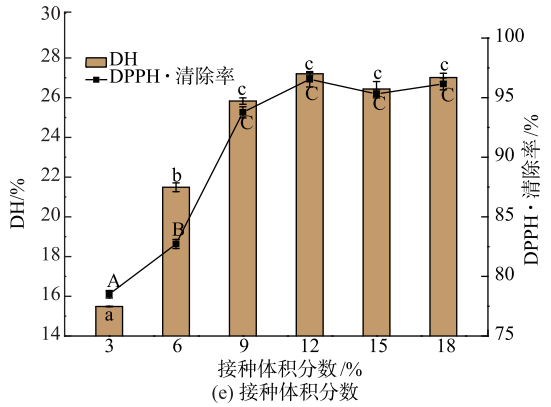
(b) 料液质量体积比



(c) pH



(d) 温度



(e) 接种体积分数

相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异(P<0.05)。

图 3 发酵时间、料液质量体积比、pH、温度、接种体积分数对水解度和 DPPH·清除率的影响

Fig. 3 Effects of fermentation time, temperature, solid-liquid ratio, pH, and inoculation amount on DH and DPPH· scavenging rate

2.4 响应面实验

2.4.1 响应面实验 选用 Design-Expert V8.0.6 优化辣木粕发酵条件,选取发酵时间、料液质量体积比、pH 进行三因素三水平的 Box-Benhnken 响应面实验,结果见表 3。

2.4.2 响应面实验的有效性及显著性分析 选用 Design-Expert V8.0.6 软件对响应面实验结果进行多元化回归方差分析,得到发酵时间(A)、料液质量体积比(B)、pH(C)的方差分析见表 4。由表 4 可知,响应面实验的回归模型为极显著(P<0.000 1),表明该模型可信。残差主要由随机误差产生的,通过检验虚拟项 P>0.005,说明未知因素对结果无影响,可对结果进行分析。同时实验模型性相关系数 R^2=0.964 3,说明实验有 96.43%的正确率,R^2_{Adj}=0.981 0,说明实验具有 98.10%的可信度,具有统计学意义。

表 3 响应面实验结果

Table 3 Response surface experiment result table

实验序号	发酵时间	料液质量体积比	pH	DH/%
1	0	0	0	29.40
2	−1	0	−1	21.28
3	0	0	0	29.89
4	0	0	0	24.09
5	0	−1	−1	22.60
6	1	1	0	23.22
7	−1	−1	0	21.65
8	0	0	0	25.01
9	1	−1	1	30.17
10	−1	0	1	25.85
11	0	−1	1	30.39
12	0	1	−1	25.26
13	1	0	−1	22.48
14	0	1	11	24.82
15	0	0	0	30.87
16	0	0	0	22.55
17	−1	0	−1	23.41

表 4 回归方程的方差分析

Table 4 Analysis of variance in regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	178.95	9	19.88	92.93	<0.000 1	***
A	0.85	1	0.85	3.95	0.087 1	
B	0.27	1	0.27	1.28	0.294 9	
C	5.62	1	5.62	26.29	0.001 4	**
AB	0.78	1	0.78	3.65	0.097 8	
AC	3.72	1	3.72	17.40	0.004 2	**
BC	3.04	1	3.04	14.21	0.007 0	**
A^2	28.39	1	28.39	132.70	<0.000 1	***
B^2	27.56	1	27.56	128.82	<0.000 1	***
C^2	93.29	1	93.29	436.03	<0.000 1	***
残差	1.50	7	0.21			
失拟项	0.28	3	0.10	0.31	0.817 0	
纯误差	1.21	4	0.30			
矫正总和	180.45	16				

注:*** 为极显著(P<0.001),** 为较显著(P<0.01)。

影响因素从大到小为:pH(C)>发酵时间(A)>料液比(B),其中 pH(C)对蛋白质水解度的影响较显著(P<0.01),发酵时间(A)和料液比(B)对蛋白质水解度的影响不显著(P>0.05)。模型中 AB(发酵时间和料液比)之间的相互影响不显著(P>0.05),AC(发酵时间和 pH)、BC(料液比和 pH)之间的相互影响表现为显著(P<0.01)。A^2、B^2、C^2 均表现为极显著,表明各因素之间不是简单的线性关系,而是具有交互作用[24]。通过分析得到多元回归方程:$DH=30.14+0.33A-0.19B-0.84C+0.87AB-0.96AC-0.44BC-2.60A^2-2.56B^2-4.70C^2$。

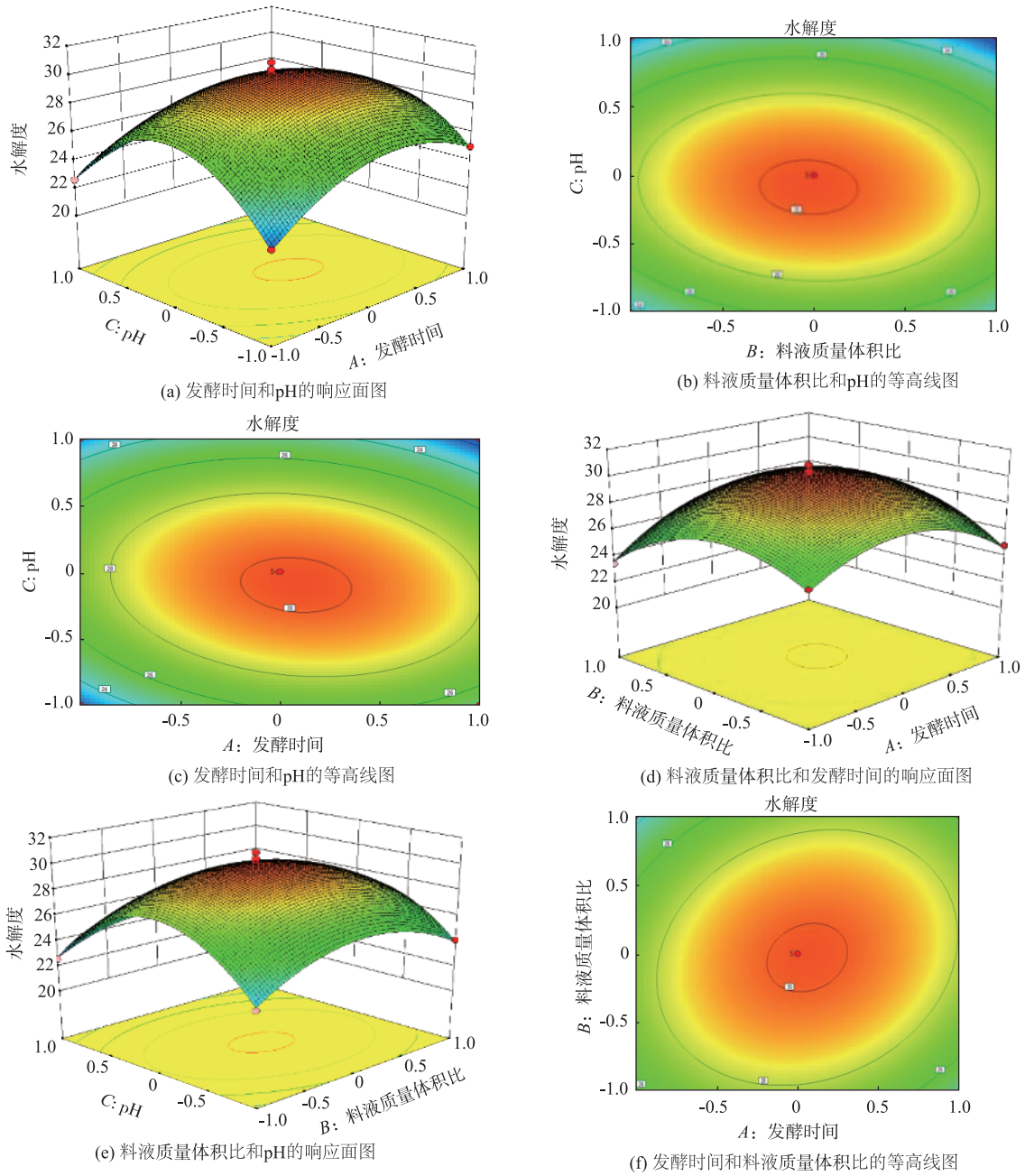
2.4.3 响应面及等高线分析结果 用 Design Expert V8.0.6 软件对响应面实验结果绘制出三维曲面图以及等高线图,见图 4。

曲面和等高线的形状不同,交互效应的强弱也不同。交互项的等高线图越近似椭圆形,且曲面图越陡峭,表明交互作用越强[25]。由图 4 的等高线图以及曲面图可以看出,在 3 组交互作用中,发酵时间和 pH 的交互作用最强,其次是料液质量体积比和 pH 值的交互作用,而发酵时间和料液比的交互作用不显著,这与表 4 显著性检验结果相符合。

通过模型预测在发酵时间 5.22 d、料液质量体积比 1 g:1.56 mL、pH 7.52 时,获得最大预测值 DH 为 29.60%。验证实验测得实际 DH 为(28.96±0.26)%,响应面实验预测结果可信度较高。

2.5 营养成分分析

表 5 列出了优化 MSSF 处理前后 MSM 的营养成分。与 MSM 相比,FMSM 增加了蛋白质、多肽、灰分、总氨基酸的质量分数。FMSM 中蛋白质、多肽、灰分、总氨基酸和必需氨基酸的质量分数分别为 MSM 的 121.9%、187.0%、123.7%、127.2%、132.0%,显著增加(P<0.05)。粗蛋白质质量分数的增多主要是由于发酵过程中碳水化合物的损失和菌体蛋白的形成;氨基酸和多肽质量分数的增多主要是由于菌种产生了大量的蛋白酶,这些蛋白酶分解了辣木粕的大分子蛋白质[26]。与 MSM 相比,FMSM 的蛋白质消化率为 MSM 的 146.5%,这是由于大分子的蛋白质降解成了易消化的小分子多肽和氨基酸,以及影响蛋白质消化吸收的抗营养因子的减少[27]。与 MSM 相比,FMSM 中的粗纤维、总糖、水分、还原糖、单宁和植酸质量分数为 MSM 的 50.96%、45.71%、82.81%、54.27%、22.62%、49.89%,显著降低(P<0.05)。因为菌种在生长过程中产生的植酸酶、单宁酶、纤维素



(a) 发酵时间和pH的响应面图
(b) 料液质量体积比和pH的等高线图
(c) 发酵时间和pH的等高线图
(d) 料液质量体积比和发酵时间的响应面图
(e) 料液质量体积比和pH的响应面图
(f) 发酵时间和料液质量体积比的等高线图

图 4　三维曲面图和等高线图

Fig. 4　Three-dimensional surface diagram and contour diagram

酶能够降低单宁、植酸、纤维素的质量分数,且菌种在生长过程中对还原糖和总糖进行分解利用,造成其质量分数降低。因此 MSSF 处理的 FMSM 提高了辣木的营养物质质量分数，降低了 MSM 的粗纤维和抗营养因子的质量分数。

2.6　MSM 和 FMSM 的扫描电镜分析

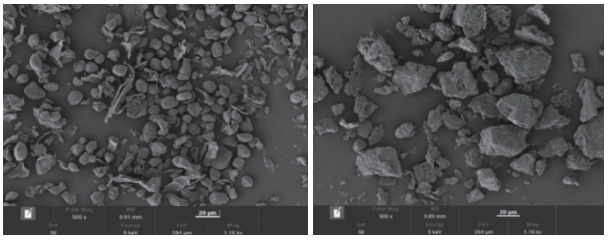
图 5 显示了在 500 倍、1 500 倍和 4 000 倍放大率下使用 SEM 获得的 MSM 和 FMSM 的微观结构。在 500 倍放大镜下，未发酵的 MSM 显示出相对完整的结构，呈现了独立均匀的圆形颗粒状；而在 FMSM 中观察到不规则形状和粗糙表面，呈现了块状,已无分散独立的颗粒状。在 1 500 倍镜下,MSM 的木质纤维素结构完整，颗粒上呈现多孔结构；FMSM 木质纤维素结构更加破碎,表面较为粗糙,已无完整的颗粒状。在 4 000 倍放大镜下,许多微生物附着在FMSM 的外部，木质纤维素的表面结构似乎部分断裂。

表 5 MSM 与 FMSM 的营养成分分析

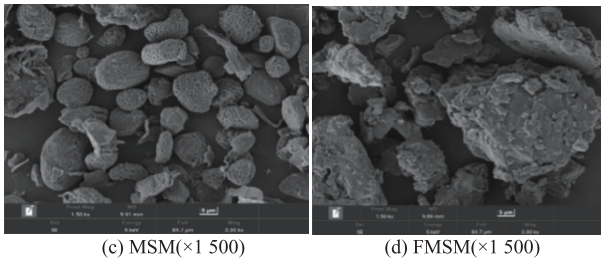
Table 5 Nutritional components analysis of MSM and FMSM

组分	MSM 质量分数/%	FMSM 质量分数/%	(FMSM:MSM)/%
粗蛋白质	55.55±1.21^a	67.72±4.40^b	121.9
多肽	6.15±0.67^a	11.50±0.78^b	187.0
水分	8.60±0.05^a	7.13±0.18^b	82.8
灰分	9.05±1.21^a	11.21±0.56^b	123.7
粗纤维	15.66±0.82^a	7.84±0.26^b	50.1
植酸	4.47±0.52^a	2.23±0.19^b	49.9
单宁	0.008 4±0.000 4^a	0.001 9±0.000 2^b	22.6
总糖	18.20±2.02^a	8.32±0.97^b	45.7
还原糖	10.06±0.55^a	5.46±0.22^b	54.3
天冬氨酸	1.75±0.55^a	2.10±0.24^b	119.7
苏氨酸*	0.94±0.18^a	1.28±0.11^b	136.2
丝氨酸	1.06±0.30^a	1.54±0.11^b	145.5
谷氨酸	5.61±1.34^a	7.62±0.72^b	136.0
甘氨酸	1.95±0.25	2.10±0.26	106.4
丙氨酸	1.05±0.11^a	1.50±0.28^b	142.4
胱氨酸	0.21±0.10	0.24±0.05	111.9
缬氨酸*	1.33±0.19^a	1.72±0.01^b	129.4
蛋氨酸*	0.92±0.33^a	1.21±0.15^b	131.7
异亮氨酸*	1.22±0.03^a	1.60±0.04^b	131.2
亮氨酸*	1.35±0.08^a	2.39±0.30^b	177.0
酪氨酸	1.15±0.01^a	1.35±0.35^b	117.5
苯丙氨酸*	1.62±0.11^a	2.14±0.0.28^b	131.8
组氨酸	0.93±0.02^a	1.42±0.46^b	153.0
赖氨酸*	1.30±0.11	1.11±0.33	85.4
精氨酸	4.27±0.69^a	5.68±0.78^b	133.0
脯氨酸	4.12±0.0.64	4.20±0.0.33	101.8

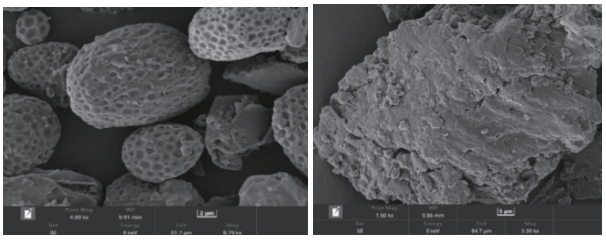
注:* 为必需氨基酸;相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异。



(a) MSM(×500) (b) FMSM(×500)



(c) MSM(×1 500) (d) FMSM(×1 500)



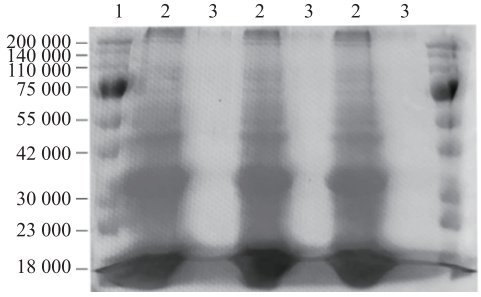
(e) MSM(×4 000) (f) FMSM(×4 000)

图 5 MSM 和 FMSM 的扫描电镜

Fig. 5 Scanning electron microscope observation of MSM and FMSM

2.7 SDS-PAGE 分析

如图 6 所示，从 MSM 中提取的主要蛋白质组分的相对分子质量为 42 000 以上;然而,这个大尺寸的蛋白质在 MSM 发酵后几乎被完全去除,FMSM 蛋白质条带主要出现在低相对分子质量区域（小于 18 000)。说明通过 MSSF 对 MSM 进行处理,将辣木粕中大分子的蛋白质降解成为小分子的氨基酸和多肽。



1. 蛋白质 marker;2. MSM 蛋白质条带;3. FMSM 蛋白质条带。

图 6 MSM 和 FMSM 蛋白质图谱的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of MSM and FMSM protein profiles

2.8 FMSM 抗氧化活性分析

米曲霉和地衣芽孢杆菌对 MSM 混合发酵能够显著提高 MSM 的抗氧化活性。由 7(a)可知,当多肽质量浓度达到 2 mg/mL 时,FMSM 的 DPPH·的清除率达到 95.56%，是 MSM 的 4.5 倍，其 EC_{50} 为 1.09 mg/mL;由图 7(b)可知,当多肽质量浓度达 2 mg/mL 时,FMSM 的 $ABTS^{+}$·的清除率达到 85.68 %,是 MSM 的 4.63 倍,其 EC_{50} 为 0.66 mg/mL;由图 7(c)可知，当多肽质量浓度达到 18 mg/mL 时,FMSM 的吸光度为 1.21(吸光度代表还原能力的大小),其还原能力是发酵前的 90 倍。其原因可能是在发酵过程中大分子的蛋白质降解成为小分子多肽,大分子

的蛋白质不具有活性,只有降解成为小分子多肽时才具有活性,这些小分子的肽显著增强了 FMSM 的抗氧化活性。

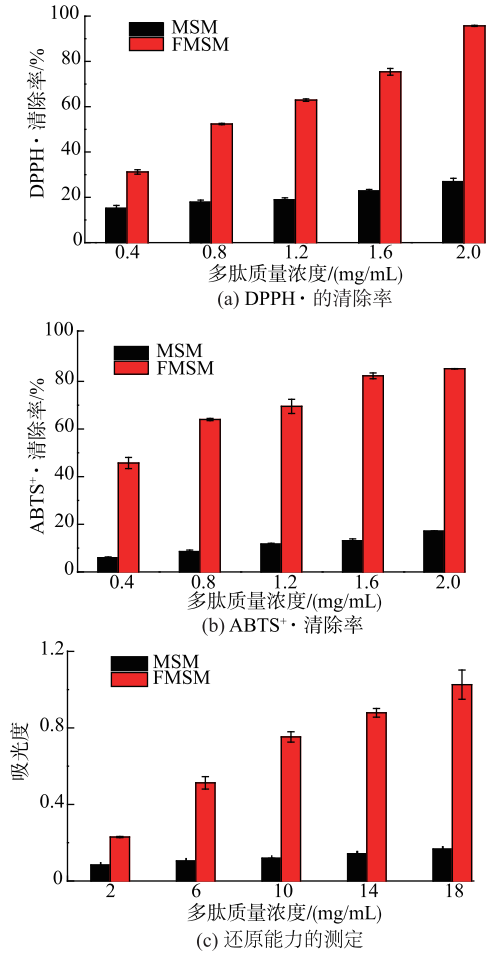


图 7　MSM 和 FMSM 抗氧化活性的测定

Fig. 7　Determination of antioxidant activity of MSM and FMSM

3 结　语

作者通过平板点种初筛选出地衣芽孢杆菌,其与枯草芽孢杆菌、米曲霉、黑曲霉能够相容,将其组合进行混菌发酵筛选实验,筛选出米曲霉和地衣芽孢杆菌为 MSM 的最适发酵菌种,其DH、DPPH·清除率、多肽质量分数和粗蛋白质质量分数分别达到 17.56%、89.01%、61.25%和 9.25%。使用 RSM 对发酵条件进行优化,最佳发酵条件为:5.22 d、料液质量体积比比 1 g:1.56 mL、pH 7.52、温度 30 ℃、接种体积分数 9%,此条件下获得最大预测值水解度 DH 为 29.60%,比预先优化的 FMSM 中的 DH 提高 1.68 倍。此外,发酵后的 FMSM 的粗蛋白质、多肽、灰分、总氨基酸、必需氨基酸质量分数显著增加(P<0.05)。FMSM 的粗纤维、总糖、水分、还原糖、单宁和植酸质量分数显著降低 (P<0.05)。通过 SEM 观察发现,MSM 的表面微观结构被破坏。通过 SDS-PAGE 观察到大分子蛋白质条带的降解。MSSF 也显著提高了 MSM 的抗氧化活性, 当质量浓度为 2 mg/mL 时,FMSM 的DPPH·的清除率达到 95.56%, 是 MSM 的 4.5 倍,EC_{50} 为 1.09 mg/mL; 当质量浓度为 2 mg/mL 时,FMSM 的 $ABTS^{+}$·的清除率达到 85.68%,是 MSM 的 4.63 倍,EC_{50} 为 0.66 mg/mL; 当质量浓度为 18 mg/mL 时,FMSM 的吸光度为 1.21, 还原能力是发酵前的90 倍。因此,MSSF 有助于提高 MSM 的营养价值,降低抗营养因子,显著提高了辣木粕的抗氧化活性,显示其在制备高蛋白质食品以及抗氧化肽方面的潜力。

参考文献:

[1] NDUBUAKU U M,NDUBUAKU T C N,NDUBUAKU N E. Yield characteristics of *Moringa oleifera* across different ecologies in Nigeria as an index of its adaptation to climate change[J]. **Sustainable Agriculture Research**,2014,3(1):95.

[2] 苏瑶,赵一鹤,冯武,等. 云南引种辣木籽营养成分分析与评价[J]. 西部林业科学,2015,44(4):142-145.
SU Y,ZHAO Y H,FENG W,et al. Analysis and evaluation on nutritional components of *Moringa oleifera* in Yunnan[J]. **Journal of West China Forestry Science**,2015,44(4):142-145. (in Chinese)

[3] FALOWO A B,MUKUMBO F E,IDAMOKORO E M,et al. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products:a review[J]. **Food Research International**,2018,106:317-334.

[4] CHEN R,WANG X J,ZHANG Y Y,et al. Simultaneous extraction and separation of oil,proteins,and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds[J]. **Food Chemistry**,2019,300:125162.

[5] 高庚渠,郭杰. 微生物发酵豆粕在养殖生产中的应用研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技,2020,45(1):10-13.
GAO G Q,GUO J. Research progress in application of microbial fermented soybean meal in animal production[J]. **Guangdong**

Journal of Animal and Veterinary Science,2020,45(1):10-13. (in Chinese)

[6] WANG Z H,ZHENG C Q,MA C Q,et al. Comparative analysis of chemical constituents and antioxidant activity in tea-leaves microbial fermentation of seven tea-derived fungi from ripened Pu-erh tea[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2021,142:111006.

[7] MELO S S F,SOUSA C A B,ALMEIDA A F,et al. Environmental and Microbial Biotechnology[M]. Singapore:Springer,2021:27-57.

[8] RUSSO P,ENGLEZOS V,CAPOZZI V,et al. Effect of mixed fermentations with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* on management of malolactic fermentation[J]. **Food Research International**,2020,134:109246.

[9] RITTHIBUT N,OH S J,LIM S T. Enhancement of bioactivity of rice bran by solid-state fermentation with *Aspergillus strains*[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2021,135:110273.

[10] ZHU Y,CHEN H,CHEN A,et al. Preparation and characteristics of small peptides from soybean residue by solid-state fermentation with *Paecilomyces militaris*[J]. **China Oils and Fats**,2019,44(12):86-91.

[11] WANG Z Q,CUI Y Y,LIU P Y,et al. Small peptides isolated from enzymatic hydrolyzate of fermented soybean meal promote endothelium-independent vasorelaxation and ACE inhibition[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2017,65(50):10844-10850.

[12] YAN L I,JIANG X,HOU C,et al. Study on free amino acid and short peptide fertilizer production by solid state fermented castor bean meal[J]. **Agricultural Biotechnology**, 2020,9(6):92-95.

[13] 郭志鹏,夏学森,黄文琪,等. 多菌种分步发酵提高辣木籽粕蛋白含量及酶活[J]. 中国酿造,2020,39(6):37-42.
GUO Z P,XIA X S,HUANG W Q,et al. Improving protein content and protease activity of *Moringa oleifera* seed meal by multi-strain step fermentation[J]. **China Brewing**,2020,39(6):37-42. (in Chinese)

[14] 郭志鹏. 发酵辣木籽粕饲料工艺及其生物活性研究[D]. 广州:华南理工大学,2020.

[15] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. 中国油脂,2000,25(6):176-177.
GUO X F. Determination of hydrolysis degree of protein[J]. **China Oils and Fats**,2000,25(6):176-177. (in Chinese)

[16] 王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 北京:中国农业出版社,2002:113-115.

[17] SHI H H,SU B,CHEN X Y,et al. Solid state fermentation of *Moringa oleifera* leaf meal by mixed strains for the protein enrichment and the improvement of nutritional value[J]. **PeerJ**,2020,8:e10358.

[18] 田旭静. 藜麦糠清蛋白的提取及多肽抗氧化性研究[D]. 太原:山西大学,2018.

[19] ARNAO M B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals:a practical case[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2000,11(11):419-421.

[20] MA Y K,WU Y Y,LI L H. Relationship between primary structure or spatial conformation and functional activity of antioxidant peptides from *Pinctada fucata*[J]. **Food Chemistry**,2018,264:108-117.

[21] SCHAGGER H,VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. **Analytical Biochemistry**,1987,166(2):368-379.

[22] RAY R C,BEHERA S S. Biotechnology of microbial enzymes[M]. Amsterdam:Elsevier,2017:43-79.

[23] 刘倩男. 苹果皮渣菌体蛋白饲料的制备及饲用有效性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2016.

[24] 徐聪聪. 固态发酵豆粕制备大豆抗氧化活性肽的研究[D]. 广州:暨南大学,2013.

[25] 徐萍. 蜂蛹多肽的制备、初步纯化及抗氧化活性研究[D]. 镇江:江苏大学,2018.

[26] 兰亚茹,黄硕,赵飞,等. 响应面法优化鹿茸胶原蛋白制备抗氧化肽的水解条件[J]. 过程工程学报,2020,20(1):91-98.
LAN Y R,HUANG S,ZHAO F,et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for antioxidant peptide preparation from velvet antler collagen by response surface methodology[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**,2020,20(1):91-98. (in Chinese)

[27] HONG K J,LEE C H,KIM S W. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals[J]. **Journal of Medicinal Food**,2004,7(4):430-435.

(责任编辑:李春丽)