

# 响应面优化黑曲霉和酿酒酵母发酵豆粕的条件

杨晓婷,徐力,田永强

(兰州交通大学 研究院,甘肃 兰州 730070)

**摘要:**以豆粕、麸皮和糖蜜为发酵原料,利用黑曲霉和酿酒酵母复合菌发酵生产饲料蛋白。首先利用单因素试验优化了豆粕蛋白发酵条件(接种量、温度和发酵时间)和发酵培养基成分(料水比、麸皮和糖蜜添加量),再利用响应面法进一步优化了发酵条件。优化结果为:装料量为 25 g(其中豆粕、麸皮和糖蜜分别为 90%、7%和 3%), $MgSO_4$  0.375 g,  $(NH_4)_2SO_4$  0.25 g, 尿素 0.25 g,  $K_2HPO_4$  0.25 g, 料水比 1:1, 菌液接种量 16%, 33.2℃ 发酵 86.6 h。优化后粗蛋白和真蛋白含量分别为 57.59%和 53.65%, 比优化前分别提高 17.42%和 24.59%;活菌数达到  $3.62 \times 10^9$  cfu/g;脲酶活性降低了 92.41%。经过优化的复合菌发酵豆粕可以提高豆粕的蛋白含量,有效地降解了抗原蛋白和营养抑制因子,提高了畜禽对豆粕的消化利用率,该发酵工艺可为发酵豆粕工业化生产提供优化依据。

**关键词:**豆粕;黑曲霉;酿酒酵母;固态发酵;响应面

**中图分类号:**TS201.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2020)05-0102-07

**DOI:** 10.13817/j.cnki.cyyep.2020.05.015

豆粕是大豆油脂加工的副产物,蛋白质含量高,必需氨基酸平衡<sup>[1]</sup>,适合于畜禽营养吸收,是一种优质廉价的植物源蛋白饲料,也是饲料行业的主要蛋白来源。目前由于动物蛋白鱼粉、骨粉缺乏,价格高昂,豆粕已成为饲料中动物蛋白的主要替代品<sup>[2-3]</sup>。但是豆粕中存在营养抑制因子(胰蛋白酶抑制因子、大豆抗原蛋白、血球凝集素等),如果直接将豆粕作为动物饲料原料,不仅对动物的消化吸收具有拮抗作用,也会影响饲料的消化利用率,并且影响动物的正常生长繁殖<sup>[4-5]</sup>。如果将豆粕利用益生复合菌发酵,既可以增加蛋白含量,又能够利用复合菌产生的蛋白酶将豆粕中营养抑制因子水解为小分子多肽和氨基酸,这样就可以提高豆粕蛋白饲料的消化利用率<sup>[6-7]</sup>。有研究用木霉和酵母菌复合发酵豆粕,粗蛋白含量增加 15.84%,胰蛋白

酶的抑制因子显著降低<sup>[8]</sup>。利用乳酸菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母发酵豆粕,粗蛋白和粗脂肪的含量分别提高了 13.48%和 18.18%,且游离氨基酸的含量提高显著,达到了 11.49%<sup>[9]</sup>。本研究采用食品发酵益生菌黑曲霉和酿酒酵母研究复合菌发酵豆粕,通过响应面设计对发酵条件和发酵底物进行了优化,分析了发酵终产物中抗营养因子降解率和小分子多肽含量,旨在探求豆粕复合菌发酵的最优条件,为工业化豆粕的生产提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 发酵原料 豆粕、麸皮和糖蜜来源于天水博亚饲料公司,豆粕粗蛋白含量 $\geq 46.0\%$ ;麸皮的粗蛋白含量 $\geq 15\%$ ;糖蜜的含糖量 $\geq 45\%$ 。

1.1.2 发酵菌株 黑曲霉(*Aspergillus niger*)购于中国工业微生物菌种保藏中心(41254)。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),保藏于兰州交通大学微生物工程实验室。

1.1.3 培养基 PDA 培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然,用于培养黑曲霉。

收稿日期:2020-04-04;修回日期:2020-09-25

基金项目:甘肃省科技重大专项(18ZD2NA005);甘肃省省级引导科技创新发展竞争性项目专项(2018ZX-11)

作者简介:杨晓婷(1993-),女,甘肃省武威人,硕士,助研。

E-mail:690769681@qq.com

田永强为通讯作者。

E-mail:tianyq@mail.lzjtu.cn

YPD 培养基:酵母提取物 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。用于培养酿酒酵母。

初始发酵培养基:装料量 25 g(其中 85% 豆粕、10% 麸皮、5% 糖蜜),  $MgSO_4$  0.375 g,  $(NH_4)_2SO_4$  0.25 g, 尿素 0.25 g,  $K_2HPO_4$  0.25 g, 料水比 1:1(物料以 25 g 计), 121 °C 灭菌 20 min。

## 1.2 试验方法

1.2.1 种子液制备 黑曲霉孢子液:将试管斜面黑曲霉菌种接种于 PDA 平板, 30 °C 培养 5 d, 灭菌双蒸水洗脱孢子, 双层纱布除去菌丝, 血球计数板计数确定孢子浓度, 使孢子浓度为  $0.8 \sim 1.2 \times 10^8$  个/mL。

酵母菌种子液:接种酵母菌于 50 mL YPD 液体培养基中, 28 °C 恒温摇床, 150 r/min 培养 24 h。

1.2.2 平板对峙实验 在同一 PDA 培养基上分别接种黑曲霉、酿酒酵母菌, 在 28 °C 培养 72 h, 观察相同条件下两种菌能否兼容<sup>[10]</sup>。

1.2.3 单因素实验 发酵培养基以豆粕为主, 添加 10% 的麸皮和 5% 的糖蜜, 料水比为 1:1, 再将两种发酵菌种按 1:1 混合, 按照 10% 的量接种, 28 °C 发酵 72 h, 测定粗蛋白含量作为指标, 分别考察菌液接种量(7%、10%、13%、16%、19%)、温度(28、30、32、34、36 °C)、发酵时间(48、60、72、84、96、108 h)、料水比(1:0.8、1:0.9、1:1、1:1.1、1:1.2)、麸皮添加量(6%、7%、8%、9%、10%)、糖蜜添加量(1%、2%、3%、4%、5%) 对豆粕发酵的影响。每个试验重复 3 次。

1.2.4 响应面设计 根据单因素试验优化的结果, 选择菌液接种量、温度和发酵时间 3 个因素, 以粗蛋白含量为响应值, 应用 design expert 8.0.6 里 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平试验<sup>[11-12]</sup>。每个试验 3 次重复。试验因素及水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiments

因素	水平		
	-1	0	+1
A 菌液接种量/%	10	13	16
B 温度/°C	30	32	34
C 发酵时间/h	72	84	96

1.2.5 营养成分及抗营养因子分析 条件优化后分析发酵豆粕中粗蛋白含量、真蛋白含量、活菌数、多肽分子量大小、脲酶和抗原蛋白。参照 GB/T 6432-94 测定粗蛋白含量; 参照  $CuSO_4$  沉淀法<sup>[11]</sup> 测定真蛋白含

量; 参照 GB 4789.15-2010 测定活菌数; 参照 GB/T 8622-2006 测定脲酶活性; 利用 SDS-PAGE<sup>[12]</sup> 测定蛋白质分子量和抗原蛋白。

## 1.3 数据统计

采用 Microsoft Excel 2016, SPSS 19.0 分析试验数据。采用单因素方差分析实验数据, 多组样本间差异显著性采用 Duncan 法分析,  $P < 0.05$  说明差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株相容性实验

为了探究两株菌株之间的相容性, 在 PDA 培养基上进行了共培养相容性实验<sup>[10]</sup>。结果表明, 黑曲霉生长速度快于酿酒酵母, 与酿酒酵母相互融合, 两菌株的接触面没有出现拮抗条带, 说明两株菌具有较好的相容性, 能够用于复合发酵豆粕(图 1)。

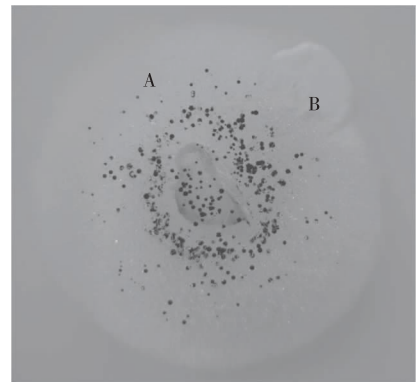


图 1 黑曲霉(A)与酿酒酵母(B)平板共培养  
Figure 1 Confrontation test of *Aspergillus niger* (A) and *Saccharomyces cerevisiae* (B) on plate

### 2.2 单因素试验

2.2.1 菌液接种量 粗蛋白含量随着接种量的增加呈先升高后下降的趋势。当接种量为 13% 时, 粗蛋白含量最大。在接种量不足时菌株不易达到对数期, 影响正常发酵速度; 接种量太大, 养分消耗太快, 不能满足长时间代谢活动, 微生物生长受到抑制。所以最适接种量为 13%, 粗蛋白含量达到最大值(图 2-A)。

2.2.2 温度 随着温度的升高粗蛋白的含量呈先升高后降的趋势, 发酵温度为 32 °C 时达到最大值, 在温度为 36 °C 时, 粗蛋白含量明显降低, 所以最适发酵温度为 32 °C(图 2-B)。这可能是由于温度较低时微生物生长缓慢。当温度较高时, 蛋白酶活力下降, 导致微生物的代谢受阻。

2.2.3 发酵时间 在发酵早期发酵时间与粗蛋白含量基本为成正比关系,在 84 h 达到峰值,后期蛋白含量保持稳定,不再增加。所以最佳发酵时间为 84 h (图 2-C)。

2.2.4 料水比 随水量的逐渐增加,粗蛋白含量呈现先上升后下降的趋势,在料水比为 1:1 时,粗蛋白含量最大。此时的培养基为黑曲霉和酿酒酵母提供了最适的生长条件,含水量和溶氧量均适宜于两种菌的生长。当继续增大水量时,会影响发酵液中溶氧量,使微生物代谢受到抑制,蛋白含量反而下降。说明 1:1 为最适料水比(图 2-D)。

2.2.5 麸皮添加量 麸皮中丰富的 B 族维生素,能够为微生物代谢提供辅酶和辅基,是微生物代谢必需的生长因子。此外,麸皮还可以提高发酵培养基的透气性。因此,麸皮的添加比例是影响发酵效果的一个重要因素。在麸皮添加量为 7% 时,粗蛋白含量最大,因此麸皮最适添加量为 7%(图 2-E)。

2.2.6 糖蜜添加量 糖蜜中含有大量的蔗糖,可以为微生物生长代谢提供碳源。糖蜜也含有丰富的矿物质、泛酸和生物素,可刺激微生物的代谢和快速生长。因此,糖蜜是微生物优选碳源培养基原料之一,试验结果表明,最适糖蜜添加量为 3%(图 2-F)。

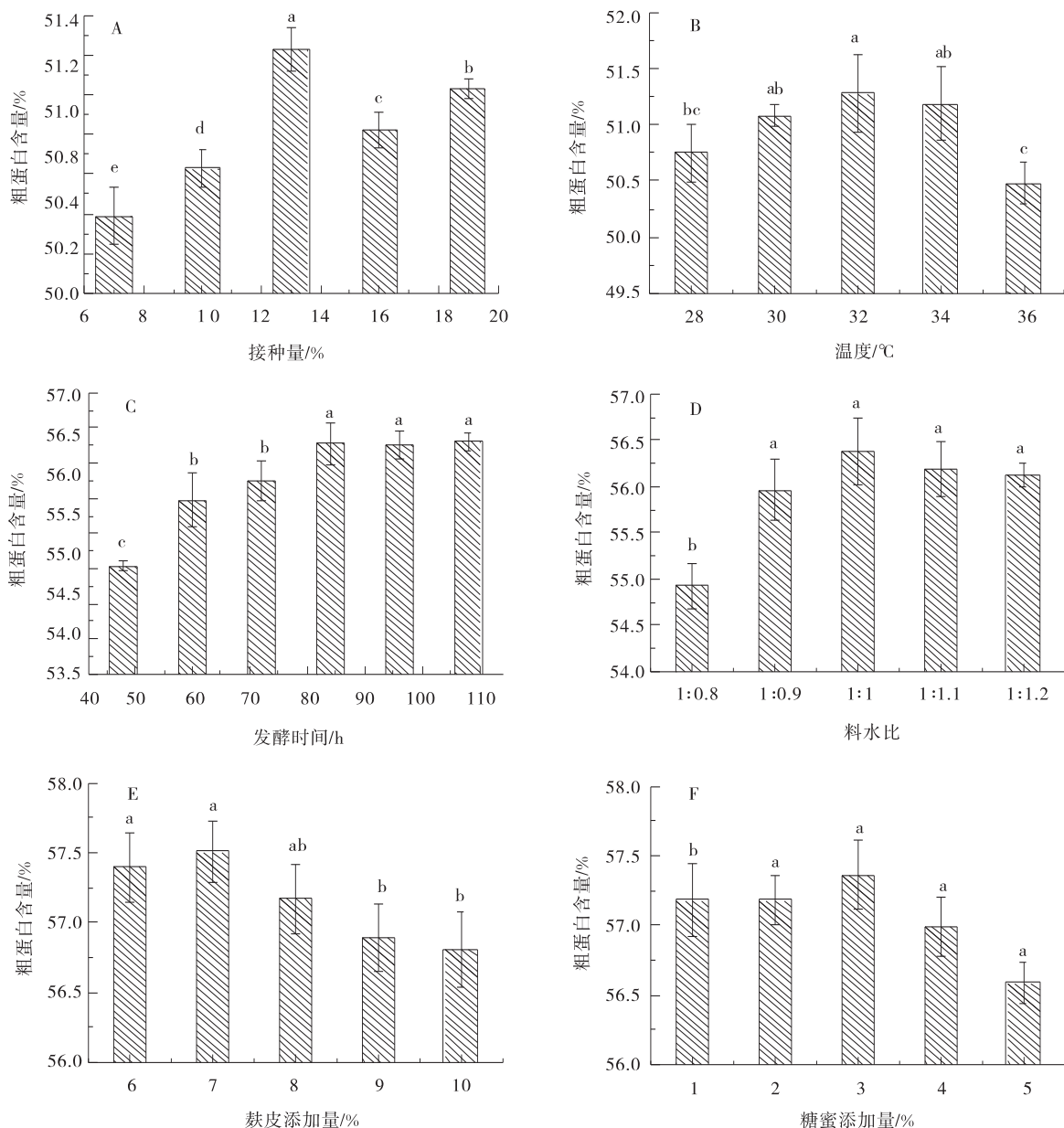


图 2 单因素试验结果

Fig. 2 The results of single factor experiment

### 2.3 响应面优化

根据单因素实验结果,对接种量、温度和发酵时间设计响应面实验(表 2)。运用 design expert 8.0.6 分析软件进行二次回归拟合实验数据,二次多项回归方程如下:

$$Y=57.26+0.53A+0.25B+0.40C+0.20AB-0.26AC+0.14BC-0.16A^2-0.41B^2-0.50C^2$$

(表 2)。

表 2 Box-Behnken 设计及结果

Table 2 Experimental design and result of Box-Behnken

试验号	A	B	C	粗蛋白含量 Y/%
1	-1.000	-1.000	0.000	55.97
2	1.000	-1.000	0.000	56.89
3	-1.000	1.000	0.000	56.08
4	1.000	1.000	0.000	57.82
5	-1.000	0.000	-1.000	55.63
6	1.000	0.000	-1.000	56.94
7	-1.000	0.000	1.000	56.78
8	1.000	0.000	1.000	57.05
9	0.000	-1.000	-1.000	55.77
10	0.000	1.000	-1.000	55.98
11	0.000	-1.000	1.000	56.45
12	0.000	1.000	1.000	57.20
13	0.000	0.000	0.000	57.25
14	0.000	0.000	0.000	57.32
15	0.000	0.000	0.000	57.33
16	0.000	0.000	0.000	57.38
17	0.000	0.000	0.000	57.03

回归模型方差分析表明, $P_{\text{model}}=0.0004$ ,二次回归模型极显著,失拟项  $P=0.1300>0.05$ ,不显著,说明模型建立成功。方差模型的相关系数  $R^2=0.9600$ ,表明粗蛋白含量的实测值与预测值之间有 96% 的符合度,拟合度较好。校正后的决定系数为  $R_{\text{Adj}}^2=0.9085$ ,表明该模型能够解释约 91% 的粗蛋白含量变异。经过 Adeq Precision 分析,信噪比  $=14.903>4$ ,所建的模型拟合程度较好,实验误差小,适合于豆粕发酵条件的优化分析。经过差异显著性分析,影响粗蛋白含量的主要因素为 A、B、C、 $B^2$ 、 $C^2$ ,差异达到极显著水平。结合  $F$  值看出,对粗蛋白含量的影响程度由大到小顺序依次为:菌液接种量、发酵时间和温度(表 3)。

通过响应面的最优化分析,豆粕发酵的最优条件为:菌液接种量 16%,温度 33.18℃,发酵时间

86.57 h,预测发酵后粗蛋白最大含量为 57.78%。结合实际生产条件的控制程度,发酵条件调整为:菌液接种量 16%,温度 33.2℃,发酵时间 86.6 h。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Anova analysis of regression models

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6.56	9	0.73	18.65	0.0004
A	2.25	1	2.25	57.48	0.0001
B	0.50	1	0.50	12.79	0.0090
C	1.25	1	1.25	31.93	0.0008
AB	0.17	1	0.17	4.30	0.0768
AC	0.27	1	0.27	6.92	0.0339
BC	0.073	1	0.073	1.86	0.2144
$A^2$	0.11	1	0.11	2.79	0.1387
$B^2$	0.71	1	0.71	18.19	0.0037
$C^2$	1.06	1	1.06	27.03	0.0013
残差	0.27	7	0.039		
失拟项	0.20	3	0.066	3.48	0.1300
纯误差	0.076	4	0.019		
总计	6.83	16			

$P<0.05$  表示结果显著, $P<0.01$  表示结果极显著, $R^2=0.9600$ , $\text{Adj } R^2=0.9085$ , $\text{Adeq Precision}=14.903$

为了验证该模型实际应用的可靠性,利用响应面所优化的条件进行发酵实验验证,发酵后产物中粗蛋白含量为 57.57%,与预测值 57.78% 十分接近,结果表明,本研究所设计的响应面模型能够应用于豆粕发酵实际生产设计,可以反映出发酵实际情况。

### 2.5 营养成分和营养抑制因子分析

根据响应面优化的豆粕发酵最佳条件,对发酵产物与豆粕原料中粗蛋白和真蛋白含量、活菌数、脲酶活性、蛋白质分子大小和抗原蛋白的降解情况进行对比分析(表 4,图 3 和图 4)。

表 4 营养成分及抗营养因子分析

Table 4 Analysis of nutritional component and antinutritional factors

	发酵前	发酵后	提高率 (降解率)/%
粗蛋白含量/%	49.03±0.21	57.57±0.28	17.42
真蛋白含量/%	43.06±0.20	53.65±0.34	24.59
活菌数 ( $10^9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ )	—	3.62±0.13	—
脲酶活性 ( $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ )	0.83±0.17	0.063±0.05	92.41

复合微生物发酵过程中产生的水解酶不仅降解了大分子蛋白质和营养抑制因子,而且明显地降低了脲酶活性。发酵后脲酶活性降低了 92.41%。发酵后豆粕中大部分蛋白被水解为小分子肽段,分子量为 20 k 左右。豆粕发酵后大分子抗原蛋白基本全部被降解,说明通过复合菌发酵产生的蛋白水解酶能够将豆粕中难消化的大分子蛋白质和营养抑制因子全部水解为小分子多肽和氨基酸,提高豆粕饲料的消化利用率。

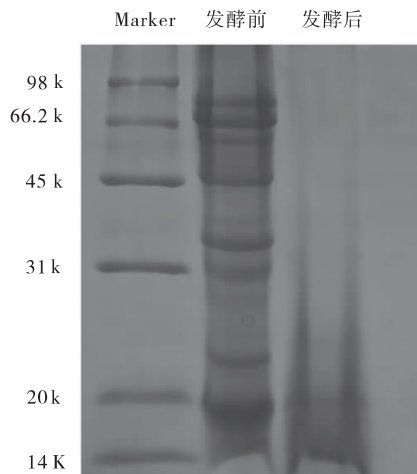


图 3 豆粕发酵前后蛋白提取液的 SDS-PAGE  
Fig. 3 SDS-PAGE pattern of proteins in soybean meal before

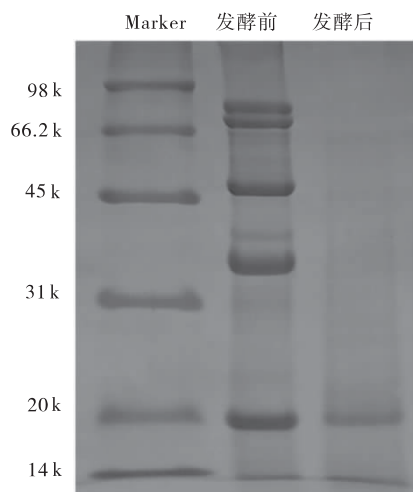


图 4 抗原蛋白的 SDS-PAGE  
Fig. 4 SDS-PAGE pattern of antigen proteins and after fermentation

原料。豆粕通过采用独特的菌群和发酵工艺发酵后,能够充分利用微生物发酵过程中分泌的蛋白酶,将豆粕原料中分子量较大的蛋白质水解为分子量小的肽段,显著提高畜禽对豆粕的饲料消化率和营养利用率。因此,豆粕发酵是国内外饲料工艺研究的热点。

豆粕经过微生物发酵后,将分子量较大、难消化的蛋白质降解为易消化的小分子肽及氨基酸,伴随着多种益生菌、不同类型的水解酶、多种维生素的产生,能够有效地消除豆粕中的营养抑制因子,显著提高饲料的适口性,提高饲料消化利用率<sup>[13]</sup>。在豆粕的发酵生产中通常选用多种微生物混合发酵,利用多种微生物分泌的蛋白酶的多样性和互补性,使豆粕蛋白的降解效果优于单一菌种。利用酵母菌和乳酸菌复合发酵豆粕后,能够将无机氮转化为菌体蛋白,提高了粗蛋白的含量。两种菌分泌的多种蛋白酶将抗原蛋白水解成小肽段和氨基酸,改善了氨基酸的组成和含量,完全降解了胰蛋白酶抑制剂,棉籽糖和水苏糖也被降解<sup>[14]</sup>。利用枯草芽孢杆菌和乳酸菌发酵豆粕,产物中游离氨基酸的含量显著提高<sup>[15]</sup>。利用啤酒酵母和米曲霉复合发酵豆粕,蛋白质含量达到了 9.51%<sup>[16]</sup>。本研究利用黑曲霉的纤维素酶和啤酒酵母的蛋白酶联合降解豆粕,通过响应面优化发酵条件后,粗蛋白和真蛋白含量分别为 57.57% 和 53.65%,比豆粕原料分别提高 17.42% 和 24.59%;脲酶活性降低了 92.41%;将分子量大的蛋白质水解转化为 20k 左右的小分子肽段。这表明利用响应面优化豆粕的固体发酵条件后,可显著增加豆粕的蛋白含量,提高豆粕的消化利用率,改善豆粕品质。

粗蛋白含量是用来衡量豆粕品质的重要评价指标,按照农业农村部行业规定,发酵豆粕粗蛋白含量必须大于 45%(NY/T 2218-2012)<sup>[17]</sup>。本研究通过黑曲霉和酿酒酵母复合发酵豆粕后,发酵产物中粗蛋白含量达到 57.57%,远远高于国家标准。有学者对发酵豆粕提高粗蛋白含量这一观点提出质疑<sup>[18]</sup>,认为粗蛋白含量的提高是发酵过程中微生物消耗豆粕中营养成分所产生的结果,发酵过程中微生物对营养物质的消耗导致营养物质总质量减少,从而造成蛋白质的浓缩效应。本研究利用复合菌发酵豆粕后,分析了发酵产物中真蛋白和粗蛋白含量,比较真蛋白和粗蛋白含量提升率,真蛋白提升率(24.59%)明显高于粗蛋白提升率(17.42%),说明在发酵过程中两种真菌利用无机氮

### 3 讨论

豆粕是一种优质的饲料蛋白源,其粗蛋白含量达到 40% 以上,是我国饲料中使用最广泛的植物源蛋白

转化为菌体蛋白,提高了总蛋白含量,有效提高了发酵豆粕的营养价值<sup>[19]</sup>。本研究所选择的菌株黑曲霉和酿酒酵母均为食品工业发酵常用的安全菌株,发酵后其活菌数达到 $3.62 \times 10^9$  cfu/g。菌株在发酵过程中能够分泌大量的水解酶,并产生动物生长所需的微生物等营养调节因子,能够提高动物对饲料的消化利用率,调节畜禽胃肠道的微生态平衡,促进肠道有益微生物(如乳酸菌)的生长,并抑制病原微生物的生长,防治畜禽的消化道疾病<sup>[20]</sup>。

## 4 结论

本研究利用单因素试验和响应面优化实验,优化筛选出黑曲霉和酵母复合发酵豆粕的最佳发酵工艺条件:装料量 25 g(包括 90% 豆粕、7% 麸皮、3% 糖蜜),料水比 1:1,接种量 16%,温度 33.2℃,发酵时间 86.6 h, MgSO<sub>4</sub> 0.375 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 g, 尿素 0.25 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g。经过发酵条件优化后,粗蛋白和真蛋白含量分别为 57.59%、53.65%,比优化前分别提高 17.42%、24.59%;活菌数达到 $3.62 \times 10^9$  cfu/g;脲酶活性降低了 92.41%;大部分分子量较大的蛋白质降解为 20 k 以下的小分子多肽和氨基酸,有效地提高了豆粕的消化利用率。

### 参考文献:

[1] 刘雪花,欧阳裕文,杨博,等.多菌株固态发酵豆粕生产高蛋白饲料的工艺优化[J].广东农业科学,2011(5):125-127.

[2] Chun Y L, Jin Jenn Lu, Chean Ping Wu, *et al.* Effects of probiotics and bremelain fermented soybean meal replacing fish meal on growth performance, nutrient retention and carcass traits of broilers[J]. Livestock Science, 2014, 163:94-101.

[3] Ding Z, Zhang Y, Ye J, *et al.* An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 44(1):295-301.

[4] Wang Y, Liu X T, Wang H L, *et al.* Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digest-

ibility of weanling pigs[J]. Livestock Science, 2014, 170: 91-99.

- [5] Mohamed S Hassaan, Magdy A Soltan, Ahmed M, *et al.* Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Animal Feed Science and Technology, 2015, 201:89-98.
- [6] 李旋,王君高,刘庆,等.固态发酵豆粕的研究[J].中国酿造,2010(4):70.
- [7] 魏春,刘茂锋,宣磊,等.固态发酵豆粕的不同生产工艺及其营养品质比较[J].食品与发酵工业,2013(5):89-93.
- [8] 姜丹,丁洪浩,张晶,等.发酵对豆粕中营养物质和抗营养因子的影响[J].中国兽医学报,2011,31(4):579-582.
- [9] 马文强,冯杰,刘欣.微生物发酵豆粕营养特性研究[J].中国粮油学报,2008,23(1):121-124.
- [10] 李善仁.混菌发酵豆粕制备大豆肽的研究[D].福建:福建农林大学,2009:39-42,58-59.
- [11] 胡艳丽,王克然.饲料中真蛋白的测定[J].河南畜牧兽医,2007(10S):31-32.
- [12] 李旺军,方华,季春源.豆粕发酵蛋白中抗原蛋白和不良寡糖的检测[J].粮食与饲料工业,2013(4):61-65.
- [13] 王永伟,宋丹,李爱科,等.发酵饲料资源开发及应用技术研究进展[J].中国饲料,2019(11):78-80.
- [14] 考书娟,张锋,张彬.丝状真菌 Y W-7 与乳酸菌共同培养发酵豆粕的研究[J].家禽科学,2008(6):9-12.
- [15] 惠明,孟可,田青,等.复合菌株固态发酵豆粕的研究[J].河南工业大学学报,2009,30(4):62-63.
- [16] 刘慧,宫彬彬,杜军霞,等.三种益生菌联合固态发酵提高豆粕中的粗蛋白含量研究[J].畜禽业,2019(1):4-7.
- [17] 章亭洲,赵艳,刘星,等.发酵豆粕的简明质量评定方法及在动物生产中的应用[J].饲料博览,2016(12):12-14.
- [18] 郑婷婷,金妙仁,许琪,等.脉孢菌发酵豆粕工艺优化及终产品分析[J].食品工业科技,2015,(19):146-150.
- [19] 汤江武,薛智勇,钱红,等.酵母固体发酵对物料营养组分及生物活性的影响[J].浙江农业科学,2003(5):56-58.
- [20] 李波,马世宏,王安如,等.酶菌复合物对于幼龄动物肠道调节的研究进展[J].中国饲料,2018(13):45-49.



(SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in red clover were measured under different degree of drought stress. Results showed that among 3 materials, the MDA content, activities of SOD and POD in R was the highest. The contents of LWC and CHL of 3 materials decreased gradually with the time of drought stress, contents of MDA and SS increased gradually, and activities of POD, SOD and CAT increased first and then decreased. From the interaction of red clover materials and drought stress days, the LWC and CHL of R varied slightly, while the contents of SS and MDA varied greatly, the activity of SOD and POD in leaves was the highest. Comprehensive evaluation based on the membership function method showed that R had the strongest drought resistance, followed by CK2 and CK1.

**Key words:** red clover; drought resistance; membership function; comprehensive evaluation

---

(上接 107 页)

## Optimization of soybean meal fermentation conditions by using response surface methodology

YANG Xiao-ting, XU Li, TIAN Yong-qiang

(Academy of Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Soybean meal, bran and molasses were used as raw materials to ferment protein feed with *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. The effects of inoculation amount, temperature, fermentation time, ratio of raw material to water, amount of bran and molasses on crude protein content were studied through single factor experiment. The response surface method based optimal fermentation conditions were as follows: 25g (90% soybean meal, 7% bran, 3% molasses) loaded raw material, 0.375g  $\text{MgSO}_4$ , 0.25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.25 g urea and 0.25 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; The ratio of raw material to water was 1:1, and the microbial inoculation amount was 16%; The fermentation temperature and time were 33.2°C and 86.6 hours. Under the optimal fermentation conditions, the crude protein and true protein content reached 57.59% and 53.65% respectively, which was 17.42% and 24.59% higher than the control. The number of viable microbe reached  $3.62 \times 10^9$  cfu/g. Urease activity decreased by 92.41%. The optimized combined fermentation could effectively increase the protein content, degrade the macromolecular protein and antigen protein, and improve digestibility of soybean meal, which was suitable for the industrial production of soybean meal fermentation.

**Key words:** soybean meal; *Aspergillus niger*; *Saccharomyces cerevisiae*; solid state fermentation; response surface