

DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20230328

多菌株发酵农产品加工副产物 制备蛋白质饲料的工艺优化

邓永平^{1,2*}, 肖 凯¹, 车 鑫¹, 刘晓兰^{1,2}

(1.齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2.黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

[摘要] 本试验以农产品加工副产物玉米蛋白粉、米糠和豆粕为原料,通过多菌株固态发酵生产蛋白质饲料。以可溶性蛋白含量为指标,经单因素和正交试验优化发酵工艺条件。结果表明:培养基中玉米蛋白粉、米糠和豆粕的质量比例为5:2:3,含水量为53%(V/m),米曲霉、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母种子液按体积比3:2:1组成复合种子液,接种量为6%,在32℃发酵72 h。在上述优化条件下发酵后玉米蛋白粉饲料中可溶性蛋白含量为19.37%、粗蛋白质约40.22%、干物质约54.17%、蛋白酶活力2926.52 U/g、羧甲基纤维素酶活力1092.07 U/g。因此表明,通过多菌株发酵显著提高了饲料营养价值。

[关键词] 玉米蛋白粉;发酵;蛋白质饲料;可溶性蛋白;优化

[中图分类号] S816.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-3314(2023)03-0149-06

发酵饲料能提高动物生产性能、抗氧化能力,改善动物免疫机能(Lv等,2022;Zhu等,2020)。我国发酵饲料市场缺口大,在“饲料禁抗令”实施的情况下,生物发酵饲料的市场需求量进一步扩大,因此,亟需加大对发酵饲料的研发(Li等,2020)。

玉米蛋白粉是湿法生产玉米淀粉的主要副产物,蛋白质含量高达60%,其构成中谷氨酰胺占氨基酸总量的1/3,有报道表明,谷氨酰胺具有维持肠道结构完整性和抗氧化功能性的作用(Beutheu等,2013)。但是由于玉米蛋白粉中蛋白质主要是醇溶蛋白和谷蛋白,水溶性差,同时,玉米蛋白粉中赖氨酸含量较低,导致其直接作为饲料原料利用度低,营养性和功能性体现不足(Loy等,2019)。米糠是稻米加工副产物,资源丰富,但含有非淀粉多肽等抗营养因子,导致其直接作为

饲料原料生物利用度较低(张志宏等,2020)。豆粕是大豆制油副产物,蛋白质含量40%以上,但因含有胰蛋白酶抑制剂等抗营养因子,直接作为饲料易导致动物腹泻,需要经处理后饲喂(许欣等,2020)。微生物发酵是提高玉米蛋白粉等农产品加工副产物生物利用度的主要方法。通过微生物发酵可以适度降解玉米蛋白粉、米糠、豆粕等原料中蛋白质、脂肪等物质,不仅可以改善饲料原料物化性质,提高吸收利用率,降低原料中抗营养因子浓度,提高饲料适口性,还可能产生具有抗氧化、提高免疫力等功能的小肽,提高动物机体抗氧化能力和免疫力,优化肠道菌群结构,在一定程度上起到“替代抗生素”的作用(袁泽珙等,2022;Liñan-Vidriales等,2020;Wang等,2019)。

本试验以农产品加工副产物玉米蛋白粉、豆粕、米糠作为发酵饲料的原料,通过单因素试验和正交试验优化多种微生物协同发酵工艺条件,旨在增加发酵饲料中可溶性蛋白含量,提高饲料的营养价值,为这些农产品加工副产物在发酵饲料开发中的应用提供科学依据。

基金项目:黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2020ZX06B01);齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(YJSCX2020021);黑龙江省教育厅校地合作项目(135409507)

* 通讯作者:邓永平,女,教授,博士,主要从事农产品加工副产物综合利用的研究,E-mail:913913_monkey@163.com

1 材料与方法

1.1 菌种 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),保存于齐齐哈尔大学食品与生物工程学院菌种保藏室。

1.2 主要试剂与仪器 玉米蛋白粉,购自黑龙江龙凤玉米开发有限公司;米糠、豆粕市售;其他试剂为分析纯,购自天津市凯通化学试剂有限公司。生化培养箱 SPX-150BS-II,天津市泰斯特仪器有限公司;高速万能粉碎机 FW80,天津市泰斯特仪器有限公司;杜马斯定氮仪 NDA701,意大利 VELP 公司。

1.3 培养基

1.3.1 液体培养基 LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化钠 10 g,加蒸馏水溶解并定容至 1000 mL,调节 pH 至 7.0。PDA 液体培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1000 mL,自然 pH。

1.3.2 固体培养基 在 1.3.1 中的液体培养基中加入 2% 的琼脂即可制得斜面培养和平板培养菌种所需的固体培养基。

1.3.3 发酵培养基 发酵培养基由玉米蛋白粉、米糠和豆粕组成,加入适量自来水,自然 pH。

1.4 试验方法

1.4.1 单因素试验优化发酵饲料生产工艺

1.4.1.1 发酵菌株的活化与种子液制备 菌株活化:将枯草芽孢杆菌划线接种于 LB 斜面培养基,32 ℃ 培养 24 h;将产朊假丝酵母接种于 PDA 斜面培养基,于 32 ℃ 培养 24 h;米曲霉接种于 PDA 斜面培养基,于 28 ℃ 培养 48 h。种子液制备:将活化的枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母分别转接到 LB 液体培养基和 PDA 液体培养基中,在 32 ℃ 培养 24 h 后备用;用无菌蒸馏水洗下 2 株霉菌孢子,制成菌悬液(控制孢子数 1×10^7 个/mL)备用。

1.4.1.2 复合菌液比例的测定 在 250 mL 三角瓶中加入比例为 1:1:1(m/m/m)的玉米蛋白粉、米糠和豆粕(总量 30 g),培养基中含水量 40%,121 ℃ 灭菌 30 min,调整米曲霉、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母菌液比例分别为 1:1:1、1:2:2、1:3:3、2:1:2、2:2:3、2:3:1、3:1:3、3:2:1、3:3:2(V/V/V),按 3% 接

种量(V/m)向发酵培养基中接种复合种子液,在 32 ℃ 恒温培养 48 h,测定发酵产物中可溶性蛋白含量。

1.4.1.3 培养基原料比例的确定 调整培养基中玉米蛋白粉、米糠和豆粕比例分别为 3:4:2、1:1:1、4:2:4、5:2:3、6:2:2、7:1:2(m/m/m),培养基含水量 40%,121 ℃ 灭菌 30 min,采用优化后的复合菌液比例接种,接种量为 3%(V/m),在 32 ℃ 培养 48 h,测定发酵产物可溶性蛋白含量。

1.4.1.4 培养基含水量的确定 在上述优化条件下,调整培养基中含水量分别为 20%、30%、40%、50%、55%、60%,121 ℃ 灭菌 30 min,复合菌液接种量为 3%(V/m),在 32 ℃ 培养 48 h,测定发酵产物可溶性蛋白含量。

1.4.1.5 单因素优化发酵条件 在上述优化条件下,以发酵产物中可溶性蛋白含量为指标,依次对接种量(分别为 1%、2%、3%、5%、8%、10%,V/m)、发酵温度(分别为 30、32、34、36 ℃)、发酵时间(分别为 48、60、72、84、96 h)进行优化。

1.4.2 正交试验优化发酵饲料生产工艺 在单因素的试验基础上,选择接种量(4%、5%、6%,V/m)、培养基含水量(45%、50%、53%,V/m)、发酵温度(30、32、34 ℃)、发酵时间(60、72、84 h)四个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验进一步优化固态发酵条件。

1.4.3 发酵饲料营养成分分析 采用杜马斯燃烧法测定未发酵培养基和发酵后产物中粗蛋白质含量;采用福林酚法测定可溶性蛋白含量(江成英等,2021),计算方程为 $y = 0.0024x + 0.0107$, $R^2 = 0.9990$,其中 y 为 640 nm 下的吸光值, x 为标准蛋白质含量($\mu\text{g/mL}$);采用酪氨酸法测定蛋白酶活力(邓永平等,2016),酪氨酸含量计算方程为 $y = 0.0106x - 0.0125$, $R^2 = 0.9983$,其中 y 为 640 nm 下的吸光值, x 为酪氨酸含量($\mu\text{g/mL}$);采用 3,5-二硝基水杨酸法计算羧甲基纤维素酶活力(邓永平等,2016),以葡萄糖为标准品,葡萄糖含量的计算方程为 $y = 1.0291x + 0.0339$, $R^2 = 0.9978$,其中 y 为 540 nm 下的吸光值, x 为葡萄糖含量($\mu\text{g/mL}$)。

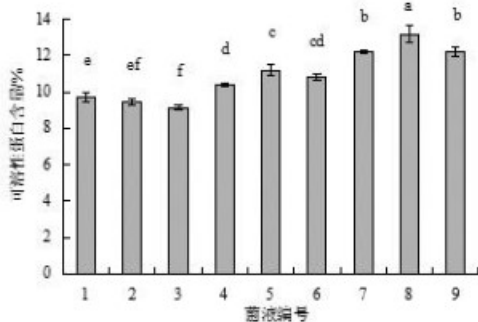
1.5 数据处理 采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 17.0 处理数据,采用 Duncan 氏法进行多重比较检验,表中同行数据左上角标或图中数据点

上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标注相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2 结果

2.1 单因素优化发酵工艺条件

2.1.1 复合种子液比例的确定 如图1所示, 米曲霉、枯草芽孢杆菌、产朊假丝酵母菌液比例为 3:2:1 时, 发酵产物中可溶性蛋白含量可达到 13.16%, 显著高于本实验其他菌种比例发酵时的可溶性蛋白含量 ($P < 0.05$), 也高于 3 种菌株单独发酵的可溶性蛋白含量。米曲霉是发酵过程中降解蛋白质的主要菌株(王国强等, 2016), 可溶性蛋白含量随着米曲霉在复合菌液中比例升高而升高, 同时, 三种菌株在降解培养基蛋白质时存在协同作用。因此, 确定菌液比例为 3:2:1。

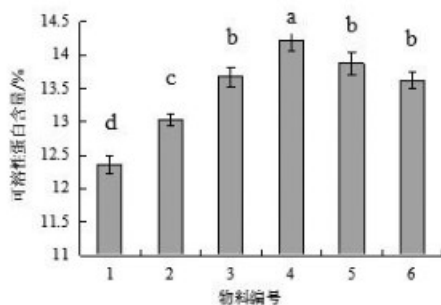


注: 编号 1~9 分别代表米曲霉、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母菌液比例为 1:1:1, 1:2:1, 1:3:1, 2:1:2, 2:2:1, 2:3:1, 3:1:3, 3:2:1, 3:3:2 (V/V/V)。

图1 菌种比例对可溶性蛋白含量的影响

2.1.2 发酵饲料原料比例确定 如图2所示, 当物料比例为 3:4:2 时, 产物的可溶性蛋白含量最低, 物料比为 5:2:3 时可溶性蛋白含量显著高于其他比例 ($P < 0.05$)。培养基中玉米蛋白粉含量的提高在一定程度上有利于提高可溶性蛋白含量, 但是玉米蛋白粉含量过高会导致培养基黏稠, 不利于好氧菌株生长, 导致可溶性蛋白含量减少。因此, 确定玉米蛋白粉、米糠和豆粕粉的比例为 5:2:3。

2.1.3 发酵初始水含量的确定 如图3所示, 含水量为 20%~50% 时, 可溶性蛋白含量随着含水量增加而增加, 在含水量 50% 时可溶性蛋白含量显著高于其他含水量 ($P < 0.05$)。可能是因为菌株生长环境的水分含量不足时, 菌种与原料、水分接触不均匀, 使得部分原料发酵不充分, 菌株生长在较干燥环境, 生长速度较缓慢, 从而代谢能力



注: 编号 1~6 分别代表玉米蛋白粉、米糠和豆粕粉比例为 3:4:2, 1:1:1, 4:2:4, 5:2:3, 6:2:2, 7:1:2 (m/m/m)。

图2 不同物料对可溶性蛋白含量的影响

低, 导致可溶性蛋白含量低; 菌株生长环境的水分含量过高时, 培养基黏稠, 溶氧量减少, 微生物的生长繁殖受到较大影响(Yang 等, 2021)。因此, 确定培养基初始含水量为 50%。

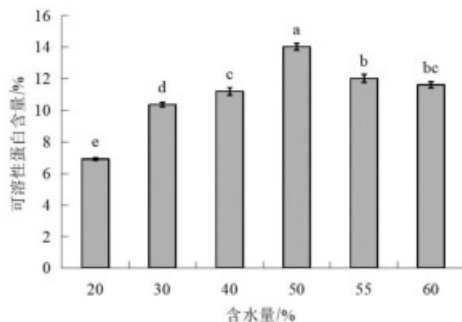


图3 不同含水量对可溶性蛋白含量的影响

2.1.4 接种量的确定 如图4所示, 随着接种量的增加可溶性蛋白含量呈先增加后缓慢减少的趋势, 当接种量较低时, 微生物浓度较小, 整体代谢速率缓慢, 使得产物中可溶性蛋白含量较少。当接种量过高时, 菌体之间竞争营养物质, 同时代谢产物的排出和生物热的释放改变了培养环境, 不利于菌株生长代谢, 使得产物可溶性蛋白含量减少(Yang 等, 2021)。接种量 5% 时发酵产物中可溶性蛋白含量显著高于其他接种量 ($P < 0.05$), 因此确定接种量为 5%。

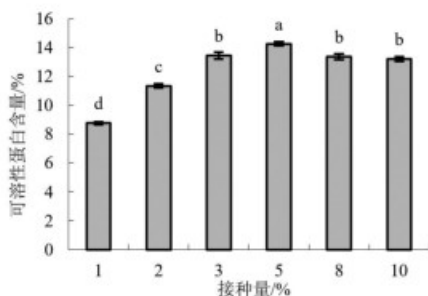


图4 不同接种量对可溶性蛋白含量的影响

2.1.5 培养温度的确定 如图 5 所示, 发酵温度为 32 ℃时发酵产物中可溶性蛋白含量显著高于其他温度, 超过 32 ℃后, 可溶性蛋白含量逐渐减少。原因可能是由于发酵菌株在适宜温度时, 生长代谢旺盛, 产酶能力及其活性高; 当温度达到 36 ℃时, 发酵菌株新陈代谢速率加快, 由于生物量的快速增加会释放生物热, 而固态发酵传热效率差, 导致微环境中温度急剧升高, 热量不能及时消散, 微生物的生长和新陈代谢就会受到影响(Yang 等, 2021)。因此, 确定发酵温度为 32 ℃。

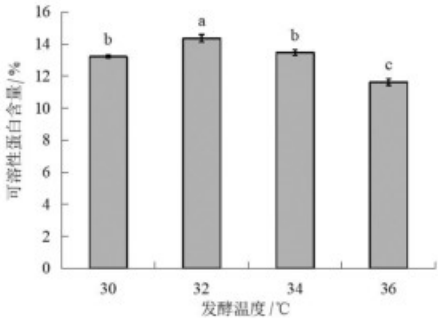


图 5 不同发酵温度对可溶性蛋白含量的影响

2.1.6 发酵时间的确定 如图 6 所示, 在 48 ~ 72 h 内, 随着发酵时间延长, 可溶性蛋白含量逐渐升高, 在 72 h 达到最大值 17.51%, 72 h 后呈逐渐降低趋势。可能是因为发酵前期, 培养基中营养供给充足, 菌株生长繁殖力旺盛, 产水解酶能力较强; 在发酵后期, 由于菌株过量繁殖导致培养基中营养被大量消耗, 供给不充足, 导致可溶性蛋白含量降低。因此, 确定发酵时间为 72 h。

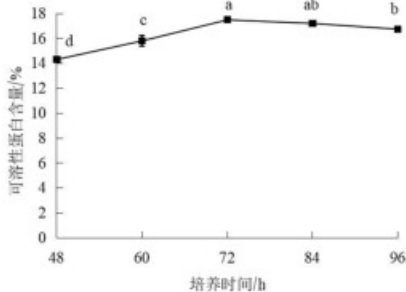


图 6 发酵时间对可溶性蛋白含量的影响

2.2 正交试验方案和结果 在单因素试验基础上采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对接种量(4%、5%、6%)、含水量(45%、50%、53%)、发酵温度(30、32、34 ℃)、发酵时间(60、72、84 h)四个条件进一步优化, 结果见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 试验结果

试验号	接种量(A)	含水量(B)	发酵温度(C)	发酵时间(D)	可溶性蛋白含量/%
1	1	1	1	1	13.57±0.27
2	1	2	2	2	15.93±0.08
3	1	3	3	3	16.37±0.13
4	2	1	2	3	15.35±0.31
5	2	2	3	1	16.24±0.12
6	2	3	1	2	16.72±0.51
7	3	1	3	2	17.01±0.36
8	3	2	1	3	17.26±0.15
9	3	3	2	1	18.51±0.37
均值 1	45.87	45.93	47.55	48.32	
均值 2	48.31	49.43	49.79	49.66	
均值 3	52.78	51.60	49.62	48.98	
极差	6.91	5.67	2.24	1.34	

如表 1 所示, 以可溶性蛋白含量为指标, 各因素的响应顺序为 $R_A>R_B>R_C>R_D$, 即接种量>含水量>发酵温度>发酵时间, 通过正交试验优化发酵得出最优组合条件为 $A_3B_3C_2D_2$, 即接种量 6%、含水量 53%、发酵温度 32 ℃、发酵时间 72 h。在上述最佳条件下进行验证试验, 确定最适工艺条件下可溶性蛋白含量平均值为 19.37%。

2.3 发酵饲料部分营养成分分析 对采用上述条件进行多菌株发酵获得的发酵饲料(发酵组)的相关营养成分含量进行测定, 并与同等条件下处理的未发酵原料(未发酵组)进行比较, 结果见表 2。

表 2 营养成分分析

产物指标	未发酵组	发酵组
干物质含量/%	51.09±0.53 ^b	54.17±1.16 ^a
粗蛋白质含量/%	38.25±0.56 ^b	40.22±0.47 ^a
可溶性蛋白含量/%	4.95±0.28 ^b	19.37±0.85 ^a
蛋白酶活力/(U/g)	701.60±40.13 ^b	2926.52±103.58 ^a
纤维素酶活力/(U/g)	207.26±17.38 ^b	1092.07±76.16 ^a

由表 2 可知, 发酵组的干物质、粗蛋白质和可溶性蛋白含量以及蛋白酶、纤维素酶活力显著高于未发酵组($P<0.05$), 经过多菌株的混合发酵有效提高了以玉米蛋白粉为主, 米糠和豆粕为辅组成的饲料的部分营养成分含量。

3 讨论

3.1 原料组成对发酵效果的影响 我国蛋白饲料资源短缺, 开发高蛋白含量的农产品加工副产物是缓解这一现状的必要途径。玉米蛋白粉含丰

富的玉米黄质、叶黄素,也是蛋氨酸和半胱氨酸的良好来源,但赖氨酸和色氨酸含量非常低(Loy等,2019),需与其他原料搭配应用提高发酵饲料的可饲性。姜鑫(2021)利用单一乳酸菌发酵玉米蛋白粉和麸皮混合物,当二者比例为6:4(m/m)时发酵效果最好。江成英等(2021)利用芽孢杆菌复合菌剂发酵玉米蛋白粉和麸皮混合物,当二者比例为7:3(m/m)时发酵效果最好。从氨基酸构成考虑,豆粕蛋白缺乏甲硫氨酸和半胱氨酸,但富含赖氨酸和色氨酸,与玉米蛋白粉蛋白质的氨基酸构成具有互补性(Loy等,2019)。通过微生物发酵,不仅可以有效降解原料中的大分子物质,还能减少豆粕中抗营养因子含量,提高饲料的营养价值(Li等,2020)。Hamidoghli(2020)研究发现,用枯草芽孢杆菌发酵豆粕和玉米蛋白粉产物替代鱼粉可以改善白对虾的生长、饲料利用率、免疫反应和抗病性,同时能改善水质指标。本研究经优化确定发酵饲料由玉米蛋白粉、豆粕和米糠组成,质量比例为5:2:3。

3.2 菌种对发酵效果的影响 发酵菌株是决定发酵饲料品质的关键因素之一。发酵饲料常用生产菌株类型包括芽孢杆菌属、乳酸菌和真菌中的某些菌株(Wang等,2019;Sugiharto等,2019)。米曲霉具有较强的产蛋白质酶、纤维素酶等水解酶的活力,在开发功能食品方面有较多的研究。已有报道表明,米曲霉发酵米糠能够增加可溶性蛋白含量,同时产生益生元,促进肠道双歧杆菌和拟杆菌的增殖(Yang等,2021);摄入米曲霉发酵的米糠和糙米的培养物可以抑制炎症细胞浸润和体细胞突变而防止肿瘤细胞转移(Nemoto等,2022)。产朊假丝酵母具有较强的合成细胞蛋白质和维生素B的能力,是食品和饲料研究中常用菌株(Hansen等,2019;Cruz等,2019)。

多菌株发酵能够发挥菌株间的协同作用,使发酵效果优于单菌株发酵。袁泽珏等(2022)利用短小芽孢杆菌SE5、乳酸乳球菌17和酿酒酵母菌Sa发酵豆粕,使豆粕中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白分别降解了71.48%和73.29%。本研究采用米曲霉、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母协同发酵玉米蛋白粉、米糠和豆粕混合物,通过优化工艺条件,显著提高了原料中蛋白质的溶解性,提高了

产物中水解酶的活力,可溶性蛋白含量较江成英等(2021)报道的枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌混合发酵制得的玉米蛋白粉发酵饲料高出40.7%。

3.3 工艺条件对发酵效果的影响 微生物的代谢受温度影响较大,当温度适宜时,酶活力旺盛,新陈代谢速度快,发酵周期短,相反,温度较低时,酶促反应速度减缓,发酵周期延长。因此,优化发酵温度和发酵时间十分必要。魏炳栋等(2017)发现,采用地衣芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌、黑曲霉四株菌混合发酵玉米蛋白粉时在33℃发酵84h时达到最佳效果。江成英等(2021)发现,芽孢杆菌复合菌剂在33℃发酵约87h效果最佳。在本研究中米曲霉、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母在32℃发酵72h时达到最佳效果。

4 结论

本试验结果表明,以玉米蛋白粉为主料的发酵饲料制备工艺为:玉米蛋白粉、米糠和豆粕的质量比例为5:2:3,含水量为53%(V/m),米曲霉、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母组成的复合菌液比例为3:2:1,接种量为6%,发酵温度为32℃,发酵时间为72h。在此条件下,发酵饲料中可溶性蛋白含量19.37%、粗蛋白质约40.22%、干物质约54.17%、蛋白酶活力 (2926.52 ± 103.58) U/g、纤维素酶活力 (1092.07 ± 76.16) U/g,饲料散发淡淡的酱香味。

参考文献

- [1] 邓永平,艾瑞波,郭建华,等.中华根霉12#产复合酶浸提条件及体外酶解饲料的研究[J].饲料工业,2016,37(20):46~50.
- [2] 江成英,刘晓兰,王松.响应面法优化玉米蛋白粉饲料发酵工艺[J].中国饲料,2021(21):123~126+142.
- [3] 王国强,王朋朋,刘超齐,等.利用肉鸡测定米曲霉发酵的非常规蛋白质饲料中营养物质代谢率[J].饲料工业,2016,37(18):41~44.
- [4] 魏炳栋,苗国伟,陈群,等.复合菌发酵玉米蛋白粉的条件优化[J].中国畜牧兽医,2017,44(10):2944~2950.
- [5] 许欣,刘洋洋,葛向阳,等.蛋白质发酵饲料研究进展[J].饲料工业,2020,41(20):16~25.
- [6] 袁泽珏,杨红玲,张姝锦,等.水产功能性发酵豆粕的工艺条件研究[J].饲料工业,2022,43(3):10~16.
- [7] 张志宏,卢淑雯.米糠的营养功效及在饲料中的应用进展[J].饲料研究,2020,43(10):139~142.
- [8] Beutheu S, Ghouzali I, Galas L, et al. Glutamine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells [J]. Clinical Nutrition, 2013, 32

- (5):863 ~ 869.
- [9] Cruz A, Håkenåsen I M, Skugor A, *et al.* *Candida utilis* yeast as a protein source for weaned piglets; Effects on growth performance and digestive function[J]. *Livestock Science*, 2019, 226: 31 ~ 39.
- [10] Hamidoghli A, Won S, Farris N W, *et al.* Solid state fermented plant protein sources as fish meal replacers in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 264: 114474.
- [11] Hansen J Ø, Hofossæter M, Sahlmann C, *et al.* Effect of *Candida utilis* on growth and intestinal health of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 734239.
- [12] Jiang X, Liu X, Xu H J, *et al.* Improvement of the nutritional, antioxidant and bioavailability properties of corn gluten-wheat bran mixture fermented with lactic acid bacteria and acid protease [J]. *LWT*, 2021, 144: 111161.
- [13] Lv J, Guo L J, Chen B G, *et al.* Effects of different probiotic fermented feeds on production performance and intestinal health of laying hens[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(2): 101570.
- [14] Li L, Li W, iu S, *et al.* Probiotic fermented feed improved the production, health and nutrient utilisation of yellow-feathered broilers reared in high altitude in Tibet [J]. *British Poultry Science*, 2020, 61: 746 ~ 753.
- [15] Liñan- Vidriales M A, Peña-Rodríguez A, Tovar-Ramírez D, *et al.* Effect of rice bran fermented with *Bacillus* and *Lysinibacillus* species on dynamic microbial activity of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 2020, 531: 735958.
- [16] Loy D D, Lundy E L. Nutritional properties and feeding value of corn and its coproducts - science direct[M]. *Corn* (Third Edition), 2019: 633 ~ 659.
- [17] Nemoto H, Otake M, Matsumoto T, *et al.* Prevention of tumor progression in inflammation-related carcinogenesis by anti-inflammatory and anti-mutagenic effects brought about by ingesting fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) [J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 88: 104907.
- [18] Sugiharto S, Ranjitkar S. Recent advances in fermented feeds towards improved broiler chicken performance, gastrointestinal tract microecology and immune responses; a review [J]. *Animal Nutrition*, 2019, 5: 1 ~ 10.
- [19] Wang Y, Liu X L, Jin L, *et al.* Effects of fermented corn gluten meal on growth performance, serum parameters, intestinal morphology, and immunity performance of three-yellow broilers [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2019, 99: 408 ~ 417.
- [20] Yang L J, Zeng X F, Qiao S Y. Advances in research on solid-state fermented feed and its utilization: The pioneer of private customization for intestinal microorganisms [J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(4): 905 ~ 916.
- [21] Yang M, Ashraf J, Tong L T, *et al.* Effects of *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus oryzae* on prebiotic potentials of rice bran pretreated with superheated steam in an in vitro fermentation system [J]. *LWT*, 2021, 139: 110482.
- [22] Zhu F, Zhang B, Li J, *et al.* Effects of fermented feed on growth performance, immune response, and antioxidant capacity in laying hen chicks and the underlying molecular mechanism involving nuclear factor-κB [J]. *Poultry Science*, 2020, 99: 2573 ~ 2580.

Optimization on production process of protein feed from agro-processing by-products fermented by multi-strains

DENG Yongping^{1,2 *}, XIAO Kai¹, CHE Xin¹, LIU Xiaolan^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang Province 161006, China;

2. Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, Qiqihar, Heilongjiang Province 161006, China)

[Abstract] In this paper, the agro-processing by-products such as corn gluten meal, rice bran and soybean meal were used as raw materials, using soluble protein production as index, fermentation medium composition and culture conditions for protein feed production by multi-strains were determined by single factor and orthogonal experiment. The results showed that the optimum conditions were as follows: the mass ratio of corn gluten meal, rice bran and soybean meal in the medium was 5:2:3, the moisture content was 53%, the inoculum size of mixed strains (*Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* and *Candida utilis* mixed by 3:2:1) was 6% (V/m), culture temperature was 32 °C and culture time was 72 h. Under the optimum conditions, the content of soluble protein were 19.37%, the crude protein content of about 40.22%, dry matter contents of about 54.17%, the protease activity was 2926.52 U/g, the CMCase activity was 1092.07 U/g. The nutritional value of feed was significantly improved by solid-state fermentation through mixed strains.

[Key words] corn gluten meal; fermentation; protein feed; soluble protein; optimization