

复合微生物固态发酵菜籽粕的研究

邱良伟^{1,2}, 顾拥建¹, 沙文锋¹, 戴晖¹, 朱娟¹

(1. 江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏如皋 226541; 2. 江苏省睢宁县林牧渔业局, 江苏睢宁 221200)

摘要 [目的] 研究复合微生物固态发酵对菜籽粕的脱毒效果及营养价值的影响。[方法] 以普通菜籽粕为原料, 利用现代固态发酵原理, 采用植物乳杆菌和黑曲霉进行固态发酵, 探讨降解抗营养因子及提高粗蛋白含量最佳发酵工艺。[结果] 试验表明, 复合微生物固态发酵可显著降低菜籽粕中抗营养因子的含量, 混菌混合发酵效果优于单菌种发酵效果。植物乳杆菌与黑曲霉接种比例为 3:1, 接种量 20%, 料水比为 1:0.8 g/ml, 菜粕: 玉米: 麸皮为 8:1:1, 发酵时间为 48 h。发酵后菜籽粕中粗蛋白含量提高了 6.57%, 小肽含量提高了 88.76%, 粗纤维含量降低 11.31%; 抗营养因子异硫氰酸酯降低了 64.00%, 噁唑烷硫酮降低了 81.82%, 硫苷降低了 75.16%; 总氨基酸含量提高了 11.59%。[结论] 研究可为菜籽粕在生物饲料中的开发利用提供一条有效途径。

关键词 微生物; 菜籽粕; 固态发酵

中图分类号 TS229; S816 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)03-209-03

Study of Solid Substrate Fermentation with Complex Microbial on Rapeseed Meal

QIU Liang-wei^{1,2}, GU Yong-jian¹, SHA Wen-feng¹ et al (1. Jiangsu Yanjiang Institute of Agricultural Sciences, Rugao, Jiangsu 226541; 2. Jiangsu Suining Board of Agriculture, Suining, Jiangsu 221200)

Abstract [Objective] To study effects of compound microbial solid fermentation on detoxification and nutritional value of rapeseed meal. [Method] With common rapeseed meal as raw material, using modern solid fermentation principle, *Lactobacillus plantarum* and *Aspergillus niger* were adopted to conduct solid fermentation. The optimal fermentation technique of degradating anti nutritional factors and improving crude protein content was discussed. [Result] The results showed that complex microbial solid fermentation can significantly reduce content of anti nutritional factors in rapeseed meal. The fermentation effect of complex bacteria is superior than single bacteria. The ratio between *Lactobacillus plantarum* and *Aspergillus niger* is 3:1, inoculation amount 20%, solid-liquid ratio 1:0.8 g/ml, rapeseed meal:maize:bran = 8:1:1, fermentation time 48 h. After fermentation, crude protein content increased 6.57%, small peptide increased 88.76%, crude fiber content reduced 11.31%; Isothiocyanate, Oxazolidine thione, Glucosinolate reduced 64.00%, 81.82%, 75.16%, respectively; total amino acid content increased 11.59%. [Conclusion] The study can provide an effective way for development and utilization of rapeseed meal in biological feed.

Key words Microorganism; Rapeseed meal; Solid fermentation

菜籽粕是一种优质的植物性蛋白饲料资源, 其蛋白质含量为 35%~42%, 氨基酸组成合理, 菜籽蛋白为全价蛋白质, 几乎不存在限制氨基酸。与大豆粕相比, 菜籽饼(粕)中蛋氨酸、胱氨酸等含硫氨基酸的含量较高, 仅赖氨酸含量略低于大豆蛋白^[1]。但是菜籽粕中含有的硫代葡萄糖苷等抗营养因子严重制约着其在饲料工业中的应用, 不仅影响菜籽粕的适口性, 还会对动物的肝脏、脾脏等生理器官造成不利影响。因此, 如何去除菜籽粕中的抗营养因子含量对其在动物饲料中的应用具有重要意义。

目前, 有关微生物发酵处理菜籽粕的研究已有诸多报道, 微生物发酵法因高效和低能耗等优点成为改良菜籽粕植物源饲料品质的研究重点。利用微生物发酵菜籽粕, 大多以提高蛋白含量和脱毒为主要研究目标, 但对饲料业中采用植物乳杆菌和黑曲霉发酵菜籽粕生产生物饲料的研究尚未见报道。笔者以普通菜籽粕为原料, 采用植物乳杆菌和黑曲霉进行固态发酵, 探讨降解抗营养因子及提高粗蛋白含量最佳发酵工艺, 以为微生物发酵生产高品质生物活性饲料提供理论指导。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试验菌种。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*,

Lp1)、黑曲霉(*Aspergillus niger*, An1)。

1.1.2 原料。菜籽粕由江苏金太阳油脂有限公司提供。

1.1.3 培养基。MRS 培养基(培养植物乳杆菌): 葡萄糖 20 g, 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, 柠檬酸氢二铵 2 g, 无水乙酸钠 5 g, K₂HPO₄ 2 g, MnSO₄·H₂O 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.58 g, 琼脂 20 g, 吐温 80 1 ml, 用蒸馏水溶解并定容至 1 000 ml, pH 6.2~6.8(1 mol/L NaOH 调节), 115 °C 湿热灭菌 30 min。PDA 培养基(培养黑曲霉): 将马铃薯去皮切成小块, 称取 200 g 置于锅中, 加水 1 L 煮沸约 30 min, 6~8 层纱布滤成清液, 滤液中加入葡萄糖 20 g, 补充水分至 1 L, 琼脂 18~20 g, 加热至融化。液体种子培养基为上述培养基除去琼脂, 其他成分相同。

1.2 试验方法

1.2.1 液体种子液制备。从保存的各菌种挑取一环菌苔接入 50 ml 液体种子培养基中。植物乳杆菌接种到 MRS 培养基中, 38 °C 恒温培养箱中静置培养 48 h; 黑曲霉接种到 PDA 培养基中, 30 °C, 150 r/min 摇动培养 48 h。从上述培养好的菌液中按 2% 的接种量接种到各自发酵种子培养基, 150 r/min 摇动培养 24 h, 得发酵用菌种。

1.2.2 单菌发酵试验。原料粉碎过 40 目筛。菜籽粕、玉米粉、麦麸按 8:1:1 装入 500 ml 三角瓶中, 接种量 20%, 料水比为 1:0.8 g/ml, 用无菌玻璃棒搅拌均匀、封口, 置于恒温培养箱中培养 48 h, 50 °C 烘干后, 分析测定营养成分及抗营养因子含量。

作者简介 邱良伟(1985-), 男, 江苏徐州人, 研究实习员, 硕士, 从事畜禽健康养殖、饲料生物技术的研究。

收稿日期 2014-12-11

1.2.3 混菌发酵试验。固态发酵培养基经灭菌后接入混合菌种,植物乳杆菌和黑曲霉接种比例为3:1,接种量20%,料水比为1:0.8 g/ml,菜粕:玉米:麸皮=8:1:1,置于30℃恒温培养箱内发酵48 h,50℃烘干后,分析测定营养成分及抗营养因子含量。

1.3 发酵样品成分分析 常规营养成分分析包括水分、粗蛋白、粗纤维,检测方法参考《饲料分析及饲料质量检测技术》^[2]。硫代葡萄糖苷按硫脲紫外比色法^[3]测定。氨基酸的测定:酸水解、碱水解前处理方法参照GB/T 18246-2000,仪器为日立L8800全自动氨基酸分析仪。小肽的测定:参照周乃继的实验处理方法^[4],采用GB/T6432-1994测定。

2 结果与分析

2.1 单菌发酵菜籽粕营养成分的变化 从表1可以看出,枯草芽孢杆菌和黑曲霉均能有效地提高菜籽粕中粗蛋白含量和降低其抗营养因子的含量。经发酵处理后,菜籽粕中粗蛋白含量较未发酵组分别提高了3.56%、0.77%;异硫氰酸酯分别降低了35.99%、47.96%;噻唑烷硫酮分别降低了67.81%、70.22%;总硫苷分别降低了55.52%、61.62%。植物乳杆菌在提高菜籽粕粗蛋白效果方面优于黑曲霉,在降解

抗营养因子效果方面黑曲霉优于植物乳杆菌。

表1 单菌发酵菜籽粕中抗营养因子含量的变化

处理组	粗蛋白	异硫氰酸酯	噻唑烷硫酮	总硫苷
	%	mg/g	mg/g	mg/g
未发酵	41.57	1.25	1.98	3.22
植物乳杆菌组	43.05	0.80	0.68	0.64
黑曲霉组	41.89	0.65	0.72	0.59

2.2 混菌发酵菜籽粕营养成分的变化 从表2、3中可以看出,菜籽粕经过混菌固态发酵处理后,其营养成分和抗营养因子含量发生了明显的变化。经过多批次重复性试验,各项指标稳定。混合固态发酵后,菜籽粕中粗蛋白含量提高了6.57%,粗纤维含量降低了11.31%,小肽含量提高了88.76%;抗营养因子异硫氰酸酯降低了64.00%,噻唑烷硫酮降低了81.82%,硫苷降低了75.16%;赖氨酸含量提高了27.41%,蛋氨酸含量提高了2.35%,苏氨酸含量提高了41.60%,亮氨酸含量提高了2.83%,总氨基酸含量提高了11.59%。微生物发酵有效地改善了菜籽粕的营养成分,大大提高了其营养价值。

表2 菜籽粕发酵前后营养成分的变化(干物质基础)

发酵前后	干物质//%	粗蛋白//%	粗纤维//%	小肽//%	异硫氰酸酯//mg/g	噻唑烷硫酮//mg/g	总硫苷//mg/g
未发酵菜籽粕	89.89	41.53	10.17	3.56	1.25	1.98	3.22
发酵菜籽粕	92.20	44.17	9.02	6.72	0.45	0.36	0.80

表3 菜籽粕发酵前后主要氨基酸含量的变化(干物质基础) %

发酵前后	赖氨酸	蛋氨酸	苏氨酸	亮氨酸	总氨基酸
未发酵菜籽粕	1.35	0.85	1.25	2.12	30.29
发酵菜籽粕	1.72	0.87	1.77	2.18	33.80

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 单菌发酵菜籽粕营养成分的变化。大量研究表明,菜籽粕中硫苷为无毒或低毒物质,而其降解产物噻唑烷硫酮和异硫氰酸酯等能影响动物的生长发育。动物采食过量易造成生长缓慢、脏器肿大等不利影响^[5-6]。Rakariyatham等研究发现,硫苷葡萄糖等抗营养因子降解的根本原因可能与发酵过程中微生物活动有关^[7]。笔者进行的该试验中植物乳杆菌和黑曲霉均能有效地降解菜籽粕中的抗营养因子含量。王晓凡等采用植物乳杆菌固态发酵菜籽粕,菜籽粕中的硫苷降解率为56.42%^[8]。陈娟等研究白地霉、产朊假丝酵母、黑曲霉和热带假丝酵母4种菌组合发酵能较好地提高菜籽粕作为饲料蛋白的品质^[9]。菜籽粕发酵后除了能有效降低或去除抗营养因子,同时菜籽粕的粗蛋白含量也得到了提高,说明微生物发酵是改善菜籽粕营养价值的有效途径。从单菌发酵试验还可以发现,植物乳杆菌提高菜籽粕粗蛋白的效果优于黑曲霉,在降解抗营养因子效果方面,黑曲霉优于植物乳杆菌。

3.1.2 混合发酵菜籽粕营养成分的变化。研究发现,混合

菌种的发酵效果要好于单菌发酵效果,这与多菌种的协同作用密切相关。刘军等采用白地霉、米曲霉、宇佐美曲霉、少根根霉解、脂假丝酵母等复合菌种能将菜籽粕中的硫苷的含量大幅度降低,脱毒率高达99%^[10]。谢建坤等研究将筛选合适的菌种混合发酵菜粕后发现硫苷降解率达60%~80%,蛋白质增加率为12%^[11]。李延海等使用白地霉菌配合硫酸铵发酵处理菜籽粕,其蛋白含量提高6%左右^[12]。鞠兴荣等也研究发现,枯草芽孢杆菌与宇佐美曲霉混菌发酵的硫苷降解率最高,达到79.49%,同时和枯草芽孢杆菌与雅致放射毛霉混菌发酵的硫苷降解率都要高于其单菌发酵^[13]。王晓凡等研究表明,多菌种复合发酵优于单菌发酵,当植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、米曲霉接种比例为9%:6%:6%,优化后的发酵条件为pH 6.5,水料比1.2:1,33℃下发酵96 h,菜籽粕硫苷含量从33.33 mol/g下降到2.79 mol/g,降解率可达91.36%(干基),粗蛋白含量提高6.06个百分点(干基)^[8]。

该试验研究结果也充分表明,植物乳杆菌和黑曲霉混合发酵优于单菌发酵效果。混菌固态发酵不仅降低了菜籽粕中的抗营养因子含量,同时提高了菜籽粕的粗蛋白含量和小肽含量,大大提高了菜籽粕的营养价值。混合固态发酵处理后,粗蛋白和氨基酸含量明显高于未发酵组。粗蛋白和氨基酸含量的提高主要是由于两株菌的协同作用,微生物大量繁殖,向细胞外分泌一定量的多肽、酶等物质,同时利用底物及非蛋白氮合成大量菌体蛋白。发酵后菜籽粕中小肽含量也显著增加,小肽含量是评价蛋白饲料资源品质的重要指标之

一。小肽含量越高,表明菜籽粕的吸收利用率越高,肽能够促进蛋白质、氨基酸及微量元素的消化吸收,提高蛋白质沉积率,提高动物生产性能。该试验中菜籽粕发酵后小肽的含量比发酵前提高了 88.76%。微生物发酵过程中分泌的蛋白酶能将大分子的蛋白部分分解,这可能是促进菜籽粕发酵后小肽含量增加的主要因素。大分子蛋白质分解为动物易吸收的小分子肽或蛋白,菜籽粕消化利用率可得到明显提高。

3.2 结论 菜籽粕分别经过植物乳杆菌、黑曲霉处理后其抗营养因子均得到大幅度降解,其中黑曲霉的降解率高于植物乳杆菌,在改善菜籽粕营养品质方面植物乳杆菌效果优于黑曲霉。

研究表明,复合混菌发酵效果优于单菌发酵。该试验中植物乳杆菌和黑曲霉接种比例为 3:1,接种量 20%,料水比为 1:0.8 g/ml,菜粕:玉米:麸皮比为 8:1:1 时,菜籽粕中抗营养因子硫苷含量降低了 75.01%,粗蛋白含量提高了 7.05%,粗纤维含量降低了 11.31%,小肽含量提高了 88.76%,总氨基酸含量提高了 11.59%。普通菜籽粕经过植物乳杆菌和黑曲霉混合固态发酵处理后,营养价值得以提高,是非常优良的生物活性蛋白饲料资源。

(上接第 109 页)

用的香蕉品种较少,得到结果可能存在一定偏差,还需在更多香蕉品种上进行研究,而且接种后香蕉体内各种酶活性发生变化是现象还是本质,对于香蕉抗枯萎病的机制非常重要。

参考文献

- [1] 谢子四,张欣,陈业渊,等. 10 份香蕉种质对枯萎病的抗性评价[J]. 热带作物学报,2009,30(3):362-264.
- [2] 刘文清,周建坤,李洪波,等. 抗枯萎病香蕉新品种引种评价[J]. 广东农业科学,2010(3):110-113.
- [3] 陈石,郑加协,周红玲,等. 香蕉品种选育研究进展[J]. 现代农业,2010,32(1):55-58.
- [4] 李赤,黎永坚,于莉. 香蕉枯萎病菌对不同香蕉品种防御酶系的影响[J]. 中国农学通报,2010,26(17):251-255.
- [5] 胡莉莉. 香蕉抗枯萎病生理生化基础的研究[D]. 海南:华南热带农业大学,2006.
- [6] 孙建波,王宇光,赵平娟,等. 拮抗菌 XB16 在香蕉体内的定殖及对抗病相关酶活性的影响[J]. 热带作物学报,2010,32(2):122-126.
- [7] 李敏慧,习平根,姜子德,等. 广东香蕉枯萎病菌生理小种的鉴定[J]. 华南农业大学学报,2007,28(2):38-41.
- [8] 陈利锋,宋玉立,徐雍泉. 抗感赤霉病小麦品种超氧化物歧化酶和过氧化物氢酶的活性比较[J]. 植物病理学报,1997,27(3):209-213.
- [9] SCHAFFRATH U, SCHEINPFLUG H, REISENDR H J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties[J]. *Physiol Mol Pathol*, 1995, 46: 293-

参考文献

- [1] 邓露芳,范学珊,王加启. 微生物发酵粕类蛋白质饲料的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(6):25-30.
- [2] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 2 版. 北京:中国农业大学出版社,2003:46-56.
- [3] 余珠花,兰燕丽,吴幼青,等. 用硫脲紫外法测定菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷的检测分析及讨论[J]. 中国油脂,2003,28(10):40-43.
- [4] 周乃继. 棉籽肽饲料开发与与小肽的检测[D]. 合肥:安徽农业大学,2009.
- [5] TRIPATHI M K, MISHRA A S. Glucosinolates in animal nutrition: A review[J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2006, 132: 1-27.
- [6] 臧海军,张克英. 硫代葡萄糖苷及其对动物的抗营养作用[J]. 饲料博览:技术版,2008(1):13-16.
- [7] RAKARIYATHAM NUANSRI, PRAKONG SAKORN. Biodegradation of glucosinolates in brown mustard seed meal (*Brassica juncea*) by *Aspergillus* sp. NR-4201 in liquid and solid-state cultures[J]. *Biodegradation*, 2002, 13: 395-399.
- [8] 王晓凡,王海斌,熊光权,等. 多菌种复合固态发酵对菜籽粕硫苷去除效果的研究[J]. 粮食与油脂,2012,37(3):196-200.
- [9] 陈娟,刘军,张云鹏,等. 微生物降解菜籽粕中抗营养因子的研究[J]. 粮食与饲料工业,2010(7):10-12.
- [10] 刘军,朱文优. 菜籽粕发酵饲料的研制[J]. 食品与发酵工业,2006,33(1):69-71.
- [11] 谢建坤,张韬. 菜籽饼微生物发酵利用率[J]. 食品与发酵工业,1995(3):11-15.
- [12] 李延海,耿二强,张山林,等. 用微生物发酵脱毒菜籽粕[J]. 中国饲料,1997(17):35-37.
- [13] 鞠兴荣,王雪峰,王立峰,等. 混菌固态发酵菜籽粕制备菜籽肽的菌种筛选[J]. 食品与发酵工业,2011,37(9):104-107.

307.

- [10] SREERAMANAN S, MAZIAH M, SARIAH C, et al. Bioassay method for testing *Fusarium* wilt disease tolerance in transgenic banana[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 108: 378-389.
- [11] CHIS B. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 42(1):83-116.
- [12] 周林,程萍,喻国辉,等. 枯草芽孢杆菌 TR21 对香蕉抗病相关酶活的诱导作用[J]. 中国农学通,2011,27(2):185-190.
- [13] MOHAMMADI M, KAZEMI H. Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance[J]. *Plant Science*, 2002, 162: 491-498.
- [14] 铃木直治. 近代植物病理化学[M]. 张际中,等,译. 上海:上海教育出版社,1981.
- [15] 余叔之. 植物生理与分子生物学[M]. 北京:科学出版社,1992:417-423.
- [16] 惠勒. 植物病程[M]. 沈崇尧,译. 北京:科学出版社,1979:15-23.
- [17] 唐倩菲,杨娟. 香蕉受枯萎病菌侵染后酚类物质含量的变化[J]. 华南农业大学学报,2006,27(3):55-57.
- [18] MCCORD J M, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte prelin (Hemocuprein)[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1969, 11(25):6049-6055.
- [19] ANA R D C F, DE ASCENSÃO D C, DUBERY I A. Soluble and wall-bound plicolics and phenolic polymer in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Phytochemistry*, 2003, 63: 679-686.