

复合微生物固态发酵菜籽饼粕对抗营养因子去除条件的研究

管维¹, 兰时乐², 詹逸舒³, 李倩⁴, 谭日晓⁵, 王璇⁵

(1.湖南省衡阳市南岳区市场监督管理局, 湖南衡阳 421900; 2.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 420128; 3.湖南省常宁市畜牧水产事务中心, 湖南常宁 421500; 4.湖南省祁东县市场监督管理局, 湖南祁东 421600; 5.湖南省南岳区树木园, 湖南南岳 421900)

摘要 以菜籽饼粕为原料, 采用固态发酵法研究了单菌和混合菌发酵对菜籽饼中抗营养因子降解率的影响。通过单因素试验筛选了菜籽饼发酵去除抗营养因子的菌种及复合微生物固态发酵菜籽饼去除抗营养因子的条件。结果表明, 纳豆杆菌、侧胞杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草杆菌去除抗营养因子的效果比较明显。最佳条件如下: 发酵时间为 5 d, 发酵温度为 35 ℃, 接种量为 6%, 发酵 pH 为 6.5。在此条件下, 植酸、纤维素、单宁的降解率最高分别达到 93.74%、36.59% 和 14.75%。

关键词 菜籽饼; 植酸; 纤维素; 单宁; 发酵

中图分类号 S816.6 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)02-0189-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.055



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Removal Conditions of Anti-nutrients by Rapeseed Meal with Complex Microbe by Solid Fermentation

GUAN Wei¹, LAN Shi-le², ZHAN Yi-shu³ et al (1. Nanyue District Market Supervision Administration of Hengyang City, Hengyang, Hunan 421900; 2. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 420128; 3. Changning Animal Husbandry and Aquatic Affairs Center, Changning, Hunan 421500)

Abstract The effects of single microbe and mixed microbe fermentation on the degradation rate of anti-nutrients in rapeseed meal were studied by using solid fermentation method, with rapeseed meal as raw materials. Single factor experiment was used to screen out the detoxified strains for removing anti-nutritional factors and the removal conditions of anti-nutritional factors in rapeseed meal. The results showed that the optimal strains were *Bacillus natto*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis*. The optimal fermentation conditions were as follows: fermentation time 5 days, fermentation temperature of 35 ℃, inoculum size of 6%, fermentation pH value of 6.5. Under these conditions, the highest degradation rate of phytic acid, cellulose and tannin was 93.74%, 36.59% and 14.75% respectively.

Key words Rapeseed meal; Phytic acid; Cellulose; Tannin; Fermentation

油菜是我国重要的油料作物, 种植面积和总产量均位居世界第一。菜籽饼的营养价值与豆饼接近, 氨基酸组成接近联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)推荐值, 是一种优良天然植物蛋白资源。但由于菜籽饼含有硫苷、植酸、纤维素、单宁、芥子碱等抗营养物质, 因此菜籽饼用作饲料的应用受到很大限制^[1-3]。笔者通过以降解限制菜粕饲用的抗营养物质——植酸、单宁、纤维素为目标, 从研究室保藏的菌株中筛选出在菜籽饼粕上生长能力强、高效降解植酸、单宁、纤维素的菌株; 用筛选出的菌株混合发酵菜籽饼粕, 测定经发酵处理后的菜籽饼粕中各项抗营养因子的降解率^[4-8], 旨在为混合菌发酵菜籽饼粕制备益生蛋白饲料提供理论依据和数据参考^[9]。在菜粕发酵单因素优化条件研究的基础上, 探讨复合微生物固态发酵菜籽饼粕对抗营养因子的去除条件, 探讨菜籽饼脱毒的理想发酵时间、发酵温度、发酵接种量、发酵 pH, 并对其工艺进行优化, 以期获得最优的菜粕固态发酵工艺参数, 从而为菜粕的深度开发利用提供技术支持。

1 材料与方**1.1 材料**

1.1.1 菌种和菜籽饼粕。酵母菌、嗜酸乳杆菌、枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、侧胞芽孢杆菌, 购买于湖南农业大学生物科学技术学院微生物实验室; 菜籽饼粕购买于衡阳市南岳区迎宾市场菜籽榨油坊。

作者简介 管维(1986—), 女, 湖南衡阳人, 质量检验工程师, 硕士, 从事食品质量检验工作。

收稿日期 2019-07-01; **修回日期** 2019-07-19

1.1.2 主要仪器与设备。分光光度计, 型号 V-5000 型, 为上海元析仪器有限公司产品; 恒温搅拌循环水箱, 型号 H.H-60, 为常州市华普达教学仪器有限公司产品; 电子天平, 型号 KF3102, 为凯丰集团有限公司产品; 恒温鼓风干燥箱, 型号 DHG-9070 型, 为上海精宏实验设备有限公司产品; 恒温摇床, 型号 QYC 2112, 为上海福玛实验设备有限公司产品。

1.1.3 主要试剂及培养基。

1.1.3.1 发酵培养基。菜籽饼粕 88.7%; 麦麸 10%; 葡萄糖 1%; 磷酸二氢钾 0.2%; 七水硫酸镁 0.1%, 固体与水的比例是 1:1。在 125 ℃ 灭菌 25 min 即可。

1.1.3.2 PDA 培养基(不加琼脂)。马铃薯 20 g, 葡萄糖 2 g, 水 100 mL, pH 自然。125 ℃ 下湿热灭菌 25 min。

1.1.3.3 MRS 培养基: 葡萄糖 2.000%, 牛肉膏 1.000%, 蛋白胨 1.000%, 酵母提取物 0.500%, 磷酸二氢钾 0.200%, 三水醋酸钠 0.200%, 柠檬酸氢二铵 0.200%, 吐温-80 0.100%, 七水硫酸镁 0.058%, pH 6.2~6.4。125 ℃ 下湿热灭菌 25 min。

1.1.3.4 牛肉膏蛋白胨培养基(不加琼脂)。牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 水 1 000 mL, pH 7.0~7.2。125 ℃ 下湿热灭菌 25 min。

1.2 试验方法

1.2.1 植酸含量的测定。采用碘量法^[10]测定植酸含量。

1.2.2 纤维素含量的测定。采用硫代硫酸钠滴定(碘量法)^[11]测定纤维素含量。

1.2.3 单宁含量的测定。采用六氰合铁(III)酸亚铁钾吸光度法^[12-13]测定单宁含量。

1.2.4 种子培养和发酵培养。

1.2.4.1 种子培养。将保存于斜面上的菌种接种到种子液培养基中,37℃、180 r/min 振荡培养 2 d,备用。

1.2.4.2 发酵培养。将接种好的种子液按 6% (V/W) 的接种量接入发酵培养基中,37℃培养 5 d,50℃下烘干粉碎,测定抗营养因子的含量,并按以下公式计算出其降解率:降解率=发酵前的含量-发酵后的含量/发酵前的含量×100%。

1.2.5 菜籽饼去除抗营养因子菌种的筛选。将枯草杆菌、凝结杆菌、侧胞杆菌、酵母菌、乳酸菌、纳豆杆菌的种子液按 6% 接种发酵培养基中,35℃下培养 5 d,50℃下烘干粉碎,测定抗营养因子的含量。

1.2.6 复合菌发酵条件的研究。通过菜籽饼脱毒,筛选出 4 种菌(枯草杆菌、凝结杆菌、侧胞杆菌、纳豆杆菌)作为复合菌,发酵菜籽饼。改变菜籽饼固体发酵条件,如发酵温度、起始 pH、接种量及发酵时间,考察其对抗营养因子去除的影响。

2 结果与分析

2.1 单菌固体发酵菜籽饼对植酸降解率的影响 在 250 mL 三角瓶中装入 45 g 菜籽饼发酵培养基,调节含水量为 50%,pH 为 7.0,37℃下静置培养 6 d,每隔 1 d 摇动 1 次,50℃下烘干,测定植酸含量,并计算其降解率,结果如图 1 所示。由图 1 可知,用不同的微生物发酵后,菜籽饼中植酸的含量都有所降低,但降低程度各不相同。经过侧胞芽孢杆菌发酵的菜籽饼,其中植酸的降解率最高(89.22%),说明侧胞芽孢杆菌的脱毒效果最为明显。其次,枯草杆菌、纳豆杆菌、凝结杆菌的脱毒效果较为理想,降解率分别为 74.93%、69.74% 和 79.48%。这可能说明这 4 种菌能产生大量植酸酶,分解了菜籽饼中的植酸。脱毒效果较差的是酵母菌和嗜酸乳杆菌,降解率分别为 26.75% 和 11.56%。

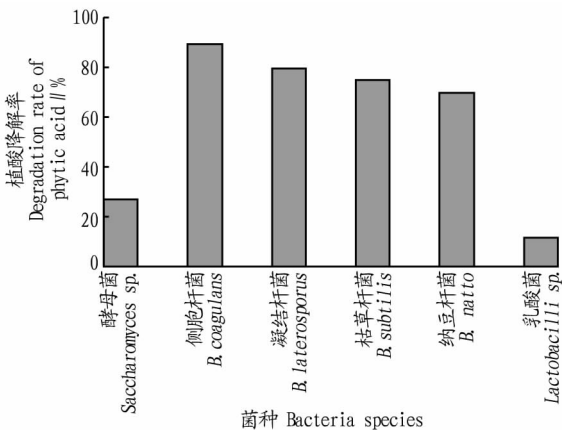


图 1 单菌固体发酵菜籽饼对植酸降解率的影响

Fig.1 The effects of single-bacteria solid fermented rapeseed meal on the degradation rate of phytic acid

2.2 单菌固体发酵菜籽饼对纤维素降解率的影响 在 250 mL 的三角瓶中装入 45 g 菜籽饼发酵培养基,调节含水量为 50%,pH 为 7.0,37℃下静置培养 6 d,每隔 1 d 摇动 1 次,50℃下烘干,测定纤维素含量,并计算其降解率,结果图 2 所示。

由图 2 可知,通过不同的微生物发酵后,其纤维素含量均有所降低。微生物在发酵的过程中产生了纤维素酶,纤维素酶

分解了纤维素,将纤维素转化为还原性糖可溶性物质,从而降低了其含量。其中,枯草芽孢杆菌对纤维素的降解率最高(30.75%),去除抗营养因子的效果最为明显。这可能是因为在发酵过程中微生物产生纤维素酶分解了纤维素。纳豆杆菌、凝结杆菌和侧胞杆菌的降解率分别为 23.15%、15.32% 和 15.32%。乳酸菌、酵母菌对纤维素的降解率较低(7.66%)。

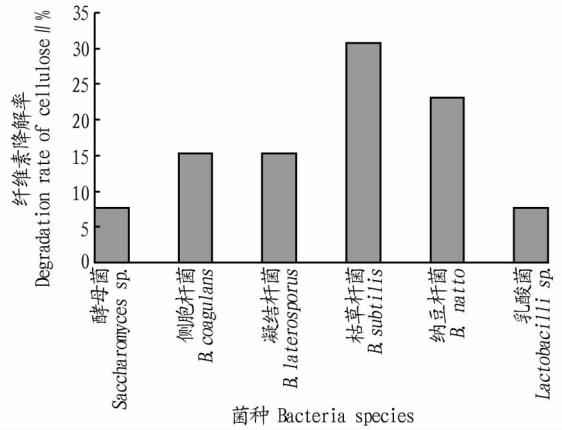


图 2 单菌固体发酵菜籽饼对纤维素降解率的影响

Fig.2 The effects of single-bacteria solid fermented rapeseed meal on the degradation rate of cellulose

2.3 单菌固体发酵菜籽饼对单宁降解率的影响

2.3.1 单宁标准曲线的绘制。分别测得不同单宁浓度下的吸光度,以试剂空白为对照,以容量瓶中单宁的浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,如图 3 所示。

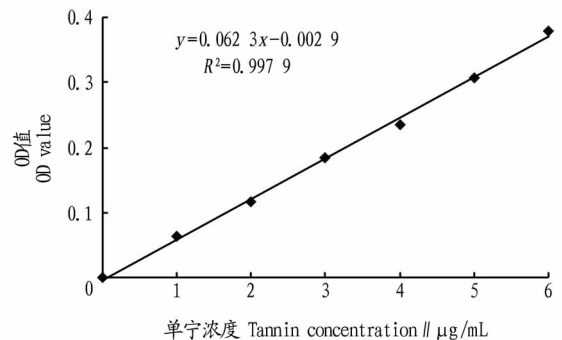


图 3 单宁的标准曲线

Fig.3 The standard curve of tannin

2.3.2 单菌发酵对单宁降解率的影响。在 250 mL 的三角瓶中装入 45 g 菜籽饼发酵培养基,调节含水量为 50%,pH 为 7.0,37℃下静置培养 6 d,每隔 1 d 摇动 1 次,50℃下烘干,测定单宁含量,并计算其降解率,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,通过微生物发酵后,各自菜籽饼中单宁的含量稍有降低,说明微生物在发酵的过程中产生的单宁酶降解了一部分单宁。其中枯草芽孢杆菌对单宁的降解率最高(10.62%),对菜籽饼的脱毒有一定的效果。侧胞杆菌、纳豆杆菌、凝结杆菌对单宁的降解率分别为 7.77%、5.44% 和 3.89%。酵母菌、乳杆菌对单宁的降解率最低分别为 2.85% 和 1.55%,说明乳杆菌几乎不降解单宁。

2.4 复合微生物发酵条件研究

2.4.1 发酵时间的确定。将发酵培养基置于 37℃、

180 r/min恒温振荡培养。从发酵第 2 天开始取样,以后每隔 1 d 取样 1 次,直至第 6 天终止培养,在 50 °C 下烘干粉碎,测定其抗营养因子的含量,并计算各抗营养因子(单宁、植酸、纤维素)的降解率。由图 5 可知,发酵时间达到 4 d 时,植酸的降解率达到最高,发酵天数为 5 d 时单宁、纤维素的降解率达到最高。发酵时间为 6、7 d 时,各抗因子的降解率基本保持不变。因此,发酵 5 d 是去除抗营养因子的最佳条件。

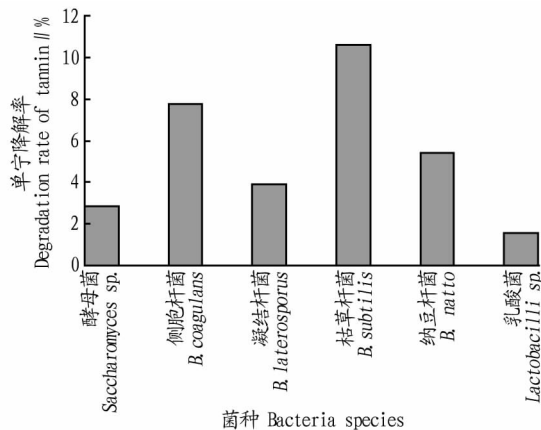


图 4 单菌发酵对单宁降解率的影响

Fig.4 The effects of single bacteria fermentation on the degradation rate of tannin

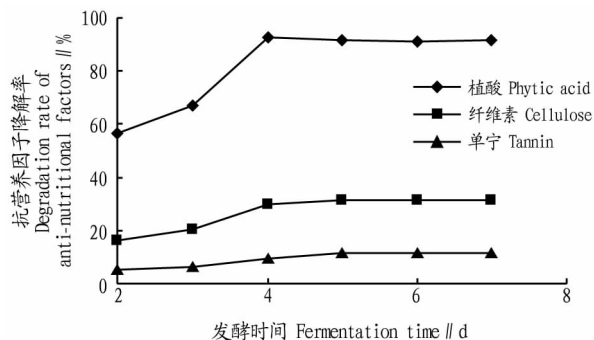


图 5 发酵时间对抗营养因子降解率的影响

Fig.5 The effects of fermentation time on the degradation rate of anti-nutritional factors

2.4.2 发酵温度的确定。设计发酵温度为 25、30、35、40 °C,在不同的温度下发酵 5 d,将采集样品在 50 °C 下烘干粉碎,测定其抗营养因子的含量,并计算各抗营养因子(单宁、植酸、纤维素)的降解率。

由图 6 可知,当发酵温度为 25 °C 时,抗营养因子的降解率很低,说明温度低不适合微生物的生长或影响酶的活性。当发酵温度为 30~35 °C 时,各抗营养因子的降解率达到最高。当发酵温度为 40 °C 时,各抗营养因子的降解率有所降低,温度高对微生物的生长、酶的活性都有影响。因此,发酵温度为 35 °C 是去除抗营养因子的最佳条件。

2.4.3 接种量的确定。发酵的接种量设置为 2%、4%、6%、8%和 10%,复合菌组比例为 1:1:1:1,35 °C 下发酵 5 d,发酵后采样在 50 °C 下烘干粉碎,测定其抗营养因子的含量,并计算各抗营养因子(单宁、植酸、纤维素)的降解率。由图 7 可知,当接种量为 2% 时,各抗营养因子的降解率几乎为零,说

明接种量太少时微生物的数量也少。当接种量为 6% 时,各因子的降解率达到最高。当接种量分别为 8% 和 10% 时,各因子的降解率有所降低,说明接种量大,微生物数量多,供微生物生长、活动的营养物质不够,导致微生物死亡。因此,发酵接种量为 6% 是去除抗营养因子的最佳条件。

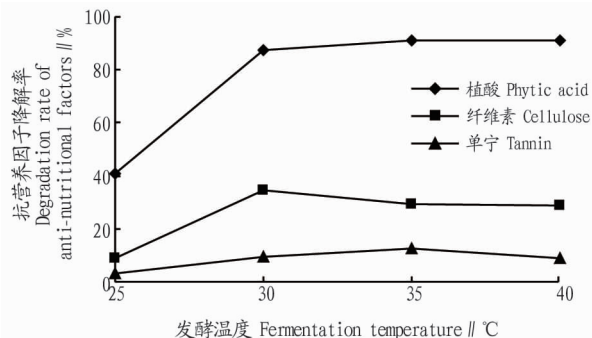


图 6 发酵温度对抗营养因子降解率的影响

Fig.6 The effects of fermentation temperature on the degradation rate of anti-nutritional factors

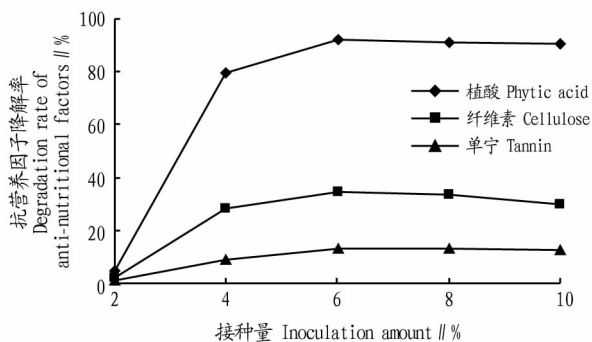


图 7 接种量对抗营养因子降解率的影响

Fig.7 The effects of inoculation amount on the degradation rate of anti-nutritional factors

2.4.4 发酵 pH 的确定。发酵的 pH 设置为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0,接种量为 6%,复合菌组内比例为 1:1:1:1,在 35 °C 下发酵 5 d,发酵后采样在 50 °C 下烘干粉碎,测定其抗营养因子的含量,并计算单宁、植酸、纤维素的降解率。

由图 8 可知,当 pH 为 5.5 时,各抗营养因子的降解率很低,说明偏酸性不适合微生物的生长,降低了各种酶的活性。

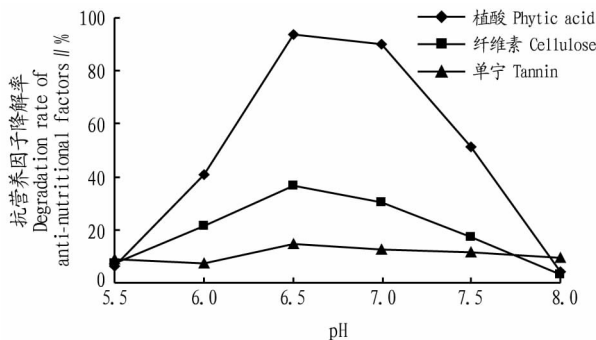


图 8 发酵 pH 对抗营养因子降解率的影响

Fig.8 The effects of fermentation pH on the degradation rate of anti-nutritional factors

表5 发酵正交试验结果

Table 5 Fermentation orthogonal test results

试验号 Test No.	A	B	C	D	酒精度 Alcohol content//%
1	1(22.5)	1(7)	1(15.0)	1(1.0)	13.8
2	1(22.5)	2(9)	2(17.5)	2(1.5)	14.9
3	1(22.5)	3(11)	3(20.0)	3(2.0)	14.3
4	2(25.0)	1(7)	2(17.5)	3(2.0)	15.7
5	2(25.0)	2(9)	3(20.0)	1(1.0)	14.6
6	2(25.0)	3(11)	1(15.0)	2(1.5)	14.2
7	3(27.5)	1(7)	3(20.0)	2(1.5)	13.9
8	3(27.5)	2(9)	1(15.0)	3(2.0)	12.4
9	3(27.5)	3(11)	2(17.5)	1(1.0)	13.6
k_1	14.3	14.5	13.5	14.0	
k_2	14.8	14.0	14.7	14.3	
k_3	13.3	14.0	14.3	14.1	
R	1.5	0.5	1.3	0.3	

为1.168,色泽鲜亮玫红。最佳发酵工艺条件为主发酵温度25℃、主发酵时间7d、白砂糖添加量17.5%、酵母接种量1.5%,以最佳工艺条件发酵制得的玫瑰花发酵酒酒精度为14.8%,色泽玫红鲜亮,酒香醇厚、回味明显、带有玫瑰花独特的风味、极具个性。

参考文献

- [1] 徐怀德,刘鄂涓,李元瑞,等.几种干花成分分析及玫瑰花饮料加工技术研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(3):91-94,98
- [2] 马猛华,崔波,于海峰,等.玫瑰花的研究进展[J].山东轻工业学院学报,2008,22(4):38-42.
- [3] 马俊,王康才.中国药用玫瑰本草考证与生产开发现状[J].现代中药研究与实践,2008,22(1):32-34.
- [4] 罗浪,王义强,王启业,等.酿造保健酒的研究进展[J].中国酿造,2014,33(9):5-8.
- [5] 孙长花,张素华.不同发酵条件对花卉酒品质影响的研究[J].食品与发酵科技,2009,45(4):9-12.
- [6] 周翠英,王珏伟,卞春娥.我国花卉食品的开发利用及展望[J].食品研究与开发,2004,25(4):16-18.
- [7] 罗浪.玛咖发酵酒酿造技术研究[D].长沙:中南林业科技大学,2015:7-9.
- [8] 郑淑彦,王恒禹,余汪平,等.玫瑰酒发酵工艺[J].食品工业科技,2017,38(22):114-118,124.

(上接第191页)

当pH为6.5时,降解率达到最高。当pH在7.0以上时,各因子的降解率逐渐降低。这说明碱性环境不适合微生物的生长与活动。因此,发酵的pH为6.5是去除抗营养因子的最佳条件。

3 结论

该研究对复合微生物固态发酵菜籽饼粕对抗营养因子的去除条件进行研究。从实验室提供的6种菌(酵母菌、嗜酸乳杆菌、枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、侧胞芽孢杆菌)中筛选出对抗营养因子(单宁、植酸、纤维素)降解率较高的4种优良菌株(枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、侧胞芽孢杆菌),用4种优良菌株复合微生物来发酵菜籽饼粕。研究去除抗营养因子的4个条件因素(发酵时间、发酵温度、发酵接种量、发酵pH)。确定其他变量,设计单一变量,筛选出每个变量的最优条件。该试验结果表明,最佳发酵条件为发酵时间为5d,发酵温度为35℃,接种量为6%,发酵pH为6.5。

参考文献

- [1] 刘文冰.浅析我国油菜生产的现状与发展[J].中国种业,2005(1):17.
- [2] 刘纹芳,阴季梯.菜籽饼发酵脱毒的研究[J].中国饲料,1994(7):36-37.
- [3] 阮再洪.菜籽蛋白质资源的开发与利用[J].粮食与饲料工业,1994(9):18-19.
- [4] 苏李伟.菜籽饼微生物脱毒生产高效蛋白饲料的可行性分析[J].新疆畜牧业,1998(4):32-33.
- [5] 周爱东,杨红晓,贺祝.菜籽饼粕脱毒及菜籽蛋白提取的研究进展[J].黑龙江农业科学,2008(1):97-99,104.
- [6] 朱文优,李华兰,周守叙.菜籽粕脱毒方法及其特点[J].粮食与食品工业,2009,16(2):6-8,10.
- [7] 黎娇凌,黄永光.菜籽饼脱毒方法及其饼粕利用研究进展[J].贵州农业科学,2007,35(6):136-138,142.
- [8] 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):40-42.
- [9] 黄茜,钮琰星,倪光远,等.菜籽饼粕饲用品质改良菌株的筛选与混合发酵[J].食品与发酵工业,2009,35(10):73-76.
- [10] 余以刚,钱海峰,姚惠源.碘量法检测植酸含量方法的校正[J].中国粮油学报,1999,14(2):60-62.
- [11] 熊素敏,左秀凤,朱永义.稻壳中纤维素、半纤维素和木质素的测定[J].粮食与饲料工业,2005(8):40-41.
- [12] 杨伟,曲祥金.吸光光度法测定啤酒花中的鞣酸[J].山东农业大学学报,1990(1):63-66.
- [13] 杨伟,曲祥金.六氰合铁(III)酸亚铁钾吸光光度法测定啤酒花中的单宁[J].山东农业大学学报,1989(2):36-40.