

DOI:10.3969/j.issn.2096-8248.2024.03.001

鱼源枯草芽孢杆菌 J5 发酵棉粕条件优化*

徐一力¹, 戴子凡¹, 陈铭川¹, 丁皓天¹, 吴冰¹, 纪逸¹, 陈香凝¹, 丁祝进¹,
魏朝青¹, 程汉良¹, 孙宜防², 许建和¹

(1. 江苏海洋大学 海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005;
2. 沐阳县周集乡孙宜防水产养殖专业合作社, 江苏 宿迁 223699)

摘要: 为了探究鱼源枯草芽孢杆菌 J5 在不同发酵条件下对棉粕中抗营养因子去除效果和棉粕营养成分影响, 以鱼源枯草芽孢杆菌 J5 为发酵菌种, 依据温度、湿度、接种量和发酵时间设计 4 因素 3 水平正交试验 L₉(3⁴)。结果表明, 温度 30 °C, 湿度 60%, 接种量 5%, 发酵 4 d, 游离棉酚脱毒率最高达 94.8%, 植酸含量显著下降, 同时发酵后棉粕中粗蛋白含量显著上升。以游离棉酚、植酸、粗蛋白主效应分析结果得到的 3 组发酵条件发酵后, 与未发酵组相比发酵棉粕中氨基酸含量和组成均优于其他组别。因此, 鱼源枯草芽孢杆菌 J5 对棉粕最适发酵条件为温度 30 °C、湿度 60%、接种量 5%、发酵时间 4 d。

关键词: 发酵棉粕; 枯草芽孢杆菌 J5; 正交试验; 棉酚

中图分类号: S963.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-8248(2024)03-0001-08

引用格式: 徐一力, 戴子凡, 陈铭川, 等. 鱼源枯草芽孢杆菌 J5 发酵棉粕条件优化[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2024, 33(3):1-8.

Optimization of the Fermentation Conditions for Cottonseed Meal by Fish-derived *Bacillus subtilis* J5

XU Yili¹, DAI Zifan¹, CHEN Mingchuan¹, DING Haotian¹, WU Bing¹, JI Yi¹,
CHEN Xiangning¹, DING Zhujin¹, WEI Chaoqing¹, CHENG Hanliang¹, SUN Yifang², XU Jianhe¹

(1. School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2. Sun Yifang Aquaculture Professional Cooperative in Zhouji Township, Shuyang County, Suqian 223699, China)

Abstract: In order to investigate the effect of fish-derived *Bacillus subtilis* J5 on the elimination of anti-nutritional factors and the nutritional composition of cottonseed meal under different fermentation conditions, *Bacillus subtilis* J5 from the gut of common carp was used as a fermentation strain in the experiment. An orthogonal experiment L₉(3⁴), four-factors and three-levels was designed to obtain the optimal combination of temperature, humidity, inoculation amount, and fermentation duration for the best fermentation effect of cottonseed meal. The results showed that the highest detoxification rate of free gossypol in the cottonseed meal was achieved when the humidity was 60%, and the inoculation amount was 5% at 30 °C for 4 d fermentation. Under this condition, 94.8% free gossypol in the cottonseed meal was eliminated with a signifi-

* 收稿日期: 2024-01-29; 修订日期: 2024-04-04

基金项目: 江苏省科技支撑项目(苏北科技专项)(SZ-SQ2021034); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20201465); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX22_1663)

作者简介: 徐一力(1998—), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料, (E-mail)1942084205@qq.com。

通信作者: 许建和(1976—), 男, 江苏淮安人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为水产动物营养与饲料, (E-mail)jianhexu218@163.com。

cant decrease of phytic acid content while the crude protein content of cottonseed meal significantly increased. The composition and amount of amino acids in the fermented cottonseed meal groups were superior to those in the unfermented group. In conclusion, the optimum fermentation conditions of *Bacillus subtilis* J5 for cottonseed meal were 60% humidity combined with 5% inoculation amount at 30 °C for 4 d fermentation.

Key words: fermented cottonseed meal; *Bacillus subtilis* J5; orthogonal experiment; gossypol

0 引言

我国是世界上水产养殖规模最大的国家。随着养殖产业快速发展,水产饲料需求大幅增大,尤其对饲料用蛋白原料资源需求日趋紧张^[1]。水产饲料用蛋白源主要为鱼粉和豆粕,但目前国内这两种蛋白原料主要依赖进口,为此国家层面提出了鱼粉和豆粕减量替代行动方案,以减少上述蛋白原料对国外的依赖,从而保证我国饲料产业发展安全^[2]。因此开发利用新型蛋白源替代上述蛋白源也是当下饲料研究的热点方向之一。棉粕作为一种重要的植物蛋白源,其粗蛋白含量高达40%~50%,除赖氨酸和色氨酸含量较低外,其营养组成能够满足水产动物需求^[3],但棉粕中游离棉酚、植酸等抗营养因子的存在会影响水产动物的生长性能和肠道健康^[4-6],限制了棉粕在水产饲料中的大规模应用。去除棉粕中抗营养因子的方法主要包括挤压膨化法(物理处理)、溶剂萃取法(化学处理)和生物发酵法(微生物处理)等^[7]。这3种方法均可以显著降低棉粕棉酚含量,但挤压膨化法会降低棉粕营养价值,且成本较高;溶剂萃取法会降低棉粕适口性。相比之下,生物发酵法具有成本低、脱毒率高、可提高棉粕营养价值等优点,是目前棉粕脱毒常用方法^[8]。目前已报道用于棉粕发酵的菌种主要包括:乳酸菌(*Lactobacillus*)^[9]、酵母菌(*Saccharomyces*)^[10]和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[11]等,这些发酵菌株均来自于陆地,在水体环境中是否能有效定殖还需进一步验证。如能利用鱼体自身分离的菌株,对棉粕进行发酵脱毒,并用发酵后的棉粕部分替代饲料中的豆粕,将具有广阔的产业应用前景。本研究利用鲤鱼肠道分离出来的一株枯草芽孢杆菌J5在不同发酵条件下对棉粕进行发酵,验证该菌株对棉粕中抗营养因子的去除效果和棉粕营养组分的影响,为该菌株后续应用于水产饲料生产提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 棉粕

实验用棉粕购自金汇油脂责任有限公司(新疆石河子),其中游离棉酚含量1200 mg/kg,粗蛋白质量分数为46%,发酵前粉碎后过60目筛。

1.2 菌种

菌种从鲤鱼肠道中分离,经生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定为枯草芽孢杆菌,将其命名为J5^[12]。

1.3 培养基与菌液制备

将分离纯化后的枯草芽孢杆菌J5接种到LB肉汤液体培养基中,摇床37 °C,转速300 r/min培养3 d。稀释涂布平板法计算菌液浓度,菌液浓度为 6×10^8 CFU。

1.4 实验设计

前期研究发现对棉粕发酵效果影响较大的4个因素为:温度(A)、湿度(B)、接种量(C)和发酵时间(D)。因此本实验选取上述4个因素,每个因素设置3个水平进行正交试验,分析主效应,推测最佳组合(见表1)。以发酵后棉粕中粗蛋白、游离棉酚和植酸含量结果分析主次效应,确定最适发酵条件,分别记为粗蛋白(crude protein, CP)组、游离棉酚组(free gossypol, FG)和植酸(phytic acid, PA)组,正交试验各组最优结果组记为最优(optimal group, OG)组。根据发酵后棉粕中游离棉酚、植酸和粗蛋白结果,与对照组(control test, CT)结果相比较,分析最适发酵条件,并检测其氨基酸组成。

表1 正交发酵试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal fermentation test

水平	因素			
	温度/°C	湿度/%	接种量/%	发酵时间/d
1	30	40	3	3
2	35	50	5	4
3	40	60	8	5

1.5 棉粕发酵

利用 SPSS 23 软件设计 L₉(3⁴) 正交试验, 获得 9 个实验发酵条件组合(见表 2), 每个组合设 3 个重复, 计 27 组。将温度、湿度、接种量和发酵时间分别用 A, B, C 和 D 代替, 按照表 2 进行分配成袋。发酵前将棉粕装入密封袋中进行高温灭菌, 然后取灭菌后的棉粕按 500 g/组分装至密封袋中, 接种不同剂量发酵菌株放入恒温培养箱中进行发酵。发酵完成后灭菌, -20 °C 留样待测。

表 2 棉粕发酵条件正交试验分组

Table 2 Orthogonally experimental groups of cottonseed meal fermentation conditions

组别	A	B	C	D
1	3	3	1	2
2	1	2	3	2
3	3	1	3	3
4	2	1	2	2
5	2	3	3	1
6	1	1	1	1
7	1	3	2	3
8	2	2	1	3
9	3	2	2	1

1.6 测定参数及方法

发酵棉粕游离棉酚含量参照《饲料中游离棉酚的测定方法》(GB/T 13086—2020) 进行, 植酸含量使用苏州科铭生物技术有限公司植酸试剂盒测定, 粗脂肪含量参照《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》(GB 5009. 6—2016) 进行, 粗蛋白含量参照《饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法》(GB/T 6432—2018) 进行, 氨基酸含量参照《饲料中氨基酸的测定》(GB/T 18246—2019) 进行。

1.7 数据统计及分析

正交试验结果利用 SPSS 23 软件进行一般线性模型中的单变量分析, 用 Duncan's 进行显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同发酵条件对棉粕中棉酚和植酸含量的影响

不同发酵条件对棉粕中游离棉酚含量的影响见表 3。由表 3 可知, 发酵前棉粕中游离棉酚含量为 1 163.9 mg/kg, 经实验菌株发酵后所有实验组中游离棉酚含量均显著降低 ($P < 0.05$), 其中第 7 组下降最为明显, 为 61 mg/kg。发酵棉粕中游离棉酚

主体间效应检验结果见表 4。从表 4 中可看出, A, B, C 和 D 4 因素对芽孢杆菌发酵后棉粕中游离棉酚含量均具有极显著影响 ($P < 0.01$)。

根据表 3 中的 R 值判断各因素对游离棉酚含量影响的重要性依次为 $B > A > D > C$, 即湿度 $>$ 温度 $>$ 发酵时间 $>$ 接种量。结合表 4 结果, 选择各因素中 k 值最小的水平为最优参数, 可得最优发酵条件为 A1B3C2D2, 即温度 30 °C, 湿度 60%, 接种量 5%, 发酵 4 d。

表 3 发酵棉粕中游离棉酚含量正交试验与极差分析结果 (干物质)

Table 3 Results of orthogonal experiment and range analysis of free gossypol content in fermented cottonseed meal (dry matter basis)

组别	A	B	C	D	游离棉酚含量/(mg·kg ⁻¹)
1	3	3	1	2	89.80±3.56**
2	1	2	3	2	128.36±6.35**
3	3	1	3	3	226.27±7.32**
4	2	1	2	2	142.02±1.40**
5	2	3	3	1	159.76±2.27**
6	1	1	1	1	125.16±4.72**
7	1	3	2	3	61.00±1.10**
8	2	2	1	3	222.26±1.57**
9	3	2	2	1	233.27±7.64**
对照	0	0	0	0	1 163.90±2.30
K_1	943.54	1 480.33	1 311.64	1 554.55	
K_2	1 572.09	1 751.64	1 308.86	1 080.51	
K_3	1 648.01	931.66	1 543.14	1 528.58	
k_1	104.84 ^c	164.48 ^b	145.74 ^b	172.73 ^a	
k_2	174.68 ^b	194.63 ^a	145.43 ^b	120.06 ^b	
k_3	183.11 ^a	103.52 ^c	171.46 ^a	169.84 ^a	
R	78.28	91.11	26.03	52.67	

注: 同列数据上标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), “*”表示差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

表 4 发酵棉粕中游离棉酚主体间效应检验

Table 4 Test of main effect of free gossypol in fermented cottonseed meal

项目	平方和	自由度	均方	F	显著性
模型	91 807.476 ^a	8	11 475.94	521.62	0.000
截距	642 069.844	1	642 069.84	29 184.39	0.000
温度/°C	33 227.159	2	16 613.58	755.15	0.000
湿度/%	38 778.801	2	19 389.40	881.32	0.000
接种量/%	4 018.212	2	2 009.11	91.32	0.000
发酵天数/d	15 783.304	2	7 891.65	358.70	0.000
残差	396.008	18	22.00		
总变异	734 273.328	27			
修正后总计	92 203.485	26			

注: $a: R^2 = 0.996$ (调整后 $R^2 = 0.994$)。

不同发酵条件对棉粕中植酸含量的影响见表5。从表5中可以看出,除第5组外,其他各发酵组植酸含量均显著降低。通过 R 值判断,各因素对植酸含量影响的重要性依次为 $D>C>B>A$,即发酵时间 $>$ 接种量 $>$ 湿度 $>$ 温度。

由表6可知,温度、湿度和接种量对芽孢杆菌发酵后的棉粕中植酸含量均具有显著影响($P<0.05$)。发酵时间对植酸含量具有极显著影响($P<0.01$)。结合表5结果,选择各因素中 k 值最小的水平为最优参数,可得最优发酵条件为A3B2C1D3,即 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度50%,接种量3%,发酵5d。

表5 发酵棉粕中植酸含量正交试验与极差分析结果
(干物质)

Table 5 Results of orthogonal experiment and range analysis of phytic acid content in fermented cottonseed meal (dry matter basis)

组别	A	B	C	D	植酸含量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
1	3	3	1	2	$11.41\pm 0.41^{**}$
2	1	2	3	2	$11.91\pm 0.16^{**}$
3	3	1	3	3	$11.86\pm 0.39^{**}$
4	2	1	2	2	$11.93\pm 0.18^{**}$
5	2	3	3	1	12.73 ± 0.23
6	1	1	1	1	12.51 ± 0.29
7	1	3	2	3	$11.81\pm 0.28^{**}$
8	2	2	1	3	$11.37\pm 0.35^{**}$
9	3	2	2	1	$11.87\pm 0.04^{**}$
对照	0	0	0	0	12.88 ± 0.17
K_1	108.70	108.91	105.89	112.54	
K_2	108.08	106.64	108.03	105.74	
K_3	106.63	107.86	109.49	105.12	
k_1	12.08 ^a	12.10 ^a	11.77 ^b	12.50 ^a	
k_2	12.01 ^a	11.85 ^b	12.00 ^b	11.75 ^b	
k_3	11.85 ^b	11.98 ^{ab}	12.17 ^a	11.68 ^b	
R	0.23	0.25	0.40	0.82	

表6 发酵棉粕中植酸主体间效应检验

Table 6 Test of main effect of phytic acid in fermented cottonseed meal

项目	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	4.757 ^a	8	0.595	7.233	0.000
截距	3 844.712	1	3 844.712	46 767.313	0.000
温度/ $^{\circ}\text{C}$	0.678	2	0.339	4.124	0.034
湿度/%	0.708	2	0.354	4.308	0.030
接种量/%	0.778	2	0.389	4.731	0.022
发酵天数/d	2.593	2	1.296	15.770	0.000
残差	1.480	18	0.082		
总变异	3 850.949	27			
修正后总计	6.237	26			

注: $aR^2=0.763$ (调整后 $R^2=0.657$)。

2.2 不同发酵条件对棉粕中粗蛋白含量的影响

不同发酵条件下棉粕粗蛋白含量见表7。与对照组相比,第2组和第5组棉粕中粗蛋白含量极显著上升($P<0.01$),第3组粗蛋白含量显著上升($P<0.05$),其余各组粗蛋白含量与对照组无显著差异,但总体呈上升趋势。根据 R 值判断各因素对粗蛋白影响的重要性依次为 $C>D>B>A$,即接种量 $>$ 发酵时间 $>$ 湿度 $>$ 温度。由表8可知,仅接种量对发酵后棉粕中粗蛋白含量有显著影响($P<0.01$)。结合表7和表8结果,选择各因素中 k 值最大的水平为最优参数,可得最优发酵条件为A2B3C3D3,即温度 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度60%,接种量8%,发酵5d。

表7 发酵棉粕中粗蛋白含量正交试验与极差分析结果
(干物质)

Table 7 Results of orthogonal experiment and range analysis of crude protein in fermented cottonseed meal (dry matter basis)

组别	A	B	C	D	粗蛋白含量/%
1	3	3	1	2	49.51 ± 1.04
2	1	2	3	2	$50.42\pm 0.21^{**}$
3	3	1	3	3	$50.32\pm 0.28^{*}$
4	2	1	2	2	49.29 ± 0.19
5	2	3	3	1	$50.56\pm 0.40^{**}$
6	1	1	1	1	48.69 ± 0.59
7	1	3	2	3	49.59 ± 0.24
8	2	2	1	3	49.70 ± 1.08
9	3	2	2	1	48.83 ± 0.31
对照	0	0	0	0	48.99 ± 0.63
K_1	446.09	444.89	443.70	444.35	
K_2	448.74	446.83	443.12	447.67	
K_3	445.98	449.09	453.99	448.79	
k_1	49.57	49.43	49.30 ^b	49.37	
k_2	49.86	49.65	49.24 ^b	49.74	
k_3	49.55	49.90	50.44 ^a	49.87	
R	0.31	0.47	1.21	0.49	

表8 发酵棉粕中粗蛋白主体间效应检验

Table 8 Test of main effect of crude protein in fermented cottonseed meal

项目	平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	11.011 ^a	8	1.376	4.032	0.007
截距	66 584.327	1	66 584.327	195 052.814	0.000
温度/ $^{\circ}\text{C}$	0.543	2	0.272	0.796	0.466
湿度/%	0.980	2	0.490	1.436	0.264
接种量/%	8.304	2	4.152	12.163	0.000
发酵天数/d	1.183	2	0.591	1.732	0.205
残差	6.145	18	0.341		
总变异	66 601.482	27			
修正后总计	17.155	26			

注: $aR^2=0.642$ (调整后 $R^2=0.483$)。

2.3 优化发酵对棉粕抗营养因子和常规营养成分的影响

以发酵后棉粕中粗蛋白、游离棉酚和植酸含量结果分析主次效应,优化发酵条件后对棉粕中抗营养因子含量影响见表 9。由表 9 可知,FG 组发酵棉

粕游离棉酚含量低于 OG 组但无显著差异($P > 0.05$);其余优化组虽然显著高于 OG 组和 FG 组($P < 0.05$),但显著低于 CT 组($P < 0.05$)。各发酵组棉粕植酸含量显著低于对照组($P < 0.05$),其中 OG 组显著高于 PA 组($P < 0.05$)。

表 9 优化发酵棉粕对棉粕中抗营养因子含量影响(干物质)

Table 9 Effect of optimized fermentation on the anti-nutritional material content of cottonseed meal (dry matter basis)

指标	CT	OG	CP	PA	FG
游离棉酚含量/(mg·kg ⁻¹)	1 163.90±2.30 ^a	61.00±1.10 ^d	157.61±0.95 ^c	222.48±2.18 ^b	59.05±2.06 ^d
植酸含量/(mg·g ⁻¹)	12.88±0.17 ^a	11.37±0.35 ^c	11.62±0.16 ^c	10.97±0.08 ^d	12.11±0.11 ^b

注:同行数据上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

由表 10 可以看出,芽孢杆菌对棉粕中常规营养成分的影响情况为:OG 组与 CP 组之间粗蛋白含量差异不显著($P > 0.05$),但显著高于对照组($P <$

0.05)。对粗脂肪含量的影响情况为:OG 组与 PA 组之间差异不显著($P > 0.05$),但显著低于对照组($P < 0.05$)。

表 10 优化发酵棉粕对棉粕中常规营养成分影响(干物质)

Table 10 Effect of optimized fermentation on the nutritional composition of cottonseed meal (dry matter basis)

指标	CT	OG	CP	PA	FG
粗蛋白含量/%	48.99±0.63 ^b	50.56±0.40 ^a	50.94±0.13 ^a	49.45±0.27 ^b	49.07±0.14 ^b
粗脂肪含量/%	0.56±0.00 ^a	0.46±0.01 ^b	0.36±0.00 ^c	0.47±0.02 ^b	0.33±0.01 ^d

2.4 优化发酵对棉粕氨基酸含量的影响

经优化后的 3 组,发酵棉粕对氨基酸的影响如表 11 所示。从表 11 可以看出,必需氨基酸发酵后除蛋氨酸和精氨酸外其余必需氨基酸含量显著上升

($P < 0.05$)。

大部分非必需氨基酸较发酵前也存在显著上升($P < 0.05$),总氨基酸含量无显著差异($P > 0.05$),呈味氨基酸也较发酵前显著提高($P < 0.05$)。

表 11 优化发酵对棉粕氨基酸含量的影响(干物质)

Table 11 Effect of optimized fermentation conditions on the amino acid content of cottonseed meal (dry matter basis) %

氨基酸	CT	CP	PA	FG
必需氨基酸 EAA				
赖氨酸 Lys	2.38±0.06 ^a	2.28±0.04 ^b	1.98±0.02 ^c	2.43±0.03 ^a
苏氨酸 Thr	1.96±0.05 ^b	2.00±0.02 ^a	1.95±0.02 ^{ab}	2.00±0.01 ^a
缬氨酸 Val	2.73±0.05 ^b	2.89±0.05 ^a	2.81±0.03 ^a	2.86±0.02 ^a
蛋氨酸 Met	1.08±0.04	1.09±0.01	1.09±0.02	1.10±0.00
异亮氨酸 Ile	1.82±0.05 ^c	1.95±0.03 ^a	1.86±0.02 ^b	1.91±0.01 ^{ab}
亮氨酸 Leu	3.54±0.09	3.76±0.07	3.60±0.04	3.69±0.02
苯丙氨酸 Phe	3.36±0.06 ^b	3.61±0.05 ^a	3.55±0.04 ^a	3.51±0.02 ^a
组氨酸 His	1.02±0.01 ^c	1.26±0.01 ^a	1.27±0.02 ^a	1.16±0.04 ^b
精氨酸 Arg	7.50±0.23 ^a	6.93±0.11 ^b	6.53±0.08 ^c	7.18±0.19 ^b
非必需氨基酸 NEAA				
谷氨酸 Glu [△]	12.21±0.32 ^b	12.83±0.19 ^a	12.74±0.11 ^a	12.81±0.08 ^a
甘氨酸 Gly [△]	2.52±0.07	2.58±0.04	2.56±0.02	2.59±0.01
丙氨酸 Ala [△]	2.32±0.06 ^b	2.44±0.04 ^a	2.36±0.02 ^{ab}	2.44±0.02 ^a
天冬氨酸 Asp [△]	5.59±0.15	5.63±0.08	5.52±0.04	5.63±0.03
半胱氨酸 Cys	3.31±0.10	3.30±0.05	3.22±0.02	3.25±0.10
酪氨酸 Tyr	0.27±0.01 ^a	0.25±0.02 ^{ab}	0.25±0.02 ^b	0.24±0.01 ^b
脯氨酸 Pro	2.17±0.06 ^b	2.27±0.04 ^a	2.22±0.02 ^{ab}	2.25±0.01 ^a
丝氨酸 Ser	2.56±0.05	2.61±0.03	2.56±0.02	2.64±0.01
呈味氨基酸 DAA	22.60±0.60 ^b	23.48±0.35 ^a	23.18±0.20 ^{ab}	23.47±0.07 ^a
必需氨基酸 EAA	16.81±0.45 ^b	17.58±0.28 ^a	16.83±0.17 ^b	17.50±0.05 ^a
总氨基酸 TAA	56.23±1.53	57.65±0.87	56.07±0.51	57.68±0.09

注:“△”代表呈味氨基酸。

3 讨论

3.1 发酵条件对去除棉粕中抗营养因子效果的影响

棉粕因其中游离棉酚、植酸和单宁等抗营养因子的存在,很难被有效利用^[13]。Du等^[14]通过固态发酵使游离棉酚的脱毒率达到81.7%,同时提高了粗蛋白含量;Zhang等^[15]分离出36株凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*),通过对菌株的筛选、发酵温度、接种量、料水比、发酵时间等条件优化,发酵后的棉粕脱毒率达到了81.3%,优化后的发酵条件为40℃、接种15%、料水比1:1(g/mL)、发酵52h。洪振^[16]以脱毒率为指标,通过正交试验得到最高脱毒率的发酵条件:30℃、料水比0.8:1(g/mL)、接种量5.5%、发酵5d,脱毒率达85.11%,同时粗蛋白含量提高4.1%;金红春等^[17]使用复合益生菌通过正交试验发酵棉粕以脱毒率为主,发现在40℃、含水量50%、接种6%的条件下游离棉酚的去除率达96.52%。在本文实验中,用芽孢杆菌J5通过设计L₉(3⁴)正交试验发酵棉粕9组,其中脱毒率最高达94.8%,最低80%,均显著降低了棉粕含量,与上述实验结果一致;实验发现4个因素对游离棉酚含量影响显著,影响脱毒率因素排序为:湿度>温度>发酵时间>接种量,最佳发酵条件为30℃、60%含水量、接种5%芽孢杆菌、发酵时间4d。

植酸是植物性饲料中普遍存在的一种抗营养物质。有研究表明,植酸可与锌、铁、钙等金属离子螯合形成不溶性络合物,从而影响鱼类对矿物质的吸收^[18];和小黑^[19]以枯草芽孢菌为主发酵棉粕,测得其中植酸酶、蛋白酶、纤维酶等酶活性显著提高,植酸含量显著降低;Su等^[20]使用芽孢杆菌和酵母菌、乳酸菌共同发酵米糠后,植酸含量显著降低;周晓容等^[21]使用益生菌固态发酵菜粕,将植酸的含量降低了24.22%;管维等^[22]通过4株不同的芽孢杆菌混合发酵菜籽粕,发现植酸降解率达93.74%。本文实验发酵棉粕的植酸最低值为11.41mg/g,相比对照组,显著降低,去除率达11.41%,与上述实验结果大致相同,推测去除率不高的原因在于单菌发酵。方洁等^[23]实验表明,混菌分两步发酵菜籽粕效果优于混菌一次发酵,混菌发酵优于单菌发酵。

3.2 芽孢杆菌发酵对棉粕常规营养成分的影响

芽孢杆菌在发酵过程中通过扩增和代谢活动可产生如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和植酸酶等酶类,

在减少抗营养因子的同时丰富了饲料中的营养成分^[24]。罗远琴等^[25]实验结果表明,棉粕经枯草芽孢杆菌-1、酿酒酵母和复合菌发酵后,芽孢杆菌组的粗蛋白含量由48.85%显著提高到56.95%,发酵3组的粗脂肪含量较对照组均显著下降,粗灰分含量较对照组均显著上升;Jazi等^[26]实验结果表明,使用芽孢杆菌、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等菌复合发酵棉粕后,粗纤维和游离棉酚含量显著降低,粗蛋白含量和乳酸菌数量提高。本文实验使用芽孢杆菌J5发酵棉粕后粗蛋白含量总体升高,其中第2组、第5组极显著上升,与上述实验结果一致,由主效应分析可知接种量对粗蛋白含量影响最大,且接种量8%为最优参数。菌株接种后可以短时间内转化基质成有用的物质,并且代谢能力极强,接种量高扩增的速度相应提升,代谢能力随之增加。研究表明芽孢杆菌在生长代谢活动中可以产生大量的蛋白酶,消耗底物中的糖类物质,合成大量的菌体蛋白,从而提高蛋白质的含量^[19]。另一方面,微生物在发酵过程中消耗基质中的碳源,干物质含量下降,而粗蛋白含量相对提高^[27]。

棉粕是棉籽仁加工的副产品,加工工艺不同导致所含粗脂肪含量各有不同^[28]。本文实验选用浸提萃取法加工棉粕,粗脂肪含量较低。孙焕林^[29]实验表明,芽孢杆菌发酵棉粕后粗脂肪和粗灰分含量显著下降,粗蛋白含量显著上升;梁敏^[30]研究表明,芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和酵母菌组成的复合益生菌发酵棉粕后,粗蛋白含量显著上升,粗脂肪含量则显著下降。本文实验棉粕发酵后粗脂肪含量显著下降,与上述实验结果相同,推测其原因可能是微生物代谢过程中氧化消耗能量,将脂肪、碳水化合物、粗纤维等分解为小分子物质,被微生物充分利用^[31]。

3.3 芽孢杆菌发酵对棉粕氨基酸含量的影响

采用微生物对蛋白饲料进行固态发酵,可以明显改变饲料原料的理化性状,降低饲料中的毒性,提高蛋白含量的同时平衡氨基酸含量^[25]。同时韩伟等^[32]研究发现,棉粕发酵会生成多种氨基酸,而氨基酸与游离棉酚结合形成不被机体吸收的结合棉酚。王卫民^[33]研究表明,通过固态发酵棉粕、血粉、羽毛粉等蛋白源,必需氨基酸和总氨基酸含量显著上升,氨基酸比例更加平衡;王晓玲等^[34]研究也表明,枯草芽孢杆菌混合发酵棉粕后,氨基酸总量上升22.2%,必需氨基酸含量提高28.4%。本文实验结果与上述实验基本相同,必需氨基酸中苏氨酸、缬氨

酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸发酵后含量均显著上升,非必需氨基酸谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸含量均显著提高,呈味氨基酸也较发酵前显著提高,风味提高,氨基酸比例更加平衡。这是因为微生物在发酵过程中产生各种酶,可以将大分子蛋白分解成氨基酸的过程加速^[35-36]。在微生物发酵过程中消耗棉粕基质中的碳源和氮源,利用饲料中的各种非蛋白氮合成为蛋白氮,提高各种氨基酸的比例,并向胞外分泌多肽,多肽通过水解作用分解为氨基酸^[37]。另一方面,氨基酸含量的提高可能是由干物质含量降低产生的“浓缩效应”导致的^[27],同时微生物分泌的转氨酶利用转氨基作用将非必需氨基酸合成为必需氨基酸^[38]。

4 结论

以不同发酵条件设计 L9(3⁴) 正交试验,并用芽孢杆菌 J5 发酵后,结果显示游离棉酚脱毒率最高达 94.8%,植酸含量也显著下降,同时粗蛋白含量显著上升。以游离棉酚、植酸、粗蛋白主效应分析结果得到的 3 组发酵条件发酵后,与未发酵相比氨基酸含量和组成都显著优于其他组别。综合脱毒率以及营养成分,最优发酵条件为温度 30 ℃、湿度 60%、接种量 5%、发酵时间 4 d。

参考文献:

- [1] 葛凯博. 棉籽浓缩蛋白替代鱼粉在松浦镜鲤幼鱼饲料中的应用研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2023.
- [2] 谯仕彦. 饲料营养与饲养科技创新是实施饲用豆粕减量行动的主要抓手[J]. 中国饲料,2023(22):8-14.
- [3] LIU Haokun, YAN Quangen, HAN Dong, et al. Effect of dietary inclusion of cottonseed meal on growth performance and physiological and immune responses in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Aquaculture Nutrition, 2019, 25(2): 414-426.
- [4] LI Weijie, WU Hongxia, ZHANG Le, et al. Effects of replacing soybean meal protein with cottonseed protein concentrate on the growth condition and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2021, 27(6): 2436-2447
- [5] SU Jianmei, HOU Hongli, WANG Chunhong, et al. Effects of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, muscle amino acids, and hematology of juvenile common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Aquaculture International, 2019, 27(2): 555-566.
- [6] JIANG Haibo, CHEN Liqiao, QIN Jianguang, et al. Partial or complete substitution of fish meal with soybean meal and cottonseed meal in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* diets[J]. Aquaculture International, 2013, 21(3): 617-628.
- [7] 周天兵. 棉籽粕化学脱毒及脱毒棉籽粕中的棉酚在肉鸡消化道内的变化规律研究[D]. 重庆:西南大学,2011.
- [8] 潘韵超. 发酵棉粕部分替代鱼粉及添加晶体赖氨酸对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长及健康的影响[D]. 上海:上海海洋大学,2023.
- [9] WANG Weikang, LI Wenjuan, WU Qichao, et al. Isolation and identification of a rumen *Lactobacillus* bacteria and its degradation potential of gossypol in cottonseed meal during solid-state fermentation[J]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2200.
- [10] ALI H Y, PIAO Minyu, MA Tao, et al. Effect of lactic acid bacteria and yeast supplementation on anti-nutritional factors and chemical composition of fermented total mixed ration containing cottonseed meal or rapeseed meal[J]. Animal Bioscience, 2021, 35(4): 556-566.
- [11] 王晓玲,刘倩,韩伟,等. 棉酚脱除菌株的筛选及棉粕混菌固态发酵研究[J]. 粮油食品科技,2016,24(1): 81-85.
- [12] 陈书畅,徐晔,曲乐天,等. 鲤肠道内产消化酶益生菌的分离与筛选[J]. 水产学杂志,2022,35(3):58-62.
- [13] 刘少娟,陈家顺,姚康,等. 棉粕的营养组成及其在畜禽生产中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2016,37(9): 45-49.
- [14] DU Guilin, ZHOU Yan, ZHANG Jingxian, et al. Optimized strategy valorizing unautoclaved cottonseed hull as ruminant alternative feeds via solid-state fermentation: detoxifying polyphenols, restraining hazardous microflora and antibiotic-resistance gene hosts[J]. Environmental Technology & Innovation, 2022, 28: 102937.
- [15] ZHANG Zhenting, YANG Danlu, LIU Ling, et al. Effective gossypol removal from cottonseed meal through optimized solid-state fermentation by *Bacillus coagulans*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 252.
- [16] 洪振. 微生物固态发酵法降低棉粕中游离棉酚含量的研究[D]. 武汉:武汉轻工大学,2016.
- [17] 金红春,兰时乐,王红权,等. 混合菌剂固态发酵棉粕脱毒条件的优化[J]. 中国农学通报,2011,27(24): 50-56.
- [18] 王金平. 饲料抗营养因子的分类、作用机理及其钝化

- 消除方法[J]. 当代水产, 2022, 47(5): 72-73.
- [19] 和小黑. 棉粕源枯草芽孢杆菌发酵饲料消化酶活性的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [20] SU Weifa, JIANG Zipeng, WANG Cheng, et al. Dynamics of defatted rice bran in physicochemical characteristics, microbiota and metabolic functions during two-stage co-fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 362: 109489.
- [21] 周晓容, 孙佩佩, 刘志云, 等. 发酵菜籽粕在生长育肥猪上的营养价值评定[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(3): 524-533.
- [22] 管维, 兰时乐, 詹逸舒, 等. 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[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(2): 189-191.
- [23] 方洁, 徐浩, 魏芬, 等. 菜籽粕发酵脱毒效果模糊评判[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(3): 96-100.
- [24] 刘建成, 吴川川, 马贵军, 等. 发酵棉粕的营养价值及其在动物生产中应用的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(5): 1258-1265.
- [25] 罗远琴, 胡倩, 芦岩, 等. 枯草芽孢杆菌、酿酒酵母及其复合菌发酵棉粕营养成分变化的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(2): 452-459.
- [26] JAZI V, BOLDAJI F, DASTAR B, et al. Effects of fermented cottonseed meal on the growth performance, gastrointestinal microflora population and small intestinal morphology in broiler chickens[J]. *British Poultry Science*, 2017, 58(4): 402-408.
- [27] 胡永娜. 微生物发酵菜籽粕营养价值的评定及其对肉仔鸡生长发育的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [28] 樊文端, 韩文杰, 张军, 等. 高蛋白含量棉粕的生产工艺探讨[J]. *中国油脂*, 2018, 43(5): 52-53.
- [29] 孙焕林. 枯草芽孢杆菌发酵棉粕对黄羽肉鸡生产性能、免疫性能和肉品质的影响研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.
- [30] 梁敏. 益生菌发酵棉粕对肉牛的应用效果研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
- [31] 寇芳. 发酵小米菌株的鉴定及其对淀粉结构、老化性质的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2018.
- [32] 韩伟, 李晓敏, 刘倩, 等. 微生物固态发酵和酶解工艺处理棉粕的研究[J]. *中国油脂*, 2017, 42(1): 112-115.
- [33] 王卫民. 米曲霉固态发酵生产优质蛋白质饲料的工艺优化及对猪生产性能影响的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.
- [34] 王晓玲, 刘倩, 韩伟, 等. 棉酚脱除菌株的筛选及棉粕混菌固态发酵研究[J]. *粮油食品科技*, 2016, 24(1): 81-85.
- [35] 武俊瑞, 顾采东, 田甜, 等. 豆酱自然发酵过程中蛋白质和氨基酸的变化规律[J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 139-144.
- [36] 魏满红, 韦票, 袁凯鑫, 等. 高产中性蛋白酶酵母菌固态发酵棉粕的参数优化[J]. *家畜生态学报*, 2021, 42(12): 44-50.
- [37] 叶盛. 棉籽饼粕微生物法降棉酚及其蛋白多肽制备研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [38] 吴正可. 多菌种固态发酵菜籽粕的工艺优化及其对肉鸡的饲用价值评定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [39] 王颖, 赵龙成, 王浩同, 等. 条斑紫菜绿斑病优势病原菌的鉴定及其生长特性与药敏分析[J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2023, 32(4): 6-12.

(责任编辑: 褚金红 实习编辑: 易圣杰)