

何跃, 田雪平, 马艳丽, 姬高升, 刘杨, 许力山, 康宇, 王新惠, 吴红, 雷珂, 田彬, 刘元兴, 闫志英. 粗糙脉孢菌固态发酵产 β -胡萝卜素及对蛋鸡饲喂的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2024, 30 (3): 600-606

He Y, Tian XP, Ma YL, Ji GS, Liu Y, Xu LS, Kang Y, Wang XH, Wu H, Lei K, Tian B, Liu YX, Yan ZY. β -Carotene production by solid-state fermentation of *Neurospora crassa* and the effects of feeding it to laying hens [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2024, 30 (3): 600-606

粗糙脉孢菌固态发酵产 β -胡萝卜素及对蛋鸡饲喂的影响

何跃^{1,2} 田雪平²✉ 马艳丽⁴ 姬高升² 刘杨² 许力山² 康宇² 王新惠¹ 吴红³
雷珂⁵ 田彬⁵ 刘元兴⁵ 闫志英^{1,2}✉

¹成都大学食品与生物工程学院 成都 610106

²中国科学院环境与应用微生物重点实验室, 环境微生物四川省重点实验室, 中国科学院成都生物研究所 成都 610041

³乐山市乐其业商贸有限公司 乐山 614000

⁴西安工程大学环境与化学工程学院 西安 710600

⁵四川瑞象农业科技发展有限公司 眉山 620000

摘要 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 能够利用农产品副产物为原料经固态发酵产生 β -胡萝卜素并应用于动物饲料中, 然而目前缺乏其发酵产物的动物饲喂评价研究. 通过单因素和正交试验对粗糙脉孢菌发酵豆渣过程的参数进行优化, 并根据最优发酵条件进行浅盘放大试验, 最后直接利用发酵物替代日粮中的豆粕成分进行蛋鸡饲喂试验. 结果表明: 粗糙脉孢菌发酵生产 β -胡萝卜素的最佳条件为发酵温度为30℃, 基质含水率为60%, pH为6, 发酵时间72 h, 此条件下 β -胡萝卜素产量为202.20 $\mu\text{g/g}$ (发酵物), 浅盘放大试验获得 β -胡萝卜素的产量为210 $\mu\text{g/g}$ (发酵物). 饲喂试验表明发酵物替代豆粕可使蛋鸡的产蛋率从75.25%提升至85.75%, 显著降低料蛋比, 提高日采食量和日增重, 提升鸡蛋的色泽, 显著提高鸡蛋中 β -胡萝卜素的含量. 因此, 粗糙脉孢菌的发酵产物直接替代豆粕进行蛋鸡饲喂能够简化发酵饲料制备工艺, 显著改善蛋鸡的生长和生产性能, 促使 β -胡萝卜素在鸡蛋中积累. 本研究对于利用粗糙脉孢菌生产富含 β -胡萝卜素的动物饲料具有重要参考价值. (图3 表6 参43)

关键词 粗糙脉孢菌; 固态发酵; β -胡萝卜素; 蛋鸡

β -Carotene production by solid-state fermentation of *Neurospora crassa* and the effects of feeding it to laying hens

HE Yue^{1,2}, TIAN Xueping²✉, MA Yanli⁴, JI Gaosheng², LIU Yang², XU Lishan², KANG Yu², WANG Xinhui¹, WU Hong³, LEI Ke⁵, TIAN Bin⁵, LIU Yuanxing⁵ & YAN Zhiying^{1,2}✉

¹College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

²CAS Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, Environmental Microbiology Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

³Leqiye Trade Co. Ltd., Leshan 614000, China

⁴College of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an Engineering University, Xi'an 710600, China

⁵Sichuan Ruixiang Agricultural Technology Development Co., Meishan 620000, China

Abstract *Neurospora crassa* can produce β -carotene through solid-state fermentation utilizing agricultural by-products. To date research into feeding animals such probiotic fermentation products is lacking. We applied one-way and orthogonal experiments to optimize parameters for β -carotene production during *N. crassa* fermentation using soybean dregs as substrate. A shallow tray test was conducted as a scale-up experiment using the elucidated optimal fermentation conditions. Finally, the fermentation products directly replaced soybean meal in the diet of laying hens. The optimum conditions to produce β -carotene by solid state fermentation using soy bean dregs as a substrate were: 30℃ fermentation temperature, 60% substrate moisture content, substrate pH of 6, and 72 h fermentation period. The yield of β -carotene reached 202.2 $\mu\text{g/g}$ (fermentation products) in orthogonal testing, and the yield of β -carotene was 210 $\mu\text{g/g}$ (fermentation products) in the platter scale-up fermentation. In the laying hen feeding experiment, replacement of soybean meal with fermentation products increased the laying rate of laying hens from 75.25% to 85.75%, significantly reduced the feed-to-egg ratio, and increased daily feed intake and weight gain. In addition, the color and β -carotene content of eggs were also significantly increased. Direct replacement of soybean meal with *N. crassa* fermentation

收稿日期 Received: 2023-08-09 接受日期 Accepted: 2023-10-19

四川省科技计划项目 (2022JDTD0027)、广西重点研发计划项目 (桂科AB23026022) 和高产 β -胡萝卜素发酵技术工艺开发服务项目 (E1A212) 资助 Supported by the Sichuan Science and Technology Program (2022JDTD0027), Guangxi Key R&D Program (GuikeAB23026022), and Project for R&D of High-Yield β -Carotene Fermentation Technology (E1A212)

✉通信作者 Corresponding authors (E-mail: yanzy@cib.ac.cn; tianxp@cib.ac.cn)

products could simplify fermented feed production, significantly improve the growth and production performance of laying hens, and enable the accumulation of β-carotene in eggs, resulting in a significant improvement in color. This study provides an important reference for using *N. crassa* to produce animal feed rich in β-carotene.

Keywords *Neurospora crassa*; solid-state fermentation; β-carotene; laying hen

β-胡萝卜素(β-carotene)是类胡萝卜素家族中的一种,也是维生素A的前体物质,具有极强的淬灭单线态氧和清除自由基的能力^[1]。β-胡萝卜素作为食品添加剂和营养增补剂已被认定为A类营养食品强化剂^[2],在食品、饲料、饲料添加剂等领域具有广阔的应用前景^[3]。此外,β-胡萝卜素作为饲料添加剂可增强动物的免疫力,改善动物的生长和生产性能,增加畜、禽和水产动物产品的色泽的同时提高肉类的品质^[4-8]。因此,β-胡萝卜素作为饲料添加剂供不应求,市场需求量大。目前β-胡萝卜素的生产方式有3种:化学合成^[9]、从盐藻或棕榈油中提取^[10]和微生物发酵^[11]。化学合成法生产周期短、成本低,但存在试剂安全性和环境污染的风险,产品仅可用作着色剂。提取法可获得天然的β-胡萝卜素,但是成本高,产量低,应用相对较少。而微生物发酵法生产β-胡萝卜素具有天然、安全、周期短、环境友好、操作简单等优点^[12]。势必会成为未来β-胡萝卜素生产的主要方式^[13]。目前国内外生产β-胡萝卜素的菌株主要是三孢布拉霉菌(*Blakeslea trispora*)^[14]、红酵母(*Phaffia rhodozyma*)^[15]和布拉克须霉菌(*Phycomyces blakesleeanus*)^[16],均需利用葡萄糖、酵母粉等精细化的原料进行液态发酵,生产成本相对较高且需要下游复杂的纯化工艺。因此寻找能够直接利用农业废弃物原料进行发酵的菌株,且得到的发酵饲料能够直接利用,对简化下游工艺具有深远意义。

粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)是脉纹孢菌属真菌^[17],其孢子中含有丰富的类胡萝卜素,其中β-胡萝卜素的含量最高,占类胡萝卜素的20.08%^[18]。研究报道粗糙脉孢菌含有高活性的纤维素酶^[19],因此能够利用含有木质纤维素的农业废弃物原料进行固态发酵,其产物直接用于动物饲喂不仅能够降低生产成本,也能够简化下游复杂的纯化工艺^[20]。然而,目前的研究主要是利用粗糙脉孢菌发酵产类胡萝卜素^[21],关于其β-胡萝卜素的研究相对较少,且发酵实验规模较小,关于其发酵物对动物生长及生产性能的影响有待进一步研究。

本研究利用粗糙脉孢菌以豆渣为原料进行固态发酵,对发酵条件进行优化以期获得更高产量的β-胡萝卜素,同时,将所得的发酵产物替代蛋鸡日粮中的豆粕成分,开展蛋鸡饲喂与鸡蛋品质评价试验,为粗糙脉孢菌发酵生产高品质、多功能新型动物饲料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发酵原料为豆腐加工废弃物豆渣,取自乐山市高新区豆腐加工厂,豆渣经过烘干过40目筛,打包后运回实验室,于阴凉干燥处存放备用;发酵菌株是由乐山市乐其业商贸有限公司提供并经实验室诱变后获得的粗糙脉孢菌;罗氏比色扇。

1.2 试验设计

1.2.1 粗糙脉孢菌固态发酵产β-胡萝卜素工艺 以豆渣为发酵基质,于高压蒸汽灭菌锅中115℃灭菌30 min,趁热分装在500 mL的广口瓶中。将菌株于接种于PDA固体培养基(马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、水1 000 mL)中进行活化,培养3 d后将孢子和菌丝刮在沙氏培养基(蛋白胨10 g、葡

萄糖40 g、水1 000 mL)中,在30℃ 200 r/min的摇床中扩大培养48 h至活菌数≥10⁶个,于超净台内用无菌玻璃棒将灭菌后的发酵基质搅拌均匀,用pH 6.0的磷酸盐缓冲液调节发酵基质的水分含量,按1%的接种量将发酵菌株接入基质中,根据实验设计在自然光照下发酵3 d后取出置于60℃烘箱中烘干,测定β-胡萝卜素含量和生物量。

1.2.2 单因素试验 经过本实验室前期对初始菌株的发酵条件包括温度、湿度、含水率、pH、接种量、光照强度和光照时间的探究,确定了温度、含水率、酸碱度和发酵时间是影响粗糙脉孢菌发酵生产β-胡萝卜素的主要影响因素。因此设置20℃、25℃、30℃、35℃、40℃共5个温度梯度,40%、50%、60%、70%、80%共5个含水率梯度,4、5、6、7、8共5个酸碱度梯度,以及24 h、48 h、72 h、96 h、120 h共5个发酵时间梯度开展单因素发酵试验^[22],测定发酵后产物的生物量和β-胡萝卜素含量。

1.2.3 正交试验 在单因素试验基础上,以含水率(A)、温度(B)、pH(C)为因素,利用IBM SPSS Statistics 27软件三因素三水平正交试验设计,L₉(3³)正交表如表1所示,以发酵饲料中β-胡萝卜素产量作为评价指标。

表1 正交试验设计表
Table 1 Table of orthogonal experimental design

因素 Factors	温度 Temperature (θ/℃)	含水率 Moisture content (w/%)	酸碱度 pH
1	25	50	6
2	25	60	7
3	25	70	8
4	30	50	7
5	30	60	8
6	30	70	6
7	35	50	8
8	35	60	6
9	35	70	7

1.2.4 浅盘放大试验 在正交试验的基础上,选取最优发酵条件进行浅盘放大试验。控制室内温度为30℃、湿度为80%,发酵间臭氧灭菌1 h。以豆渣为发酵基质,于高压蒸汽灭菌锅中115℃灭菌30 min,趁热分装在固体发酵浅盘(40 cm×10 cm×4 cm)中,用pH=6.0的磷酸盐缓冲液调节发酵基质水分含量,待基质冷却后按1%接种量接入发酵种子液,用灭菌的铁铲翻料、搅拌均匀。盖上4层纱布,整齐地放在发酵架上进行半开放式发酵。每隔6 h搅拌一次,使发酵基质松软、增加其透气性,自然光照下于无菌发酵间发酵3 d。间隔6 h取样,测定基质内温度并利用烘干法^[23]测定含水率、样品放在-20℃冰箱待实验结束后测定β-胡萝卜素含量和生物量。

1.2.5 蛋鸡饲喂与鸡蛋品质评价试验 选取40只健康、生长状态相近、大小均一的产蛋鸡随机分为两组,每组20只。对照组饲喂基础日粮,试验组使用发酵饲料替代日粮中的豆渣。具体日粮配方见表2。

供给蛋鸡充足的饲料和干净的饮水,保证其自由采食和饮水。按照蛋鸡免疫程序做好禽流感、传染性支气管炎等疾病预防和免疫接种工作。在上午8点和下午6点定时饲喂,每次

表2 基础日粮配方
Table 2 Formulation of the basic diet

日粮组成 Diet composition	含量 Content (w%)	营养水平 Nutrient level	含量 Content
玉米 Sorghum	60.93	代谢能 Metabolic energy	12.31 MJ/kg
棉籽粕 Cottonseed meal	5.00	蛋白质 Carbohydrate	19.78%
豆渣 Soya bean dregs	20.00	赖氨酸 Lysine	0.83%
鱼粉 Fishmeal	1.80	蛋氨酸 Essentia	0.34%
大豆油 Soya bean oil	1.18	钙 Calcium	3.54%
石粉 Talcum powder	9.92	总磷 Total phosphorus	0.52%
碳酸氢钙 Ca(HCO ₃) ₂	1.17	有效磷 Effective phosphorus	0.38%
食盐 Salt	0.30	铜 Copper	17.76 mg/kg
氯化胆碱 Choline chloride	0.10	铁 Iron	339.12 mg/kg
DL-蛋氨酸 DL-essentia	0.08	锌 Zinc	169.76 mg/kg
预混料 Premix	0.22	锰 Manganese	138.66 mg/kg

混合预混料可为每千克日粮提供锰60.00 mg, 锌80.00 mg, 碘0.35 mg, 硒0.30 mg, 维生素D 1 600 IU, 维生素E 5.00 IU, 维生素K 0.50 mg, 维生素B 10.80 mg, 维生素B2 2.50 mg, 泛酸2.20 mg, 烟酸20 mg, 维生素B6 3.00 mg, 生物素0.10 mg, 叶酸0.25 mg, 维生素B1 20.00 mg. The mixed premix can provide 60.00 mg of manganese, 80.00 mg of zinc, 0.35 mg of iodine, 0.30 mg of selenium, 1 600 IU of vitamin D, 5.00 IU of vitamin E, 0.50 mg of vitamin K, 10.80 mg of vitamin B, 2.50 mg of vitamin B2 per kg of diet. Pantothenic acid 2.20 mg, niacin 20 mg, vitamin B6 3.00 mg, biotin 0.10 mg, folate 0.25 mg, and vitamin B1 20.00 mg.

喂料采食后料槽有少量余料。每天打扫鸡舍, 保持圈舍干净卫生、通风良好和干燥, 每周对粪板消毒, 每天对蛋鸡精神状态、采食情况和粪便状态进行细致观察, 并做好记录。试验蛋鸡在第1天、第28天、第56天空腹12 h后的早上进行体重称量, 每天早上结算前一天的余料量, 准确记录试验期间饲料的添加量, 以及每天的饲料浪费量, 分别计算试验全期的平均日采食量(ADFI)、平均日增重(ADG)、耗料增重比(F/G)和鸡蛋的产蛋率、平均蛋重和蛋黄中β-胡萝卜素含量, 测定鸡蛋中蛋白高度、哈夫单位、蛋形指数、蛋壳强度、蛋黄比、蛋壳比、蛋壳厚度。

1.3 测定方法

1.3.1 β-胡萝卜素含量测定 β-胡萝卜素含量采用高效液相色谱法^[24]测定, 发酵物低温烘干后、粉碎。取0.1 g发酵物, 加入2 mL 1.0 mol/L盐酸浸泡20 min, 然后在沸水中水浴2 min, 将制备好的盐酸和发酵物溶液抽滤至中性后加入20 mL丙酮浸取1 h, 再离心取上清液得到类胡萝卜素粗提取液, 将类胡萝卜素粗提取液经0.22 μm有机微孔滤膜过滤, 高效液相色谱法采用的色谱条件为色谱柱: C18柱, 柱长150 mm、内径4.6 mm, 粒径5微米, 或等效柱; 流动相: 甲醇/乙腈/异丙醇=54/44/2, 含抗坏血酸0.4 g/L, 经0.45 μm滤膜过滤; 流速: 2.0 mL/min; 检测波长: 455 nm; 柱温: 30 (± 1) °C; 进样体积: 20 μL。

1.3.2 生物量测定 生物量采用核酸提取法^[25-26]测定, 准确称取0.1 g发酵物, 加入25 mL 5%三氯乙酸, 在80 °C水浴中抽提25 min, 其间振荡数次, 然后置于离心机中, 4 °C, 9 000 r/min离心10 min, 取上清液5 mL, 于比色管中定容至25 mL, 在260 nm处测定其吸光度

1.3.3 蛋鸡性能和鸡蛋参数测定 蛋鸡性能和鸡蛋数据分别采用《NY/T 2123-2012》和《GB-2749-2015》计算^[26]。

蛋鸡平均日采食量=总耗料量/(鸡数×试验天数)×100% (1)

平均产蛋率=产蛋总数/蛋鸡总数×100% (2)

平均蛋重=产蛋总重/产蛋总数×100% (3)

料蛋比=耗料总重/产蛋总重 (4)

平均日增重=试验期间总增重/试验天数 (5)

哈夫单位=100 × lg [鸡蛋高度+7.57 - 1.7 × (鸡蛋质量^0.37)] (6)

蛋形指数=鸡蛋长/鸡蛋宽 (7)

蛋壳强度用蛋壳强度测定仪测定。

1.4 计算和统计方法

试验所得数据经过Excel 2021处理, 结果用“平均值±标准差”表示, 采用IBM SPSS Statistics 27软件中的T检验进行数据显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

适宜的环境条件能够加快微生物的生长速率, 增加代谢产物。单因素发酵试验结果见图1。

随着发酵时间的增加, 菌株的生物量和发酵物中β-胡萝卜素含量增加, 生物量在发酵96 h时达到峰值, 然后迅速降低, 而β-胡萝卜素产量在72 h已经达到峰值, 72 h后发酵基质表面没有更多的空间产生β-胡萝卜素, 为节约时间成本, 确定最佳发酵时间为72 h。

基质的含水率会影响到菌株的生长与代谢, 当基质的含水率升高, 菌株会利用更多的水分活度参与生长与代谢, 从而加快反应速率, 而含水率过高则会使基质的通气性不好, 不利于菌株的生长和代谢, 从而使发酵速率降低甚至终止发酵过程^[27]。在本研究中, 当含水率到60%时, β-胡萝卜素和生物量达到峰值, 故我们选择最佳的含水率为60%。

pH也是影响微生物生长和代谢的主要因素之一, 各类微生物都有最适宜生长的pH。pH主要是通过影响微生物酶的活性和稳定性, 从而增强或减弱微生物对外界环境的抵抗力^[28]。本研究中, 强酸性环境和强碱性环境均会使菌株的活性降低, 从而使β-胡萝卜素和生物量降低。在pH为6时, β-胡萝卜素的产量达到峰值, 故选择pH为6作为发酵的最佳pH。

温度不仅影响微生物的生长还能够影响其酶的活性^[29]。本研究中, β-胡萝卜素产量和生物量随着温度的升高而升高, 在30 °C时达到峰值, 当温度高于30 °C后, β-胡萝卜素产量和生物量随着温度的升高而降低。因此选择30 °C作为发酵的最佳温度。因此, 通过单因素实验获得最佳发酵条件为发酵温度为30 °C, 发酵基质的含水率为60%, pH为6, 发酵时间为72 h。

2.2 正交试验结果

正交试验结果见表3, 分别对因素A、B、C分析后, 影响β-胡萝卜素产量的主次顺序为C > B > A, 因素C对β-胡萝卜素产量的影响最大, 其次是因素B, 因素A的影响最小, 根据, 因此选择最优水平为A₃B₂C₁, 即发酵温度为35 °C, 发酵含水率为60%, 发酵pH为6。此组合下获得的β-胡萝卜素产量最高, 为

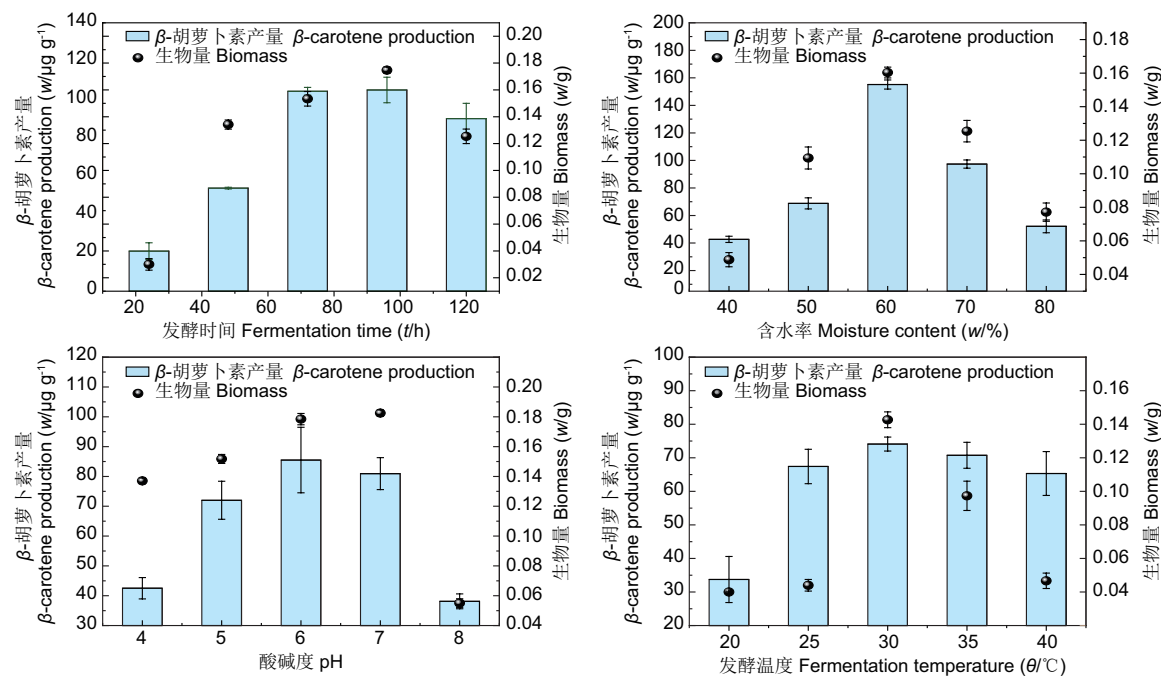


图1 发酵时间、含水率、pH和温度对β-胡萝卜素产量和生物量的影响。
Fig. 1 Effect of fermentation time, moisture content, pH, and temperature on β-carotene production and biomass.

表3 正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal experiments

因素 Factor	温度 Temperature (θ/°C)	含水率 Moisture content (w/w%)	酸碱度 pH	β-胡萝卜素含量 β-carotene content (w/μg g ⁻¹)
1	25	50	6	72.34
2	25	60	7	82.85
3	25	70	8	46.43
4	30	50	7	78.25
5	30	60	8	67.96
6	30	70	6	108.96
7	35	50	8	72.86
8	35	60	6	180.25
9	35	70	7	110.56
K1	67.20	85.07	121.22	
K2	74.48	110.35	62.64	
K3	120.51	90.54	62.61	
R	0.527	0.188	0.221	

180.25 μg/g。但考虑到温度的影响最小，且放大试验中为节约能耗，并且结合单因素试验结果，选择30℃作为放大试验的温度条件。此组合不在9次试验中，追加以A₂B₂C₁为模型的试验加以验证。此条件下平行操作3次，并测定发酵后β-胡萝卜素产量。经过3 d发酵后β-胡萝卜素含量分别为188.25 μg/g、192.80 μg/g、202.20 μg/g。与优化前相比，β-胡萝卜素产量在未优化的基础上提升了26.25%，证明该试验方案合理。

2.3 浅盘放大试验结果

浅盘放大发酵共装得浅盘40盘。在发酵第32 h时，豆渣表面和底部开始长出白色菌丝体，不同于实验室广口瓶的密闭环境发酵，在半开放式环境中，增强了供氧，使得菌株能够利用底部的豆渣，发酵48 h时，豆渣表面的白色菌丝体逐渐变成黄色，发酵时间64 h时，豆渣表面产生橙黄色的孢子，第72 h时，豆渣的表面和底部布满橙黄色的菌丝体和孢子粉。此发酵过程与李静等的研究^[21]相似，发酵物在24 h时长出白色菌丝，到48 h后菌丝变黄，72 h后产生橙黄色的孢子。同时，在浅盘放大试验中，粗糙脉孢菌的生长特性与前期单因素试验的

生长特性相似，未出现发酵滞后、发酵终止等现象，表明浅盘放大试验的发酵效果良好。

粗糙脉孢菌发酵豆渣的过程中温度、含水率、生物量和β-胡萝卜素产量如图2所示。发酵过程中，基质内温度会随着发酵时间的延长先增高后降低，这是因为发酵开始后，有足够的基质和氧气，使菌体内的呼吸作用加快，并加速菌株的代谢和散热，所以基质内温度由30℃提高到35.3℃，到发酵后期，菌株可利用的基质减少，氧气含量减少，并产生了代谢产物β-胡萝卜素，导致菌株在发酵后期呼吸作用减慢，发酵基质内温度逐渐降低至30℃。由图2可见，发酵基质的含水率随发酵时间的增长而逐渐减少，从60%逐渐降低至43%，这是由于粗糙脉孢菌在固态发酵的过程中需要水分参与。发酵3 d后，大部分培养基表面布满了粗糙脉孢菌菌丝体，浅盘底部粗糙脉孢菌的生长状况良好，培养基开始结块，少部分存在染菌的情况，可能是半开放式发酵导致浅盘内染菌，若能使用无菌搅拌机且在恒温培养室中发酵则能减少杂菌污染。随机选取3盘取样，生物量和β-胡萝卜素产量随着发酵时间的增加而增加，最终生物量达到0.2 g，β-胡萝卜素产量达到了210 μg/g（发酵物）。

2.4 蛋鸡饲喂与鸡蛋品质评价试验结果

2.4.1 日粮中添加发酵饲料对蛋鸡生长和生产性能的影响

由表4可见，试验组中蛋鸡的平均末重、平均日增重、平均日采食量和平均产蛋率都显著高于对照组（*P* < 0.05），而料蛋比则低于对照组，这可能是因为发酵饲料的特殊香味刺激了蛋鸡的采食欲，且发酵饲料本身的菌体蛋白更容易使蛋鸡吸收。该结果表明发酵产物替代基础日粮中的豆粕能够显著促进蛋鸡采食，进而提高蛋鸡生长性能和生产性能。

2.4.2 饲料中添加发酵饲料对鸡蛋品质的影响

由表5可见，试验组鸡蛋的蛋白高度、哈夫单位、蛋形指数、蛋壳强度、蛋壳厚度都略高于对照组，但不存在显著差异，而蛋黄比显著高于对照组（*P* < 0.05）。除蛋黄比外的结果表明发酵产物的替代对鸡蛋的品质整体无显著影响。

2.4.3 蛋黄颜色和蛋黄中β-胡萝卜素含量

蛋鸡饲喂试验

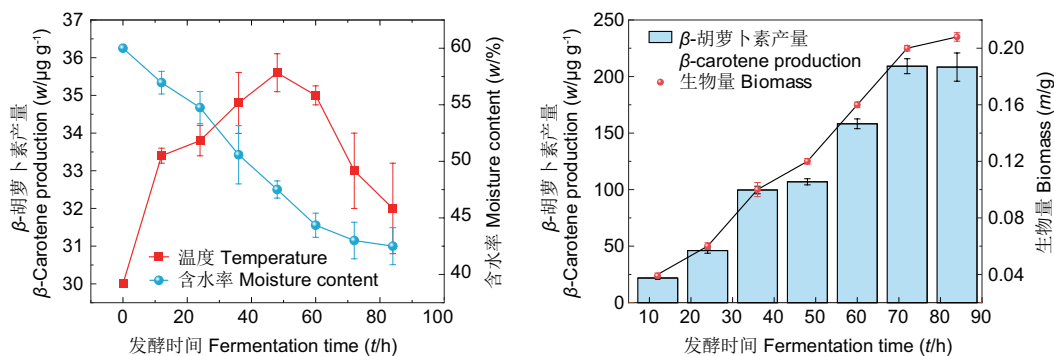


图2 发酵过程中含水率、温度、β-胡萝卜素产量和生物量的变化。

Fig. 2 Changes in moisture content, temperature, β-carotene production, and biomass during fermentation.

中,鸡蛋颜色对比效果见图3。可以看出:对照组的蛋黄呈黄色,试验组的蛋黄明显比对照组的蛋黄颜色更深,显出橙红色,更加趋近于β-胡萝卜素的颜色。表6中的蛋黄颜色等级也进一步确定了试验组的鸡蛋蛋黄颜色与对照组有明显差异:对照组中的蛋黄颜色主要分布在7-9级,试验组的蛋黄颜色分布在11-13级。对两组鸡蛋中β-胡萝卜素含量的测定结果显示对照组的鸡蛋中未检测到β-胡萝卜素,而试验组鸡蛋中β-胡萝卜素含量达到 $45 \pm 2.5 \mu\text{g/g}$ 鸡蛋(表6)。这是由于蛋鸡无法代谢β-胡萝卜素,一部分的β-胡萝卜素会转移到鸡蛋的蛋黄中^[30]。

3 讨论

近年来,我国饲料资源短缺的问题日益严重,玉米豆粕价格的飙升迫使饲料企业和养殖企业寻求能量饲料和蛋白饲料的替代品。同时,随着人民群众对动物类食品更高层次的要求,以β-胡萝卜素为主、能够显著改善动物生长和生产性能的饲料添加剂的需求也日益提高,且价格昂贵。因此,高成本投入已成为目前饲料行业的痛点^[31]。发酵饲料成为解决这一问题的重要方式,它能够以较为低廉的原料发酵为动物提供比豆粕营养价值更高的菌体蛋白^[32]。能够改善饲料风味和适口性,刺激动物的食欲,提高动物的采食量和日增重^[33]。同时,发酵饲料中的β-胡萝卜素作为维生素A的前提物质能够增强动物免疫能力和抗氧化能力^[34],在一定程度上改善动物的生长

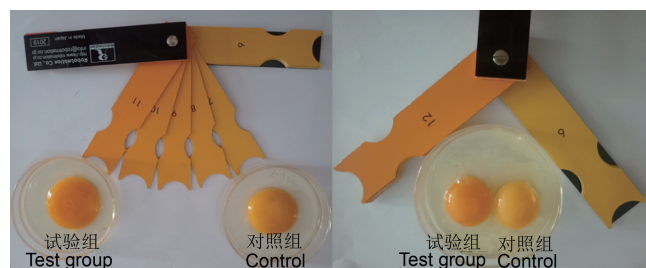


图3 对照组和试验组鸡蛋颜色对比。

Fig. 3 Comparison in egg colours between control and test groups.

和生产性能。

粗糙脉孢菌凭借较高的纤维素酶活,能够利用农业废弃物或农产品副产物产生富含β-胡萝卜素的功能蛋白饲料,逐渐成为农业废弃物发酵的热门菌种之一。粗糙脉孢菌发酵农产品副产物能将部分纤维素、蛋白质和脂肪等大分子营养物质降解成易被动物吸收的糖类和可溶性小肽和有机酸等小分子物质^[35]。发酵饲料中的β-胡萝卜素也能够预防动物疾病、提高动物免疫力、改善动物的生长与生产性能^[36]。且发酵产物可直接用于动物饲喂,直接简化了下游提纯工艺,极大地降低了成本。

目前,粗糙脉孢菌以豆渣为基质的发酵大都研究其类胡萝卜素的含量及作用^[37],而聚焦其β-胡萝卜素研究相对较少。国内外以粗糙脉孢菌发酵豆渣获得孢子中β-胡萝卜素的产量最高达到了 $140.98 \mu\text{g/g}$,产物中却只有 $7.14 \mu\text{g/g}$ 的β-胡萝卜

表4 蛋鸡采食量生长和生产数据

Table 4 List of feed intake growth and production data for laying hens

指标 Index	对照组 Control group	试验组 Test group	P
平均初重 Average initial weight (m/kg)	1.20 ± 0.14	1.22 ± 0.13	0.691
平均末重 Average final weight (m/kg)	2.26 ± 0.02	2.42 ± 0.58	0.020
平均日增重 Average gain (m/kg)	0.018 ± 0.002	0.021 ± 0.002	0.036
平均日采食量 Average intake (m/kg)	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.041
料蛋比 Ratio of cooked eggs to feed	2.06 ± 0.48	1.53 ± 0.56	0.785
平均蛋重 Average egg weight (m/g)	60.21 ± 0.78	65.79 ± 1.12	0.832
平均产蛋率 Average egg production rate	75.25% ± 2.50%	85.75% ± 3.20%	0.042

表5 日粮中添加发酵饲料对鸡蛋品质的影响

Table 5 Effect of addition of fermentation products to diets on egg quality

指标 Index	对照组 Control group	试验组 Test group	P
蛋白高度 Protein height (h/mm)	9.50 ± 1.62	10.20 ± 1.73	0.240
哈夫单位 Haugh unit	88.50 ± 3.76	90.00 ± 3.17	0.576
蛋形指数 Egg-shaped index	1.30 ± 0.03	1.34 ± 0.07	0.136
蛋壳强度 Egg shell strength (F/N)	35.43 ± 2.72	36.13 ± 2.42	0.341
蛋黄比 Yolk ratio (r/%)	32.40 ± 5.15	36.10 ± 5.32	0.008
蛋壳比 Eggshell ratio (r/%)	10.00 ± 1.70	9.40 ± 0.72	0.250
蛋壳厚度 Eggshell thickness (δ/mm)	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.146

表6 蛋黄颜色和蛋黄中β-胡萝卜素含量
Table 6 Egg yolk color and β-carotene content in egg yolks

试验分组 Test group	罗氏比色分级占比(个数) Percentage of Roche color grading (number)						β-胡萝卜素含量 β-carotene content (w/μg g ⁻¹)
	< 7	8-9	10-11	11-12	12-13	> 14	
对照组 Control group	55	25					0
试验组 Test group				34	43	3	45 ± 2.5

素^[38]。而在β-胡萝卜素的提纯后,孢子中的β-胡萝卜素达到了561.08 μg/g^[18]。本研究通过正交实验将β-胡萝卜素的产量提升到了202.20 μg/g,而在正交试验的基础上通过放大试验最终将β-胡萝卜素产量提升到了210 μg/g,在国内最高β-胡萝卜素产量的研究基础上提升了36.40%。因此,本研究为β-胡萝卜素在饲料中的廉价应用奠定了基础。

在本研究的蛋鸡饲喂和鸡蛋品质评价试验中,蛋鸡的采食量和日增重显著提高。Shevchenko等人的研究发现,在蛋鸡的日粮中添加β-胡萝卜素能够提高蛋鸡的采食量和日增重^[39]。任延利等人研究表明,在日粮中添加β-胡萝卜素能够显著提高雏鸡每日增重量,有效提高日粮增重比^[40]。与本研究的結果一致。功能性鸡蛋的出现已成为消费者关注的焦点。生产富含类胡萝卜素的鸡蛋因其多功能生物特性而备受关注,对蛋鸡日粮进行营养调整是生产此类鸡蛋的一种策略^[41]。研究结果表明,β-胡萝卜素可以沉积到鸡蛋中,并有助于提高鸡蛋的营养价值^[42]。在鸡蛋品质评价试验中,黎雄等人研究表明,在蛋鸡的日粮中添加32 mg/日β-胡萝卜素,可以加深蛋黄颜色,提高鸡蛋品质;在鸡日粮中添加20%左右的胡萝卜,对提高产蛋率有一定的作用,但是却不能显著增加蛋重^[43]。任延利等人的研究^[40]表明,在蛋鸡基础日粮中使用发酵产物替代豆粕能够改善蛋黄的色泽的原因是发酵物中含有丰富的类胡萝卜素,其中β-胡萝卜素含量最多^[30],它能够促进蛋鸡肠道营养物质的消化和吸收,促进色素沉淀,改善蛋黄色泽,提高鸡蛋品质。在本研究中,蛋鸡日常的β-胡萝卜素摄入量达到40 mg,发酵物替代蛋鸡日粮中

的豆粕成分能够显著提高蛋鸡的采食量和日增重,并且能够改善蛋黄色泽,提升鸡蛋品质。说明本研究中利用粗糙脉孢菌的发酵饲料直接饲喂,可达到与纯品β-胡萝卜素添加相当的结果,而本研究所需的工艺简单,在节约成本的同时还能够获得直接饲喂的高品质、多功能型的发酵饲料,为后续应用与推广奠定了基础。本研究仅探究了粗糙脉孢菌发酵饲料化的饲喂可行性,离发酵饲料规模化应用与推广还存在一定距离,还需要开展更多深入的研究,如饲料的发酵条件控制与优化、不同反刍动物对饲料的适应性、更大规模的饲喂试验等。

4 结论

以粗糙脉孢菌发酵豆渣生产β-胡萝卜素,通过单因素试验和正交试验对发酵条件进行了优化,拟合了发酵温度、基质pH和含水率3个因素对β-胡萝卜素产量影响的模型,确定的最佳工艺是发酵时间为72 h,发酵温度为30 ℃,发酵基质含水率为60%,pH为6,在此条件下β-胡萝卜素产量可达到202.20 μg/g(发酵物),浅盘放大试验获得β-胡萝卜素产量为210 μg/g(发酵物),该结果对利用粗糙脉孢菌规模化发酵生产富含β-胡萝卜素的发酵饲料具有指导意义。利用发酵产物代替蛋鸡日粮中的豆粕,不仅能够显著改善蛋鸡的生长和生产性能,还能使鸡蛋中积累β-胡萝卜素,显著提升鸡蛋的颜色。本研究将发酵产物直接用于蛋鸡饲喂,简化了下游工艺,节约成本的同时为畜牧业提供了优质饲料,具有重要的参考价值。

参考文献 [References]

1 Lin W, Zhen L, Hong J, Xiangzhao M. Biotechnology advances in β-carotene production by microorganisms [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2021 (111): 322-332

2 Rahul V, Krishika S. An overview of β-carotene production: current status and future prospects [J]. *Food Biol Sci*, 2023 (47): 17-27

3 孙铁男. 好食脉孢菌固态发酵麸皮产类胡萝卜素功能性饲料[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020 [Sun YN. Production of carotenoid functional feed from solid state fermentation of bran of *Neurospora habilis* [D]. Harbin: Harbin Commercial University, 2020]

4 Chew BP. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health [J]. *J Nutr*, 1995, 125 (6): 1804-1808

5 李梓妍. β-胡萝卜素不同添加量对奶牛产后繁殖性能、生殖激素及抗氧化指标的影响[D]. 银川: 宁夏大学, 2017 [Li Z Y. Effects of different additions of β-carotene on postpartum reproductive performance, reproductive hormones and antioxidant indexes in dairy cows [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2017]

6 吉莹利, 刘碧凡, 杨婷, 赵玉蓉. β-胡萝卜素的生物学功能及在动物生产中的应用[J]. 湖南饲料, 2020 (1): 37-40 [Ji YL, LIU BF, Yang T, Zhao YR. Biological function of beta-carotene and its application in animal production [J]. *Hunan Feed*, 2020 (1): 37-40]

7 杨旭. 日粮中添加不同水平β-胡萝卜素对育成熟期奶牛生长性能生理、生化指标的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020 [Yang X. Effects of dietary supplementation of different levels of beta-carotene on growth performance, physiological and biochemical indexes of dairy cows during growing period [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020]

8 安济山, 胡睿智, 杨玲, 贺建华. β-胡萝卜素的生理功能及其在母猪生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2019, 31 (11): 4933-4939 [An JS, Hu RZ, Yang L, H JH. Physiological function of beta-carotene and its application in sow production [J]. *Anim Nutr*, 2019, 31 (11): 4933-4939]

9 Zhao JLZ. Production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* through altering yeast lipid metabolism [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118 (5): 2043-2052

10 叶双明, 王胜南, 马金萍, 晁红娟, 吕红萍, 张莉华. 化学合成β-胡萝卜素和天然β-胡萝卜素(发酵法)的鉴别区分初探[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31 (1): 76-84 [Ye SM, Wang SN, Ma JP, Yao HJ, Lü HP, Zhang LH. Chemical synthesis of β-carotene and natural β-carotene (fermentation method) differentiation initial investigation [J]. *Chin Food Addit*, 2020, 31 (1): 76-84]

11 李振辉. 杜氏盐藻β-胡萝卜素合成研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2019 [Li ZH. Dust salt algae β-carotene synthesis studies [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2019]

12 庄坤. 两种工业杜氏盐藻生长的优化和β-胡萝卜素积累机制的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020 [Zhuang K. The optimization of both industrial ductal algae growth and the study of the mechanisms of beta-carotene accumulation [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020]

13 Postigo L, Daniel A, Jacobo V, Guajardo F, Amezcuita L, Tomás G.

- Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: recent advances and its industrial feasibility [J]. *Food Biol Sci*, 2021, **5** (41): 926-929
- 14 Mehta BJ, Obraztsova IN, Cerda E. Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** (7): 4043-4048
 - 15 Zi HZ, Xue H, Li LW, Jing JG, Shuai Z, Meng H. The fermentation technology optimization with high β -carotene by red yeast [J]. *Food Ferment Technol*, 2020, **50** (1): 66-73
 - 16 Goodwin TW. Biosynthesis of carotenoids: an overview [J]. *Method Enzymol*, 1993, **214**: 330-340
 - 17 Folco HD, Freitag M, Ramon A, Temporini ED, Alvarez ME, Garcia I, Scazzocchio C, Selker EU, Rosa AL. Histone H is required for proper regulation of pyruvate decarboxylase gene expression in *Neurospora crassa* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2003, **2** (2): 341-350
 - 18 杜佳, 胡盛本, 余诚玮, 梁莎, 邓泽元, 李静. 粗壮脉纹孢菌孢子中 β -胡萝卜素的提取优化[J]. 食品工业, 2017 (11): 4 [Du J, Hu SB, Yu CW, Liang S, Deng ZY, Li J. Optimized extraction of β -carotene in thick pulse bacterial membranes [J]. *Food Ind*, 2017 (11): 4]
 - 19 Mussagy CU, Winterburn J, Santos-Ebinuma VC, Pereira JFB. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, **103** (3): 1095-1114
 - 20 Chawla P. Microbial cellulose. Fermentative production and applications [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2009, **47**: 107-124
 - 21 李静, 杨建远, 杨凤玲, 何悦铭, 邓泽元. 粗壮脉纹孢菌固态发酵产类胡萝卜素的条件优化及其抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2017, **17** (5): 55-63 [Li J, Yang JY, Yang FL, He YM, Deng ZY. Conditions for the optimization of the fermented carotenoid and its antioxidant activity [J]. *Chin Food J*, 2017, **17** (5): 55-63]
 - 22 赵峰, 聂小琦, 余丽娟, 李芳, 湛斌, 于方明. 木聚糖酶高产菌株的筛选及其产酶营养条件研究[J]. 酿酒科技, 2008 (9): 3 [Zhao F, Nie XQ, Yu LJ, Li F, Zhan B, Yu FM. Screening of high xylanase-producing strains and their enzyme-producing nutritional conditions [J]. *Liquor-mak Sci Technol*, 2008 (9): 3]
 - 23 李峰. 烘干法对测定玉米秸秆含水率不确定度的评定 [J]. 新疆农机化, 2023 (4): 46-48 [Li F. Evaluation of the uncertainty of the drying method for the determination of the moisture content of corn stove [J]. *Xinjiang Agric Mech*, 2023 (4): 46-48]
 - 24 叶帆, 巫广华, 陈晓嘉. 高效液相色谱法同时测定番茄红素油树脂中的番茄红素及 β -胡萝卜素[J]. 现代食品, 2019 (16): 171-173 [Ye F, Wu GH, Chen XJ. Simultaneous determination of lycopene and β -carotene in lycopene oleoresin by high performance liquid chromatography [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019 (16): 171-173]
 - 25 张吉鹏, 李龙瑞. 功能大豆寡肽蛋白饲料的研制及其固态发酵工艺参数的优化研究[J]. 中国奶牛, 2010 (10): 7 [Zhang JK, Li LR. The study on optimized technical parameters of solid-state fermentation soybean meal with associative multi-bacterial species to produce functional soy oligopeptide-protein feeds [J]. *Chin Dairy Cattle*, 2010 (10): 7]
 - 26 郭全海, 华书婧, 姬普雨. 日粮添加刺五加多糖对蛋鸡产蛋性能、蛋品质及血清生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2023 (10): 46-49 [Guo QH, Hua SQ, Ji PY. Effects of dietary acanthopanax polysaccharide on laying performance, egg quality and serum biochemical indexes of laying hens [J]. *Chin Feed*, 2023 (10): 46-49]
 - 27 刘威, 赵园园, 陈小龙. 土壤含水率对豫中植烟土壤微生物群落多样性及氮循环功能基因丰度的影响[J]. 中国农业科技导报, 2023 (7) 1-12 [Li W, Zhao YY, Chen XL. Soil water content impact on soil microbial diversity and genetic abundance of nitrogen cycle function [J]. *J Agric Sci Technol*, 2023 (7): 1-12]
 - 28 王静. 微环境的调控对酶活的影响机制研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2020 [Wang J. Study of the mechanisms of regulation of the micro-environment on enzyme activity [D]. Beijing: Beijing University of Chemistry, 2020]
 - 29 何连顺, 张仲良, 米造吉, 李斌水, 马静, 马腾. 生物催化合成中生物酶破碎过程温度与浓度对酶活的影响[J]. 化工设计通讯, 2017, **43** (1): 130+139 [He LS, Zhang ZL, Mi ZJ, Li BS, Ma J, Ma T. Effects of the temperature and concentration of the biosynthesis breakdown process on enzyme activity [J]. *Chem Design Commun*, 2017, **43** (1): 130+139]
 - 30 于智慧, 王宁, 蔡朝霞, 马美湖. 鸡蛋蛋黄高密度脂蛋白结构、组成、来源及功能研究进展[J]. 中国家禽, 2016 (4): 38-43 [Yu ZH, Wang N, Cai ZX, Ma MH. Progress in the study of the structure, composition, source and function of egg yolk high-density lipoprotein in eggs [J]. *Chin Poultry*, 2016 (4): 38-43]
 - 31 张关锋, 曾文林, 郑梦莉, 陈清华. 微生物发酵饲料的特性及其在动物生产中的应用研究进展[J]. 饲料工业, 2023 (9): 1-16 [Zhang GF, Zeng WL, Zheng ML, Chen QH. Research progress on the characteristics of microbial fermented feeds and their application in animal production [J]. *Feed Ind Mag*, 2023, (9): 1-16]
 - 32 武深秋. 秸秆菌体蛋白生物饲料的优点及制作技术[J]. 湖南饲料, 2005 (3): 35 [Wu SQ. Advantages and manufacturing techniques of bacterial protein biofeed [J]. *Hunan Feed*, 2005 (3): 35]
 - 33 封海生, 姚红涛, 王志宽, 吴广进, 毛兴艳, 谢文平. 发酵来源 β -胡萝卜素和虾青素对蛋鸡产蛋品质与抗氧化功能的影响[J]. 当代畜牧, 2020 (1): 14-18 [Feng HS, Yao HT, Wang ZK, Wu GJ, Mao XY, Xie WP. The effects of beta-carotene and crimpine on egg quality and antioxidant function [J]. *Contemp Livestock*, 2020 (1): 14-18]
 - 34 吴邦国. 玉米秸秆预处理及粗糙脉孢菌发酵[D]. 镇江: 江苏大学, 2018 [Wu BG. Corn stover pre-treatment and fermentation by *Neurospora crassa* [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018]
 - 35 黄文利, 欧阳耀铭, 卢玲. 粗壮脉纹孢菌发酵前后豆渣多糖理化性质和结构特性[J]. 食品工业科技, 2022, **43** (3): 7-14 [Huang WL, Ouyang YM, Lu L. Physicochemical and structural properties of soya bean dregs polysaccharides before and after fermentation by *Neurospora crassa* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, **43** (3): 7-14]
 - 36 Miao QX, Yang YY, Du LH, Tang CH, Zhao QY, Li FD, Zhang JM. Development and application of SFC-DAD-MS/MS method to determine carotenoids and vitamin A in egg yolks from laying hens supplemented with β -carotene [J]. *Food Chem*, 2023, **414**: 135-276
 - 37 张妍妍, 刘佩卉, 刘新利. 粗糙脉孢菌及其在发酵工业中的应用研究[J]. 山东科学, 2011, **24** (3): 6 [Zhang YY, Liu PH, Liu XL. Studies on *Neurospora crassa* and its application in the fermentation industry [J]. *Shandong Sci*, 2011, **24** (3): 6-16]
 - 38 李红艳, 邓泽元, 范亚苇, 余苇. 粗壮脉纹孢菌发酵豆渣所产类胡萝卜素的的研究[J]. 食品工业科技, 2009, **30** (4): 160-162+199 [Li HY, De ZY, Fan YW, Yu W. The study of carotenoids produced by the fermented bacterial grapefruit [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, **30** (4): 160-162+199]
 - 39 Shevchenko LV, Yaremchuk OS, Gusak S, Mihalska VM, Poliakovskiy VM. Effect of glycine microelements and β -carotene on content of microelements and vitamin A in quail eggs [J]. *Ukr J Ecol*, 2017, **7**: 19-23
 - 40 任延利, 齐德生, 郭万英. 发酵 β -胡萝卜素对蛋鸭生产性能及蛋黄色泽的影响[J]. 养殖与饲料, 2006 (12): 11-13 [Ren YL, Qi DS, Guo WY. Effects of fermented beta-carotene on egg duck production performance and egg yellowing [J]. *Breeding Feed*, 2006 (12): 11-13]
 - 41 Dansou DM, Zhang HY, Yu YN, Wang H, Tang CH, Zhao QY, Zhang JM. Carotenoid enrichment in eggs: from biochemistry perspective [J]. *Anim Nutr*, 2023, **14**: 315-333
 - 42 Chen RC, Jiang CY, Li XZ, Shi XF, Zhuang LY, Zhou WB, Zheng JX. Research on Chinese consumers' shell egg consumption preferences and the egg quality of functional eggs [J]. *Poult Sci*, 2023, **10**: 332-357
 - 43 黎雄, 王胜萍, 赖炳群, 姚小桃. 添加不同剂量 β -胡萝卜素对鸡蛋蛋黄颜色影响观察[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2017 (4): 14 [Li X, Wang SP, Lan BQ, Yao XT. The effect of adding different doses of β -carotene on egg yellow color observed [J]. *Jangxi Veterin J*, 2017 (4): 14]