

魏嘉, 李丽, 刘军, 等. 混菌发酵对提高棉籽粕蛋白和降低游离棉酚的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 231-238. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100091

WEI Jia, LI Li, LIU Jun, et al. Effect of Mixed Fermentation on Improving Cottonseed Meal Protein and Reducing Free Gossypol[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(16): 231-238. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100091

· 工艺技术 ·

混菌发酵对提高棉籽粕蛋白和降低游离棉酚的影响

魏嘉¹, 李丽^{1,*}, 刘军¹, 毛祥¹, 赵琦锴^{1,2}, 邹雨宏¹
(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644000;
2. 乐山恒峰华邦生物科技有限公司, 四川乐山 614000)

摘要: 为了降低棉籽粕中游离棉酚的含量, 提高棉籽蛋白品质, 本研究采用两阶段发酵法对棉籽粕进行处理, 即先添加屎肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, E), 再添加米曲霉 (*Aspergillus oryzae*, M1) 进行分段发酵, 通过单因素实验和正交试验优化混菌发酵工艺条件。结果表明, 当屎肠球菌接种量 1.5%、发酵温度 37 °C、发酵时间 24 h、米曲霉接种量 1.5%、发酵温度 30 °C、发酵时间 96 h、棉粕物料初始水分 50% 时, 棉籽粕的粗蛋白含量从 39.6% 提高到 49.64%, 酸溶蛋白含量从 4.79% 提高到 36.58%, 游离棉酚的含量从 1370 mg/kg 降低至 45.32 mg/kg, 其降解率达到了 96.7%, 研究结果为棉粕的高值化利用提供了科学依据。

关键词: 发酵棉籽粕, 两阶段发酵, 屎肠球菌, 米曲霉, 蛋白品质, 混菌发酵, 游离棉酚

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)16-0231-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100091

本文网刊:



Effect of Mixed Fermentation on Improving Cottonseed Meal Protein and Reducing Free Gossypol

WEI Jia¹, LI Li^{1,*}, LIU Jun¹, MAO Xiang¹, ZHAO Qikai^{1,2}, ZOU Yuhong¹

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Light Chemical Technology, Yibin 644000, China;

2. Leshan Heng Feng Hua Bang Biotechnology Co., Ltd., Leshan 614000, China)

Abstract: To reduce the content of free gossypol in cottonseed meal and improve the quality of cottonseed protein, this study used a two-stage fermentation method to treat cottonseed meal. *Enterococcus faecalis* (E) was first added, and then *Aspergillus oryzae* (M1) was added for staged fermentation. The fermentation conditions of mixed were optimized by single factor and orthogonal experiments. The results showed that when the inoculation amount of *Enterococcus faecium* was 1.5%, the fermentation temperature was 37 °C, the fermentation time was 24 h, the inoculation amount of *Aspergillus oryzae* was 1.5%, the fermentation temperature was 30 °C, the fermentation time 96 h, and the initial fermentation moisture of cottonseed meal was 50%, the crude protein content of cottonseed meal increased from 39.6% to 49.64%, the acid-soluble protein content increased from 4.79% to 36.58%, and the free gossypol content decreased from 1370 mg/kg to 45.32 mg/kg, and the detoxification rate reached 96.7%. The results would provide a scientific basis for the high-value utilization of cottonseed meal.

Key words: fermented cottonseed meal; two-stage fermentation; *Enterococcus faecalis*; *Aspergillus oryzae*; protein quality; mixed bacteria fermentation; free gossypol

收稿日期: 2023-10-13

基金项目: 四川省科技厅项目 (2022NSFSC1733)。

作者简介: 魏嘉 (1998-), 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: weij0808@163.com。

* 通信作者: 李丽 (1982-), 博士, 教授, 研究方向: 微生物发酵代谢调控, E-mail: li_li821008@163.com。

2021~2022年,中国的棉花产量约为588万吨,每生产100公斤的棉花,就有150 kg的棉籽产出^[1]。棉籽粕是棉籽榨油后的副产物,其粗蛋白含量较高,可用于家畜和鱼类的蛋白补充剂^[2-4],是一种具有极高性价比的混合饲料添加物。同时,棉籽粕中氨基酸组成平衡合理,除蛋氨酸含量稍低,其余必需氨基酸含量均达到由联合国粮农组织和世界卫生组织(FAO/WHO)推荐的标准^[5],是一种可供人体食用的优质膳食蛋白资源。但作为棉籽中主要的抗营养物质,棉酚占棉籽干物质质量的0.02%~6.64%^[6],棉籽中的棉酚包括游离棉酚和结合棉酚,其中结合棉酚不能被人或畜禽的消化系统吸收、毒性低,可通过粪便快速排除。而游离棉酚则对细胞、神经系统和血管等具有明显的毒害作用^[7],使得蛋白的消化和吸收受到影响。因此,为了提高棉粕在食品中的用量,需要通过降低棉粕中的游离棉酚来减少对动物机体带来的毒害。

常用的脱毒技术有物理、化学、微生物等方法。物理脱毒方法以膨化、干热、浸泡、蒸煮等方式为主。其中膨化法不仅对游离棉酚的降低效果显著^[8],还具有成本低、操作方便等优点,但该方法容易导致样品中的蛋白质经加热和加压处理后变性,使棉籽粕的营养价值有所下降;化学法常用的有钝化法、碱处理法、萃取法。碱处理法常用的试剂有硫酸亚铁、尿素等^[9]。对游离棉酚的降低效果也非常明显,但在处理过程中棉粕味道较大、适口性差,且对设备抗腐蚀要求高、投资大、成本高。混合溶剂萃取法使用混合溶剂从棉粕中萃取棉酚^[10],处理后的棉粕蛋白质量高、品质好,但是投资大、不易推广;微生物脱毒法通过在棉粕中接种微生物进行发酵,对棉粕中的游离棉酚进行分解,从而达到脱毒的效果。张莉等^[11]筛选出一株具有良好降解棉酚能力的乳酸片球菌,使棉粕中游离棉酚的脱毒率达到40%;吴慧昊等^[12]发现东洋芽孢杆菌可以将游离棉酚的含量降低到81.3%;宣秋希等^[13]通过接种比例为酿酒酵母SC17-1:植物乳杆菌LP15-1:枯草芽孢杆菌BS15-3=1:1:10,获得的发酵棉籽粕的游离棉酚降解率为66.28%。目前,生物发酵是脱毒效果最好,最安全,生产成本较低,最有发展前途的脱毒方法^[14]。

但目前大多数对棉籽粕营养价值提升的研究仅侧重于通过微生物发酵进行脱毒,对于改善蛋白质品质的研究较少。虽然游离棉酚得到了降解,但棉籽粕中的大分子蛋白较多,小肽含量和蛋白溶解度均较低,对于后续投入食品中作为可食用的蛋白补充剂优势不明显。相较于粗蛋白,酸溶蛋白具有更好的消化性和生物利用率,酸溶蛋白的含量直接影响着动物的生长发育和免疫能力,其含量也反映了物料中蛋白质的质量。目前的研究中,主要以单菌发酵为主,虽然能降低游离棉酚的含量,但也存在一些不足,如曲霉的脱毒效果不佳,芽孢杆菌在氨基酸代谢中会发生脱

羧或脱氨反应,产生刺鼻的氨味等。本实验采用两阶段混菌发酵,可以在改善棉籽粕蛋白品质的同时也能进一步提高游离棉酚的脱毒率,为拓展棉籽蛋白的应用领域奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米曲霉 *Aspergillus oryzae*(M1)、黑曲霉 *Aspergillus niger*(A1)、屎肠球菌 *Enterococcus faecalis*(E)、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*(L)、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*(C1)、产阮假丝酵母 *Candida utilis*(C2)、布拉迪酵母 *Saccharomyces cerevisiae boulardii*(C3)、芽孢杆菌-枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*(B1)、地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*(B2) 本实验室保藏;棉粕、麸皮 乐山恒峰华邦生物科技有限公司提供;玉米粉 超市采购。

T-114型分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;T6紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;QYC-2102C型恒温培养摇床 上海福马实验设备有限公司;MF80BSH-2型霉菌培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;LS-75HD立式高压蒸汽灭菌器 江阴滨江医疗设备有限公司;SW-CJ-2F型超级洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;K9840自动凯氏定氮仪 山东海能科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的制备 保藏培养基:霉菌采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、酵母菌采用麦芽汁琼脂培养基、乳酸菌采用乳酸细菌琼脂培养基(MRS)、芽孢杆菌采用营养肉汤琼脂培养基(NB);霉菌麸皮种子培养基:麸皮:水=1:0.9(m:v),自然pH混匀取30 g装于500 mL三角瓶,121℃灭菌15 min;酵母菌培养基:酵母浸出粉葡萄糖培养基(YPD):酵母膏10 g/L、蛋白胨20 g/L、葡萄糖20 g/L。取100 mL培养基装入250 mL的三角瓶中,121℃灭菌15 min;乳酸菌培养基:MRS培养基参考文献[9]配制。取100 mL培养基装入250 mL的三角瓶中,121℃灭菌15 min;芽孢杆菌培养基:蛋白胨10 g、可溶性淀粉15 g、牛肉浸粉3 g、酵母浸粉5 g、氯化钠5 g、加蒸馏水至1 L。pH 7.2±0.2,取200 mL培养基装入250 mL的三角瓶中,121℃灭菌15 min;发酵培养基:棉粕:麸皮:玉米粉=85:5:10(m:m:m)。料水比1:0.9(m:v),自然pH;混匀取100 g装于1 L三角瓶,121℃灭菌15 min。

1.2.2 菌种的活化和种子的制备

1.2.2.1 菌种的活化 将保藏的菌种勾取2~3环分别接种于液体培养基中,霉菌接入PDA培养基,在30℃培养72 h;乳酸菌接入MRS培养基,在37℃培养24 h;酵母菌接入YPD培养基,在30℃培养24 h;芽孢杆菌接入芽孢杆菌培养基,在30℃培养48 h。

1.2.2.2 发酵种子的制备 将 1.2.2.1 中活化好的霉菌、乳酸菌、酵母菌和芽孢杆菌液分别接入麸皮培养基、MRS 培养基、YPD 培养基和芽孢杆菌培养基上,培养条件同 1.2.2.1。

1.2.3 适合棉籽粕固态发酵单菌株的筛选 将种子液以 5×10^7 CFU/mL 的接种量分别接入已灭菌处理 (121 °C, 15 min) 的 100 g 发酵培养基中(料水比 1:0.9 m/v)培养条件同 1.2.2.1。发酵结束后,将物料置于烘箱中 70 °C、24 h 烘干,之后粉碎过 40 目筛,用于测定游离棉酚的含量。

1.2.4 适合棉籽粕固态发酵混合菌株的筛选 取发酵培养基 100 g、料液比 1:0.9、121 °C、15 min 灭菌后,分别添加由 1.2.3 得出适合棉粕发酵最佳的单菌株进行混菌发酵,混合接种量 5%(m:v),接种比例为 1:1(v:v),发酵条件同 1.2.3,发酵结束后测定棉粕中蛋白含量和游离棉酚含量,以评价其发酵效果。

1.2.5 混菌固态发酵棉籽粕培养条件优化 通过混合菌株的筛选,确定屎肠球菌和米曲霉作为适合的菌株进行混菌发酵工艺条件优化。以屎肠球菌为固定培养条件(37 °C, 24 h),再加入米曲霉进行发酵,以酸溶蛋白含量为考核指标,按照 1.2.4 的流程进行操作。考察米曲霉在不同初始水分(45%、50%、55%、60%、65%),不同总接种量(1%、3%、5%、7%、9%),不同发酵温度(26、28、30、32、34 °C),不同发酵时间(48、72、120 h),接种比例为 1:1 条件下,分别对粗蛋白,酸溶蛋白和游离棉酚含量的影响。

1.2.6 正交试验设计 根据单因素实验筛选的结果,选取影响棉粕物料中蛋白含量和游离棉酚降解率最适参数作正交试验,对结果进行极差分析,以确定最佳的发酵条件。主要因素为初始水分(A)、总接种量(B)、M1 发酵温度(C)、M1 发酵时间(D),设置四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验,以确定混菌固态发酵棉粕物料的工艺条件。见表 1。

表 1 正交试验因素与水平设计

Table 1 Orthogonal experimental factors and horizontal design

水平	A 初始水分 (%)	B 总接种量 (%)	C M1 发酵温度 (°C)	D M1 发酵时间 (h)
1	50	1	28	72
2	55	3	30	96
3	60	5	32	120

1.2.7 理化指标测定 粗蛋白含量根据 GB/T 21264-2007《饲料用棉籽粕》方法测定^[14];酸溶蛋白含量根据 NY/T 3801-2020《饲料原料中酸溶蛋白的测定》^[15];游离棉酚采用国标标准 GB/T 13086-2020《饲料中游离棉酚的测定方法》测定^[16]。蛋白溶解度根据文献 [17] 测定。蛋白分子量分布采用 Tricine-SDS-PAGE 法测定^[18]。棉籽粕脱毒率计算公式如下:

$$W(\%) = \left(1 - \frac{M_2}{M_1}\right) \times 100$$

式中:W 表示脱毒率,%;M₁ 表示发酵前棉籽粕游离棉酚含量,mg/kg;M₂ 表示发酵后棉籽粕游离棉酚含量,mg/kg。

1.3 数据处理

每组数据重复三次,采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析,并用 Duncan 检验法进行多重比较,试验结果采用平均值±标准误差表示,以 $P < 0.05$ 作为差异性显著判断标准。采用 Origin 2018 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 单菌发酵对棉籽粕蛋白品质的影响

根据图 1 结果可知,黑曲霉、地衣芽孢杆菌和米曲霉在单菌发酵后提升粗蛋白和酸溶蛋白的效果较好,加入黑曲霉、地衣芽孢杆菌和米曲霉进行发酵后,物料的酸溶蛋白含量分别提升至 19.8%、23.6% 和 22%,粗蛋白含量分别提升至 42.5%、43.21% 和 42.8%,明显高于其他菌种。黑曲霉和米曲霉提升蛋白溶解度的效果较好,由于黑曲霉和米曲霉具有较强的纤维素酶活性^[19-20],能促进棉粕中营养素的降解,使粗蛋白含量提升,纤维素含量降低。但黑曲霉发酵的棉粕物料颜色较暗,感官效果不佳。地衣芽孢杆菌在发酵过程中产生的有机酸会降低物料的 pH,有利于酸溶蛋白的提高^[33]。因此选择地衣芽孢杆菌和米曲霉作为提升蛋白品质较好的菌株。

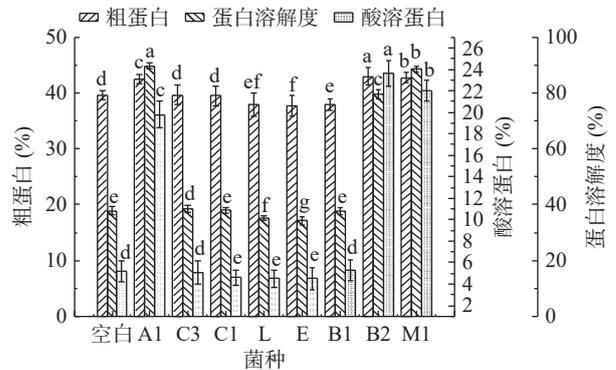


图 1 单菌发酵对蛋白品质的影响

Fig.1 Effects of single bacteria fermentation on protein quality 注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),图 2~图 7 同。

2.2 单菌固态发酵对降解游离棉酚的影响

根据图 2 结果可知,在乳酸菌属中,屎肠球菌的脱毒率最佳,脱毒率达到 94.4%,其次是植物乳杆菌,发酵后脱毒率达到 89.4%。在芽孢杆菌属中,地衣芽孢杆菌的脱毒能力较强,脱毒率达到 87.15%。与同样使用芽孢杆菌进行脱毒的研究相比较,王晓玲等^[21]筛选的一株枯草芽孢杆菌(ST-144),棉酚脱除率可达 48.5% 以上。洪振^[22]对乳酸菌和芽孢杆菌进行混菌发酵,使脱毒率提升至 85.11%。而米曲霉在后续混合发酵过程中,将蛋白质分解成小分子肽的能力

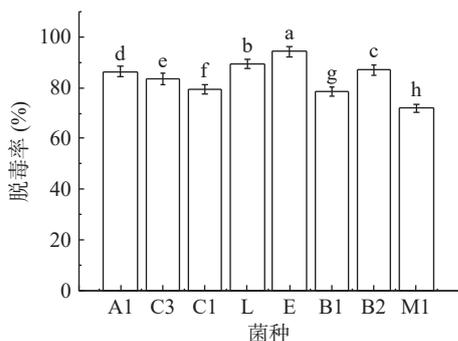


图2 单菌固态发酵对脱毒效果的影响

Fig.2 Effects of single bacteria solid fermentation on detoxification

较强,可有效提高物料粗蛋白和酸溶蛋白的含量。因此,结合 2.1 与 2.2 的结果,选择屎肠球菌、植物乳杆菌、地衣芽孢杆菌和米曲霉作为脱毒菌种,后续进行混菌固态发酵。

2.3 混菌固态发酵对棉籽粕蛋白含量的影响

从图 3 中可以看出,两个菌种的混菌发酵组合,其脱毒率最高为 96.8%,而三个菌种和四个菌种的组合中最高脱毒率分别是 94.66% 和 79.58%,可能是由于两个以上的菌种在发酵过程中会抢夺营养物质,使菌种在发酵过程中的协同作用不能完全发挥。

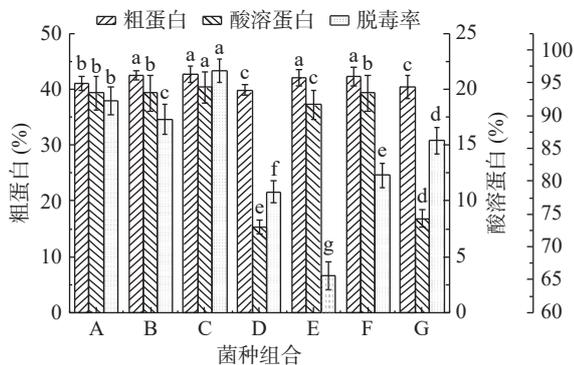


图3 混菌固态发酵对粗蛋白、酸溶蛋白和脱毒效果的影响

Fig.3 Effects of mixed bacteria solid fermentation on crude protein, acid-soluble protein and detoxification

注: A: E+B2; B: E+B2+M1; C: E+M1; D: E+L; E: E+L+M1; F: E+L+M1+B2; G: L+B2+M1

在 A 组, C 组和 D 组这 3 组两菌种组合中, C 组蛋白提升的效果显著优于其他菌种组合 ($P < 0.05$)。因此,选择使用屎肠球菌和米曲霉混菌发酵棉粕底物。

在 B 组, E 组和 G 组这 3 组三菌种组合中, B 组和 E 组都使用了屎肠球菌和米曲霉两株菌,这两组酸溶蛋白的含量都高于 G 组,说明米曲霉和植物乳杆菌混合发酵时,不利于酸溶蛋白含量的提高。同时, B 组的脱毒效果优于 E 组 ($P < 0.05$),说明屎肠球菌和植物乳杆菌混合发酵时,不利于脱毒。在与两个菌种的组合相比,多加入一个菌种对提高蛋白质品质和脱毒率并没有明显效果 ($P > 0.05$)。

将两菌种组合中最优的 C 组与三菌种组合中最

优的 B 组相比较可以看出, B 组的脱毒率相对于 C 组显著 ($P < 0.05$) 下降,这表明虽然屎肠球菌和地衣芽孢杆菌都是脱毒效果较强的菌株,但是混合使用具有拮抗作用。

综合比较可知,所有组中 C 组粗蛋白及酸溶蛋白含量均最高,分别为 44.25%、19.57%;相比于未发酵棉粕分别提高了 11% 和 75.3%。C 组混菌发酵后脱毒率可达到 96.8%。

通过将筛选出的脱毒效果较好的屎肠球菌和米曲霉进行混菌发酵,游离棉酚的降解率达到了 96.8%,不仅使棉粕中乳酸,醋酸等有机酸含量大大增加,提高了物料的风味和适口性,同时分泌了大量的蛋白酶,将大分子的蛋白分解成小分子的肽^[23]。与大分子蛋白相比,酸溶蛋白吸收效率更快且不易饱和,可直接安全的被动物肠道所吸收。

2.4 固态发酵工艺条件优化

2.4.1 初始水分对棉籽粕蛋白和游离棉酚含量的影响

图 4 是在不同初始水分下混菌发酵后的蛋白和游离棉酚含量。初始水分在 45%~65% 范围内,粗蛋白和酸溶蛋白均随着初始水分的升高呈现先上升后下降的趋势,且有显著差异 ($P < 0.05$)。粗蛋白在初始水分为 50% 时达到最大值 47.85%,酸溶蛋白在初始水分 55% 时达到最大值 24.65%。但当初始发酵水分超过 55%,酸溶蛋白含量显著下降 ($P < 0.05$),可能是由于发酵底物水分含量过高,影响了米曲霉对空气的利用^[24]。但如果发酵底物的含水量过低,菌体生长受到抑制,使得米曲霉分解抗营养因子受到阻碍,会导致产生活性酶能力降低^[19]。游离棉酚则随着初始水分的升高呈现先下降后上升的趋势,有显著差异 ($P < 0.05$),在初始水分 50% 时达到最小值 65.32 mg/kg。根据试验结果,选择 50%, 55% 和 60% 作为正交试验的因素水平。

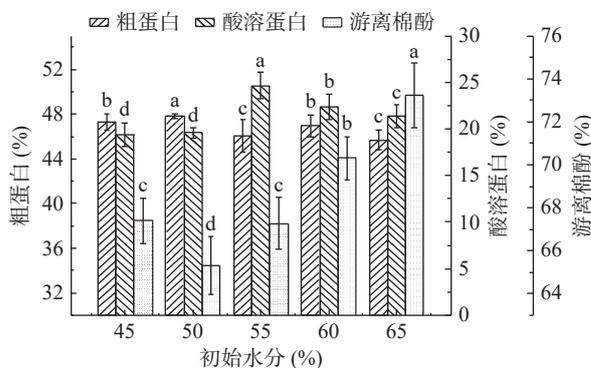


图4 初始水分对混菌发酵棉籽粕粗蛋白、酸溶蛋白和游离棉酚含量的影响

Fig.4 Effect of initial moisture on the content of crude protein, acid soluble protein, and free gossypol in cottonseed meal during mixed bacterial fermentation

2.4.2 总接种量对棉籽粕蛋白和游离棉酚含量的影响

图 5 为不同总接种量混菌发酵棉籽粕后的蛋白

和游离棉酚含量。结果表明, 总接种量在 1%~9%, 粗蛋白和酸溶蛋白含量均随接种量的增加呈先上升后下降的趋势, 且具有显著差异($P<0.05$)。粗蛋白在总接种量 3% 时达到最大值 48.93%, 酸溶蛋白在总接种量 5% 时达到最大值 35.44%。发酵底物内菌种的含量在达到饱和以后, 如果继续增加接种量, 可能会加速菌种之间由于营养物质的不足而发生的竞争, 不利于微生物的生存和生长, 影响棉粕物料的品质^[25]。游离棉酚的含量呈现出先降低后增高的趋势, 在总接种量为 5% 时达到最低值 53.4%。综合各因素, 选择 5% 作为最佳接种量进行后续试验。

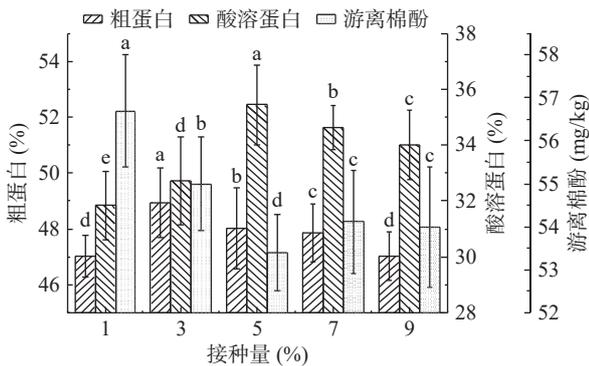


图 5 总接种量对混菌发酵棉籽粕粗蛋白、酸溶蛋白和游离棉酚含量的影响

Fig.5 Effect of total inoculation amount on the content of crude protein, acid soluble protein, and free gossypol in cottonseed meal fermented by mixed bacteria

2.4.3 发酵温度对棉籽粕蛋白和游离棉酚含量的影响 图 6 为不同温度下混菌发酵后的蛋白和游离棉酚含量。由于米曲霉在提高蛋白质品质上起决定性作用, 因此仅优化米曲霉的发酵温度。结果表明, 发酵温度在 26~34 °C 范围内, 酸溶蛋白含量随着温度的升高呈现先上升后下降的趋势, 且有显著性差异($P<0.05$)。在发酵温度 30 °C 时达到最大值 26.5%。与常磊等^[4]的研究结果相同, 当发酵温度较低时, 蛋白酶活性低, 不利于分解大分子蛋白, 而随着发酵温度超过 32 °C, 由于固态发酵不利于散热, 因此在发

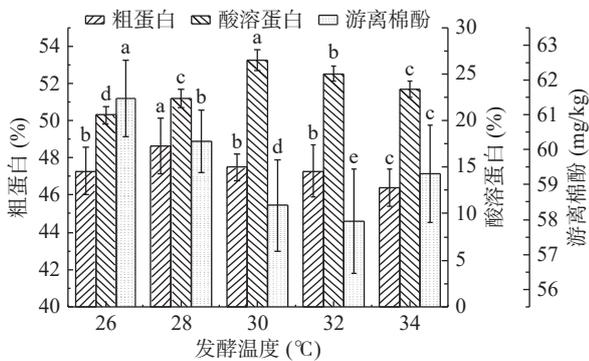


图 6 发酵温度对混菌发酵棉籽粕粗蛋白、酸溶蛋白和游离棉酚含量的影响

Fig.6 Effect of fermentation temperature on the content of crude protein, acid soluble protein, and free gossypol in cottonseed meal fermented by mixed bacteria

酵过程中物料实际温度会高于所设温度, 较高的温度可能对米曲霉的生长产生了不利影响, 减弱了米曲霉的产酶能力, 从而导致降解大分子蛋白的能力下降。游离棉酚的含量随着温度的升高呈现先下降后上升的趋势, 在发酵温度 30 °C 时达到了最小值。综合各因素, 选择 30 °C 为合适的发酵温度。

2.4.4 发酵时间对棉籽粕蛋白和游离棉酚含量的影响 米曲霉在不同时间下, 混菌发酵棉籽粕后的蛋白和游离棉酚含量结果如图 7 所示。发酵时间在 48~120 h 范围内, 蛋白含量随着时间的增加呈现先上升后下降的趋势, 且有显著性差异($P<0.05$)。粗蛋白和酸溶蛋白含量在发酵时间 96 h 时分别达到最大值 49.81% 和 36.65%。发酵时间对蛋白含量有较大影响, 发酵过程中, 米曲霉产生的蛋白酶对物料中的大分子蛋白进行降解, 使蛋白的含量逐步提高^[19], 而米曲霉所产的纤维素酶可能有助于释放被纤维素包裹或阻隔的蛋白质, 也进一步提高了物料的蛋白品质。游离棉酚含量随着时间的增加而下降, 且有显著性差异($P<0.05$), 在发酵时间 120 h 达到最小值 46.31 mg/kg; 与 96 h 相比, 仅下降 1.46 mg/kg。综合各因素, 选择 96 h 作为最佳发酵时间。

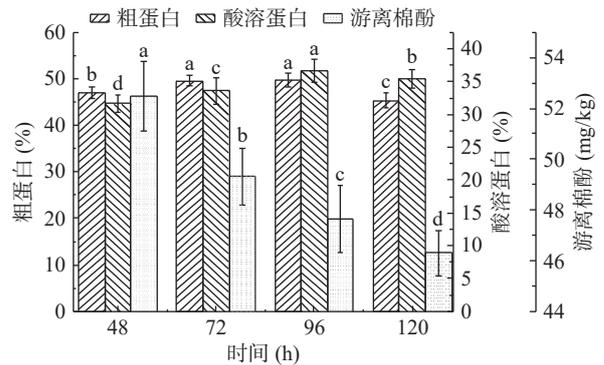


图 7 发酵时间对混菌发酵棉籽粕粗蛋白、酸溶蛋白和游离棉酚含量的影响

Fig.7 Effect of fermentation time on the content of crude protein, acid soluble protein, and free gossypol in cottonseed meal fermented by mixed bacteria

2.5 正交试验结果

正交试验结果如表 2 所示, 经过固态发酵后得到的物料品质更优, 发酵时的接种量, 初始水分, 发酵温度, 发酵时间是影响发酵的主要因素。由于对蛋白质品质起主要作用的菌种是米曲霉, 因此仅优化米曲霉的发酵温度和发酵时间。正交试验结果表明, 8 号实验组酸溶蛋白含量最高, 达到 35.22%。但综合粗蛋白和游离棉酚的数据比较可知, 2 号实验组粗蛋白含量和游离棉酚降解率都明显高于 8 号, 分别达到 50.21% 和 45.76%, 且 2 号酸溶蛋白含量仅比 8 号低 1.8%, 因此选择 2 号实验组为最佳工艺组合。通过极差分析可知, 对酸溶蛋白含量影响的主次顺序为 D>B>C>A。即影响最大的因素是发酵时间、影响最小的是初始水分; 对游离棉酚降解率影响的主

次顺序为 B>D>A>C。即影响最大的因素是温度、影响最小的是接种量；粗蛋白含量影响的主次顺序为 A>C>B>D。即影响最大的因素是初始水分、影响最小的是发酵时间。以酸溶蛋白含量为考核指标，最终确定的最优水平分别为 A₂、B₂、C₂、D₃，即最优组合为 A₂B₂C₂D₃，即初始水分 55%，总接种量 3%，米曲霉发酵温度 30℃，发酵时间 120 h，屎肠球菌发酵 24 h 为固定时间，共培养 144 h。

综合极差分析过程中由于各因素的数级不同，为进一步分析各因素对蛋白品质的影响效应，对表 2 数据进行方差分析，方差结果如表 3 所示。对各因素影响的显著性进行判断^[26]，当显著性小于 0.05 时，因素影响显著，当显著性大于 0.05 时，因素

无显著影响。据此可以判断温度、水分、接种量对蛋白品质的影响显著，时间无显著影响，属于次要影响因素。

2.6 验证试验

按照正交试验结果，选择最优组合 A₂B₂C₂D₃ 和实验组 2 进行验证实验，分别平行安排三组试验，测定粗蛋白、酸溶蛋白及游离棉酚的含量，确定最佳发酵工艺，结果见表 4。

由试验结果可知，最优组合的蛋白和游离棉酚含量低于 2 号组合，因此采用 2 号组合的工艺条件进行发酵，即初始水分 50%，总接种量 3%，米曲霉温度 30℃，米曲霉时间 96 h。混合棉粕中粗蛋白和酸溶蛋白含量均达到预期，证明该发酵工艺可行。同时

表 2 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal tests

实验号	初始水分(%)	总接种量(%)	M1发酵温度(℃)	M1发酵时间(h)	酸溶蛋白(%)	粗蛋白(%)	游离棉酚(mg/kg)
1	50	1	28	72	31.24±0.95	45.33±0.94	50.82±2.13
2	50	3	30	96	33.45±0.25	50.21±1.25	45.76±1.44
3	50	5	32	120	33.21±0.98	47.31±1.75	46.58±1.73
4	55	1	30	120	35.22±0.33	46.62±2.13	46.89±2.11
5	55	3	32	72	33.22±0.88	44.28±0.68	60.31±1.87
6	55	5	28	96	31.36±0.30	43.72±1.72	62.35±2.11
7	60	1	32	96	27.45±0.33	40.45±1.95	65.44±1.07
8	60	3	28	120	35.25±0.78	43.33±0.88	62.46±1.68
9	60	5	30	72	32.11±0.2	46.25±0.62	48.64±0.73
酸溶蛋白	k1	32.63	31.33	32.61	32.19		
	k2	33.22	33.97	33.59	30.75		
	k3	31.60	32.18	31.29	34.56		
	R	1.60	2.64	2.30	3.81		
粗蛋白	k1	47.61	44.13	44.12	45.28		
	k2	44.87	45.94	47.69	44.79		
	k3	43.34	45.76	44.01	45.75		
	R	4.27	1.81	3.68	0.96		
游离棉酚	k1	47.72	54.38	58.54	53.25		
	k2	56.51	56.17	47.09	57.85		
	k3	58.84	52.52	57.44	51.97		
	R	11.12	3.65	11.45	5.88		

表 3 方差分析结果
Table 3 Analysis of variance results

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
初始水分	61.46	2	30.73	135.52	0.000	*
总接种量	15.35	2	7.67	33.85	0.000	*
发酵温度	44.79	2	22.39	98.76	0.000	*
发酵时间	0.5	2	0.25	1.1	0.372	
误差	2.04	9	0.22			
总计	37185.99	18				

表 4 正交试验最优组合验证结果
Table 4 Optimal combination verification results of orthogonal experiments

试验号	水平组合	粗蛋白含量(%)	酸溶蛋白含量(%)	游离棉酚含量(mg/kg)
优化前的棉籽粕	-	44.25±0.48	19.57±0.36	76.44±0.86
正交试验2号	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	50.21±1.25	33.62±0.52	45.32±0.43
最优组合	A ₂ B ₂ C ₂ D ₃	50.08±0.77	32.51±0.31	46.04±0.68

通过与未进行工艺优化的混合棉粕对比, 优化后的混合棉粕粗蛋白和酸溶蛋白的含量分别从 44.25% 和 19.57% 提升至 50.68% 和 33.62%, 游离棉酚降解率从 94.42% 提高至 96.7%。

2.7 棉粕中大分子蛋白降解情况分析

将发酵前后和酶解前后所得的混合棉粕样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以未处理过的棉粕作为对照, 结果如图 8 所示。结果表明, 发酵处理对大分子蛋白有较强的降解作用, 由于棉粕的蛋白分子量主要在 80 kDa 左右^[26], 经发酵处理 48 h 的棉粕, 除去了大部分分子量较大的蛋白质, 其他分子量也基本上处于 17 kDa 以下, 使大分子蛋白被降解为利于吸收的小分子蛋白类, 从而可实现棉粕蛋白消化利用率的提高。

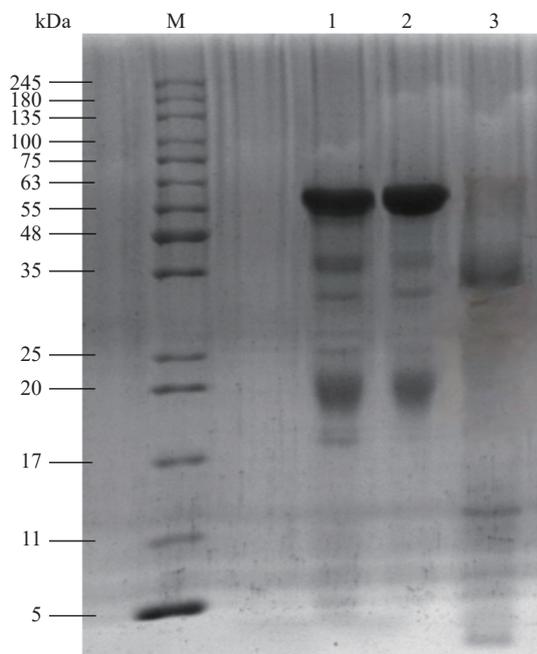


图 8 棉籽粕发酵前后蛋白分子量组成变化

Fig.8 Changes of protein molecular composition of cottonseed meal before and after fermentation

注: 1: 空白; 2: 混合棉粕样品; 3: 混菌固态发酵后的混合棉粕样品; M: 彩虹光谱蛋白 marker。

3 结论

经初始发酵水分、发酵温度、接种量及发酵时间四个因素的正交优化试验, 确定棉粕物料的最优发酵条件为: 初始水分 50%、总接种量 3%、米曲霉发酵温度 30 ℃、发酵时间 120 h (米曲霉: 96 h, 屎肠球菌: 24 h)。在此条件下, 粗蛋白和酸溶蛋白含量分别提高了 16.71% 和 88.31%。在游离棉酚测定中, 屎肠球菌对棉粕的脱毒效果较好, 加入米曲霉进行混菌发酵后进一步提高了脱毒率, 使游离棉酚含量降至 45.32 mg/kg。在蛋白分子量的测定中, 发酵后的棉粕蛋白分子量由 80 kDa 降至 17 kDa 以下。研究证明混菌发酵使棉粕中的营养物质有效提高, 且对棉粕中的抗营养因子降解效果较好。本研究为棉粕的

开发利用提供了客观依据, 棉粕作为高蛋白原料具有重要研究意义和应用价值。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 中国饲料数据库 [EB/OL]. [2020-12-08] (2022-10-06) [China Feed Database [EB/OL]. [2020-12-08] (2022-10-06.)]
- [2] 潘晶. 棉籽粕蛋白的制备及其性质研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2010. [PAN J, Study on preparation and property of protein from cottonseed meal [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.]
- [3] 舒文秀, 周瑞, 蓝婧婷, 等. 棉籽粕脱毒技术及其在畜禽生产中的应用 [J]. 饲料研究, 2021, 44(2): 147-151. [SHU W X, ZHOU R, LAN J T, et al. Detoxification technology of cottonseed meal and its application in livestock and poultry production [J]. Feed Research, 2021, 44(2): 147-151.]
- [4] 常磊. 棉粕固态发酵及游离棉酚降解的研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013. [CHANG L, Study on the solid-state fermentation of cottonseed meal and the degradation of free gossypol [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.]
- [5] HUANG W Q, CUI K, HAN Y, et al. Long term effects of artificial rearing before weaning on the growth performance, ruminal microbiota and fermentation of fattening lambs [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(4): 1146-1160.
- [6] RONBINSON P H, GETACHEW G, PETERS E J D, et al. Influence of variety and storage for up to 22 days on nutrient composition and gossypol level of Pima cottonseed (*Gossypium* spp.) [J]. Animal Feed Science & Technology, 2001, 91(3-4): 149-156.
- [7] GADELHA I, FONSECA N, OLORIS S, et al. Gossypol toxicity from cottonseed products [J]. The Scientific World Journal, 2014, 20(2): 231635.
- [8] 倪海球, 李军国, 杨玉娟, 等. 响应面分析法优化棉粕膨化工艺参数 [J]. 饲料工业, 2020, 41(21): 24-31. [NI H Q, LI J G, YANG Y J, et al, Response surface analysis method for optimizing cotton meal puffing process parameters [J]. Feed Industry, 2020, 41(21): 24-31.]
- [9] MA X K, HU J X, SHANG Q, et al. Chemical composition, energy content and amino acid digestibility in cottonseed meals fed to growing pigs [J]. Chemical composition, energy content and amino acid digestibility in, 2019, 47(1): 20-28.
- [10] 王丽, 王薇薇, 周航, 等. 棉粕脱毒工艺及游离棉酚对蛋鸡性能影响的研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2019, 27(2): 50-54. [WANG L, WANG W W, ZHOU H, et al, Research progress on detoxification of gossypol in cottonseed meal and the effects of free gossypol on the performance of laying hens [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2019, 27(2): 50-54.]
- [11] 张莉, 杨晓龙, 王海亮, 等. 一株棉酚降解菌株的筛选鉴定及对棉粕的脱毒效果 [J]. 新疆农业科学, 2022, 59(12): 3057-3065. [ZHANG L, YANG X L, WANG H L, et al, Selection and identification of a cotton phenol degradation strain and its detoxification effect on cotton meal [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2022, 59(12): 3057-3065.]
- [12] 吴慧昊, 舒文秀, 李姿茹, 等. 游离棉酚脱除菌株的分离鉴定及体内定植效果研究 [J]. 中国酿造, 2022, 41(3): 104-109. [WU H H, SHU W X, LI Z R, et al, Isolation, identification and *in vivo* colonization of free gossypol-degrading strain [J]. China Brewing,

- 2022, 41(3): 104–109.]
- [13] 宣秋希, 乔琳, 侯晓林, 等. 固态生料发酵棉籽粕菌种筛选及发酵工艺的研究[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(5): 3376–3391. [XUAN Q X, QIAO L, HOU X L, et al. Screening of strains for solid-state fermentation of raw cottonseed meal and study on fermentation technology[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(5): 3376–3391.]
- [14] 国家市场监督管理总局. GB/T21264-2007 饲料用棉籽粕[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China GB/T21264-2007 Cottonseed meal(solvent)for feedstuffs[S] Beijing: China Standards Publishing House, 2017: 12–24.]
- [15] 国家市场监督管理总局. GB/T 13086-2020 饲料中游离棉酚的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020. [State Administration for Market Regulation GB/T 13086-2020 Method for determination of free gossypol in feeds[S] Beijing: China Standards Publishing House, 2020.]
- [16] 农业农村部. NY/T 3801-2020 饲料原料中酸溶蛋白的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020: 11–12. [Ministry of agriculture and rural affairs NY/T 3801-2020 Determination of acid-soluble protein in feed materials[S] Beijing: China Standards Publishing House, 2020: 11–12.]
- [17] MAHARACH M, METHA W. Phytonutrient pellet supplementation enhanced rumen fermentation efficiency and milk production of lactating Holstein-Friesian crossbred cows[J]. *Animal Nutrition*, 2022, 9(2): 119–126.
- [18] SON H, TANG J W, YAO X H, et al. Improvement of the nutritional quality of cottonseed meal by *Bacillus subtilis* and the addition of papain[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 14(4): 563–568.
- [19] 李园园. 米曲霉产淀粉酶和纤维素酶的初步研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014. [LI Y Y. Primary study on the amylase and cellulase fermented in *Aspergillus oryzae*[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2014.]
- [20] 管浩. 外源氮和锰对黑曲霉降解小麦秸秆的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023. [GUAN H. Effects of exogenous nitrogen and manganese on decomposition of wheat straw by *Aspergillus niger*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2023.]
- [21] 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. [WANG X L, LIU Q, HAN W, et al. Screening of gossypol-removing strain and the fermentation of cottonseed meal with mixed culture[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2016, 24(1): 81–85.]
- [22] 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, 2017. [HONG Z. Microbial solid fermentation to reduce free gossypol content in the cottonseed meal[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2017.]
- [23] ZHANG W J, XU Z R, SUN J Y, et al. Effect of selected fungi on the reduction of gossypol levels and nutritional value during solid substrate fermentation of cottonseed meal[J]. *Journal of Zhejiang University Science(Life Science)*, 2006(9): 690–695.
- [24] 亢乐. 基于比较组学研究豆类发酵食品制曲过程米曲霉关键蛋白酶[D]. 无锡: 江南大学, 2023. [KANG L. Study on the key proteases of *Aspergillus oryzae* during koji-making of bean-based fermented food based on comparative omics analysis[D] Jiangnan University, 2023.]
- [25] BAHAR M, BERNA N, et al. Organic acids production from low-cost cellulosic substrates by fermentation[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023, 28(4): 146–148.
- [26] 唐金泉, 宋卫国, 黄隽辉. 棉籽精深加工新技术与新工艺[J]. *中国油脂*, 2007(10): 32–35. [TANG J Q, SONG W G, HUANG J H. New technology and process for cotton seed deep processing[J]. *China Oils and Fats*, 2007(10): 32–35.]