

硫苷降解菌筛选及改良菜籽粕营养特性的研究

张寒^{1,2}, 韩梅^{1,2}, 郑竟成^{1,2}, 罗质^{1,2}, 雷芬芬^{1,2,3}, 陈东^{1,2},
周力^{1,2}, 何东平^{1,2,3}, 刘曙⁴, 洪坤强^{1,2,3}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023;
3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430023; 4. 湖南九丰农业发展有限公司, 湖南 岳阳 414399)

摘要:为改善菜籽粕的营养价值,以腐烂菜籽粕为原料,硫苷为唯一碳源,筛选可高效降解菜籽粕中主要抗营养因子硫苷的菌株,并经16S rRNA基因序列分析对其进行种属鉴定。以筛选得到的菌株和枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌单菌或组合菌对菜籽粕进行固态发酵,并以硫苷降解率和粗蛋白质增加率为指标,采用综合评分法对混菌发酵菌株接种量进行优化。结果表明:获得2株硫苷降解率大于25%的菌株B3、B16,经鉴定分别为欧文氏杆菌(*Erwinia tasmaniensis*)、鸡肠球菌(*Enterococcus gallinarum*);相较于单菌发酵和两菌、三菌组合发酵,四菌组合发酵的硫苷降解效果最好;四菌组合发酵中B3、B16、枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌接种量分别为15%、5%、15%、10%时,固态发酵菜籽粕中硫苷含量为(18.97 ± 0.29) μmol/g,降解率为(39.31 ± 0.91)%,粗蛋白质含量为(33.54 ± 0.12)%,增加率为(33.62 ± 0.47)%。综上,通过混菌固态发酵菜籽粕可有效降解硫苷,提高粗蛋白质含量,改善菜籽粕营养价值。

关键词:菜籽粕;微生物发酵;硫苷降解;欧文氏杆菌;鸡肠球菌

中图分类号:Q815;TS229

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2025)03-0022-08

Screening of glucosinolates – degrading bacteria and their role in improving the nutrition characteristics of rapeseed meal

ZHANG Han^{1,2}, HAN Mei^{1,2}, ZHENG Jingcheng^{1,2}, LUO Zhi^{1,2},
LEI Fenfen^{1,2,3}, CHEN Dong^{1,2}, ZHOU Li^{1,2}, HE Dongping^{1,2,3},
LIU Shu⁴, HONG Kunqiang^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil, Ministry of Education, Wuhan 430023, China; 3. Key Laboratory of Edible Oil Quality and Safety for State Market Regulation, Wuhan 430023, China; 4. Hunan Jiufeng Agricultural Development Co., Ltd., Yueyang 414399, Hunan, China)

Abstract: In order to improve the nutrition value of rapeseed meal, using rotten rapeseed meal as the raw material and glucosinolates as the only carbon source, strains of efficiently degrading the main anti-nutrient factor glucosinolates in rapeseed meal were screened, and their species were identified by 16S rRNA gene sequence analysis. Solid state fermentation of rapeseed meal was carried out by single bacteria or mixed bacteria using the screened strains and *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. The

收稿日期:2023-09-06;修回日期:2024-09-29

基金项目:2022年湖北省揭榜项目“冷榨菜籽油加工工艺及关键装备研究开发”(08022243);广西科技计划项目资助(2022AB39034)

作者简介:张寒(1997),女,在读硕士,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白(E-mail)zhan_4823@163.com。

通信作者:洪坤强,讲师,博士(E-mail)hongkq@whpu.edu.cn。

inoculation amount of the strains in mixed bacterial fermentation was optimized using a comprehensive scoring method based on the degradation rate of glucosinolates and the increase rate of crude protein. The results showed that two strains B3 and B16 with glucosinolates degradation rate greater than 25% were obtained, and they were identified as *Erwinia tasmaniensis*

and *Enterococcus gallinarum*, respectively. Compared with single bacteria, two bacteria and three bacteria combined fermentation, four bacteria combined fermentation had the best effect on glucosinolates degradation of rapeseed meal. When the inoculation amount of B3, B16, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* was 15%, 5%, 15% and 10% respectively, the glucosinolates content was $(18.97 \pm 0.29) \mu\text{mol/g}$ with the degradation rate of $(39.31 \pm 0.91)\%$, and the crude protein content was $(33.54 \pm 0.12)\%$, with the increase rate of $(33.62 \pm 0.47)\%$ in rapeseed meal after solid state fermentation. In conclusion, solid state fermentation of rapeseed meal with mixed bacteria can effectively degrade glucosinolates, increase crude protein content and improve the nutritional value of rapeseed meal.

Key words: rapeseed meal; microbial fermentation; glucosinolates degradation; *Erwinia tasmaniensis*; *Enterococcus gallinarum*

油菜籽是世界三大油料之一,自 2017 年始其全球年产量超 7 000 万 t^[1],2022 年我国油菜籽产量 1 553 万 t,进口量 196 万 t^[2]。菜籽粕是油菜籽加工副产物,其粗蛋白质含量为 35%~45%,除赖氨酸外,其氨基酸组成相对均衡,还含有丰富的矿物质和维生素^[3]。近年来,随着我国畜牧养殖业迅速发展,养殖体量不断扩大,玉米、大豆粕等常规饲料供应不足,引入菜籽粕等粕类可丰富畜牧业多元化饲料结构,缓解当前饲料市场短缺,降低饲料成本,但有关菜籽粕的高值化利用有限。这主要是因为菜籽粕中含有硫苷及其降解产物、粗纤维等抗营养因子^[4],严重制约了其深度开发利用;另外,油菜种植区分散,农户饼粕处理知识匮乏,饼粕常被用作堆肥^[5-6],造成资源浪费。

为进一步提高菜籽粕饲用价值,国内外研究者针对菜籽粕中的抗营养因子降解开展了大量研究。早期的菜籽粕脱毒方法为物理法和化学法^[7],但物理法存在营养成分破坏性较大、脱毒率低,化学法存在溶剂残留、成本较高等缺点^[5]。近年来,研究者发现采用微生物发酵可有效降低菜籽粕中抗营养因子含量。将发酵菜籽粕作为植物蛋白来源替代大豆粕添加到动物饲料中具有较高的开发价值^[8-9],如在低蛋白饲料中添加发酵菜籽粕替代大豆粕可有效改善育肥猪生长性能和肉质^[10]。微生物发酵其代谢产物丰富、功能多样、风味独特,其中混菌发酵可产生协同效应,进一步提升底物的营养特性,如:Wang 等^[11]利用实验室筛选的高产蛋白酶的枯草芽孢杆菌结合植物乳杆菌固态发酵菜籽粕,发现发酵后菜籽粕的可溶性多肽和游离氨基酸浓度显著提高,表面结构疏松多孔;Huang 等^[12]利用枯草芽孢杆菌、乳酸链球菌、产热假丝酵母混菌于 40℃ 固态发酵菜籽粕 3 d,发现菜籽粕的硫苷含量降低 46.2%,且发酵后菜籽粕的微生物多样性降低;郭珍

红等^[13]研究表明,采用植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、米曲霉混菌在最优条件下发酵菜籽粕 72 h 后可使菜籽粕的硫苷降解率达 85.06%,发酵 120 h 后其可溶性蛋白质含量提高 38.44 mg/g。

目前,主要选用工业保藏菌种发酵菜籽粕以改良其营养特性,存在发酵条件单一,发酵效果差异较大,菜籽粕的营养价值开发受限等问题。本研究从腐烂菜籽粕中筛选出能高效降解硫苷的菌株,结合枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌固态发酵菜籽粕,以硫苷降解率和粗蛋白质含量增加率为指标,采用综合评价法优化混菌固态发酵菜籽粕菌株接种量,以期缓解当前饲料资源紧缺,促进养殖业健康可持续发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

菜籽粕(由高含油率、低粗蛋白质含量油菜籽制备,硫苷含量 $31.25 \mu\text{mol/g}$,粗蛋白质含量 25.10%),湖北巴山食品有限责任公司;腐烂菜籽粕(菜籽粕自然条件下放置 2 周);枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, CICC 20445)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, CICC 21825),中国工业微生物保藏管理中心;磺胺嘧啶(Sulfanilamide)标准品,Sigma 公司;氯化钡,麦克林公司;其他分析纯试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

硫苷固体筛选培养基:硫苷粗提物 20 g、氯化铵 1 g、磷酸二氢钾 3 g、硫酸镁 0.478 g、氯化钙 0.011 g、磷酸氢二钠 6.78 g、琼脂 18~20 g,pH 7,定容至 1 L,121℃ 灭菌 20 min。

LB 液体培养基:酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g,pH 7.2,定容至 1 L,121℃ 灭菌 20 min。

LB 固体培养基:在 LB 液体培养基的基础上添加 18 g 琼脂,121℃ 灭菌 20 min。

菜籽粕发酵培养基:菜籽粕 25 g、料水比 1:1.5, 自然 pH, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 仪器与设备

YRE-2000E 旋转蒸发仪, 上海予华仪器设备有限公司; LB941 酶标仪, 德国 Berthold 公司; SW-CJ-2FD 超净台, 苏州净化设备有限公司; LDZM 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; Vario EL cube 元素分析仪, 德国 Elementar 公司; THZ-Q 台式冷冻恒温振荡器, 太仓市华美生化仪器厂; CX40 生物显微镜, 舜宇光学科技公司; 日立-HT7800 透射电镜, 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 硫苷粗提物的制备

参考 Zhan 等^[14]的方法并稍作修改制备硫苷粗提物。将菜籽粕粉碎, 过 0.25 mm (60 目) 筛, 110 °C 下烘干 2 h 以钝化芥子酶活性, 防止硫苷在提取过程中降解。菜籽粕冷却后, 采用正己烷浸提 12 h 脱脂。取适量脱脂菜籽粕, 在常温条件下以料液比 1:4 加入 70% 乙醇, 在功率 150 W 条件下超声提取 20 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 沉淀重复提取 3 次, 合并上清液, 进行旋转蒸发后获得浓缩液, 在浓缩液中加入约 1/10 体积的 0.2 mol/L 乙酸铅-乙酸锌溶液, 低速离心分离沉淀蛋白质, 用少量 70% 乙醇洗涤沉淀, 再次离心, 合并两次上清液, 于 -80 °C 预冻 2 h, 真空冷冻干燥 2 d, 得硫苷粗提物。该硫苷粗提物呈黄棕色, 易吸潮, 有黏性。

1.2.2 硫苷降解菌的筛选

1.2.2.1 硫苷降解菌的初筛

称取 10 g 腐烂菜籽粕, 加入 90 mL 无菌水, 轻微摇晃使其充分混合, 常温振荡培养 30 min, 直至腐烂菜籽粕完全分散, 不结块, 静置, 取上清液 1 mL 依次按 10^{-1} 、 10^{-2} 、...、 10^{-7} 倍稀释, 每个稀释度各取 100 μ L 分别涂布至硫苷固体筛选培养基上, 于 37 °C 培养 48 h, 挑选生长快、菌落大、数量多、形态不一致的菌株进行平板划线、分离纯化, 甘油保存备用。

1.2.2.2 硫苷降解菌的复筛

种子液的制备: 将初筛得到的菌株接种至 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 过夜培养, 按 1% 的接种量再次接种于 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养 4~5 h, 以 600 nm 下光密度 (OD_{600}) 在 0.5~1.0 的菌液作为种子液。

菜籽粕的固态发酵: 取种子液以 10% 接种量分别接种至菜籽粕发酵培养基中, 于 37 °C 培养 72 h,

每隔 12 h 用无菌玻璃棒搅拌透气。发酵结束后将菜籽粕发酵培养基在 55 °C 下烘干至恒重, 粉碎, 测定硫苷含量, 以发酵前后菜籽粕中硫苷含量变化与发酵前菜籽粕中硫苷含量比值计算硫苷降解率, 选取硫苷降解率最高的菌株作为目标菌株。

1.2.3 菌株鉴定

1.2.3.1 形态学特征观察

取 1 环目标菌株种子液平板划线至 LB 固体培养基上, 于 37 °C 培养 24 h, 观察菌落形态, 采用革兰氏染色观察菌株显微形态。

取在 LB 液体培养基中生长至对数期的目标菌株, 1 500 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀于微量离心管中, 用 0.01 mol/L pH 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2~3 次, 弃掉上清液, 沿管壁缓慢加入 4 °C 预冷的 2.5% 戊二醛固定液, 使菌体沉淀完全浸没在固定液中, 于 4 °C 固定 12 h, 采用透射电镜观察其超微结构。

1.2.3.2 16S rRNA 基因序列分析

将目标菌株菌液交由武汉天一辉远科技有限公司进行 16S rRNA 基因双向测序, 测序结果在 NCBI 数据库的 GenBank 中进行 BLAST 相似度比对, 寻找同源序列, 采用 MEGA6.0 软件中的邻接法将测序结果与近源序列构建系统发育树, 对基因系统进化关系进行分析。

1.2.4 菌株生长曲线测定

将目标菌株平板划线培养, 挑取单菌落于 10 mL LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养 24 h, 按 1% 的接种量转接于 100 mL LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养 36 h。以未添加目标菌株的 LB 液体培养基为参比, 每 3 h 取样 1 次, 测定 OD_{600} , 根据培养液 OD_{600} 随时间的变化情况绘制生长曲线。

1.2.5 硫苷含量的测定

参考文献[15]采用氯化钡法并稍加修改, 测定硫苷含量。称取 100 mg 菜籽粕, 沸水浴下干蒸 30 min 钝化芥子酶活性, 加入 8 mL 80~90 °C 水, 涡旋混匀, 继续蒸煮 30 min, 冷却至室温后定容至 10 mL, 过滤, 向 1 mL 滤液中加入 4 mL 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液和 2 mL 8 mmol/mL 氯化钡显色剂, 24 °C 恒温显色 2 h, 以羧甲基纤维素钠和氯化钡溶液为参比, 540 nm 下测定吸光度 (A_1)。另取滤液 1 mL, 将 2 mL 氯化钡替换为蒸馏水, 测定吸光度 (A_2)。按公式(1)计算硫苷含量 (C)。

$$C = 0.2 + 185.2 \times (A_1 - A_2) \quad (1)$$

1.2.6 粗蛋白质含量的测定

参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》第三法稍作修改,测定粗蛋白质含量。使用锡舟称取(5.00 ± 0.25) mg 菜籽粕,精密包裹并压实,放入样品盘进行测定。测定条件:载气为氦气;助燃气为高纯氧;燃烧管温度 1 150 °C;还原管温度 850 °C;Sulfanilamide 作基准物质,每 20 个样品做 1 次对照。

1.2.7 菌株发酵效果综合评分的计算

采用综合评分法评价菌株对菜籽粕的发酵效果^[16]。

以硫苷降解率和粗蛋白质增加率为指标,按公式(2)计算二者的隶属度,分别记为 X_1 、 X_2 。

$$X = (V - V_{\min}) / (V_{\max} - V_{\min}) \quad (2)$$

式中: V 为实验值; V_{\min} 为最小实验值; V_{\max} 为最大实验值。

定义 X_1 、 X_2 权重分别为 0.6、0.4,按公式(3)计

算综合评分(Z)。

$$Z = 0.6X_1 + 0.4X_2 \quad (3)$$

1.2.8 数据统计与分析

采用 Excel 2016 对数据进行整理,采用 SPSS 26 对正交实验进行一般线性模型分析,采用 Origin 2021 作图。

2 结果与分析

2.1 硫苷降解菌的筛选

2.1.1 硫苷降解菌的初筛

按 1.2.2.1 方法进行硫苷降解菌的初筛,分离得到能较好利用硫苷且长势优良的 36 株菌株,对应编号 B1 ~ B36。

2.1.2 硫苷降解菌的复筛

按 1.2.2.2 方法,将初筛得到的菌株(B1 ~ B36)制备的种子液分别接种于菜籽粕发酵培养基中,测定各菌株对硫苷的降解情况。复筛硫苷降解率如图 1 所示。

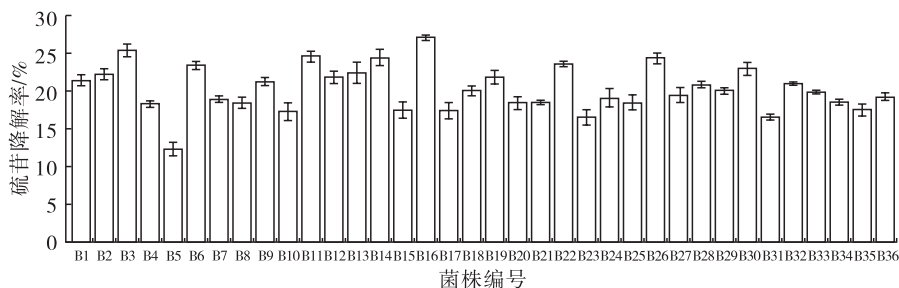


图 1 复筛硫苷降解率

Fig.1 Degradation rate of glucosinolates

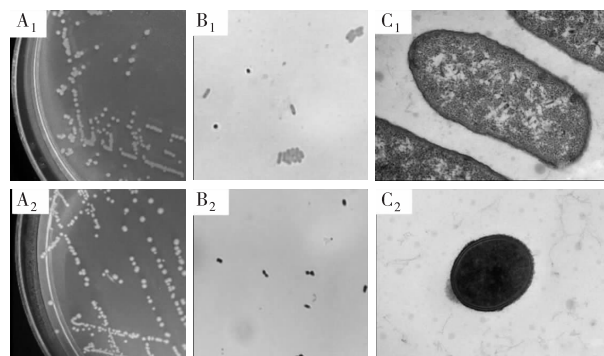
由图 1 可知,36 株菌株的硫苷降解率介于(12.44 ± 0.93)% ~ (27.26 ± 0.35)%,其中,硫苷降解率大于 25% 的菌株共有 2 株,分别是 B3 和 B16,其硫苷降解率分别为 25.48% 和 27.26%,均高于于新颖等^[17]选用粗状脉文孢菌(*Neurospora crassa*)发酵菜籽粕后的硫苷降解率(14.79%),故选取菌株 B3、B16 进行下一步实验。

2.2 硫苷降解菌株的鉴定

2.2.1 菌株形态学特征

B3、B16 菌株的形态学特征如图 2 所示。

由图 2 可知,B3 菌株菌落呈明黄色、边缘不整齐、表面粗糙、不规则凸起、黏稠,革兰氏染色结果为阴性,光学显微镜下有时成链,直短杆状,体长约 1.7 μm。B16 菌株菌落呈米白色、圆形凸起、表面光滑、稍有光泽、边缘整齐,革兰氏染色结果为阳性,光学显微镜下成对,圆球状或近似圆球状,无芽孢,无鞭毛或其他细胞外结构,体长约 0.6 μm。



注:A₁. B3 菌株菌落形状;A₂. B16 菌株菌落形状;B₁. B3 菌株革兰氏染色;B₂. B16 菌株革兰氏染色;C₁. B3 菌株透射电镜图;C₂. B16 菌株透射电镜图

Note:A₁. Colony morphology of strain B3; A₂. Colony morphology of strain B16; B₁. Gram's staining of strain B3; B₂. Gram's staining of strain B16; C₁. TEM of strain B3; C₂. TEM of strain B16

图 2 B3、B16 菌株的形态学特征

Fig.2 Morphology characteristics of strains B3 and B16

2.2.2 16S rRNA 基因序列

基于 16S rRNA 基因序列 B3、B16 菌株的系统

发育树如图3所示。B3、B16菌株的16S rRNA基因全序列总长分别为1 410、1 438 bp。

由图3可知：B3菌株与欧文氏杆菌(*Erwinia tasmaniensis*)有较高的亲源关系且相似度达98.79%，其在NCBI数据库中的匹配序列登录号为NR_074869.1；B16菌株与鸡肠球菌(*Enterococcus*

gallinarum)亲源关系最近，相似度达99.86%，其在NCBI数据库中的匹配序列登录号为NR_113924.1。结合B3、B16菌株的形态学特征和系统发育进化树分析，判定B3、B16菌株分别为欧文氏杆菌、鸡肠球菌。

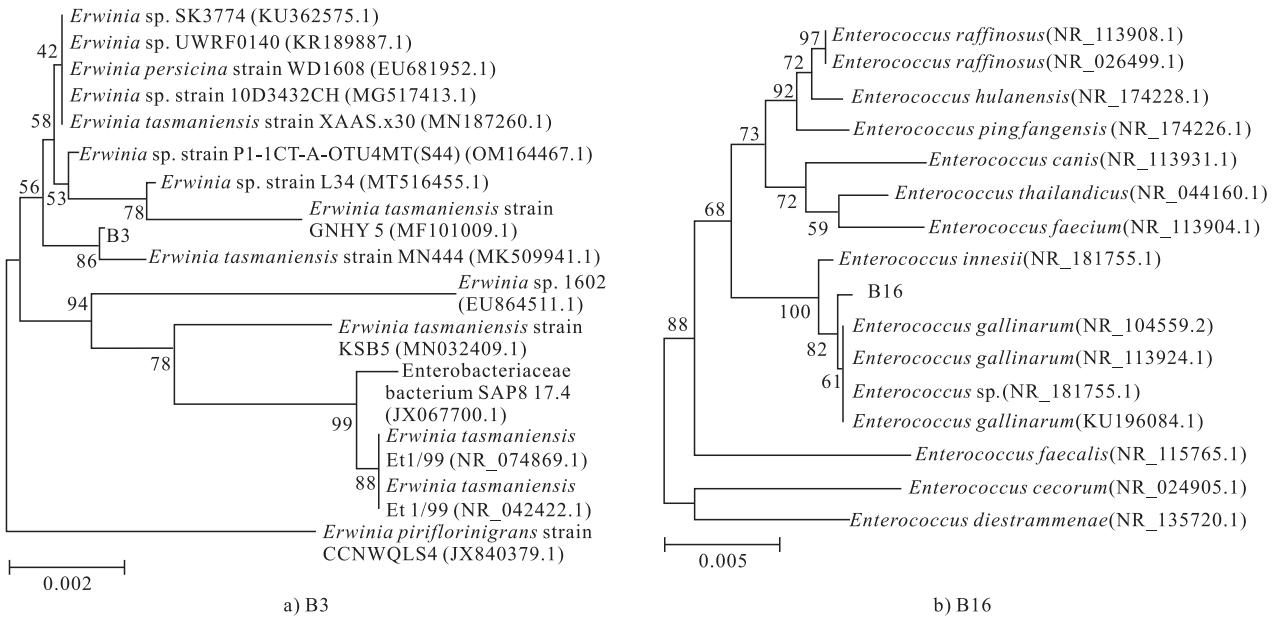


图3 基于16S rRNA基因序列B3、B16菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strains B3 and B16

2.3 菌株生长曲线

生长曲线可定量描述LB液体培养基中微生物群体生长规律。B3、B16菌株生长曲线如图4所示。

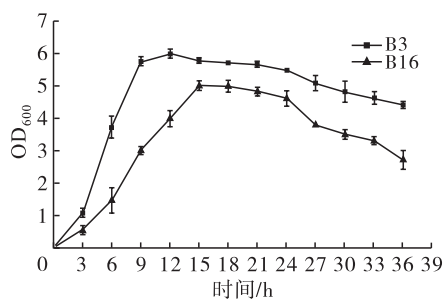


图4 B3、B16菌株生长曲线

Fig. 4 Growth curves of strains B3 and B16

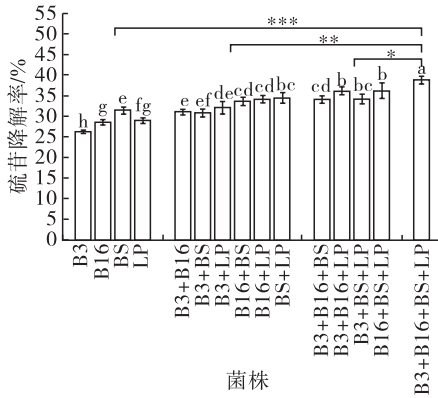
由图4可知，B3、B16菌株生长曲线呈迟缓期、对数期、稳定期、衰亡期。B3菌株生长较为迅速，经过短暂的迟缓期后，在3 h后进入对数期，培养12 h后 OD_{600} 达高峰，即此时菌体浓度最大，15~21 h维持稳定， OD_{600} 变化不明显，21 h后进入衰亡期，菌株出现“负生长”。B16菌株为了适应新的LB液体培养基，重新调整代谢过程出现了较长的生长迟缓期，6~15 h为对数期，此时菌体数量迅速增长，15 h后

菌体生长缓慢，逐步过渡至稳定期，此时营养物质耗尽，菌体数量趋于平衡，21 h后菌株死亡率逐渐增加，B16菌株进入衰亡期。B3、B16菌株在6~9 h均属于对数期，此时 OD_{600} 在1.0~6.0范围，菌体内酶系活跃、代谢旺盛、菌体数目以几何级数增加，因此后续实验选择 OD_{600} 在1.0~2.0范围内的菌液作为接种菌液备用。

2.4 菌株组合及菌株接种量优化

2.4.1 固态发酵菜籽粕菌株组合优化

以实验室筛选的B3、B16菌株结合商业购买的枯草芽孢杆菌(BS)和植物乳杆菌(LP)(BS和LP接种菌液的制备同目标菌株)进行15组菌株复配实验，以确定固态发酵菜籽粕的最优菌株组合。具体菌株组合：单菌B3、B16、BS、LP；两菌组合B3+B16、B3+BS、B3+LP、B16+BS、B16+LP、BS+LP，菌种比为1:1；三菌组合B3+B16+BS、B3+B16+LP、B3+BS+LP、B16+BS+LP，菌种比为1:1:1；四菌组合B3+B16+BS+LP，菌种比为1:1:1:1。按1.2.2.2方法进行不同组合菌株的菜籽粕固态发酵，考察不同菌株组合发酵菜籽粕疏苜降解效果，结果见图5。



注:不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$); * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, *** 表示 $p < 0.001$ 。下同

Note: Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The same below

图 5 不同菌株组合的固态发酵菜籽粕硫苷降解效果
Fig. 5 Glucosinolates degradation effects of different strain combinations for solid state fermentation of rapeseed meal

由图 5 可知,不同菌株组合固态发酵菜籽粕降解硫苷的能力不同,其中 B3 菌株硫苷降解率最低,为 26.07%,B3 + B16 + BS + LP 四菌组合硫苷降解率最高,为 38.71%。单菌发酵中,BS 菌株的硫苷降解率显著高于其他 3 种单菌。两菌组合发酵中,硫苷降解率介于 $(30.82 \pm 0.91)\% \sim (34.37 \pm$

1.23)% ,且含 B3 菌株组合的硫苷降解率差异不显著。三菌组合发酵中,硫苷降解率介于 $(33.98 \pm 0.90)\% \sim (36.15 \pm 1.90)\%$,含 LP 菌株组合的硫苷降解率差异不显著。对比分析 4 种菌株组合方式,不同菌株组合方式之间均存在显著差异,混菌组合发酵的硫苷降解效果优于单菌发酵,其中四菌组合发酵的硫苷降解效果最好,因此选用 B3 + B16 + BS + LP 四菌组合进行下一步实验。

2.4.2 固态发酵菜籽粕菌株接种量优化

在最优菌株组合基础上,以接种量为实验因素,固态发酵后菜籽粕中硫苷降解率、粗蛋白质增加率综合评分 (Z) 为评价指标,采用正交实验探究各菌株不同接种量对固态发酵菜籽粕的影响。正交实验因素与水平见表 1,正交实验设计及结果见表 2,正交实验方差分析见表 3。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Orthogonal experiment factor and levels

水平	A B3 接种量/%	B B16 接种量/%	C BS 接种量/%	D LP 接种量/%
1	5	5	5	5
2	10	10	10	10
3	15	15	15	15

表 2 正交实验设计及结果

Table 2 Orthogonal experimental design and results

实验号	A	B	C	D	硫苷降解率/%	粗蛋白质增加率/%	X_1	X_2	Z
1	1	1	1	1	36.35	29.66	0.38	0.03	0.24
2	1	2	2	2	33.58	31.31	0.00	0.42	0.17
3	1	3	3	3	34.37	32.08	0.11	0.61	0.31
4	2	1	2	3	37.14	29.55	0.49	0.00	0.29
5	2	2	3	1	36.55	30.10	0.41	0.13	0.30
6	2	3	1	2	38.72	29.99	0.70	0.11	0.46
7	3	1	3	2	39.11	33.73	0.76	1.00	0.85
8	3	2	1	3	40.30	29.88	0.92	0.08	0.58
9	3	3	2	1	40.89	29.55	1.00	0.00	0.60
k_1	0.24	0.46	0.43	0.38					
k_2	0.35	0.35	0.35	0.50					
k_3	0.68	0.46	0.49	0.39					
R	0.44	0.11	0.13	0.12					

表 3 正交实验方差分析

Table 3 ANOVA of orthogonal experiment

因变量源	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F	p	显著性
校正模型	1.066	8	0.133	31.285	0.000	***
A	0.830	2	0.415	97.476	0.000	***
B	0.070	2	0.035	8.167	0.003	**
C	0.089	2	0.044	10.438	0.001	**
D	0.077	2	0.039	9.059	0.002	**
误差	0.077	18	0.004			
总和	1.142	26				

由表 2 可知,影响不同菌株接种量固态发酵菜籽粕的综合评分主次顺序为 $A > C > D > B$,即 B3 接种量 $> BS$ 接种量 $> LP$ 接种量 $> B16$ 接种量。由表 3 可知,4 个因素对四菌组合固态发酵菜籽粕综合评分影响均显著,其中,因素 A 对综合评分的影响极显著($p < 0.001$),因素 C、D、B 的影响次之($p < 0.01$)。因此,结合直观分析和方差分析结果,确定 $A_3B_1C_3D_2$ 为最优组合,即 B3 菌株接种量为 15%、B16 菌株接种量为 5%、BS 菌株接种量为 15%、LP 菌株接种量为 10%。

参照正交实验优化得到的最优菌株接种量参数,设置 B3、B16、BS、LP 菌株接种量分别为 15%、5%、15%、10%,进行 3 次平行验证实验,结果表明,发酵后菜籽粕原本带有的菜籽油香味消失,散发出浓郁的酸香味,颜色加深呈深棕褐色,表面蓬松,发酵菜籽粕硫苷含量为 $(18.97 \pm 0.29) \mu\text{mol/g}$,降解率为 $(39.31 \pm 0.91)\%$,粗蛋白质含量为 $(33.54 \pm 0.12)\%$,增加率为 $(33.62 \pm 0.47)\%$ 。验证实验综合评分为 0.86,接近正交实验组中 7 号实验(最优菌株组合)的综合评分,表明采用正交实验优化混菌固态发酵菜籽粕菌株接种量可靠。本文发酵后菜籽粕中粗蛋白质增加率高于 Zhu 等^[18]采用 3 种乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus johnsonii*)等比例发酵菜籽粕的粗蛋白质增加率(3.66%),但硫苷降解率接近(45.09%),原因可能是由于枯草芽孢杆菌具有较强的中性蛋白酶和胞外蛋白酶分泌能力,这些蛋白酶的存在使菜籽粕中蛋白质含量增加^[19-20],也有可能是 4 种不同菌株协同发酵菜籽粕过程中产生一系列酶类物质互补,这些酶可不同程度地降解大分子蛋白质为小分子多肽或氨基酸,菌株利用这些多肽或氨基酸迅速生长繁殖合成更加优质的微生物菌体蛋白质,使蛋白质含量增加。

3 结论

本研究从自然界筛选出两株可高效降解菜籽粕中硫苷的天然微生物菌株欧文氏杆菌、鸡肠球菌,扩展了微生物发酵菜籽粕的菌种资源库。利用欧文氏杆菌、鸡肠球菌、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌混菌发酵可有效降低菜籽粕中的硫苷含量,提高其粗蛋白质含量,改善菜籽粕的风味和提高其营养价值。采用自然界筛选菌株联合商业菌株共同发酵菜籽粕可显著降低抗营养因子含量,提高菜籽粕的饲用价值,缓解饲用植物蛋白资源匮乏问题,为微生物发酵菜籽粕应用提供参考。但研究筛选的菌株未有在菜籽粕发酵方向的报道且对菜籽粕仅进行简单的菌株接

种量优化,实验室将进一步深入研究发酵菜籽粕工艺优化以及发酵菜籽粕对动物及动物生产性能的影响。

参考文献:

- [1] WANG M, YANG C, FRANÇOIS J M, et al. A two - step strategy for high - value - added utilization of rapeseed meal by concurrent improvement of phenolic extraction and protein conversion for microbial iturin A production [J/OL]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 735714 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.735714>.
- [2] 王瑞元. 2022 年我国粮油产销和进出口情况[J]. 中国油脂, 2023, 48(6): 1 - 7.
- [3] 樊庆山, 刁其玉, 毕研亮, 等. 新型植物饼粕类饲料在反刍动物生产中的应用[J]. 家畜生态学报, 2018, 39(2): 79 - 85.
- [4] XIE C, LI W, GAO R, et al. Determination of glucosinolates in rapeseed meal and their degradation by myrosinase from rapeseed sprouts [J/OL]. Food Chem, 2022, 382: 132316 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132316>.
- [5] GEORGIEV R, IVANOV I G, IVANOVA P, et al. Phytochemical profile and bioactivity of industrial rapeseed meal ethanol - wash solutes [J]. Waste Biomass Val, 2021, 12(9): 5051 - 5063.
- [6] SOUSA D, SIMÕES L, OLIVEIRA R, et al. Evaluation of biotechnological processing through solid - state fermentation of oilseed cakes on extracts bioactive potential [J]. Biotechnol Lett, 2023, 45(10): 1293 - 1307.
- [7] DAS PURKAYASTHA M, GOGOI J, KALITA D, et al. Physicochemical and functional properties of rapeseed protein isolate: Influence of antinutrient removal with acidified organic solvents from rapeseed meal [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(31): 7903 - 7914.
- [8] ISMAEL A, REFAT B, GUEVARA - OQUENDO H, et al. Effect of blend - pelleted products based on *Carinata* meal or canola meal in combination with lignosulfonate on ruminal degradation and fermentation characteristics, intestinal digestion, and feed milk value when fed to dairy cows [J]. Dairy, 2023, 4(2): 345 - 359.
- [9] 黄利娜, 孙爱荣, 冯倩倩. 不同品种菜籽粕对生长猪消化率及肠道发酵性能的影响 [J]. 中国饲料, 2023(14): 122 - 125.
- [10] 顾方, 刘世龙, 李红胜, 等. 低蛋白质饲料中添加发酵菜籽粕对育肥猪生长性能和肉品质的影响 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(3): 1489 - 1500.
- [11] WANG Y, SUN H, LIU X. A novel fermented rapeseed meal, inoculated with selected protease - assisting screened *B. subtilis* YY - 4 and *L. plantarum* 6026, showed high availability and strong antioxidant and immunomodulation potential capacity [J/OL]. Foods, 2022, 11(14): 2118 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.3390/foods11142118>.

(下转第 43 页)

- metathesis of unsaturated natural oils with 2 - butene. High conversion and productive catalyst turnovers [J]. Chem Commun, 2005(44): 5546 - 5547.
- [7] 杨继生, 倪永全. 高纯油酸的性能、制备及应用[J]. 上海化工, 1999, 24(18): 28 - 30.
- [8] 郭霞, 陶华东, 王晓辉. 油酸的生产工艺及应用[J]. 广州化工, 2017, 45(24): 6 - 8, 25.
- [9] 衣丹, 林学政, 刘发义, 等. 共轭亚油酸两种主要异构体冷冻结晶分离工艺研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 26 - 28.
- [10] 张霞, 郝晓丽, 何静, 等. 尿素包合法富集驼峰油中不饱和脂肪酸的工艺优化[J]. 中国油脂, 2020, 45(4): 9 - 13.
- [11] ZHANG G, LIU J, LIU Y. Concentration of ω - 3 polyunsaturated fatty acids from oil of *Schizochytrium limacinum* by molecular distillation; Optimization of technological conditions [J]. Ind Eng Chem Res, 2013, 52(10): 3918 - 3925.
- [12] 范明明, 王灿, 张萍波, 等. 尿素包合和选择性加氢结合法制备高纯油酸[J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 53 - 57, 63.
- [13] SINGH D, REZAC M E, PFROMM P H. Partial hydrogenation of soybean oil with minimal *trans* fat production using a Pt - decorated polymeric membrane reactor[J/OL]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86(1): 93 [2023 - 07 - 17]. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1321-z>.
- [14] BELKACEMI K, HAMOUDI S. Low *trans* and saturated vegetable oil hydrogenation over nanostructured Pd/silica catalysts; Process parameters and mass - transfer features effects[J]. Ind Eng Chem Res, 2009, 48(3): 1081 - 1089.
- [15] POMEROY B, GRILC M, GYERGYEK S, et al. Catalyst structure - based hydroxymethylfurfural (HMF) hydrogenation mechanisms, activity and selectivity over Ni [J/OL]. Chem Eng J, 2021, 412: 127553 [2023 - 07 - 17]. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127553>.
- [16] STANKOVIĆ M, GABROVSKA M, KRSTIĆ J, et al. Effect of silver modification on structure and catalytic performance of Ni - Mg/diatomite catalysts for edible oil hydrogenation[J]. J Mol Catal A Chem, 2009, 297(1): 54 - 62.
- [17] SARNO M, IULIANO M, VISCUSI G, et al. A nickel/palladium/ruthenium - graphene based nanocatalyst for selective catalytic hydrogenation of vegetable oils[J/OL]. Ind Crops Prod, 2021, 170: 113815 [2023 - 07 - 17]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113815>.
- [18] TRASARTI A F, SEGOBIA D J, APESTEGUÍA C R, et al. Selective hydrogenation of soybean oil on copper catalysts as a tool towards improved bioproducts[J]. J Am Oil Chem Soc, 2012, 89(12): 2245 - 2252.
- [19] UPARE P P, JEONG M G, HWANG Y K, et al. Nickel - promoted copper - silica nanocomposite catalysts for hydrogenation of levulinic acid to lactones using formic acid as a hydrogen feeder[J]. Appl Catal A Gen, 2015, 491: 127 - 135.
- [20] SEEMALA B, CAI C M, KUMAR R, et al. Effects of Cu - Ni bimetallic catalyst composition and support on activity, selectivity, and stability for furfural conversion to 2 - methylfuran[J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2018, 6(2): 2152 - 2161.
- [21] 周姣. 负载镍铜催化剂催化乙炔选择加氢反应的研究[D]. 辽宁 大连: 大连理工大学, 2012.
- [22] BYKOVA M V, ERMAKOV D Y, KAICHEV V V, et al. Ni - based sol - gel catalysts as promising systems for crude bio - oil upgrading: Guaiacol hydrodeoxygenation study [J]. Appl Catal B Environ, 2012, 113/114: 296 - 307.
-
- (上接第 28 页)
- [12] HUANG W, XU H, PAN J, et al. Mixed - strain fermentation conditions screening of polypeptides from rapeseed meal and the microbial diversity analysis by high - throughput sequencing[J/OL]. Foods, 2022, 11(20): 3285 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.3390/foods11203285>.
- [13] 郭珍红, 管军军, 杨刚, 等. 混菌固态发酵菜籽粕提高可溶性蛋白的研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(13): 121 - 128.
- [14] ZHAN Q, YAN J, BIAN J, et al. Study on ultrasonic extraction and stability of glucosinolate in rapeseed cake [J/OL]. IOP Conf Ser: Earth Environ Sci, 2020, 446(2): 22066 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/446/2/022066>.
- [15] SHI C, HE J, YU J, et al. Physicochemical properties analysis and secretome of *Aspergillus niger* in fermented rapeseed meal [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153230 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153230>.
- [16] 王涵, 高盼盼, 李天, 等. 隶属度法优化黑顺片炮制工艺研究[J]. 陕西理工大学学报(自然科学版), 2021, 37(3): 26 - 33.
- [17] 于新颖, 魏长浩, 余诚玮, 等. 粗壮脉纹孢菌固态发酵对菜籽粕营养品质的改善[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 221 - 227.
- [18] ZHU X, WANG L, ZHANG Z, et al. Combination of fiber - degrading enzymatic hydrolysis and *Lactobacilli* fermentation enhances utilization of fiber and protein in rapeseed meal as revealed in simulated pig digestion and fermentation *in vitro* [J/OL]. Anim Feed Sci Technol, 2021, 278: 115001 [2023 - 09 - 06]. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115001>.
- [19] 翟晓娜, 师建芳, 赵慧凝, 等. 菜籽饼粕蛋白的提取、功能特性及其在食品中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 389 - 397.
- [20] LIU F, CHEN Z, SHAO J, et al. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ [J]. Food Biosci, 2017, 20: 141 - 148.