

米曲霉发酵对棉籽壳饲用品质的影响

陈天明¹, 李新民², 张国玉², 赵海山³, 陆健¹, 蔡国林¹

(1. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏无锡 214122; 2. 新疆天牧生物科技有限公司, 新疆铁门关 841000; 3. 乌兰浩特市嘉鹤牧业有限公司, 内蒙古乌兰浩特 137400)

摘要:旨在改善棉籽壳的饲用品质,研究了米曲霉 TM-1 发酵对棉籽壳中棉酚和纤维类物质降解、蛋白质品质提升和有益代谢产物积累的影响。结果显示:米曲霉发酵后棉籽壳中棉酚含量由 645.3 mg/kg 降低为 137.2 mg/kg,降解率达到 78.7%;发酵后棉籽壳结构松散,空隙较大,且木质素、纤维素、半纤维素、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量均明显下降,表明影响棉籽壳消化利用的结构屏障被有效降解;发酵后棉籽壳中总酸和 8 种有机酸含量均显著增加,其中苹果酸含量提高了 49.2 倍,达到 734.0 mg/100 g;发酵后棉籽壳中粗蛋白质含量由 12.5% 增加至 15.5%,酸溶蛋白占比由 4.8% 上升到 13.5%,分子质量在 1 000 Da 以下的寡肽含量占比达 83.0%,游离氨基酸总量增加了 115.7%,其中限制性氨基酸赖氨酸和组氨酸分别增加了 117.4% 和 64.2%;发酵后棉籽壳具有丰富的水解酶系,包括中性蛋白酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶和 β -1,4 内切木聚糖酶等,其酶活分别为 245.2、13.4、39.7、19.7 U/g。综上,经过米曲霉 TM-1 发酵处理,棉籽壳的饲用品质得到了明显改善。

关键词:米曲霉;固态发酵;棉籽壳;棉酚;饲用品质

中图分类号:TS229;S816

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)11-0033-08

Effect of *Aspergillus oryzae* fermentation on the feeding quality of cottonseed shells

CHEN Tianming¹, LI Xinmin², ZHANG Guoyu²,
ZHAO Haishan³, LU Jian¹, CAI Guolin¹

(1. National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Xinjiang Tianmu Biotechnology Co., Ltd., Tiemenguan 841000, Xinjiang, China; 3. Jiahe Animal Husbandry Co., Ltd., in Ulanhot, Ulanhot 137400, Inner Mongolia, China)

Abstract: In order to improve the feeding quality of cottonseed shells, the effects of *Aspergillus oryzae* TM-1 fermentation on the degradation of gossypol and fiber-like substance, the improvement of protein quality and the accumulation of beneficial metabolites in cottonseed shells were studied. The results showed that after fermentation, the gossypol content in cottonseed shells decreased from 645.3 mg/kg to 137.2 mg/kg, and the degradation rate reached 78.7%. The structure of cottonseed shells fermented was loose and the gap was large, and the contents of lignin, cellulose, hemicellulose, neutral detergent fiber and acid detergent fiber decreased significantly, indicating that the structural barrier affecting the digestion and utilization of cottonseed shells was effectively degraded. The contents of total acid and eight organic acids

in cottonseed shells increased significantly, and the content of malic acid increased by 49.2 times, reaching 734.0 mg/100 g. The content of crude protein in cottonseed shells increased from 12.5% to 15.5%, the proportion of acid-soluble protein increased from 4.8% to 13.5%, the content of oligopeptides with molecular weight

收稿日期:2023-12-27;修回日期:2024-07-28

基金项目:第二师铁门关市科技攻关(2023GG2504);兴安盟科技计划项目

作者简介:陈天明(1997),男,硕士研究生,研究方向为饲料原料的生物技术处理(E-mail)1440873997@qq.com。

通信作者:蔡国林,副研究员(E-mail)glcai@jiangnan.edu.cn。

below 1 000 Da accounted for 83.0% , and the total free amino acids increased by 115.7% . The limiting amino acids lysine and histidine increased by 117.4% and 64.2% , respectively. The fermented cottonseed shells were rich in hydrolytic enzymes, including neutral protease, cellulase, β -glucanase and β -1,4 endoxylanase, and their enzyme activities were 245.2, 13.4, 39.7 U/g and 19.7 U/g, respectively. In summary, the feeding quality of cottonseed shells is significantly improved by *Aspergillus oryzae* TM-1 fermentation.

Key words: *Aspergillus oryzae*; solid state fermentation; cottonseed shell; gossypol; feeding quality

棉籽壳是棉花生产中的主要副产品,其价格低廉,含有约48%的粗纤维、5%的粗蛋白质和少量的粗脂肪等营养成分,是一种常见的地源性饲料原料^[1]。然而,由于棉籽壳中存在有害物质棉酚,过量摄入会导致动物贫血并损害其生殖功能^[2],严重限制了其在饲料工业中的应用。棉酚的脱除方法主要包括物理法、化学法和微生物发酵法^[3],物理法和化学法虽然降低了产品中棉酚含量,但也会导致产品营养成分损失、适口性降低及化学品残留等^[4]。而微生物发酵法则被认为是一种条件温和、易于操作且脱毒效率高的方法^[5]。通过采用《饲料添加剂品种目录》中许可使用的微生物发酵棉籽壳等饲料原料,将大分子物质、有毒有害物质和抗营养因子等降解并生物转化,以此提高动物对饲料中营养物质的吸收能力,同时代谢产生一系列有机酸和抗菌肽等功能性成分,是养殖行业“禁抗”政策下极具前景的脱毒方法^[6]。

目前,用于棉籽壳发酵的微生物主要有乳酸菌、芽孢杆菌、酵母菌和米曲霉等,但研究大多仅限于棉籽壳的脱毒,尚未有改善其饲用品质的研究,未能实现棉籽壳的提质增效。此外,由于乳酸菌和酵母菌缺乏大量分泌丰富水解酶系的能力,限制了其在棉籽壳基质上的发酵强度,导致其改善棉籽壳饲用品质的效果有限^[7]。芽孢杆菌虽然可以在棉籽壳基质上正常发酵,但同时会产生吲哚、硫醇等具有刺激性气味的代谢产物,影响产品的适口性^[8]。米曲霉作为食品和饲料工业中常见的发酵菌种,具有产生许多次生代谢物、酶、有机酸和氨基酸等具有生物活性的物质的潜力^[9]。以大豆粕和麸皮等常规饲料原料为基质发酵产生的米曲霉发酵物,不仅可以改善动物采食量和干物质消化率^[10],还在稳定动物肠道菌群^[11]和提高动物免疫性能^[12]等方面具有显著的效果。目前,以棉籽壳为基质的米曲霉发酵物尚未开展相关的饲用品质评价,对于米曲霉发酵后棉籽壳的营养成分、代谢产物尚缺乏相关的研究,难以指导棉籽壳米曲霉发酵物在动物养殖上的高效使用。

本研究以具有棉酚降解能力的米曲霉固态发酵棉籽壳,通过考察米曲霉发酵对棉籽壳棉酚和纤维类物质的降解效果,对粗蛋白质含量、肽含量和氨基酸组成等蛋白质品质的提升作用,以及有机酸和酶系等有益代谢产物的积累情况,全方位评估米曲霉发酵对棉籽壳饲用品质的改善效果,以期开发以棉籽壳为基质的米曲霉发酵物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

棉籽壳,由新疆天牧生物科技有限公司提供;米曲霉 TM-1,由江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心保藏。

马铃薯固体培养基(PDA):称取200 g 去皮的马铃薯,切成小块放入烧杯中,加入800~1 000 mL 水,边煮沸边不停搅拌,保持30 min,用8层纱布过滤,收集滤液于烧杯中,加入20 g 葡萄糖和20 g 琼脂,充分搅拌,补水至1 000 mL,115℃灭菌20 min。

促孢培养基:将1 g 磷酸二氢钾、1 g 硝酸钾、0.5 g 硫酸镁、0.5 g 氯化钾、0.2 g 可溶性淀粉、0.2 g 葡萄糖、20 g 琼脂混合均匀,pH 自然,用水定容至1 000 mL,115℃灭菌20 min。

葡萄糖、磷酸二氢钾、乙腈、硝酸钾、硫酸镁、氯化钾、可溶性淀粉、琼脂,阿拉丁(上海)生物科技有限公司;98% 醋酸棉酚,陕西金泰康生物科技有限公司;土豆,江南大学北区生活超市;其他试剂均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.1.2 仪器与设备

酶标仪,南京拜尔沃克智能科技有限公司;Quanta 200 扫描电子显微镜,荷兰 FEI 公司;超高效液相色谱仪、高效液相色谱仪(HPLC),美国 Waters 公司;S433D 全自动氨基酸分析仪,德国赛卡姆公司;Hanon k1160 凯氏定氮仪,海能未来技术集团股份有限公司;恒温培养箱,上海捷呈实验仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 米曲霉 TM-1 的活化与纯化

用接种环轻刮保存于斜面的米曲霉菌丝,涂布

到 PDA 平板上,30℃培养 2 d。培养结束后,挑选出独立生长的真菌菌落,并使用三点法再次将其点在 PDA 平板上进行纯化,30℃培养 2 d。再次挑取纯化菌株,涂布于促孢培养基中,30℃培养 3~4 d,产生肉眼可见的孢子,将孢子用灭菌过的 75% 生理盐水冲洗,形成孢子悬液(10^7 CFU/mL),保存备用。

1.2.2 棉籽壳米曲霉发酵物的制备

通过预试验,以棉酚降解率和产酶能力为响应值进行了包括接种量、发酵时间、装料量、料液比和初始 pH 等棉籽壳米曲霉发酵物制备条件的优化确定。称取粉碎的棉籽壳 20 g 于 500 mL 三角瓶中,加水 16 mL,调整初始 pH 为 7,混合均匀后用 6 层纱布封口,121℃灭菌 20 min。按接种量 10% 接入孢子悬液,混匀后放入恒温恒湿培养箱,在发酵温度 30℃,湿度 96% 条件下发酵 4 d,每 6~8 h 翻料一次,发酵结束后置于 45℃ 烘箱烘干,粉碎,过 0.85 mm(20 目)筛后备用。

1.2.3 游离棉酚含量的测定

标准曲线的绘制:将棉酚标准品溶解在流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液(体积比 85:15)中制备 1.0 mg/mL 标准棉酚溶液,依次稀释为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.1 mg/mL 6 个梯度,进 HPLC 测定峰面积,以峰面积为纵坐标,棉酚质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

样品前处理:将样品与上述流动相以料液比 1:10 混合,超声 1.5 h,离心并取上清液,过 0.22 μ m 有机滤膜,进 HPLC 分析。

HPLC 条件:Xbridge-C18 色谱柱;流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液(体积比 85:15),流速 1.0 mL/min,等度洗脱;紫外检测波长 235 nm;柱温 25℃;进样量 20 μ L;内衬管补偿值 0.2 mm。

1.2.4 扫描电镜分析及纤维含量的测定

扫描电镜分析:将棉籽壳发酵物用导电胶带固定在铜台上,喷金后置于干燥器中静置 2 d,使用扫描电子显微镜进行观察。

纤维:根据 Fan 等^[13]的方法测定样品的中性洗涤纤维含量和酸性洗涤纤维含量,按照 Lu 等^[14]的方法测定样品的木质素、纤维素、半纤维素含量。

1.2.5 pH、总酸含量、有机酸含量的测定

pH:将样品加水稀释后置于 30℃ 恒温恒湿摇床中振荡 30 min 后,直接使用 pH 计测定 pH。

总酸:参照 GB 12456—2021 测定总酸含量。

有机酸:参考 Marazza 等^[15]的方法并稍作修改。按料液比 1:10 混匀样品和纯水,在 30℃ 恒温恒湿摇床中振荡提取 1 h,超声 15 min,离心取上清液,经

0.45 μ m 滤膜过滤后,待 HPLC 测定。HPLC 条件:WondaCract ODS-2 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m),柱温 27℃;流动相为 0.3% 的偏磷酸,流速 0.8 mL/min;紫外检测波长 220 nm;测试时间 30 min;进样量 15 μ L。

1.2.6 粗蛋白质和酸溶蛋白含量的测定

参考刘瑞芳等^[16]的方法测定粗蛋白质的含量,参考肖志明等^[17]的方法测定酸溶蛋白的含量。

1.2.7 肽分子质量分布和游离氨基酸的测定

肽分子质量分布:取 1 g 研碎的样品,加入 10 mL 15% 三氯乙酸溶液,超声 15 min 后离心,取上清液,过 0.22 μ m 有机微孔滤膜,进超高效液相色谱分析。色谱条件:ACQUITY UPLC Glycan BEH 酰胺色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 1.7 μ m);流动相为含 30% 乙腈的水溶液(含 0.1% 三氯乙酸),流速 0.6 mL/min;柱温 25℃;紫外检测波长 220 nm;检测时间 30 min;进样量 10 μ L。通过已知分子质量的标准品进行定性,峰面积归一化法定量。

游离氨基酸:参考徐珊珊等^[18]的方法并作修改。按料液比 1:10 向粉碎样品中加入 75% 乙醇,45℃ 下于超声功率 175 W 超声 60 min,离心取上清液,经 0.22 μ m 水系膜过滤后进 HPLC 测定。HPLC 条件:Hypersil™ ODS-2 C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);柱温 37℃;紫外检测波长 255 nm;进样量 15 μ L;流动相 A 为 90 mmol/L 乙酸钠缓冲液,流动相 B 为 80% 的乙腈溶液;流速 1.0 mL/min;梯度洗脱程序为 0~13 min 85% A、15% B,13~30 min 65% A、35% B,30~37 min 100% B,37~50 min 100% A。

1.2.8 酶活的测定

纤维素酶:参照李豪等^[19]的方法并稍作修改。以质量浓度为 10 mg/mL 的羧甲基纤维素钠为底物,加入 1 mL 稀释酶液和 1 mL 底物,50℃ 保温 30 min 后,立即加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液混匀,沸水浴 5 min,冷却后蒸馏水定容至 25 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度,以灭酶组为空白对照计算酶活。在上述反应条件下每分钟水解底物产生 1 μ mol 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活单位。

β -葡聚糖酶:采用 Qiu 等^[20]的方法并稍作修改,以溶解在乙酸-乙酸钠缓冲液中 β -葡聚糖(8 mg/mL)为底物进行测定。将 1 mL 稀释酶液和 1 mL 底物混合,37℃ 保温 30 min,加入 2 mL DNS 溶液混匀终止反应,沸水浴煮沸 5 min,振荡混合均匀,冷却后蒸馏水定容至 25 mL,于 540 nm 波长下测定吸

光度,以灭酶组为空白对照计算酶活。反应条件下每分钟释放 1 μmol 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

β -1,4 内切木聚糖酶:参考徐善恒等^[21]的方法并稍作修改,以溶解在 100 mmol/L 的醋酸钠缓冲液(pH 5.5)中的 1% 小麦阿拉伯木聚糖为底物进行测定。将 1 mL 稀释酶液和 1 mL 底物混合,40 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25 min 后迅速加入 2 mL DNS 溶液,沸水浴 5 min,冷却至室温,蒸馏水定容至 25 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度,以灭酶组为空白对照计算酶活。反应条件下每分钟降解木聚糖产生 1 μmol 木糖所需的酶量为一个酶活单位。

果胶酶:参照谷艺明^[22]的方法并稍作改进。吸取果胶溶液 0.7 mL 于比色管中,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min,加入 0.3 mL 稀释酶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min,立即加入 2 mL DNS 溶液,沸水浴煮沸 5 min,冷却后蒸馏水定容至 25 mL,混合均匀,用酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光度,以灭酶组为空白对照计算酶活。反应条件下每分钟释放 1 μmol 半乳糖醛酸所需酶量为一个酶活单位。

α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、 β -D-木糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶:参考解西柱^[23]的方法并稍作修改,分别配制 2 mmol/L 的对硝基苯基阿拉伯呋喃糖苷、对硝基苯基木糖苷和对硝基苯基葡萄糖苷作为底物,同时配制 0.1 mol/L 的醋酸钠溶液(pH 5.5)和 1 mol/L 的碳酸钠溶液。将 25 μL 底物、50 μL 醋酸钠溶液和 25 μL 稀释酶液混合均匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 15 min,加入 100 μL 碳酸钠溶液,冷却至室温,利用酶标仪在 410 nm 波长下测定吸光度,以高温灭酶组为空白对照。在上述反应条件下,每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活单位。

中性蛋白酶:按照 GB/T 28715—2012 测定。

1.2.9 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行方差分析,使用 Origin 2019 软件进行统计分析与作图, $p < 0.05$ 表示差异显著。

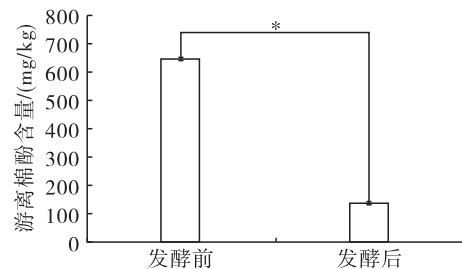
2 结果与分析

2.1 米曲霉发酵对棉籽壳棉酚降解的影响

米曲霉发酵前后棉籽壳中游离棉酚的含量如图 1 所示。

由图 1 可知,发酵前棉籽壳的游离棉酚含量为 645.3 mg/kg,超过了欧盟对成年牛羊等反刍动物日粮中游离棉酚 500 mg/kg 的允许量,但经米曲霉发酵处理后,棉籽壳的游离棉酚含量降至 137.2 mg/kg,降解率达到 78.7%,满足欧盟对反刍动物日粮中游离棉酚的限量要求。米曲霉 TM-1 对棉

酚的降解率高于张莉等^[24]筛选的乳酸片球菌 JD-1 和汪丰等^[25]从棉花中分离得到的拉乌尔菌 YL01 对棉酚的降解率,与陈生琴等^[26]筛选的红平红球菌的棉酚降解率(72.54%)相当。棉酚是一类多酚羟基双萜醛类化合物,其确切的降解机制还不明确,目前的研究认为微生物的水解酶系,特别是漆酶,与棉酚的降解相关,此外棉酚作为萜的衍生物,可能经历某些代谢途径,被降解成无害物质^[27]。米曲霉基因组学分析显示,其含有与萜和芳香族化合物降解途径相关的基因^[28],这可能是米曲霉 TM-1 可以高效降解棉酚的重要原因。



注: * 表示具有显著差异($p < 0.05$); ** 表示具有极显著差异($p < 0.01$)。下同

Note: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. The same below

图 1 米曲霉发酵前后棉籽壳中游离棉酚含量

Fig. 1 Content of free gossypol in cottonseed shells before and after *Aspergillus oryzae* fermentation

2.2 米曲霉发酵对棉籽壳粗纤维降解的影响

采用扫描电子显微镜对米曲霉发酵前后的棉籽壳进行观察,结果如图 2 所示。

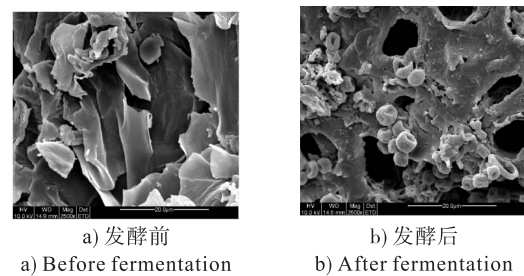


图 2 米曲霉发酵前后棉籽壳的扫描电镜图

Fig. 2 SEM images of cottonseed shells before and after *Aspergillus oryzae* fermentation

由图 2 可以看出:发酵前,棉籽壳表面结构紧密且呈大片块状,排列规律,没有细小孔洞;米曲霉发酵后的棉籽壳表面覆盖了大量米曲霉孢子和部分菌丝,呈现出较为松散和稀疏的网状结构,存在较大的空隙。这种结构的变化表明米曲霉分泌的多种水解酶能够有效破坏棉籽壳表面的粗纤维结构。

通过测定发酵前后棉籽壳中纤维素、半纤维素、木质素、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的含量,发现这些物质的含量分别下降了 9.3%、12.1%、11.7%、

12.4%和15.3%,说明米曲霉固态发酵能有效降低棉籽壳中难以消化的粗纤维含量,对于提高动物饲喂消化率具有正向作用。

2.3 米曲霉发酵对棉籽壳总酸及有机酸含量的影响

经米曲霉发酵后,棉籽壳 pH 由 6.4 降为 4.7,总酸含量也由 0.4% 升至 1.0%,在这种偏酸性条件下,有害菌(大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌)的生长受到一定程度抑制,这对米曲霉的正常生长和代谢活力维持起到促进作用,也有利于动物肠道健康和生产性能提升。进一步采用 HPLC 测定发酵前后棉籽壳中有机酸组成及含量,结果如图 3 所示。

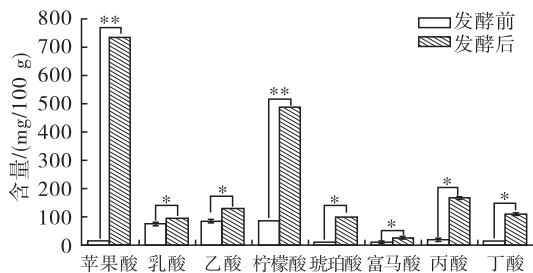


图 3 米曲霉发酵前后棉籽壳中有机酸组成及含量

Fig. 3 Composition and content of organic acids in cottonseed shells before and after *Aspergillus oryzae* fermentation

由图 3 可知,米曲霉发酵后,棉籽壳中的苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、丙酸和丁酸含量都有所上升。其中,苹果酸、琥珀酸、丙酸、丁酸和柠檬酸的上涨幅度最大,分别上升了 49.2、9.7、8.1、6.6 倍和 4.6 倍。发酵后,棉籽壳中苹果酸含量最高,为 734.0 mg/100 g,其次是柠檬酸,为 486.4 mg/100 g。研究发现,添加适量苹果酸和柠檬酸对提高发酵木薯叶的微生物群和发酵品质有显著效果^[29],另外在犊牛开食料中添加适量的柠檬酸,可以显著提高犊牛采食量,改善营养物质的表观消化率和犊牛的生长性能,并对哺乳犊牛的机体代谢及瘤胃微生物群落也具有一定的影响^[30]。综上,米曲霉发酵可以产生较多的复合有机酸,有效抑制有害菌的生长,延长饲料产品的保质期,促进反刍动物肠道健康,提高饲料营养价值和矿物质消化率,提高反刍动物生长性能^[31]。

2.4 米曲霉发酵对棉籽壳蛋白品质的影响

经米曲霉发酵后,棉籽壳中粗蛋白质含量由 12.5% 提高至 15.5%,这可能是因为碳水化合物在发酵过程中代谢形成气体或易挥发的物质,进而促使蛋白质相对含量升高^[32]。酸溶蛋白在粗蛋白质中的占比从 4.8% 增加至 13.5%,提高了 1.8 倍,表

明米曲霉发酵使得蛋白质得到较大程度的降解,生成了大量的多肽和小肽类物质。米曲霉发酵前后棉籽壳的肽分子质量分布情况如表 1 所示。

表 1 米曲霉发酵前后棉籽壳的肽分子质量分布

Table 1 Molecular weight distribution of peptides in cottonseed shells before and after *Aspergillus oryzae* fermentation

分子质量/Da	发酵前/%	发酵后/%
>10 000	3.73	5.83
5 000 ~ 10 000	3.67	1.03
3 000 ~ 5 000	3.78	2.31
2 000 ~ 3 000	3.66	2.10
1 000 ~ 2 000	7.27	5.77
500 ~ 1 000	8.43	0.48
180 ~ 500	16.82	11.02
<180	52.64	71.46

由表 1 可知,分子质量在 1 000 Da 以下的寡肽在发酵后约占 83.0%,而寡肽往往具备高生物活性,如抗氧化、降血压和免疫激活等多种生理活性。与发酵前相比,发酵后的棉籽壳中分子质量 180 ~ 10 000 Da 的肽含量均有一定程度下降,而分子质量小于 180 Da 的寡肽含量显著增加。棉籽壳蛋白有效降解有益于动物的消化和吸收,还可以增强动物免疫细胞的分化和免疫球蛋白的表达,提高动物的免疫性能、抗炎特性和抗糖尿病活性^[33]。

在反刍动物饲粮喂养中,蛋白质饲料利用率不高,导致蛋白资源浪费、营养失衡严重、免疫力下降等挑战一直存在,通过增加氨基酸总量以及补充限制性氨基酸可以提高反刍动物的产奶量和生长性能。米曲霉发酵前后棉籽壳中游离氨基酸组成及含量如图 4 所示。

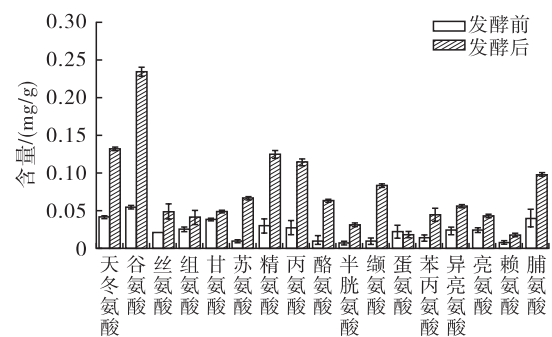


图 4 米曲霉发酵前后棉籽壳中游离氨基酸的组成及含量

Fig. 4 Composition and content of free amino acids in cottonseed shells before and after *Aspergillus oryzae* fermentation

由图 4 可知,棉籽壳经米曲霉发酵后,除了蛋氨酸含量略微减少外,其他游离氨基酸含量均有所增加,氨基酸总量提高了 115.7%。其中,反刍动物所需的必需氨基酸中精氨酸和天冬氨酸增加最明显,

分别增加 318.5% 和 220.3%。限制性氨基酸中,赖氨酸和组氨酸含量增加最多,分别增加了 117.4% 和 64.2%。游离氨基酸可以被反刍动物高效吸收,不仅能提高反刍动物肌肉的香甜味和营养价值,还可促进幼年反刍动物的生长^[34]。此外,游离氨基酸在调节机体免疫活性方面也发挥重要作用^[35],可增加肠道消化酶和抗氧化酶的活性,从而提高断奶仔猪的肠道免疫和调节功能^[36]。综上,米曲霉 TM-1 发酵后显著增加了棉籽壳游离氨基酸和限制性氨基酸总量,对提升反刍动物机体生长和代谢能力都具有积极作用。

2.5 米曲霉发酵棉籽壳对产酶的影响

米曲霉发酵物是目前饲料行业常见的饲料添加剂,米曲霉发酵物对反刍动物瘤胃发酵的积极作用主要源于培养物中丰富酶系的促进作用^[37]。测定了米曲霉发酵棉籽壳中蛋白质、纤维素、半纤维素和果胶降解酶的相关酶活,结果如表 2 所示。

表 2 米曲霉发酵棉籽壳中各酶的酶活

Table 2 Enzyme activities of various enzymes in cottonseed shells fermented by *Aspergillus oryzae*

酶种类	酶活/(U/g)
纤维素酶	13.4
β -葡聚糖酶	39.7
β -1,4 内切木聚糖酶	19.7
果胶酶	2.2
α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶	0.1
β -D-木糖苷酶	0.2
β -葡萄糖苷酶	0.1
中性蛋白酶	245.2

由表 2 可知,米曲霉发酵棉籽壳中中性蛋白酶的酶活最高,为 245.2 U/g,可以有效提升动物对蛋白质的消化和吸收效率,且有助于降低动物内部菌群失衡的风险,维护肠道健康^[38]。米曲霉发酵棉籽壳中纤维素酶的酶活为 13.4 U/g,该酶可以裂解纤维中的 β -1,4 葡萄糖苷键释放多糖,降低酸性与中性洗涤纤维含量^[39]。米曲霉发酵棉籽壳中 β -葡萄糖苷酶的酶活为 0.1 U/g,该酶可将纤维寡糖水解开成葡萄糖,其与纤维素酶具有很好的协同作用,可提高纤维素的降解效果,进而更好地降解棉籽壳中的纤维素,提高机体对棉籽壳纤维的利用率。米曲霉发酵棉籽壳中 β -葡聚糖酶的酶活达到 39.7 U/g,其对棉籽壳中 β -葡聚糖的水解作用可以促进生物质的有效降解和利用,促进动物对饲料的消化吸收。米曲霉发酵棉籽壳中 β -1,4 内切木

聚糖酶的酶活为 19.7 U/g, β -D-木糖苷酶和 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶可以协同木聚糖酶降解木聚糖,产生有益健康的低聚木糖和阿拉伯糖等,从而增强动物对饲料的消化能力,提高动物的生长性能^[40]。此外,果胶酶的存在可以协助纤维素和半纤维素降解酶打破原料的细胞壁结构屏障,提高干物质消化率。综上,米曲霉具有较强的蛋白质合成分泌能力,其发酵产物所具有的具有协同效应的各类水解酶可以促进营养物质的溶出和降解,从而提升营养消化率。

3 结论

将实验室筛选所得的米曲霉 TM-1 应用于棉籽壳固态发酵,可将棉籽壳中棉酚含量由 645.3 mg/kg 降低为 137.2 mg/kg,木质素、纤维素、半纤维素、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量下降,总酸和有机酸含量上升,粗蛋白质含量由 12.5% 上升到 15.5%,酸溶蛋白占比由 4.8% 增至 13.5%,分子质量小于 180 Da 的寡肽含量显著增加,游离氨基酸总量增加 115.7%。米曲霉发酵棉籽壳具有丰富的水解酶系,包括中性蛋白酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶和 β -1,4 内切木聚糖酶等。综上,利用米曲霉 TM-1 发酵棉籽壳,可以综合提升棉籽壳作为饲料资源的自身营养属性,改善饲养效果,提高机体发育生长潜力,具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] EIRAS C E, MOTTIN C, PASSETTI R A C, et al. How dietary cottonseed hull affects the performance of young bulls finished in a high-concentrate system[J/OL]. Anim Prod Sci, 2017, 57(8): 1719[2023-12-27]. <https://doi.org/10.1071/an15474>.
- [2] 郁钧. 仔鹅饲料中棉籽粕替代豆粕效应及游离棉酚损伤肠肝机制的研究[D]. 江苏扬州:扬州大学,2023.
- [3] 海米代·吾拉木,阿依米热·毛拉木,乌斯满·依米提. 2 株棉酚分解菌对棉籽油脱毒效果的研究[J]. 中国油脂,2017,42(1): 74-75,79.
- [4] 何涛,滕达,张海军,等. 微生物降解棉酚的响应面分析优化[J]. 食品与发酵工业,2008,34(4): 71-74.
- [5] 元秀晔,谢全喜,张志焱,等. 适宜棉籽粕固态发酵的菌株的筛选[J]. 广东饲料,2018,27(11): 29-33.
- [6] 钱荣,续晓琪,许宗奇,等. 枯草芽孢杆菌 KC-WQ 发酵液中抗菌脂肽的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 食品工业科技,2022,43(15): 123-131.
- [7] CAO Y, LU J, CAI G. Quality improvement of soybean meal by yeast fermentation based on the degradation of anti-nutritional factors and accumulation of beneficial metabolites[J]. J Sci Food Agric,2024,104(3): 1441-1449.

- [8] LEE K, KWON S H, SONG S, et al. Comparative analysis of volatile and non - volatile metabolites derived from *Bacillus subtilis* strains producing different levels of biogenic amines[J/OL]. *Metabolites*, 2023, 13(2): 219[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.3390/metabo13020219>.
- [9] LI J, LIU B, FENG X, et al. Comparative proteome and volatile metabolome analysis of *Aspergillus oryzae* 3.042 and *Aspergillus sojae* 3.495 during Koji fermentation[J/OL]. *Food Res Int*, 2023, 165: 112527[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112527>.
- [10] SUCU E, MOORE C, VANBAALE M J, et al. Effects of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation product to transition Holstein cows on performance and health[J]. *Can J Anim Sci*, 2019, 99(2): 237 - 243.
- [11] ICHIKAWA N, NG L S, MAKINO S, et al. Solid - state fermented okara with *Aspergillus* spp. improves lipid metabolism and high - fat diet induced obesity[J/OL]. *Metabolites*, 2022, 12(3): 198[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.3390/metabo12030198>.
- [12] DOSSOU S, KOSHIO S, ISHIKAWA M, et al. Effects of replacing fishmeal with fermented and non - fermented rapeseed meal on the growth, immune and antioxidant responses of red sea bream (*Pagrus major*)[J]. *Aquacult Nutr*, 2019, 25(2): 508 - 517.
- [13] FAN Z, CHEN T, CAI G, et al. Effect of *Aspergillus niger* fermentation on the metabolites in corn stalks[J/OL]. *Fermentation*, 2023, 9(1): 50[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010050>.
- [14] LU X, LI F, ZHOU X, et al. Biomass, lignocellulolytic enzyme production and lignocellulose degradation patterns by *Auricularia auricula* during solid state fermentation of corn stalk residues under different pretreatments[J/OL]. *Food Chem*, 2022, 384: 132622[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132622>.
- [15] MARAZZA J A, NAZARENO M A, SAVOYDE GIORI G, et al. Bioactive action of β - glucosidase enzyme of *Bifidobacterium longum* upon isoflavone glucosides present in soymilk[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2013, 48(12): 2480 - 2489.
- [16] 刘瑞芳, 王艺伟. 优化凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白质条件的研究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(20): 104 - 107.
- [17] 肖志明, 李丽蓓, 邓涛, 等. 饲料原料中酸溶蛋白的测定方法研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(2): 72 - 75, 80.
- [18] 徐珊珊, 史星雲, 李强, 等. 不同桉柳游离氨基酸组成及含量分析[J]. *林业科技通讯*, 2023(9): 63 - 67.
- [19] 李豪, 邹伟, 白光剑, 等. 高产纤维素酶真菌的筛选及鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(6): 54 - 58.
- [20] QIU R, LU J. Improved hydrolase activity in barley and reduced malting time by adding phytase as an activator during malting steeping[J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(12): 1889 - 1894.
- [21] 徐善恒, 辛瑜, 刘建民, 等. 优化 *Bacillus subtilis* 对异源 β - 1,4 - 内切木聚糖酶分泌表达的研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3222 - 3234.
- [22] 谷艺明. 果胶酶高产菌株的筛选、发酵优化及酶学性质的研究[D]. 江苏常州: 常州大学, 2021.
- [23] 解西柱. 阿拉伯呋喃糖苷酶的克隆表达及其在麦汁制造中的应用研究[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2018.
- [24] 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.
- [25] 汪丰, 张维树, 崔颖, 等. 棉酚降解菌的筛选、鉴定及棉粕固态发酵效果研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(17): 132 - 139.
- [26] 陈生琴, 陈丽娟, 程茂基, 等. 高效降解棉酚菌株的选育及发酵棉粕最佳工艺的研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(4): 19 - 24.
- [27] 周生飞. 高效降解棉酚菌种筛选、降解机理及固体发酵工艺研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- [28] CHEN S, ZHANG W, ZHANG H, et al. The complete genome sequence of a gossypol - degrading bacterial strain, *Raoultella* sp. YL01[J/OL]. *Curr Microbiol*, 2023, 80(5): 163[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03204-4>.
- [29] LI M, ZHANG L, ZHANG Q, et al. Impacts of citric acid and malic acid on fermentation quality and bacterial community of cassava foliage silage[J/OL]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 595622[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.595622>.
- [30] 王姗姗. 柠檬酸对哺乳犊牛生长、血液生化指标、瘤胃发酵及菌群的影响[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2022.
- [31] DITTOE D K, RICKE S C, KIESS A S. Organic acids and potential formodifying the avian gastrointestinal tract and reducing pathogens and disease[J/OL]. *Front Vet Sci*, 2018, 5: 216[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00216>.
- [32] CAO Y, LU J, CAI G. Quality improvement of soybean meal by yeast fermentation based on the degradation of anti - nutritional factors and accumulation of beneficial metabolites[J]. *J Sci Food Agric*, 2024, 104(3): 1441 - 1449.
- [33] LI J, YANG L, LI G, et al. Low - molecular - weight oysterpeptides ameliorate cyclophosphamide - chemotherapy side - effects in Lewis lung cancer mice by mitigating gut microbiota dysbiosis and immunosuppression[J/OL]. *J Funct Foods*, 2022, 95: 105196[2023 - 12 - 27]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105196>.

- hydrogenated soybean oil, *Cinnamomum camphora* seed oil, and perilla oil by Lipozyme TL IM[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(6): 1189 – 1195.
- [16] ZOU X G, HU J N, ZHAO M L, et al. Lipozyme RM IM – catalyzed acidolysis of *Cinnamomum camphora* seed oil with oleic acid to produce human milk fat substitutes enriched in medium – chain fatty acids[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(43): 10594 – 10603.
- [17] AUGUSTIN K, KHABBUSH A, WILLIAMS S, et al. Mechanisms of action for the medium – chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders[J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(1): 84 – 93.
- [18] TANWAR B, GOYAL A. Oilseeds: Health attributes and food applications[M]. Singapore: Springer, 2021.
- [19] TAN C P, NEHDI I A. The physicochemical properties of palm oil and its components[M]//Palm oil. Amsterdam: Elsevier, 2012: 377 – 391.
- [20] MARINA A M, CHE MAN Y B, AMIN I. Virgin coconut oil: Emerging functional food oil[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2009, 20(10): 481 – 487.
- [21] 曾哲灵, 徐井水, 万冬满. 水乳化萃取与冻熔破乳化释放法提取樟树籽仁油的方法: CN104232296B[P]. 2016 – 09 – 28.
- [22] 熊亮清, 张若良. 水乳化萃取樟树籽仁油的方法研究[J]. *现代食品*, 2021, 29(19): 102 – 104.
- [23] 罗登林, 聂英, 罗磊, 等. 超临界 CO₂ 萃取樟树籽仁油的研究[J]. *粮油加工*, 2007(4): 52 – 54.
- [24] 傅婧. 樟树籽仁油改善肥胖大鼠脂代谢紊乱的作用及机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [25] FU J, ZENG C, ZENG Z, et al. *Cinnamomum camphora* seed kernel oil ameliorates oxidative stress and inflammation in diet – induced obese rats[J]. *J Food Sci*, 2016, 81(5): H1295 – H1300.
- [26] FU J, ZENG C, ZENG Z, et al. *Cinnamomum camphora* seed kernel oil improves lipid metabolism and enhances $\beta 3$ – adrenergic receptor expression in diet – induced obese rats[J]. *Lipids*, 2016, 51(6): 693 – 702.
- [27] 彭婷, 梁丽军, 曾哲灵, 等. 樟树籽仁油的 90 d 亚慢性经口毒性评价[J]. *中国油脂*, 2024, 49(7): 83 – 89, 100.
- [28] 南昌大学. 一种食用安全的樟树籽仁油的提取方法: CN202111331563.5[P]. 2022 – 02 – 08.
- [29] MATULKA R A, NOGUCHI O, NOSAKA N. Safety evaluation of a medium – and long – chain triacylglycerol oil produced from medium – chain triacylglycerols and edible vegetable oil[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(9): 1530 – 1538.
- [30] BERK B A, PACKER R M, FRITZ J, et al. Orallatatability testing of a medium – chain triglyceride oil supplement (MCT) in a cohort of healthy dogs in a non – clinical setting[J/OL]. *Animals*, 2022, 12(13): 1639 [2023 – 04 – 21]. <https://doi.org/10.3390/ani12131639>.
- [31] ZHOU S, WANG Y, JIANG Y, et al. Safety assessment of medium – and long – chain triacylglycerols containing 30% (*w/w*) medium – chain fatty acids in mice and rats[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 86: 42 – 48.
- [32] TRAU L K A, DRIEDGER A, INGLE D L, et al. Review of the toxicologic properties of medium – chain triglycerides[J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(1): 79 – 98.
-
- (上接第 39 页)
- [34] LI Y, HAN H, YIN J, et al. Effects of glutamate and aspartate on growth performance, serum amino acids, and amino acid transporters in piglets[J]. *Food Agric Immunol*, 2018, 29(1): 675 – 687.
- [35] CHEN T S, LIOU S Y, WU H C, et al. Amino acids with basic amino side chain accelerate the pro – oxidant ability of polyphenolic compounds[J]. *Food Chem*, 2012, 134(1): 9 – 14.
- [36] CHEN L, ZHONG Y, OUYANG X, et al. Effects of β – alanine on intestinal development and immune performance of weaned piglets[J]. *Anim Nutr*, 2023, 12: 398 – 408.
- [37] 孙华, 吴跃明, 李亚学, 等. 体外法研究米曲霉培养物对瘤胃发酵参数及微生物酶活性的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(11): 37 – 40.
- [38] 贾仲昕. 高产蛋白酶芽孢杆菌菌株的筛选和关键酶基因的比较基因组学分析[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2022.
- [39] 巨纪. 纤维素酶和植物乳杆菌对柠条青贮品质、细菌群落和体外瘤胃发酵参数的影响[D]. 内蒙古通辽: 内蒙古民族大学, 2023.
- [40] 高林青, 王铁岗, 倪海星. 菜粕型日粮添加植酸酶和木聚糖酶对肉鸡生长性能及小肠氨基酸和矿物质元素表观消化率的影响[J]. *中国饲料*, 2018(8): 35 – 40.