

袋式固态发酵法生产饲用棉粕的初步研究

韩伟,刘倩,李晓敏,张晓琳

(国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:研究在益生菌与蛋白酶共同参与的袋式固态发酵体系中,棉粕的毒性因子、营养成分及微生物等的变化。结果发现,相比原棉粕,经过72 h的固态发酵与酶解,游离棉酚降低30.3%,酸溶蛋白提高了77.8%,粗蛋白无显著提高;持续检测60 d,pH降至5.5左右,枯草芽孢杆菌含量大于 1.0×10^7 cfu/g,霉菌含量小于 1.0×10^4 cfu/g。由此可见,袋式发酵工艺下棉籽蛋白的营养价值有所提高,并利于湿料储存。

关键词:棉粕;袋式发酵;酶解;游离棉酚;霉菌

中图分类号:S 816.6 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2017)01-0070-04

Preliminary study on production of feeding cottonseed meal by bagging solid - state fermentation

HAN Wei, LIU Qian, LI Xiao-min, ZHANG Xiao-lin

(Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

Abstract: The change of virulence factors, nutritional components and microbes in cottonseed meal was researched in the bagging solid - state fermentation system with probiotics and proteinase as main participants. The results showed that compared to the unfermented cottonseed meal, the free gossypol decreased by 30.3%, the acid soluble protein increased by 77.8%, and the crude protein was not different significantly in 72 h. In 60 d detection, pH decreased to 5.5 or so, the content of *bacillus subtilis* was more than 1.0×10^7 cfu/g and mould content was less than 1.0×10^4 cfu/g. Therefore, the application of bag fermentation for producing cottonseed protein, not only improves the nutrition, but also is conducive to the preservation of wet feed.

Key words: cottonseed meal; bagging fermentation; enzymatic hydrolysis; free gossypol; mould

棉粕是畜牧业常用的饲用蛋白质原料,粗蛋白含量35%~50%^[1-2]。我国棉粕年产量超过600万t^[3],资源量大。通过微生物固态发酵法处理棉粕,可降低游离棉酚、肽链长度,提高小肽、总氨基酸和必需氨基酸含量,显著改变有机酸、B族维生素、游离氨基酸等含量,且能提升棉粕的饲用价值^[4-7]。闫理东等^[8]发现发酵棉粕可提高血液总蛋白、白蛋白、钙、磷、免疫球蛋白、法氏囊指数等。李巧云等^[9]用芽孢杆菌、酵母菌和链球菌等4种菌固态发

酵棉粕,粗蛋白提高了6.1%,可溶性蛋白增加了120.3 mg/g,同时提高了必需氨基酸的含量。但固态发酵棉粕通常需要添加30%~55%的水,通过烘干法终止发酵过程并得到成品,导致大量的热能消耗。据测算,烘干1 t棉粕所需要的成本约为150~300元。

动物养殖过程中,除选择优良饲料和加强饲养管理外,饲喂方法也至关重要。湿拌料是指水和饲料混合物或食品工业液体副产品与常规饲料原料的混合物。采用湿料饲喂猪(特别是仔猪)与采用干料相比,可以降低饲料成本、增加适口性、改善畜舍环境、改善仔猪生产性能,减少疾病发生。因此,湿

收稿日期:2016-09-06

基金项目:国家粮食局科学研究院自主选题科研计划课题(ZX1505)

作者简介:韩伟,1983年出生,男,助理研究员。

通讯作者:张晓琳,1975年出生,女,研究员。

料饲喂有较大的改善环境和降低饲养成本的潜力^[10]。袋式发酵,一方面提供了相对密闭的、易于操作的发酵场所,另一方面可实现棉粕湿料成品的长时间储存,避免干燥工序、便于运输。

本研究通过枯草芽孢杆菌、酿酒酵母与中性蛋白酶的协同作用,以呼吸袋为发酵场所、棉粕为主要底物进行发酵并酶解,研究棉粕的营养价值变化,探索袋式固态发酵法应用于微生物发酵棉粕源蛋白质饲料的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

棉粕,新疆泰昆集团奎屯油厂。产品指标:粗蛋白 50.27%,脂肪 1.57%,水分 8.04%,溶解度 63.96%,纤维素 6.71%,灰分 6.47%。实验前粒径要求:高于 10 目。

枯草芽孢杆菌 GJ00141:实验室保藏,该菌株经由游离棉酚标准品为唯一碳源的筛选体系证实,对游离棉酚有显著脱除作用。酿酒酵母 GJ00079:实验室保藏。

蛋白酶活性为 25 U/g,玉米粉、葡萄糖为食品级,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备

枯草芽孢杆菌 GJ00141:取斜面菌种一环接于营养肉汤培养基中,37 ℃、200 r/min 摇床培养 8 h 后,按 0.5% 比例转接至另一同样液体培养基,37 ℃、220 r/min 摇床或发酵罐(通氧)培养 12 h,备用。

酿酒酵母 GJ00079:取斜面菌种一环接于 PDA 液体培养基中,30 ℃、150 r/min 摇床培养 12 h 后,按 5% 比例转接到另一同样液体培养基中,30 ℃、180 r/min 摇床或发酵罐(通氧)培养 36 h,备用。

1.2.2 固态发酵与酶解工艺

原料配比见表 1。添加顺序:1)将棉粕、玉米粉、葡萄糖、无机盐等投入呼吸袋中,搅拌均匀;2)将枯草芽孢杆菌发酵液与水(25 ℃ ≤ 温度 ≤ 35 ℃、质量分数 25.0%)混合后均匀洒入发酵体系中;3)发酵 24 h,将酿酒酵母发酵液与水(质量分数 3.43%)混合后均匀洒入发酵体系中,搅拌均匀;4)

发酵 36 h,将蛋白酶与水(45 ℃ ≤ 温度 ≤ 60 ℃、质量分数 2.0%)混合后均匀洒入发酵体系中,再次搅拌均匀;5)持续实验 60 d,实验过程中定时取样、检测。

表 1 原料配比

原料	添加量/%
棉粕	67.61
玉米粉	0.85
葡萄糖	0.51
无机盐组合 ^①	0.17
中性蛋白酶	0.07
枯草芽孢杆菌 ^②	0.03
酿酒酵母 ^②	0.34
水	30.43

注:①无机盐组合含磷酸氢二钾和磷酸二氢钠(1:1);②枯草芽孢杆菌和酵母菌粉中有效活菌数分别约为 1.0×10^8 cfu/g 和 1.0×10^7 cfu/g。

1.2.3 呼吸袋的制备

呼吸袋(见图 1),使用 70% 酒精擦拭内部,紫外灯下低温晾干或烘干使用。装料达到呼吸袋容量的 2/3,保持通气阀通畅、不堵塞。呼吸袋口在实验过程中始终密封。发酵料表面和中部分别放置 1 个微型温湿度记录仪,每 5 min 记录一次数据,连续观测 60 d。

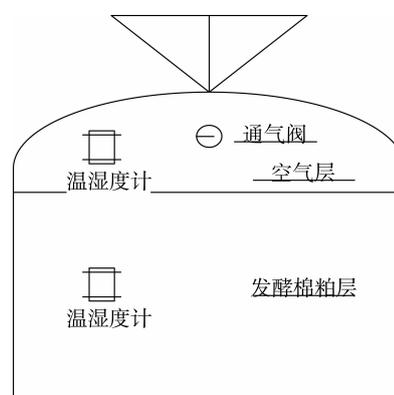


图 1 呼吸袋示意图

1.2.4 指标检测

粗蛋白,参照 GB/T 6432—1994^[11]方法;游离棉酚,参照 GB/T 13086—1991^[12]方法;酸溶蛋白,参照 GB/T 22492—2008^[13]方法;枯草芽孢杆菌活菌数,参照 GB/T 4789.2—2010^[14]方法;酵母和霉菌活菌数,参照 GB/T 4789.15—2010^[15]方法。

2 结果与分析

2.1 发酵体系温、湿度变化

为了获得发酵体系中必要的信息,研究中检测了温、湿度两个指标,结果见图2,温湿度变化的T检验结果见表2。

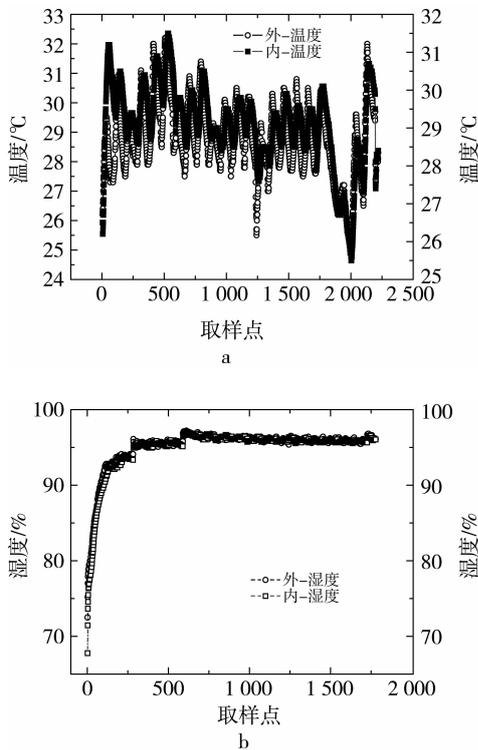


图2 发酵体系温度(a)和湿度(b)变化

注:相邻取样点间隔5 min。

表2 发酵体系(空气层和发酵棉粕层)温湿度变化的T检验

项目	自由度	平均数	标准差	标准误	P
空气层温度	2 223	28.785 38	1.289 9	0.027 36	3.0×10^{-57}
发酵棉粕层温度	2 223	29.099 42	1.063 13	0.022 55	
空气层湿度	2 223	94.137 11	8.967 51	0.190 2	0.125 17
发酵棉粕层湿度	2 224	94.457 28	4.061 71	0.086 13	

由图2和表2可见,投入种子、发酵起始后,温度迅速上升,这符合芽孢杆菌的生长特征;同时发酵层和空气层的湿度趋于统一。结合发酵层和空气层的温、湿度T检验结果发现,60 d的持续检测过程中,发酵层和空气层的温度变化存在极显著性差异($P < 0.01$),且发酵层温度变化范围更加小,这说明微生物代谢活动明显,导致发酵层温度不完全随外部环境温度的变化而改变。发酵层和空气层的湿度变化不存在显著性差异($P > 0.05$),说明整个实验

过程中发酵层和空气层的湿度变化趋势一致。

2.2 游离棉酚、pH和微生物的变化

按照发酵反应池处理棉粕的经验,在呼吸袋中重复了反应条件,结果见图3。

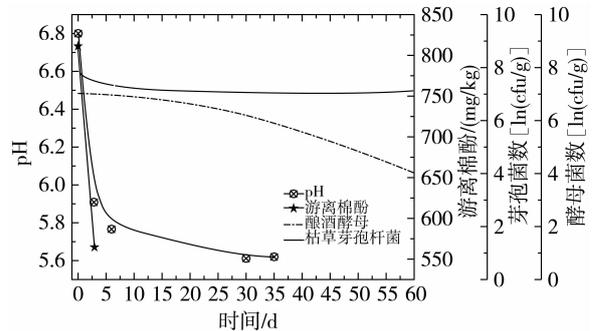


图3 发酵体系中pH、游离棉酚和菌数的变化

由图3可见,0~72 h内,棉粕中游离棉酚含量由810 mg/kg降低至564.7 mg/kg,降解率为30.3%,pH由6.80降至5.91,随时间的再延长逐渐稳定至5.5左右,尽管枯草芽孢杆菌GJ00141和酿酒酵母GJ00079的活菌数没有增长趋势,但可推测它们的代谢活动在此期间比较活跃。跟踪检测微生物活菌数直至60 d,发现GJ00141的活菌数降低约0.8个数量级,而酿酒酵母GJ00079的活菌数缓慢降低3个数量级,直至反应过程结束,枯草芽孢杆菌GJ00141和酿酒酵母GJ00079的活菌数分别为 1.2×10^7 cfu/g和 1.04×10^4 cfu/g。

2.3 粗蛋白和酸溶蛋白的变化

粗蛋白和酸溶蛋白是评定棉粕营养品质的两个重要指标。

由表3可看出,通过袋式固态发酵72 h,棉粕的粗蛋白含量并没有显著增长($P > 0.05$),而酸溶蛋白提高77.8% ($P < 0.05$),含量从3.6%提高至6.4%。由此推断,所用菌种GJ00141和GJ00079的发酵过程粗蛋白总量没有显著影响;该体系中微生物的产酶量相对较少,故酸溶蛋白的提高与蛋白酶的参与直接相关。

表3 粗蛋白和酸溶蛋白的变化

项目	原棉粕	发酵和酶解72 h后的棉粕
粗蛋白/%	50.1 ± 2.1^a	51.1 ± 1.7^a
酸溶蛋白/%	3.6 ± 0.15^a	6.4 ± 0.2^b

注:同行不含相同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.4 霉菌检测结果

要想实现湿料喂养,首先要保证湿料的安全性,并延长货架期,这其中最重要的一点是,避免霉菌污染与滋生。

由表4可见,3~6 d,呼吸袋内初始霉菌含量在 1.0×10^5 cfu/g左右,而在30 d和60 d时,霉菌含量已降至 1.0×10^4 cfu/g以下。可以推断,随着发酵体系中可溶性糖等营养物质的逐渐减少,枯草芽孢杆菌 GJ00141 成为优势菌,霉菌的生长受到明显限制。 1.0×10^4 cfu/g以下的霉菌含量符合现行一般饲料对霉菌上限的控制要求。

表4 霉菌菌落检测

时间/d	3	6	30	60
10^{-5} 稀释平板	+	+	-	-
10^{-4} 稀释平板	+	+	-	-

注:“+”代表该稀释浓度平板上有1~10个霉菌菌落;“-”代表该稀释浓度平板上没有霉菌菌落。

3 结论

本文研究了在枯草芽孢杆菌 GJ00141、酿酒酵母 GJ00079 和中性蛋白酶等参与的袋式固态发酵体系中棉粕的毒性因子、营养成分、微生物的变化。相比原棉粕,经过72 h的固态发酵与酶解,棉粕中游离棉酚含量降低至564.7 mg/kg(降解率为30.3%),酸溶蛋白含量提高至6.4%左右(增长率为77.8%);持续检测60 d,pH降至5.5左右。固态发酵成品的枯草芽孢杆菌 GJ00141 含量大于 1.0×10^7 cfu/g,而霉菌含量小于 1.0×10^4 cfu/g。

综上所述,使用袋式固态发酵法生产饲用棉粕,

棉粕的游离棉酚明显降低,营养品质显著提升,60 d检测期内,霉菌含量降至 1.0×10^4 cfu/g以下,棉粕湿料的储存稳定性提高。

参考文献:

- [1]薛福连. 开发棉籽蛋白饲料[J]. 饲料与畜牧,2001(1): 31-32.
- [2]GB/T 21264-2007,饲料用棉粕[S].
- [3]王春芳. 固态生料发酵棉粕对游离棉酚含量及猪生产性能的影响[D]. 合肥:安徽农业大学,2011.
- [4]诸葛斌,刘俊,方慧英,等. 混菌发酵改良棉粕蛋白工艺及协同作用研究[J]. 中国生物工程杂志,2011,31(9):62-68.
- [5]乔晓艳,蔡国林,陆健. 微生物发酵改善棉粕饲用品质的研究[J]. 中国油脂,2013,38(5):30-34.
- [6]吴妍妍,张文举,聂存喜,等. 棉粕源发酵饲料产物中有机酸、B族维生素和游离氨基酸的研究[J]. 粮食与饲料工业,2013(5): 46-50.
- [7]聂存喜. 酵母发酵棉粕对肉鸡脂类代谢的影响及其代谢组学研究[D]. 石河子:石河子大学,2015.
- [8]闫理东,张文举,聂存喜,等. 发酵棉粕对黄羽肉鸡血液生化指标和免疫性能的影响[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(10):95-100.
- [9]李巧云,侯冰,王潇,等. 复合微生物发酵棉粕的生产工艺研究[J]. 饲料研究,2014(7):58-60.
- [10]王汉夫,武书庚. 华南地区干、湿料两种不同饲喂方法对肉猪生产性能的影响[J]. 饲料工业,2008,29(21):29-30.
- [11]GB/T 6432-1994,饲料中粗蛋白测定方法[S].
- [12]GB/T 13086-1991,饲料中游离棉酚的测定方法[S].
- [13]GB/T 22492-2008,大豆肽粉[S].
- [14]GB/T 4789.2-2010,食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
- [15]GB/T 4789.15-2010,食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数[S].