

菜籽粕硫甙生物降解工艺优化及其动力学研究

闫丹丹¹, 李炳浩¹, 张寒¹, 刘栋¹, 高盼¹, 殷娇娇¹,
王澍², 胡传荣^{1,2,3}, 何东平^{1,2,3}, 钟武^{1,2,3*}

[1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 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 430071; 3. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023]

摘要: **目的** 优化菜籽粕硫甙降解工艺, 并研究生物发酵过程中优势菌株对硫甙的降解动力学。**方法** 以菜籽粕为原料, 以实验室自筛菌种 B38(鉴定为短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*)与商业菌株(植物乳杆菌 LP21825、枯草芽孢杆菌 BS20445)进行复配, 确定最佳硫甙降解菌株组合, 进一步优化硫甙降解工艺, 并对降解率进行拟合, 选用 Logistic 方程来适配发酵过程中硫甙浓度的变化。**结果** 结果表明 B38+BS20445 为最佳菌株组合, 确定最佳硫甙降解工艺为料液比 1:1.5 (g:mL), 发酵时间 48 h, 接种量 10%, 此时硫甙降解率为 56.66%, 并且菜籽粕经发酵后蛋白含量与酸度均有所增加。硫甙生物降解过程符合 Logistic 动力学方程, 其 R^2 大于 0.99, 表明拟合性良好, 进一步说明模型能够很好地描述和预测菜籽粕硫甙的降解过程。**结论** 菌种复配发酵能提高菜籽粕硫甙降解率, 降低菜籽粕毒性, 为菜籽粕的应用提供重要理论基础。

关键词: 硫甙; 菜籽粕; 固体发酵; 菌株复配; 降解动力学

Optimization of biodegradation process and kinetics of glucosinolate from rapeseed meal

YAN Dan-Dan¹, LI Bing-Hao¹, ZHANG Han¹, LIU Dong¹, GAO Pan¹, YIN Jiao-Jiao¹,
WANG Shu², HU Chuan-Rong^{1,2,3}, HE Dong-Ping^{1,2,3}, ZHONG Wu^{1,2,3*}

[1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. National Key Laboratory of Market Regulation (Quality and Safety of Edible Oil), Wuhan 430071, China; 3. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil of Ministry of Education in China, Wuhan 430023, China]

ABSTRACT: Objective To optimize the degradation process of glucosinolates in rapeseed meal and study the degradation kinetics of glucosinolates by dominant strains during biological fermentation. **Methods** Using rapeseed meal as raw material, a laboratory self screened strain B38 (identified as *Bacillus pumilus*) was mixed with commercial strains (*Lactobacillus plantarum* LP21825, *Bacillus subtilis* BS20445) to determine the optimal combination of glucosinolates degrading strains. The glucosinolates degradation process was further optimized, and the degradation rate was fitted. Logistic equations were used to adapt to changes in glucosinolates concentration during the fermentation process. **Results** The result showed that B38+BS20445 was the optimal strain combination, and the optimal glucosinolates degradation process was determined as follows: Material liquid ratio 1:1.5 (g:mL), fermentation time 48 hours, inoculation amount 10%. At this time, the glucosinolates degradation rate was 56.66%, and the protein content

基金项目: 2023 武汉轻工大学校立科研项目(01500001)

Fund: Supported by the 2023 Wuhan Polytechnic University Establishment Scientific Research Project (01500001)

*通信作者: 钟武, 博士, 讲师, 主要研究方向为微生物油脂制备及高值化利用研究。E-mail: zhongwu@whpu.edu.cn

*Corresponding author: ZHONG Wu, Ph.D, Lecturer, Wuhan Polytechnic University, No.68 Xuefu South Road, Evergreen Garden, Wuhan 430023, China. E-mail: zhongwu@whpu.edu.cn

and acidity of rapeseed meal increased after fermentation. The biodegradation process of glucosinolates conformed to the logistic kinetic equation, with an R^2 greater than 0.99, indicating good fitting. This further indicated that the model could effectively describe and predict the degradation process of glucosinolates in rapeseed meal. **Conclusion** The mixed fermentation of strains can improve the degradation rate of glucosinolates in rapeseed meal, reduce the toxicity of rapeseed meal, and provide an important theoretical basis for the application of rapeseed meal.

KEY WORDS: glucosinolate; rapeseed meal; solid fermentation; strain recombination; degradation kinetics

0 引言

菜籽粕是油菜籽经预压浸出提取油脂后所得的副产品, 21 世纪以来其产量逐年升高^[1]。菜籽粕中粗蛋白含量为 35%~45%, 真蛋白含量为 83%~87%^[2]。菜籽粕蛋白主要由 12S 球蛋白和 2S 白蛋白构成, 其营养指标如蛋白质净利用率和生物价均优于大豆蛋白^[3], 同时蛋白氨基酸构成合理, 富含赖氨酸、蛋氨酸等限制性氨基酸。菜籽蛋白营养价值和功能特性已被广泛接受, 但目前国内外仍无工业化产品, 这是由于菜籽粕中含有硫甙(glucosinolate, GS)及其降解产物如噁唑烷硫酮(oxazolidine thione, OZT)、异硫氰酸酯(isothiocyanate, ITC)、硫氰酸盐(thiocyanate, TC)和腈(nitrile)以及粗纤维、植酸、单宁、芥子碱等多种抗营养因子, 严重影响菜籽粕的营养性和适口性^[4]。

硫甙全称是硫代葡萄糖苷, 几乎存在于所有十字花科植物的体内, 根据侧链氨基酸来源的不同, 被分为脂肪族、芳香族和吡啶族硫甙 3 大类, 但它们的基本结构相同。硫甙对人体具有一定的药用价值, 但其也是菜籽粕中主要的抗营养因子之一, 其含量可以达到 4%~6%^[5]。硫甙主要存在于菜籽粕柔软的组织中, 在菜籽粕中的平均含量为 60 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ^[6]。菜籽粕中抗营养因子的降解产物对动物机体有很大的毒害作用, 会伤害到动物的肝脏、肾脏等器官, 对生殖健康影响极大, 严重限制了菜籽粕的推广应用。实现低毒性菜籽蛋白的工业化生产, 对于当今饲料行业蛋白紧缺的现状将有极大的改善。因此对菜籽粕中的硫甙进行降解处理是提高菜籽粕饲料价值的关键。

国内外已对菜籽粕脱毒方法进行了大量的研究, 主要有物理、化学、遗传育种和微生物 4 种脱毒方法^[7], 在提高菜粕的利用率方面获得了较好的成效。物理脱毒法相对简便, 但是不能完全除去菜粕中的有害物; 化学脱毒法是利用物质具有特定的毒性对其进一步降解, 并根据酸碱中和及溶解等方法去除其原有的毒性; 遗传育种法是从基因层面出发, 进一步改变菜粕中的抗营养物质; 而微生物脱毒法是利用微生物生长速率快、种类繁多、数量大、适应能力强、容易培养的优点, 该方法不仅可以降解硫甙和其他物质, 微生物通过自身的代谢机制, 还可以提升菜粕的香味, 同时增加蛋白质含量。

随着近几年研究的深入, 微生物脱毒相比于其他方

法(物理、化学等)具有高效、环境污染小、成本低等优点^[8], 目前国内外多采用枯草芽孢杆菌、白地霉菌、曲霉菌等菌^[9]进行菜籽粕的脱毒发酵。针对菜籽粕中抗营养因子对微生物选择性有限和抵抗性强的问题, 可以利用多种不同的微生物菌株或菌种复配, 实现菌株之间的协同作用, 增加菌株或菌种的适应性范围, 提高降解效率^[10], 但目前关于此方面的研究相对较少。前期预实验研究从腐烂菜籽粕中进行分离纯化筛选得到多种菌株, 其中 B38 在料液比 1:1.5 (g:mL, 下同)、接种量 10%和发酵时间 36 h 条件下, 硫甙降解率为 22.75%, 发酵较为稳定, 菌种鉴定结果为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*, BP)。本研究从购买的优良商业菌种植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, LP)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS)、粘红酵母菌(*Rhodotorula glutinis*, RG)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, BC)中筛选出降解率高的菌种和自筛菌种 B38 进行菌种复配, 并采用了单因素实验和正交实验, 研究不同菌种复配方案以及发酵工艺参数对菜籽粕中硫甙降解率的影响, 并于最优发酵工艺条件下构建动力学模型, 以期为实现菜籽粕资源的高效利用提供理论支持和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菜籽粕(含水量 13.42%, 硫甙含量 28.51 $\mu\text{mol}/\text{g}$, 过 60 目筛网, 华杂四号, 武汉集思仪器设备有限公司); 植物乳杆菌 LP (CICC21825)、枯草芽孢杆菌 BS (CICC20445)、粘红酵母菌 RG (CICC32765)、蜡样芽孢杆菌 BC (CICC63301) (中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

酵母膏(固性物 $\geq 70\%$, 氮含量 $\geq 7.2\%$)、胰蛋白胨、氯化钠(纯度 99%)、琼脂粉、牛肉膏(固性物 $\geq 75\%$, 总氮 $\geq 13\%$)、吐温 80(北京索莱宝科技有限公司); K_2HPO_4 (纯度 99%, 南京化学试剂股份有限公司); 葡萄糖(纯度 99%)、乙酸钠、硫酸镁、硫酸锰、羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose-Na, CMC-Na)(分析纯)(天津市科密欧化学试剂有限公司); 柠檬酸二铵(分析纯, 江苏天华药业股份有限公司); 氯化钡(纯度 98%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

LB 液体培养基(酵母膏 0.5%、胰蛋白胨 1%、氯化钠 1%, pH 7.4)、LB 固体培养基(液体培养基基础上加入琼脂粉 1.5%~2.0%)、MRS 液体培养基(蛋白胨 10 g、酵母膏 4 g、

牛肉膏 5 g、葡萄糖 20 g、K₂HPO₄ 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸二铵 2 g、硫酸镁(七水)0.2 g、一水硫酸锰 0.05 g、吐温 80 1 g、pH 6.2)、MRS 固体培养基(MRS 液体培养基基础上加入固体琼脂 18 g)(实验室配制)。

1.2 仪器与设备

GZX-9070MBE 电热鼓风干燥机(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); L5S 紫外-可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); LDZM-80KCS 立式压力蒸汽灭菌器(上海中安医疗器械厂); SHP-150E 生化培养箱(上海培因实验仪器有限公司); SHZ-82A 星气浴恒温振荡器(太仓市华美生化仪器厂); SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司); XH-C 旋涡混合器(常州繁华设器制造有限公司); BCD-215KALM 电冰箱(青岛海尔股份有限公司); AE11003 电子分析天平(精度 0.0001 g, 长沙湘仪天平仪器设备有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 菌株鉴定

将菌株 B38 送至武汉天一辉远生物科技有限公司测序, 对测序结果进行分子鉴定, 拼接序列在 NCBI 核酸数据库中进行 Blast 比对, 查找同源相似性较高的序列。

1.3.2 筛选菌种发酵条件

单菌株(BS20445、LP21825、RG32765 和 BC63301)和 B38、装载量 10 g/250 mL、料液比为 1:1.5 (g:mL)、接种量为 10%、发酵时间为 36 h、发酵培养箱温度为 37℃, 每 12 h 进行一次翻料, 发酵结束后放置于 55℃的烘箱, 烘干时间为 12 h。

1.3.3 硫甙含量测定

氯化钡法: 准确称取发酵后的菜籽粕 0.1 g(精确到 0.0001 g), 加入到 10 mL 的试管中, 然后加入 10 mL 85℃的蒸馏水使微生物和酶失活。涡旋 30 s 后静置 15 min, 待溶液的温度冷却至室温并过滤。取滤液 0.5 mL 置于 10 mL 试管中, 加入 2 mL 0.1% CMC-Na 和 1 mL 8 mmol/L PbCl₂, 利用涡旋混匀, 将混合后的溶液放置于 24℃培养箱里, 显色反应 2 h。以 PbCl₂ 和 CMC-Na 作参比, 在 540 nm 波长下测定吸光度值, 代入公式(1)~(2)计算硫甙含量及硫甙降解率^[11]。

硫甙含量=185.2×OD₅₄₀+0.2 (1)

硫甙降解率/%=
$$\frac{\text{原液硫甙含量} - \text{实验后硫甙含量}}{\text{原液硫甙含量}} \times 100\%$$
 (2)

1.3.4 高效硫甙降解单菌株筛选

单菌株的筛选: 选用 4 种较为理想的商业菌株(BS20445、LP21825、RG32765 和 BC63301)和 B38 分别进行单菌发酵, 选取硫甙降解率较高的菌株。

1.3.5 复合菌株筛选

采用 BS20445+B38、B20445+LP21825、LP21825+B38 和 BS20445+LP21825+B38 4 种复配方案以等比例混菌发

酵, 测定硫甙降解率。选取降解率最高的复合菌株作为后续实验的研究对象, 进行单因素实验和正交实验。

1.3.6 菜粕发酵单因素实验研究

在料液比[1:0.5、1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0 (g:mL)]、发酵时间(36、48、60、72、84、96 h)、接种量(5%、10%、15%、20%、25%、30%)、初始 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、装载量(10、20、30、40、50、60 g/250 mL)下分别进行实验。

1.3.7 优化设计

在单因素实验的条件下, 确定主要效应因素为料液比、接种量和发酵时间, 其他次要因素皆为最适值, 如: pH 7.4, 装载量 10 g, 故在最优条件下, 实验因子水平及编码设计见表 1。

表 1 实验因子水平及编码设计

Table 1 Experimental factor level and coding design					
变量	水平				
A 接种量/%	5	10	15	20	25
B 发酵时间/h	36	48	60	72	84
C 料液比(g:mL)	1:0.6	1:0.9	1:1.2	1:1.5	1:1.8

以硫甙降解率为考察指标, L₉(3⁴)正交实验表见表 2。

表 2 正交实验表

Table 2 Table of orthogonal experiments			
水平	A 接种量/%	B 发酵时间/h	C 料液比(g:mL)
1	10	48	1:1.2
2	15	60	1:1.5
3	20	72	1:1.8

1.3.8 菜粕发酵粗蛋白测定研究

按照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》测定蛋白质的含量。

1.3.9 菜粕发酵 pH 和酸度测定

取发酵前和发酵后样品各 10 g, 加蒸馏水 90 mL, 于摇床上 100 r/min 振荡 30 min, 测其 pH。混合液过滤, 取 10 mL 滤液, 加入 2 滴酚酞指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH 标准液滴定至微红色, 30 s 不褪色即为终点, 记录消耗的 NaOH 体积, 通过公式(3)测定酸度:

酸度/%=(C×V×K)/M×100% (3)

式中, C: 标准 NaOH 溶液的浓度, mol/L; V: 滴定待测样消耗 NaOH 标准溶液的体积, mL; K: 换算系数, 即 1 mmol 氢氧化钠相当于酸的质量, g; M: 样品质量, g。

1.3.10 菜粕发酵菌落总数测定研究

稀释平板法: 无菌条件下, 取 1 mL 不同浓度稀释液注入培养皿, 倒入 45℃的 LB 固体培养基中, 混匀, 冷却后倒置于 37℃恒温培养箱培养 48 h, 计菌落数^[12]。

1.3.11 发酵动力学模型研究

在正交实验的优化方案条件下，以料液比 1:1.5 (g:mL)、接种量 10%、发酵时间(0、6、12、18、24、30、36、42、48、60、72、84、96 h)下分别进行实验。

1.3.12 发酵动力学模型的建立

根据硫甙浓度的变化，选用 Logistic 曲线来描述复合菌的生长过程，其方程如公式(4):

$$X(t)=\frac{A_1-A_2}{1+(X/X_0)^p}+A_2 \tag{4}$$

式中, X(t)为菌数, lg(CFU/mL); A₁ 为菌体数量初始值, A₂ 为菌体数量最终值; p 代表幂值, X₀ 为中心值, 用于模拟混合菌在菜粕中生长情况。

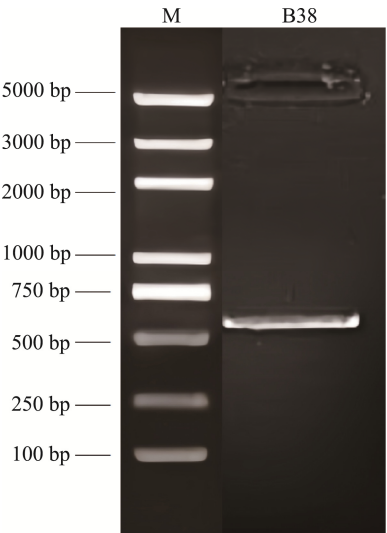
1.4 数据处理

采用 IBM SPSS 26 和 Origin 2021 统计软件进行数据分析, 所有指标的测定均重复 3 次, 组间均值比较用单因素方差分析, 结果用平均值±标准误差表示, 采用 Microsoft Excel 2010 进行数据处理和作图, P<0.05 被认为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 分子生物学鉴定结果

经聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 进行琼脂糖凝胶电泳检测(1%浓度), 16S 位点扩增电泳抽检胶图如图 1 所示, B38 显示出单一明亮且清晰的条带, 扩增产物的片段大小为 600 bp 左右, 选择电泳条带符合理论目的大小的良好 PCR 产物进行 Sanger 测序, 利用 Blast 将菌株的 16S PCR 的测序产物在 NCBI 上数据库中已知序列进行比对, 结果与短小芽孢杆菌基因(*Bacillus pumilus*)相似度为 100%, 说明菌株 B38 为短小芽孢杆菌。



注: M 为 Marker。

图 1 16S 位点扩增电泳抽检胶图

Fig.1 16S site amplification electrophoresis sampling gel map

2.2 高效硫甙降解菌株筛选

单菌株发酵结果见表 3。

表 3 单菌株发酵
Table 3 Single strain fermentation

分组	菌株	硫甙含量/(μmol/g)	硫甙降解/%
1	空白	28.51±0.029 ^a	—
2	BS20445	19.84±0.48 ^e	31.67±0.165 ^a
3	LP21825	20.38±0.29 ^d	29.78±1.02 ^b
4	B38	22.43±0.17 ^c	22.75±0.59 ^c
5	BC63301	23.24±0.19 ^b	19.96±0.66 ^d
6	RG32765	23.11±0.21 ^b	20.39±0.70 ^d

注: —表示无此项; 上标不同字母表示组间具有显著差异, P<0.05, 下同。

由表 3 可得, 在初始条件料液比 1:1.5 (g:mL)、接种量 10%和发酵时间为 36 h 的条件下, BS20445、LP21825 以及 B38 的硫甙降解能力较强, 这 3 株菌种用于后续菌种复配。

2.3 复合菌株筛选

复合菌株发酵结果见表 4。

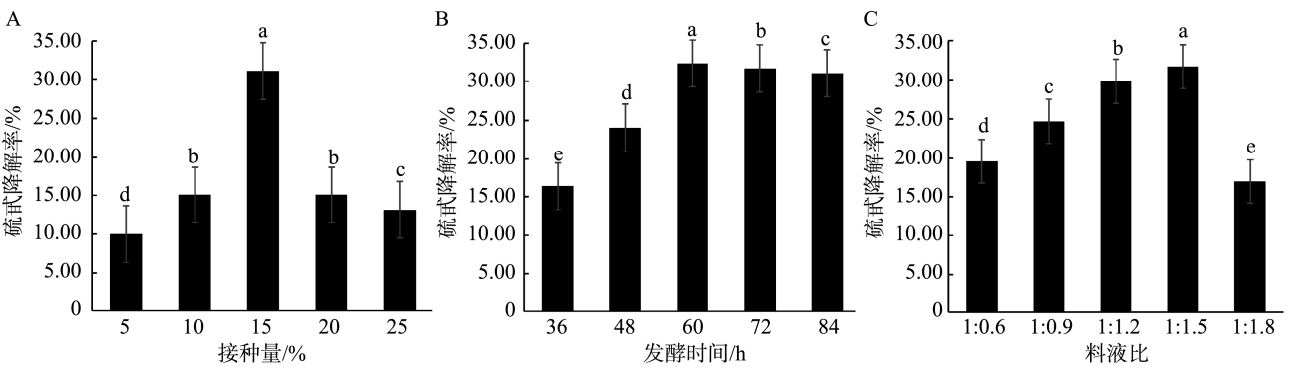
表 4 复合菌株发酵
Table 4 Composite strain fermentation

菌株	硫甙降解率/%
BS20445+B38	37.43±1.11 ^a
LP21825+B38	27.22±1.07 ^d
BS20445+LP21825	32.32±0.27 ^c
BS20445+LP21825+B38	35.51±0.49 ^b

由表 4 可知, 复合菌种组合中含有 BS20445 的发酵组合, 其硫甙的降解率都超过了 30%, 由此可见, BS20445 是用于菜籽粕中硫甙降解的优势菌株; 由 BS20445 和 B38 的所组成的复合菌种的硫甙降解能力最强, 降解率为 37.43%, 可作为后续发酵菌株组合。

2.4 单因素实验

发酵过程中不同单因素条件下对硫甙降解率的影响如图 2。接种量增加会增加菌种的数量, 提高降解反应的速率, 而接种量过高会引起菌种之间的竞争和抑制作用, 导致降解率下降, 由图 2A 确定固体发酵最适接种量为 15%时, 硫甙降解率为 31.05%; 随着发酵时间的增加, 菌种代谢活性增强, 降解率逐渐提高。当发酵时间过长时, 营养物质可能会逐渐耗尽, 导致菌种的生长和代谢活性受到限制, 从而降解率下降, 由图 2B 确定最适发酵时间为 60 h, 硫甙降解率为 32.32%; 料液比增大, 底物浓度也会增大,



注: 不同字母表示组间具有显著差异, $P<0.05$, 下同。

图 2 发酵过程中不同单因素条件对硫甙降解率的影响

Fig.2 Effect of different single-factor conditions on the degradation rate of thiolate during fermentation

降解反应可以更充分地进行, 当料液比过高时, 营养物质的供应可能不足, 限制了微生物的生长和降解活性, 从而降解率下降。由图 2C 确定最适料液比为 1:1.5 (g:mL) 时, 硫甙降解率为 31.69%。

2.5 正交实验

正交实验结果及分析见表 5。

表 5 正交实验结果及分析				
Table 5 Results and analysis of orthogonal experiments				
水平	A	B	C	硫甙降解率/%
1	1	1	1	52.74
2	1	2	2	50.19
3	1	3	3	39.98
4	2	1	2	61.67
5	2	2	3	34.24
6	2	3	1	22.12
7	3	1	3	34.88
8	3	2	1	48.27
9	3	3	2	42.53
K_1	142.9	149.3	123.1	
K_2	118.0	132.7	154.4	
K_3	125.7	104.6	109.1	
k_1	47.64	49.76	41.04	
k_2	39.34	44.23	51.46	
k_3	41.89	34.88	36.36	
极差 R	24.9	44.7	45.3	
优方案	A_1	B_1	C_2	

从表 5 的极差 R 分析可得, $R_C>R_B>R_A$, 因此可以说明料液比对硫甙的降解率影响最大, 其次为时间, 影响最小的为接种量, 最佳工艺条件为 $A_1B_1C_2$, 即最佳条件应该为接种量 10%、时间为 48 h、料液比为 1:1.5 (g:mL), 此时硫甙降解率为 55.68%。而正交实验预测值为 54.74%, 实际值和预测值相差不大, 说明预测模型具有较好的准确性和预

测能力, 同时也反映了实验设计的可靠性。

以方案 $A_1B_1C_2$ 再次进行实验, 分别在 0、6、12、18、24、30、36、42、48、60、72、84、96 h 测硫甙的降解率。硫甙降解率随时间变化的趋势图如图 3 所示。

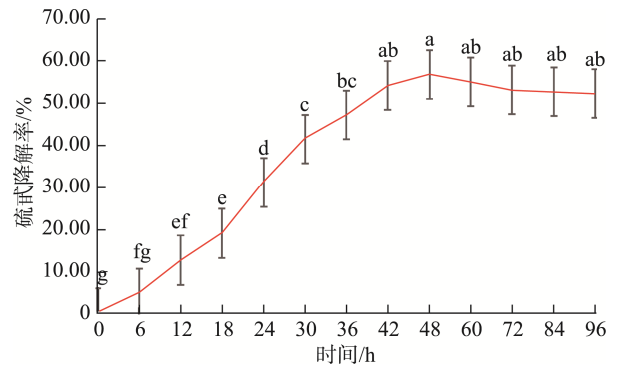


图 3 硫甙降解率随时间变化的趋势图

Fig.3 Trend plot of the degradation rate over time

如图 3 可知, 在初始条件料液比 1:1.5 (g:mL)、接种量 10%、发酵时间 0~48 h 的条件下, 发酵至 24 h 时, 降解率为 30.98%, 此后随着发酵时间延长, 硫甙降解率均有不同程度增加, 36 h 和 48 h 分别为 47.11% 和 56.66%, 在 48 h 时, 硫甙的降解率达到最大。经验证两次实验, 确认 $A_1B_1C_2$ 为最优方案。

2.6 发酵对菜粕质量指标的影响

菜粕发酵过程中的质量指标见表 6。由表 6 可知, 菜籽粕经复合菌发酵后, 粗蛋白质含量从 38.74% 上升至 40.70% 和 41.35%, 分别增加了 1.96% 和 2.61%, 增加趋势符合硫甙降解率的增长趋势, 粗蛋白质含量的增加表明发酵后的菜粕蛋白质营养价值也会升高。在发酵前期(0~48 h), pH 从 7.57 下降至 5.42, 酸度从 0.90% 增加至 1.30%, 此后 pH 持续下降, 而酸度持续升高, 但变化较平缓, 发酵至 96 h 时, pH 和酸度分别达到 5.34 和 2.69%, 说明适当的 pH 有利于

菌种的生长和代谢活性, 酸度的增加能促使硫甙分解, 提高发酵菜粕的保鲜性。菌落总数的增长情况与硫甙降解率的增长相似, 在前 48 h 内随着发酵时间的延长, 菌落总数有不同幅度的增加并达到最大值。

表 6 质量指标
Table 6 Qualitative index

发酵时间 /h	pH	酸度/%	粗蛋白质/%	菌落总数 /(CFU/mL)
0	7.57±0.19 ^a	0.90±0.67 ^c	38.74±0.67 ^b	4.10×10 ⁶ ±0.24 ^a
48	5.42±0.22 ^b	1.30±0.58 ^b	40.70±0.47 ^a	2.54×10 ⁷ ±0.16 ^b
96	5.34±0.31 ^b	2.69±0.62 ^a	41.35±0.25 ^a	1.72×10 ⁷ ±0.31 ^c

2.7 硫甙降解动力学模型

经过 Origin 2021 非线性拟合, Logistic 模型拟合硫甙降解率随时间的变化如图 4 所示。

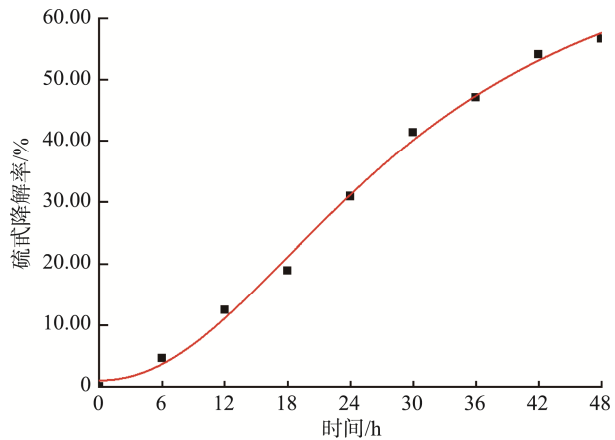


图 4 Logistic 模型拟合硫甙降解率随时间的变化
Fig.4 Logistic model fit to the change of thioside degradation rate over time

根据硫甙浓度变化实验数据及动力学模型, 求得硫甙降解动力学方程见表 7。

表 7 硫甙降解动力学方程
Table 7 Kinetic equation of thioside degradation

绘图	硫甙降解率
模型	Logistic
方程	$X(t)=\frac{A_1-A_2}{1+(X/X_0)^p}+A_2$
参数	$A_1=1.02217$
	$A_2=78.44493$
	$p=2.09092$
	$R^2=0.994$
动力学方程	$X(t)=\frac{-77.42276}{1+(X/29.73722)^{2.09092}}+78.44493$

硫甙作为复合菌发酵过程中的消耗产物, 菌体浓度和降解速率都有关系。由图 4 可知在 0~48 h 的发酵时间范围内实验数据与模型计算曲线趋势基本能够拟合, R^2 大于 0.99, 所选模型能够描述发酵过程硫甙降解的变化。接种复合菌菌株 12 h 后, 菌株数量大幅度增长, 复合菌能在菜粕中较好生长, 其生长符合 Logistic 模型; 计算值与实验值拟合良好, 证明模型在描述硫甙降解过程具有较高的可靠性和预测能力, 并且模型可以用来预测不同时间点的硫甙降解程度^[13]。表明应用 Logistic 方程描述复合菌在菜籽粕中降解硫甙的情况可行且较为简便。

3 讨论

3.1 菌株发酵对菜籽粕硫甙降解率的影响

3.1.1 单菌发酵实验对菜籽粕硫甙降解率的影响

本研究表明, 枯草芽孢杆菌对于菜籽粕固体发酵效果明显优于其他单菌, 其硫甙的降解率达到 31.67%, 这和李娜莉等^[14]菜籽粕固态发酵及其理化性质的研究结果相似, 其硫甙降解率 33.98%。菜籽粕经过植物乳杆菌、蜡状芽孢杆菌处理后其抗营养因子含量均得到大幅度降低, 其中植物乳杆菌的降解率高于蜡状芽孢杆菌, 在改善菜籽粕营养品质方面植物乳杆菌效果优于蜡状芽孢杆菌, 这与邱良伟等^[15]的研究报道一致。

3.1.2 混菌发酵实验对菜籽粕硫甙降解率的影响

根据先前的研究表明, 复合菌种的硫甙降解率显著高于单菌发酵的硫甙降解率^[16]。本研究发现, BS20445 结合 LP21825 硫甙的降解率达到最高为 32.32%, 这一结果与前人的研究不一致, 胡永娜等^[17]利用枯草芽孢杆菌和植物乳杆菌混菌组合发酵菜籽粕, 菜籽粕硫甙降解率达到了 56.44%, 其原因可能是接种量的不同以及固体发酵时条件不同而导致的。BS20445 和 B38 进行复配的降解率达到了 56.66%, 通过混合复配, 两者之间可能存在协同作用, 相互促进生长和代谢, 增强降解能力, 这与王俊贤^[18]利用枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌在研究控制桃果采后病害方面的协同效应一致, 两种细菌复配处理可以显著减轻桃果的病害发生率^[19], 并且对果实的贮藏期延长和保持果实品质有积极影响。

3.2 硫甙降解率变化分析

硫甙的降解率随料液比出现先上升后下降的趋势, 这与肖萌^[20]利用益生菌混合发酵菜籽粕及其营养特性的研究的结果现象一致, 推断其原因可能与微生物的新陈代谢以及发酵基底的通透性有关, 微生物并没有自己所特有的消化器官以及排泄器官, 营养物质和代谢产物溶于水后才能被微生物以主动运输的方式通过细胞膜。水对微生物的生命活动是必不可少的, 其直接参与了微

生物的许多代谢反应并维持了微生物体内的酸碱平衡, 料液比高的时候, 发酵基底透气性差, 流质状态不理想以及杂菌爆发, 微生物生长受到阻碍^[21-22]; 料液比低的时候, 发酵基底容易结块, 微生物缺乏生存条件且代谢受到阻碍。

硫甙的降解率随发酵时间出现先上升后下降的趋势, 这与孙林^[23]利用微生物固态发酵菜籽粕的研究的结果现象一致, 推断其原因可能与微生物的生长周期有关, 在 60 h 之前, 微生物处于生长对数期, 代谢能力强, 对于物质的需求大, 所以菜籽粕中硫甙的含量大幅度减小, 从而导致硫甙的降解效率大幅度增加, 而 72 h 之后硫甙的降解效率减小, 可能是微生物产生了与硫甙类似的次级代谢产物, 或者是发酵基底其他微生物的代谢产物导致分解的硫甙又重新被合成^[24-25]。

硫甙的降解率随接种量出现先上升后下降的趋势, 推断其主要原因可能是随着接种量的增加, 菌种的总体代谢强度有所增加, 所以硫甙的降解率增加, 但是当菌群的密度达到一定的强度之后, 因为营养物质的量是固定的以及发酵培养基的空间限制, 菌群之间就会产生竞争, 菌体裂解速度加快, 从而导致发酵效果下降^[26]。菜籽粕发酵过程中微生物产生的丰富酶系对菜籽粕进行预消化, 降低抗营养因子含量, 提高蛋白质的含量与质量, 并显著提高酸度含量, 改善适口性与风味, 使其能够更好地被动物消化吸收与利用^[27]。

3.3 动力学模型特征分析

通过对复合菌正常发酵菜籽粕发酵特征的分析, 以及构建 Logistic 方程, 建立了描述发酵过程中菌体生长、硫甙含量变化的动力学模型, 经模型验证实验情况良好^[28]。随着时间的增加, 硫甙的降解率逐渐升高, 可以证明模型在描述硫甙降解过程中的变化趋势上是准确的, 并且可以用来预测随着时间的推移硫甙降解程度的增加情况^[29]。微生物混菌固态发酵对菜籽粕营养价值的改善是各菌株协同发酵的结果^[30]。

菜籽粕经微生物发酵后, 粗蛋白质含量得到了提高, 菜籽粕总酸含量显著增加, 这是因为在枯草芽孢杆菌生长代谢过程中消耗蛋白质和脂肪等营养物质的同时产生了大量的乳酸和不饱和脂肪酸类物质^[31]。此外, 酸香味可以缓解动物因环境变化、饲料原料改变等应激产生的采食量下降, 同时刺激动物的嗅觉器官, 进而促进采食量, 调节饲料适口性。但微生物发酵过程中影响因素的多变性, 使所得发酵动力学模型在实际生产中可能无法完全反映微生物发酵过程的复杂性和变异性^[32-33]。因此, 在今后实际应用中需要对实际发酵过程进行多次优化以及对所建模型进行修正和补充, 使模型更好更准确地对实际发酵过程进行预

测和控制。本研究提出了复杂体系发酵底物中的某种成分消耗动力学模型研究方法, 并通过发酵中与该成分相关的代谢指标来推出该成分在发酵中的消耗情况^[34], 对以后复杂发酵底物的某种成分消耗动力学的研究、发酵过程的工艺控制具有重要的参考价值^[35]。

4 结 论

本研究通过单菌和复合菌发酵, 以硫甙的降解率为指标, 得出了 BS20445 与自筛菌株 B38 等比例时为优势组合, 最优发酵条件下(接种量为 10%、时间为 48 h 和料液比为 1:1.5)硫甙的降解率为 56.66%, 取得了比较理想的效果。混菌发酵菜籽粕能够提高菜粕中粗蛋白质含量、降低 pH、增加酸度, 同时菜粕硫甙降解率与混合菌数呈正相关, 构建 Logistic 方程显示硫甙生物降解模型拟合良好。上述结果说明, 混菌发酵使硫甙降解率达到最高, 且采用混菌发酵可以更有效地降低菜籽粕中的抗营养因子含量, 该结果符合实际, 从单菌发酵和复合菌发酵来看, 复合菌发酵之间具有协同作用, 发酵效果更加明显。

参考文献

- [1] 魏瑞芝, 刘广志, 王乐涛, 等. 菜籽粕中的抗营养因子及应用研究进展[J]. 中国饲料, 2023, (7): 17-26.
- [2] WEI RZ, LIU GZ, WANG LT, *et al.* Progress on anti-nutritional factors and application in rapeseed meal [J]. China Feed, 2023, (7): 17-26.
- [3] 张寒, 郑竟成, 罗质, 等. 微生物发酵对菜籽粕营养特性改良的研究进展[J/OL]. 中国油脂: 1-14. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230294>
- [4] ZHANG H, ZHENG JC, LUO Z, *et al.* Improvement of rapeseed meal by microbial fermentation [J/OL]. China Oils Fats: 1-14. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230294>
- [5] SIKORSKA-ZIMNY K, BENEDUCE L. The glucosinolates and their bioactive derivatives in Brassica: A review on classification, biosynthesis and content in plant tissues, fate during and after processing, effect on the human organism and interaction with the gut microbiota [J]. Crit Rev Food Sci, 2021, 61(15): 2544-2571.
- [6] YADAV S, TENG PY, CHOI J, *et al.* Influence of rapeseed, canola meal and glucosinolate metabolite (AITC) as potential antimicrobials: Effects on growth performance, and gut health in *Salmonella typhimurium* challenged broiler chickens [J]. Poultry Sci, 2022, 101(1): 101551.
- [7] CHONG X, WANMEI L, RONGGUANG G, *et al.* Determination of glucosinolates in rapeseed meal and their degradation by myrosinase from rapeseed sprouts [J]. Food Chem, 2022, 382: 132316.
- [8] ZHANG Z, WEN M, CHANG Y. Degradation of glucosinolates in rapeseed meal by *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis* [J]. Grain

- Oil Sci Technol, 2020, 3(2): 70–76.
- [7] 孙林, 刘平, 曾作财, 等. 菜籽粕中抗营养因子去除方法的研究进展[J]. 养猪, 2018, (5): 13–16.
- SUN L, LIU P, ZENG ZC, *et al.* Progress in anti-nutrient factor removal methods in rapeseed meal [J]. Swine Prod, 2018, (5): 13–16.
- [8] 李军训. 微生物固态发酵植物饼粕的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- LI JX. Research on microbial solid-state fermented plant cake meal [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014.
- [9] 兰时乐, 毛小伟, 肖调义, 等. 菜籽粕混合菌固体发酵脱毒条件的响应面优化研究[J]. 动物营养学报, 2013, 25(3): 617–627.
- LAN SL, MAO XW, XIAO TY, *et al.* Optimization of response surface for solid fermentation of rapeseed meal mixed bacteria [J]. Chin J Anim Nutr, 2013, 25(3): 617–627.
- [10] WEI H, HAINING X, JIAYIN P, *et al.* Mixed-strain fermentation conditions screening of polypeptides from rapeseed meal and the microbial diversity analysis by high-throughput sequencing [J]. Foods, 2022, 11(20): 3285.
- [11] 王晓凡, 王海滨, 熊光权, 等. 多菌种复合固态发酵对菜籽粕疏武去除效果的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(3): 196–200.
- WANG XF, WANG HB, XIONG GQ, *et al.* Study on the removal effect of compound solid fermentation [J]. Food Sci Technol, 2012, 37(3): 196–200.
- [12] 史兰. 菜籽粕中有效成分的提取分离工艺研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
- SHI L. Study on the extraction and separation process of the active components in rapeseed meal [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2014.
- [13] MIHAELA V, MIUȚA F, IONELIA T, *et al.* The yeast fermentation effect on content of bioactive, nutritional and anti-nutritional factors in rapeseed meal [J]. Foods, 2022, 11(19): 2972.
- [14] 李莉娜, 张林鑫, 张凯凯, 等. 菜籽粕固体发酵及其理化性质的研究[J]. 饲料工业, 2019, 40(13): 43–48.
- LI LN, ZHANG LX, ZHANG KK, *et al.* Study on the solid fermentation of rapeseed meal and its physicochemical properties [J]. Feed Ind, 2019, 40(13): 43–48.
- [15] 邱良伟, 顾拥建, 沙文锋, 等. 复合微生态固态发酵菜籽粕的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(3): 209–211.
- QIU LW, GU YJ, SHA WF, *et al.* Compound microecological solid-state fermented rapeseed meal [J]. J Anhui Agric Sci, 2015, 43(3): 209–211.
- [16] CHENG L, KOEN V. Pretreatment of rapeseed meal increases its recalcitrant fiber fermentation and alters the microbial community in an *in vitro* model of swine large intestine [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 588264.
- [17] 胡永娜, 李爱科, 王之盛, 等. 微生物固态发酵菜籽粕营养特性的研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(3): 76–80.
- HU YN, LI AIK, WANG ZS, *et al.* Nutritional characteristics of microbial solid-state fermented canola meal [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 2012, 27(3): 76–80.
- [18] 王俊贤. 酶解鸡浆和大豆浓缩蛋白在珍珠龙胆石斑鱼饲料中的应用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.
- WANG JX. Application of enzymatic digestion of chicken pulp and soy concentrate protein in pearl gentian grouper diet [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020.
- [19] 刘淑娇, 张东旭, 李凤, 等. 微生物发酵菜籽粕在动物生产中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(24): 151–154.
- LIU SJ, ZHANG DX, LI F, *et al.* Progress in the application of rapeseed meal in animal production [J]. Feed Res, 2022, 45(24): 151–154.
- [20] 肖萌. 益生菌混合发酵菜籽粕及其营养特性的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- XIAO M. Study on the nutritional characteristics of rapeseed meal with probiotics [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014.
- [21] 吴正可. 多菌种固态发酵菜籽粕的工艺优化及其对肉鸡的饲用价值评定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- WU ZK. Process optimization of multiple bacterial solid-state fermentation of rapeseed meal and its feeding value evaluation for broiler chickens [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [22] 刘敏佳. 菜籽粕的抗营养因子及其脱毒研究的进展[J]. 饲料与畜牧, 2016, (9): 45–47.
- LIU MJ. Progress in the anti-nutritional factors and detoxification of rapeseed meal [J]. Feed Anim Husbandry, 2016, (9): 45–47.
- [23] 孙林. 微生物固态发酵菜籽粕的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- SUN L. Microbial solid-state fermentation of rapeseed meal [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2008.
- [24] SOUSA D, SALGADO JM, CAMBRALÓPEZ M, *et al.* Degradation of lignocellulosic matrix of oilseed cakes by solid state fermentation: Fungi screening for enzymes production and antioxidants release [J]. J Sci Food Age, 2021, 102(4): 1550–1560.
- [25] BORATYŃSKI F, SZCZEPAŃSKA E, GRUDNIEWSKA A, *et al.* Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10157.
- [26] BORATYŃSKI F, SZCZEPAŃSKA E, GRUDNIEWSKA A, *et al.* A novel approach for microbial synthesis of enantiomerically pure whisky lactones based on solid-state fermentation [J]. Molecules, 2018, 23(3): 659.
- [27] TEPE O, DURSUN AY. Endo-pectinase production by *Bacillus pumilus* NRRL B-212 and optimization by RSM using sugar beet pulp [J]. Chem

- Biochem Eng Quart, 2021, 35(4): 439–453.
- [28] 蔡国林, 王刚, 陆健. 硫甙降解菌的筛选及其在菜籽粕饲用品质改善的应用[J]. 饲料与畜牧, 2012, (3): 15–18.
- CAI GL, WANG G, LU J. Screening of thioside-degrading bacteria and its application in feeding quality improvement of rapeseed meal [J]. Feed Anim Husb, 2012, (3): 15–18.
- [29] 毛小伟. 菜粕发酵菌株的优化及固体发酵工艺的初步研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- MAO XW. Optimization of rapeseed meal fermentation strains and preliminary study of solid fermentation process [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012.
- [30] 温拥军, 游玫娟. 混菌固态发酵菜籽粕生产饲用复合酶培养基优化[J]. 轻工科技, 2019, 26(1): 83–87.
- WEN YJ, YOU MJ. Optimization of mixed solid fermentation of rapeseed meal [J]. Light Ind Sci Technol, 2019, 26(1): 83–87.
- [31] 刘永萍. 固态发酵及微生物降解硫苷的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2012.
- LIU YP. Research on solid-state fermentation and microbial degradation of thiosides [D]. Guangdong: Jinan University, 2012.
- [32] TAHERI M, DASTAR B, ASHAYERIZADEH O, *et al.* The effect of fermented rapeseed meal on production performance, egg quality and hatchability in broiler breeders after peak production [J]. Brit Poultry Sci, 2023, 64(2): 259–267.
- [33] 许欣, 刘洋洋, 葛向阳, 等. 蛋白质发酵饲料研究进展[J]. 饲料工业, 2020, 41(20): 16–25.
- XU X, LIU YY, GE XY, *et al.* Progress in protein-fermented feed [J]. Feed Ind, 2020, 41(20): 16–25.
- [34] 顾斌, 马海乐, 刘斌. 菜籽粕混菌固态发酵制备多肽饲料的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(1): 83–87.
- GU B, MA HL, LIU B. Study on preparation of peptide feed by solid state fermentation of rapeseed meal [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 2011, 26(1): 83–87.
- [35] XING Z, JIANG H, HE R, *et al.* Rapid detection model of *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation of rapeseed meal [J]. J Food Saf, 2020, 40(2): e12754.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



闫丹丹, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物油脂纳米乳液。

E-mail: dan15530718367@163.com



钟 武, 博士, 讲师, 主要研究方向为微生物油脂制备及高值化利用研究。

E-mail: zhongwu@whpu.edu.cn