



假丝酵母 ZD-3 固体发酵对棉子饼脱毒的效果研究

张文举^{1,2}, 许梓荣¹, 孙建义¹, 杨霞¹, 赵顺红², 晏向华¹, 王彦波¹

(1. 浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029;

2. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要:利用热带假丝酵母 ZD-3 对不同因子处理的棉子饼底物进行生物固体发酵, 然后测定发酵底物中游离棉酚(FG)、蛋白质(CP)含量等指标。结果表明:棉子饼底物中加入不同的糖源, 可显著提高脱毒效率, 其中淀粉效果最好, 脱毒率高达 91.91%; 加热处理可极显著降低 FG 含量, 有利于棉子饼底物的发酵脱毒; 但底物中添加尿素, 可降低棉子饼发酵脱毒率, 不利于热带假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒; 底物中添加硫酸亚铁, 可显著提高假丝酵母 ZD-3 对棉子饼的发酵脱毒率, 脱毒率达 94.70%。

关键词:热带假丝酵母 ZD-3; 棉酚; 固体发酵; 棉子饼; 脱毒

中图分类号:S562 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2006)05-0259-05

Effect of Solid Substrate Fermentation of *C. tropicalis* ZD-3 on Detoxification of Cottonseed Meal

ZHANG Wen-ju^{1,2}, XU Zi-rong¹, SUN Jian-yi¹, YANG Xia¹, ZHAO Shun-hong², YAN Xiang-hua¹, WANG Yan-bo¹

(1. The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029; 2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: The objectives were to study effects of carbohydrate sources, urea, heat treatment and ferrous sulfate on reduction of gossypol content during solid substrate fermentation of cottonseed meal (CSM). CSM substrate was treated with carbohydrate sources (including glucose, sucrose, maltose and starch), urea and ferrous sulfate, respectively. Then the mixtures were moistened, (substrate : water was 1 : 0.9), and autoclaved at 112.6°C for 20 min. The treated substrate, 100 g in each 500 mL conical flask, was inoculated with 5 mL of *C. tropicalis* ZD-3, and incubated at 30°C for 48 h in a 95% relative humidity chamber. After fermentation was complete, assayed the free gossypol (FG), crude protein (CP) content in CSM substrate. The results showed that CSM substrate supplemented with selected carbohydrate sources was beneficial to fermentation detoxification, of which starch was most effective, the detoxification efficiency up to 91.91%; Heat treatment remarkably reduced gossypol levels during solid substrate fermentation of CSM, but CSM substrate supplemented with urea could decrease detoxification rate of FG, and was not beneficial to CSM fermentation; Adding ferrous sulfate to CSM substrate could increase detoxification rate of FG significantly, *C. tropicalis* ZD-3 detoxification efficiency reached up to 94.70%.

Key words: *C. tropicalis* ZD-3; gossypol; solid substrate fermentation; cottonseed meal; detoxification

收稿日期: 2005-12-08 作者简介: 张文举(1966—), 男, 副教授, 博士, zhang-wj1022@tom.com

基金项目: 国家自然科学基金(30471255)

棉子饼粕富含蛋白质,是很好的动物饲料蛋白资源。但因含有对动物有毒的游离棉酚,其利用价值和使用量受到极大限制^[1-4]。为此,国内外有关研究人员对棉子饼粕的脱毒方法及途径进行了广泛而深入的研究,取得了许多研究成果,如物理法^[5-7]、化学法^[8-10]以及微生物发酵法^[11-16]等。其中微生物发酵法是20世纪80年代后期在中国首先发展起来的一种棉子饼粕脱毒途径^[11, 12],该法不但能脱除棉子饼粕中的棉酚,而且还可以提高棉子饼粕的蛋白质含量,发酵底物中存留许多酶类、维生素、氨基酸以及一些促生长因子,因而受到了广泛重视。但是脱毒效率不理想,研究内容仅局限在菌种的选育、发酵参数研究以及发酵后棉子饼粕营养成分含量的测定等方面,缺乏发酵辅料的作用效果研究。本研究主要利用浙江大学选育的对棉酚具有较强降解力的热带假丝酵母 ZD-3 对棉子饼粕进行固体发酵,然后通过测定发酵底物中游离棉酚(FG)、蛋白质(CP)含量等方法,研究糖源、尿素以及硫酸亚铁处理等因素对棉子饼生物发酵脱毒效果的影响。

1 材料和方法

1.1 试验材料

棉子饼:新疆石河子产,粉碎,过筛径 0.25 mm 网筛。其干物质(DM)中 CP 含量 33.53%,游离棉酚 784 mg·kg⁻¹。

棉子饼底物(基础底物):将上述棉子饼与玉米粉、麦麸按 7:2:1 的比例混合均匀,构成发酵用基础底物。发酵时再按底物与水为 1:0.9 的比例加入水分,0.056 MPa, 112.6℃蒸汽灭菌

20 min。

菌株:热带假丝酵母 ZD-3 由浙江大学饲料科学研究所选育提供。

斜面培养基:麦芽汁糖度 5°Bè,琼脂 2.0%, 0.056 MPa, 112.6℃灭菌 20 min。

种子培养液:麦芽汁糖度 5°Bè, 0.056 MPa, 112.6℃灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 棉子饼底物固体发酵。将热带假丝酵母 ZD-3 接入麦芽汁斜面培养基, 30℃培养 72 h,挑取一环菌苔接入 5 mL 麦芽汁,在试管中 30℃, 150 r·min⁻¹摇动培养 24 h(一级菌种),取 1.0 mL 一级菌种接入 20 mL 麦芽汁,在 100 mL 三角瓶中 30℃, 150 r·min⁻¹摇动培养 20 h(二级菌种),再取 5 mL 二级菌种接入 100 g 棉子饼底物中,在 500 mL 三角瓶中 30℃恒温静置培养 48 h,设 3 个重复。

1.2.2 分析测定。游离棉酚的测定:按国标 GB13086-91“饲料中游离棉酚的测定方法”测定。

蛋白质测定:凯氏定氮法。

1.2.3 试验数据统计方法。应用 SAS 统计软件对试验数据进行方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同糖源对假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒的影响

棉子饼底物组成中 10%的麦麸分别被 10%的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉替换,构成试验组。对照组仍为 10%的麦麸,即基础底物。然后调湿、灭菌、接种发酵(表 1)。

表 1 不同糖源对棉酚脱毒的影响(以干物质计)

Table 1 The effect of different carbohydrate sources on the reduction of gossypol content (based on DM)

组别	FG 含量/(mg·kg ⁻¹)	脱毒率/%	CP 含量/%	CP 提高百分率/%
基础底物	549.06	-	23.79	-
发酵对照	75.19 a	86.31	25.65 b	7.82
葡萄糖组	67.52 b	87.70	25.27 b	6.22
蔗糖组	52.06 c	90.52	25.48 b	7.10
麦芽糖组	61.32 b	88.83	26.71 a	12.27
淀粉组	44.44 d	91.91	26.97 a	13.37
SEM	7.04	-	0.44	-

注:同列数据后标小写字母为 P≤0.05 时差异显著性检验,有相同字母者为差异不显著。下表同。SEM 为平均数标准误。

结果表明,棉子饼底物中加入不同的糖源,对生物发酵脱毒有显著影响,其中淀粉效果最好,脱

毒率高达 91.91%,残留 FG 含量只有 44.44 mg·kg⁻¹;其次为蔗糖、麦芽糖和葡萄糖,其脱毒率

分别为 90.52%、88.83% 和 87.70%。从发酵底物 CP 含量测定结果看,不同发酵处理的底物 CP 含量均显著高于基础底物含量;但是葡萄糖和蔗糖处理的底物 CP 含量与发酵对照底物 CP 含量差异不显著,而麦芽糖和淀粉处理的底物 CP 含量显著高于发酵对照,淀粉、麦芽糖以及发酵对照处理的底物 CP 含量分别为 26.97%、26.71% 和 25.65%;他们分别比基础底物提高 CP 含量 13.37%、12.27% 和 7.82%。综合 FG 含量和 CP 含量测定结果,可以看出底物中添加淀粉,发酵效果最好,不但棉酚脱毒率高,而且底物发酵彻底,CP 含量高。

2.2 尿素对棉子饼棉酚脱毒的影响

2.2.1 对棉子饼加热处理脱毒效果的影响。棉子饼底物 100 g,分别加入 0、1%、1.5%、2% 的尿素,混合均匀,然后按固液比 1:0.9 的比例,用蒸馏水调湿,0.056 MPa, 112.6℃ 蒸汽加热处理 20 min,随后在烘箱中 60℃ 烘干 24 h,粉碎制样,测定 FG 含量。每个处理 3 个重复(图 1)。

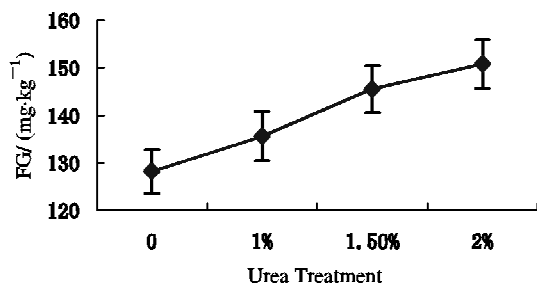


图 1 尿素对基础底物 FG 含量的影响

Fig. 1 Effect of urea on FG content in basal substrate

随着尿素添加量的增加,样品中 FG 含量提高,0、1%、1.5%、2% 尿素处理的样品残留 FG 含量分别为 128.28、135.68、145.56、150.84 mg·kg⁻¹ DM。但是各处理的 FG 含量都极显著小于棉子饼底物中的 FG 含量,脱毒率达 72.53%~76.64%。结果表明,加热处理可极显著降低 FG 含量,但添加尿素,会显著降低棉酚脱毒率。

2.2.2 对假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒的影响。棉子饼底物中加入 1.0% 的尿素,然后调湿、灭菌、接种发酵。试验和对照组各设 3 个重复(表 2)。

底物中加入 1.0% 的尿素,FG 发酵脱毒率显著降低,棉酚脱毒率从 86.18% 降低到 77.27%,FG 含量从对照组的 75.86 mg·kg⁻¹ 提高到 124.81 mg·kg⁻¹。底物中由于加入了含氮物尿素,因此发酵底物 CP 含量极显著提高,比发酵对照增加 CP 含量 9.22%,比基础底物增加 CP 18.50%。结果表明,底物中添加尿素,可降低棉子饼发酵脱毒率,不利于热带假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒,但可显著提高底物 CP 含量。

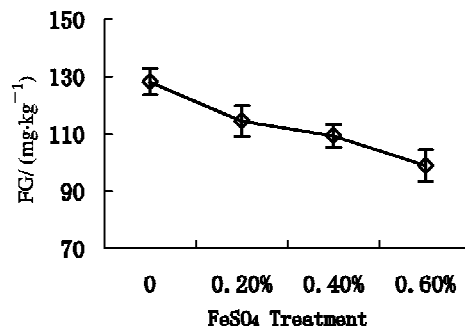


图 2 硫酸亚铁对基础底物 FG 含量的影响

Fig. 2 Effect of ferrous sulfate on FG content in basal substrate

表 2 尿素和硫酸亚铁对棉酚发酵脱毒的影响(以干物质计)

Table 2 The effect of urea and ferrous sulfate treatments on the reduction of gossypol content (based on DM)

组别	FG/(mg·kg ⁻¹)	脱毒率/%	CP/%	CP 提高百分率/%
基础底物	549.06 a	-	23.79 c	-
发酵对照	75.86 c	86.18	25.81 b	8.49
1.0% 尿素	124.81 b	77.27	28.19 a	18.50
0.5% 硫酸亚铁	29.08 d	94.70	26.31 b	10.59
SEM	138.25	-	1.04	-

2.3 硫酸亚铁对棉子饼棉酚脱毒的影响

2.3.1 对棉子饼加热处理脱毒效果的影响。棉子饼底物 100 g,分别加入 0、0.2%、0.4%、0.6% 的硫酸亚铁,混合均匀,随后的试验步骤和方法与尿素加热处理相同(图 2)。

随着样品硫酸亚铁添加量的增加,样品中 FG 含量显著降低,0、0.2%、0.4%、0.6% 硫酸亚铁处理的样品残留 FG 含量分别为 128.28、114.59、109.42、99.09 mg·kg⁻¹ DM。各个处理的 FG 含量极显著小于棉子饼底物中的 FG 含

量,脱毒率达76.64%~81.95%。结果表明,加热处理可极显著降低FG含量;添加硫酸亚铁,可显著提高棉酚脱毒率。

2.3.2 对假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒的影响。棉子饼基础底物中加入0.5%的硫酸亚铁,然后调湿、灭菌、接种发酵。试验和对照组各设3个重复(表2)。

底物中加入0.5%的硫酸亚铁,FG发酵脱毒率显著提高,棉酚脱毒率从86.18%提高到94.70%,FG含量从对照组的75.86 mg·kg⁻¹降低到29.08 mg·kg⁻¹。底物CP含量与发酵对照组相比,略有增加,但差异不显著。底物中添加硫酸亚铁,可显著提高棉子饼发酵脱毒率,有利于热带假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒。

3 结论与讨论

3.1 棉子饼生物发酵的脱毒效果

采用热带假丝酵母 ZD-3 对棉子饼底物进行单菌固体发酵,可极显著降低棉子饼底物游离棉酚含量,其结果与前人^[11-15]的研究结论是一致的,说明生物发酵是棉子饼粕脱毒的有效途径。其脱毒机理一般认为是一部分游离棉酚被转变为结合棉酚,另一部分被微生物所分泌的降解酶分解利用。

3.2 棉子饼生物发酵的蛋白质营养价值变化

发酵前后棉子饼底物中蛋白质含量的变化主要与微生物的生长繁殖有关。酵母菌利用棉子饼底物,合成自身所需的菌体蛋白和细胞骨架,向细胞外分泌一定量的多肽、酶蛋白等物质,同时也释放出能量和二氧化碳,消耗一定量的糖类物质,糖类物质比例降低,因而提高了粗蛋白的单位含量,发酵饲料的产品产率一般为90%左右^[16];另外向底物中接种的菌种本身含有一定量的蛋白质,因而也提高了发酵底物的CP含量。棉子饼生物发酵可提高CP含量,其与前人的研究结论^[11-15]是一致的。

3.3 糖源与假丝酵母 ZD-3 发酵脱毒的效果

棉子饼中含有较高的粗蛋白、中性洗涤纤维和粗脂肪,还含有不能被假丝酵母发酵的棉子三糖,因此可发酵糖类物质含量较少,影响发酵效果。研究表明在底物中分别添加一定量的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖或淀粉等可发酵糖源物质,均有

利于提高发酵脱毒效率,底物发酵彻底,而且有较好的甜香气味,其中淀粉的发酵效果最好。

3.4 尿素与棉子饼发酵脱毒效果

棉子饼粕中游离棉酚通常情况下呈相对稳定的双醛式,它与尿素等酰氨类化合物在一定温度和湿度下生成西佛碱类加成物,经干燥脱水后生成西佛碱,使游离态棉酚转变为结合态棉酚,达到脱毒的目的^[17]。但是本研究结果与上述结论不一致,发酵前后底物中添加不同比例的尿素,均不利于棉酚脱毒,且随着添加浓度的增加,脱毒效果降低,因此尿素的作用效果有待进一步探讨。

3.5 硫酸亚铁与棉子饼发酵脱毒效果

双醛式游离棉酚能与Fe²⁺反应生成变性的棉酚——铁络合物,使游离棉酚的活性羟基失去作用而达到脱毒的目的。此棉酚——铁络合物不能被吸收,最终排出体外,不会对动物体产生不良的负作用^[7-8]。本研究表明向底物中添加不同浓度的硫酸亚铁,可促进加热处理脱毒效果,并可进一步提高生物发酵脱毒效率。但是添加硫酸亚铁使发酵产品颜色变灰,影响饲料品质。

参考文献:

- [1] FRANCIS G, Makkar H P S, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish[J]. *Aquaculture*, 2001,199:197-227.
- [2] ROBINSON P H, Getachew G, De Peters E J, 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 and Technology*, 2001,91:149-156.
- [3] CANELLA M, Sodini G. Extraction of gossypol and oligosaccharides from oil seed meals[J]. *Journal of Food Science*, 1977,42:1218-1219.
- [4] WILLARD S T, Neuendorff D A, Lewis A W, et al. Effect of free gossypol in the diet of pregnant and postpartum Brahman cows on calf development and cow performance [J]. *Journal of Animal Science*, 1995,73: 496-507.
- [5] CHERRY J P, Gray S. Methylene chloride extraction of gossypol from cottonseed products[J]. *Journal of Food Science*, 1981,46:1726-1733.
- [6] RAHMA E H, Narasingo Rao M S. Gossypol re-

- removal and functional properties of protein produced by extraction of glanded cottonseed with different solvents[J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49:1057-1060.
- [7] BARRAZA M L, Coppock C E, Brooks K N, et al. Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3457-3467.
- [8] NAGALAKSHMI D, Sastry V R B, Agrawal D K. Detoxification of undecorticated cottonseed meal by various physical and chemical methods[J]. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 2002, 2: 2, 117-126.
- [9] NAGALAKSHMI D, Sastry V R B, Pawde A. Rumen fermentation patterns and nutrient digestion in lambs fed cottonseed meal supplemental diets [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, 103: 1-4.
- [10] TABATABAI F, Golian A, Salmoeini M. Determination and detoxification methods of cottonseed meal gossypol for broiler chicken rations[J]. *Agricultural Sciences and Technology*, 2002, 16 (1): 3-15.
- [11] 吴小月,陈金湘. 利用微生物降解棉仁饼粕中游离棉酚的研究[J]. *中国农业科学*, 1989, 22(2): 82-86.
- [12] 钟英长,吴玲娟,朱汝筋,等. 棉子饼的微生物脱毒法研究[J]. *饲料工业*, 1989, (8): 4-8.
- [13] 孙建义,许梓荣. 利用假丝酵母进行棉子饼脱毒的研究[J]. *中国粮油学报*, 1995, 10(1): 61-64.
- [14] 施安辉,张 勇,曲 品,等. 高效降解棉酚菌株的选育及脱毒条件的研究[J]. *微生物学报*, 1998, 38(4): 318-320.
- [15] 杨继良,周大云,杨伟华,等. 高效降解棉酚菌种的筛选及棉子饼脱毒参数的研究[J]. *棉花学报*, 2000, 12 (5): 225-229.
- [16] 孙建义,许梓荣. 利用假丝酵母进行棉仁饼固体发酵的培养基筛选[J]. *浙江农业大学学报*, 24(6): 663-666.
- [17] 张嗣炯. 棉子饼粕脱毒工艺的研究[J]. *中国粮油学报*, 1995, 10(4): 55-58. ●