

# 高效降解游离棉酚菌株的鉴定、安全性评价及发酵工艺研究

亓秀晔, 谢全喜, 于佳民, 赵倩, 张志焱, 徐海燕

(山东宝来利来生物工程股份有限公司, 山东泰安 271000)

**摘要:** 本实验利用芽孢杆菌发酵棉籽粕, 研究对棉粕中游离棉酚降解率的影响, 及对发酵前后饲料营养成分如活菌数、中性蛋白酶活和酸溶蛋白等的影响, 并对发酵效果较好的菌株进行菌株鉴定、安全性分析及发酵工艺探索。研究发现: 可高效降解棉籽粕中游离棉酚含量及改善营养品质的芽孢杆菌为 BLCC1-0039, 游离棉酚的测定方法确定为高效液相色谱法; 菌株形态观察和生理生化鉴定并结合其 16S rDNA 序列, 初步确定其为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 的体内安全性评价, 发现未对实验小鼠造成形态和活动异常, 也未观察到脏器器官病变, 初步确定了枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 的体内安全性; 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕提高发酵料的酸溶蛋白含量和中性蛋白酶活性并有效降低游离棉酚含量: 发酵 48 h 时, 发酵棉籽粕酸溶蛋白为 26.96%, 中性蛋白酶活性为 3897 U/g, 游离棉酚降解率为 97.81%。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 游离棉酚; 鉴定; 安全性评价

文章编号: 1673-9078(2018)05-158-166

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.05.023

## Identification, Safety Evaluation and Fermentation Technology of High Efficient Free Gossypol-Degrading Strains

QI Xiu-ye, XIE Quan-xi, YU Jia-min, ZHAO Qian, ZHANG Zhi-yan, XU Hai-yan

(Shandong BaoLai-LeeLai Bioengineering Co., Ltd., Tai'an 271000, China)

**Abstract:** The cottonseed meal fermented by *Bacillus* was used in this study to investigate the effects on the degradation rate of free gossypol in cottonseed meal, as well as the effects on the nutrient components before and after fermentation, such as viable count bacteria, neutral proteases activity and acid-soluble protein content. In addition, the strains with better fermentation effects were used for identification, and safety analysis and fermentation technology were also performed. The results showed that the *Bacillus subtilis*, which could efficiently degrade the free gossypol and improve the nutritional quality of cottonseed meal, was BLCC1-0039, and the free gossypol was determined by high performance liquid chromatography. The BLCC1-0039 was preliminarily identified as the *Bacillus subtilis* by the morphology, and by the biochemical characteristics combined with 16S rDNA sequence. The in vivo safety evaluation of *B. BLCC1-0039* showed that no morphological and activity abnormalities appeared for the mice used, and no organ lesions were observed, which preliminarily suggested the safety of *B. BLCC1-0039*. Also, the fermentation induced by *B. BLCC1-0039* could effectively reduce the content of free gossypol in cottonseed meal and improve the neutral proteases activity and acid-soluble protein content, the acid soluble protein was 26.96%, the activity of neutral protease was 3897 U/g and the degradation rate of free gossypol was 97.81% after fermentation for 48 h.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; free gossypol; identification; safety evaluation

棉籽饼粕是一种优质的植物性蛋白饲料, 粗蛋白含量约 20%~40%左右, 粗纤维约 11%, 此外, B 族维生素硫胺素和有机磷也比较多<sup>[1,2]</sup>, 是畜禽饲料中非常有价值的一种原料。然而, 棉籽饼中含有棉酚、环丙稀脂肪酸、单宁等有毒物质, 制约了其在畜牧业中的应用, 其中最主要的是棉酚。棉酚的存在形式有两

收稿日期: 2018-01-16

基金项目: 泰安市科技发展计划 (201540701)

作者简介: 亓秀晔 (1987-), 女, 助理研究员, 研究方向: 微生物制剂研发

种, 即结合棉酚和游离棉酚。结合棉酚在机体消化系统中不被吸收, 可很快随粪便排出体外, 毒性很低。游离棉酚分子结构中的活性基团 (醛基和羧基) 对动物毒性很大, 长期饲喂动物过多的未经脱毒的棉粕饲料, 棉酚含量会在动物体内蓄积, 引发中毒, 导致动物出现急性呼吸窘迫临床症状, 厌食乏力, 甚至死亡等<sup>[3]</sup>。目前研究最多的棉粕脱毒方法为微生物发酵脱毒, 该法不但能脱除棉籽饼粕中的游离棉酚, 而且还可以提高棉籽饼粕的蛋白质含量和中性蛋白酶活性,

改善发酵风味,从而大大改善棉粕的营养价值和饲用价值,提高棉粕利用率<sup>[4]</sup>。据报道,芽孢菌对棉酚具有较高的降解活性<sup>[5,6]</sup>,而且芽孢菌发酵棉籽粕降解游离棉酚的能力与其产生的中性蛋白酶活性的高低有很大关系<sup>[7]</sup>。微生物制剂的广泛应用导致微生物安全性越来越得到重视,而对菌株做出正确的鉴定是对微生物安全评价的第一步。与传统的益生菌(双歧杆菌和乳酸菌)相比,芽孢益生菌的制剂成份主要是芽孢体,具有耐高温、耐干燥和稳定性高等特点,更有利于保存和运输<sup>[8]</sup>。文献中对于益生乳酸菌的效果和安全性评价研究较多,但对于益生芽孢菌的安全性研究报道较少<sup>[9,10]</sup>。

本研究通过选取降解棉酚效果较好的芽孢杆菌,并对菌株进行鉴定和安全性评价及发酵工艺探索,为菌株安全利用到实际生产中并改善饲料价值具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 发酵原材料及菌株

试验用棉籽粕由新疆泰昆生物集团提供,粉碎过40目筛。

芽孢杆菌菌株 BLCC1-0039、BLCC1-0090、BLCC1-0157 和 BLCC1-0169。均由山东宝来利来生物工程股份有限公司研究院菌种保藏中心保存。

#### 1.1.2 培养基

芽孢杆菌液体培养基:葡萄糖0.2%、蛋白胨1.0%、氯化钠0.5%、酵母膏0.5%,均为质量百分数。pH值7.0,121℃灭菌30min备用。

芽孢杆菌平皿培养基:葡萄糖0.2%、蛋白胨1.0%、氯化钠0.5%、酵母膏0.5%、琼脂1.5%,均为质量百分数。pH值7.0,121℃灭菌30min备用。

#### 1.1.3 化学试剂

葡萄糖:山东祥瑞药业有限公司;蛋白胨:北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠(分析纯):天津博迪化工股份有限公司;酵母膏:天津市英博生化试剂有限公司;乙腈、丙酮、甲醇(均为色谱级):天津市永大化学试剂有限公司;磷酸(分析纯):天津市凯通化学试剂有限公司;微孔滤膜(直径13mm、孔径0.22μm):上海安谱有限公司;棉酚标准品[高效液相色谱(HPLC级)]:上海源叶生物科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒:天根生化科技有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 种子液制备

取经过2次活化的芽孢杆菌斜面1环(约0.05g)于装有100mL芽孢杆菌液体培养基的500mL三角瓶中,于37℃、180r/min摇床培养24h,待用。

### 1.2.2 芽孢杆菌的筛选

采用生料发酵。称取一定量的棉籽粕于1000mL三角瓶中,料水比为1.0:0.4(g:mL),装料量为100g/瓶,按2%接种量分别接入培养好的芽孢杆菌种子液中,每个样品设3个平行,以不接种任何菌株的空白料为空白对照,均置于37℃培养箱进行需氧发酵,分别于发酵24h和48h后取样,测定发酵样的芽孢杆菌活菌数、中性蛋白酶活性、酸溶蛋白及游离棉酚含量。

### 1.2.3 菌株鉴定

#### 1.2.3.1 形态学鉴定

挑取降解游离棉酚效果最好的菌株的纯培养物种接于芽孢杆菌培养基平皿,37℃培养20h,观察菌落形态。

#### 1.2.3.2 分子生物学鉴定

将目的菌株接种于新鲜的芽孢杆菌液体培养基中培养20h,采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌体DNA,并对其进行16SrDNA序列扩增。所用引物为通用引物:

1492r: 5'-ggttaccttgttacgactt-3'

27f: 5'-agagttgacctcgctcag-3'

PCR反应体系(50μL)为: Mixture 25μL(含Taq DNA聚合酶及dNTP等),上下游引物各1μL,模板DNA 2μL,超纯水21μL。PCR扩增程序为94℃预变性5min,94℃变性1min,52℃退火1min,72℃延伸2min,25个循环,72℃延伸10min。PCR产物送北京博尚生物技术有限公司进行序列测定。

### 1.2.4 BLCC1-0039 安全性试验

#### 1.2.4.1 菌粉制备

枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 中试试验后,发酵液喷雾干燥,制备喷干菌粉。

#### 1.2.4.2 试验动物

昆明系小白鼠(许可证号SYXK(鲁)20130002),体重20±2g,购自山东鲁抗医药股份有限公司。

#### 1.2.4.3 试验设计

选择体重20±2g健康昆明种小鼠100只,雌雄各半。基础日粮预饲一周后随机分为5组,每组20只,其中雌雄各10只,分笼喂养,其中一组为对照组,其余四组为试验组,分别灌胃 $1 \times 10^8$  CFU/mL、

$10 \times 10^8$  CFU/mL、 $100 \times 10^8$  CFU/mL 和  $1000 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 1.2.4.4 给药

给药方式为灌胃, 各组小鼠禁食 16 h 后, 对照组灌胃生理盐水, 其余 4 个试验组分别灌胃生理盐水稀释好的菌粉, 按照 0.4 mL/20 g 体重的受试样品量进行灌胃给药, 连续灌胃 2 d, 每次灌胃后密切观察 2 h, 2 h 后常规饮食, 连续观察 14 d, 每天定时观察记录。

#### 1.2.4.5 观察指标

①肉眼观察: 详细记录被毛和皮肤、眼睛和粘膜, 呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体活动和行为等改变。特别注意是否出现震颤、抽搐、流涎、腹泻、嗜睡和昏迷等症状。应记录毒作用特征出现和消失的时间和死亡时间。

②小鼠体重: 于试验开始时、7 d 和 14 d 分别对每组雌雄小鼠进行称重, 比较其体重情况。

③病理学检查: 14 d 时对各组小鼠随机取 5 只进行尸检, 观察脏器器官病变, 对观察有变化的脏器需进行组织病理学检查。

### 1.2.5 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕发酵工艺的探索

采用生料发酵。称取一定量的棉籽粕于 1000 mL 三角瓶中, 料水比为 1.0:0.4(g:mL), 装料量为 100 g/瓶, 按 2% 接种量分别接入培养好的芽孢杆菌种子液中, 每个样品设 3 个平行, 以不接种任何菌株的空白料为空白对照, 均置于 37 °C 培养箱进行需氧发酵 48 h, 前 12 h 每隔 6 h 取次样, 之后每隔 4 h 取次样, 测定发酵样的中性蛋白酶活性、酸溶蛋白及游离棉酚含量。

## 1.3 测定指标及方法

### 1.3.1 芽孢杆菌活菌数的测定

准确称取发酵棉籽粕 10.0 g, 用玻璃珠振荡打散菌群, 以便稀释计数。用生理盐水 10 倍递增稀释, 取适当稀释度的样品至芽孢杆菌平皿培养基中, 37 °C 培养 24 h, 根据菌落数计算样品中芽孢杆菌活菌数, 结果用 CFU/g 表示。

### 1.3.2 中性蛋白酶活性的测定 (SB/T 10317-1999)

准确称取发酵棉籽粕 1.0 g, 加入 8 倍体积的磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 溶解, 充分混匀后离心取上清液, 采用福林-酚试剂法测定样品中中性蛋白酶活性。中性蛋白酶酶活定义: 1 g 固体酶粉 (或 1 mL 液体酶), 在一定温度和 pH 条件下, 1 min 水解酪素产生 1  $\mu$ g 酪氨酸为 1 个活力单位, 以 U/g 表示。

### 1.3.3 酸溶蛋白的测定 (GB/T 6432-1994)

准确称取 2.00 g 发酵棉籽粕于 25 mL 具塞试管中, 加入 15% 三氯乙酸溶液 10 mL, 混合均匀, 静止 5 min。定容至 25 mL, 每隔 2 min 混匀 1 次, 共计 30 min。将溶液定量转移, 抽滤, 取滤液 10 mL, 转入消化管中, 加入 3 g 混合催化剂 (硫酸钾: 无水硫酸铜=15:1), 与滤液混合均匀, 再加入 7~8 mL 浓硫酸, 将消化管置于消化炉中 420 °C 消化, 待消化液呈透亮的蓝绿色时, 继续消化 40 min, 按照凯氏定氮法测定上清液中可溶性蛋白质含量。

酸溶蛋白含量 (%) = (上清液中可溶性蛋白质含量  $\times$  25/10) / 样品中粗蛋白质含量。

### 1.3.4 游离棉酚含量的测定<sup>[11]</sup>

棉酚标准溶液的配制: 准确称取棉酚标准品, 用乙腈-0.2% 磷酸 (体积比为 85:15) 溶解得 1.21 mg/mL 的标准品贮备液, 标准贮备液再用乙腈-0.2% 磷酸 (体积比为 85:15) 稀释成 121  $\mu$ g/mL 的标准品工作液。用流动相将标准品工作液逐级稀释得到浓度分别为 61.50、20.17、5.04、2.52 和 1.21  $\mu$ g/mL 的标准工作液, 浓度由低至高进样测定, 以峰面积和浓度作图, 得到标准曲线回归方程, 为:  $Y=0.00000545X+0.160525$  ( $R^2=0.9999652$ ), 线性范围为 1.21~121  $\mu$ g/mL。

待测样品游离棉酚的提取: 准确称取待测样品 3.00 g, 加入丙酮 30 mL, 超声提取 30 min, 25 °C 下 3000 r/min 离心 10 min, 重复提取 3 次, 合并上清液。将上清液全部转移至蒸发瓶中, 旋转蒸发至干, 用乙腈-0.2% 磷酸 (体积比为 85:15) 溶液溶解, 多次超声清洗转移至 25 mL 容量瓶, 定容, 过 0.22  $\mu$ m 滤膜后供 HPLC 测定。

HPLC 法测定游离棉酚含量: 色谱条件为色谱柱 Intersil® ODS-2 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸 (体积比为 85:15) 溶液, 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 235 nm, 进样量 20  $\mu$ L, 柱温 25 °C。

## 1.4 数据分析

试验数据用 Excel 2007 进行初步处理后, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 程序进行方差分析, LSD 法进行组间多重比较, 结果以“平均值  $\pm$  标准差”表示,  $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉酚标准曲线的绘制



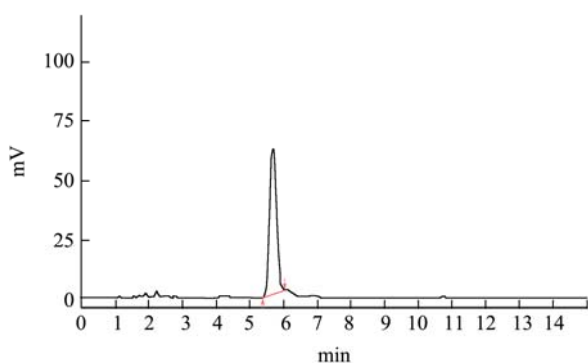


图1 棉酚标准品的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of gossypol standard

由棉酚标准品的HPLC色谱图(图1,棉酚标准品浓度6.15 μg/mL),可以看出,在5.686 min左右出棉酚色谱峰,且稳定性良好、分离效果好、峰型理想、灵敏度高。

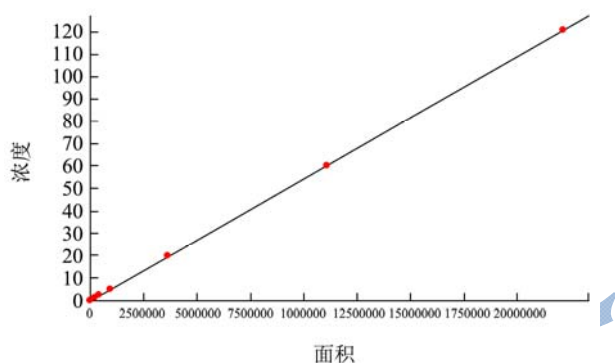


图2 游离棉酚的标准曲线

Fig.2 Standard curve of free gossypol

由图2可以看出,游离棉酚标准曲线线性吻合良好、定量范围广、定量限低、准确度和灵敏度高,该方法可用于准确测定游离棉酚的含量。

## 2.2 芽孢杆菌的筛选

由表1可知,发酵24 h时,各芽孢杆菌菌株均能

表1 芽孢杆菌发酵对发酵棉籽粕品质的影响

Table 1 Effects of *Bacillus* on the quality of fermented cottonseed meal

项目	24 h			48 h		
	酸溶蛋白/%	活菌数 /( $\times 10^8$ CFU/g)	中性蛋白酶酶活 /(U/g)	酸溶蛋白/%	活菌数 t/( $\times 10^8$ CFU/g)	中性蛋白酶酶活 /(U/g)
CK	6.31 $\pm$ 1.09 <sup>a</sup>	0	0	6.45 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	0	140.96 $\pm$ 23.10 <sup>a</sup>
BLCC1-0090	8.28 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	31.10 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>	1701.80 $\pm$ 34.19 <sup>a</sup>	15.77 $\pm$ 2.01 <sup>b</sup>	62.00 $\pm$ 3.47 <sup>a</sup>	1792.83 $\pm$ 45.30 <sup>b</sup>
BLCC1-0039	13.96 $\pm$ 1.11 <sup>d</sup>	57.00 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>	4111.40 $\pm$ 63.20 <sup>c</sup>	21.10 $\pm$ 1.98 <sup>d</sup>	117.00 $\pm$ 5.98 <sup>c</sup>	3983.24 $\pm$ 73.02 <sup>c</sup>
BLCC1-0157	10.72 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>	68.00 $\pm$ 4.22 <sup>b</sup>	3416.69 $\pm$ 34.23 <sup>c</sup>	18.78 $\pm$ 2.34 <sup>c</sup>	103.00 $\pm$ 10.02 <sup>b</sup>	3596.15 $\pm$ 42.09 <sup>c</sup>
BLCC1-0169	9.83 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	41.40 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>	2626.37 $\pm$ 98.18 <sup>b</sup>	16.73 $\pm$ 2.01 <sup>b</sup>	92.80 $\pm$ 8.20 <sup>b</sup>	2323.14 $\pm$ 29.40 <sup>b</sup>

注: 同行肩表不同小写字母表示差异显著( $p < 0.05$ ), 下同。

够成功发酵棉籽粕, 各组发酵棉籽粕中芽孢杆菌活菌数均在几十亿水平, 以 BLCC1-0039 和 BLCC1-0157 组较高, 显著高于 BLCC1-0090 和 BLCC1-0157 组 ( $p < 0.05$ ); 发酵棉籽粕酸溶蛋白含量以 BLCC1-0039 组最高, 其次是 BLCC1-0157 组, 均显著高于空白对照组 ( $p < 0.05$ ), 其中 BLCC1-0039 组的酸溶蛋白含量较空白对照组高出 54.80%。发酵棉籽粕中中性蛋白酶活性以 BLCC1-0039 组最高, 达到 4111.40 U/g, 其次是 BLCC1-0157 组, 二者均显著高于 BLCC1-0090 和 BLCC1-0169 组 ( $p < 0.05$ )。但二者间差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

由表1可知, 发酵48 h时, 各组发酵棉籽粕中芽孢杆菌活菌数均达到几十亿水平及以上, 以 BLCC1-0039 组最高, BLCC1-0157 组次之。与空白对照组相比, 各菌株发酵均显著提高了发酵棉籽粕中酸溶蛋白含量 ( $p < 0.05$ ), 其中以菌株 BLCC1-0039 发酵时最高, 较空白对照组提高了 69.43%。发酵棉籽粕中中性蛋白酶活性以 BLCC1-0039 组最高, 达到 3983.24 U/g, 发酵料, 其次是 BLCC1-0157 组, 二者均显著高于空白对照组以及 BLCC1-0090 和 BLCC1-0169 组 ( $p < 0.05$ ), 但两者间差异不显著 ( $p > 0.05$ )。综上可知, 芽孢杆菌各菌株发酵棉籽粕均可以提高酸溶蛋白含量和中性蛋白酶活性, 其中以菌株 BLCC1-0039 的效果最好。由表2可知, 发酵24 h时以 BLCC1-0039 组发酵棉籽粕游离棉酚含量最低, 显著低于其他各组 ( $p < 0.05$ ), 其游离棉酚降解率达到 93.89%, 其次是 BLCC1-0157 组; BLCC1-0039 组发酵棉籽粕48 h时发酵棉籽粕游离棉酚含量最低, 显著高于其余3组发酵时 ( $p < 0.05$ ), 其游离棉酚降解率为 96.67%。综合可知, 4株芽孢杆菌中以菌株 BLCC1-0039 发酵棉籽粕降游离棉酚效果最好, 后续试验选择芽孢杆菌菌株 BLCC1-0039 为研究对象。

表2 芽孢杆菌发酵对发酵棉籽粕游离棉酚含量的影响

Table 2 Effects of *Bacillus* on the free gossypol content of fermented cottonseed meal

项目	24 h		48 h	
	棉酚含量/( $\mu\text{g/g}$ )	降解率/%	棉酚含量/( $\mu\text{g/g}$ )	降解率/%
CK	57.84 $\pm$ 2.98 <sup>c</sup>	0	54.62 $\pm$ 3.01 <sup>d</sup>	0
BLCC1-0090	15.81 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>	72.67	12.02 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>	77.99
BLCC1-0039	3.53 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	93.89	1.82 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	96.67
BLCC1-0157	10.44 $\pm$ 2.10 <sup>b</sup>	81.95	6.19 $\pm$ 1.29 <sup>b</sup>	88.67
BLCC1-0169	13.78 $\pm$ 1.98 <sup>b</sup>	76.18	9.64 $\pm$ 1.79 <sup>c</sup>	82.35

注: 棉酚降解率=[(对照样品棉酚含量-发酵样棉酚含量)/对照样品棉酚含量] $\times$ 100%。

### 2.3 菌株 BLCC1-0039 鉴定

#### 2.3.1 形态学鉴定

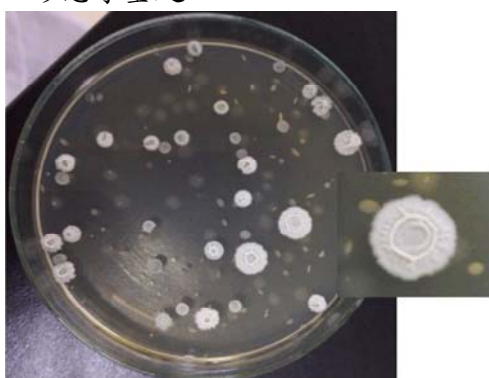


图3 芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌落形态图

Fig.3 Colonial morphology of BLCC1-0039

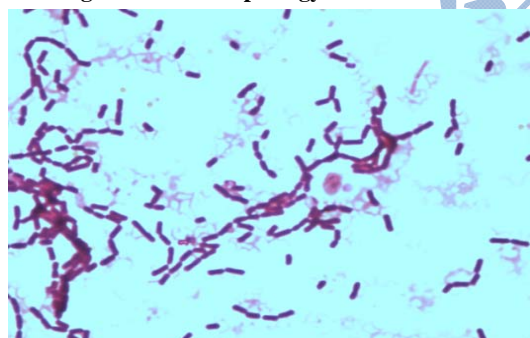


图4 芽孢杆菌 BLCC1-0039 革兰氏染色图

Fig.4 Gram stain of BLCC1-0039

菌株 BLCC1-0039 在 37 °C 培养 20 h, 形成灰白色

菌落, 不透明, 表面较粗糙, 似毛玻璃状或融蜡状(如图3)。光学显微镜下观察, 革兰氏阳性, 杆状(如图4)。

#### 2.3.2 分子生物学鉴定

菌株 BLCC1-0039 的 16S rDNA PCR 产物电泳结果显示, 在分子量大小为 1500 bp 左右得到一条特异性好的条带, 与预期结果一致, 并进行测序, 序列如 SEQ ID NO.1 所示。将测序序列与 NCBI 网站上已登录的部分菌株的 16S rDNA 基因序列进行比对, 结果表明, 菌株 BLCC1-0039 与已报道的 *Bacillus subtilis* (EU346662.1、HQ317166.1 和 KF836543.1 等) 的序列同源性为 99%。鉴定 BLCC1-0039 菌株属于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

### 2.4 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 安全性试验

#### 2.4.1 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌粉对各组小鼠(雌性和雄性)的生长和死亡情况的影响

由表3可知, 在14 d观察期内, 雌性小鼠体态观察正常, 四肢活动正常, 对体重无显著性影响, 各组均没有出现死亡情况。解剖仔细观察肝脏、肾脏和脾脏, 均无肉眼可见病变。

由表4可知, 在14 d观察期内, 雄性小鼠体态观察正常, 四肢活动正常, 对体重无显著性影响, 各组均没有出现死亡情况。解剖仔细观察肝脏、肾脏和脾脏, 均无肉眼可见病变。

表3 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌粉对各组雌性小鼠生长和死亡情况的影响

Table 3 Effects of *B. BLCC1-0039* on the growth and mortality of female mice in each group

雌性	I -CK	II	III	IV	V
初始体重/g	19.22 $\pm$ 0.02	20.60 $\pm$ 0.02	20.93 $\pm$ 0.01	20.31 $\pm$ 0.02	20.05 $\pm$ 0.01
7 d 平均末重/g	23.90 $\pm$ 0.02	25.90 $\pm$ 0.02	25.00 $\pm$ 0.02	24.00 $\pm$ 0.02	24.70 $\pm$ 0.02
14 d 平均末重/g	24.00 $\pm$ 0.02	26.40 $\pm$ 0.02	26.25 $\pm$ 0.02	25.53 $\pm$ 0.01	25.64 $\pm$ 0.02
行为、动作	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑
体态观察	正常	正常	正常	正常	正常

转下页

接上页

死亡记录	0	0	0	0	0
肝脏病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变
肾脏病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变
脾脏病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变

表 4 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌粉对各组雄性小鼠生长和死亡情况的影响

Table 4 Effects of *B.BLCC1-0039* on the growth and mortality of male mice in each group

雄性	I -CK	II	III	IV	V
初始平均体重/g	21.91±0.02	21.74±0.02	22.05±0.02	21.86±0.02	21.96±0.01
7 d 平均末重/g	27.50±0.02	28.90±0.01	28.13±0.02	28.20±0.03	28.00±0.02
14 d 平均末重/g	31.00±0.02	31.50±0.02	31.10±0.01	31.05±0.02	31.26±0.02
行为、动作	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑	反应敏捷、被毛平整顺滑
体态观察	正常	正常	正常	正常	正常
死亡记录	0	0	0	0	0
肝脏病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变
肾脏病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变
脾脏病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变	无肉眼可见病变

### 2.4.2 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌粉对各组小鼠的器官指数的影响

由表 5 可知, BLCC1-0039 菌粉对各试验组小鼠的脾脏指数和肝体比没有显著性影响。

### 2.5 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕发酵工艺研究

#### 2.5.1 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕酸溶蛋白的影响

由表 6 可知, 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕的酸溶蛋白随发酵时间延长呈现增加趋势, 发酵 48 h 时酸溶蛋白最高, 达到 26.96%。

#### 2.5.2 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕中性蛋白酶活性的影响

枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕产中性蛋白酶结果如表 7 及图 5 所示, 发酵至 12 h 时, 中性蛋白酶活性低于 1000 U/g, 之后随发酵时间的延长中性蛋白酶活性增加, 24 h 中性蛋白酶活性达到 3900 U/g, 之后中性蛋白酶活性维持一个相对稳定水平, 32 h 中性蛋白酶活性达到最高, 为 4101 U/g, 48 h 为 3897 U/g。

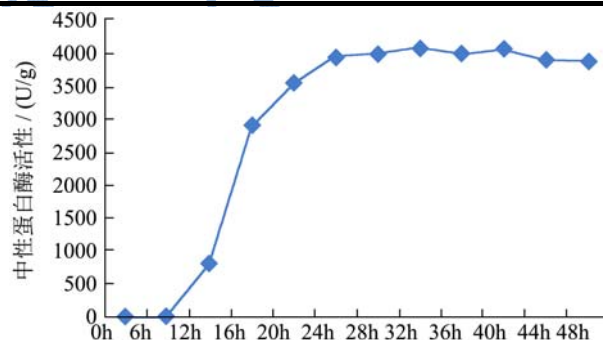


图 5 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕中性蛋白酶活性的影响

Fig.5 Effects of *B.BLCC1-0039* on the acid-soluble protein content of fermented cottonseed meal

#### 2.5.3 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕游离棉酚含量的影响

枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕对游离棉酚含量的影响如表 8 所示。发酵 12 h 时, 游离棉酚降解率达到 58.83%, 随着发酵时间延长, 游离棉酚降解率呈现增加趋势, 这与表 3 中的结论一致。具体为: 发酵 24 h 时游离棉酚含量仅为 2.87 μg/g, 降解率达到 94.63%, 发酵 48 h 时游离棉酚含量仅为 1.17 μg/g, 降解率为 97.81%。

表 5 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌粉对各组小鼠器官指数的影响

Table 5 Effect of *B.BLCC1-0039* on organ index of mice in each group

项目	I -CK	II	III	IV	V
脾脏指数/(g/kg)	0.519±0.001 <sup>b</sup>	0.552±0.059 <sup>ab</sup>	0.554±0.048 <sup>ab</sup>	0.565±0.034 <sup>ab</sup>	0.529±0.049 <sup>a</sup>
肝体比	5.154±0.335	5.391±0.234	5.573±0.261	5.325±0.334	5.296±0.196



表 6 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕酸溶蛋白的影响

Table 6 Effects of *B.LC1-0039* on the acid-soluble protein content of fermented cottonseed meal

	0 h	6 h	12 h	16 h	20 h	24 h
酸溶蛋白/%	4.53±0.12	4.87±0.09	5.13±0.51	7.86±0.42	10.12±0.64	16.61±0.96
	28 h	32 h	36 h	40 h	44 h	48 h
酸溶蛋白/%	20.87±1.01	23.34±0.78	24.17±0.98	25.04±1.08	26.16±1.11	26.96±1.21

表 7 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕中性蛋白酶活性的影响

Table 7 Effect of *B.LC1-0039* on the neutral protease activity of fermented cottonseed meal

	0 h	6 h	12 h	16 h	20 h	24 h
中性蛋白酶 酶活/(U/g)	0	10.19±1.82	801.01±40.51	2932.78±72.83	3587.36±106.63	3961.15±130.24
	28 h	32 h	36 h	40 h	44 h	48 h
中性蛋白酶 酶活/(U/g)	4020.26±121.61	4101.43±119.27	4000.99±178.58	4082.61±151.67	3912.66±201.62	3897.72±101.90

表 8 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵对发酵棉籽粕游离棉酚含量的影响

Table 8 Effect of *Bacillus LC1-0039* on the gossypol content of fermented cottonseed meal

	0 h	6 h	12 h	16 h	20 h	24 h
棉酚含量/(μg/g)	53.44±2.78	38.94±2.09	22.00±1.85	8.69±0.56	5.07±0.34	2.87±0.12
降解率/%	0	27.13	58.83	83.74	90.51	94.63
	28 h	32 h	36 h	40 h	44 h	48 h
棉酚含量/(μg/g)	2.64±0.29	2.32±0.45	2.07±0.29	1.87±0.14	1.46±0.23	1.17±0.65
降解率/%	95.06	95.66	96.13	96.50	97.27	97.81

### 3 讨论

微生物发酵棉籽饼(粕)脱毒的关键是菌种的选择,不同微生物菌种对棉酚的降解能力不同,筛选优良的微生物菌种是影响棉籽饼(粕)脱毒效果的首要条件。关于棉籽饼粕微生物发酵脱毒及脱毒工艺,国内有许多文献报道,脱毒率为 60%~94.74%<sup>[12]</sup>。本实验通过 4 株芽孢菌发酵筛选出的 BLCC1-0039 微生物发酵棉籽粕游离棉酚的降解率达到 96.67%以上,高于国内外发表的有关棉籽粕发酵脱毒的文献资料结果。对 BLCC1-0039 进行了菌株形态观察和生理生化鉴定并结合其 16S rDNA 序列,初步确定其为枯草芽孢杆菌。枯草芽孢杆菌是美国食品药品监督管理局公布的安全菌种<sup>[13]</sup>,是当今工业酶的主要生产菌种之一,也是工业生产上应用最广泛的菌种之一,其中性蛋白酶活性为枯草芽孢杆菌生长的主要考察指标<sup>[14]</sup>,酸溶蛋白含量是主要的营养指标。因此,微生物发酵棉籽饼(粕),不仅可以使其游离棉酚含量的安全性大大提高,同时蛋白质含量及其他饲用品质也能得到大幅度的提高,从而提高其在动物饲料中的添加量,提高棉籽饼(粕)的利用率<sup>[15]</sup>。枯草芽孢杆菌作为益生菌被广泛地应用于医药、食品和饲料微生物添加剂中<sup>[16,17]</sup>。据报道,利用枯草芽孢杆菌发酵棉籽粕,特别是加入木瓜蛋白

酶后可有效提高棉籽粕的营养价值<sup>[18]</sup>。在本研究中,利用枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕的酸溶蛋白含量随发酵时间延长呈现增加趋势,48 h 时最高,达到 26.96%;中性蛋白酶活性逐渐升高,发酵 32 h 时达到最高,为 4101 U/g;游离棉酚的含量在短时间内大大降低,发酵 24 h 时游离棉酚降解率达到 94.63%,发酵 48 h 时游离棉酚降解率为 97.81%。

目前,益生菌的评价主要从安全性和有效性入手,安全性和有效性评价又包括体内和体外的评价。本文主要对益生菌的体内安全性评价。益生菌的体内安全性评价主要涉及机体水平的病态学分析、急性和亚慢性毒性分析、产肠毒素和呕吐毒素的分析(主要是芽孢杆菌)、细菌易位和遗传毒性分析等。如 Gu 等<sup>[19]</sup>采用  $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^7$  和  $5 \times 10^9$  芽孢/kg 体重的饲喂剂量,连续饲喂小鼠 72 h 观察每组小鼠的毒性和死亡的临床症状,分析急性毒性;采用  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^8$  和  $1 \times 10^{10}$  芽孢/kg 体重的饲喂剂量,饲喂小鼠 4 周,每天观察每组小鼠的毒性和死亡的临床症状。Zhou 等<sup>[20]</sup>按照  $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^9$  或  $5 \times 10^{10}$  CFU/g 干饲料重的饲喂剂量,饲喂小鼠 28 d,期间每天观察和记录动物的活跃状态、皮毛色泽和有死亡情况等,并在饲喂结束,无菌采集血液样品,检测菌血症,检测待测菌是否发生易位;Endres 等<sup>[21]</sup>采用  $5.2 \times 10^{11}$  CFU/kg 体重的饲喂

剂量饲喂小鼠 14 d, 观察皮毛、眼睛、黏膜、自主性、循环系统和中枢神经系统、躯体行为、抽搐、流涎、粪便稠度、嗜睡、步态姿势等, 并在第 15 d 时乙醚处死, 检测器官的病理学。在本研究中, 采用不同浓度的枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 菌粉的稀释液饲料小鼠 14 d, 观察和记录动物的活跃状态、皮毛色泽和有无死亡情况等, 结果为均正常无异常表现, 14 d 小鼠尸检, 也未观察到脏器官病变, 初步确定了枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 的体内安全性。

## 4 结论

4.1 可高效降解棉籽粕中游离棉酚含量的芽孢杆菌为 BLCC1-0039。

4.2 菌株形态观察和生理生化鉴定并结合其 16S rDNA 序列, 初步确定其为枯草芽孢杆菌。

4.3 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 的体内安全性评价, 发现未对实验小鼠造成形态和活动异常, 也未观察到脏器官病变, 初步确定了枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 的体内安全性。

4.4 枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 发酵棉籽粕 48 h 时, 酸溶蛋白为 26.96%, 中性蛋白酶活性为 3897 U/g, 游离棉酚降解率为 97.81%。

## 参考文献

- [1] 李佳, 袁洪水, 朱宝成. 棉籽饼中棉酚降解菌株的分离及脱毒效果初探[J]. 科技传播, 2010, 14: 85-91  
LI Jia, YUAN Hong-shui, ZHU Bao-cheng. Isolation and detoxification of gossypol degrading strains in cottonseed meal [J]. Science Communication, 2010, 14: 85-91
- [2] 朱德伟, 刘志鹏, 蔡国林, 等. 高效降解棉酚菌种的筛选及棉粕发酵脱毒工艺研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(2): 24-28  
ZHU De-wei, LIU Zhi-peng, CAI Guo-lin, et al. Screening of gossypol-degrading strain and its application in fermentation of cottonseed meal [J]. China Oils and Fats, 2010, 35(2): 24-28
- [3] 刘建成, 马贵军, 蒋粒薪. 高效降解棉粕中游离棉酚菌种的筛选[J]. 饲料工业, 2012, 33(1): 29-31  
LIU Jian-cheng, MA Gui-jun, JIANG Li-xin. Screening of bacteria degrading gossypol in cottonseed meal [J]. Feed Industry, 2012, 33(1): 29-31
- [4] 元秀晔, 谢全喜, 陈振, 等. 高效降解游离棉酚并改善棉籽粕营养品质的菌株筛选[J]. 动物营养学报, 2017, 29(9): 3258-3266  
QI Xiu-ye, XIE Quan-xi, CHEN Zhen, et al. Screening of high efficient free gossypol-degrading and improving cottonseed meal nutritive quality strains [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(9): 3258-3266
- [5] 李佳, 张爱民, 袁洪水, 等. 棉酚降解菌株的分离及对棉饼的脱毒效果[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 220-224  
LI Jia, ZHANG Ai-min, YUAN Hong-shui, et al. The separation of gossypol degrading strain and the effect of detoxification of cottonseed meal [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(1): 220-224
- [6] 张丛, 李佳, 袁洪水, 等. 高效降解棉酚菌株的筛选鉴定及毒性试验[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 112-117  
ZHANG Cong, LI Jia, YUAN Hong-shui, et al. Isolation and identification of strains for digesting free-gossypol and toxicity test [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(12): 112-117
- [7] 元秀晔, 谢全喜, 陈振, 等. 中性蛋白酶降解棉粕中棉酚的研究[J]. 中国饲料, 2017, 36(10): 144-148  
QI Xiu-ye, XIE Quan-xi, CHEN Zhen, et al. Degradation of cottonseed meal gossypol by neutral protease [J]. China Brewing, 2017, 36(10): 144-148
- [8] Femia A P, Luceri C, Dolara P, et al. Antitumorogenic activity of the prebiotic inulin enriched with Oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(11): 1953-1960
- [9] Wang Y, He Z. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds [J]. Aquaculture, 2009, 287: 94-97
- [10] Guo X H, Kim J M, Nam H M, et al. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties [J]. Anaerobe, 2010, 16(4): 321-326
- [11] 陈来, 冷向军, 李小勤, 等. 优化高效液相色谱法测定棉籽粕中游离棉酚的含量[J]. 动物营养学报, 2012, 24(7): 1320-1328  
CHEN Lai, LENG Xiang-jun, LI Xiao-qin, et al. Optimized HPLC method for determining free gossypol content in cottonseed meal [J]. China Brewing, 2012, 24(7): 1320-1328
- [12] 金红春, 兰时乐, 王红权. 混合菌剂固态发酵棉粕脱毒条件的优化[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 50-56  
JIN Hong-chun, LAN Shi-le, WANG Hong-quan. Optimization of detoxification conditions of cottonseed cake by solid-state fermentation with mixed culture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(24): 50-56
- [13] 闫亚婷. 固态发酵玉米条件的优化及营养物质变化的比较研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010



- YAN Ya-ting. Optimization of conditions for solid state fermentation of corn and a comparative study of nutrient change [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010
- [14] 刘颖,张彬彬,孙冰玉,等. 枯草芽孢杆菌高产中性蛋白酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 166-170
- LIU Ying, ZHANG Bin-bin, SUN Bing-yu, et al. Optimization of fermentation conditions for production of neutral protease by *Bacillus subtilis* 10075 [J]. Food Science, 2014, 35(13): 166-170
- [15] 柴秀航,付元元,毕艳兰,等. 棉仁中游离棉酚提取工艺的优化[J]. 中国油脂, 2014, 39(5): 61-65
- CHAI Xiu-hang, FU Yuan-yuan, BI Yan-lan, et al. Optimization of free gossypol extraction process in cotton kernel [J]. Chinese Oils and Fats, 2014, 39(5): 61-65
- [16] Simon M. Bacillus probiotics [J]. Food Microbiology, 2010
- [17] Sorokulova I B, Pinchuk I V, Denayrolles M, et al. The safety of two Bacillus probiotic strains for human use [J]. Dig Dis Sci., 2008, 53: 954-963
- [18] SUN H, TANG J W, YAO X H. Improvement of the nutritional quality of cottonseed meal by *Bacillus subtilis* and the addition of papain [J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2012, 14(4): 74-79
- [19] Gu S B, Zhao L N, Wu Y, et al. Potential probiotics attributes of new strains of *Bacillus coagulans* CG-MCC 9951 isolated from healthy piglet feces [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2015, 31(6): 1-13
- [20] Zhou J S, Shu Q, Rutherford K J, et al. Safety assessment of potential probiotics lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb.acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 56(1): 87-96
- [21] Endres J R, Clewell A, Jade K A, et al. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotics, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient [J]. Food Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2009, 47(6): 839-855