

高效降解棉酚菌株的选育及脱毒条件的研究*

施安辉 张 勇 曲 品 阎建国 萧海杰

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

关键词 选育, 诱变和驯化, 高效降解棉酚

分类号 Q939.99

目前, 世界棉籽年产量高达 2700 万~3000 万吨, 我国棉籽产量在 800 万~900 万吨左右, 约占各类植物饼、粕产量的 30%。但是, 由于棉籽中有有毒物质游离棉酚, 因此大大地限制了棉籽蛋白资源在食品和饲料等方面的应用。近十年来, 国内外都在进行棉籽饼的脱毒研究。国外主要采用液体旋流加工法, 设备投资大, 费用高, 国内不易推广。目前, 我国主要采用硫酸亚铁脱毒, 产品存有适口性差, 色泽黑褐, 脱毒能力较低等缺点。微生物脱毒国外未见报道。

1 材料和方法

1.1 培养基

棉酚选育培养基: 查氏培养基不加 3% 的蔗糖, 改加 0.2%、0.4%、0.5% 的棉酚。测定棉酚脱毒率培养基: 查氏培养基不加 3% 的蔗糖, 改加 1% 的棉酚。

1.2 样品和菌种

1.2.1 样品: 山东省莘县棉花加工厂的霉变棉籽饼。

1.2.2 菌种: 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 2 号, 黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 5 号, 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 1 号和 2 号, 甘薯曲霉 (*Aspergillus bafafae*) 4 号, 红曲霉 (*Monascus purpureus*) 1 号和乾氏曲霉 (*Aspergillus inuii*) 8 号, 系作者从大曲中分离。

1.3 菌株的分离和选育^[1,2]

1.3.1 降解棉酚菌株的初筛: 把霉变的棉籽饼稀释后, 涂布在 0.2% 的棉酚选育培养基平板上, 30℃, 恒温培养 3~4d, 从中选出霉菌和酵母菌菌落, 并在培养基上进一步分离纯化。

1.3.2 高棉酚驯化: 把以上获得的霉菌和酵母及作者分离保存的 7 株菌种, 分别点种到 0.4% 的棉酚选育培养基平板上, 30℃, 恒温培养 3~4d, 从中选出利用并降解棉酚能力高的菌株。

1.3.3 诱变育种: 经高棉酚驯化后获得的菌株作为原始菌株进行亚硝基胍、紫外线分别处理及复合处理, 培养基为 0.5% 的棉酚选育培养基。

1.4 测定方法

1.4.1 棉酚的定量测定^[3,4]: 主要采用苯胺法, 也探讨了间苯三酚法。

1.4.2 蛋白质含量的测定^[3,4]: 采用凯氏定氮法。

1.4.3 淀粉含量的测定^[2]: 采用酸水解法把淀粉水解为葡萄糖, 然后测定葡萄糖的含量, 再乘 0.9, 即得粗

* 山东省科委资助项目, 获 1995 年度国家教委科技进步三等奖。

收稿日期: 1997-06-09

淀粉的含量。

1.4.4 黄曲霉毒素含量的测定^[5]：采用荧光法。

2 结果

2.1 菌种的选育、鉴定和脱毒性能的测定

2.1.1 高效降解棉酚菌种的选育^[1,2]：采用平板稀释法。从霉变的棉籽饼中筛选到能降解棉酚的霉菌 18 株，酵母菌 5 株，再加上实验室保存的霉菌 7 株，分别点种到棉酚选育培养基上。最后筛选到霉菌 C-1、黄曲 5 号和酵母 Y2、Y3，共 4 株分解棉酚能力高的菌种。

2.1.2 菌种鉴定^[6~8]：经鉴定，菌株 G-1 为黑曲霉，菌株黄曲 5 号为黄曲霉，菌株 Y-2 为热带假丝酵母，菌株 Y-3 为白色球拟酵母。

2.1.3 菌株脱毒率的测定：根据不同浓度棉酚溶液在波长 44.5nm 处光密度值和标准溶液中棉酚的浓度绘制出标准曲线图，确定计算公式。同时，测定加热的脱毒率。根据反复的试验结果，以 114℃ 处理 25min 较为适宜。把以上选育出的 4 株菌种分别接种于棉酚脱毒培养基中进行固体培养，最后取样测定棉酚的含量。不经高温处理的作为对照 1，经高温处理的作为对照 2，经高温处理又接种的作为试验组。其结果见表 1。

表1 高效降解棉酚菌株的脱毒率测定结果

组 别	对照1	对照2	黄曲5号	G-1	Y-2	Y-3
棉酚含量(%)		0.076	0.025	0.028	0.022	0.023
微生物脱毒率(%)			67.1	63.6	71.5	69.81
总脱毒率(%)	0.123	38.2	79.7	77.3	82.2	81.3

试验结果表明，菌株降解棉酚能力为：Y-2 > Y-3 > 黄曲 5 号 > G-1。

2.1.4 黄曲霉毒素的测定：Y-2 和 Y-3 为酵母菌，不需作产黄曲霉毒素的测定。G-1 和黄曲 5 号经山东省卫生防疫站检测为不产毒素菌株，其小试和中试产品也均未检出黄曲霉毒素 B₁。

2.2 微生物降解棉酚小试和中试工艺条件

采用 Y-2、Y-3 和黄曲 5 号作为供试菌种，小试规模为 10kg，共试验 8 批次。中试规模为 1000kg，共 5 批次。试验结果表明，Y-2 和 Y-3 培养物料的加水量为 1:0.8，培养温度为 35℃，自然通风，培养脱毒周期为 60h，黄曲 5 号培养物料的加水量为 1:1，培养温度为 30℃，自然通风，培养周期为 48h。

2.3 棉籽饼经微生物脱毒后氨基酸含量的变化

试验结果表明，棉籽饼经微生物脱毒降解后，天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸和脯氨酸等 17 种氨基酸含量均有明显提高，特别是与食品和饲料密切相关的甲硫氨酸、赖氨酸和精氨酸的提高更为明显。例如，甲硫氨酸含量 Y-2 提高 56.4%，Y-3 提高 92.5%，黄曲 5 号提高 120.6%。

参 考 文 献

[1] 施安辉,张 勇,曲 品. 中国酿造, 1993, (2): 28~31.
[2] 白毓谦,高 东,方善康等. 微生物实验技术, 济南: 山东大学出版社, 1987. 357~363.
[3] 许元杰,王 方. 中国酿造, 1989, (2): 15~17.
[4] 余忠谊,刘 力. 农副产品加工, 1986, (3): 26~27.
[5] 居乃斌. 黄曲霉毒素. 北京: 轻工业出版社, 1980. 203~208.

- [6] 中国科学院微生物研究所常见与常用真菌编写组. 常见与常用真菌. 北京: 科学出版社, 1973. 77~97; 143~156.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 65~156.
- [8] 巴特 J. A(胡瑞卿译). 酵母的特征和鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. 17~70.

SCREENING AND BREEDING OF HIGHLY-EFFECTED DEGRADING COTTON-PHENOL STRAINS AND STUDY ON DEFOXICATION TECHNOLOGY AND CONDITIONS

Shi Anhui Zhang Yong Qu Pin Yan Jianguo Xiao Haijie

(National Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract From mildewed cottonseed cake and stock cultures of mold and yeast. We select more than ten strains of yeasts and molds which can degrade cotton phenol. At last we got four strains which can degrade cotton phenol highly effected after mutagenized by physical and chemical factors and induced by cotton phenol. They belong to *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. By small and medium size fermentations, the content of dissociated cotton phenol all reach safe criterion (the lowest dissociated cotton phenol content is 220mg / L in the defoxicated cottonseed cake), compared with FeSO_4 method, defoxicated cottonseed cake looks and tastes well and the content of protein and amino acid are highly enhanced as will.

Key words Screening and breeding, Inducing and taming, Highly effected degrading cotton phenol