

利用微生物将棉籽中游离 棉酚脱毒的研究

钟英长 吴玲娟

(生物学系)

摘 要

本文通过添加棉酚的培养基进行微生物的自然筛选和诱变育种,获得5株对棉酚有高脱毒率而不产黄曲霉毒素的霉菌,对未经榨油的棉籽仁粉的微生物脱毒率达60%—74%。它们分别属于梨孢霉属(*Scopulariopsis* sp.)、曲霉属(*Aspergillus* sp.)、串珠霉属(*Monilia* sp.)和红曲霉属(*Monascus* sp.)。通过测定经固态发酵脱毒处理后棉籽仁粉、饼粉中游离棉酚的残留量证实棉籽饼脱毒后游离棉酚含量达到安全标准。对发酵后棉籽仁粉、饼粉的动物毒性试验和营养分析,结果也表明发酵后的棉籽仁粉、饼粉毒性大为减少而营养价值却有所提高。

关键词 棉酚,微生物脱毒,棉籽饼

利用棉籽作为动物饲料和人类食品时,对游离棉酚的含量有一定的安全标准,一般规定不得超过0.03%。棉籽仁含游离棉酚大约0.8%,棉籽饼则因榨油工艺的不同,残留的棉酚含量差异很大。棉籽饼在加工过程中,受压、热处理,游离棉酚大部分与蛋白质结合而形成无毒的结合棉酚^[1,2]。但一般榨油后的棉籽饼的游离棉酚含量仍超过规定的安全标准,需要进一步脱毒后方能使用。

棉籽的脱毒有各种不同的方法,目前国内外采用的脱毒工艺,如加热去毒法,液体旋流加工工艺,胺去毒法、碱法脱毒、硫酸亚铁脱毒和极性溶剂浸出法等^[2-5],均属于物理或化学的脱毒方法,这些方法都存在一定的缺点,如脱毒率不理想、成本过高、破坏棉籽中的营养成分、降低营养价值等,因此有必要寻求成本低、效率高和工艺简单的新方法。本文着重研究利用微生物将棉酚脱毒的方法,即利用微生物在发酵过程中对棉酚的转化,以达到脱毒的目的。

1 材料与方法

1.1 培养基

①蔡氏(Czapek)培养基;②2%葡萄糖—胡萝卜—马铃薯培养基;③0.2% (g/ml)醋酸棉酚—蔡氏培养基;④0.4% (g/ml)醋酸棉酚—蔡氏培养基;⑤不同含糖量和棉酚量的棉籽仁粉水抽提液平板;⑥测定棉酚脱毒率培养基(棉籽粉或饼粉于

0.56kg/cm² 灭菌30分钟后加入60%浓度为1g/120ml的无菌葡萄糖水溶液); ⑦0.4% (g/ml) 醋酸棉酚—无糖蔡氏培养基; ⑧0.4% (g/ml) 醋酸棉酚—0.5% 蔗糖蔡氏培养基。

1.2 棉酚耐受菌株的选育

1.2.1 自然筛选 按常规方法从垃圾土和霉变棉籽饼中取样, 稀释后涂布在③号培养基平板上, 29℃培养一定时间。选取所生长的霉菌菌落在③号培养基上分离纯化。另选部分菌株点植到④和⑤号培养基平板上, 29℃培养一定时间后观察记录生长情况。

1.2.2 诱变育种 参考《微生物应用技术》^[6]一书中的方法。选用01、37和G-1号菌株作为出发菌株进行亚硝基胍诱变和亚硝基胍—紫外线双重诱变。用含棉酚的培养基(⑦号、⑧号培养基)进行筛选。

1.3 测定方法

1.3.1 游离棉酚的定量测定 游离棉酚的含量采用 Boatner 等人的三氯化铋反应法^[7,8]测定。每个样品做2个重复, 取平均值。由标准曲线求得游离棉酚的含量。

1.3.2 固态发酵和脱毒率的测定 将经活化(用②号培养基)的菌接种⑥号培养基, 于29℃培养48小时。同时将一瓶经过相同条件预处理的培养基不接种置于3℃作为热脱毒对照。均于70℃烘2.5小时, 粉碎。

以上样品分别取样测定游离棉酚的含量。与经过相同预处理不接种的对照样品中游离棉酚的含量相比较计算出菌株的微生物脱毒率, 与不经任何处理的样品中游离棉酚的含量相比较求得总脱毒率。

1.3.3 黄曲霉毒素的含量测定 将01、09、37、57、78和G-1号菌株接种⑥号培养基进行固态发酵。以经过相同处理但不接种的培养基置于3℃作对照(对照Ⅱ)。于70℃烘5小时, 并取适量未经预处理(不灭菌, 不调湿)的棉籽粉也于70℃烘5小时作对照(对照Ⅰ)。用高效液相色谱(HPLC)法(SHIMADZUT1C—3A型高效液相色谱仪)测定各样品的黄曲霉毒素的含量。

1.3.4 蛋白质、氨基酸含量测定 经固态发酵的棉籽仁粉和棉籽饼粉⑥号培养基, 于70℃烘2.5小时, 粉碎。以不经任何处理的棉籽仁粉、棉籽饼粉分别作对照。

以瑞典Kjeltec自动定氮仪(Ⅲ型)测定各个样品的蛋白质含量。以高速氨基酸分析仪(日立835—50型)测定各个样品的氨基酸含量。

1.4 动物毒性试验

40只幼龄纯种小白鼠分成4组, 每组10只, 分别饲喂4种饲料: ①40%发酵棉籽仁粉—60%混合粉; ②40%对照棉籽仁粉—60%混合粉; ③全部发酵棉籽仁粉; ④全部不发酵(对照)棉籽仁粉, 各组并经常补充饲喂胡萝卜。

2 结果

2.1 棉酚耐受菌株的选育

以④号培养基从垃圾土和霉变棉籽饼取样筛选到90株具棉酚耐受能力的霉菌。经诱变选育出20株棉酚耐受能力相对较强的突变株。各菌株暂时以数字编码。根据各菌株点植到④、⑤号培养基上的生长情况, 初步确定01号等30个菌株对棉酚的耐受能力比较强。

2.2 菌株脱毒率

自然选育到的90株霉菌接种⑥号培养基进行固态发酵后取样测定游离棉酚的含量, 并与处理条件完全相同但不接种的培养基和不经任何处理直接测定的棉籽仁粉(未榨油)和棉籽饼粉(榨过油)的游离棉酚含量相比较分别求得微生物脱毒率和总脱毒率, 结果菌株的脱毒率高低各异, 如表1所示(表中数据为经多次重复试验测定的部分菌株的平均值)。其中, 01、09、37、57、78和G-1号菌株对游离棉酚的平均脱毒率均高于60%, 最高为01号菌株, 微生物脱毒率达74%。

重复试验, 测定了几个菌株对棉籽饼游离棉酚的脱毒率, 结果见表2。由表2可见, 受检的几株霉菌对棉籽饼的脱毒率也很高, 达68%以上, 而且略高于对棉籽仁粉的脱毒率。这可能是棉籽饼里游离棉酚含量比较低, 对霉菌生长的抑制作用比较小, 菌体生长比较好, 因而脱毒率也比较高。

表1 固态发酵的棉酚脱毒率(棉籽仁粉)

Tab.1 The reduction of free gossypol in cottonseed kernel meal (oil not extracted) by solid-state fermentation

项目	对照(I)	对照(II)	01	09	11	37	57	67	75	78	79	80	G-1
残留游离棉酚含量(%)	0.753	0.274	0.071	0.097	0.132	0.076	0.090	0.211	0.21	0.082	0.167	0.148	0.105
微生物脱毒率(%)	—	—	74.1	64.7	51.8	72.4	67.1	23.0	23.3	70.1	38.8	46.0	61.5
总脱毒率(%)	—	63.6	90.6	87.2	82.5	90.0	88.0	72.0	72.1	89.1	77.7	80.4	86.0

注: ①对照(I)——棉籽仁粉不作任何处理, 直接抽提;

②对照(II)——棉籽仁粉经过相同条件处理(培养基的灭菌、调湿、烘干相同), 但不接种

表2 固态发酵的棉酚脱毒率(棉籽饼粉)

Tab.2 The reduction of free gossypol in cottonseed meal (oil extracted) by solid-state fermentation

项目	对照(I)	对照(II)	01	37	57	78	G-1
残留游离棉酚含量(%)	0.0456	0.0307	0.0080	0.0080	0.0095	0.0085	0.0097
微生物脱毒率(%)	—	—	74.1	74.1	69.2	72.3	68.5
总脱毒率(%)	—	32.7	82.5	82.5	79.2	81.4	78.8

注: 对照(I)和对照(II)同表1所注, 但材料为棉籽饼粉

另挑选5株诱变选育的棉酚耐受菌株, 经固态发酵后测定脱毒率。其中, 脱毒率最高者达64.5%。

2.3 棉酚耐受菌株的初步鉴定

对不产黄曲霉毒素的5株高脱毒率霉菌: 01、37、57、78和G-1号菌株在①、②号培养基上进行点植培养、载片培养。同时检查了各菌株的蔡氏培养物上清液与氯化

高铁水溶液的反应情况。参考有关的鉴定资料、手册^[9-14],根据各菌株的形态和培养特征,初步确定,01号菌为梨孢霉属(*Scopulariopsis* sp.),G-1和57号菌为曲霉属(*Aspergillus* sp.),37号菌为串珠霉属(*Monilia* sp.),78号菌为红曲霉属(*Monascus* sp.)。

2.4 营养分析和营养价值

经01号菌株发酵以及不经任何处理(作对照)的棉籽仁粉、棉籽饼粉的蛋白质、氨基酸含量见表3。由表3可见,经过发酵后,棉籽仁粉、棉籽饼粉蛋白质含量提高的百分率分别为5.18%和5.75%(若把含水量统一为5.57%,那么发酵组棉籽仁粉棉籽饼粉与对照组棉籽饼粉的蛋白质含量折算后分别为41.61%、57.0%和53.9%);发酵后棉籽仁粉和棉籽饼粉氨基酸总量提高的百分率分别为7.34%和21.91%(含水量也统一为5.57)。棉籽饼粉发酵后氨基酸含量的增加幅度很大,这可能是因为棉籽饼粉中棉酚等毒性物质含量很小,霉菌能很好地生长而不受抑制,能产生较多的菌体蛋白和氨基酸。由表3还可看出,几种必需氨基酸(表3中有*号者)含量都有显著的提高。

表3 棉籽仁、饼粉固态发酵前、后蛋白质和氨基酸含量
Tab.3 Protein and amino acids content in fermented and non-fermented cottonseed meal and kernel meal

处 理	棉籽仁粉		棉籽饼粉	
	发酵组 (I)	对照组 (I)	发酵组 (II)	对照组 (II)
蛋白质含量(%)	41.14	39.54	50.04	49.29
水份(%)	6.64	5.57	17.03	13.64
氨 基 酸				
*门冬氨酸	3.3398	3.2896	3.5598	3.0213
*苏氨酸	1.0475	0.9103	1.1050	0.9144
丝氨酸	1.2312	1.0674	1.3441	1.1178
谷氨酸	8.8169	8.3979	9.3361	7.8009
脯氨酸	1.2813	1.0601	1.2844	1.0012
甘氨酸	1.6358	1.5134	1.6665	1.3941
丙氨酸	1.6996	1.4456	1.5586	1.3519
胱氨酸	0.6033	0.5539	0.4755	0.4616
*缬氨酸	1.9636	1.7653	1.8719	1.5999
甲硫氨酸	0.4047	0.4587	0.4256	0.3226
*异亮氨酸	1.2173	1.0915	1.2026	1.0310
*亮氨酸	2.2910	2.1247	2.3099	1.9808
酪氨酸	1.0841	1.0055	0.9817	0.8545
*苯丙氨酸	2.1002	1.9692	2.0752	1.7625
*赖氨酸	1.6569	1.5781	1.5856	1.3934
(%) 氨	0.6037	0.5188	0.6027	0.5291
组氨酸	1.0768	1.0571	1.0459	0.9079
色氨酸	—	—	—	—
精氨酸	4.1452	4.3357	3.9886	3.6273
总计	36.23%	34.14%	36.42%	31.07%

2.5 安全性分析

2.5.1 黄曲霉毒素含量 几株霉菌的固态发酵物黄曲霉毒素 B_1 (Aflatoxin B_1 , 简称AFTB $_1$)的含量见表4。其中,01、37、57、78和G-1号菌株均不产生AFT,其

产品AFT含量低于国家规定的大米中允许含量标准(10ppb以下),更低于饲料中允许含量标准(美国规定为20ppb以下)。所以,01、37、57、78和G-1号菌株制成的饲料安全可靠。09号菌株的发酵产物黄曲霉毒素含量略高于允许标准,不宜采用。

表4 受检菌固态发酵物AFTB₁含量Tab.4 The AFTB₁ content in fermented cottonseed kernelmeal

菌株	对 照 (I)	对 照 (II)	01	09	37	57	78	G-1
黄曲霉毒素B ₁ 含量	4.6	未检出	5.8	22.6	7.7	6.6	未检出	4.2

注:对照(I)和对照(II)同表1注

2.5.2 动物毒性试验 试验结果如表5。由表5可见,第①、②组小鼠(即40%棉籽仁粉组)在开始饲养的第42、66天分别有一只死亡,其它生长正常。以②组的增重率为100%计,那么①组的增重率为141%。第③、④组小白鼠的生长情况受影响较大。第④组的小白鼠从饲养的第26天开始陆续死亡,至第40天,10只小白鼠全部死亡。第③组在饲养的第22天、30天分别有1只小白鼠死亡,但其余8只仍生存,但生长速度很慢,增重率较小(22.5%),生长受到一定的抑制。

表5 小白鼠毒性试验结果

Tab.5 The result of the animal toxicity test

项 目	40%棉籽仁粉+60%混合粉		纯棉籽仁粉	
	发酵组 ①	对照组 ②	发酵组 ③	对照组 ④
残留游离棉酚含量(%)	0.0344	0.0631	0.0860	0.1519
总棉酚含量(%)	0.5516	0.4509	1.382	1.268
小白鼠原重(g/10只)	166.75	164.7	112.0	113.0
饲养后重量	第55天	---	110g/8只	---
	第75天	230g/9只	205g/9只	---
增重率(%)	52.7	37.8	22.5	---

3 讨 论

在自然界筛选到的5株不产毒霉菌,微生物脱毒率达61%以上,加上发酵前原料灭菌处理同时产生的热脱毒,可以使对棉籽饼粉的总脱毒率达到79%—83%,游离棉酚含量低达0.008%;对棉籽仁粉(未榨过油)的总脱毒率达到80%—90.6%,游离棉酚含量降到0.1%—0.07%,脱毒效率不亚于其他的脱毒工艺。目前,脱毒效率最高的是极性溶剂浸出法,脱毒率达92.0%¹⁾。但是,目前各地油厂,只少数具有浸提设备,而大多数油厂仍采用一次性榨油,不具浸提设备,不宜采用预榨浸出工艺。微生物脱毒工艺,因采用固态发酵方法因而大大简化了设备和工艺流程,又能满足脱毒要求,是一种投资少、投产快、成本低、三废少、效率高的脱毒工艺。

1) 新疆八一农学院应用化学研究室,生物应用化学论文集,1986, P.53—75

此外,微生物脱毒处理的整个过程都比较温和,而且不外加任何化学制剂、有机溶剂,不会破坏其原有的营养成分,也不会因残存的有机溶剂而产生异味。相反,它能在脱毒的同时生成菌体蛋白和维生素。菌丝蛋白中,必需氨基酸尤其是赖氨酸、蛋氨酸含量很高^[15]。本实验测定结果也表明,发酵后的棉籽仁粉、棉籽饼粉中蛋白质、氨基酸含量都得到了提高。此外,真菌发酵后还能产生香味。因此,经过微生物脱毒后,棉籽粉的营养价值和食用价值都得到了提高。这是本法优于其他脱毒工艺的独特之处。

参 考 文 献

- [1] 高振川, 饲料研究, 1980, 11, P. 2~4
 [2] 刘毓湘, 国外农业科技, 1984, 7, P. 15~22
 [3] 厉秋岳等译, 粮食科技译丛, 1966, 3, P. 26~30
 [4] 万良才, 饲料研究, 1983, 6, P. 8~9
 [5] 陈祥奎, 食品与发酵工业, 1982, 1, P. 67~75
 [6] 冯清平等(编), 微生物应用技术, 甘肃人民出版社, P. 182~185
 [7] Boatner C H et al., *Industrial and Engineering Chemistry*, 16 (1944), 566~572
 [8] Hall C M et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 25(1984), 457~461
 [9] 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, 科学出版社, 1973, P. 250—254
 [10] 徐浩(译), 工业真菌学纲要, 科学出版社, 1964, P. 172, 228
 [11] 李茹光, 吉林省有用和有害真菌, 吉林人民出版社, 1986
 [12] 周德庆(主编), 微生物学实验手册, 上海科学技术出版社, 1986
 [13] 魏景超, 真菌鉴定手册, 上海科学技术出版社, 1979
 [14] 沈崇尧(译), 半知菌属图解, 科学出版社, 1977
 [15] 林伯荃, 工业微生物, 1985, 6, P. 12~14

Detoxication of Free Gossypol in Cottonseed Meal by Microorganisms

Chung Yinchuang* Wu Lingjuan

Abstract

Five strains of molds which are able to detoxicate free gossypol were screened from mildewed cottonseed meal. They were selected by using Czapek medium containing 0.4% gossypol. These molds were initially identified as *Scopulariopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Monilia* sp., and *Monascus* sp.. After the cottonseed meal was fermented in solid-state by these organisms, the reduction of free gossypol ranged from 60% to 74%. The nutritional value of the fermented material improved considerably and no aflatoxin can be detected. The animal toxicity test also confirmed that the toxicity of the fermented cottonseed meal is reduced.

Keywords gossypol, microbial detoxication cottonseed meal

* Department of Biology