

菜籽粕发酵脱毒的一些影响因素*

周世宁 钟英长

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要 报告了菜籽饼粕发酵脱毒的菌种复壮方法及脱毒辅助剂. 应用芥子甙的酶分解产物异硫氰酸酯类, 通过产物耐受性筛选法, 获得提高了脱毒率的曲霉 (*Aspergillus* sp.) 菌株. 从饲料添加剂中寻找找到一种可增强发酵脱毒效果的脱毒助剂, 并试验了影响发酵脱毒的各种因子.

关键词 异硫氰酸酯, 菜籽粕, 发酵, 脱毒添加剂

分类号 TQ 920.1

菜籽粕脱毒方法多年来已在世界范围进行了研究^[1-3]. 微生物发酵脱毒法在很多方面可以克服物理和化学法的缺点, 因而发酵法近来受到了重视. 早在 1958 年 Reese 等人^[4]已发现真菌经培养可产生芥子甙酶, 随后 Ohtsuru 等也研究真菌芥子甙酶; 至 1974 年, Poznanski 等人^[5]试验了霉菌和细菌的发酵脱毒作用, 但可能由于发酵需要利用乳品厂的乳清作基质, 因而没有广泛推广意义. 近年, 我们分离到一株能降解芥子甙的曲霉菌 (*Aspergillus* sp.), 并应用于菜籽饼粕脱毒^[6]. 此菌在菜籽饼粕原料上快速生长, 并使固态发酵产物的毒素含量降低, 适口性大为改善. 然而, 由于经济上考虑而采用的固态发酵法, 使该菌的脱毒能力不能充分发挥, 而且该菌的脱毒力在使用过程有下降倾向, 因而造成有时产物中毒素残留量仍然偏高. 本文将报道一种能增强微生物发酵产物脱毒效果的饲料添加剂, 与其使用有关的基本研究和通过产物耐受力选择法进行菌种复壮的方法和结果.

1 材料与方 法

1.1 菌种和培养基

曲霉 R10 菌株为本组分离. 菌种保藏斜面培养基用马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA). PDA 还用于菌种复壮平板.

1.2 药 品

芥子甙 (sinigrin) 为 Sigma 公司产品. 异硫氰酸苯酯为第二军医科学院产品. 饲料添加剂为本地市场购入.

1.3 菌种复壮

原种孢子接种于异硫氰酸苯酯浓度为 0.1 g/L 的 PDA 平板, 28°C, 培养至孢子成熟, 从中挑选生长快孢子茂盛的菌落, 重复先前操作接种于含更高浓度异硫氰酸苯酯的 PDA 平板, 至异硫氰酸苯酯浓度为 0.3 g/L 的平板上长出菌落后, 选取菌落试验产酶能力, 脱毒能

* 收稿日期: 1996-01-19 周世宁, 男, 49 岁, 副教授

力及生长特征,留取具优良特征者。

1.4 固态发酵

种子制备:斜面菌种接种于灭菌麸皮培养基,28°C,约 3 d 长成孢子,作发酵种子。

发酵:菜籽饼粕 97 g,麸皮 2 g,种子 1 g,加水 60 mL,28°C,24 h,烘干成产品。各种添加剂可溶于水后与菜籽粕混合。

1.5 真菌芥子甙酶活力测定

粗酶制备:将斜面菌种接入马铃薯葡萄糖-芥子甙(100 mg/g)液体培养基中,28°C,振荡培养 3 d,离心取上清作粗酶液。

芥子甙酶活力测定:参照 Palmieri 等人方法^[7],经预热至 37°C 的 2.85 mL H₂O 被加入 0.5 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)0.25 mL,芥子甙溶液 0.15 mL(含芥子甙 0.15 mg)和粗酶液 0.5 mL,于 37°C 反应 3 min,测定波长 227 nm 处的光吸收,据消光系数 $\epsilon = 6784 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算酶活。酶活力单位规定为,在本反应条件下,每分钟使 1 nmol/L 芥子甙降解所需的酶量为 1 酶活单位。

1.6 固态物料的毒素测定^[8]

干样品 200 mg 放于 10 mL 离心管中,每管加入 2 mL 芥菜籽粗酶液,轻摇混匀,于 40°C 振荡保温 2 h,加入 5 mL 二氯甲烷,充分提取毒素,离心分离,抽取二氯甲烷层 100 μ L 加到 6 mL 氨乙醇(1:4)溶液中,另抽取 100 μ L 加到 6 mL 95%乙醇中,将两反应管置于 50°C 水浴保温 2 h,用紫外分光光度计测定 2 管反应液在波长(λ /nm) 235, 245 和 255 三处的吸光度(A)。以纯二氯甲烷的氨乙醇或 95%乙醇溶液作参比液。毒素计算:

$$A_{245_{\text{E}}} = A_{245} - (A_{235} + A_{255}) / 2$$

$$C_{\text{TC}} (\text{mg/g}) = A_{245_{\text{E}}} \times 28.55$$

$$C_{\text{OZT}} (\text{mg/g}) = A_{245_{\text{E}}} \times 22.10$$

芥菜籽粗酶制备:为了制备芥子甙酶,以预冷蒸馏水 75 mL 混悬 25 g 芥菜籽粉末,在 4°C 浸提 1 h,离心分层,取上清,加入等体积预冷的乙醇,放冰箱 1 h,离心收集沉淀,沉淀用 70% 的冷乙醇洗 2 次,离心得粗酶。使用时将粗酶溶解于约 40 mL 柠檬酸磷酸盐缓冲液中,制成的粗酶液,可供约 40 个样品测定。

2 结果

2.1 菌种的脱毒力

高水平脱毒能力的菌种是确保发酵脱毒能够实用化的关键因素。曲霉(*Aspergillus* sp.) R10 菌株具有相当水平的去除菜籽粕中芥子甙毒素的能力。这一能力在菌种保藏的多代转接过程有降低倾向。应用异硫氰酸酯平板能够淘汰脱毒力低的菌株,选择出具有高脱毒力的菌株。R101 和 R102 是由 R10 出发,经异硫氰酸酯法筛选得到的两个菌株,经液态诱导培养后,在培养液中它们产生的胞外芥子甙酶活性均比出发菌株提高了约 30%。它们的固态发酵脱毒率也明显高于原菌株,R101 脱毒率提高了 16%,R102 提高了 18% (表 1)。因此异硫氰酸酯耐受菌株筛选法可以用于菌种脱毒性能的维持和复壮。

表 1 菌株 R10, R101和 R102的芥子甙酶活力及脱毒率

Tab. 1 Activity of myrosinase and detoxification rate of R10, R101 and R102

项 目	R10	R101	R102
芥子甙酶活力 ($\times 10^4$ /L)	2. 26	2. 89	2. 92
总脱毒率 (%)	30. 0	46. 3	48. 1

2.2 饲料添加剂对发酵脱毒影响

试验了 20 多种常用饲料添加剂对菜籽粕固态发酵脱离的影响。在饲料配方允许量的范围内, 这些添加剂分别加入菜籽粕原料中, 然后经接种、发酵和干燥过程, 产物的 ITC 和 OZT 毒素含量被检测。图 1 是其中一组试验的结果。这一试验中, 加入了添加剂 CP 的样品, ITC 和 OZT 的检出量最低, 加入了腐植酸 HA 的样品 ITC 和 OZT 的量有轻度的降低。其它添加剂赖氨酸 (Lye), FeSO_4 , KI 和已在我国市场流通的菜籽粕专用脱毒添加剂 6107 对发酵产物毒素水平没有明显的影响。

图 1 各种添加剂的助脱毒作用

Fig. 1 Effect of additives on fermentative detoxification

1 原料; 2 发酵; 3 CP; 4 HA; 5 Lye;
6 Fe^{2+} ; 7 KI; 8 添加剂 6107

图 2 不同 CP 浓度对脱毒的影响

Fig. 2 Effect of CP concentration on detoxification

2.3 添加剂 CP 的使用浓度

进一步的试验表明, 随着发酵原料中加入的添加剂 CP 量的增加, 产物中 ITC 和 OZT 量相应减少 (图 2)。在不加 CP 的情况下, 接种固态发酵 24 h, 毒素降低 48%, 当 CP 量增加至 650 mg/kg 时, 产物毒素含量降低 91%。一般每克原料含毒素 ITC 和 OZT 的总量约 5 mg, 这时如使用 325 mg/kg 的 CP 浓度, 产物中残余毒素为原料毒素的 17%, 实际含量为 0.85%。这一水平能为饲料工业所接受。

2.4 添加剂 CP 的非发酵脱毒作用

在非发酵情况下, 添加剂 CP 也可以降低菜籽饼粕的 ITC 和 OZT 含量, 毒素降低幅度同样随着 CP 的添加量增加而增大 (图 2)。在每一试验的 CP 浓度下, 同时接种发酵均比单独应用 CP 的脱毒效果好, 也比单独发酵效果好。然而在添加了 CP 的情况下发酵脱毒的总

脱毒率并不简单地等于发酵脱毒作用及 CP 脱毒作用的总和。

热处理能够提高添加剂 CP 的脱毒率。在实验中加入了不同浓度的 CP 的菜籽粕,按 1 : 1 与水混合,然后分成二份,一份经 120°C 烘 20 min,另一份不经热烘干直接用于毒素测定,样品经快速测定水份,以相同干重比较两部分产物的脱毒率。结果表明在不同浓度 CP 存在时,热处理步骤均使脱毒率提高了 45% ~ 53% (图 3)。

图 3 热处理对 CP 脱毒作用的影响

Fig. 3 Effect of heat treatment on detoxification

图 4 添加剂 CP 对发酵过程毒素变化的影响

Fig. 4 Effect of CP on detoxification during fermentation

2.5 添加剂 CP 对发酵过程毒素变化的影响

从实验结果可知,当 200 mg /kg CP 存在时的脱毒作用较快。CP 溶液与菜籽粕混合后,6 h 开始定时取样测定 ITC 和 OZT 毒素含量,发现 6 h 的作用已使毒素总量下降 52%,12 h 后脱毒作用已几乎平衡,达到最大值。从图 4 可看到,加入了 CP 的发酵,在开始的 6 h,毒素下降最快,这时物料尚未升温,发酵尚未进入生长旺盛期;而在不加 CP 的发酵中,开始几小时毒素变化缓慢,6 h 后,随着微生物生长的加快,发酵物料温度升高,毒素下降速度加快,至 24 h 时,毒素仍呈下降趋势。这与添加了 CP 的发酵情况很不同。

3 讨论

异硫氰酸酯是母体分子芥子甙降解产物的一种,不仅对动物有伤害作用,也是一种强烈的杀菌剂,不少微生物对其敏感。曲霉 R10 菌株在异硫氰酸苯酯浓度 0.4 g /L 时,3 d 内平板无菌生长。异硫氰酸酯类物质还是一类致突变试剂,因而可能具有诱变作用。用异硫氰酸苯酯筛选出来的菌株,具有一种特点,则有耐受高浓度芥子甙分解产物异硫氰酸酯的能力,这是高脱毒力菌株须具备的基本特征,因此这一筛选方法能够得到高脱毒力的菌株,而且这些菌株很可能具有进一步降解这些毒素的能力,而通常情况下,芥子甙的降解产物 ITC 和 OZT 依赖烘干过程除去,部份可能会在发酵过程挥发释放于空气中。

添加剂 CP 是常用饲料添加剂的组分之一,能有效促进牲畜的生长。本研究已发现,在菜籽粕发酵过程若加入添加剂 CP,可使产物的毒素检出量大大降低。这样用此法生产的菜籽饼蛋白饲料不仅毒性降低,且还同时起饲料添加剂的本来作用。

迄今尚不清楚添加剂 CP 是如何引起毒素降低的。在试验中 CP 能在短时间内降低毒

素的检出量,这似乎表明 CP 具有降解芥子甙的可能性。以芥子甙作初步试验中,CP 的作用产物在葡萄糖氧化酶—过氧化氢酶双酶法检测中显出红色,通常只有葡萄糖存在时才会发生这一反应。CP 是否真正使芥子甙断裂产生葡萄糖,有待进一步试验。另外,我们也正在进一步探讨 CP 对微生物酶促脱毒作用的影响。

值得提出的是,添加剂 CP 虽然可以使毒素 (ITC 和 OZT) 总量降低,但未经接种发酵的菜籽粕,其综合品质,如植酸量、丹宁量及适口性等指标,明显不如经过发酵的产物,因此,微生物发酵与添加剂 CP 使用的结合可能是一种值得推荐的菜籽粕脱毒方法。

参 考 文 献

- 1 廖峰. 棉菜籽饼脱毒方法的研究. 饲料研究, 1992, 2: 23~ 27
- 2 陈彩. 菜籽饼的开发利用综述. 饲料工业, 1990, 2: 25~ 28
- 3 夏尚培. 棉菜籽饼的加工与利用综述. 饲料工业, 1990, 2: 21~ 24
- 4 Reese E T, Clapp R C, Mandels M A. Thioglucosidase in Fungi. Arch Biochem Biophys, 1958, 75: 228~ 242
- 5 Poznanski S, Bednarski W, Jakubowski J. Use of whey in rapeseed meal detoxification. FSTA, 1975, 7: 596
- 6 Chung Y C, Xiao J M, Zhou S N. Detoxification of rapeseed meal by microorganism. In: Chang S T, Ed. The Proceedings of Symposium on Microbial and Engineering Technology in Wastes Treatment. HongKong The Commercial Press Ltd, 1990. 161~ 166
- 7 Palmieri S, Iori R, Leoni O. Comparison of methods for determining myrosinase activity. J Agric Food Chem, 1987, 35: 617~ 621
- 8 Wetter L R, Youngs C G. A thiourea-UV assay for total glucosinolate content in rapeseed meals. J Amer Oil Chem Society, 1975, 53: 162~ 164

Some Factors Affecting the Detoxification of Rapeseed Meal by *Aspergillus* Fermentation

Zhou Shining* Chung Yingcheung

Abstract A method of rejuvenescence for rapeseed meal detoxification strains of *Aspergillus* sp. was reported. The strains with higher detoxification rate were obtained by using potato dextrose agar plates containing isothiocyanate. A feed additive was effective in reducing the isothiocyanate and oxazolidnethione contents in fermented or nonfermented rapeseed meals. The detoxification rate was affected by different factors such as microorganism strains, additive content, temperature and time.

Keywords isothiocyanate, rapeseed meal, fermentation, detoxification additive

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275