

菜籽饼脱毒菌株的筛选及初步鉴定*

姜文波 李玉英 李家藻 杨 涛

(中国科学院西北高原生物研究所)

摘 要

采用硫脲-UV₂₄₅法和紫外吸收法测定发酵菜籽饼中毒素含量。并从青藏高原部分地区土壤中筛选可供菜籽饼脱毒的真菌 14 株, 还对其中脱毒效果最好的 NF49 真菌进行了鉴定。

关键词: 菜籽饼粉; 异硫氰酸盐; 噁唑烷硫酮; 米曲霉

菜籽饼中含有硫代葡萄糖苷 (glucosinolates), 它在一定条件下可分解为有毒的异硫氰酸盐 (isothiocyanates) 和噁唑烷硫酮 (vinyl thiooxazolidone), 因此解决菜籽饼中的含毒问题, 对提高其饲用价值有着重要的现实意义。近年来菜籽饼的脱毒和利用国内外研究较多, 主要有化学脱毒、物理脱毒和微生物发酵脱毒等方法。微生物发酵法脱毒的成本低, 而且还可以提高其营养价值。此法关键是筛选出能够快速脱毒的菌株。青海省菜籽饼资源非常丰富, 因此我们对菜籽饼的微生物发酵脱毒进行了研究, 其结果报道如下。

一、菜籽饼脱毒菌株的筛选

(一) 供试菌株

供筛选用的真菌是从青藏高原部分地区土壤中用查氏琼脂平板法分离得到的, 共 92 株。

(二) 菜籽饼的发酵

菜籽饼经粉碎后加入适量水, 接入供筛选用的菌株, 在 27°C 的条件下进行发酵, 3 天后测定其中的毒素含量。

* 王启兰、孙希春和安华参加部分工作, 特此致谢。

本文 1989 年 12 月 16 日收到。

(三) 菜籽饼中异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮含量的分析测定

菜籽饼中毒素的含量通常有 2 种方式来表示, 一种用硫代葡萄糖苷的总量表示, 另一种用异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮的含量表示。测定方法很多, 将几种常用的方法进行比较, 从中选出较适合的方法。

1. 硫酸钡重量法 (徐义俊, 1980): 在没有紫外分光光度计时测定未发酵的菜籽饼效果较好, 其测定值用硫代葡萄糖苷的含量表示。但菜籽饼发酵后, 其中大量的硫代葡萄糖苷被微生物分解成为硫酸根离子, 测定时增大了相对偏差, 结果其精确度和重复性不能满足菌种筛选的要求。

2. 硫苷钯复合物 (Pd-glucosinolate complexes) 比色法 (Thies, 1982; 吴谋成等, 1983): 可快速准确地测定菜籽饼中的硫代葡萄糖苷的含量。但发酵后的菜籽饼处理时, 上清液大多都是带有颜色的溶液, 其最大吸收波长和形成的硫苷钯复合物的最大吸收波长非常接近, 严重影响了比色结果的准确性。从几十个样品的测定结果看出不理想。

3. 硫脲-UV₂₄₅ 法 (Wetter 等, 1976): 能快速准确且不受发酵产生的色素的影响。在无气相色谱的条件下, 用此法测定异硫氰酸盐的含量重复性较好, 但测定噁唑烷硫酮含量的灵敏度较差 (每克样品中噁唑烷硫酮含量必须大于 0.15 毫克)。

4. 气相色谱、紫外吸收联用法 (中国农业科学院油料研究所油菜品质育种组, 1982):

表 1 用不同真菌接种后的发酵菜籽饼中残留的
异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮含量及其蛋白酶活性

Table 1 Contents of remained isothiocyanates and vinyl thiooxazolidone, and activities of proteinase in fermented rapeseed meals inoculated with different fungal strains

真菌菌株 Fungal strains	异硫氰酸盐含量 (毫克/克) Content of isothiocyanates (mg/g)	噁唑烷硫酮含量 (毫克/克) Content of vinyl thiooxazolidone (mg/g)	蛋白酶活性 [毫克酪氨酸/(克·分)] Activities of proteinase [mg Tyr/(g·min)]
NF48	0.84	0.32	0.953
NF49	0.00*	0.00*	3.758
NF53	0.64	0.63	1.271
NF54	0.51	0.48	1.609
NF59	0.98	0.72	2.475
NF60	0.24	0.84	1.053
NF61	0.99	0.47	4.758
NF62	1.08	0.96	1.943
NF63	0.47	0.76	1.693
NF64	1.52	0.27	2.673
NF65	1.08	0.97	1.898
NF66	1.29	0.50	1.582
NF67	0.53	1.04	2.057
NF68	0.92	0.87	2.374
未发酵菜籽饼 Unfermented rapeseed meals	5.89	2.32	—

* 未测出。

Not determined.

本方法用气相色谱和紫外分光光度计分别测定异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮的含量,其测定结果准确性和重复性都较好。

综上所述,试验中采用硫脲-UV₂₄₅法测定异硫氰酸盐的含量,用紫外吸收法测定噁唑烷硫酮的含量。结果可以满足菜籽饼脱毒菌株筛选工作的需要,经部分菌株发酵的菜籽饼中异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮含量见表1。

(四) 发酵后菜籽饼中蛋白酶的活性

菜籽饼中含有部分动物难以消化的植物蛋白,为了提高它的营养价值,我们把发酵后产品中蛋白酶活性的大小也作为筛选菌株的一个指标。蛋白酶活性用天津轻工业学院等(1980)方法进行测定(表1)。其中NF49、NF61的蛋白酶活性较高。

(五) 菜籽饼脱毒菌株的筛选结果

对92株真菌进行了测定和筛选,结果指出,发酵后异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮含量较低而蛋白酶活性较高的菌株共14株(表1)。

未发酵菜籽饼中的异硫氰酸盐和噁唑烷硫酮含量分别为5.89毫克/克和2.32毫克/克。从表1可以看出,14株真菌的脱毒效果都极显著。其中NF49菌株脱毒效果最好。

二、菜籽饼脱毒菌株的鉴定

对14株真菌进行鉴定时,真菌用查氏琼脂培养基进行培养,镜检用Melzer氏溶液作封片剂,镜检和显微摄影用的显微镜为德国蔡司厂生产的Nu型万用显微镜。

经初步鉴定,在14株真菌中有曲霉属10株(NF48, NF49, NF53, NF59, NF61-65和NF67),毛霉属2株(NF54和NF68),根霉属1株(NF60),木霉属1株(NF66)。选用其中脱毒效果最好且蛋白酶活性较高的NF49菌株进行了较详细的形态观察和分类鉴定。

NF49菌株为曲霉属,经点植培养、盖片培养和镜检观察,其分类学特征描述如下。

菌落 在查氏琼脂平板上生长迅速,经25°C培养10天后菌落直径达5.5—6.0厘米(图版I:1)¹⁾,营养菌丝大多长在基质内(图版I:2),从培养基内长出的菌丝体可形成分生孢子结构和气生菌丝。菌落开始为白色,随着分生孢子的成熟,菌落变为淡绿黄色。老年时(生长10天以后),菌落颜色由绿黄色变为暗褐色。菌落背面有皱纹,微带淡土黄色。无明显气味。

分生孢子头 呈放射状,大小不等,直径为75—176微米(图版I:2)。

分生孢子梗 多从基内菌丝上直接长出(图版I:2),无色,较长(196—1133微米),顶端靠近顶囊处变粗,达4.8—11.2微米(图版I:3a, 3b)。分生孢子梗的表面不光滑,显得有些粗糙。

顶囊 呈亚球形,也有瓶形的,但较少。瓶梗遍布于全部顶囊表面(图版I:3),

1) 本文图版在第199页。

壁较薄，顶囊大小一般为32微米左右。

瓶梗 单层，瓶形，大小一般为8—13微米（图版I:3）。

分生孢子 呈球形、亚球形到椭圆形（图版I:4），大小不等，3.5—6.4微米，以4.6微米的较多。分生孢子的表面几乎是光滑的，无刺。

根据《曲霉属鉴定手册》（Raper等，1965），NF49菌株是黄曲霉群中的米曲霉（*Aspergillus oryzae*）。与Raper等记载的米曲霉的标准分类学特征相比较，基本的主要特征相同，但在某些次要方面（如菌落背面有淡土黄色、瓶梗较短等）又略有差异，可以认为NF49菌株是米曲霉的一种生态型。

三、结 语

将筛选到的NF49菌株用于菜籽饼发酵的工业生产，产品中的异硫氰酸盐的含量由发酵前的6.33毫克/克降至0.39毫克/克，噻唑烷硫酮由1.39毫克/克降为0.05毫克/克；产品按中国预防医学科学院标准（1988）处方法测定黄曲霉毒素B₁，其含量为5.35微克/千克，均符合饲用标准。

发酵的产品还进行了蛋鸡饲喂实验，结果表明，它可以代替部分大豆饼粉和鱼粉来饲喂蛋鸡，经济效益相当可观。

参 考 文 献

- 天津轻工学院、大连轻工学院、无锡轻工学院、华南工学院，1965，工业发酵分析，轻工业出版社，90—92。
中国农业科学院油料研究所油菜品质育种组，1982，菜籽饼异硫氰酸盐和噻唑烷硫酮的定量测定——气相色谱、紫外吸收联用法，中国油料，(4): 9—13。
中国预防医学科学院标准处，1988，食品卫生国家标准汇编，中国标准出版社，410—415。
吴谋成、黄荣汉，1983，油菜籽（饼）中硫代葡萄糖甙总量的快速定量测定，华中农学院学报，2(3): 73—81。
徐义俊，1980，芥子甙的测定方法，中国油料，(4): 63—66。
Raper, K. B. and D. I. Fennell, 1965, The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
Thies, W., 1982, Complex-formation between glucosinolates and tetrachloropalladate(II) and its utilization in plant breeding, Fette Seifen Anstrichmittel, 84(9): 338—342。
Wetter, L. R. and C. G. Youngs, 1976, A thiourea-UV assay for total glucosinolate content in rapeseed meals, J. Amer. Oil Chem. Soc., 54(2): 162—164。

SCREENING AND PRELIMINARY IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS FUNGI FOR DETOXIFICATION OF RAPESEED MEALS

Jiang Wenbo, Li Yuying, Li Jiazao and Yang Tao

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining)

Two toxins— isothiocyanate (ITC) and vinyl thiooxazolidone (VTO) in rapeseed meals used as feedstuff were harmful to animals. In order to find out the most effective detoxificant strain of filamentous fungi, a simple and rapid method for determination of ITC and VTO contents in fermented rapeseed meals previously inoculated with fungal cultures was developed and introduced in this paper. After ground and defatted, the ITC and VTO contents of the rapeseed meals were determined by thiourea-UV and UV spectrophotometry respectively.

Using this method, 14 detoxicated strains had been screened out from 92 strains of fungi isolated from the soil of Qinghai-Xizang Plateau. The contents of remained ITC and VTO in fermented rapeseed meals inoculated with different fungal strains were shown in Table 1.

The identification results showed that among 14 strains of fungi, ten belong to the genus of *Aspergillus*, two belong to the genus of *Mucor*, one is *Rhizopus* sp., and the other one is *Trichoderma* sp. The most effective strain NF. 49 has been identified. It is an ecotype of *Aspergillus oryzae*, and has been used in the industrial production of detoxicated rapeseed meals.

Key words: Rapeseed meals; Isothiocyanates; Vinyl thiooxazolidone; *Aspergillus oryzae*