

两株真菌降解菜籽饼中植酸的研究

香卫钦* 钟英长

(中山大学生命科学学院生化系 广州 510275)

摘 要 利用选择性培养基从土壤中分离到两株能降解植酸的丝状真菌。这些菌株能利用肌醇作为唯一的碳源和能源而生长。在液态发酵中植酸的降解率分别为 74.4% 和 95.0%; 在固态发酵中植酸的降解率为 40% 左右。某些金属离子对菌株的降解率的提高具有一定的促进作用。对温度、pH 和水分等影响因子也进行了初步的探讨。经初步鉴定, 这两株菌株中有一株为拟青霉 (*Paecilomyces* sp.), 另一株为青霉 (*Penicillium* sp.), 它们均不产黄曲霉毒素。

关键词 菜籽饼, 植酸, 降解, 拟青霉, 青霉

分类号 Q939.5

菜籽饼资源丰富, 粗蛋白含量高, 是一种宝贵的饲料蛋白资源^[1,2]。植酸是菜籽饼中一种抗营养物质, 菜籽饼中植酸含量达 4~8%^[3]。植酸的存在, 严重影响了菜籽饼的营养价值, 使其在饲料生产上的广泛应用受到了很大的限制^[4~8]。因此, 如何去除菜籽饼中的植酸, 使其营养价值提高, 从而使菜籽饼作为饲料蛋白能够广泛地应用于饲料工业, 是一个很有应用价值的研究课题。

水解植酸的植酸酶, 广泛地存在于动植物组织中^[9]; 此外, 许多微生物也能产生这种酶, 并有人对其特性作了研究^[10~14], 国外曾有人尝试用微生物的植酸酶水解饲料中的植酸, 以提高饲料的营养价值, 虽然其效果显著, 但用于生产酶的费用昂贵, 没有实际价值^[15~18]。而用微生物或其他处理方法降解菜籽饼中的植酸迄今尚未见报道。

利用微生物固态发酵进行植酸的降解, 具有投资少、工艺简便、耗能低和无三废等显著优点。本文旨在分离出能够降解植酸的菌株, 并通过固态发酵降解菜籽饼中的植酸, 以提高其营养价值, 同时, 对菌株的特性及其培养条件也进行了研究。

1 材料和方法

1.1 土样

将油菜籽用粉碎机磨碎后埋入土壤中, 五十多天后取土样两平皿, 供菌种分离用。

1.2 培养基

1.2.1 查氏 (Czapek) 培养基

1.2.2 营养琼脂

*现在地址: 广东省微生物研究所 广州 510070

收稿日期: 1996-08-27

1.2.3 植酸选择培养基: 植酸 20.0ml, NH_4NO_3 2.0g, K_2HPO_4 1.0g, KCl 0.5g, MgSO_4 0.5g, MnSO_4 0.01g, FeSO_4 0.01g, CaCl_2 0.02g, 蒸馏水 1000ml, pH5.5. $0.60 \times 10^5\text{Pa}$ 灭菌 30min. 需要时加入 2% 的琼脂配成固体培养基。

1.2.4 肌醇培养基: 肌醇 20.0g, NH_4NO_3 2.0g, K_2HPO_4 1.0g, KCl 0.5g, MgSO_4 0.5g, MnSO_4 0.01g, FeSO_4 0.01g, CaCl_2 0.02g, 蒸馏水 1000ml, pH5.5. $0.60 \times 10^5\text{Pa}$ 灭菌 30min.

1.2.5 固态发酵培养基: 菜籽饼粉 90%, 麦麸 10%, 水 60% (W / W)。

1.3 改良的魏氏试剂^[19]

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 磺基水杨酸 0.3g, 蒸馏水 100ml.

1.4 方法

1.4.1 菌种的分离及纯化: 称取一定量的土样, 用无菌水稀释后, 取 0.2ml 稀释液涂布于分离培养基平板上, 置 30℃ 培养箱培养, 挑取单菌落, 经平板划线纯化后, 转接斜面保存。

1.4.2 植酸含量的测定方法: 参照 Latta 和 Eskin 的方法^[19], 并对其测定方法略加改进。

1.4.3 菌种鉴定: 按《常见与常用真菌》的方法^[20]进行鉴定。

2 结果和讨论

2.1 菌种的分离和筛选

将土样稀释涂布于植酸选择培养基平板上进行分离, 一共分离出 49 株细菌和 11 株丝状真菌。

将细菌各菌株分别接种于植酸选择培养基中, 在 30℃ 的温度下摇床培养 48h 后离心, 取上清液测定其 A_{500} 光密度, 求出降解率。结果降解率最高的是 48[#] 菌株, 降解率为 60.6%, 其余的均低于 48[#] 菌株。几株有代表性的菌株的降解率见表 1。

真菌的各菌株也分别接种于植酸选择培养基中, 在 30℃ 摇床培养 48h 后用滤纸过滤除去菌丝得滤液, 测定其 A_{500} , 求出降解率。结果表明, 真菌降解植酸的能力明显比细菌强, 其中 B₃ 及 B₄ 降解率达到 90% 以上, 其余的菌株在 29.3% 至 80.5% 之间, 见表 2。

在所有分离得到的菌株中, 以丝状真菌 A₃ 和 B₃ 最具代表性, 它们分别属于两个不同的属。

表1 细菌各菌株在液态发酵时的降解率

Table 1 Degradation rate of phytic acid by various isolated bacteria

菌 株 Isolate No.	A_{500}	降解率 (%) Degradation rate
1	0.289	41.6
8	0.271	37.6
9	0.254	33.8
14	0.263	35.8
29	0.258	34.8
36	0.264	36.0
48	0.374	60.6
50	0.279	39.4
对照Control	0.103	--
空白Blank	0.550	--

注: 发酵温度为 30℃; 培养时间为 48h.

Note: Incubated at 30℃ for 48h.

对照: 植酸选择培养基 Control: Phytic acid selective medium.

空白: 蒸馏水 Blank: Distilled water.

表2 真菌各菌株在液态发酵时的降解率

Table 2 Degradation rate of phytic acid by various isolated molds

菌株 Isolate No.	A ₅₀₀	降解率(%) Degradation rate
A ₁	0.322	41.2
A ₂	0.408	63.8
A ₃	0.448	74.4
A ₄	0.277	29.3
A ₅	0.423	67.8
P	0.374	54.9
B ₁	0.353	49.3
B ₂	0.452	75.5
B ₃	0.526	95.0
B ₄	0.508	90.2
B ₅	0.471	80.5
对照Control	0.166	--
空白Blank	0.545	--

注: 发酵温度为30℃; 培养时间为48h.

Note: Incubated at 30℃ for 48h.

对照: 植酸选择培养基 Control: Phytic acid selective medium.

空白: 蒸馏水 Blank: Distilled water.

2.2 菌种的鉴定

将菌株 A₃和 B₃分别点种于查氏培养基平板上, 在 30℃ 培养 3~11d, 观察各菌落的生长情况和个体形态。

菌株 A₃菌落带蓝绿色, 边缘白色。菌落质地致密, 绒状; 菌丝具横隔, 分生孢子梗先端生有扫帚状的帚状枝。菌株 B₃菌落质地紧密毡状, 菌落白色, 偶尔带有浅绿色调, 但从不是真正的绿色, 背面橙黄色; 菌丝具横隔, 一簇小梗直接着生于菌丝上, 小梗上部逐渐变尖, 成为产生分生孢子的管状体。

根据菌株的培养特征及个体形态, 菌株 A₃初步

鉴定为青霉属 (*Penicillium* sp.), 菌株 B₃为拟青霉属 (*Paecilomyces* sp.)。

2.3 培养时间对菌株 A₃和 B₃的液态发酵降解率的影响

将菌株 A₃、B₃接种于植酸选择培养基中, 30℃ 培养 1、2、3、4 和 5d 后分别测定其降解率, 结果见图 1。由图 1 可见, 菌株 A₃ 30℃ 培养 2d 其降解率为 74% 左右, 3d 达到 95.2%, 4、5d 降解率提高很少, 3d 后菌株 A₃ 的降解率基本上达到最高; 菌株 B₃ 的降解率在 1d 和 2d 之间提高很快, 到 2d 时降解率达 95.0%, 3d 至 5d 之间略有提高。

2.4 pH 值对菌株降解率的影响

将菌株 A₃和 B₃接种至 pH2.0、3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0 及 9.0 的植酸选择培养基中, 在 30℃ 摇床培养 48h 后, 过滤除去菌丝, 分别测定其 A₅₀₀, 求出降解率, 结果见图 2。由图 2 可以看出, 菌株 A₃和 B₃的降解率在 pH 范围 3.0 至 5.5 之间较高, 这种现象与菌株嗜好偏酸性的生长条件有关。

2.5 温度对菌株生长的影响

温度在菌株的生长过程中是一个较重要的因素。将菌株分别点种于植酸选择培养基平板上, 分别在 11~15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 和 45℃ 的条件下培养, 在不同时间分别观察其生长情况。结果表明 (见表 3), 菌株在 11~15℃ 和 45℃ 的条件下均不能生长, 在 20℃ 时的长势较弱, 25℃ 至 35℃ 时适合于菌株的生长, 最适温度为 30℃。

2.6 植酸浓度对菌株降解率的影响

将菌株 A₃和 B₃分别接种于浓度为 1%、2%、3% 和 4% 的植酸液体培养基中, 在 30℃ 培

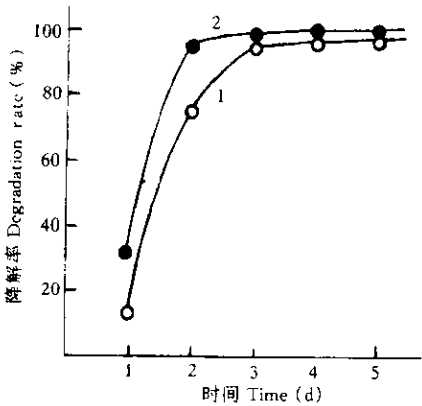


图1 培养时间对菌株 A₃ 和 B₃ 的液态发酵降解率的影响

Fig.1 Effect of incubation time on the degradation rate of phytic acid by isolates A₃ and B₃
1. A₃; 2. B₃.

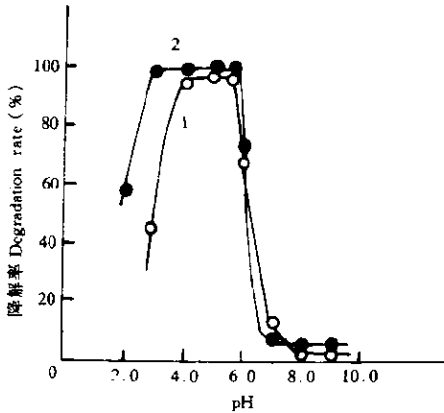


图2 pH 值对菌株 A₃ 和 B₃ 降解率的影响

Fig.2 Effect of pH on the degradation rate of phytic acid by isolates A₃ and B₃
1. A₃; 2. B₃.

养 48h 后, 过滤除去菌丝, 分别测定其 A₅₀₀, 求出降解率。结果表明 (见表 4), 随着植酸浓度的增加, 菌株的降解率有所下降。

表3 温度及培养时间对菌株生长的影响

Table 3 Effect of temperature and incubation time on growth of various isolates

温度 (°C) Temperature	24h		48h		72h	
	A ₃	B ₃	A ₃	B ₃	A ₃	B ₃
11~15	-	-	-	-	-	-
20	-	-	±	±	+	+
25	±	±	++	++	+++	+++
30	+	+	+++	+++	++++	++++
35	±	±	++	++	+++	+++
40	±	±	+	+	++	++
45	-	-	-	-	-	-

注: “-”, 表示不生长; “±”表示极少生长; “+”, 表示能够生长, 但长势较弱; “++”, 表示生长一般; “+++”, “++++”, 表示生长良好。

Note: “-”, No growth; “±”, Little growth; “+”, Poor growth; “++”, General growth; “+++”, “++++”, Good growth.

2.7 金属离子对菌株降解率的影响

将菌株 A₃ 和 B₃ 分别接种于含 Cu²⁺、Al³⁺、Zn²⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Fe³⁺ 和 Li⁺ 等离子 的植酸选择培养基中, 30℃ 摇床培养 48h, 过滤除去菌丝, 分别测定其 A₅₀₀, 求出降解率。金属离子的浓度为 0.01%, 结果见图 3。由图 3 可见, Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 对菌株 A₃ 和 B₃ 植酸的降解有抑制作用; 而 Zn²⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Fe³⁺ 和 Li⁺ 等金属离子则对菌株的植酸的降解有一定的促进作用。

表4 植酸浓度对菌株的影响

Table 4 Effect of phytic acid concentration on degradation rates

植酸深度(%) Phytic acid concentration	A_{500}			降解率(%) Degradation rate	
	A_3	B_3	对照Control		
				A_3	B_3
1	0.550	0.548	0.347	100	99.4
2	0.540	0.543	0.216	97.0	97.9
3	0.396	0.448	0.065	68.2	79.0
4	0.341	0.418	0.027	60.0	74.8

注: 发酵温度为30℃; 培养时间为48h.

Note: Incubated at 30℃ for 48h.

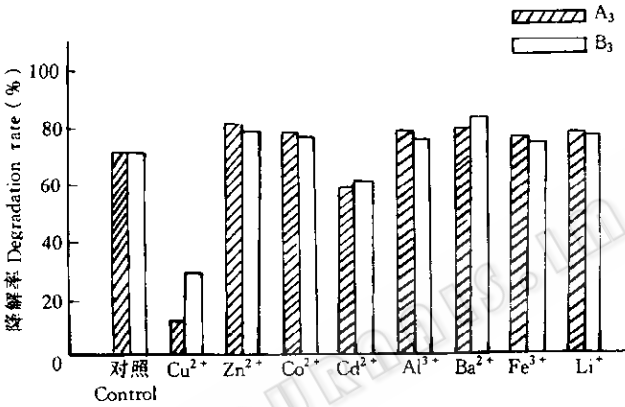


图3 金属离子对菌株的影响

Fig.3 Effect of metal ions on the degradation of phytic acid

也随之增大。

2.9 葡萄糖对菌株降解率的影响

微生物在培养基中含有速效碳源时一般会先利用较易代谢的碳源,然后才利用其他的碳源。

在植酸选择培养基中分别加入 0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的葡萄糖,将菌株 A_3 分别接种于其中,在 30℃ 摇床培养 48h 后过滤除去菌丝,测定其 A_{500} ,求出降解率,结果见图 5。由图 5 可见,葡萄糖的存在大大地降低了菌株 A_3 降解植酸的能力。这说明葡萄糖作为碳源比植酸更适合于该菌株的生长和利用。

2.10 无机磷对菌株降解植酸的影响

植酸在微生物的作用下可以分解出无机磷,微生物因而可以利用其而生长,只有无机磷能作为微生物生长的直接磷源。

在不含无机磷的植酸培养基中分别接种菌株 A_3 、 A_4 、 A_5 、 P 、 B_2 、 B_3 、 B_4 、 B_5 。在 30℃ 摇床培养 48h 后过滤除去菌丝,测定 A_{500} 光密度,求出降解率。从所得结果来看(见表 5),不加 K_2HPO_4 时菌株的降解率比在培养基中加入 K_2HPO_4 时的降解率低,各菌株受影响的程度

2.8 金属离子浓度对菌株的影响

将菌株 A_3 分别接种于 Cu^{2+} 和 Ba^{2+} 的浓度为 0.001%、0.002%、0.01%、0.05%、0.1% 和 0.2% 的植酸选择培养基中,在 30℃ 培养 48h 后过滤除去菌丝,分别测定其 A_{500} ,求出降解率,结果见图 4。由图 4 可见,金属离子 Cu^{2+} 对菌株 A_3 的抑制作用比较明显; Ba^{2+} 在 0.001%~0.2% 之间对菌株 A_3 有一定的促进作用,随着 Ba^{2+} 浓度的增加,其促进作用

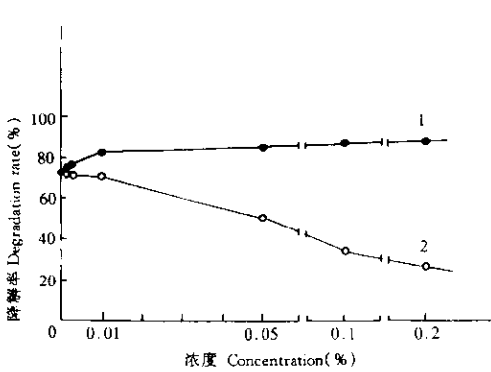


图4 铜离子和钡离子浓度对菌株的影响

Fig.4 Effect of Cu^{2+} and Ba^{2+} concentration on the degradation rate of Phytic acid

1. Ba^{2+} ; 2. Cu^{2+} .

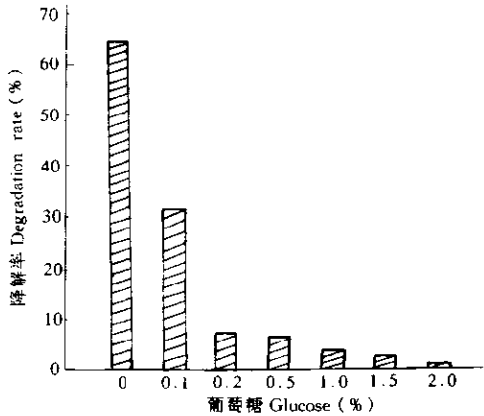


图5 葡萄糖对菌株 A_3 降解率的影响

Fig.5 Effect of glucose on the degradation rate of phytic acid by Isolate A_3

大小不一，菌株 B_5 受影响最大。

2.11 菌株对肌醇的利用

植酸在微生物的作用下分解产生肌醇^[7]。将菌株 A_3 、 A_5 、 P 、 B_3 、 B_4 和中山大学微生物室提供的对照菌株 $G-1$ 、 R_{10} 、 A_{35} 接种于肌醇培养基中，在 30°C 摇床培养 48h 后，观察各菌株能否利用肌醇作为其生长的唯一碳源。结果表明（见表 6），对照菌株 $G-1$ 、 R_{10} 和 A_{35} 均不能利用肌醇作为唯一碳源而生长；本实验所分离的菌株 A_3 、 A_5 、 P 、 B_3 和 B_4 在肌醇培养基上生长情况良好，都能利用肌醇作为唯一碳源而生长。

2.12 水分对菌株在固态发酵培养基中生长情况的影响

将菌种分别接入 30%、40%、50%、60% 和 70% 水分的固态发酵培养基中， 30°C 温箱培养，不同的时间观察菌体的生长情况，结果水分为 60% 的固态发酵培养基最适合于菌体的生长。

表5 无机磷对菌株降解率的影响

Table 5 Effect of Inorganic phosphate on the degradation rate of phytic acid

菌株 Isolate No.	A_{500}	降解率(%) Degradation rate
A_3	0.337	56.9
A_4	0.248	36.1
A_5	0.293	46.6
P	0.166	16.9
B_2	0.354	60.9
B_3	0.440	83.4
B_4	0.365	63.4
B_5	0.175	19.0
对照Control	0.094	--
空白Blank	0.521	--

注：发酵温度为 30°C ；培养时间为 48h。
Note: Incubated at 30°C for 48h.
 K_2HPO_4 的浓度为 0.1%。The Concentration of K_2HPO_4 is 0.1%.
对照：不含磷的植酸选择培养基Control: Phytic acid Selective Medium without K_2HPO_4 .
空白：蒸馏水Blank: Distilled water.

表6 菌株对肌醇的利用情况

Table 6 Utilization of inositol by various isolates

菌株 Isolate No.	生长情况 Growth
G-1	-
R ₁₀	-
A ₃₅	-
A ₃	++
A ₅	+++
P	+++
B ₃	++++
B ₄	++++

注:“-”,表示不能生长;“++”,“+++”,表示生长情况良好;“++++”,表示生长情况很好。

Note:“-”, No growth; “++”, “+++”, Good growth; “++++”, Excellent growth.

其余的菌株在 19.2% 至 40.0% 之间,结果见表 7。

表7 菌株在固态发酵时的降解率

Table 7 Degradation rate of phytic acid in solid-state fermentation by various isolates

菌株 Isolate No.	A ₅₀₀	降解率(%) Degradation rate	菌株 Isolate No.	A ₅₀₀	降解率(%) Degradation rate
A ₃	0.464	47.3	B ₃	0.455	40.0
A ₅	0.446	32.7	B ₄	0.453	38.6
P	0.429	19.2	对照Control	0.405	—

注:发酵温度为30℃;培养时间为48h。Note: Incubated at 30℃ for 48 h.

对照: 未经发酵的固态培养基。Control: Solid-state medium without fermentation treatment.

2.14 黄曲霉毒素的检测

某些真菌在代谢过程中会产生真菌毒素,在实际应用中应该避免使用产生真菌毒素的菌株。黄曲霉毒素是最常见的真菌毒素,尤以 B₁ 产生的量最多而且毒性最强。因此,一般测定黄曲霉毒素 B₁ 的含量代表样品中真菌毒素的含量。

菜籽饼固态发酵培养基经菌株 A₃ 和 B₃ 发酵后的固态发酵产物经高效液相色谱法检测其黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

菌株 A₃ 和 B₃ 的发酵产物的黄曲霉毒素 B₁ 的含量均少于 5μg / kg, 与不接种的对照相同,说明这两个菌株都不产生黄曲霉毒素 B₁, 结果见表 8。

2.13 菌株在固态发酵条件下的降解率

微生物固态发酵具有工艺简便,投资少等优点,便于工业上推广应用。固态发酵的降解率比较能直接反映工业生产上的实际情况。菌种经活化、扩大培养后,接入固态发酵培养基中,接种量大约为 2%,在 30℃ 培养至长满白色菌丝但未长孢子前将其烘干,然后分别测定其 A₅₀₀, 求出降解率。其中菌株 A₃ 的降解率为 47.3%,

表8 固态发酵产物黄曲霉毒素检测结果

Table 8 Production of aflatoxin by isolates A₃ and B₃

样品 Sample	黄曲霉毒素B ₁ 含量(μg/kg) Aflatoxin B ₁ content
A ₃	<5
B ₃	<5
对照Control	<5

参 考 文 献

- [1] 董京玉译. 饲料与畜牧, 1988, 5: 9~11.
- [2] 陈 彩. 饲料工业, 1990, 2: 25~28.
- [3] 陈新民. 中国油料, 1985, 4: 80~87.
- [4] Appelqvist L A. Rapeseed. Amsterdam: Elsevier Publishing Co, 1972. 354~375.
- [5] 苏 琪, 陆肇海, 段玉琴. 饲料研究, 1980, 2: 11~13.
- [6] 孙长春, 杨 凤, 端木道, 等. 中国畜牧杂志, 1990, 26(6): 5~8.
- [7] Shieh T R, Ware J H. *Appl Microbiol*, 1968, 16: 1348~1351.
- [8] 罗绪刚, 黄俊纯, 苏 琪, 等. 饲料研究, 1991, 6: 6~7.
- [9] Han Y W, Wilfred A G. *J Agric Food Chem*, 1988, 36(2): 259~262.
- [10] Cosgrove D J, Irving G C J, Bromfield S M. *Aust J Biol Sci*, 1970, 23: 339~343.
- [11] Greaves M P, Webley D M. *Soil Biol Biochem*, 1969, 1: 37~43.
- [12] Han Y W, Gallagher D J, Wilfred A G. *J Ind Microbiol*, 1987, 2: 195~200.
- [13] Shieh T R, Wodzinski R J, Ware J H. *J Bacteriol*, 1969, 100(3): 1161~1165.
- [14] Yamada K, Minoda Y, Yamamoto S. *Agric Biol Chem*, 1968, 32(10): 1275~1282.
- [15] Chang R, Schwimmer S, Burr H K. *J Food Sci*, 1977, 42: 1098~1101.
- [16] Liener I E. *Adv Chem Ser*, 1977, 160: 283~300.
- [17] Nelson T S, Shieh T R, Wodzinski R J *et al. Poultry Sci*, 1968, 47: 1842~1848.
- [18] Whitaker F, Brunner H. *Adv Chem Ser*, 1977, 160: 95~155.
- [19] Latta M, Eskin M J. *J Agric Food Chem*, 1980, 28(6): 1313~1315.
- [20] 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.

DEGRADATION OF PHYTIC ACID IN RAPESEED MEAL BY TWO STRAINS OF MOLDS

Xiang Weiqin Zhong Yingchang

(Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract By using selective media, two strains of molds which are able to degrade phytic acid were isolated from soil samples. These molds are able to use inositol as the sole carbon and energy sources for growth. In broth cultures, the degradation rates of phytic acid by these molds were 74.4% and 95.0%, respectively. However, in solid-state fermentation which used rapeseed meal as a raw material, the degradation rate was about 40%. Several metal ions tested were able to enhance the degradation rate of phytic acid. Factors such as temperature, pH and moisture content which affect the growth of molds were also explored. These two strains of molds were initially identified as *Paecilomyces* sp. and *Penicillium* sp.. They do not produce any detectable amount of aflatoxins.

Key words Rapeseed meal, Phytic acid, Degradation, *Paecilomyces*, *Penicillium*