

高效降解棉酚菌株的分离鉴定及 诱变选育

孙中超¹ 方慧英^{1*} 诸葛斌^{1*} 张濛² 诸葛健¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室和工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122)
(2. 德班理工大学 生物技术学院 1334 信箱 南非 德班 4000)

摘要: 作为一种蛋白资源, 棉籽粕因其含有毒素——游离棉酚限制了其在饲料工业中的应用。为获得能高效降解棉籽粕中棉酚的菌株, 以醋酸棉酚为唯一碳源培养基从 16 份样品中筛选出一株高效降解棉酚菌株(Y-2), 经生理生化及 18S rDNA 鉴定为 *Pichia guilliermondii*, 此菌种为非致病酵母, 且首次报道用于棉酚的降解, 在工业生产中具有潜在的应用前景。通过紫外诱变获得一株棉酚降解率更高的突变株 YUV-51。通过对突变株 YUV-51 发酵温度、时间及接种量的初步优化, 获得其固态发酵优化条件: 30 °C 培养 48 h, 接种量 0.025 g 湿菌体/g 棉籽粕, 初始水分含量 50%。为避免游离棉酚在前处理中大量降解棉籽粕, 不进行湿热处理, 经接种发酵后脱毒率可达到 58%。这使微生物脱毒在实际生产中应用成为可能。

关键词: 生物降解, 紫外诱变, 季也蒙毕赤酵母

Isolation, identification and mutation breeding of high gossypol detoxification strain

SUN Zhong-Chao¹ FANG Hui-Ying^{1*} ZHUGE Bin^{1*} ZHANG Meng²
ZHUGE Jian¹

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and the Research Centre of Industrial Microbiology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. P.O. Box 1334, Department of Biotechnology Durban University of Technology, Durban 4000, South Africa)

Abstract: As a protein resource, only a little of cottonseed meal was used in feed industry due to the presence of toxin, gossypol. To obtain strains for gossypol detoxification, 16 soil samples were collected from China and 144 strains were isolated. Among them, a strain (Y-2) possess gossypol detoxification markedly. The strain Y-2 was identified as *Pichia guilliermondii* by traditional and molecular

* 通讯作者: 方慧英: ✉ fanghuiying@126.com

诸葛斌: ✉ bzhuge@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-02-11; 接受日期: 2011-04-01

genetic identification. This strain was non-pathogenic yeast, and was first reported used on degradation of gossypol. Mutant YUV-51 with the highest detoxification was obtained by UV mutation. The detoxification rate of gossypol was up to 58% under optimized culture conditions: inoculation of 0.025g wet cell/g cottonseed meal, 30 °C, initial moisture content of solid substrate 50%, 48 h. Moreover, to avoid degradation of a large part of free gossypol before the fermentation, a great lot of energy could be saved with no heat-moisture treatment.

Keywords: Bio-degradation, Mutagenesis by ultraviolet irradiation, *Pichia guilliermondii*

棉籽粕中约含有 40%以上的优质蛋白资源, 据美国农业统计中心(USDA)调查显示, 600 万 t 的棉籽粕可满足 7 000 万人口一年的蛋白需求总量^[1]。我国是产棉大国, 如果能对我国棉籽饼粕进行有效的开发利用, 无疑会对我国畜牧及食品行业产生推动作用并带来显著的经济效益和社会效益。然而, 棉籽粕中棉酚的存在影响了棉籽粕这一重要资源的广泛使用, 棉酚是一种存在于棉花中的多酚萜衍生物, 棉酚按其存在形式分为游离棉酚和结合棉酚, 其中游离棉酚因含有活性基团对动物有毒性作用。Mccaughey 等^[2]研究发现即使对棉酚抗性较高的奶牛, 当向其饲喂棉籽粕时也会严重影响其产奶量, 严重时会导致死亡; Fthenakis 等^[3]和 Solaiman 等^[4]研究发现, 当饲料中有较高的棉酚含量时会导致绵羊高发乳腺炎病, 同时其免疫能力大幅下降。

由于游离棉酚会带来上述问题, 因此越来越多的国内外研究人员利用各种方法对棉籽粕进行脱毒研究工作, 希望能对这一蛋白资源进行有效利用, 其中利用微生物脱毒是一种安全有效的方法, 此前的研究大都对棉籽粕湿热灭菌后进行生物脱毒, 虽然取得了良好的效果, 但是大规模湿热灭菌在实际生产中因能耗太大而无法在饲料加工中大规模使用。同时, 湿热本身可使游离棉酚大量减少, 使得总脱毒率较高, 不能反应出棉酚被微生物降解情况。本研究从大量的土样中筛选出一株可高效降解棉籽粕中棉酚的菌株, 将该菌株紫外诱变, 进一步提高菌株脱毒能力。为减少原料中杂菌对实验结果的影响, 本文采用中温干燥处理棉籽粕后进行发酵脱毒研究, 对比实验显示, 干热对实验结果影响较小, 同时非湿热处理发酵减少了大量的能耗, 为微生物棉酚脱毒工业化提供了途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料: 棉籽粕, 来自新疆三旺饲料; 土样, 采自山东枣庄棉花种植地, 共 16 份; 醋酸棉酚, 北京中棉紫光有限公司。

1.1.2 培养基及培养条件: 筛选及斜面培养基(g/L): 醋酸棉酚 1, NaCl 1, (NH₄)₂SO₄ 5, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 1, 琼脂 2.0, 吐温-80 7.5 mL。

种子培养基(g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。

发酵培养基: 棉籽粕先置于距 30 W 紫外灯 30 cm 处照射 15 min, 再置于干燥箱 60 °C 烘干后分装入培养皿中, 每只培养皿加入 10 g, 用无菌纱布密封。

种子培养基培养条件: 30 °C、150 r/min 培养 15 h。

固态发酵培养条件: 接种量 0.020 g 湿菌体/g 棉籽粕, 水分 50%, 30 °C, 培养 48 h, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 游离棉酚与总棉酚测定方法: 参照国际标准组织 ISO 6866-1985 中游离棉酚和总棉酚的测定^[5]。

1.2.2 可降解棉酚菌株的筛选方法: (1) 可降解棉酚菌株的初步筛选: 取土样少许浸于无菌水中, 12 h 后取 0.2 mL 土壤悬液涂布于筛选培养基, 置于 30 °C 培养箱培养 48 h, 挑单菌落纯化, 转接入斜面保藏。(2) 高效降解棉酚菌株的筛选: 将各斜面分别转接入种子培养基中, 培养 15 h 后接种于发酵培养基中。发酵后将培养基中温烘干, 粉碎测定游离棉酚含量, 用无菌水代替菌悬液做空白对照, 计算脱毒率。

$$\text{脱毒率}(\%) = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100 \quad (1)$$

式中, m_1 : 对照组游离棉酚含量($\mu\text{g/g}$); m_2 : 实验组游离棉酚含量($\mu\text{g/g}$)。

1.2.3 降解棉酚菌株的鉴定: 将 Y-2 制片, 在 8 000 倍的放大倍数下, 用扫描电镜观察酵母细胞形态。将所筛酵母接种于固态完全培养基中, 观察巨大菌落形态。生理生化特征检测参考《酵母菌的特征与鉴定手册》^[6]。

用酵母通用引物进行 18S rDNA PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L)为 Ex Taq 0.25 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L, 上下游引物(Primer 1: 5'-GCCTGAGAA ACGGCTACCAC-3'; Primer 2: 5'-GGCAGGGACGT AATCAACGC-3')各 0.3 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 48 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物中的目的片段(约 1.2–1.3 kb)用试剂盒纯化后测序, 测得的序列在 NCBI 中用 BLAST 进行序列比对, 找出与 Y-2 的 18S rDNA 同源性最高的几种菌种或菌属。

1.2.4 紫外诱变: 诱变处理步骤同参考文献[7], 突变株筛选同 1.2.2(2)。

1.2.5 湿热处理发酵与非湿热处理发酵对比: 将棉籽粕原料分别进行湿热处理(121 $^{\circ}$ C, 20 min)和非湿热处理(60 $^{\circ}$ C, 30 min), 冷却后接种发酵, 同时以不接种作为空白对照, 每组 3 个平行样。测定原料、湿热处理后发酵、非湿热处理后发酵及对照组游离棉酚含量, 以原料为 m_1 , 后 4 组为 m_2 , 按 1.2.2 中公式(1)计算脱毒率, 非湿热或湿热处理后发酵组脱毒率减去其对照组脱毒率即为微生物脱毒部分, 两组对照组为非湿热处理脱毒部分和湿热处理脱毒部分, 比较湿热处理和非湿热处理对发酵结果的影响。

1.2.6 发酵过程中游离棉酚与总棉酚的变化规律: 以筛得突变株为研究对象, 按 1.1.2 中固态发酵条件发酵, 观察其在发酵时间 60 h 内降解棉籽粕中游离棉酚和总棉酚的变化。

1.2.7 发酵条件研究: 以诱变筛得菌株为研究对象, 在棉籽粕固态发酵培养条件的基础上分别单独改变上述 4 个参数其中之一, 其他参数不变。发酵温度设 25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、32 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 5 个水平, 发酵时间设 24、36、48、60、72 h 5 个水平, 接种量设 0.010、0.015、0.020、0.025、0.030 g 湿菌体/g 培养基, 初始水分含量设 45.0%、47.5%、

50.0%、52.5%、55.0% 5 个水平, 每个水平设 3 组平行, 研究上述 4 种参数变化对发酵脱毒的影响。

2 结果与分析

2.1 筛菌结果

从 16 份土样中分离筛选到 144 (Y-1–Y-144)株可降解棉酚的菌株, 分别在发酵培养基中 30 $^{\circ}$ C 发酵 48 h, 计算脱毒率, 其中 Y-2、Y-13、Y-47、Y-81、Y-83、Y-94 6 株菌脱毒率最高, 分别为 45.3%、39.2%、43.5%、38.9%、40.0%和 41.2%, 因此选定 Y-2 为研究菌株。

2.2 菌种鉴定结果

经扫描电镜观察(图 1), Y-2 在棉籽粕中固态发酵呈棒状, 长 5 μ m–7 μ m, 直径 0.7 μ m–0.9 μ m, 巨大菌落呈乳白色, 表面有光泽, 边缘整齐, 易挑起(图 2)。糖发酵实验表明: Y-2 可发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖、海藻糖和棉籽糖, 不能发酵麦芽糖和乳糖。同化碳源实验表明: Y-2 可同化葡萄糖、半乳糖、蔗糖、棉籽糖、纤维二糖、甘油和 D-木糖, 不能同化乳糖、淀粉、赤藓糖和肌醇。同化氮源实验表明 Y-2 可同化乙胺, 不能同化硝酸盐、亚硝酸盐和尿素。

18S rDNA 鉴定分析显示, Y-2 的 18S rDNA 序列(GenBank 登录号 HQ435809)共 1 257 bp, 与 *Pichia guilliermondii* strain CCO 8 的相似性达到 99%以上, 综合《酵母菌的特征与鉴定手册》及其序列在 NCBI 上的 BLAST 比对分析结果, Y-2 确定为 *Pichia guilliermondii* (季也蒙毕赤氏酵母)。

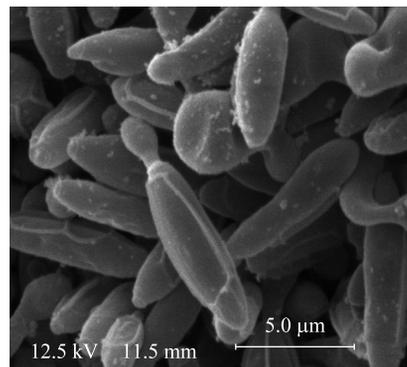


图 1 Y-2 单菌形态

Fig. 1 Cell morphology of strain Y-2



图2 Y-2 巨大菌落形态
Fig. 2 Giant colony morphology of strain Y-2

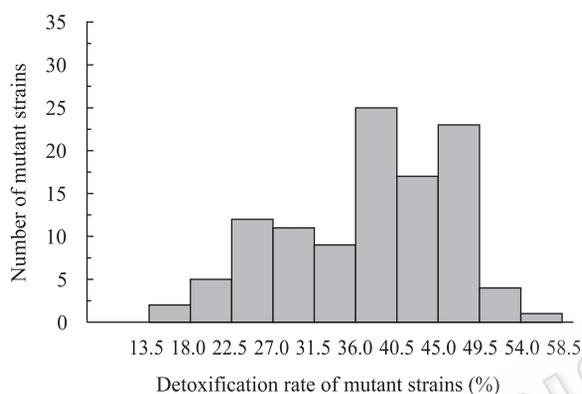


图3 紫外诱变突变效果
Fig. 3 Effect of UV mutation

“Yeast Biotechnology: Diversity and Applications”^[8]中报道 *Pichia guilliermondii* 属于 GRAS (General Recognize As Safe)中的一员, 用作工业微生物有广阔的前景。

2.3 紫外诱变筛选结果

Y-2 经紫外诱变后, 共得到 109 株突变株, 分别命名为 YUV-1-YUV-109, 分别种子培养后接入固态发酵培养基发酵, 测定游离棉酚含量, 计算脱毒率。如图 3 所示, 在 109 株突变株中, 60%的菌株脱毒率介于原始菌株 Y-2 脱毒率 $45.3\% \pm 4.5\%$ 之间, 8%的突变株相较原始菌株提高了 10%, 其中 YUV-15、YUV-19、YUV-51、YUV-98 和 YUV-102 这 5 株突变率有明显提高, 初步脱毒率分别为 51.2%、49.9%、55.4%、53.7%和 52.9%, 突变株 YUV-51 对棉籽粕中棉酚有着最大脱毒率, 并且遗传性状稳定(图 4), 选取 YUV-51 作为后续研究对象。

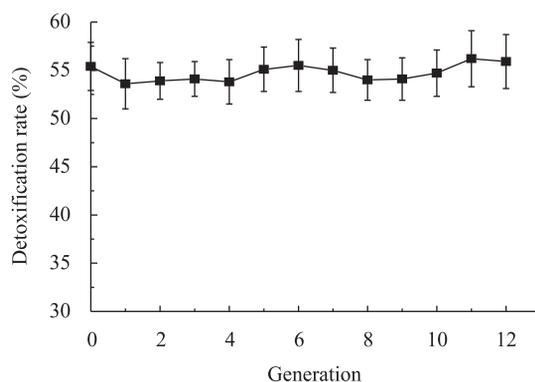


图4 突变株 YUV-51 遗传稳定性
Fig. 4 Hereditary stability of mutant strain YUV-51

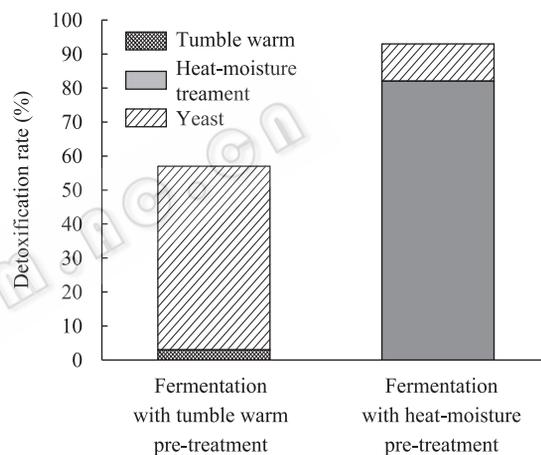


图5 不同前处理及酵母对发酵脱毒组成的影响
Fig. 5 Effect of different pre-treatments and yeast on the fermentation detoxification

2.4 湿热灭菌发酵与非湿热灭菌发酵对比

对比湿热灭菌发酵与非湿热灭菌发酵发现(图 5), 虽然湿热灭菌表观脱毒率很高(93%), 但实际微生物脱毒的部分很少, 仅为 11%, 大部分是灭菌过程中的湿热处理导致了棉酚的大量降解。对比于湿热灭菌处理后发酵, 非湿热灭菌处理发酵虽然表观脱毒率(57%)不如湿热组, 但外界环境影响小, 主要是微生物参与脱毒作用(54%), 同时能耗较湿热灭菌大大降低, 因此更适合实际大生产需要。

2.5 游离棉酚与总棉酚随发酵时间变化曲线

从图 6 可以看出, 游离棉酚和总棉酚随发酵时间的延长总体都呈下降的趋势, 但游离棉酚最初会

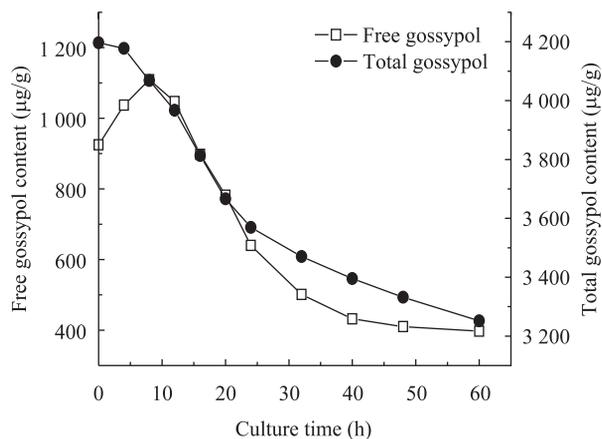


图6 游离棉酚与总棉酚随发酵时间的变化

Fig. 6 The change of free gossypol and total gossypol in 60 h

有小幅的提高然后再下降。我们分析认为,并非所有的结合棉酚在结构上都是非常稳固的,结合棉酚在某些外界条件下会有少部分的分解,释放出游离棉酚,与贾晓峰的报道类似^[9]。游离棉酚的降解总量 528 µg/g 小于总棉酚降解总量 944 µg/g,同时外界环境对游离棉酚的影响很小(图 5),因此可推断游离棉酚主要是被微生物分解利用,而非是与其他物质结合转化为结合棉酚。

2.6 菌株 YUV-51 发酵条件的研究

对突变株 YUV-51 的固态发酵条件进行优化。

图 7 显示当其他条件不变,发酵温度为 30 °C 时,脱毒率处于最大值;图 8 结果显示,随发酵时间延长,脱毒率不断提高,但当发酵时间达到 48 h 后,脱毒率变化较小;图 9 则显示当其他条件不变,初始水分含量为 50% 时,脱毒率处于最大值;图 10 显示,脱毒率随接种量增加而提高,但当接种量增大到 0.025 g 湿菌体/g 培养基后脱毒率升幅很小。因此,初步确定最适发酵条件为:温度 30 °C,初始水分含量 50%,接种量 0.025 g 湿菌体/g 培养基,发酵时间 48 h。以此条件发酵并与出发菌株 Y-2 做对比,在此条件下菌株 YUV-51 脱毒率达到 58%,比出发菌株提高了 13.7%。

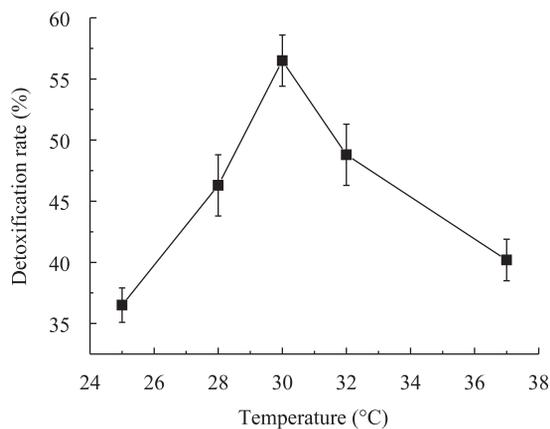


图7 不同发酵温度对发酵脱毒率的影响

Fig. 7 Effects of temperature on the detoxification rate

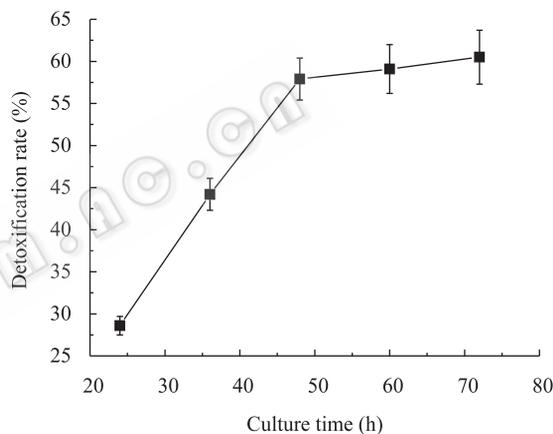


图8 不同发酵时间对发酵脱毒率的影响

Fig. 8 Effects of culture time on the detoxification rate

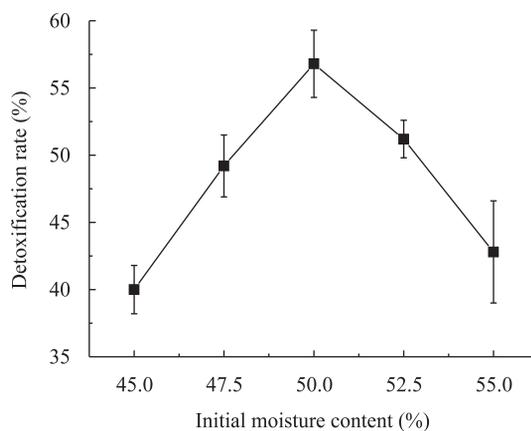


图9 不同初始含水量对发酵脱毒率的影响

Fig. 9 Effects of initial moisture content on the detoxification rate

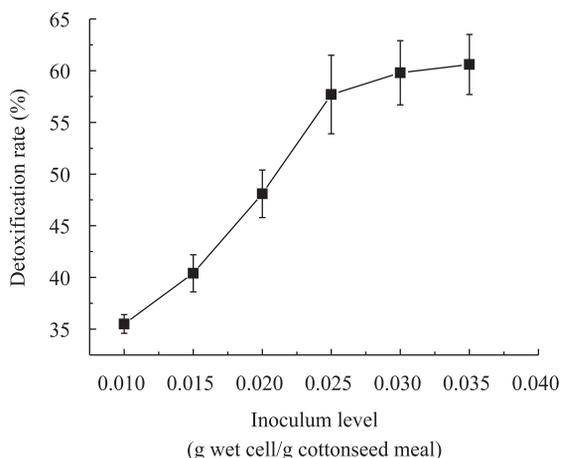


图 10 不同接种量对发酵脱毒率的影响

Fig. 10 Effects of inoculum level on the detoxification rate

3 讨论

目前国内外研究人员开展了大量的棉籽饼粕脱毒研究工作, 其中浙江大学和石河子大学利用热带假丝酵母取得了较好的成果^[10-11], 但以上研究均在棉籽粕湿热灭菌然后发酵的基础上进行研究。本文以筛到的 *Pichia guilliermondii* 菌株为研究对象, 研究湿热处理发酵与非湿热处理发酵并进行对比, 发现湿热处理发酵脱毒率的主要贡献在于湿热处理过程, 这与张文举等人的报道相一致^[9,12], 其中微生物脱毒部分仅为 11%; 而非湿热处理发酵脱毒的主要贡献为微生物, 微生物脱毒部分为 54%, 因此非湿热处理发酵更能反映出微生物的实际脱毒能力。同时湿热处理能耗较高, 因此非湿热处理发酵在大生产中更具优势。

本文同时研究了游离棉酚与总棉酚随时间的变化情况, 发现随发酵时间的延长, 结合棉酚会有少量的溶出使得游离棉酚含量增加, 同时游离棉酚的降解总量小于总棉酚降解总量, 因此可推断, 游离棉酚并非是与其它物质(如糖、赖氨酸及大分子蛋白等)结合转化成了结合棉酚, 而是被微生物分解。最后对发酵时间、温度及接种量进行优化, 优化后的固态发酵条件为 30 °C 培养 48 h, 接种量 0.025 g 湿菌体/g 棉籽粕, 初始水分含量 50%, 此时棉酚脱毒率达到了 58%。

本研究首次报道了从棉花地土壤中筛选到菌株

Pichia guilliermondii 可用于棉酚的降解, 此菌为非致病性菌株, 因此在工农业生产中有较好的应用前景, 目前关于此菌在棉籽粕发酵过程中的代谢机理还不清楚, 我们正在进行进一步研究。

参考文献

- [1] Liu JG, Stipanovic RD, Bell AA, et al. Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(18): 3038-3042.
- [2] McCaughey KM, DePeters EJ, Robinson PH, et al. Impact of feeding whole Upland cottonseed, with or without cracked Pima cottonseed with increasing addition of iron sulfate, on productivity and plasma gossypol of lactating dairy cattle[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, 122(3/4): 241-256.
- [3] Fthenakis GC, Leontides L, Skoufos J, et al. Case report: high prevalence rate of ovine mastitis, caused by coagulase-negative staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption[J]. *Small Ruminant Research*, 2004, 52(1): 185-189.
- [4] Solaiman SG, Gurung NK, McCrary Q, et al. Feeding performance and blood parameters of male goat kids fed EasiFlo cottonseed[J]. *Small Ruminant Research*, 2009, 81(2): 137-145.
- [5] 国际标准组织. ISO 6866-1985. 游离棉酚和总棉酚的测定.
- [6] Barnett JA, Penn RW, Jaro D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 20-22, 148-151.
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 388-392.
- [8] Satyanarayana T, Kunze G. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*[M]. Italy: Springer Press, 2009: 111-115.
- [9] 贾晓峰. 固态发酵对棉籽粕棉酚脱毒及蛋白质降解的影响[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008.
- [10] Weng XY, Sun JY. Biodegradation of free gossypol by a new strain of *Candida tropicalis* under solid state fermentation: Effects of fermentation parameters[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1663-1668.
- [11] Zhang WJ, Xu ZR, Zhao SH, et al. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 135(1): 176-186.
- [12] 魏二虹, 张文举, 刘东军. 不同热处理对棉籽饼中棉酚含量的影响[J]. 石河子大学学报, 2010, 28(1): 52-55.