

研究报告

高效棉酚降解枯草芽孢杆菌 M-4 菌株的常压室温等离子体诱变及发酵工艺优化

陈佳瑞, 孔薪茹, 高同国, 李佳*

河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071000

陈佳瑞, 孔薪茹, 高同国, 李佳. 高效棉酚降解枯草芽孢杆菌 M-4 菌株的常压室温等离子体诱变及发酵工艺优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2212-2220

Chen Jiarui, Kong Xinru, Gao Tongguo, Li Jia. Mutagenesis of *Bacillus subtilis* M-4 strain with high gossypol degradation by atmospheric and room temperature plasma and optimization of fermentation process[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2212-2220

摘要: 【背景】棉粕中游离棉酚的存在制约了棉粕作为饲料蛋白源的利用, 棉酚的微生物降解问题成为研究热点。本实验室前期发现枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) M-4 菌株具有较强的降解棉酚能力, 而且已经应用于棉粕脱毒工业。【目的】进一步提高枯草芽孢杆菌 M-4 菌株降解棉粕中棉酚的能力, 扩大棉粕在养殖业的应用领域。【方法】采用常压室温等离子体诱变(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术对菌株 M-4 进行诱变, 以液体培养条件下的棉酚降解率为初筛指标, 筛选获得正向突变株。以棉粕固体发酵条件下的棉酚降解率为复筛指标, 测定初筛获得的正向突变株实际降解棉粕中游离棉酚的能力。以棉酚残存量和棉酚降解率为检测指标, 采用单因素试验优化固体条件下棉粕发酵条件, 获得突变株发酵棉粕的最适工艺参数。【结果】初筛获得正向突变株 19 株。复筛得到一株高效的突变株 MY-4-17, 在棉粕固体发酵条件下其棉酚降解率高达 97.15%, 比菌株 M-4 的棉酚降解率提高了 2.55%。经过 5 次传代培养, 突变株 MY-4-17 的遗传稳定性良好。突变株 MY-4-17 发酵棉粕的最适工艺参数为: 碳源选用 4% 玉米粉, 物料含水量控制在 45%–50%, 菌剂使用量为 1.0×10^{13} CFU/t, 发酵时间 13–15 d。此工艺下发酵棉粕, 可将棉粕中的棉酚含量由 980 mg/kg 降至 22 mg/kg 以下, 降解率达 97.75% 以上。【结论】采用 ARTP 技术诱变选育的突变株可以有效降解棉粕中的棉酚, 为棉粕发酵菌剂的开发与生产提供参考。

关键词: 常压室温等离子体诱变; 棉酚; 枯草芽孢杆菌; 棉粕固体发酵; 发酵工艺

基金项目: 河北省重点研发计划(20326614D, 20322901D)

Supported by: Key Research and Development Plan of Hebei Province (20326614D, 20322901D)

*Corresponding author: E-mail: qilan82@126.com

Received: 2021-08-25; Accepted: 2021-11-25; Published online: 2022-03-03

Mutagenesis of *Bacillus subtilis* M-4 strain with high gossypol degradation by atmospheric and room temperature plasma and optimization of fermentation process

CHEN Jiarui, KONG Xinru, GAO Tongguo, LI Jia*

College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

Abstract: [Background] Free gossypol in cottonseed meal restricts the application of the meal as a dietary protein resource, and thus the degradation of gossypol has become a research hotspot. We previously found that *Bacillus subtilis* M-4 can degrade gossypol and it has been used in the industrial detoxification of cottonseed meal. [Objective] To improve the ability of M-4 to degrade gossypol in cottonseed meal and expand the application of cottonseed meal in breeding industry. [Methods] We employed atmospheric and room temperature plasma (ARTP) for mutagenesis of M-4, and preliminarily screened the forward mutants with the index of gossypol degradation rate in liquid medium. Furthermore, according to the degradation rate of gossypol in solid fermentation medium, the free gossypol-degrading ability of the forward mutants was evaluated. In addition, based on gossypol residue and degradation rate of gossypol, the solid fermentation conditions for cottonseed meal were optimized by single-factor experiment and the optimal fermentation parameters were obtained. [Results] A total of 19 forward mutants were screened out and MY-4-17 was identified to be most efficient. In solid medium, the gossypol degradation rate of MY-4-17 reached 97.15%, 2.55% higher than that of M-4. MY-4-17 showed genetic stability after 5 passages. The optimal fermentation conditions for cottonseed meal with MY-4-17 are as follows: 4% corn flour as sugar source, water content in raw material of 45%–50%, MY-4-17 dose at 1.0×10^{13} CFU/t, and fermentation duration of 13–15 days. Under such conditions, the content of gossypol in cottonseed meal was reduced from 980 mg/kg to 22 mg/kg and the degradation rate was over 97.75%. [Conclusion] The mutant screened by ARTP can effectively degrade the gossypol in cottonseed meal. The result can serve as a reference for the development and production of fermentation agent for cottonseed meal.

Keywords: atmospheric and room temperature plasma; gossypol; *Bacillus subtilis*; solid fermentation of cottonseed meal; fermentation process optimization

随着我国养殖业的规模化发展, 蛋白质资源日益匮乏^[1], 目前我国常用的豆粕产量严重不足, 主要依赖进口。棉粕富含蛋白质^[2], 含量在 36%–47%^[3], 是一种具有很大开发潜力的蛋白质饲料资源^[4]。然而棉粕中的游离棉酚含有致毒作用的活性羟基和醛基等, 直接饲喂会引起动物中毒, 制约了其在畜牧养殖业的应用^[5]。因此, 通常需要对棉粕进行脱毒处理,

从而扩大棉粕应用范围和使用量, 增加饲用蛋白质资源^[6]。

微生物发酵法是目前的研究热点, 胡永娜^[7]利用枯草芽孢杆菌、粪肠球菌和单胞假丝酵母混合发酵, 对菜籽饼进行脱毒, 降低抗营养因子含量, 提高了菜籽饼的营养价值。郭宝珠等^[8]利用枯草芽孢杆菌对亚麻籽饼中氰糖苷(cyanogenic glycosides, CGs)进行脱毒, 脱毒

率超过 90%，经过发酵处理改善营养成分，提高了亚麻籽饼的使用价值。微生物发酵法也是棉粕脱毒的主要方法^[9-10]，我国对饲料中棉粕的添加限量通常以棉粕或添加后饲料中游离棉酚的含量为标准，具体要求参见国家标准饲料卫生标准 GB13078—2017^[11]。

常压室温等离子体技术是一种新兴的诱变育种技术^[12]，其诱变机理是密度高的等离子体造成菌株 DNA 损伤，即使细胞具有强大的自我修复功能，但由于 DNA 损伤种类多^[13]，修复的过程中仍会出现大量错误，使之形成突变位点^[14]，从而获得具有良好性能和稳定遗传能力的突变株。常压室温等离子体诱变(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术因其操作简单、突变率高等特点^[15]被广泛应用于真菌、细菌诱变等领域^[16]。

高效降酚菌株的选育是微生物脱毒的基础，本试验利用常压室温等离子体诱变技术对实验室获得的棉酚降解菌株 M-4 进行诱变选育，筛选出一株更高效降酚突变株 MY-4-17，并采用单因素试验对菌株 MY-4-17 发酵棉粕降酚的固体发酵条件进行优化，以期扩展棉粕在养殖业的应用领域。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

枯草芽孢杆菌 M-4 为本实验室保存。

1.1.2 培养基

棉粕固体发酵培养基：棉粕 600 g/L，玉米粉 25 g/L。

1.1.3 棉粕粉

从保定某榨油厂购买的普通压榨油饼，经粉碎等工序加工成粒度为 10–12 目的棉粕粉，参照国家标准 GB/T 13086—2020^[17]进行测定，

加工后棉粕粉中棉酚含量为 980 mg/kg。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线的绘制

取 M-4 菌株种子液 4 mL，接种到 80 mL NB 液体培养基中，于 37 °C、180 r/min 摇床培养，每隔 2 h 取样，以分光光度计测定相对菌体浓度(600 nm 下的光吸收值)。再以发酵时间为横轴、以相对菌体浓度为纵轴绘制曲线。培养至 14 h 进入对数生长期末期， OD_{600} 稳定在 2.32 左右，取对数生长期末期为最适诱变种龄。

1.2.2 致死曲线的绘制

将 M-4 菌株接到 NB 培养基中，37 °C、180 r/min 培养至对数生长期末期(OD_{600} 稳定在 2.32 左右)。4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体制成菌悬液。将菌悬液进行梯度稀释至 10^{-5} ，取 10 μ L 稀释液均匀涂于载片，用无菌镊子放到 ARTP 诱变仪中。处理距离设定为 2 mm，功率设定为 120 W，以氦气为工作气体，气流量为 10 L/min，处理时间分别为 0、20、40、60、80、100 和 120 s 进行诱变。诱变结束后，载片掉入装有 1.0 mL 生理盐水的 EP 管中，菌体振荡洗脱后取 100 μ L 菌液均匀涂布于 NA 培养基平板上，在 37 °C 培养至对数生长期末期即 14 h。长出菌落后计算致死率，设 3 个平行实验。致死率=(未经诱变的菌落数–经诱变的菌落数)/未经诱变的菌落数 \times 100%。

1.2.3 诱变

选择诱变时间为 80 s，重复上述操作步骤，设定 3 个平行实验进行诱变。

1.2.4 突变株的初筛

挑取分离得到的不同形态突变株单菌落，分别转接至含有 0.5 g 棉酚的 100 mL 培养液，37 °C、180 r/min 摇床培养 72 h (液体发酵借助于摇床的振荡作用能够快速进行，一般 3 d 就能达到效果)，收集培养液于 4 °C、5 000 r/min 离心

5 min, 上清液用 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 得到除菌的发酵液。以国家标准 GB/T 13086—2020^[17] 分别测定发酵前后发酵液中棉酚的含量。根据发酵液中棉酚的降解率, 选取优良突变菌株。

1.2.5 突变株的复筛

将初筛得到的突变菌株接入棉粕固体发酵培养基中发酵 7 d (固体发酵相对较慢, 因此复筛所需的时间略长, 一般发酵时间为 7 d 时, 棉酚残存量已经达到畜禽饲养的标准), 按国家标准 GB/T 13086—2020^[17] 测定发酵前后培养基中棉酚的含量, 通过计算棉酚降解率筛选出降解活性优良的突变菌株。

1.2.6 棉粕固体发酵条件优化

在实验室条件下, 以棉粕为基料和不同碳源组合, 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 20 min 后接种并发酵培养, 确定菌株 MY-4-17 固体发酵棉粕的最佳条件。

(1) 不同碳源对棉粕发酵的影响

固体发酵培养基组成中的碳源分别设定为 4% 的玉米粉、糖蜜、蔗糖和淀粉, 将配制好的各组固体发酵料调湿, 灭菌, 接种菌剂, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 15 d, 设 3 个平行, 分别测定发酵料样品中棉酚残存含量和降解率。

(2) 水分含量对棉粕发酵的影响

设计料水比分别为 1:0.2、1:0.4、1:0.6、1:0.8、1:1 和 1:1.2 的棉粕固体培养基, 灭菌后接种菌剂, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 15 d, 设 3 个平行, 培养测定发酵料样品中棉酚残存含量和降解率。

(3) 接种量对棉粕发酵的影响

设计菌含量分别为 1.0×10^{12} 、 2.5×10^{12} 、 5.0×10^{12} 、 7.5×10^{12} 、 1.0×10^{13} 、 2.50×10^{13} 和 5.0×10^{13} CFU/t 的菌剂使用量, 分别接入上述试验所得最适料水比的棉粕固体发酵培养料, 灭菌后接种菌剂, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵 15 d, 设 3 个平行, 测定发酵料样品中棉酚残存含量和降解率。

(4) 发酵时间对棉粕发酵的影响

将菌株 MY-4-17 以最适使用量 1.0×10^{13} CFU/t 接入灭菌后的最适料水比的棉粕固体发酵培养料中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 发酵, 设 3 个平行, 从发酵第 3 天起, 每天取样一次, 测定其棉酚残存含量和降解率。

2 结果与分析

2.1 菌株生长曲线

由图 1 可知, 菌体在 0–2 h 时处于延滞期, 2–14 h 为对数生长期, 14 h 后生长减慢, 进入对数生长期末期, 16–24 h 处于稳定期。处于对数生长期末期的菌体数量达到最高, 此时诱变可以达到较好的效果。

2.2 致死曲线

由图 2 可知, 随着诱变时间的增长, 菌株 M-4 致死率增加; 当诱变时间为 80 s 时, 菌体死亡率达 93.47%–93.92%。一般来说, 当致死率在 90% 以上时, 菌株往往能以较高概率正向突变; 当诱变时间继续增加, 菌株死亡率几乎达到 100%。综合考虑, 以 80 s 为诱变时长进行诱变。

2.3 突变株初筛

筛选出 19 株正向突变株, 其棉酚降解率如表 1 所示。由表 1 可知, 19 株正向突变株的棉

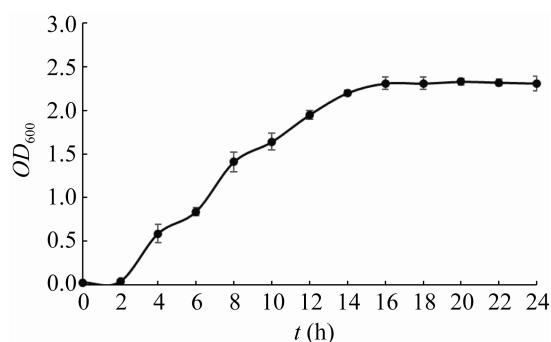


图 1 菌株 M-4 的生长曲线

Figure 1 Growth curve of strain M-4.

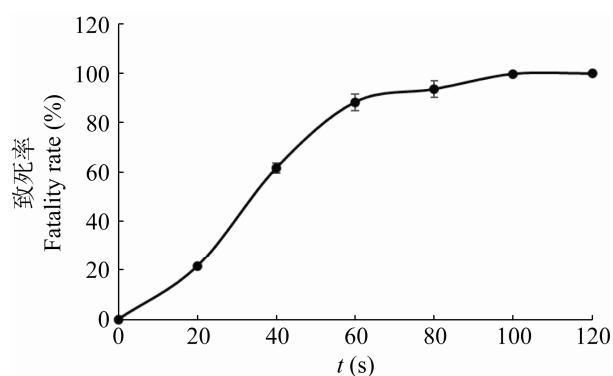


图2 ARTP 诱变致死曲线

Figure 2 Fatality curve of ARTP mutagenesis.

表1 初筛突变株的棉酚降解率

Table 1 Degradation rate of gossypol of mutant in initial screening

菌株编号 Strain No.	降解率 Degradation rate (%)
MY-4-1	94.8
MY-4-2	97.3
MY-4-3	97.3
MY-4-4	94.7
MY-4-5	96.4
MY-4-6	94.8
MY-4-7	95.0
MY-4-8	95.6
MY-4-9	95.3
MY-4-10	98.1
MY-4-11	95.8
MY-4-12	97.1
MY-4-13	95.7
MY-4-14	95.8
MY-4-15	96.4
MY-4-16	97.2
MY-4-17	97.3
MY-4-18	96.9
MY-4-19	96.1

酚降解率较出发菌株 M-4 均有 0.1%–3.5% 的提升, 其中有 7 株棉酚降解能力显著提高, 分别是 MY-4-2、3、10、12、16、17 和 18。考虑选择初筛获得的降解能力显著提高的菌株进行复筛, 能较大概率获得高效棉酚降解的菌株, 因

此选择该 7 株菌进行复筛。

2.4 突变株的复筛

选择 7 株突变菌株测定在棉粕固体发酵条件下的棉酚降解能力, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, 在棉粕固体发酵中, 突变株 MY-4-17 的棉酚降解能力最强, 棉酚降解率为 97.15%, 显著高于其他 6 株突变株。综合考虑突变株在初筛和复筛中的降解能力, 因此选择 MY-4-17 为高效突变株进行后续的研究。

2.5 棉粕固体发酵条件优化

2.5.1 不同碳源对棉粕发酵的影响结果

由表 3 可知, 采用不同碳源对棉粕发酵均有不错的效果, 碳源为 4% 蔗糖时棉酚降解率最

表2 棉粕固体发酵的棉酚降解率

Table 2 Degradation rate of gossypol in solid state fermentation of cottonseed meal

菌株编号 Strain No.	降解率 Degradation rate (%)
MY-4-2	95.17±0.78
MY-4-3	94.28±0.48
MY-4-10	94.98±0.33
MY-4-12	95.46±0.32
MY-4-16	94.71±0.56
MY-4-17	97.15±0.34
MY-4-18	96.41±0.16

表3 不同碳源作用下的棉酚残存量和降解率

Table 3 Residual stock and degradation rate of gossypol under different sugar sources

碳源 Sugar source	棉酚残存量 Gossypol residual stock (mg/kg)	棉酚降解率 Gossypol degradation rate (%)
糖蜜 Sugar honey (4%)	37.24±1.47	96.20±0.15
蔗糖 Cane sugar (4%)	20.39±3.24	97.92±0.33
淀粉 Starch (4%)	60.32±6.91	93.83±0.72
玉米粉 Corn flour (4%)	49.95±6.57	94.91±0.67

高, 为 97.92%; 碳源为 4%淀粉时棉酚降解率最低, 为 93.83%; 4 种碳源对棉酚的降解率影响较小。因此, 4%的糖蜜、蔗糖、淀粉及玉米粉均可选定为理想的碳源用于棉粕发酵, 考虑到工业发酵生产中的成本问题, 选择 4%玉米粉作为碳源是比较理想的。

2.5.2 水分对菌株发酵棉粕的影响结果

由表 4 可以看出, 发酵料中水分含量适量增加, 有利于菌株生长及棉酚残存量的减少, 料水比在 1:0.4 以上时棉粕发酵均有较好的脱毒效果, 料水比在 1:0.6 以上时棉酚降解率均在 97%以上, 而料水比达 1:0.8 以上时培养料基本呈稀糊状态, 不利于大规模发酵生产。因此, 选择 1:0.6 或 1:0.7 的料水比用来配制发酵料。不同产地、工艺或批次的棉粕中含水量均有区别, 本试验采用的棉粕含水量约 13%, 经换算, 实际生产中发酵物料含水量控制在 45%–50% 左右可达到较好的发酵效果。

2.5.3 菌剂使用量对棉粕发酵的影响结果

由表 5 可以看出, 随着菌剂使用量的增加, 菌株 MY-4-17 对棉粕的发酵脱毒效果略有增加, 但是菌剂使用量在 1.0×10^{12} – 5.0×10^{13} CFU/t 范围, 棉粕发酵脱毒均可达到较好的效果, 考虑到 10^{12} CFU/t 或 10^{13} CFU/t 的使用量其菌剂成本相差不大, 而较高的菌剂使用量可以保证不同批次棉粕发酵效果的稳定性及发酵棉粕的

表 4 不同料水比作用下的棉酚残存量和降解率
Table 4 Residual stock and degradation rate of gossypol under different ratio of feed to water

料水比 The ratio of material to water	棉酚残存量 Gossypol residue stock (mg/kg)	棉酚降解率 Gossypol degradation rate (%)
1:0.4	51.16±5.39	94.78±0.55
1:0.6	24.21±3.34	97.53±0.34
1:0.8	23.52±2.16	97.60±0.22
1:1.0	27.83±2.35	97.16±0.24
1:1.2	28.03±3.73	97.14±0.38

表 5 不同接种量下的棉酚残存量和降解率
Table 5 Residual stock and degradation rate of gossypol under different inoculation quantities

接种量 Inoculation amount (CFU/t)	棉酚残存量 Average gossypol residue stock (mg/kg)	棉酚降解率 Gossypol degradation rate (%)
1.0×10^{12}	47.83±4.61	95.12±0.47
2.5×10^{12}	39.59±6.37	95.96±0.65
5.0×10^{12}	26.86±3.24	97.26±0.33
7.5×10^{12}	24.70±4.81	97.48±0.49
1.0×10^{13}	23.13±2.55	97.64±0.26
2.5×10^{13}	22.74±3.92	97.68±0.40
5.0×10^{13}	22.25±3.14	97.73±0.32

质量, 因此选定 1.0×10^{13} CFU/t 的菌剂使用量作为适宜的接种量。

2.5.4 发酵时间对棉粕发酵的影响结果

从表 6 可以看出, 当使用菌株 MY-4-17 对棉粕进行发酵时, 发酵 0–7 d 棉酚残存量随时间增加呈现显著下降, 当发酵至 7 d 时棉粕中棉酚残存量为 56.75 mg/kg, 发酵 7–11 d 时棉酚

表 6 不同发酵时间下的棉酚残存量和降解率
Table 6 Residual stock and degradation rate of gossypol at different fermentation times

发酵时间 Fermentation time (d)	棉酚残存量 Gossypol residue stock (mg/kg)	棉酚降解率 Gossypol degradation rate (%)
3	698.74±8.23	28.70±0.84
4	409.35±14.90	58.23±1.52
5	197.08±7.55	79.89±0.77
6	90.55±2.55	90.76±0.26
7	56.75±3.24	94.21±0.33
8	39.30±3.25	95.99±0.33
9	32.05±9.31	96.73±0.95
10	27.93±1.37	97.15±0.14
11	25.19±7.55	97.43±0.77
12	23.23±2.45	97.63±0.25
13	21.76±2.26	97.78±0.23
14	20.39±5.69	97.92±0.58
15	20.09±6.17	97.95±0.63
16	20.29±4.41	97.93±0.45

残存量仍出现一定的下降,直到发酵 13–15 d 棉酚残存量下降趋势基本停止,此时棉酚残存量为 20.09–21.76 mg/kg。

3 讨论

随着经济的发展,日益增长的饲用蛋白质需求与逐渐减少的农牧土地面积矛盾突显。我国饲用蛋白主要来自大豆且需要进口。为了应对饲用蛋白原料紧缺的问题,减少进口,提高棉粕蛋白质的利用效率,棉酚的脱毒处理至关重要,因此成为了研究热点^[18–19]。棉酚降解的方法有多种,其中微生物降解法因其安全、效率高特点备受研究者青睐,能够降解棉酚的微生物有多种,例如产朊假丝酵母 CU-3 对棉秸秆的脱毒率高达 70%^[20],热带假丝酵母 ZD-3 棉酚降解率达 88.21%^[21]。由于棉酚会在畜禽体内累积,在饲喂对棉酚含量要求严格的种畜禽及一些其他畜禽时,为了保障安全性,需要更低的棉酚残存量,因此需进一步提升菌株的棉酚降解率,使得发酵后的棉粕使用更加灵活、限制性降低。突变株 MY-4-17 棉酚降解率为 97.15%,即棉酚含量为 980 mg/kg 的棉粕经突变株 MY-4-17 固体发酵后,棉酚残存量为 27.93 mg/kg,将其作为饲料蛋白原料制备全价饲料,可以使棉酚残存量控制到 8.38 mg/kg 左右,此时棉粕作为蛋白饲料原料的限制性更小,可以依据饲喂过程中的营养要求自由添加,因此由突变株 MY-4-17 发酵的棉粕可以在养殖业的各领域都实现安全灵活的使用,在工业生产中是一个较大的进步。突变株 MY-4-17 经过 5 次传代培养后仍具有良好的遗传稳定性,是一株具有很大工业微生物降解棉酚前景的菌株,也可以用于后续的应用研究。

本实验采用 ARTP 诱变,诱变时间由致死曲线确定为 80 s,这与多拉菌素产生菌 ARTP

诱变时间为 35 s^[22]及乳酸菌的 ARTP 诱变时间为 60 s^[23]不同,可能是诱变的菌种不同及操作不同导致。实验中对高效降酚菌 MY-4-17 进行了发酵条件的优化,结果表明不同碳源对发酵的影响差别不大,棉酚的降解率均能达到 93% 以上,从成本方面考虑,4%的玉米粉较理想;发酵物料含水量控制在 45%–50%较适宜,避免水分过多引起物料的稀糊,不利于大规模发酵;考虑到成本和发酵效果,菌剂的接种量为 1.0×10^{13} CFU/t 时为最适量;发酵时间在棉酚的降解过程中有重要影响,在实验室使用液体发酵时,3 d 就能达到降解效果。在实际生产中发酵 7 d 可以达到符合禽畜饲喂的棉酚残存量要求,由于室温固体发酵不会消耗大量的能源和人力,可以通过延长发酵时间提高棉酚降解率。在工业上 M-4 的发酵时间为 14 d,本次实验表明突变株 MY-4-17 在 13–15 d 时发酵效果最好,棉酚降解率达 97.75% 以上,此时棉酚残存量为 21 mg/kg 左右。在发酵时间相同的条件下,突变株 MY-4-17 与出发菌株相比在降低棉酚残存量方面有很好的提升,因此,在用于对饲料棉酚残存量要求严格的畜禽品种饲喂且不需使用的条件下,可以选择 13–15 d 作为发酵终点。本次诱变选育及发酵条件优化的结果为棉酚降解能力显著升高的 MY-4-17 应用于棉酚脱毒工作、提高脱毒效率奠定了基础,从而便于菌株应用到大规模工业棉酚脱毒工作中,并扩展棉粕在养殖业的应用领域。

4 结论

本研究通过 ARTP 诱变,选育得到一株棉酚降解率提高、使棉粕中棉酚残存量显著降低的突变菌株 MY-4-17,通过发酵条件优化,在固体发酵条件下,该菌株发酵棉粕 15 d 的棉酚降解率达 97.95%。

REFERENCES

- [1] 陈生琴, 陈丽娟, 程茂基, 周媛媛, 高燕. 高效降解棉酚菌株的选育及发酵棉粕最佳工艺的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(4): 19-24
Chen SQ, Chen LJ, Cheng MJ, Zhou YY, Gao Y. Screening of high efficient gossypol-degrading strain and fermentation optimization of cottonseed meal[J]. China Oils and Fats, 2016, 41(4): 19-24 (in Chinese)
- [2] 赵轲, 吕淑霞, 曹慧颖, 林英. 复合微生物菌剂发酵在棉籽饼脱毒中的应用[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(1): 56-60
Zhao K, Lü SX, Cao HY, Lin Y. Application of fermentation by compound microbial preparation on cottonseed cake detoxication[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(1): 56-60 (in Chinese)
- [3] 舒文秀. 棉酚脱毒菌的筛选鉴定及其棉籽粕发酵试验研究[D]. 兰州: 西北民族大学硕士学位论文, 2021
Shu WX. Screening and identification of gossypol detoxification bacteria experimental study on fermentation of cottonseed meal[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest University for Nationalities, 2021 (in Chinese)
- [4] 李佳, 高同国, 袁洪水, 王伟, 朱宝成. 芽孢杆菌发酵棉粕粉脱酚及其饲喂肉鸡的效果[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(8): 171-174
Li J, Gao TG, Yuan HS, Wang W, Zhu BC. Dephenolization of cottonseed meal fermented with *Bacillus* and its detoxification effect on broiler breeding[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 171-174 (in Chinese)
- [5] 侯敏, 刘亚男, 王宁, 包慧芳, 詹发强, 侯新强, 杨蓉, 崔卫东. 微生物发酵技术在新疆棉籽壳饲料化的应用研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(21): 44-47, 56
Hou M, Liu YN, Wang N, Bao HF, Zhan FQ, Hou XQ, Yang R, Cui WD. Advances in the application of microbial fermentation technology on cotton seed husk feed in Xinjiang[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(21): 44-47, 56 (in Chinese)
- [6] 孙中超, 方慧英, 诸葛斌, 张濛, 诸葛健. 高效降解棉酚菌株的分离鉴定及诱变选育[J]. 微生物学通报, 2011, 38(8): 1166-1171
Sun ZC, Fang HY, Zhuge B, Zhang M, Zhuge J. Isolation, identification and mutation breeding of high gossypol detoxification strain[J]. Microbiology China, 2011, 38(8): 1166-1171 (in Chinese)
- [7] 胡永娜. 微生物发酵菜籽粕营养价值的评定及其对肉仔鸡生长发育的影响[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2012
Hu YN. Nutritional value evaluation of fermented rapeseed meal and its effects on growth and development of broilers[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [8] 郭宝珠, 蔡辉益, 王茂森, 逯春香, 刘国华, 常文环, 郑爱娟, 陈志敏. 生氰糖苷脱毒菌株筛选及其发酵亚麻籽饼研究[J]. 饲料工业, 2020, 41(22): 24-28
Guo BZ, Cai HY, Wang MS, Lu CX, Liu GH, Chang WH, Zheng AJ, Chen ZM. Screening of cyanogenic glycosides detox strain and its effect on fermentation of flaxseed cake[J]. Feed Industry, 2020, 41(22): 24-28 (in Chinese)
- [9] 姚艳辉, 李佳, 茹雪峰, 高同国, 朱宝成. 枯草芽孢杆菌 M-4 发酵脱毒棉粕对肉鹅生长的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(7): 112-115
Yao YH, Li J, Ru XF, Gao TG, Zhu BC. Effects of *Bacillus subtilis* M-4 fermented detoxifying cotton meal on the growth of meat geese[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(7): 112-115 (in Chinese)
- [10] 亓秀晔, 谢全喜, 刘乃芝, 于佳民, 赵倩, 张志焱, 徐海燕, 谷巍. 高效液相色谱测定棉酚方法的建立及不同棉酚脱毒方法比较[J]. 中国饲料, 2019(7): 70-74
Qi XY, Xie QX, Liu NZ, Yu JM, Zhao Q, Zhang ZY, Xu HY, Gu W. Establishment of HPLC method for gossypol determination and comparison of different gossypol detoxification methods[J]. China Feed, 2019(7): 70-74 (in Chinese)
- [11] 国家质量监督检验检疫总局. 饲料卫生标准: GB 13078—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Hygienical STANDARD for feeds: GB 13078—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese)
- [12] 胡悦, 李汉文, 喻晨, 余华顺, 姚鹃, 龚大春. LiCl-ARTP 复合诱变选育高产碱性蛋白酶菌株及其发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(2): 59-65
Hu Y, Li HW, Yu C, Yu HS, Yao J, Gong DC. Breeding of high yield alkaline protease strain by LiCl-ARTP compound mutation and fermentation condition optimization[J]. China Brewing, 2021, 40(2): 59-65 (in Chinese)
- [13] 段赛菲, 黄艳娜, 王金斌, 束仕元, 周茂超, 唐雪明. 常压室温等离子体诱变选育高固氮酶活褐球固氮菌[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(5): 194-201
Duan SF, Huang YN, Wang JB, Shu SY, Zhou MC,

- Tang XM. Mutation breeding of *Azotobacter chroococcum* with high nitrogenase activity by atmospheric and room temperature plasma[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(5): 194-201 (in Chinese)
- [14] 张雪, 张晓菲, 王立言, 张翀, 陈韵亿, 常海波, 李和平, 邢新会. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(7): 2676-2684
- Zhang X, Zhang XF, Wang LY, Zhang C, Chen YY, Chang HB, Li HP, Xing XH. Recent progress on atmospheric and room temperature plasma mutation breeding technology and its applications[J]. CIESC Journal, 2014, 65(7): 2676-2684 (in Chinese)
- [15] 马娜娜, 车树刚, 张心青, 吴文雷, 傅英旬, 李超孟, 杨丹丹, 刘海玉. 灰树花菌株的复壮及常压室温等离子体诱变[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2526-2535
- Ma NN, Che SG, Zhang XQ, Wu WL, Fu YX, Li CM, Yang DD, Liu HY. Rejuvenation and atmospheric room temperature plasma mutagenesis in breeding of *Grifola frondosa*[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2526-2535 (in Chinese)
- [16] 金丽华, 方明月, 张翀, 蒋培霞, 葛楠, 李和平, 邢新会, 包成玉. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件及其突变株的特性[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 461-467
- Jin LH, Fang MY, Zhang C, Jiang PX, Ge N, Li HP, Xing XH, Bao CY. Operating conditions for the rapid mutation of the oleaginous yeast by atmospheric and room temperature plasmas and the characteristics of the mutants[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(3): 461-467 (in Chinese)
- [17] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 饲料中游离棉酚的测定方法: GB/T 13086—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Method for determination of free gossypol in feeds: GB/T 13086—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese)
- [18] 魏莲清, 牛俊丽, 赵官正, 于静仔, 张文喆, 陈宏, 张文举, 聂存喜. 添加不同水平的发酵棉粕对科宝肉鸡生长性能、屠宰性能和血清生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(7): 1953-1961
- Wei LQ, Niu JL, Zhao GZ, Yu JZ, Zhang WZ, Chen H, Zhang WJ, Nie CX. Effects of different levels of fermented cottonseed meal on growth performance, slaughter performance and serum biochemical indexes of Cobb broilers[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(7): 1953-1961 (in Chinese)
- [19] 牛俊丽, 魏莲清, 张文举, 聂存喜. 发酵棉粕对肉仔鸡生长性能、屠宰性能、营养物质表观消化率和脂肪沉积的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(8): 2385-2394
- Niu JL, Wei LQ, Zhang WJ, Nie CX. Effects of fermented cottonseed meal on growth performance, apparent digestibility, carcass traits, and lipid-related indices in broilers[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(8): 2385-2394 (in Chinese)
- [20] 侯敏, 詹发强, 宫秀杰, 包慧芳, 王宁, 杨蓉, 侯新强, 崔卫东. 产朊假丝酵母 CU-3 在棉秸秆饲料发酵中的应用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(10): 3166-3175
- Hou M, Zhan FQ, Gong XJ, Bao HF, Wang N, Yang R, Hou XQ, Cui WD. Study on application of *Candida utilis* CU-3 in cotton straw feed fermentation[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(10): 3166-3175 (in Chinese)
- [21] 杨文婷. 棉酚降解酶与益生菌对棉粕生物脱毒效果的比较研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2020
- Yang WT. A comparative study of gossypol degradation enzymes and probiotics on detoxification of cottonseed meal[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2020 (in Chinese)
- [22] 梁剑光, 栗波, 赵明霞, 王泽建, 任敏, 凌青云. 常压室温等离子体技术快速选育多拉菌素高产菌[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(4): 30-40
- Liang JG, Li B, Zhao MX, Wang ZJ, Ren M, Ling QY. Mutation breeding of a high doramectin producing strain by atmospheric pressure and room temperature plasma technology[J]. Journal of Changzhou University: Natural Science Edition, 2021, 33(4): 30-40 (in Chinese)
- [23] 林杨, 布丽根·加冷别克, 孙建, 谭慧林, 周洁, 刘少杰, 王伟, 顾美英, 张志东. 乳酸菌的筛选及高产酸菌株的常压室温等离子体诱变选育[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 176-181
- Lin Y, Buligen-JLBK, Sun J, Tan HL, Zhou J, Liu SJ, Wang W, Gu MY, Zhang ZD. Screening of lactic acid bacteria and breeding of high acid producing strain by ARTP mutation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 176-181 (in Chinese)