

## 研究报告

## 蓖麻碱降解菌的选育及脱毒效果的研究

王昌禄<sup>1</sup> 张 盈<sup>1</sup> 王文杰<sup>2</sup> 陈勉华<sup>1</sup> 张 民<sup>1</sup>(天津科技大学食品工程与生物技术学院 天津市食品营养与安全重点实验室 天津 300457)<sup>1</sup>(天津市畜牧兽医研究所 天津 300112)<sup>2</sup>

**摘要:**以蓖麻碱为底物,从牛瘤胃液中选育出脱毒能力强、生长旺盛的菌株4-2w,经初步鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),其最适生长温度为36℃,最适pH为7.0。经脱毒实验,4-2w菌降解蓖麻碱的脱除率达到90%以上,且该菌株未降解其中的蛋白质。

**关键词:**蓖麻饼粕,蓖麻碱,生物降解,饲料

**中图分类号:**Q93-331 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2007)01-0001-05

## Isolation of Ricinine Degrading Strain and its Detoxicating Projecting

WANG Chang-Lu<sup>1</sup> ZHANG Ying<sup>1</sup> WANG Wen-Jie<sup>2</sup> CHEN Mian-Hua<sup>1</sup> ZHANG Min<sup>1</sup>(School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin 300450)<sup>1</sup>(Tianjin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Tianjin 300112)<sup>2</sup>

**Abstract:** The strain 4-2w was isolated from the cattle's gastric juice by enrichment culture with ricinine as a substrate. This strain was identified as *Pseudomonas* sp. 4-2w according to its characteristics of physiology and biochemistry. The optimal growing temperature and pH were 36℃ and 7.0, respectively. The rate of detoxification was more than 90%. And this bacterium did not use up protein of castor bean meal.

**Key words:** Castor bean meal, Ricinine, Biogradation, Forage

蓖麻饼粕含有动物需要的蛋白质、纤维、脂肪、钙和磷等营养物质,其中蛋白质含量达33%~35%,蓖麻饼粕中的蛋白质含量高,氨基酸组成较好,动物对其消化吸收率较高,特别是动物营养中的限制性氨基酸——蛋氨酸的含量比豆粕还高,不含或含少量动物难以吸收的醇溶蛋白<sup>[1]</sup>,是良好的动物蛋白质补充饲料,与豆粕等其他饲料混合使用,可以达到氨基酸互补的作用<sup>[2]</sup>。但是,由于蓖麻饼粕中含有蓖麻碱和变应原等有毒物质<sup>[3]</sup>,目前添加到饲料中的用量十分有限,长期以来蓖麻饼粕被当作肥料施用于农田。

目前,从蓖麻饼粕中脱除毒素的方法有生物法、化学法、物理法以及化学和物理联合法<sup>[4-6]</sup>。化学法和物理法脱毒易使蓖麻饼粕中的营养物质

受到破坏,降低了其营养价值,同时也污染了环境,且耗能大,成本高<sup>[7,8]</sup>。生物脱毒具有经济安全,生产工艺简单,将生物脱毒菌种与一些耐受性的产单细胞蛋白菌种复合使用,可以达到脱毒和平衡氨基酸、解决蛋白质缺乏等问题<sup>[9-11]</sup>。

已经发现,酯基可通过两个基本途径发生变化<sup>[12,13]</sup>:一种是酯酶催化生肌糖苷的糖苷配基部分裂生成醛和无机氰化物,在该类反应中,碳碳键被破坏,但碳氮键没有被破坏;另一种是酯基被水解,但底物的碳碳键仍保持完整。显然,第一种方法不适用于蓖麻碱的降解,因为蓖麻碱的氰基是其具有毒性的原因,所以,降解蓖麻碱的氰基就是要破坏碳氮键。由图1可知,微生物利用蓖麻饼粕中的蓖麻碱后,氰基被水解生成羧

基,在加入指示剂的初筛平板上通过菌落周围颜色变化可筛选能够产生蓖麻碱腈水解酶的菌株。由于反刍动物在短期内食用添加蓖麻饼粕饲料后不会产生中毒症状,本文报道了从牛瘤胃液中分离出能够降解蓖麻碱的菌株,并对其脱毒效果进行了初步研究。

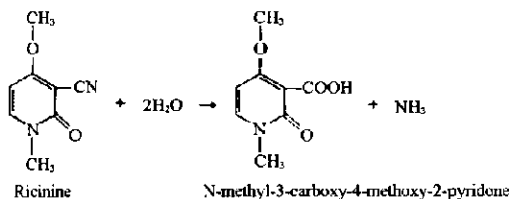


图1 蓖麻碱降解反应

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:**胃液:天津市畜牧兽医研究所提供的牛瘤胃液。选择健康无病、生长正常的公牛,施瘤胃瘘管术,单槽饲喂蓖麻饼粕,自由采食。取瘤胃内容物,离心得上清液为瘤胃液, pH 为 6.5, 主要含有纤毛虫、细菌和真菌。

**蓖麻饼粕:**天津南大海泰科技有限公司提供。蓖麻饼粕中含蛋白质 35.67%, 粗纤维 33.87%, 粗脂肪 7.37%, 粗灰分 6.51%, 蓖麻碱 1.17%。

**蓖麻碱标准品:**纯度 98%, 最大吸收波长为 312nm, 分子量为 164.16。

**1.1.2 培养基:**富集培养基:葡萄糖 5.0g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.0g, NaCl 5.0g, 蒸馏水定容至 1,000mL。pH7.0 ~ 7.2, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20min, 0.2mg/mL 蓖麻碱 20mL (过滤除菌)。分离培养基:在 1,000mL 富集培养基中加入 0.04% 溴百里酚蓝 (变色范围 pH6.0 ~ 7.6) 40mL。复筛培养基: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.0g, NaCl 5.0g, 蒸馏水定容至 1,000mL。pH7.0 ~ 7.2, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20min, 0.2mg/mL 蓖麻碱 20mL (过滤除菌)。细菌培养基:牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 蒸馏水定容至 1,000mL。pH7.2 ~ 7.4, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20min。

**蓖麻碱降解培养基:** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5g, NaCl 5.0g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, CaCl<sub>2</sub> 0.1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g, 蒸馏水定容至 1,000mL, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 15min, 0.2mg/mL 蓖麻碱 20mL (过滤除菌)。蓖麻饼粕脱毒试验培养基:蓖麻饼粕:蒸馏水 3:7 (w/v)。1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20min。

### 1.2 方法

**1.2.1 蓖麻碱降解菌株的筛选:** (1) 富集:吸取 5mL 牛瘤胃液至 45mL 无菌水中, 充分振荡 10min (120r/min), 从中吸取 1mL 菌悬液于 50mL 富集培养基中, 26℃ ~ 28℃ 恒温箱中培养 3 ~ 5d, 待培养基混浊后进行初筛。 (2) 初筛:吸取 1mL 经富集培养的菌悬液至 9mL 无菌水中, 充分振荡, 制成 10<sup>1</sup> 菌悬液, 用无菌水 10 倍稀释至 10<sup>7</sup>, 分别取 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> 菌悬液涂布于分离培养基平板上, 每个稀释度重复 3 次, 置于 26℃ ~ 28℃ 恒温箱中培养 3 ~ 5d, 待菌落长出后, 根据菌落周围颜色的变化, 挑取形态、色泽、大小不同的单菌落重新在初筛平板上进行纯化。将单菌落接入斜面培养基中编号进行保存。 (3) 复筛:用接种环取一环初筛后保存在斜面上的细菌, 接入细菌培养基中活化 24h, 再以 10% 接种量接入到复筛培养基中, 26℃ ~ 28℃ 培养 3 ~ 5d, 待培养基混浊后, 检测蓖麻碱含量。

**1.2.2 蓖麻碱降解菌的初步鉴定:**革兰氏染色及生理生化试验参照文献[14]进行。

**1.2.3 蓖麻碱降解菌生长曲线绘制:**将活化后的 4-2w 菌株接种到细菌培养基中培养 12h, 吸取 1mL 菌悬液到 200mL 蓖麻碱降解液体培养基中, 以未接种的蓖麻碱降解培养基作为对照, 120r/min 振荡培养 40h, 每隔 3h 取样, 在 600nm 处测定其吸光度值。

**1.2.4 脱毒条件优化:**蓖麻碱降解菌最适生长温度及 pH 参照文献[15]进行。采用蓖麻碱降解培养基, 一组接种后分别置于不同温度下培养 30h, 另一组培养基分别调节为不同初始 pH, 接入供试菌株, 培养 30h, 测定不同发酵液的吸光度值, 得出最适生长温度和 pH。

采用蓖麻饼粕脱毒试验培养基, 接种后培养 3d, 对含水量、接种量和发酵时间进行优化, 检测试验后的蓖麻碱含量。

**1.2.5 微生物脱毒:**挑取一环在细菌培养基斜面上活化的供试菌株, 接入细菌液体培养基中, 28℃ ~ 30℃ 培养至对数生长期, 按 20% (v/w) 接

种量接入蓖麻饼粕脱毒培养基中培养 5d, 过滤蓖麻饼粕, 经多次水洗, 烘干, 检测蓖麻碱含量。

1.2.6 蓖麻碱的测定: 采用紫外分光光度法测定蓖麻碱含量, 经扫描测定, 蓖麻碱的最大吸收波长为 312nm, 其甲醇溶液在 0~20mg/L 内其光吸收与浓度呈线性关系  $Y = 0.047X - 0.0017$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。

1.2.7 样品处理及测定: 准确称取蓖麻饼粕 10g, 加入 100mL 氯仿, 在索氏抽提器中回流提取 12h, 过滤, 滤液用旋转蒸发仪浓缩、蒸干, 用 100mL 无水乙醚分 3 次洗涤, 回收瓶中干燥物, 置真空干燥器中进行干燥, 用甲醇溶解, 定容在 100mL 容量瓶中。从中取 1mL 滤液定容在 10mL 容量瓶中, 用紫外分光光度计在最大吸收波长处测其吸光度, 根据标准曲线, 求出蓖麻碱含量<sup>[16]</sup>。

1.2.8 粗蛋白含量的测定: 采用凯氏定氮法<sup>[17]</sup>测定样品中含氮量并推算其蛋白质含量。

2 结果与讨论

2.1 蓖麻碱降解菌株的选育

按照 1.2.1 和 1.2.2 方法, 从牛瘤胃液中筛选出 89 株细菌, 通过对其蓖麻碱降解能力及耐受能力的比较, 选出生长速度快、降解和耐受蓖麻碱能力强的一株细菌 4-2w。

2.2 4-2w 菌株的初步鉴定

4-2w 菌株经革兰氏染色, 为革兰氏阴性杆菌, 呈不规则排列, 大小为  $0.5\mu\text{m} \times 1.7\mu\text{m}$ , 有鞭毛。其生理生化特性如表 1 所示。

表 1 4-2w 菌的部分生理生化特性

指标	结果	指标	结果
氧化酶	+	果聚糖形成	-
过氧化氢酶	+	非荧光色素	-
葡萄糖氧化发酵	氧化产酸	荧光色素	+
淀粉水解	-	类胡萝卜素	-
明胶水解	-	胰育素	-

+ 为阳性 (或利用)、- 为阴性 (或不利用)

根据 4-2w 菌株的形态特征及部分生理生化实验结果, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[18]</sup>, 初步鉴定 4-2w 菌株为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 4-2w。

2.3 4-2w 菌生长曲线

按照 1.2.3 方法绘制 4-2w 菌株的生长曲线, 其结果如图 2 所示。

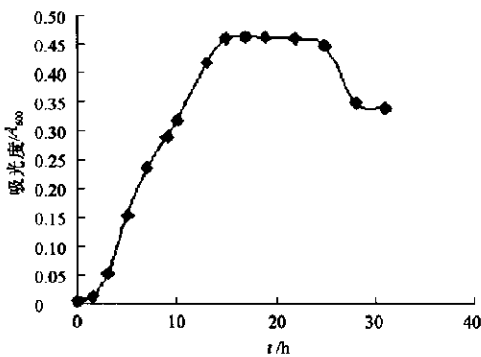


图 2 4-2w 菌生长曲线

由图 2 可以看出, 4-2w 菌培养 3h 后进入对数生长期, 27h 后进入衰亡期。

2.4 4-2w 菌脱毒条件优化

2.4.1 4-2w 菌脱毒最适温度、pH 的确定: 按照 1.2.4 的方法测定 4-2w 菌株脱毒最适温度和 pH, 其结果分别如图 3 和图 4 所示。

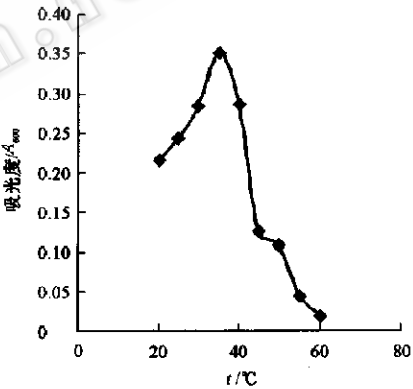


图 3 不同温度下 4-2w 菌的生长曲线

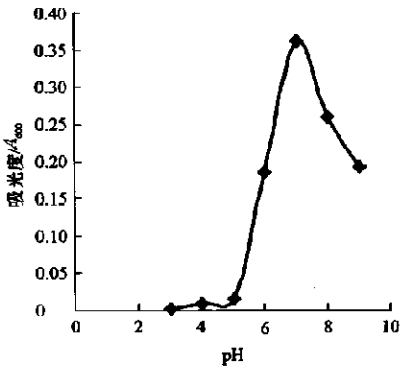


图 4 不同 pH 下 4-2w 菌的生长曲线

由图 3 和图 4 可知, 4-2w 菌的最适生长温度

为 36℃，最适 pH 为 7.0。

2.4.2 4-2w 菌脱毒条件的确定：按照 1.2.4 方法

优化 4-2w 菌脱毒条件，其结果分别如图 5A、B、C 所示。

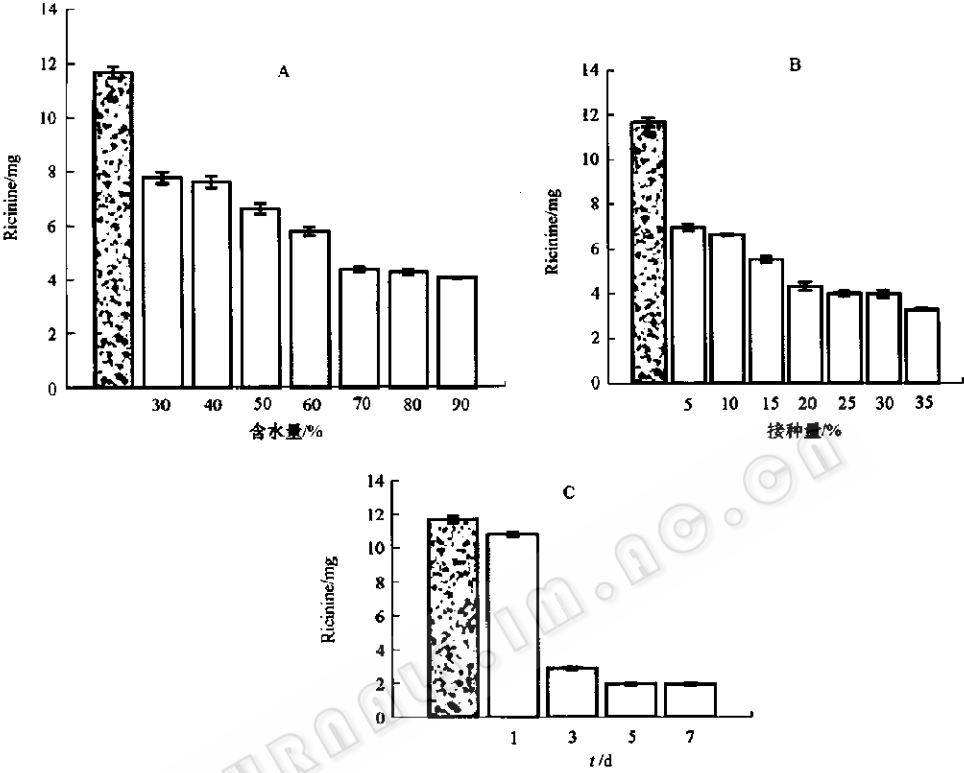


图 5 添加 4-2w 菌后蓖麻饼粕中蓖麻碱含量  
阴影为未处理的蓖麻饼粕

由图 5A 可以看出，当蓖麻饼粕含水量从 30% ~ 90% 时，含水量对 4-2w 菌株的脱毒效果具有显著影响 ( $P > 0.05$ )，但当含水量从 70% ~ 90% 时无显著影响 ( $P < 0.05$ )。因此，应控制蓖麻饼粕的含水量在 70% 左右就能达到较好的脱毒效果。

由图 5B 可以看出，接种量从 5% ~ 35% 时，对蓖麻饼粕的脱毒效果有显著影响 ( $P > 0.05$ )，但当接种量从 20% ~ 30% 时，接种量对蓖麻饼粕的脱毒效果无显著影响 ( $P < 0.05$ )。

由图 5C 可以看出，发酵时间从 1d 到 7d 时，对脱毒效果影响显著 ( $P > 0.05$ )，但当发酵时间从 5d 到 7d 时，脱毒效果不显著 ( $P < 0.05$ )，因此，4-2w 菌发酵 5d 即可达到较好的脱毒效果。

2.5 蓖麻碱及粗蛋白含量的测定

按照 1.2.7 和 1.2.8 的方法，测定接入 4-2w 菌前后蓖麻饼粕中蓖麻碱及粗蛋白含量，并计算

蓖麻碱脱除率，其结果如表 2 所示。

表 2 4-2w 菌脱毒效果

样品	蓖麻碱 (%)	脱除率 (%)	粗蛋白 (%)
脱毒前	1.168 ± 0.02177		35.67
4-2w 菌处理后	0.080 ± 0.00851	93.13 ± 1.35	43.31

从表 2 可以看出，经过培养条件的优化，在 pH 为 7.0 的培养基中，4-2w 菌蓖麻碱脱除率达 90% 以上。

3 结论

由于反刍动物对蓖麻饼粕中毒素的耐受力较高，有人曾用含毒素量较高的蓖麻饼粕饲喂成牛，未发现任何中毒现象，也没有影响养分的消化率和瘤胃发酵特征<sup>[19,20]</sup>。因此，可从牛瘤胃液中筛选出能够降解蓖麻碱的菌株。

以蓖麻碱为底物，筛选出一株生长快、降解

蓖麻碱能力强的菌株 4-2w, 经形态及生理生化实验, 初步鉴定其为假单胞菌。实验室脱毒试验结果表明, 4-2w 菌株在含有 1.17% 蓖麻碱的培养基中, 36℃ 培养 5d, 对蓖麻碱脱除率可达到 90% 以上, 同时未降解蓖麻饼粕中的蛋白质, 反而有所增加。据文献报道<sup>[21]</sup>, 当饲料中蓖麻碱含量达到 0.01% 时, 鸡的生长受到抑制。采用 4-2w 菌处理过的蓖麻饼粕, 其中的蓖麻碱含量由 1.17% 降低到 0.10% 以下, 通过与其他蛋白质含量高的饼粕按比例混合使用, 可以降低饲料成本, 提高蓖麻饼粕的附加值, 保证混合饲料中蓖麻碱含量在安全性范围之内。利用 4-2w 菌脱毒后的蓖麻饼粕是否可直接作为蛋白饲喂动物, 其中残余蓖麻碱的安全性还不能最终确定, 尚需进行动物饲喂实验, 以确定脱毒后的蓖麻饼粕在饲料中的添加量。

### 参考文献

- [1] 绍建新, 邓树娥, 高景华, 等. 中国卫生检验杂志, 2002, 12 (2): 157~158.
- [2] 史志诚, 牟永义. 饲用饼粕脱毒原理与工艺. 北京: 中国计量出版社, 1996. 262~263.
- [3] 于炎湖. 饲料毒物学附毒物分析. 北京: 农业出版社, 1992. 100~102.
- [4] 唐彩琴, 王建民, 刘幼平. 中国专利: CN91109657.4, 1991-04-03.
- [5] Jernu H. JAOCs, 1989, 2: 227.
- [6] 梁平. 中国饲料, 2000, 6: 18.
- [7] 孙玉成, 孙泽威, 姜玉杰. 中国饲料, 1998, 15: 27~28.
- [8] Mottola A G. JAOCs, 1972, 11: 101, 662.
- [9] 李延云. 中国饲料, 1995, 10: 28~30.
- [10] 李延云, 付中高. 饲料工业, 2000, 21 (12): 10~11.
- [11] 田春, 李佰林, 张通, 等. 内蒙古工业大学学报, 2002, 21 (4): 263~266.
- [12] Bové C, Conn E E. J Biol Chem, 1961, 236: 207~210.
- [13] Thimann K V, Mahadevan S. Biochem Biophys, 1964, 105: 133~141.
- [14] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 116~163.
- [15] 沈萍, 范秀容, 李光武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999. 105~108.
- [16] 徐文清, 陈艾, 庄湘莲, 等. 中国油脂, 2001, 26 (2): 45~46.
- [17] 杨胜主编. 饲料分析及饲料质量检测技术. 北京: 农业出版社, 1993. 16~90.
- [18] R E 布坎南, N E 吉本斯编. 中国科学院微生物研究所翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册 (第 8 版). 北京: 科学出版社, 1984. 274.
- [19] 赵青余, 桂荣, 那日苏, 等. 饲料研究, 2003, 6: 27~28.
- [20] 闵建华. 饲料工业, 1990, 11: 8.
- [21] 金征宇, 李星. 粮食与饲料工业, 1995, 5: 26~30.

### • 论文写作要点 •

## 摘 要

中英文摘要为报道性文摘, 用第三人称书写。本刊要求中文摘要控制在 200 字左右, 外文摘要不超过 250 个实词。摘要内容要简明扼要, 客观如实反映自己的工作内容, 包括: 目的、方法、结果。书写时注意语法一定要正确, 符合中英文表达方式, 特别是英文摘要最好请英文水平较好的专家审定, 以免出现错误。

按照国家标准, 摘要应具有独立性和自明性, 并拥有与 1 次文献同等量的主要信息, 可以说, 摘要是一种可以被引用的完整短文。

## 前 言

简明介绍论文背景, 相关领域研究历史与现状, 同时与自己的工作进行比较, 突出自己著文的意图与分析依据, 包括: 论文追求目标和创新性, 研究范围和理论, 技术方案选取与确定, 研究结论等。

前言应言简意赅, 切勿相同于摘要, 切勿评述同行熟知或教科书中已陈述的基本理论和实验方法。