



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849613 A

(43) 申请公布日 2010.10.06

(21) 申请号 201010176035.2

(22) 申请日 2010.05.18

(71) 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市一环路南一段
24号

(72) 发明人 杨志荣 赵建 冯甦 张杰
侯若彤 聂远洋

(51) Int. Cl.

A23K 1/14 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

油菜饼生物脱毒技术

(57) 摘要

本发明提供了一种利用酵母菌和乳酸菌混合发酵进行油菜饼脱毒的新方法。油菜饼作为饲料添加剂由来已久,但是由于油菜饼中含有硫葡萄糖甙等对家畜有害的成分,需要脱毒后才能使用。微生物发酵是目前油菜饼脱毒技术中一种新型脱毒方法,可以改善和补充物理和化学脱毒方法脱毒范围较小、脱毒率低、脱毒后菜籽饼的适口性较差等缺陷。本发明利用酵母菌和乳酸菌混合发酵进行油菜饼中硫甙的脱除,发现酵母菌和乳酸菌以1:1混合发酵3~7天,脱毒率可达到60%左右,能将硫甙含量降低至0.15%左右,并且油菜饼中的蛋白含量因微生物发酵而有明显的增长。

1. 一种油菜饼脱毒的方法,包括:(1)用麦芽汁液体培养基和MRS液体培养基分别培养待用菌种酵母菌和乳酸菌2~3天;(2)按酵母菌:乳酸菌=1:1的比例将待用菌混合好后,按 $(4.50\pm 0.5)\times 10^7$ cfu/g的总接种量接种于油菜饼:麸皮=9:1,水料比5:3的发酵培养基,于 $32\pm 1^\circ\text{C}$,含水率:30±5%,培养3~7天;(3)将经(2)处理脱毒后的油菜饼碾细,过60目筛,在100℃烘烤2h,自然冷却后参照硫脲法测定硫葡萄糖甙;(4)用全自动凯氏定氮仪测定脱毒前后油菜饼的蛋白质含量。

2. 权利要求1的脱毒菌种,为酵母菌和乳酸菌。

3. 权利要求2的酵母菌和乳酸菌混合比例为1:1,混合菌总接种量为 $(4.50\pm 0.5)\times 10^7$ cfu/g。

4. 权利要求1的发酵培养基,所述配方为油菜饼:麸皮=9:1,水料比为5:3。

5. 权利要求1的微生物发酵脱毒条件,所述温度为 $32\pm 1^\circ\text{C}$,含水率为30±5%,培养3~7天。

油菜饼生物脱毒技术

一、技术领域

[0001] 本发明是利用微生物发酵的方法对油菜饼进行脱毒。

二、背景技术

[0002] 油菜籽在中国和世界上都是主要的油料作物之一,在我国,产量占植物油料产品产量的四分之一。中国年产油菜籽 800 多万吨,占世界第一位。油菜籽榨油后的菜籽饼,一般占原料的 60%左右,巨大的油菜籽产量使我国拥有了丰富的油菜籽饼资源。油菜饼含有丰富的蛋白质,其蛋白质含量一般在 30~40%之间,最高可达 47%以上。油菜蛋白质的氨基酸组成合理,其赖氨酸含量与大豆相当,而赖氨酸、蛋氨酸等含硫氨基酸的含量则高于大豆蛋白质,是我国有待开发利用的最大宗优质饲用蛋白源,本应是良好的精饲料。它与大豆饼粕的区别在于含有硫代葡萄糖甙类物质,此类物质代谢产生的有毒物质对畜禽有毒害作用,畜禽采食过量,会导致肠炎、甲状腺肿大,轻者造成畜禽减产,重者死亡。另外,硫甙分解后产生的刺激性气味,使得饼粕的适口性差。因此,油菜饼在作为饲料的应用方面,受到很大的限制。目前我国油菜饼主要被当作肥料使用,造成的浪费每年高达 80 亿元左右。

[0003] 油菜饼作为饲料添加剂由来已久,但是由于油菜饼中含有硫葡萄糖甙等对家畜有害的成分,需要脱毒后才能使用。很多科研工作者对油菜饼的脱毒方法进行了研究,并提出了干热处理、水洗、化学脱毒工艺及微生物发酵工艺。目前世界上较为成熟的方法一般有物理和化学方法,但是物理、化学脱毒方法的脱毒范围都较小,脱毒率低,脱毒后菜籽饼的适口性较差,所以脱毒效果不理想,而且这些方法对油菜饼中的有效成分破坏比较大,或者残留比较严重,或者工序比较复杂,成本较高,都有一定的缺点。而利用微生物数量大、酶系复杂的特点进行菜籽饼的全方位脱毒,不仅在脱毒过程中增加适口性,而且还能进一步提高蛋白质含量。因此,利用微生物对油菜饼脱毒是一种较理想而有前途的脱毒方法。

[0004] 油菜饼的微生物脱毒方面已有一些研究成果,发现霉菌、酵母、细菌、放线菌中的一些菌种均有脱毒功效,尤其是多种微生物配合使用能够达到 99%以上的硫甙降解率。本发明应用酵母和乳酸菌两种无副作用且在食品和饲料中经常使用的菌种,对油菜饼进行脱毒,可得到较好的脱毒效果,并使油菜饼中的蛋白含量因微生物发酵而有明显的增长,因此油菜饼的微生物脱毒能够使油菜饼在饲料中的充分应用得以实现,是一个行之有效的方法。

三、发明内容

[0005] 油菜饼作为饲料添加剂由来已久,但是由于油菜饼中含有硫葡萄糖甙等对家畜有害的成分,需要脱毒后才能使用。微生物发酵是目前油菜饼脱毒技术中一种较理想而有前途的脱毒方法。本发明提供了一种利用酵母和乳酸菌混合发酵进行油菜饼中硫甙的脱除的方法。

[0006] 本发明的技术方案:先将酵母菌和乳酸菌分别接种到麦芽汁液体培养基和 MRS 液体培养基上,培养 2~3 天后,再将酵母菌和乳酸菌分别按照一定比例接入用油菜饼和麸皮

按照 9 : 1 配制的发酵培养基上进行混合固体发酵。发酵一定时间后,将固体发酵产物烘干测定其中硫甙的含量,并测定脱毒前后油菜饼蛋白质的含量。

[0007] 步骤为:

[0008] 1) 待用菌种的培养

[0009] 待用菌种为酵母菌和乳酸菌;

[0010] 培养基配方:

[0011] 麦芽汁液体培养基:将麦芽糖化液用 4 ~ 6 层纱布过滤,滤液如混浊不清,可用鸡蛋白澄清,即将一个鸡蛋白加水约 20ml,调匀至生泡沫时为止,然后倒在糖化液中搅拌煮沸后再过滤。将滤液稀释到 5 ~ 6 波美度, pH 约 6.4。121℃ 灭菌 20 分钟;

[0012] MRS 液体培养基:蛋白胨 10g;牛肉膏 10g;酵母膏 5g;K₂HPO₄·3H₂O 2g;乙酸钠 5g;葡萄糖 20g;吐温 801g;柠檬酸二铵 2g;MgSO₄·7H₂O 0.58g;MnSO₄·4H₂O 0.25g;加蒸馏水 1000mL;pH6.2 ~ 6.4,121℃,15min 灭菌备用;

[0013] 培养方法:

[0014] 酵母菌:用麦芽汁液体培养基,灭菌、接种,摇床 (150r/min)28℃ 培养 2 ~ 3 天;

[0015] 乳酸菌:用 MRS 液体培养基,灭菌、接种,静置培养,30℃,2 ~ 3 天。

[0016] 2) 固体发酵

[0017] 培养基配方:

[0018] 发酵培养基:油菜饼:麸皮=9 : 1,水料比:5 : 3;

[0019] 培养方法:将假丝酵母和保加利亚乳杆菌按酵母菌:乳酸菌=1 : 1 混合后接种于发酵培养基进行固体发酵(总接种量为 $(4.50 \pm 0.5) \times 10^7$ cfu/g)。发酵条件:32±1℃,含水率:30±5%,培养 3 ~ 7 天。

[0020] 3) 硫甙的测定

[0021] ①样品的制备:将脱毒后的菜籽饼碾细,过 60 目筛,在 100℃ 烘烤 2h,自然冷却后放干燥器中备用;

[0022] ②粗芥子酶的制备:将白芥子碾碎后装入滤纸包,置索氏抽提器中,加无水乙醚淹过滤包,浸泡 12h,在 50 ~ 60℃ 水浴锅中回流抽提 6 ~ 8h 除去脂肪。取出滤包,自然风干,乙醚挥发后,在 40℃ 恒温箱中干燥 2h,碾成粉并过 60 目筛,装入带塞三角瓶中,贮存于干燥器中备用;

[0023] ③硫甙测定方法:

[0024] 硫葡萄糖甙参照硫脲法测定;

[0025] 称取烘干保存的样品 0.1g 装入磨口试管中,加入 4 ~ 6mg 粗芥子酶粉,再加入 2.5ml 的二氯甲烷,1.0ml 磷酸-柠檬酸缓冲液(配方:0.1mol/L 柠檬酸溶液 3.5ml+0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 16.5ml, pH7),用玻璃塞盖紧密闭,混匀后在电振荡器上振荡 2 个小时,离心 (1000r/min, 20 分钟),用微量注射器取出最下层含有酶解产物异硫氰酸酯的二氯甲烷吸收液 100 μl,分装入两个试管,每管各 50 μl (使用磨口试管,减少挥发),分装完毕后,其中一份加入 95% 乙醇 3ml,另一份加入 20% 氨乙醇 (1 体积氨水加 4 体积无水乙醇),分别以 50 μl 二氯甲烷加 3ml 95% 乙醇和 50 μl 二氯甲烷加 20% 氨乙醇为空白对照组,将试管加塞密闭在 50℃ 水浴锅中加热 2 小时,2 小时到后等其冷却,用紫外分光光度计分别测定在 235nm、245nm、255nm 波长处的 OD 值,并按下列公式计算:

[0026] 95%乙醇用以测 OZT 值 = OD245 校正 \times 22.1 (mg/g)

[0027] OD245 校正 = OD245 - 0.5 (OD235 + OD255)

[0028] 20%氨乙醇用以测 ITC 值 = OD245 校正 \times 28.55 (mg/g)

[0029] OD245 校正 = OD245 - 0.5 (OD235 + OD255)

[0030] 硫甙 = OZT + ITC (mg/g)。

[0031] 4) 脱毒前后油菜饼蛋白质含量测定

[0032] 用全自动凯氏定氮仪测定。

[0033] 本发明的有益效果:本发明利用酵母和乳酸菌混合发酵对油菜饼中硫甙的进行脱除,其脱毒率可高达60%左右,能将硫甙含量降低至0.15%左右,脱毒效果显著。在利用酵母和乳酸菌共同发酵脱毒的过程中,酵母还能提高油菜饼蛋白的含量,而乳酸菌能提高油菜饼营养成分的利用率,同时还能提高油菜饼脱毒后的香味。本发明主要利用两种常见微生物菌株对油菜饼进行脱毒,其污染小,成本低,工艺简单,科技含量高,不易被仿冒,附加值高,适宜于大量推广。

四、具体实施方式

[0034] 1) 待用菌种的培养

[0035] 待用菌种为酵母菌和乳酸菌;

[0036] 培养基配方:

[0037] 麦芽汁液体培养基:将麦芽糖化液(购于新都啤酒厂)用4~6层纱布过滤,滤液如混浊不清,可用鸡蛋白澄清,即将一个鸡蛋白加水约20ml,调匀至生泡沫时为止,然后倒在糖化液中搅拌煮沸后再过滤。将滤液稀释到5~6波美度,pH约6.4。121℃灭菌20分钟;

[0038] MRS 液体培养基:蛋白胨 10g;牛肉膏 10g;酵母膏 5g;K₂HPO₄·3H₂O 2g;乙酸钠 5g;葡萄糖 20g;吐温 801g;柠檬酸二铵 2g;MgSO₄·7H₂O 0.58g;MnSO₄·4H₂O 0.25g;加蒸馏水 1000mL;pH6.2-6.4,121℃,15min 灭菌备用;

[0039] 培养方法:

[0040] 酵母菌:用麦芽汁液体培养基,灭菌、接种,摇床(150r/min)28℃培养3天;

[0041] 乳酸菌:用 MRS 液体培养基,灭菌、接种,静置培养,30℃,3天。

[0042] 2) 固体发酵

[0043] 培养基配方:

[0044] 发酵培养基:油菜饼:麸皮=9:1,水料比:5:3;

[0045] 培养方法:将假丝酵母和保加利亚乳杆菌按酵母菌:乳酸菌=1:1混合后接种于发酵培养基进行固体发酵(总接种量为 4.50×10^7 cfu/g)。发酵条件:32℃,含水率:30%,培养3天。

[0046] 3) 硫甙的测定

[0047] ①样品的制备:将脱毒后的菜籽饼碾细,过60目筛,在100℃烘烤2h,自然冷却后放干燥器中备用;

[0048] ②粗芥子酶的制备:将白芥子碾碎后装入滤纸包,置索氏抽提器中,加无水乙醚淹过滤包,浸泡12h,在50~60℃水浴锅中回流抽提6~8h除去脂肪。取出滤包,自然风干,

乙醚挥发后,在 40℃恒温箱中干燥 2h,碾成粉并过 60 目筛,装入带塞三角瓶中,贮存于干燥器中备用;

[0049] ③硫甙测定方法:

[0050] 硫葡萄糖苷参照硫脲法测定;

[0051] 称取烘干保存的样品 0.1g 装入磨口试管中,加入 4~6mg 粗芥子酶粉,再加入 2.5ml 的二氯甲烷,1.0ml 磷酸-柠檬酸缓冲液(配方:0.1mol/L 柠檬酸溶液 3.5ml+0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 16.5ml, pH7),用玻璃塞盖紧密闭,混匀后在电振荡器上振荡 2 个小时,离心(1000r/min, 20 分钟),用微量注射器取出最下层含有酶解产物异硫氰酸酯的二氯甲烷吸收液 100 μ l,分装入两个试管,每管各 50 μ l(使用磨口试管,减少挥发),分装完毕后,其中一份加入 95%乙醇 3ml,另一份加入 20%氨乙醇(1 体积氨水加 4 体积无水乙醇),分别以 50 μ l 二氯甲烷加 3ml 95%乙醇和 50 μ l 二氯甲烷加 20%氨乙醇为空白对照组,将试管加塞密闭在 50℃水浴锅中加热 2 小时,2 小时到后等其冷却,用紫外分光光度计分别测定在 235nm、245nm、255nm 波长处的 OD 值,并按下列公式计算:

[0052] 95%乙醇用以测 OZT 值 = OD₂₄₅ 校正 \times 22.1(mg/g)

[0053] OD₂₄₅ 校正 = OD₂₄₅ - 0.5(OD₂₃₅ + OD₂₅₅)

[0054] 20%氨乙醇用以测 ITC 值 = OD₂₄₅ 校正 \times 28.55(mg/g)

[0055] OD₂₄₅ 校正 = OD₂₄₅ - 0.5(OD₂₃₅ + OD₂₅₅)

[0056] 硫甙 = OZT + ITC(mg/g)

[0057] 4) 脱毒前后油菜饼蛋白质含量测定

[0058] 用全自动凯氏定氮仪测定。

[0059] 5) 结果:将乳酸菌和酵母菌混合发酵对油菜饼进行脱毒,发酵三天后的脱毒率较脱毒前明显提高,达到了 60%,硫甙含量降低至 0.15%,并且油菜饼中的蛋白含量因微生物发酵增加了 5.34%。