

利用响应面优化 *Klebsiella variicola* 对麻疯树籽饼粕佛波酯的固态发酵降解*

刘莹 张晓喻 白艳林 文瑜 尹晶 唐琳**

¹四川大学生命科学学院 成都 610064

²能源植物生物燃料油制备及利用国家地方联合工程实验室 成都 610225

摘要 为降解麻疯树籽饼粕中的毒性成分佛波酯, 利用 *Klebsiella variicola* 进行固态发酵. 采用单因素实验法研究了发酵温度、接种量、初始加水量、发酵时间对佛波酯降解率的影响. 在此实验结果基础上, 利用 Design Expert 8.0 软件进行分析建立了发酵温度、接种量、初始加水量3个因素对佛波酯降解率影响的优化模型. 该模型极显著 ($P < 0.001$), 拟合度良好. 经实验证实, 在发酵温度为 37 °C、接种量 33% (V/m)、初始加水量为 105% (V/m) 条件下发酵 48 h, 佛波酯降解率可达 84.30%, 另一种毒性物质 curcin 的降解率可达 63.21%. 研究表明, 利用响应面优化 *K. variicola* 固态发酵麻疯树籽饼粕过程, 既可提高佛波酯降解率, 也可降解 curcin, 具有生产指导意义. 图3 表9 参29

关键词 麻疯树籽饼粕; 佛波酯; *Klebsiella variicola*; 固态发酵; curcin

CLC Q949.753.506 : X172

Optimization of response surface for degrading phorbol esters in *Jatropha curcas* seed cake through *Klebsiella variicola* solid-state fermentation*

LIU Ying, ZHANG Xiaoyu, BAI Yanlin, WEN Yu, YIN Jing & TANG Lin**

¹College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

²National and Local Joint Engineering Laboratory of Energy Plants Biological Fuel Oil Preparation and Utilization, Chengdu 610225, China

Abstract This study aimed to optimize the degradation rate of phorbol ester of *Jatropha curcas* seed cake through solid-state fermentation of *Klebsiella variicola*. Firstly, by the single factor experiments, the effects of fermentation temperature, inoculum amount, initial amount of water and fermentation time were determined. Then Design Expert 8.0 was used to analyze and optimize the model of phorbol esters degradation rate by three factors (fermentation temperature, inoculum amount and initial amount of water) through response surface methodology. A model was then set up, its validity verified, and the degradation rate of curcin measured. The model was significant ($P < 0.001$), fitting well. In confirming experiments, under the condition of fermentation temperature 37 °C, inoculation (V/m) 33%, the initial water content 105% (V/m), after fermentation for 48 hours, the phorbol ester degradation rate was 84.30% and curcin degradation rate 63.21%. The results suggested that with optimization of the response surface methodology, *K. variicola* can degrade phorbol ester efficiently and at the same time degrade curcin.

Keywords *Jatropha curcas* seed cake; phorbol esters; *Klebsiella variicola*; solid-state fermentation; curcin

麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 又名膏桐、小桐子、假油桐、假花生等, 为大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属 (*Jatropha*) 落叶灌木或小乔木, 原产热带、美洲, 在我国主要分布于广东、广西、云南、贵州、四川、海南等省市. 麻疯树是一种抗旱耐瘠、速生、多用途的油料植物^[1], 结实量大, 种子含油量高 (一般为 35%-40%), 被认为是发展生物柴油的

合适树种, 是当前生物柴油研究的热点. 伴随麻疯树原油规模化生产, 必将会产生大量麻疯树籽饼粕, 如何有效合理利用饼粕是值得思考的问题. 麻疯树籽饼粕富含粗蛋白, 是植物源蛋白优质原料, 在饲料、食品及日用化工等领域具有广阔的应用前景^[2-4]. 但由于饼粕含有有毒物质, 因此不能直接应用. 饼粕中毒性成分主要为佛波酯^[5], 也有研究认为毒蛋白也是饼粕主要毒性成分之一^[6].

佛波酯 (Phorbol ester, PE) 是一种四环二萜类化合物, 麻疯树中含有多种佛波酯类化合物. 据报道, 佛波酯能够激活 PKC, 富集致癌物质, 引发癌细胞增殖^[5]; 人畜直接或间接服食或接触佛波酯后, 会出现眼花、呕吐和腹泻、刺激皮肤和器官出血等症状, 甚至导致死亡^[7]; 实验也已证明佛波酯

收稿日期 Received: 2013-12-23 接受日期 Accepted: 2014-01-17

*四川省科技支撑计划项目 (2011HH0006) 和国家自然科学基金项目 (31170312) 资助 Supported by the Sci-tech Pillar Project of Sichuan, China (2011HH0006) and the National Natural Science Foundation of China (31170312)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangL66@sina.com)

对鲤鱼^[8]、蜗牛^[9]、羊^[10]、猪^[11]、小白鼠^[12]、人类^[13-14]和老鼠^[15]都有毒性。麻疯树毒蛋白(Curcin)与蓖麻籽毒蛋白(Ricin)和巴豆毒蛋白(Croon)毒性相似,具有抑制真核细胞中蛋白质合成的作用,属于I型核糖体失活蛋白,但毒性远小于II型核糖体失活蛋白蓖麻籽毒蛋白(Ricin)^[16]。

关于麻疯树籽饼粕脱除佛波酯的研究中,通常为物理和化学方法联用,或通过微生物发酵的生物方法进行。由于佛波酯具有热稳定性,所以通过热处理方法进行佛波酯去除效果并不理想。已有去除效率高的物理化学联用方法包括:将佛波酯融于甲醇中通过等离子照射可以完全降解佛波酯^[17],65%乙醇反复洗涤也可完全去除佛波酯^[18],用含有0.07%的NaHCO₃的乙醇溶液可除去种子中98%的佛波酯^[19]等。利用微生物发酵降解佛波酯已经进行的研究包括:*Pseudomonas aeruginosa*^[20]及白腐菌(*Bjerknera adusta*和*Phlebia rufa*)^[21]固态发酵可降解饼粕中90%以上佛波酯,但发酵需要9-30 d,时间过久经济效益相对较低,发酵过程中饼粕的营养成分和微生物代谢产物均会被降解;*Streptomyces fomicarius*固态发酵后仁粕佛波酯降解率97%^[22],但其降解能力针对麻疯树籽仁粕而非饼粕;*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*两种混合作用^[23]和*Ganoderma resinaceum*^[21]固态发酵饼粕佛波酯降解率为62%和20%,降解能力较弱,不适用于工业生产。已有的研究存在发酵时间过长、经济效益不高和佛波酯降解效率低等问题,因此需要建立一种快速高效降解麻疯树籽饼粕佛波酯的方法。与前人研究相比,本研究也采用固态发酵技术降解麻疯树籽饼粕中的佛波酯;不同的是,本研究采用另一种菌株——*Klebsiella variicola*,并利用响应面法进行实验条件的优化。*K. variicola*也存在于水稻和烟草等植物体内及根际土壤中^[24]。本研究通过响应面法优化*K. variicola*固态发酵麻疯树籽饼粕降解佛波酯的发酵条件,旨在短时间内高效降解麻疯树籽饼粕中佛波酯。除了得到固态发酵的优化条件外,本研究首次对经微生物发酵降解的麻疯树籽饼粕中另一种毒性物质curcin也进行准确检测,以期日后麻疯树籽饼粕脱毒及麻疯树的综合利用提供参考文献。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵菌种:由能源植物生物燃料油制备及利用国家地方联合工程实验室提供。

麻疯树种子:麻疯树种子采于云南省永胜县仁里乡,取当年成熟、自然干燥的种子进行实验。

培养基:LB液体培养基。

1.2 试剂与仪器

试剂:乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,去离子水,二氯甲烷、酵母提取物、琼脂、氯化钠等均为分析纯,酶标记二抗:山羊抗兔IgG-HRP(北京中杉金桥公司),N,N,N',N'-TMB(四甲基联苯胺)显色液(美国Amresco)。

仪器:Waters515 高效液相色谱仪(美国)、UT-1900 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器厂)、AE-240 电子分析天平(0.000 1 g)、SB-300 DTR 超声波扫频清洗机、RE-

52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、JL-100 万能粉碎机(上海广沙工贸有限公司)、SpectraMax M2/M2e 型多功能酶联免疫分析仪(美国Molecular Devices 公司)、螺旋式冷榨机、生化培养箱、摇床、无菌操作台、高压灭菌锅等。

1.3 方法

1.3.1 麻疯树籽饼粕的制备 麻疯树种子经螺旋式冷榨机进行冷榨处理后冷却,再经过粉碎机进行粉碎后过40目筛子,制得饼粕密封且于-20℃冰箱保存。

1.3.2 菌悬液制备 将菌种接种到LB液体培养基中,在37℃、180 r/min条件培养过夜,当菌种浓度达到10⁸ cfu/mL进行接种。

1.3.3 固态发酵过程 每次取5 g饼粕置于100 mL三角瓶中,再接入适当的菌液、水等,在一定温度条件下生化培养箱进行培养发酵。

1.3.4 佛波酯的提取 基于文献,采用二氯甲烷提取法^[25]。向含有饼粕或饼粕发酵物三角瓶中,每次加入40 mL二氯甲烷并进行20 min超声,如此重复6次。将超声液收集进行抽滤旋蒸,得到佛波酯浓缩液并用甲醇溶解。再经过12 000 r/min离心10 min后,取上清液用0.22μm有机滤膜过滤,得到含有佛波酯的甲醇溶液。

1.3.5 佛波酯的检测 基于Makkar HPS(2008)报道的麻疯树佛波酯检测方法^[26],确定液相色谱条件为:色谱柱位十八烷基硅烷键合将硅胶填充柱(Spherisorb C18),柱长25 cm,内径46 mm;以80% 乙腈(含有0.175%磷酸)为流动相;检测波长为280 nm、流速为1.0 mL/min、柱温为25℃、进样量为20 μL,以外标法计算供试样品中麻疯树佛波酯的含量。

1.3.6 curcin含量的测定 参照辜小苹等(2011)的间接ELISA法,并进行了优化^[27-28]。

2 结果

2.1 未脱毒饼粕中佛波酯和curcin的含量

从饼粕中,随机取5.00 g ± 0.02 g 10份,进行含油量、佛波酯和curcin含量的检测。测得在平均含油量为17.21%的情况下,饼粕中佛波酯平均含量为2.327 mg/g,curcin平均含量为77.340 μg/g,发酵效果以降解率表示。

2.2 单因素实验结果

单因素实验包括发酵时间、发酵温度、接种量、初始加水量对佛波酯降解率的影响4个实验。

2.2.1 最适发酵温度 分别在27℃、32℃、37℃、42℃、47℃生化培养箱中,接种量和初始加水量适当的条件下,进行48 h固态发酵,其佛波酯降解率如表1所示,确定其最适发酵温度为37℃。

2.2.2 最适接种量 分别接种量(*V/m*)为20%、40%、60%、80%、100%时,初始加水量适当的条件下,在37℃进行发酵48 h,其佛波酯降解率如表2所示,最适接种量为40%(*V/m*)。

2.2.3 最适初始加水量 分别在初始加水量(*V/m*)为50%、75%、100%、125%、150%时,接种量适当为40%(*V/m*)的条件下,在37℃进行发酵48 h,佛波酯降解率如表3所示,得出最适初始加水量为100%(*V/m*)。

2.2.4 发酵时间的影响 在接种量为40%(*V/m*),初始加水量

表1 发酵温度对佛波酯降解率的影响

Table 1 Effect of fermentation temperature on degradation rate of phorbol ester

发酵温度 Fermentation temperature ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	27	32	37	42	47
PE降解率 Degradation rate of phorbol ester ($P/\%$)	64.87 ± 2.43	70.35 ± 2.34	78.51 ± 1.70	71.77 ± 2.07	59.43 ± 2.10

表2 接种量对佛波酯降解率的影响

Table 2 Effect of inoculation on degradation rate of phorbol ester

接种量 Inoculation ($\phi/\%$)	20	40	60	80	100
PE降解率 Degradation rate of phorbol ester ($P/\%$)	78.27 ± 2.14	81.35 ± 2.46	75.02 ± 1.88	76.10 ± 1.22	72.09 ± 1.05

表3 初始加水量对佛波酯降解率的影响

Table 3 Effect of initial amount of water on degradation rate of phorbol ester

初始加水量 Initial amount of water ($\phi/\%$)	50	75	100	125	150
PE降解率 Degradation rate of phorbol ester ($P/\%$)	66.08 ± 1.12	77.87 ± 1.48	82.87 ± 1.07	72.09 ± 3.35	71.70 ± 2.68

表4 发酵时间对佛波酯降解率的影响

Table 4 Effect of fermentation time on degradation rate of phorbol ester

发酵时间 Fermentation time (t/h)	24	36	48	60	72
PE降解率 Degradation rate of phorbol ester ($P/\%$)	54.87 ± 3.11	75.48 ± 1.49	82.16 ± 3.33	81.19 ± 2.02	82.47 ± 1.53

表5 实验设计因素水平及编码

Table 5 Design of experimental factors and codes

变量 Variance	编码 Code	编码水平 Code Level		
		-1	0	1
发酵温度 Fermentation temperature ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	X1	32	37	42
接种量 Inoculation amount ($\phi/\%$)	X2	20	40	60
初始加水量 Initial amount of water ($\phi/\%$)	X3	75	100	125

为100% (V/m) 的处理下, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行发酵, 分别进行24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 固态发酵, 确定发酵时间. 佛波酯降解率图如表4所示, 当发酵时间达到48 h左右时, 佛波酯降解率已经达到最大, 所以进行发酵实验可以选择48 h作为发酵时间.

2.3 响应面发酵条件优化

2.3.1 响应面设计及结果分析 基于单因素实验结果, 在发酵时间为48 h的条件下, 选取发酵温度、接种量和初始加水量3个因素, 利用Design Expert8.0软件对*K. variicola* 固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯的影响进行Box-Behnken设计, 佛波酯降解率为相应值, 每个因素取3个水平, 利用Design Expert8.0进行分析实验数据, 进一步优化各个因素的参数. 各因素水平的编码表见表5.

采用Design Expert8.0进行响应面分析, 结果见表6、表7.

根据表6结果, 采用Design Expert8.0进行实验结果分析. 由表7可知, X_2 、 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对佛波酯降解率的影响极显著 ($P < 0.001$), 说明接种量、发酵温度和初始加水量是发酵过程中的重要因素, 其中以接种量的影响最大. 发酵温度和接种量、接种量和初始加水量之间交互作用显著 ($P < 0.01$). 失拟项不显著 ($P > 0.05$), 说明数据中没有异常点, 模型适当.

用Design Expert8.0分析模型的可信度, 结果见表8.

根据响应面系数的回归分析, 得到该次模型的拟合方程为: $Y = 82.95 + 1.16A - 2.73B - 0.36C + 3.54AB + 2.73AC - 4.05BC - 8.24A^2 - 4.76B^2 - 3.06C^2$. 回归方程的方差分析结果见表7、表

8. 从表7、表8可以看出, 回归模型极显著 ($P < 0.001$), 失拟不显著 ($P = 0.2721$), 表明回归方程拟合度良好; 回归方程的复相关系数为0.9951, 表明99.51%的佛波酯降解率的变化可用此模型解释, 与实际情况拟合较好. 校正相关系数为0.9887, 佛波酯降解流程变异系数为0.92%, 信噪比为38.438, 说明模型可信度较高. 该方程为*K. variicola* 固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯提供了一个合适的模型.

2.3.2 响应面分析 采用Design Expert8.0软件对回归模型进行规范分析, 发酵温度、接种量、初始加水量3个因素交互影响*K. variicola* 固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯的响应面图和等高线图见图1、2、3.

2.3.3 显著因素水平优化 利用Design Expert8.0软件对回归模型进行规范分析, 找出佛波酯最大降解率的稳定点及对应的因素水平, 结合图1、2、3给出的回归方程的三维响应面图及等高线图可知, 回归模型存在稳定点 (0.1775, 0.3196, 0.2318) 对应实际取值 (37.12, 32.81, 104.73), 最大降解率估计值是83.42%.

2.3.4 模型的验证 为了验证模型的有效性, 根据优化实验所得的各因素优化值结合实际实验条件, 即发酵温度37 $^{\circ}\text{C}$, 接种量1.61 mL, 初始加水量为1.05 mL下进行固态发酵48 h, 重复3次, 测得佛波酯平均降解率为84.30% (表9), 与理论预测值相近, 相对偏差为1.06%. 可见, 该模型较好地预测*K. variicola* 固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯的情况.

2.4 *K. variicola*对curcin降解能力的检测

按照优化条件对麻疯树籽饼粕进行固态发酵, 对发酵

表6 Box-Behnken响应面实验设计及结果

Table 6 Box-Behnken response surface design and results

实验号 Experimental No.	编码 Code			PE降解率 Degradation rate of phorbol ester (P/%)
	X1	X2	X3	
1	1	1	0	71.57
2	0	0	0	83.31
3	-1	0	-1	73.94
4	1	0	-1	70.82
5	0	-1	1	81.58
6	0	0	0	83.68
7	0	0	0	82.12
8	1	-1	0	70.64
9	0	-1	-1	73.47
10	-1	0	1	67.03
11	-1	1	0	62.20
12	-1	-1	0	75.41
13	0	0	0	82.86
14	0	1	1	68.68
15	0	1	-1	76.79
16	0	0	0	82.78
17	1	0	1	74.82

表7 二元回归方程的方差分析

Table 7 Analysis of variance of binary regression equations

来源 Sources	离差平方和 Sum of squares	自由度 d_f	均方 Mean square	F	P
Model	677.12	9	75.24	156.80	< 0.0001
X_1	10.74	1	10.74	22.39	0.0021
X_2	59.73	1	59.73	124.49	< 0.0001
X_3	1.06	1	1.06	2.21	0.1811
X_1X_2	49.98	1	49.98	104.17	< 0.0001
X_1X_3	29.76	1	29.76	62.02	0.0001
X_2X_3	65.77	1	65.77	137.08	< 0.0001
X_1^2	285.62	1	285.62	595.27	< 0.0001
X_2^2	95.35	1	95.35	198.72	< 0.0001
X_3^2	39.46	1	39.46	82.23	< 0.0001
残差 Residual error	3.36	7	0.48		
失拟 Lack of fit	1.97	3	0.66	1.89	0.2721
纯误差 Pure error	1.39	4	0.35		
总计 Sum	680.48	16			

表8 响应面结果方差分析

Table 8 Analysis of variance of experimental results of response surface

项目 Item	数据 Data	项目 Item	数据 Data
标准差 SD	0.69	复相关系数 R -squared	0.9951
均值 Mean	75.39	校正相关系数 Adjust R -squared	0.9887
变异系数 CV/%	0.92	预测相关系 Predict R -squared	0.9505
预测残差平方 PRESS	33.70	信噪比 SNR	38.438

表9 响应面实验的验证

Table 9 Verification of response surface experiment

实验号 Experimental No.	PE降解率 Degradation rate of phorbol ester (P/%)	curcin降解率 Degradation rate of curcin (P/%)
1	84.48	60.13
2	84.36	64.28
3	84.07	63.14
平均值 Average	84.30	63.21

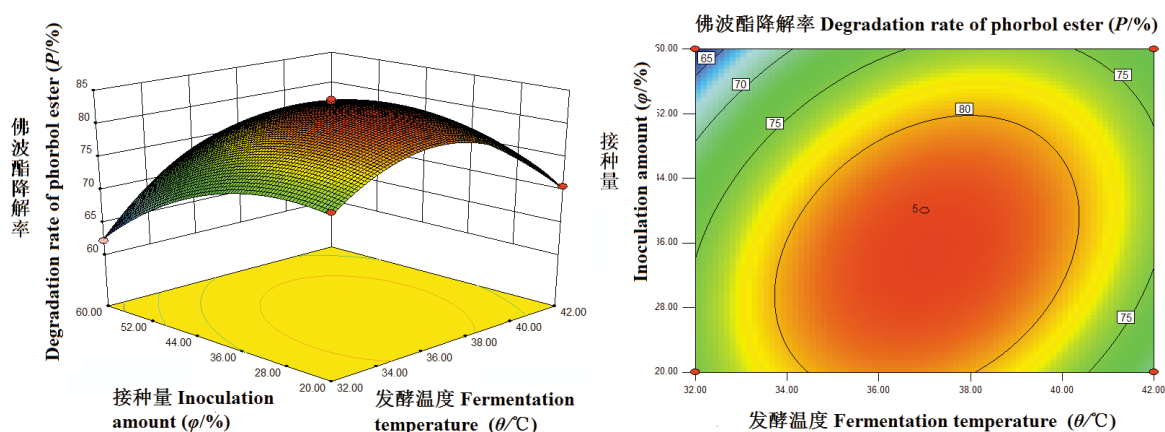


图1 发酵温度和接种量对佛波酯降解率影响的响应面图和等高线。

Fig. 1 Response surface and contour graphs of the effect of fermentation temperature and inoculation on degradation rate of phorbol ester.

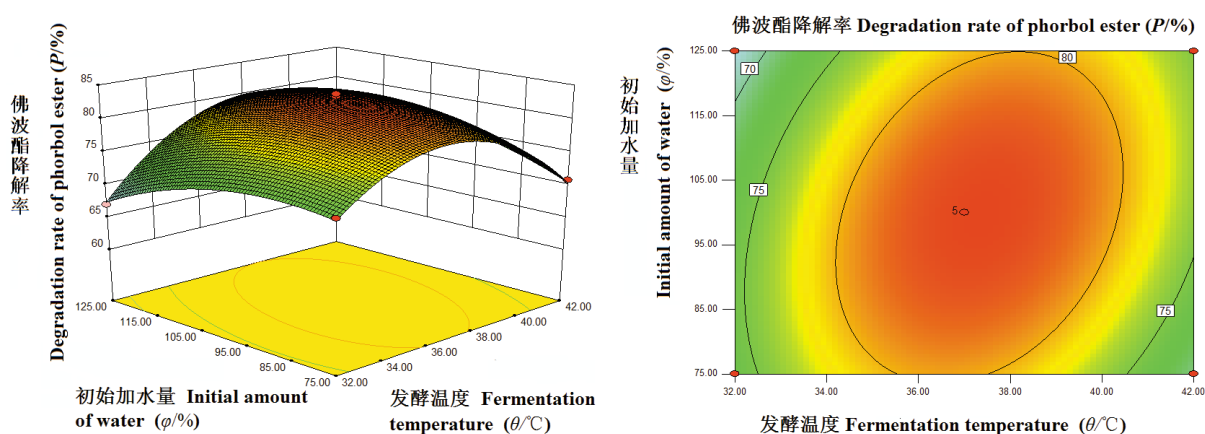


图2 发酵温度和初始加水量对佛波酯降解率影响的响应面图和等高线。

Fig. 2 Response surface and contour graphs of the effect of fermentation temperature and initial amount of water on degradation rate of phorbol ester.

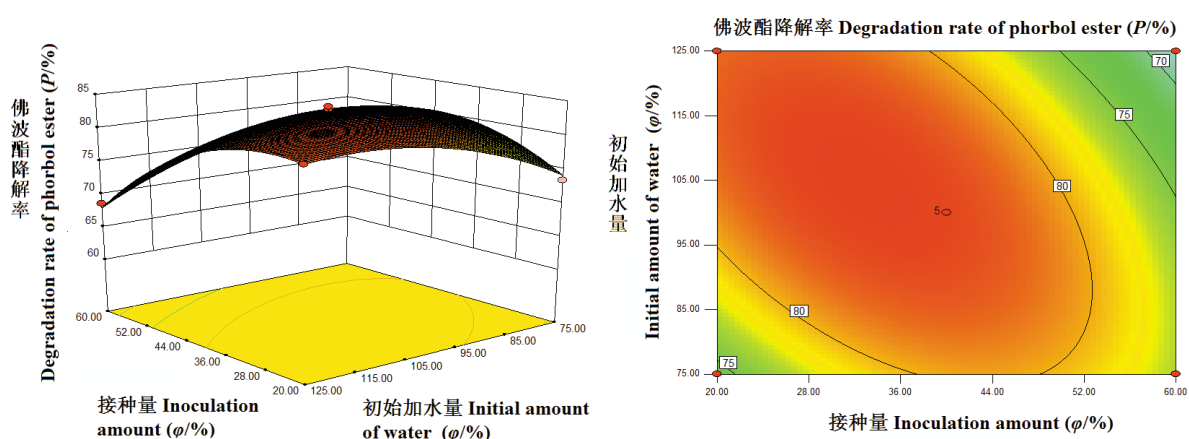


图3 初始加水量和接种量对佛波酯降解率影响的响应面图和等高线。

Fig. 3 Response surface and contour graphs of the effect of initial amount of water and inoculation on degradation rate and of phorbol ester.

过后的饼粕进行curcin含量的检测,发现curcin含量对比发酵前降解了63.21%(表9),说明*K. variicola*固态发酵降解麻疯树籽饼粕也可以降解其中的毒蛋白curcin成分。

3 讨论

本研究通过优化*Klebsiella variicola*固态发酵麻疯树籽饼粕降解佛波酯过程,建立了影响佛波酯降解关键因子的二次多项数学模型,确定了*K. variicola*固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯的工艺条件,可为实现*K. variicola*固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯的工业化生产提供理论依据。由表7中二元回归方程方差分析可知,在利用*K. variicola*固态发酵麻疯树籽饼粕降解佛波酯过程中,接种量、发酵温度和初始加水量是发酵过程中的重要因素,其中以接种量的影响最大。由图1、2、3中响应面和等高线图中发现,对于佛波酯降解率的影响,发酵温度和接种量、发酵温度和初始加水量的交互作用要大于接种量和初始加水量的交互作用。通过Box-Behnken响应面设计得出发酵温度、接种量、初始加水量对佛波酯降解影响的数学模型为: $Y = 82.95 + 1.16A - 2.73B - 0.36C + 3.54AB + 2.73AC - 4.05BC - 8.24A^2 - 4.76B^2 - 3.06C^2$ 。软件统计分析表明,该模型的相关系数 $R^2 = 0.9505$,佛波酯降解率的变异系数为0.92%,信噪比为34.438(表8),说明模型可信度较高。

麻疯树作为第二代生物柴油原料生产树种,减轻了生物柴油对食用油脂的依赖性,但由于饼粕中佛波酯等毒性成分,严重影响了其在饲料、食品及日用化工等领域的应用,为了更有效地利用饼粕资源,饼粕脱毒十分必要。已有的物理化学方法由于成本高、不环保、且操作复杂等因素并不广泛适用。近年来利用微生物固态发酵由于成本低、环保、操作简单,同时可以丰富饼粕的蛋白质、氨基酸等营养成分,已经引起重视。本研究所用的*K. variicola*是在前期实验过程中,从麻疯树生长土壤中分离得到,经过筛选发现具有降解佛波酯能力。利用*K. variicola*对麻疯树籽饼粕进行固态发酵降解佛波酯,首次通过响应面法优化发酵条件,在48 h的较短时间内,佛波酯降解率达到83.42%(即残余含量为0.384 mg/g),大大减少了佛波酯含量。同时,首次对经固态发酵后饼粕中另一种毒性成分curcin进行准确检测,由于curcin是蛋白质,经过冷榨、粉碎等处理会使含量大部分降解,但在饼粕中仍含有77.340 μg/g残余,经优化条件发酵后,其对curcin降解率达到63.21%(即残余含量为28.454 μg/g),也大大降解了curcin的含量。综上所述,*K. variicola*不仅对佛波酯有很强的降解能力,对毒蛋白curcin同样具有较强的降解能力,这一点是前人研究所没有关注的。

无毒品种的墨西哥麻疯树种子中佛波酯含量为0.11 mg/g,因此可认定,当饼粕中佛波酯含量在小于等于0.11 mg/g时,可视为无毒饼粕^[29]。虽然*K. variicola*对佛波酯及curcin均具有相对较强的降解能力,但发酵过后仍有部分佛波酯残留会影响其利用,需要进一步处理尽量除去残余佛波酯。就其在工业应用方面来说,可选择佛波酯含量降低品种进行应用;或可采用多次脱油减少饼粕中佛波酯使初始含量下降至0.7 mg/g左右,再经发酵后使得饼粕中佛波酯的含量下降到无毒

水平;也可采用乙醇等有机溶剂对发酵过后饼粕进行后续简单处理,亦可使饼粕中佛波酯含量降低至无毒水平。在利用*K. variicola*固态发酵的基础上,未来的研究重点将集中在对于通过添加外源物质进一步提高*K. variicola*降解能力,或利用其他菌株同*K. variicola*混菌进行固态发酵,使其对饼粕中佛波酯及curcin含量进行更彻底地降解,相关研究可为麻疯树籽饼粕在饲料、食品及日用化工等领域的应用提供理论基础。

4 结论

本研究利用响应面优化得出,*K. variicola*固态发酵麻疯树籽饼粕降解佛波酯的最优条件为发酵温度37.12 ℃,接种量33%(V/m),水料比105%(V/m),发酵时间48 h,此条件下佛波酯降解率为83.42%。通过实验验证,佛波酯实际平均降解率为84.30%,与理论值相比,相对误差为1.06%,说明该模型能较好地预测*K. variicola*固态发酵降解麻疯树籽饼粕佛波酯的实际情况。同时,在优化条件下固态发酵也可使curcin降解率达到63.21%,说明*K. variicola*固态发酵麻疯树籽饼粕也可以减少饼粕中毒蛋白curcin含量。与以往利用微生物固态发酵降解麻疯树籽饼粕中佛波酯的研究相比,利用响应面法优化*K. variicola*固态发酵麻疯树籽饼粕过程可在48 h时间内去除饼粕中84.30%的佛波酯,也可降解饼粕中63.21%的毒蛋白(curcin),脱毒效率较高,经济环保,具有生产指导意义。

参考文献 [References]

- Ye M, Li CY, Francis G, Makkar HPS. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China [J]. *Agrofor Syst*, 2009, **76** (2): 487-497
- 张婷婷, 兰翠玲, 马博, 曾小彪, 李荣峰, 李力. 微生物发酵在麻疯树籽粕资源化利用中的应用[J]. 中国酿造, 2012, **31** (3): 16-20 [Zhang TT, Lan CL, Ma B, Zeng XB, Li RF, Li L. Application of microbial fermentation in the resource utilization of *Jatropha curcas* L. seed cake [J]. *China Brewing*, 2012, **31** (3): 16-20]
- 马博, 兰翠玲, 李力. 麻疯树籽饼粕饲用品质改良及深加工技术研究进展[J]. 中国油脂, 2011, **32** (5): 26-30 [Ma B, Lan CL, Li L. Research progress on quality improvement and deep processing technology of *Jatropha curcas* L. seed meal/cake as animal feed [J]. *China Oils Fats*, 2011, **32** (5): 26-30]
- Devappa RK, Makkar HPS, Becker K. Nutritional, bio-chemical and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: review [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58** (11): 6543-6555
- Goel G, Makkar HPS, Francis G, Becker K. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals [J]. *Intern J Toxicol*, 2007, **26** (4): 279-288
- Makkar HPS, Francis G, Becker K. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate [J]. *J Sci Food Agric*, 2008, **88** (9): 1542-1548

- 7 Makkar HPS, Becker K, Schmook B. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds [J]. *Plant Foods Human Nutr*, 1998, **52**: 31-36
- 8 Kumar V, Makkar HPS, Becker K. Detoxification of *Jatropha curcas* seed meal and its utilization as a protein source in fish diet [J]. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 2008, **151** (1): S13-S14
- 9 Liu SY, Sporer F, Wink M. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria*, and *Bulinus* [J]. *Med Intern*, 1997, **2**: 179-188
- 10 Adam SEI, Magzoub M. Toxicity of *Jatropha curcas* for goats [J]. *Toxicology*, 1975, **4**: 347-354
- 11 Chivandi E, Erlwanger KH, Makuza SM, Read JS, Mtumuni JP. Effects of dietary *Jatropha curcas* meal on percent packed cell volume, serum glucose, cholesterol and triglyceride concentration and alpha-amylase activity of weaned fattening pigs [J]. *Res J Anim Sci*, 2006, **1**: 18-24
- 12 Rakshit KD, Darukeshwara J, Raj KR. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, **46**: 3621-3625
- 13 Rai DK, Lakhanlal P. *Jatropha curcas* poisoning in pediatric patients, Mauritius [J]. *Intern J Pediatrics Neonatol*, 2008, **6** (6): 259-262
- 14 Rakshit KD, Joy SR, Makkar HPS, Becker K. Ocular and dermal toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2013, **94**: 172-178
- 15 Li CY, Devappa RK, Liu JX, Lv JM, Makkar HPS, Becker K. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, **48**: 620-625
- 16 张春强, 刁其玉, 屠焰, 陆燕. 麻疯树籽实的毒性原理及其脱毒处理方法[J]. 饲料博览, 2009, **5**: 29-31
- 17 Kongmany S, Matsuura H, Furuta M, Okuda S, Lmamura M, Maeda Y. Plasma application for detoxification of *Jatropha* phorbol esters [J]. *J Phys*, 2013, **441** doi: 10.1088/1742-6596/441/1/012006
- 18 Xiao JH, Zhang H, Niu LY, Wang XG, Lu X. Evaluation of detoxification methods on toxic and antinutritional composition and nutritional quality of proteins in *Jatropha curcas* Meal [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, **59** (8): 4040-4044
- 19 Martinez-Herrera J, Siddhuraju P, Francis G, Becker K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico [J]. *Food Chem*, 2006, **96**: 80-89
- 20 Joshi C, Mathur P, Khare SK. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102**: 4815-4819
- 21 Candida RM, DeBaxros L, Ferreira MM, Fernando MN. The Potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake [J]. *Engin Life Sci*, 2011, **11**: 107-110
- 22 Wang XH, Ou LC, Fu LL, Zheng S, Lou JD. Detoxification of *Jatropha curcas* kernel cake by a novel *Streptomyces fomicarius* strain [J]. *J Hazard Mater*, 2013, **260**: 238-246
- 23 Phengnuam T, Suntornsuk W. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, **115** (2): 168-172
- 24 孙建光, 罗琼, 高森, 胡海燕, 徐晶, 周义清. 小麦、水稻、玉米、白菜、芹菜内生固氮菌及其系统发育[J]. 中国农业科学, 2012, **45** (7): 1303-1317 [Sun JG, Luo Q, Gao M, Hu HY, Xu Q, Zhou YQ. Growth promotion potential and distribution features of nitrogen-fixing bacteria in field environments [J]. *China Agric Sci*, 2012, **45** (7): 1303-1317]
- 25 梁慧, 彭彤, 颜钊, 唐琳, 陈放. 不同产地麻疯树种仁的含油量及脱油种仁的佛波酯含量[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (4): 546-548 [Liang H, Peng T, Yan , Tang L, Chen F. Oil content in kernel and phorbol ester content in defatted kernel of *Jatropha curcas* from different origins [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (4): 546-548
- 26 Makkar HPS, Martinez-Herrera J, Becker K. Variation in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol esters in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curca* [J]. *J Plant Sci*, 2008, **3**: 260-265
- 27 辜小苹, 蔡峰, 朱习红, 谢瑜, 徐莺, 陈放. 酶联免疫吸附法测定麻疯树核糖体失活蛋白[J]. 应用与环境生物学报, 2011, **17** (2): 227-231 [Gu XP, Cai F, Zhu XH, Xie Y, Xu Y, Chen F. An enzyme-linked immunosorbent assay for determination of ribosome-inactivating protein from *Jatropha curcas* L. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, **17** (2): 227-231]
- 28 Xie Y, Cai F, Shao ZJ, Ji RF, Zhao XP, Xu Y, Chen F. Curcin content of *Jatropha curcas* seeds and its correlation with seed traits in dry-hot valley of Jinsha River [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2012, **20** (5): 425-431
- 29 Makkar HPS, Aderibigbe AO, Becker K. Comparative evaluation of nontoxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors [J]. *Food Chem*, 1998, **62** (2): 207-215