



发酵油菜籽壳产纤维素酶的初步研究

作者:曾莹 王伟平 黄维 邱思

期号:2006年第10期

摘要 为了开发利用油菜籽壳这一油脂工业副产品,从60株保藏菌种中筛选得到一株能发酵油菜籽壳高产纤维素酶的菌株木霉T5。通过实验初步研究其适宜产酶的工艺条件。结果表明,木霉T5在m(油菜籽壳):m(啤酒糟):m(麸皮)=5:2:3、NH₄NO₃ 2%、CaCl₂ 0.1%、Tween80 0.1%的基质上,加水量为120%,接种量为10%,置30℃下培养60h,产酶量可达80.116 IU/g,具有较好的应用前景。

关键词 油菜籽壳; 固态发酵; 纤维素酶; 木霉

中图分类号 S816.43

Preliminary studies on cellulase produced by rapeseed hull fermentation

Zeng ying, Wang Weiping, Huang Wei, Qiu Si

Abstract A cellulase producing strain, *Trichoderma* spT5 was screened by rapeseed hull fermentation from 60 strain of collection. cellulase production conditions of *Trichoderma* spT5 by rapeseed hull solid-state fermentation were investigated through experiment. The result shows that the composed of medium were: rapeseed hull: brewers grains:wheat bran=5:2:3, NH₄NO₃ 2%, CaCl₂ 0.1%, Tween80 0.1%, water 120%.The optimum for producing cellulase were inoculate amount 10%, temperature 30℃ and cultivation for 60h. The cellulase production by *Trichoderma* spT5 can reach 80.116IU/g.

Key words rapeseed hull; solid state fermentation; cellulase; *Trichoderma* sp

纤维素酶 (cellulase) 是降解纤维素生成葡萄糖的一种复合酶, 主要由外切β-葡聚糖酶、内切β-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶等组成。

由于纤维素酶能将纤维类废弃物转化成有用物质而受到世界各国的普遍重视。研究发现: ①纤维素酶可破解富含纤维素的细胞壁, 使其包含的蛋白质、淀粉等营养物质释放出来, 同时又可以纤维素降解为可被畜禽机体消化吸收的还原糖, 从而提高饲料利用率。因此, 纤维素酶在饲料工业中具有极大的应用潜力。②纤维素酶在扩大食品工业原料和植物原料的综合利用、提高原料利用率、净化环境和开辟新能源等方面也具有十分重要作用。目前存在的主要问题是酶活性不高导致的生产成本过高, 使其应用受到一定的限制。因此, 选育高活性纤维素酶产生菌, 采用工农业生产的废弃物作原料进行纤维素酶的生产, 是降低生产成本的重要措施。

一直以来, 我国油菜籽制油是采用带壳高温压榨后浸出工艺, 而近年来, 新研制出的油菜籽脱壳制油工艺不仅可以提高出油率5%~10%, 还能有效地去除以往存在于油菜籽饼粕中的色素、芥子碱、单宁等抗营养物质, 使菜籽饼粕蛋白质含量提高到45%, 极大地提高了饼粕的质量。由此也带来了约占油菜籽重量17%的壳, 即油菜籽壳是采用油菜籽脱壳制油工艺生产的副产品, 其中粗纤维含量高达31%~34%。据报道, 油菜籽壳既可作牛饲料也可加工成纤维板或提取增粘剂——羧甲基纤维素钠, 还可以用来生产食用菌。本研究对以油菜籽壳作为主要原料, 添加其它辅料, 利用一株通过筛选得到的纤维素酶产生菌——T5进行固态发酵生产饲用纤维素酶的工艺条件进行初步研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 油菜籽壳

取自武汉工业学院。

1.1.2 菌种

黑曲霉n1、n2、n3、n4; G1、G2、G3、G4、G5、G6; An1、An3、An4、An5、An6、An54; An54-1、An54-2、An54-3、An54-4; 85.685.6-1 3.758 柠-1、As3.4309、黑X、B1。

米曲霉 O1、O2、O3 Ao-2-N-4、Ao-3、Ao-6、Ao-6-1 3.042A 3.042G。

木霉T5、T6、T8等。共60个菌株, 均为课题组保藏菌种。

1.1.3 斜面培养基 (PDA培养基)

马铃薯20%、蔗糖2%、琼脂1.5%~2%, 自然pH值。

1.1.4 发酵 (基础) 培养基

m (油菜籽壳): m (麸皮) = 6: 4。添加培养基干料重2%的 (NH₄)₂SO₄, 自然pH值。

1.2 方法

1.2.1 菌种的活化

将菌种接入斜面培养基中, 置30℃下培养至长满孢子。

1.2.2 菌种的筛选

将孢子浓度为3.0~5.0×10⁶个/ml的孢子悬浮液定量接入发酵培养基中, 摇匀后置30℃下培养48h, 测定酶活力。

1.2.3 纤维素酶活力测定

1.2.3.1 酶液的制备

称取固态培养物2g, 加入20ml自来水, 在40℃下浸提1h, 过滤, 滤液即为酶液。

1.2.3.2 酶活力测定

取0.1ml适当稀释的粗酶液, 加入用pH值4.8的醋酸缓冲液配制的1%羧甲基纤维素钠悬液0.9ml于试管中, 40℃水浴保温10min后加入2.0ml DNS试剂, 沸水浴加热3min, 用3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法 (DNS法) 测定葡萄糖含量, 以100℃灭活粗酶液作对照。

酶活力单位定义为: 每分钟水解羧甲基纤维素钠形成1μmol葡萄糖所需的酶量 (IU/g)。

1.2.4 发酵条件的研究

将筛选得到的优良菌株分别在不同的基质条件和环境条件下进行固态发酵培养, 以酶活力为指标优化发酵工艺条件。

2 结果与分析

2.1 可发酵油菜籽壳高产纤维素酶菌株的筛选

将课题组保藏的60个菌株分别接入以油菜籽壳为主要碳源的发酵培养基中, 经培养后测定酶活力。再对其中酶活力较高

相关文章

- 根霉脂肪酶产生菌筛选及发酵...
- β-葡萄糖苷酶的研究
- 谷朊粉的胰蛋白酶水解工艺研...
- 如何正确使用酶制剂
- 以柑橘皮为原料用宇佐美曲霉...
- 真菌纤维素酶及其在饲料中的...
- 植酸酶的研究与应用
- 不同物候期苜蓿POD同工酶分...
- 植酸酶对提高肉仔鸡日粮中钙...
- 饲用纤维素酶热稳定性的研究...
- 一氧化氮合酶与动物生殖

合作伙伴



的菌株进行多次传代培养，测定酶活力，结果见表1。
综合比较表1中数据可见，T5菌株的酶活力较高，产酶性能较稳定。而且T5菌株生长旺盛，产孢子能力强，所以选T5菌株进行产酶条件试验。

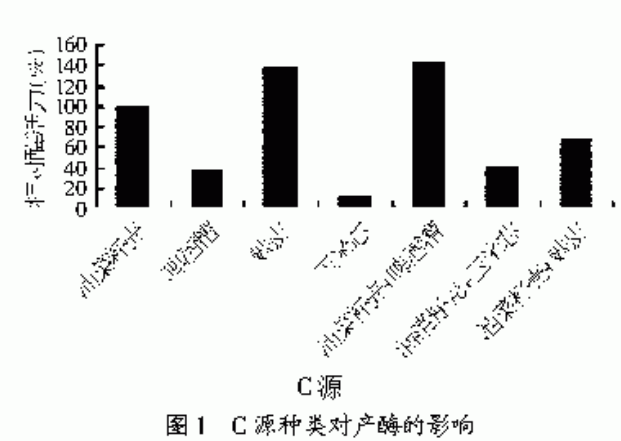
2.2 碳源对产酶的影响

2.2.1 最适碳源的选择

分别以油菜籽壳、啤酒糟、玉米芯、麸皮作为单一碳源，以油菜籽壳和啤酒糟、油菜籽壳和玉米芯、油菜籽壳和麸皮构成的复合碳源取代基础培养基中的碳源制备培养基，进行发酵培养后测定酶活力，结果见图1。

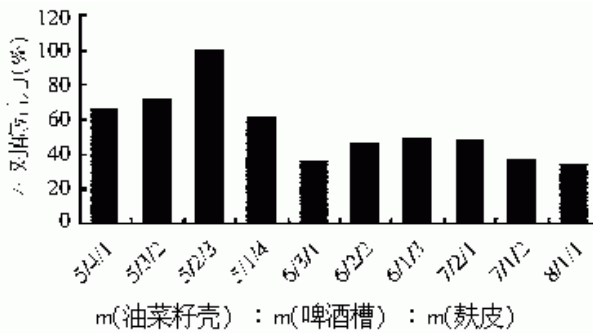
表1 主要产酶菌株的纤维素酶活力及其产酶稳定性的比较

菌株	纤维素酶活(1U/g)			
	一次传代	二次传代	三次传代	平均值
T5	67.675	65.116	41.959	58.25
T6	40.754	45.214	40.040	42.003
T8	46.859	29.449	44.204	40.171
F54-2	50.614	22.437	49.941	40.997
F54-3	48.747	39.803	45.927	44.826
F54-4	52.624	30.826	33.853	39.101
G4	45.212	34.836	29.213	36.420
G5	39.461	50.567	15.698	35.242
N1	42.792	36.871	48.443	42.702
N3	48.537	41.951	51.401	47.296
85.6	44.209	38.384	40.567	41.053



由图1可见，在油菜籽壳和啤酒糟构成复合碳源制备的培养基中菌株产酶活力最高，麸皮次之。故选油菜籽壳、啤酒糟、麸皮3种原料构成复合碳源，进一步对复合碳源的最佳配比进行选择实验。

2.2.2 复合碳源最佳配比的选择 (见图2)



由图2可见：复合碳源的配比为m(油菜籽壳) : m(啤酒糟) : m(麸皮) = 5 : 2 : 3时，菌株的产酶活力最高。

2.3 氮源对产酶的影响

2.3.1 最适氮源的选择

分别用不同的无机氮或有机氮取代基础培养基中的(NH4)2SO4作为氮源进行产酶实验，结果见图3。

图3 不同氮源对产酶的影响

结果表明：以 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作氮源时，菌株的产酶活力较高，这与每种含氮物质中氮元素含量不同有一定关系，总的来看，无机氮较有利于该菌种产酶。本试验最后选择 NH_4NO_3 作氮源。

2.3.2 含氮量对产酶的影响

在研究氮源对菌株产酶影响的基础上，进一步探讨含氮量对菌株产酶的影响，结果见图4。

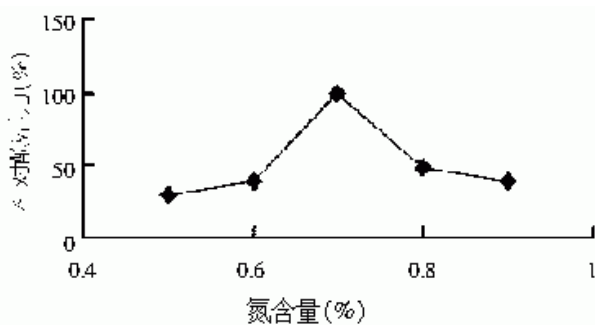


图4 含氮量对产酶的影响

由图可见：当培养基中含氮量为0.7%时，菌株的产酶能力最高。培养基中含氮量过高或者过低都会影响菌株产酶。

2.4 无机盐对产酶的影响

据报道，一定浓度的无机盐对纤维素酶的合成有抑制或激活作用。在培养基中添加一定浓度的不同无机盐溶液，培养后测定纤维素酶的酶活力，结果见图5。

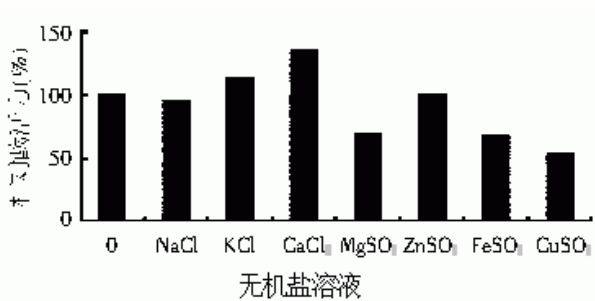


图5 无机盐对产酶的影响

结果表明：发酵培养基中添加 CaCl_2 、 KCl 可促进产酶，本试验最后选择用0.1%的 CaCl_2 。

2.5 表面活性剂 (Tween80) 对产酶的影响

有研究认为，表面活性剂可强化传质传氧，提高细胞膜的通透性，使酶易向胞外分泌。往培养基中添加一定量的Tween80，进行产酶试验，结果见图6。

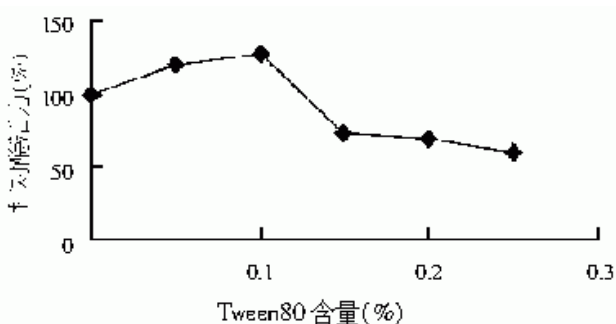


图6 Tween80含量对产酶的影响

由图6可见：培养基中Tween80的含量对菌株产酶有一定的影响。添加0.1%的Tween80可以使产酶量提高26%，Tween80的添加量过高则会抑制产酶。

2.6 加水量对产酶的影响

固态发酵时微生物在没有或几乎没有游离水的固体物上生长，而培养基质的含水量会影响到微生物生长所要求的渗透压和固体颗粒的物理性质，所以在整个发酵过程中培养基的含水量起着关键作用：含水量过高会影响原料颗粒之间的松散性，使原料颗粒成团，影响氧的传递和发酵热的散失，导致酶活力下降；含水量过低会影响营养基质的溶解和传递以及颗粒的肿胀等从而影响微生物对营养基质的利用，调节基质的初始含水量是控制培养基含水量的有效措施。

对试验选出的培养基[m(油菜籽壳):m(啤酒糟):m(麸皮)]=5:2:3]进行加水量的选择实验，结果表明，在加水量为120%~140%时产酶活性较高，含水量过多或者过少都会影响产酶，见图7。

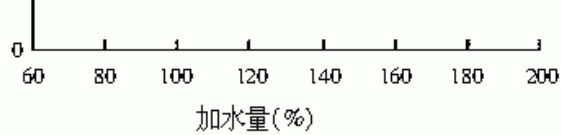


图7 加水量对产酶的影响

2.7 培养基初始pH值对产酶的影响

分别用10%NaOH或0.2mol冰醋酸调节发酵培养基的pH值，研究不同起始pH值对菌株产酶的影响。结果（见图8）表明：当培养基的起始pH值为5.5（自然pH值）时酶活力最高。培养基的起始pH值过高或过低都会抑制菌种产酶。

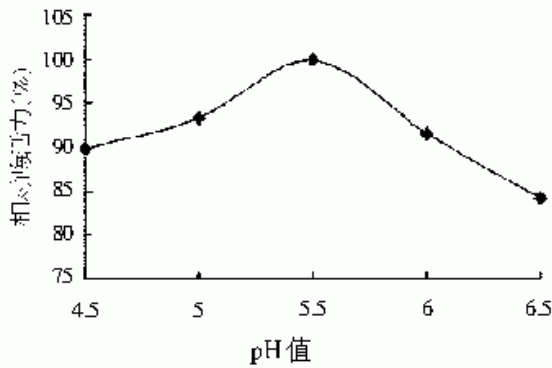


图8 pH值对产酶的影响

2.8 通气量对产酶的影响

以250ml 三角瓶中的装料量（瓶内剩余空间即为通气量）来衡量通气量的大小进行试验，结果见图9。

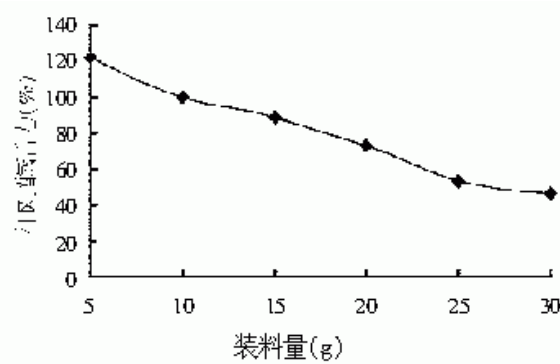


图9 通气量对产酶的影响

由图9可见，通气量越大，酶活力越高。说明此菌种产酶对氧气的需求量较大。

2.9 接种量对产酶的影响

将培养好的斜面菌种用无菌水制成浓度为 $3.0 \sim 5.0 \times 10^6$ 个/ml的孢子悬液，分别定量接入培养基中，进行发酵培养后测定酶活力，结果见图10。

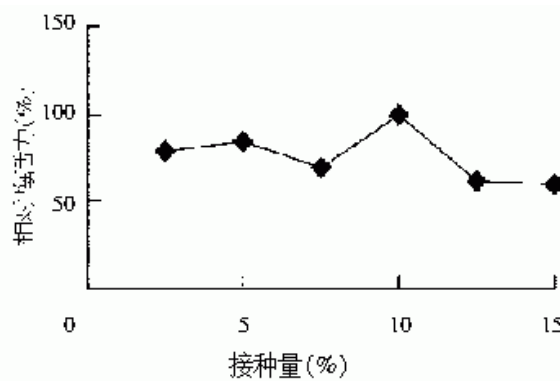


图10 接种量对产酶的影响

由图10可见，接种量对产酶量有一定的影响，在接种量为10%（m/v）时酶活力最高，接种量过大或者过小都会影响产酶。

2.10 温度和时间对产酶的影响

将接种后的培养基分别置30℃、37℃下进行培养，定时取样测定酶活力，结果见图11。

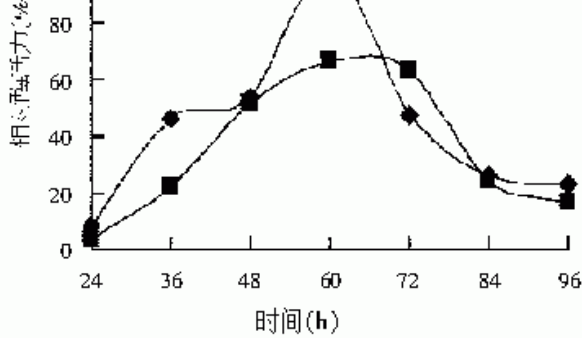


图 11 产酶进程曲线

由图11可见，在30℃下菌株产酶活力较高，是菌株产酶的适宜温度。两条产酶曲线都在60h达到酶活力的峰值，因此，培养时间应以60h为宜。

在适宜的工艺条件下接种木霉T5菌株进行培养后，测定酶活力。结果显示，在适宜的工艺条件下木霉T5所产纤维素酶活力最高可达80.116IU/g，比工艺条件优化前的酶活力提高了37.54%

3 小结

3.1 采用以油菜籽壳为主要原料的培养基进行固态发酵培养，从保藏菌种中筛选得到一株可发酵油菜籽壳高产纤维素酶的菌株——木霉T5。

3.2 通过试验研究发现，适宜的培养基组分为m(油菜籽壳)：m(啤酒糟)：m(麸皮)=5：2：3、NH₄NO₃ 2%、CaCl₂ 0.1%、Tween80 0.1%，加水120%~140%，自然pH值。

适宜的培养条件是：250ml三角瓶装料量为5g，灭菌后以10%的接种量接入孢子浓度为3.0×10⁶~5.0×10⁶个/ml的孢子悬浮液，置30℃下培养60h。

在适宜的条件下培养木霉T5，酶活力最高可达80.116IU/g。

(编辑：孙崎峰，sqf0452@126.com)

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽ICP备05006846号

饲料工业杂志社地址：沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编：110036 投稿：E-mail:tg@feedindustry.com.cn 广告：E-mail:ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部：(024) 86391926 (传真) 编辑二部：(024) 86391925 (传真) 网络部、发行部：(024) 86391237 总编室：(024) 86391923 (传真)