

单菌固态发酵油茶饼粕生产多酶生物饲料

卫洋洋¹, 蔡海莹^{1*}, 王力生¹, 夏涛², 杜先锋²

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: 采用黑曲霉为发酵菌种, 用固态发酵技术改善油茶饼粕的饲用品质以制取油茶饼粕多酶生物饲料。通过单因素试验和正交试验, 以纤维素酶活力和蛋白酶活力为检测指标, 确定黑曲霉固体发酵最佳基质中油茶饼粕与豆粕的混合比例为 1:1, 料水比为 1:0.5, 添加 1% (W/W) 的硫酸铵, 0.1% (W/W) 的磷酸氢二钾, 装瓶量(干料)为 50 g (500 mL 锥形瓶)。试验结果表明, 以 pH 5, 温度 28℃, 1.5% 接种量为最佳发酵条件, 培养 4 d, 纤维素酶活力达到 1 481.9 U·g⁻¹, 蛋白酶活力达到 4 128.1 U·g⁻¹。发酵后的油茶饼粕粗蛋白质提高 41.8%, 真蛋白提高 48.2%, 必需氨基酸明显提高, 粗纤维降低 38.0%, 同时油茶饼粕中的抗营养因子单宁降低 78.7%, 茶皂素降低了 65.3%, 其饲用价值得到极大改善。

关键词: 黑曲霉; 油茶饼粕; 固态发酵; 纤维素酶; 蛋白酶

中图分类号: S816.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0041-06

Production of multi-enzyme enriched bio-feed from camellia oleifera seed cake in solid state fermentation by *Aspergillus niger*

WEI Yang-yang¹, CAI Hai-ying¹, WANG Li-sheng¹, XIA Tao², DU Xian-feng²

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In this paper, *Aspergillus niger* was used to produce multi-enzyme enriched bio-feed from camellia oleifera seed cake with solid-state fermentation. The suitable medium for mixed fermentation of *Aspergillus niger* were soya bean meal to oil-tea-cake ratio of 1:1, material- to -water ratio of 1: 0.5, 1% (W/W) (NH₄)₂SO₄, 0.1% (W/W) K₂HPO₄, and 50 g dry material in 500 mL tapered bottle. The best fermentation conditions were 1.5% (W/W) inoculum size of *Aspergillus niger*, at 28℃ for 4 d at pH 5. The activities of proteinase and cellulase could reach to 4 128.1 U·g⁻¹ and 1 481.9 U·g⁻¹, respectively. The crude protein and the pure protein in camellia oleifera seed cake increased by 41.8%, 48.2%, respectively, while the crude fibre, tannin and tea saponin reduced by 38.0%, 78.7%, and 65.3%, respectively. Nutritional values of the fermented bio-feed improve obviously.

Key words: *Aspergillus niger*; camellia oleifera seed cake; solid-state fermentation; cellulase; proteinase

我国油茶面积约有 5 500 万亩^[1], 油茶籽年产量 100 万 t 左右, 按油茶茶籽含油量为 26%~39%, 机榨得油率为 70% 计算, 油茶饼粕年产量约 73 万 t^[2]。如此庞大的油茶饼粕数量却没有被得到充分利用, 大部分被用作清塘剂、肥料、燃料, 甚至废弃, 仅少量用于茶皂素的提取, 这不但严重污染环境, 而且在目前国内饲料原料市场严重匮乏的情况下, 更是一种资源浪费。目前, 各方面对油茶饼粕饲用研究得到

了普遍的关注。国内外学者的研究表明, 限制油茶饼粕饲用的主要因素有两点: 一是蛋白质含量过低, 纤维素含量较高, 营养水平较低; 二是油茶饼粕中单宁、茶皂素等抗营养因子含量过高, 影响了饲料的适口性和动物的摄食量^[2-3]。黑曲霉是工业应用常见的真菌菌种之一, 是一种在微生物发酵方面被广泛使用的曲霉菌, 不产生毒素, 对繁殖生长的营养要求较低, 同时可以产生许多种酶类。同时黑曲霉

收稿日期: 2011-08-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(2009BADB1B10)资助。

作者简介: 卫洋洋, 男, 硕士研究生。E-mail: 3318171@163.com

* 通讯作者: 蔡海莹, 女, 副教授。E-mail: haiying20@ahau.edu.cn

耐性好,可以耐高温、耐酸、耐盐,耐挤压等,具有很好的稳定性,在饲料中添加微生物时,其多被制成休眠状态的活菌制剂。美国食品和药物管理局(FDA)规定:黑曲霉菌无需经鉴定可直接生产。作者选用黑曲霉作为发酵菌种,以油茶饼粕配比豆粕作为固态发酵基质主要成分,采用实验室固态发酵的方法,以纤维素酶活和蛋白质酶活力为检测指标对其固态发酵生产工艺进行优化^[4],并对油茶饼粕的粗蛋白质、氨基酸组成的提高和改善,以及纤维素、单宁等抗营养因子的降解进行了初步研究和探讨,以期为今后的油茶饼粕进一步饲用化研究提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验原料 油茶饼粕:由安徽省六安市映山红生物有限公司提供。其中粗蛋白含量为12.56%,真蛋白含量为10.77%,粗纤维含量为17.1%,单宁含量为1.7%,茶皂素含量为13.4%。

1.1.2 试验菌种 黑曲霉菌种:中国普通微生物保存中心提供。

1.2 菌种培养方法

1.2.1 斜面培养基 PDA培养基。

1.2.2 液体种子培养基 PDA培养基(不加琼脂)

1.3 试验方法

1.3.1 培养方法 向培养基中以0.5%(W/W)的接种量接入黑曲霉孢子,培养72h,发酵完毕后置于通

风干燥箱中55℃干燥24h,粉碎过70目筛备用^[4]。

1.3.2 粗酶液的制备 纤维素酶液的制备:准确称取0.500g粉状干曲,加入20mL pH5.5,浓度为0.1 mol·L⁻¹的醋酸-醋酸钠缓冲液,37℃水浴保温,振荡1h,用滤纸过滤;取滤液用相同的缓冲液将其稀释合适倍数,用于纤维素酶活测定^[6]。

蛋白酶液的制备:准确称取0.500g粉状干曲,加入20mL pH7.2,浓度为0.1 mol·L⁻¹的磷酸盐缓冲液,40℃水浴保温,振荡1h,用滤纸过滤;取滤液用相同的缓冲液将其稀释合适倍数,用于蛋白酶活测定^[7]。

1.3.3 单因素设计试验 确定最佳培养基。采用不同的豆粕添加量,添加量分别为10%、20%、30%、40%、50%和60%,并以纯油茶饼粕培养基为对照,测定蛋白酶活力、纤维素酶活力以确定最佳培养基组成。

确定最佳无机氮源。在确定最佳培养基的基础上,分别添加1%(W/W)的(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、(NH₂)₂CO和NH₄Cl,测定蛋白酶活力、纤维素酶活力以确定最佳无机氮源。

1.3.4 正交试验 在以上单因素试验基础上,设计正交试验测定料水比、装料量、无机氮源添加量、磷酸氢二钾添加量对酶活的影响及其最佳水平。采用4因素3水平设计,因素与水平设计见表1。试验不设空白列,每组试验做个平行,重复2次,以重复试验误差作为方差分析的试验误差。

表1 最佳培养基正交试验因素与水平

Table 1 Orthogonal experiment factors and their levels for optimization of medium

水平 Level	A	B	C	D
	料水比 Ratio of material to water	装料量(干料, 250 mL 锥形瓶)/g Material-loading amount	无机氮源添加量/% Inorganic nitrogen source additives	K ₂ HPO ₄ 添加量/% K ₂ HPO ₄ additives
1	1:0.5	15	1	0.1
2	1:0.75	20	2	0.2
3	1:1	25	3	0.3

表2 最佳发酵条件正交试验因素与水平

Table 2 Orthogonal experiment factors and their levels for optimization of the best fermentation condition

水平 Level	A	B	C	D
	培养时间/d Incubation time	pH	温度/℃ Temperature	接种量(W/W) Inoculum size
1	3	5	26	0.5%
2	4	6	28	1.0%
3	5	7	30	1.5%

在以上单因素和正交试验的基础上,设计正交

试验测定培养时间、pH值、温度、接种量对酶活

的影响及其最佳水平。采用 4 因素 3 水平设计, 因素与水平设计见表 2。试验不设空白列, 每组试验做 3 个平行, 重复 2 次, 以重复试验误差作为方差分析的试验误差。

1.3.5 测量方法 纤维素酶活测定采用 CMC 法: 以 37℃、pH 为 5.5 的条件下, 每分钟从浓度为 4 mg·mL⁻¹ 的羧甲基纤维素钠溶液中降解释放 1 μg 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位^[5]。

蛋白酶活测定采用福林酚法: 以 40℃、pH 为 7.2 的条件下, 每分钟水解 2% 酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需要的酶量为一个酶活力单位^[6]。

粗蛋白测定采用凯氏定氮法, 真蛋白测定采用钨酸钠法^[8], 纤维素测定采用范式称量法, 单宁测定采用 F-D 试剂法^[9-10], 茶皂素测定采用乙醇浸提法^[11]。

1.3.6 数据处理 所有数据统计采用 SAS 进行方差分析, 判断其差异是否显著。

2 结果与分析

2.1 不同豆粕添加量对酶活力的影响

单菌发酵与混菌发酵相比, 具有发酵条件简单, 发酵过程易控制, 发酵产物纯度高优势, 同时由于发酵时间仅为 4 d, 次级代谢产物对菌体本身和发酵样的影响效果不大, 因而采用黑曲霉单菌固态发酵模式。试验结果表明 (图 1), 不同的基质配比对黑曲霉分泌纤维素酶活和蛋白酶活有显著影响。纯油茶饼粕的培养基由于氮源不足, 且抗营养因子过多, 阻碍了菌体的正常生长和产酶, 随着豆粕添加量的增加, 氮源逐渐得到补充, 并稀释了油茶饼粕中的抗营养因子, 且带入了一些豆粕中的生长因子, 从而菌体能够正常生长和产酶, 纤维素酶活和蛋白酶活都有不同程度的提高。豆粕添加量达到 60% 时, 纤维素酶活和蛋白酶活达到最高峰, 分别为 1 253.1 U·g⁻¹ 和 3 019.4 U·g⁻¹, 但豆粕添加量为 50% 时, 纤维素酶活和蛋白酶活分别 1 243.91 U·g⁻¹ 和 2 949.4 U·g⁻¹, 与添加量为 60% 时相差无几, 同时豆粕价格远远高于油茶饼粕价格, 因此试验选用豆粕添加量为 50% 的培养基作为最适配比的培养基。

2.2 添加无机氮源对酶活力的影响

无机氮源对酶活力影响的试验结果见图 2。氮源的种类和性质会影响黑曲霉分泌酶的活力和产率, 添加 1% (W/W) 的无机氮源对黑曲霉产酶均有一定帮助, 这是由于一定比例无机氮源的添加, 能够使菌体更好的利用氮元素来完成自身的生长和分泌相关酶类。其中硫酸铵对蛋白酶的提高影响最

大, 且差异显著 ($P < 0.05$), 很多研究表明黑曲霉对硝态氮的利用优于铵态氮, 我们的试验结果也表明硝酸铵对黑曲霉分泌纤维素酶的影响最大, 但由于差异不显著 ($P > 0.05$), 综合考虑, 试验选择硫酸铵作为无机氮源添加到培养基中。

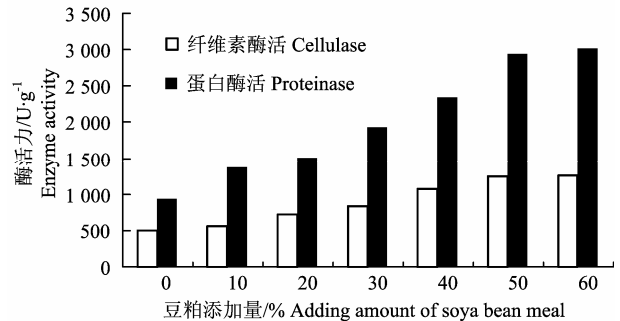


图 1 不同豆粕添加量对酶活力的影响

Figure 1 Effects of adding amount of soya bean meal on the enzyme activities

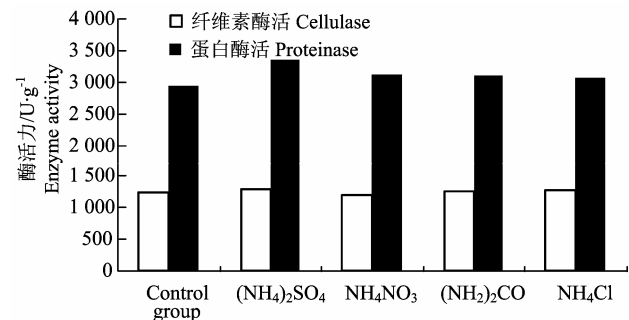


图 2 不同无机氮源对酶活力的影响

Figure 2 Effects of different inorganic nitrogen sources on the enzyme activities

2.3 油茶饼粕固态发酵基质的优化正交试验

正交分析的结果与分析如表 3 所示, 培养基组成为 A₁B₁C₁D₁ 时, 纤维素酶活力和蛋白酶活力最高。通过方差分析得出, 因素 A 和 B 对 2 种酶的产量均影响显著 ($P < 0.05$), A₁B₁ 为纤维素酶活与蛋白酶活的最佳水平。因素 C 和 D 对两种酶的产量影响不显著 ($P > 0.05$)。试验选用 A₁B₁C₁D₁ 为最佳油茶饼粕固态发酵基质组合, 即料水比为 1:0.5, 添加 1% (W/W) 的硫酸铵, 0.1% (W/W) 的磷酸氢二钾, 装瓶量为 50 g (干料, 500 mL 锥形瓶)。

2.4 培养条件的优化正交试验

固态发酵基质的 pH 不但影响黑曲霉的产酶量, 还影响其酶的活性和稳定性; 在较高温度状态下, 黑曲霉孢子菌体生长较快, 但阻碍产酶量; 在较低温度条件下虽然黑曲霉孢子菌体生长较慢, 但可延

表 3 培养基优化正交试验结果及其极差分析
Table 3 Orthogonal experiment results and range analysis for optimization medium

试验号 Test number	A	B	C	D	纤维素酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Cellulase	蛋白酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Proteinase
1	1	1	1	1	1 340.7	3 822.2
2	1	2	2	2	1 271.8	2 551.6
3	1	3	3	3	1 143.4	2 794.5
4	2	1	2	3	1 131.8	3 214.7
5	2	2	3	1	953.7	2 751.9
6	2	3	1	2	1 053.5	3 013.5
7	3	1	3	2	1 075.9	2 708.8
8	3	2	1	3	977.8	2 911.8
9	3	3	2	1	1 024.9	3 074.9
纤维素酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Cellulase						
K_1	1 251.9	1 182.8	1 124.0	1 106.4		
K_2	1 046.3	1 067.8	1 142.8	1 133.7		
K_3	1 026.2	1 073.9	1 057.7	1 084.3		
R	225.7	115.0	85.1	49.4		
蛋白酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Proteinase						
K_1	3 056.1	3 248.6	3 249.2	2 883.0		
K_2	2 993.4	2 738.4	2 613.7	2 758.0		
K_3	2 565.2	2 627.6	2 751.7	2 973.7		
R	490.9	621.0	635.5	215.7		

表 4 培养条件优化正交试验结果及其方差分析
Table 4 Orthogonal experiment results and range analysis for optimization the best fermentation conditions

试验号 Test number	A	B	C	D	纤维素酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Cellulase	蛋白酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Proteinase
1	1	1	1	1	1 145.7	3 571.8
2	1	2	2	2	1 043.4	3 071.1
3	1	3	3	3	973.4	3 564.9
4	2	1	2	3	1 481.9	4 128.1
5	2	2	3	1	1 399.7	3 746.9
6	2	3	1	2	1 088.5	3 288.6
7	3	1	3	2	1 227.5	3 587.4
8	3	2	1	3	943.9	2 544.5
9	3	3	2	1	874.6	2 313.4
纤维素酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Cellulase						
K_1	1 054.2	1 285.0	1 059.4	1 140.0		
K_2	1 323.4	1 129.0	1 133.3	1 119.8		
K_3	1 015.3	978.8	1 200.2	1 133.1		
R	308.1	306.2	140.8	20.2		
蛋白酶活/ $U \cdot g^{-1}$ Proteinase						
K_1	3 402.6	3 762.4	3 135.0	3 210.7		
K_2	3 721.2	3 120.8	3 170.9	3 315.7		
K_3	2 815.1	3 055.6	3 633.1	3 412.5		
R	906.1	706.8	498.1	201.8		

长产酶时间；同时，培养时间对黑曲霉分泌的酶活力影响较为突出，但是培养时间如果过长，有机养

分也会相应减少，而且其次级有害代谢产物增多，菌种生活环境恶化，因此培养时间的控制是整个固

态发酵中最核心的环节^[12]。所以本试验选择对 pH、温度、发酵时间、接种量作为发酵条件进行优化。本试验的正交分析的结果与分析如表所示,培养条件为 A₂B₁C₂D₃ 时,纤维素酶活和蛋白酶活最高。通过方差分析得出,因素 A 对 2 种酶的产量影响极为显著 ($P<0.01$), 因素 B 和 C 对 2 种酶的产量影

响显著 ($P<0.05$), 因素 D 对产酶影响不显著 ($P>0.05$)。试验结果表明: 设定 pH 值为 5, 温度 28℃, 接种量为 1.5% 的最佳发酵条件, 培养 4 d, 黑曲霉固态发酵油茶饼粕产纤维素酶活和蛋白酶活分别达到 1 481.9 和 4 128.1 U·g⁻¹。

表 5 发酵前后营养成分对比

Table 5 Nutrients before and after fermentation

营养成分 Nutrient component	油茶饼粕原样/% Camellia oleifera seed cake	发酵后油茶饼粕样品/% Camellia oleifera seed cake after fermentation
粗蛋白 Crude protein	12.56	17.82
真蛋白 Pure protein	10.77	15.96
氨基酸 Amino acid	10.00	15.37
Asp	0.85	1.67
Thr	0.37	0.67
Ser	0.45	0.78
Glu	2.74	3.37
Gly	0.42	0.67
Ala	0.53	0.73
Cys	0.07	0.33
Val	0.36	0.75
Met	0.13	0.17
Ile	0.37	0.67
Leu	0.74	1.17
Tyr	0.25	0.42
Phe	0.48	0.71
Lys	0.48	0.84
His	0.19	0.37
Arg	0.96	0.91
Pro	0.38	0.70
纤维素 Cellulose	17.10	10.60
单宁 Tannin	1.70	0.40
茶皂素 Saponin	13.40	4.65

2.5 发酵前后营养成分和抗营养因子含量的变化

由试验结果可知, 发酵前后, 蛋白质与氨基酸含量均有显著的提高, 其中粗蛋白和真蛋白含量分别提高了 41.8% 和 48.2%。必须氨基酸中除了精氨酸有微量下降外, 其他氨基酸含量明显提高, 同时, 粗纤维含量下降了 38.0%, 单宁含量下降了 78.7%, 茶皂素含量下降了 65.3%, 营养价值显著提高 (表 5)。

黄卫文在抑菌试验中证明, 茶皂素对黑曲霉有一定的抑制作用^[13], 因而固态发酵的原料最好采用提取过茶皂素的油茶饼粕, 发酵过后少量残存的茶皂素, 不但没有毒副作用, 反而会促进畜禽生长, 陈作勇在猪日粮中添加去毒茶籽粕的实验中证实了

这一点^[14]。本试验结果也表明去除茶皂素的油茶饼粕比含有一定量茶皂素的油茶饼粕具有较好的发酵效果。

3 结论

采用黑曲霉单菌发酵油茶饼粕生产多酶蛋白饲料, 最佳固态发酵基质配比为油茶饼粕与豆粕的配比为 1:1, 料水比为 1:0.5, 添加 1% (W/W) 的硫酸铵, 0.1% (W/W) 的磷酸氢二钾, 装瓶量为 50 g (干料, 500 mL 锥形瓶); 最佳发酵条件为 pH 5, 温度 28℃, 接种量为 1.5%。培养时间 4 d; 在此最佳发酵条件下, 黑曲霉分泌的纤维素酶活力达到 1 481.9 U·g⁻¹, 蛋白酶活力达到 4 128.1 U·g⁻¹; 发酵过后的

油茶饼粕粗蛋白质提高 42.4%，真蛋白提高 77.4%，必需氨基酸明显得到改善，粗纤维降低 38.0%，同时油茶饼粕中的抗营养因子单宁降低 78.7%，茶皂素降低了 65.3%，其饲用价值得到极大改善。

参考文献：

- [1] 张庆华, 黄文奎, 雷雄, 等. 福建省主要油茶产区油茶立地生产力研究[J]. 福建林学院学报, 1984, 10: 7-14.
- [2] 杨强, 胡海波, 张石蕊, 等. 茶粕饲料资源开发及利用技术研究进展[J]. 饲料工业, 2006(1): 53-55.
- [3] Roses R P, Guerra N P. Optimization of amylase production by *Aspergillums niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material [J] World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2009, 25(11): 1929-1939.
- [4] 钟海雁, 王承南, 黄健屏. 油茶枯饼固态发酵技术的研究[J]. 中南林学院学报, 2001, 21(1): 28-31.
- [5] 庄童琳, 李虎, 郭凤霞, 等. 黑曲霉固态混菌发酵苹果渣生产多酶生物饲料[J]. 生物工程, 2010, 12: 171-175.
- [6] 譙仕彦, 陆文清. 饲料添加剂纤维素酶活的测定分光光度法[S]. 中华人民共和国农业行业标准: NY/T 912-2004.
- [7] 须风高. 蛋白酶活力测定法[S]. 中华人民共和国行业标准: SB/T 10317-1999.
- [8] 王俊锋. 饲料中真蛋白质含量的测定方法[J]. 广东饲料, 2004(6): 37-38.
- [9] 董玉辉, 董春平, 代铁军, 等. 进出口粮食、饲料单宁含量检验方法[S]. 国家标准检测, SN/T 0800.9-1999.
- [10] Cruz-Hernandez M, Contreras J C, Lima N, et al. Production of *Aspergillums niger* GH1 tannase using solid-state fermentation[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2009, 3(1): 21-26.
- [11] 方柔, 李伟飞, 李竹君, 等. 油茶饼粕中茶皂素的提取及其在洗涤剂中的应用初探[J]. 粮油加工, 2009(10): 91-93.
- [12] 曾莹, 杨明, 曾灿伟, 等. 发酵棉籽壳生产饲用复合酶的初步研究[J]. 中国油脂, 2007, 32: 62-64.
- [13] 黄卫文, 熬常伟, 钟海雁. 油茶皂素抑菌效果研究[J]. 经济林研究, 2002(3): 17-19.
- [14] 陈作勇. 籽饼去毒后喂猪的试验[J]. 中国畜牧杂志, 1987(4): 42-43.