

黑曲霉固态发酵橘皮生产纤维素酶及淀粉酶

张 帅, 陈 懿, 董 基, 梁巧荣
(肇庆学院化学化工学院, 广东 肇庆 526061)

摘 要: 以橘皮为原料, 以黑曲霉 AS3.3928 为生产菌株, 采用固态发酵法生产纤维素酶和淀粉酶。通过单因素试验考察固态发酵培养基中橘皮含量、培养基含水量、接种量及发酵时间 4 个因素对纤维素酶和淀粉酶活力的影响。在单因素试验基础上, 通过正交试验最终确定最优产酶条件为: 固态发酵培养基中添加 16g 橘皮, 并加入 5mL 无菌水使培养基初始含水量为 64mL/100g, 黑曲霉接种量 15%, 发酵 60h。在此发酵条件下所产纤维素酶活力可达 1816U/g, 淀粉酶活力达 196U/g。结果表明, 利用黑曲霉固态发酵橘皮, 非常有利于纤维素酶和淀粉酶的生产。

关键词: 橘皮; 黑曲霉; 固态发酵; 纤维素酶; 淀粉酶

Solid State Fermentation (SSF) of Orange Peels for Production of Cellulase and Amylase by *Aspergillus niger*

ZHANG Shuai, CHEN Yi, DONG Ji, LIANG Qiao-rong
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: Orange peels were fermented by *Aspergillus niger* to produce cellulase and amylase by solid state fermentation (SSF). The effects of orange peel and water contents in SSF medium, inoculum size and fermentation time on cellulose and amylase activities were explored by one-factor-at-a-time method. Based on the results obtained, the fermentation conditions for the production of cellulase and amylase were optimized by orthogonal array design to be orange peel content of 16 g, initial water content of 64 mL/100 g, inoculum size of 15% and fermentation time of 60 h. Under these fermentation conditions, the activities of cellulase and amylase were 1816 U/g and 196 U/g, respectively. This study suggests that solid state fermentation can provide a promising strategy for the production of cellulase and amylase from orange peels by *Aspergillus niger*.

Key words: orange peels; *Aspergillus niger*; solid state fermentation (SSF); cellulase; amylase

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0190-04

我国是柑橘生产大国, 每年都有大量副产物柑橘皮作为废弃物而扔掉, 既浪费了资源又污染了环境。柑橘皮富含果胶、纤维素、可溶性糖及多种维生素和矿物元素, 是一种良好的微生物生长基质。目前对柑橘皮的研究主要集中在内含成分的提取方面, 对利用柑橘皮发酵产酶的报道极少。单丽君等^[1]对固体发酵柑橘皮生产饲用复合酶的菌株进行了选育, Ismail^[2]对曲霉和青霉液体发酵柑橘皮产复合酶进行了研究, 戚炯炯等^[3]对宇佐美曲霉固体发酵柑橘皮生产饲用复合酶进行了研究。

纤维素酶是饲用酶制剂的主要酶类之一, 在饲料中与半纤维素酶、果胶酶协同破坏植物细胞壁使营养物质释放出来以利于动物消化吸收^[4-5]。淀粉酶是我国目前用途最广泛、产量最大的工业酶制剂之一, 主要应用于淀粉加工、纸浆制造、纺织工业、酿酒及饲料加工业等领域^[6]。本实验以橘皮为原料, 以黑曲霉为生产菌株, 采用固态发酵法生产纤维素酶和淀粉酶, 经检索

国内外尚未见相关报道。本研究通过单因素试验和正交试验确定最优产酶条件, 旨在为酶制剂的生产提供参考数据, 同时为柑橘皮的综合利用提供新途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

橘皮: 四会砂糖橘, 于 2009 年 11 月市购, 洗净阴干, 去瓢取皮, 直接干燥法^[7]测得橘皮含水量为 68.14%, 将橘皮剪碎备用。

氢氧化钠溶液(200g/L)、柠檬酸钠缓冲液(0.05mol/L, pH5.5)、Whatman 1 号滤纸条(1.0cm × 6.0cm)、DNS 试剂、葡萄糖标准溶液(10.0mg/mL), 均参照文献[8]配制; 可溶性淀粉溶液(20g/L)、碘液、磷酸缓冲液(pH6.0)、盐酸溶液(0.1mol/L), 均参照文献[9]配制; 所有试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种与培养基

收稿日期: 2011-05-16

作者简介: 张帅(1978—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品发酵。E-mail: Chinazhsh@gmail.com

菌种：黑曲霉(*Aspergillus niger*) AS3.3928, 购于广东省微生物菌种保藏中心(GIMCC)。

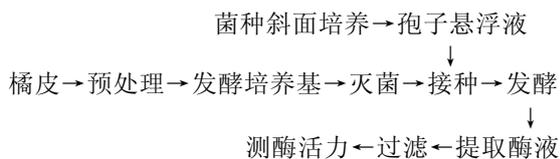
斜面培养基(PDA 培养基)：马铃薯 200g、葡萄糖 20g、琼脂 18g、水 1000mL, 自然 pH 值；固态发酵培养基：橘皮适量、麸皮 2.5g、豆粕粉 1.5g、(NH₄)₂SO₄ 0.1g、K₂HPO₄ 0.009g、ZnSO₄ 0.018g、MnSO₄·7H₂O 0.036g、FeSO₄·7H₂O 0.002g、吐温-80 0.1mL、水适量, 自然 pH 值。

1.3 仪器与设备

UV-4802H 紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司；SW-CJ-2FD 洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司；GKC21CR4 可控硅恒温水浴锅 上海锦屏仪器仪表有限公司；PYX-DHS 隔水式电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械一厂；DHG-9070B 数显电热恒温干燥箱、LRH-150 生化培养箱 上海浦东荣丰科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 工艺流程



1.4.2 孢子悬浮液制备

在斜面试管上接种黑曲霉, 28℃培养 3~5d^[10], 以斜面试管长满孢子为准, 加入 10mL 无菌水洗下, 用玻璃珠打散, 制成孢子悬浮液。

1.4.3 固态发酵产酶

在 250mL 锥形瓶中, 装入固态发酵培养基, 装料量高 2cm^[11], 在 121℃、0.1MPa 灭菌 30min, 冷却后接种孢子悬浮液, 摇匀打散, 在 28℃恒温培养, 培养期间翻曲 2~3 次, 并注意保持培养箱内空气湿度。

1.4.4 粗酶液制备

取 5g 麸曲于三角瓶中, 加入 50mL 蒸馏水, 在 40℃水浴浸提 1h。然后用脱脂棉过滤, 滤液即为粗酶液, 4℃保存, 24h 内使用^[12]。

1.4.5 酶活力测定

纤维素酶活力测定：采用文献[7]设计的滤纸法测定。纤维素酶活力定义：在 37℃、pH5.5、反应 60min 的条件下, 每分钟降解滤纸释放 1μmol 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。以每克麸曲所含的酶活力单位(U/g)表示。葡萄糖标准曲线制作参照文献[7]并稍作修改, 以吸光度为纵坐标, 对应标准葡萄糖溶液含糖的毫克数为横坐标作图, 得拟合的线性回归方程为 $y = 0.2628x + 0.0047(R^2 = 0.9980)$, 拟和度较高, 曲线线性良好, 可信度较高。

淀粉酶活力测定：采用文献[8]的方法测定。淀粉酶活力定义：1mL 酶液, 在 60℃、pH6.0 条件下, 1h 液化 1g 可溶性淀粉定义为 1 个酶活力单位。以每克麸曲所含的酶活力单位(U/g)表示。

1.4.6 正交试验设计

在单因素试验基础上, 选取橘皮含量、接种量、培养基含水量及发酵时间进行四因素三水平 L₉(3⁴) 正交试验, 确定最优产酶条件。

2 结果与分析

2.1 固态发酵各因素对发酵橘皮产酶的影响

2.1.1 橘皮含量对产酶的影响

分别称取 10、12、14、16、18、20g 剪碎的橘皮, 制成固态发酵培养基, 并分别在培养基中加入 4mL 无菌水、接入 15% 的孢子液, 28℃条件下培养 60h, 产酶结果见图 1。

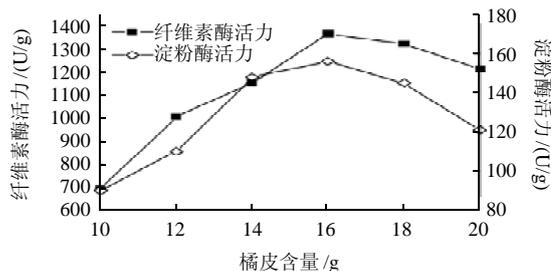


图 1 固态发酵培养基橘皮含量对产酶的影响

Fig.1 Effect of orange peel content on the production of cellulase and amylase

由图 1 可知, 随着培养基中橘皮含量的增加, 纤维素酶和淀粉酶活力均逐渐增大, 尤其纤维素酶的活力较高。当橘皮含量为 16g 时, 纤维素酶和淀粉酶活力均达到最大值, 此后随着橘皮含量的增加, 两种酶活力均不断降低。分析原因可能是, 橘皮中含有碳水化合物、多种维生素及矿物元素等营养成分供菌种利用产酶, 而其中含量较高的纤维素还对纤维素酶的产生具有诱导作用, 使纤维素酶大量生成, 但添加橘皮过多时, 培养基黏度增大, 透气性变得较差, 影响了产酶效果。

2.1.2 接种量对产酶的影响

分别在含 16g 橘皮的发酵培养基中接入 5%、10%、15%、20%、25% 的孢子液, 各培养基分别加入 4mL 无菌水, 28℃条件下培养 60h, 产酶结果见图 2。开始时纤维素酶和淀粉酶的产量均随孢子液接种量的增加而增大, 且在一定接种量时达到最大值, 此后两种酶的产量均随接种量的增加而减少。分析原因可能是, 接

接种量过小时, 菌体生长较弱, 影响酶活力, 且接种量小往往使发酵周期延长, 不利于生产; 接种量太大时, 菌体生长过快, 培养基中的营养主要被菌体用于自身的生长, 且培养液黏度增加, 造成溶氧不足, 另外菌体大量生长产热多, 使曲内温度升高, 后期菌丝营养不足, 从而影响菌丝的生长和酶的产生^[13]。图2显示, 接种量为15%时, 纤维素酶活力最大; 当接种量为10%时, 淀粉酶活力最大, 但与接种量15%时的淀粉酶活力相差很小。综合考虑, 选择接种量15%作为最佳接种条件。

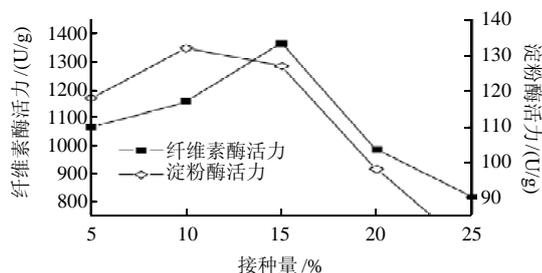


图2 孢子液接种量对产酶的影响

Fig.2 Effect of inoculum size on the production of cellulase and amylase

2.1.3 培养基初始含水量对产酶的影响

分别在含16g橘皮、接种量15%的发酵培养基中加入无菌水1、3、4、6、8mL, 相应的培养基初始含水量分别为57.0、60.0、62.5、65.0、68.0mL/100g, 28℃条件下培养60h, 产酶结果见图3。

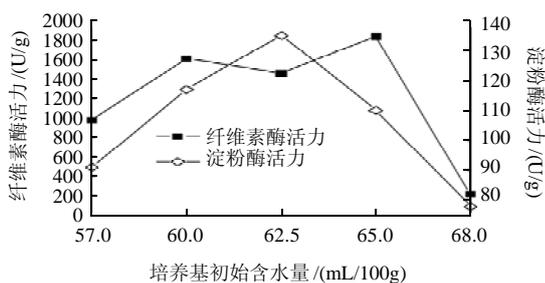


图3 培养基初始含水量对产酶的影响

Fig.3 Effect of water content in solid medium on the production of cellulase and amylase

由图3可知, 当培养基初始含水量为65mL/100g时, 纤维素酶活力水平最高, 而淀粉酶在含水量为62.5mL/100g时酶活性最高。培养基含水量过高时, 培养基黏度增加, 易结块, 透气性差, 氧气输送量减少^[14-15], 影响产酶, 两种酶的活力都迅速下降到最低值。综合考虑,

培养基含水量为62.5~65.0mL/100g, 即加水量为4~6mL时, 两种酶的活力均较高。

2.1.4 发酵时间对产酶的影响

发酵培养基加入橘皮16g、无菌水4mL、接种量15%, 28℃条件下分别发酵36、48、60、72、84h, 两种酶活测定结果见图4。

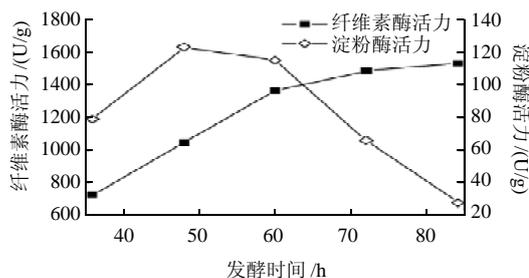


图4 发酵时间对产酶的影响

Fig.4 Effect of fermentation time on the production of cellulase and amylase

由图4可知, 发酵36h时, 菌体生长处于延迟期, 培养基表面有少量白色菌丝形成, 此时有少量纤维素酶和淀粉酶生成; 发酵48h时, 白色菌丝长满, 培养基结块, 有零星黑色孢子长出, 此时纤维素酶开始大量合成, 而淀粉酶活力达到最大值; 发酵60h时, 孢子长得较快, 纤维素酶活力继续上升, 而淀粉酶活力则明显降低; 发酵72h时, 白色菌丝表面长满黑色孢子, 遍及培养基表面, 但此阶段纤维素酶生成速度趋缓, 酶活基本达到高峰, 而淀粉酶活力持续下降; 发酵84h时, 是菌体生长的减速期, 培养基内外长满黑色孢子, 孢子趋向成熟, 此阶段纤维素酶继续有少量生成, 酶活达最大值, 淀粉酶活力则下降到最低值。虽然发酵72h后纤维素酶活力较高, 但考虑到72~84h时, 有大量孢子产生, 不利于产品性状, 因为麸曲中含孢子量的多少直接影响后续工艺中酶的提取、纯化等处理, 进而影响到酶的质量^[16-17], 而发酵60h时, 淀粉酶活力不但比发酵72h时高很多, 而且纤维素酶活力同发酵72h相差不大, 时间却可以节省很多, 综合考虑, 选取最佳发酵时间为60h。

2.2 最优产酶条件的确定

由表1的极差分析结果表明, 各因素对产纤维素酶和淀粉酶的影响是不一致的。影响纤维素酶活力的因素主次顺序为D>A>C>B, 发酵时间为主要影响因素, 最佳产酶条件为A₁B₂C₂D₂; 影响淀粉酶活力的因素主次顺序为C>D>A>B, 培养基含水量为主要影响因素, 最优产酶条件为A₃B₂C₂D₂。

表1 正交试验结果及极差分析
Table 1 Results of orthogonal tests and range analysis

试验号	因素				纤维素酶活力/(U/g)	淀粉酶活力/(U/g)
	A 橘皮含量/g	B 接种量/%	C 培养基含水量*/(mL/100g)	D 发酵时间/h		
1	1(16.0)	1(12.5)	1(62.5)	1(54)	1640	78
2	1	2(15.0)	2(64.0)	2(60)	1816	196
3	1	3(17.5)	3(65.0)	3(66)	1026	93
4	2(16.5)	1	2	3	984	159
5	2	2	3	1	1256	63
6	2	3	1	2	1356	155
7	3(17.0)	1	3	2	1196	122
8	3	2	1	3	1054	183
9	3	3	2	1	1306	163
k_1	1494.0	1273.3	1350.0	1400.7		
纤维素酶活力 k_2	1198.7	1375.3	1368.7	1422.7		
k_3	1185.3	1229.3	1159.3	1021.3		
R	308.7	146	209.4	401.4		
k_1	122.3	119.7	138.7	101.3		
淀粉酶活力 k_2	125.7	147.3	172.7	157.7		
k_3	156.0	137.0	92.7	145.0		
R	33.7	27.6	80.0	56.4		

注：* . 分别在固态发酵培养基中加入4、5、6mL 无菌水。

由于因素A是影响纤维素酶活力的较主要因素，却是影响淀粉酶活力的次要因素，因此应优先考虑因素A对纤维素酶活力的影响，对于因素A的水平可选择A₁，这不仅与单因素试验结果相符，而且节约了原料，降低了生产成本。最终确定最优产酶条件为A₁B₂C₂D₂，即在固态发酵培养基中添加16g橘皮，并加入5mL无菌水使得培养基初始含水量为64mL/100g，黑曲霉接种量15%，发酵60h。该条件下所得纤维素酶和淀粉酶的活力均达到最大值，分别为1816U/g和196U/g。

3 结论

富含果胶、纤维素及其他营养物质的柑橘皮是微生物发酵产酶的良好原料，不仅可以生产出某些活力较高的酶制剂，而且使柑橘皮这一废弃资源得到了充分利用，因而具有良好的经济效益和生态效益。本研究通过单因素试验和正交试验，确定最优产酶条件为：固态发酵培养基中添加16g橘皮，并加入5mL无菌水使培养基初始含水量为64mL/100g，黑曲霉接种量15%、发酵60h。在此发酵条件下所产纤维素酶活力可达1816U/g，淀粉酶活力达196U/g。表明利用黑曲霉固态发酵橘皮，非常有利于纤维素酶的生产，所得酶活力较高，但淀粉酶产量较低，这可能是因为橘皮中含量丰富的纤

维素对纤维素酶的产生具有诱导作用。因而利用黑曲霉固态发酵橘皮产纤维素酶是一种很有应用前景的纤维素酶制备方法。

参考文献：

- [1] 单丽君, 郑晓冬, 叶兴乾, 等. 利用柑橘皮固体发酵生产饲用复合酶菌株的选育[J]. 菌物学报, 2005, 24(2): 227-234.
- [2] ISMAIL A M S. Utilization of orange peels for the production of multi-enzyme complexes by some fungal strains[J]. Process Biochemistry, 1996, 31(7): 645-660.
- [3] 戚炯炯, 张嘉, 单丽君, 等. 以柑橘皮为原料用宇佐美曲霉生产饲用复合酶的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(16): 11-14.
- [4] NOUSIAINEN J, RINNE M, HELLAMAKI M, et al. Prediction of the digestibility of primary growth and regrowth grass silages from chemical composition, pepsin-cellulase solubility and indigestible cell wall content [J]. Animal Feed Science and Technology, 2003, 110(1/4): 61-74.
- [5] XIN Fengxue, GENG Anli. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(1): 295-306.
- [6] 吴大治, 张礼星, 徐柔, 等. 固态发酵生产细菌α-淀粉酶[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(1): 54-57.
- [7] GB 5009.3—2010 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] 何凤琴, 杨林, 钱昉, 等. GB/T 23881—2009 饲用纤维素酶活性的测定滤纸法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [9] 张蔚, 吴炳文, 郭庆文, 等. GB/T 24401—2009 α-淀粉酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] 冯培勇, 赵彦宏, 张丽. 响应面法优化黑曲霉产纤维素酶发酵条件[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 335-339.
- [11] 吴振强. 固态发酵技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 15-17.
- [12] 苏香萍, 龚大春, 陈国华, 等. 混合菌固态发酵产纤维素酶条件的研究[J]. 酿造科技, 2010(9): 21-24.
- [13] VARZAKAS T H, ROUSSOS S, ARVANITTOYANNIS I S. Glucoamylases production of *Aspergillus niger* in solid state fermentation using a continuous counter-current reactor[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2008, 43(7): 1159-1168.
- [14] MARQUES D D V, TORRES B R, PORTO A L F, et al. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 47(1/3): 122-126.
- [15] CHENG K C, DEMIRCI A, CATCHMARK J M. Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*[J]. Food Science and Technology International, 2011, 17(2): 99-109.
- [16] PAL A, KHANUM F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(19): 7563-7569.
- [17] KAMRA P, SATYANARAYANA T. Xylanase production by the thermophilic mold *Humicola lanuginosa* in solid-state fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 119(2): 145-157.