

Neurospora.crassa 降解茶粕培养基粗纤维的 发酵工艺研究

肖玉娟, 邓泽元*, 范亚苇, 李 静, 刘 蓉, 胡蒋宁

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 高等研究院, 江西 南昌 330047)

摘 要: 以提取茶皂素后的茶粕为材料, 研究 *Neurospora.crassa* (粗壮脉纹胞菌) 降解茶粕培养基粗纤维的发酵条件。在单因素试验的基础上, 选定豆渣、米糠、含水量及发酵时间进行四因素三水平 Box-Behnken 实验, 建立粗纤维降解率的二次回归方程, 通过响应面分析得到优化组合工艺条件。结果表明: 最佳的茶粕发酵条件为豆渣添加量 29.38%、米糠添加量 18.54%、含水量 72%、发酵时间 74.9h 时, 培养基粗纤维降解率达到最大值。该条件下粗纤维降解率预测值为 48.65%, 验证值为 48.36%。

关键词: 粗壮脉纹胞菌; 茶粕; 发酵条件; 响应曲面法优化

Fermentation Processing of Fiber Degradation from Oil-tea-cake Residue by *Neurospora. crassa*

XIAO Yu-juan, DENG Ze-yuan*, FAN Ya-wei, LI Jing, LIU Rong, HU Jiang-ning

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Institute for Advanced Study, Nanchang University,
Nanchang 330047, China)

Abstract: The fermentation processing for fiber degradation from the residue of oil-tea-cake after the extraction of tea saponin was investigated. According to results of single-factor experiments, soybean residue, rice bran, water content and fermentation time were selected for the Box-Behnken design to establish a quadric regression equation for describing the degradation of fiber. The optimal fermentation conditions were achieved by response surface analysis to be soybean residue of 29.38%, rice bran of 18.54%, water content of 72% and fermentation time of 74.9 h. Under the optimal fermentation conditions, the highest degradation of fiber reached up to 48.65%, which was consistent with 48.36% of the validated value.

Key words: *Neurospora. crassa*; oil-tea-cake; fermentation processing; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0243-05

茶粕, 又称茶籽饼、茶麸、茶枯, 呈紫褐色颗粒, 是山茶科植物的果实榨油后剩下的渣, 其中油茶茶籽粕和茶叶茶籽粕产量较大, 其年均总产量约 70 万 t, 是潜在的可利用茶粕资源^[1]。目前, 茶籽主要采用传统的压榨法榨油工艺制油, 所生产的茶粕中茶皂素、单宁等抗营养因子含量过高, 不适宜直接用于动物饲料生产, 大部分被用作清塘剂、肥料、燃料, 少量用于茶皂素的提取, 极少部分用于饲料资源的开发应用^[2]。茶粕如果去除了有毒物质茶皂素, 其营养价值可与米糠媲美, 且经过微生物发酵后, 可得到较高的菌体蛋白, 提高了茶粕的利用价值^[3]。因此, 本实验采用提取茶皂素(本课题组的专利技术)后的茶粕为主要原料, 利用实

验室自行筛选的一株产纤维素酶能力较强的粗壮脉纹胞菌 (*Neurospora.crassa*) 降解茶粕培养基粗纤维, 以期在茶粕的动物饲料开发利用方面提供一种更为有效的途径。

响应面分析(response surface methodology) 法是采用多元二次回归方法作为函数估计的工具^[4], 将实验中多因素与指标的相互关系作近似拟合, 可同时对影响生物产量的各因素水平及其交互作用进行评价与优化^[5]。因此它能快速有效地确定多因子系统中的最优条件, 该法已经广泛应用于各种培养基及发酵条件的优化^[6]。本实验在单因素试验的基础上, 选出对粗壮脉纹胞菌降解茶粕培养基粗纤维具有显著作用的 4 个因素的 3 个水平进行 Box-Behnken 试验, 通过响应面分

收稿日期: 2010-07-23

基金项目: 2010 年江西省科技重大专项; 食品科学与技术国家重点实验室目标导向课题(SKLF-MB-201003)

作者简介: 肖玉娟(1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事发酵工程研究。E-mail: xiaoyujuan0520@163.com

* 通信作者: 邓泽元(1963—), 男, 教授, 博士, 主要从事脂肪酸及天然产物研究。E-mail: dengzy28@yahoo.com.cn

析确定其最佳值、优化工艺参数。

1 材料与方法

1.1 菌种

粗壮脉纹孢菌(*Neurospora crassa*)由本实验室筛选保存。

1.2 仪器与设备

高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、移液器、恒温恒湿培养箱、电子天平、干燥箱、广口瓶、调温电热套等。

1.3 培养基

斜面固体培养基: 2% 蛋白胨、4% 麦芽糖、1.5%~1.8% 琼脂, pH5.5~6.0。

种子液培养基: 葡萄糖 10g、蛋白胨 5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 KH_2PO_4 1g、pH 值自然, 蒸馏水定容到 1L。

1.4 方法

1.4.1 种子培养

从新鲜菌体活化培养基上取 1 环菌接入种子液培养基(30mL/250mL 锥形瓶), 于 30℃、160r/min 摇瓶培养 36h, 备用。

1.4.2 发酵方法

在茶粕培养基中配入相应比例的豆渣和米糠, 装入 200mL 的广口瓶中, 料层厚度控制在 3~4cm, 按不同的料水比加入水搅匀, 高压灭菌。接入 5mL/100g 的种子液于固体培养基中, 将广口瓶置于恒温恒湿箱中, 在温度为 30℃, 湿度为 70% 的条件下进行好氧发酵^[7]。

1.4.3 含水量的测定

茶粕培养基中配入豆渣和米糠后, 加水浸润, 置于广口瓶中, 并用纱布和报纸盖上, 放入高压灭菌锅后, 121℃ 灭菌 30min。灭菌后的培养基 105℃ 烘干至质量恒定^[8], 含水量的计算公式如下:

$$\text{培养基含水量} / \% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

式中: m_1 为灭菌后培养基的质量; m_2 为干燥后培养基的质量。

1.4.4 粗纤维的含量测定及降解率的计算

茶粕固态发酵样品粉碎过筛孔尺寸为 0.425mm 的筛子, 混匀后先用煮沸的体积分数为 1.25% 的稀硫酸处理, 以去除其中的糖、淀粉、果胶等酸溶性物质, 再用煮沸的体积分数为 1.25% 的氢氧化钠溶液处理, 以除去蛋白、脂肪等碱溶性物质。最后用 95% 乙醇和无水乙醚处理除去单宁、色素以及残余的脂肪, 105℃ 烘干后所得残渣即为粗纤维^[9]。

$$\text{粗纤维降解率} / \% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: m_1 为培养基发酵前粗纤维总质量/g; m_2 为培养基发酵后粗纤维总质量/g。

1.5 粗壮脉纹孢菌降解茶粕培养基粗纤维的发酵条件优化

1.5.1 单因素对茶粕培养基粗纤维降解率的影响

影响粗壮脉纹孢菌生长及粗纤维降解率的因素很多^[10], 如添加的豆渣比例、米糠比例、培养基含水量、初始 pH 值及发酵时间等。根据相关文献报道^[11-12], 选用豆渣 10%、米糠 20%、初始 pH 值自然、含水量 68%、发酵时间 72h 为基本参数。确定一项最优条件后, 后续试验均按前面的优化值来进行试验。

1.5.2 Box-Behnken 中心组合试验

在单因素试验的基础上, 确定影响粗壮脉纹孢菌降解茶粕培养基粗纤维的显著因素, 采用 Box-Behnken 试验设计进行发酵条件优化^[13]。得到的数据采用 SAS 8.2 软件进行统计分析, 当 $P < 0.05$ 时为显著性水平。

1.5.3 验证实验

将优化实验所得的数据与响应面模型进行回归拟合, 确定其极值点及其相应自变量的取值, 并进行验证实验及可靠性分析。重复 3 次, 用平均值进行验证比较。

2 结果与分析

2.1 茶粕发酵过程中单因素对粗纤维降解率的影响

2.1.1 豆渣比例对粗纤维降解率的影响

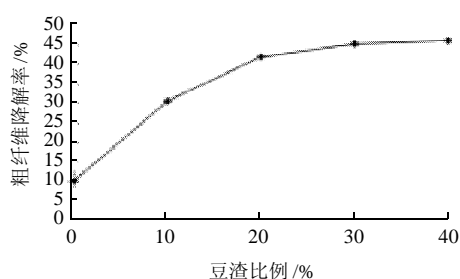


图1 豆渣比例对粗纤维降解率的影响

Fig.1 Effect of soybean residue on the degradation rate of crude fiber

如图 1 所示, 粗纤维降解率随豆渣比例的增加而呈上升趋势, 当向培养基中添加 20% 以上的豆渣时, 粗纤维的降解率增幅减小, 上升缓慢。为了多利用茶粕, 故选择豆渣比例为 20%。

2.1.2 米糠比例对粗纤维降解率的影响

如图 2 所示, 粗纤维降解率随米糠比例的增加, 呈

现先上升再下降的总体趋势,在添加量为20%附近出现最大值。

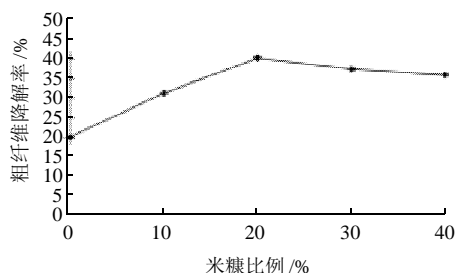


图2 米糠比例对粗纤维降解率的影响

Fig.2 Effect of rice bran on the degradation rate of crude fiber

2.1.3 初始 pH 值对粗纤维降解率的影响

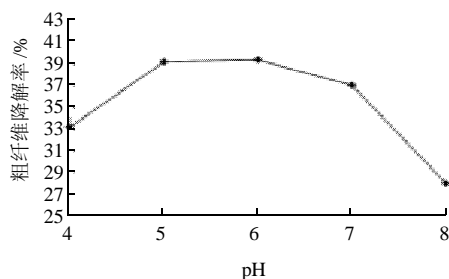


图3 初始 pH 值对粗纤维降解率的影响

Fig.3 Effect of initial pH on the degradation rate of crude fiber

如图3所示,培养基的pH值会影响微生物的生长和酶的稳定性,粗纤维降解率在初始pH6.0左右达到最大值,此后随着pH值上升而逐渐降低,特别是pH值为8.0时,粗纤维降解率显著降低。由于培养基的自然pH值在5~6之间,故选择自然pH值发酵。

2.1.4 含水量对粗纤维降解率的影响

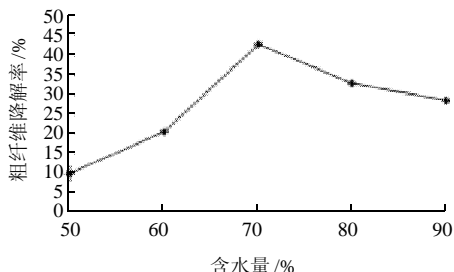


图4 含水量对粗纤维降解率的影响

Fig.4 Effect of water content on the degradation rate of crude fiber

如图4所示,粗纤维降解率随培养基含水量的增加,呈现先上升再下降的趋势,且增减幅度明显,在

含水量为70%附近达到最大值。初步确定含水量在70%时发酵效果最佳。

2.1.5 发酵时间对粗纤维降解率的影响

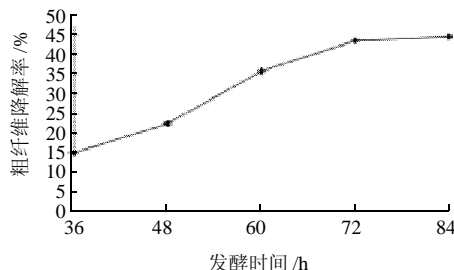


图5 发酵时间对粗纤维降解率的影响

Fig.5 Effect of fermentation time on the degradation rate of crude fiber

如图5所示,发酵时间是影响发酵产物中粗纤维含量的一个重要参数^[14],主要取决于微生物的生长和代谢速率,还取决于基质中的营养成分及内部环境^[15]。发酵时间太短,微生物不能充分利用碳源来生长,达不到理想的粗纤维降解效果;发酵时间太长,则生产周期变大,生产成本变高,而且容易滋生杂菌。在发酵初期,随着发酵时间的延长,产品中粗纤维的含量逐渐减少,当发酵时间为72h后,产品的粗纤维降解率增幅很低,故选用发酵时间72h左右为宜。

2.2 响应面分析法优化粗纤维降解率工艺条件

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素试验所得结果,确定发酵pH值为自然,选取豆渣比例、米糠比例、含水量和发酵时间4个对粗纤维降解率影响显著的因素,分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 代表,每一个自变量的低、中、高试验水平分别以-1、0、1进行编码(表1)。以茶粕培养基粗纤维降解率为响应值(Y),在单因素试验的基础上采用四因素三水平的响应面分析方法,试验因素与水平设计见表1。

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素	编码	水平		
		-1	0	1
A 豆渣比例 / %	X_1	10	20	30
B 米糠比例 / %	X_2	10	20	30
C 含水量 / %	X_3	60	70	80
D 发酵时间 / h	X_4	60	72	84

对豆渣比例 X_1 、米糠比例 X_2 、含水量 X_3 和发酵时间 X_4 作变换如下: $X_1=(A-20)/10$, $X_2=(B-20)/10$, $X_3=(C-70)/10$, $X_4=(D-72)/12$ 。以 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 为自变量,以3次试验所得粗纤维降解率的平均值为响应值(Y),得到结果见表2,其中1~24是析因试验,

25~27 是中心试验, 用来估计实验误差。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	Y/%
1	-1	-1	0	0	30.7884
2	-1	1	0	0	43.7813
3	1	-1	0	0	47.4462
4	1	1	0	0	47.4172
5	0	0	-1	-1	30.1885
6	0	0	-1	1	33.0827
7	0	0	1	-1	30.4351
8	0	0	1	1	35.1617
9	-1	0	0	-1	35.3874
10	-1	0	0	1	39.4522
11	1	0	0	-1	45.2132
12	1	0	0	1	47.5876
13	0	-1	-1	0	28.5485
14	0	-1	1	0	30.6059
15	0	1	-1	0	29.6244
16	0	1	1	0	32.0521
17	-1	0	-1	0	26.7087
18	-1	0	1	0	26.278
19	1	0	-1	0	29.4011
20	1	0	1	0	44.9465
21	0	-1	0	-1	36.8169
22	0	-1	0	1	42.2655
23	0	1	0	-1	43.6244
24	0	1	0	1	45.0583
25	0	0	0	0	43.5921
26	0	0	0	0	42.3526
27	0	0	0	0	43.0417

采用 SAS8.2 软件对响应值与各因素进行回归拟合后, 得到二次多元回归模型: $Y=0.429955 + 0.04968X_1 + 0.020905X_2 + 0.018271X_3 + 0.017452X_4 - 0.001914X_1^2 - 0.032555X_1X_2 + 0.03994X_1X_3 - 0.004226X_1X_4 - 0.009888X_2^2 + 0.000926X_2X_3 - 0.010037X_2X_4 - 0.111132X_3^2 + 0.004581X_3X_4 - 0.002082X_4^2$ 。

从表3的回归分析结果可以看出, 用上述的回归模型描述各因素与响应值之间的关系时, 模型4个因素的 P 值均小于 0.01, 失拟项 $P=0.080434 > 0.05$, 表明该模型显著; 回归方程的相关系数 $R^2=0.9662$, 表明该模型与实际实验拟合较好, 因此该模型可用于该菌对茶粕培养基粗纤维降解的分析和预测。回归方程各项的方差分析结果还表明, 自变量(豆渣比例、米糠比例、含水量和发酵时间)与响应值(粗纤维降解率)之间线性关系极显著($P < 0.01$); 含水量对粗纤维降解率的曲面效应极显著; 豆渣比例与米糠比例、豆渣比例与含水量的交互作用也极显著; 而 X_1^2 、 X_2^2 、 X_4^2 、 X_1X_4 、 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 的作用不显著。

表3 响应面试验回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis

系数项	自由度	均方差	F 值	$P > F$	显著性
X_1	1	0.029617	76.62405	0.0001	**
X_2	1	0.005244	13.56799	0.003129	**
X_3	1	0.004006	10.36424	0.007363	**
X_4	1	0.003655	9.455825	0.009628	**
X_1^2	1	0.00002	0.050557	0.82588	
X_1X_2	1	0.004239	10.96762	0.006204	**
X_1X_3	1	0.006381	16.50841	0.001573	**
X_1X_4	1	0.000071	0.184817	0.674884	
X_2^2	1	0.000521	1.34896	0.268042	
X_2X_3	1	3.428E-6	0.008869	0.926524	
X_2X_4	1	0.000403	1.042485	0.327388	
X_3^2	1	0.065869	170.4134	0.0001	**
X_3X_4	1	0.000084	0.217172	0.649548	
X_4^2	1	0.000023	0.059814	0.810922	
模型	14	0.009465	24.48839	0.0001	**
失拟项	10	0.000456	11.82585	0.080434	
纯误差	2	0.000039			

注: *.差异显著($P < 0.05$); **.差异极显著($P < 0.01$)。

对茶粕培养基粗纤维降解率模型进行求导和解逆矩阵可以得到模型的极值点, 豆渣为 29.38%、米糠为 18.54%、含水量为 72%、发酵时间 74.9h 时, 此时模型预测的最大响应值为 48.65%。

2.3 验证实验

为了检验模型预测的准确性, 在上述响应面分析得到的最优化条件和原始菌体生长条件下进行发酵实验, 重复 3 次实验所得茶粕培养基粗纤维的降解率为 48.36%, 与模型预测的最佳值基本吻合。说明响应面法优化得到的发酵条件参数准确可靠。

3 讨论

3.1 培养基一定的载氧能力有利于粗壮脉纹胞菌的生长

单因素试验表明粗纤维降解率随豆渣比例的增加而呈上升趋势, 当培养基中豆渣比例超过 20% 时, 粗纤维的降解率增幅减小, 上升缓慢; 同样粗纤维降解率随米糠比例的增加, 呈现先上升再下降的趋势, 在米糠比例 20% 附近出现最大值。响应面优化得到豆渣为 29.38%、米糠为 18.54% 时, 粗壮脉纹胞菌生长好、粗纤维降解率最大。粗壮脉纹胞菌为需氧菌, 培养基一定的载氧能力有利于该菌的生长和发育; 而豆渣富含淀粉和纤维、米糠也富含纤维, 他们的添加可以改善培养基的载氧能力, 因此蓬松的原料有利于该菌的生长。在固态发酵中, 适宜的发酵含水量, 使得基质颗粒之间膨松有空隙, 疏松度合适, 有助于菌体从中获得营养及氧气的传递。但是过高的含水量会导致基质黏结成团, 通气性下降, 影响氧的传递, 导致酶活下降; 而

含水量过低,水的活度下降,不利于物质传递,从而抑制粗壮脉纹胞菌对粗纤维的降解过程。

3.2 茶粕通过粗壮脉纹胞菌发酵是一种较好的饲料资源

我国可利用的茶粕资源十分丰富,但目前对茶粕的研究报道,大多专注于活性物质茶皂素的提取,而把茶粕发酵成饲料的报道较少。通过脱茶皂素加工工艺生产的茶粕是一种良好的饲料原料。它含有多种对动物生长发育有利的必需微量元素,其中Mg、Ca、Fe、Zn、K、Cu的含量分别为:2730、1230、268.4、29.7、14790、17.28mg/kg;而据刘彦明等^[16]的研究报道,茶粕中的有害元素Pb、Cd的含量却很低或近于零。经粗壮脉纹胞菌发酵生产的茶粕发酵产品,粗纤维含量降低,从初始的21.52%降至14.15%,部分纤维素和木质素成为了易消化的单糖或对肠道细菌有益生作用的低聚糖,经检测,可溶性糖含量由初始的7.6%提高至35.97%。发酵后的粗蛋白含量提高,从初始的12.82%提高至18.34%,茶粕中的非蛋白氮转化为菌体真蛋白,产品的营养价值得到较大的提升。另外,粗壮脉纹胞菌是一株产 β -胡萝卜素能力较强的菌,其发酵后培养基中 β -胡萝卜素含量可达100mg/kg以上,这使茶粕发酵产品同时有望成为一种良好的蛋禽天然色素饲料。总之,在动物生产中科学合理地使用茶粕发酵产品有利于缓解我国饲料资源紧缺的局面。

参考文献:

- [1] 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,2006,27(19):53-55.
- [2] 周薇,吴雪辉.油茶综合利用开发前景[J].中国农村科技,2006(10):21-23.
- [3] 邓桂兰,魏强华.利用茶粕生产菌体蛋白饲料的研究[J].粮食与食品工业,2008,15(3):31-34.
- [4] 王鸿,邓泽元,刘蓉,等.响应面法优化山落菜根多糖的提取工艺[J].食品科学,2010,31(2):46-50.
- [5] VOHRA A, SATYANARAYANA T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*[J]. Process Biochemistry, 2002, 37: 999-1004.
- [6] ING L S, CHIA Y K, FENG C H, et al. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation[J]. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 2008, 39: 635-643.
- [7] 王立梅,杜似娟,郑丽雪,等.响应面法优化高产虾青素菌株的发酵条件[J].食品科学,2009,30(21):312-315.
- [8] SHARMA A, VIVEKANAND V, SINGH R P. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 3444-3450.
- [9] 贾才华,邓泽元,范亚苇,等.响应面法优化粗壮脉纹胞菌降解啤酒糟粗纤维的培养基[J].食品科学,2009,30(21):195-199.
- [10] 张杰,姜月,程大友,等.甜菜固态发酵生产酒精的条件优化[J].中国农学通报,2009,25(5):72-75.
- [11] 李强,郑旭煦,殷钟意,等.白腐菌固态发酵中药废渣生产蛋白饲料工艺条件[J].三峡环境与生态,2009,2(2):36-39.
- [12] PATRICK G, PAUL M. The role of water in solid-state fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 13(2/3): 85-101.
- [13] BAS D, BOYAC I H. Modeling and optimization ability of response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78: 836-845.
- [14] 王永红,冉伟,张富国,等.混合菌种固体发酵菜生产氨基酸肥料的条件研究[J].中国农业科学,2009,42(10):3530-3540.
- [15] 方传记,陆兆新,孙力军,等.淀粉液化芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及醇条件的优化[J].中国农业科学,2008,41(2):533-539.
- [16] 刘彦明,杨宇,王辉.茶饼中茶皂素的提取和微量元素的测定[J].信阳师范学院学报,2000,13(1):21-23.