

微生物固体发酵提取杜仲胶工艺参数的筛选

苏印泉^{1a}, 任 钊^{1a}, 杜双田^{1b}, 池 明^{1a}, 丁奋霞^{1a},
中泽庆久², 堤雅史², 鲁 婷²

(1 西北农林科技大学 a 林学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 大阪大学, 日本大阪府 565-0871)

[摘 要] 【目的】探讨菌株 D-5 在不同条件下对杜仲种皮固体发酵时羧甲基纤维素(CMC)酶、果胶酶活力及纤维类物质去除率的变化规律, 筛选利用微生物固体发酵提取杜仲胶的发酵工艺参数。【方法】以曲霉 D-5 为发酵菌株, 研究发酵基质不同的含水率、初始 pH、起爆剂用量、发酵温度对 CMC 酶、果胶酶活力及纤维类物质去除率的影响。【结果】发酵基质的含水率、初始 pH、起爆剂用量、发酵温度对菌株 D-5 的酶活力及纤维类物质的去除率有显著的影响。菌株 D-5 发酵的适宜条件为: 基质含水率为 60%、初始 pH 6.0、发酵温度 30℃、起爆剂用量 1.5%, 在此条件下发酵 6 d CMC 酶及果胶酶的活力最高, 发酵 18 d 纤维类物质去除率可达 86.43%。【结论】利用微生物发酵去除纤维类物质是杜仲胶提取的重要途径之一, 菌株 D-5 在杜仲胶提取中有一定的应用价值。

[关键词] 杜仲胶; 固体发酵; 纤维素酶; 果胶酶; 纤维类物质去除率

[中图分类号] S789.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)07-0155-06

Screening parameters for the extraction of Eucommia rubber (EU-rubber) by microbial solid fermentation

SU Yin-quan^{1a}, REN Zhao^{1a}, DU Shuang-tian^{1b}, CHI Ming^{1a},
DING Fen-xia^{1a}, NAKAZAWA Yoshihisa², TSUTSUMI Masafumi², LU Ting²

(1 a College of Forestry, b College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Osaka University, Osaka Prefecture 565-0871, Japan)

Abstract: 【Objective】The study aimed to investigate changes of carboxymethyl cellulase (CMC) and pectinase activity and the elimination rate of cellulosic materials caused by microbial solid fermentation (*Aspergillus* D-5) on *Eucommia* pericarp under different conditions to screen parameters for the extraction of EU-rubber by microbial solid fermentation. 【Method】*Aspergillus* D-5 was used to investigate the effect of different moisture contents of fermentation substrate, initial pH, dosage of ignition agent and culture temperature on CMC and pectinase activity. 【Result】The results showed that the moisture content of fermentation substrate, initial pH, dosage of ignition agent and culture temperature had significant effect on the enzyme activity of D-5 strain and the elimination rate of cellulosic materials. The optimal conditions for fermentation by D-5 strain was determined: moisture content of fermentation substrate was 60%, initial pH 6.0, culture temperature 30℃, dosage of ignition agent 1.5%. Under these conditions, the CMC and pectinase activity was the highest after 6 days of fermentation and the elimination rate of cellulosic materials was 86.43% after 18 days of fermentation. 【Conclusion】Removing cellulosic materials by microbial fermentation material is one of the most important ways to extract EU-rubber. D-5 strain in the extraction of

* [收稿日期] 2009-12-25

[基金项目] 中日(NEDO)合作项目“利用工业植物原料杜仲开发可持续发展的杜仲胶生产技术”(K332020908); 陕西省日元贷款项目(K332020023)

[作者简介] 苏印泉(1954—), 男, 陕西白水人, 教授, 主要从事资源植物开发利用研究。E-mail: syq009@126.com

[通信作者] 杜双田(1961—), 男, 陕西扶风人, 副教授, 主要从事微生物研究。E-mail: dst6107@126.com

EU-rubber has certain application value.

Key words: Eucommia rubber; solid state fermentation; cellulase; pectinase; elimination rate of fiber materials

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv) 是中国特有的名贵经济树种,也是世界上适应范围最广的重要胶源植物^[1]。杜仲胶因独有的“橡—塑二重性”而成为新材料研究的热点之一^[2]。杜仲树在我国分布很广,其种皮中杜仲胶的含量达 12%~18%^[3]。但杜仲胶的产出率低、提取过程复杂、生产成本低且对环境污染严重^[4-5],这严重限制了杜仲胶的产业化发展。

杜仲含胶细胞的分布与微管系统密切相关,天然植物细胞壁架构物质和填充物质主要是由纤维素、角质和果胶等物质(以下简称纤维类物质)构成,除了酸、碱能水解微管束,使胶体从组织中萃取出来外,纤维素酶、果胶酶通过酶解也可使细胞内成分溶出。酶解法最大的特点是反应条件温和,酶作为一种生物催化剂,具有高效性、底物专一性等特点,在反应中不会产生副产物。用纤维素酶水解杜仲叶细胞壁后,可以得到高强度的长丝杜仲胶,经微生物发酵分解可使杜仲胶提取材料中粗纤维素含量减少 65.46%,发酵后纤维素、黏结素等被破坏,使杜仲胶完全暴露在外^[6-9],从而大大简化了杜仲胶的提取工序,并具有提取过程操作简单、成本低、对环境无污染等特点。

目前,人们在提取杜仲胶时多将提取材料粉碎,以提高杜仲胶在溶剂中的溶出率,但杜仲胶丝在机械外力的作用下会受到一定程度的破坏^[9]。本试验以杜仲种皮为材料,利用曲霉菌株 D-5 进行固体发酵,通过研究发酵过程中羧甲基纤维素(CMC)酶、果胶酶及纤维类物质去除率的变化规律,筛选发酵工艺参数,旨在为微生物在杜仲胶提取中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 杜仲种皮,采于河南灵宝杜仲基地。

1.1.2 菌种 曲霉由西北农林科技大学生命科学院微生物实验室提供,菌株编号 D-5。

1.1.3 培养基 斜面培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,蔗糖 10 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,琼脂粉 12 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 6.5;固体菌种培养

基:含水率 60%的麸皮,自然 pH;发酵培养基:杜仲种皮,起爆剂 1.5% (质量分数),调节含水率为 60%。以上 3 种培养基均于 121 °C 下灭菌 30 min。

1.2 不同因素对固体发酵效果的影响

1.2.1 发酵时间 在无菌条件下,将曲霉 D-5 按 20 g/kg 的接种量接种于发酵培养基上,菌种与基质混匀后于(30±1) °C 静置培养 18 d,期间每隔 3 d 取样测定 CMC 酶和果胶酶活力,以确定发酵时间与酶活力的关系,每个处理重复 3 次。

1.2.2 基质含水率 用蒸馏水调节发酵培养基的含水率分别为 45%,50%,55%,60%,65%和 70%,接种菌株 D-5,接种量 20 g/kg,于(30±1) °C 条件下静置培养 144 h,取样测定 CMC 酶和果胶酶活力,以确定酶活力与培养基含水率的关系,每个处理重复 3 次。

1.2.3 基质初始 pH 以 HCl 及 NaOH 调节发酵培养基的初始 pH 分别为 4.0,5.0,6.0,7.0 和 8.0,用蒸馏水调节其含水率为 60%,121 °C 下灭菌 30 min。发酵培养基冷却后接种菌株 D-5,接种量 20 g/kg,于(30±1) °C 条件下静置培养 144 h,取样测定 CMC 酶和果胶酶活力,以确定培养基不同初始 pH 与酶活力的关系,每处理重复 3 次。

1.2.4 发酵温度 在无菌条件下,将菌株 D-5 按 20 g/kg 的接种量接入发酵培养基,充分搅拌均匀后分别置于 20,25,30,35 和 40 °C 条件下培静置养 144 h,取样测定 CMC 酶和果胶酶活力,以确定培养温度与酶活力的关系,每个处理重复 3 次。

1.2.5 起爆剂用量 以杜仲种皮为原料,分别加其风干质量 0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%的起爆剂(碳、氮源的补充物,提高发酵速度),充分混匀后加水使其含水率为 60%,于 121 °C 下灭菌 30 min。培养基冷却后接种菌种 D-5,接种量为 20 g/kg,在无菌条件下使菌种与基质混合均匀,置于(30±1) °C 条件下静置培养 144 h,取样测定 CMC 酶和果胶酶活力,以确定起爆剂用量与酶活力的关系,每处理重复 3 次。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 CMC 和果胶酶活力的测定 (1)标准曲线的绘制。取 6 支试管编号,依次加入 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,分别加蒸

馏水 2.0,1.9,1.8,1.7,1.6,1.5 mL,得到葡萄糖含量依次为 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mg 的葡萄糖溶液;各管均加入 DNS 试剂 2.5 mL,混匀,沸水浴中加热 5 min,取出后迅速用流水冷却。以 1 号管作为空白调零,用分光光度计在 540 nm 波长处测定各管的吸光度(OD₅₄₀)。以葡萄糖含量(μg)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制其标准曲线。同样方法配制 1 mg/mL 的半乳糖醛酸溶液,在 540 nm 下测定其 OD₅₄₀ 值,绘制其标准曲线。

(2)粗酶液的制备。取上述发酵物,充分拌匀后取 1 g 于 150 mL 三角瓶中,加入 0.1 mol/L HAc-NaAc(pH 4.6)缓冲液 20 mL 及少许玻璃珠;在 30 ℃、150 r/min 条件下振荡 1 h 后于 4 000 r/min 离

纤维类物质去除率 = $\frac{\text{发酵前杜仲种皮风干质量} - \text{冲洗后剩余物的风干质量}}{\text{发酵前杜仲种皮风干质量}} \times 100\%$ 。

1.4 数据处理

对试验所得原始数据求其均值即为试验结果,用 EXCEL 数据处理系统分析并作图。

2 结果与分析

2.1 发酵时间对酶活力及纤维类物质去除率的影响

由图 1 可见,接种后 3 d,CMC 酶和果胶酶活力分别为 0.663 和 0.958 μmol/(min · g),此时发酵产生的菌丝量较少,酶活力相对较低;之后随着发酵

心 10 min,取上清液(粗酶液)备用。

(3)酶活力的测定。采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)^[10]测定 CMC 酶和果胶酶活力。在此定义:以羧甲基纤维素钠为底物,在 50 ℃、pH 4.6 的条件下每分钟形成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为一个 CMC 酶活力单位(μmol/(min · g));以果胶为底物,在 50 ℃、pH 4.6 的条件下每分钟形成 1 μmol 半乳糖醛酸所需的酶量为一个果胶酶活力单位(μmol/(min · g))。

1.3.2 纤维类物质去除率的测定 发酵结束后,对发酵材料进行适当碾压处理,用德国产 K2.99M 高压清洗机充分冲洗,对剩余物风干后称质量,按下式计算纤维类物质去除率:

时间的延长,菌丝量增加,CMC 酶及果胶酶活力逐渐增强,在发酵的第 6 天时达到最大值,分别为 1.086 和 1.672 μmol/(min · g);发酵 6 d 后,随着发酵时间的进一步延长,以上 2 种酶活力均逐渐下降。在发酵的第 3~15 天,果胶酶活力明显高于 CMC 酶,15 d 后果胶酶的活力低于 CMC 酶。在发酵的第 4~9 天,CMC 酶活力较高,表明在此阶段大量的纤维类物质被分解。从基质中纤维类物质去除率曲线可见,纤维类物质去除率随发酵时间的延长而快速增大,在发酵的第 15 天以后,趋于平稳。

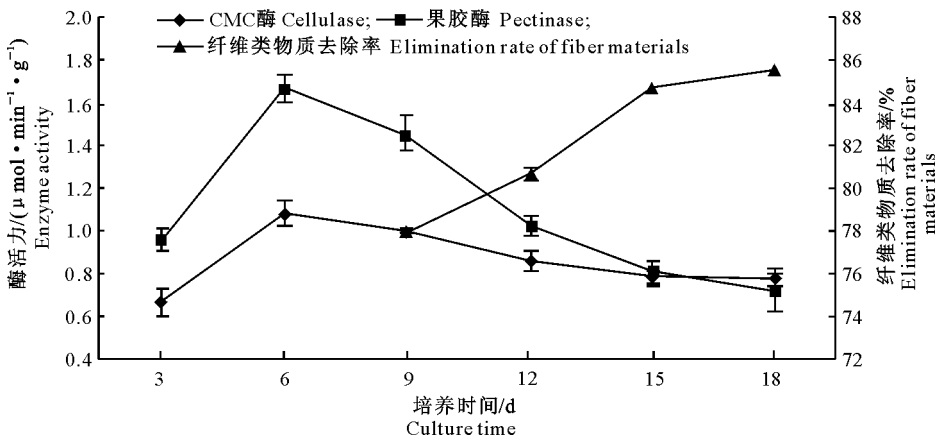


图 1 培养时间对 CMC 酶和果胶酶活力及纤维类物质去除率的影响

Fig.1 Effect of different culture time on the elimination rate of fiber materials and the enzyme activity of CMC and pectinase enzyme

2.2 培养基含水率对酶活力及纤维类物质去除率的影响

由图 2 可见,发酵培养基的含水率对 CMC 酶及果胶酶活力有很大的影响,在基质含水率为 45% 时,CMC 酶及果胶酶的活力分别为 0.916 和 0.848

μmol/(min · g);随着培养基含水率的增加,CMC 酶及果胶酶的活力逐渐增大,在基质含水率为 60% 时,2 种酶活力均达到最大值;之后随着基质含水率的进一步增加,酶活力逐渐降低。在基质含水率低于 55% 时,CMC 酶与果胶酶的活力差异不大;在基

质含水率为 55%~65%时,果胶酶活力明显高于 CMC 酶,此时果胶酶活力对基质含水率的变化非常敏感,含水率微小的变化就会对果胶酶产生较大的影响。因此在发酵过程中要严格控制基质的含水率。由图 2 还可以看出,培养基的含水率对纤维类

物质去除率有很大的影响,随着培养基含水率的增大,发酵基质中纤维类物质的去除率随之增加;当发酵基质的含水率达 60%时,纤维类物质去除率达到最大值,可见培养基的含水率以 60%为宜。

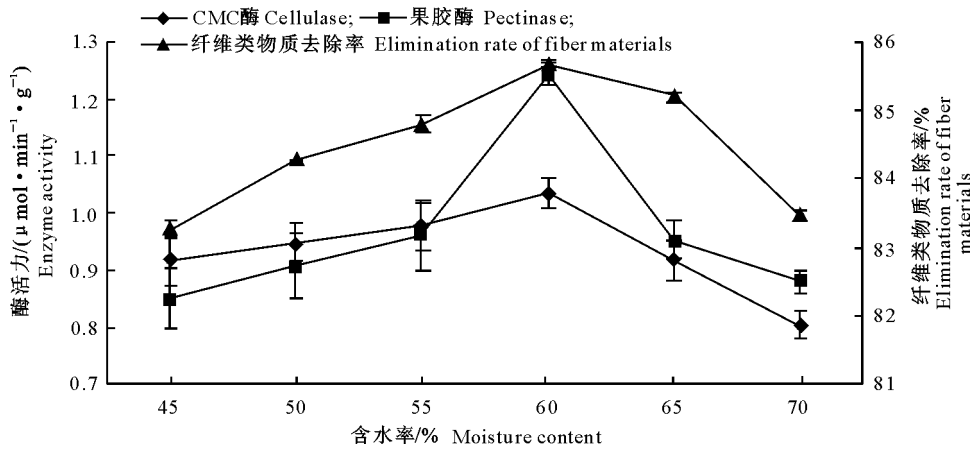


图 2 基质含水率对 CMC 酶和果胶酶活力及纤维类物质去除率的影响

Fig. 2 Effect of different moisture contents on the elimination rate of fiber materials and the enzyme activity of CMC and pectinase enzyme

2.3 培养基初始 pH 对酶活力及纤维类物质去除率的影响

由图 3 可见,培养基初始 pH 对 CMC 酶及果胶酶活力影响较大,随着培养基初始 pH 的增大,CMC 酶及果胶酶活力迅速增加,在 pH 为 6.0 时 2 种酶的活力均达到最大值;之后随着 pH 的进一步增大,2 种酶活力逐渐降低,表明培养基初始 pH 对微生

物的产酶有一定的影响,且对果胶酶活力的影响较大,在基质 pH 为 4.5~6.5 时,果胶酶活力高于 CMC 酶。由图 3 还可以看出,纤维类物质去除率与培养基的初始 pH 有关,其随初始 pH 变化而变化的趋势与 CMC 酶及果胶酶活力的变化趋势基本一致,可见最适的培养基初始 pH 为 6.0。

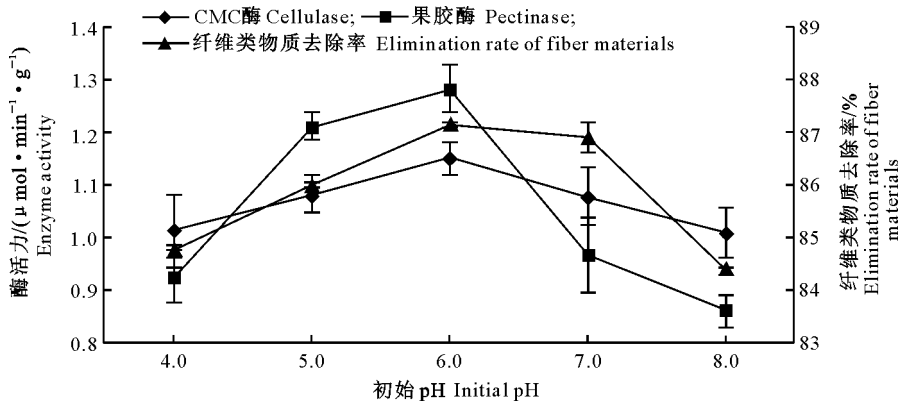


图 3 培养基初始 pH 对 CMC 酶和果胶酶活力及纤维类物质去除率的影响

Fig. 3 Effect of different initial pHs on the elimination rate of fiber materials and the enzyme activity of CMC and pectinase enzyme

2.4 发酵温度对酶活力及纤维类物质去除率的影响

由图 4 可见,发酵温度对 CMC 酶和果胶酶活力影响较大,发酵温度低于 25℃时,CMC 酶和果胶酶活力较低;温度在 25~30℃时,2 种酶的活力随

着发酵温度的升高而迅速增加,在 30℃时,酶活力最高,分别为 0.962 和 1.317 μmol/(min·g);之后随着发酵温度的进一步升高,2 种酶活力均逐渐下降。由图 4 还可见,发酵温度是影响纤维类物质去除率的重要因素,这是因为温度直接影响着微生物

的代谢活动及酶的活性,进而影响着纤维类物质的去除率。综上所述,发酵的适宜温度为 30 ℃。

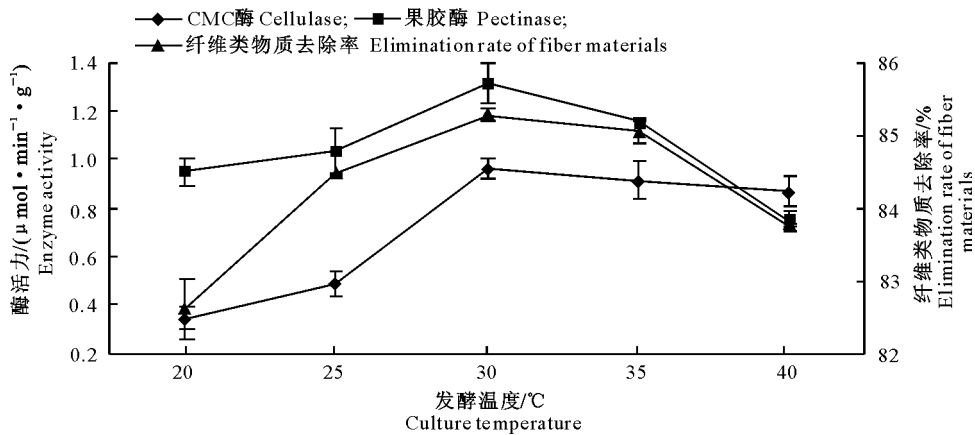


图 4 发酵温度对 CMC 酶和果胶酶活力及纤维类物质去除率的影响
Fig. 4 Effect of different culture temperatures on the elimination rate of fiber materials and the enzyme activity of CMC and pectinase enzyme

2.5 起爆剂用量对酶活力及纤维类物质去除率的影响

由图 5 可见,随着起爆剂用量的增加,2 种酶活力均明显增加,当起爆剂用量为 1.5 %~2.0 %时,2 种酶的酶活力达最大值,之后随着起爆剂用量的进一步增加,2 种酶活力均逐渐下降。表明,在进行杜仲种皮发酵时,适量添加起爆剂是十分必要的。由于杜仲种皮中可溶性营养成分较少,对微生物初期生长不利,起爆剂补充了可溶性的碳源及氮源成分,起到了营养调节作用,促进了微生物的生长,因而酶

活力增大。而过量添加起爆剂,可促进微生物对简单营养成分的分解,不利于大分子物质的分解。由图 5 还可以看出,随着起爆剂用量的增加,纤维类物质的去除率迅速增大,在起爆剂用量为 1.5 %时,纤维类物质去除率达到最大值;之后随着起爆剂用量的进一步增加,纤维类物质的去除率逐渐降低。表明,适量的起爆剂是提高发酵基质中纤维类物质去除率的关键因素之一。综合考虑,起爆剂的用量以 1.5 %为宜。

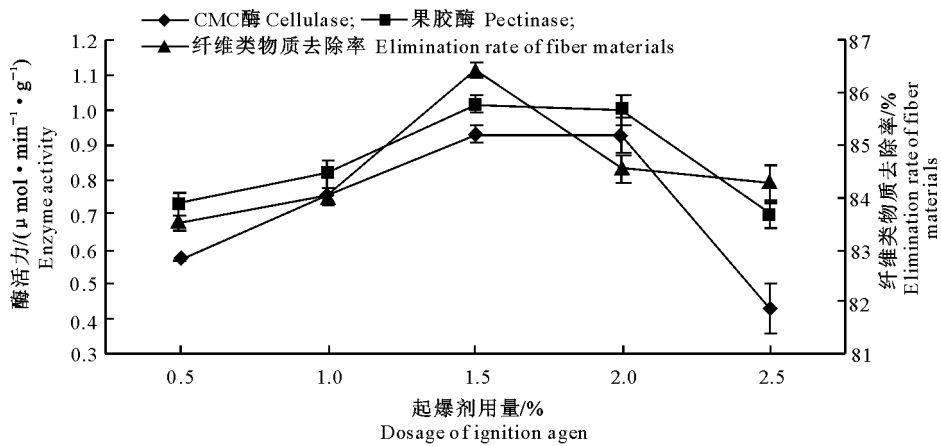


图 5 起爆剂用量对 CMC 酶和果胶酶活力及纤维类物质去除率的影响
Fig. 5 Effect of different dosages of ignition agen on the elimination rate of fiber materials and the enzyme activity of CMC and pectinase enzyme

综上可知,曲霉 D-5 对杜仲种皮发酵提取杜仲胶的适宜发酵工艺参数为:发酵温度 30 ℃、基质含水率 60 %、初始 pH 6.0、起爆剂用量为 1.5 %。在此条件下发酵 18 d,纤维类基质的去除率最高为

86.43 %,在生产上具有一定的实际应用价值。

3 结论与讨论

发酵温度、基质含水率及基质初始 pH 对曲霉

菌株 D-5 CMC 酶及果胶酶活力影响较大。因为温度直接影响微生物的代谢活动及酶的活性,因此对 CMC 酶及果胶酶活力的影响较大;水分是微生物细胞的主要组成成分及酶促反应的介质,直接影响微生物的营养吸收及酶的分泌,发酵基质的含水率较低,不能满足微生物生长繁殖的需要,但含水率过高时,又会使发酵基质的透气性下降,进而影响微生物代谢过程中的电子传递,最终影响发酵的效果^[11]。发酵基质的 pH 影响微生物细胞膜表面电荷的性质和膜的通透性^[12]、酶促反应的速率以及代谢途径,也影响营养物质的吸收。因此发酵温度、基质含水率及 pH 均是影响微生物生长及代谢的重要因素。

适量添加起爆剂对提高发酵效果是十分重要的。因为杜仲种皮中可溶性成分含量较低,碳氮源比例不当,这不利于微生物初期的生长繁殖,而富有可溶性碳源及氮源的起爆剂具有调节营养作用,可促进微生物的生长繁殖^[13],缩短发酵周期,提高生产效率,降低生产成本。

本试验 CMC 酶、果胶酶活力及纤维类物质去除率的变化趋势比较吻合,表明 CMC 酶及果胶酶的活力可以作为菌种筛选的主要指标。

综上所述,微生物发酵是杜仲胶提取的重要途径之一,具有操作简单,成本低,对环境无污染等特点。发酵菌种的筛选及合理的工艺参数是杜仲胶提取的关键。本研究采用的曲霉菌株 D-5 在生产中具有一定的应用潜力,若能进一步选育并进行发酵工艺参数的多因素优化,将会进一步提高发酵效果。另外,关于微生物发酵提取的杜仲胶的性能及理化性质,如分子质量与相对分子质量^[5]、胶体的交联度等,还需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 张康健,王 蓝,马柏林,等. 中国杜仲次生代谢物 [M]. 北京:科学出版社,2002.
Zhang K J, Wang L, Ma B L, et al. Secondary metabolites of *Eucommia ulmoides* in China [M]. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)

[2] 李芳东,杜红岩,杜仲 [M]. 北京:中国中医药出版社,2001:260-280.
Li F D, Du H Y. *Eucommia ulmoides* [M]. Beijing: China TCM Press, 2001: 260-280. (in Chinese)

[3] 周政贤. 中国杜仲 [M]. 贵阳:贵州出版社,1993.
Zhou Z X. *Eucommia ulmoides* in China [M]. Guiyang: Guizhou Press, 1993. (in Chinese)

[4] 徐咏梅,苏印泉,彭 锋,等. 杜仲乔林与叶林树皮中次生代谢物含量的比较 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,

2006, 34(4): 55-57.

Xu Y M, Su Y Q, Peng F, et al. Study on the contents of secondary metabolites in the bark of high forest tree model and leaf-oriented tree model of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Jour of Northwest A&F Univ: Nat Sci Ed, 2006, 34(4): 55-57. (in Chinese)

[5] 岳 杰,苏印泉,李雪红,等. 杜仲不同无性系叶中杜仲胶含量及相对分子质量研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(4): 51-54.
Yue J, Su Y Q, Li X H, et al. Study on the content and the molecular weight of *Eucommia ulmoides* gum in different clones [J]. Jour of Northwest A&F Univ: Nat Sci Ed, 2006, 34(4): 51-54. (in Chinese)

[6] 张 檀,郑瑞杰,李晓明,等. 微生物在杜仲叶胶提取中的作用研究 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 101-104.
Zhang T, Zheng R J, Li X M, et al. A Study on the function of microorganism in extracting *Gutta-percha* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(3): 101-104. (in Chinese)

[7] 田兰馨. 杜仲形态学研究 [M]. 西安:陕西科技出版社,1992.
Tian L X. Morphological Study on *Eucommia ulmoides* [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1992. (in Chinese)

[8] 宋 磊,张学俊,董大鹏,等. 杜仲胶性质及提取研究的进展 [J]. 贵州化工, 2006, 31(4): 4-8.
Song L, Zhang X J, Dong D P, et al. A Review of the properties and extraction of *Eucommia* Rubber [J]. Guizhou Chemical Industry, 2006, 31(4): 4-8. (in Chinese)

[9] 张学俊,宫本红,王庆辉,等. 酶水解杜仲纤维素细胞壁及长丝杜仲胶的提取 [J]. 天然产物研究与开发, 2009(21): 115-121.
Zhang X J, Gong B H, Wang Q H, et al. Hydrolysis of plant cell wall of *Eucommia ulmoides* by cellulase and extraction of long silk gum [J]. Natural Product Research and Development, 2009 (21): 115-121. (in Chinese)

[10] 程丽娟. 微生物学实验技术 [M]. 西安:世界地图出版社, 2000.
Cheng L J. Experimental technique of microbiology [M]. Xi'an: Map of the World Press, 2000. (in Chinese)

[11] Arzumanova T, Jenkinsa N, Roussos S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1037-1042.

[12] Mika M, Arto P, Marianne N. Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH [J]. Journal of Membrane Science, 2006, 280: 311-320.

[13] 孙俊良. 不同碳源对黑曲霉产糖化酶活力的影响 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 433-436.
Sun J L. Effects of different carbon sources on activity of glucoamylase produced by *aspergillus niger* [J]. Food Science, 2008, 29 (8): 433-436. (in Chinese)