

饲用复合酶产生菌好食脉孢霉发酵条件研究

吴慧清 吴清平* 郭楚盛 李剑英 刘淑欢

(广东省微生物研究所 广州 510070)

摘要: 利用好食脉孢霉发酵蔗渣、麸皮、木薯渣等工农业有机废料, 生产可用于配制饲用复合酶制剂的酶制品。合适的培养基配方为每千克固体料中含蔗渣 100g、麸皮 600g、木薯渣 300g, 并添加 20g 复合氮源和适量的磷酸盐, 培养基含水量为固体料干重的两倍; 接种后先在 34℃ 以下培养 2d, 然后在 37℃ 发酵 2~3d, 发酵过程中无光照、空气供应充分、培养基中含水量损失不能太大。发酵结束后固体曲中纤维素酶活力 (CMC + C1) 1,759 mg/g/h, 糖化酶活力 3,110 mg/g/h, 蛋白酶活力 297 mg/g/h。另一方面, 低温、光照、供气充分、培养基中含水量较小时有利于菌株孢子的形成。

关键词: 好食脉孢霉, 有机废料, 饲用复合酶, 孢子形成

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0033-06

STUDY ON FERMENT CONDITIONS OF FEED COMPLEX ENZYMES PRODUCED BY A *NEUROSPORA* SP.

WU Hui-Qing WU Qing-Ping GO Chu-Sheng LI Jian-Ying LIU Shu-Fang WU Jun
(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract: A *Neurospora* sp. was used to ferment organic waste materials such as sugarcane residue powder (bagasse), bran and cassava residue. The feed complex enzymes including cellulase, saccharifying enzyme, neutral proteinase and other growth factors were produced. The experimental results showed that suitable medium contained sugarcane residue powder 100 g, bran 600 g, cassava residue 300 g, mixed nitrogen sucrose 20 g per kilogram solid materials and some content of phosphate, the water in medium was twice as weight as the solid materials; the suitable fermentation conditions were that the strain was cultured first for 2 days under 34℃ and then fermented for 2~3 days at 37℃, no light, keeping the watering medium and suppling enough oxygen during fermentation. The cellulase (CMC + C1) was 1759mg/g/h, saccharifying enzyme to 3110 mg/g/h, neutral proteinase 297mg/g/h in ferment product. On the other hand, light, enough air, lower temperature and less water content in medium were benefit to producing spores.

Key words: *Neurospora* sp., Organic waste materials, Feed complex enzymes, Spores production

饲用复合酶是一种具有促进动物消化吸收, 提高饲料利用率, 减少疾病的饲料添加剂。饲用酶制剂产品中, 除了植酸酶是单一酶外, 大部分都是复合酶, 主要成分有纤维素酶、半纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶、果胶酶及未知生长因子等。

饲用复合酶大部分为几种微生物发酵酶的配制产品, 其商业化应用在国内外已有 20 多年历史^[1,2]。本文前期工作从发酵食品中分离得到了好食脉孢霉, 其酶系主要由纤维素酶、糖化酶、蛋白酶等组成, 人们用它来发酵豆类食品。它除了能在玉米、豆类种子上生长外, 亦能在桔杆、薯渣、麸皮、稻草、统糠等处生长。一些含纤维较多的垃圾上也能生长。此类型菌国外大多用作基因工程的宿主菌, 仅有几篇用 *Neurospora* 作为纤维素酶、β-葡萄糖苷酶和蛋白质的产生菌株^[3-7]。本文报告好食脉孢霉菌株发酵生

* 联系人

作者还有: 吴军

收稿日期: 2002-07-22, 修回日期: 2002-09-22

产饲用复合酶产品发酵条件的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

好食脉孢霉 (*Neurospora sp.*) 编号: C013。

1.2 原材料

选择广东地区来源比较丰富的工农业有机废料如蔗渣、麸皮、木薯渣等作为研究对象。

1.3 培养方法

三角瓶固体培养及固态浅层培养。

1.4 分析方法

1.4.1 纤维素酶活力测定^[8]: 纤维素酶包括羧甲基纤维素酶 (CMCase) 和滤纸糖酶 (FPase)。活力单位定义为: 60 min 水解生成 1mg 葡萄糖的酶量为 1 个活力单位。

1.4.2 糖化酶和蛋白酶活力测定: 参见文献 [9, 10]。

2 结果与讨论

2.1 原材料选择和配比的确定

本文前期工作观察了好食脉孢霉 C013 菌株在不同基质上的生长特性, 发现此菌可在许多纤维素基质上生长, 且生长旺盛, 可以用来发酵广东地区来源丰富的工农业有机废料, 如蔗渣、麸皮、木薯渣等生产饲用复合酶。为了获得较优的原材料配比, 试验采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计方案 (表 1)。

表 1 原材料选择和配比确定试验

编号	因素			结果					
				蛋白酶 (mg/g/h)		糖化酶 (mg/g/h)		纤维素酶 ($C_1 + C_x$) (mg/g/h)	
	A	B	C	72h	168h	72h	168h	72h	168h
1	1	1	1	189.9	211.3	1387.4	2021.9	965.4	1385.7
2	1	2	2	105.7	125.6	1103.7	1765.1	888.9	1759.6
3	1	3	3	84.7	86.9	632.6	1580.8	274.8	939.1
4	2	1	2	100.8	129.0	927.8	1404.9	768.4	1417.9
5	2	2	3	82.7	97.2	830.4	1483.2	564.0	1441.8
6	2	3	1	82.1	112.0	488.9	1007.2	126.0	860.0
7	3	1	3	75.6	87.1	949.7	1150.1	549.4	1177.7
8	3	2	1	59.3	33.1	492.9	929.8	122.2	697.0
9	3	3	2	48.3	41.8	633.3	594.1	46.7	273.0

注: 此表为引用本项目研究组承担广东省重点科研计划鉴定会的部分实验数据, A: 蔗髓糠 (水平 1 10%, 水平 2 20%, 水平 3 30%), B: 木薯渣 (水平 1 30%, 水平 2 40%, 水平 3 50%), C: 硫酸铵 (水平 1 2%, 水平 2 3%, 水平 3 4%), 原材料用量除蔗髓糠和木薯渣外用麸皮补足至 100%, 并加入 2% 的过磷酸钙, 料水比为 1:2, 装量为 25g 干料/500mL 三角瓶

试验表明: 三角瓶培养 3d (72h), 蛋白酶活性即达到高峰, 延长培养时间变化不大; 糖化酶、纤维素酶活性, 则随培养时间延长而明显增加。经正交分析, 蛋白酶、糖化酶和纤维素酶的活性都以试验 1 号最高。即原料配比为蔗髓糠 10%、木薯渣 30%、麸皮 60%, 在此基础上适当增加蔗髓糠含量有利于纤维素酶活性的提高 (表 3)。

2.2 N 源对 C013 菌株产酶的影响

在基本培养基配方中, 在不改变发酵培养基中 C, N 比例前提下, 改变氮源种类:

A为硫酸铵；B为与硫酸铵相当的尿素；C为与硫酸铵相当的蛋白胨；D为与硫酸铵含N量相当的复合氮源（硫酸铵+尿素+蛋白胨）。发酵108h，测定曲的水份及酶活（表2）。

结果表明：(1) 试验中采用尿素代替硫酸铵，不利于提高纤维素酶（CMC和FP）的活性，而糖化酶和蛋白酶的活性相对升高；(2) 复合氮源对纤维素酶、糖化酶的生成都有利，蛋白酶的活性一般。(3) 34℃低温适合菌株生长；37℃适合菌株产酶，温度更高时对生长和产酶均不利，但对蛋白酶的形成为利。

表2 不同N源对C013菌株产酶的影响

样号	水份 (g/100g)	CMC (mg/g/h)	FP (mg/g/h)	糖化酶 (μg)	蛋白酶 (μg)	培养温度 ($^{\circ}\text{C}$)	N源
1-1	77.26	967.46	10.99	543.0	86.15	34	A
1-2	78.96	741.44	6.18	1967.75	110.14	34	B
1-3	78.18	676.42	50.73	1394.28	89.54	34	C
1-4	78.50	958.14	74.42	2871.64	60.75	34	D
2-1	78.94	1092.12	37.98	1276.10	118.40	37	A
2-2	79.65	707.62	4.42	2034.49	113.77	37	B
2-3	80.39	836.30	9.18	2111.25	154.39	37	C
2-4	78.78	970.78	143.73	2122.21	58.75	37	D
2-5	80.85	762.40	26.11	3110.20	82.20	37	CK
3-1	76.84	777.20	9.50	1693.56	84.59	40.5	A
3-2	77.66	384.96	3.13	1365.57	199.30	40.5	B
3-3	75.20	438.71	0	2401.60	57.45	40.5	C
3-4	76.62	547.47	5.56	2392.2	297.09	40.5	D

2.3 固体培养工艺条件研究

2.3.1 酶的形成与培养时间的关系：采用基本配方，用液体孢子接种法，在500mL三角瓶中装50g湿曲，37℃恒温培养，从第88h开始取样，每24h测1次，结果见图1。

从图1可以看出，CMC酶、FP酶、糖化酶、蛋白酶的活力在发酵108h后均已达相当水平，糖化酶在156h达到高峰。

2.3.2 曲水比、培养温度及装量对C013菌株产酶及孢子形成的影响：固体发酵的关键工艺参数为曲水比、培养温度和通气好坏，在空间一定的情况下，通气好坏则与容器的培养基装量有关。设计了曲水比为1:1.3, 1:2.0, 1:2.6, 温度为34℃, 37℃, 39℃和不同装量的实验，以正交方式进行实验，结果见表3。

接种量是按装量计算的，10g装量接半支斜面，20g装量接1支斜面，30g装量接1.5支斜面。

正交试验发现，影响CMC和FP的因素次序均为温度、曲水比和装量，对CMC酶活力形成的较佳方案为37℃培养，料水比1:2.6，装量20g；FP酶活力较佳方案为

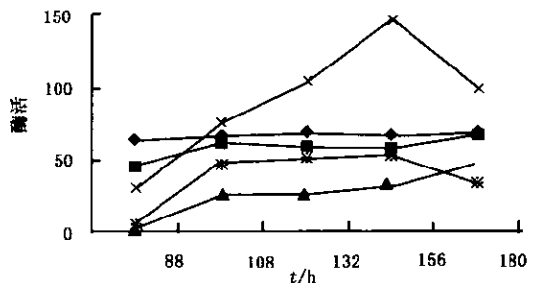


图1 酶活形成与培养时间的关系

◆ 水份 (g/100g), ■ CMC (*10mg/g·h),
▲ FP (mg/g·h), × 糖化酶 (*10μg), * 蛋白酶 (μg)

37℃培养,料水比为1:1.3,装量为10g;影响孢子形成的最大因素是温度,低温(34℃)有利于孢子形成。从基础配方中3种酶的相关性来说,整个系统各因素对各酶活性大小的影响顺序均应为温度、料水比和装量。考虑到CMC和FP的矛盾,兼顾其它酶,最好选择37℃培养,料水比为1:2.0,装量为20g的方案。

表3 水份、温度及装量对C013菌株产酶和孢子形成的影响

试验号	因素			水份 (g/100g曲)	CMC (mg/g/h)	FP (mg/g/h)	孢子形成
	A	B	C				
1	1	1	3	73.04	833.83	11.13	++
2	2	1	1	68.11	815.30	33.55	+
3	3	1	2	65.02	474.55	0.286	-
4	1	2	2	78.83	906.94	9.44	++
5	2	2	3	79.70	1044.33	19.70	-
6	3	2	1	71.52	519.66	0	-
7	1	3	1	80.10	874.37	0	++
8	2	3	2	81.77	1140.97	0	+
9	3	3	3	74.90	501.99	0	+

注:++ 产孢子很多,+ 表面可见孢子但不多,- 表面不可见孢子,接种量是按装量计算的,10g装量接半支斜面,20g装量接1支斜面,30g装量接1.5支斜面

2.3.3 空气、温度、水份蒸发对C013菌株孢子形成和产酶的影响:采用改进配方,用特大号饭盒做培养容器,接种量为1支斜面/盒,通过在饭盒上加纱布和盒盖来调节空气的量,经不同温度培养108h,检测产酶活力和孢子形成情况。

表4 空气、温度、水份蒸发对C013菌株孢子形成和产酶的影响

编号	水份 (g/100g)	CMC (mg/g/h)	FP (mg/g/h)	产孢情况*	培养温度(℃)		通气**		水份减少***	
					前期(3.5d)	后期(1.5d)	前期	后期	前期	后期
1	70.31	1268.5	27	++	34	34	差	好	少	大
2	71.18	1193.6	13.9	-	34	37	差	好	少	大
3	72.89	1475.5	37	-	34	39	差	好	少	大
4	76.0	1250.0	6.25	+	34	34	差	差	少	少
5	71.94	912.3	16.0	-	34	37	差	差	少	少
6	78.2	1485.6	0	-	34	39	差	差	少	少
7	71.20	1101.5	10.5	++	34	34	好	好	大	大
8	55.46	987.87	34.82	+	34	37	好	好	大	大
9	60.05	1023.82	25.6	+	34	39	好	好	大	大
10	68.22	1309.1	40.9	++	34	34	差	好	少	大
11	78.08	1467.15	8.21	+	34	34	差	差	少	少
12	55.85	896.94	28.31	-	37	37	差	好	少	大
13	75.55	392.64	19.63	-	37	37	差	差	少	少
14	63.06	1039.52	29.77	-	39	39	差	好	少	大
15	70.31	404.17	0	-	39	39	差	差	少	少

*: ++ 产孢子很多, + 表面可见孢子但不多, - 表面不可见孢子, **: “好”在此实验中为在饭盒上仅盖纱布培养通气状况较好, “差”在饭盒上盖纱布并加铝盖培养通气状况较差, ***: “大”在此实验中为在饭盒上仅盖纱布培养水份蒸发大, “小”在饭盒上盖纱布并加铝盖培养水份蒸发小

试验表明恒温培养时,高温少氧,对CMC和FP酶活力形成很不利。二步培养法,培养前后期供气都充足,则因培养过程中水份损失较大,CMC酶活力降低,FP活力升高,产孢子情况普遍良好,但二步法后期培养温度不宜太高(表4)。

2.3.4 光照、温度和空气对菌株孢子形成和产酶的影响:如2.3.3所述培养固体曲,

在不同的温度、光照情况下培养 4.5d, 观察孢子形成情况并检测产酶活力。试验结果表明无光照、通气良好、后期培养温度适宜 (37℃ ~ 39℃) 的情况下有利于酶产量的提高。而低温、光照、通气良好有利于孢子形成 (表 5)。

表 5 光照、温度和空气对菌株孢子形成和产酶的影响

编号	水份 (g/100g)	CMC (mg/g/h)	孢子形成*	培养温度℃		光照**	通气***
				前期 (2.5d)	后期 (2.0d)		
1	75.74	713.93	+	37	25 ~ 30	无	不良
2	75.28	776.70	++	37	25 ~ 30	无	良
3	74.36	533.5	++	37	25 ~ 30	有	良
4	75.03	696.84	+++	25 ~ 30	25 ~ 30	有	不良
5	76.84	901.55	-	37	37	无	不良
6	75.6	936.73	-	37	37	无	良
7	75.66	936.73	-	37	37	有	良
8	75.23	621.72	-	37	37	有	不良

*: “+++”为产孢子特别多, “++”为产孢子较多, “+”为表面可见孢子但不多, “-”为表面不可见孢子, **: “有”表示在光照情况下培养, “无”表示在无光照情况下培养, ***: “良”在此实验中为在饭盒上仅盖纱布培养, 通气状况良好, “不良”为在饭盒上盖纱布并加铝盖培养, 通气状况较差

综上所述, 好食链孢霉为一种好气中温菌, 可发酵蔗渣、木薯渣、麸皮等工农业有机废料。前期低温 (34℃) 有利于菌株生长, 后期低温对孢子形成有利, 对酶的活性增长不利, 光照对孢子形成有促进作用, 整个培养过程中曲的含水量必须适当, 充足的空气供给对产酶和孢子形成都是重要的因素。好食链孢菌最佳产酶温度为 37℃, 最佳产酶时间为 6.5d, 料水比为 1:2.0, 产酶较高的原材料配比为 (10% 蔗渣 + 30% 薯渣): 60% 麸皮, 氮源以复合氮源对纤维酶、糖化酶有利, 而尿素则有利于蛋白酶活性的提高。

致谢 对本课题前期工作参与人员在此一并致谢。

参考文献

- [1] 刘亚力, 陈宏, 朱光招. 饲料研究, 1998 (2): 17~19.
- [2] 梁运祥. 动物科学与动物医学, 1999, 16 (2): 14~16.
- [3] Macris B J, Kekos D, Evangelidou V. Appl Microbiol Biotechnol, 1989, 31 (2): 150~151.
- [4] Macris B J, Kekos D. Appl Cellul Hemicellul Lignin Degrading Enzyme Syst J, 1989, 261~271.
- [5] Yazdi M T, Radford A, Keen J N, et al. Enzyme Microb Technol, 1990, 12 (2): 120~122.
- [6] Shojaosadati S A, Vikinsky S J, Looi C. Int J Eng, 2000, 13 (3): 65~68.
- [7] Moo-Y M, Chisti Y, Vlach D. Biotechnol Lett, 1992, 14 (9), 863~881.
- [8] 张海, 冯成刊. 标准化报道, 1995, 16 (4): 37~38, 44.
- [9] 郭杰炎, 蔡武城. 微生物酶. 北京: 北京科学出版社, 1986. 242~246.
- [10] 郭杰炎, 蔡武城. 微生物酶. 北京: 北京科学出版社, 1986 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>