

微生物混菌发酵法提纯油茶皂素的工艺研究

姚开波, 周建平

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 本文以水酶法提取油茶籽油后产生的工艺水为原料, 研究了微生物发酵法提取油茶皂素的工艺, 得出较优的菌种组合为褶皱假丝酵母和米曲霉; 较佳发酵条件为: 总接种量8%, 接种比例为2:3, 发酵时间为4 d。按此优化条件进行三角瓶液态发酵, 油茶籽工艺水经发酵后蛋白质含量降低了60.99%, 多糖含量降低了54.02%, 从工艺水中提取的油茶皂素的纯度从发酵前的36.45%提高到发酵后的58.74%, 且油茶皂素产品的颜色由原来的黑褐色变为棕黄色。

关键字: 工艺水; 发酵; 提纯; 油茶皂素

文章篇号: 1673-9078(2012)12-1726-1729

Study on Purification of Camellia Saponin by Mixed Microbial Fermentation

YAO Kai-bo, ZHOU Jian-ping

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128)

Abstract: The purification technique of camellia saponin by mixed microbial fermentation was studied via using oil Camellia seed wastewater as raw materials. The optimal results were achieved by *Candida rugosa* and *Aspergillus oryzae*. The optimal fermented condition were the total inoculation quantity 8%, the ratio of inoculation 2:3 and the fermentation time 4 days. By liquid fermentation tests under the above mentioned conditions, protein content was reduced by 60.99% and polysaccharide content was lowered by 54.02%. Purity of camellia saponin improved from 36.45% to 58.74% and the color of camellia saponin products was changed from dark brown to pale brown.

Key words: camellia seed wastewater; fermentation; extraction; camellia saponin

油茶 (*Camellia oleifera*) 为世界四大木本油料植物之一, 起源于中国, 是我国特有的木本油料植物。据统计我国现年产油茶籽约106万t, 油茶籽油约27.7万t, 油茶籽粕的年平均产量为70万t左右^[1]。油茶籽粕中含有10%~14%的油茶皂素^[2]。油茶皂素是一种优良天然非离子型表面活性剂, 具有较强的乳化、分散、湿润等性能与抗渗透、止痒、消炎、止咳、抗癌、杀菌、杀虫等多种生理活性和生理功能, 广泛用于医药、日化、轻纺、建筑、冶金、矿山等部门^[3]。至今己有多种油茶皂素提取方法, 但总体上可以归纳为水浸法、有机溶剂法和吸附法等三种方法^[4]。

油茶籽工艺水是油茶籽经水酶法提取油茶籽油后的副产物, 经笔者测定工艺水中水分含量在80%~82%之间, 蛋白质含量约为4%~6%, 总糖含量为7%左右, 油茶皂素含量为7%~8%, 以及0.7%左右

收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 湖南省科技厅重大专项 (04NK1008)

作者简介: 姚开波(1987-), 男, 硕士研究生, 从事油脂与蛋白质工程方向研究

通讯作者: 周建平(1955-), 男, 教授, 硕士生导师, 从事粮油加工方向研究

的脂肪。本研究拟以油茶籽工艺水为原料, 接入经筛选出的适宜菌株进行液态发酵, 以期降低工艺水中蛋白质、糖类及油脂的含量, 达到提高油茶皂素的提取率和纯度的目的。

1 材料和方法

1.1 材料、仪器设备与试剂

1.1.1 试验材料

1.1.1.1 菌种

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、青霉 (*Penicillium glaucum*)、根霉 (*Rhizopus*)、毛霉 (*Mucor mucedo*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、褶皱假丝酵母 (*Candida rugosa*)、啤酒酵母 (*beer yeast*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 湖南农业大学食品科技学院微生物研究所保存。

1.1.1.2 原料与培养基

工艺水: 取100 mL工艺水放入300 mL的三角瓶中, 自然pH, 121 °C灭菌30 min。湖南农业大学康奕达油茶产品研究中心提供。

工艺水琼脂培养基:工艺水:水=1:1,琼脂粉:2.5%,自然pH,121℃灭菌30 min。

1.1.2 主要仪器和设备

SW-CJ-1FD 单人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;(内循环)立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-75KBS),上海申安医疗器械厂;LXJ-IIB 低速大容量多管离心机,上海安亭科学仪器制造厂;SKY-1102C 恒温摇床,上海苏坤实业有限公司。

1.1.3 主要试剂

硫酸;85%磷酸;95%乙醇;无水乙醇;葡萄糖;考马斯亮蓝G-250;牛血清白蛋白;琼脂粉;萘酚;香草醛。

1.2 试验方法

1.2.1 油茶皂素提取工艺流程

工艺水→灭菌→接入菌种发酵培养→离心→过滤→浓缩→干燥→油茶皂素成品

1.2.2 培养方法

细菌和酵母菌的培养方法:将分离纯化所得的细菌接种工艺水琼脂培养基上进行活化,再接入50 mL已经灭菌的工艺水中,置摇床中150 r/min、30℃扩大培养48 h,作为种子液。

霉菌的培养方法:先将霉菌接种工艺水琼脂培养基上进行活化,再接入50 mL已经灭菌的工艺水中,置摇床中150 r/min、30℃扩大培养48 h,制成孢子悬液。

1.2.3 工艺水及其发酵液中多糖的测定

采用萘酚-硫酸分光光度法测定多糖的含量^[5]。

1.2.4 工艺水及其发酵液中蛋白质的测定

采用考马斯亮蓝G-250染色法测定蛋白质的含量^[6]。

1.2.5 工艺水及其发酵液中油茶皂素的测定

油茶皂素的测定采用香草醛-硫酸法^[7]。

1.2.6 单一菌种发酵试验

将初筛试验筛选出的菌种分别单独接种于经过灭菌的工艺水中,细菌在37℃下、霉菌和酵母菌于28℃下分别恒温培养4 d,然后测定发酵液中蛋白质、多糖及茶皂素的含量,选出分解蛋白质及多糖能力较强且对油茶皂素影响较小的菌种。

1.2.7 混合菌种筛选试验

根据单一菌种发酵试验的结果,将选出的酵母菌和霉菌以不同组合按1:1比例,6%的总接种量,接入灭菌过的工艺水中进行混菌发酵试验,恒温28℃培养4 d。测定发酵液中蛋白质和多糖含量,选出发酵后降解蛋白质及多糖能力最强的组合为混菌发酵较优组合。

1.2.8 混菌发酵接种量的确定

将混合菌种发酵试验选出的较优组合,按不同接

种量4%、6%、8%、10%、12%,进行三角瓶液态发酵,然后提取发酵液中油茶皂素,测定其纯度,以确定最佳接种量。

1.2.9 混菌发酵接种比例的确定

将混合菌种筛选试验选出的较优组合,按接种比例褶皱假丝酵母:米曲霉=1:2、1:1、3:2、2:1、2:3进行三角瓶液态发酵,然后提取发酵液中油茶皂素,测定其纯度,以确定最佳接种比例。

1.2.10 混菌发酵时间的确定

将混合菌种筛选试验选出的较优组合,按发酵时间2 d、3 d、4 d、5 d、6 d进行三角瓶液态发酵试验,提取发酵液中的油茶皂素,测定其纯度,以确定最佳发酵时间。

1.2.11 混菌发酵对提取出的油茶皂素产品纯度的影响

将筛选出的混菌组合于试验确定的最佳接种量、接种比例和发酵时间条件下进行三角瓶液态发酵,测定发酵液中蛋白质和多糖的含量并提取发酵液中的油茶皂素,测定其纯度。

2 结果与分析

2.1 单一菌种发酵试验结果

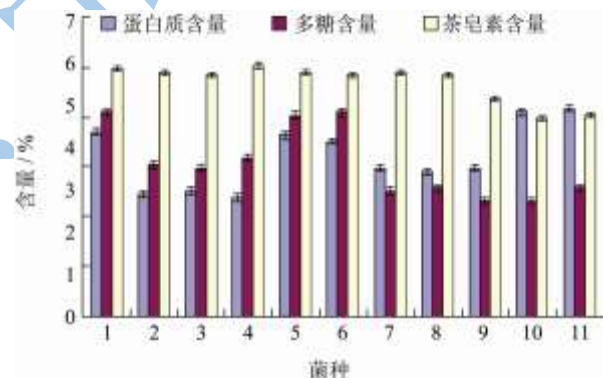


图1 菌种发酵试验结果

Fig.1 Fermentation test of the strains

注:1.原液;2.米曲霉;3.黑曲霉;4.青霉;5.毛霉;6.根霉;7.褶皱假丝酵母;8.热带假丝酵母;9.啤酒酵母;10.枯草芽孢杆菌;11.地衣芽孢杆菌。

从图1中可以看出,毛霉和根霉由于油茶皂素的抑菌作用而在工艺水中无法生长。啤酒酵母、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌对多糖的分解能力较强,但都对油茶皂素有一定的降解能力,故不能选用。对油茶皂素含量影响较小且分解蛋白质和多糖能力较强的为:米曲霉、黑曲霉、青霉、褶皱假丝酵母、热带假丝酵母。

2.2 混合菌种的发酵试验结果

从图2可以看出,褶皱假丝酵母和米曲霉组合发酵

后, 发酵液中蛋白质和多糖的降解程度最大, 且与图1的结果相比较, 其他组合发酵后降解蛋白质和多糖的能力与单一菌种相差不大, 而褶皱假丝酵母和米曲霉混合发酵后, 发酵液与原液相比, 其中蛋白质的含量降低了48%, 多糖的含量降低了50%, 故选用褶皱假丝酵母和米曲霉这个组合作为发酵较优组合。

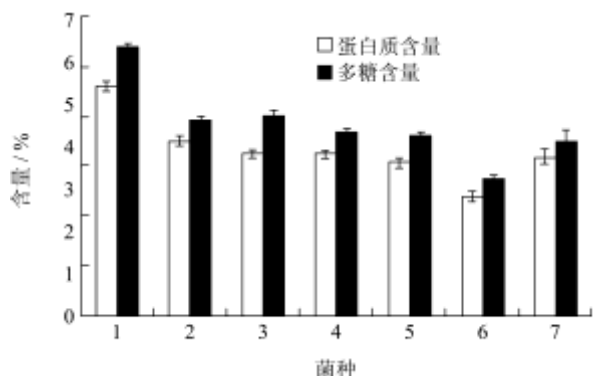


图2 混合菌种的发酵试验结果

Fig.2 Fermentation test of the mixed strains

其中: 1.原液; 2.热带假丝酵母和米曲霉; 3.热带假丝酵母和黑曲霉; 4.热带假丝酵母和青霉; 5.褶皱假丝酵母和青霉; 6.褶皱假丝酵母和米曲霉; 7.褶皱假丝酵母和黑曲霉。

2.3 混菌发酵接种量的确定

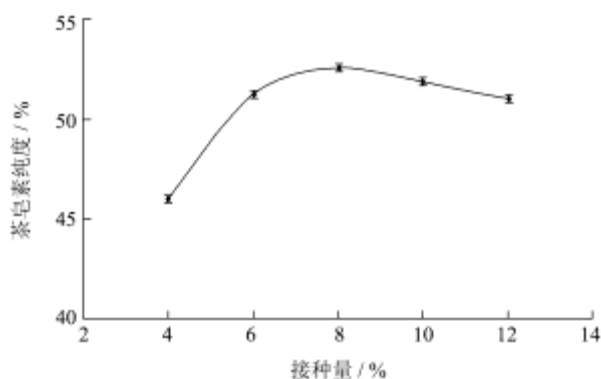


图3 接种量与油茶皂素纯度的关系

Fig.3 The relationship between inoculation dosage and purity of *Camellia saponin*

从图3可以看出, 随着接种量的增加, 从发酵液提取的油茶皂素的纯度先升高后降低, 在接种量小于8%时, 随着接种量的增加, 油茶皂素的纯度逐渐增加, 当接种量超过8%后, 油茶皂素的纯度不再增加, 而是略有下降, 原因是接种量过少时, 微生物分解工艺水中营养成分不够充分, 一些大分子杂质依然大量存在, 直接影响油茶皂素的纯度; 但当接种量过大时, 可能是菌与菌之间产生竞争性, 反而不利于菌株的生长, 影响发酵效果。所以, 本试验确定最佳的接种量为8%。

2.4 混菌发酵接种比例的确定

从图4可以看出, 在混菌接种比例小于1:1时,

油茶皂素的纯度会随着接种比例的增加而升高; 当褶皱假丝酵母和米曲霉的接种比例为2:3时, 发酵后提取出的油茶皂素的纯度最高; 当接种大于1:1时, 油茶皂素的纯度没有出现大幅改变, 处于较稳定状态。分析其原因可能有由于褶皱假丝酵母和米曲霉在协同发酵过程中, 米曲霉在生长过程中利用了工艺水中的部分营养物质, 并分泌多种酶系如: 淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶等。使废水中的大分子杂质分解成糖类、氨基酸等小分子物质, 有利于褶皱假丝酵母的生长繁殖, 所以只有在适宜的接种比例下才会使发酵液中杂质降低, 油茶皂素的纯度升高。因此, 混菌发酵的最佳接种比例为2:3。

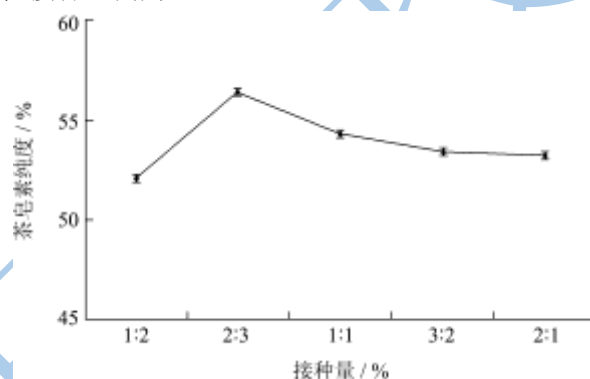


图4 接种比例与油茶皂素纯度的关系

Fig.4 The relationship between ratio of inoculation and purity of *Camellia saponin*

2.5 混菌发酵培养时间的确定

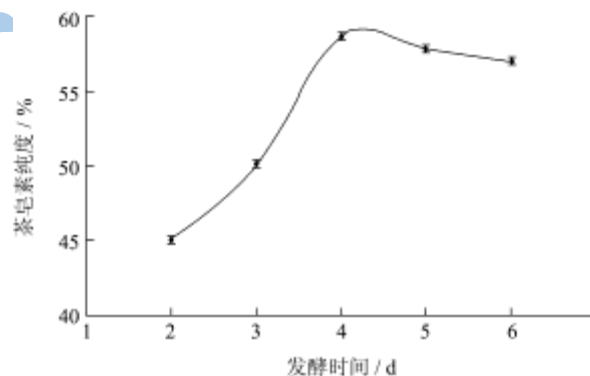


图5 发酵时间和油茶皂素纯度的关系

Fig.5 The relationship between fermentation time and purity of *Camellia saponin*

从图5可以看出, 随着发酵时间的增加油茶皂素的纯度也随着明显升高。当混菌发酵时间超过4d之后, 所提取出的油茶皂素的纯度略有下降, 这可能是因为微生物生长过程中要经过迟缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期, 当菌种生长到衰亡期时, 其发酵能力会大幅下降, 菌体可能产生自溶现象, 增加了发酵液中杂质的含量, 影响油茶皂素的纯度。所以, 混菌发酵的最佳发酵时间为4d。

2.6 混菌发酵前后蛋白质、多糖含量及油茶皂素纯度的变化

表 1 发酵前后蛋白质、多糖含量及油茶皂素纯度变化

Table 1 The change of protein, polysaccharide content and purity of *Camellia saponin* after fermentation

样品名称	蛋白质含量/%	多糖含量/%	油茶皂素纯度/%
发酵前	5.46±0.03	6.35±0.06	36.45±0.05
发酵后	2.13±0.03	2.92±0.04	58.74±0.04

从表 1 可以看出,经较优组合褶皱假丝酵母和米曲霉发酵后的工艺水,蛋白质的含量为 2.13%,相比于发酵前,蛋白质的含量降低了 60.99%;多糖的含量为 2.92%,相比于原液降低了 54.02%;从发酵后的工艺水中提取的油茶皂素,其纯度为 58.74%,而从未发酵的工艺水中提取的油茶皂素的纯度为 36.45%。两者相比,油茶皂素的纯度提高了 22.29%,且油茶皂素产品的颜色由原先的黑褐色变为棕黄色。

3 结论

3.1 将米曲霉、黑曲霉、青霉、根霉、毛霉、热带假丝酵母、褶皱假丝酵母、啤酒酵母、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌进行单一菌种发酵试验,选出对油茶皂素含量影响较小且分解蛋白质和多糖能力较强的菌种为:米曲霉、黑曲霉、青霉、褶皱假丝酵母、热带假丝酵母。并将酵母和霉菌进行不同组合,进行混菌发酵试验,选出较优组合:褶皱假丝酵母和米曲霉。

3.2 对混菌发酵较优组合进行发酵条件的优化试验,得出较优组合褶皱假丝酵母和米曲霉的最佳接种量为 8%,接种比例为 2:3,发酵时间为 4 d。

3.3 采用工艺水为原料,使用本研究选出的较优组合,在试验确定的最佳发酵条件下培养,使水提法提取出的油茶皂素的纯度由未发酵时的 36.45%提高到 58.74%。且油茶皂素产品的颜色由原先的黑褐色变为棕黄色。

参考文献

- [1] 于红卫,吴峰华,朱伯荣,等.酶预处理对油茶籽粕蛋白提取效果的影响[J].油脂工程.2011,9:61-63
- [2] 方飞,王力生.油茶粕资源综合利用研究进展[J].饲料博览,2011,6:30-32
- [3] 邹璐.高纯茶皂素的提取技术及应用研究[J].内蒙古石油化工.2011,17:127-128
- [4] 刘红梅,周建平,郭华,等.油茶皂素提取纯化及含量检测研究综述[J].现代食品科技,2006,4:265-267
- [5] 易剑平,毕雅静,宋秀荣,等.蒽酮-硫酸法测定枸杞多糖质量分数的研究[J].北京工业大学学报.2005,3,(6):641-646
- [6] 乐萍,雷颀,熊建铭,等.蛋白质测定方法比较与研究进展[J].江西化工,2007,2:50-52
- [7] 傅春玲,洪奇华,阮辉,等.茶皂素定量测定方法的研究[J].杭州大学学报(自然科学版),1997,24,(3):239-241