

降解油茶皂素的菌种的筛选及其培养条件的优化

周玥, 郭华, 王小蓉

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 经过筛选得到了能降解油茶皂素的目的菌青霉, 再通过单因素试验及 $L_9(3^4)$ 正交试验, 确定青霉在28℃、接种量12%、pH 4.5的茶皂水中培养5 d, 可使发酵液中油茶皂素的降解率达到83.11%。

关键词: 降解; 油茶皂素; 筛选; 条件优化

文章编号: 1673-9078(2012)1-43-46

Screening of Camellia Saponin-Degradating Strains and Optimization of the Cultivation Conditions

ZHOU Yue, GUO Hua, WANG Xiao-rong

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

Abstract: *Penicillium* was screened for the degradation of camellia saponin. The optimal condition for *Penicillium* culture and camellia saponin degradation was determined through single factor test and $L_9(3^4)$ orthogonal test. The best culture conditions were: culture temperature 28℃, inoculation dose 12%, pH 4.5, and *Penicillium* cultivating time 5 days. Under these condition degradation rate of camellia saponin could reached 83.11%.

Key words: degradation; camellia saponin; selection; condition optimization

油茶籽饼是山茶科植物油茶的种子经过榨油后剩下的饼粕, 其中含有大量的油茶皂素^[1], 可利用溶剂浸提的方法制取高纯度的油茶皂素^[2,3]。油茶皂素是一种天然的非离子型表面活性剂, 具有生物、药理等活性, 因而广泛应用于化妆品、洗涤剂、纺织工业等领域。

但油茶皂素对鱼类具有溶血性, 即通常所说的鱼毒活性^[4]。其机理主要是油茶皂素通过鱼鳃的上皮细胞进入鳃血管, 使细胞膜通透性发生改变, 导致细胞质外渗, 红细胞解体, 发生溶血^[5]。根据研究, 油茶皂素对常见淡水鱼类有较强的毒性^[6], 并呈现出良好的剂量-药效和时间-药效的关系, 在浓度2.5 mg/L时即可将部分淡水鱼类杀死。

油茶皂素的制取过程中总会产生一定量的工业废水, 这部分液体若排放到江河中, 一旦水体中油茶皂素的浓度达到鱼类的致死值, 将造成局部生态平衡的破坏和经济损失。为此, 笔者期望通过筛选能降解油

茶皂素的菌株, 并采用单因素试验和正交试验优化筛选出的菌株的培养条件, 使其能在废水中迅速生长, 达到缩短油茶皂素降解时间的目的, 为降低排放水对鱼类的影响、维护水体生态提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 菌种

2 d内能够在含有油茶皂素的水体中生长出菌苔或菌丝体的已知菌种: 纳豆芽胞杆菌(*Bacillus natto*)、假丝酵母(*Candida*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、青霉(*Penicillium*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) (湖南农业大学食品科技学院微生物研究所保存)。

1.1.2 培养基

种子培养基: 牛肉膏 0.5%、蛋白胨 1%、NaCl 0.5%, pH 自然。

发酵培养基: 水酶法提取油茶籽油后产生的工艺水(简称茶皂水), 含油茶皂素4.98%, 可溶性糖2.17%, pH 4.5。

1.1.3 主要仪器设备

AUY220电子天平, SHIMADZU; SW-CJ-1FD超净工作台, 苏州净化; SKY-2102C恒温摇床, 上海苏坤

收稿日期: 2011-10-08

基金项目: 湖南省科技厅重大专项(009FJ1006-3)

作者简介: 周玥(1986-), 女, 硕士研究生, 从事粮食、油脂与蛋白质工程方向研究

通讯作者: 郭华(1956-), 女, 教授, 硕士生导师, 从事食品分析与粮油加工方向研究

实业有限公司; UV-9100型紫外可见分光光度计, 北京瑞利仪器公司; DRP-9082电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; DF-101S数显水浴锅, 巩义实予华仪器有限责任公司。

1.1.4 试剂

油茶皂素-纯度 90.5%、8% 香草醛乙醇液、77% 浓硫酸、60% 乙醇及 80% 乙醇

1.2 试验方法

1.2.1 油茶皂素的测定及降解率的计算

先根据香草醛-浓硫酸法^[7]制备油茶皂素标准曲线, 再将茶皂水发酵液离心后, 准确吸取 10 mL 上清液于 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀。吸取此稀释液 0.50 mL, 按制备标准曲线的方法测定其吸光值, 查标准曲线计算油茶皂素的含量。由发酵前后茶皂水中油茶皂素的含量之差计算油茶皂素的降解率。

1.2.2 降解油茶皂素的菌种的筛选

1.2.2.1 初筛

将 2.5 mL 经过 1 d 培养的菌种液接入盛有 25 mL 茶皂水的 250 mL 锥形瓶中, 将锥形瓶置于恒温摇床上, 在 28 °C、pH 4.5、摇床转速 120 r/min 条件下培养 5 d 后, 测定发酵茶皂水中油茶皂素的含量, 并计算各菌种对油茶皂素的降解率。

1.2.2.2 复筛

将初筛出的菌种接入种子液中培养 1 d 后, 分别取 2.5 mL 菌种液接入 25 mL 茶皂水中培养, 空白组为自然发酵; 在 1~7 d 内每天测定一次发酵茶皂水中油茶皂素含量, 根据油茶皂素变化的情况, 选取降解油茶皂素效率最高的菌种作为目的菌进行试验。

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 菌种培养时间对油茶皂素降解率的影响

在一系列 250 mL 锥形瓶中各加入 25 mL 茶皂水, 将培养 1 d 的菌种液按 10% 的接种量加入其中, 在 28 °C、pH 4.5、120 r/min 条件下分别培养 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h 后, 测定发酵后茶皂水中油茶皂素含量。

1.2.3.2 菌种培养温度对油茶皂素降解率的影响

在一系列 250 mL 锥形瓶中各加入 25 mL 茶皂水, 将培养 1 d 的菌种液按 10% 的接种量接种于发酵液中, 在 pH 4.5 条件下, 将筛选出的菌种分别在 24 °C、26 °C、28 °C、30 °C、32 °C 培养 96 h 后, 测定发酵后茶皂水中油茶皂素含量。

1.2.3.3 接种量对油茶皂素降解的影响

在 250 mL 锥形瓶中各加入 25 mL 茶皂水, 将培养 1 d 的菌种液按 4%、6%、8%、10%、12%、14% 的接

种量分别接种于发酵液中, 在 28 °C、pH 4.5 条件下培养 96 h 后, 测定发酵后茶皂水中油茶皂素的含量。

1.2.3.4 培养液最佳 pH 值的确定

在锥形瓶中各加入 25 mL 茶皂水, 分别调节茶皂水的 pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0, 将培养 1 d 的菌种液按 10% 的接种量接种于发酵液中, 在温度 28 °C 培养 4 d 后, 测定发酵后茶皂水中油茶皂素的含量。

1.2.4 优化培养条件的正交试验

根据单因素试验的结果, 选择培养时间、发酵温度、接种量和发酵液 pH 四因素, 每因素选三水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以油茶皂素降解率作为评价指标。

表 1 优化培养条件的 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A (培养时间/d)	B (发酵温度/°C)	C (接种量/%)	D (pH)
1	3	26	8	4.0
2	4	28	10	4.5
3	5	30	12	5.0

2 结果分析

2.1 油茶皂素测定标准曲线

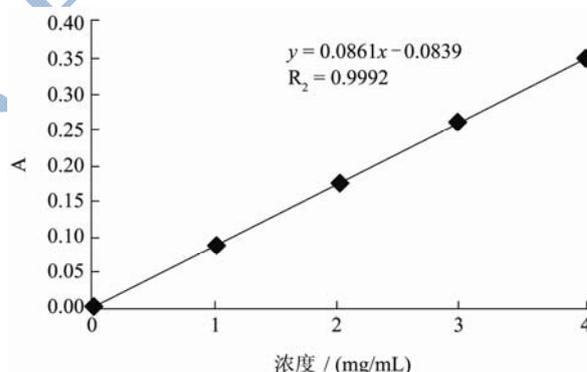


图 1 油茶皂素含量标准曲线

Fig.1 The calibration curve of camellia saponin content

由图 1 可知, 油茶皂素含量在一定范围内与吸光度成正比, 且线性相关性较好, 可以利用此方法测定发酵后茶皂水中油茶皂素的含量。

2.2 降解油茶皂素的菌种的初筛结果

从表 2 可知, 不同菌种降解油茶皂素的能力相差很大, 青霉、地衣芽胞杆菌、纳豆芽胞杆菌、假丝酵母的油茶皂素降解率均达到 66% 以上; 而枯草芽胞杆菌与米曲霉对油茶皂素的降解率小于 5%, 因而选择青霉、地衣芽胞杆菌、纳豆芽胞杆菌、假丝酵母进行复筛。

表 2 不同菌种降解油茶皂素的结果

Table 2 Degradation rate of camellia saponin for various strains

菌种名称	青霉	地衣芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	米曲霉	纳豆芽孢杆菌	假丝酵母
降解率/%	78.31±0.43	66.06±0.34	4.81±0.07	2.23±0.04	74.30±0.59	75.70±0.76

2.3 复筛结果

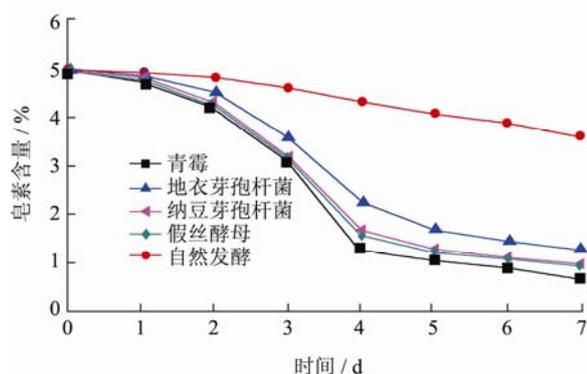


图 2 不同菌种对油茶皂素降解的影响

Fig.2 Influence of various strains on camellia saponin degradation

由图 2 可知,与其他菌种相比,青霉的油茶皂素降解量是最大的,降解速度也是最快的。发酵第 5 d 后,青霉发酵的茶皂水中油茶皂素含量为 1.08%,而自然发酵的茶皂水中油茶皂素含量为 4.08%,与自然降解对比,青霉的油茶皂素降解率增加了 60.24%。

2.4 菌种培养条件的优化

2.4.1 培养时间对油茶皂素降解的影响结果

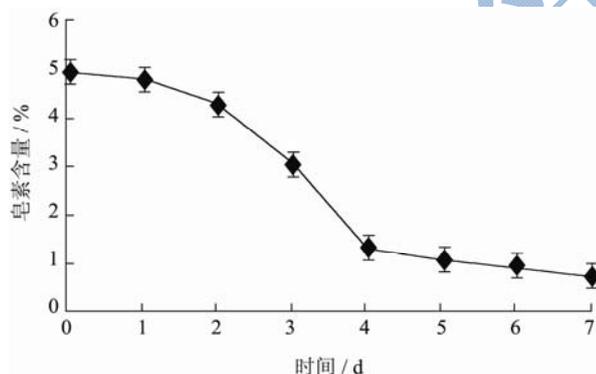


图 3 培养时间对油茶皂素降解的影响

Fig.3 Influence of time on camellia saponin degradation

由图 3 结果可知,培养 5 d 后,发酵茶皂水中油茶皂素的含量趋于恒定,即在培养第 5 d 时油茶皂素的降解率趋近最大值,因此,从节约时间,增加发酵设施的利用率的角度考虑,青霉的培养时间为 5 d。

2.4.2 培养温度对油茶皂素降解的影响结果

由图 4 可知,在 28 °C 条件下培养的发酵茶皂水中油茶皂素的含量最低;而在 30 °C 下培养的发酵茶皂水中油茶皂素的含量也较低,即 28~30 °C 为降解率最大的温度区,因此在后续单因素试验中,选取青霉的培养温度为 28 °C。

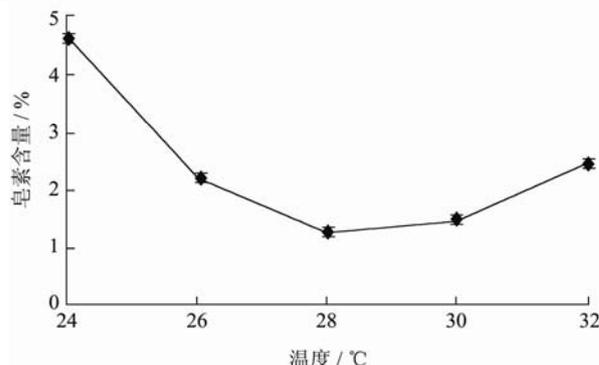


图 4 温度对油茶皂素降解的影响

Fig.4 Influence of temperature on camellia saponin degradation

2.4.3 接种量对油茶皂素降解的影响

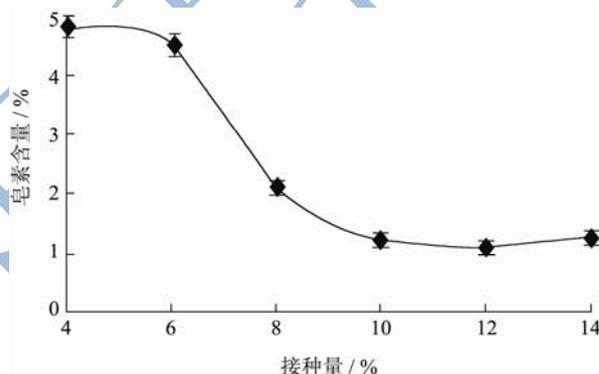


图 5 接种量对油茶皂素降解的影响

Fig.5 Influence of inoculation dose on camellia saponin degradation

由图 5 可知,在接种量为 12% 时,发酵茶皂水中油茶皂素的含量达到最低值;而接种量为 10% 时,发酵茶皂水中油茶皂素的含量与 12% 接种量的茶皂水中油茶皂素含量相近,因此最佳接种量在 10%~12% 范围内。

2.4.4 培养液最佳 pH 值的选择结果

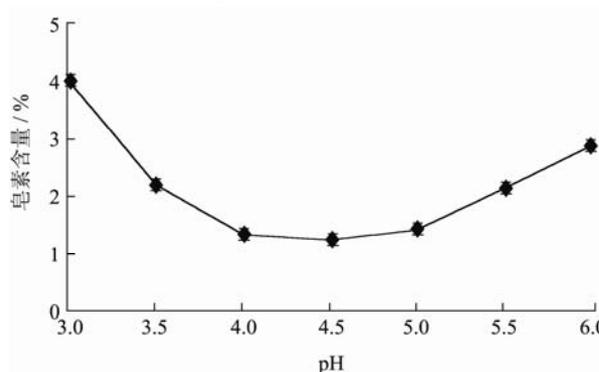


图 6 pH 对油茶皂素降解的影响

Fig.6 Influence of pH on camellia saponin degradation

由图6可知,在pH为4.0、4.5、5.0时,培养4 d后发酵茶皂水中油茶皂素的含量相近,而茶皂水的自然pH为4.5,因此,从节约成本以及避免带入新的杂质的角度考虑,选取茶皂水培养液的pH为4.5。

2.4.5 优化培养条件的正交试验结果

表3 优化培养条件的正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test for culture condition optimization

试验号	因素				茶皂素含量/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.02
2	1	2	2	2	3.09
3	1	3	3	3	3.08
4	2	1	2	3	1.89
5	2	2	3	1	1.12
6	2	3	1	2	1.36
7	3	1	3	2	1.06
8	3	2	1	3	1.01
9	3	3	2	1	0.98
K ₁	10.19	6.97	6.39	6.12	
K ₂	1.37	5.22	5.96	5.51	极差分析
K ₃	3.05	5.42	5.26	5.98	R _A >R _B >R _C >R _D
k ₁	3.40	2.32	2.13	2.04	最佳水平
k ₂	1.46	1.74	1.99	1.84	组合为:
k ₃	1.02	1.81	1.75	1.99	A ₃ B ₂ C ₃ D ₂
R	2.38	0.58	0.38	0.20	

从表3结果可知,不同因素对青霉降解油茶皂素的影响主次为A>B>C>D,即培养时间>培养温度>接种量>pH,其中培养时间和培养温度是显著影响因素。最佳组合为:A₃B₂C₃D₂,即培养时间5 d、培养温度28℃、接种量12%、pH 4.5。但由正交试验结果发现,此最佳条件不在正交表内,故需对优选出的因素水平进行验证。按照上面确定的最佳培养条件重复试验3次,测得此条件下发酵茶皂水中油茶皂素的含量稳定

在0.841±0.036%,降解率达到83.11%。说明采用正交试验所得的最优培养条件是正确、可行的。

3 结论

3.1 通过初筛试验得知,青霉、地衣芽胞杆菌、纳豆芽胞杆菌、假丝酵母对油茶皂素的降解率都能达到66%以上;而枯草芽胞杆菌与米曲霉对油茶皂素的降解率小于5%,因而选择青霉、地衣芽胞杆菌、纳豆芽胞杆菌、假丝酵母进行复筛。

3.2 由复筛的结果得知,被试菌种中青霉的降解油茶皂素的速度最快,降解率最大。与自然降解相比,可使油茶皂素的降解率增加60.24%。

3.3 通过优化培养条件的正交试验,得知培养时间和培养温度是显著影响因素。最佳组合为A₃B₂C₃D₂,即菌种在培养温度28℃、接种量12%、pH 4.5的条件下培养5 d,可使茶皂水中油茶皂素的降解率达到83.11%。

参考文献

- [1] 唐玲,冯宝民,李红冰,等.油茶皂素的研究进展[J].中南药学,2008,3:330-333
- [2] 吴季勤.茶皂素及提取茶皂素后的油茶饼粕应用研究[Z].华中农业大学,2005
- [3] 刘红梅,周建平,李海林,等.沉淀法制取茶皂素的工艺研究[J].现代食品科技,2008,24(6):571-574
- [4] 朱艳芳,张世萍,龙全,等.油茶籽饼水浸液对成鳢和仔鳢的短期毒性影响[J].中国水产,2007,377(4):67-69
- [5] 陈剑锋,何晓玲,李国平,等.油茶皂素鱼毒制剂对常见淡水鱼虾的毒性研究[J].淡水渔业,2006,1:28-31
- [6] 罗毅志,叶雪平,施伟达.茶皂素对部分常见淡水水生物的毒性试验[J].淡水渔业,2004,1:10-12
- [7] 谢秋英,黄玉英,宋振荣.茶皂素的提取纯化及成品中茶皂素含量的测定[J].福建水产,2010,2:14-17