

响应面法优化黑曲霉产纤维素酶发酵条件

冯培勇, 赵彦宏, 张 丽
(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘 要: 利用响应面法对黑曲霉产纤维素酶的发酵条件进行优化。首先通过二水平设计的 Plackett-Burman 试验分析 7 种因素对黑曲霉产纤维素酶活力的影响, 确定发酵温度、发酵时间、装液量为影响酶活的重要因素。然后通过响应面分析得到最优条件: 发酵温度 31.02℃、发酵时间 73.17h、装液量 100.4ml。考虑实验的实际情况, 确定最优条件为发酵温度 31℃、发酵时间 73h、装液量 100ml。优化后纤维素酶活由 267.81U/ml 提高到 360.02U/ml, 提高 34.4%。

关键词: 黑曲霉; 纤维素酶; 响应面; SAS

Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology

FENG Pei-yong, ZHAO Yan-hong, ZHANG Li
(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: Response Surface Methodology was applied to optimize the fermentation of *Aspergillus niger* for cellulose. In the first step, two level factorial design of Plackett-Burman was used to evaluate the influence of seven related factors. The results showed that the effects of temperature, time and packing volume on the activities of cellulase were significant among the seven factors. In the follow step, the optimal conditions of the three factors were assessed by the RSA. The optimal conditions of the three factors were as follows: fermentation temperature of 31.02 °C, 73.17 h of fermentation and 100.4 ml of packing volume. Under the optimal condition, the enzyme activity was increased by 34.4 %, from 267.81 to 360.02 U/ml.

Key words: *Aspergillus niger*; cellulase; response surface; SAS system

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0335-05

纤维素是自然界中存在最广泛的一类碳水化合物, 同时也是地球上数量最大的再生资源, 通过植物的光合作用, 地球上每年合成的植物总量约为 1×10^{11} t, 其中纤维素占了 40%^[1]。随着世界粮食、饲料及能源短缺问题的日益严重, 纤维素作为地球上分布最广、含量最丰富的碳源物质, 其降解和利用越来越受到人们的重视。而利用纤维素酶降解纤维素是经济有效的途径之一。纤维素酶是水解纤维素 β -1,4 葡萄糖苷键, 使纤维素分解成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称。纤维素酶是由葡聚糖内切酶(endoglucanase, EG, EC3.2.1.4)、葡聚糖外切酶(cellobiohydrolase, CBH, EC3.2.1.91)、 β 葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BG, EC3.2.1.21)三个主要成分组成的诱导复合酶系^[2]。

纤维素酶降解纤维素的研究及应用进展较快, 并取得了显著的经济效益^[3]。纤维素酶的工业化生产有固体

发酵法和液体深层发酵法两种, 由于液体深层发酵法的培养条件容易控制, 不易污染杂菌, 生产效率高, 成为国内外重要的研究和生产工艺^[4-5]。而黑曲霉是公认的安全的微生物, 用其生产酶制剂安全、可靠、不产生毒素, 而且黑曲霉生长较快, 产酶周期短, 因此采用黑曲霉生产纤维素酶具有优越性^[6]。

目前培养条件的优化是提高纤维素酶活、增加微生物产酶量的重要途径之一^[7]。优化发酵条件通常用单因素和正交试验设计法, 但它们都无法找到整个区域上各个因素的最佳组合和响应值的最优值^[8]。借助 SAS (statistical analysis system)统计软件能迅速、可靠、简地进行优化试验的安排和数据分析, 从而找出微生物培养条件的最佳组成^[9]。本实验利用 SAS 统计软件对黑曲霉产纤维素酶的液体发酵培养条件进行优化, 为黑曲霉液体发酵生产纤维素酶的进一步扩大实验提供参考。

收稿日期: 2008-12-08

基金项目: 鲁东大学基金项目(20053305)

作者简介: 冯培勇(1977—), 男, 实验师, 硕士, 主要从事微生物产酶研究。E-mail: fengpeiyong2004@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

黑曲霉(*Aspergillus niger*) 本实验室提供。3,5-二硝基水杨酸(DNS) 德国 Sigma 公司。

Z323K 高速冷冻离心机 德国 Herme 公司; 760CKJ 分光光度计 上海分析仪器厂; QYC-211 全温空气摇床 上海福玛实验设备公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备

斜面培养基: PDA 培养基^[14]、土豆汁 20%、葡萄糖 2%、琼脂 2%。种子培养基: 麸皮 0.5%、葡萄糖 3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15%; 初始发酵培养基: 麸皮 6%、蛋白胨 1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.5%、 MgSO_4 0.3%、 CaCl_2 0.3%, 微量元素 1ml(微量元素: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4mg、 CoCl_2 2.0mg, 定容到 1L)。

1.2.2 培养方法

斜面培养: 28℃ 培养 3d; 种子培养: 250ml 三角瓶中装入种子培养基 100ml, 每支斜面加 5ml 无菌水, 取 1ml 接入种子培养基中, 转速 180r/min, 30℃ 摇床培养 1d; 发酵培养: 250ml 三角瓶中装入发酵培养基 100ml, 按 10% 接种量接入种子培养液, 转速 150r/min, 30℃ 摇床培养 3d。

1.2.3 粗酶液制备

发酵培养液在 5000r/min 下离心 10min, 收集上清液即为粗酶液。

1.2.4 DNS 试剂配制

按照参考文献^[15]的方法: 取 6.3g 3,5-二硝基水杨酸和 262ml 浓度为 2mol/L 的 NaOH 溶液加到 500ml 含有 182g 酒石酸钠的热水溶液中, 再加 5g 重蒸酚和 5g 亚硫酸钠, 搅拌溶解, 冷却后加蒸馏水定容至 1000ml, 贮于棕色瓶中, 7~10d 后使用。

1.2.5 羧甲基纤维素酶酶活力测定方法

标准葡萄糖曲线的制作: 取 7 支干净的试管, 分别加入 1mg/ml 标准葡萄糖溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2ml, 然后各加入缓冲液 2.5、2.3、2.1、1.9、1.7、1.5、1.3ml, 再各加入 DNS 溶液 2.5ml, 混合液(5ml)于沸水浴中煮沸 5min, 冷却后加蒸馏水 10ml, 摇匀, 波长 540nm 处测定光密度(OD 值), 并用葡萄糖含量(mg)与测定值(OD 值)作图, 即为标准曲线。

羧甲基纤维素酶酶活力测定^[15]: 干净试管中分别加入 1% 羧甲基纤维素钠缓冲溶液 2.0ml、0.5ml 酶液, 50℃ 保温 30min, 取出加入 2.5ml DNS 试剂, 煮沸 5min, 冷却后加蒸馏水 10ml, 摇匀, 波长 540nm 处测定光密度,

并从标准曲线上查出相应的葡萄糖含量, 折算成酶活力单位 U/ml。在上述条件下, 1min 由水解底物生成 1μg 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)^[16]。

1.2.6 培养基优化方法

采用 Plackett-Burman 设计法及响应面分析法。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

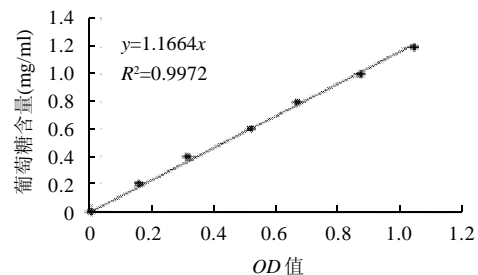


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

以 OD 值为横坐标, 葡萄糖含量为纵坐标, 得到葡萄糖标准曲线如图 1 所示。经统计分析, 得线性回归曲线为: $y = 1.1664x$, $R^2 = 0.9972$, 说明曲线可信度较高, 可以应用。

2.2 Plackett-Burman 设计法筛选重要因素

表1 Plackett-Burman 试验因素水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

因素	水平	
	-1	1
X_1 初始 pH 值	5	6.25
X_2 发酵温度(℃)	24	30
X_3 转速(r/min)	120	150
X_4 接种量(%)	5	6.25
X_5 发酵时间(h)	60	75
X_6 装液量(ml)	80	100
X_7 种子培养时间(h)	96	120

表2 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and responses of Plackett-Burman design

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	Y(U/ml)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	284.05
2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	340.64
3	-1	1	1	1	-1	1	1	342.49
4	1	-1	-1	-1	1	1	1	320.51
5	1	-1	1	1	-1	1	-1	300.56
6	1	1	-1	1	1	-1	1	348.04
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	315.25
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	318.12
9	-1	1	-1	-1	-1	1	1	331.02
10	1	-1	1	-1	-1	-1	1	292.32
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	324.58
12	1	1	1	-1	1	1	-1	352.25

根据黑曲霉发酵特性以及前人和本实验室研究成果设计试验因素及水平,选择7种条件(初始pH值、发酵温度、转速、接种量、发酵时间、装液量、种子培养时间)作为PB实验设计的7个因素 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_7$,每个因素分别取2个水平,高水平取低水平的1.25倍,以每毫升酶液的纤维素酶活力作为响应值 Y ,依次进行培养基的配制、接种、发酵实验(每组3个平行)。试验设计与结果见表1、2。

对上述结果进行 t 检验,分析各因素的主效应如表3所示。

表3 各因素影响的主效应分析

Table 3 Main effects of seven factors for Plackett-Burman B design

因素	t 检验	$Pr > t $	重要性
X_1	0.809474	0.477488	7
X_2	25.1929	0.000137	1
X_3	2.774474	0.069309	6
X_4	3.418181	0.041899	5
X_5	14.4943	0.000712	2
X_6	6.573797	0.007161	3
X_7	4.255484	0.02379	4

从表3可以看出,7种培养条件对黑曲霉产纤维素酶影响的显著性排列为:发酵温度>发酵时间>装液量>种子培养时间>接种量>转速>初始pH值。其中,发酵温度、发酵时间、装液量影响最为显著,可作为进一步优化因素。

2.3 应用响应面分析法确定重要因素的最佳水平

表4 响应面因素水平表

Table 4 Factors and levels in RSA

因素	水平		
	-1	0	1
x_1 发酵温度(°C)	28	30	32
x_2 发酵时间(h)	60	72	84
x_3 装液量(ml)	80	100	120

Plackett-Burman 试验设计确定了3个重要因素,即发酵温度、发酵时间、装液量。将3个因素分别作为 x_1, x_2, x_3 ,根据Box-Behnken中心组合设计原理,设计三因素三水平共15个实验点的响应面分析实验,其中12个是析因点,3个零点重复,用以估计实验误差,依次进行培养基的配制、接种、发酵实验(每组3个平行),以每毫升酶液的纤维素酶活力为响应值 Y 。各因素水平的取值、试验设计及结果如表4、5所示。

根据表5的实验结果,通过SAS软件处理确定回归方程: $Y = 351.81 + 6.09875x_1 + 4.7675x_2 + 1.89875x_3 - 6.11x_1^2 + 0.9175x_1x_2 - 3.05x_1x_3 - 26.9125x_2^2 + 1.6175x_2x_3 - 12.83x_3^2$ 。

表5 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 5 Experimental design and response of Box-Behnken design

试验号	x_1	x_2	x_3	$Y(U/ml)$
1	-1	-1	0	305.95
2	-1	1	0	322.06
3	1	-1	0	313.68
4	1	1	0	333.46
5	0	-1	-1	311.07
6	0	-1	1	311.94
7	0	1	-1	308.96
8	0	1	1	316.30
9	-1	0	-1	320.66
10	1	0	-1	341.59
11	-1	0	1	330.25
12	1	0	1	338.98
13	0	0	0	347.88
14	0	0	0	354.85
15	0	0	0	352.70

表6 回归方程的方差分析

Table 6 ANOVA analysis for regression equation

方差来源	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	$P > F$ 值
x_1	1	297.558	297.558	8.22056	0.035111
x_2	1	181.8324	181.8324	5.023439	0.075092
x_3	1	28.84201	28.84201	0.796811	0.412943
x_1^2	1	137.8416	137.8416	3.808115	0.10847
x_1x_2	1	3.367225	3.367225	0.093025	0.772653
x_1x_3	1	37.21	37.21	1.027991	0.357153
x_2^2	1	2674.274	2674.274	73.8815	0.000352
x_2x_3	1	10.46523	10.46523	0.28912	0.613845
x_3^2	1	607.7867	607.7867	16.79117	0.009376
模型	9	3703.516	411.5017	11.36846	0.007756
一次项	3	508.2325	169.4108	4.68027	0.064846
二次项	3	3144.241	1048.08	28.95505	0.00138
交叉乘积项	3	51.04245	17.01415	0.470046	0.716227
误差项	5	180.984	36.1968		
失拟项	3	155.5054	51.83514	4.068916	0.203551
纯误差	2	25.4786	12.7393		
所有项	14	3884.5			

从方差分析表6中可以看出,二次项对响应值的影响极显著,失拟项反映的是实验数据与模型不相符的情况, $P=0.203551 > 0.1$,失拟不显著,因此模型选择正确。

表7 模型的可信度分析

Table 7 Fit statistics for Y

平均值	复相关系数 R^2	校正后的 R^2	模型误差的平方根	Y 的变异系数 CV
327.3553	0.9534	0.8695	6.016378	1.837874

由表7可知,复相关系数 $R^2=0.9534$,说明模型可解释95.34%实验所得的酶活力变化,表明方程拟合较好。 Y 的变异系数 CV 表示实验的精确度, CV 值越高,实验的可靠性越低,本实验中 $CV=1.837874$,较低,说

明实验操作可信。

响应面分析图如图2~4所示。

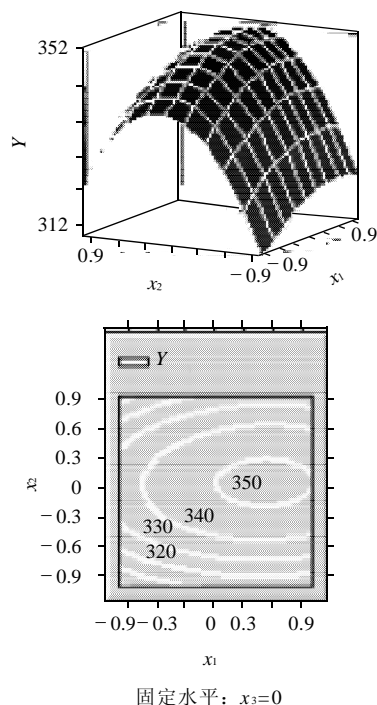


图2 x_1, x_2 对 Y 值预测响应面图和等高线图
Fig.2 Response surface plot and contour plot of $Y=(x_1, x_2)$

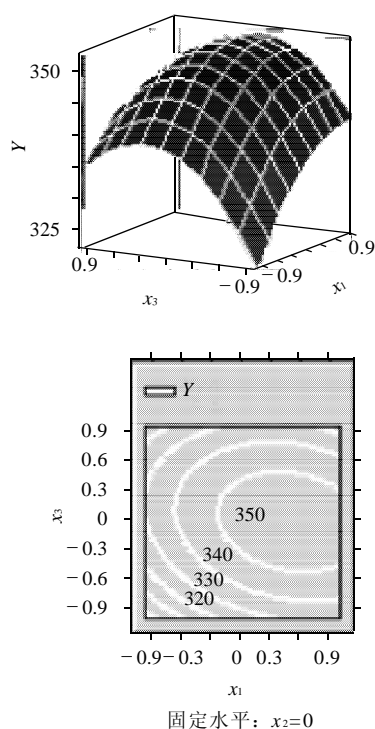


图3 x_1, x_3 对 Y 值预测响应面图和等高线图
Fig.3 Response surface plot and contour plot of $Y=(x_1, x_3)$

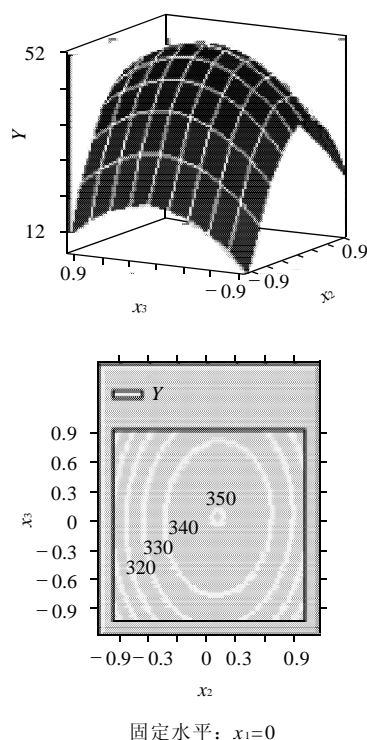


图4 x_2, x_3 对 Y 值预测响应面图和等高线图
Fig.4 Response surface plot and contour plot of $Y=(x_2, x_3)$

由图2~4响应面的分析可知,三个因素的最优实验点(x_1, x_2, x_3)为(0.50128, 0.09774, 0.02057),即发酵温度31.02℃,发酵时间73.17h,装液量100.4ml,在此点预测的酶活力为353.59U/ml。考虑试验的实际情况,确定3个因素的量发酵温度31℃,发酵时间73h,装液量100ml。

在其余培养基成分和培养条件不变的情况下,在初始发酵条件和优化发酵条件下进行验证实验,摇瓶发酵3d后,酶活分别为267.81U/ml和360.02U/ml,条件优化后酶活提高了34.4%,与预测实验结果相差不大,说明发酵培养条件的优化比较有效。

3 结 论

SAS软件是包括数据的统计分析、运筹等为题的科学计算等大量模块的集成软件系统。Plackett-Burman (PB)设计法是一种两水平的实验设计方法。它试图用最少的实验次数使因素的尽可能精确的估计,适用于从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素供进一步研究^[10]。响应面法(response surface analysis, RSA)可同时对影响生物产量的核因子水平及其交互作用进行优化与评价^[11],因此它可快速有效地确定多因子系统的最佳条件^[12-13]。本实验通过二水平设计的Plackett-Burman实验分析了7种因素对黑曲霉产纤维素酶活力的

影响,利用响应面法对黑曲霉产纤维素酶的发酵条件进行了优化。实验结果表明,在黑曲霉产纤维素酶摇瓶发酵过程中,发酵温度、发酵时间、装液量是重要因素。然后根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,经过响应面优化的培养条件为发酵温度 31.02℃,发酵时间 73.17h,装液量 100.4ml。考虑试验的实际情况,确定最优发酵条件为发酵温度 31℃,发酵时间 73h,装液量 100ml。在该优化发酵条件下,酶活力达 360.02U/ml,较初始发酵条件提高了 34.4%。

参考文献:

- [1] 刘小杰,何国庆,陈启和. 康氏木霉 ZJ5 纤维素酶发酵培养基的优化[J]. 浙江大学学报:工学版, 2003, 37(5): 623-628.
- [2] 陈小坚. 纤维素酶的分子生物学研究及应用进展[J]. 湖北民族学院学报:医学版, 2006, 23(4): 48-51.
- [3] 郝月,杨翔华,洪新. 纤维素酶的应用研究[J]. 青海科技, 2005(3): 31-35.
- [4] SILVERSTEIN J, MINES R, SHERRARD J H. Actevared sludge[J]. Research Journal WPCF, 1990, 62: 398-410.
- [5] 姚冬梅,赵杉林,商丽燕,等. 天然高分子吸收剂吸水中的 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} [J]. 辽宁石油化工大学学报, 2006, 26(1): 42-44.
- [6] 谢宇,王平宇,汪月华. 一株高活力纤维素酶产生菌-黑曲霉 NO.5.1 产酶条件研究[J]. 南昌航空大学学报:自然科学版, 2007, 21(2): 55-58.
- [7] 王晓芳,徐旭士,吴敏,等. 不同碳源对两株真菌纤维素酶合成的诱导与调控[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(6): 653-657.
- [8] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20(2): 58-61.
- [9] 欧宏宇,贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化重的应用[J]. 天津轻工业学院报, 2001, 36(1): 14-17.
- [10] MILLER A, SITTTER R R. Using the folded-over 12-run plackett-burman design to consider interactions[J]. Technometrics, 2001, 3: 44-54.
- [11] AMBAT P, AYYANNA C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric production from palmyra jaggery using response surface methods[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17: 331-335.
- [12] RATNAM B V V, NARASIMHA R M, DMODAR R M, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(5): 523-526.
- [13] TRUPKIN S, LEVIN S, FORCHIASSIN F. Optimization of a culture medium for lig-ninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(12): 682-690.
- [14] 宫清明. 食用茵母种培养基的制作比例及方法-琼脂培养基[J]. 安徽农业, 2001(6): 12-15.
- [15] 高培基. 纤维素酶活力测定方法研究进展[J]. 工业微生物, 1985, 6(5): 5-8.
- [16] 李亮亮,牛森. 纤维素酶活力测定方法的比较研究[J]. 辽宁农业科学, 2002(4): 16-18.