

文章编号:1673-1689(2006)04-0097-04

正交旋转回归试验优化纤维素酶发酵培养基

郝学财^{1,2}, 缪静³, 余晓斌^{*1,2}, 周洪^{1,2}, 汤蕾^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 3. 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 利用旋转回归法研究里氏木霉 WX-112 发酵生产纤维素酶的两个重要因素: 微晶纤维素粉(Avicel)和麸皮对滤纸酶活的影响, 并拟合出回归方程。经回归分析表明, 培养基中 Avicel、麸皮的含量及其配比对滤纸酶活有显著影响。通过岭脊分析寻优得出: Avicel 最佳浓度为 1.34 g/dL、麸皮最佳浓度为 3.35 g/dL, 在此优化条件下滤纸酶活可达 6.51 U/mL。用 30 L 发酵罐进行放大试验, 滤纸酶活可达 10.84 U/mL, CMCase 达到 449.57 U/mL。

关键词: 纤维素酶; 里氏木霉; 岭脊分析; 培养基优化

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Optimization of the Cellulase Fermentation Media by the Quadratic Rotary Combination Design

HAO Xue-cai^{1,2}, MIAO Jing³, YU Xiao-bin^{*1,2}, ZHOU Hong^{1,2}, TANG Lei^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. School of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Abstract: With the quadratic rotary design, the two important factors-Avicel and wheat bran, which play an important part in cellulase production by *Trichoderma reesei* WX-112 were analysed and studied. Regression analysis showed that the contents and the proportion of Avicel and wheat bran in the medium influenced the FPA significantly. Through ridge analysis, the optimum Avicel and wheat bran contents were determined as 1.34% and 3.35% respectively. Under this optimized condition, the FPA reached 6.51 U/mL. 10.84 U/mL of FPA and 449.57 U/mL of CMCase were obtained when the process was scaled up to 30 L fermentor.

Key words: cellulase; *Trichoderma reesei*; ridge analysis; medium optimization

纤维素作为植物光合作用的主要多糖类产物, 是地球上最为丰富的可再生天然资源。通过微生物产生的纤维素酶(Cellulase)来降解、转化纤维素是自然界中碳素转化的主要环节。近年来, 国内外

纤维素酶的应用研究十分活跃, 已筛选到一批高产菌株。本研究采用二元二次正交旋转回归模型, 以里氏木霉 WX-112 作纤维素酶发酵菌株, 对其发酵培养基的碳源进行了优化。对霉菌而言, 纤维素酶

收稿日期: 2005-10-25; 修回日期: 2006-02-22.

作者简介: 郝学财(1981-), 男, 山东临沂人, 发酵工程硕士研究生; * 通讯作者。

万方数据

是诱导酶,碳源的不同对纤维素酶的合成有显著的影响,本实验室以前对一系列不同碳源及与麸皮复合对产酶影响的研究表明,Avicel 与麸皮复合碳源产酶最高^[1]。因此在本试验中,选用 Avicel 与麸皮作为碳源,分析了两者的不同配比对纤维素酶酶活的影响。优化以后,发酵液酶活达到国内外先进水平(国内^[2] 5.51 U/mL、国外^[3] 23 U/mL),为进一步扩大发酵奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 供试菌种 里氏木霉 WX-112,为纤维素酶高产变异株,该菌种由里氏木霉 Rut C-30 诱变选育获得,由作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基 试管斜面培养基:将菌种接种于 5 g/dL 麸皮汁斜面培养基上,28 ℃ 培养 3 d 后使用或 4 ℃ 保存。

起始摇瓶培养基:2 g/dL 麸皮,1 g/dL Avicel,0.2 g/dL KH₂PO₄,0.4 g/dL 蛋白胨,酵母粉 0.02 g/dL,及其它各种微量元素,自来水配制成 100 mL,自然 pH 值。

优化摇瓶培养基:3.35 g/dL 麸皮,1.34 g/dL Avicel,0.2 g/dL KH₂PO₄,0.4 g/dL 蛋白胨,酵母粉 0.02 g/dL,及其它各种微量元素,自来水配制成 100 mL,自然 pH 值。

1.1.3 主要仪器与设备 721 型分光光度计;电热恒温水浴锅;TGL-16C 台式离心机;HYG 转式恒温调速摇瓶柜。

1.2 分析测定方法

1.2.1 酶活单位定义 50 ℃ 下,每分钟水解底物生成 1 μmol 葡萄糖所对应酶活定义为 1 个酶活单位(U)。

1.2.2 还原糖测定 采用 DNS 法^[4];DNS 试剂与还原糖发生氧化还原反应,生成 3-氨基-5-硝基水杨酸,其产物在煮沸后显色,其颜色深度与还原糖的含量成线性关系,利用分光光度计测量还原糖。

1.2.3 滤纸酶活(FPA)测定 取适当稀释酶液 0.5 mL 加入 1 mL pH 值 4.8 的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液,加入新华 1# 滤纸条(0.5 cm×5 cm)一片,在 50 ℃ 酶解 30 min,然后进行还原糖测定,最后再扣除发酵液中的还原糖含量。

1.2.4 CMC 酶活(CMCase)测定 将 CMC 溶解于 pH 值 4.8 的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液中,使其浓度为 10 mg/mL,取该溶液 1 mL,然后再加入适当稀释酶液 0.5 mL,在 50 ℃ 酶解 20 min,然后

进行还原糖测定。

1.3 统计分析

采用国际上最常用的统计软件 SAS8.1 对实验数据进行回归分析。并根据回归方程寻优预测出最佳点。

2 结果与分析

2.1 实验设计与结果

根据预备试验确定上下水平后,按二元二次正交旋转组合设计表确定各试验组的编码与取值,Avicel 的质量百分含量 Z_1 ,对应于自变量 x_1 ,麸皮质量百分含量 Z_2 ,对应于自变量 x_2 ,编码变换为: $x_1 = (Z_1 - 1.2)/0.2$; $x_2 = (Z_2 - 3)/1$,具体设计见表 1。

表 1 试验因素水平表

编码值	质量分数/%	
	Z_1	Z_2
1.414	1.48	4.41
1	1.4	4
0	1.2	3
-1	1	2
-1.414	0.92	1.59

通过二元二次正交旋转组合设计,对这两个重要因素进行寻优,以纤维素酶的酶活为响应值,对应于因变量 Y。运行 SAS 软件得到实验设计表及实验结果如表 2 所示。

表 2 实验设计和结果

实验号	x_1	x_2	Y
1	-1	-1	4.12
2	-1	1	5.07
3	1	-1	4.43
4	1	1	6.53
5	-1.414	0	5.03
6	1.414	0	5.95
7	0	-1.414	4.15
8	0	1.414	4.56
9	0	0	6.22
10	0	0	6.29
11	0	0	6.37
12	0	0	6.24
13	0	0	6.36

2.2 二次回归拟合及方差分析

以滤纸酶活为响应值,根据正交旋转设计表中 Avicel 及麸皮的用量 ,利用统计分析软件进行多元回归分析 ,得出酶活(U/mL)依 Avicel 及麸皮的二元二次回归方程为:

$$y = 0.159 - 0.013 x_1 - 0.019 x_2 + 0.012 x_1 x_1 - 0.007 x_1 x_2 + 0.035 x_2 x_2$$

从表 3 中可以看出,用上述回归方程描述各因

子与响应值之间的关系时,其因变量和自变量之间的线性关系是显著的,决定系数为 92.89%,说明回归方程的拟合程度较好。

表 4 中的 F 检验显示,总回归达到显著。表明 Avicel 和麸皮 2 个培养基组分与酶活之间总的来说存在显著的回归关系。其中一次项,平方项都达显著水平,交互项也较高,表明改变 Avicel 或麸皮用量对酶活的影响是显著的。

表 3 偏回归系数的估计值
Tab.3 Estimate value of partial regression coefficient

参数	自由度	参数估计	标准误	t 值	大于 t 的概率
x_1	1	-0.013 07	0.004 257	-3.070 28	0.018 06
x_2	1	-0.018 589	0.004 257	-4.366 94	0.003 286
$x_1 * x_1$	1	0.011 776 5	0.004 565	2.579 775	0.036 484
$x_2 * x_1$	1	-0.006 779	0.006 02	-1.126	0.297 281
$x_2 * x_2$	1	0.035 123 5	0.004 565	7.694 183	0.000 117
Root MSE		离回归偏差	0.012 04		
R-square		决定系数	92.89%		

表 4 回归方程的方差分析
Tab.4 Variance analysis of regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	大于 F 的概率
一次项	2	2.825 898	0.312 7	8.53	0.024 4
二次项	2	5.051 519	0.559 0	15.25	0.0074
交互项	1	0.330 625	0.036 6	2.00	0.216 8
总回归	5	8.208 042	0.908 4	9.91	0.012 5

2.3 采用岭脊分析寻求 Avicel 与麸皮的最佳配比
对全变量的二次回归模型进行规范分析,考察所拟合出的响应曲面的形状。获得的响应面立体图如图 1 所示。

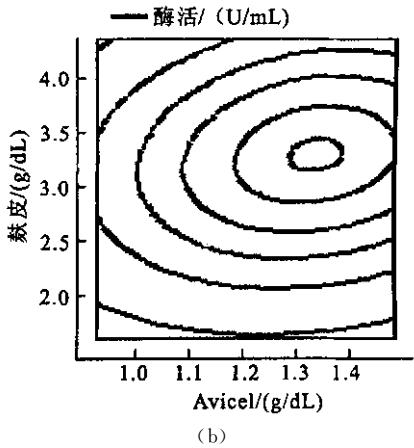
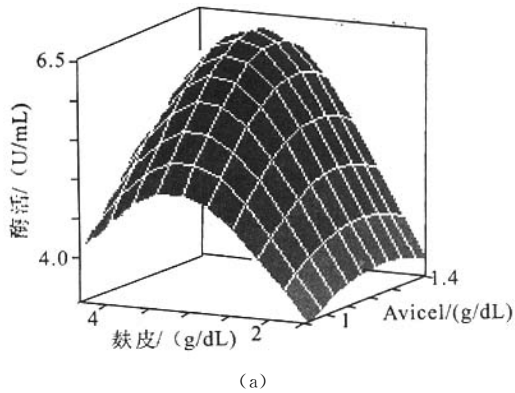


图 1 酶活与 Avicel 和麸皮的响应面图
Fig.1 Response surface plot of Avicel and wheat bran on FPA

由图分析可知,当 Avicel 含量的编码值在 (0.248,1.108) 之间,麸皮含量的编码值在 (0.086, 0.595) 之间,即 Avicel 含量在 (1.25 g/dL, 1.42 g/dL) 之间,麸皮含量在 (1.34 g/dL,3.35 g/dL) 之间,滤纸酶活可达 6.50 以上。当 Avicel 含量与麸皮含量均以最大值组合时,滤纸酶活却偏低。可见,Avicel 含量与麸皮含量只有在合理配合下才能获得较高的滤纸酶活。

利用 SAS 软件进行岭脊分析^[5](也可以通过求偏导解出最佳值),对这两个显著因素进行寻优,得

出回归模型存在稳定点, $Y(U/mL)$ 的最大估计值为 6.60,两个因素的取值分别为:Avicel 为 1.34 g/dL、麸皮为 3.35 g/dL。在以上优化条件下进行验证试验,共进行 5 批次 250 mL 摇瓶试验,结果见表 5。证明预测值 6.60 与试验平均值 6.51 是非常接近的。

表 5 验证试验结果
Tab.5 Result of validating experiment

批次	酶活/(U/mL)
1	6.47
2	6.45
3	6.62
4	6.43
5	6.56
平均值	6.51

2.4 30 L 罐扩大试验

30 L 罐发酵,接种量体积分数 5%,28 ℃,风量 1:0.2~1 vvm,转速 150~200 r/min,通过控制风量和转速,保持溶氧饱和度在 20%。在此条件下,采用优化后的 Avicel 与麸皮的最佳配比,测定了发酵过程中的 CMC_{ase}、FPA 和还原糖的变化,结果见图 2。

从图 2 可看出,发酵 2 d 后,纤维素酶活力开始增加,第 3 d 到第 6 d 是产酶的高峰期 CMC_{ase}和 FPA 活性同步迅速增长。发酵至第 6 d,FPA 可达 10.84 U/mL,CMCase 达到 449.57 U/mL 当培养至第 6 d 后,菌体生长进入衰亡期,酶活增幅略变缓,在整个发酵过程中还原糖浓度始终小于 1 mg/mL。由于优化后的麸皮含量高,能有效缓解发酵过程 pH 值的下降(优化前 pH 值平均下降至 3.92),使其始终维持在产酶最佳 pH 值附近。

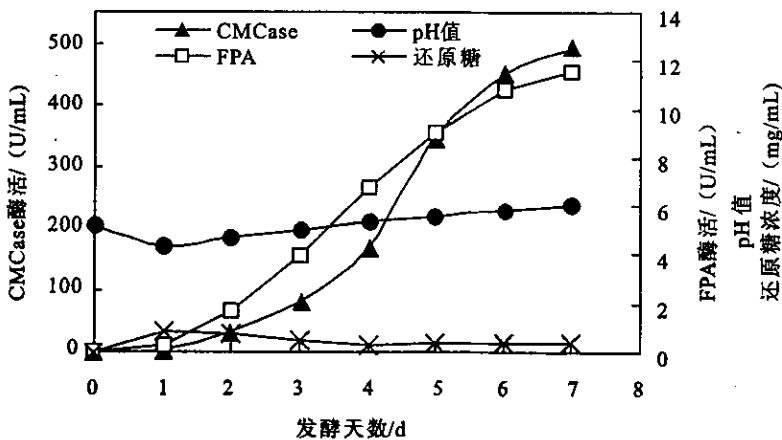


图 2 30 L 罐发酵过程曲线
Fig.2 The time course of the fermentaion in 30 L fermentor

3 结 论

Avicel 和麸皮是发酵生产纤维素酶比较理想的廉价碳源,对纤维素酶也有着较好的诱导作用。纤维素酶的合成过程中伴随着产酸,产酸被认为是纤维素酶合成过程中必需的,并可能对纤维素酶的合成具有诱导作用^[6],因而批 pH 对产酶有着重要影响,而在高浓度碳源条件下,由于碳源代谢菌体大量产酸,培养液 pH 急剧下降,从而导致酶的失活和菌体生长的停滞^[7],而不利于产酶。而当 Avicel

与麸皮的配比合适时,可以使 pH 得到有效的控制,从而有利于产酶。本试验在以前的研究^[8-9]的基础上,进一步优化了 Avicel 与麸皮的配比,精确地求出它们的最佳浓度为:Avicel 为 1.34 g/dL、麸皮为 3.35 g/dL。在此优化条件下进行验证试验,共进行 5 批次 250 mL 摇瓶试验,试验平均值为 6.51 U/mL,比优化前 4.12 U/mL 提高了 58%。在此基础上进行 30 L 发酵罐放大试验,发酵 6 d,FPA 可达 10.84 U/mL,CMCase 达到 449.57 U/mL,为纤维素酶的进一步工业化生产奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] 余晓斌,具润漠. 里氏木霉 Rut C-30 液体发酵法生产纤维素酶[J]. 无锡轻工大学学报,1998,17(21):7-10.
[2] 韩峰,孙彩云,宋桂经,等. 拟康氏木霉(Trichoderma pseudoningii) UVIII 产纤维素酶液体发酵研究[J]. 工业微生物, 2002,33(1):30,35.
(下转第 104 页)

右^[7,8]。向卷烟中添加不同用量的碳酸钾后,测定卷烟主流烟气 PH 值,结果见表 5。

表 5 碳酸钾用量对卷烟主流烟气 pH 值的影响
Tab. 5 The effect of potassium carbonate cigarette's pH

碳酸钾用量/%	烟气 pH 值
0	6.03
1.0	6.30
2.0	6.50
3.0	6.69

由表 5 可知,随着碳酸钾用量的增加,卷烟主流烟气 pH 值从 6.03 增加到 6.69。这是可能是由于碳酸钾添加到烟丝中,改变了烟草体系原来的酸碱平衡,使烟草中的烟碱更容易游离出来,在卷烟抽吸过程中进入卷烟烟气,从而使烟气更偏向碱性。另外,由于碳酸钾影响了卷烟的燃烧状况,使碳酸钾燃吸产物发生了变化,从而使卷烟烟气 pH 值上升。因此,尽管碳酸钾使卷烟主流烟气中烟碱的总量减少,但由于主流烟气 pH 值增加,提高了游离烟碱的转化率,主流烟气中游离烟碱的含量和比例都增加,主流烟气 pH 值增加是卷烟劲头增加的原因。

参考文献:

[1] Yamamoto T. 外加钾对卷烟烟气中焦油烟碱和 CO 释出量减低的影响[J]. 世界烟草动态,1997,(1):33—35.
[2] 许萍,宁敏,杨承华. 添加有机酸钾对卷烟焦油量等的影响[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 1999,(3):88—93.
[3] 戴亚. 外加钾盐对卷烟焦油释放量的影响[J]. 烟草科技, 1998,(1):11—12.
[4] 陈建潭,李世杰,王明锋,等. 卷烟烟气粒相物 pH 值、游离烟碱含量与卷烟劲头的关系[J]. 烟草科技,2000,(6):20—21.
[5] 张槐苓,马林,姚光明,等. 卷烟工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.
[6] 刘艺,毕功元,李国斌,等. 卷烟总粒相物 pH 值与游离烟碱及总烟碱关系的探讨[A]. 中国烟草学会工业专业委员会香精香料学组 2003 年学术研讨会论文集[C]. 广州:2003.
[7] 卢斌斌,谢剑平,刘惠民. 烟草中游离烟碱与其 pH 值之间的关系[J]. 烟草科技,2003,(6): 6—10.
[8] 苏明亮,吴鸣,谢剑平. 烟草及烟气中烟碱形态研究进展[J]. 烟草科技,2004,(6):20—26.

(责任编辑:朱 明)

(上接第 100 页)

[3] S Ellouz Chaabouni, H Belguith, I Hassairi, et al. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1995,43(2):267—269.
[4] 管斌,丁友昉,谢来苏,等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报, 1998,18(3):74—78.
[5] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002.
[6] Mandels M and Andreotti R E. Problems and challenges in the cellulose fermentation[J]. **Process Biochemistry**, 1978, 13:6.
[7] Tangnu S K, Harvey W B, Charles R W. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -gluco sidase by *T rich-oderma reesei*(Rut C-30)[J]. **Biotechnol and Bioeng**, 1981, 23:1837—1840.
[8] 余晓斌,具润漠. 分批与流加发酵法生产纤维素酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 1999 ,25 (1):16—19.
[9] 韩铭海,黄俊,余晓斌,等. 中性纤维素酶高产菌株的诱变选育及产酶条件[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(3):86—88.

(责任编辑:杨 萌)