

文章编号:1671-6833(2011)05-0030-04

响应面法优化黑曲霉产木聚糖酶发酵条件的研究

马晓建, 杨君芳, 常 春

(郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001)

摘 要:从实验室保藏的10株黑曲霉菌株中经过筛选,得到一株产木聚糖酶活性较高的菌株黑曲霉F-3.利用响应面分析方法,对该菌株发酵产木聚糖酶的发酵温度、发酵时间和pH性值进行了优化研究,得到了产木聚糖酶的最优条件:发酵温度为30.8℃、发酵时间为98.7h、起始pH为4.85,在该优化条件下,木聚糖酶的最高酶活可达到266.41 U/mL,较优化前提高了64.25%.

关键词:黑曲霉;木聚糖酶;筛选;优化;响应面分析方法

中图分类号:Q814.1

文献标志码:A

0 引言

木聚糖酶能将自然界中含量丰富的木聚糖降解为低聚木糖、木糖及少量其他单糖,在农业、食品工业、造纸工业、饲料工业等领域具有广泛的应用^[1].木聚糖酶可由自然界中广泛存在的真菌、放线菌、细菌、酵母菌等微生物发酵产生.而黑曲霉生长迅速、发酵周期短,且发酵过程不产生毒素、安全、可靠,是公认安全的微生物,具有明显的优越性^[2-3].因此,选育高产木聚糖酶的黑曲霉菌株并对其发酵工艺条件进行优化,有助于开发、研制木聚糖酶制剂,是当前国内外研究热点之一.

目前,用于优化发酵条件的数学统计方法有很多,比如正交实验法和响应面分析(Response Surface Methodology, RSM)^[4].响应面分析比正交实验法更为有效,因为它采用了更为经济的方式和更为合理的实验设计方案,考虑实验的随机误差,对实验进行更为全面的分析,在化学工业、生物学、医学以及食品学等领域得到广泛的应用^[5-6].为此,笔者通过液态发酵筛选得到一株产木聚糖酶的黑曲霉菌株,并运用响应面分析方法对其培养条件进行了初步优化,为进一步的放大研究提供参考.

1 材料和方法

1.1 出发菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*):郑州大学生化中

心实验室保存.

1.2 培养基

斜面及平板培养基 PDA:去皮马铃薯 200 g 切成小块加入 1 000 mL 水煮沸 30 min,然后用纱布过滤,加入葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,溶化后补足水至 1 000 mL, pH 自然, 121℃ 灭菌 30 min.

液体筛选培养基(g/L):麸皮 15 g, 蛋白胨 10 g, KH_2PO_4 30 g, NaNO_3 30 g, CaCl_2 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.007 5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 5 g, ZnSO_4 0.02 g, CoCl_2 0.03 g^[7].

发酵条件优化培养基(g/L):玉米芯 20 g, 麸皮 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 6 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 4 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003 7 g^[8].

1.3 主要仪器

电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); LDZX-40A1 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);标准型洁净工作台(上海博迅实业有限公司);隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);PHS-3C 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司);722N 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司).

1.4 菌种的分离和筛选

(1)菌种活化.采用 PDA 斜面活化出发菌株,接种后于 30℃ 恒温培养箱中培养 3 d.

收稿日期:2011-05-14;修订日期:2011-06-25

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2007BAD66B04);河南省教育厅自然科学研究计划项目(2008B480004)

作者简介:马晓建(1953-),男,河南遂平人,郑州大学教授,博士生导师,主要从事生物质能源化工方面的研究, E-mail: maxj@zzu.edu.cn.

(2)菌种筛选.用接种环从活化后菌种斜面上取2环孢子接入液体培养基中,于30℃,150 r/min的条件下培养4 d,然后测定菌种的酶活.

1.5 酶活测定方法

木聚糖酶活的测定

取1 mL 1.0%的木聚糖溶液(溶于pH=4.8乙酸缓冲液中)于10 mL的刻度具塞试管中,再准确加入0.5 mL一定稀释度的待测酶液(空白管不加),50℃水浴30 min后,立即加入2 mL DNS试剂,再于空白管中准确加入0.5 mL一定稀释度的待测酶液.充分混匀后,置于沸水浴中5 min,然后迅速取出冷却至室温,加蒸馏水定容至10 mL,摇匀.样品在波长540 nm下测定吸光度,将吸光度平均值代入线性回归方程求出木糖的含量.

木聚糖酶活力定义单位:在上述条件下,每小时分解底物释放出1 μmol木糖所需要的酶量为一个单位(U/mL).

1.6 发酵条件优化设计方法

本实验采用响应面分析的方法对黑曲霉产木聚糖酶的发酵条件进行优化.

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选

将编号F-1、F-2、F-3、F-4、F-5、G-1、G-2、G-3、G-4、G-5,共10株黑曲霉菌株接入液体筛选培养基中,通过测定木聚糖酶活来筛选高产木聚糖酶的菌株.筛选结果见图1.从图1

中可以看出:F-3的酶活最高,为162.20 U/mL,因此最终选定F-3为实验菌株,进行下面的优化实验.

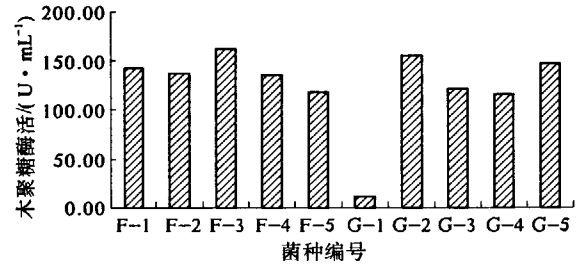


图1 黑曲霉筛选结果

Fig.1 Screening results from Aspergillus niger

2.2 发酵条件的优化

根据RSM实验设计方案^[9]并参考预试验的结果,选取发酵温度、发酵时间和起始pH为考察因素,分别设为 X_1 、 X_2 、 X_3 ,每个因素取3个水平,共设计了15个实验点的响应面分析实验,其中12个为析因点,3个为零点,零点实验进行了3次,以估计误差.以每毫升酶液的木聚糖酶活力作为响应值 Y .实验因素水平见表1,响应面实验设计与结果见表2.

表1 实验因素水平表

Tab.1 Experimental factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
发酵温度 X_1 /℃	28	30	32
发酵时间 X_2 /h	72	96	120
起始 pH 值 X_3	4.4	4.8	5.2

表2 响应面实验设计与结果

Tab.2 Experimental design and results of RSM

No	X_1	X_2	X_3	$Y / (U \cdot mL^{-1})$	No	X_1	X_2	X_3	$Y / (U \cdot mL^{-1})$
1	-1	-1	0	216.27	9	-1	0	-1	218.20
2	-1	1	0	229.79	10	1	0	-1	227.56
3	1	-1	0	249.40	11	-1	0	1	229.34
4	1	1	0	256.68	12	1	0	1	237.51
5	0	-1	-1	225.48	13	0	0	0	257.72
6	0	-1	1	230.53	14	0	0	0	258.31
7	0	1	-1	220.58	15	0	0	0	272.13
8	0	1	1	236.77					

利用SAS软件运行表2中的数据,得到的回归方程为

$$Y = 26\,272 + 9.69X_1 + 2.77X_2 + 5.29X_3 - 1\,244X_1X_1 - 1.56X_1X_2 - 0.30X_1X_3 - 1\,225X_2X_2 + 2.79X_2X_3 - 2\,213X_3X_3.$$

上述方程的决定系数 $R^2 = 0.9004$,表明回归方程的拟合程度良好.回归方程的方差分析见表3.

表3中 P 值为显著性概率,当小于0.05时说明影响显著,小于0.01时影响高度显著.因此, X_1

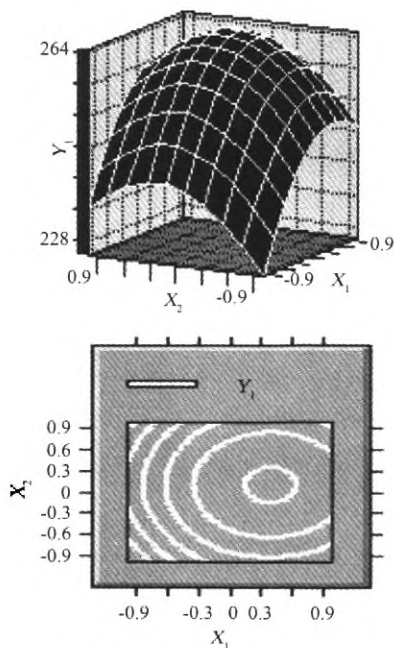
的一次项、 X_1 的平方项显著; X_2 的一次项不显著、 X_2 的平方项显著; X_3 的一次项不显著、 X_3 的平方项高度显著, 这说明 3 个考察因素对木聚糖酶产量都有一定的影响, 但方差分析中交互项不显著, 这说明可以不考虑 3 个考察因素的交互作用^[10].

表 3 方差分析结果

Tab. 3 The results of analysis of variance

方差来源	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	751.75	751.75	9.26	0.028 664
X_2	61.27	61.27	0.75	0.424 758
X_3	223.98	223.98	2.76	0.157 644
$X_1 \times X_1$	571.05	571.05	7.03	0.045 324
$X_1 \times X_2$	9.73	9.73	0.12	0.743 260
$X_1 \times X_3$	0.35	0.35	0.004	0.949 914
$X_2 \times X_2$	553.96	553.96	6.82	0.047 560
$X_2 \times X_3$	31.02	31.02	0.38	0.563 563
$X_3 \times X_3$	1 808.46	1 808.46	22.27	0.005 246
回归	3 671.58	407.95	5.02	0.045 113
误差	4 06.01	81.20		
总和	4 077.59			

发酵时间、温度和起始 pH 值 3 个因素的响应面分析图分别见图 2、图 3、图 4。

图 2 X_1, X_2 对 Y 值响应面分析图 ($X_3 = 0$)Fig. 2 Analysis of the RSM of $Y = f(X_1, X_2)$

从图 2 可以看出发酵温度 X_1 、发酵时间 X_2 对黑曲霉 F-3 液态发酵产木聚糖酶酶活的影响, 在最优点处 X_1, X_2 无论是增加或减少都对黑曲霉产木聚糖酶的酶活有消极影响^[11].

由图 3 可见黑曲霉 F-3 液态发酵产木聚糖酶的酶活随发酵温度 X_1 、起始 pH 值 X_3 的增大呈

现先增大后减小的趋势, 在发酵温度为 30 ℃、起始 pH 为 4.85 左右时, 木聚糖酶酶活最高。

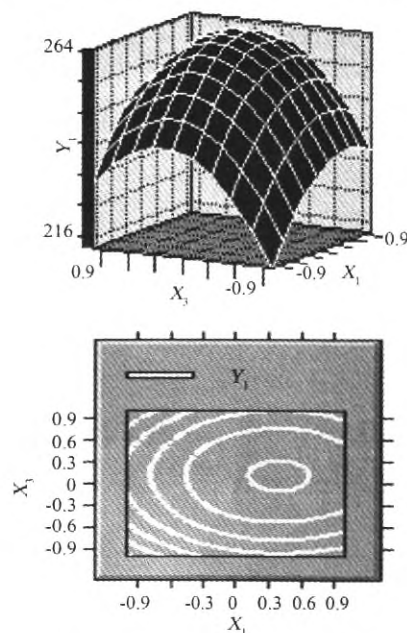
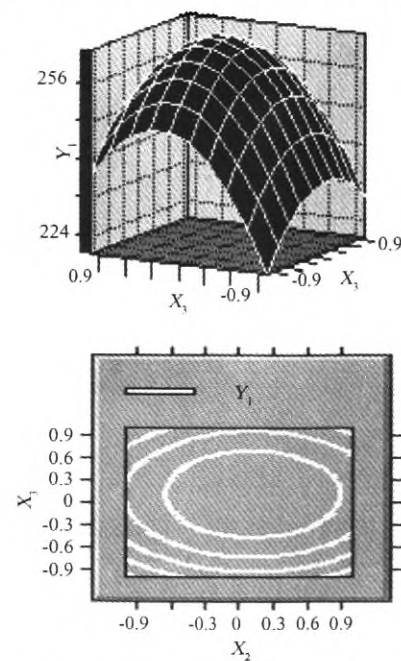
图 3 X_1, X_3 对 Y 值响应面分析图 ($X_2 = 0$)Fig. 3 Analysis of the RSM of $Y = f(X_1, X_3)$ 图 4 X_2, X_3 对 Y 值响应面分析图 ($X_1 = 0$)Fig. 4 Analysis of the RSM of $Y = f(X_2, X_3)$

图 4 为 $Y_1 = f(X_2, X_3)$ 的响应面分析图 ($X_1 = 0$), 反映出类似上述的变化规律, 在发酵时间为 98 h 左右、pH 为 4.85 时, 木聚糖酶酶活最高。

对利用 SAS 软件得到的回归方程求一阶偏导并使其等于零, 可得到响应面的最大值, 即 3 个因素的最佳值: 温度为 30.8 ℃、发酵时间为 98.7 h、起始 pH 为 4.85, 此时木聚糖酶酶活最优值为

265.08 U/mL. 按上述的最佳条件做验证实验,最终测得的酶活结果见表4.

表4 验证实验结果

Tab.4 The results of validation experiment U/mL

编号	木聚糖酶活	优化后平均酶活	优化前酶活
1	264.05		
2	267.16	266.41	162.20
3	268.02		

3 结论

通过液态发酵筛选得到一株高产木聚糖酶的黑曲霉菌株 F-3,其最高酶活为 162.20 U/mL. 利用响应面分析的方法对黑曲霉菌株 F-3 的发酵温度、发酵时间和起始 pH 进行了初步优化,确定了其最优发酵条件为温度 30.8 ℃、发酵时间 98.7 h、起始 pH 值为 4.85,使其产木聚糖酶的最高酶活可达 266.41 U/mL,比之前提高了 64.25%.

参考文献:

- [1] 闫振丽,程杰渊,杨付伟,等. 黑曲霉固态生产木聚糖酶发酵条件的优化[J]. 中国酿造,2009,(4):99.
- [2] 黄林,钟敏,涂晓勇,等. 黑曲霉 X-1 产木聚糖酶液体发酵工艺研究[J]. 生物技术,2008,18(6):81-82.
- [3] 白爱枝,闫祖威,梁运章. 黑曲霉产纤维素酶液体发酵条件的优化[J]. 生物工程学报,2008,34(3):11-12.
- [4] 杨月芬. 产 β -葡聚糖酶菌株的诱变育种、发酵产酶及其性质研究[D]. 苏州:江南大学食品学院,2008.
- [5] 吴有炜. 实验设计与设计处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002. 135-142.
- [6] 冯培勇,赵彦宏,张丽. 响应面法优化黑曲霉产纤维素酶发酵条件[J]. 生物工程学报,2009,30(23):335.
- [7] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2007.
- [8] 刘明启,关荣发,陈文伟. 黑曲霉固体发酵产木聚糖酶的响应面优化设计及其酶学性质的研究[J]. 农业生物技术学报,2010,18(1):52-53.
- [9] 郝学财,余晓斌,刘志钰,等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发,2006,27(1):39-41.
- [10] LI Yin, CUI Feng-jie, LIU Zhi-qiang. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(5):1382-1387.
- [11] 李淑瑞,余晓斌,孙婷. 响应面法优化绿色木霉产壳聚糖酶培养基[J]. 生物工程学报,2009,30(10):178-180.

Study on the Optimization of the Fermentation Conditions of Xylanase Production by *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology

MA Xiao-jian, YANG Jun-fang, CHANG Chun

(School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: *Aspergillus niger* F-3 with a higher activities of xylanase was screened from ten strains of *Aspergillus* sp. preserved in the laboratory. Using response surface methodology, the fermentation conditions including fermentation temperature, fermentation time and initial pH were investigated, and the optimal conditions were obtained. The conditions are: fermentation temperature 30.8 ℃, fermentation time 98.7 h, starting pH 4.85. U/mL. Under these conditions, the highest activity of xlanase was 266.41 U/mL, increased by 64.25% compared to initial conditions.

Key Words: *Aspergillus niger*; xylanase; screen; optimization; response surface methodology