

二次通用旋转试验设计优化黑曲霉固态发酵 纤维素酶条件的研究

李兰晓¹, 杜金华¹, 商曰玲², 耿云², 孙中涛²

1 (山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安, 271018) 2 (山东农业大学生命科学学院, 山东泰安, 271018)

摘 要 采用二次通用旋转试验设计, 对黑曲霉(*Aspergillus niger* sp.) 固态发酵啤酒糟生产纤维素酶的条件进行了优化, 并建立了纤维素酶随啤酒糟与棉粕的配料比、料水比和发酵时间变化的二次回归方程。利用该方程探讨了各因子对纤维素酶的影响。结果表明, 各因子对纤维素酶的影响顺序为: 配料比>发酵时间>料水比, 而因子的交互作用不显著。利用统计优选法寻优, 确定了最优发酵条件: 啤酒糟与棉粕的配料比 7:3, 料水比 1:1.5, 发酵时间 66 h, 滤纸酶活最高值为 782.4 u/g。

关键词 纤维素酶, 固态发酵, 啤酒糟, 二次通用旋转试验设计

发酵条件的优化是发挥菌种生产能力、降低生产成本的主要途径。目前, 微生物发酵条件的优化多采用单因子法, 即固定其他因素不变的情况下改变一个因素的水平。但由于考察的因素间经常存在交互作用, 使得该方法并非总能获得最佳的优化条件^[1]。为了弥补单因子试验的缺陷, 多种优化方法已被成功地运用于微生物发酵条件的优化研究中^[2~4]。二次通用旋转试验设计具有准确性高、综合性好、系统性强、信息量大等优点, 广泛应用于生产试验和科学试验^[5]。

本研究在单因素研究的基础上^[6], 采用三因素二次通用旋转试验, 研究了啤酒糟与棉粕的配料比、料水比和发酵时间对黑曲霉(*Aspergillus niger* sp.) 固态发酵啤酒糟生产纤维素酶的影响, 并确定各因素的最优水平, 为工业化发酵生产提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

黑曲霉(*Aspergillus niger* sp.), 本实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基

10%麸皮浸汁培养基。

1.2.2 发酵培养基

500 mL 三角瓶中装入啤酒糟和棉粕共 20g, 具体因素水平设置参照试验设计。

1.3 培养方法

在无菌条件下, 取 1 mL 孢子悬液(孢子浓度约

为 10^6 个/mL) 至灭菌后的发酵培养基中, 30℃ 恒温培养, 发酵结束后于 50℃ 干燥 24 h, 粉碎, 制成粗酶粉。

1.4 仪器与试剂

1.4.1 主要仪器

DHP-9272 型电热恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; UV-2000 分光光度计, 上海尤尼柯公司; pH5-3C 型精密 pH 计, 上海理达仪器厂; 电热恒温水浴锅, 黄骅综合仪器厂; 高压灭菌锅, 山东新华医疗器械股份有限公司; 高速万能粉碎机, 无锡祺锐科技有限公司。

1.4.2 主要试剂

3,5-二硝基水杨酸, 酒石酸钾钠, NaOH, 苯酚, 无水 Na_2SO_3 , 醋酸, 醋酸钠, 葡萄糖, 新华 1 号滤纸。所用试剂均为分析纯。

1.5 纤维素酶活测定

1.5.1 粗酶液制备

准确称取 0.5 g 干燥的粗酶粉, 加 25 mL 0.2 mol/L pH4.6 醋酸缓冲液, 室温浸提 1h 后过滤, 滤液即为粗酶液。另取一定量固体曲 105℃ 烘干至恒重, 测定含水量。

1.5.2 滤纸酶活(FPA)测定^[7]

25 mL 具塞试管底部放入 1 张 M 状的新华 1 号滤纸(1 cm×6 cm, 50±1 mg), 加入 1.5 mL pH4.6 的醋酸缓冲液和 0.5 mL 适当稀释的酶液, 40℃ 保温 60 min, 加入 3.0 mL DNS 试剂, 沸水浴显色 10 min, 冷却后定容至 25 mL, 摇匀, 540 nm 波长测吸光值。以相同条件下, 失活的酶液作对照, 从标准曲线上查得生成的葡萄糖量。

酶活单位定义: 上述反应条件下, 1 min 水解底

第一作者: 硕士研究生(杜金华教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-07-19, 改回日期: 2007-08-29

物生成 $1\mu\text{g}$ 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位。换算成每克干物料含有的酶活,以 u/g(dw) 表示。

1.5.3 试验设计

选取啤酒糟与棉粕的配料比、料水比和发酵时间 3 个因素,采用二次通用旋转实验设计,试验因子及水平见表 1。

表 1 二次通用旋转试验设计因素水平编码表

编码值	配料比(X_1)	料水比(X_2)	发酵时间(X_3)
上星臂号+1.682	9.68 ± 0.32	1 : 2.3	76.1
上水平+1	9 : 1	1 : 2.0	72
基准水平 0	8 : 2	1 : 1.5	66
下水平-1	7 : 3	1 : 1.0	60
下星臂号-1.682	6.32 ± 3.68	1 : 0.7	55.9

2 结果与分析

2.1 数学模型的建立与检验

二次通用旋转试验方案及结果见表 2。利用 DPS 软件对试验结果进行统计分析,得到 FPA 与各因素之间的回归方程如下: $Y=750.141\ 05-74.255\ 24X_1+62.913\ 03X_2+66.379\ 26X_3-41.941\ 41X_1^2-86.170\ 94X_2^2-80.019\ 11X_3^2+7.575\ 00X_1X_2-13.875\ 00X_1X_3-3.075\ 00X_2X_3$ 。对所得到的数学方程及各因素的方差分析见表 3。

表 2 二次通用旋转试验方案及结果

试验号	配料比 (X_1)	料水比 (X_2)	发酵时间 (X_3)	Y (FPA)/ $\mu\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	638.8
2	1	1	-1	472.2
3	1	-1	1	520.6
4	1	-1	-1	326.6
5	-1	1	1	739.5
6	-1	1	-1	613.3
7	-1	-1	1	636.5
8	-1	-1	-1	513.1
9	-1.682	0	0	749.2
10	1.682	0	0	469.8
11	0	-1.682	0	367.8
12	0	1.682	0	601.0
13	0	0	-1.682	413.7
14	0	0	1.682	589.9
15	0	0	0	734.4
16	0	0	0	785.4
17	0	0	0	724.2
18	0	0	0	729.3
19	0	0	0	785.4
20	0	0	0	749.7

由表 3 可以看出,失拟检验 $F_1=2.090<F_{0.05}(5,5)=5.05$,差异不显著,说明未控制因素对试验结

果干扰很小,拟合不足被否定,可进一步对回归模型进行拟合检验;拟合检验 $F_2=35.997>F_{0.01}(9,10)=4.94$,达到极显著水平,复相关系数 $R^2=0.970\ 1$,说明该方程与实际情况拟合良好,正确反映了 FPA 与配料比、料水比及发酵时间的关系。对各试验因子的偏回归系数的检验结果表明: X_1 、 X_2 、 X_3 及 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 的偏回归系数达到极显著水平 ($P<0.01$),说明试验因子对响应值影响极显著,且不是简单的线性关系;而交互项均未达到显著水平 ($P>0.05$),即各因子之间的交互作用不显著。但由于二次项系数之间具有相关性,因此,这些微弱的交互项,原则上不能删除^[8]。

表 3 回归方程方差分析表

变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值	显著水平 P
X_1	116328.5	1	116328.5	98.25021	0
X_2	83505.11	1	83505.11	70.52783	0.00001
X_3	92960.12	1	92960.12	78.51347	0
X_1^2	39162.47	1	39162.47	33.07635	0.00018
X_2^2	165312.5	1	165312.5	139.6218	0
X_3^2	142551.4	1	142551.4	120.3979	0
X_1X_2	709.1422	1	709.1472	0.59894	0.45689
X_1X_3	2379.234	1	2379.234	2.00948	0.18672
X_2X_3	116.8588	1	116.8588	0.0987	0.75985
回归	383588.9	9	42620.98	$F_2=35.997$	0.00000
剩余	11840.02	10	1184.002		
失拟	8007.883	5	1601.577	$F_1=2.090$	0.15038
误差	3832.14	5	766.428		
总和	395428.9	19			

2.2 数学模型的解析

2.2.1 主因子效应分析

由于各因素处理均经无量纲线性编码代换,偏回归系数已经不受因素取值的大小和单位的影响,即已标准化,其绝对值的大小直接反映了变量对响应值的影响程度^[9]。因此,各因素在试验取值范围内对 FPA 作用大小顺序依次为: X_1 (配料比) $>X_3$ (发酵时间) $>X_2$ (料水比),且 X_2 、 X_3 是正效应, X_1 是负效应。

2.2.2 单因子效应分析

将 3 因素中的 2 个固定在 0 水平,对数学模型进行降维分析,得到以其中 1 个因素为决策变量的偏回归模型:

$$Y_1=750.14105-74.25524X_1-41.94141X_1^2$$

$$Y_2=750.14105+62.91303X_2-86.17094X_2^2$$

$$Y_3=750.14105+66.37926X_3-80.01911X_3^2$$

上述 3 个方程,二次项系数均为负值,说明其表

征的抛物线都开口向下,因此,3个因素取值均存在最佳值,过大或过小均会使响应值降低。

2.2.3 交互效应分析

对模型的方差检验表明,交互项偏回归系数均未达到显著水平,即各因素之间的交互作用不显著,因此,不进行讨论。

2.3 数学模型寻优

根据已建立的数学模型,在 $-1.682 \leq X_i \leq 1.682 (i=1,2,3)$ 范围内,每个因素取5个水平(±1.682,1和0),对 $5^3=125$ 个方案进行统计寻优,在试验范围内可得FPA最高值为782.4 u/g,此时各因素取值为: $X_1=-1, X_2=0, X_3=0$,相当于啤酒糟与棉粕的配料比7:3,料水比1:1.5,发酵时间66 h。以0水平试验的均值750.1为临界值,求得FPA大于临界值的方案共5个,各变量取值的频率分布见表4。

表4 最佳方案各变量取值的频率分布表

水平因素	X_1		X_2		X_3	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率
-1.682	1	0.2	0	0	0	0
-1	3	0.6	0	0	0	0
0	1	0.2	4	0.8	4	0.8
1	0	0	1	0.2	1	0.2
1.682	0	0	0	0	0	0
加权均数	-0.936		0.200		0.200	
标准差	0.240		0.179		0.179	
95%的分布区间	-1.408~-0.465		-0.151~0.551		-0.151~0.551	

由表4可以看出,当 $X_1=-1.408 \sim -0.465$, $X_2=-0.151 \sim 0.551$, $X_3=-0.151 \sim 0.551$ 时,相应的实际值为:啤酒糟与棉粕的配料比为6.6:3.4~7.5:2.5,料水比1:1.4~1:1.8,发酵时间65.1~69.3 h,FPA有95%的可能高于750.1 μ /g。为了确认这一试验结果,按得出的条件重复3次验证试验,结果表明,FPA都在750 u/g以上,进一步证实了分析的可靠性。

3 讨论

二次通用旋转试验统计寻优得到的优化条件与单因素试验的结果略有差异,这是由于研究中的3个因素的二次项对FPA影响显著,而因素之间的交互作用不显著。但二次通用旋转试验所得到的信息量要远比单因素试验多,尤其是当试验因素之间具有显著的交互效应时,单因素试验所得到的结论有可能是错误的,本研究的试验结果则进一步验证了单因素试

验所得到的结论。

4 结论

(1)建立的FPA与试验因素之间的回归方程如下: $Y=750.14105-74.25524X_1+62.91303X_2+66.37926X_3-41.9414X_1^2-86.17094X_2^2-80.01911X_3^2+7.57500X_1X_2-13.87500X_1X_3-3.07500X_2X_3$,回归关系极显著,拟合程度较高,对于黑曲霉固态发酵啤酒糟生产纤维素酶的因子效应分析具有实际意义。

(2)在试验所选的水平范围内,3个因素对FPA作用效应顺序为:配料比>发酵时间>料水比,且各因素的二次项对发酵有显著影响,而交互作用不显著

(3)利用统计优选法对回归方程寻优,确定了最佳发酵条件为:啤酒糟与棉粕的配料比7:3,料水比1:1.5,发酵时间66 h,FPA最优值为782.4 u/g。

(4)当啤酒糟与棉粕的配料比为6.6:3.4~7.5:2.5,料水比1:1.4~1:1.8,发酵时间65.1~69.3 h时,FPA有95%的可能高于750.1 u/g。

参考文献

- 1 欧闯字,贾士儒,马霞.细菌纤维素发酵培养基的优化[J].食品与发酵工业,2002,29(1):18~22
- 2 Chenhung Liu, Weibin Lu, JoShu Chang. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(9): 1940~1944
- 3 Julio Xandro Heck, Luis Henrique, Barros Soares, et al. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(4): 417~423
- 4 Liu HL, Lan YW, Cheng YC. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology[J]. Process Biochem, 2004, 39: 1953~1961
- 5 肖占文,赵致禧.回归旋转设计在甜菜种衣剂配方研究中的应用[J].中国糖料,2005(1):23~25
- 6 李兰晓,杜金华,高日玲,等.黑曲霉固态发酵啤酒糟生产纤维素酶的研究[J].食品与发酵工业,2007,33(6):34~37
- 7 Zhiyou Wen, Wei Liao, Shulin Chen. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure[J]. Biore-source Technology, 2005, 96(4): 491~499
- 8 卢恩双,宋世德,郭满才.回归通用旋转设计的几个问题[J].西北农林科技大学学报,2002,30(5):110~113
- 9 唐启义,冯明光.实用统计分析及其数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002.159~163

Studies on Optimizing the Conditions of Cellulase Fermentation by *Aspergillus niger* in Solid State through Quadratic General Rotary Design

Li Lanxiao¹, Du Jinhua¹, Shang Yueling², Geng Yun², Sun Zhongtao²

1(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

2(College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

ABSTRACT Cellulase production by *Aspergillus niger* sp. in solid state fermentation using brewers grain was optimized by quadratic general rotary design, and a quadratic regression equation was established. The effects of the factors were studied by the equation. The results showed the order of significance that affected the cellulase fermentation as the ratio of brewers grain to cotton cake, fermentation time, and the ratio of material to water. The mutual interaction of these factors was not significant. The statistical optimization method was used to optimize the fermentation conditions. The optimum conditions were; the ratio of brewers grain to cotton cake was 7 : 3, the ratio of material to water was 1 : 1.5, the time of fermentation was 66h, the maximal filter paper activity of the enzyme could reached 782.4μ/g (dry matter).

Key words cellulase, solid-state fermentation, brewers grain, quadratic general rotary design

市场
动态

全球新能源市场分析

全球涌动新能源热潮。在全球石油储量越来越少和国际石油价格居高不下的趋势下,近年来世界各国都积极探索能源的多元化,积极寻找新型替代能源。

发展生物质能源被认为是替代石油的最佳途径。近年来,世界上许多国家都将发展生物质能源作为国家能源战略的重点。如欧盟计划,2010年生物柴油的产量达800~1000万t,占柴油市场份额5.75%,2020年达到20%。美国计划2012年燃料乙醇达到2200万t。美国计划到2020年,生物燃油取代全国燃油消费量的10%,生物质产品取代石化原料制品的25%。到2050年,生物质能源占总能耗的50%。

在亚洲,早在2006年,菲律宾就通过一条法律,规定两年内所有引擎的液体燃料必须含有部分国内生产的生物燃料。一家菲律宾石油公司计划在菲律宾南部建立一座3000万美元的乙醇工厂,以赶上生物燃料潮流。在开发生物能源方面,非洲国家有得天独厚的优势,尤其是原料比较广泛,如秸秆、甘蔗、玉米以及畜牧业的废弃物等。

新能源产业前景广阔。目前,中国用于发展生物能源的非粮原料资源潜力很大,而且技术日趋成熟,特别是一些关键技术,尽管中国发展新能源时机逐步成熟,但也出现了一些不良苗头,“一窝蜂”地大于快上,不分析资源状况,不分析技术经济可行性,不考虑市场风险,盲目研发项目。要发展新能源产业,必须按照经济规律办事,统筹考虑各种因素,特别是要正确处理好确保粮食安全与发展能源作物的关系,处理好全面推动与因地制宜的关系,需要政府部门、企业和全社会密切配合,共同推动新能源产业发展。

随着能源危机步步紧逼,人们对风能、太阳能、地热能、生物能等新能源和可再生能源的探求不断升温。而相关数据显示,太阳能年日照时数在2200h以上的地区约占中国国土面积的2/3以上,太阳能在中国具有良好的开发条件和应用价值。中国可开发的风能资源储量为2.53亿千瓦。地热资源远景储量相当于2000亿t标准煤,已勘探的40多个地热田可供中低温直接利用的热储量相当于31.6亿t标准煤。可见,中国拥有丰富的新能源和可再生能源资源。

探索开发新能源的新路径。近期,一大批新能源项目也在我国各地如火如荼地开工建设。广东省投资逾4亿元,在湛江市建设该省首个风力发电项目;中粮集团在广西北海投资14.6亿元建设20万t燃料乙醇项目;龙岩连润新能源科技有限公司在福建连城投资2.2亿元建设年产20万t二甲醚项目等,以可再生能源为代表的新能源产业大有燎原整个中国之势。

甲醇制二甲醚是目前国内最热门替代燃料方案,至2007年底,全国二甲醚总产能将突破100万t,目前规划和建设中的总产能达到千万吨以上。二甲醚既可以作民用燃料,也可以作车用燃料。随着今年8月份建设部二甲醚民用燃料标准的出台,二甲醚替代城市煤气和液化气已经没有任何障碍。此外,二甲醚车用燃料也已取得突破性进展。

用秸秆生产燃料乙醇,也具有很大的发展前景,但最大的技术难点就在发酵环节。纤维素酶的成本能否下降,是纤维素乙醇能否实现工业化生产的关键因素。目前全世界只有两家公司能够生产用于纤维素工业化水解的酶,一家是丹麦的诺维信,一家是美国的杰能科。目前两家公司垄断着全球酶制剂市场份额的65%以上,拥有近4000项专利,而且新型酶制剂开发路径也被诺维信公司注册专利加以保护。目前,诺维信与中粮集团已在纤维素酶领域签署了战略合作协议。人们期待中国能够尽早纤维素乙醇领域实现突破。