

响应面法对绿色木霉产纤维素酶固态发酵条件优化

刘 华¹, 李崇高², 黄建初¹

(1. 广州工商学院, 广州 510850; 2. 广州城市职业学院, 广州 510000)

摘 要: 为探讨绿色木霉固态发酵产生纤维素酶的最佳发酵条件, 在单因素分析的基础上, 采用 Box-Behnken 方法设计实验, 选取麸皮与秸秆粉质量比、培养基含水量和初始 pH 值作为影响因素, 以产酶量为响应值建立二次回归方程, 并通过响应曲面分析法分析数据并确定优化条件。结果显示, 在不同条件下绿色木霉产纤维素酶活力存在显著差异 ($P < 0.05$), 采用响应面法在培养温度 29℃, 硫酸铵添加量为 2% 时, 获得了最适培养基成分为麸皮秸秆粉比例 1.37:1, 含水率 250% (10 g 干基), 初始 pH 6.04, 在 72 h 获得了最大产酶量, 酶活为 59.72 U·g⁻¹, 与基础培养基相比有近 20% 的提高。

关键词: 纤维素酶; 绿色木霉; 响应曲面法; 固体发酵

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-0980-06

Condition optimization of solid fermentation for cellulase production by *Trichoderma viride* using response surface methodology

LIU Hua¹, LI Chonggao², HUANG Jianchu¹

(1. Guangzhou College of Technology and Business, Guangzhou 510850; 2. Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510000)

Abstract: The aim of the study was to investigate the optimal fermentation conditions for cellulase production through solid state fermentation of *Trichoderma viride*. The study was designed based on the basis of single factor analysis. An orthogonal test was conducted by chosen three parameters, including the ratio of wheat bran to straw powder, moisture content and initial pH value as effect factors with the Box-Behnken method. The quadratic regression equation was established based on the yield of enzyme, and the optimal conditions were determined using response surface methodology. The activity of *Trichoderma viride* cellulase displayed significant differences under different conditions ($P < 0.05$). The optimal fermentation medium obtained when 2% ammonium sulfate was added at the culture temperature of 29 °C was as follows: wheat bran to straw powder ratio of 1.37:1, water content of 250% (10 g dry basis), and the initial pH value of 6.04. The highest enzyme activity of 59.72 U·g⁻¹ (dry media) was obtained after 72 hours, which increased about 20% compared to that of the basal medium.

Key words: cellulase; *Trichoderma viride*; response surface methodology; solid state fermentation

木质纤维素是世界上最丰富的、最廉价的可再生资源, 是人类社会赖以生存的基本物质来源。这类物质是植物细胞壁的主要成分, 也是地球上最丰富可再生资源。中国的纤维素资源极为丰富, 每年农作物秸秆的产量达 5.7×10^8 t, 目前此部分资源尚未得到充分开发利用, 主要用于畜牧饲料, 积肥与燃料, 不仅利用率低, 同时会对环境造成一定的污染。随着全球能源的不断枯竭, 生物能源因其具有资源丰富、可再生性和环境保护等优点, 正日益受到社会和政府的高度重视, 研究如何利用纤维素

酶将纤维素高效转化为人类急需的食物、能源和原料, 对于人类社会解决食物短缺、环境污染和能源危机具有极其重大的现实意义和发展前景^[1]。酶水解是纤维素生物转化的重要途径, 纤维素酶在水解过程中起着关键作用, 纤维素酶种类繁多, 来源很广, 由于真菌纤维素酶产量高、活性大, 故在工业生产中应用的纤维素酶主要是真菌纤维素酶。但是目前纤维素酶的生产成本还较高, 限制了其工业化应用, 也阻碍了生物能源的利用。生产纤维素酶的方法有固态发酵和液态发酵 2 种, 液体深层发酵法

收稿日期: 2016-12-19

作者简介: 刘 华, 讲师。E-mail: annyih2008@126.com

所需设备的投资大、生产成本低,同时由于其大量的废水和高能耗,阻碍了此方法的进一步发展;固态发酵方法具有易分离、可回收和反复多次使用等优点,因此近年来纤维素酶固态发酵的研究在全世界备受关注,开发出能耗低、稳定性高、成本低和环境污染小的纤维素酶固态发酵法,对拓展纤维素酶在工业生产中的应用具有至关重要的作用^[2]。

绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 是好氧异养型真菌,是木霉菌的一种,在自然界分布广泛,常腐生于木材、种子及植物残体上,是产纤维素酶活性最高的菌株之一,由于低成本高产量,采用绿色木霉固态发酵生产纤维素酶成为纤维素酶工业生产的技术发展方向^[3]。目前国内外已报道的绿色木霉多侧重于其所代谢的酶类研究,对绿色木霉固态发酵的培养条件的研究相对较少,以使用正交试验的方法为主,对于纤维素酶的产量和活性的提高效果并不明显^[4-5]。本研究在单因素分析基础上,运用响应曲面法对固态发酵产酶的多种因素进行优化,对绿色木霉产纤维素酶的发酵工艺进行优化,为进一步为玉米秸秆和麸皮工业化生产纤维素酶提供依据,实现工业生产的“绿色化”,提高生物资源的有效利用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

供试绿色木霉,作者所在实验室保藏;马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA):Mendels 营养液;微量元素:3,5-二硝基水杨酸显色液:0.1%标准葡萄糖溶液:pH4.6 醋酸-醋酸钠缓冲液;BS210S 型电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏州净化设备有限公司;光学显微镜,L1000A 型;PHS-2C 型酸度计,上海虹益仪器厂;手提式压力蒸汽消毒器,江阴滨江医疗设备厂;DK-8AD 电热恒温水槽,上海安谱实验科技股份有限公司;离心机,80-2 型,上海悦丰仪器仪表有限公司;722 型分光光度计,上海棱光技术有限公司;DHZ-D 冷冻恒温振荡器,广州深华生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 斜面培养 将菌种接种至已灭菌的 PDA 斜面培养基后,置 28℃ 恒温培养箱中培养 7 d,移至 4℃ 左右冰箱中,备用。

1.2.2 孢子悬液的制备 将培养 7 d 的 PDA 平板,用灭菌的蒸馏水洗下孢子,用移液枪转移到含玻璃珠和无菌水的灭菌三角瓶中充分振荡。在显微镜下用血球计数板计数,调整孢子浓度至 10^7 个·mL⁻¹,

作为种子液,备用^[6]。

1.2.3 固体发酵 根据前期实验优化条件,将种子培养液按一定接种量加入固体产酶培养基中,放置于 29℃ 恒温培养箱中培养。接种过程中,用 8 层纱布封口,保证固态发酵所需要的通气量,通气量过大可造成发酵过程中基质含水量下降,通气量过小则不能满足固态发酵的需氧量,32 h 摇动三角瓶,防止培养基板结影响通气^[5]。

1.2.4 粗酶液制备 取发酵后的固体曲,加入蒸馏水 100 mL,30℃ 下抽提 60 min,在摇床上 28℃,200 r·min⁻¹ 浸提 30 min,之后在 4 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min,提取上清液即为粗酶液,放置 10 min 后待测。

1.2.5 滤纸酶活力测定 采用国际纯粹与化学联合会规定的方法,在 10 mL 具塞试管中加入 2.0 mL 酶液和 3.0 mL 缓冲液于试管中(空白测定:吸取 2.0 mL 蒸馏水代替 2.0 酶液,其他操作同样品测定),加入滤纸条一条(1 cm×6 cm 新华 5 号滤纸),50℃ 水浴加热静止反应 60 min。吸取滤纸酶解液 1.0 mL,同时在试管中加入蒸馏水 1.5 mL,以及 3,5-二硝基水杨酸显色液 2.5 mL,沸水浴煮沸 5 min,冷却后稀释 10 倍,540 nm 处测定光密度 OD 值。采用 DNS 法测定反应液中的还原糖含量,每组做 3 个平行实验,取 3 个重复光密度的平均值,从葡萄糖标准曲线上查出对应的葡萄糖含量,折算成酶活单位 U·g⁻¹。酶活的定义为在上述下,以水解反应中每分钟有底物生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量为 1 个活性单位,酶活力单位为 FPI U·g⁻¹(以干曲计),简写为 U·g⁻¹。

滤纸酶活力(U·g⁻¹)=

$$\frac{\text{葡萄糖质量}(\text{mg}) \times 5.56}{\text{酶液加入量}(\text{mL}) \times \text{酶液中干曲浓度}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{反应时间}(\text{min})}$$

式中:5.56 为 1 mg 葡萄糖的微摩尔数,μmol·L⁻¹,1000/180=5.56。

1.2.6 标准曲线的绘制 吸取不同容积的 0.1% 标准葡萄糖溶液,定容至 50 mL,取具塞试管依次加入上述溶液各 2.5 mL,在各管中加入 3,5-二硝基水杨酸显色液 2.5 mL,摇匀后煮沸 5 min;另作空白对照^[6]。冷却后,使用 721 型分光光度计,在 530 nm 波长下用空白对照管调零,测定 OD 值,每组做 3 管重复并取平均值,以光密度值为横坐标,以葡萄糖含量(mg)为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。

1.2.7 响应面实验设计 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理^[8],对绿色木霉进行发酵生产纤维素酶的培养基进行了优化。从单因素实验中可以

得知, 麸皮秸秆粉比、含水量和 pH 值 3 个因素对纤维素酶发酵具有比较显著的影响。所以本研究根据 Box-Behnken 的设计原理, 以麸皮秸秆粉比、含水量和初始 pH 值为自变量, 以产酶量为响应值设

计了 3 因素 3 水平共 15 个实验的响应面分析实验。发酵培养基的其他条件为: 干基总重 (麸皮+秸秆粉 10 g), 加入硫酸铵 2%。实验选取水平如表 1。

表 1 Box-Behnken 设计的因素及因素水平选取
Table 1 Factors and factors of Box-Behnken design

因素 Factor	低水平(-1) Low level (-1)	中水平(0) Medium level (0)	高水平(1) High level (1)
麸皮秸秆粉质量比(比值) (X1) Wheat bran and straw powder ratio (ratio)	1	1.5	2
加水量/mL(X2) Amount of water/mL	15	25	35
初始 pH(X3) Initial pH	4.5	6	7.5

实验以随机次序进行, 实验获得的产酶响应值用 SAS 软件进行分析, 并由此给出响应面分析图及方差分析表。

2 结果与分析

2.1 秸秆和麸皮的比值对绿色木霉固态发酵影响

绿色木霉对于不同的碳源的利用效率不同, 因此在不同种类的碳源条件下, 绿色木霉产纤维素酶的能力不同, 麸皮和秸秆是最常见且来源经济的碳源, 其混合比例对产酶具有一定的影响, 麸皮具有绿色木霉所需要的维生素和蛋白质等营养物质, 秸秆则主要提供纤维素^[9], 同时由于麸皮的物理结构, 若比例过高会影响发酵过程中的透气性, 从而影响固态发酵的产酶效果^[10-11]。本研究通过选用不同比例的秸秆与麸皮相混合, 在一定条件下培养, 分别测定酶活。实验结果显示, 当秸秆粉与麸皮的比值在 3:2 与 4:2 之间时, 纤维素酶的酶活最大可达 52.71 (见图 1)。因此, 单因素实验结果显示, 最适碳源条件是在秸秆粉与麸皮的比值达到 4:2。

2.2 加水量对产酶的影响

水是微生物生长本身所需的生长因子, 是良好的溶剂, 微生物所需的营养物及代谢产物必须溶解在水中, 才能通过细胞膜被吸收或排出。体内各种生化反应, 也必须在水溶液中方能进行。对于固体发酵来说, 加水量是一个极其重要的因素, 因为一方面微生物新陈代谢必须的物质, 而同时含水量的高低与通气性有密切关系。在该实验中研究加水量对产酶的影响。在干基为 10 g 的固体培养基中, 加水量小于 15 mL (干基的 15%) 时, 将有部分干基难以润湿, 而大于 35 mL (干基的 35%) 时, 三角瓶底将出现积液现象, 影响培养基的均一性, 选取加水量 12、16、20、24、28、32、36、40 和 44 mL 进行实验。实验结果 (图 2) 显示, 在满足木霉菌所需氧的情况下, 产酶活力随着培养基加水量增加

而增加。但加水量超过 28 mL 时, 培养基的结块将影响通气, 从而使产酶活力下降^[12]。因此, 单因素实验确定的最适含水量为 280%。

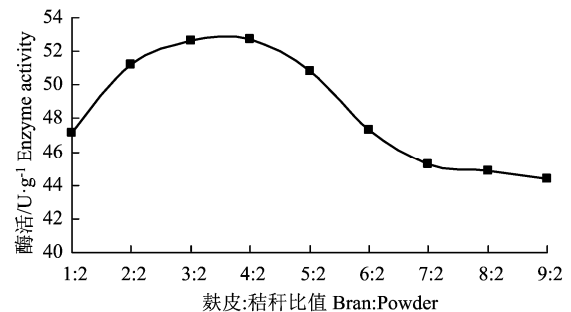


图 1 麸皮秸秆粉比对产酶的影响

Figure 1 Effect of the ratio of bran and straw powder on enzyme production

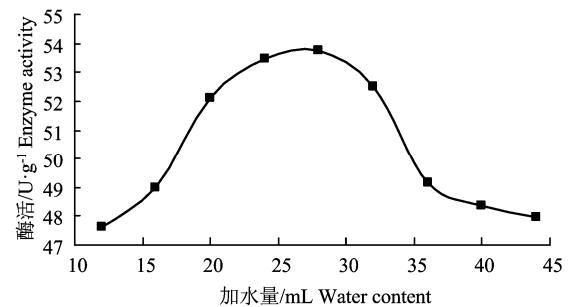


图 2 加水量对产酶量的影响

Figure 2 Effect of water content on the yield of enzyme

2.3 初始 pH 对产酶的影响

环境因子对微生物的生长有很大影响, 尤其是环境的 pH 值与微生物有密切的联系。pH 值会影响到细胞膜所带的电荷, 从而引起细胞对营养物质吸收状况的变化。此外, pH 值除了对微生物有上述直接影响外, 还可以通过改变培养基中的有机化合物的离子化程度, 对细胞施加间接影响, 改变某些化合物分子进入细胞的状况, 从而促进或抑制微生物的生长。该实验研究初始 pH 值在培养基其他成分

相同的情况下对纤维素酶生产的酶活的影响, 提出实际生产中较为适宜的 pH 值。

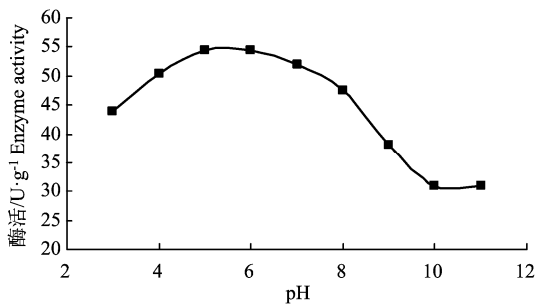


图 3 初始 pH 值对酶活的影响

Figure 3 Effect of initial pH value on enzyme activity

表 2 Box-Behken 设计及实验结果

Table 2 Box-Behken design and experimental results

编号 RUN	X_1	X_2	X_3	Y_1
1	-1	-1	0	51.1847
2	-1	1	0	54.3202
3	1	-1	0	45.2754
4	1	1	0	45.9989
5	0	-1	-1	48.3475
6	0	-1	1	48.6521
7	0	1	-1	49.5566
8	0	1	1	43.1649
9	-1	0	-1	44.3106
10	1	0	-1	46.3004
11	-1	0	1	52.2700
12	1	0	1	40.6927
13	0	0	0	59.6766
14	0	0	0	58.9384
15	0	0	0	59.3575

表 4 方差分析

Table 4 Table of variance analysis

方差来源 Source	自由度 DF	主模型 Master model			
		方差 SS	均方差 MS	F 值	Pr > F
Model	9	488.3888	54.26543	13.46711	0.005265
线性检验 Linear	3	72.67872	24.22624	6.01225	0.041083
二次多项式检验 Quadratic	3	357.0286	119.0095	29.53471	0.001318
交叉乘积 Cross Product	3	58.68155	19.56052	4.854354	0.060793

由表 4 方差分析得知, 回归模型的 F -检验显著, 说明所拟合的二次回归方程合适。回归方程的一次项 F -检验(95.9%), 二次项(99.9%), 交互项(94%)。说明响应面分析所选 3 个因素的主效应显著, 而且各因素之间存在较大的相互作用。

由表 5 各因素的 F 检验可知, X_1 (麸皮秸秆比) 对产酶量影响最大, X_3 (初始 pH 值) 次之, X_2 (含

表 3 回归方程的标准差与决定系数分析

Table 3 Analysis of the standard deviation and the coefficient of determination of the regression equation

项目 Project	主模型 Master model
均值 Mean	49.86976
决定系数 R-square	96.04%
调整后的决定系数 Adj.R-square	88.91%
均方根 RMSE	2.007356

实验结果(图 3)显示, 绿色木霉在 pH 值为 5 到 6 之间获得最高值, 而在 pH 大于 7 时迅速下降。这可能与霉菌一般比较适合在酸性条件下生长有关, 而在碱性较强的条件下菌体生长受到严重抑制。

2.4 绿色木霉固体发酵条件响应面法优化

本实验运用 Box-Behken 设计的响应面实验, 综合单因素实验结果, 选取麸皮秸秆粉比、含水量和初始 pH 值为实验因素, 以产酶量为响应值设计了 3 因素 3 水平的响应面分析实验。实验结果(表 2)显示, 15 个实验点可分为 2 类, 第 1 类是析因点, 自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点, 共有 12 个析因点。第 2 类是零点, 为区域的中心点, 零点实验重复 3 次, 用以估计实验误差。

以产酶 (Y) 为响应值, 经回归拟合后, 各实验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$Y = -192.622 + 94.19217 \times X_1 + 2.993409 \times X_2 + 49.78308 \times X_3 - 23.33245 \times X_1 \times X_2 - 0.120579 \times X_1 \times X_2 - 4.5224 \times X_1 \times X_3 - 0.042963 \times X_2 \times X_3 - 0.111604 \times X_2 \times X_3 - 3.376722 \times X_3 \times X_3$$

如表 3 所示, 回归方程标准差 $S = 2.007356$, 决定系数 $R^2 = 0.9604$, 说明回归方程的拟合程度良好。

水量) 影响相对较小。而 X_1 、 X_3 存在较大的交互作用, 对产酶量也有很大的影响。最后的优化结果如表 6 所示。

图 4 中, 麸皮: 秸秆粉比值固定在中心点, 为 1.5:1。随着其他 2 个因素的变化, 产酶量取得了最大值, 说明这 2 个水平的取值是合理的。

结果表明, 经响应面优化后所获得的最适培养

基为：麸皮秸秆粉比 1.3682:1，加水量 25.0708 mL，初始 pH6.0410，优化获得了最大产酶量，酶活为 59.70986。对全变量二次回归模型进行规范形分析 (canonical analysis)，考察所拟合响应曲面的形状。从图 4—图 6 可以看出响应面的鞍点形状，说明初

始发酵培养基浓度在最优浓度区域。

图 5 中，含水量被固定在中心点，为 250%。随着其他 2 个因素的变化，产酶量取得了最大值，说明这 2 个水平的取值是合理的。

表 5 各因素的 F-检验

Table 5 F- test for each factor

方差来源 Source	自由度 DF	主模型 Master Model			
		方差 SS	均方 MS	F 值	Pr > F
X ₁	1	70.91255	70.91255	17.59844	0.008530
X ₂	1	0.021949	0.021949	0.005447	0.944027
X ₃	1	1.744216	1.744216	0.432864	0.539667
X ₁ ×X ₂	1	1.454374	1.454374	0.360934	0.574181
X ₁ ×X ₃	1	46.01723	46.01723	11.42014	0.019688
X ₂ ×X ₃	1	11.20995	11.20995	2.781985	0.156204

表 6 优化后的最佳条件及最大产酶量

Table 6 Optimal conditions and the maximum yield of enzyme

因子名 Factor name	代码值 Coded	原始值 Uncoded
X ₁	-0.26351	1.3682
X ₂	0.00708	25.0708
X ₃	0.02731	6.0410

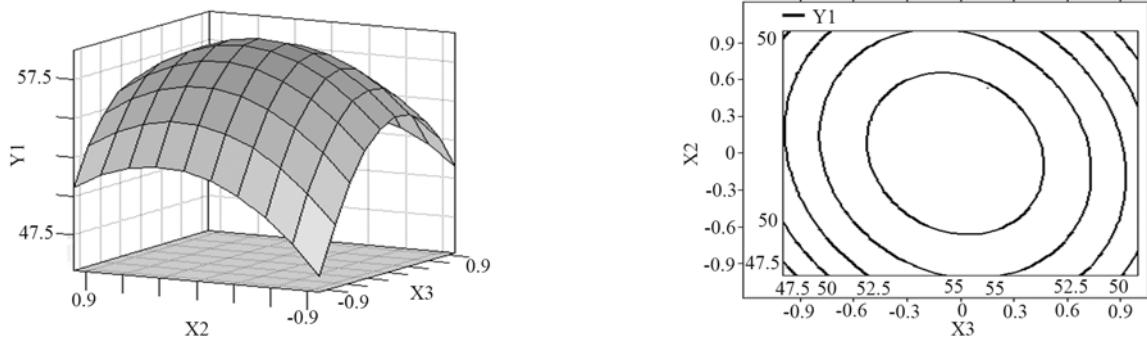


图 4 响应面和等高图(固定水平: 麸皮: 秸秆粉=1.5)

Figure 4 Response surface and contour map (fixed level: wheat bran straw powder =1.5)

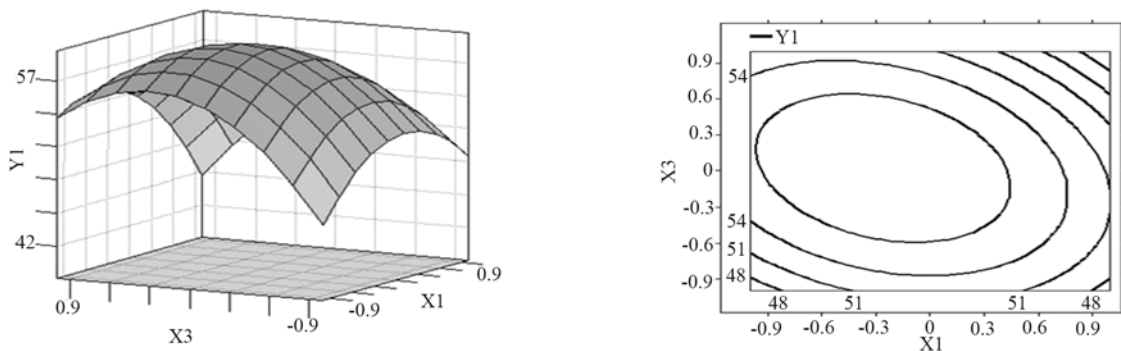


图 5 响应面和等高图(固定水平: 含水量=250%)

Figure 5 Response surface and contour map (fixed level: moisture content=250%)

图 6 中，初始 pH 值为 6，固定在中心点。随着其他 2 个因素的变化，产酶量取得了最大值，说

明这 2 个水平的取值是合理的。

在培养基进行优化后，采用最优化培养基进行

产酶时间曲线的研究, 以获得产酶最大的时间, 为工业生产提供指导。获得产酶时间曲线如图 7 所示。

如图 7 所示, 绿色木霉产酶的最高峰在 60 h 到

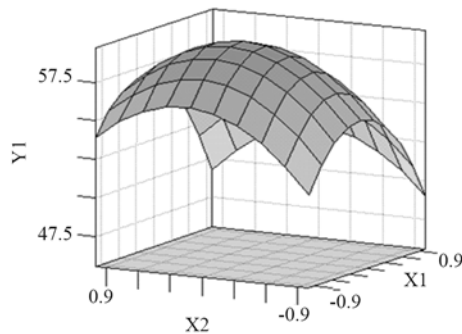


图 6 响应面和等高图(固定水平:初始 pH=6)

Figure 6 Response surface and contour map (fixed level: initial pH=6)

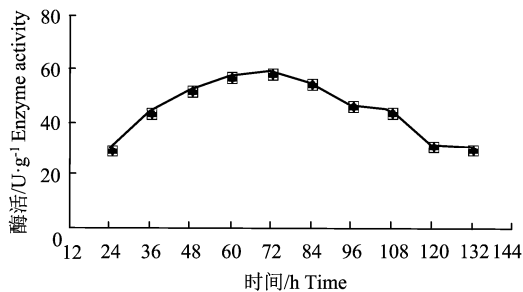


图 7 绿色木霉固体发酵生产纤维素酶产酶时间曲线

Figure 7 time curve of enzyme production by solid fermentation of *Trichoderma*

在培养过程中, 据观察在 48 h 后可见白色的菌丝, 培养基开始结块, 60 h 后可见培养基表面有绿色孢子出现, 而 120 h 后菌体和孢子数目有减少趋势, 可见纤维素酶的产生和微生物的生长基本呈同步趋势。

参考文献:

- [1] 王晓明, 孙玉辉, 张欢, 等. 绿色木霉固态发酵生产纤维素酶条件优化与酶的固定化[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(1): 186-193.
- [2] 陈莉. 绿色木霉固态发酵产纤维素酶条件研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(7): 2823-2825.

84 h 之间, 而在 108 h 后下降得很快, 可能是微生物的自溶导致了酶的降解。

- [3] 武金霞, 武建, 朱晓. 绿色木霉 JD-1 固态发酵玉米芯产纤维素酶条件优化[J]. 中国酿造, 2015, 34(34): 79-83
- [4] YANG Y H, WANG B C, WANG Q H, et al. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium[J]. Colloid Surface B, 2004, 34(1): 1-6.
- [5] 邢欢, 许文宗, 李婕, 等. 绿色木霉自絮凝产纤维素酶发酵条件的优化[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 228-231.
- [6] 张丽萍, 钱磊. 绿色木霉固态发酵产纤维素酶条件及酶性质的研究[J]. 河北省科学院学报, 2000, 17(2): 120-121.
- [7] 刘华. 绿色木霉固态发酵工艺及诱导条件研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(8): 174-177.
- [8] FERREIRA S L C, BRUNS R E, FERREIRA H S, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods[J]. Anal Chim Acta, 2007, 597(2): 179-186.
- [9] 常娟. 高效玉米秸秆生物饲料的研制及其在肉鸡生产中的应用研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [10] 唐洁, 姚开, 贾冬英, 等. 黑曲霉 TJ-1 降解赤霉酸的条件优化及其特性研究[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2012, 44(5): 184-189.
- [11] 张佩华, 王加启, 贺建华, 等. 青贮对饲料稻秸秆 DM 和 NDF 瘤胃降解特性的影响[J]. 草业科学, 2008, 25(6): 80-84.
- [12] YOON J J, KIM Y K. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*[J]. J Microbiol, 2005, 43(6): 487-492.