

用响应面法优化油茶籽壳发酵产羧甲基纤维素酶的条件

杨俊换, 郭华, 欧阳晶

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以羧甲基纤维素酶(Carboxymethyl cellulase enzyme, *CMCase*)的酶活力作为响应值, 用响应面法对康宁木霉利用油茶籽壳发酵产纤维素酶的发酵条件进行优化。在油茶籽壳预处理方法、氮源、起始 pH、发酵时间、接种量、营养液体积对 *CMCase* 酶活力单因素试验的基础上, 筛选出主要影响因素培养时间、起始 pH 和营养液体积进行正交试验, 通过 Box-Behnken 设计, 利用 Design Expert 软件进行回归分析, 得出 3 种因素的交互作用及最佳发酵条件。结果表明, 用碱法处理油茶籽壳较为适宜; 油茶籽壳发酵产纤维素酶的适宜氮源为 0.2%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 其他适宜条件为接种量 5%、初始 pH 5.8、营养液体积 22 mL、发酵时间 5 d。在此条件下, *CMCase* 的酶活力达 179.15 U/mL, 比单因素试验最高酶活力提高了 24.52%。

关 键 词: 油茶籽壳; 康宁木霉; 羧甲基纤维素酶; 响应面法

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)04-0416-05

Optimization for cellulase production by fermentation of camellia testa using response surface approach

YANG Jun-huan, GUO Hua, OUYANG Jing

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Fermentation conditions were optimized by taking Carboxymethyl cellulase enzyme (*CMCase*) activity as a response indicator for cellulase production from *Trichoderma koningii* using response surface method (RSM). Three factors that affecting *CMCase* activity were screened out among pretreatment methods of raw material, nitrogen sources, initial pH values, amount of inoculation, days of fermentation and volume of liquid, they were days of fermentation, initial pH values, and volume of liquid. The optimum conditions of fermentation and their interaction of the three factors were determined through Box-Behnken design and regression analysis using design expert software. The results showed that the *CMCase* activity could reach 179.15 U/mL, increased by 24.52% under the following conditions: pretreatment methods of raw material was alkaline treatment, nitrogen source was 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, initial pH value was 5.8, inoculation dosage was 5%, volume of liquid was 22 mL, and day of fermentation was 5 d.

Key words: camellia testa; *Trichoderma koningii*; Carboxymethyl cellulose (*CMCase*); response surface methodology

据国家粮油信息中心统计, 1990 年中国油茶籽产量为 52.3 万 t, 2012 年为 109.2 万 t, 累积增长了 108.8%, 平均年增长 5.4%^[1]。油茶籽壳的主要成分为木质素、纤维素与半纤维素。目前国内对油茶籽壳的利用仍处于研究阶段, 主要用来制备活性炭、木糖醇和糠醛等产品, 利用率较低。利用康宁木霉

发酵油茶籽壳产纤维素酶, 不仅可以缓解资源浪费与环境破坏问题, 还可以增加油茶籽壳利用的附加值, 生产的纤维素酶可以用于食品、农业和饲料等行业。利用响应面法^[2-4]优化黑曲霉发酵玉米秸秆粉, 滤纸酶活力最高达 59.432 U/g^[5]。利用响应面法优化黑曲霉产纤维素酶的发酵条件后, 纤维素酶

的酶活力提高了 34.4%^[6]。笔者研究利用康宁木霉发酵油茶籽壳产纤维素的优化条件,旨在为油茶籽壳的利用与纤维素酶的生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

康宁木霉由湖南农业大学食品科学与技术学院微生物实验室提供。油茶籽壳由湖南农业大学康奕达油茶产品研究中心提供。

PDA 培养基的配制:将马铃薯汁 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 25 g、水 1 L 充分混合,121 ℃灭菌 20 min。

初始产酶培养基的配制:将油茶籽壳 2.5 g、麸皮 0.5 g、发酵营养液 20 mL 置于 100 mL 锥形瓶中,121 ℃灭菌 20 min。其中,发酵营养液为(NH₄)₂SO₄ 2.0 g、KH₂PO₄ 1.0 g、MgSO₄ 0.5 g、FeSO₄ 0.05 g、MnSO₄ 0.016 g、ZnSO₄ 0.014 g、CoCl₂ 0.02 g、水 1 L 的混合溶液。

1.2 方 法

1.2.1 油茶籽壳预处理

油茶籽壳原料(简称 UTM):油茶籽壳经自然风干后粉碎,过孔径 0.45 cm 筛。

酸处理油茶籽壳(简称 ACM):将 UTM 用 0.5% 硫酸溶液浸泡 1 d,用清水洗涤至中性,于 70 ℃烘干,备用。

醇处理油茶籽壳(ALM):将 UTM 用 65%的乙醇溶液浸泡 2 h,用清水洗涤 3 次,于 70 ℃烘干备用。

碱处理油茶籽壳(ETM):将 UTM 用 2%的氢氧化钾溶液浸泡 1 d,用清水洗涤至中性,于 70 ℃烘干,备用。

1.2.2 康宁木霉产酶培养

将康宁木霉接种到 PDA 斜面培养基上,28 ℃培养 5 d 后,用 10 mL 无菌生理盐水在无菌条件下洗出其孢子。将孢子移入试管,混匀,经血球计数板镜检,待孢子浓度为 10⁷ 个/mL 时按 5% 接种量接入产酶培养基中,于 150 r/min、28 ℃条件下摇床培养 5 d。

1.2.3 粗酶液制备

初始产酶培养基接种发酵 5 d 后,于 50 ℃水浴恒

温振荡器中振摇 1 h。取适量的发酵液于 4 000 r/min 离心 15 min。离心后的上清液即为粗酶液。将粗酶液用 pH 4.8 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲溶液稀释到一定的倍数后,吸取 0.50 mL 测定酶活力。

1.2.4 羧甲基纤维素酶酶活力的测定

- 1) 用 3,5-二硝基水杨酸法绘制葡萄糖标准曲线。
- 2) 羧甲基纤维素酶(Carboxymethyl cellulase enzyme, CMCase)的酶活力测定:于干净试管中分别加入 1%的 CMCase (0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠,缓冲液, pH 4.8) 1.5 mL 和 0.50 mL 酶液,50 ℃准确保温 30 min,沸水浴灭活,取出加入 3.0 mL DNS 试剂,煮沸 7 min,冷却后加蒸馏水 10 mL,摇匀静置 10 min,于波长 540 nm 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^[7]。以灭活的酶液作为对照。在上述条件下,1 min 内由水解底物生成 1 μg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)^[8]。每组数据均平行测定 3 次。

1.3 单因素试验

以发酵培养基为基础,以发酵液中 CMCase 的酶活力为指标,针对培养基中的油茶籽壳预处理方法(UTM、ACM、ALM、ETM)、氮源(0.2%的(NH₄)₂SO₄、0.2%的(NH₄)₃PO₄、尿素、蛋白胨、酵母膏)、初始 pH(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、发酵时间(1、2、3、4、5、6、7、8 d)、接种量(5%、10%、15%、20%、25%)、营养液体积(12、18、24、30、36 mL)进行单因素试验。

1.4 响应面优化试验设计

通过单因素试验,确定响应面法试验设计的因素和水平,选取 3 个主要影响因子为自变量,即针对发酵时间(A)、初始 pH(B)、营养液体积(C)3 个因素,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,以发酵液中粗酶液 CMCase 的酶活力为响应值,设计 3 因素 3 水平 17 个试验点的响应面试验,其中零点试验重复 5 次,以估计误差。中心组合试验方案中的因素及水平如表 1 所示。

表 1 中心组合试验设计方案中的因素及水平

Table 1 Factors and levels used in the Box-Behnken design

水平	因素		
	A(发酵时间/d)	B(初始 pH)	C(营养液体积/mL)
-1	4	5	18
0	5	6	24
1	6	7	30

1.5 验证试验

根据前面试验所得到的最佳发酵产酶条件进行试验,将优化试验所得到的 *CMCase* 酶活力与发酵条件进行拟合,以验证模型的可靠性。

1.6 数据分析

利用统计软件 Design-Expert 7.1.6 进行回归分析,建立 *CMCase* 活力关于发酵条件的回归模型。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖标准曲线

以葡萄糖含量为横坐标(x),以 OD 为纵坐标(y),

绘制葡萄糖标准曲线,其方程 $y=0.431\ 3x-0.004\ 6$, $R^2=0.999\ 6$ 。曲线可信度较高,可以应用。

2.2 单因素试验结果与分析

2.2.1 油茶籽壳预处理方式的选取

由表 2 可见,各预处理方式对 *CMCase* 酶活力的影响较大,碱处理、醇处理、酸处理油茶籽壳的 *CMCase* 酶活力依次减小,未处理油茶籽壳的 *CMCase* 酶活力最低。考虑到碱处理油茶籽壳的成本比较低,而其发酵产 *CMCase* 的酶活力较高,故选择碱处理作为油茶籽壳的预处理方式。

表 2 康宁木霉产 *CMCase* 的酶活力单因素试验结果

Table 2 Results of the single factor experiment for <i>CMCase</i> activity using <i>Trichoderma koningii</i>							
因素	预处理方式	氮源	初始 pH	发酵时间/d	接种量/%	营养液体积/mL	酶活力/(U·mL ⁻¹)
预处理方式	UTM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	69.03
	ALM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	122.10
	ACM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	85.59
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	140.71
氮源	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	123.53
	ETM	(NH ₄) ₃ PO ₄	5	5	5	20	97.38
	ETM	酵母膏	5	5	5	20	37.88
	ETM	尿素	5	5	5	20	14.94
	ETM	蛋白胨	5	5	5	20	69.31
初始 pH	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	4	5	5	20	107.35
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	120.26
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	6	5	5	20	142.54
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	7	5	5	20	132.28
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	8	5	5	20	130.20
发酵时间	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	3	5	20	80.15
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	4	5	20	123.89
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	142.87
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	6	5	20	96.13
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	7	5	20	75.14
接种量	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	20	145.10
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	10	20	123.24
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	15	20	116.75
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	20	20	106.97
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	25	20	80.22
营养液体积	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	12	51.38
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	18	100.09
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	24	143.70
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	30	136.64
	ETM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	5	5	36	112.40

2.2.2 适宜氮源的选取

由表 2 可见,康宁木霉可以利用多种氮源,氮源种类对 *CMCase* 酶活力有较大影响,硫酸铵、磷酸铵等无机氮源比有机氮源发酵油茶籽壳产 *CMCase* 的酶活力高。虽然氮源并不能作为诱导纤维素酶的诱导物,但对菌体的迅速增长有很重要的作用,对产酶影

响较大。利用无机氮源发酵油茶籽壳的成本较低,酶活力较高,故选择硫酸铵作为发酵氮源。

2.2.3 适宜初始 pH 的选取

由表 2 可见,发酵培养基初始 pH 为 4.0~6.0,随 pH 升高,发酵 *CMCase* 的酶活力明显增加,pH 为 6.0 时达到最高,随后随 pH 升高,酶活力呈下降

趋势。产 *CMCase* 发酵培养基适宜的起始 pH 为 6.0，自然 pH。

2.2.4 适宜发酵时间的选取

由表 2 可见，发酵时间对 *CMCase* 的酶活力影响较大，发酵时间为 1~5 d 时，随发酵时间的延长 *CMCase* 的酶活力明显增加，在发酵 5 d 时达到最高，*CMCase* 的酶活力为 142.87 U/mL；随后随发酵时间的增加，*CMCase* 的酶活力下降，故认为 5 d 为适宜发酵时间。

2.2.5 适宜接种量的选取

由表 2 可见，随着接种量的增加，*CMCase* 的酶活力呈降低趋势。发酵培养基中含氧量与营养物质是一定的，接种量越多，则孢子生长竞争越大，导致 *CMCase* 的酶活力降低；接种量越小，则导致进入对数期的时间延长，发酵周期长，故认为适宜接种量为 5%。

2.2.6 适宜装样量的选取

由表 2 可见，随着营养液体积的增加，*CMCase* 的酶活力先增加后减小。营养液体积为 12~24 mL 时，营养物质的增加促进康宁木霉的生长，酶活力增加，在营养液体积为 24 mL 时，*CMCase* 的酶活力达 143.70 U/mL；营养液体积进一步增加，接触氧气的液面减少，发酵受到抑制，*CMCase* 的酶活力降低，故认为适宜营养液体积为 24 mL。

2.3 发酵条件优化结果

2.3.1 回归模型的建立及分析结果

对表 3 中数据进行回归分析，得方程 $y = 11.1x_1 - 5.505x_2 - 22.4775x_3 - 18.2225x_1x_2 + 21.6775x_1x_3 + 16.9075x_2x_3 - 36.8343x_1^2 - 29.5243x_2^2 - 30.9493x_3^2$ 。式中： y 为 *CMCase* 的酶活力(U/mL)， x_1 为发酵时间， x_2 为初始 pH， x_3 为营养液体积。对上述回归方程进行检验，模型的校正决定系数为 0.9978，说明此模型能解释 99.78% 响应值的变化，即此模型与数据拟合度很高，试验误差小。对方程系数进行方差分析，模型的一次项、二次项交互影响显著，各影响因素对 *CMCase* 酶活力的影响不是简单的线性关系，其影响从大到小依次为营养液体积、发酵时间、初始 pH。对该模型进行方差分析和对模型系数进行显著性检验的结果表明，回归模型极显著 ($P < 0.01$)，说明建立的模型有意义；模型失拟项之间的

差异无统计学意义 ($P = 0.0569 > 0.05$)，说明模型拟合度良好，可用此模型和方程来分析和预测发酵油茶籽壳产 *CMCase* 的酶活力大小。

表 3 中心组合试验设计方案及 *CMCase* 酶活力响应值

Table 3 Scheme of Box - Behnken design and response values of *CMCase* activity

编号	发酵时间/d	初始 pH	营养液体积/mL	<i>CMCase</i> 酶活力/(U·mL ⁻¹)
1	5	5	30	78.37
2	5	7	30	101.68
3	5	6	24	174.24
4	6	6	18	115.75
5	5	6	24	171.94
6	5	6	24	174.23
7	4	7	24	107.39
8	5	6	24	174.47
9	6	5	24	143.79
10	5	5	18	158.64
11	4	6	30	52.78
12	5	7	18	114.32
13	4	5	24	82.46
14	6	7	24	95.83
15	6	6	30	115.65
16	5	6	24	173.75
17	4	6	18	139.59

2.3.2 响应面分析结果

由响应面分析结果(图 1~3)可见，在营养液体积一定时，随着发酵时间与初始 pH 增加，发酵液中 *CMCase* 的酶活力先增加后减小；在初始 pH 一定时，随着发酵时间与营养液体积增加，发酵液中 *CMCase* 的酶活力先增加后减小；在发酵时间一定时，随着 pH 与营养液体积的增加，发酵液中 *CMCase* 的酶活力先增加后减小。利用 Design-Expert 7.1.6 进行优化处理，得到使得 *CMCase* 酶活力最大的发酵条件为培养时间 5.09 d、初始 pH 5.77、营养液体积 21.63 mL。*CMCase* 酶活力最大预测值为 179.324 U/mL。

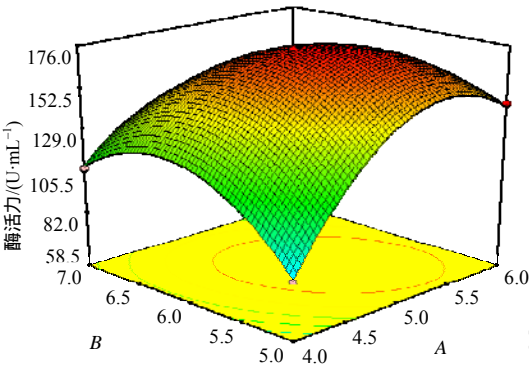


图 1 培养时间(A)与初始 pH(B)对 *CMCase* 酶活力影响的响应面分析结果

Fig.1 Chart of response surface on the effects of days of fermentation and initial pH values on *CMCase* activity

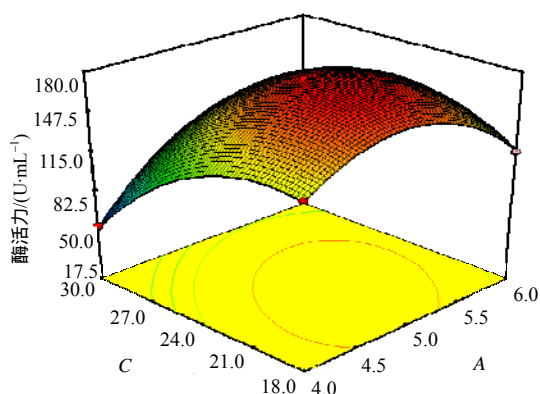


图 2 培养时间(A)与营养液体积(C)对 *CMCase* 酶活力影响的响应面分析结果

Fig.2 Chart of response surface on the effects of days of fermentation and volume of liquid on *CMCase* activity

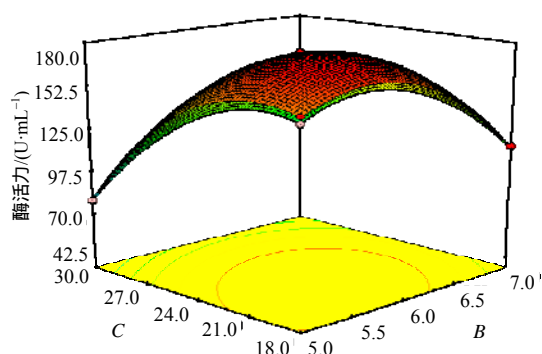


图 3 初始 pH(B)与营养液体积(C)对 *CMCase* 酶活力影响的响应面分析结果

Fig.3 Chart of response surface on the effects of initial pH value and volume of liquid on *CMCase* activity

2.3.3 验证试验

根据单因素试验与响应面试验得到的结果,考虑到试验的可操作性,在如下条件下进行用油茶籽壳发酵产纤维素酶的验证试验:原料预处理采用碱处理法,氮源采用 0.2%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,接种量为 5%,初始 pH 为 5.8,营养液体积为 22 mL,发酵时间为 5 d。5 组验证试验发酵液的平均 *CMCase* 酶活力为 179.15 U/mL,预测值与试验值之间具有良好的拟合性,表明模型有效、可靠。

3 结论与讨论

根据本研究结果,经综合考虑,认为油茶籽壳发酵产纤维素酶的适宜条件为:油茶籽壳预处理采用碱处理方法,以 0.2%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源,种子液接种量为 5%,初始 pH 为 5.8,营养液体积为 22 mL,发酵时间为 5 d。优化条件下 *CMCase* 的酶活力为 179.15 U/mL,比单因素试验最高酶活力提高了 24.52%。

国内外学者多以里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)和青霉(*Penicillium* sp.)作为菌株,以酒糟、稻草、玉米秸秆等为碳源生产纤维素酶^[9-11],如王菁莎^[10]等利用康宁木霉固态发酵稻草粉,滤纸酶活力为 172.3 U/mL;武香玉^[11]等采用固态发酵酒糟的方法生产纤维素酶,其 *CMCase* 的酶活力为 7 105.92 U/g。本研究中采用纤维素酶高产菌种康宁木霉发酵油茶籽壳,产出的纤维素酶的酶活力虽然比利用稻草、酒糟等的低,但其可为油茶籽壳的综合利用提供参考。目前,中国的纤维素酶工业仍处于研究、开发阶段,全国仅有少数几家工厂在小批量试产,产品供不应求,因此,利用油茶籽壳液体发酵生产纤维素酶具有广阔的开发前景。

参考文献:

- [1] 王瑞元. 中国食用植物油加工业的现状 & 今后的发展趋势[R]. 第十四届国际谷物科技与面包大会暨国际油料与油脂科技发展论坛. 北京: 中国粮油学会, 2012: 16-19.
- [2] 栾庆祥, 赵杨, 周欣, 等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 859-865.
- [3] 胡成旭, 侯欣彤, 冯永宁, 等. 响应面法优化云芝多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(7): 124-130.
- [4] Majumder A, Bhandari S, Purama R K, et al. Enhanced production of a novel dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 by response surface methodology[J]. Ann Microbiol, 2009, 59(2): 309-315.
- [5] 张辉, 桑青. 响应面法优化黑曲霉 HQ-1 产纤维素酶固体发酵条件[J]. 中国酿造, 2011(7): 17-21.
- [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]. 食品科学, 2009, 30(23): 335-339.
- [7] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 206-207.
- [8] 田慧, 肖启明, 谭周进, 等. 纤维素分解菌的分离及腐解稻草的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(1): 49-52.
- [9] Fang H, Zhao C, Song X. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02[J]. Bioresource Technol, 2010, 101(11): 4111-4119.
- [10] 王菁莎, 王颖, 刘景彬. 康宁木霉固态发酵秸秆生产纤维素酶的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2005, 13(4): 26-31.
- [11] 武香玉, 陈存社, 张京, 等. 绿色木霉固态发酵生产纤维素酶的研究[J]. 中国酿造, 2010(5): 93-95.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库