

黑曲霉产木聚糖酶发酵条件的正交设计试验*

孙 迅 高庆义 毕瑞明

(山东菏泽高等师范专科学校生物系 菏泽 274015)

陈 新 爱

(山东菏泽造纸厂 菏泽 274016)

摘要: 通过正交设计试验,优化了黑曲霉(*Aspergillus niger* m12)产胞外木聚糖酶的液体发酵条件,合适的产酶培养基含麦草粉 3g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3g, KH_2PO_4 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, NaCl 0.03g, Tween 80 0.3g, 酵母膏 0.1g, 微量元素(B, Zn, Mn, Fe, Mo)定容 1L; 接种量为 1.0×10^7 个孢子 / 50mL 培养基, 28℃, 120r/min, 振荡培养 5d, 木聚糖酶活力达 34.47u/mL。

* 山东省科委资助项目(No.971164805)

收稿日期:1998-12-16, 修回日期:1999-01-21

关键词: 木聚糖酶, 黑曲霉 m12, 发酵, 正交试验

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)02-0108-05

AN ORTHOGONAL EXPERIMENT IN THE XYLANASE FERMENTATION OF *ASPERGILLUS NIGER*

SUN Xun GAO Qing-Yi BI Rui-Ming

(Biology Department of Heze Teacher's College, Heze 274015)

CHEN Xin-Ai

(Heze Paper Mill, Heze 274016)

Abstract: Through orthogonal experiment, the optimal condition was given for producing extracellular xylanases of *Aspergillus niger* m12. The suitable medium contained 3% wheat-straw powder, 0.3%(NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.03% NaCl, 0.3% Tween 80, 0.1% yeast extract, and trace elements (B, Zn, Mn, Fe and Mo). 1.0×10^7 spores were inoculated into 50mL medium in 250mL Erlenmeyer Flask in a water rocker (120r/min, 28℃) which stirred for 5.5 days. The xylanase activity of culture filtrate of m12 was 34.47u/mL.

Key words: Xylanases, *Aspergillus niger* m12, Fermentation, Orthogonal experiment

我国木材资源较为缺乏,非木材纤维原料(如麦草等)在造纸工业中占有很大比例。传统的造纸制浆工艺是利用烧碱等试剂蒸煮麦草原料,再利用次氯酸盐等漂剂漂白化学浆。由于化学制浆过程排放出大量的蒸煮黑液,漂白废水中又含有大量的致癌及剧毒氯化有机物,故造纸废水污染十分严重。不断改造制浆工艺是造纸企业发展的长久之计,而酶法制浆工艺技术的研究是革新传统制浆工艺的一个重要研究方面。木聚糖酶是一类重要的半纤维素酶,在造纸工业中可用来预漂纸浆,提高木素溶出率,减少 Cl₂ 和 ClO₂ 用量,并可改善纸张特性^[1~3],故开发和研制木聚糖酶制剂的研究工作已倍受关注。国内、外在木聚糖酶的研究方面曾做了不少工作^[4,5],但木聚糖酶作为一种工业酶制剂在我国尚属空白。本文以富含半纤维素的廉价基质麦草粉为营养碳源,对黑曲霉产胞外木聚糖酶的液体发酵条件进行正交设计试验,并对多个因素进行优化处理,为木聚糖酶制剂的研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养方法

黑曲霉 (*A. niger* m12) 系作者自土壤中分离,并经初步鉴定和命名。菌种保藏和孢子产生培养基均为 PDA 培养基。

制备孢子悬液,使浓度为 2.5×10^7 个孢子/mL。接种一定量的孢子于已灭菌的盛有 50mL 培养基的 250mL 锥形瓶中[培养基无机盐液(%): KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, NaCl 0.03, 微量元素(B, Zn, Mn, Fe, Mo)],在往复式恒温水浴振荡器中培养(28℃, 120r/min)。离心发酵液(3000r/min, 15min),上清液即为粗酶液。

1.2 测定方法

1.2.1 木聚糖酶活力测定:按有关文献^[6,7]所述方法进行(略作改动)。取 0.5% 燕麦木聚糖(由 50mmol/L, pH4.5 醋酸缓冲液配制)0.9mL,加入 0.1mL 适当稀释的酶液,在 55℃ 水浴振荡器中保温 30min,加入 3mL DNS 试剂^[8]终止反应;在沸水中煮 15min,冷却;加蒸馏水至 25mL,混匀,用 723 型可见分光光度计(上海分析仪器三

厂)于 550nm 处比色。用煮沸 15min 的酶液作比色对照。酶活力单位定义为每 min 水解木聚糖生成 1μmol 木糖所需的酶量。

1.2.2 纤维素酶(CMCase)活力测定:用羧甲基纤维素钠代替木聚糖,其余操作同木聚糖酶活力测定。

1.3 试剂

燕麦木聚糖(oat spelt xylan)为美国 Sigma

公司产品,3,5-二硝基水杨酸由中国上海亚太医药工业研究所生产,其余试剂为分析纯(A.R.)和化学纯(C.P.)。

2 结果与讨论

2.1 制定因素、水平表

根据预备试验,选定 7 个重要的影响因素,制定因素水平表(表 1)。

表1 因素、水平表

水平	A 麦草粉* (%)	B C:N (m:m)	C 酵母膏 (%)	D 乳糖 (%)	E Tween 80 (%)	F 接种量 (孢子数/50mL)	G 发酵天数 (d)
1	3.0	10:1	0.1	0	0.30	0.5×10 ⁷	4.0
2	4.0	7:1	0.3	0.15	0.15	1.0×10 ⁷	5.5
3	5.0	4:1	0.5	0.30	0	2.0×10 ⁷	7.0

* 过60目筛

2.2 正交试验结果

根据正交表 L₁₈(3⁷),做正交试验,结果见表 2。

表2 正交试验结果

实验号	列 号							酶活力 (u/mL)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	30.20
2	1	2	2	2	2	2	2	30.86
3	1	3	3	3	3	3	3	20.87
4	2	1	1	2	2	3	3	31.53
5	2	2	2	3	3	1	1	14.43
6	2	3	3	1	1	2	2	31.97
7	3	1	2	1	3	2	3	27.75
8	3	2	3	2	1	3	1	18.21
9	3	3	1	3	2	1	2	24.20
10	1	1	3	3	2	2	1	23.98
11	1	2	1	1	3	3	2	31.08
12	1	3	2	2	1	1	3	28.86
13	2	1	2	3	1	3	2	25.31
14	2	2	3	1	2	1	3	21.31
15	2	3	1	2	3	2	1	15.54
16	3	1	3	2	3	1	2	26.64
17	3	2	1	3	1	2	3	29.75
18	3	3	2	1	2	3	1	12.43
K ₁	165.85	165.41	162.30	154.74	164.30	145.64	114.79	Σ=444.92
K ₂	140.09	145.64	139.64	151.64	144.31	159.85	170.06	
K ₃	138.98	133.87	142.98	138.54	136.31	139.43	160.07	
k ₁	27.64	27.57	27.05	25.79	27.38	24.27	19.13	
k ₂	23.35	24.27	23.27	25.27	24.05	26.64	28.34	
k ₃	23.16	22.31	23.83	23.09	22.72	23.24	26.68	
R	4.48	5.26	3.78	2.70	4.66	3.40	9.21	

2.3 结果

2.3.1 影响产酶能力的因素分析: 由表 2 极差 R 值可以看出, 7 种因素影响黑曲霉 m12 产胞外木聚糖酶能力的主次顺序为 $G > B > E > A > C > F > D$, 其中, 因素 G 即培养时间的影响最大, 由趋势图(图 1)可看出, 产酶量在 5.5d 即达到最高值。其次是因素 B, 当 C:N 比分别为 10:1、7:1 和 4:1 时, 酶产量呈依次下降趋势, 说明类晶体状态的麦草粉只含有少量的易为菌体利用的碳源, 故在菌体生长及合成酶蛋白时, 所需氮源的量也相应较少。因素 E, 即 Tween 80 的影响也较明显, 在本试验条件下, 当其含量为 0.3% 时, 酶产量最高; 一般认为, 该化合物作为

一种表面活性剂, 可提高细胞膜的通透性, 进而影响某些蛋白质的分泌^[4]。当麦草粉浓度(因素 A)为 3% 时, 酶产量最高, 说明较高浓度的麦草粉(如当浓度大于 3% 时)反而不利于酶的产生, 原因很可能是高浓度的麦草粉使培养基过于粘稠, 溶解氧少, 不利于菌体呼吸作用所致。由趋势图可以看出, 培养基中添加 0.1% 酵母膏, 黑曲霉 m12 产木聚糖酶量最高, 说明较高浓度(如大于 0.3% 时)酵母膏中的营养成分(如单糖类等)不利于木聚糖酶的产生。试验表明, 每 50mL 培养基接种 1.0×10^7 个孢子较为合适(因素 F)。乳糖(因素 D)作为一种有利于木聚糖酶形成的诱导剂在某些霉菌中已被证实^[4], 但本

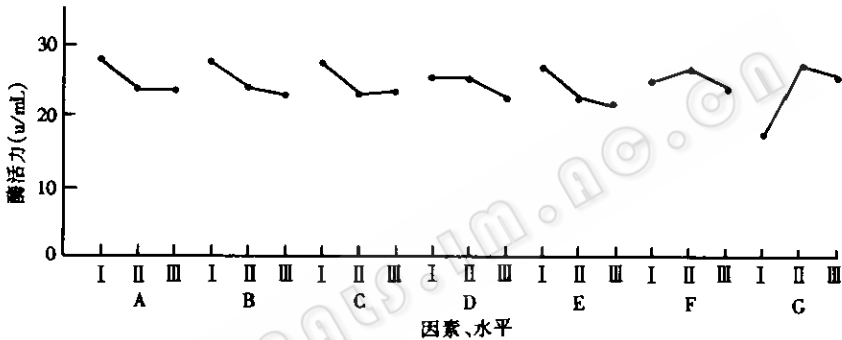


图1 因素、水平与酶活力的关系(趋势图)

试验表明, 该双糖对黑曲霉 m12 无诱导作用。

2.3.2 培养条件的进一步优化处理: 分析趋势见图 1, $A_1B_1C_1D_1E_1F_2G_2$ 为优势组合, 其中, F、G 已取得最佳值; ABC 等因素仍需进一步优化, 为此, 在 $D_1E_1F_2G_2$ 为最优条件的基础上, 再设计一个 3 因素 3 水平的正交试验(表 3)。

表3 因素、水平表

水平	A' 麦草粉 (%)	B' C:N (m:n)	C' 酵母膏 (%)
1	1.5	10:1	0
2	2.0	13:1	0.10
3	2.5	16:1	0.20

根据正交表 $L_9(3^4)$, 作正交试验(结果略)。由正交试验结果及趋势图(图 2)知, $A_3B_1C_2$ 为优势组合, 其酶活力最高, 达 34.37u/mL。综合考虑培养基成本及多因素对酶活力影响的程度,

优化后的发酵条件为: $A_3B_1C_2D_1E_1F_2G_2$, 即适合黑曲霉 m12 产木聚糖酶的液体发酵条件为: 培养基含麦草粉 3g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3g, KH_2PO_4 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, NaCl 0.03g, Tween 80 0.3g, 微量元素(B、Zn、Mn、Fe、Mo)定容 1L, pH 自然; 接种量为 1.0×10^7 个孢子/50mL 培养基; 28℃, 培养(120r/min)5.5d。

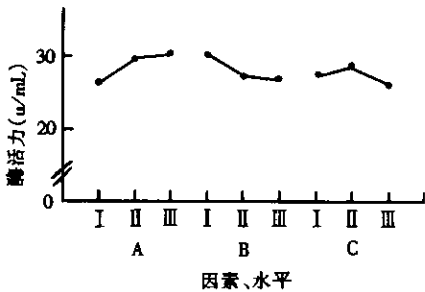


图2 因素、水平与酶活力的关系(趋势图)

CMCase 活力, 其活力约相当于木聚糖酶的 12%, 这显然不利于酶法制浆纤维得率的提高; 又由于自然界中纤维素总是与半纤维素联结在一起^[9], 麦草粉类基质在诱导木聚糖酶生成的同时, 也往往诱导纤维素酶的产生, 故从酶法制浆角度开展纤维素酶抑制剂的研究工作是十分必要的。

参 考 文 献

- [1] Anna Suurnakki, Thomas A. Clark, Robert W. Tappi Journal. 1996, 79(7):111~117.
- [2] Pratima Bajpai, Pramod K. Baipai. Tappi Journal. 1996, 79(4):225~230.
- [3] Jean-Claude Pommier, Jean-Luc Fuentes, Gerard Goma. Tappi Journal. 1989, June, 187~191.
- [4] Dietmar Haltrich, Bernd Nidetzky, Klaus D. Kulbe, et al. Bioresource Technology. 1996, 58:137~161.
- [5] 陈惠忠, 高培基, 王祖农. 微生物学报. 1990, 30(5): 351~357.
- [6] Sridevi Rajaram, Ajit Varma. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34:141~144.
- [7] Laura P. Wendicuti Castro, Blanca A. FEMS Microbiology Letters. 1997, 146:97~102.
- [8] Gail Lorenz Miller. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426~428.
- [9] A. H. Bahkali. Bioresource Technology. 1996, 57: 265~268.