

# 响应面法优化黑曲霉产单宁酶的固体发酵条件

保玉心<sup>1</sup>, 邱树毅<sup>2</sup>

(1. 遵义医学院, 贵州遵义 563000) (2. 贵州大学发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州贵阳 550025)

**摘要:** 通过固体发酵培养基单因素研究, 确定了三个影响单宁酶产率的关键因素, 对氮源用量、五倍子用量、培养温度采用响应面法的中心旋转实验设计原理, 进行三因素三水平的响应面分析, 以获得最佳产单宁酶的培养基及培养条件组成。结果表明, 固体发酵黑曲霉最佳产酶条件为: 五倍子含量为 9%; 氮源添加量为 2.3%; 温度为 32 °C。在此条件下进行发酵产酶重复实验, 酶活力为 219.4 U/mL。

**关键词:** 单宁酶; 固体发酵; 响应面法; 优化

文章编号: 1673-9078(2012)8-986-989

## Optimization of the Solid State Fermentation Conditions for Tannase

### Production by *Aspergillus niger* using Response Surface Method

BAO Yu-xin<sup>1</sup>, QIU Shu-yi<sup>2</sup>

(1. Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

(2. Fermentation Engineering and Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** To obtain the best producing tannase medium and culture conditions, three key factors influencing the tannase production in solid fermentation were determined by single factor experiment and then response surface methods were applied. Results showed that the optimum conditions for the solid fermentation by *Aspergillus niger* were: gallnut content 9%; nitrogen source 2.3% and temperature 32 °C, under which the enzyme activity was 219.4 U/mL.

**Key word:** tannase; solid state fermentation; response surface methodology; optimization

单宁酶 (Tannase EC 3.1.1.20) 全称单宁酰基水解酶 (Tannin Acyl Hydrolase) 是一种细胞膜结合酶, 可水解没食子酸单宁中的酯键和缩酚键生成没食子酸和葡萄糖<sup>[1]</sup>。产单宁酶的真菌主要分布于曲霉属、青霉属、根霉属及毛霉属, 而研究得较多较深入的是黑曲霉<sup>[2]</sup>。单宁酶用途广泛, 应用于食品工业, 利用单宁酶防止茶饮料中的“冷后浑”<sup>[3]</sup>, 效果非常好。应用于红茶、绿茶、乌龙茶深加工中, 提高茶叶品质、产量<sup>[4]</sup>。还可用于皮革工业、饲料工业等等。但是由于生产提纯过程复杂、产量很小所以市场价格昂贵。单宁酶属于诱导酶, 主要利用微生物发酵生产, 国内对单宁酶发酵生产主要以液体发酵研究为主。Lekha和Lonsne<sup>[5]</sup>对黑曲霉DKL104进行液体发酵和固体发酵比较实验, 结果固体发酵黑曲霉所产的单宁酶几乎全部都是胞外酶, 且比液体发酵缩短大半黑曲霉培养的时间, 酶产量可提高2倍左右, 固体发酵方法有较多的优越性。

国外有一些研究针对固体发酵产单宁酶, 如 Sabu

等利用罗望子果实棕榈果仁作为培养基基础, 进行固体发酵黑曲霉产单宁酶的研究<sup>[6]</sup>。Trevino-Cueto等用沙漠植物作为培养基其中富含单宁酸, 对黑曲霉进行固体发酵研究, 所得到的酶活力为 9.2 U/g 干基<sup>[7]</sup>。本实验利用五倍子作为诱导物对黑曲霉固体发酵产单宁酶进行研究, 在对发酵培养基进行了单因素研究<sup>[8]</sup>基础上, 用响应面法对关键影响单宁酶产率的几个因素进行发酵条件的优化, 以得到高的单宁酶活力。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

菌种: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 贵州大学生命科学院提供, 菌种保存在马铃薯葡萄糖琼脂斜面培养基上在 4 °C 条件下, 发酵试验菌株为 B-0201;

试剂: PG 没食子酸丙酯: 湖南省张家界贸源化工有限公司; Rhodanine 绕单宁: 上海君创化工有限公司; 五倍子: 贵州省遵义市余庆县。

仪器: 岛津 UV2550 紫外可见分光光度计; 微生物恒温培养箱。

### 1.2 固体发酵方法

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: 贵州省科技厅工业攻关项目 (黔科合 GY 字 (2009) 3022)

作者简介: 保玉心 (1979-), 女, 讲师, 主要从事应用微生物研究

称取 5 g 五倍子和麸皮混合物置于 250 mL 三角瓶中，然后加入 0.1% (m/V) 的无机盐溶液 5 mL，用玻璃棒将混合物搅拌均匀，120 °C 灭菌 20 min，冷却后接种 1 mL 孢子悬液 (11×10<sup>9</sup> 个/mL)，混匀后置于培养箱中 30 °C 静置培养 96 h。

### 1.3 粗酶液提取

培养 96 h 时取出三角瓶，在其中加入 50 mL pH 5.0 的柠檬酸缓冲液，30 °C 条件下 180 r/min 振荡浸提 1 h 使其充分溶解在缓冲液中，后用定性滤纸过滤即得粗酶液。

### 1.4 酶活检测方法

将 30 °C 条件下每分钟产生 1 μmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活单位。采用保玉心<sup>[9]</sup>的酶活力检测方法检测酶活。

### 1.5 固体发酵条件优化

根据单因素实验，知道对酶活力影响最明显的因素主要是氮源，诱导物五倍子的添加量以及培养温度。为了得到最佳发酵培养基组成、发酵条件及了解各因素之间的交互作用，采用响应面法的中心旋转实验设计原理，选取对酶活力影响最大的氮源用量，五倍子用量，培养温度三个因素，采用三因素三水平的响应面法对培养条件进行进一步优化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养温度的影响

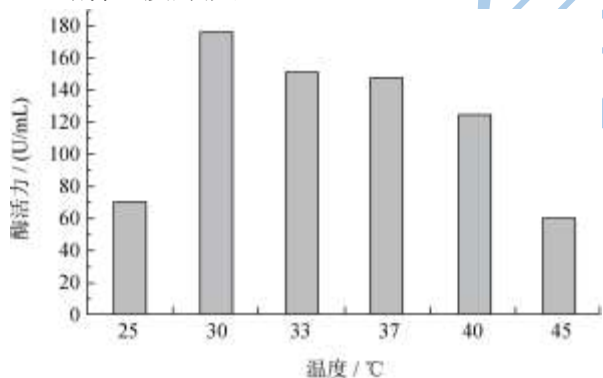


图 1 不同培养温度对产酶的影响

Fig.1 Effect of culture temperature on the enzyme activity

温度对产单宁酶酶活的影响主要表现于在菌丝生长过程，代谢途径中对酶活性的影响。结果可见图 1，在培养温度 30~37 °C 条件下黑曲霉菌株产出的单宁酶活力都较高，且当温度控制为 30 °C 时，酶活力最大，可达 176.2 U/mL。而温度过低或过高，酶活都会受到不同程度的抑制。调节培养温度到 45 °C 的时候，酶活性十分低，究其原因可能是由于酶在生长代谢过程中受到高温影响从而变性失活所致。因此 30 °C 是黑曲霉菌株产单宁酶的最适温度。

### 2.2 不同氮源含量对产酶的影响

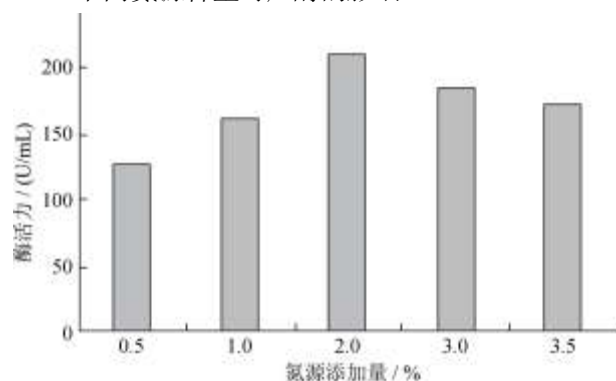


图 2 各种不同氮源对产酶的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on the enzyme activity

选用不同含量 NH<sub>4</sub>Cl 作为氮源加入基础培养基中，结果见图 2，从图上我们可以看出氮源添加量为 2% 时酶活可达到最高 208 U/mL，然而随着氮源量的不断增加，酶活力反而呈现一个下降趋势。

### 2.3 不同含量五倍子对产酶的影响

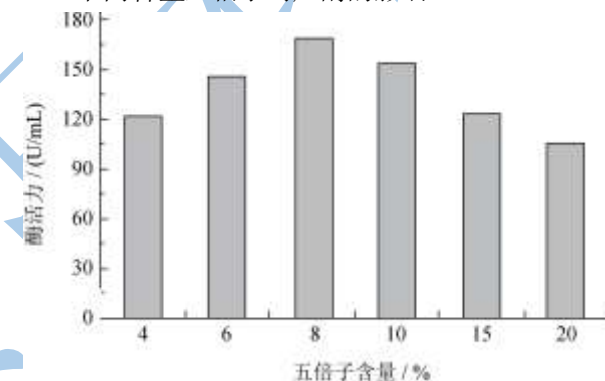


图 3 不同含量的五倍子对产酶的影响

Fig.3 Effect of gallnut contents on the enzyme activity

由于五倍子含有丰富的单宁酸，且黑曲霉产单宁酶的过程需要诱导，因此用五倍子粉作为诱导物对酶活提高具有明显作用，于是本实验研究了不同含量的五倍子诱导对产酶酶活的影响。结果如图 3。发现当五倍子添加量为 8% 时酶活可以达到最高，但是随着五倍子添加量的增加酶的活力反而不断下降，分析其原因可能是由于五倍子含量的增加，导致单宁酸含量累积增加，从而致使培养基中 pH 值减小，抑制了单宁酶的产生和酶活。

### 2.4 响应面法优化的结果

表 1 响应面因素水平编码

Table 1 Response surface factors and levels

水平	X <sub>1</sub> (五倍子含量/%)	X <sub>2</sub> (氮源添加量/%)	X <sub>3</sub> (温度/°C)
-1	6	1	25
0	8	2	30
1	10	3	35

表 2 响应面试验结果分析

**Table 2 Analysis of response surface methodology**

序号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y 酶活/(U/mL)
1	8.00	2.00	30.00	207.1
2	10.00	1.00	35.00	169.7
3	6.00	3.00	35.00	145
4	8.00	2.00	30.00	221.9
5	6.00	1.00	25.00	95.26
6	6.00	3.00	25.00	144.22
7	6.00	1.00	35.00	159.7
8	8.00	3.68	30.00	201.21
9	8.00	2.00	30.00	219.8
10	8.00	0.32	30.00	132.81
11	10.00	1.00	25.00	178.59
12	8.00	2.00	38.41	125.91
13	10.00	3.00	25.00	181.28
14	8.00	2.00	30.00	192.84
15	8.00	2.00	21.59	136.48
16	8.00	2.00	30.00	205.61
17	10.00	3.00	35.00	180
18	4.64	2.00	30.00	136.88
19	8.00	2.00	30.00	198.33
20	11.36	2.00	30.00	197.52

表 3 回归模型分析

**Table 3 Regression analysis**

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	Prob>F	显著性
Model	9	22154.93	2630.00	9.87	0.0005	☆☆
X <sub>1</sub>	1	5324.56	5423.05	20.58	0.5309	
X <sub>2</sub>	1	1928.43	1928.43	7.99	0.0180	☆
X <sub>3</sub>	1	101.73	101.73	0.42	0.0009	☆☆
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	56.55	56.55	0.23	0.6389	
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	710.46	710.46	2.94	0.1171	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	392.70	392.70	1.63	0.0088	☆☆
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	1	2540.69	2540.69	10.52	0.2311	
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1	2566.47	2566.47	10.63	0.0086	☆☆
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	1	9747.61	9747.61	40.37	<0.0001	☆☆
误差	5	661.31	132.26			
总和	19	23660.24				

注：☆为显著 (P<0.05)，☆☆为高度显著 (P<0.01)，R<sup>2</sup>=0.9404 R<sub>Adj</sub><sup>2</sup>=0.8817。

固体发酵黑曲霉最佳产酶条件为：五倍子含量为 9%；氮源添加量为 2.3%；温度为 32℃。在此条件下进行发酵产酶，由回归方程预测酶活力为 226.8 U/mL。

采用Design-Expert7.0程序对响应值与各因素进行回归拟合后，得到回归方程：

$$Y = -1782.614 + 56.83002x_1 + 105.3641x_2 + 62.05761x_3 - 1.29547x_1x_2 - 0.87238x_1x_3 - 1.52104x_2x_3 - 4.49133x_1^2 - 13.34493x_2^2 - 1.87215x_3^2$$

回归方程中各变量对指标影响的显著性，由 F 检验来判定<sup>[10]</sup>，概率 P 的值越小，则相应变量的显著程度越高。由表 3 可以看出，最显著的因素一次项 X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>，二次项 X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>，X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>，X<sub>3</sub>X<sub>3</sub>。回归方程也是高度显著的，相关系数 R<sup>2</sup>=0.9404，说明回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系，其校正决定系数 R<sub>Adj</sub><sup>2</sup>=0.8817，表明有约 12.0%的酶活力变化不能由该模型进行解释。利用该回归方程可以确定最佳发酵培养基及发酵条件。对回归方程取一阶偏导数等于零，整理可得到如下三式：

$$85.3800 - 1.2934X_2 - 0.8244X_3 - 7.0398X_1 = 0 \text{-----①}$$

$$83.5302 - 1.9424X_1 - 8.0806X_3 - 1.4013X_2 = 0 \text{-----②}$$

$$117.9352 - 1.40125X_3 - 26.6899X_2 - 1.3294X_1 = 0 \text{-----③}$$

①、②、③联立方程组，解得 X<sub>1</sub>=9.27≈9，X<sub>2</sub>=2.2637≈2.3，X<sub>3</sub>=31.8721≈32

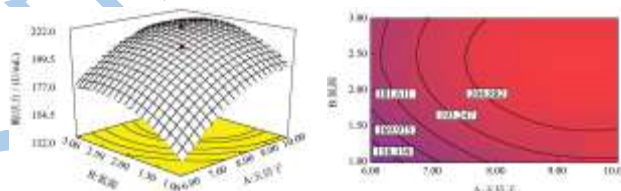


图 4 响应面法（氮源添加量、五倍子含量）立体分析图和相应等高线

**Fig.4 The response surface and contour plots illustrating the effects of nitrogen source and gallnut contents on the enzymatic activity**

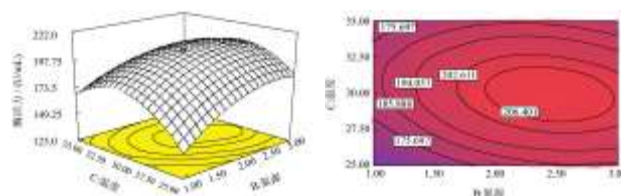


图 5 响应面法（氮源添加量、发酵温度）立体分析图和相应等高线

**Fig.5 The response surface and contour plots illustrating the effects of nitrogen source dosage and fermentation temperature on the enzymatic activity**

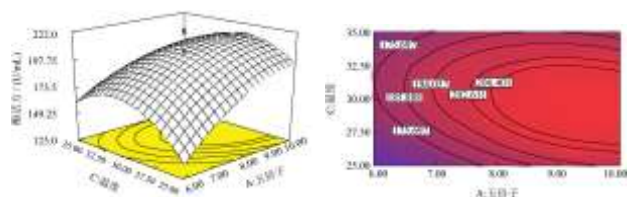


图6 响应面法(五倍子含量、发酵温度)立体分析图和相应等高线

Fig.6 The response surface and contour plots illustrating the effects of gallnut content and fermentation temperature on the enzymatic activity

根据响应面分析法得到的最佳条件,进行了重复实验验证预测值,重复实验结果反应响应值与回归方程预测值吻合良好,结果见表4。

表4 验证试验结果

Table 4 Validation test results

结果	重复实验值	响应面预测值
酶活力/(U/mL)	219.4	226.8

### 2.5 单宁酶产酶活力曲线

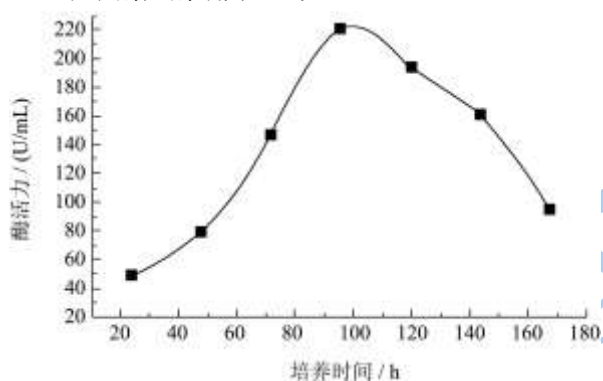


图7 固体发酵酶活力曲线

Fig.7 Time course of enzyme activity in solid state fermentation

综合以上各项参数,采用优化后的培养基及培养条件对黑曲霉进行固体发酵168 h,每隔24 h取样一次检测单宁酶活性,得到曲线如图7,酶活力的最高为第96 h的220.6 U/mL。

### 3 结论

本实验通过紫外诱变筛选出的一株黑曲霉菌株,在五倍子诱导下可以高产单宁酶,在该菌株进行单因素实验后,确定温度、五倍子含量及氮源添加量为对酶活影响最大的三个因素,因此选用这三个因素进

行响应面的优化,得到发酵产酶的最佳条件:五倍子含量为9%;氮源添加量为2.3%;温度为32℃。然后根据这几个响应面法优化后的这些条件参数进行固体发酵重复实验,发现酶活力为219.4 U/mL。在很大程度上提高了黑曲霉产单宁酶的酶活力。而五倍子主要产地是贵州、四川等地,因此利用此种含单宁酸丰富的地方植物资源,来进行产酶的研究具有重要意义。

### 参考文献

- [1] WEETAL H. Enzymatic gallic acid esterification [J]. Biotechnol Bioeng, 1985, 27: 124-127
- [2] IIBUEHI, MINODA Y, YAMADA K. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganism Part 11. A new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption [J]. Agr Biol Chem, 1967, 31: 513-518
- [3] 宋志萍,蔡俊鹏,曹丽芳.香蕉及茶叶中单宁降解菌株的筛选[J].现代食品科技,2005,21(3):39-41
- [4] Lauren S J Kenlee. Chemical forms of iron, calcium, magnesium and zinc in black, oolong, green and instant black tea [J]. Food Sci., 1988, 53 (1): 181-184
- [5] Lekha P K, Lonsane B K, Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations [J]. Process Biochemistry, 1994, 29: 497
- [6] A Sabu, A Pandey, M Jaafar Daud, Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agroresidues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620 [J]. Bioresource Technology, 2005, 96: 1223-1228
- [7] B Trevino-cueto, M luis J C Contreras-Esquivel. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.) [J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 721-724
- [8] 保玉心,邱树毅,李秧针,等.固态发酵黑曲霉产单宁酶发酵条件研究[J].食品与发酵工业,2008,34(6):54-56
- [9] 保玉心,邱树毅,李秧针,等.一种胞外单宁酶的活力检测方法[J].精细化工,2008,25(6):621-624
- [10] 徐春泽,王泽南,占子奇,等.响应面法对产甘露醇发酵乳杆菌发酵条件的优化[J].现代食品科技,2012,28(2):168-171