

# 基于 Taguchi 试验设计稻草发酵产纤维素酶的优化

辛 婷<sup>1,2</sup>, 谢逸萍<sup>1</sup>, 张 兴<sup>1,2</sup>, 马代夫<sup>1</sup>, 王 慧<sup>2</sup>

(1.徐州农科院,江苏 徐州 221121;2.中国矿业大学生物工程系,江苏 徐州 221116)

**摘要:** 采用 Taguchi 设计法综合考察接种量、硫酸铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁等因素对实验室筛选出的 1 株木霉菌种进行产纤维素酶的影响。结果表明,接种量对产酶的影响最大,其次是硫酸铵、七水硫酸镁,而磷酸二氢钾对产酶酶活的影响最小。Taguchi 设计优化后得到产纤维素酶的最优条件为:接种量为 8%,硫酸铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁添加量分别为 0.6%、0.25% 和 0.03%。在最优条件下预期纤维素酶活能达到 6.276  $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ ,而验证性试验证明在优化条件下,纤维素酶活达到了 5.222  $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ ,比优化前的纤维素酶活平均值 3.128  $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$  增加了 2.094  $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ ,表明 Taguchi 方法对于产纤维素酶优化具有较好的应用价值。

**关键词:** 燃料乙醇; Taguchi 试验设计; 纤维素酶; 优化; 方法

中图分类号:TS262.2 Q55 ;TQ925

文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)05-0130-03

## Optimization of the Fermentation of Straw to Produce Cellulase Based on Taguchi Design

XIN Ting<sup>1,2</sup>, XIE Yi-ping<sup>1</sup>, ZHANG Xing<sup>1,2</sup>, MA Dai-fu<sup>1</sup> and WANG Hui<sup>2</sup>

(1.Xuzhou Agricultural Science Academy, Xuzhou, Jiangsu 221121; 2. Bioengineering Department of China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

**Abstract:** Taguchi design method was adopted to investigate the effects of inoculation quantity,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  on cellulase production by a trichoderma strain (screened in the Lab). The results showed that the inoculation quantity had the strongest influence and then followed by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The optimum conditions for cellulase production were summed up as follows by use of Taguchi Design Method: inoculation quantity was 8%, the best addition levels of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  were 0.6%, 0.25% and 0.03% respectively. Under the most optimized conditions, the activity of the produced cellulase could achieve 6.276  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$  theoretically. The validation experiments showed that the average activity of the produced cellulase under the optimized conditions was up to 5.222  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$  (increased by 2.094  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$  than before (3.128  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ ), which proved that Taguchi design method was of good application value in the optimization of cellulase production conditions.

**Key words:** Taguchi design; cellulase; optimization; method

随着全球能源的日趋紧张,生物乙醇作为一种可再生的环保燃料成为新的替代能源。甘薯作为一种新型可再生的高效生物质能源作物,其生产和利用具有原料及加工成本低、综合利用潜力大和环境污染少等优点,且我国是世界上最大的甘薯生产国家,因此,合理利用甘薯作为原料对保障我国粮食与能源安全起了重要作用<sup>[1~2]</sup>。在甘薯乙醇生产过程中,由于其中含有一定的纤维素,因此投加纤维素酶,对提高甘薯乙醇发酵效率起到促进作用。而稻草是亚洲主要的农副产品,每年的稻草产量大约为  $1.85\times 10^8$  t。如何利用如此丰富的纤维素原料,是研究的一个热点,国内外学者研究最多的就是利用纤维素来生

产乙醇<sup>[3~4]</sup>。总之,在生物乙醇的生产过程中纤维素酶起到重要的作用,所以生产经济、有效的纤维素酶成为研究的关键。

在利用稻草发酵产纤维素酶试验中发现了几个很明显的因素,比如淀粉的添加量,添加的淀粉中直链淀粉和支链淀粉的比例,稻草中不同部位的产酶<sup>[5]</sup>。后来又做了几个常见因素如接种量、硫酸铵用量、磷酸二氢钾用量、七水硫酸镁用量对产酶的影响。在做单一因素对产纤维素酶的影响时发现各因素之间存在着很明显的交互作用。为确定出影响因素的主次,消除上述因素之间的交互作用,本文引入 Taguchi 设计法做进一步的考察,以确定

基金项目:江苏省高技术项目(BG2007320)、中国矿业大学科学基金项目(B011)。

收稿日期:2009-03-12

作者简介:辛婷(1984-),女,硕士研究生,研究方向为生物质能源。

通讯作者:张兴(1964-),男,教授。

最佳优化条件, 并且减少在生产中由于环境等因素的改变而减少产量情况的发生。

Taguchi 设计法是由日本的田口一博士提出来的, 它包括实验设计、实验操作、分析和验证 4 个阶段。该设计法有别于一般的试验设计方法。虽然 Taguchi 设计法中有正交试验设计, 但它又优于普通的正交试验方法<sup>[6]</sup>。使用 Taguchi 设计法, 能使试验结果受环境因素的影响减少到最低<sup>[7~8]</sup>。最初, Taguchi 设计法只是应用在美国和日本的一些制造业中的全面质量控制, 最近已经开始应用在生物化学工艺和生物过程中。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和原料

康宁木霉菌株 MM-3 保藏于中国矿业大学微生物实验室。

稻草由徐州农科院提供, 经 80 °C 烘 3 h, 粉碎过 32 目筛。

### 1.2 培养基

种子斜面培养基: PDA 琼脂培养基。

二代种子培养基: 250 mL 三角瓶中分装 10 g 干稻草粉, 加入 30 mL 营养液后混匀, 加 1.2 g 淀粉。起始 pH 为 5.5~6(自然 pH)。

固体发酵培养基: 250 mL 三角瓶中分装 10 g 干稻草粉, 加入 30 mL 配比不同的营养液(见表 2)。起始 pH 为 5.5~6(自然 pH)。

营养液成分: 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 二代种子的制备

取培养好的斜面种子一支, 用 5 mL 无菌水洗下制成孢子悬液(孢子浓度为 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> 个/mL), 取 1 mL 接入二代种子培养基中, 待发酵 5 d 菌体生长旺盛、孢子达到最多时备用。

#### 1.3.2 酶活的测定

采用 DNS 法测还原糖。滤纸酶活(FPA)的测定参考文献<sup>[9]</sup>。酶活力单位: 1 g 纤维素固体干酶曲 1 min 水解底物生成 1 μmol 葡萄糖, 为一个纤维素酶活力单位(U)。

#### 1.3.3 试验方案设计

根据 Taguchi 设计法原理, 进行方案设计。首先要先确定需要优化的因素。本试验选择接种量、氮源(硫酸铵)用量、磷酸盐(磷酸二氢钾)用量、七水硫酸镁 4 个对产酶影响较大的因素作为可控因素。同时每个因素取 4 个水平, 2 个低水平, 2 个高水平, 水平选择见表 1, 按照 5 因素 4 水平的正交表(L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>))来设计实验, 5 个因素中除 4 个可控因素外有一个因素是 Taguchi 特有的误差项, 即不可控因素, 这样使得结果更可靠。具体设计方案见表

2, 所得试样分别记为 1~16 号, 并在发酵培养 5 d 酶活达到最高时对酶活进行测定, 以确定最佳制备条件。

表 1 4 种可控因素与水平 (%)

因素	水平			
	低水平 1	低水平 2	高水平 1	高水平 2
接种量	8	10	12	16
硫酸铵	0.6	0.8	1	1.2
磷酸二氢钾	0.1	0.15	0.2	0.25
七水硫酸镁	0.02	0.025	0.03	0.035

表 2 Taguchi 设计法正交表 (%)

瓶号	因素			
	接种量	硫酸铵	磷酸二氢钾	七水硫酸镁
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	1	4	4	4
5	2	1	2	3
6	2	2	1	4
7	2	3	4	1
8	2	4	3	2
9	3	1	3	4
10	3	2	4	3
11	3	3	1	2
12	3	4	2	1
13	4	1	4	2
14	4	2	3	1
15	4	3	2	4
16	4	4	1	3

#### 1.3.4 试验操作

按照表 2 中 16 个不同因素的配比, 进行 16 组试验, 每组都设定 3 个平行样, 发酵 5 d, 分别测定酶活, 取每组的平均值。

#### 1.3.5 对于 Taguchi 方法给出的最佳组合进行验证实验

得出优化条件后, 按照最佳条件, 进行验证性试验, 设 3 个平行样。

## 2 结果与分析

### 2.1 Taguchi 设计法数据处理

通过测定, 计算出每个瓶样的酶活, 结果见表 3。然后利用 Qualitek-4 软件对试验数据进行处理。所用公式如下<sup>[10]</sup>:

$$S/N = -10 \times \log \left\{ \frac{1}{n} \left[ \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right] \right\}$$

式中: S/N——Signal/Noise ration 信噪比;

Y——测试评价参数, 本试验即为滤纸酶活数值;

n——同一实验重复次数, 本试验 n 为 3。

根据稳健性优化, 信噪比要求越大越好。

用 Qualitek-4 软件处理数据后得到表 3~表 6 的数据结果。按照实验条件设计好的 16 个瓶培养发酵后所测

酶活见表3,求得其平均酶活和信噪比。

表3 按正交表得到的酶活以及信噪比

项目	酶活 a	酶活 b	酶活 c	酶活平均值	信噪比 ?
1	4.296	4.301	4.295	4.297	12.663
2	4.172	4.171	4.172	4.634	13.32
3	4.591	4.593	4.591	4.138	12.336
4	1.880	1.885	1.882	3.965	11.965
5	4.637	4.635	4.635	4.891	13.789
6	2.691	2.691	2.692	2.057	6.264
7	1.186	1.187	1.186	2.186	6.794
8	3.210	3.209	3.211	2.963	9.436
9	2.388	2.385	2.389	2.387	7.558
10	4.715	4.718	4.716	4.716	13.472
11	0.694	0.698	0.696	2.505	7.979
12	0.617	0.617	0.615	2.456	7.805
13	2.582	2.583	2.582	3.874	11.764
14	1.411	1.411	1.412	1.411	2.992
15	0.888	0.889	0.890	1.889	5.524
16	0.675	0.676	0.674	1.674	4.48

由表3可知,随着实验条件的不同,酶活有着显著差异。所选择的4个因素在不同的水平上对产酶的影响见表4。

表4 因子反应结果

项目	水平1	水平2	水平3	水平4	L2~L1
接种量	4.258	3.024	3.016	2.212	-1.234
硫酸铵	3.826	3.204	2.679	2.765	-0.658
磷酸二氢钾	2.633	3.467	2.725	3.685	0.834
七水硫酸镁	2.587	3.494	3.855	2.574	0.907

由表4可知,接种量、硫酸铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁分别在水平1、水平2、水平4、水平3上对产酶的影响最大。每个因素在水平1和水平2上数值的差别表示因素间相对的影响。差值越大,影响越大。在几个因素中,接种量的影响最大,其次是七水硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸铵。图1表明了不同因素在不同水平条件下对产酶的影响。

了解2个因素之间的交互作用有助于整体的分析,表5考察了因素间的交互作用。其中,交互作用严重性指数(SI)表示2个因素交互后对产酶的影响程度。Columns代表设计好的2个相交互的因素。

由表5可知,磷酸二氢钾和七水硫酸镁交互的SI值最大,其次是硫酸铵和七水硫酸镁、接种量和硫酸铵,而接种量和七水硫酸镁交互的SI值最小。值得注意的是,硫酸铵和七水硫酸镁单独对产酶的影响都是较小的,但是交互后SI值却相对较大,即对产酶的影响反而较大。由此可见,单独因素对产酶的影响与因素组合后对产酶的影响是不同的。

表6(方差分析表)考察了在置信度为

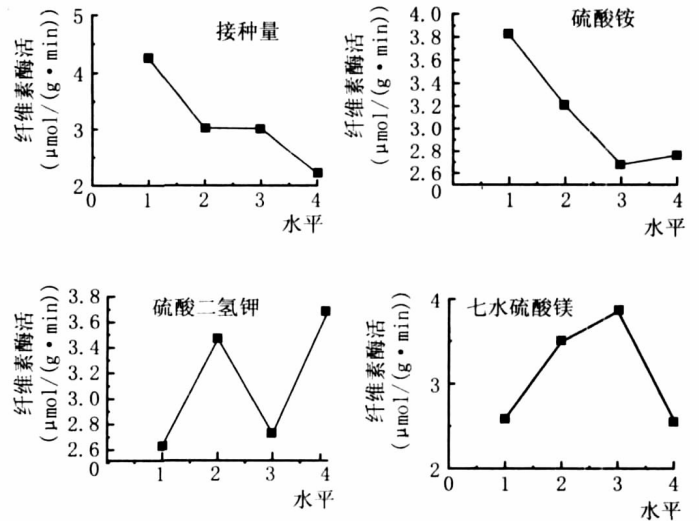


图1 不同因素在不同水平的酶活

表5 因素间的交互作用

序号	因素	columns	SI (%)	col	opt.
1	磷酸二氢钾×七水硫酸镁	3×4	57.03	7	[2,3]
2	硫酸铵×七水硫酸镁	2×4	52.38	6	[1,3]
3	接种量×硫酸铵	1×2	45.57	3	[2,1]
4	接种量×磷酸二氢钾	1×3	35.87	2	[2,2]
5	硫酸铵×磷酸二氢钾	2×3	28.49	1	[1,2]
6	接种量×七水硫酸镁	1×4	6.31	5	[2,3]

95%时各个因素对产酶的影响是否显著。表6结果表明,4个因素对产纤维素酶都有显著性影响。其中接种量的影响最大。

总贡献率为3.147;SN比平均值9.259。

酶活平均值为3.128;优化条件下的预期值为6.276。

## 2.2 产纤维素酶最优条件的确定

表7结果表明,接种量为8%,硫酸铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁添加量分别为0.6%、0.25%和0.03%时,所产纤维素酶的酶活达到最大。其中,接种量的贡献率最大。通过Qualitek-4软件得出优化条件下预期产纤维素酶的酶活值为6.276 μmol/g·min,比优化前的纤维素酶的酶活平均值3.128 μmol/g·min增加了100.6%。

## 2.3 验证性实验

为了研究Taguchi设计法的可靠性,进行了验证性实验,4个因素都设置为最优水平,做3个平行实验,得出3瓶酶活分别为:5.207 μmol/g·min、5.206 μmol/g·min和

表6 方差分析表

序号	因素	DOF	Sum of squrs	V	F	Pure Sum/	P
1	接种量	3	25.684	8.561	87.693	25.392	39.199
2	硫酸铵	3	10.539	3.513	35.982	10.246	15.817
3	磷酸二氢钾	3	9.996	3.332	34.131	9.703	14.98
4	七水硫酸镁	3	15.138	5.046	51.685	14.845	22.918
	其他误差	3	3.416	0.097	—	—	7.086
	合计	15	64.776	—	—	—	100%

(下转第135页)

表 1 纳米 TiO<sub>2</sub>/凹凸棒土对酿酒工业废水的降解效果

加量(mg/L)	废水 COD 值(mg/L)	COD 的去除率(%)
0	8700	-
0.5	6646.8	23.6
1.0	4567.5	47.5
1.5	1365.9	84.3
1.8	365.4	95.8
2.0	330.6	96.2
2.2	287.1	96.7
2.5	435	95.0
3.0	496	94.3

锐钛型纳米 TiO<sub>2</sub> 具有优良的光催化活性,其在能量大于 3.2 eV 的光照下,纳米 TiO<sub>2</sub> 产生光生电子(e<sup>-</sup>)和空穴(h),空穴与水反应生成羟基自由基(OH),而光生电子与氧和水等反应生成活性氧的超氧离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),超氧离子和过氧化氢具有很强的氧化性能,能将酿酒工业废水中的部分有机物氧化为二氧化碳和水<sup>[3~4]</sup>,凹凸棒土由于具有多孔结构,具有良好的吸附性能,能吸附废水中的有机物,TiO<sub>2</sub> 的光催化性和凹凸棒土的吸附性结合使酿酒工业废水达到了行业排放标准的二级标准(300 mg/L),当光催化剂投入量过多时,可能引起光线散射,凹凸棒土表面吸附过多有机物,引起光线屏蔽,光利用率降低,COD 的去除率下降。

### 3 结论

(上接第 132 页)

表 7 优化结果以及贡献率

序号	因素	水平	值(%)	贡献值
1	接种量	1	8	1.13
2	硫酸铵	1	0.6	0.734
3	磷酸二氢钾	4	0.25	0.557
4	七水硫酸镁	3	0.03	0.727

5.253 μmol/g·min,平均值为 5.222 μmol/g·min。结果表明,通过 Taguchi 试验设计法优化,纤维素酶活从优化前的 3.128 μmol/g·min 提高到了 5.222 μmol/g·min。

### 3 结论

用 Taguchi 方法对降解稻草产纤维素酶进行了优化,找出了对实验影响最显著的因素为接种量,并推断出实验条件的最佳化趋势。得出接种量为 8%,硫酸铵、磷酸二氢钾、七水硫酸镁的添加量分别为 0.6%、0.25% 和 0.03% 时,所产纤维素酶活达到最大。通过验证性实验得出 Taguchi 方法是一个比较可靠有效的优化方法。

#### 参考文献:

- [1] 邓虹.发展甘薯燃料乙醇产业的原料有效供给对策[J].农业科技管理,2008,27(1):29-31.
- [2] 钱伯章.我国燃料乙醇产业发展现状及前景[J].太阳能,2007,(8):7-9.

3.1 通过 XRD 分析,凹凸棒土负载的主要是锐钛矿相的纳米 TiO<sub>2</sub> 和部分金红石相 TiO<sub>2</sub>。

3.2 预处理凹凸棒土和纳米 TiO<sub>2</sub>/凹凸棒土 SEM 图比较可以看出,在凹凸棒土松散纤维状表面有均匀分散的白色纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒,并且纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒镶嵌在凹凸棒土纤维状表面。

3.3 在光照条件下,利用复合纳米 TiO<sub>2</sub>/凹凸棒土可以有效地去除酿酒工业废水的 COD,其 COD 可以降低到 287.1 mg/L,去除率达 96.7%,可以实现高浓度酿酒工业废水的达标排放。

#### 参考文献:

- [1] Hoffmann M R, Martin S T, Choi W, et al. Environment applications of semiconductor Photocatalysis [J]. Chem. Rev., 1995, 95(1): 69.
- [2] 杨波,杨淑华,等.废水中 COD 快速测定的研究[J].沈阳化工学院学报,2003,17(2):110-113.
- [3] Yanghee Kim, Minjoong Yoon. TiO<sub>2</sub>/Y-Zeolite encapsulating intramolecular charge transfer molecules: a new photocatalyst for photoreduction of methyl orange in aqueous medium [J]. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2001, (168): 257-263.
- [4] 陈前林,王龙现,吴建青.纳米 TiO<sub>2</sub> 对酿酒工业废水的降解作用[J].酿酒科技,2006,(3):57-61.
- [5] 王晓娟,王斌,冯浩,李志义.木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展[J].石油与天然气化工,2007,(6):452-456.
- [6] KRISHNA H S, JANARDHAN R T, CHOWDARY G V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast [J]. Bioresource Technol, 2001, 97(2): 193-196.
- [7] 辛婷,张兴,谢逸萍,等.影响稻草降解及其产纤维素酶的几个关键性因素[J].粮油加工,2008,(10):117-120.
- [8] 施夏蓉,杨聪斌,洪清华.基于 Taguchi 和 ANOVA 方法的 HPLC 中药成分检测实验优化设计[J].海峡药学,2008,20(8):45-47.
- [9] K. Krishna Prasad, S. Venkata Mohan, R. Sreenivas Rao. Laccase production by Pleurotus ostreatus 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology [J]. Biochemical Engineering, 2005, 24: 17-26.
- [10] K. Yasotha, M. K. Aroua, K. B. Ramachandran, I. K. P. Tan. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration [J]. Biochemical Engineering, 2006, 30: 260-268.
- [11] Ghose TK. Measurement of cellulase activities [J]. Pure Appl Chem, 1987, 59: 257-268.
- [12] 吴邵亮,刘欣梅,阎子峰. Taguchi 设计法钨钼固溶体的优化合成 [J]. 分子催化, 2008, 22(1): 61-64.