

## 以玉米秸秆为基质的微生物发酵产多糖的工艺优化

王雯雯<sup>1</sup>, 吴金皎<sup>1</sup>, 杨晓林<sup>1</sup>, 李艳红<sup>1</sup>, 冯焯<sup>1</sup>, 解玉红<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384; 2. 易科力(天津)环保科技发展有限公司, 天津 300391)

**摘要** 以玉米秸秆为底物, 通过培养 3 株放线菌组成的 7<sup>#</sup> 菌群来发酵生产多糖。采用乙醇沉淀法对玉米秸秆发酵后的水溶性多糖进行了分离, 并利用 Minitab 15 对 7<sup>#</sup> 菌群降解玉米秸秆的发酵工艺进行优化设计和分析。结果表明, 7<sup>#</sup> 菌群培养后多糖含量增加了 677.54 mg/L, 并随培养时间呈上升趋势。培养时间和秸秆量对多糖含量有显著影响, 培养时间 12 d、秸秆量 50.4 g/L 时多糖含量的最佳值为 2 146.90 mg/L。

**关键词** 玉米秸秆; 多糖; 微生物; 生产条件; 工艺优化

中图分类号 X172 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)09-0194-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.048



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Process Optimization of Polysaccharide Production by Microbial Fermentation with Corn Stalks as Substrate

WANG Wen-wen, WU Jin-jiao, YANG Xiao-lin et al (School of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384)

**Abstract** Corn stalks was used as a substrate to produce polysaccharides by culturing 7<sup>#</sup> flora composed of 3 actinomycetes. The ethanol precipitation method was used to separate the water-soluble polysaccharides after fermentation of corn stalks, and the fermentation process of 7<sup>#</sup> bacteria degrading corn stalks was optimized and analyzed by Minitab15. The results showed that the polysaccharide content of 7<sup>#</sup> bacteria group increased by 677.54 mg/L after culturing, and showed an upward trend with the culturing time. Cultivation time and straw amount had a significant effect on polysaccharide content. The optimum value of polysaccharide content was 2 146.90 mg/L when the cultivation time was 12 d and the straw amount was 50.4 g/L.

**Key words** Corn stalks; Polysaccharide; Microorganism; Production conditions; Process optimization

多糖是大分子化合物, 其与多种生理功能联系紧密, 在生命活动中起重要作用。如纳米纤维素, 作为一种结构多糖, 由于其可再生性功能已被广泛研究<sup>[1]</sup>。多糖具有多种生物活性如抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、免疫调节等<sup>[2-3]</sup>。在以前的研究中, 对于细菌和真菌方面, 研究者对从中分离得到的各种荚膜多糖进行了研究<sup>[4]</sup>; 对于植物多糖方面, 研究者对芦荟多糖、枸杞多糖、黄芪多糖、稻草多糖、麦秸多糖等研究较多<sup>[5-7]</sup>, 而对玉米秸秆多糖的研究较少。

我国每年都会产生大量的玉米秸秆, 由于是废渣大部分被人们丢弃, 不仅使资源浪费, 而且环境受到破坏。玉米秸秆主要由木质纤维素组成, 具有很好的生物转化前景, 可用于堆肥<sup>[8]</sup>、草酒<sup>[9]</sup>和生产多糖, 实现资源的有效利用。将玉米秸秆转化为糖和其他衍生物的方法有脱木素、解聚和酶水解<sup>[7]</sup>。木质纤维素的转化方法很多, 如酸法、碱法、加热法等。然而, 酸提和碱提会破坏多糖结构, 影响其生物活性, 同时也不可避免地造成设备腐蚀和环境污染。与化学转化法相比, 加热萃取法可以避免污染, 但需要消耗大量的能量。以玉米秸秆为原料, 采用生物降解法生产多糖, 工艺温和, 不会造成环境污染。这种转化可以实现玉米秸秆的创新利用, 在当前资源和能源短缺的情况下具有重要意义。笔者从玉米秸秆发酵液中提取多糖, 并对其进行进一步纯化, 优化生产工艺。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和菌株** 7<sup>#</sup> 菌群, 由鲤链霉菌(*Streptomyces carpatius*)、灰略红链霉菌(*Streptomyces griseorubens*)、娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) 3 个菌株组成。玉米秸秆采自天津郊区, 洗净, 烘干, 粉碎成 60 目。培养基: NaNO<sub>3</sub> 2.5 g, NaCl 0.1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.3 g, FeCl<sub>3</sub> 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, 水 1 000 mL, 秸秆粉 20 g, pH 7.2~7.4。苯酚试剂 6%(g:mL): 将 80%(g:mL) 苯酚稀释至 6%(g:mL) 后, 在 4 °C 下用棕色瓶中贮存。DNS 试剂: 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸、262 mL NaOH(2 mol/L)、185 g 酒石酸钠、2 g 苯酚、5 g 亚硫酸钠、1 L 蒸馏水, 储存于棕色瓶中。

**1.2 多糖的生产与分离** 在 2 个试验组中, 一个是无菌发酵, 另一个是 7<sup>#</sup> 菌发酵。将 7<sup>#</sup> 菌群接种于玉米秸秆培养基中, 在 30 °C、120 r/min 恒温振荡培养 8 d, 另一组不接种任何微生物, 30 °C、120 r/min 培养 8 d。离心(5 000 r/min, 10 min)取上清液, 旋转蒸发(55 °C)至 1/10, 再加入 1/5 体积的 Seavage 试剂, 进行脱蛋白直至液相与有机相之间无沉淀, 加入 3 倍体积的无水乙醇摇匀, 在 4 °C 冰箱中静置 24 h。离心(5 000 r/min, 10 min)弃上清液, 沉淀在 37 °C 下烘干, 用无水乙醇、乙醚、丙酮溶液进行洗涤, 再在 37 °C 下烘干以获多糖。可溶性糖含量和总糖含量通过 DNS 方法测定, 每日用 DNS 法<sup>[10]</sup>测定多糖含量, 得到了多糖含量随时间的变化曲线。

**1.3 多糖生产条件优化** 这一部分使用 Plackett-Burman 设计和响应面分析。筛选出影响多糖含量的最显著因素, 采用 N=12 的试验设计。发酵过程的影响因素包括秸秆量、培养时间、温度、初始 pH、接种量和培养基体积。每个因子有 2 个级别(-1, 1)。试验设计如表 1 所示。

**基金项目** 天津理工大学创新训练计划项目(202010060094); 天津市自然科学基金重点项目(09JCZDJC26200)。

**作者简介** 王雯雯(1994—), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向: 固废资源化利用。\* 通信作者, 副教授, 硕士, 硕士生导师, 从事环境微生物学研究。

**收稿日期** 2021-07-14; 修回日期 2021-09-06

表 1 发酵过程的 Plackett-Burman 设计

Table 1 Plackett-Burman design of fermentation process

水平 Level	A (初始 pH Initial pH)	B(温度 Temperature//°C)	C(培养基体积 Medium volume//mL)	D(接种量 Inoculation amount//%)	E(培养时间 Cultivation time//d)	F(秸秆量 Straw amount//g/L)
-1	7.0	30	50.0	4	7	20
1	8.7	37	62.5	5	9	25

根据表 1 进行试验,对数据进行多项式回归,得到二次多项式方程,如式(1)所示。利用 Excel 2007 对方程进行求解,得到多糖产量最大的发酵条件。

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k (\beta_i X_i) + \sum_{i=1}^{j-1} \sum_{j=1}^k (\beta_{ij} X_i X_j) + \sum_{i=1}^k (\beta_{ii} X_i^2) \quad (1)$$

式中, $Y$ 是响应函数(多糖含量); $X_i$ 和 $X_j$ 均是独立变量编码, $X_i = (x_i - x_0) / \Delta x$ , $x_i$ 是自变量的真实值, $x_0$ 是试验中心点处自变量, $\Delta x$ 是自变量的变化步长; $\beta_0$ 是模型的截距; $\beta_i$ 、 $\beta_{ii}$ 、 $\beta_{ij}$ 分别表示一次项、二次项和相互作用项的系数。

## 2 结果与分析

**2.1 多糖的生产与分离** 在 2 个试验组中,从 7<sup>#</sup> 菌群发酵的一个菌群中分离得到样品如图 1 所示,多糖为淡黄色粉末,该糖无味且易溶于水,不溶于有机溶剂(乙醇、乙醚、乙酮)。



图 1 多糖外观

Fig. 1 Polysaccharide appearance

无菌群发酵组和 7<sup>#</sup> 菌群发酵培养基中多糖含量分别为 307.96、985.50 mg/L,7<sup>#</sup> 菌群发酵培养基比无微生物发酵组多糖含量提高了 677.54 mg/L。7<sup>#</sup> 菌群发酵组由于微生物降解多糖含量显著增加,由此可见,微生物降解玉米秸秆可以提高多糖含量。

**2.2 多糖含量随时间变化** 从 7<sup>#</sup> 菌群发酵组多糖含量随时间变化(图 2)可以看出,发酵过程中多糖含量随时间延长呈增长趋势,前 5 d 由于菌群对其代谢活性的适应和多糖的消耗,含量不稳定;6 d 后含量基本稳定。第 6 天达到图 1 所示的稳定生产状态;第 7 天最高含量达到 1 150 mg/L 以上。

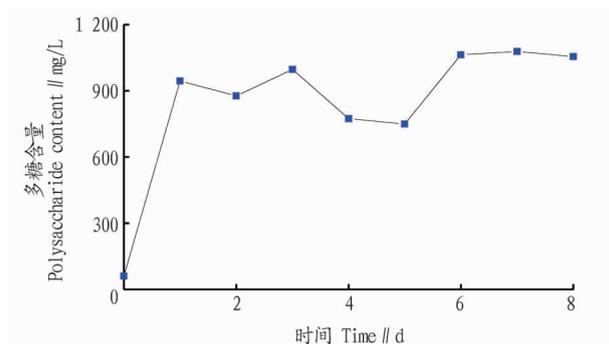


图 2 多糖含量随时间变化曲线

Fig. 2 Variation curve of polysaccharide content with time

**2.3 多糖生产条件优化** 采用 Plackett-Burman 设计,以初始 pH(A)、温度(B)、培养基体积(C)、接种量(D)、培养时间(E)和秸秆量(F)为发酵条件。采用 Minitab 15 设计 6 因素试验, $N=12$ ,响应值为多糖含量。每个因子取 2 个水平,每个样本设 2 个平行水平,每个样本重复 3 次,确定平均值。以 2 个平行平均值作为发酵秸秆中多糖含量,结果见表 2。

表 2 发酵过程及结果的 Plackett-Burman 设计

Table 2 Plackett-Burman design of fermentation process and results

序号 No.	A	B	C	D	E	F	多糖含量 Polysaccharide content//mg/L
1	1	-1	1	1	-1	1	692.09
2	1	1	-1	1	-1	-1	568.08
3	-1	1	-1	-1	-1	1	784.44
4	-1	1	1	-1	1	-1	569.38
5	-1	-1	-1	1	1	1	1 106.56
6	1	-1	-1	-1	1	1	967.66
7	1	1	1	-1	1	1	894.11
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	632.68
9	1	1	-1	1	1	-1	678.65
10	-1	1	1	1	-1	1	762.47
11	-1	-1	1	1	1	-1	825.22
12	1	-1	1	-1	-1	-1	706.43

使用 Minitab 15 对表 2 中的数据进行分析,各因素对多糖含量的影响如表 3 所示。由表 3 可知,对多糖含量的影响为正的因子有接种量、培养时间和秸秆量,对多糖含量的影响为负的因子有初始 pH、温度和培养基体积。培养时间和秸秆量的  $P$  值均小于 0.05,说明培养时间和秸秆量是显著因

素。为了尽快接近最大含量,设计了这 2 个因素的最陡爬升试验。培养基体积、初始 pH、温度和接种量对多糖含量无显著影响,原值不变。培养时间和秸秆量对多糖含量的影响均为正,应提高其值,设计和结果如表 4 所示。

表 3 各种因素对多糖含量的影响及各因素的显著性

Table 3 Effects of various factors on polysaccharide content and the significance of each factor

因素 Factor	效应 Effect	系数 Coefficient	显著性 Significance		
			$t$	$P$	重要性排序 Importance order
初始 pH Initial pH(A)	-28.957	-14.478	-0.51	0.634	5
温度 Temperature(B)	-112.249	-56.125	-1.96	0.107	3
培养基体积 Medium volume(C)	-48.064	-24.032	-0.84	0.439	4
接种量 Inoculation amount(D)	13.062	6.531	0.23	0.829	6
培养时间 Cultivation time(E)	149.234	74.617	2.61	0.048	2
秸秆量 Straw amount(F)	204.482	102.241	3.57	0.016	1

表 4 最陡爬坡试验设计及其结果

Table 4 Design and results of the steepest climbing test

试验编码 Test code	培养时间 Cultivation time//d	秸秆量 Straw amount g/L	多糖含量 Polysaccharide content//mg/L
1	7	20	977.53
2	8	25	1 268.28
3	9	30	1 425.18
4	10	35	1 730.02
5	11	40	2 027.06
6	12	45	2 095.34
7	13	50	2 070.27

表 4 显示最佳发酵条件为试验编码 6,因此  $X_1 = 12$  d 和  $X_2 = 45$  g/L 是后续响应面试验的重点。根据最陡爬坡试验获得的中心数据( $X_1 = 12$  d,  $X_2 = 45$  g/L),进行  $X_1$ (培养时间)和  $X_2$ (秸秆量)的中心组合设计。为了使拟合方程具有可旋转性和通用性,将中心点重复 5 次,星号臂长  $C = 1.414$ 。测试因子的值和编码见表 5,测试结果见表 6。

表 5 中心组合设计因子及水平

Table 5 Central portfolio design factors and levels

水平 Level	$X_1$	$X_2$
-1.414	10.586	32.272
-1	11	36
0	12	45
1	13	54
1.414	13.414	57.728

采用 Minitab 15 中的响应面分析方法对试验数据进行方差回归分析。Joglekar 等<sup>[11]</sup>认为,一个好的相关回归模型的  $R^2$  至少高于 0.8。该研究方差分析结果发现,回归模型的  $R^2$  和调整后的  $R^2_{Adj}$  分别为 0.978 9 和 0.963 9,这 2 个值均高于 0.900 0,且相互接近,表明该模型可用于分析响应值。

根据表 7 中各因素的效应系数,建立了微生物发酵玉米秸秆多糖含量的拟合方程,如式(2)所示。根据式(2)绘制响应面曲线图和等高线图,如图 3 和图 4 所示。

表 6 中心组合设计及结果

Table 6 Center combination design and results

序号 No.	$X_1$	$X_2$	多糖含量 Polysaccharide content//mg/L
1	0	1.414	2 080.71
2	-1	1	1 997.63
3	-1	-1	1 760.39
4	1	-1	1 827.55
5	0	-1.414	1 586.64
6	1	1	2 084.62
7	1.414	0	1 995.17
8	-1.414	0	1 897.62
9	0	0	2 096.45
10	0	0	2 093.33
11	0	0	2 098.11
12	0	0	2 095.68
13	0	0	2 099.12

表 7 中心组合设计试验回归分析

Table 7 Regression analysis of center combination design test

变量 Variable	自由度 DOF	效应系数 Effect coefficient	标准误差 SE	$t$ 值 $t$ value	$P$ 值 $P$ value
截距 Intercept	1	2 096.54	13.93	150.536	0.000
$X_1$	1	36.51	11.01	3.316	0.013
$X_2$	1	149.13	11.01	13.544	0.000
$X_1^2$	1	-68.19	11.81	-5.776	0.001
$X_2^2$	1	-124.55	11.81	-10.549	0.000
$X_1X_2$	1	4.96	15.57	0.318	0.760

$$Y = 2\,096.54 + 36.51X_1 + 149.13X_2 - 68.19X_1^2 - 124.55X_2^2 + 4.96X_1X_2 \quad (2)$$

根据式(2)、图 3 和图 4,培养时间( $X_1$ )和秸秆量( $X_2$ )分别为 12.289 7 d(取 12 d)和 50.439 78 g/L(取 50.4 g/L),多糖含量的最佳值为 2 146.90 mg/L。

为了验证试验结果,建立了 5 个平行试验,结果发现,5 个平行试验多糖含量平均值(2 159.23 mg/L)与预测值(2 146.90 mg/L)基本一致,说明该回归方程能较好地反映

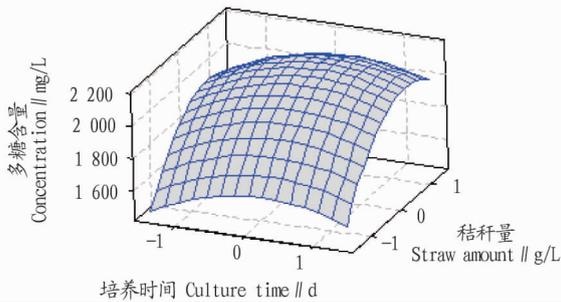


图3 培养时间和秸秆量对多糖含量影响的响应曲面图

Fig. 3 Response surface graph of the effect of culture time and straw amount on polysaccharide content

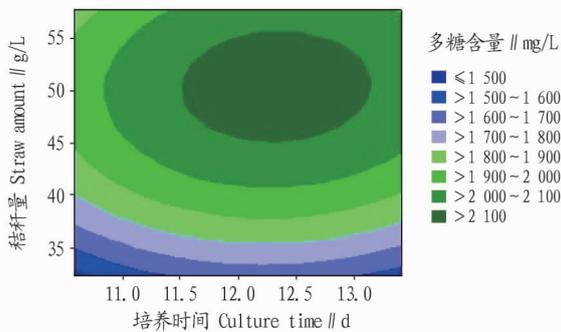


图4 培养时间和秸秆量对多糖含量影响的等高线图

Fig. 4 Contours of the effect of culture time and straw amount on polysaccharide content

微生物发酵秸秆中各因素对多糖含量的影响。

### 3 结论与讨论

以玉米秸秆为基质,利用7<sup>#</sup>菌群发酵生产多糖,DNS法每日测定多糖含量,为时7 d,结果显示多糖含量随发酵时间呈上升趋势,在此基础上利用Minitab 15软件对发酵条件进行优化,通过Plackett-Burman设计筛选出2个重要因素为培养时间( $X_1$ )和秸秆量( $X_2$ ),最陡爬坡试验确定后续中心点为 $X_1=12$  d、 $X_2=45$  g/L,通过中心组合设计和响应面分析得

(上接第193页)

归水重复利用率对耗水系数的影响等仍需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 刘韶斌. 甘肃省水资源现状与发展节水灌溉的思考[J]. 甘肃农业科技, 2006(5): 37-38.
- [2] 周斌. 甘肃省主要生态地质环境问题及环境保护对策研究[J]. 甘肃地质, 2011, 20(4): 60-64.
- [3] 操信春, 吴普特, 王玉宝, 等. 不同灌溉水分生产率指标的时空变异与相关关系[J]. 农业机械学报, 2014, 45(4): 189-194.
- [4] 周鸿文, 袁华, 吕文星, 等. 黄河流域耗水系数评价指标体系研究[J]. 人民黄河, 2015, 37(12): 46-49, 53.
- [5] 岳卫峰, 杨金忠, 王旭升, 等. 河套灌区义长灌域耗水机制分析[J]. 中国农村水利水电, 2004(8): 11-13.
- [6] 雷志栋, 杨汉波, 倪广恒, 等. 干旱区绿洲耗水分析[J]. 水利水电技术, 2006, 37(1): 15-20.
- [7] 金瑞琴, 蒋秀华, 任笑焱, 等. 青海省香日德河谷灌区典型地块作物耗

到回归方程,解得最优发酵条件为培养时间和秸秆量分别为12.289 7 d(取12 d)和50.439 78 g/L(取50.4 g/L),多糖含量的最佳值为2146.90 mg/L。建立5个平行试验验证试验结果,试验值与预测值基本一致。该试验对发酵条件的研究具有很强的指导性和实用性,为玉米秸秆的资源化利用奠定基础。

### 参考文献

- [1] TAN K W, HEO S K, FOO M L, et al. An insight into nanocellulose as soft condensed matter: Challenge and future prospective toward environmental sustainability[J]. Science of the total environment, 2019, 650: 1309-1326.
- [2] CHEN L, HUANG G L. Antitumor activity of polysaccharides: An overview [J]. Current drug targets, 2018, 19(1): 89-96.
- [3] HAO Y L, SUN H Q, ZHANG X J, et al. A novel acid polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*: Hypoglycemic activity *in vitro* and chemical structure [J/OL]. Journal of molecular structure, 2020, 1220 [2021-04-17]. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128717.
- [4] TODERO I, CONFORTIN T C, LUFT L, et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide[J]. Environmental technology, 2020, 41(21): 2742-2749.
- [5] 卢碧玉, 蔡小连. 芦荟多糖抑制肿瘤新生血管作用的研究[J]. 中医药导报, 2013, 19(1): 83-84.
- [6] 石永芳. 黄芪多糖对II-型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(29): 29-30, 37.
- [7] LI A L, HOU X D, LIN K P, et al. Rice straw pretreatment using deep eutectic solvents with different constituents molar ratios; Biomass fractionation, polysaccharides enzymatic digestion and solvent reuse[J]. Journal of bioscience & bioengineering, 2018, 126(3): 346-354.
- [8] XU X Q, WU P, WANG T Z, et al. Synergistic effects of surfactant-assisted biodegradation of wheat straw and production of polysaccharides by *Inonotus obliquus* under submerged fermentation [J]. Bioresource technology, 2019, 278: 43-50.
- [9] MLECZEK M, GASECKA M, BUDKA A, et al. Changes in mineral composition of six strains of *Pleurotus* after substrate modifications with different share of nitrogen forms[J]. European food research and technology, 2021, 247(1): 245-257.
- [10] GUZZON R, FRANCIOSI E, LARCHER R. A new resource from traditional wines: Characterisation of the microbiota of "Vino Santo" grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* [J]. European food research and technology, 2014, 239(1): 117-126.
- [11] JOGLEKARA M, MAY A T. Product excellence through design of experiments [J]. Cereal Foods World, 1987, 32: 857-868.
- [12] 水试验与模拟研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(18): 169-172, 186.
- [13] 周鸿文, 翟禄新, 吕文星, 等. 基于VSMB模型的灌溉水损耗模拟研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 5866-5871, 5940.
- [14] 王则玉, 冯耀祖, 陈署晃, 等. 彭曼-蒙太斯法定阿克苏红枣根灌灌溉制度[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(11): 2189-2194.
- [15] 中华人民共和国水利部. 水资源水量监测技术导则: SL 365—2007 [S]. 北京: 中国水利水电出版社, 2007.
- [16] 周鸿文, 吕文星, 常远远, 等. 青海省大峡渠灌区典型地块农业灌溉耗水监测试验与模拟研究[J]. 水利水电技术, 2016, 47(12): 136-142.
- [17] 吕文星, 张学成, 周鸿文, 等. 湟水流域灌区水循环规律研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 308-312.
- [18] 中华人民共和国水利部. 旱情等级标准: SL 424—2008 [S]. 北京: 中国水利水电出版社, 2008.
- [19] 牛振红. 降水入渗补给系数的实验研究与分析计算[J]. 地下水, 2003, 25(3): 152-154.
- [20] 张志杰, 杨树青, 史海滨, 等. 内蒙古河套灌区灌溉入渗对地下水的补给规律及补给系数[J]. 农业工程学报, 2011, 27(3): 61-66.