

李衡香,王凤学,钟超,等. 1 株解淀粉芽孢杆菌 CEL-1 发酵产纤维素酶的条件优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):379-382.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.118

1 株解淀粉芽孢杆菌 CEL-1 发酵产纤维素酶的条件优化

李衡香,王凤学,钟超,王春明,邵婷婷,贾红华,韦萍

(南京工业大学生物与制药工程学院,南京 211800)

摘要:从沼气站秸秆堆肥中分离筛选得到 1 株室温下产纤维素酶的菌株,经鉴定为 *Bacillus amyloliquefaciens* CEL-1,在选定最适碳氮源的基础上,采用 Plackett-Burman 试验设计筛选出 3 个显著因素为可溶性淀粉、玉米浆和硫酸铵。进而通过爬坡试验和 Box-Behnken 试验进一步优化得到最佳产纤维素酶条件为:培养温度 27 ℃,pH 值为 6.0,可溶性淀粉 27.5 g/L,玉米浆 8.0 g/L,硫酸铵 5.0 g/L,纤维素酶酶活力达 161.34 U/mL,比优化前提高了 2.71 倍。

关键词:解淀粉芽孢杆菌 CEL-1;纤维素酶;响应面法;优化

中图分类号: S216.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0379-04

纤维素是目前地球上极为丰富可再生的生物质资源,纤维素酶能够高效地将纤维素水解成单糖进而发酵生产甲烷和乙醇等生物燃料^[1-3]。纤维素酶广泛存在于生物体中^[4-5],其产生菌大多为细菌、放线菌和丝状真菌等^[6-8]。其中细菌因生长周期短、培养条件简单、生长和产酶稳定而受到广泛关注。

由于纤维素酶的活力是限制纤维素酶进一步运用的关键,目前在已得到高产菌株的基础上,获得高效纤维素酶最简单的方法就是进行发酵条件优化。响应面分析法(RSM)因其所需试验次数少、周期短、能确定多种因素间的交互作用,并可通过多元二次回归方程精确预测最终产量,已被广泛应用于各种领域。张蕾等利用响应面分析法优化芽孢杆菌 T3-4 的产脂肪酶发酵条件,脂肪酶活性提高了 24.79 倍^[9]。苟亚峰等利用响应面法对产内切菊粉酶菌株培养条件进行了优化后,内切菊粉酶活性较优化前提高了 1.55 倍^[10]。梁昌聪等人采用响应面法优化解淀粉芽孢杆菌 C101 发酵培养基,测得的实际平均芽孢含量与预测芽孢含量相近,比之前的芽孢含量提高了 188%^[11]。这些都足以表明,响应面分析法是一种科学、有效的试验优化方法。

目前,国内外学者虽有利用响应面法进行解淀粉芽孢杆菌发酵条件优化,但因其具有的广谱抑菌活性,产生的代谢产物在生物防治方面有特殊的效果,所以学者大多在研究其抗真菌和细菌的能力^[12-14],而研究其产纤维素酶的相对较少^[15-16]。本研究以解淀粉芽孢杆菌 CEL-1 (*Bacillus amyloliquefaciens* CEL-1) 为出发菌株,利用响应面法对其产

纤维素酶的发酵条件进行优化,为高产纤维素酶菌株的开发及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

Bacillus amyloliquefaciens CEL-1,由笔者所在实验室自行筛选鉴定保存。

1.2 试验方法

1.2.1 产纤维素酶菌株的鉴定 从沼气站秸秆堆肥中分离筛选得到 1 株纤维素酶高产菌株,将该菌株在 27 ℃ 下培养 12~16 h,利用细菌基因组提取试剂盒对其进行总 DNA 的提取。以基因组 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 通用引物,PCR 扩增所筛选出菌株的 16S rDNA,并将扩增片段进行测序。将测序后的序列通过与 GenBank 中的已有基因序列进行 Blast 比对,确定本研究中菌株的种属。

1.2.2 酶活力测定方法 采用 DNS 法测定酶反应体系中产生的还原糖^[17],酶活的测定均以该组灭活的酶作为对照。酶活力单位定义为在试验条件下,1 min 催化底物产生 1 μg 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力(U)。

1.2.3 最适碳氮源筛选试验 改变 LB 培养基中的碳氮源种类以及浓度,碳源种类分别为蔗糖、葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖、木糖;碳源浓度分别为 5、10、15、20、25、30、35、40 g/L;氮源种类为大豆饼粉、蛋白胨、玉米浆、酵母粉、牛肉膏、CH₄NO₂、(NH₄)₂SO₄、KNO₃;氮源浓度分别为 5、10、15、20、25、30、35、40 g/L。

1.2.4 响应面优化设计

1.2.4.1 Plackett-Burman 试验-显著影响因素的筛选 根据已确定好的碳源和氮源,选用 $n=12$ 的 Plackett-Burman 试验设计,为了增加准确性,设置 3 个空白作为误差分析项,对可能影响解淀粉芽孢杆菌 CEL-1 液体发酵产纤维素酶的 8 个因子进行全面考察。

1.2.4.2 最陡爬坡试验 根据 Plackett-Burman 试验筛选出的 3 个显著因素和其给出的一次拟合方程系数的正负,确

收稿日期:2014-12-22

基金项目:车用生物燃料技术国家重点实验室开放课题(编号:2013024);国家“863”计划。

作者简介:李衡香(1991—),女,江苏溧阳人,硕士研究生,主要研究方向为生物质能源的预处理。E-mail:15195997172@163.com。

通信作者:贾红华,副研究员,主要研究方向为生物能源。E-mail:hhjia@njtech.edu.cn。

定该因素的爬坡方向和步长进行最陡爬坡试验,找出酶活最高的区域。

1.2.4.3 Box – Behnken 设计及响应面分析 根据单因素试验所筛选的可溶性淀粉、玉米浆和硫酸铵,应用 3 因素 3 水平的 Box – Behnken 设计^[18],以所产纤维素酶酶活为响应值,采用响应面法进行分析,试验因素及水平见表 1。响应面试验结果运用 Design Expert 分析软件进行方差分析。为了验证所得结果的可靠性,结合实际试验条件,在优化条件下进行验证试验,经过 3 次平行试验后取平均值。

表 1 Box – Behnken 设计及各因子水平编码			
水平	A:可溶性淀粉(g/L)	B:玉米浆(g/L)	C:硫酸铵(g/L)
-1	22.5	8	4
0	25.0	10	5
1	27.5	12	6

2 结果与分析

2.1 产纤维素酶的菌株的鉴定

本研究所用菌株通过用 16S rDNA 序列与 GenBank 中已有基因序列进行 Blast 比对后,结果发现该序列与解淀粉芽孢杆菌的 16S rDNA 同源性为 97%,将该菌株命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* CEL – 1^[19]。

2.2 最适碳氮源筛选试验

2.2.1 最适碳源的选择 由图 1 可见,碳源种类对产纤维素酶的影响较大,作为能被快速吸收的单糖,葡萄糖对于菌株 CEL – 1 产酶没有较好的效果,而作为多糖的可溶性淀粉却对产酶活力有非常好的促进作用,原因可能是 *B. amyloliquefaciens* 具有很好的淀粉酶活性,并且正因为它不易被其他菌直接吸收而可以减少其他微生物的污染。可溶性淀粉的浓度对菌株 CEL – 1 产纤维素酶活力的影响见图 2,随着可溶性淀粉浓度升高至 25 g/L 时,产酶活力不断增加并达到最高,随后其浓度进一步升高却抑制了菌株 CEL – 1 产酶。因此,最适的可溶性淀粉浓度为 25 g/L。

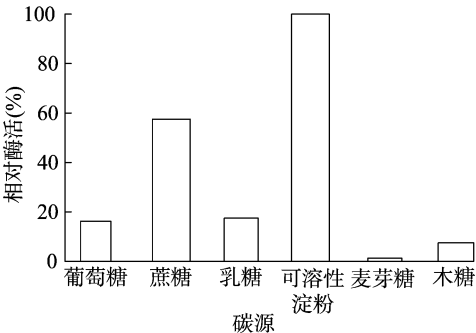


图1 碳源种类对产纤维素酶的影响

2.2.2 最适氮源的选择 由图 3 可见,有机氮源相对于无机氮源来说效果较好,同时一些成本较低的氮源(大豆饼粉、玉米浆)也表现出较好的效果,相对酶活也能达 80% 以上。虽然牛肉膏较玉米浆效果稍好,但牛肉膏的成本相对较高,所以选择廉价的玉米浆作为氮源。玉米浆浓度对产纤维素酶的影响见图 4,当玉米浆浓度从 5 g/L 增加到 10 g/L,提高了菌株 CEL – 1 产酶活力;而当浓度高于 10 g/L 的时候,产酶急剧下

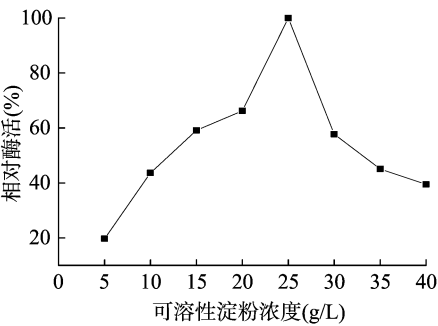


图2 可溶性淀粉浓度对产纤维素酶的影响

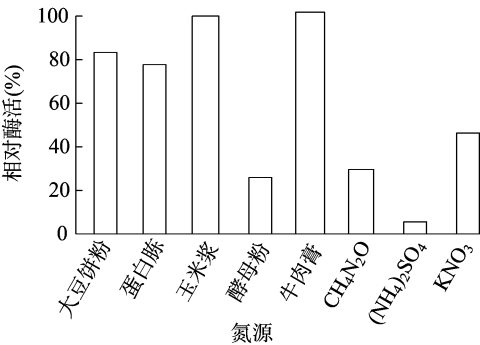


图3 氮源种类对产纤维素酶的影响

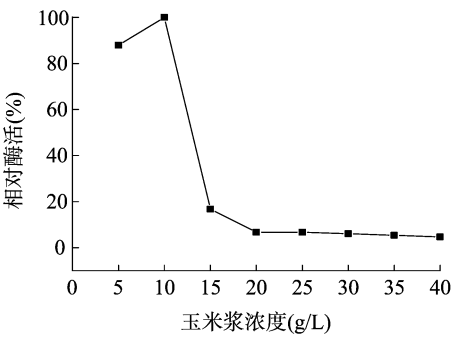


图4 玉米浆浓度对产纤维素酶的影响

降,可以说明,玉米浆的浓度对菌产酶是一个特别显著的因素,而当浓度达到 20 g/L 以上时,产酶维持在一个稳定的低水平。因此,最适的玉米浆浓度为 10 g/L。

2.3 响应面设计结果分析

2.3.1 Plackett – Burman 试验设计及结果分析 Plackett – Burman 试验结果(表 2),通过对不同组合所表现出来的解淀粉芽孢杆菌 CEL – 产纤维素酶活力的观察,并结合软件对 Plackett – Burman 试验的结果的分析(表 3),可以看出对 *B. amyloliquefaciens* CEL – 1 产酶量影响相对显著的因子依次为 A > B > E,即可溶性淀粉 > 玉米浆 > 硫酸铵。硫酸铵通常在培养基中充当氮源的角色^[20],而通过图 3 可以看出,在它作为氮源时对产纤维素酶量的作用不大,但由于它也是一种酸性盐,若菌将其利用,一般是铵离子被利用,则可能会起到调剂 pH 值的作用从而能显著影响 *B. amyloliquefaciens* CEL – 1 产纤维素酶。同时,可溶性淀粉和硫酸铵对其产生的是正效应,而玉米浆产生的是负效应,选择这 3 个显著因素作为进一步优化试验的关键因素。

表 2 Plackett – Burman 度试验设计各因素水平及评价

变量	因素	水平		<i>t</i> 检验	<i>P</i> > <i>t</i>	重要性 排序
		低 (-1)	高 (1)			
A	可溶性淀粉(g/L)	20	25	1.54	0.222	1
B	玉米浆(g/L)	5	10	-1.23	0.307	2
C	氯化钠(g/L)	5	10	-0.23	0.833	7
D	硫酸镁(g/L)	1	5	0.35	0.752	5
E	硫酸铵(g/L)	1	5	0.69	0.539	3
F	磷酸二氢钾(g/L)	1	5	-0.19	0.860	8
G	接种量(mL)	10	20	0.31	0.779	6
H	pH 值	6	7	0.42	0.701	4

2.3.2 最陡爬坡试验 Plackett – Burman 试验得出的结果为可溶性淀粉对 *B. amyloliquefaciens* CEL – 1 产纤维素酶的影响最大,其次为玉米浆,再次为硫酸铵,又由于可溶性淀粉和硫酸铵对其产生的是正效应,而玉米浆产生的是负效应,因此可溶性淀粉和硫酸铵的浓度应依次增加,而玉米浆则反之。由表 3 可知,随着可溶性淀粉,玉米浆和硫酸铵的变化,发酵液中的纤维素酶的酶活由 97.27 U/mL 上升至 128.99 U/mL,之后又下降到 109.96 U/mL,而当纤维素酶酶活最高的时候,所对应的可溶性淀粉为 25 g/L、玉米浆 10 g/L、硫酸铵 5 g/L,由此,最大产酶区在第 5 次试验附近,故以试验 5 的条件为响应面试验因素水平的中心点。

表 3 最陡爬坡试验设计结果

试验编号	可溶性淀粉 (g/L)	玉米浆 (g/L)	硫酸铵 (g/L)	酶活 (U/mL)
1	12.5	18	1	97.27
2	15.0	16	2	106.78
3	20.0	14	3	112.07
4	22.5	12	4	125.81
5	25.0	10	5	128.99
6	27.5	8	6	119.47
7	30.0	6	7	117.36
8	32.5	4	8	109.96

2.3.3 Box – Behnken 设计及响应面分析 综合分析单因素爬坡试验所确定的显著因子的最优水平,选择对纤维素酶活力影响显著的可溶性淀粉、玉米浆和硫酸铵 3 个因素为自变量,根据 Box – Behnken 试验设计,以纤维素酶活力为响应值设计试验。响应面试验设计及结果见表 4。

根据试验得到的纤维素酶酶活结果,运用 Design – Expert 软件对其进行多元回归分析,分析结果见表 5。从表 5 可以发现,该模型 R^2 为 0.976 5,表明预测值与试验值之间有 97.75% 的相关性,同时,调整型决定系数 R^2_{Adj} 为 0.946 3,也说明了方程模型的可信度比较高,能够较好地预测试验的结果。回归模型 P 值($P > F$) < 0.000 1,表明建立的回归模型是显著的($P < 0.05$);失拟项 P 值为 0.097 1 > 0.05,表明失拟不显著,模型没有失拟现象。经过回归拟合得到二次多项式方程: $R_1 = 161.34 + 13.51A - 4.44B + 0.56C - 0.74AB + 2.59AC - 2.96BC - 8.33A^2 - 5.00B^2 - 6.11C^2$ 。其中 R_1 为纤维素酶活力。

表 4 Box – Behnken Design 试验设计及其结果

试验编号	可溶性淀粉 (g/L)	玉米浆 (g/L)	硫酸铵 (g/L)	纤维素酶活力 (U/mL)
1	-1	0	-1	134.70
2	-1	-1	0	140.62
3	1	0	-1	156.90
4	0	0	0	159.86
5	1	0	1	164.30
6	0	-1	-1	149.50
7	0	0	0	161.34
8	0	0	0	164.30
9	0	1	-1	150.98
10	1	-1	0	168.74
11	0	1	1	145.06
12	0	0	0	159.86
13	0	-1	1	155.42
14	-1	0	1	131.73
15	0	0	0	161.34
16	1	1	0	153.94
17	-1	1	0	128.77

表 5 Box – Behnken Design 试验方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> > <i>F</i>
模型	2 298.73	9	255.41	32.32	< 0.000 1
A:可溶性淀粉	1 459.41	1	1 459.41	184.67	< 0.000 1
B:玉米浆	157.74	1	157.74	19.96	0.002 9
C:硫酸铵	2.46	1	2.46	0.31	0.593 9
AB	2.19	1	2.19	0.28	0.614 8
AC	26.84	1	26.84	3.40	0.107 9
BC	35.05	1	35.05	4.44	0.073 2
A ²	291.88	1	291.88	36.93	0.000 5
B ²	105.08	1	105.08	13.30	0.008 2
C ²	156.97	1	156.97	19.86	0.002 9
残差	55.32	7	7.90		
失拟项	42.17	3	14.06	4.28	0.097 1
纯误差	13.15	4	3.29		
总回归	2 354.05	16			
R ²	0.976 5				
R ² _{Adj}	0.946 3				

利用 Design – Expert 软件对回归模型进行分析,得到响应面立体分析见图 5,分别表示了可溶性淀粉、玉米浆和硫酸铵 2 个因素两两之间的相互作用对响应值的影响,图 5 – a 中,当硫酸铵固定为 5 g/L 时,随着玉米浆从 8 g/L 增加到 10 g/L 时,可溶性淀粉由 22.5 g/L 增大至 27.5 g/L 的过程中,纤维素酶活力均呈现先增大后平缓的趋势,曲面的顶点即为纤维素酶活力最大值点,同时相对于其他交互因子,可溶性淀粉和玉米浆两因子交互作用更为显著,并且利用回归方程对最值进行求解,得到模型的最佳理论值点,即当可溶性淀粉、玉米浆和硫酸铵的浓度分别达到 27.25、8.75、5.39 g/L 时,响应值 R_1 能达到最大值,即解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶活力能达 168.91 U/mL。

2.3.4 响应面设计结果验证与分析 为了验证在此条件下响应面分析的可靠性,根据响应面分析得到的理论上纤维素酶酶活最高时各因素的工艺参数,结合实际试验条件,将各因

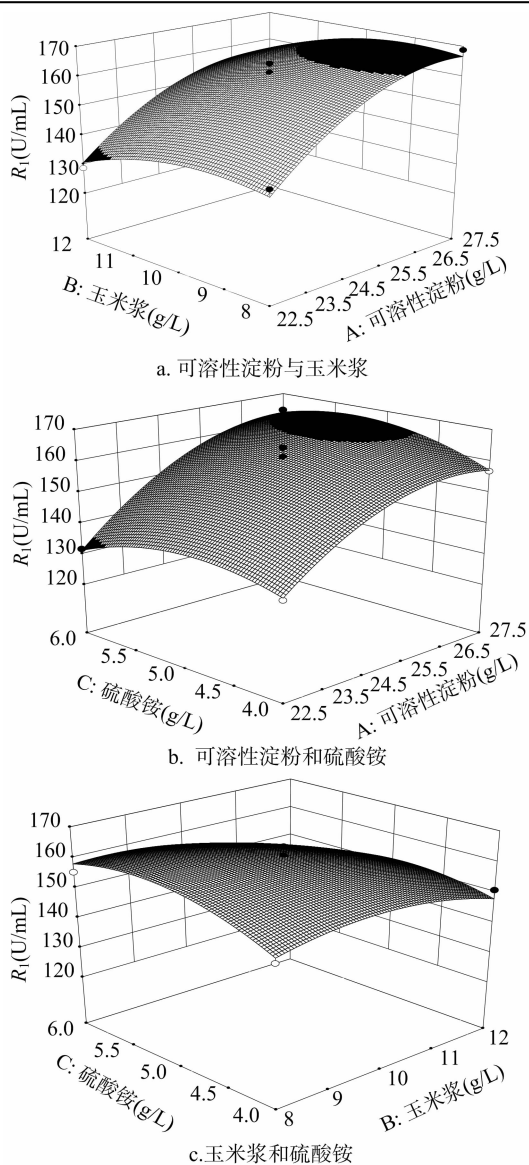


图5 因子间交互作用

素参数设定为可溶性淀粉 27.5 g/L、玉米浆 8 g/L、硫酸铵 5 g/L,其他因子不变,进行 3 次重复试验验证,测得纤维素酶活力的平均值为 161.34 U/mL,与理论预测值 168.91 U/mL 接近,可见该模型能较好地预测菌株 CEL-1 产纤维素酶活力,具有较高的参考价值。

3 结论

本研究在单因素试验的基础上进行响应面分析,对 *B. amyloliquefaciens* CEL-1 产纤维素酶的发酵条件进行了优化。结合实际试验后的研究表明,菌株的最适发酵培养基配方为可溶性淀粉 27.5 g/L、玉米浆 8.0 g/L、硫酸铵 5.0 g/L,此时的发酵条件为温度 27℃、装液量 10 mL、转速 200 r/min,初始 pH 值为 6.0,接入菌量 1%,发酵时间 60 h,实际产得的纤维素酶活力高达 161.34 U/mL,较之前未优化的提高了 2.71 倍,这说明了响应面法能够有效地提高纤维素酶的产量。

参考文献:

- [1] 谢占玲,吴润. 纤维素酶的研究进展[J]. 草业科学,2004,21(4):72-76.
- [2] 吕伟民. 纤维素酶在酒精发酵中的应用[J]. 酿酒,2008,35(2):50-51.
- [3] Tyndall R M. Improving the softness and surface appearance of cotton fabrics and garments by treatment with cellulase enzymes[J]. Textile Chemist & Colorist,1992,24(6).
- [4] Smant G,Stokkermans J P,Yan Y,et al. Endogenous cellulases in animals;isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1998,95(9):4906-4911.
- [5] Watanabe H,Noda H,Tokuda G,et al. A cellulase gene of termite origin[J]. Nature,1998,394(6691):330-331.
- [6] 王仪明,张宗舟,蒯海明,等. 绿色木霉固态发酵产纤维素酶活力的研究[J]. 草业科学,2009,26(5):123-127.
- [7] 张倩,王宝维,张名爱,等. 鹅源草酸青霉 F67 产纤维素酶培养条件的优化[J]. 沈阳农业大学学报,2009,40(1):47-52.
- [8] 乔君毅,亢晋,张福元,等. 黑曲霉发酵玉米秸秆产纤维素酶的研究[J]. 饲料研究,2008,29(12):63-66.
- [9] 张蕾,黎继烈,蒋丽娟. 响应面法优化芽孢杆菌产脂肪酶发酵条件[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(9):126-131.
- [10] 苟亚峰,王丹,孙丹,等. 一株产内切菊粉酶菌株培养条件的响应面优化[J]. 食品工业科技,2013,34(19):135-140.
- [11] 梁昌聪,郭立佳,刘磊,等. 响应面法优化解淀粉芽孢杆菌 C101 发酵培养基[J]. 生物技术通报,2014(8):169-174.
- [12] Zhao P,Quan C,Wang Y,et al. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*[J]. Journal of Basic Microbiology,2014,54(5):448-456.
- [13] Chen D,Liu X,Li C,et al. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt[J]. Journal of Environmental Management,2014,137:120-127.
- [14] Wang Y,Lu Z X,Bie X M,et al. Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin[J]. European Food Research and Technology,2010,231(2):189-196.
- [15] Lee S H,Chae J P,Kim M J,et al. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* ATC6 producing acidic cellulase[J]. Journal of Animal Science and Technology,2010.
- [16] 崔海洋,程仕伟,黄田红,等. 产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌分离鉴定及酶学性质研究[J]. 食品科学技术学报,2014,32(3):43-47,53.
- [17] Mandels M,Hontz L,Nystrom J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering,2010,105(1):3-25.
- [18] 张帅,董基,吴紫俊. 米根霉固态发酵橘皮产纤维素酶工艺的优化[J]. 食品工业,2012(3):27-31.
- [19] Goto K,Omura T,Hara Y,et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology,2000,46(1):1-8.
- [20] 江意义,宗斯,李洋,等. 纤维素酶高产菌株的筛选及产酶条件的研究[J]. 安徽农学通报:上半月刊,2010,16(21):48-50,52.