

藏金萍, 韩志校, 姜军坡. 响应面法优化产纤维素酶菌株深层液体发酵的条件[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 368–370, 374.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.107

# 响应面法优化产纤维素酶菌株深层液体发酵的条件

藏金萍<sup>1</sup>, 韩志校<sup>2</sup>, 姜军坡<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; 2. 河北农业大学国资处, 河北保定 071000)

**摘要:**为提高解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) Tu-115 菌株产纤维素酶的能力, 以滤纸酶活力为指标, 根据 Box-Behnken 中心组合试验的设计原理, 设计 4 因素 3 水平试验, 建立以滤纸酶活力为响应值的二次回归方程模型, 并利用响应面法分析得到深层液体发酵的最优条件是: 葡萄糖含量为 4.4%, 豆饼粉含量为 0.7%, 接种量为 3.0%, 装瓶量为 67.6 mL, 此时供试菌株相应的滤纸酶活力达到 12.32 U/mL, 菌株产纤维素酶活力提高了 27.4 倍。

**关键词:**响应面; 滤纸酶; 纤维素酶; 发酵条件; 菌株

**中图分类号:** TQ920.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0368-03

纤维素是丰富的可再生资源 and 碳水化合物, 可转化为糖类, 并进一步转化成乙醇、菌体蛋白或气体燃料。农作物秸秆的主要成份是纤维素, 而我国目前农作物秸秆的年产量可达 10 t, 其中一半以上被焚烧或废弃<sup>[1]</sup>。人口增加和耕地面积锐减之间的矛盾, 使人畜争粮问题日益突显。通过纤维素酶降解、利用纤维素资源已成为目前非常规资源研究的热点<sup>[2]</sup>, 提高纤维素的转化效率, 对解决当今世界面临的环境污染、饲料资源紧张和能源危机等具有重大的现实意义<sup>[3]</sup>。

纤维素酶是微生物分解纤维素时合成的一种胞外酶, 其产量直接影响纤维素的利用率。在发酵过程中, 通过一定的外部条件优化, 可以提高产酶活力<sup>[4]</sup>。纤维素酶发酵条件优化常采用单因素和正交试验设计相结合的方法, 但这种方法不能考察各因素之间的交互作用, 无法实现各因素达到最优<sup>[5]</sup>。响应面分析法通过合理的试验设计, 可使用最少的试验次数尽可能精确地估计各因素, 对各因素水平及其交互作用进行评价和优化, 快速有效地确定多因子的最佳条件<sup>[6-8]</sup>, 是一个十分有效的优化试验方法。

解淀粉芽孢杆菌 Tu-115 菌株是一株胞外产纤维素酶, 能有效抑制大肠杆菌, 本研究组对其产纤维素酶的发酵条件已进行一些研究<sup>[9-10]</sup>, 但菌株固体发酵生产机械化程度较低, 缺乏在线传感器, 过程控制较为困难, 不利于大规模生产。本试验在前期单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 组合设计, 考察影响 Tu-115 菌株深层液体发酵产纤维素酶的关键因素如葡萄糖含量、豆饼粉含量、接种量、装瓶量, 旨在利用响应面法确定该菌株液态发酵产纤维素酶的最佳工艺参数, 为其大规模液态发酵和应用奠定基础。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2015-02-16

基金项目: 国家星火计划(编号: 2010GA105010); 石家庄市科学技术研究与发展计划(编号: 08150142A)。

作者简介: 藏金萍(1981—), 男, 辽宁抚顺人, 硕士, 实验师, 主要从事分子与微生物学研究。E-mail: jipzang@163.com。

通信作者: 姜军坡, 硕士, 讲师, 主要从事农业微生物方向研究。Tel: (0312)7528273; E-mail: jip\_poe@126.com。

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 Tu-115 菌株, 由河北农业大学生命科学院制药工程系提供。

1.1.2 培养基及试剂 Mandel's 无机盐营养液、DNS 试剂, 配制方法参考文献[9]; 芽孢杆菌种子培养基和基础发酵培养基: 蛋白胨 2 g、蔗糖 2 g、Mandel's 无机盐营养液 100 mL, 自然 pH 值。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 Tu-115 菌株产纤维素酶活性的测定

1.2.1.1 酶活力测定原理 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法<sup>[11]</sup>(DNS 法)测定纤维素酶的酶活力。

1.2.1.2 标准曲线的绘制 精确称取无水葡萄糖分析纯 100 mg, 溶于蒸馏水中, 定容至 100 mL, 即得浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖标准母液; 取 11 支试管, 分别加入不同体积的葡萄糖标准母液, 用蒸馏水定容至 50 mL, 将母液稀释成不同浓度; 分别吸取 1.0 mL, 分别加入 3 mL DNS, 沸水浴 10 min; 用流水冷却至室温, 加入 6.0 mL 蒸馏水, 混匀, 测定吸光度, 以葡萄糖浓度为  $x$  轴, 吸光度为  $y$  轴绘制标准曲线。

1.2.1.3 Tu-115 发酵液纤维素酶比活力测定 取发酵液 1 mL 加入 EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min; 试管中加入 0.5 mL 上清液, 加入 1 mL 浓度为 1 mol/L NaOH 溶液, 摇匀以终止反应; 加入 75 mg 滤纸和 1.5 mL 浓度为 0.05 mol/L、pH 值为 4.5 的乙酸钠溶液, 50 °C 反应 30 min; 加入 3 mL DNS 试剂, 沸水浴 10 min, 冷却, 所得溶液作为空白调零。

在另 1 支试管中加入 75 mg 滤纸、1.5 mL 浓度为 0.05 mol/L、pH 值为 4.5 的乙酸钠溶液和 0.5 mL 粗酶液, 50 °C 反应 30 min, 加入 1 mL 浓度为 1 mol/L NaOH 溶液, 摇匀以终止反应; 加入 3 mL DNS 试剂, 沸水浴 10 min, 冷却, 测定吸光度。每 1 min 催化纤维素水解生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位(U)。

1.2.2 Tu-115 菌株种子液培养 将菌种用 5 mL 无菌蒸馏水从 1 支斜面培养基上冲洗下来, 接种于装有种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 装瓶量为 100 mL; 37 °C 200 r/min, 摇床培养 12 h, 待用。

1.2.3 响应面优化 Tu-115 菌株产纤维素酶条件 采用

Box - Benhnken 组合设计,对影响菌株产纤维素酶的 4 个因素分别选取不同水平(表 1),以进行响应面优化分析。

表 1 响应面试验因素与水平设计

编码	葡萄糖含量 (%)	豆粕粉含量 (%)	接种量 (%)	装瓶量 (mL)
-1	2	0.5	2	50
0	4	1.5	4	75
1	6	2.5	6	100

2 结果与分析

2.1 DNS 法测定葡萄糖浓度的标准曲线

根据 DNS 法测定葡萄糖吸光度值,得回归方程为  $y = 1.3938x (r^2 = 0.9966)$ ,其线性关系良好。绘制葡萄糖标准曲线见图 1。

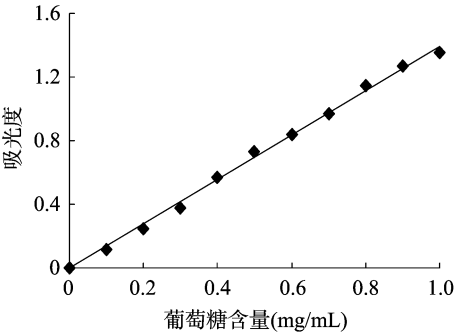


图1 DNS 法测定葡萄糖浓度的标准曲线

2.2 响应面发酵试验与数据回归

采用 Box - Benhnken 组合设计,对影响菌株 Tu - 115 产纤维素酶的 4 个关键因素进行 29 组试验,计算滤纸酶活力及其平均值(表 2)。采用 Design Expert 8.0.6 软件,对响应面试验数据进行多元回归拟合,以滤纸酶活力为响应值(Y),葡萄糖含量、豆粕粉含量、接种量、装瓶量为自变量,建立回归方程为: $Y = -47.096 + 15.537A + 1.526B + 1.529C + 1.198D +$

$0.258AB + 0.297AC - 5.208 \times 10^{-3}AD + 0.364BC + 1.347 \times 10^{-2}BD + 0.0680CD - 1.826A^2 - 2.877B^2 - 0.787C^2 - 1.025 \times 10^{-2}D^2 (R^2 = 0.7402)$ ,方程拟合程度良好,试验误差较小。

表 2 以滤纸酶为指标的产纤维素酶深层液体发酵条件响应面分析

试验号	A:葡萄糖含量	B:豆粕粉含量	C:接种量	D:装瓶量	滤纸酶活力(U/mL)			
					1	2	3	平均值
1	0	-1	-1	0	12.15	10.24	12.39	11.59
2	0	-1	0	-1	4.54	3.11	7.13	4.93
3	0	0	-1	-1	8.47	9.42	9.61	9.17
4	1	0	1	0	7.89	6.70	9.85	8.15
5	0	1	-1	0	3.64	4.50	5.36	4.50
6	1	0	-1	0	6.41	4.21	6.36	5.66
7	-1	0	1	0	1.39	0.48	1.67	1.18
8	-1	1	0	0	2.50	2.06	2.47	2.34
9	1	0	0	1	5.21	4.45	5.88	5.18
10	1	0	0	-1	4.40	6.07	6.70	5.72
11	0	0	0	0	4.37	3.61	4.20	4.07
12	-1	-1	0	0	6.22	6.27	3.49	5.33
13	0	0	0	0	4.20	4.85	3.95	4.33
14	0	0	1	1	1.54	2.03	2.46	2.01
15	-1	0	-1	0	0.32	0.45	0.40	0.39
16	1	-1	0	0	3.92	5.79	5.69	5.13
17	0	1	1	0	2.52	1.77	2.07	2.12
18	0	1	0	-1	2.07	2.46	1.83	2.12
19	0	-1	0	1	6.62	6.46	4.02	5.70
20	0	0	-1	1	2.65	1.75	3.20	2.54
21	1	1	0	0	2.97	3.22	2.49	2.89
22	0	0	0	0	4.07	3.64	4.34	4.02
23	0	1	0	1	2.97	3.35	3.86	3.39
24	0	-1	1	0	9.02	8.07	7.43	8.17
25	0	0	1	-1	3.44	3.51	4.37	3.77
26	0	0	0	0	4.43	3.51	3.92	3.95
27	-1	0	0	-1	2.55	3.03	2.77	2.78
28	-1	0	0	1	2.47	3.12	2.25	2.61
29	0	0	0	0	4.00	5.07	3.79	4.29

2.3 回归方程显著性检验

由表3可见,以滤纸酶为指标的产纤维素酶深层液体发

表 3 以滤纸酶为指标的产纤维素酶深层液体发酵条件响应面模型和回归系数显著性检验

方差来源	总偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	P 值	显著性
模型	258.43	14	15.243 0	3.435 867	0.004 3	**
A	27.308 04	1	27.308 04	5.636 723	0.032 4	*
B	46.034 77	1	46.034 77	9.502 155	0.008 1	**
C	5.926 451	1	5.926 451	1.223 294	0.287 4	
D	4.141 568	1	4.141 568	0.854 872	0.370 8	
AB	0.136 427	1	0.136 427	0.028 16	0.869 1	
AC	0.717 643	1	0.717 643	0.148 13	0.706 1	
AD	0.034 599	1	0.034 599	0.007 142	0.933 8	
BC	0.271 259	1	0.271 259	0.055 991	0.816 4	
BD	0.057 832	1	0.057 832	0.011 937	0.914 5	
CD	5.924 647	1	5.924 647	1.222 922	0.287 4	
A <sup>2</sup>	44.135 78	1	44.135 78	9.110 18	0.009 2	**
B <sup>2</sup>	10.159 43	1	10.159 43	2.097 034	0.169 6	
C <sup>2</sup>	8.2105 91	1	8.2105 91	1.694 769	0.214 0	
D <sup>2</sup>	33.931 71	1	33.931 71	7.003 932	0.019 2	*
误差项	67.825 33	14	4.844 666			
失拟项	66.005 39	10	6.600 539	14.507 21	0.221 3	
纯误差	1.819 934	4	0.454 984			
所有项	226.256 3	28				

注:“\*”为差异显著(P<0.05);“\*\*”为差异极显著(P<0.01)。

醇条件响应面模型  $P$  值为 0.004 3, 小于 0.01, 说明不同条件下差异具有极显著性, 试验方法可行; 失拟项不显著, 这表明模型选择相对合适;  $A$ 、 $B$ 、 $A^2$ 、 $D^2$  对滤纸酶活的影响显著, 其他各因素交互作用均不显著, 各试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系; 由  $P$  值大小可知, 各因素对结果的影响大小为: 豆饼粉含量 > 葡萄糖含量 > 接种量 > 装瓶量。离散系数 ( $CV$ ) 一般表示试验的精确度, 其值越小, 试验结果的可靠性越高, 本试验  $CV$  值为 0.004 3, 在可接受范围内, 所得二次回归方程可以很好地对响应值进行预测。

#### 2.4 响应面分析

利用 Design Expert 软件对数据进行二次多元回归, 拟合得到二次回归方程的响应曲面及其等高线。由图 2 至图 7 可见, 葡萄糖含量与豆饼粉含量相互作用较弱, 沿豆饼粉含量方向的等高线密度大于沿葡萄糖含量方向的等高线密度, 豆饼粉含量对酶活力的影响大于葡萄糖含量 (图 2); 葡萄糖的含量与接种量相互作用较强, 沿葡萄糖含量方向的等高线密度大于沿接种量方向的等高线密度, 葡萄糖含量对酶活力的影响大于接种量 (图 3); 葡萄糖的含量与装瓶量相互作用较强, 沿葡萄糖含量方向的等高线密度大于沿装瓶量方向的等高线密度, 葡萄糖含量对酶活力的影响大于装瓶量 (图 4); 接种量与豆饼粉的含量相互作用较强, 沿豆饼粉含量方向的等高线密度大于沿接种量方向的等高线密度, 豆饼粉含量对酶活力的影响大于接种量 (图 5); 豆饼粉含量与装瓶量相互作用较强, 沿豆饼粉含量方向的等高线密度大于沿装瓶量方向的等高线密度, 豆饼粉含量对酶活力的影响大于装瓶量 (图 6); 接种量与装瓶量的相互作用较强, 沿装瓶量方向的等高线密度小于沿接种量方向的等高线密度, 装瓶量对酶活力的影响小于接种量 (图 7)。

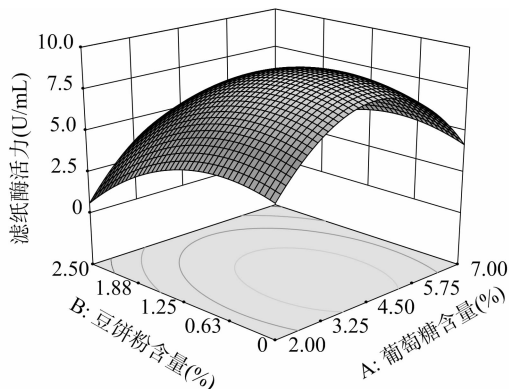


图2 葡萄糖含量和豆饼粉含量的响应曲面图及其等高图

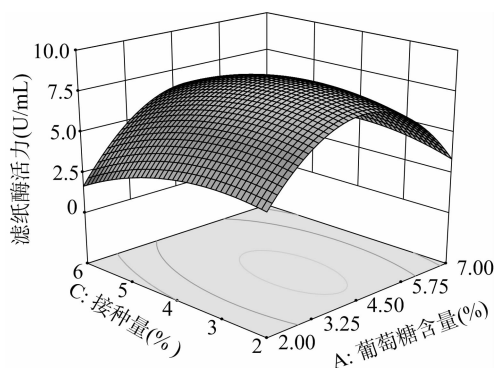


图3 葡萄糖含量和接种量的响应曲面图及其等高图

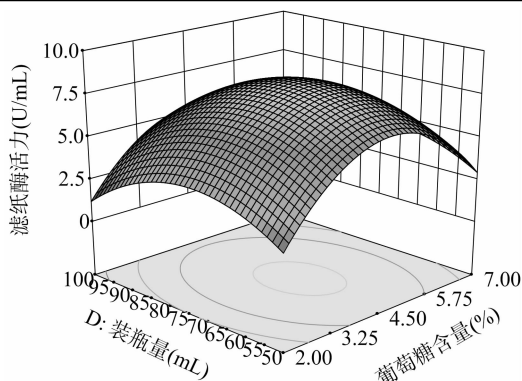


图4 葡萄糖含量和装瓶量的响应曲面图及其等高图

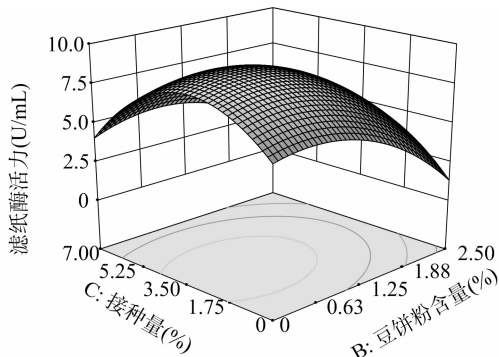


图5 豆饼粉含量和接种量的响应曲面图及其等高图

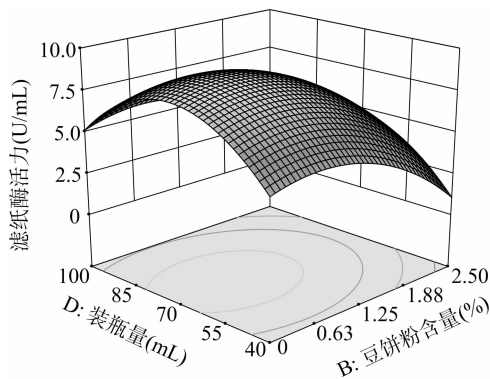


图6 豆饼粉含量和装瓶量的响应曲面图及其等高图

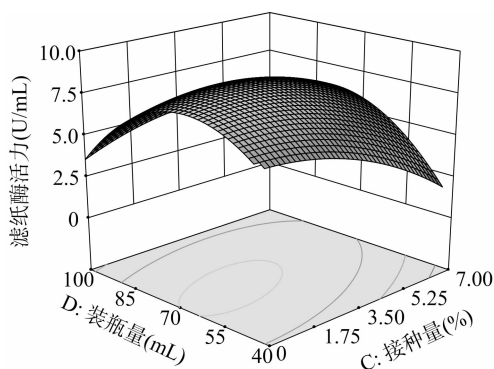


图7 接种量和装瓶量的响应曲面图及其等高图

#### 2.5 Tu-115 菌株产纤维素酶响应面结果的优化分析和条件验证

试验结果表明, 回归方程对响应面法优化 Tu-115 菌株 (下转第 374 页)

草地、园地和耕地因定期施肥和定期翻耕,因此养分相对较高。

根据对3种土壤酶的分析可知,土壤酶的活性与土层深度有关,酶活性在0~60 cm随土层增加而降低,这与植物枯枝落叶和残根集中在土壤表层有关。而通过对不同土地利用方式养分和酶活性的相关性分析可知土壤酶活性与有机质、速效氮、速效磷、速效钾有一定的相关,这与薛蕙等<sup>[3]</sup>和梁毅等<sup>[15]</sup>的结论基本相符。

土地的利用方式对土壤养分含量高低和土壤酶活性强弱会有影响,因此合理的土地管理方式和施肥可以提高农业生产效益,为防止土地荒漠化、盐碱化等土地问题提供科学依据。同时,增加覆被植物种类可以间接提高土壤肥力,进而提高生态系统的稳定性。

### 参考文献:

- [1] 赵瑞芬,张一弓,张强,等. 不同土地利用方式对土壤养分状况的影响——以太原市为例[J]. 中国农学通报,2011,27(14): 262-266.
- [2] 王莹,刘淑英,王平,等. 不同土地利用方式对秦王川灌区土壤酶活性及土壤养分的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2013(5): 107-113.
- [3] 薛蕙,李占斌,拳鹏,等. 不同土地利用方式对于热河谷地区土壤酶活性的影响[J]. 中国农业科学,2011,44(18): 3768-3777.
- [4] 陈彩虹,叶道碧. 4种人工林土壤酶活性与养分的相关性研究[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(6): 64-68.
- [5] 桂东伟,雷加强,曾凡江,等. 绿洲边缘不同土地利用方式下的土

(上接第370页)

产纤维素酶深层液体发酵条件试验结果拟合良好,可用此回归方程对该菌株产纤维素酶深层液体发酵条件进行优化分析。采用 Design Expert 8.0.6 软件获取滤纸酶活力极大值,方法为:选取 Optimization→Numerical→Criteria,选定指标“滤纸酶活力”;Goal 设定为 maximize→Solution,从 Solution 寻找最大响应值为 12.23 U/mL,此时葡萄糖含量为 4.44%、豆饼粉含量为 0.67%、接种量为 2.95%、装瓶量为 67.61 mL。考虑试验的实际情况,确定最优条件为葡萄糖含量为 4.4%、豆饼粉含量为 0.7%、接种量为 3.0%、装瓶量为 67.6 mL,此条件测定得该菌株相应的滤纸酶活力为 (12.32 ± 0.41) U/mL ( $n=6$ )。优化前采用基础发酵培养基培养该菌株对应的平均酶活力为 (0.45 ± 0.02) U/mL ( $n=6$ ),优化后菌株产纤维素酶活力提高了 27.4 倍。

### 3 结论

本试验采用 DNS 染色法,通过 Box-Behnken 试验设计及响应面分析,对以 Tu-115 菌株产纤维素酶的深层液体发酵条件进行优化,得到由影响产纤维素酶活力发酵的各因素变量构成的二次方程,该模型回归显著,对试验结果拟合良好。在此基础上,确定 Tu-115 菌株产纤维素酶的深层液体发酵最优工艺条件,为该菌株的大规模发酵和应用奠定了良好基础。采用响应面法能很好地预测产纤维素酶的深层液体发酵条件,方法简单易行,结果可靠,具有一定的实用和推广价值。

- 壤质量变化及分析[J]. 环境科学,2010,31(9): 2248-2253.
- [6] 贡璐,张雪妮,吕光辉,等. 塔里木河上游典型绿洲不同土地利用方式下土壤质量评价[J]. 资源科学,2012,34(1): 120-127.
- [7] 林明珠,谢世友,林玉石. 喀斯特山地不同土地利用方式土壤养分特征研究[J]. 中国水土保持,2009(9): 8-10.
- [8] 阳利永,吴献花,赵斌,等. 滇池柴河流域不同土地利用方式土壤养分剖面分异[J]. 水土保持研究,2012,19(5): 95-99.
- [9] 任勃,杨刚,谢永宏,等. 洞庭湖区不同土地利用方式对土壤酶活性的影响[J]. 生态与农村环境学报,2009,25(4): 8-11.
- [10] 刘梦云,常庆瑞,齐雁冰,等. 宁南山区不同土地利用方式土壤酶活性特征研究[J]. 中国生态农业学报,2006,14(3): 67-70.
- [11] 陈新燕. 不同土壤管理方式对南疆干旱区梨园土壤性质的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2012.
- [12] 王莹. 秦王川灌区不同土地利用方式土壤活性有机碳库、土壤酶活性和土壤养分研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2013.
- [13] 高勇,伍宇春,黎磊,等. 岩溶区不同土地利用方式下土壤养分的剖面分布特征[J]. 广东农业科学,2014,41(17): 69-73.
- [14] 王莉,张强,牛西午,等. 黄土高原丘陵区不同土地利用方式对土壤理化性质的影响[J]. 中国生态农业学报,2007,15(4): 53-56.
- [15] 梁毅,杨慧,曹建华,等. 不同土地利用方式下土壤养分和酶活性的变化[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2013,31(1): 125-129.
- [16] 李文凤,房翠翠,牛玉昊,等. 高原地区不同农作物土壤酶活性与土壤养分关系研究[J]. 北方园艺,2014(12): 159-161.
- [17] 王兵,刘国彬,薛蕙. 退耕地养分和微生物量对土壤酶活性的影响[J]. 中国环境科学,2010,30(10): 1375-1382.

### 参考文献:

- [1] 潘春梅,王辉,任敏. 纤维素酶液体发酵工艺条件的响应面分析优化[J]. 环境科学与技术,2008,31(8): 120-124.
- [2] 杨丽娜,张建,龚月生. 响应面法优化 *Bacillus subtilis* NP29 产纤维素酶发酵条件的研究[J]. 饲料工业,2012,33(14): 48-52.
- [3] 孙君社,李雪,董秀芹. 纤维素酶高产菌株的选育及产酶条件的研究[J]. 北京林业大学学报,2002,24(2): 85-87.
- [4] 李悦,薛桥丽,李世俊,等. 响应面法优化小刺青霉 16-7 产纤维素酶液体发酵工艺[J]. 食品科学,2014,35(17): 137-145.
- [5] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药:抗生素分册,1999,20(2): 58-60,66.
- [6] 胡丽娟,薛高尚,卢向阳,等. 响应面法优化芽孢杆菌 25-2 产纤维素酶发酵条件[J]. 酿酒科技,2012(4): 21-26.
- [7] 陈帅,刘琨毅,郑佳,等. 基于响应面法优化酿酒黄水酶促酯化条件的研究[J]. 食品工业科技,2012,33(12): 205-209.
- [8] 王琳,赵荷娟,魏启舜,等. 双孢蘑菇子实体多糖的响应面法优化提取及其纯化[J]. 江苏农业学报,2014,30(5): 1139-1146.
- [9] 姜军坡,朱宝成,王世英. 以滤纸酶活力为指标优化解淀粉芽孢杆菌 Tu-115 菌株产纤维素酶液体发酵条件[J]. 饲料工业,2014,35(20): 43-47.
- [10] 尚伟,姜军坡,王世英,等. 兔源益生菌 Tu-115 菌株鉴定及其产纤维素酶固体发酵条件优化[J]. 饲料工业,2012,33(2): 55-60.
- [11] 周向军,高义霞. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定芥菜多糖含量的研究[J]. 安徽农业科学,2009(35): 17297-17298,17308.