

郭建华,张春强,郭宏文,等.一株产纤维素酶细菌的发酵产酶条件优化[J].江苏农业科学,2020,48(9):298-304.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.056

一株产纤维素酶细菌的发酵产酶条件优化

郭建华¹,张春强²,郭宏文¹,邹东恢¹,王 燕¹,韩国栋¹,马 瑞¹

[1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院,黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 中粮麦芽(大连)有限责任公司,辽宁大连 116200]

摘要:以 1 株产纤维素酶的细菌 DM-4 为试验菌株,以滤纸酶(FPA 酶)活和 CMC 酶活为指标,通过单因素试验和响应面试验,优化菌株发酵产酶条件。结果显示,在发酵时间为 36 h、接种量 4%、培养基初始 pH 值 5.5~6.0、麸皮浓度 2.54%、蛋白胨浓度 0.92%、磷酸盐浓度 0.5% 的培养条件下,菌株产纤维素酶活力最高。验证试验表明,优化模型是有效和可靠的。

关键词:产纤维素酶细菌;FPA 酶;CMC 酶;发酵条件优化

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)09-0298-06

能源、环境及工农业原料生产等问题越来越影响着人们的日常生活,高产纤维素酶微生物的筛选对解决这些问题都十分重要^[1-3]。大多数细菌所产纤维素酶与真菌来源的酶性质不同,某些方面具有真菌酶不可替代的作用^[4]。细菌纤维素酶在饲料工业、洗涤剂工业及纺织工业中具有广泛的利用前景,因此在工业生产中的地位逐渐提高^[5],其中产纤维素酶的芽孢杆菌成为近年来的研究热点^[6]。本试验以从白酒酒醅中选育得到的产纤维素酶细菌菌株 DM-4 为试验菌株,利用单因素试验和响应面试验设计,优化其发酵产酶条件,为进一步的试验研究准备条件。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

菌株 DM-4,由笔者所在实验室从白酒酒醅中选育得到,经鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

1.2 培养基

种子培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%,pH 值 7.5~7.6,121℃下灭菌 30 min。发酵培养基:CMC-Na 10 g,蛋白胨 2.5 g,酵母浸出汁 1.0 g,NaCl 2.5 g,KH₂PO₄ 0.5 g,硫酸镁 0.1 g,琼脂 10 g,去离子水 500 mL,121℃下灭菌 30 min。

1.3 纤维素酶活力测定方法

待测发酵液倒入离心管中,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定酶活。滤纸酶(FPA 酶)活力测定:根据国际理论应用化学协会(IUPAC)的方法测定^[7]。CMC 酶活力测定见参考文献[8]。

1.4 菌株液体发酵产酶条件的优化

1.4.1 发酵时间的确定 发酵培养基内接入种子后,从 12 h 开始,每 12 h 取样测定酶活,直到 72 h。

1.4.2 接种量的确定 按照 1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 的接种量将种子液接入发酵培养基中,于 37℃、摇瓶转速 200 r/min 的条件下发酵 36 h 后测酶活力。

1.4.3 培养基成分的优化

1.4.3.1 碳源的优化 (1)碳源种类的优化:以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、麸皮(过 80 目筛)、玉米粉、葡萄糖、蔗糖、淀粉和微晶纤维素作为唯一碳源(2%)配制培养基,接入种子后发酵 36 h 后测酶活力。(2)碳源浓度的优化:在优化碳源种类后,配制碳源浓度为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5% 和 4% 的发酵培养基,接入突变菌株发酵 36 h 后测酶活力。

1.4.3.2 氮源的优化 (1)氮源种类的优化:优化碳源后,以蛋白胨、豆饼粉(过 80 目筛)、大豆蛋白粉、硫酸铵、硝酸钾和尿素作为唯一氮源(0.5%)配制发酵培养基,接入种子后发酵 36 h 后测酶活力。(2)氮源浓度的优化:在优化氮源种类后,配制优化氮源浓度为 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9% 和 1.1% 发酵培养基,接入种子后发酵 36 h 后测酶活力。

收稿日期:2019-05-09

基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(编号:C2017066);黑龙江省教育厅省属高校基本科研业务项目(编号:135109257)。

作者简介:郭建华(1977—),男,山东高唐人,博士,副教授,主要研究方向为微生物发酵。E-mail:gh19771123@163.com。

1.4.3.3 初始 pH 值的优化 分别配制 pH 值 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 碳氮源优化后发酵培养基,接入突变菌株发酵 36 h 后测酶活力。

1.4.3.4 磷酸盐浓度优化 配制 K_2HPO_3 浓度为 0.1%、0.5%、0.9%、1.3% 和 1.7% 的上述条件优化后的发酵培养基,接入突变菌株发酵 36 h 后测酶活力。

1.4.4 响应面设计试验 在上述优化基础上,根据 Box - Behuken 设计方法,采用 minitab 16 构建 3 因素(碳源浓度、氮源浓度和磷酸盐浓度)3 水平响应面分析^[9-10]。

1.4.5 统计分析 利用 SPASS 软件实现统计分析 & 差异显著性检验^[11]。

2 结果与分析

2.1 发酵时间的确定

接入种子液后,从发酵 12 h 开始每隔 12 h 测定 FPA 酶活和 CMC 酶活,直到发酵后 72 h,结果如图 1 所示。发酵时间为 36 h 时,菌株产 FPA 酶和 CMC 酶都表现出了比较高的酶活力,继续发酵到 48 h 会有少许增加,之后逐渐下降。经差异显著性检验,发酵 36 h 酶活与发酵 48 h 酶活差异不显著($P > 0.05$),而与其他发酵时间的酶活差异极显著($P < 0.01$),确定 36 h 为最优发酵时间。

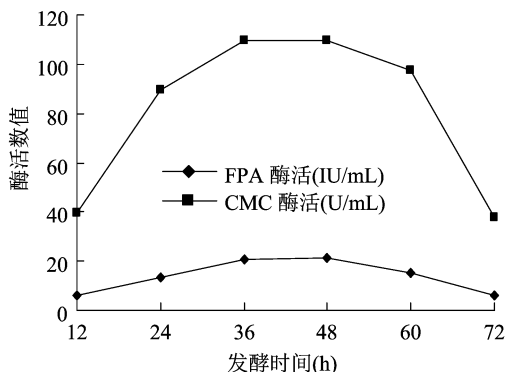


图1 不同发酵时间菌株 DM-4 产酶活力

2.2 接种量的确定

不同接种量下菌株发酵产酶结果见图 2。随接种量提高,菌株产酶活力不断提高。接种量大于 4% 时,酶活提高量变小。经差异显著性检验,4%、5% 和 6% 这 3 种接种量条件下的酶活差异不显著($P > 0.05$),综合考查,选择 4% 的接种量为优化条件。

2.3 初始 pH 值的优化

菌株 DM-4 在不同初始 pH 值条件下发酵产纤维素酶活力结果见图 3。试验结果显示,初始 pH 值为 5.5 ~ 6.0 时,菌株 DM-4 产酶活性最高。显

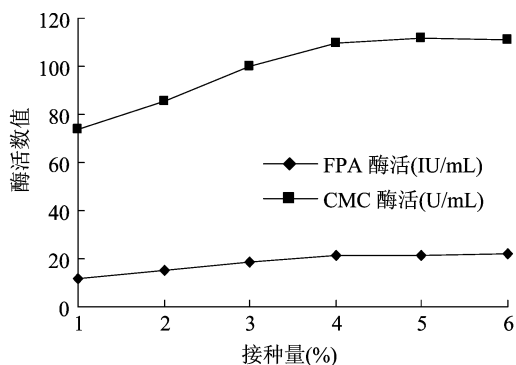


图2 不同接种量条件下菌株 DM-4 产酶活力

著性检验结果表明,初始 pH 值 5.5 条件下菌株所产酶活与初始 pH 值 6.0 条件下差异不显著($P > 0.05$),而与其他初始 pH 值条件下差异极显著($P < 0.01$),因此,确定最优产酶初始 pH 值为 5.5 ~ 6.0。

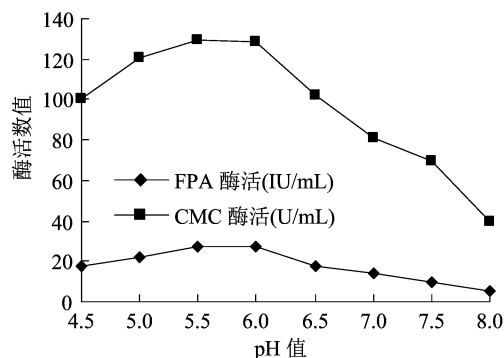


图3 不同 pH 值条件下菌株 DM-4 产酶活力

2.4 培养基组分的优化

2.4.1 碳源的优化 分别利用不同碳源作为唯一碳源配制培养基进行发酵,结果见图 4。总体分析,含有纤维素物质的碳源比不含纤维素物质的碳源所产酶活高。其中以麸皮为唯一碳源时产酶能力最强,与其他碳源比较差异极显著($P < 0.01$),确定麸皮为最优碳源。由图 5 可知,当麸皮浓度在 2.5% 以下时,随着麸皮浓度升高,酶活升高,超过 2.5% 时,酶活反而下降。在碳源浓度为 2.5% 时菌株所产酶活与其他浓度下所产酶活比较具有显著性差异。碳源浓度过低会造成营养不足,能源物质少,细胞不能生成足够的 ATP 满足菌体的生长代谢,菌体生长不良,产酶活性低;而碳源浓度过高时,能源物质充足,细胞生长快,同时发酵液黏度升高,溶氧不足,使细胞产酶量下降,降低活性。在本试验条件下选择麸皮浓度 2.5% 作为优化碳源浓度。

2.4.2 氮源的优化 分别以不同物质作为唯一氮源进行发酵试验,结果见图 6。总体而言,有机氮源产纤维酶酶活性要比无机氮源稍高。差异显著性

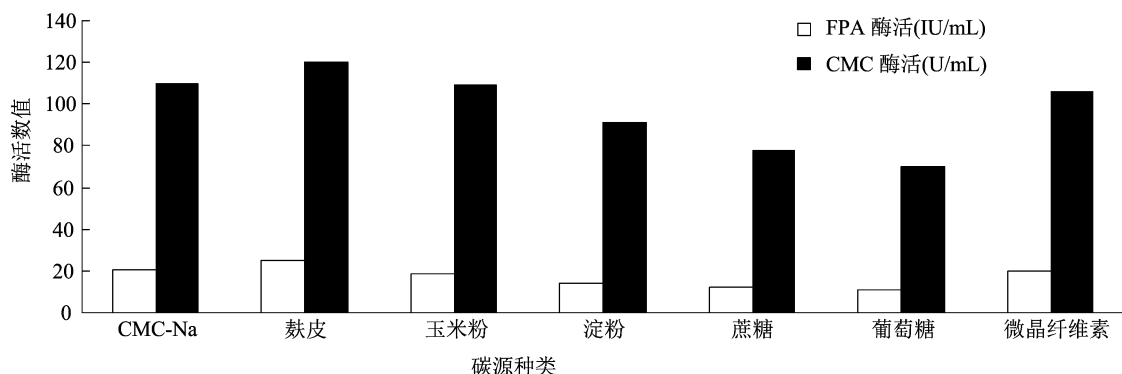


图4 不同碳源条件下菌株 DM-4 酶活力

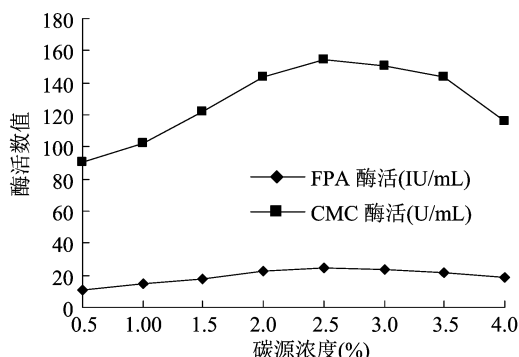


图5 不同碳源浓度条件下菌株 DM-4 产酶活力

检测表明,蛋白胨、豆饼粉和大豆蛋白粉作为氮源时,其酶活之间差异不显著($P > 0.05$),而与硫酸铵、硝酸钾和尿素作为氮源时的产酶活性差异极显著($P < 0.01$)。由于试验菌株是在酒醅中筛选出来

的,经常年不断优化,适应了有机氮源的营养,同时,有机氮源中所含的营养,除氮源外还有其他营养成分,会促进菌体产酶。综合考虑,本试验以蛋白胨作为最佳氮源。氮源浓度优化试验结果(图7)显示,随氮源浓度增加,菌株产酶活力增加,当氮源浓度为0.9%时,菌株产酶活力最高,氮源浓度继续提高至1.1%后,酶活力少许下降。氮源是细胞合成产物的重要物质,数量过少,产物合成不足,数量过多,有可能造成底物抑制,细胞合成酶的数量降低,从而使菌体产酶活性降低。通过0.9%浓度时的酶活力与其他氮源浓度下的酶活力差异性比较可知,氮源浓度0.9%时,FPA酶活和CMC酶活与其他浓度下的酶活具有显著性差异($P < 0.05$),因此,选择氮源浓度为0.9%作为优化浓度。

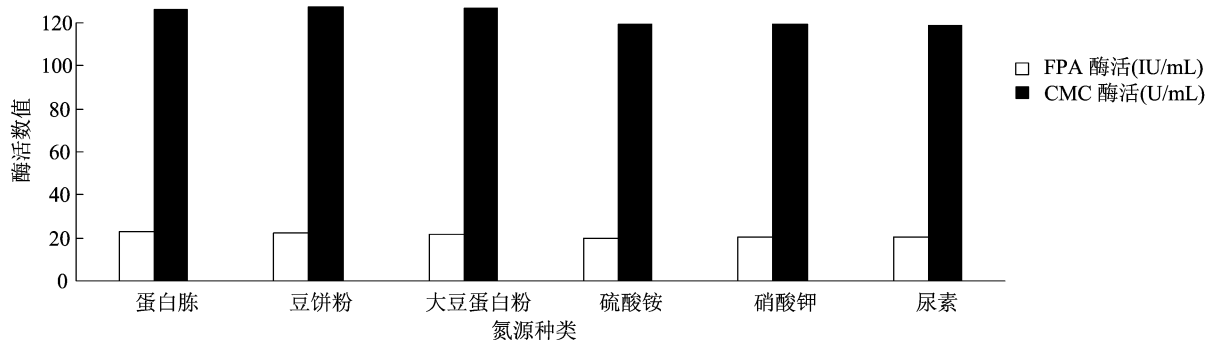


图6 不同氮源条件下突变菌株产酶活力

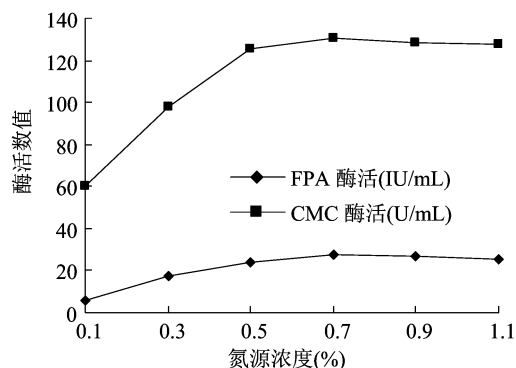


图7 不同氮源浓度下突变菌株产酶活力

2.4.3 磷酸盐浓度的优化 配制磷酸盐浓度分别为0.1%、0.5%、0.9%、1.3%和1.7%的培养基,接入菌株后进行发酵,36 h后测定纤维素酶活力,结果见图8。当磷酸盐(KH_2PO_3)浓度为0.5%时,菌株所产酶活最高。浓度进一步增加后,酶活反而下降。磷酸盐浓度很小时,磷元素不足造成细胞代谢缓慢,磷酸盐浓度过高,会引起细胞生长过快,导致营养物质只合成细胞而不产酶。显著性检验表明,在磷酸盐浓度为0.5%的条件下,与其他浓度条件下的酶活差异极显著($P < 0.01$),因此,确定磷酸盐

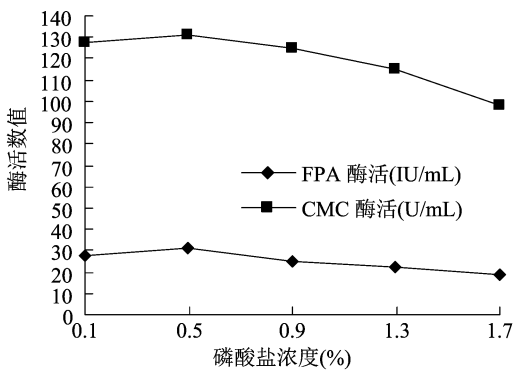


图8 不同磷酸盐浓度下突变菌株产酶活力

0.5% 的浓度作为优化结果。

2.3.5 响应面试验结果 选择碳源(麸皮)浓度、氮源(蛋白胨)浓度和磷酸盐(KH_2PO_3)浓度作为培养基组分优化因子(分别为 X_1 、 X_2 、 X_3)以 FPA 酶(Y_1)和 CMC 酶(Y_2)活力分别作为响应值设计试验方案。试验因子和水平见表 1,试验方案和结果见表 2。

表 1 Box - Behnken 试验因子及水平

水平编码	浓度(%)		
	X_1 :麸皮	X_2 :蛋白胨	X_3 :磷酸盐
-1	2.0	0.5	0.1
0	2.5	0.9	0.5
1	3.0	1.3	0.9

表 2 Box - Behnken 试验设计及结果

试验编号	试验因子			FPA 酶活 (IU/mL)	CMC 酶活 (U/mL)
	X_1	X_2	X_3		
1	1	-1	0	25.01	127.65
2	0	1	-1	27.89	128.05
3	1	1	0	24.42	126.84
4	-1	-1	0	22.18	119.08
5	-1	1	0	23.07	122.97
6	0	1	1	22.56	123.01
7	0	-1	-1	23.57	125.08
8	0	0	0	30.08	134.62
9	1	0	1	21.12	120.98
10	-1	0	1	21.55	118.97
11	1	0	-1	22.92	126.34
12	0	0	0	29.51	133.75
13	-1	0	-1	22.50	121.95
14	0	-1	1	23.65	127.39
15	0	0	0	29.84	134.05

使用 mintab 16 进行关于响应值与因子麸皮浓度(X_1)、蛋白胨浓度(X_2)和磷酸盐浓度(X_3)的二次回归分析,去掉不显著因素,得到二次表达式:

$$Y_1 = 29.81 - X_3 - 4.2675X_1^2 - 1.8725X_2^2 - 3.52X_3^2 - 1.3525X_2X_3;$$

$$Y_2 = 134.14 + 2.355X_1 - 1.3838X_3 - 6.9137X_1^2 - 3.0912X_2^2 - 5.1663X_3^2 - 1.8375X_2X_3。$$

方程显著性检验结果如表 3 至表 6 所示,2 个回归方程都具有显著性($R_1^2 = 0.936$, $R_2^2 = 0.949$, $P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),剔除其他项后,保留的各项系数都具有显著性($P < 0.05$)。根据显著性检验结果可以得知,对于菌株产 FPA 酶活力来说,培养基中的麸皮浓度和蛋白胨浓度在二次水平上影响 FPA 酶的产生,磷酸盐浓度在一次水平和二次水平上都对 FPA 酶的产生具有显著性影响,

表 3 FPA 酶回归方程显著性检验

模型	df	平方和	均方	F 值	P 值
回归	5	126.866	25.373	26.332	0.000
残差	9	8.672	0.964		
失拟	2	3.389	1.695	2.25	0.176
纯误差	7	5.283	0.755		
合计	14	135.538			

表 4 FPA 酶回归方程系数显著性检验

来源	系数	标准误差	t 值	P 值
常量	29.810 0	0.566 7	52.599	0.000
X_3	-1.000 0	0.347 1	-2.881	0.018
X_1^2	-4.267 5	0.510 8	-8.354	0.000
X_2^2	-1.872 5	0.510 8	-3.665	0.005
X_3^2	-3.520 0	0.510 8	-6.890	0.000
X_2X_3	-1.352 5	0.490 8	-2.756	0.022

表 5 CMC 酶回归方程显著性检验

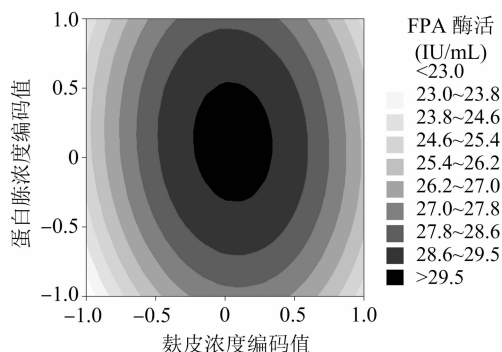
模型	df	平方和	均方	F 值	P 值
回归	6	347.998	58.000	24.82	0.000
残差	8	18.692	2.337		
失拟	4	10.407	2.602	1.26	0.415
纯误差	4	8.525	2.071		
合计	14	366.690			

表 6 CMC 酶回归方程系数显著性检验

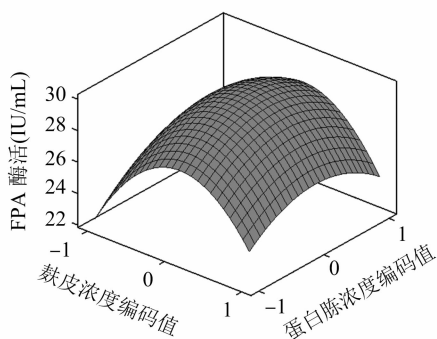
自变量	系数	标准误差	t 值	P 值
常量	134.140 0	0.883 0	152.00	0.000
X_1	2.355 0	0.540 4	4.36	0.002
X_3	-1.383 8	0.540 4	-2.56	0.034
X_1^2	-6.913 7	0.795 5	-8.69	0.000
X_2^2	-3.091 2	0.795 5	-3.89	0.005
X_3^2	-5.166 3	0.795 5	-6.49	0.000
X_2X_3	-1.837 5	0.764 3	-2.40	0.043

麸皮浓度和蛋白浓度之间及麸皮与磷酸盐浓度之间不具有交互作用,而蛋白胨和磷酸盐之间对 FPA 酶的产生具有交互作用。对菌株所产 CMC 酶来说,麸皮浓度在一次水平上也会影响 CMC 酶活的生产,其他与 FPA 酶一致,由此说明,菌株所产的 CMC 酶活力是 FPA 酶活力的重要组成部分。

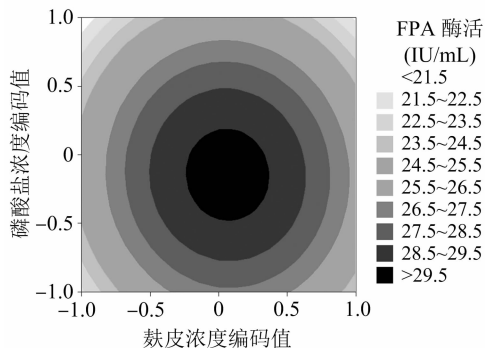
利用 mintab 16 软件绘出等值线图及响应面图(图 9、图 10)。等值线的形状反映因素间交互作用的大小,图形倾斜表示交互作用显著。结合方差分析和响应面图可知,蛋白质浓度与磷酸盐浓度交互作用具有显著水平,而麸皮与蛋白胨、麸皮与磷酸盐之间的交互作用不显著。



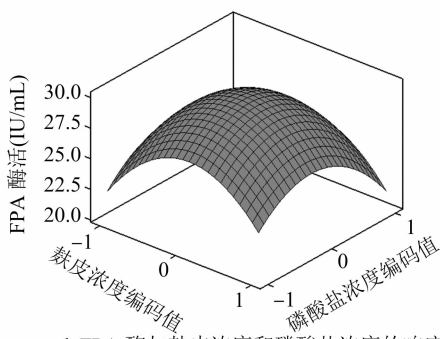
a. FPA 酶与麸皮浓度和蛋白胨浓度的等值线



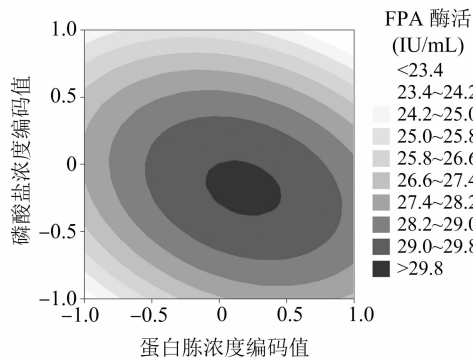
b. FPA 酶与麸皮浓度和蛋白胨浓度的响应面



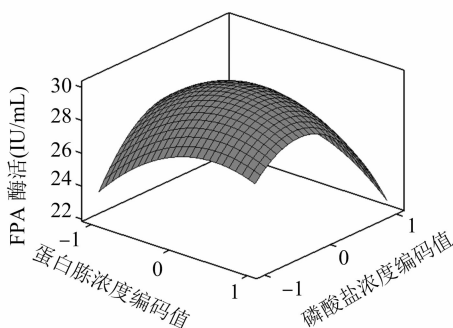
c. FPA 酶与麸皮浓度和磷酸盐浓度的等值线



d. FPA 酶与麸皮浓度和磷酸盐浓度的响应面



e. FPA 酶与蛋白胨浓度和磷酸盐浓度的等值线



f. FPA 酶与蛋白胨浓度和磷酸盐浓度的响应面

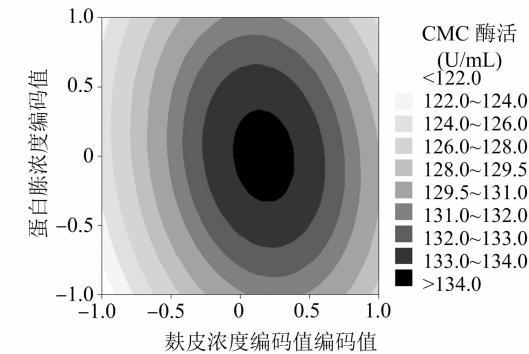
图9 FPA 酶与各因子等值线和响应面

FPA 酶优化后水平为: $X_1 = 0$, $X_2 = 0.055$, $X_3 = -0.152$; CMC 酶优化后因子水平为: $X_1 = 0.170$, $X_2 = 0.037$, $X_3 = 0.141$ 。考虑 2 种酶取因子水平平均值: $X_1 = 0.085$, $X_2 = 0.046$, $X_3 = -0.005$ 。对应的麸皮浓度为 2.54%, 蛋白胨为 0.92%, 磷酸盐为 0.497% (取 0.50%)。在此条件下利用回归表达式预测 2 种酶活力大小, FPA 酶为

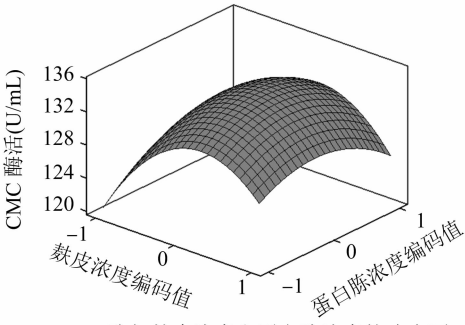
29.78 IU/mL, CMC 酶为 134.29 U/mL。

2.4 优化结果验证

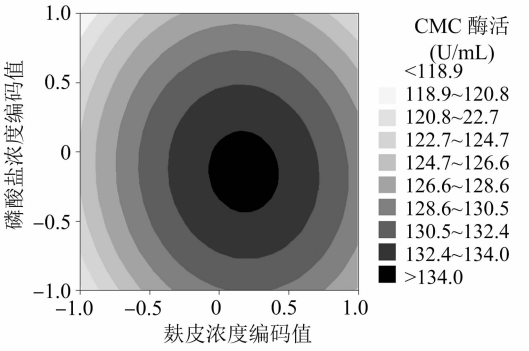
根据优化结果,在麸皮浓度 2.54%、蛋白胨浓度 0.92%、磷酸盐浓度 0.50%、发酵初始 pH 值 5.5、接种量 4% 和发酵时间 36 h 的条件下对菌株进行 5 次产酶试验,检测产酶活力,并与模型预测值比较,结果如表 7 所示。



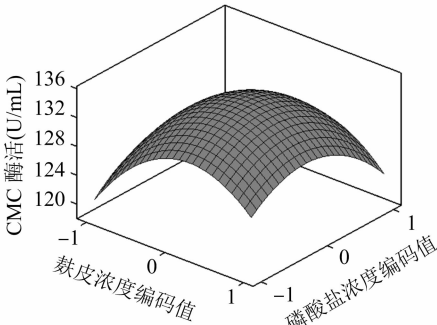
a. CMC 酶与麸皮浓度和蛋白胨浓度的等值线



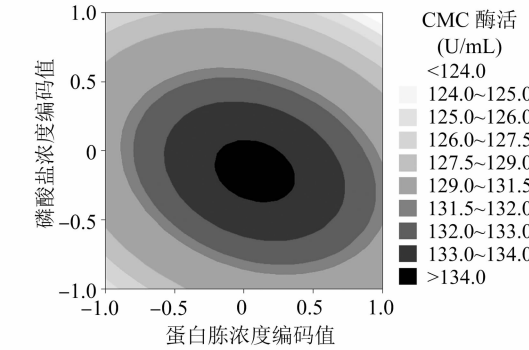
b. CMC 酶与麸皮浓度和蛋白胨浓度的响应面



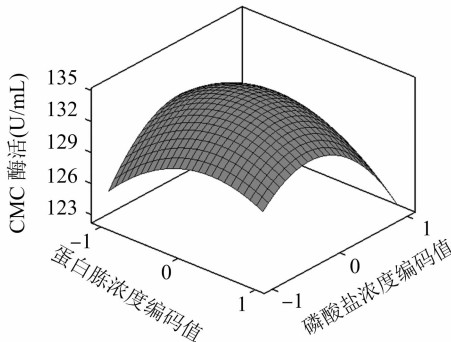
c. CMC 酶与麸皮浓度和磷酸盐浓度的等值线



d. CMC 酶与麸皮浓度和磷酸盐浓度的响应面



e. CMC 酶与蛋白胨浓度和磷酸盐浓度的等值线



f. CMC 酶与蛋白胨浓度和磷酸盐浓度的响应面

图10 CMC 酶与各因子的等值线图及响应面

表 7 验证试验结果

试验编号	FPA 酶活 (IU/mL)	CMC 酶活 (U/mL)
1	28.47	129.27
2	26.85	135.35
3	28.72	129.58
4	31.81	132.81
5	27.25	130.76
平均值	28.62	131.554
与预测值差率	-3.90%	-2.04%

验证试验显示,在菌株所产纤维素酶活力与模型预测值接近,差率很小(<5%),由此可确定对菌株 DM-4 产酶条件的优化模型是有效和可靠的。

3 结论

利用单因素试验和响应面试验,确定产纤维酶菌株 DM-4 的产酶优化条件为:发酵时间为 36 h,接种量 4%,培养基初始 pH 值 5.5~6.0,培养基麸皮浓度 2.54%,蛋白胨浓度 0.92%,磷酸盐浓度 0.5%。验证试验表明优化模型是有效和可靠的。

参考文献:

[1] Peter M, Zarnea G, Adrina P, et al. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterialb and fungalcells immobilized hydrogels[J]. Resources Conservation and Recycling, 1999, 27(5): 309-332.

[2] Rabinovich M L, Melnick M S, Bolobova A V. The structure and

李林红,李孟涵.农产品图文呈现与在线评论不一致性对销量的影响——以苹果为例[J].江苏农业科学,2020,48(9):304-309.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.057

农产品图文呈现与在线评论不一致性对销量的影响 ——以苹果为例

李林红,李孟涵

(昆明理工大学管理与经济学院,云南昆明 650032)

摘要:以淘宝网农产品(以苹果为例)图文呈现与在线评论信息为研究对象,探讨图文呈现信息与在线评论内容不一致性对销量的影响。研究发现,图文呈现信息与在线评论内容可分为外在、口感、整体等3类,初次评价整体不一致性对农产品销量产生显著负向影响,而其不一致性离散度与销量呈正“U”形相关关系;追加评价口感不一致性对销量产生负向影响,而其不一致性离散度对销量产生显著正向影响;追加评价整体不一致性离散度与销量呈倒“U”形相关关系。

关键词:图文呈现;在线评论;不一致;销量;农产品消费者;购买决策;初次评价;追加评价;外在;口感;整体;离散度
中图分类号: F713.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)09-0304-06

近年来,电子商务一直在不断地迅速发展,中国互联网络信息中心(CNNIC)最新发布的第43次《中国互联网络发展状况统计报告》显示,截至2018年12月,我国网民规模达到了8.29亿人,全年新增网民5 653万人,互联网普及率为59.6%,较2017

年年底提升3.8百分点^[1],农产品的网络交易量也随之增加,庞大的网民群体为网络购物行为的研究提供了坚实的基础。

网络购物过程中的图文呈现与在线评论信息是影响消费者购买决策的重要因素。消费者在作出购买决策前,不仅会关注已购买者给出的在线评论,而且会参考商家给出的商品介绍详情页的图文呈现信息^[2]。目前国内外学者在图文呈现、在线评论、在线评论不一致性与商品销量关系的实证研究方面做了很多有益尝试,在图文呈现方面,分析了图片数量和文本长度对销量的影响;在在线评论方面,探

收稿日期:2019-04-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:71463032)。

作者简介:李林红(1963—),男,重庆人,硕士,教授,主要从事可持续发展研究。E-mail:monashlee@163.com。

通信作者:李孟涵,硕士研究生,主要从事可持续发展研究。
E-mail:13223738656@163.com。

mechanism of action of cellulolytic enzymes [J]. Biochemistry - Moscow, 2002, 67(8): 850-871.

[3] Chinnarjan R, Thangiah N, Govindaswamy R V. Optimization of alkaline cellulase production by the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. using agricultural and industrial wastes as substrates [J]. Botanica Marina, 2010, 53(3): 275-282.

[4] Taechapoempol K, Sreethawong T, Rangsunvigit P, et al. Cellulase - Producing bacteria from Thai higher termites, *Microcerotermes* sp.: enzymatic activities and ionic liquid tolerance [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(2): 204-222.

[5] Deka D, Jawed M, Goyal A. Purification and characterization of an alkaline cellulase produced by *Bacillus subtilis* (AS3) [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2013, 43(3): 256-270.

[6] Choudhury B, Chauhan S, Singh S N, et al. Production of xylanase of *Bacillus coagulans* and its bleaching potential [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22(3): 283-288.

[7] Ghose T K. Measurement of cellulase activity [J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.

[8] Nwagu K E, Ominyi M C, Nwoba G E. Isolation, screening and measurement of amylase and cellulase activities of some microorganisms [J]. Continental Journal of Biological Sciences, 2012, 6(1): 37.

[9] Wang G G. Adaptive response surface method using inherited Latin hypercube design points [J]. Journal of Mechanical Design, 2003, 125(2): 210-220.

[10] Steinberg D M, Bursztyn D. Response surface methodology in biotechnology [J]. Quality Control & Applied Statistics, 2011, 22(2): 109-110.

[11] Hoshino T, Hashimoto T, Shigemasa K. A bayesian significance test for the difference and linear combination of factor means between groups [J]. Japanese Journal of Educational Psychology, 2001, 49(1): 31-40.