

# 利用响应面法优化耐冷纤维素降解菌产内切纤维素酶的发酵条件

崔秀秀 韩 梅 李丽娜 李 晶

沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110866

**摘要** 为探究 1 株耐冷纤维素降解细菌 HQ 产内切纤维素酶的最佳发酵条件,通过测定菌株 HQ 细胞培养液和超声细胞破碎液的 CMCase 酶活,确定 CMCase 为胞外酶。以 CMCase 酶活为指标,运用 Plackett-Burman 方法初步筛选出影响 CMCase 酶活的 3 个主要因素,即初始 pH、接种量和促进因子。以响应面法对菌株 HQ 发酵条件进一步优化,最终确定菌株 HQ 较优的发酵条件为:30.0 g/L CMC-Na 为培养基碳源、40.0 g/L 1:1 牛肉膏-蛋白胨为氮源、0.11%吐温-80 作为促进因子、初始 pH 为 5.35、最适产酶温度为 40℃、接种量为 6.42%。在最适条件下摇瓶培养,4 d 后 CMCase 酶活可达到 32.5 U,较优化前提高 2.96 倍。经 16S rDNA 序列测定及 GenBank 序列相似性分析,鉴定 HQ 为枯草芽孢杆菌亚种(*Bacillus subtilis* subsp.)。

**关键词** 耐冷细菌;内切纤维素酶;Plackett-Burman;响应面法;产酶条件优化

**中图分类号** Q 815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0062-08

秸秆主要成分为纤维素,其有效利用途径是用纤维素酶降解转化为葡萄糖等,再用于能源和饲料等生产<sup>[1]</sup>。纤维素酶是复合酶,一般包括内切纤维素酶(CMCase)、葡萄糖外切酶(CBH)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶(BG)3种组分,其中CMCase为关键酶<sup>[2-4]</sup>。产纤维素酶的微生物以真菌居多,细菌少,最适作用温度45℃以上,不耐低温。少数产纤维素酶的细菌能耐低温,属低温菌。低温菌分为嗜冷菌(psychrophiles)和耐冷菌(psychrotrophs)2类,按照Morita<sup>[5]</sup>的定义,嗜冷菌的最适生长温度 $<16^{\circ}\text{C}$ ,其生长温度的上限为 $20^{\circ}\text{C}$ ;耐冷菌的最适生长温度为 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 左右。低温菌通常分泌低温酶,其最适作用温度多在 $5\sim 40^{\circ}\text{C}$ ,远低于常温酶的作用温度,甚至在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 下仍具有较高酶活<sup>[6-7]</sup>。我国东北地区冷凉期较长,常温菌和高温菌及其酶在这些地区的应用受到较大限制,因此,加强低温纤维素降解菌及其酶的研究对于冷凉地区生物质资源的有效利用具有重要意义。

研究者对微生物产酶液体发酵条件的优化所采用的优化手段多为逐一因子的单因素试验,或人为

主观选定几个单因素和水平采用正交试验以补充考察因素间的交互效应<sup>[8]</sup>。上述方法仅能比较各种因素中已选定水平的优劣,不能提供未考察区域的信息,因此,不能很好地进行预测和控制。对菌株产酶量及酶活性的影响因子较多,且各因素间交互作用较为复杂,选择哪些因素和哪些交互效应作为重点考察对象对于结论的可信度影响很大,一旦研究中遗漏了一些重要因素,会造成较大偏差,甚至会得到错误结论。Plackett-Burman法是基于不完全平衡块原理,能从众多变量中快速筛选出关键因素,而响应面法(response surface methodology, RSM)能将试验设计和数学建模综合起来,通过合理地选取试验点和迭代策略,来保证多项式函数能够在失效概率上收敛于真实的隐式极限状态函数的失效概率,从而得到准确有效的试验结论。从原理来看,采用上述方法有可能弥补之前微生物培养优化中的一些不足。因此,目前RSM方法在生物技术的众多领域得到广泛应用<sup>[9]</sup>。笔者应用前期筛选获得的1株产低温纤维素酶的耐冷细菌采用数学统计方法对菌株产酶的液体发酵因素进行优化,为进一步利用该

收稿日期: 2015-11-25

基金项目: 国家产业技术体系花生专项(nycytx-19)

崔秀秀,硕士研究生,研究方向:微生物资源, E-mail: huamei1109590284@163.com

通信作者: 韩梅,博士,副教授,研究方向:生物有机复合肥料, E-mail: hanmei1126@126.com

菌发酵产低温纤维素酶的扩大培养奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用菌

HQ为1株耐冷纤维素降解细菌,由笔者所在实验室分离保存。在培养基上形成扁平圆形单菌落,呈乳白色。在光学显微镜下菌体细胞为杆状,能滑行运动。其生长的最适温度为20℃,最适pH为6.0。

### 1.2 培养基

斜面培养基:蛋白胨10.0g、牛肉膏5.0g、NaCl 5.0g、琼脂20.0g、蒸馏水5L、pH 7.2~7.4。

种子液培养基:蛋白胨10.0g、牛肉膏5.0g、NaCl 5.0g、无机盐溶液1.0mL(无机盐溶液成分(g/L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.20,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.30,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.20),土壤浸液100mL,蒸馏水900mL,pH为6.0。

液体发酵培养基:CMC-Na 10.0g、蛋白胨10.0g、酵母粉5.0g、NaCl 5.0g、蒸馏水1.0L、pH 6.0~7.0。

### 1.3 粗酶液制备

将新鲜的种子液按6.0%的接种量接于液体发酵培养基中,在40℃、180r/min下培养4d,于4℃、10000r/min离心15min,收集上清液,即为粗酶液。

### 1.4 酶活的测定

将底物1.0% CMC-Na溶液(用pH 5.0的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液溶解)预热至30℃,取2.0mL于洁净干燥的试管中,加入1.0mL粗酶液,置于30℃水浴中反应30min,立即加入3.0mL DNS溶液终止酶促反应,摇匀,煮沸5min,取出,冷却至室温,定容至25.0mL,于540nm处测定其OD值。酶活定义:上述条件下,每毫升粗酶液在1min内催化底物CMC-Na生成1μmol葡萄糖所需的酶量为1个酶活单位(U),酶活计算公式(1):

$$\text{CMCase 酶活} = \frac{A \times D \times 1\,000}{t}$$

A:OD值在标准曲线上对应的葡萄糖质量,mg;D:酶液的稀释倍数;t:反应时间,min<sup>[10]</sup>。

### 1.5 CMCase的胞外/胞内属性试验

将30.0mL的菌体培养液于4℃、10000r/min离心15min后,测其菌株细胞培养液中的CMCase酶活,即为菌株HQ胞外CMCase酶活。向沉淀中

加入等体积的pH 5.0柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,混匀后,在4℃的冰浴环境、超声波破碎功率为350W、超声破碎总时间为5min(超声2s、间隔3s)的条件下对菌悬液进行细胞破碎<sup>[11-12]</sup>,进而测其细胞破碎液中的CMCase酶活,即为菌株HQ胞内CMCase酶活。最后比较两者CMCase酶活大小并初步确定菌株HQ所产CMCase为胞外、胞内酶的属性。

### 1.6 单因素试验

取4℃下保存菌种用斜面培养基于20℃下活化24h。将活化菌种用10.0mL无菌水制成菌悬液,以4.0%的接种量接于种子液培养基,于20℃、180r/min下恒温震荡培养24h;以6.0%的接种量将种子液接入摇瓶液体发酵培养基中,于40℃、180r/min下培养,每隔24h取样1次,测定CMCase酶活,绘制酶活-时间关系图。对培养基的碳源(CMC-Na、玉米秸秆、水稻秸秆、淀粉、甘氨酸、柠檬酸钠)和氮源(蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、硫酸铵、牛肉膏-蛋白胨、蛋白胨-酵母粉和牛肉膏-酵母粉),以及产酶促进因子(0.1%吐温-80、0.1%SDS、0.1%EDTA、0.1%Triton x-100)进行产酶单因素试验,其中碳源和氮源质量浓度范围分别为5.0~40.0、4.0~40.0g/L,产酶促进因子含量为0.1%~1.0%,分别测定CMCase酶活,方法同上。对产酶条件初始pH(4.0~10.0)、温度(10~50℃)、接种量(4.0%~14.0%)进行单因素试验,CMCase酶活测定方法同上。每个试验组设3次重复,以平均值做统计分析。

### 1.7 发酵条件优化

1) Plackett-Burman 试验设计筛选显著因素。在单因素试验的基础上采用P-B设计方法,对每个因素采用高、低2个水平,分别记为1、-1,并设定高水平为低水平的1.5倍,各因子水平见表1。利用SPSS软件对各因素进行重要性评价,对显著性位于前三的单因素进行响应面设计<sup>[13-14]</sup>。

2) 响应面(RSM)试验设计。筛选出对CMCase酶活影响显著的3个因素后,以显著因素为自变量,以CMCase酶活为响应值采用3因素3水平17组试验进行响应面设计<sup>[15-17]</sup>,以确定最适的产酶条件。

3) 优化条件下CMCase酶活的测定。按照RSM试验设计结果在优化条件下对菌株进行恒温震荡培养,培养液于4℃、10000r/min下离心15min,收集上清液测定CMCase酶活。

4) 数据处理与分析。采用WPS Office、RSM程

表 1 试验设计因素水平

Table 1 Level of Plackett-Burman experiment factors

因素 Factors	编号 Code	水平 Level		
		-1	0	1
羧甲基纤维素钠/(g/L) CMC-Na	X <sub>1</sub>	23.3	40.0	45.0
蛋白胨-牛肉膏(1:1)/(g/L) Peptone beef extract	X <sub>2</sub>	30.0	40.0	45.0
初始 pH Initial pH	X <sub>3</sub>	4	5	6
温度/℃ Temperature	X <sub>4</sub>	30	40	45
接种量/% Inoculum dose	X <sub>5</sub>	5.3	6.0	8.0
吐温-80/% Tween-80	X <sub>6</sub>	0.08	0.10	0.12
时间/d Time	X <sub>7</sub>	3	4	5

序及 SPSS 17.0 软件对数据进行 ANOVA 方差统计分析,分析方法为 Duncan’s multiple range test (DMRT,  $P<0.05$ )。

1.8 细菌鉴定

1)生化鉴定。根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[19]</sup>对实验室保藏菌种进行常规的生理生化鉴定。

2)16S rDNA PCR 鉴定。引物:用通用引物 fd1 (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')、rp2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 扩增 16S rDNA。DNA 的提取:将菌液离心收集菌体,利用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA。反应体系(25  $\mu$ L):DNA 模板 2  $\mu$ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,上、下游引物(25  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L,dNTP 2  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 17.25  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 40 s,56  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 结束后,将 PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶电泳上检测,观察结果后测序。16S rDNA 基因序列分析:将测序结果与 GenBank 中的序列进行同源性比对并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 CMCase 胞内、外属性的确定

通过比较菌株 HQ 胞外、胞内 CMCase 酶活,发现菌体胞内 CMCase 酶活几乎为 0,胞外 CMCase 酶活为 11.45 U,因此,可以确定由菌株 HQ 所产的 CMCase 为胞外酶。

2.2 单因素试验

1)产酶温度。设置不同的发酵温度,对菌株进行摇瓶培养,测定粗酶液 CMCase 酶活(图 1 A)。从图 1 A 中可见,40  $^{\circ}$ C 时 CMCase 酶活最大,初步确定产酶温度为 40  $^{\circ}$ C。

2)产酶时间。培养 4 d 时,菌株产 CMCase 酶

活最高,随后酶活开始下降(图 1B),其原因可能是:液体发酵培养基中的营养物质逐渐被消耗,发酵环境改变,不利于菌株合成 CMCase,导致菌株分解纤维素能力降低;当代谢产物浓度降低到一定值时,阻碍解除,CMCase 活力开始上升,分解纤维素的能力逐渐增强,从而使酶活呈现升高—降低—升高的波浪状变化。因此,初步确定菌株产酶的时间为 4 d。

3)碳源种类及质量浓度。设置 6 种不同碳源,质量浓度均为 10.0 g/L,通过测定粗酶液 CMCase 酶活(图 1 C)。以 CMC-Na 为碳源时,菌株的酶活最高,说明菌株能够较好的利用 CMC-Na。因此,初步确定菌株产酶的最适碳源为 CMC-Na。确定最适碳源后,考察不同质量浓度 CMC-Na 对菌株产酶的影响(图 1D),在 CMC-Na 质量浓度为 30.0 g/L 时,CMCase 酶活最大。因此,初步确定菌株产酶的最适碳源质量浓度为 30.0 g/L。

4)氮源种类及质量浓度。设置 7 种不同氮源,质量浓度均为 10.0 g/L,通过测定粗酶液 CMCase 酶活(图 1 E)。以蛋白胨-牛肉膏(1:1)为氮源时,菌株的 CMCase 酶活最高,说明菌株对有机氮源的利用要优于无机氮源。因此,初步确定菌株最适产酶氮源为蛋白胨-牛肉膏(1:1)。确定最适氮源后,探究不同蛋白胨-牛肉膏(1:1)质量浓度对菌株产酶的影响(图 1 F),柱形图变化趋势为先升高后降低,在蛋白胨-牛肉膏(1:1)质量浓度为 40.0 g/L 时,CMCase 酶活最大。因此,初步确定菌株产酶的最适氮源质量浓度为 40.0 g/L。

5)促进因子种类及浓度。探究 4 种促进因子对菌株产酶的影响,其加入质量浓度均为 1.0 g/L。通过测定粗酶液 CMCase 酶活(图 1G),发现吐温-80 能提高 CMCase 酶活。因此,初步确定菌株的最适产酶促进因子为吐温-80。确定最适产酶因子后,考察其含量对 CMCase 酶活的影响(图 1H)。当吐温-80 含量为 0.1%时,CMCase 酶活最高。因此,初步确定菌株最适的产酶因子含量为 0.1%。

6)初始 pH。设置 7 个产酶初始 pH,通过测定粗酶液 CMCase 酶活(图 1I)。当初始 pH 为 5.0 时,CMCase 酶活最高。pH 为 10.0 时,酶活急剧下降。因此,初步确定了菌株产酶的最适初始 pH 为 5.0。

7)接种量。无菌环境下,将种子液按不同接种量接入液体发酵培养基中,对菌株进行摇瓶培养,测定 CMCase 酶活(图 1J)。当接种量为 6.0% 时,

CMCase 酶活最高。当接种量 $>6.0\%$ 时,由于接种量较大,菌体大量繁殖,培养基中的营养物质被大量消耗,不利于菌株产酶。因此,初步确定菌株产酶的最适接种量为  $6.0\%$ 。

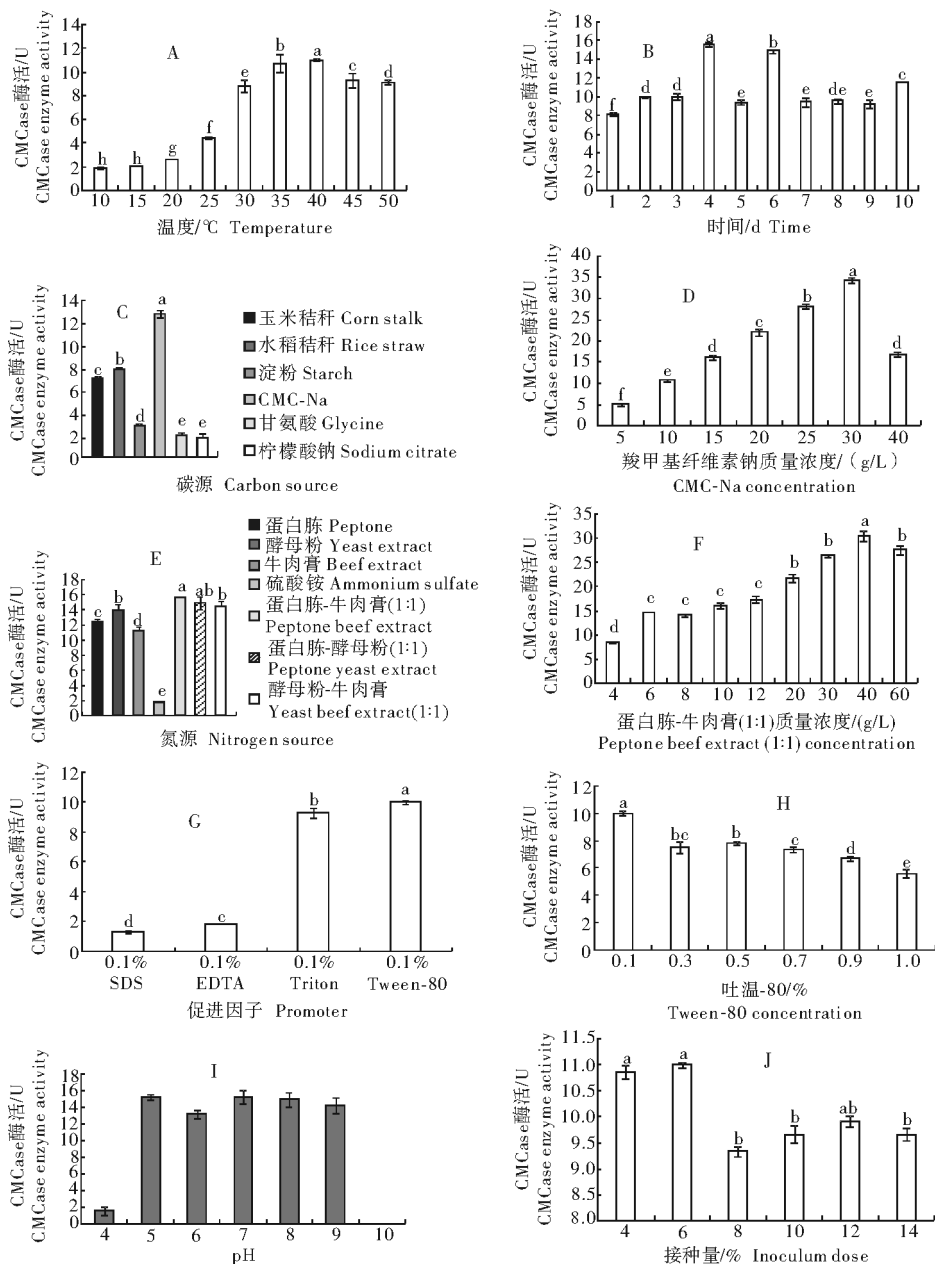


图 1 不同因素对 CMCase 酶活的影响

Fig.1 Effects of different factors on CMCase enzyme activity

2.3 P-B 试验

对 7 个因素选取合适水平,应用 Design-Expert 8.0 软件进行 P-B 实验设计,以考察氮源、碳源、吐温-80、初始 pH、接种量、发酵温度和时间等因素对菌株产 CMCase 酶活的影响,结果见表 2。

在单因素的基础上根据 P-B 设计方法以及 SPSS 软件对数据进行了统计分析,结果见表 3。7 个因素中影响显著性顺序为初始 pH $>$ 接种量 $>$

吐温-80 $>$ 温度 $>$ 蛋白胨-牛肉膏(1 : 1) $>$ 时间 $>$ CMC-Na,因此,初始 pH、接种量和吐温-80 对 CMCase 酶活存在着较显著的影响,确定其为下一步试验设计的关键因素。

2.4 响应面(RSM)模型的构建

运用 Design-Expert 8.0 软件对各个因素间的交互作用进行响应面分析,响应面分析结果见表 4 和表 5。



表 2 P-B 试验设计结果 (n=12)

Table 2 Experimental results of Plackett-Burman design (n=12)

编号 No.	因素 Factor							CMCase 酶活/U CMCase enzyme activity
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	25.98
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.74
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	45.58
4	-1	1	1	-1	1	1	1	14.25
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	14.94
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6.22
7	-1	-1	-1	-1	1	1	1	3.32
8	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.00
9	1	-1	1	1	-1	1	1	28.99
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	4.11
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	22.39
12	1	1	-1	1	1	1	-1	2.58

表 3 各因素效应及重要性评价

Table 3 Effects of various factor and evaluations  
of the importances

因素 Factor	t	P	显著性排序 Significant rank
X <sub>1</sub>	0.041	0.970	7
X <sub>2</sub>	0.875	0.431	5
X <sub>3</sub>	6.010	0.004	1
X <sub>4</sub>	1.634	0.178	4
X <sub>5</sub>	-2.163	0.097	2
X <sub>6</sub>	-1.990	0.117	3
X <sub>7</sub>	-0.803	0.467	6

表 5 二次多项模型及各项的方差分析

Table 5 Analyses of variance for RSM model

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P
模型 Model	1 184.40	9	131.60	78.25	<0.000 1
X <sub>3</sub> :初始 pH Initial pH	340.87	1	340.87	202.68	<0.000 1
X <sub>5</sub> :接种量 Inoculation dose	59.30	1	59.30	35.26	0.000 6
X <sub>6</sub> :吐温-80 Tween-80	121.06	1	121.06	71.98	<0.000 1
X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>	0.82	1	0.82	0.49	0.507 8
X <sub>3</sub> X <sub>6</sub>	6.94	1	6.94	4.13	0.081 7
X <sub>5</sub> X <sub>6</sub>	51.77	1	51.77	30.78	0.000 9
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	425.17	1	425.17	252.81	<0.000 1
X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	35.14	1	35.14	20.89	0.002 6
X <sub>6</sub> <sup>2</sup>	97.16	1	97.16	57.77	0.000 1
残差项 Residual term	11.77	7	1.68		
失拟项 Lack of fit	6.76	3	2.25	1.80	0.011 9
误差 Error	5.01	4	1.25		
和 Total	1 196.17	16			

以 CMCase 酶活为响应值,对各试验因子进行回归方程拟合,拟合结果如下:  $Y = 32.14 + 6.53X_3 + 2.72X_5 + 3.89X_6 + 0.45X_3X_5 + 1.32X_3X_6 - 3.6X_5X_6 - 10.051X_3^2 - 2.89X_5^2 - 4.8X_6^2$ ,方差分析见表 5,由表 5 可以看出回归项  $P<0.001$ ,失拟项 $>0.05$ ,说明回归效果显著,失拟效果不显著。回归方程相关系数  $R^2=0.990\ 2$ ,进一步说明了回归方程的拟合度较好,97.75%的数据的可变性可用此模型来解释,因此,可利用该回归方程

表 4 RSM 试验设计及结果 (n=17)

Table 4 Experimental design and results of RSM (n=17)

试验序号 No.	X <sub>3</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	内切纤维素酶活/U CMCase enzyme activity
1	0	1	1	28.20
2	0	0	0	31.37
3	0	0	0	30.73
4	1	0	-1	19.20
5	-1	0	1	12.74
6	-1	0	-1	9.33
7	1	-1	0	22.70
8	1	0	1	27.88
9	0	-1	1	30.21
10	0	0	0	33.50
11	-1	1	0	14.80
12	0	0	0	32.90
13	-1	-1	0	10.00
14	0	1	-1	25.88
15	1	1	0	29.31
16	0	0	0	32.20
17	0	-1	-1	13.50

确定最适产酶条件。综合响应面回归分析和回归方程绘制的响应面图形见图 2~图 4。

通过观察图 2~图 4 的变化趋势得出,a、b、c 在试验范围内存在极大值点。最优试验点(a、b、c)为(5.35、6.42、0.11),即初始 pH 5.35、接种量 6.42%、吐温-80 0.11%,在此点预测的 CMCase 酶活为 34.36 U.AC 交互作用的等高线近似圆形,两者的交互作用不显著,AB、BC 交互作用的等高线都是椭圆,两元素间的交互作用显著。为了检验模型预测

的准确性,在优化条件下,对菌株进行 5 组发酵试验,测其粗酶液 CMCase 酶活平均值为 32.5 U,与所得的预测值相近,与优化前 CMCase 酶活 11.0 U 相比提高 2.96 倍。

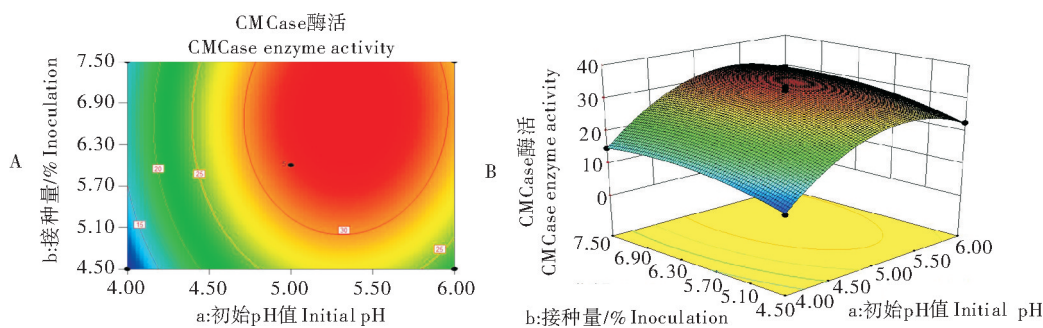


图 2 初始 pH 和接种量对 CMCase 酶活的模型方程等高线图(A)和响应面立体分析图(B)  
Fig.2 Contour plots and response surface stereo analysis diagram of regression equation of initial pH vs inoculation dose and CMCase enzyme activity

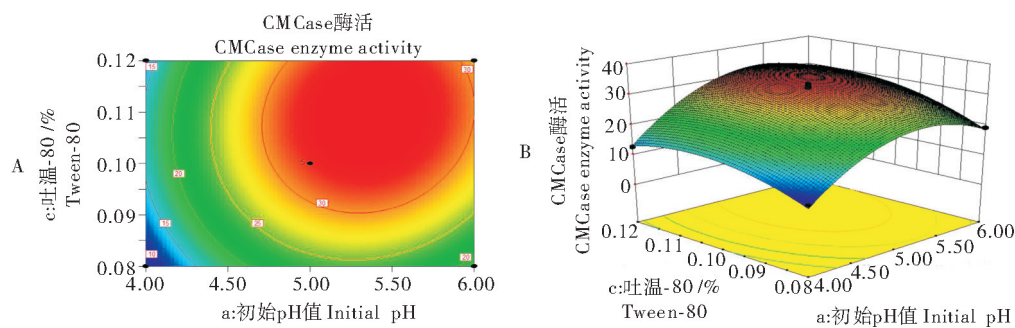


图 3 初始 pH 和吐温-80 对 CMCase 酶活的模型方程等高线图(A)和响应面立体分析图(B)  
Fig.3 Contour plots and response surface stereo analysis diagram of regression equation of initial pH vs tween-80 and CMCase enzyme activity

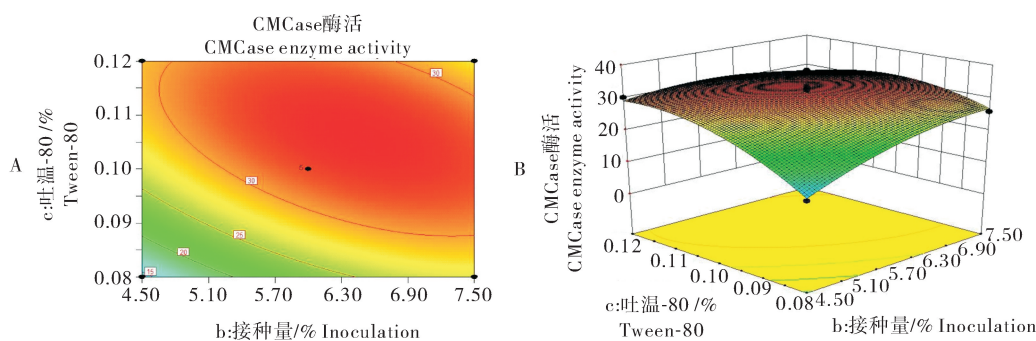


图 4 接种量和吐温-80 对 CMCase 酶活的模型方程等高线图(A)和响应面立体分析图(B)  
Fig.4 Contour plots and response surface stereo analysis diagram of regression equation of inoculation dose vs tween-80 and CMCase enzyme activity

2.5 细菌鉴定结果

1)生化特性鉴定结果。接触酶反应阳性,能够利用柠檬酸盐、还原硝酸盐,不形成吡啶,水解淀粉,可使明胶液化。

2)16S rDNA 序列分析比对。16S rDNA 扩增的片段长度为 1500 bp,PCR 扩增结果见图 5A。

在 GenBank 上进行 Blast 比对,得出该菌株与枯草芽孢杆菌亚种序列相似性达到 99.0%;从 GenBank 中得到序列相近的 19 个参比菌株,运用 MEGA 6.0 通过邻接法构建系统发育树,见图 5B,可初步推测菌株 HQ 为枯草芽孢杆菌亚种(*Bacillus subtilis* subsp.)。

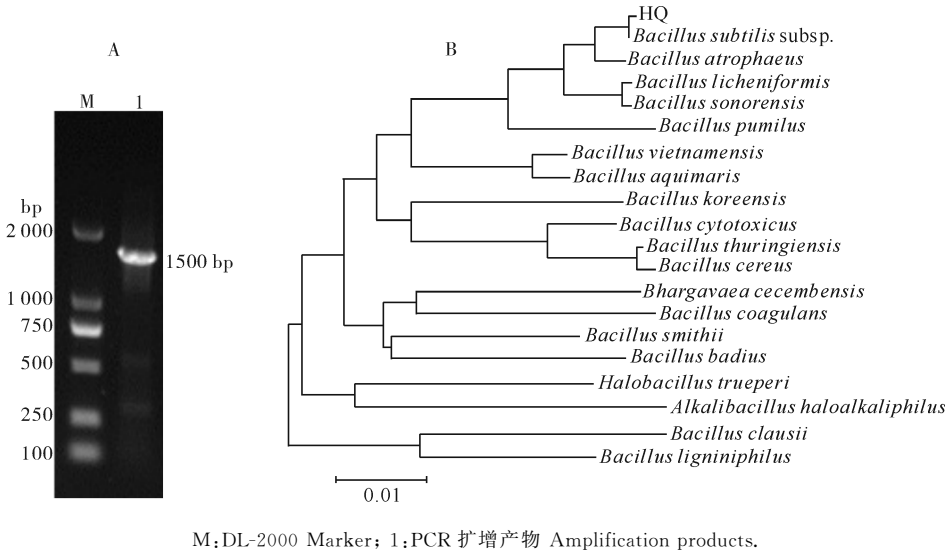


图 5 PCR 扩增结果(A)及基于 16S rDNA 基因序列相似性构建的系统发育树(B)  
Fig.5 PCR amplification results and phylogenetic tree of strain HQ and its related bacteria constructed using 16S rDNA sequences

3 讨论

耐冷细菌所产纤维素酶的酶活一般较低,如李春艳等<sup>[18]</sup>在低温条件下分离得到 1 株纤维素降解细菌 FLX-1,并运用响应面法对其产 CMCase 的培养条件进行优化,优化后酶活达 14.12 U。任红梅等<sup>[19]</sup>筛选出 1 株低温纤维素降解菌 M7,通过 Box-Behnken 中心组合设计和响应面分析法对其产 CMCase 条件进行优化,优化后酶活达 4.39 U。钱文佳等<sup>[20]</sup>在 南极海冰中分离的 *Pseudoalteromonas* sp.545 所产 CMCase 酶活为 35 U。黄玉兰等<sup>[21]</sup>筛选出 1 株耐低温纤维素降解菌 XW-1,所产 CMCase 酶活为 15.6 U。胡丽娟等<sup>[22]</sup>采用最陡爬坡试验,结合中心组合试验及响应面分析,从而得到最优发酵条件,酶活较优化前提高 1.748 倍。与之相比,本试验的优化效果更为明显<sup>[18]</sup>。在实际工业生产上,对 CMCase 的酶活要求较高,本试验通过探索培养基成分及条件对菌株产 CMCase 的影响并运用响应面法对其产 CMCase 的酶活进行优化,结果表明优化后的酶活达 32.5 U,较优化前提高 2.96 倍,因此,菌株 HQ 在低温环境下产 CMCase 的酶活相对较高,在该领域中具有较大的应用前景。

鉴于低温纤维素降解细菌繁殖周期短,利用其分泌的低温纤维素酶既能缩短生产时间又能够节省资金,因而对纤维素酶研究工作的重心逐渐从真菌

类转移到了细菌类,尤其是芽孢杆菌产纤维素酶的研究。本试验虽成功地提高了菌株产 CMCase 的活力,但较其他低温纤维素酶高产菌在实际中的应用还有一定的距离。在今后的研究中,除了采用一些数学统计方法外,也可以通过转基因、菌株诱变等手段对菌株进行改良,为严寒地区有效降解农业秸秆提供技术支持。

参 考 文 献

[1] 刘晓辉,高晓梅,恒明辉,等.产纤维素酶低温菌株的分离鉴定[J].山东农业科学,2014,46(3):54-57.  
[2] 陈梅,斜卧青霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的性质和功能研究及基因表达谱分析[D].济南:山东大学,2013.  
[3] ZHUO L Y, ANDREW N L, GEROLD A W, et al. Scaled-up separation of cellobiohydrolase from a cellulase mixture by ion-exchange chromatography[J]. Biotechnol, 2011, 27(6): 1644-1652.  
[4] 李志平,杨盛,侯红萍.高活性纤维素酶的分离纯化[J].中国农学通报,2012,28(18):205-208.  
[5] MORITA R Y. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriol Rev, 1975, 39(2):144-167.  
[6] 曾胤新,陈波.南极低温微生物研究及其应用前景[J].极地研究,1999,11(2):66-75.  
[7] 辛明秀,马延和.嗜冷菌和耐冷菌[J].微生物学通报,1999,26(2):155.  
[8] 梅乐和,胡升,许静,等.纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J].浙江大学学报(工学版),2004,38(10):1356-1360.

- [9] 胡升,梅乐和,姚善泾.响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J].食品与发酵工业,2002,29(1):13-17.
- [10] 武金霞,常淑英,孙鹏,等.米曲霉(*Aspergillus oryzae*)沪酿3.042内切型纤维素酶的分离纯化与鉴定[J].河北大学学报(自然科学版),2012,32(1):68-74.
- [11] 陈新琪,易长海,甘厚磊,等.超声波条件下纤维素酶的活性及其在牛仔布洗水中的应用[J].天津工业大学学报,2012,31(5):55-58.
- [12] 陶羽,樊建阳,孟建宇,等.细菌 *Bacillus*.sp.A-1-3 纤维素酶提取条件的研究[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2012,33(2):260-263.
- [13] KIM B, KIM J. Optimization of culture conditions for the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* JK-1 using response surface methodology[J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2013, 56: 279-287.
- [14] LEE Y J, KIM H J, GAO W, et al. Statistical optimization for production of carboxymethylcellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 by a recombinant *Escherichia coli* JM109/DL-3 from rice bran using response surface method[J]. Biotechnology and bioprocess engineering, 2012, 17: 227-235.
- [15] 陆继臣,迟乃玉,窦少华,等.响应面法优化灰霉病生防菌 CNY-04 培养条件[J].微生物学通报,2013,40(8):1414-1422.
- [16] ARIANE L L, JULIA F M Q N, ANA P C A, et al. Optimization of medium formulation and seed conditions for expression of mature PsaA (Pneumococcal surface adhesin A) in *Escherichia coli* using a sequential experimental design strategy and response surface methodology [J]. Microbiol Biotechnol, 2012, 39: 897-908.
- [17] 苏同伟,包斌,严婷,等.响应面法优化海洋微生物发酵产生纤溶化合物的培养条件[J].生物工程学报,2013,29(6):857-861.
- [18] 李春艳,于琦,冯露,等.低温纤维素降解菌分离鉴定及产酶条件优化[J].东北农业大学学报,2015,46(10):74-81.
- [19] 任红梅,刘左军,袁惠君,等.低温纤维素降解菌的筛选及其产酶研究[J].食品工业科技,2013,34(19):127-134.
- [20] 钱文佳,阚光锋,徐仲,等.产低温纤维素酶南极细菌的筛选、生长特性及酶学性质的初步研究[J].食品科技,2010,35(1):15-18.
- [21] 黄玉兰,李征,刘晓宁,等.一株耐冷纤维素酶高产菌株的筛选、鉴定和产酶的初步试验[J].微生物学通报,2010,37(5):637-644.
- [22] 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.

## Optimizing fermentation conditions of endo-cellulase production by a psychrotrophic bacteria using response surface method

CUI Xiuxiu HAN Mei LI Lina LI Jing

College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract** In order to optimize fermentation conditions of endo-cellulase production by a cellulose-degradable psychrotrophic bacteria HQ (laboratory separated and preserved) and to measure CMCase enzyme activity of cell fermentation broth and ultrasonic cell-break liquid of strain HQ, the P-B (Plackett Burman) method was used to screen three main factors including initial pH, inoculation dose and promoters affected CMCase enzyme activity using CMCase as extracellular enzyme and CMCase enzyme activity as index. The fermentation conditions of HQ were optimized with response surface methodology. The results showed that the optimal fermentation conditions were 30.0 g/L CMC-Na, 1 : 1 ratio of nitrogen source to peptone beef extract 40.0 g/L in culture medium, 0.11% tween-80, pH 5.35, 40 °C, and 6.42% inoculation dose. Shaking culture under the optimal conditions, CMCase enzyme activity was 32.5 U after 4 days, 2.96-fold more than that before the optimization. HQ was identified as *Bacillus subtilis* subsp. through sequencing its 16S rDNA and analyzing its similarity with GenBank sequence.

**Keywords** psychrotrophic bacteria; CMCase; Plackett-Burman; response surface methodology (RSM); optimization of fermentation conditions

(责任编辑:陆文昌)