

文章编号: 1000-5013(2012)02-0172-04

# 以响应面法优化短小芽孢杆菌木聚糖酶产酶条件

葛慧华, 林锦霞, 张光亚

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 应用响应面分析对短小芽孢杆菌木聚糖酶的产酶条件进行优化,得到碳源、氮源及培养时间 3 种因素交互影响的回归方程. 从该方程得到理论最佳产酶条件:培养时间为 24 h,麸皮、玉米粉、蛋白胨和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的质量浓度分别为 10, 5, 5, 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 在优化条件下,实际最高产酶量为 12.1  $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与理论最高产酶量 12.0  $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$  接近,比初始酶活提高 12.2 倍.

**关键词:** 木聚糖酶; 短小芽孢杆菌; 响应面分析; 交互影响

**中图分类号:** TQ 925

**文献标志码:** A

木聚糖酶(EC 3. 2. 1. 8)是木聚糖降解酶系中的关键酶,在造纸、食品、饲料、纺织、酿酒、医药、环境和能源等行业有广泛应用<sup>[1-2]</sup>. 利用微生物发酵产生木聚糖酶,影响产量的因素除菌种本身以外,还和培养基组成及培养条件密切相关. 如何快速、有效找出主效应,确定最佳培养基组成及培养条件是关键. 响应面分析法是通过对响应面等值线的分析寻求最优工艺参数,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间函数关系的一种统计方法. 应用响应面法得到的两两因素交互响应面图直观地反映因素间的交互影响,便于实验者快速对实验数据进行分析,提取有效信息<sup>[3]</sup>. 已有报道利用该方法优化木聚糖酶培养基并取得了较好的效果<sup>[4]</sup>,但缺乏对两两因素间交互影响的分析. 本文在单因素考察的基础上,选取影响较大的碳源和氮源作为复合考察的两个因素,以培养时间为第 3 个因素,经响应面分析法对短小芽孢杆菌木聚糖酶的产酶条件进行优化.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),购于中国普通微生物菌种保藏管理中心,菌液加 15% 已灭菌的甘油,于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存.

### 1.2 培养基和培养条件

基础产酶培养基组成( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 麸皮 5.0, 蛋白胨 5.0,  $\text{NaCl}$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  0.1. 培养基灭菌之前用  $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaOH}$  调节 pH 值至 9.5. 接种之前,保存在  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱的菌体先在 LB(Luria-Bertani)培养基活化约 4 个 h,待光密度  $D(620)$  为 0.46 左右,以 1% 的接种量接种至不同组成的产酶培养基. 在 50 mL 摇瓶中装液 5 mL,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $250\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  按要求培养.

### 1.3 木聚糖酶的提取和检测

将培养液于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $15\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 10 min,取上清液,细胞沉淀用  $9\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaCl}$  洗 2 次,  $250\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖液(加终浓度为  $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA)洗 1 次. 粗酶液为第 1 次离心的上清液和 3 次洗液,稀释一定倍数后使用. 取 0.2 mL 酶液(用一定 pH 值的缓冲液稀释一定的倍数),加入到 0.2 mL 用  $\text{pH}=7.0$ ,  $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液(PBS)中配成的 1% 木聚糖溶液,于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  下反应 10 min,加入 0.4 mL 的 DNS 试剂,煮沸 5 min;用水定容至 2.4 mL 后,在 540 nm 波长下测光密度值<sup>[5]</sup>,以木糖制作

收稿日期: 2011-10-07

通信作者: 张光亚(1975-),男,副教授,主要从事酶与生物信息的研究. E-mail:zhgyghh@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2009J01030); 华侨大学科研基金资助项目(07HZR20)

标准曲线. 定义每秒钟转化 1 摩尔底物(被反应物)所需的酶活力为 1 个酶活力单位(kat). 空白对照以 0.2 mL, pH=7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)代替粗酶液, 其他的步骤同上.

1.4 复合因素考察产酶条件

为了优化 *Bacillus pumilus* 木聚糖酶的最佳产酶条件, 根据单因素单水平实验, 发现碳源和氮源是 *Bacillus pumilus* 木聚糖酶生产的主要影响因素. 由于该生产菌是芽孢杆菌类, 培养时间不同, 菌体的生长水平相差较大, 产酶水平也受限制. 基于此, 选取碳源(麸皮与玉米粉的质量比)和氮源(蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的质量比)作为复合考察的两个因素, 培养时间( $t$ )为第 3 个因素, 安排 3 因素 3 水平实验, 如表 1 所示. 统计分析用 STA-TISTICA 软件(30 d 试用版)<sup>[6]</sup>.

表 1 3 因素 3 水平设计表

Tab. 1 Factorial design of the 3 factors and 3 levels

因素	标识	水平		
		−1	0	1
$t/\text{h}$	$X_1$	24	48	72
$m(\text{麸皮}):m(\text{玉米粉})$	$X_2$	5:10	5:5	10:5
$m(\text{蛋白胨}):m(\text{NH}_4\text{Cl})$	$X_3$	5:2	2:5	5:10

2 结果与分析

2.1 初始培养条件的优化

依据表 1 的设计进行实验, 计算结果如表 2 所示. 表 2 中:  $z$  为木聚糖酶酶活力. 由表 2 可知, 最高的木聚糖酶活力出现在第 3 组( $z=8.7\text{ mkat}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 比第 11 组(除培养时间外, 其他培养条件相同)酶活力高出 3.64 倍.

表 2 初始培养条件的优化实验结果

Tab. 2 Optimal results of the primary culture condition

编号	编码水平			$z/\text{mkat}\cdot\text{L}^{-1}$	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	观测值	预测值
1	−1	−1	0	7.2	6.9
2	−1	0	−1	3.6	4.0
3	−1	0	1	8.7	9.5
4	−1	1	0	7.7	6.9
5	0	−1	−1	6.5	6.5
6	0	−1	1	7.5	7.0
7	0	1	−1	3.5	3.9
8	0	1	0	5.2	5.1

编号	编码水平			$z/\text{mkat}\cdot\text{L}^{-1}$	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	观测值	预测值
9	1	−1	0	1.2	1.9
10	1	0	−1	2.2	1.4
11	1	0	1	2.4	2.0
12	1	1	0	1.4	1.8
13	0	0	0	3.1	3.3
14	0	0	0	3.2	3.3
15	0	0	0	3.6	3.3

表 3 实验系数的估计值

Tab. 3 Coefficient estimates by the regression model

编码	系数	标准差	$t$ 值	$P$ 值
截距	199.23	28.59	6.97	0.000 936**
$X_1$	−150.35	17.97	−8.37	0.000 399**
$X_1^2$	−44.43	27.31	−1.63	0.164 686
$X_2$	−1.11	19.65	−0.06	0.956 969
$X_2^2$	108.26	27.90	3.88	0.011 638*

编码	系数	标准差	$t$ 值	$P$ 值
$X_3$	92.11	21.44	4.30	0.007 744**
$X_3^2$	97.76	29.33	3.33	0.020 707*
$X_1^* X_2$	−2.65	25.41	−0.10	0.920 868
$X_1^* X_3$	−73.69	25.41	−2.90	0.033 792*
$X_2^* X_3$	75.83	34.54	2.20	0.079 565

\* 表示置信区间为 95% 时有统计学意义; \*\* 表示置信区间为 99% 时有统计学意义

应用响应面法进行回归分析, 其  $t$  检验值和  $P$  检验值如表 3 所示. 系数的可信程度与  $t$  检验值成正比, 与  $P$  检验值成反比. 即  $t$  检验值越大及  $P$  检验值越小, 回归系数的可信程度越高. 当试验在置信区间为 99% 和 95% 时, 除  $X_2, X_1^2, X_1 X_2, X_2 X_3$  的系数外, 其他系数均具有统计学意义. 这些系数表明, 其代表的因素可能为回归模型的限制因子, 改变这些因素值对木聚糖酶的生产有重要影响.

对实验数据进行回归响应分析, 得到可以解释各主因素对木聚糖酶生产的影响的二次模型为

$$Y = 199.2 - 150.3X_1 + 108.3X_2^2 + 92.1X_3 + 97.8X_3^2 - 73.7X_1X_3.$$

式中:  $Y$  为木聚糖酶的活力( $\text{mkat}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $R=0.979, P<0.01$ .

整个模型的平方和(SS)结果表明: 实验的  $R^2$  值为 95.78%, 即只有 4.22% 的的变数不能由模型解释. 该模型的  $F$  检验值为 12.609, 说明模型可信度较高.

2.2 木聚糖酶生产影响因素的响应面分析

应用响应面分析培养时间( $X_1$ )、麸皮与玉米粉的质量比( $X_2$ )及蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的质量比( $X_3$ )对

木聚糖酶生产的影响,3 个因素两两相互作用的三维响应面如图 1 所示。

由表 3 可知,短小芽孢杆菌木聚糖酶的生产与培养时间的长短有很大关系( $X_1$  系数的  $P$  检验值小于 0.01),其他与木聚糖酶生产有关的因素有碳源的二次因子( $X_2^2$  的系数, $P$  检验值小于 0.05)。如图 1(a)所示,当麸皮与玉米粉的质量比为 5:10 或是 10:5 时,木聚糖酶的产量都呈相似的上升趋势,并且培养时间越短,酶产量越高。

一般而言,短小芽孢杆菌木聚糖酶的产酶培养时间需要 16 h 左右,与其半对数生长期相对应。产酶培养时间超过 20 h 后,芽孢快速生长,使细胞裂解;当细胞开始裂解时,蛋白激酶分泌到培养基中,使酶发生水解。本次优化实

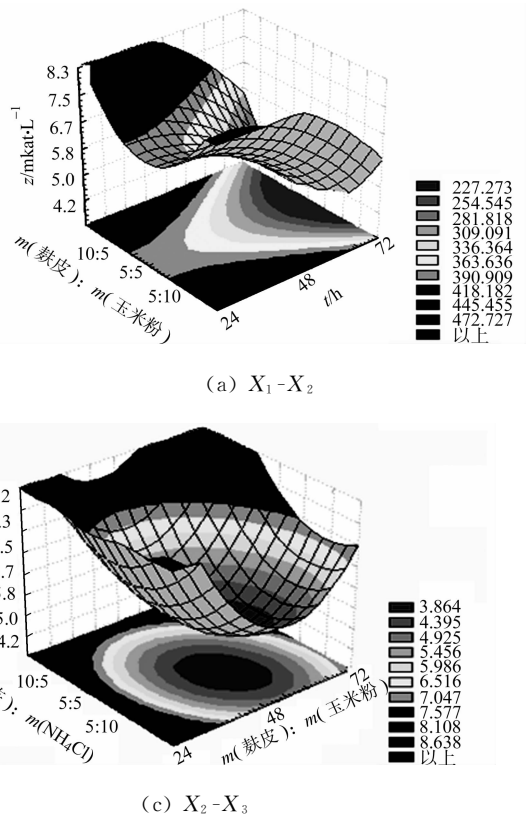


图 1 各因素与木聚糖酶产生的交互影响

Fig. 1 Interaction effect among the three factors responsible for xylanase production

验培养时间为 24 h,比 48 h 或 72 h 的酶产量都要高,说明培养时间在短小芽孢杆菌木聚糖酶的生产中起重要作用。

由表 3 可知,蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  质量比的一次效应( $P$  检验值小于 0.01)和二次效应( $P$  检验值小于 0.05)都具有统计学重要意义。由图 1(b)可知,培养时间和蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  比例的交互影响,同样对短小芽孢杆菌木聚糖酶的生产有重要影响。培养时间越短,蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  比例越大,产酶量越高。

由图 1(c)可知,当麸皮与玉米粉的质量比及蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的质量比分别为 5:5 和 2:5 时,不考虑培养时间,木聚糖酶的产酶量最低。然而,当培养基组成取值在图中直径最大的圆形区域以外的配比时,木聚糖酶产酶量最大。

2.3 与其他木聚糖酶产生菌产酶条件优化的比较

与其他细菌或真菌产木聚糖酶条件优化比较,本优化采用价格低廉的麸皮和玉米粉为复合碳源,未采用价格昂贵的木聚糖为单一碳源,约可使木聚糖酶整个生产过程的成本约降低 25%<sup>[7]</sup>。优化的最佳产酶培养时间仅为 24 h,与其他长达 11 d 的产木聚糖酶培养比较,极大缩短了产酶时间。据报道<sup>[8]</sup>,利用响应面法和中心组合设计优化 *Aspergillus fischeri* 产木聚糖酶,培养 72 h 后,产酶量仅提高了 1.9 倍;而以纤维素大豆残渣为碳源,应用 3 因素 2 水平中心组合设计实验优化 *Bacillus circulans* 产木聚糖酶,培养 120 h 后,产酶量提高了 2.5 倍<sup>[7]</sup>。另一以木聚糖为碳源的 3 因素 3 水平实验设计优化 *Bacillus circulans* D1 产木聚糖酶,经 48 h 培养后,木聚糖酶产量也仅提高了 3.15 倍<sup>[9]</sup>。文献<sup>[10]</sup>应用响应面法优化嗜盐细菌产胞外木聚糖酶,经 7 d 培养,产酶量提高了 20 多倍,但其使用价格昂贵的桦木木聚糖为底物,成本明显高。

对于上述回归出来的二次多项式方程进行求导求极值,在培养时间为 24 h,麸皮与玉米粉的质量浓度分别为 10,5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,蛋白胨与  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的质量浓度分别为 5,10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,得到理论上最大木聚糖酶活力为 12.0  $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为了验证此培养基成份和培养时间,重复实验 5 次,得到木聚糖酶活力平均值为 12.1  $\text{mkat} \cdot \text{L}^{-1}$ ,比基础培养基产木聚糖酶的活力提高了 12.2 倍。

### 3 结束语

以价格低廉的麸皮和玉米粉为复合碳源,以蛋白胨和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为复合氮源,对短小芽孢杆菌木聚糖酶产酶条件进行优化,应用响应面法对实验结果进行分析,回归出二次多项式回归模型。对模型进行分析,得到理论产酶极大值。将从模型导出的最高酶活力的培养基组成进行反复实验,得到的实验值与理论值匹配良好,单位体积发酵液中木聚糖酶活力提高了 12.2 倍。

#### 参考文献:

- [1] BEG Q K, KAPOOR M, MAHAJAN L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review[J]. Applied and Microbial Biotechnology, 2001, 56(3/4): 326-338.
- [2] 王涛, 万红贵, 蔡恒. 毕赤酵母液态发酵产木聚糖酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 108-111.
- [3] KHURI AI, CORNELL J A. Responses surfaces: Design and analyses[M]. New York: Marcel Dekker, 1987.
- [4] 崔月明, 樊妙姬, 韦莉莉, 等. 木聚糖酶产生菌 XY1432 液体发酵的响应面法优化[J]. 化工技术与开发, 2008, 37(11): 13-16.
- [5] KHAN A W. Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1986, 8(6): 373-377.
- [6] 洪楠. STATISTICA for windows 统计与图表分析教程[M]. 北京, 北京交通大学出版社, 2002.
- [7] SENTHILKUMAR S R, ASHOKKUMAR B, CHANDRA R K, et al. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn1 in solid-state fermentation using central composite rotary design[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(12): 1380-1386.
- [8] HECK J X, SOARES L H B, AYUB M A Z. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(4): 417-423.
- [9] BOCCHINI D A, ALVES-PRADO H F, BAIDA L C, et al. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 727-731.
- [10] WEJSE P L, INGVOSEN K, MORTENSEN K K. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(6): 721-727.

## Optimization of the Fermentation Conditions of Xylanase Production from *Bacillus pumilus* with Response Surface Analysis

GE Hui-hua, LIN Jin-xia, ZHANG Guang-ya

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The response surface analysis was applied to optimize the fermentation conditions of xylanase production from *Bacillus pumilus*. It resulted in a regression equation which reflected the interaction effect among carbon resource, nitrogen resource and cultivation time. The optimized fermentation conditions of xylanase production were: cultivation time 24 h, the proportion of bran and corn power 10 : 5, the proportion of peptone and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 : 10. In this optimal conditions, the level of xylanase production was  $12.1 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$ , with an increase of 12.2-fold compared with the enzyme production in the basic medium. The experimental value was very close to the theoretic value, which was  $12.0 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$  according to the regression equation.

**Keywords:** xylanase; *Bacillus pumilus*; response surface analysis; interaction

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)