

响应面法优化重组枯草芽孢杆菌 生产纤维素酶 EGA 的研究

陈 涛, 张漫莉, 李晶虹, 吴程雨, 赵辅昆, 陈 玮

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 通过响应面优化法(response surface methodology, RSM)对分泌表达纤维素酶 EGA 重组枯草芽孢杆菌的发酵条件进行优化。利用 Plackett-Burman 实验设计对淀粉、酵母粉、蛋白胨等 8 个因素对枯草芽孢杆菌产纤维素酶 EGA 的显著影响与否进行评估分析, 筛选得到淀粉、酵母粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 3 个显著影响的因素, 再利用 Box-Behnken 实验设计对这 3 个因素进行进一步优化, 确定最佳培养基的配比为淀粉 21 g/L, 酵母粉 11.26 g/L, 蛋白胨 25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.52 g/L, KH_2PO_4 0.395 g/L, NaCl 3.25 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L。在最优条件下, 利用小型发酵罐对重组菌进行扩大培养, 其最高酶活力达到 1 264 U/L。

关键词: 纤维素酶 EGA; 枯草芽孢杆菌; 响应面优化; 发酵

中图分类号: Q786

文献标志码: A

0 引 言

纤维素是由 β -1,4-糖苷键连接的多聚葡萄糖, 广泛地分布于自然界中, 如秸秆稻草、木材及各类废弃纸张等都是纤维素的丰富来源。同时, 纤维素又是自然界中分布最为广泛的可再生资源, 通过光合作用每年可产生超过 100 亿 t 纤维素物质贮存于植物干物质内。然而, 这巨大的资源宝库还未被有效开发与利用。通过生物降解的方法能有效地将纤维素物质转化成简单糖, 进而再发酵生产醇类物质, 可作为一种洁净的可再生资源^[1-4]。

纤维素的生物降解体系包含了各种组分的纤维素酶(cellulase)^[5-6], 其中最主要的为内切 β -1,4-葡聚糖酶(endo-1,4- β -glucanase, EC3.2.1.4)、外切 β -1,4-葡聚糖酶(exo-1,4- β -D-glucanase, EC3.2.1.91)和 β -1,4-糖苷酶(β -1,4-glucosidase, EC3.2.1.21)。通过各种酶的协同作用可将纤维素酶彻底降解成单糖。因此, 纤维素酶的获取是有效利用纤维素的关键之一。

纤维素酶 EGA 是由福寿螺胃液中分离出的共生菌株 *Bacillus* sp. Strain AC-1 所产的一种纤维素内切酶。该酶具有较好的热稳定性且在酸性条件下相对稳定, 有较好的工业应用前景^[7]。在前期工作中, 利用了枯草芽孢杆菌^[8]对其进行了重组表达, 在此基础上, 本文利用相应面法^[9-10]对已构建的重组菌株的发酵产酶条件进行了进一步优化, 并进行了小规模发酵放大实验, 为大规模生产纤维素酶 EGA 提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

重组枯草芽孢杆菌 pAUsp-ega/WB700, 由本实验室构建保存。

1.1.2 试剂

酵母粉、蛋白胨购自 OXOID 公司, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产试剂。

收稿日期: 2013-12-27

基金项目: 浙江省大学生科技创新项目(2013R406021)

作者简介: 陈 涛(1988-), 男, 浙江湖州人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和微生物发酵的研究。

通信作者: 陈 玮, 电子邮箱: cw@zstu.edu.cn

1.1.3 培养基

LB培养基:NaCl 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L。

枯草芽孢杆菌基础表达培养基:蛋白胨 20 g/L,酵母粉 10 g/L,可溶性淀粉 20 g/L,KH₂PO₄ 0.5 g/L,MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L,CaCl₂ 0.1 g/L,NaCl 5 g/L,FeSO₄ · 7H₂O 0.005 g/L。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶培养操作

将低温保存的 pAUsp-*ega*/WB700 甘油菌在的 LB 培养基固体平板上进行划线培养 12 h。挑取单个菌落接种至含 3 mL 的 LB 培养基的试管中,在 37℃,200 r/min 摇床中培养 8~12 h,以 1:100 的比例转接至含 50 mL LB 培养基的锥形瓶中,置于 37℃,200 r/min 摇床培养 24 h。收集发酵液于 4℃,5 000 r/min 离心 5 min 收集上清液,测定纤维素 EGA 酶活力。为保持菌株质粒稳定性,各级培养基中均含有终浓度为 50 μg/mL 硫酸卡纳霉素(Kanamycin)。

1.2.2 发酵罐培养操作

将筛选出的 pAUsp-*ega*/WB700 单克隆菌株先接种至含的 3 mL 的 LB 试管中,在 37℃,200 r/min 的摇床培养 8~12 h;再按 1:100 的比例接种至含 50 mL LB 培养基的锥形瓶中,在 37℃,200 r/min 培养 12 h 后转接至含 5 L 优化培养基的发酵罐中进行发酵培养,在培养温度为 37℃,pH 为 7.0,转速 800 r/min,通气量为 10 L/min 的稳定条件进行发酵培养,并间隔一定时间提取适量发酵液,离心取上清液测定酶活力。

1.2.3 纤维素酶 EGA 酶活力测定

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)检测法^[11]:先将羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶于 20 mM 的 pH 6.5 的磷酸钠缓冲液中,配成 1%(w/v)的溶液;取 180 μL 1%的 CMC-Na 于 65℃ 条件下预热 5 min;加入 20 μL 纤维素酶 EGA 酶液,在 65℃ 进行酶活反应 10 min;然后加入 500 μL DNS 试剂煮沸 5 min 终止反应;迅速冷却并加入 500 μL ddH₂O;利用分光光度计检测 520 nm 吸光值。以灭活的酶液进行空白对照。

酶活力定义:在羧甲基纤维素钠(CMC-Na)检测法中定义一个酶活力单位为 1 min 水解产生 1 μmol 还原糖所需的酶量。

1.2.4 Plackett-Burman 实验

根据前期单因素实验结果对包含空白在内的共 9 个因素分别选取高水平(用“1”表示)和低水平(用

“-1”表示)进行的 Plackett-Burman 实验设计,各因素值见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验设计

参数	因素	水平/(g/L)	
		-1	1
A	淀粉	15.00	25.00
B	酵母粉	10.00	12.00
C	蛋白胨	15.00	25.00
D	NaCl	2.50	7.50
E	磷酸盐	0.00	0.50
F	空白	—	—
G	CaCl ₂	0.00	0.10
H	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.00	2.00
J	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005	0.015

1.2.5 Box-Behnken 实验

在 Plackett-Burman 实验设计的基础上,对其显著影响产酶活力的因素重新编号,分别选取 3 个水平(高水平用“1”表示,中水平用“0”表示,低水平用“-1”表示)进行 Box-Behnken 实验设计分析,详细取值见表 2。

表 2 Box-Behnken 实验设计

参数	因素	水平/(g/L)		
		-1	0	1
A	淀粉	15	20	25
B	酵母粉	10	15	20
C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	1.5	2.0

2 结果

2.1 Plackett-Burman 实验设计结果

按表 1 的取值进行 Plackett-Burman 实验结果见表 3。

表 3 Plackett-Burman 实验结果

参数	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	重要性
Model	153912.4	9	17 101.38	32.054 95	0.030 6	
A	46582.13	1	46 582.13	87.313 88	0.011 3	1
B	36927.49	1	36 927.49	69.217 16	0.014 1	3
C	7132.613	1	7 132.613	13.369 42	0.067 3	7
D	8130.037	1	8 130.037	15.239 00	0.059 8	5
E	48.10673	1	48.106 73	0.090 172	0.792 3	9
F	48.10673	1	48.106 73	0.090 172	0.792 3	8
G	4754.243	1	4 754.243	8.911 388	0.096 3	4
H	42451.27	1	42 451.27	79.570 98	0.012 3	2
J	7838.4	1	7 838.400	14.692 36	0.061 8	6

$R^2=99.31\%$, $R^2(\text{调整})=96.21\%$

表 3 的结果通过 Design Expert 7.0 软件对数据进行分析。当 P 值小于 0.05 时,该因素为显著影响因素,由分析结果可知, A 、 B 、 H 为 3 个显著影响因素。 R^2 (调整)为 96.21%,表示此模型可以解释 96.21%的以上实验结果,且可靠。

2.2 Box-Behnken 实验设计结果

Box-Behnken 实验数据结合软件分析的结果见表 4 和表 5,所选取的 3 个因素中各因素的交互作用见图 1—3 图。

等高线图越接近椭圆,说明这两个因素之间的交互作用显著,反之,若等高线图接近圆形则说明这两个因素之间的交互作用不显著。由图 1—图 3 的响应面和等高线图可以直观地反映出各因素之间的交互作用,其中,淀粉和酵母粉之间的交互作用最显著。而图 1—图 3 的响应面立体显示的顶点即为产酶量的最大值,该顶点的坐标值则为对应最大产酶时各因素的取值,分别是 $A=0.2$, $B=0.08$, $C=0.03$,对应浓度为可溶性淀粉 21 g/L,酵母粉 11.26

g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.52 g/L,获得最优产酶量为 1 052 U/L。

表 4 Box-Behnken 实验数据

试验号	因素			酶活/(U/L)
	A	B	C	
1	−1	−1	0	748.6
2	−1	1	0	670.9
3	0	0	0	1 118.9
4	1	1	0	875.8
5	−1	0	−1	706.2
6	1	0	−1	819.3
7	0	0	0	1 038.4
8	−1	0	1	642.6
9	1	0	1	805.2
10	0	1	1	791.0
11	0	−1	−1	720.4
12	0	−1	1	784.0
13	1	−1	0	706.2
14	0	1	−1	713.3
15	0	0	0	981.8

表 5 Box-Behnken 实验数据软件分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
MODEL	254 448.28	9	28 272.031	7.789 162 8	0.018 0	显著
A	24 002.405	1	24 002.405	6.612 847 9	0.049 9	
B	1 053.405	1	1 053.405	0.290 221 2	0.613 2	
C	505.62	1	505.62	0.139 302 2	0.724 3	
AB	15 289.323	1	15 289.323	4.212 326 4	0.095 4	
AC	612.562 5	1	612.562 5	0.168 765 7	0.698 2	
BC	49.702 5	1	49.702 5	0.013 693 4	0.911 4	
A^2	85 780.1	1	85 780.1	23.633 08	0.004 6	
B^2	76 108.003	1	76 108.003	20.968 343	0.006 0	
C^2	83 766.039	1	83 766.039	23.078 19	0.004 9	
残差项	18 148.312	5	3 629.662 3			
失拟项	8 654.905	3	2 884.968 3	0.607 783 6	0.670 7	不显著
误差项	9 493.4067	2	4 746.703 3			
总和	272 596.59	14				

$R^2=91.34\%$, R^2 (调整)=81.36%

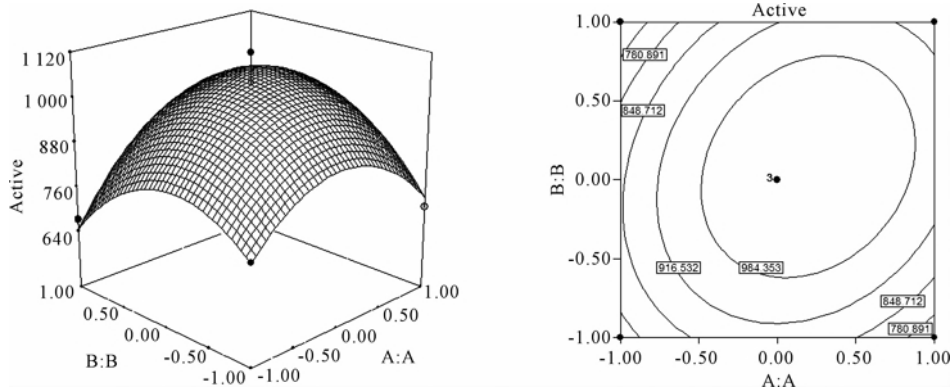
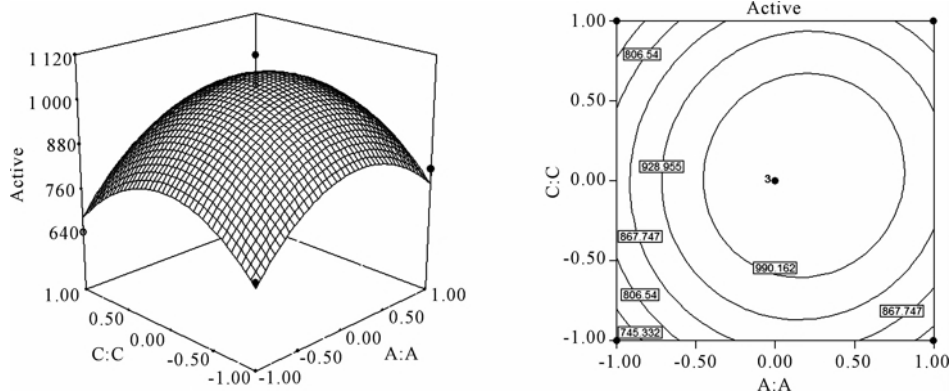
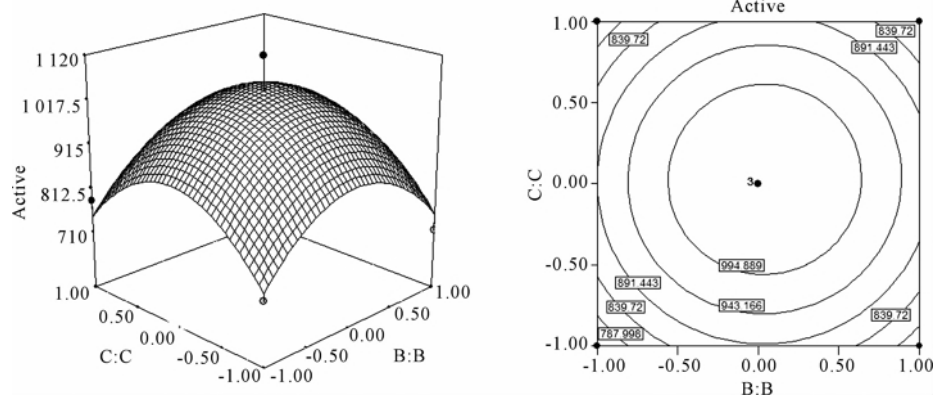


图 1 淀粉和酵母粉影响产酶量的响应和等高线

图2 淀粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 影响产酶量的响应和等高线图3 酵母粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 影响产酶量的响应和等高线

2.3 发酵实验

在响应面优化的基础上采用小型发酵罐对重组菌进行扩大培养。控制温度为 37°C 、利用稀 HCl 和 NaOH 控制发酵过程 pH 为 7, 恒定转速为 800 r/min, 通气量为 10 L/min。取不同时间点检测发酵液菌体密度和上清酶活力其结果如图 4 示。

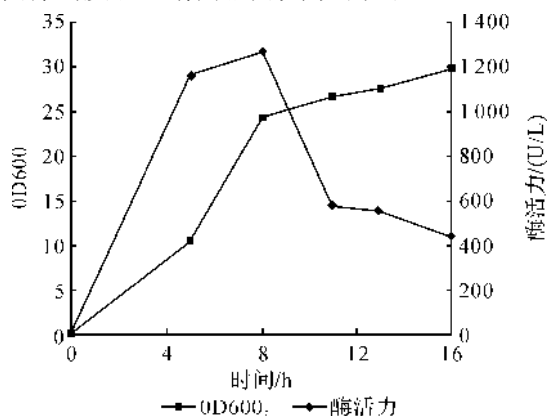


图4 发酵时间与菌体生长密度和纤维素酶 EGA 产酶活力的关系曲线

菌体的生长在 8 h 内呈现对数增长的趋势, 同时纤维素酶活力快速增长; 发酵至 8 h 时达到最大产酶量 1264 U/L。之后, 菌体生长逐渐进入平台期, 发酵体系中蛋白水解酶的逐渐积累, 纤维素酶

EGA 被降解, 酶活力持续降低。

3 结论

纤维素酶作为一种高效的生物催化剂, 其应用主要集中在饮料业, 发酵、酿造工业, 饲料工业和医药行业中, 除此之外, 纤维素酶在糖化发酵生产燃料乙醇的领域也有重要的应用。本文通过响应面优化法对重组枯草芽孢杆菌 pAUsp-ega/WB700 产纤维素酶 EGA 进行发酵培养基配比进行优化, 通过 Plackett-Burman 实验设计, 从各培养基组分中筛选出显著影响因素为淀粉、酵母粉和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。并对这 3 个因素进一步使用 Box-Behnken 实验设计方案, 结合软件分析, 确定摇瓶培养的最优产酶时各因素的取值分别为淀粉 21 g/L, 酵母粉 11.26 g/L, 蛋白胨 25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.52 g/L, KH_2PO_4 0.395 g/L, NaCl 3.25 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L。在此基础上, 采取发酵罐扩大培养, 相比普通的摇瓶实验只能控制体系的温度和转速, 发酵实验过程中还可以精准的控制体系的 pH、溶氧量和营养成份, 发酵产纤维素酶 EGA 的最高酶活力可达 1264 U/L, 相比原始菌种的产酶活力提高了 6 倍^[12], 对提高纤维素酶表达量, 广泛应用于工业化生产具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Zhu W, Wang H, Lu Y, et al. Functional characteristics and diversity of a novel lignocelluloses degrading composite microbial system with high xylanase activity [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(2): 254-264.
- [2] Fukuoka A, Dhepe P L. Catalytic conversion of cellulose into sugar alcohols[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(31): 5161-5163.
- [3] Taherzadeh M J, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(9): 1621-1651.
- [4] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4851-4861.
- [5] Zhang Y H P, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88(7): 797-824.
- [6] Eveleigh D E, Mandels M, Andreotti R, et al. Measurement of saccharifying cellulase[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2(1): 1-8.
- [7] Irshad M N, Anwar Z, But H I, et al. The industrial applicability of purified cellulase complex indigenously produced by *trichoderma viride* through solid-state bioprocessing of agro-industrial and municipal paper wastes [J]. *BioResources*, 2012, 8(1): 145-157.
- [8] 李 明, 双 宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(9): 111-114.
- [9] Baş D, Boyacı İ H. Modeling and optimization i: usability of response surface methodology[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78(3): 836-845.
- [10] Trupkin S, Levin L, Forchiasin F, et al. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(12): 682-690.
- [11] 张漫莉, 耿新伟, 王梦婷, 等. 纤维素酶 EGA 基因在枯草芽孢杆菌中的表达及其产物性质研究[J]. *浙江理工大学学报*, 2013, 30(3): 389-393.
- [12] Li Y H, Ding M, Wang J, et al. A novel thermoacidophilic endoglucanase, ba-ega, from a new cellulose-degrading bacterium, *bacillus* sp. Ac-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(4): 430-436.

Research on Cellulase EGA Production through Optimization and Recombination of *Bacillus Subtilis* Based on Response Surface Methodology

CHEN Tao, ZHANG Man-li, LI Jing-hong, WU Cheng-yu, ZHAO Fu-kun, CHEN Wei
(School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Response Surface Methodology was used to optimize the fermentation conditions for secretory expression cellulase EGA and recombination of *bacillus subtilis*. Plackett-Burman experimental design was adopted to evaluate and analyze obvious effects of 8 factors (including starch, yeast powder and peptone) on producing cellulase EGA by *bacillus subtilis*. 3 factors with obvious effects were screened out: starch, yeast powder and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Then, Box-Behnken experimental design was used to further optimize the 3 factors. Finally, the ratio of optimal culture medium was confirmed as follows: starch 21 g/L, culture medium 11.26 g/L, peptone 25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.52 g/L, KH_2PO_4 0.395 g/L, NaCl 3.25 g/L, CaCl_2 0.1 g/L and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L. Under the optimal conditions, a small fermentation tank was used to enlarge cultivation of recombinant bacteria. The highest enzyme activity reached 1 264 U/L.

Key words: cellulase EGA; *bacillus subtilis*; response surface methodology; fermentation

(责任编辑: 许惠儿)