

# $\beta$ -葡萄糖苷酶新型高产菌株筛选及其液态发酵培养基的优化

张益波 王娟 何欢 韩微 张盈 田鸿儒 刘青 毛国涛 逯家辉 滕利荣\*

(吉林大学 生命科学学院 吉林 长春 130012)

**摘要:** 从腐败的玉米秸秆上分离得到一株能够发酵生产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的弯颈霉属的柱孢弯颈霉菌株 syzx4, 使用统计学方法对其发酵培养基进行优化。在单因子实验的基础上使用 Plackett-Burman 法对碳源、氮源和无机盐进行产酶显著性分析, 培养基组分对  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产影响的排序为: 气爆秸秆粉(TCS) $>$ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> $>$ 黄豆饼粉(SM) $=$ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。响应面模型结果表明最优培养基为: TCS 25.72 g/L, SM 6.82 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.90 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.21 g/L, 其余成分保持原始浓度。在 30 °C 发酵 8 d,  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性可以达到 2.21 U/mL。

**关键词:** 工农业废料,  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 柱孢弯颈霉 syzx4, 液体深层发酵(SmF), 响应面分析法(RSM)

## Production of $\beta$ -glucosidase by a novel isolated strain *Tolypocladium cylindrosporum* syzx4 and statistical optimization of fermentation media

ZHANG Yi-Bo WANG Juan HE Huan HAN Wei ZHANG Ying TIAN Hong-Ru  
LIU Qing MAO Guo-Tao LU Jia-Hui TENG Li-Rong\*

(College of Life Science, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China)

**Abstract:** A novel fungus, named *Tolypocladium cylindrosporum* syzx4, which can efficiently produce extracellular  $\beta$ -glucosidase, was isolated from naturally rotten corn stover. It is first time to report the  $\beta$ -glucosidase produced by *T. cylindrosporum* gams using agro-industrial residues in SmF. The fermentation variables optimized by single-factor experiment approach were further optimized by statistical optimization. Results of Plackett-Burman design indicated the evaluation of the medium components could be ranked as: TCS $>$ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> $>$ SM $=$ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. With the optimum medium, viz. TCS 25.72 g/L, SM 6.82 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.90 g/L and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.21 g/L predicted by RSM model with others as the

基金项目: 吉林省农业重大专项项目(No. 20096013); 吉林大学研究生创新基金资助项目(No. 20101043)

\*通讯作者: Tel: 86-431-85168646; ✉ zhangy08@mails.jlu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-08; 接受日期: 2010-12-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

original, 2.21 U/mL  $\beta$ -glucosidase activity was obtained. The results suggest that the  $\beta$ -glucosidase can be used for various biotechnological applications.

**Keywords:** Agro-industrial residues,  $\beta$ -Glucosidase, *Tolypocladium cylindrosporium* syzx4, Submerged fermentations (SmF), Response surface methodology (RSM)

$\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21;  $\beta$ -D-糖苷水解酶)在不同生物中由多种同源酶组成,它从非还原性末端催化水解  $\beta$ -葡萄糖苷键释放  $\beta$ -D-葡萄糖。在纤维素糖化过程中, $\beta$ -葡萄糖苷酶是分解纤维二糖生产葡萄糖的关键酶。 $\beta$ -葡萄糖苷酶重要的工业化应用价值还体现在食品、葡萄酒加香,纺织和洗涤,以及造纸等方面。目前,阻碍  $\beta$ -葡萄糖苷酶大规模应用的瓶颈问题是生产成本过高,还没有成型的工业化试剂。我国是农业大国,每年都有大量的工农业废料,这些廉价、可再生的废料在发酵培养基的应用中具有很大的潜力<sup>[1]</sup>。

关于弯颈霉属菌株最早的报道是在欧洲作为一种土壤腐生菌进行研究<sup>[2]</sup>,并发展为极有潜力的一种杀幼蚊剂新产品<sup>[3]</sup>。目前还没有关于将柱孢弯颈霉应用于纤维素酶生产领域中的报道。

本研究从天然腐烂的玉米秸秆中分离、筛选到一株能高效生产胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶的菌株,柱孢弯颈霉 syzx4,并研究不同工农业废料和无机离子作为其液体深层发酵(SmF)的培养基。在单因子实验优化发酵碳源、氮源的基础上,使用 Plackett-Burman 设计实验<sup>[4]</sup>筛选了产酶的影响显著因子,并使用响应面法进一步优化<sup>[5]</sup>,得到最佳的  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵生产培养基配比,为此菌株在  $\beta$ -葡萄糖苷酶大规模发酵生产上提供参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:** 实验中的化学试剂购买于 Sigma,工农业废料由吉林燃料乙醇有限公司提供。

**1.1.2 仪器设备:** 电热恒温培养箱 SKP-01 (湖北省黄石市医疗器械厂,中国湖北),超净工作台 VS-1300-U (苏净集团安泰公司,中国),紫外可见分光光度计 752 (上海光谱仪器有限公司,中国上海),SKPC-01 电热恒温鼓风干燥箱(湖北省黄石市医疗

器械厂),MDF-492 超低温冰箱(日本三洋公司),可调式微量取液器(德国 Eppendorf 公司)等。

**1.1.3 培养基(g/L):** 纤维二糖诱导培养基: 酵母 2.5, 纤维二糖 2.5, 蛋白胨 2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.2, 七叶苷 1, 琼脂粉 20, 灭菌后加入滤菌后的柠檬酸铁铵溶液至铁的终浓度为 0.3%<sup>[6]</sup>。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株分离方法:** 实验菌株是从东北农村腐烂的玉米秸秆中筛选得到的。在 250 mL 的摇瓶中,加入剪成小块的腐烂的玉米秸秆样本和已消毒的玻璃珠,摇床振荡制备样品悬液,加入适量纤维二糖在 30 °C、130 r/min 条件培养 5 d。离心取上清梯度稀释,取  $10^3$ - $10^6$  倍体积稀释液涂布到筛选平板,过夜培养后挑选出黑色透明圈与菌落直径比值较大的菌落,接种于纤维二糖诱导培养基,30 °C 摇床培养 5 d, 12 000×g、4 °C 离心 10 min,取上清测定  $\beta$ -葡萄糖苷水解酶活性<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 菌株鉴定:** 菌株形态和分子生物学鉴定过程由武汉典型微生物保藏中心完成。

**1.2.3 培养基质的前处理:** 工农业废渣即麦麸(WB)、气爆玉米秸秆(TCS)、未处理的玉米秸秆(UTCS)、酒糟(DDG)、玉米浆(CSL)、豆粉(SM)和豆饼粉(BCP)由吉林燃料乙醇公司提供。将这些原料烘干粉碎,过 0.355 mm (45 目)筛分离后备用。

**1.2.4 接种和培养条件:** 诱导产酶培养基的配制(g/L): 碳源 20, 氮源 5, Mandels 营养盐<sup>[8]</sup>,  $1 \times 10^5$  Pa 高压蒸汽灭菌 30 min, 备用。

种子悬液的制备: 菌株接种于 PDA 斜面, 30 °C 培养 5 d 使其产生孢子, 使用 0.85% 的无菌 NaCl 冲洗孢子并摇匀。按照体积比为 0.5% 接种, 30 °C、120 r/min 培养 8 d 后, 离心取上清测定酶活力。

**1.2.5 酶活力测定方法:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定采用 pNPG 法进行测定<sup>[9]</sup>。1 个酶活性单位(U)定义为

实验条件下每分钟从底物中分解释放 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯所消耗的酶量。

**1.2.6 培养基优化实验设计:** (1) 单因子筛选碳、氮源: 采用的工农业废料 WB、TCS、UTCS、WS、DDG、CSL、SM、BCP 作为待选培养基组分, 对  $\beta$ -葡萄糖苷酶碳、氮源进行筛选。

(2) Plackett-Burman 实验设计: 通过 Plackett-Burman 实验设计<sup>[10]</sup>来探讨 7 种因素[TCS、SM、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ ]对发酵产酶的影响。表 1 给出了各个参数的最高和最低值, 最高参数平均为最低参数的 2.0 倍<sup>[11]</sup>。表 2 为本实验使用的实验设计方案, 表中分别使用 -1 和 +1 表示高低水平。在 12 组平行设计中设有 8 个可变参数, 虚拟变量 *I*、*J* 和 *K*, 用来评估实验的标准误差。

(3) 响应面分析法(RSM): 确定了对  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性有显著影响的变量后, 设计了以 TCS、SM、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 因素 5 水平中心组合实验。表 2 中列出变量的编码情况及其编码值。

(4) 统计分析: SAS 软件(8.0 版, SAS Institute Inc., USA)和 Matlab 软件(Version 8.0 by SAS Institute Inc., USA)分别用来对所得数据进行回归和图形分析。

表 1 Plackett-Burman 实验设计中的因子水平和编码表  
Table 1 Level and code of variables chosen of Plackett-Burman design experiments

| 变量<br>Independent  | 变量水平<br>Variable levels                          |                        |
|--|--|------------------------|
|  | 低水平<br>Low level (-1)                            | 高水平<br>High level (+1) |
|  | <i>A</i> Microelement solution ( $\mu\text{L}$ ) | 100.0                  |
| <i>B</i> TCS (g/L)                                       | 20.0   | 40.0                   |
| <i>C</i> SM (g/L)  | 5.0  | 10.0                   |
| <i>D</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)                  | 1.4  | 2.8                    |
| <i>E</i> $\text{CaCl}_2$ (g/L)                           | 2.0  | 4.0                    |
| <i>F</i> $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CO}$ (g/L)         | 0.4  | 0.8                    |
| <i>G</i> $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) | 0.3  | 0.6                    |
| <i>H</i> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)              | 3.5  | 7.0                    |
| <i>I</i> Dummy variable                                  | -  | -                      |
| <i>J</i> Dummy variable                                  | -  | -                      |
| <i>K</i> Dummy variable                                  | -  | -                      |

表 2 中心组合设计实验中变量的最大和最小值  
Table 2 Maximum and minimum levels of the variables used in the central composite experimental design

| 变量<br>Independent                            | 变量水平<br>Variable levels |      |      |      |      |
|--|-------------------------|------|------|------|------|
|  | -2                      | -1   | 0    | 1    | 2    |
| <i>X1</i> TCS (g/L)                          | 10.0                    | 20.0 | 30.0 | 40.0 | 50.0 |
| <i>X2</i> SM (g/L)                           | 2.5                     | 5.0  | 7.5  | 10.0 | 12.5 |
| <i>X3</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)     | 1.0                     | 1.5  | 2.0  | 2.5  | 3.0  |
| <i>X4</i> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) | 2.0                     | 3.5  | 5.0  | 6.5  | 8.0  |

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离鉴定

从筛选的平板上选出 200 个黑色透明圈和菌落比值较大的菌落, 选择最大比例的 4 株(syzyx 1、syzyx 2、syzyx 3 和 syzyx 4), 分别使用纤维二糖诱导培养基培养, 诱导培养后的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力分别为 1.06、1.24、1.35 和 1.48 U/mL。

将 syzyx4 在 PDA 培养基上培养 3 d 后进行形态观察, syzyx4 菌落柔软的绿色菌丝在培养基上逐渐扩散。显微形态观察显示其菌丝分开且修长, 分生孢子梗较短, 呈圆柱形, 侧枝或末端有螺旋瓶梗, 在其顶端上膨胀形成球茎。对该菌株的 ITS 序列进行鉴定, 该序列提交到 GenBank 数据库, 登录号为 GU244350。形态学和 ITS 序列分析表明 syzyx4 在系统发育学上属弯颈霉属的柱孢弯颈霉, 已经获得武汉典型微生物保藏中心鉴定和保藏, 菌株的保藏编号为 CCTCC M 209312。

### 2.2 单因子实验优化碳、氮源

在这类需要从培养基上清中获得产物的发酵过程中, 碳源和氮源的选择对产物生产是非常重要的。几种工农业废料中, WB、TCS、UTCS 和 WS 被用作碳源, CSL、DDG、SM 和 BCP 被用作氮源, 对  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵过程进行优化, 实验结果见表 3。

从实验结果看, TCS 是最好的碳源。TCS 经气爆前处理后, 其干重组成如下: 纤维素 49.5%, 木质素 28.6%, 半纤维素 8.6%, 葡萄糖 0.6%, 其它 12.1%。与其它碳源相比, 0.6%的葡萄糖以及疏松的结构组成更适合于酶的发酵生产。氮源对  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产也有很重要的作用, SM 做培养基时  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性为 2.075 U/mL, 这与 SM 中富含微量元素和维生素等物质<sup>[12]</sup>有很大的关系。

表3 不同碳源对酶活和生物量的影响  
Table 3 Effect of different carbon sources on enzyme activity and cell weight of yeast

| 培养基成分来源<br>Source   | 酶活<br>Enzyme activity (U/mL) |
|---------------------|------------------------------|
| 碳源 Carbon source    |                              |
| WB                  | 1.035                        |
| TCS                 | 1.716                        |
| UTCS                | 1.353                        |
| WS                  | 1.146                        |
| 氮源 Nitrogen sources |                              |
| CSL                 | 1.186                        |
| DDG                 | 1.439                        |
| SM                  | 2.075                        |
| BCP                 | 1.597                        |

### 2.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶产量影响因子的评价

按照表1给出的变量取值,通过SAS软件设计的Plackett-Burman实验进行发酵,得到发酵液的酶活力见表4。使用SAS软件对数据进行拟合,得到

的一次多项式模型为:

$$Y=2.03025+0.004083A+0.049083B+0.00475C+0.005417D+0.00275E+0.002083F-0.002083G+0.00475H \quad (1)$$

一次多项式拟合的相关系数 $R^2$ 值为0.9963,回归模型相关度也较为显著( $P<0.05$ )。这些结果表明该模型解释了Plackett-Burman实验中99.6%的数据。以此结果基础,我们选择 $B$ 、 $C$ 、 $D$ 和 $H$ 这4个因素,并用中心组合设计法确定其在SmF培养基中的最佳浓度。

表5列出了在90%的置信区间上变量 $t$ 检验的结果,表明在Plackett-Burman设计所筛选的变量中, $B$ 、 $C$ 、 $D$ 和 $H$ 对 $\beta$ -葡萄糖苷酶产量具有正项影响。其中 $B$  ( $P<0.01$ )是对 $\beta$ -葡萄糖苷酶产量具有正项影响的最重要的因子。其它变量按对 $\beta$ -葡萄糖苷酶产量影响大小依次排序为 $B>D>C=H>A>E>F>G$ 。

表4 以 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性为指标的Plackett-Burman实验设计结果  
Table 4 Results of Plackett-Burman design experiments with  $\beta$ -glucosidase activity as responses

| 实验安排<br>Run | 变量 Variables |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 酶活<br>Enzyme activity (U/mL) |
|-------------|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------------|
|             | A            | B  | C  | D  | E  | F  | G  | H  | I  | J  | K  |                              |
| 1           | 1            | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1.979                        |
| 2           | 1            | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 2.084                        |
| 3           | -1           | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 2.068                        |
| 4           | 1            | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1.993                        |
| 5           | 1            | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 2.080                        |
| 6           | 1            | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 2.099                        |
| 7           | -1           | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | 2.077                        |
| 8           | -1           | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1.994                        |
| 9           | -1           | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | 1.986                        |
| 10          | 1            | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1.971                        |
| 11          | -1           | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | 2.068                        |

表5 Plackett-Burman试验各因素参数的 $t$ -检验分析结果  
Table 5 Regression analysis and  $t$ -test of the Plackett-Burman design experiments

| 变量<br>Variables | 系数<br>Estimate | $t$ -值<br>$t$ -value | $Pr> t $ | 变量<br>Variables | 系数<br>Estimate | $t$ -值<br>$t$ -value | $Pr> t $ |
|-----------------|----------------|----------------------|----------|-----------------|----------------|----------------------|----------|
| A               | 0.008167       | 2.298840             | 0.105100 | G               | -0.004170      | -1.172880            | 0.325499 |
| B               | 0.098167       | 27.633000            | 0.000104 | H               | 0.009500       | 2.674161             | 0.075423 |
| C               | 0.009500       | 2.674161             | 0.075423 | I               | -              | -                    | -        |
| D               | 0.010833       | 3.049482             | 0.055451 | J               | -              | -                    | -        |
| E               | 0.005500       | 1.548198             | 0.219328 | K               | -              | -                    | -        |
| F               | 0.004167       | 1.172878             | 0.325499 |                 |                |                      |          |

Note:  $P=Pr>|t|$ .

## 2.4 中心组合设计法优化培养基

以 Plackett-Burman 设计法的结果为基础,  $B$ 、 $C$ 、 $D$ 、 $H$  的中心点和变化范围按表 3 进行选择。培养基其它组分的浓度设定为其在 Plackett-Burman 设计中相应较低的值。因子的编码值、实验安排和结果见表 6。

按照表 6 的结果得到描述  $\beta$ -葡萄糖苷酶和这 3 个变量之间关系的多项式模式如下:

$$\begin{aligned}
 Y = & 2.07213 - 0.083944X_1 - 0.047092X_2 + \\
 & 0.046804X_3 - 0.181353X_4 - 0.198761X_1^2 - \\
 & 0.004131X_1X_2 - 0.006139X_1X_3 + \\
 & 0.072039X_1X_4 - 0.093566X_2^2 - 0.002169X_2X_3 + \\
 & 0.004159X_2X_4 - 0.064808X_3^2 + 0.020813X_3X_4 - \\
 & 0.087449X_4^2 \quad (2)
 \end{aligned}$$

此处  $Y$  为代表  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  和  $X_4$  分别表示测试变量  $B$ 、 $C$ 、 $D$  和  $H$  的编码值。表 7 列出了此实验得到模型和相对应参数的显著性

分析结果。

从表 7 的方差分析结果可以看出, 此实验得到的模型回归显著性  $P < 0.01$ 。用以评价回归模型拟合度的  $R^2$  值为 0.9295, 这表明方程(2)代表的模型适合于模拟此发酵过程。在独立变量中的 TCS ( $X_1$ )、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ ) 的影响非常显著, 其  $P$  值 ( $< 0.01$ ) 分别为 0.000827 和 0.0001, SM ( $X_2$ ) 和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_3$ ) ( $P < 0.05$ ) 的影响显著。在二次变量中,  $X_1 \times X_1$ 、 $X_2 \times X_2$ 、 $X_3 \times X_3$  和  $X_4 \times X_4$  具有显著影响, 其  $P$  值 ( $< 0.01$ ) 分别为 0.0001、0.0001、0.002257 和 0.000125。TCS ( $X_1$ )、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ ) 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性之间的线性和二次方关系都很显著, 表明这 2 个变量对增加  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性起重要作用, 而其它因子的相互作用系数则不显著。这些结果表明变量与响应值之间不是简单的线性或二次方关系, 他们之间的交互作用也很重要。

表 6 中心组合设计实验的方案及结果  
Table 6 Experimental design and results of the central composite design (CCD)

| Run | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | 酶活力<br>Enzyme activity (U/mL) | Run | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | 酶活力<br>Enzyme activity (U/mL) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|
| 1   | -1    | -1    | -1    | -1    | 2.09182                       | 19  | 0     | -2    | 0     | 0     | 1.80309                       |
| 2   | -1    | -1    | -1    | 1     | 1.50251                       | 20  | 0     | 2     | 0     | 0     | 1.58526                       |
| 3   | -1    | -1    | 1     | -1    | 2.01180                       | 21  | 0     | 0     | -2    | 0     | 1.66470                       |
| 4   | -1    | -1    | 1     | 1     | 1.65402                       | 22  | 0     | 0     | 2     | 0     | 1.95372                       |
| 5   | -1    | 1     | -1    | -1    | 1.92793                       | 23  | 0     | 0     | 0     | -2    | 2.08254                       |
| 6   | -1    | 1     | -1    | 1     | 1.41990                       | 24  | 0     | 0     | 0     | 2     | 1.35475                       |
| 7   | -1    | 1     | 1     | -1    | 2.08386                       | 25  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07509                       |
| 8   | -1    | 1     | 1     | 1     | 1.51422                       | 26  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.03648                       |
| 9   | 1     | -1    | -1    | -1    | 1.59595                       | 27  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.08732                       |
| 10  | 1     | -1    | -1    | 1     | 1.35593                       | 28  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.06921                       |
| 11  | 1     | -1    | 1     | -1    | 1.73250                       | 29  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07179                       |
| 12  | 1     | -1    | 1     | 1     | 1.43788                       | 30  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07296                       |
| 13  | 1     | 1     | -1    | -1    | 1.57303                       | 31  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07179                       |
| 14  | 1     | 1     | -1    | 1     | 1.29543                       | 32  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07916                       |
| 15  | 1     | 1     | 1     | -1    | 1.46669                       | 33  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07338                       |
| 16  | 1     | 1     | 1     | 1     | 1.40678                       | 34  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07231                       |
| 17  | -2    | 0     | 0     | 0     | 1.19160                       | 35  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07810                       |
| 18  | 2     | 0     | 0     | 0     | 1.35519                       | 36  | 0     | 0     | 0     | 0     | 2.07796                       |

表 7  $\beta$ -葡萄糖苷酶响应面二次多项式方差分析结果Table 7 ANOVA results and regression coefficients of response surface quadratic model for  $\beta$ -glucosidase activity

| Source        | DF | SS        | MS        | F-value     | Pr>F      |
|---------------|----|-----------|-----------|-------------|-----------|
| X1            | 1  | 0.169 120 | 0.169 120 | 15.203 100  | 0.000 827 |
| X2            | 1  | 0.053 224 | 0.053 224 | 4.784 623   | 0.040 169 |
| X3            | 1  | 0.052 574 | 0.052 574 | 4.726 153   | 0.041 288 |
| X4            | 1  | 0.789 333 | 0.789 333 | 70.957 430  | 0.000 100 |
| X1×X1         | 1  | 1.264 193 | 1.264 193 | 113.645 200 | 0.000 100 |
| X1×X2         | 1  | 0.000 273 | 0.000 273 | 0.024 550   | 0.876 991 |
| X1×X3         | 1  | 0.000 603 | 0.000 603 | 0.054 215   | 0.818 139 |
| X1×X4         | 1  | 0.083 033 | 0.083 033 | 7.464 267   | 0.012 488 |
| X2×X2         | 1  | 0.280 147 | 0.280 147 | 25.183 910  | 0.000 100 |
| X2×X3         | 1  | 0.000 075 | 0.000 075 | 0.006 769   | 0.935 210 |
| X2×X4         | 1  | 0.000 277 | 0.000 277 | 0.024 879   | 0.876 176 |
| X3×X3         | 1  | 0.134 401 | 0.134 401 | 12.082 040  | 0.002 257 |
| X3×X4         | 1  | 0.006 931 | 0.006 931 | 0.623 079   | 0.438 728 |
| X4×X4         | 1  | 0.244 717 | 0.244 717 | 21.998 970  | 0.000 125 |
| Model         | 14 | 3.078 900 | 0.219 921 | 19.769 940  | 0.000 100 |
| Linear        | 4  | 1.064 251 | 0.266 063 | 23.917 830  | 0.000 100 |
| Quadratic     | 4  | 1.923 457 | 0.480 864 | 43.227 530  | 0.000 100 |
| Cross Product | 6  | 0.091 192 | 0.015 199 | 1.366 293   | 0.273 541 |
| Error         | 21 | 0.233 605 | 0.011 124 |             |           |
| Total         | 35 | 3.312 505 |           |             |           |

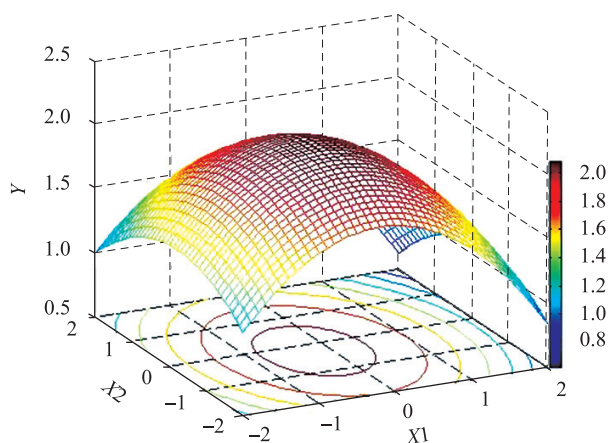
Note:  $P=Pr>F$ ;  $DF$ =Degree of freedom;  $SS$ =Sum of squares;  $MS$ =Mean square.

为理解变量之间的相互关系及发酵中最高  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性下每个变量的水平, 我们用 Matlab R2008a 作出了三维响应面曲线和等高线图。

图 1 显示了 TCS ( $X_1$ )和 SM ( $X_2$ )对  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响。由图 1 可看出当 SM ( $X_2$ )浓度较低时, 随 TCS ( $X_1$ )浓度的增加,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性先稳定升高然后下降, SM ( $X_2$ )浓度在较高水平时依然如此。因此, TCS ( $X_1$ )和 SM ( $X_2$ )之间的相互作用可忽略。并且, 用 Matlab 软件的 Meshgrid 函数分析后显示要获得 2.086 5 U/mL  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的最佳浓度为 25.718 g/L TCS 和 6.8224 g/L SM。

图 2 描绘了显示 TCS ( $X_1$ )和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ )对  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响的三维响应面和等高线图。很明显, 当 TCS ( $X_1$ )值较低时,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性随  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ )值的下降而显著升高, 而当 TCS ( $X_1$ )值较高时,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性随  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ )值的

下降而成平缓升高趋势。TCS ( $X_1$ )和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_4$ )强烈的相互作用不仅在低概率值上有所表现, 也可以从响应面和等高线图中反应出来<sup>[13]</sup>。

图 1  $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线分析图Fig. 1  $Y=f(X_1, X_2)$  of responsive surfaces and contours

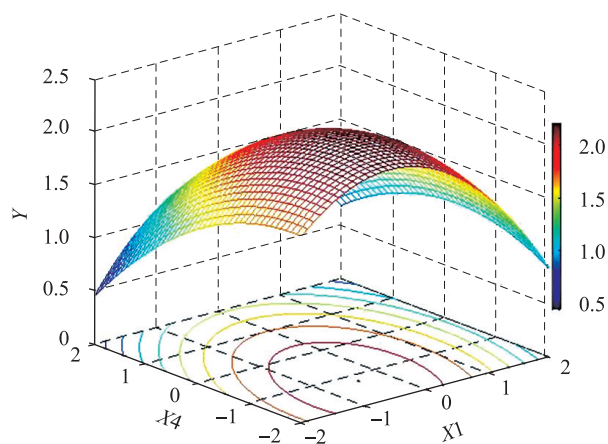


图2  $Y=f(X1, X4)$ 的响应面和等高线分析图  
Fig. 2  $Y=f(X1, X4)$  of responsive surfaces and contours

使用 SAS RSREG 求解得到  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵的最佳培养基组成为: TCS 25.72 g/L, SM 6.82 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.90 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.21 g/L, 其它组分保持原始浓度。最优培养基预测发酵生产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力为 2.209 U/mL。

为检验模型的可行性, 使用推算的最优培养基进行了 3 次平行实验, 平均活力为 2.21 U/mL。预测值与实验值相吻合, 表明此统计模型能够满足发酵过程的模拟, 实验结果对工业化生产有重要参考价值。

### 3 结论

本实验从腐败的玉米秸秆中分离得到柱孢弯颈霉 *syzx4* 菌株, 并首次将此种属的菌株应用在  $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵生产过程。在单因子实验优选了不同的工农业废料作为碳源和氮源的基础上, 使用统计实验方法优化培养基组分浓度。得到的培养基最佳组成如下: TCS 25.72 g/L, SM 6.82 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.90 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.21 g/L, 其它成分保持原始浓度, 30 °C 条件下进行液体发酵 8 d 后得到  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性 2.21 U/mL。此外, 由于工农业废料来源丰富, *syzx4* 菌株所生产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有低成本优点, 这是解决纤维素酶瓶颈问题的一条极有希望的途径。

### 参考文献

- [1] Marimuthu Jeya M, Zhang YW, Kim IW, et al. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. *Bioresour Technol*, 2009, 100(21): 5155–5161.
- [2] Gardner JM, Pillai JS. *Tolyposcladium cylindrosporium* (Deuteromycotina: Moniliales), a fungal pathogen of the mosquito *Aedes australis*. *Mycopathologia*, 1987, 97: 83–88.
- [3] Rocha LGN, Luz C. Utility of six fungicides for selective isolation of *Evlachovaea* sp. and *Tolyposcladium cylindrosporium*. *Mycopathologia*, 2009, 167(6): 341–350.
- [4] Bogar B, Szakacs G, Linden JC, et al. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(3): 183–189.
- [5] Yu L, Lei T, Ren XD, et al. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 39(3): 496–502.
- [6] Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(4): 777–780.
- [7] Wang FC, Li F, Chen GJ, et al. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiological Research*, 2009, 164(6): 650–657.
- [8] Mandels M, Weber J. The production of cellulases. *Advances in Chemistry*, 1969, 95: 391–414.
- [9] Daniel DJ, Silvana ST, Hertz PF, et al. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. *Process Biochemistry*, 2007, 42(5): 904–908.
- [10] Haaland PD. *Experimental Design in Biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc, 1989: 123–157.
- [11] Ahuja SK, Ferreira GM, Moreira AR. Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(6): 666–675.
- [12] Romero MD, Aguado J, González L, et al. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25(3/5): 244–250.
- [13] Gu XB, Zheng ZM, Yu HQ, et al. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. *Process Biochemistry*, 2005, 40(10): 3196–3201.