

# 响应面法优化异硫链霉菌 LMZM 利用玉米芯粉产木聚糖酶发酵培养基的研究

罗玲, 蔡俊\*, 王常高, 杜馨, 林建国

(湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室和工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068)

**摘要:**本研究采用响应面法对异硫链霉菌 LMZM 产木聚糖酶的发酵培养基进行优化。首先利用 Plackett-Burman 实验设计筛选出影响产酶的 4 个显著性因素: 玉米芯粉、大豆粉、酵母粉和  $MgSO_4$ 。在此基础上, 研究不显著因素的最低添加量来降低生产成本, 然后运用最陡爬坡法逼近最大响应值区域, 最后利用中心复合设计确定显著性因素之间的交互作用及最佳组成。结果表明, 玉米芯粉 27.85 g/L、大豆粉 16.25 g/L、酵母粉 3.46 g/L、 $MgSO_4$  1.18 g/L、 $K_2HPO_4$  0.60 g/L、 $Na_2HPO_4$  0.40 g/L, 木聚糖酶最大理论酶活可达 117.80 U/mL, 经 3 次平行实验验证, 实际酶活平均值为 116.63 U/mL 与预测酶活相近, 且比优化之前的酶活提高了 1.28 倍。

**关键词:** 木聚糖酶, 异硫链霉菌, 响应面法, 培养基优化, 玉米芯粉

## Study on optimization of culture medium for xylanase production by *Streptomyces althiolicus* LMZM using response surface methodology with corncob

LUO Ling, CAI Jun\*, WANG Chang-gao, DU Xin, LIN Jjian-guo

(Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China.)

**Abstract:** In this study, response surface methodology (RSM) was employed to optimize a fermentation medium for the production of *Streptomyces althiolicus* LMZM in submerged fermentation with corncob as substrate. Four significant influence factors including corncob powder, soybean, yeast extract powder and magnesium sulfate were screened by the method of Plackett-Burman design. In addition, the minimum addition amount experiment was used for finding out the minimum add amount of non-significant factors to reduce the source cost. The steepest ascent design was applied to approach the optimal region of the three significant factors. And the optimal concentration and correlations among three factors were identified by central composite design. The optimal fermentation parameters for enhanced xylanase production were found to be corncob powder 27.85 g/L, soybean 16.25 g/L, yeast extract powder 3.46 g/L, magnesium sulfate 1.18 g/L, potassium phosphate dibasic 0.60 g/L and disodium hydrogen phosphate 0.40 g/L. The model predicted a xylanase activity of 117.80 U/mL. After three parallel verifications, the maximum theoretic value was consistent with mean value of verification test which was 116.63 U/mL, and the xylanase production was increased by 1.28-fold in comparison with that before optimization.

**Key words:** xylanase; *Streptomyces althiolicus*; RSM; medium optimization; corncob

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)23-0266-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.23.046

木聚糖(XyLan)作为半纤维素的主要组成成份,也是植物细胞壁的重要组成成份,是自然界中仅次于纤维素的多糖,在植物中的总含量大约占 1/3 左右<sup>[1-3]</sup>。木聚糖作为重要的可再生资源,广泛的存在于玉米芯、米糠、甘蔗渣、秸秆、麦麸等农副产品中,但难以得到充分的利用。此外,在造纸制浆工业中富含木聚糖废料的再利用率低,通常直接排入水中,

导致水质富营养化,严重破坏生态环境,在我国此现象尤为突出<sup>[4]</sup>。木聚糖酶是指能够降解木聚糖成低聚木糖和木糖的一组酶系的统称,主要包括  $\beta$ -1,4-外切木聚糖酶, $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶和  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[5]</sup>。由于部分链霉菌菌株能产生较高活性的木聚糖酶,且酶比较单一,纤维素酶活较低,有较高的工业应用价值,因此近年来被广泛关注<sup>[6]</sup>。目前,国内

收稿日期:2015-02-13

作者简介:罗玲(1990-),女,硕士,研究方向:发酵过程优化与放大,E-mail:jkrjll@live.com。

\*通讯作者:蔡俊(1968-),男,博士,教授,研究方向:发酵过程优化与放大,E-mail:hgcaijun@126.com。

外对异硫链霉菌产木聚糖酶能力的研究较少,有待进一步发掘。同时,木聚糖酶在食品、纺织、饲料和造纸工业等方面都具有广阔用途<sup>[7]</sup>。

目前,用于优化发酵条件的数学统计方法主要为单因素法、正交实验法和响应面分析法。李家群等采用单因素和正交实验研究用稻草粉在最佳条件下发酵培养链霉菌 LH-3,木聚糖酶活力最高为 120.30 U/mL<sup>[8]</sup>。单因素法无法得知因素之间的交互影响,正交实验只能得到最佳因素水平组合<sup>[9]</sup>。而响应面分析则可以有效、经济的方式更为合理的实验设计方案,考虑实验的随机误差,对实验进行全面的分析<sup>[10]</sup>。Coman, G. 等以 *Streptomyces* sp.P12-137 利用中心复合实验研究以小麦麸皮作碳源产木聚糖酶的情况,其酶活为 27.77 UA/mL<sup>[11]</sup>。Zhicai Zhang 等以 *Rhizopus stolonifer* 利用中心复合实验研究以玉米芯作碳源产木聚糖酶的情况,其酶活为 13.90 U/g<sup>[12]</sup>。

本研究旨利用响应面分析方法对异硫链霉菌 LMZM 利用农业废弃物玉米芯粉产木聚糖酶的发酵培养基成分进行初步优化,提高酶活同时,降低原料成本,减少环境污染,为进一步的放大研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

异硫链霉菌 LMZM 实验室筛选保藏;种子培养基(g/L) 可溶性淀粉 20、KNO<sub>3</sub> 1.0、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5、NaCl 0.5、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01;发酵培养基(g/L) 玉米芯粉 24.4、大豆粉 16、KNO<sub>3</sub> 8、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.754、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4;斜面保藏培养基(g/L) 可溶性淀粉 20、KNO<sub>3</sub> 1.0、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5、NaCl 0.5、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01,琼脂粉 20。

AR1140 电子分析天平 奥豪斯国际贸易有限公司;立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;SW-CJ-1D 型单人净化工作台 苏州净化设备有限公司;台式高速冷冻离心机 3K15 德国 Sigma 公司;ZHWHY-2102C 恒温培养箱震荡器 上海智城分析仪器制造有限公司;2000 可见分光光度计(unic) 尤尼柯上海仪器有限公司。

### 1.2 培养条件

发酵周期 108 h,发酵温度 40 ℃,接种量 8%,初始 pH5.5,装液量 50 mL/250 mL 三角瓶,摇床转速为 160 r/min。

### 1.3 木聚糖酶活力的测定

DNS 法测定还原糖(以木糖为标准品):发酵液 8000 r/min 离心 10 min,所得上清液即为粗酶液。粗酶液稀释适当倍数,取 1.5 mL 1% 木聚糖溶液加入 25 mL 比色管,加 0.5 mL 适当稀释的粗酶液后置于 60 ℃ 水浴中反应 10 min,加入 3 mL DNS 溶液,其混合物在沸水浴中加热 10 min 后,立即冷却至室温,定容至 25 mL,540 nm 波长下测定吸光值,对照用灭活酶液代替粗酶液。用木糖作标准曲线,吸光值经曲线对比得出木糖含量后计算木聚糖酶活力<sup>[13-14]</sup>。木聚糖酶活力单位定义为每分钟催化产生 1 μmol 木糖所需要的酶量。

## 1.4 实验设计

1.4.1 Plackett-Burman 设计 Plackett-Burman 设计是以最少实验次数找到对木聚糖酶活有显著性影响的因素(可信度大于 95% 的因素作为主效应)的实验方法。对于 N 次实验至多可研究(N-1)个因素,每个因素取两个水平:高水平 and 低水平<sup>[15]</sup>。通过该设计进行实验,筛选出显著性因素进行下一步的实验。根据前期的单因素实验结果,实验选取的因素共有 8 个,虚拟项 3 个,每个因素取 2 个水平,Plackett-Burman 实验设计的各因素和水平,见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计各因素与水平  
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

实验因素(g/L)	水平	
	-1	+1
A 玉米芯粉	10	50
B 大豆粉	10	30
C 酵母粉	5	15
D 虚拟项 1	0	0
E 虚拟项 2	0	0
F 虚拟项 3	0	0
G K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	1.5
H Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25	0.75
I NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25	0.75
J MgSO <sub>4</sub>	0.5	1.5
K CaSO <sub>4</sub>	0.25	0.75

1.4.2 最低添加量实验 在 Plackett-Burman 实验设计得出不显著因素基础上,以培养基最节省为目的研究不显著因素的最低添加量,依据各因素效应合理设计变化步长,设计最低添加量实验表头,进行实验。

1.4.3 最陡爬坡实验 在 Plackett-Burman 实验设计得出的显著性因素后,对其最佳值区域进行进一步确定的实验方法。找到拐点,为后续的中心复合设计提供实验依据。根据显著性因素效应值确定变化步长,进一步靠近最佳值区域。根据 Plackett-Burman 实验的结果,做最陡爬坡实验。

1.4.4 Central composite design(CCD)设计 以爬坡设计得出的实验结果为依据进行 CCD 设计,见表 2,用软件 Design expert 8.0.6 对实验进行实验设计回归分析,确定显著性因素的最佳添加量,依据回归方程绘制响应面三维立体分析图。

表 2 中心复合设计各因素与水平  
Table 2 Factors and levels of Central composite design

因素(g/L)	编码水平				
	-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub> 玉米芯粉	25	30	35	40	45
X <sub>2</sub> 大豆粉	10	12.5	15	17.5	20
X <sub>3</sub> 酵母粉	2	4	6	8	10
X <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub>	1	1.2	1.4	1.6	1.8

## 1.5 验证实验

用 2.4 中心复合设计实验结果的培养基组成预测值进行 3 次平行实验,摇瓶发酵培养测定酶活,酶

活取平均值,以验证模型是否可靠,进而确定最终优化培养基组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 设计

Plackett-Burman 实验结果见表 3。从 Plackett-Burman 设计回归分析(表 4)看出,该回归模型的  $p$  值( $\text{prob} > F$ )为 0 小于 0.05,则该模型在 95% 的置信区间内显著。玉米芯粉、大豆粉、酵母粉和  $\text{MgSO}_4$  的  $p$  值分别为 0.004、0.030、0.027 和 0.042,均小于 0.05,则玉米芯粉、大豆粉、酵母粉和  $\text{MgSO}_4$  在 95% 的置信区间内显著,而  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{CaSO}_4$  的  $p$  值分别为 0.160、0.413、0.101 和 0.180,均大于 0.05,则  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{CaSO}_4$  在 95% 的置信区间内不显著。其决定系数  $R^2 = 0.7836$  说明回归方程可以解释高达 78.36% 的实验数据。

### 2.2 最低添加量实验

根据 Plackett-Burman 实验,由于  $R^2 = 0.7836 < 0.9$ ,因此为了进一步提高数据的准确度,对不显著因素  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{CaSO}_4$  做最低添加量实验。

由图 1A 知,随着  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  添加量的增加,木聚糖酶活逐渐减小,当添加量为 0 g/L 时,木聚糖酶活最高,为 90.97 U/mL;由图 1B 知,随着  $\text{CaSO}_4$  添加量的增加,聚糖酶活逐渐减小,当添加量为 0 g/L 时,木聚糖酶活最高,为 90.97 U/mL;由图 1C 知, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  木聚糖酶活逐渐增大,当添加量为 0.40 g/L,木聚糖酶活最高,为 93.17 U/mL;由图 1D 知,随  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  添加量的增加,木聚糖酶活逐渐增大,当添加量为 0.60 g/L 时,木聚糖酶活最高,为 93.83 U/mL。故选择  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的添加量分别为 0、0、0.40、0.60 g/L。

### 2.3 最陡爬坡实验

为了进一步提高木聚糖酶活,寻求发酵培养基的最优组合,根据 Plackett-Burman 实验的回归分析和方差分析,玉米芯粉和  $\text{MgSO}_4$  为正效应,则说明随着添加量水平逐步升高,木聚糖酶活也会得到提高。反之,大豆粉、酵母粉为负效应,说明随着其添加水平的逐步降低,木聚糖酶活将会得到提高。据此,设

计了最陡爬坡实验,见表 5。

表 3 Plackett-Burman 设计及结果

Table 3 Design and result of Plackett-Burman

实验号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	酶活 (U/mL)
1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	26.19
2	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	46.08
3	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	96.34
4	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	67.27
5	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	38.88
6	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	32.30
7	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	39.53
8	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	70.61
9	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	20.83
10	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	27.59
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	27.96
12	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	27.56
13	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	23.22
14	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	39.97
15	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	80.82
16	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	65.91
17	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	41.95
18	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	78.26
19	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	57.14
20	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	34.55

表 5 最陡爬坡实验设计及结果

Table 5 Designs and the results of steepest experiment

实验号	玉米芯粉 (g/L)	大豆粉 (g/L)	酵母粉 (g/L)	硫酸镁 (g/L)	酶活 (U/mL)
1	25	20	10	1	95.52
2	30	17.5	8	1.2	107.09
3	35	15	6	1.4	110.52
4	40	12.5	4	1.6	107.24
5	45	10	2	1.8	98.49
6	50	7.5	0	2	96.95
7	55	5	0	2.2	74.69
8	60	2.5	0	2.4	64.61

表 4 Plackett-Burman 设计回归分析

Table 4 Regression analysis of Plackett-Burman design

变异源	自由度	估计系数	平方和	均方	F 值	p 值( $\text{prob} > F$ )
模型	8	47.148	7323	916.1	17.36	0.000
A	1	11.179	2500	2500	13.588	0.004
B	1	-7.559	1143	1143	6.213	0.030
C	1	-7.728	1194	1194	6.491	0.027
G	1	-4.566	417	417	2.268	0.160
H	1	2.583	133	133	0.724	0.413
I	1	-5.423	588	588	3.198	0.101
J	1	6.985	976	976	5.306	0.042
K	1	4.346	378	378	2.053	0.180

$R^2 = 0.7836$

注: \*  $\alpha = 0.05$ 。

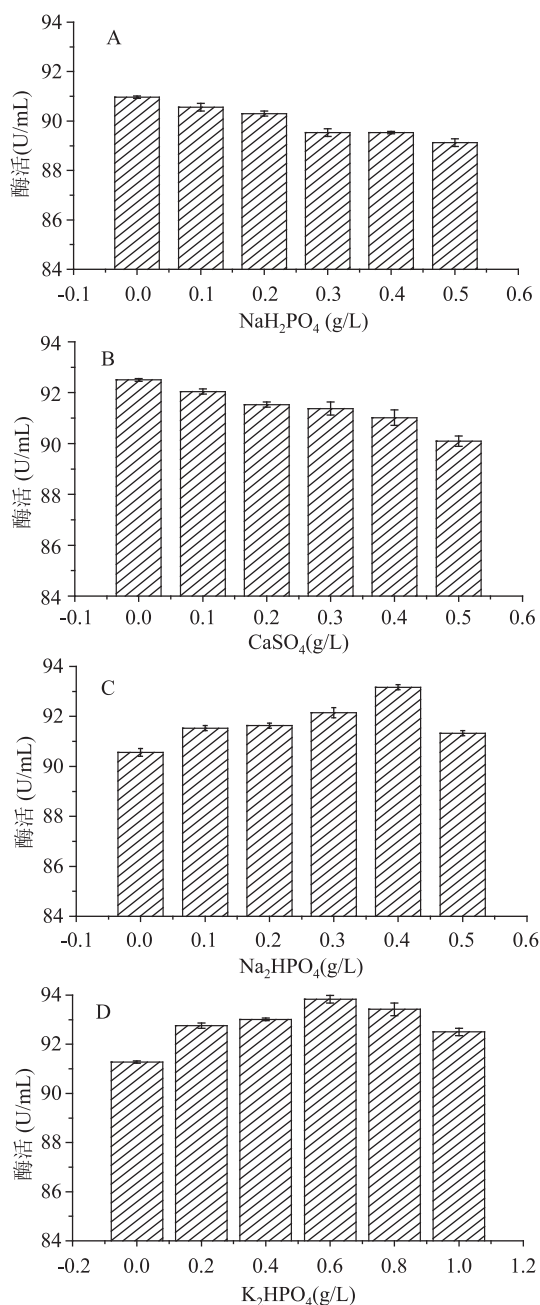


图1 最低添加量的实验设计与结果

Fig.1 The design and result of minimum amount

由表5知,第3组木聚糖酶活最高,即玉米芯粉、大豆粉、酵母粉和MgSO<sub>4</sub>的用量分别为35、15、6和1.4 g/L时,酶活为110.52 U/mL,随着运行序的进一步增加,木聚糖酶活逐渐降低。故选择玉米芯粉、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的添加量分别为35、15、6和1.4 g/L作为中心复合设计的原点。

## 2.4 中心组合实验设计 (Central composite design)

### 2.4.1 模型的建立及显著性检验

根据中心组合实验设计原理,根据上述实验结果,设计玉米芯粉、大豆粉、酵母粉和MgSO<sub>4</sub>进行中心复合实验,每个因素选5个水平,以木聚糖酶活力为响应值作响应面设计,实验设计的各因素和水平,见表2。6个中心点、30次实验设计及结果和预测见表6。

表6 中心复合设计及结果

Table 6 Design and result of Central composite

实验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	酶活 (U/ml)	
					Y <sup>α</sup>	Ŷ
1	0	0	-2	0	95.64	94.59
2	1	1	-1	-1	81.93	82.70
3	-1	-1	-1	1	99.43	100.39
4	0	0	0	0	112.43	111.75
5	1	1	1	1	100.25	100.89
6	1	-1	-1	-1	88.07	88.85
7	-1	1	-1	1	108.34	109.39
8	0	0	0	0	110.79	111.75
9	-1	1	1	1	93.39	92.54
10	0	0	0	0	111.41	111.75
11	0	0	0	2	99.53	98.45
12	-1	-1	1	1	81.62	81.85
13	1	-1	-1	1	89.19	89.13
14	-2	0	0	0	102.71	102.41
15	-1	-1	1	-1	93.59	93.34
16	1	1	-1	1	86.33	86.51
17	0	0	0	0	111.82	111.75
18	0	0	2	0	93.59	93.70
19	-1	1	-1	-1	115.09	114.07
20	2	0	0	0	91.65	91.02
21	-1	1	1	-1	99.43	100.49
22	-1	-1	-1	-1	108.24	108.60
23	0	2	0	0	97.99	98.06
24	0	0	0	0	111.61	111.75
25	0	0	0	0	112.43	111.75
26	0	0	0	-2	105.98	106.13
27	1	-1	1	1	100.87	101.82
28	1	1	1	-1	101.38	100.35
29	1	-1	1	-1	104.86	104.82
30	0	-2	0	0	94.52	93.52

注:Y<sup>α</sup>为实际酶活,Ŷ为预测酶活。

由响应面的回归分析(表7)知,模型的p值(prob > F)小于0.05,说明模型具有显著性,该二次模型多元相关性系数R<sup>2</sup>(预测)=0.9713,明预测仅有2.87%的变异情况不能由该模型解释,失拟项p值为0.1076表明失拟项不显著,模型没有失拟现象。X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>对酶活的影响显著,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>、X<sub>1</sub>X<sub>4</sub>、X<sub>2</sub>X<sub>4</sub>、X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>的交互影响显著,X<sub>1</sub><sup>2</sup>、X<sub>2</sub><sup>2</sup>、X<sub>3</sub><sup>2</sup>、X<sub>4</sub><sup>2</sup>对酶活的影响均显著。

通过二次模型回归系数的计算,得到如下方程以表征4个因素对木聚糖酶活力的影响:

$$\hat{Y} = 111.75 - 2.85X_1 + 1.13X_2 - 0.22X_3 - 1.92X_4 - 2.90X_1X_2 + 7.81X_1X_3 + 2.12X_1X_4 + 0.42X_2X_3 + 0.88X_2X_4 - 0.82X_3X_4 - 3.76X_1^2 - 3.99X_2^2 - 4.40X_3^2 - 2.37X_4^2$$

式中,Ŷ表示木聚糖酶的预测值(U/mL),X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>和X<sub>4</sub>分别代表玉米芯粉、大豆粉、酵母粉和MgSO<sub>4</sub>的编码值。

Design Expert 8.0.6分析解得最优值点为X<sub>1</sub> =

表7 中心复合设计回归分析

Table 7 Regression analysis of Central composite design

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值(Prob > F)	显著性
模型	2609.55	14	186.40	191.97	<0.0001	显著
X <sub>1</sub>	194.77	1	194.77	200.59	<0.0001	显著
X <sub>2</sub>	30.85	1	30.85	31.77	<0.0001	显著
X <sub>3</sub>	1.18	1	1.18	1.22	0.2869	不显著
X <sub>4</sub>	88.44	1	88.44	91.08	<0.0001	显著
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	134.97	1	134.97	139.00	<0.0001	显著
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	975.16	1	975.16	1004.30	<0.0001	显著
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	72.12	1	72.12	74.28	<0.0001	显著
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2.85	1	2.85	2.93	0.1074	不显著
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	12.48	1	12.48	12.85	0.0027	显著
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	10.71	1	10.71	11.03	0.0047	显著
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	387.54	1	387.54	399.12	<0.0001	显著
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	436.69	1	436.69	449.74	<0.0001	显著
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	531.04	1	531.04	546.91	<0.0001	显著
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	153.43	1	153.43	158.01	<0.0001	显著
残差	14.56	15	0.97			
失拟项	12.58	10	1.26	3.17	0.1076	不显著
纯误差	1.99	5	0.40			
总离差	2624.11	29				

R<sup>2</sup> = 0.9944    R<sup>2</sup> (调整) = 0.9893    R<sup>2</sup> (预测) = 0.9713

-1.43, X<sub>2</sub> = 0.50, X<sub>3</sub> = -1.27, X<sub>4</sub> = -1.12 即质量浓度分别为玉米芯粉 27.85 g/L、大豆粉 16.25 g/L、酵母粉 3.46 g/L、MgSO<sub>4</sub> 为 1.18 g/L, 预测最大酶活 117.80 U/mL。

2.4.2 响应面显著性交互作用图分析 根据预测公式建立显著性交互作用的三维立体图, 观察其对木聚糖酶活的影响。

由图 2 知, 当玉米芯粉质量浓度较高时, 大豆粉对木聚糖酶的产生没有显著性影响, 同时玉米芯粉编码水平取 0 水平附近时, 木聚糖酶活较高。图 3 知, 当玉米芯粉和酵母粉的编码水平分别从 -0.2 到 0.5、从 0 到 0.8 之间时, 木聚糖酶的酶活皆高于 100 U/mL。由图 4 知, 编码水平取 0 水平附近时, 木聚糖酶活较高。由图 5 知, 当大豆粉和 MgSO<sub>4</sub> 的编码水平分别从 -0.4 到 0.5、从 -0.5 到 0.2 之间时, 木聚糖酶的酶活皆高于 102 U/mL。由图 6 知, 当酵母粉

和 MgSO<sub>4</sub> 的编码水平分别从 -0.3 到 0.7、从 -0.5 到 0.5 之间时, 木聚糖酶的酶活皆高于 104 U/mL。

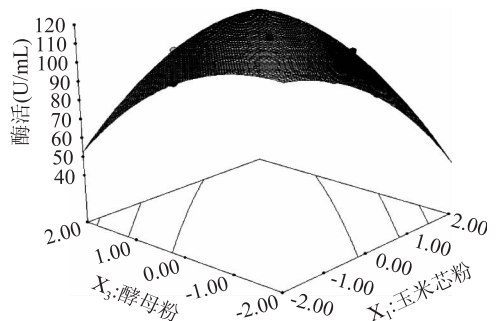


图3 玉米芯粉和酵母粉的交互作用对木聚糖酶酶活影响的响应面图

Fig.3 Response surface for interaction effects of corncob and yeast extract on xylanase activity

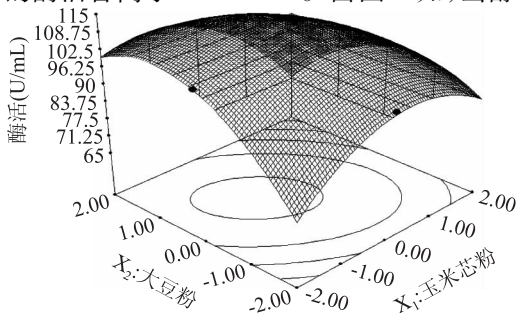


图2 玉米芯粉和大豆粉的交互作用对木聚糖酶酶活影响的响应面图

Fig.2 Response surface for interaction effects of corncob and soybean on xylanase activity

## 2.5 验证实验

用 CCD 设计得到的最佳培养基组成: 玉米芯粉 27.85 g/L、大豆粉 16.25 g/L、酵母粉 3.46 g/L、MgSO<sub>4</sub> 1.18 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.60 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.40 g/L 作 3 次重复验证性实验, 酶活平均值为 116.63 U/mL。实测值与回归方程预测值 (117.80 U/mL) 吻合良好, 由此可见, 用该回归模型优化 *Streptomyces althoticus* LMZM 木聚糖酶的培养成分是可行的, 且具有实用价值。此外, 与培养基优化前的最大酶活力 (51.73 U/mL) 相比, 提高了 1.28 倍。

## 3 结论

本研究从各种土样中筛选出木聚糖酶生产菌株异硫链霉菌 LMZY, 利用响应面法对其液体发酵产酶

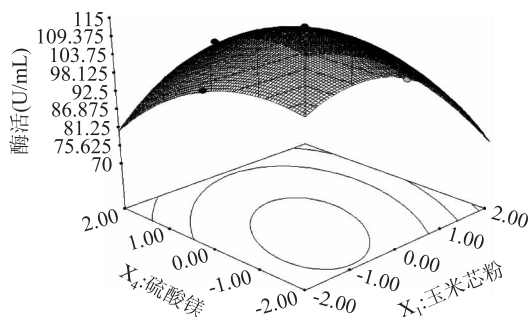


图4 玉米芯粉和硫酸镁的交互作用对木聚糖酶酶活影响的响应面图

Fig.4 Response surface for interaction effects of corncob and  $MgSO_4$  on xylanase activity

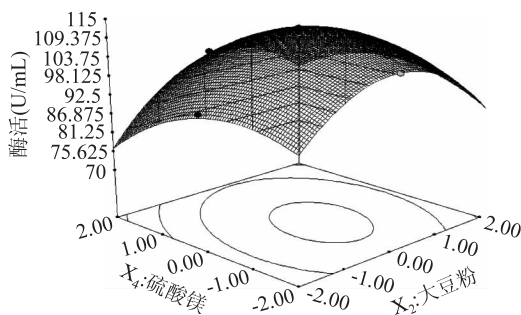


图5 大豆粉和硫酸镁的交互作用对木聚糖酶酶活影响的响应面图

Fig.5 Response surface for interaction effects of soybean and  $MgSO_4$  on xylanase activity

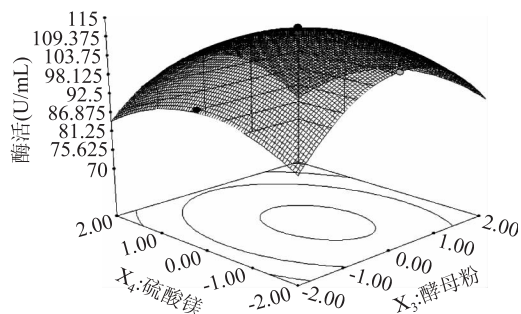


图6 酵母粉和硫酸镁的交互作用对木聚糖酶酶活影响的响应面图

Fig.6 Response surface for interaction effects of yeast extract and  $MgSO_4$  on xylanase activity

培养基成分进行优化,培养基组成:玉米芯粉 27.85 g/L、大豆粉 16.25 g/L、酵母粉 3.46 g/L、 $MgSO_4$  1.18 g/L、 $K_2HPO_4$  0.60 g/L、 $Na_2HPO_4$  为 0.40 g/L,最高产酶活力可达 116.63 U/mL,与理论最大酶活力 117.80 U/mL 接近,说明运用响应面法优化异硫链霉菌 LMZM 产木聚糖酶是合理可靠的,且酶活力比培养基成分优化前提高 1.28 倍。同时,本文以廉价的农业废弃物玉米芯为碳源,未经化学药品处理直接发酵产酶,大大降低预处理和原料成本,减少环境污

染,具有环保及经济的双重效益。

参考文献

[1] Prade R A. Xylanases from biology to biotechnology [J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1996, 13 (1): 101-132.

[2] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases [J]. *FEMS microbiology reviews*, 2005, 29 (1): 3-23.

[3] Joseleau J P, Comtat J, Ruel K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls [J]. *Process Biochem*, 1991 (7): 1-5.

[4] 孙迅,朱陶.产胞体木聚糖酶放线菌的分离与筛选[J].*微生物学杂志*, 1998, 18 (4): 29-32.

[5] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanase [J]. *FEMS Microb Rev*, 1999, 23 (4): 411-456.

[6] Kusakabe I, Kawaguchi M, Yasui T, et al. Purification and some properties of extracellular xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 [J]. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1997, 51 (2): 429-437.

[7] 聂国兴,王俊丽,明红.木聚糖酶的应用现状与研发热点[J].*工业微生物*, 2008, 38 (1): 53-59.

[8] 李家群,黄珊,张云开,等.链霉菌发酵稻草粉产木聚糖酶的条件研究[J].*食品与生物*, 2009, 4 (4): 1-3.

[9] 黄瑞,张超,李小娟,等.响应面法优化里氏木霉产木聚糖酶发酵培养基[J].*食品工业科技*, 2013, 34 (11): 119-123.

[10] 吴有炜.实验设计与设计处理[M].苏州:苏州大学出版社, 2002: 135-142.

[11] Coman G, Bahrim G. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. P12-137 using response surface methodology and central composite design [J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61: 773-779.

[12] Zhang Z, Li J, Feng F, et al. Optimization of nutrition constituents for xylanase activity by *Rhizopus stolonifer* under solid-state fermentation on corncob [J]. *BioResources*, 2013, 8 (2): 2018-2032.

[13] Geetha K, Gunasekaran P. Optimization of nutrient medium containing agricultural waste for xylanase production by *Bacillus pumilus* 20 [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15 (5): 882-889.

[14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical chemistry*, 1959, 31 (3): 426-428.

[15] Chaiyaso T, Kuntiya A, Techapun C, et al. Optimization of cellulase-free xylanase production by thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through Plackett - Burman and response surface methodological approaches [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75 (3): 531-537.