

文章编号: 1673-1689(2010)03-0464-07

响应面法优化灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 产酶条件

段学辉, 颜淑芳, 彭云召, 贾奎艳

(食品科学与技术国家重点实验室 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘要: 采用响应面法对灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 生产纤维素酶的发酵条件进行了优化, 通过 Plackett-Burman 实验方法研究有关碳源、氮源、无机盐、发酵时间、摇床转速等 18 个发酵因子对菌株发酵产纤维素酶活力的影响。结果显示, 影响产酶的显著因子是麸皮、CMC 的含量和发酵时间。根据实验结果和经验方法对显著影响因子的取值范围进行预估, 并采用 Box-Behnken 设计实验进行优化, 然后应用响应面模拟预测和摇瓶发酵实验验证, 结果表明, 优化发酵条件为培养基中麸皮 6.0 g/L, CMC 7.0 g/L, 发酵时间 96 h, 摇瓶发酵液中 CMC 酶活均接近 309 IU/mL, 优化预测值和实验验证值拟合度达到 99%, 比初始培养基和发酵条件下菌株产 CMC 酶活 94.51 IU/mL 提高了 227%。

关键词: 灰绿青霉; 纤维素酶产生菌; CMC 酶活; 响应面

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Optimization of Fermentation Condition for Cellulase-Producing *Penicillium glaucum* NS 16 by Response Surface Methodology

DUAN Xue-hui, YAN Shu-fang, PENG Yun-zhao, JIA Kui-yan

(State Key Laboratory of Food Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this manuscript, response surface design was used to optimize the nutritional and environmental conditions of cellulase production by *Penicillium glaucum* NS16. There are 18 factors affect the cellulose production, including the fermentation time, shaking rate, concentration of carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts. The influence of the 18 factors was evaluated by Plackett-Burman design. The result showed that wheat bran, CMG-Na and the fermentation time play important roles on the cellulase production. According to the result of Plackett-Burman design experiment, the value range of the significant influential factors could be estimated, and a Box-Behnken design was employed to optimize these factors and the results were shown in response surface graph. Following the results, the optimum conditions listed as follows: 6.0 g/L wheat bran, 7.0 g/L CMG-Na, and 96 hours fermentation time. By the optimum conditions, 309 IU/ml of cellulase was produced by *Penicillium glaucum* NS16, which was higher 227% than that of the control (94.51 IU/mL).

收稿日期: 2009-09-03

基金项目: 江西省科技攻关项目(20041B0103000)。

作者简介: 段学辉(1958-), 男, 江西永新人, 工学博士, 教授, 硕导, 主要从事食品生物技术方向研究。Email: xhduan@ncu.edu.cn

Key words: *Penicillium glaucum*, cellulase-producing strain, CM Case, response surface

随着全球经济的发展,各工业国对能源的需求与日俱增。近年来我国石油及其产品净进口量逐年增加,对国际石油的依存度已经接近 50%^[1]。发展洁净能源以及可再生的生物质能源是缓解我国能源供需压力,减少环境污染,保障经济平稳发展的长远国策。研究微生物对纤维类物质的酶解作用,开发基于纤维素基质生物转化成燃料乙醇、糖、饲料蛋白质等工业产品的生产技术,对解决经济发展中面临的能源、食品和饲料资源紧张以及环境污染问题有着重要意义^[1]。目前,木质纤维素降解酶的研究与应用主要集中于产酶活力高、酶系组成比较齐全的木霉(*Trichoderma*)和白腐菌(*white rot fungi*)等菌株^[2],不同微生物来源的木质纤维素降解酶的酶系组成往往不同。Jorgensen H 等研究报道^[2-4],青霉属(*Penicillium*)真菌能分泌出较全的降解天然木质纤维素的聚糖酶系,其菌体培养容易、生长快,产酶活力较高,表现出良好的商业开发潜力。

灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 是作者所在实验室分离筛选并保藏的一株产纤维素酶野生菌株。作者报道了采用响应面法(Response Surface Methodology)对 *Penicillium glaucum* NS16 生长和发酵产酶因素的影响并优化了发酵产酶条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16, 作者所在实验室保藏。

1.2 试剂

1) pH 5.0 柠檬酸缓冲液: 分别吸取 24.3 mL、0.2 mol/L 磷酸氢二钠液, 25.7 mL、0.1 mol/L 的柠檬酸液, 混匀, 调 pH 值至 5.0。

2) 羧甲基纤维素溶液: 称取 2.0 g 羧甲基纤维素钠盐置于 200 mL 蒸馏水中, 沸水浴中搅拌溶解, 过滤, 取滤液 150 mL, 加柠檬酸缓冲液 30 mL 以及蒸馏水 60 mL, 混匀, 贮存于冰箱中备用。

3) 3,5-二硝基水杨酸溶液: 称取 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸置于 262 mL、2 mol/L 氢氧化钠溶液, 加入 500 mL、0.645 mol/L 的酒石酸钾钠的热溶液, 再加 5.0 g 苯酚和 5.0 g 亚硫酸钠, 搅拌至溶解, 冷却后定容至 1 000 mL, 贮于棕色瓶中, 置冰

箱中备用。

4) 1 mg/mL 标准葡萄糖溶液: 称取经 105 °C 烘至恒重的无水葡萄糖 200 mg, 溶于蒸馏水中, 定容至 200 mL^[4]。

1.3 培养基

初始发酵培养基组分: CMC 4 g/L, 麸皮 10 g/L, 硫酸铵 2 g/L, 蔗糖 3 g/L, 胰蛋白胍 0.4 g/L, 吐温-80 1.5 mL/L, KH₂PO₄ 2.0 g/L, CaCl₂ 0.3 g/L, MgSO₄ 0.3 g/L, 硫酸锰 0.3 g/L, pH 6。发酵 72 h, 菌株 *Penicillium glaucum* NS16 CMC 酶活 94.51 IU/mL。

1.4 CMC 酶活测定方法

CMC 酶活测定参考刘德海等方法^[5-6], 取 2 mL、10 g/L CMG-Na 溶液, 置 5 mL 反应管中, 于 50 °C 水浴锅中预热 3 min, 加入 1 mL 酶液(发酵液), 50 °C 水浴锅中恒温反应 30 min, 快速移取 1 mL 反应液到 20 mL 试管中, 加入 2 mL DNS 溶液, 置于沸水浴中显色反应 5 min, 取出试管流动水并快速冷却, 然后加入 7 mL 蒸馏水, 振荡混匀, 分光光度计于 530 nm 处测量 OD 值, 根据标准曲线计算酶活。

CMC 酶活(IU) 定义: 在 1 min 内催化底物水解生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为 1 IU (国际单位)。

1.5 Plackett-Burman 实验设计

对实验选取的 18 个纤维素酶生产发酵因素进行考察, 实验设计中有 3 个空项, 每个因素取 2 个水平, 各因素及水平见表 1。实验设计及结果见表 2, 表 2 中每行代表 1 个实验, 每列代表 1 个独立变量, 符号“- 1”“+ 1”分别代表高和低 2 个不同水平。

1.6 Box-Behnken 实验设计

针对 Plackett-Burman 实验筛选出的有显著影响的因素, 利用 Box-Behnken 实验对它们在培养基中或发酵过程中的取值进行优化。每个因素取 5 个水平, 组成 20 组实验。实验数据经多项式回归分析得到一个关于响应值与自变量关系的二阶数学方程, 即描述响应量(应变量)和自变量(操作条件)关系的经验模型:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i Y_i + \sum_{i=1}^{j-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2$$

式中, Y 为纤维素酶活力的预测响应值; β_0 为偏移量; β_i 为线性偏移量; β_{ii} 为二阶偏移; β_{ij} 为交互作用

系数; X 为各因素水平值。

1.7 模型拟合和验证

对优化实验所得的实验数据与响应面模型进行拟合,再对该多元函数进行分析,确定其极值点的相应的自变量的取值。按照计算所得的参数进行实验,验证模型的可靠性,确定优化结果。实验数据均用 SAS(version 8.0, SAS Institue Ine, Cary, NC, USA) 处理分析^[7-15]。

2 结果与讨论

2.1 显著影响因素的筛选

根据灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 生长所需营养要素、培养产酶条件并结合相关文献报道以及前期实验探索,选取 18 个影响灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 发酵生产纤维素酶的条件因子,编号 $X_1 \sim X_{18}$,其水平设计见表 1。采用 Plackett-Burman 设计的 20 个实验组合及其发酵产酶活力见表 2。表 2 中 1~20 分别代表一个实验,按照实验设计的培养条件进行发酵产酶考察,并测定酶活。每组重复 3 次,结果取平均值,得到相应的发酵酶活 Y_i 值。

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平范围

Tab. 1 Coding table of Plackett-Burman factors and levels

编号	因子	水平	
		- 1	1
X_1	麸皮(g/ L)	10	6
X_2	CMC(g/ L)	8	5
X_3	蔗糖(g/ L)	5	3
X_4	空项		
X_5	胰蛋白胨(g/ L)	0. 4	0. 2
X_6	硫酸铵(g/ L)	2	1. 4
X_7	磷酸二氢钾(g/ L)	2	1. 5
X_8	空项		
X_9	硫酸镁(g/ L)	0. 5	0. 3
X_{10}	硫酸锰(g/ L)	0. 3	0. 2
X_{11}	氯化钙(g/ L)	0. 5	0. 3
X_{12}	pH	6	4. 8
X_{13}	空项		
X_{14}	接种量(g/ L)	15	10
X_{15}	发酵温度($^{\circ}\text{C}$)	31	28
X_{16}	发酵时间(h)	96	72
X_{17}	吐温-80(mL/ L)	1. 5	1
X_{18}	摇床转速(r/ min)	200	180

注: $X_1 \sim X_{18}$ 代表各个不同的影响因子, - 1, + 1 分别代表高低两个不同的水平。

表 2 Plackett-Burman 实验设计和结果

Tab. 2 Design and results of Plackett-Burman response surface test

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	酶活 Y_i
1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	303. 500
2	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	250. 630
3	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	123. 753
4	- 1	- 1	1	1		- 1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	231. 790
5	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	275. 850
6	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	253. 680
7	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	120. 750
8	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	253. 790
9	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	30. 420
10	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	273. 870
11	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	30. 130
12	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	267. 280
13	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	- 1	61. 050
14	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	- 1	198. 780
15	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	1	93. 920
16	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	1	232. 590
17	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	- 1	297. 720
18	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	1	123. 850
19	- 1	1	1	- 1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	- 1	1	1	1	1	- 1	- 1	1	29. 780
20	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	90. 170

注: 1~20 代表 20 组不同培养条件, Y_i 代表纤维素酶活力, 单位为 IU/mL, “- 1”“+ 1”代表高和低两个不同的水平。

对表 2 中实验数据进行方差分析, 结果见表 3。

表 3 Plackett-Burman 实验设计方差分析
Tab.3 Variance analysis of Plackett-Burman

主模型					
因素	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	84 312. 25	84 312. 25	352. 796 9	0. 033 862
X_2	1	48 773. 12	48 773. 12	204. 086 7	0. 044 490
X_3	1	770. 102 6	770. 102 6	3. 222 424	0. 323 565
X_4	1	221. 877 9	221. 877 9	0. 928 428	0. 511 817
X_5	1	5 466. 306	5 466. 306	22. 873 26	0. 131 221
X_6	1	62. 781 96	62. 781 96	0. 262 705	0. 698 474
X_7	1	117. 297 5	117. 297 5	0. 490 820	0. 610 950
X_8	1	17. 568 75	17. 568 75	0. 073 515	0. 831 442
X_9	1	1 255. 558	1 255. 558	5. 253 767	0. 261 896
X_{10}	1	21. 290 16	21. 290 16	0. 089 087	0. 815 344
X_{11}	1	43. 262 11	43. 262 11	0. 181 026	0. 743 907
X_{12}	1	149. 467 8	149. 467 8	0. 625 434	0. 574 017
X_{13}	1	569. 831 5	569. 831 5	2. 384 408	0. 365 859
X_{14}	1	27. 366 30	27. 366 30	0. 114 512	0. 792 271
X_{15}	1	31. 538 16	31. 538 16	0. 131 969	0. 778 169
X_{16}	1	37 953. 39	37 953. 39	158. 812 5	0. 050 411
X_{17}	1	117. 103 8	117. 103 8	0. 490 010	0. 611 197
X_{18}	1	2 938. 494	2 938. 494	12. 295 86	0. 176 857
模型	18	18 2848. 6	10 158. 26	42. 506 29	0. 120 196
误差	1	238. 982 4	238. 982 4		
所有项	19	183 087. 6			

注: 如果 $P \leq 0.05$, 则说明模型中项的影响是显著的。

从表 3 中可以看出, 在这个模型中 $P(X_1) = 0.033\ 862$, $P(X_2) = 0.044\ 49$, $P(X_{16}) = 0.050\ 411$, 所以 X_1 、 X_2 、 X_{16} 是模型的显著项。通过 SAS 分析, 各因素对酶活性影响的显著水平还可以从表 3 中 F 值看出, X_1 、 X_2 、 X_{16} 的 F 值显著性大, 其他因素的 F 值都较小。因此麸皮、CMC 和培养时间对纤维素酶的活力具有显著的影响, 而其他的因素影响不明显。

2.2 显著影响因子的 Box-Behnken 设计优化

选取影响纤维素酶生产的 3 个显著因素——麸皮、CMC 质量浓度和发酵时间为变量, 利用 Box-Behnken 设计实验对它们在发酵过程中的取值进一步优化。3 个显著因素编号及各自的 5 个水平见表 4。Box-Behnken 设计出 20 组实验见表 5。20 组实验中除 3 个显著因素外, 其它因素取值与初始培养

条件中取值一致, 按照实验设计的培养条件进行发酵产酶考察, 并测定酶活。每组重复 3 次, 结果取平均值, 得到相应的发酵酶活 Y_i 值。

表 4 Box-Behnken 实验因素水平
Tab.4 Coding table of Box-Behnken factors and levels

编号	因子	水平				
		- 1.681 79	- 1	0	+ 1	+ 1.681 79
X_1	麸皮 质量浓度/ (g/L)	2	4	6	8	10
X_2	CMC 质量浓度/ (g/L)	5	6	7	8	9
X_3	发酵 时间/ h	72	84	96	108	120

表 5 Box-Behnken 实验设计和结果
Tab. 5 Design and results of Box-Behnken

序号	X_1	X_2	X_3	酶活 Y_i
1	- 1.000 00	- 1.000 00	- 1.000 00	50.08
2	- 1.000 00	- 1.000 00	1.000 00	23.52
3	- 1.000 00	1.000 00	- 1.000 00	53.73
4	- 1.000 00	1.000 00	1.000 00	25.69
5	1.000 00	- 1.000 00	- 1.000 00	52.18
6	1.000 00	- 1.000 00	1.000 00	22.16
7	1.000 00	1.000 00	- 1.000 00	51.03
8	1.000 00	1.000 00	1.000 00	25.34
9	- 1.681 79	1.000 00	1.000 00	100.53
10	1.681 79	1.000 00	1.000 00	104.18
11	1.000 00	- 1.681 79	1.000 00	150.06
12	1.000 00	1.681 79	1.000 00	153.19
13	1.000 00	1.000 00	- 1.681 79	304.82
14	1.000 00	1.000 00	1.681 79	240.57
15	0.000 00	0.000 00	0.000 00	309.19
16	0.000 00	0.000 00	0.000 00	309.24
17	0.000 00	0.000 00	0.000 00	308.72
18	0.000 00	0.000 00	0.000 00	308.28
19	0.000 00	0.000 00	0.000 00	308.95
20	0.000 00	0.000 00	0.000 00	309.12

注: 1~ 20 代表 20 组不同培养条件, Y_i 代表纤维素酶活力, 单位为 IU/ mL, “- 1”“+ 1”代表高和低 2 个不同的水平。

表 6 二次多项模型及各项的方差分析表
Tab. 6 Variance analysis of secondary model

主核型					
变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	1.074 353	1.074 353	0.000 199	0.989 011
X_2	1	12.595 83	12.595 83	0.002 338	0.962 388
X_3	1	3 491.504	3 491.504	0.648 051	0.439 531
$X_1 * X_1$	1	141 395	141 395	26.244 05	0.000 449
$X_1 * X_2$	1	1.795 512	1.795 512	0.000 333	0.985 794
$X_1 * X_3$	1	0.154 013	0.154 013	0.000 029	0.995 839
$X_2 * X_2$	1	96 035.96	96 035.96	17.825 05	0.001 766
$X_2 * X_3$	1	1.015 313	1.015 313	0.000 188	0.989 317
$X_3 * X_3$	1	21 726.9	21 726.9	4.032 688	0.072 397
模型	9	22 7365.8	25 262.87	4.688 992	0.012 051
误差	10	53 876.98	5 387.698		
失拟项	5	53.858 05	10.77 161	7.002 31	0.120 14
纯误差	5	18.925 73	3.785 147		
所有项	19	281 242.8			

$R^2= 90.84\%$

通过 SAS 软件对 Box-Behnken 实验结果进行方差分析及二次多项模型拟合, 方差分析结果见表 6。

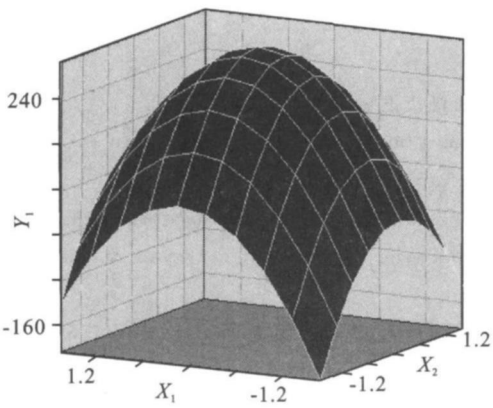
从表 6 可知, 在 3 个因素交互作用下, 交互项 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1X_3 的 F 值分别为 0.000 333、0.000 188、0.000 029, 表明这 3 个因素之间的相互影响小, 对菌株发酵产 CMC 酶活影响不显著。从单因素影响看, X_1X_1 、 X_2X_2 、 X_3X_3 的 F 值分别为 26.244 05、17.825 05、4.032 688, 表明其对菌株发酵产 CMC 酶活影响高度显著。经回归拟合, 得回归方程为:

$$Y_i=309.272\ 40+0.280\ 48X_1+0.960\ 37X_2-15.989\ 36X_3-99.052\ 65X_1^2-0.473\ 75X_1X_2-0.138\ 75X_1X_3-81.633\ 05X_2^2+0.356\ 25X_2X_3-38.828\ 27X_3^2$$

经 The SAS System for windows V8 软件分析得到回归方程的 $R^2=0.908\ 4$, 表明模型对实验数据拟合度高, 能较好地预测菌株发酵产纤维素酶活力的能力。

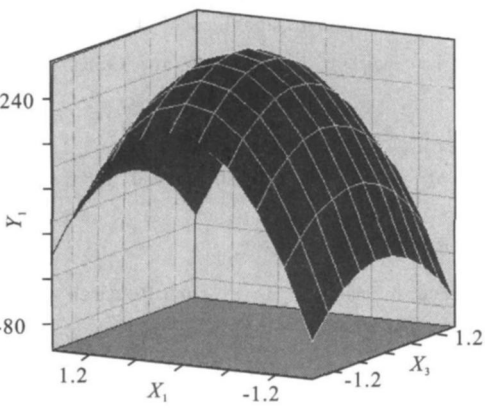
2.3 响应面模型拟合与实验验证

X_1 、 X_2 、 X_3 这 3 个显著影响因素交互作用的响应面图见图 1~ 3。其分别表示固定发酵时间、CMC 质量浓度、麸皮质量浓度为优化值时, 其他两个因素与响应值关系的三维坐标图, 直观地反映了各个因素对响应值的关系。



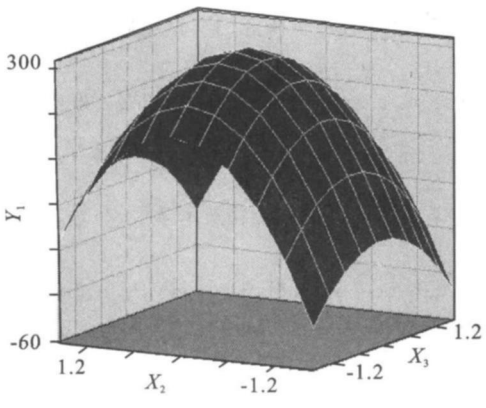
固定值: 发酵时间 $X_3=96\text{ h}$

图 1 CMC 酶活与麸皮量、CMC 质量浓度的响应面图
Fig.1 Response surface plot of CMC activity (IU) versus wheat bran and CMC amount



固定值: CMC $X_2=7.0\text{ g/L}$

图 2 CMC 酶活与麸皮量、发酵时间的响应面图
Fig.2 Response surface plot of CMC activity (IU) versus wheat bran amount and fermentation time



固定值: 麸皮 $X_1=6.0\text{ g/L}$

图 3 CMC 酶活与 CMC 量、发酵时间的响应面图
Fig.3 Response surface plot of CMC activity (IU) versus CMC amount and fermentation time

比较图 1~ 3 响应面图可知, 其存在极值的条件分别在曲面最高点处, 麸皮量 (X_1)、CMC 量 (X_2) 的变化对菌株发酵产 CMC 酶活的影响较大, 表现为曲线较陡, 发酵时间 (X_3) 变化对菌株发酵

产 CMC 酶活的影响较小, 表现为曲线较平滑。通过麸皮量、CMC 量、发酵时间的响应面轮廓线岭脊分析得到极大值所对应的各主要因素 X_1 、 X_2 、 X_3 的编码值分别为 0.000 919、0.003 227、0.022 416, 即麸皮、CMC 和发酵时间的优化值分别为 6.000 919 g/L、7.003 227 g/L 和 96.022 416 h。在优化发酵条件下, 菌株发酵液的纤维素酶活力均达 309 IU/mL。

为了考察优化模型的预测值与实验结果是否相符, 对菌株在优化预测条件下产 CMC 酶能力进行发酵实验验证。验证实验中, 麸皮、CMC 和发酵时间的优化取值分别为 6 g/L、7 g/L、96 h, 其它因素取值与初始培养条件中取值一致, 菌株发酵液中纤维素酶活分析结果见表 7。

表 7 实验验证设计及结果

Tab. 7 Design and results of the experiment				
实验组	麸皮质量浓度/ (g/L)	CMC 质量浓度/ (g/L)	发酵时间/ h	酶活/ (IU/mL)
1	6	7	96	308.26
2	6	7	96	310.67
3	6	7	96	309.00

从表 7 中可以看出, 在 3 组平行验证实验中, 菌株发酵产 CMC 酶活的平均值为 309.31 IU/mL, 与优化模型的预测值 309 IU/mL 十分接近, 其拟合度达到 99%, 说明实验选择的响应面优化模型可靠, 能较好地预测优化条件下菌株发酵所产生的纤维素酶活力。结果表明, 灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 发酵产酶的响应面模型优化发酵条件为: 麸皮 6.0 g/L, CMC 为 7.0 g/L, 发酵时间 96 h。

3 结 语

应用响应面分析方法优化灰绿青霉 *Penicillium glaucum* NS16 产纤维素酶的发酵条件, 通过 Plackett-Burman 实验设计研究了 18 个选取的发酵条件因素对菌株纤维素酶生产活性的影响, 从中筛选获得 3 个显著影响因素, 分别是麸皮、CMC 含量以及发酵时间。经过 Box-Behnken 实验对筛选因素的进一步优化, 得到优化的发酵条件为: 麸皮 6.0 g/L, CMC 7.0 g/L, 发酵时间 96 h。响应面模拟和验证发酵实验结果表明, 优化条件下发酵液的 CMC 酶活模型预测值和实验验证值拟合度达到 99%, 酶活均接近 309 IU/mL, 比初始发酵条件下菌株产 CMC 酶活 94.51 IU/mL 提高了 227%。

参考文献(References):

- [1] 李军,张福琴,商辉,等.我国发展燃料乙醇的基础条件与前景[J].石油科技论坛,2009,4(8):25-27.
LI Jun,ZHANG Fu-jun,SHANG Hui,et al. Basic conditions and prospect of fuel ethanol development in our country[J]. **Oil Forum**,2009,4(8):25-27.(in Chinese)
- [2] Jorgensen H, Morkeberg A, Krogh K B R, et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium species*: Effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis[J]. **Enzyme & Microbial Technol**, 2005, 36(1): 42-48.
- [3] 孙宪昀,曲音波,刘自勇.青霉木质纤维素降解酶系研究进展[J].应用与环境生物学报,2007,13(5):736-740.
SU N Xian-yun,QU Yi-bo,LIU Zi-yong. Progress in research of lignocellulose-degrading enzymes from *Penicillium*[J]. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**, 2007, 13(5): 736-740.(in Chinese)
- [4] Rapp P, Grote E, Wagner F. Fermentation and location of 1, 4-beta-glucanases and 1, 4-beta-glucosidases from *Penicillium janthinellum*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1981, 41(4): 857-866.
- [5] 王俊刚,张树珍,杨本鹏,等.3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J].甘蔗糖业,2008,5(2):45-49.
WANG Jun-gang,ZHANG Shu-zhen,YANG Ben-peng,et al. Application of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method to test the reducing sugar and water-soluble total sugar content in sugarcane internodes[J]. **Sugarcane and Cane sugar**, 2008, 5(2):45-49.(in Chinese)
- [6] 刘德海,杨玉华,安明理.纤维素酶酶活的测定方法[J].中国饲料,2002,17(1):27-28.
LIU De-hai,YANG Yu-hua,AN Ming-li. Assay method on the activity of feed cellulase[J]. **China Feed**, 2002, 17(1):27-28.(in Chinese)
- [7] 赵玉萍,杨娟.四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J].食品研究与开发,2006,27(3):116-118.
ZHAO Yu-ping,YANG Juan. Comparison of four cellulase activity measurement methods[J]. **Food Research and Development**, 2006, 27(3): 116-118.(in Chinese)
- [8] Suzelle Barrington A, Jin-Woo Kim. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss[J]. **Bioresource Technology**,2008,99(2):368-377.
- [9] 吴有炜.SAS操作入门[Z].无锡:江南大学,2003:144-152.
- [10] 缪静,张术臻,程显好,等.纤维素酶提取工艺及酶学性质的研究[J].安徽农业科学,2008,36(19):7954-7955.
MIAO Jing,ZHANG Shu-zhen,CHENG Xian-hao,et al. Study on the extraction technology and enzymatic properties of cellulase[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2008,36(19):7954-7955.(in Chinese)
- [11] 李忠玲,王卫卫,任平,等.产碱性纤维素酶兼性厌氧菌株的筛选和酶学性质的初步研究[J].微生物学通报,2008,35(6):851-854.
LI Zhong-Ling,WANG Wei-Wei,REN Ping,et al. Screening of facultative anaerobic strain producing alkaline cellulase and study on enzymatic properties[J]. **Microbiology**, 2008,35(6):851-854.(in Chinese)
- [12] 何国庆.食品发酵与酿造工艺学[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [13] 白东栋,吴坚平,徐刚,等.响应面法优化烯丙醇酮乙酸酯水解酶的产酶条件[J].食品与生物技术学报,2007,26(1):71-76.
BAI Dong-dong,WU Jian-ping,XU Gang,et al. Optimization of the production conditions of HMPK hydrolase employing response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(1): 71-76.(in Chinese)
- [14] 刘小杰,何国庆,陈启和.康氏木霉 ZJ5 纤维素酶发酵培养基的优化[J].浙江大学学报:工学版,2003,37(5):623-628.
LIU Xiao-jie,HE Guo-qing,CHEN Qi-he. Culture medium optimization for producing cellulase by *Trichoderma koningii* ZJ5[J]. **Journal of Zhejiang University**, 2003, 37(5): 623-628.(in Chinese)
- [15] Xin Li, Jia Ou-yang, Yong Xu, Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology[J]. **Bioresource Technology**, 2009,100(1):3613-3617.

(责任编辑:李春丽)