

响应面法优化毛云芝菌产漆酶的培养条件研究

范文霞^{1,2}, 蔡友华^{1,2}, 刘学铭¹, 肖更生¹, 陈卫东¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共实验室, 广东 广州 510610)

(2. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究了影响毛云芝菌产漆酶的培养条件, 通过单因素实验选取试验各因素的水平, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 进行响应面回归分析, 以漆酶酶活为响应值, 确定了影响漆酶产量的各因素的水平, 结合验证实验结果得到其最佳的培养条件为接种量 8.2%、装液量 30.8%、摇床转速 141 r/min。

关键词: 响应面法; 毛云芝菌; 漆酶; 培养条件

中图分类号: Q939.97; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0153-04

Optimization of Culture Conditions of a White-Rot Fungus for Laccase Production by Response Surface Design

FAN Wen-xia^{1,2}, CAI You-hua^{1,2}, LIU Xue-ming¹, XIAO Geng-sheng¹, CHEN Wei-dong¹

(1. Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Guangzhou 510610, China)

(2. College of Bioscience & Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The fermentation conditions of a white-rot fungus *Coriolus hirsutus* for laccase production were optimized by single factor experiment and response surface design. The results showed that the optimal inoculum size, amount of broth in flask and shaking rate were 8.2%, 30.8% and 141r/min, respectively.

Key words: response surface design; *Coriolus hirsutus*; laccase; fermentation condition

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 与抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同源, 都属于蓝色多铜氧化酶家族^[1]。该酶在白腐菌中普遍存在, 少数低等真菌和植物中也产生, 多为分泌型糖蛋白^[2]。由于漆酶是一种氧化还原酶, 其作用主要是催化氧化还原反应, 可催化大量的酚类和芳香胺类化合物的氧化^[3]。漆酶作用的底物相当广泛, 包括多酚、甲基替代单酚、芳香胺、苯硫醇、聚甲氧基苯以及其他容易氧化的化合物^[3]。由于具有相当广泛的底物专一性和较好的稳定性, 漆酶在食品工业、废水处理、生物漂白、芳香化合物转化、环境监测等方面具有重要应用价值^[3]。目前, 国内关于毛云芝菌产漆酶的研究报道并不多见, 本文在单因素实验的基础上, 对影响毛云芝菌产酶能力的接种量、装液量以及摇床转速三个因素进行Box-

behnen 实验设计, 并采用响应面分析法分析三者之间的协同作用对毛云芝菌产酶的影响, 对漆酶的工业化生产具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

Coriolus hirsutus (毛云芝菌): 澳大利亚某研究所赠送, 本试验室保藏。

1.1.2 培养基

斜面种子培养基: 土豆 20%, 葡萄糖 2%, 酵母膏 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%, VB_1 0.001%, 琼脂 2%; 液体种子培养基: 斜面培养基配方中不加琼脂即得; 产酶发酵培养基: 麸皮 3%, 蛋白胨 0.2%, 牛肉膏 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.3%, TE (微量元素混合液) 6%, VB_1 20 mg/L, $CaCl_2$ 0.001%, $NaCl$ 0.01%, 自来水, pH 自然; 微量元素混合液 (参照胡道伟^[4]等进行调整) (g/L): 氨基乙酸 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, $NaCl$ 1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CoSO_4$

收稿日期: 2007-11-06

基金项目: 留学回国人员科研启动基金 (教外司留[2007]1108 号)

作者简介: 范文霞(1980-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为微生物次级代谢产物

通讯作者: 刘学铭, 医学硕士, 工学博士, 研究员, 硕导

0.1, CaCl₂·2H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 0.1, CuSO₄·5H₂O 0.01, KAL(SO₄)₂·12H₂O 0.01, H₃BO₃ 0.01, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01, MnSO₄·H₂O 0.1, 用蒸馏水配制。

1.1.3 主要试剂

ABTS (即 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)): 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

斜面菌种培养: 将保存的菌种接种于斜面培养基上, 28 °C 恒温培养 7~10 d, 置于 4 °C 冰箱中保存备用; 液体种子培养: 用灭菌竹签将每支 PDA 斜面上的菌丝刮到含有玻璃珠的 30 mL 无菌水中, 将其打散, 然后用无菌吸管取 5 mL 悬浮液, 接入装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 150 r/min, 28 °C 振荡培养 4 d; 液体深层培养: 将培养好的种子以体积分数 10% 接种量接入到发酵培养基中, 28 °C, 150 r/min 振荡培养 5 d。每一培养条件至少进行三个平行试验。

1.2.2 灭菌方法

121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2.3 酶液制备

取摇瓶发酵液经真空抽滤后, 得到的清液即为粗酶液。

1.2.4 漆酶活力测定方法^[5]

3 mL 反应总体积中, 含 0.1 mL 酶液, 2.7 mL 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5), 加入 0.2 mL 0.5 mmol/L ABTS 以启动反应, 室温条件下, 采用 UV-1700 紫外可见分光光度计测定 420 nm 下反应前 3 min 内的吸光值变化。酶的活力单位 (IU) 定义为: 在上述条件下 (室温, pH4.5), 每秒催化底物 (ABTS) 引起吸光值增加 0.001 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.2.5 实验结果统计分析

采用 SAS V8.0 专业统计软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 响应面法优化培养条件

通过单因素实验, 对发酵培养基的接种量、装液量以及摇床转速进行优化, 确定了各因素合成漆酶的最佳水平分别为 8%、250 mL 三角瓶中的装液量为 70 mL、150 r/min。根据单因素实验结果, 设计响应面分析实验, 见表 1。

根据响应面分析实验软件安排 15 次实验, 实验安排及结果见表 2。

表 1 响应面分析实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of RSD

因素	编码值		
	-1	0	1
X ₁ 接种量 inoculating amount	6%	8%	10%
X ₂ 装液量 inoculation volume	24%	28%	32%
X ₃ 摇床转速 rotate speed (r/min)	120	150	180

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken

序号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 酶活 (U/mL)
1	-1	-1	0	3604
2	-1	1	0	4497
3	1	-1	0	2583
4	1	1	0	4479
5	0	-1	-1	4053
6	0	-1	1	2174
7	0	1	-1	3973
8	0	1	1	3392
9	-1	0	-1	3734
10	1	0	-1	3746
11	-1	0	1	2767
12	1	0	1	2755
13	0	0	0	4661
14	0	0	0	4626
15	0	0	0	4635

响应面分析的立体图以及等高线图见图 1~3。

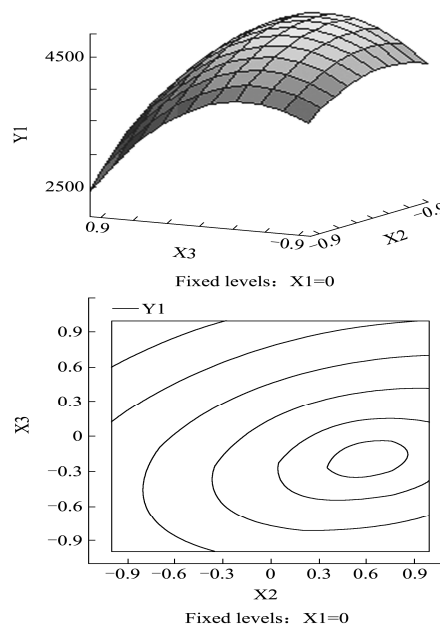


图 1 装液量与摇床转速对酶活的响应面分析图与等高线图
Fig.1 RSD figures and contour of amount of broth in flask and shaking rate on enzymatic activity

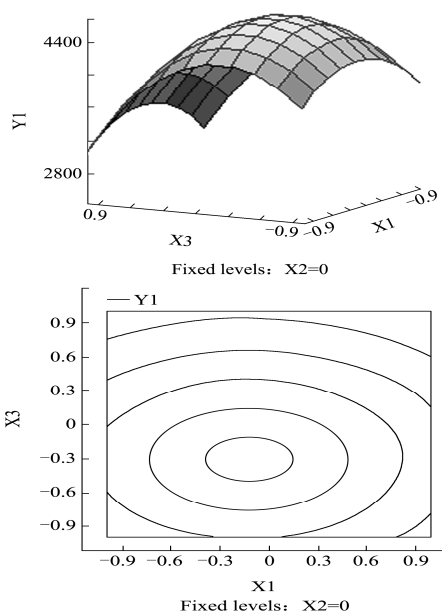


图2 接种量与摇床转速对酶活的响应面分析图与等高线图
Fig.2 RSD figures and contour of inoculum size and shaking rate on enzymatic activity

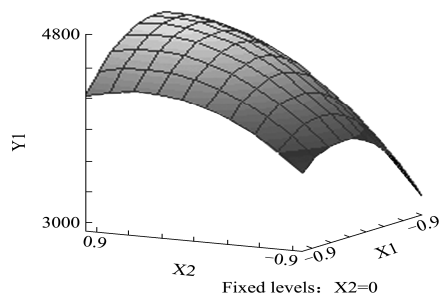


图3 接种量与装液量对酶活的响应面分析图与等高线图
Fig.3 RSD figures and contour of inoculum size and amount of broth in flask on enzymatic activity

图1~3是接种量、装液量、摇床转速三者相互之间交互作用对响应值影响的响应面图。由图1可以看出，装液量与摇床转速对酶活的影响是显著的，当装液量接近1水平时，随着转速的提高酶活力水平不断增加。由图2可以看出，当转速接近0水平时，随着接种量的增加酶活力水平不断增加。由图3可以看出，当接种量接近0水平时，随着装液量的增加酶活力水平不断增加。综上可以看出，当接种量、转速接近0水平，装液量接近1水平时，酶活力水平呈不断增加的趋势，随后继续增大各量，酶活力水平呈下降的趋势。当接种量接近0水平时，随着装液量增加与摇床转速的提高，酶活力水平呈不断增加的趋势，说明装液量与摇床转速对酶活的影响是非常显著的。

表3 响应面实验方差分析表

Table 3 Variance of RSD experiments

Source	DF	SS	MS	F	(Pr>F)	Prominence
X ₁	1	134940.1	134940.1	1.328605	0.301165	
X ₂	1	1927666	1927666	18.97958	0.007214	*
X ₃	1	2439841	2439841	24.02239	0.00447	*
X ₁ *X ₁	1	918313.9	918313.9	9.041612	0.029861	*
X ₁ *X ₂	1	251502.3	251502.3	2.476262	0.176389	
X ₁ *X ₃	1	144	144	0.001418	0.971421	
X ₂ *X ₂	1	455436.2	455436.2	4.484172	0.087774	
X ₂ *X ₃	1	421201	421201	4.147096	0.097309	
X ₃ *X ₃	1	2934269	2934269	28.89048	0.003003	*
模型	9	9033679	1003742	9.882728	0.010634	*
误差	5	507826.4	101565.3			
总和	14	9541505				

根据表2的实验结果，以毛云芝菌漆酶的活力(U/mL)为响应值，经SAS V8.0统计软件进行统计分析，得到该实验的回归方程为：

$$Y=4640.667-129.857*X_1+490.875*X_2-552.25*X_3-4$$

$$98.7083*X_1*X_1+250.75*X_1*X_2-6*X_1*X_3-351.2083*X_2*X_2+324.5*X_2*X_3-891.4583*X_3*X_3$$

根据表3的显著性分析结果，剔除各因素间不明显的交互作用，得到的回归方程为：

$$Y=4640.667-129.857*X_1+490.875*X_2-552.25*X_3-498.7083*X_1*X_1-351.2083*X_2*X_2-891.4583*X_3*X_3$$

模型显著性检验结果表明： $P(F>F_\alpha)=0.010634$ ，所以该模型回归显著，由 SAS V8.0 软件计算得该模型确定系数 $R^2=0.9468$ ，表明模型与实际情况拟合得较好，因此可用回归方程代替真实试验点对毛云芝菌漆酶的发酵条件进行分析和预测。对回归方程求一阶偏导，并令其等于零，可以得到曲面的最大点，即三个主要因素的最佳水平值，分别为： $X_1=-0.1$ ，接种量体积分数为 8.2%， $X_2=0.7$ ，装液量体积分数为 30.8%， $X_3=-0.3$ ，摇床转速为 141 r/min。其相对应的响应值为 4906 U/mL。为了进一步验证最优培养条件，采用上述条件进行了实验，结果酶活力水平达到了 4850 U/mL，与理论预测值相比，相对误差仅为 1%。因此，采用响应面法优化得到的毛云芝菌的培养参数准确可靠，具有实用价值。

3 结果与讨论

在微生物代谢产物的研究中，微生物培养条件的优化工作起着重要的作用。实验室最常用的优化策略是单次因子法，而响应面方法是统计技术的合称，包括实验设计、建模、因子效应评估以及寻求因子最佳操作条件^[6]。响应面方法已成功应用于许多生物过程、培养基和操作条件的优化^[7]。

接种量的大小取决于生产菌种在摇瓶或者发酵罐中的繁殖速度^[8]。采用较大的接种量可以缩短发酵罐中菌丝繁殖到达高峰的时间，使产物的合成期提前到来；同时种子量多，使生产菌迅速占据了整个培养环境，成为优势菌，减少了杂菌生长的机会^[8]。但是如果接种量过多，菌丝往往生长过快、培养液粘度增加，造成溶解氧不足，影响产物的合成^[8]。毛云芝菌是一种好氧菌，装液量以及摇床转速反应了毛云芝菌产漆酶对氧的需求情况。从响应面实验的方差分析结果可

以看出装液量与摇床转速对酶活的影响是显著的，两者都存在最佳水平值，当超过最佳水平值时，酶活力水平也降低。因为当装液量超过一定值时，其溶解氧的水平降低，不利于漆酶的合成。提高摇床转速虽然可以提高溶氧，但是过高的转速容易产生很大的剪切力，不利于菌体的生长，进而影响漆酶的合成。

本实验将响应面分析法应用于毛云芝菌产酶培养条件的优化，并得到三个因素的最佳水平值，分别为接种量体积分数为 8.2%、装液量体积分数为 30.8%以及摇床转速 141 r/min。其相对应的响应值为 4906 U/mL。并对优化条件进行发酵实验，实验值为 4850 U/mL，与理论预测值相差仅为 1%，实验结果良好，说明采用响应面分析法优化毛云芝菌产漆酶的培养条件是可行的。

参考文献

- [1] 许颖,兰进.真菌漆酶研究进展[J].食用菌学报,2005,12(1):57-64
- [2] 钞亚鹏,钱世钧.真菌漆酶及其应用[J].生物工程进展,2001,21(5):23-28
- [3] 刘涛,曹瑞钰.漆酶在环境保护领域中的研究及应用进展[J].云南环境科学,2005,24(3):12-14
- [4] 胡道伟,朱雄伟,梅运军,等.白腐菌产漆酶培养条件的研究[J].华中科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):111-113
- [5] 候红漫,蒋姣姣.白腐菌 *Pleurotus ostreatus* 漆酶的生产及其最佳诱导条件[J].大连轻工业学院学报,2003,22(1):28-31
- [6] 李孱,白景华,蔡昭铃,等.细菌素发酵培养基的优化及动力学初步分析[J].生物工程学报,2001,17(2):187-192
- [7] 刘小杰,何国庆,陈启合,等.黑曲霉 β -葡萄糖苷酶发酵培养基的优化[J].中国食品学报,2006,6(2):6-9
- [8] 吴剑波,张致平,金文藻,等.微生物制药(第一版)[M].北京:化学工业出版社,2002,143-144

(上接第 149 页)

制备芒果汁后，需要加热灭酶，温度 80~90℃、1 min，然后冷却到室温。通过加热灭酶的果汁才可以在 0~5℃ 的冰箱存放 3 d。加热过程一定要使果汁温度快速达到 80~90℃，加热的目的是灭酶，防止果汁褐变。

本试验研究出了风味独特的芒果乳酸饮料，具有清爽的芒果香味和柔和的乳香味，易于人体吸收，是很好的健康乳饮料。芒果风味发酵酸乳不添加香精香料，不添加稳定剂，成品不经灭菌处理，为活性乳酸

菌饮料，经试验确定，保存于 0~4℃ 的冰箱内，保持质期为 5 d。制品组织细腻，色泽良好，口感细腻，酸甜可口，芒果香味与乳香味最协调，香气独特。

参考文献

- [1] 杜林,黄健明.香芋酸奶的制作[J].农产品加工学刊,2005,(04):1-2
- [2] 王琴.甘薯酸奶的工艺研究[J].仲恺农业技术学院学报,2002,(2):6-9