

文章编号:1000-8551(2011)03-0482-06

响应面法优化白腐菌 *Pleurotus eryngii* - C₀₀₀₇ 产木质素降解酶条件

陈敏¹ 郭倩¹ 姚善泾²

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310012;

2. 浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要:为提高 *Pleurotus eryngii* - C₀₀₀₇ 产木质素降解酶能力, 考察了初始 pH、秸秆浓度、Cu²⁺ 浓度、吐温-80 含量对其产木质素降解酶的影响。采用单因素试验和响应面分析法的 Central Composite 进行试验设计, 得到 *Pleurotus eryngii* - C₀₀₀₇ 产木质素降解酶的最佳条件: 培养基初始 pH 5.63、秸秆加量 1.12%、Cu²⁺ 浓度 4.00mmol/L、吐温-80 含量 0.83g/L。在此条件下, 第 8 天摇瓶发酵液中木质素降解酶活性达到 241.40U/ml, 与回归模型的预测值相对误差仅 2.18%。

关键词: 刺芹侧耳; 木质素降解酶; 产酶条件; 响应面

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR LIGNINOLYTIC ENZYMES PRODUCTION FROM WHITE ROT FUNGI *Pleurotus eryngii* - C₀₀₀₇ BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

CHEN Min¹ GUO Qian¹ YAO Shan-jing²

(1. College of Food Science & Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou Zhejiang 310012;

2. Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou Zhejiang 310027)

Abstract: In order to enhance the ligninolytic enzymes activity of *Pleurotus eryngii* - C₀₀₀₇, the influence of initial pH, straw, Cu²⁺ concentration, Tween-80 content on ligninolytic enzymes production were studied. Designed with single factor experiment and the Central Composite in the response surface methodology, the optimization conditions of producing ligninolytic enzymes were initial pH at 5.63, 1.12% of straw, Cu²⁺ at 4.00mmol/L, Tween-80 0.83g/L. Under these conditions, the ligninolytic enzymes activity in fermentation broth of shake flask on the eighth day was 241.40U/ml, which was similar to that predicted from the regression model with a relative error of 2.18%.

Key words: *Pleurotus eryngii*; ligninolytic enzymes; fermentation conditions; response surface

白腐菌是一种能够引起木材白色腐烂的担子菌, 它能分泌多底物的木质素降解酶, 以氧化还原反应形式对木质素及多环芳烃衍生物进行催化反应, 因此能降解多种难降解的有机污染物^[1]。木质素降解酶在食品工业、环境保护(酚类、芳香族化合物^[2]、染料类物质^[3-5]的生物降解)、造纸工业(纸浆生产中木质素

的降解^[6,7])、土壤修复及其他领域显现出巨大的研究价值和潜力, 已成为国内外研究的热点之一。国内的研究工作主要围绕选育优良的白腐真菌菌株, 探索适宜的培养方式及优化培养条件提高其木质素降解酶的产量等方面展开。研究的白腐真菌主要集中在 *Phanerochaete chrysosporium*、*Bjerkandera*、*Trametes*、

收稿日期:2010-09-29 接受日期:2011-01-05

基金项目:浙江省自然科学基金(Y5053340)

作者简介:陈敏(1974-),女,浙江杭州人,副教授,研究方向为应用微生物及产物分离。Tel:0571-88071024-7578; E-mail: chenmin@mail.zjgsu.edu.cn

Pleurotus 等^[8-15]。

刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*) 隶属于真菌门、担子菌亚门、真担子菌纲、层菌亚纲、伞菌目、侧耳科^[16]。据报道,其分泌的木质素降解酶对多种有机污染物、木质素等有降解作用^[17-20],但相关通过发酵条件优化来提高其木质素降解酶产量方面的研究报道较少。*Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇^[15]是本实验室经紫外和⁶⁰Co γ 辐照复合诱变选育的菌株,具有较强的木质素降解酶生产能力。本课题组曾考察 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ 产酶的影响因素^[21],发现初始发酵 pH、秸秆加量、Cu²⁺ 以及吐温-80 浓度对该菌株木质素降解酶的表达影响明显。本研究以木质素降解酶酶活为响应值,采用响应面分析法的 Central Composite 试验设计建立响应曲面模型,优化 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ 产木质素降解酶的条件,为木质素降解酶的工业化生产提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇^[15] 为本实验室保存菌种,经紫外照射 25s 和 1000Gy ⁶⁰Co γ 射线辐照(剂量率为 67.8Gy/h)复合诱变筛选获得。其原始菌株(GIM5.280)购于广东微生物研究所。

1.1.2 培养基 CYM 固体培养基:葡萄糖 2%,麦芽糖 1%,硫酸镁 0.05%,磷酸二氢钾 0.4%,酵母粉 0.2%,胰蛋白胨 0.2%,琼脂 1.8%,pH 自然。

PDA 培养基:土豆汁 20%,葡萄糖 2%,酵母粉 0.2%,蛋白胨 0.2%,硫酸镁 0.1%,磷酸二氢钾 0.2%,琼脂 2%,pH 自然。

发酵培养基(CYM 培养基):葡萄糖 1%,麦芽糖 1%,硫酸镁 0.05%,磷酸二氢钾 0.4%,酵母粉 0.2%,胰蛋白胨 0.2%,pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 粗酶液的制备 将经 CYM 固体平板活化 5d 的 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ 菌种接种到 CYM 液体种子培养基中(500ml 三角瓶中装液量为 200ml),23℃、150r/min 培养 4d,即得液体种子。

配制 200ml 液体发酵培养基于 500ml 三角瓶中,灭菌后以 10% 的接种量接入种子培养液。在 25℃、150r/min 的条件下摇床培养 8d。在 CYM 发酵培养基的基础上,添加不同浓度的秸秆、Cu²⁺、吐温-80,构成不同配方的发酵培养基。

发酵液经 4℃、8000r/min 离心 2min,取上清液适当稀释后用于酶活测定。

1.2.2 酶活测定^[15,22,23] 1ml 反应体系中含有 5mmol/L ABTS-(NH₄)₂O₂ 0.1ml pH 5.0 乙酸钠 0.5ml 和经一定稀释的上清液 0.4ml,室温下测量该体系 436nm 波长下 3min 内的吸光度变化。

每毫升反应体系每分钟生成 1 μ mol 产物所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。其消光系数 $\epsilon_{436} = 29300\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

1.2.3 响应面法对培养基条件进行优化 通过单因素试验结果,确定 4 因素(pH、秸秆、Cu²⁺ 和吐温-80)的中心点,设计步长,进行中心组合试验的响应面优化,采用 Design-Expert 软件进行 Central Composite 试验设计,并对试验数据进行回归分析。设计了 4 因素 3 水平的响应面(Response Surface Methodology, RSM)。以单因素试验的最佳水平为中心点,进行 16 个析因点、8 个星号点、重复 6 次中心点的 Central Composite 试验(见表 1)。

表 1 Central Composite 试验设计的因素与水平

Table 1 Factors and levels of Central Composite design

水平 level	X ₁ pH	X ₂ 秸秆 straw (g/L)	X ₃ Cu ²⁺ (mmol/L)	X ₄ Tween-80 (g/L)
-1	5	0.5	3	0.5
0	5.5	1	5	1
1	6	1.5	7	1.5

2 结果分析与讨论

2.1 单因素条件优化

2.1.1 培养基初始 pH 对木质素降解酶活性的影响 考察培养基的不同初始 pH 对 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ 发酵产酶活性的影响,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,*Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ 菌株在不同初始 pH 值的培养基中,木质素降解酶的表达差异较大。培养基 pH 在 5.5 时酶活最高,达 128.60U/ml。pH 超过 5.5 后,随着 pH 的上升,发酵液中酶活显著下降。当培养基初始 pH8.0 时,发酵 8 d 发酵液中菌株的生物量较 pH 5.5 培养基中的明显减少。分析原因可能是初始 pH 值的变化使菌体生长受到了抑制,进而影响了酶的合成,这也是导致发酵液中酶活较低的原因之一。初步确定较适宜的初始 pH 为 5.5。

2.1.2 秸秆对木质素降解酶活性的影响 向 CYM 培养基中分别加入 0.5%、1%、1.5%、2% 和 3% (W/W) 的秸秆粉,考察其对 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₀₇ 发酵产酶活性的影响,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,

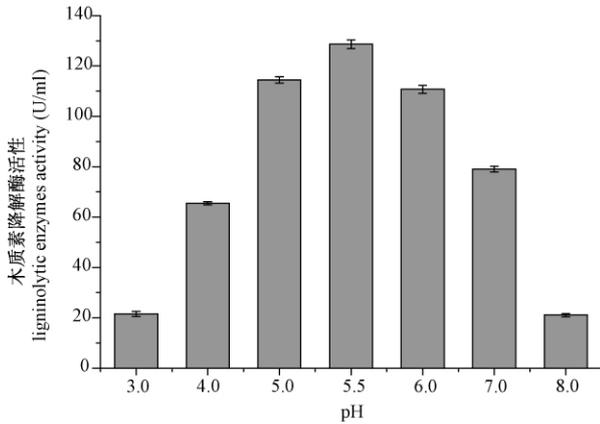


图 1 培养基初始 pH 对 *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇ 产木质素降解酶的影响

Fig. 1 Effect of initial pH on ligninolytic enzymes production of *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇

Pleurotus eryngii-C₆₀₀₇ 菌株在添加不同浓度秸秆的培养基中,木质素降解酶的表达有较大差异。秸秆浓度在 1.0% 时,发酵液中酶活最高,较对照组提高了 1.58 倍。其后随着秸秆浓度的增加,发酵液中酶活下降。当秸秆浓度达 3% 时,酶活与对照组的酶活相差不大。低浓度的秸秆可以促进木质素降解酶的分泌,初步确定较适的秸秆添加量为 1%。

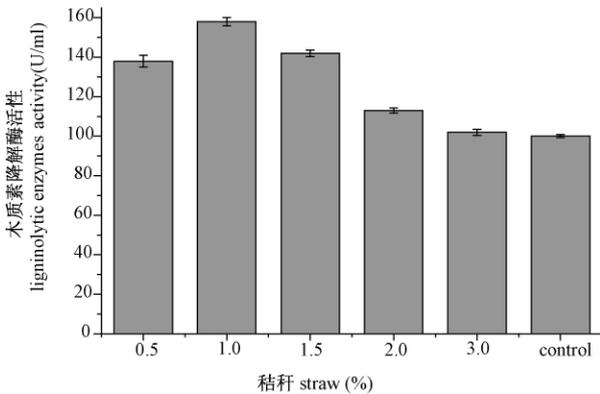


图 2 秸秆对 *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇ 产木质素降解酶的影响

Fig. 2 Effect of straw on ligninolytic enzymes production of *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇

2.1.3 Cu^{2+} 对木质素降解酶活性的影响 金属离子参与酶的组成、激活酶活性、维持细胞结构的稳定性、调节细胞渗透压。本试验向培养基中分别加入不同浓度的 Cu^{2+} , 考察其对 *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇ 发酵产酶活性的影响, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 当 Cu^{2+} 浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时, 发酵液酶活达到最大。随着

Cu^{2+} 浓度的降低, 酶活也随着降低。但当 Cu^{2+} 浓度提高到 10^{-2} mol/L 时, 培养基中木质素降解酶酶活只有 89.35 U/ml , 低于对照。由此可见, 低浓度 Cu^{2+} 对 *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇ 木质素降解酶的产生有促进作用, 高浓度的 Cu^{2+} 反而会抑制其木质素降解酶的表达, 这一结果与 Galhaup 等^[24] 的研究结果一致。初步确定较适的 Cu^{2+} 浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

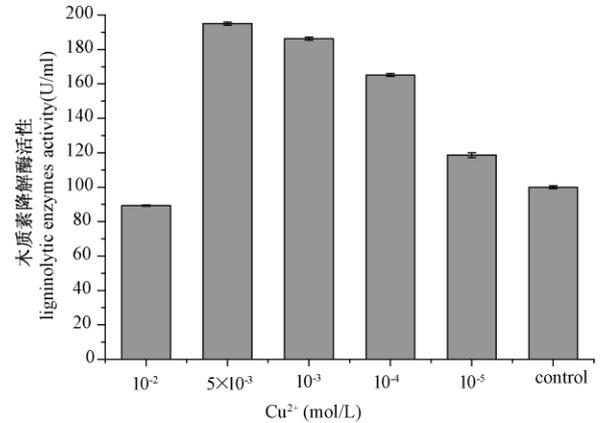


图 3 Cu^{2+} 对 *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇ 产木质素降解酶的影响

Fig. 3 Effect of Cu^{2+} on ligninolytic enzymes production of *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇

2.1.4 吐温-80 对木质素降解酶活性的影响 吐温-80 是一种表面活性剂, 它可以降低细菌菌体与培养基接触面之间的表面张力, 从而改善微生物细胞膜的通透性。它能解除已合成的酶在细胞内对酶基因的转录或 mRNA 翻译的阻遏, 促进营养物质进入细胞及代

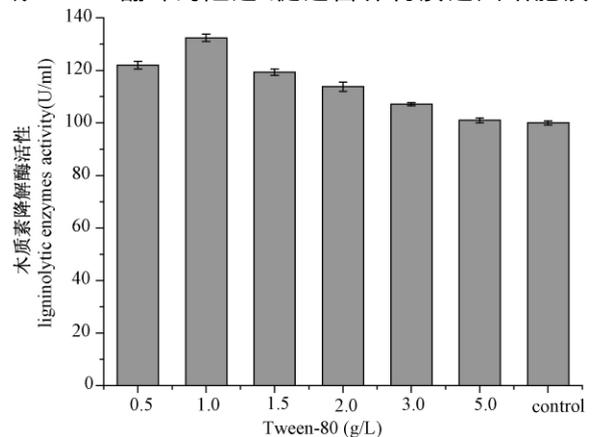


图 4 吐温-80 浓度对 *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇ 产木质素降解酶的影响

Fig. 4 Effect of Tween-80 content on ligninolytic enzymes production of *Pleurotus eryngii*-C₆₀₀₇

谢产物排出体外,因此可提高生物的产酶量^[12,14,25,26]。向 CYM 培养基中分别加入 0 (control)、0.5、1、2、3 和 5 g/L 的吐温-80,考察其对 *Pleurotus eryngii* - Co007 产木质素降解酶的影响,结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,加入适量吐温-80 可以使发酵液中木质素降解酶的表达明显增加。当吐温-80 的添加量为 1g/L 时,发酵液中木质素降解酶酶活是对照组的 1.32 倍,

达到最高。此后,随吐温的添加量增加,发酵液中木质素降解酶的酶活缓慢下降。当吐温-80 含量为 5 g/L 时,其酶活与对照组接近。初步确定较适的吐温-80 含量为 1g/L。

2.2 响应面法对培养基条件进行优化

以发酵液中木质素降解酶活性为响应值(Y),回归分析结果见表 2,响应面分析结果见图 5~图 10。

表 2 回归分析结果

Table 2 Results of regression analysis

参数 term	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significance
X_1 (pH)	1	117.53	117.53	0.65	0.4339	
X_2 (straw)	1	1246.03	1246.03	6.85	0.0194	*
X_3 (Cu^{2+})	1	3170.09	3170.09	17.44	0.0008	**
X_4 (Tween-80)	1	3664.25	3664.25	20.16	0.0004	**
X_1X_2	1	24.38	24.38	0.13	0.7193	
X_1X_3	1	116.26	116.26	0.64	0.4364	
X_1X_4	1	6.52	6.52	0.036	0.8524	
X_2X_3	1	2.88	2.88	0.016	0.9015	
X_2X_4	1	564.18	564.18	3.10	0.0985	
X_3X_4	1	23.21	23.21	0.13	0.7259	
X_1^2	1	1239.28	1239.28	6.82	0.0197	*
X_2^2	1	9264.05	9264.05	50.96	<0.0001	**
X_3^2	1	3728.60	3728.60	20.51	0.0004	**
X_4^2	1	10544.24	10544.24	58.00	<0.0001	**
回归 regression	14	27674.12	1976.72	10.87	<0.0001	**

相关系数 coefficient of correlation $R^2 = 0.9103$

注: **表示极显著, * 表示显著

Note: * and ** indicated significance at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

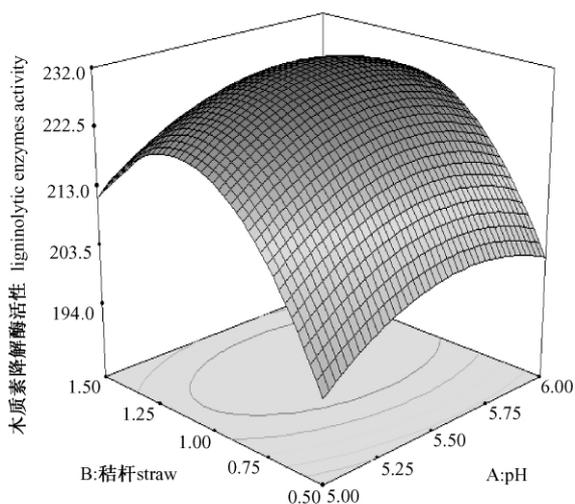


图 5 pH 和秸秆对木质素降解酶表达的响应面

Fig. 5 Response surface plots of pH and straw on ligninolytic enzymes

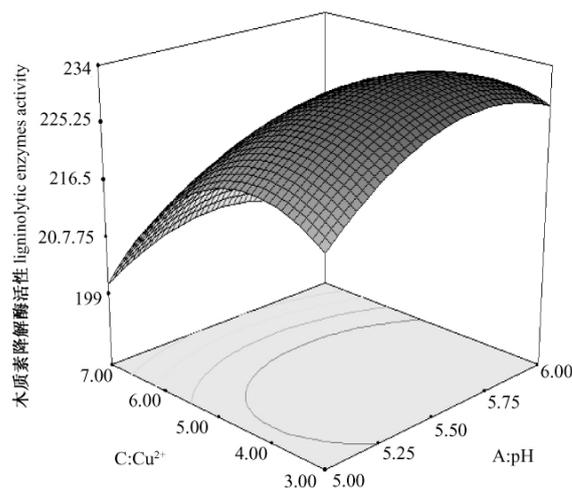


图 6 pH 和 Cu^{2+} 对木质素降解酶表达的响应面

Fig. 6 Response surface plots of pH and Cu^{2+} on ligninolytic enzymes

回归方程中各变量对响应值(即木质素降解酶活性)影响的显著性由 F 检验来判定, P 值越小, 则相应

变量的显著程度越高。表 2 表明, X_3 、 X_4 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对响应值的影响极显著, X_2 、 X_1^2 的影响显著。说明在该

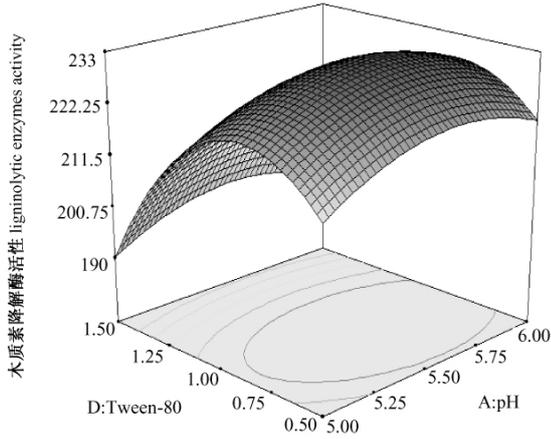


图 7 pH 和吐温 - 80 对木质素降解酶表达的响应面
Fig. 7 Response surface plots of pH and Tween-80 on ligninolytic enzymes

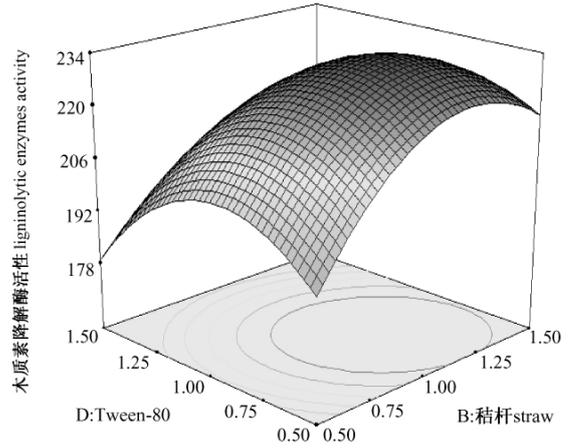


图 9 秸秆和吐温 - 80 对木质素降解酶表达的响应面

Fig. 9 Response surface plots of straw and Tween-80 on ligninolytic enzymes

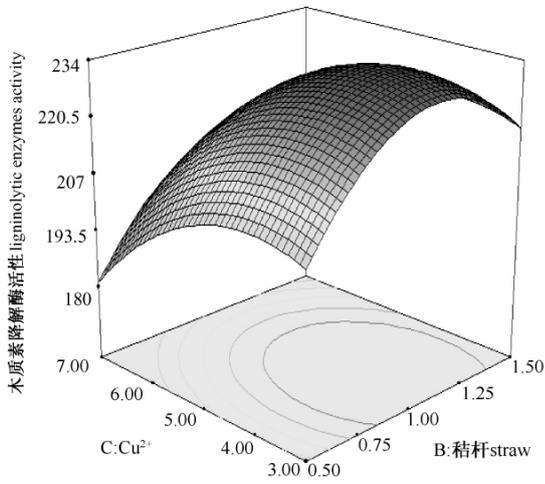


图 8 秸秆和 Cu²⁺ 对木质素降解酶表达的响应面

Fig. 8 Response surface plots of straw and Cu²⁺ on ligninolytic enzymes

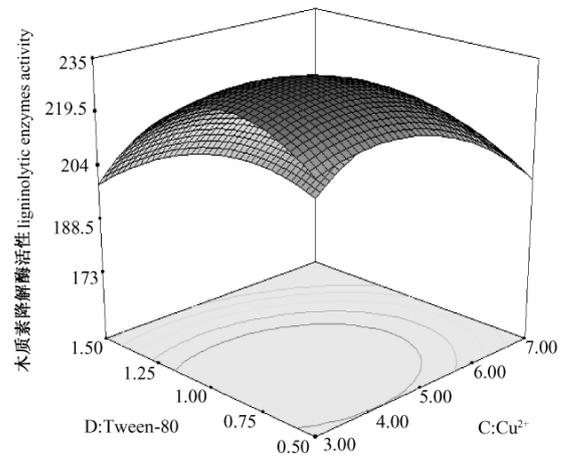


图 10 吐温 - 80 和 Cu²⁺ 对木质素降解酶表达的响应面

Fig. 10 Response surface plots of Tween-80 and Cu²⁺ on ligninolytic enzymes

试验水平下 Cu²⁺ (X₃)、吐温 - 80 (X₄) 对 *Pleurotus eryngii* - C₀₀₀₇ 分泌木质素降解酶影响极显著 秸秆(X₂)影响显著。回归方程相关系数 R² 为 0.9103,说明响应值的变化有 91.03% 来源于所选变量。因此该回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该回归方程来预测酶的最佳表达条件。

采用 Design Expert 软件对响应值与各因素进行回归拟合,得到如下回归方程。

$$Y = 230.14 + 2.21X_1 + 7.21X_2 - 11.49X_3 - 12.36X_4 - 12.36X_1X_2 - 2.70X_1X_3 - 0.64X_1X_4 + 0.42X_2X_3 - 5.94X_2X_4 -$$

$$1.20X_3X_4 - 6.72X_1^2 - 18.38X_2^2 - 11.66X_3^2 - 19.61X_4^2 \quad (1)$$

此方程二次项系数均为负值,抛物线开口向下,因而有极大值点。对方程进行求导,可以得到该模型的极值点。当 pH 为 5.63、秸秆加量为 1.12%、Cu²⁺ 浓度为 4.00mmol/L 和吐温 - 80 浓度为 0.83g/L 时,模型预测的最大响应值是 236.26U/ml。

为检验模型预测的准确性,在各变量的理论最佳值进行试验,摇瓶发酵液中实际酶活为 241.40 ± 15.5U/ml,与回归模型的预测值相对误差仅 2.18% ,

响应值的试验值与回归方程预测值吻合较好,可见该模型可以很好地预见实际发酵情况。

3 结论

选取影响木质素降解酶活表达显著的 pH、秸秆、 Cu^{2+} 和吐温-80 这 4 个因素进行单因素和中心组合试验的响应面优化,确定 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₇ 产木质素降解酶最优表达条件为: pH 5.63、秸秆 1.12%、 Cu^{2+} 浓度 4.00mmol/L 和吐温-80 浓度 0.83g/L。响应面模拟和验证发酵试验结果表明,优化条件下酶活模型预测值和试验验证值拟合度达到 97.82%,第 8 天发酵液中木质素降解酶活达到 241.40U/ml,较初始产酶条件提高了 2.3 倍。

参考文献:

[1] 黄丹莲,曾光明,黄国和,胡天觉,陈耀宁,时进钢. 白腐菌的研究现状及其在堆肥中的应用展望[J]. 微生物学通报,2004,31(2):112-115

[2] Perezboada M P, Ruizduenas F J, Pogni R, et al. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways[J]. Mol Biol,2005,354(2):385-402

[3] Li Xudong, Jia Rong, Li Pingsheng, et al. Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2009,56(1):1-6

[4] Selvam K. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. [J]. Bioresource Technol,2003,2(88):115-119

[5] Novotny C, Rawal B, et al. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes [J]. J Biotechnol,2001,89(2-3):113-122

[6] Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, et al. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps[J]. Journal of biotechnology,2005,115(4):333-343

[7] Wu Juan, Xiao Ya Zhang, Yu Ha Qing. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm [J]. Bioresource Technol,2005,96(12):1357-1363.

[8] Paulina L, Kristina H, Nina A, et al. Manganese peroxidase of *agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2005,66(4):401-407

[9] Martin S, Katerina S. Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*[J]. World J Microbiol Biotechnol,2008,

24(2):225-230

[10] 杨晓宽,路福平,杜连祥. 黄孢原毛平革菌产锰过氧化物酶培养基优化[J]. 天津科技大学学报,2004,19(2):29-32

[11] 杨宗渠,张荷珍. 修复抑制剂对侧耳辐射损伤的效应[J]. 核农学报,1996,10(1):25-29

[12] 王力生,朱洪龙,李春风,程茂基,蔡海. N^+ 注入选育漆酶高产菌株及其产酶优化研究[J]. 核农学报,2009,23(2):228-234

[13] 赵凤霞,张莉. 白腐菌 *Trametes pubescens* MB89 产漆酶发酵条件的优化及其部分酶学性质的研究[J]. 西北农业学报,2009,18(4):175-180

[14] 范文霞,刘学铭,蔡友华,肖更生,徐玉娟. 白腐菌 *Coriolus hirsutus* 产漆酶培养条件的优化研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(11):61-64

[15] 陈敏,姚善泾. 原生质体复合诱变选育刺芹侧耳木质素降解酶高产菌株[J]. 高校化学工程学报,2010,24(3):462-467

[16] 王玉玉,李玉. 中国侧耳属 [*Pleurotus* (Fr.) Kumm.] 真菌系统分类学研究[D]. 长春:吉林农业大学,2004

[17] Lucilia Caramelo, María Jesús Martínez, Ángel T. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving α -keto- γ -thiomethylbutyric acid and lignin model dimers[J]. American Society for Microbiology,1999,65(3):916-922

[18] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:1-9

[19] 陈敏,姚善泾,梁新乐. 刺芹侧耳木质素降解酶纯化及对染料脱色作用[J]. 食品与发酵工业,2010,36(2):34-38

[20] Pérez-Boada M, Doyle W A, Ruiz-duenas F J, et al. Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimization of in vitro folding [J]. Enzyme and Microbial Technology,2002,30:518-524

[21] 陈敏,郭倩,姚善泾. 白腐菌 *Pleurotus eryngii*-C₀₀₇ 产木质素降解酶条件的优化[J]. 食品与发酵工业,2011,37(1):7-11

[22] Munoz C, Guillen F, Martinze A T, et al. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation [J]. Applied and Environmental Microbiology,1997,6:2166-2174

[23] 余瑞元,袁明秀,陈丽蓉,陈雅蕙,陈来同,胡晓倩,周先碗. 生物化学实验原理和方法(第二版)[M]. 北京:北京大学出版社,2005

[24] Galhaup C, Halt rich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2001,56:225-232

[25] 李越中,高培基,王祖农. 黄孢原毛平革菌合成木素过氧化物酶的营养调控[J]. 微生物学报,1994,34(1):26-36

[26] Bazlev S, Kirk T. Effects of molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochate chrysosporiam*[J]. Biochem Biophys Res Commun,1981,99:373-378

(责任编辑 王媛媛)