

文章编号:0253-9721(2012)02-0063-05

黄多孔菌产漆酶最佳培养条件的优化

徐雪霏, 毕云枫, 蒋海芹, 沈明浩

(吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘要 采用 Plackett-Burman 设计法,对影响黄多孔菌生产漆酶的9个因素进行了筛选。结果表明,影响该菌产生漆酶的主要营养因素为碳氮比、铜离子浓度和 pH 值。在此基础上,采用响应面法对其中3个显著因子的最佳水平范围进行研究,利用统计软件 Design-Expert 进行二次回归分析。当碳氮比、铜离子浓度和 pH 值分别为 4:1、0.1 mmol/L 和 5.5 时,漆酶产量从 178 U/mL 提高到 446 U/mL,是优化前的 2.5 倍。

关键词 Plackett-Burman; 漆酶; 响应面; 水平

中图分类号:TS 201.25 文献标志码:A

Optimization of culture conditions for laccase production from *Polyporus elegans* Fr.

XU Xuefei, BI Yunfeng, JIANG Haiqin, SHEN Minghao

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract The 9 factors that influenced laccase production from *Polyporus elegans* Fr. were studied using Plackett-Burman design, it was found that they were main nutrition factors such as C/N ratio, the concentration of Cu^{2+} and pH. On that basis, response surface analysis was adopted to investigate the optimal levels of the 3 main factors. The second regression analysis of the findings using Design-Expert software showed that the laccase activity was 446 U/mL (178 U/mL before optimization) when the C/N ratio, concentration of Cu^{2+} and pH were 4:1, 0.1 mmol/L and 5.5 respectively, which was 2.5 folds of that under the original culture conditions.

Key words Plackett-Burman; laccase; response surface; level

漆酶有广泛的底物专一性和显著的非特异性^[1]。漆酶可以催化多种耦合物质氧化还原成水^[2-3]。近年研究表明,漆酶还可用于生物传感器的制造和生物修复^[4-5],如免疫探测器、药物等^[6],所以漆酶从十九世纪末至今受到了极大的关注^[7]。

响应面法是通过一系列确定性实验,用多项式函数来近似隐式极限状态函数进行数据分析,得出回归模型和最佳水平后,预测结果是否理想,它是生产条件,降低成本,提高产量、质量的一种有效方法^[8],该法已经广泛地应用于生物发酵条件的优化研究中^[9]。

本文采用响应面分析法对黄多孔菌产漆酶的培

养基进行了优化,优化后酶活提高达 2.5 倍,为漆酶的工业化生产提供了基础。

1 实验部分

1.1 材料

实验菌株:黄多孔菌(*Polyporus elegans* (Bull.) Fr.),来源于中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所。

斜面种子培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L, VB_1 0.01 g/L,琼脂 20 g/L,用蒸馏水配制, pH 值

收稿日期:2011-04-26 修回日期:2011-08-21

基金项目:吉林省科技厅课题(20090553)

作者简介:徐雪霏(1986—),女,硕士生。主要研究方向为食品安全。沈明浩,通信作者,E-mail:shenmh2003@yahoo.com.cn。

自然。

液体种子培养基:葡萄糖 10 g/L,酵母粉 1 g/L, Mandels 营养盐浓缩液 100 mL, Mandels 微量元素浓缩液 1 mL, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, 1 mol/L 柠檬酸缓冲液 50 mL (pH = 5.0)。

液体发酵培养基:马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L, VB_1 0.01 g/L, 用蒸馏水配制, pH 值自然。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵培养

150 mL 三角瓶中装液体培养基 50 mL, 接入 2~3 日龄平板菌种 3 片 (10 mm), 130 r/min、32 °C 条件下恒温振荡培养, 然后取 8% 的种子液接入发酵培养基, 在相同条件下振荡培养。

1.2.2 粗酶液制备

取培养 7~10 d 的发酵液, 1 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 冰箱 4 °C 保存备用。

1.2.3 酶活测定

根据漆酶活力测定方法, 取 0.1 mol/L pH 值为

4.6 的醋酸缓冲液 3.5 mL, 加入 3.36 mmol/L 的邻联甲苯胺 0.5 mL, 再加入适当稀释的粗酶液 0.1 mL, 25 °C 保温 5 min, 利用 722E 型紫外可见分光光度计测 595 nm 处的光密度 (OD 值), 酶活力以样品与底物反应 5 min 后光密度的改变值表示, 以每分钟光密度增加 0.001 为 1 个酶活力单位 (U/mL)。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 设计筛选影响因子

在前期实验的基础上, 选取可能影响产酶的 7 个因素: pH 值 (A)、碳氮比 (B)、接种量 (C)、装液量 (D)、铜离子 (E)、镁离子 (F)、诱导剂 (G) 进行 $N=12$ 的 Plackett-Burman 实验。7 个因素分别对应于表中的 7 个列, 每个因素取低水平“-1”和高水平“1”。以漆酶活力为响应值对实验结果进行分析, 得出各因素的 t 值和可信度水平。实验设计及结果见表 1, 各因素主效应分析见表 2。

表 1 $N=12$ 的 Plackett-Burman 实验设计及响应值

Tab. 1 Plackett-Burman experimental design and response values of $N=12$

实验点	pH 值	碳氮比	接种量	装液量	铜离子	镁离子	诱导剂	漆酶活力/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	102
2	1	-1	1	-1	-1	-1	1	168
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	171
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	105
5	1	-1	-1	-1	1	1	1	114
6	-1	-1	1	1	1	-1	1	138
7	1	1	1	-1	1	1	-1	75
8	1	1	-1	1	1	-1	1	84
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	132
10	-1	1	-1	-1	-1	1	1	138
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	189
12	-1	1	1	1	-1	1	1	138

表 2 Plackett-Burman 实验设计的因素水平及效应分析

Tab. 2 Plackett-Burman experimental design factor levels and effect analysis

因素	水平		效应	系数	T 检验	P 值	重要性 排序
	-1	1					
A pH 值	5	6	-0.700 0	-7.667	-3.34	0.029	3
B 碳氮比	3:1	5:1	-1.500 0	-1.000	-7.61	0.002	1
C 接种量/%	6	10	0.200 0	-6.667	0.95	0.394	4
D 装液量/mL	70	90	-0.133 3	4.667	-0.64	0.559	5
E 铜离子/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.075	0.125	-1.433 3	3.000	-6.84	0.002	1
F 镁离子/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1	2	-0.100 0	-7.000	-0.48	0.658	6
G 诱导剂 (1 mmol/L)	邻联甲苯胺	愈创木酚	-4.667 0	0.033	0.16	0.881	7

由表2的主效应分析结果可知,在 Plackett-Burman 设计的二水平范围内,影响黄多孔菌发酵产漆酶的重要因素为碳氮比、铜离子和 pH 值这3个因素。

2.2 响应面设计确定显著因子的最佳值

2.2.1 Box-Behnken 设计

由单因素实验确定实验因素中心点,利用统计软件 Design-Expert,对表中3因素的实验数据运行15次的响应面分析实验。自变量碳氮比、铜离子(mmol/L)和 pH 值,分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 代表, $x_1 = (X_1 - 4)/1$, $x_2 = (X_2 - 0.1)/0.025$, $x_3 = (X_3 - 5.5)/0.5$,各因素编码水平设计见表3。

表3 Box-Behnken 实验设计因素与水平

Tab.3 Box-Behnken experimental design factors and levels

项目	水平		
	-1	0	1
X_1 碳氮比	3:1	4:1	5:1
X_2 铜离子/(mmol·L ⁻¹)	0.075	0.1	0.125
X_3 pH 值	5	5.5	6

2.2.2 二次回归模型拟合及方差分析

通过 Design-Expert 统计软件对实验数据进行二次响应面回归分析,建立二次回归方程,根据回归模型寻求培养基因子水平的最优值,结果见表4、5。

表4 响应面 Box-Behnken 设计和实验结果

Tab.4 Box-Behnken response surface design and test results

实验号	X_1 碳氮比	X_2 铜离子/ (mmol·L ⁻¹)	X_3 pH 值	漆酶活力/ (U·mL ⁻¹)
1	0	-1	1	302
2	0	1	-1	332
3	-1	0	1	333
4	1	-1	0	358
5	0	0	0	448
6	0	-1	-1	321
7	1	0	1	373
8	0	0	0	446
9	0	0	0	446
10	1	1	0	365
11	0	1	1	335
12	1	0	-1	349
13	-1	1	0	362
14	-1	0	-1	392
15	-1	-1	0	348

由表4、5可知, X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对黄多孔菌产酶量都有极显著的影响($p < 0.01$), C 也有影响($p < 0.05$)。利用 Design-Expert 回归拟合实验数据,得到酶活对碳氮比(X_1)、铜离子浓度(X_2)及 pH 值(X_3)的三元二次回归方程:

表5 回归方程中回归系数的估计值

Tab.5 Regression equation estimated value of regression coefficient

模型项	参考估计	标准误差
常数项	447.00	2.31
X_1	1.25	1.83
X_2	8.13	1.83
X_3	-6.38	1.83
X_1^2	-1.75	2.59
X_2^2	20.75	2.59
X_3^2	5.50	2.59
X_1X_2	-24.75	2.52
X_1X_3	-64.00	2.52
X_2X_3	-60.50	2.52

酶活 = $447.00 + 1.25X_1 + 8.13X_2 - 6.38X_3 - 1.75X_1X_2 + 20.75X_1X_3 + 5.50X_2X_3 - 24.75X_1^2 - 64.00X_2^2 - 60.50X_3^2$ 。

表6示出 Box-Behnken 实验分析结果。回归方程方差分析表明 $p = 0.095 > 0.05$,又有该模型决定系数 $R^2 = 0.9955 > 0.9$,说明预测值与实测值之间相关性较高,因此可用该回归方程代替实验真实点对黄多孔菌发酵产漆酶进行分析和预测。

表6 Box-Behnken 实验分析

Tab.6 Box-Behnken experimental analysis

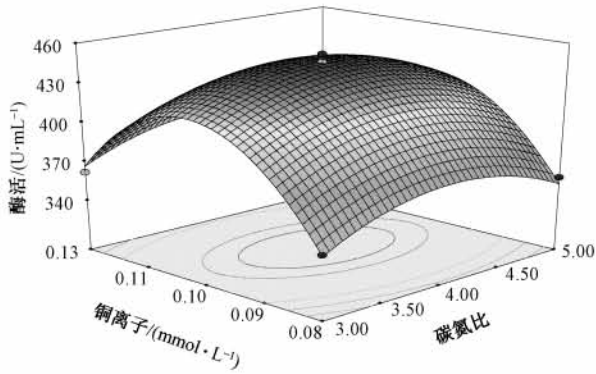
来源	平方和	自由度 df	均方	F	P
模型	41 437.81	9	4 604.20	172.12	<0.000 1
X_1	12.50	1	12.50	0.47	0.516 2
X_2	528.13	1	528.13	19.74	0.003 0
X_3	325.13	1	325.13	12.15	0.010 2
X_1X_2	12.25	1	12.25	0.46	0.520 3
X_1X_3	1 722.25	1	1 722.25	64.38	<0.000 1
X_2X_3	121.00	1	121.00	4.52	0.071 0
X_1^2	2 579.21	1	2 579.21	96.42	<0.000 1
X_2^2	17 246.32	1	17 246.32	644.72	<0.000 1
X_3^2	15 411.58	1	15 411.58	576.13	<0.000 1
误差	187.25	7	26.75		
失拟	143.25	3	47.75	4.34	0.095 0
纯误差	44.00	4	11.00		
合计	41 625.06	16			

对回归方程求一阶偏导数可得模型的极值点,分别为 $X_1 = 0.003 0$,碳氮比为 4.003 0:1, $X_2 = 0.061 0$,铜离子浓度为 0.101 5 mmol/L, $X_3 = -0.049 0$,pH 值为 5.4755。其相对应的响应值为 447.408 U/mL。考虑到实际操作的可行性,将黄多孔菌发酵培养基的成分在理论值基础上修正为:碳氮比为 4:1,铜离子浓度为 0.1 mmol/L,pH 值为 5.5。在上述条件下对模型预测值进行实验验证,漆酶活力为 446 U/mL,实验值与理论值误差在 5% 之

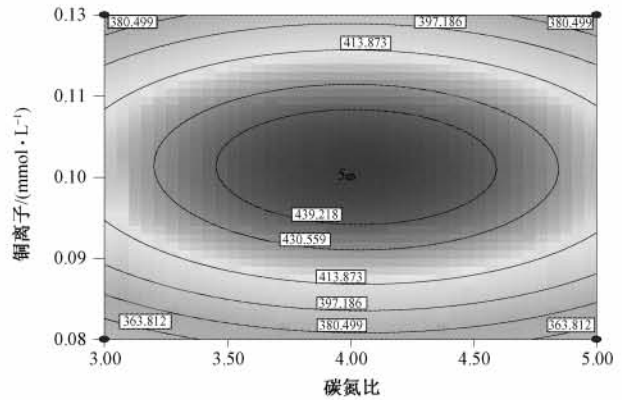
内,属正常范围,可见模型可以较好地预测实际酶活情况。

根据回归方程利用 Design-Expert 绘出响应面分析图^[10],见图 1~3。可以看出,碳氮比、铜离子浓度及 pH 值与漆酶活力存在显著相关性。其中

铜离子浓度对漆酶活力影响最为显著。由等高线图可以看出,碳氮比与铜离子浓度、铜离子浓度与 pH 值的等值线图呈椭圆形,交互作用显著,而碳氮比与铜离子浓度的等值线图接近圆形,交互作用不显著。



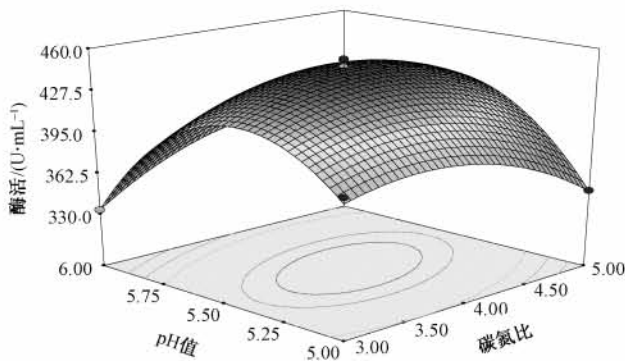
(a) 响应分析图



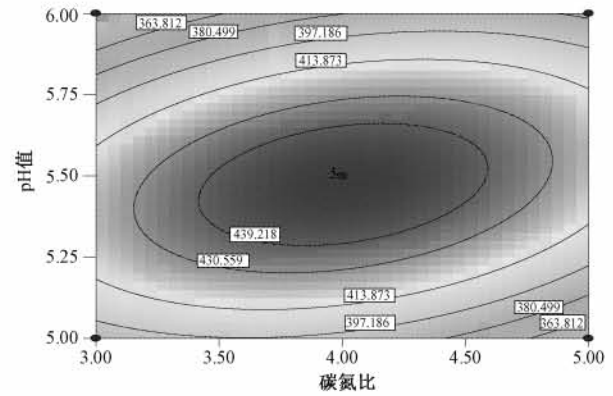
(b) 等高线图

图 1 碳氮比与铜离子对酶活的响应面分析图与等高线图

Fig. 1 Carbon/nitrogen ratio and copper ions on laccase activity of response surface analysis map (a) and contour map (b)



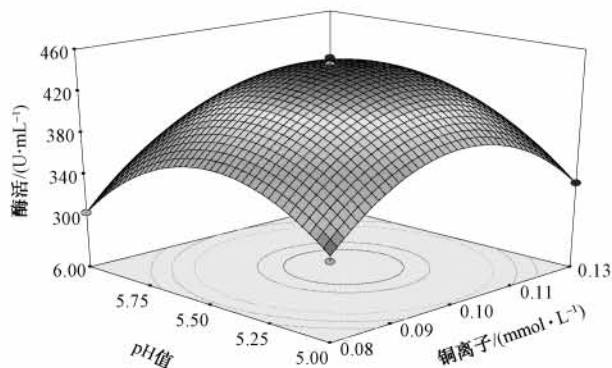
(a) 响应分析图



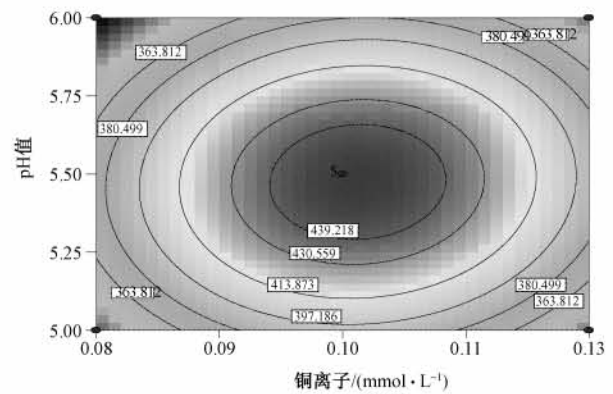
(b) 等高线图

图 2 碳氮比与 pH 对酶活的响应面分析图与等高线图

Fig. 2 Carbon/nitrogen ratio and pH on laccase activity of response surface analysis map (a) and contour map (b)



(a) 响应分析图



(b) 等高线图

图 3 铜离子与 pH 值对酶活的响应面分析图与等高线图

Fig. 3 Copper ions and pH on laccase activity of response surface analysis map (a) and contour map (b)

3 结 论

通过 Plackett-Burman 实验设计筛选出影响黄多孔菌产漆酶的重要因素有碳氮比、铜离子浓度和 pH 值。利用 Design-Expert 软件进行响应面回归分析,确定黄多孔菌产漆酶的最佳培养基配方:碳氮比、铜离子浓度和 pH 值分别为 4.003 0:1、0.101 5 mmol/L、5.475 5 时,可得到最大酶活预测值为 447.408 U/mL,在此条件下对实验结果进行验证,所得酶活 446 U/mL 与理论预测值基本吻合。

FZXB

参考文献:

- [1] KOROLIVA OV, STEPANOVA EV, GAVRILOVA VP, et al. Laccase of *Coriolus zonatus*: isolation, purification, and some physicochemical properties [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1999, 76(2): 115 - 127.
- [2] PPIONTEK K, ANTORINI M, CHOINOWSKI T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 37663 - 37669.
- [3] RANSBARGER D, XU F. Activation of laccase by penicillin and derivatives [J]. Process Biochem, 2006, 41: 2082 - 2086.
- [4] COUTO SR, TOCA-HERRERA JL. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi [J]. Biotechnol Adv, 2007, 25: 558 - 569.
- [5] SUSANA RC, JOSÉ LTH. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review [J]. Biotechnol Adv, 2006, 24: 500 - 513.
- [6] GHINDILIS A. Direct electron transfer catalysed by enzymes: application for biosensor development [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 84 - 89.
- [7] GNANAMANI A, JAYAPRAKASHVEL M, ARULMANI M, et al. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes [J]. Enzyme Microbiol Tech, 2006, 38: 1017 - 1021.
- [8] 欧宏宇,贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用 [J]. 天津轻工业学院学报, 2001(1): 14 - 27.
- OU Hongyu, JIA Shiru. The application of SAS system in optimization of microbial culture conditions [J]. Journal of Tianjin University of Light Industry, 2001(1): 14 - 27.
- [9] 邓祖新. SAS 系统和数据分析 [M]. 北京:电子工业出版社, 2002.
- DENG Zuxin. SAS system and Data Analysis [M]. Beijing: Electronic Industry Press, 2002.
- [10] 凌秀梅,邱树毅,胡鹏刚,等. 响应面法优化从啤酒废酵母中提取谷胱甘肽工艺条件 [J]. 中国酿造, 2007, 172(7): 35 - 38.
- LING Xiumei, QIU Shuyi, HU Penggang, et al. Optimization of extraction technique of GSH from waste beer yeast via response [J]. Chinabrewing, 2007, 172(7): 35 - 38.