

表面响应法优化黑曲霉过氧化氢酶的发酵工艺*

刘建忠^{1**} 翁丽萍^{1,2} 计亮年^{1,2**}

(中山大学基因工程教育部重点实验室 广州 510275)¹ (中山大学化学系 广州 510275)²

摘要: 采用表面响应法(response surface methodology)研究了黑曲霉发酵过氧化氢酶过程的搅拌与通风条件的优化,获得了1个二次模型用于描述搅拌与通风对产过氧化氢酶的影响。当搅拌与通风量分别为691 r/min、1.3 L·L⁻¹·min⁻¹时,黑曲霉产过氧化氢酶水平最高。

关键词: 过氧化氢酶, 黑曲霉, 优化, 表面响应法

中图分类号: Q558 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0017-05

OPTIMIZATION OF BIOPROCESS OF CATALASE PRODUCTION BY *ASPERGILLUS NIGER* USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

LIU Jian-Zhong¹ WENG Li-Ping^{1,2} JI Liang-Nian^{1,2}

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Zhongshan University, Guangzhou 510275)¹

(Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275)²

Abstract: Response surface methodology is the most widely used statistical technique for bioprocess optimization. It has been successfully employed for optimizing the medium ingredients and operation conditions in many fermentations. The interaction among the possible influencing parameters can be evaluated with limited number of experiments by using response surface methodology. Response surface methodology was applied to optimize the speed of agitation and the rate of aeration for the maximum production of catalase by *Aspergillus niger*. A 2² central composite design using response surface methodology was employed in this investigation. A quadratic model for catalase production was obtained. The maximum level of catalase was achieved when the speed of agitation and the rate of aeration were 691 r/min and 1.3 L·L⁻¹·min⁻¹.

Key words: Catalase, *Aspergillus niger*, Optimization, Response surface methodology

过氧化氢酶 (CAT, EC 1.11.1.6, H₂O₂: H₂O₂ 氧化还原酶) 既能有效地催化过氧化

* 广东省自然科学基金 (No. 001278)

高等学校重点实验室访问学者基金资助项目

** 联系人 Tel: 020-84110115, E-mail: lssljz@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-05-14, 修回日期: 2001-07-02

氢的分解又能在 H_2O_2 作用下氧化醇类、烷基过氧化物和甲酸等化合物。在葡萄糖酸及其盐制备过程中, 过氧化氢酶能及时分解葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖所产生的 H_2O_2 ; 利用 H_2O_2 作为杀菌时, 因 H_2O_2 有毒不能残留在食物中, 必须利用过氧化氢酶将 H_2O_2 充分分解; 在食品保藏中利用葡萄糖氧化酶去除食品中残留的葡萄糖或氧时, 生成的过氧化氢用过氧化氢酶分解, 分解时产生的氧有杀菌和漂白作用; 在纺织工业, 利用过氧化氢酶分解过氧化氢产生氧, 用来漂白, 同时也可杀菌。因此, 过氧化氢酶广泛应用于食品和化学工业。工业上过氧化氢酶主要来源于动物肝脏、植物、霉菌和细菌。

许多学者进行了过氧化氢酶发酵的培养条件的优化研究^[1-5], 但在这些研究中, 过氧化氢酶基本上都是以葡萄糖氧化酶发酵的副产物的形式出现的, 而真正以过氧化氢酶为主要产物的发酵过程研究却较少, 而且所使用的优化法都是传统的“定时单因子法”(one-factor-at-a-time), 即在其它因子不变下, 考察一个因子对发酵的影响, 该法费时、实验次数多而且无法评估各个因子之间对发酵的相互影响^[6]。近年来在生物过程的优化研究中, 通常采用一种叫“表面响应法”(Response surface methodology, RSM)的优化法。RSM法能够在有限的实验次数下, 除探讨出每个因子对发酵的影响, 还能评估各个因子之间相互对发酵的影响^[7]。RSM法已成功应用于许多发酵过程的优化^[6-8], 但在国内至今未见有利用RSM法进行发酵过程优化的报道。

以前我们研究了黑曲霉同步摇床发酵生产葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶^[4,5,9], 为此, 我们以过氧化氢酶为主要产物, 利用RSM法进行了黑曲霉发酵过程的搅拌与通风条件的优化研究。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养条件

1.1.1 培养基: 参阅文献 [5]。

1.1.2 培养条件: 黑曲霉 ZBY-7^[4,5,9] 斜面菌种接入灭菌后的种子培养基中, 于 30℃、250 r/min 下摇床培养 24 h; 按 10% 接种量将种子液接入灭菌后的 5 L 玻璃发酵罐 (B. Braun Biostat B 5), 发酵罐装液量为 4 L。发酵条件为: 32℃、通风和搅拌按实验设计方案进行设定、必要时用花生油进行消泡。

1.2 分析方法

在发酵 12 h 时取样, 过滤并用蒸馏水洗涤, 收集菌体, 用电动玻璃匀浆器进行细胞破碎, 细胞破碎液在 4,000 g、4℃ 下离心 10 min, 取上清液供过氧化氢酶活力测定。过氧化氢酶活力采用紫外分光光度法进行测定^[5,9]。菌体干质测定见文献 [5]。残糖测定采用碘量法^[5]。

文中所有数据都是 2 次取样, 分别测定的平均值。

1.3 实验设计

中心交叉设计 (central composite design, CCD) 通常应用于生物过程优化的实验设计, 本研究中利用 Design Expert 软件 (Version 6.0.2 trial, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) 进行实验方案的设计、结果的回归和优化。

根据中心交叉设计法, 总的实验次数为 $2^k + 2K + n_0$, 式中 K 为考察的独立因子数, 这里为 2; n_0 为中心点的重复实验次数, 这里为 5; $2K$ 为轴点 (axial points) 的实

验次数 ($\alpha = 2^{1/2}$)。

本研究中要考察的因子为通气量和搅拌转速两个因子, 因此采用 2^2 CCD 方案, 该方案含有 13 组实验, 具体的实验方案见表 1。

表 1 中心交叉实验设计方案及实验结果

序号	搅拌转速		通气量		过氧化氢酶, U·mL ⁻¹			预测值
	X_1	编码	X_2	编码	实验值	Set1	Set2	
	r/min	x_1	L·L ⁻¹ ·min ⁻¹	x_2	平均值			
1	700	0	1.7	1.41	95.24	92.60	93.92	100.79
2	740	1	1.0	-1	135.68	126.99	131.34	117.69
3	700	0	1.3	0	165.05	170.95	168.00	168.27
4	756	1.41	1.3	0	100.85	106.91	103.88	114.80
5	700	0	1.3	0	172.15	164.45	168.30	168.27
6	700	0	1.3	0	166.58	178.72	172.65	168.27
7	660	-1	1.0	-1	137.14	127.08	132.11	118.65
8	644	-1.41	1.3	0	125.10	135.00	130.05	140.70
9	700	0	0.9	-1.41	94.27	90.83	92.55	107.25
10	700	0	1.3	0	157.05	166.35	161.70	168.27
11	740	1	1.6	1	102.56	105.21	103.88	95.77
12	700	0	1.3	0	165.14	176.26	170.70	168.27
13	660	-1	1.6	1	133.83	144.86	139.34	131.42

各个变量按方程 (1) 进行编码:

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X} \quad i = 1, 2, 3 \dots j \quad (1)$$

式中: x_i ——变量 X_i 的编码值; X_0 ——变量 X_i 的中心点的值; ΔX ——变量 X_i 的变化间隔值。

各变量的具体编码为:

$$x_1 = (X_1 - 700)/40 \quad x_2 = (X_2 - 1.3)/0.3$$

下面的二次方程可用于描述各个变量对发酵的影响:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

式中: y ——预测的响应值 (过氧化氢酶的活力); β_0 ——常数; β_i ——一次常数; β_{ii} ——二次常数; β_{ij} ——交叉常数。

2 结果与讨论

实验结果及 RSM 法预测的结果见表 1。将实验结果根据方程 (2), 用 Design Expert 进行多次回归, 拟合出二次多元方程见方程 (3):

$$y = 168.27 - 9.15 x_1 - 2.29 x_2 - 20.26 x_1^2 - 32.13 x_2^2 - 8.67 x_1 x_2 \quad (3)$$

为了检验回归模型的显著性, 利用方差分析进行了 F 检验, 其结果见表 2。表中平均偏差平方和 (mean square) 为各自的总偏差平方和除以相应的自由度。 F 值则为来源于回归模型及离回

表 2 方差分析结果^a

变异来源	总偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F	$P > F$
回归	10020.36	5	2004.07	13.23	0.0019
离回归	1060.14	7	151.45		
总变异	11080.50	12			

a, 偏差系数 (CV) = 9.05%, 测定的复相关系数平方 (coefficient of determination) $R^2 = 0.9043$, 复相关系数 (R) = 0.9509

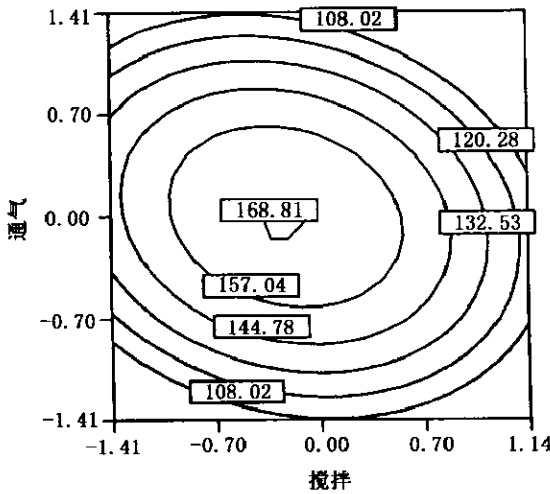


图1 中心交叉实验响应图

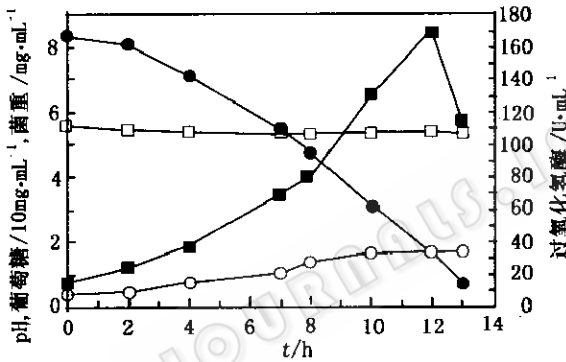


图2 在最优化搅拌与通风条件下黑曲霉发酵过氧化氢酶的各参数时间变化曲线

●—葡萄糖, ■—过氧化氢酶, □—pH, ○—菌重
所有数据均为2批发酵的平均值

利用 Design Expert 软件对回归模型及表面响应图进行发酵产过氧化氢酶最大化, 得到搅拌与通气的编码值分别为 -0.23、0, 对应的搅拌转速和气液比分别为 691 r/min、1.3 L·L⁻¹·min⁻¹时, 黑曲霉产过氧化氢酶水平最高。结果与 Petruccioli M 等报道的青霉菌同时发酵生产过氧化氢酶与葡萄糖氧化酶结果相似, 他们研究发现在 3 L 台式搅拌发酵罐中, 搅拌转速 300~900 r/min 间, 转速 400 r/min 时过氧化氢酶发酵水平最高^[2]。图 2 为在最佳搅拌与通风条件下, 黑曲霉发酵生产过氧化氢酶的各参数的时间变化曲线。从图 2 可知, 发酵约 12 h 时, 产过氧化氢酶水平最高, 达 169.39U·mL⁻¹, 该值非常接近模型预测值 (169.31 U·mL⁻¹)。

参考文献

[1] Caridis K A, Christakopoulos P, Maeris B J. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 34: 794 ~ 797.
 [2] Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P, et al. Enzyme Microb Technol, 1995, 17: 336 ~ 339.

归的平均偏差平方和的比值。查 F 分布表可知, $F_{0.95}(5, 7) = 3.97$, 回归模型的 F 值 (13.23) 远远大于查表得 $F_{0.95}(5, 7)$, 因此, 该模型在 5% 水平上是显著的。

复相关系数 R 越接近 1, 说明模型的预测值与实验值的相关性就越好。这里 $R = 0.9509$, 说明模型能够很好地描述实验结果。测定复相关系数平方 R^2 为 0.9043, 说明最多只有约 10% 的变化不能用此模型来解释。偏差系数 (coefficient of variation, CV) 表示实验精确度。CV 越大, 实验的可靠性就越低。这里 $CV = 9.05\%$, 其值是较低的, 说明实验操作可信。

表面响应图 (response surface plot) 能够预测检测变量的响应值和确定变量相互作用的形式。若为圆形等高线, 则说明变量间的相互作用可忽略; 若为椭圆或马鞍形, 则变量间的相互作用对考察目标是非常明显的。图 1 为搅拌和通气对过氧化氢酶发酵的表面响应图。从图 1 可看出, 等高线是近似圆形的椭圆, 因此搅拌与通气对黑曲霉发酵过氧化氢酶存在相互交叉的影响, 但影响程度较弱。

- [3] Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash M H, *et al.* *Process Biochem*, 1999, **34**: 187 ~ 191.
- [4] 刘建忠, 杨惠英, 赵继伦, 等. *中山大学学报*, 1998, **37** (1): 68 ~ 72.
- [5] Liu J Z, Huang Y Y, Liu J, *et al.* *Lett Appl Microbiol*, 2001, **32**: 16 ~ 19.
- [6] Sen R, Swaminathan T. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**: 358 ~ 363.
- [7] Sunitha K, Lee J K, Oh T K. *Bioprocess Eng*, 1999, **21**: 477 ~ 481.
- [8] Kapat A, Jung J K, Park Y H, *et al.* *Bioprocess Eng*, 1998, **18**: 978 ~ 984.
- [9] Liu J Z, Yang H Y, Weng L P, *et al.* *Lett Appl Microbiol*, 1999, **29**: 337 ~ 341.