

均匀设计法优化烟管菌产漆酶培养基

王剑锋^{1,2} 李江¹ 王璋^{2*}

(东华理工大学生物系 抚州 344000) (中国食品发酵工业研究院 北京 100027)

摘要 应用均匀设计、二次多项式逐步回归分析对烟管菌(*Bjerkandera adusta*) WZFF.W-Y11 产漆酶液态发酵培养基进行优化。结果表明 培养基组成为麸皮水解液 1%、淀粉 24.0 g/L、葡萄糖 24.0 g/L、豆饼粉 4.8 g/L、 NH_4Cl 3.2g/L、 KH_2PO_4 3.2 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g/L, 起始 pH6.5, 在 28℃、150r/min、250mL 的摇瓶培养条件下可以稳定地获得 9672U/L 的漆酶活力。

关键词 烟管菌 漆酶 均匀设计 培养基优化

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0625-04

Optimization of Culture Medium for Laccase Production from *Bjerkandera adusta* by Uniform Design

WANG Jian-Feng^{1,2} LI Jiang¹ WANG Zhang^{2*}

(Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000)

(China national Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027)

Abstract Both uniform design and stepwise regression were employed in this study to optimize culture medium for laccase production from *Bjerkandera adusta* WZFF.W-Y11. The optimal fermentation parameters of *B. adusta* WZFF.W-Y11 in shaking flask were as follows: starch 24.0g/L, glucose 24.0g/L, bean cake powder 4.8g/L, NH_4Cl 3.2g/L, KH_2PO_4 3.2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g/L, hydrolysate from wheat bran 1%, initial pH6.5, rotating speed 150 r/min, culture temperature 30℃. The activity of laccase reached 9672 U/L.

Key words *Bjerkandera adusta*, Laccase, Uniform design, Culture medium optimization

漆酶(EC.1.10.3.2)与木素过氧化物酶、锰过氧化物酶同属于木质素降解酶类^[1],能催化 6 大类 250 多种物质发生自由基介导的羟化、歧化、聚合等反应,同时分子氧被还原为水^[2];特别是能有效降解环境污染物如 DDT、林丹、二恶英、多氯联苯、苯并芘、菲、杂酚油等^[3,4]。在生物制浆、生物漂白、环境修复、绿色有机合成、食品加工等领域,漆酶以具有广泛的应用价值而日益受到重视。

实验菌株 WZFF.W-Y11 是从野外采集分离筛选到的一株漆酶高产菌株,其产酶优于杂色云芝(*Coriolus versicolor*)、粗毛栓菌(*Trametes gallica*)等常见菌种^[5],经鉴定属于烟管菌(*Bjerkandera adusta*),在国内外极少见到烟管菌产漆酶的研究报道。在液体培养条件下,烟管菌 WZFF.W-Y11 的漆酶合成与分泌受到多种营养因子的显著影响^[6],只有综合考察各影响因素才能充分发挥其产酶性能;方开

泰、王元首创的均匀设计相比于正交设计,在处理多因子、多水平的实验设计问题时,具有试验次数少、布点更均匀等特点,能够快速有效地实现寻优,该法已在工业生产和科研中得到了大量而有效的应用^[7]。文中用 DPS 数据处理软件统计分析,采用均匀设计法对影响烟管菌漆酶发酵的 6 个因素进行了多水平实验,结合二次多项式逐步回归分析对烟管菌产漆酶液体发酵培养基进行了优化研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

烟管菌(*Bjerkandera adusta*) WZFF.W-Y11,分离自杨树枯木。

1.2 培养基

菌种保藏培养基:PDA 培养基

种子培养基:玉米粉 15.0 g、葡萄糖 20.0 g、豆

* 通讯作者 Tel 010-64647557, E-mail: wangz0909@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-20, 修回日期:2007-04-03

饼粉 2.0 g、 KH_2PO_4 1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、水 1000mL pH 自然。

产酶培养基:葡萄糖-淀粉(1/1)、氯化铵-豆饼粉(2/3)、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CuSO_4 的质量浓度(g/L)和 pH 按照均匀设计实验安排表添加,麸皮水解液 1%(以干麸皮质量计)。

1.3 菌体培养

取约 3mm × 3mm × 3mm 的斜面菌种接入有 100mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中,28℃、150 r/min 培养 4d。在 50mL 产酶培养基的 250mL 三角瓶内接入种子液 5 mL,28℃、150 r/min 培养 5d,取样测发酵液漆酶活力。每种培养条件进行 4 个平行试验。

1.4 漆酶活力测定

取发酵液 10mL 在低温 3000r/min 离心 10min,上清液为粗酶液,活力测定方法根据 Coll 等人^[8]进行改进,主要操作如下:在含有 1.0mmol/L 愈创木酚的 4mL、50mmol/L 琥珀酸缓冲液(pH4.5)中加入 1mL 经适当稀释的粗酶液,混匀,置 30℃ 反应 30min,然后立即在波长 465nm 处比色,以煮沸热灭活粗酶液加入上述含愈创木酚的琥珀酸缓冲液作为空白对照;一个酶活单位(U)定义为 1min 内氧化 1 μmol 愈创木酚所需要的酶量,已知 465nm 处愈创木酚的摩尔消光系数 $\epsilon_{465} = 1.21 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[9]。

1.5 实验设计与数据分析

利用软件 DPS v3.01 专业版的试验设计功能,以中心化偏差为均匀性度量指标,经过计算机多次运行寻优确定多因素多(水平)处理的均匀设计方案,利用软件的多元分析功能进行实验数据分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 WZFF. W-Y11 的子实体形态特征与分类鉴定

子实体无柄、背着生平伏生长,多个生长在一起呈覆瓦状,鲜时伸展扁平,边缘渐薄近白色,反卷呈贝壳状,横径 58mm,纵径 29mm,厚 2mm;菌盖正面灰白色,被细绒毛不消失,有细微皱缩,同心环纹较明显;菌肉白色软革质,遇氢氧化钾溶液变为褐色,干后白色硬而韧,厚 1~2mm;菌盖反面(菌管面)灰褐色,菌管一层,近边缘极短,至边缘无,中心渐长至 1mm,与菌肉界线清晰,管口多角形、灰褐

色、不破裂且 4 个/1mm。菌丝系统一体型,生殖菌丝细胞壁较厚而透明,分枝少,直径 3~4 μm ,具有锁状联合。孢子印形状不规则,白色渐淡黄色,孢子(图 1)椭圆形,基部有锐突,无色光滑,5 μm × 3 μm 。

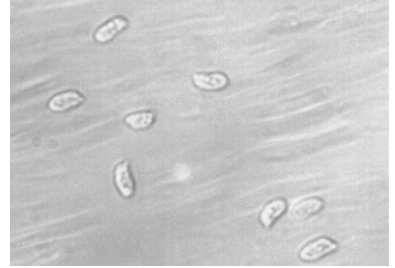


图 1 菌株 WZFF. W-Y11 的孢子(40 × 10)

根据上述菌体子实体和孢子形态结构的观察结果,检索《中国真菌志》第三卷多孔菌科^[10]分类检索表、对比属种描述及相关模式菌株图样,结果显示,菌株 WZFF. W-Y11 为烟管菌(也称黑管菌属的烟管菌,也称黑管菌) *Bjerkandera adusta*。

2.2 发酵产酶培养基优化

2.2.1 第一次均匀设计试验 综合考虑制约烟管菌漆酶发酵的各影响因子^[6],以葡萄糖-淀粉、氯化铵-豆饼粉、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 CuSO_4 的浓度和起始 pH 为重点考察对象,在 50mL/250mL、28℃、150r/min 的培养条件下,采用计算机多次运行寻优获得的 6 因素 18(水平)处理的均匀设计方案进行实验。结果(表 1)表明,在各因素的不同水平组合中 N16 的产酶活力最高达到 6273U/L, N4 的产酶活力居中为 2853U/L, N13 的产酶活力最低只有 91U/L。

2.2.2 试验数据的回归分析和回归方程的验证与优化:各因素的水平值为自变量、发酵活力为响应值,利用 DPS 数据处理系统对表 1 试验数据进行二次多项式逐步回归分析,建立回归方程并进行了显著性检验和极大值求解(表 2)。结果显示,不同相关系数对应不同回归方程,各方程都很好地拟和已有试验数据,方程的显著性水平均小于 0.01。

不同相关系数的回归方程对最高酶活的预测值相差很大。为建立真实可靠的回归方程,获得有效的优化培养基,依据求解各方程得出的最高酶活时各因素的组合以及表 1 中显示高酶活水平的组合 N13、N16 和 N4 进行了验证试验。通过对其产酶活力进行 *t*-检验分析($\alpha = 0.05$),发现同种组合的漆酶发酵活力在不同批次间不存在显著性差异,说明

表 1 产酶发酵培养基的均匀设计试验方案及实验结果

因素水平	X ₁ 碳源 (g/L)	X ₂ 氮源 (g/L)	X ₃ KH ₂ PO ₄ (g/L)	X ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	X ₅ CuSO ₄ (g/L)	X ₆ pH	Y 酶活 (U/L)
N1	25.0	1.0	1.0	1.6	0.001	4.0	2421
N2	30.0	1.0	0.4	1.2	0.008	5.5	2835
N3	20.0	1.5	2.8	1.8	0.006	6.0	4554
N4	20.0	2.0	1.3	0.2	0.009	5.0	2835
N5	40.0	1.5	1.9	0.4	0.002	6.0	3488
N6	35.0	2.5	2.8	0.4	0.004	4.0	3777
N7	45.0	3.5	1.0	0.2	0.006	6.0	5033
N8	50.0	3.5	2.5	1.4	0.002	5.0	2826
N9	35.0	4.5	1.3	1.8	0.005	5.5	4496
N10	40.0	3.0	2.2	1.6	0.009	4.5	3669
N11	10.0	0.5	2.2	0.6	0.005	5.0	248
N12	50.0	2.0	0.7	0.8	0.007	4.5	2769
N13	45.0	0.5	1.6	1.0	0.004	6.5	91
N14	10.0	2.5	0.7	1.4	0.003	6.5	1008
N15	15.0	3.0	1.9	1.0	0.001	5.5	777
N16	30.0	4.5	2.5	0.8	0.008	6.5	6273
N17	15.0	4.0	1.6	1.2	0.007	4.0	1091
N18	25.0	4.0	0.4	0.6	0.003	4.5	1802

了该均匀试验设计方法的有效性。因此利用该方法 ,应用验证试验中各组合发酵酶活的实测值对各

表 2 均匀设计回归方程的统计检验和极大值

回归方程	相关系数	显著水平	最高酶活时各个因素的组合				预测值		
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃	<i>X</i> ₄	<i>X</i> ₅	<i>X</i> ₆	<i>Y</i>
1	0.89075	0.0009	40.0	4.5	2.1	1.8	0.009	6.5	7273
2	0.90942	0.0037	28.0	4.5	1.8	0.2	0.009	6.5	10991
3	0.91911	0.0007	46.0	4.5	0.8	0.2	0.008	5.0	7355
4	0.93186	0.0003	45.0	4.5	2.8	0.2	0.009	6.5	8512
5	0.95158	0.0002	50.0	4.5	0.4	0.2	0.007	6.0	8136
6	0.97227	0.0016	26.7	2.1	0.4	1.8	0.009	6.5	14215
7	0.97301	0.0056	30.0	4.5	0.4	0.9	0.009	6.2	16529

$$Y = 0.0559 + 1.0166X_1 - 0.9718X_1^2 + 0.6625X_1X_2 - 0.1911X_1X_4 - 0.3033X_2X_6 + 0.2443X_3X_5$$

其中 , $F = 12.0931$, $P = 0.0003$, $S(\text{ 剩余标准差 }) = 0.09640$ 。

该方程显示 ,在烟管菌漆酶发酵过程中各影响因子间存在着复杂的相互作用 ;在正相关因子中碳源量的影响作用最大 ,其次为碳源和氮源的互作项 ,而碳源量的平方项为最大的负相关因子。因此

组合的发酵活力进行了区间预测估计 : $\bar{y} \pm t_{\alpha}S$, $\alpha = 0.10$,置信度 90% ,结果如图 2 所示 :回归方程相关系数取 0.93186 时 ,方程对漆酶活力的预测值高于相关系数分别为 0.89075、0.90942 和 0.91911 时的 ,并且相应的回归方程对最高酶活的预测值都没有超出实测区间 ,说明这些回归方程不仅能够很好地拟和实验数据 ,而且具有可靠的预测能力。而当回归方程的相关系数大于 0.93186 时 ,随其增大 ,虽然方程的表观预测值有所增加 ,但却逐渐远离实测区间 ,可见随着回归方程的过度拟和 ,方程的预测能力会下降。综合考虑拟和、预测和产酶最优 3 个方面 ,相关系数为 0.93186 的回归方程为优化的回归模型(数据经过标准化处理) :

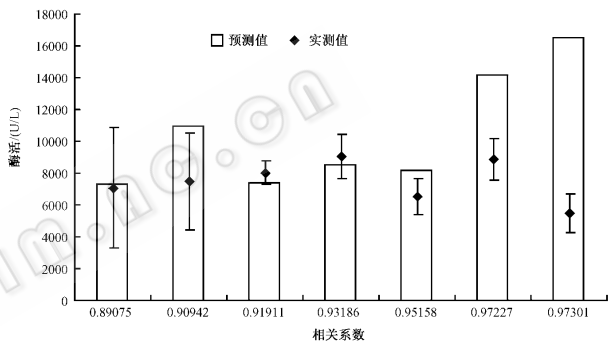


图 2 均匀设计回归方程预测能力的实验检验

适当增加氮源的量可能会提高漆酶的合成量。

由该模型得到的最适产酶培养基组成是 :淀粉 22.5g/L、葡萄糖 22.5g/L、豆饼粉 2.7g/L、NH₄Cl 1.8g/L、KH₂PO₄ 2.8g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2g/L、CuSO₄·5H₂O 0.009g/L、麸皮水解液 1% ,pH6.5。

经实验验证 ,在 28℃、150r/min、50mL/250mL 的摇瓶培养条件下可获得 8300U/L (RSD = 0.133) 的酶活力 ,实测值与预测值之间无显著性差异。

2.2.3 第二次均匀设计试验 考察第一次优化结果中各影响因素的最佳水平值,发现除碳源量接近考察范围的边界值外,其余 5 个影响因素的最佳水平值均为考察范围的边界值,因此,进一步扩大了各因素的取值范围,对产酶发酵培养基进行了 6 因素 13 水平的均匀设计优化(表 3)。

表 3 产酶发酵培养基的第二次均匀设计
试验方案及实验结果

因素 水平	X ₁ 碳源 (g/L)	X ₂ 氮源 (g/L)	X ₃ KH ₂ PO ₄ (g/L)	X ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)	X ₅ CuSO ₄ (g/L)	X ₆ pH	Y 酶活 (U/L)
N1	28.0	4.0	2.4	0.8	0.007	6.0	6198
N2	20.0	7.0	0	1.8	0.010	7.0	2996
N3	24.0	10.0	4.0	0.6	0.016	6.0	4236
N4	36.0	3.0	4.4	2.0	0.011	7.5	0
N5	56.0	13.0	4.8	1.2	0.009	7.5	5103
N6	48.0	8.0	3.2	0.2	0.006	6.5	10888
N7	40.0	12.0	0.8	0	0.012	6.5	9153
N8	68.0	2.0	1.6	0.4	0.013	6.5	8740
N9	32.0	14.0	2.0	1.4	0.014	6.0	6694
N10	60.0	6.0	3.6	1.6	0.015	7.0	9711
N11	52.0	5.0	0.4	1.0	0.017	7.0	9519
N12	44.0	9.0	2.8	2.4	0.018	8.0	7872
N13	64.0	11.0	1.2	2.2	0.008	8.0	7128

结果显示,N6 组合最有利于烟管菌 WZFF-W-Y11 发酵产酶。对 N6 组合经过 6 个批次的发酵实验验证,在该培养条件下烟管菌发酵产酶活力达到了 $9672 \pm 954\text{U/L}$ ($y \pm t_{\alpha}s, \alpha = 0.10$),比初次优化提高了 1370U/L。与第一次优化得到的产酶培养基相比较,在 N6 组合中除氮源量增加到 8g/L 外,其余组分的量接近或等于初次优化培养基中各组分的含量,说明高 N/C 比值的富氮培养基有利于烟管菌漆酶的合成,这与多数菌株需要富氮培养才能获得较高的漆酶活力的结论一致^[11,12],也与优化的回归方程的预期相符。

综上所述,烟管菌产漆酶的最适培养基组成是:淀粉 24.0g/L、葡萄糖 24.0g/L、豆饼粉 4.8g/L、

NH₄Cl 3.2g/L、KH₂PO₄ 3.2g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、CuSO₄·5H₂O 0.006 g/L、麸皮水解液 1%,起始 pH6.5,发酵产酶活力可以达到 $9\,672 \pm 954\text{U/L}$ ($y \pm t_{\alpha}s, \alpha = 0.10$)。

3 结论

对均匀设计的实验数据进行二次多项式逐步回归分析时,回归模型的预测能力并不随着方程相关系数的增大而提高,只有选择合适的相关系数,才能得到真实可靠的回归模型。经过两次均匀设计优化,烟管菌产漆酶的最适发酵培养基组成是:淀粉 24.0g/L、葡萄糖 24.0g/L、豆饼粉 4.8g/L、NH₄Cl 3.2g/L、KH₂PO₄ 3.2g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、CuSO₄·5H₂O 0.006 g/L、麸皮水解液 1%,起始 pH6.5,在 28℃、150r/min、250mL 的摇瓶培养条件下培养 5d 可稳定获得 $9672 \pm 954\text{U/L}$ ($y \pm t_{\alpha}s, \alpha = 0.10$)的漆酶活力,同时,培养基中 N/C 的提高有利于烟管菌漆酶的合成。

参考文献

[1] Ten Have R, Teunissen P J M. Chem Rev 2001, **101**: 3397 ~ 3413.
[2] 季立才, 胡培植. 林产化学与工业, 1997, **17**(1): 79 ~ 84.
[3] E Rodríguez, O Nuero, F, Guillén, A. T. Martínez, et al. Soil Biology & Biochemistry, 2004, **36**: 909 ~ 916.
[4] Takao Saito, Katsuya Kato, Yoshiyuki Yokogawa, et al. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, **98**(1): 64 ~ 66.
[5] 谢 君, 孙 迅, 任 路, 等. 高技术通讯, 2001, **8**: 11 ~ 16.
[6] 王剑锋, 苏国成, 刘建玲, 等. 食品与发酵工业, 2006, **32**(2): 20 ~ 24.
[7] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002.
[8] Coll PM, Fernandez-Abalos JM, Villanueva JR, et al. Appl Environ Microbiol, 1993, **59**(8): 2607 ~ 2613.
[9] 吴 坤, 朱显峰, 张世敏, 等. 菌物系统, 2001, **20**(2): 207 ~ 213.
[10] 赵继鼎. 中国真菌志(多孔菌科, 第三卷). 北京: 科学出版社, 1998.
[11] Herpoel I, Moukha S, Lesage-Messen L, et al. FEMS Microbol, 2000, **183**: 301 ~ 306.
[12] 肖亚中, 张 敏, 吴 涓, 等. 生物工程学报, 2001, **117**(5): 579 ~ 583.