

# 均匀设计优化葡萄糖氧化酶发酵培养基

谭莹, 童群义\*

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 为了提高黑曲霉发酵生产葡萄糖氧化酶的产率, 采用单因素实验考察碳源和氮源的种类对产酶的影响, 然后采用均匀设计对发酵培养基的碳源、氮源、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCO}_3$  的浓度水平进行考察, 实验数据进行二次多项式逐步回归模型分析。结果显示, 葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  对产酶影响效果显著; 发酵培养基的最佳组成为: 葡萄糖 16.24%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.12%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.57%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.63%、 $\text{CaCO}_3$  5.69%。

**关键词:** 黑曲霉, 葡萄糖氧化酶, 发酵, 均匀设计

## Optimization of fermentation medium of glucose oxidase by uniform design methodology

TAN Ying, TONG Qun-yi\*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In order to improve the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*, the effect of carbon source and nitrogen source of fermentation medium were explored in single factor experiments and the concentration level of carbon source, nitrogen source,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaCO}_3$  were studied through uniform design methodology. The results indicated that: glucose and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  of enzyme effect was remarkable. The optimum fermentation medium for production of glucose oxidase was composed of glucose of 16.24%,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  of 0.12%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  of 0.57%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  of 0.63%,  $\text{CaCO}_3$  of 5.69%.

**Key words:** *Aspergillus niger*; glucose oxidase; fermentation; uniform design methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)06-0233-03

葡萄糖氧化酶, 是一种用途广泛的食物添加剂, 可以加入到面团中利用葡萄糖氧化酶氧化蛋白质的巯基产生的二硫键来改善面团的烘焙性质; 还可以制备低酒精度的啤酒和红酒等; 以及用于包装食品中的脱氧; 制备生物传感器快速检测血糖含量; 工业上还能够用来生产葡萄糖酸等<sup>[1]</sup>。另外, 纺织业中还利用葡萄糖氧化酶生成的过氧化氢进行漂白<sup>[1]</sup>。目前, 葡萄糖氧化酶的制备方法中以微生物发酵法使用最为广泛。常用的制备葡萄糖氧化酶的菌株有黑曲霉和青霉菌。均匀设计是一种适用于多水平的多因素实验设计方法, 其优点是不考虑整齐可比性, 并且能够完全保证均匀性, 让实验点在实验范围内充分的均匀分散, 这样不仅可以大大减少实验点, 且仍能得到反映实验体系主要特征的实验结果<sup>[2]</sup>。近年来利用均匀设计对培养基的优化已经取得了一些成绩<sup>[3-6]</sup>。本实验拟采用单因素和均匀设计对培养基进行优化, 以期生产出高酶活的葡萄糖氧化酶。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) M2632 由本实验室筛选保藏。

立式压力蒸汽灭菌器 上海华线医用核子仪器有限公司; 迴转式恒温调速摇瓶柜 上海欣蕊自动化设备有限公司; UV-2100 型紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; 低速大容量多管离心机 无锡市瑞江分析仪器有限公司; 恒温水浴锅 巩义市予华仪器有限责任公司。

### 1.2 培养基及培养方法

斜面培养基: PDA 培养基, 115℃ 灭菌 20min, 28℃ 培养 72h。

种子培养基: 葡萄糖 5%、KCl 0.002%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0015%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0012%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.006%、酵母膏 0.03%、蛋白胨 0.02%, 自然 pH, 121℃ 灭菌 15min; 将斜面培养基保藏的菌种接入种子培养基中, 28℃ 培养 20h<sup>[7]</sup>。

发酵基础培养基<sup>[8]</sup>: 葡萄糖 10%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0035%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0015%、尿素 0.0055%、 $\text{CaCO}_3$  0.35%, 自然 pH, 121℃ 灭菌 15min; 将种子培养液接入到发酵培养基中, 28℃ 培养 48h。

### 1.3 实验方法

1.3.1 酶活力测定方法 利用靛蓝胭脂红褪色分光

收稿日期: 2011-06-02 \* 通讯联系人

作者简介: 谭莹 (1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事碳水化合物研究。

光度法<sup>[9]</sup>测定葡萄糖氧化酶的酶活力。原理是利用葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化,葡萄糖转化为葡萄糖酸过程中产生的过氧化氢能使靛蓝胭脂红褪色,以此测定葡萄糖氧化酶的活力。

准确吸取 0、1、2、3、4、5、6mL 过氧化氢标准溶液(12mg/L)置于 25mL 具塞比色管中,并加入 1.3mL 靛蓝胭脂红溶液( $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L)和 pH 4.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液 3.0mL,再加入蒸馏水稀释至 25mL,于沸水浴中加热 13min 后,用流水冷却比色管 5min;用 1cm 比色皿,以蒸馏水作参比,在波长 615nm 处测定其吸光度  $A^{[9]}$ 。以  $\lg(A_0/A)$  对过氧化氢浓度作图,得标准曲线<sup>[9]</sup>。 $A_0$  为加入 0mL 过氧化氢时的吸光度值。

取 4mL 的 0.2mol/L 葡萄糖溶液和 1mL 葡萄糖氧化酶置于试管中,37℃ 下反应 10min,终止反应,得酶促反应液<sup>[9]</sup>。在 25mL 具塞比色管中,分别加入 pH 4.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液 3.0mL、1.3mL 靛红溶液和 1mL 的上述反应液,稀释至 25mL,于沸水浴中煮沸 13min 后,取出用流水冷却 5min,终止反应;用 1mL 比色皿,在波长 615nm 处,以蒸馏水作参比,测定其吸光度  $A$ 。根据上面的标准曲线计算酶活力<sup>[9]</sup>。酶活力单位规定为:37℃ 条件下,1min 内催化葡萄糖反应产生 1mg 过氧化氢所需的酶量为 1 个活力单位(U/mL)。

1.3.2 培养基的单因素实验 采用单因素实验,选定不同种类的碳源和氮源摇瓶发酵培养 48h 选择最佳碳源和最佳氮源。

1.3.3 发酵培养基的均匀设计实验 参照文献针对培养基的各组分选定一定的上下限,葡萄糖 2%~15%<sup>[10-12]</sup>、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.1%~0.8%<sup>[13-14]</sup>、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%~0.5%<sup>[15]</sup>、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%~0.5%<sup>[15]</sup>、 $\text{CaCO}_3$  0.5%~5%<sup>[15-16]</sup>,采用 DPS 实验设计与数据处理软件,得出实验方案,按照该实验方案,摇瓶发酵培养 48h,测定各组分酶活力,并用该软件处理分析数据,得出最佳组合。

1.3.4 验证实验 对上述实验得出的结果进行验证实验,检测模型及结果的准确性。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基的单因素实验

2.1.1 碳源种类对酶活力的影响 黑曲霉制备葡萄糖氧化酶时,不同的菌种碳源都各不相同。*Aspergillus niger*(BTL)<sup>[15]</sup> 的最佳碳源为蔗糖,*Aspergillus niger* AM111<sup>[15]</sup> 的最佳碳源为葡萄糖,另外有的还利用甘露糖、醇糖等做为碳源。本实验选取 6 种碳源:葡萄糖, $\alpha$ -乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇、甘露糖为碳源,以初始浓度 12% 的培养基进行摇瓶发酵培养,以酶活力为指标研究它的最佳碳源。实验结果见图 1。

从图 1 可以看出,葡萄糖为碳源时,酶活力最高为 57.2437U/mL,说明黑曲霉 M2632 的最佳碳源为葡萄糖,可能由于葡萄糖为碳源时,底物利用率最高,所产生的葡萄糖氧化酶也就最多。山梨醇为碳源时,酶活力最低,说明醇糖的利用率最低。甘露糖做为碳源时,酶活力也很高,说明甘露糖作为底物时,利用率也很

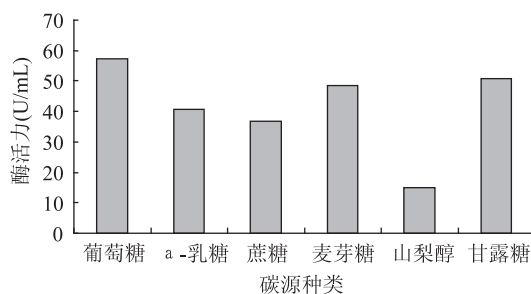


图1 碳源种类对葡萄糖氧化酶活力的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on activity of glucose oxidase

高,但是甘露糖相比葡萄糖来说,价格高出很多,因此选用葡萄糖作为碳源。

2.1.2 氮源种类对酶产量的影响 不同的氮源对不同品种的黑曲霉有不同的影响,所以选择合适的氮源对于提高葡萄糖氧化酶的产量有相当重要的影响。张婷<sup>[8]</sup>等以黑曲霉 Z-25 产葡萄糖氧化酶胞外酶发酵培养基的研究发现, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为最佳无机氮源,胨蛋白胨为最佳有机氮源。Kona R<sup>[14]</sup>发现玉米浆作为唯一碳源时,酶活力可以达到 550~640U/mL,其他外加碳源则不能继续提高酶活力。因此本实验选取 8 种氮源:鱼粉蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、胰蛋白胨、胨蛋白胨、尿素、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,以 5% 为初始浓度进行摇瓶发酵,研究氮源种类对葡萄糖氧化酶活力的影响。结果见图 2。

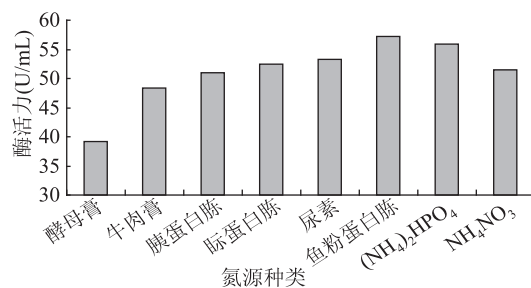


图2 氮源种类对酶活力的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on activity of glucose oxidase

实验结果发现,以酵母膏和牛肉膏为氮源时,酶活力较低,以鱼粉蛋白胨为氮源时酶活力最高,以 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 为氮源时酶活力虽然稍低于鱼粉蛋白胨,但是由于 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 成本大大低于鱼粉蛋白胨,所以选用 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 作为氮源。

### 2.2 发酵培养基的均匀设计实验

2.2.1 回归模型的拟合 由 DPS 实验设计与数据处理软件得优化实验设计方案及结果见表 1。

由 DPS 软件对实验数据进行二次多项式逐步回归分析,得到葡萄糖氧化酶与各因素的回归方程为: $Y = -98.9402238 + 2260.1096908X_1 + 20394.066185X_2 + 1253031.462671X_3X_4 - 191685.693736X_1X_2 + 317809$ 。复相关系数为  $R = 0.9999999$ , 剩余标准差  $SSE = 0.2730$ , 调整相关系数为  $R_a = 0.999992$ ,  $F$  值 = 76984.5927, 作  $F$  检验,  $F > F_{0.05}(5, 1) = 922$ , 回归方程显著,准确度高。

表1 均匀实验设计与实验结果  
Table 1 Uniform experiment design table and results

实验号	X <sub>1</sub> 葡萄糖 (%)	X <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	X <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	X <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (%)	X <sub>5</sub> CaCO <sub>3</sub> (%)	酶活力 (U/mL)
1	3.97	0.11	0.29	0.39	3.68	26.64959
2	8.10	0.34	0.51	0.50	2.02	144.6753
3	16.04	0.45	0.53	0.25	4.29	216.0797
4	6.11	0.85	0.21	0.33	0.14	124.201
5	12.21	0.72	0.14	0.47	1.34	184.0433
6	10.32	0.24	0.05	0.10	2.98	153.6804
7	2.13	0.57	0.37	0.18	0.55	48.69559

表2 回归方程预测效果

Table 2 The prediction effect of regression equation

实验号	观察值	拟合值	拟合误差
1	31.1531	31.7742	-0.0981
2	156.2494	158.8271	0.0242
3	239.6777	239.6920	-0.0145
4	135.6055	130.8789	-0.1842
5	186.4358	193.3343	0.0951
6	145.4098	149.8053	0.0025
7	50.9556	49.4157	0.1780

由表2可以看出,拟合误差很小,说明拟合模型准确性高。

2.2.2 单因子效应分析及最佳培养基组合 根据回归方程的通径系数分析各因素对酶活力的影响。X<sub>1</sub> (1.6046) > X<sub>2</sub> (0.8441) > X<sub>4</sub><sup>2</sup> (0.2212) > X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> (-0.8619) > X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> (0.0464)。即在培养基的组成中,葡萄糖的浓度对酶活力的影响最大,起决定作用,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的浓度次之,与MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O浓度的二次方相关,葡萄糖与(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的浓度相互影响,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>与MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O的浓度也相互影响,CaCO<sub>3</sub>的影响最小可以忽略不计。

根据二次函数求极值原理,上述回归方程求极值,得到葡萄糖 16.24%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.12%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.57%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.63%、CaCO<sub>3</sub> 5.69%时,酶活力取得最大值(320.50168 ± 8.67) U/mL。

2.2.3 验证实验 为检测模型及结果的准确性,配制得到的最佳培养基在上述同等条件下摇瓶发酵培养48h,经过3次平行实验,取其平均值,得到酶活力为323.375U/mL,在上述误差范围内,说明该模型及结果准确性高。

### 3 结论

采用单因素实验优化碳源和氮源的种类,发现葡萄糖对酶产量的影响效果最为显著,说明葡萄糖为底物时,可以更好的促进黑曲霉菌株产酶,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>为氮源时,有利于促进酶产量的提高。

应用均匀设计优化黑曲霉生产葡萄糖氧化酶的发酵培养基,用DPS实验设计和数据处理软件对各因素的水平对酶产量的影响进行二次多项式逐步回归拟合。结果表明,黑曲霉发酵生产葡萄糖的最佳培养基为:葡萄糖 16.24%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.12%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.57%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.63%、CaCO<sub>3</sub> 5.69%。通过验证实验表明,采用均匀实验优化黑曲霉生产葡萄糖氧化酶的发酵培养基的方法准确可靠。优化

后葡萄糖氧化酶的活力最高达到323.375U/mL,酶活力显著提高。

### 参考文献

[1] 康辉.葡萄糖氧化酶简介及其应用[J].行业综述,2007,13(1):16-19.  
 [2] 王兆军.均匀设计在参数设计中的应用[J].南开大学学报,2000,33(2):57-60.  
 [3] 代志凯,唐嘉婕,阮征,等.均匀设计优化节杆菌产β-吡喃果糖苷酶发酵培养基[J].食品科学,2009,30(9):218-222.  
 [4] 关亚鹏,姜忻,张莉,等.均匀设计法优化咪唑立宾发酵培养基配方[J].中国抗生素杂志,2008,33(8):471-473.  
 [5] 王剑锋,李江,王璋.均匀设计法优化烟管菌产漆酶培养基[J].微生物学通报,2007,34(4):625-628.  
 [6] 袁伟,惠丰立,柯涛,等.均匀设计法优化廉价型牛凝乳酶工程菌发酵培养基[J].食品科学,2011,32(7):258-261.  
 [7] 刘建忠,翁丽萍,杨惠英,等.葡萄糖氧化酶及过氧化氢酶摇床发酵过程数学模型[J].化工学报,2002,53(1):50-53.  
 [8] 张婷,吕凤霞,别小妹,等.黑曲霉Z-25产葡萄糖氧化酶胞外酶发酵培养基优化研究[J].食品科学,2009,30(3):209-212.  
 [9] 周建芹,陈韶华,王剑文.测定葡萄糖氧化酶活力的一种简便方法[J].实验技术与管理,2008,25(12):58-60.  
 [10] Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P. Distribution and typology of glucose oxidase activity in the genus *Penicillium* [J]. Lett Appl Microbiol, 1993, 17(2): 285-293.  
 [11] Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P, et al. Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucoode oxidase and catalase by *Penicillium variabile* in benchtop bioreactor [J]. Enzyme Microb Technol, 1995, 17(4): 336-345.  
 [12] Rogalski J, Fiedurek J, Szczordrak J, et al. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant [J]. Enzyme Microb Technol, 1988, 10(8): 508-519.  
 [13] Hatzinikolaou DG, Macris BJ. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* [J]. Enzyme Microb Technol, 1995, 17(6): 530-534.  
 [14] Kona R, Qureshi N, Pai J. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor [J]. Bioresour Technol, 2001, 78(2): 123-129.  
 [15] Sandip BB, Mahesh VB, Rekha SS, et al. Glucose oxidase—An overview [J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(4): 489-501.  
 [16] Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture [J]. Appl Microbiol, 2000, 89: 85-94.