

响应面法优化 *Coriolus versicolor* ZZH-2产漆酶培养基

尹将来,刘长根,贾红华,周 华*,韦 萍
(南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 210009)

摘要:采用响应面法对*Coriolus versicolor* ZZH-2产漆酶培养基进行优化,首先用Plackett-Burman(PB)法筛选出3个影响较大的重要因素,分别为酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸。在此基础上,用最陡爬坡实验逼近最大响应区域,并利用中心组合实验以及响应面分析确定了主要影响因素的最佳条件,即酵母膏13.82g/L、羧甲基纤维素钠13.29g/L和L-天冬氨酸1.44g/L,在优化培养基后漆酶酶活达到9693U/mL,比优化前提高了1.7倍,其实验值与理论值基本相符。
关键词:漆酶,响应面法,培养基优化

Medium optimization of *Coriolus versicolor* ZZH-2 for laccase production by response surface methodology

YIN Jiang-lai, LIU Chang-gen, JIA Hong-hua, ZHOU Hua*, WEI Ping

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: In this report, response surface methodology was applied to optimize the fermentation conditions *Coriolus versicolor* ZZH-2 for Laccase Production. Firstly, Plackett-Burman design was used to select the main factors affecting laccase yield of *Coriolus versicolor* ZZH-2. The results showed that three factors played important roles in the fermentation conditions, including the concentration of yeast extract, sodium carboxymethyl cellulose (CMC) and L-aspartic acid. The pass of steepest ascent was undertaken to approach the optimal region of the three significant to factors. Then the central composite design and response surface analysis were applied to investigate the mutual interaction between the variables and identify optimal values that bring maximum laccase activity. The activity of laccase increased nearly 1.7 times to 9693U/mL where concentrations of yeast extract, sodium carboxymethyl cellulose (CMC) and L-aspartic acid were at 13.82, 13.29 and 1.44g/L. The experimental values agreed with the predicted values.

Key words: laccase; response surface methodology; culture medium optimization

中图分类号: TS201.2+5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)16-0183-04

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶(p-diphenol oxidase, EC1.10.3.2),与抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同源,都属于蓝色多铜氧化酶家族^[1]。Yoshida^[2]最先对漆酶进行了描述,Bertrand^[3]确定了它是一种包含金属的氧化酶。近年来,由于漆酶能对有毒的酚类物质起作用,在木质素降解、微生物菌体形态形成等方面的功能,使之在食品工业、环境保护、造纸工业等领域显示出巨大的研究价值和应用潜力,其在纳米生物技术和土壤生物修复等方面的应用也越来越受到重视^[4],成为国内外绿色环保型酶的研究热点。漆酶在自然界中分布广泛,在多种植物、真菌、细菌、昆虫以及少数高等动物中都有发现。分泌漆酶的真菌主要集中于担子菌亚门、子囊菌亚门

及半知菌亚门等高等真菌,其中最主要的是担子菌亚门的白腐真菌^[5]。但由于白腐真菌好氧,生长速度慢,产酶周期长等特点,发酵条件比较苛刻,限制了白腐真菌漆酶的工业化生产和应用。因此,高酶活漆酶发酵条件的研究也受到广泛关注。张田田等^[6]通过对火红密孔菌发酵产漆酶营养条件的优化,使该菌产漆酶酶活提高38.9%。本研究采用响应面分析法对白腐菌*Coriolus versicolor* ZZH-2产漆酶培养基进行优化,进一步提高了漆酶的产量和酶活,为实现漆酶的工业化生产和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白腐菌*Coriolus versicolor* ZZH-2 由本实验室筛选分离保藏;种子培养基(g/L) 麦芽汁30,蛋白胨3,pH5.6;斜面培养基(g/L) 麦芽汁30,蛋白胨3,琼脂20,pH5.6;发酵培养基(g/L) 葡萄糖1.25,羧甲基纤维素钠(CMC)15,酵母膏15,KH₂PO₄1,MgSO₄

收稿日期:2011-12-30 * 通讯联系人

作者简介:尹将来(1986-),男,硕士研究生,研究方向:生物化工。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2009CB724706);国家自然科学基金资助项目(20906048)。

表1 Plackett-Burman (PB)实验因素水平设计 (g/L)
Table 1 Levels design of variables of Plackett-Burman (g/L)

水平	因素									
	X ₁ 葡萄糖	X ₂ 酵母膏	X ₃ 吐温80	X ₄ 磷酸二氢钾	X ₅ 氯化钙	X ₆ 硫酸镁	X ₇ 羧甲基纤维素钠	X ₈ L-天冬氨酸	X ₉ 硫酸铜	X ₁₀ 诱导剂
低(-1)	1	12	1.6	0.8	0.04	0.2	12	0.8	0.02	0.2
高(1)	1.5	18	2.4	1.2	0.06	0.3	18	1.2	0.03	0.3

0.25, CaCl₂ 0.05, L-天冬氨酸(L-Asp) 1, Tween-80 2, CuSO₄ 0.5, 诱导剂(2,5-二甲基苯胺)0.25, pH4.0。

HVE-50型高压灭菌锅 日本Hirayama公司;
THE-C1台式冷冻恒温振荡器 太仓市实验设备厂;
752型紫外-可见分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;
GL-21M型冷冻离心机 上海市离心机机械研究所。

1.2 培养方法

种子培养:用灭菌后的竹签将斜面上的菌丝刮到含有玻璃珠的30mL无菌水中将其打散,然后吸取2mL悬浮液加入装有50mL种子培养基的250mL三角瓶中,于25℃、转速为160r/min的条件下,摇床振荡培养3d。

发酵培养:将培养好的种子液以4%(体积分数)的接种量接入到发酵培养基中(250mL三角瓶中),于30℃、转速为180r/min的条件下,摇床振荡培养7d。

取适量发酵液在4℃、转速为10000r/min的条件下离心10min,得到上清液即为漆酶粗酶液。

1.3 漆酶活力测定

采用2,2'-连氮-双(3-乙基并噻-6-磺酸)(ABTS)法测定酶活力(一个漆酶单位U为每1min转化1μmol ABTS的酶量,使产物ABTS自由基浓度从a增加到b),计算粗酶液的酶活力,计算公式如下^[7-8]:

$$\text{酶活力} = 1000 \times 0.1884 \times (A_2 - A_1) \times 60 \times \text{稀释倍数} / t$$

其中:酶活力单位为U/mL, A₂、A₁为吸光值变化的两个端值, t为吸光值从A₁增加到A₂经历的时间(s), 0.1884为ABTS自由基浓度跟吸光值关系曲线的斜率, 详见文献[8]。

本文以漆酶酶活为响应目标。

1.4 实验方法

1.4.1 Plackett-Burman (PB) 实验设计 Plackett-Burman (PB) 设计^[9]是一种经济而有效的二水平实验设计方法,它用最少的实验次数使因子的主要效果尽可能精确的估计,11个二水平变量的PB设计仅需要12次实验就可以达到良好的效果,且因子间的交互作用仅部分的与主因子发生混淆^[10]。利用PB实验设计方案筛选出对漆酶酶活影响较大的因素,各因素水平设置见表1。

1.4.2 最陡爬坡实验 响应面拟合方程只有在考察的临近区域里才能充分近似真实情况,因此确定主要因素后,根据拟合得到一阶模型回归系数的符号和大小来确定最陡爬坡的路径,通过使主要因素同时朝响应值增大的方向变化,找出其峰值,从而快速逼近最大响应区域,再建立有效的拟合方程。

1.4.3 中心组合设计和响应面分析 在对PB实验结果充分分析的基础上,在最陡爬坡实验确定的区域内,以漆酶比酶活为响应值对数据进行二次回归拟

合,得到二次方程,分析各因素的主效应和交互效应,最后在一定的水平范围内求出最佳值。

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman (PB) 实验设计及分析

以葡萄糖(X₁),酵母膏(X₂),吐温80(X₃),磷酸二氢钾(X₄),氯化钙(X₅),硫酸镁(X₆),羧甲基纤维素钠(X₇),L-天冬氨酸(X₈),硫酸铜(X₉),诱导剂(X₁₀)为培养基成分因素,各因素分别取正、负两水平,正水平为负水平的1.5倍,本实验选用N=12的PB实验设计,实验设计及结果见表2。采用STATISICA8.0软件进行数据分析,结果见表3。

根据表3的实验分析数据,建立以漆酶比酶活为响应值的多元线性回归模型,见式(1)。

$$Y = 5094.417 + 219.250X_1 - 832.917X_2 + 81.750X_3 + 113.583X_4 + 35.417X_5 + 395.583X_6 - 710.417X_7 + 1034.917X_8 + 388.417X_9 - 546.250X_{10} \quad \text{式(1)}$$

表2 Plackett-Burman (PB) 实验设计及产漆酶酶活

实验号	Plackett-Burman										Y 酶活 (U/mL)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	6890
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	5722
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	3115
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	5390
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2512
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	6836
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	3840
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	4986
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	8798
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	4532
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	3544
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4968

表3 Plackett-Burman (PB) 实验因素水平及主要效应分析

Table 3 Levels of variables and the main effect analysis of Plackett-Burman				
因素	T值	p值	F值	Coeff.值
X ₁	4.143	0.151	17.167	219.250
X ₂	-15.740	0.040	247.753	-832.917
X ₃	1.545	0.366	2.387	81.750
X ₄	2.146	0.278	4.607	113.583
X ₅	0.669	0.624	0.448	35.417
X ₆	7.476	0.085	55.884	395.583
X ₇	-13.425	0.047	180.236	-710.417
X ₈	19.558	0.032	382.495	1 034.917
X ₉	7.340	0.086	53.878	388.417
X ₁₀	-10.323	0.061	106.561	-546.250
R ² =0.9990 Adj R ² =0.9896				

其中Y为漆酶酶活,该模型的复相关系数 $R^2=0.9990$,说明该模型相关性良好;校正决定系数 $Adj R^2=0.9896$,表明98.96%的实验数据的变异性可用此回归模型来解释。由表2分析可知,各因素中对漆酶产酶影响显著($p<0.05$)的因素为酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸。其中酵母膏和羧甲基纤维素钠为负效应,而L-天冬氨酸为正效应。

2.2 最陡爬坡实验分析

根据PB实验得到的对产酶影响显著的因子是酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸,通过最陡爬坡实验确定最优点的所在范围,由式(1)确定最陡爬坡的路径。由表4数据可知,产漆酶酶活随关键因素浓度的改变而变化,产量最高的为第3组,比酶活达到10176U/mL,说明该组实验的酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸浓度接近最优。故选第3组为中心点,用于培养基组成的进一步优化。

表4 最陡爬坡实验设计及结果

Table 4 Experimental design and results of the steepest ascent path experiments

实验号	因素			酶活(U/mL)
	酵母膏(g/L)	CMC(g/L)	L-Asp(g/L)	
1	15	15	1	5742
2	14	14	1.2	7683
3	13	13	1.4	10176
4	12	12	1.6	8630
5	11	11	1.8	6782
6	10	10	2.0	5036

2.3 中心复合实验及响应面分析

由上述最陡爬坡实验结果可知,第3组相应变量值最接近最大响应值区域,因此选择第3组的培养基条件为原点进行中心组合实验设计,中心组合实验设计及其结果见表5,结果分析见表6。

根据中心组合实验得到的结果,对实验数据进行响应面回归分析,得到以漆酶比酶活为响应值的多元回归二次拟合模型见式(2)^[1]。

$$Y=9865.25 + 688.35X_1 + 322.32X_2 + 251.74X_3 - 2.62X_1X_2 + 274.88X_1X_3 - 35.37X_2X_3 - 1311.25X_1^2 -$$

表5 中心组合实验设计及其结果

Table 5 Experimental design and results of central composite design

实验组	因素(g/L)			Y酶活(U/mL)
	X ₁ 酵母膏	X ₂ CMC	X ₃ L-asp	
1	10.00	10.00	1.00	4215
2	10.00	10.00	1.80	4956
3	10.00	16.00	1.00	5013
4	10.00	16.00	1.80	5338
5	16.00	10.00	1.00	4970
6	16.00	10.00	1.80	6536
7	16.00	16.00	1.00	5483
8	16.00	16.00	1.80	7182
9	7.95	13.00	1.40	4780
10	18.04	13.00	1.40	7620
11	13.00	7.95	1.40	4647
12	13.00	18.04	1.40	5892
13	13.00	13.00	0.73	6192
14	13.00	13.00	2.07	5652
15	13.00	13.00	1.40	9820
16	13.00	13.00	1.40	10124
17	13.00	13.00	1.40	9886
18	13.00	13.00	1.40	9614

$$1640.37X_2^2 - 1421.15X_3^2 \quad \text{式(2)}$$

由表6分析可知, X₁、X₂、X₃、X₁X₃、X₁²、X₂²和X₃²的p值均小于0.05,表明对漆酶酶活的影响是统计显著的,在建模时需加以考虑,忽略其中影响不显著的项,简化得漆酶产酶预测的二次关联表达式为(3)。

$$Y=9865.25 + 688.35X_1 + 322.32X_2 + 251.74X_3 + 274.88X_1X_3 - 1311.25X_1^2 - 1640.37X_2^2 - 1421.15X_3^2 \quad \text{式(3)}$$

式中Y为漆酶比酶活, X₁、X₂、X₃分别为酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸的编码值。回归模型方差分析结果见表6,模型 $p<0.0001$,说明模型在 $\alpha=0.01$ 水平上回归达到极显著;式(2)模型的相关系数 $R^2=0.9702$,调整后的 $Adj R^2=0.9368$,表明方程模型于实验数据有93.68%的符合度,有很高的可信度。图1~图3是由多元回归方程式(2)拟合出的响应曲面图及其等高线图,由此可对任何两因素交互影响漆酶产量进行分析与评价,以确定最佳因素水平范围^[2]。由

表6 回归模型方差分析

Table 6 ANOVA of quadratic polynomial model

变异源	自由度	平方和	均方	F值	p值	Coeff.值
模型	9	--	--	--	<0.0001	--
X ₁	1	6470481	6470481	25.1674	0.0012	688.35
X ₂	1	1418720	1418720	5.5182	0.0109	322.32
X ₃	1	862588	862588	3.3551	0.0215	251.74
X ₁ X ₂	1	55	55	0.0002	0.9740	-2.62
X ₁ X ₃	1	604450	604450	2.3511	0.0343	274.88
X ₂ X ₃	1	10011	10011	0.0389	0.6665	-35.37
X ₁ ²	1	21760032	21760032	84.6373	<0.0001	-1311.25
X ₂ ²	1	34054161	34054161	132.4562	<0.0001	-1640.37
X ₃ ²	1	25226644	25226644	98.1209	<0.0001	-1421.15
失拟项	5	1924296	384859	8.7148	0.0523	--
纯误差	3	132484	44161	--	--	--
总和	17	69108970	--	--	--	--
相关系数	0.9702					
调整相关系数	0.9368					

(图1~图3)交互影响的响应面可以看出, X_1 、 X_2 、 X_3 存在极值点,对式(3)利用STATISICA8.0进行分析,可以得到曲面的最高点,即3个因子的最优实验点(X_1 、 X_2 、 X_3)的数值(13.82、13.29、1.44)。图1中L-天冬氨酸的量一定的情况下,随着酵母膏和羧甲基纤维素钠的量的增加,漆酶酶活开始不断提高,达到峰值后又开始下降。这是由于酵母膏和羧甲基纤维素钠的量的增加,可以使菌体更好的生长,从而提高漆酶的产量,但是由于羧甲基纤维素钠具有一定的粘性,过多的加入会使发酵液的粘度增大,从而使发酵液中的溶氧量减少,不利于菌体的生长。图2中羧甲基纤维素钠的量一定的情况下,增加酵母膏和L-天冬氨酸的量,漆酶产量先随之增加,到达最大值后又逐渐下降,这是由于过量的L-天冬氨酸和酵母膏不利于漆酶的生长,酶活降低。图3表明在酵母膏的量不变的情况下,不断增加羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸的量,漆酶酶活先增加后又不断降低,再次表明过量的羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸不利于漆酶的分泌。因此,培养基中酵母膏的量为13.82g/L、羧甲基纤维素钠的量为13.29g/L和L-天冬氨酸的量为1.44g/L,此时漆酶活力

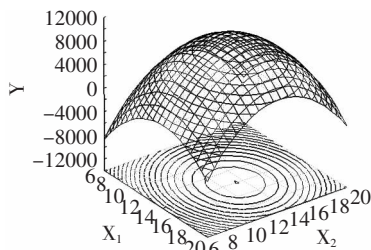


图1 酵母膏和CMC对漆酶酶活交互影响的三维曲面图

Fig.1 Surface of mutual-influence for yeast extract and CMC on the activity of laccase

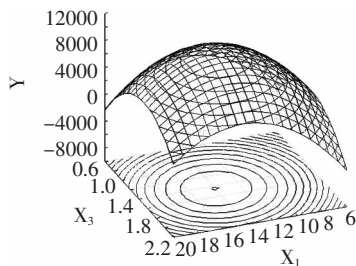


图2 酵母膏和L-Asp对漆酶酶活交互影响的三维曲面图

Fig.2 Surface of mutual-influence for yeast extract and L-Asp on the activity of laccase

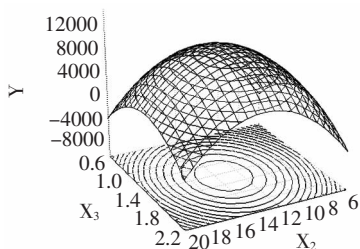


图3 L-Asp和CMC对漆酶酶活交互影响的三维曲面图

Fig.3 Surface of mutual-influence for L-Asp and CMC on the activity of laccase

达到最高,预测值达9989.6U/mL。因此最佳培养基配方(g/L):葡萄糖1.25,羧甲基纤维素钠(CMC)13.29,酵母膏13.82, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0.25, CaCl_2 0.05, L-天冬氨酸(L-Asp)1.44, Tween-80 2, CuSO_4 0.5, 诱导剂(2,5-二甲基苯胺)0.25, pH4.0。经实验验证,摇瓶发酵漆酶平均酶活可达9693U/mL,与模型预测值基本相当,表示该模型能很好的预测实际发酵情况。

3 结论

本研究采用响应面分析法对 *Coriolus versicolor* ZZH-2产漆酶培养基进行了优化,首先用Plackett-Burman法确定了培养基中酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸这三个显著因素;然后通过最陡爬坡实验逼近最佳响应面区域;最后采用中心组合实验和STATISICA8.0软件分析确定出主要因素的最优浓度,得到酵母膏、羧甲基纤维素钠和L-天冬氨酸最佳浓度分别为13.82、13.29、1.44g/L。漆酶酶活从优化前的5742U/mL提高到9693U/mL,提高了1.7倍。同时回归方程的预测值跟验证值十分相近,说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响,为产漆酶研究奠定了一定的基础。响应面优化方法作为一种科学可行的统计分析方法将越来越广泛的运用于微生物培养基和培养条件的优化中。

参考文献

- [1] Nina H, Laura-Leena K, Kristiina K, et al. Crystal structure of laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(8): 601-605.
- [2] Yoshi, H. Chemistry of Lacquer (Urusht) part I[J]. *J Chem Soc*, 1883, 43: 472-486.
- [3] Mayer A M, Staples R C. Laccase: new functions for an old enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 551-565.
- [4] Susana Rodríguez Couto, José Luis Toca Herrera. Industrial and biotechnological applications of laccase: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2006(24): 500-513.
- [5] 王佳玲, 余惠生, 付时雨, 等. 白腐菌漆酶的研究进展[J]. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 233-236.
- [6] 张田田, 沈明浩. Plackett-Burman设计和相应面法优化火红密孔菌发酵产漆酶培养基[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(9): 223-226.
- [7] 何为, 詹怀宇, 王习文, 等. 一种改进的漆酶酶活检测方法[J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2003, 31(12): 46-50.
- [8] 张鹏. 以ABTS为底物测定漆酶活力的方法[J]. *印染助剂*, 2007, 24(1): 43-45.
- [9] Beres DL, Hawkins DM. Plackett-Burman technique for sensitivity analysis of many-parametered models[J]. *Ecol Model*, 2001, 141(2): 171-183.
- [10] LOUKAS Y L. A Plackett-Burman screening design directs the efficient formulation of multicomponent DRV liposomes[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 26: 255-263.
- [11] 平芮巾, 孙溢, 刘均忠, 等. 响应面法优化海洋细菌MP-2酯酶发酵条件[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(4): 548-552.
- [12] *Ganoderma lucidum* UIM-281产漆酶发酵条件的筛选及响应面优化[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(11): 72-76.