

文章编号:1673-1689(2009)05-0688-05

中心组合试验优化毛云芝菌固体发酵培养条件

孙巍^{1,2}, 夏春雨^{1,2}, 蔡和晖^{1,2}, 吴娱明¹,
陈智毅¹, 邹宇晓¹, 施英¹, 刘学铭^{*1}

(1. 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610; 2. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘 要: 为了优化毛云芝菌固体发酵培养条件, 采用中心组合试验设计方法, 研究初始加水量、接种量、培养温度及其交互作用对漆酶活力的影响。应用 SAS 软件和响应面分析相结合的方法, 模拟得到回归方程的预测模型和可信度, 并通过岭脊分析得到最佳的发酵条件为: 装量为 10 g 干料的 250 mL 三角瓶中加蒸馏水 38 mL, 种子液 4.3 mL, 培养温度 26.6 °C。该条件下酶活达到 1.4778×10^4 U, 约是优化培养条件前酶活的 11.75 倍。

关键词: 毛云芝菌; 漆酶; 固体发酵; 中心组合设计; 岭脊分析

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Culture Condition Optimization of Solid Substrate Fermentation by *Coriolus hirsutus* Using Central Composite Design

SUN Wei^{1,2}, XIA Chun-yu^{1,2}, CAI He-Hui^{1,2}, WU Yu-Ming¹,
CHEN Zhi-Yi¹, ZOU Yu-Xiao¹, SHI Ying¹, LIU Xue-Ming^{*1}

(1. Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China; 2. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this manuscript, the environmental conditions for laccase production by *Coriolus hirsutus* solid substrate fermentation were carefully investigated through the central composite design. Those environmental conditions including, the original humidity, inoculating amount and culture temperature. The predictive model and reliability were developed by SAS software and response surface analysis. The optimal fermentation condition were achieved and listed as follows: 38 mL distilled water, 4.3 mL seed liquid of 250 mL flask with 10 g fresh substrate at the temperature of 26.6 °C through ridge analysis. With the optimum conditions, the laccase activity was achieved at 1.4778×10^4 U, was 11.75 times of that of the original condition.

Key words: *Coriolus hirsutus*, laccase, solid substrate fermentation, central composite design, ridge analysis

收稿日期: 2008-11-13

基金项目: 教育部留学回国科研启动基金(教外司留[2007]1108号)。

作者简介: 孙巍(1982-), 女, 吉林省吉林市人, 微生物资源与利用博士研究生。

* 通讯作者: 刘学铭(1967-), 男, 江西兴国人, 工学博士, 研究员, 主要从事蚕桑资源综合利用和农产品深加工方面的研究。Email: xuemingliu37@126.com

由于能源危机和环境问题日益严重,固体发酵技术越来越受到国内外的重视。固体发酵成本低,能耗低,产物浓度高,微生物附着于发酵基质表面或菌丝体穿透固体颗粒,进而刺激微生物产多种不同特性的酶及其它代谢产物。固体发酵气体传递速率比液体发酵高得多,从而使发酵目标产物的获得较传统的深层液体发酵具有更大的优势^[1]。固体发酵模拟真菌天然的生长条件,适合丝状真菌产酶^[2-3]。但固体发酵菌体生长、营养物的吸收和代谢产物的分泌在各处都是不均匀的,使得发酵参数的检测和控制比较困难。

漆酶是含铜多酚氧化酶,广泛应用于纺织染料脱色、纸浆漂白、废水处理、生物修复等^[4-5]。它存在于担子菌、半知菌和子囊菌中,但最主要的生产者担子菌中的白腐菌^[6]。其中毛云芝菌是一种具有较高产酶能力的白腐真菌,它能分泌多种胞外木质素酶。目前国外已有研究毛云芝菌漆酶和锰过氧化物酶纯化及酶学性质^[7-8]的报道。Madhavi S等^[9]通过正交试验优化了毛云芝菌液体发酵培养基,酶活达到305 U/mL是基础培养基酶活的两倍,添加诱导剂2,5-二甲苯胺后酶活达到820 U/mL。关于固体发酵培养毛云芝菌产漆酶的国内外研究较少,选择合适的培养基质,研究其适合的培养基和培养条件是提高漆酶产量的关键。国外固体发酵产漆酶的研究较国内多样化且技术完善,国外有采用椰子果肉^[10]、栗子壳^[11]、酿造加工副产物^[12]、香蕉收获时的残留废物^[13]等作为固体发酵基质,这样既有利于解决环境问题,又可以使农产品加工废物得到充分利用。

桑叶和麸皮作为发酵原料,来源广泛,成本低,且较适合毛云芝菌固体发酵产漆酶,所测得的漆酶活力高,为了进一步提高酶活,增加产量,对固体发酵的培养条件进行了研究。作者选择初始含水量、接种量、培养温度为自变量,漆酶活力为响应值,运用中心组合设计方法,借助SAS软件进行了响应面分析,得到毛云芝菌固体发酵最佳的培养条件。

1 材料与方法

1.1 菌株

毛云芝菌(*Coriolus hirsutus*),澳大利亚联邦科学工业研究组织食品科学研究所赠送,作者所在实验室保藏。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(组分 g/dL) 马铃薯 20,葡萄糖 2,琼脂 2。

1.2.2 液体种子培养基(组分 g/dL) 马铃薯 20,葡萄糖 2,酵母膏 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15, KH_2PO_4 0.3, VB_1 0.001, 121 °C 灭菌 30 min。

1.2.3 固体发酵培养基(组分 g/dL) 桑叶 48.15, 麸皮 48.15, 葡萄糖为 1.05, 草酸铵 1.4, KH_2PO_4 0.75, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CuSO_4 0.03, 充分混匀后, 121 °C 灭菌 35 min。

1.3 培养方法

1.3.1 菌种活化 将保存的菌种接种于斜面培养基上, 28 °C 恒温培养 7~8 d, 置于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3.2 液体种子培养 用灭菌竹签将每支 PDA 斜面上的菌丝刮到含有玻璃珠的无菌水中, 将其打散, 适当稀释, 然后用无菌移液管吸取 7 mL 悬浮液, 接入装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 4 d。

固体发酵培养: 以 250 mL 三角瓶为容器(每瓶装鲜料 10 g), 静置培养 10 d, 按照中心组合试验设计, 分别试验了初始加水量(23、30、40、50、57 mL 蒸馏水), 接种量(3.3、4.5、6、6.7 mL 培养好的液体种子), 培养温度(22、25、30、35、38 °C) 各因素及其交互作用对漆酶活性的影响, 每个处理设 3 个重复。对各种样品整瓶取样, 按干物料(g): 水(mL) = 1: 5 加入蒸馏水, 20~22 °C 浸提过夜, 挤出发酵液, 以手握无水滴出为宜, 然后以 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 测定酶活。发酵后的湿曲放入 70 °C 烘箱烘干至恒重, 称取质量。

1.4 漆酶活力测定

3 mL 反应总体积中, 含 0.1 mL 适当稀释的粗酶液, 2.7 mL、0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 0.2 mL、0.5 mmol/L ABTS, 室温条件下采用 UV-1700 紫外可见分光光度计测定 420 nm 下反应前 3 min 内的吸光值变化。酶的活力单位(U)定义为: 每克浸提后培养料每分钟催化底物(ABTS)引起吸光值增加 0.1 的值^[14]。

2 试验设计及数据处理

2.1 试验设计

作者以发酵初始加水量 X_1 、接种量 X_2 、发酵温度 X_3 为试验因素, 进行二次回归中心组合试验设计, 各因素及水平的试验设计见表 1。

2.2 试验数据处理

2.2.1 数学模型 以漆酶活力为指标(因变量), 考察三因素对因变量的影响, 采用软件 SAS V8 对数据进行二次回归拟合, 预测模型的方程式, 即

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3$$

表 1 试验因素与水平
Tab. 1 Factors and levels

因素	符号	编码水平				
		-r (-1.682)	-1	0	+1	+r (1.682)
初始加水量/mL	X ₁	23	30	40	50	57
接种量/mL	X ₂	3.3	4.0	5.0	6.0	6.7
发酵温度/℃	X ₃	22	25	30	35	38

2.2.2 数据分析 利用方差分析,根据复相关系数的平方确定模型的拟合度,可以看出方程的一次项、二次项及交互项的显著性,进而分析各因素的主效应和交互效应。

2.2.3 寻求最优值 为了确定各因素的最佳取值,通常有两种方法。其一,根据 Box 的 Complex Algorithm 法拟合方程存在极值的必要条件即 Y 分别对 X₁、X₂、X₃ 的偏导为零,对拟合出的二次方程求导,得出方程组,然后解方程组即可。其二,可以利用 SAS 软件进行岭脊分析,使用 ridge max(求最小值是用 ridge min)命令就可以轻松解出。笔者采用岭脊分析的方法求得毛云芝菌固体发酵的最佳条件。

3 结果与分析

3.1 发酵条件拟合模型的建立

选取发酵初始含水量、接种量、发酵温度为试验因素,按照中心组合试验设计确定毛云芝菌固体发酵的试验方案,具体试验方案和漆酶活力 Y 的测定结果见表 2。根据表 2 的试验结果,借助 SAS V8 进行模拟,得到回归方程的预测模型如下:

$$Y = 136.4481 - 13.31724X_1 - 6.620541X_2 - 28.14996X_3 - 31.30608X_1X_1 - 0.7675X_1X_2 + 1.23X_1X_3 - 6.87196X_2X_2 + 4.32X_2X_3 - 23.70465X_3X_3$$

式中, Y 为漆酶活力; X₁、X₂、X₃ 为初始含水量、接种量和温度编码值。

3.2 回归方程的拟合度检验

中心组合设计预测模型的方差分析结果见表 3。结果表明,初始加水量 X₁、接种量 X₂ 和温度 X₃ 均对毛云芝菌固体发酵产漆酶的影响显著,上述回归方程描述各因子与响应值之间的变化关系,其因

变量和所有自变量之间的关系是显著的,相关系数 R² 为 98.87%,说明模型可以解释 98.87% 实验所得漆酶酶活的变化,方程的 F 值为 97.43,显著性系数 0.000 1,表明方程的拟合较好。回归方程各项的方差分析结果表明,模型的一次项和二次项对响应值的影响是高度显著的,说明分析结果可靠;交换项的影响不显著,说明各因素之间的交互作用不明显。综上所述,可以用此回归方程代替各组试验对试验结果进行分析。

对回归系数的显著性检验结果表明: b₁、b₂、b₃、b₁₁、b₂₂、b₃₃ 高度显著,而 b₁₂、b₁₃、b₂₃ 均不显著,根据方差分析和 t 检验的结果将差异不显著的因子剔除后得到回归方程为

$$Y = 136.4481 - 13.31724X_1 - 6.620541X_2 - 28.14996X_3 - 31.30608X_1X_1 - 6.87196X_2X_2 - 23.70465X_3X_3$$

表 2 中心组合试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of central composite experiment				
序号	X ₁	X ₂	X ₃	Y(×10 ⁴ U)
1	-1	-1	-1	1.205
2	-1	-1	1	0.582 8
3	-1	1	-1	1.028 6
4	-1	1	1	0.506
5	1	-1	-1	1.034 9
6	1	-1	1	0.388 7
7	1	1	-1	0.754 6
8	1	1	1	0.354 4
9	-1.682	0	0	0.804 4
10	1.682	0	0	0.192 6
11	0	-1.682	0	1.289 6
12	0	1.682	0	1.089 6
13	0	0	-1.682	1.205
14	0	0	1.682	0.222
15	0	0	0	1.426 5
16	0	0	0	1.334 9
17	0	0	0	1.392
18	0	0	0	1.346 7
19	0	0	0	1.315 1
20	0	0	0	1.365

表 3 中心组合试验方差分析表
Tab.3 Variance analysis on the result of central composite experiment

变异来源	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	Pr>F
X_1	1	2 422.026	2 422.026	61.813 06	0.000 1
X_2	1	598.600 9	598.600 9	15.2770 3	0.002 92
X_3	1	1 0821.96	10 821.96	276.189 7	0.000 1
X_1X_1	1	14 124.05	14 124.05	360.462 9	0.000 1
X_1X_2	1	4.712 45	4.712 45	0.1202 67	0.735 932
X_1X_3	1	12.103 2	12.103 2	0.308 888	0.590 58
X_2X_2	1	680.554 7	680.554 7	17.368 59	0.001 925
X_2X_3	1	149.299 2	149.299 2	3.810 298	0.079 484
X_3X_3	1	8 097.838	8 097.838	206.666 7	0.000 1
模型	9	34 360.1	3 817.789	97.434 63	0.000 1 [*]
(一次项)	3	13 843	4 614.33	117.76	<0.000 1
(二次项)	3	20 351	6 783.67	173.13	<0.000 1
(交互乘积项)	3	166.114 850	55.37	1.41	0.295 9
误差项	10	391.830 8	39.183 08		
所有项	19	3 4751.93			

3.3 响应面分析

将初始加水量、接种量、培养温度 3 个参数分别固定,通过回归方程来绘制漆酶活力随其余两个参数变化趋势分析图,考察所拟合的相应曲面的形状,响应面立体分析图见图 1~3。

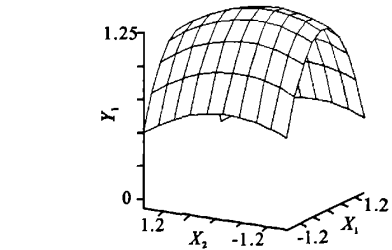


图 1 X_1 、 X_2 对酶活影响的响应面图($X_3=0$)
Fig.1 Response surface plots of X_1 and X_2 on laccase activity

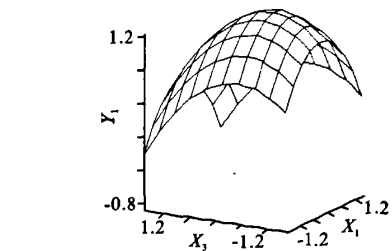


图 2 X_1 、 X_3 对酶活影响的响应面图($X_2=0$)
Fig.2 Response surface plots of X_1 and X_3 on laccase activity

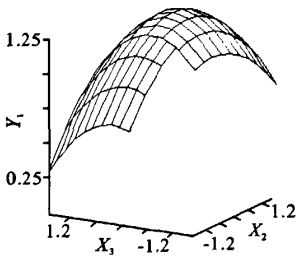


图 3 X_2 、 X_3 对酶活影响的响应面图($X_1=0$)
Fig.3 Response surface plots of X_2 and X_3 on laccase activity

从图 1 可知,初始加水量和接种量对漆酶活力影响显著,随着加水量和接种量的增加,漆酶活力呈现增加的趋势,当初始加水量接近 38 mL,接种量接近 4.3 mL 后,漆酶活力不再增加,加水量或接种量继续增加,漆酶活力将不会显著提高。从图 2 可知,随着温度的升高,漆酶活力先升高后降低,初始加水量对酶活力的影响基本与图 1 一致。从图 3 可知,随着接种量和温度的升高,漆酶活力呈先增加后降低的趋势,对漆酶活力影响显著。

3.4 最佳固体培养条件的确定

从图中及软件分析,回归方程存在稳定点,稳定点是极大值点,通过岭脊分析得到极大值点所对应的各主要因素(X_1 , X_2 , X_3)的编码值分别为(-0.219 572,0.717 53,-0.674 662),即装量为 10 g 固体培养基的 250 mL 三角瓶中加入蒸馏水 38 mL,接液体种子 4.3 mL,培养温度 26.6℃,漆酶活力达到 1.4943×10^4 U。

3.5 验证试验

为验证上述优化结果,在确定的培养条件下,即装量 10 g 固体培养基的 250 mL 三角瓶中加蒸馏水 38 mL,接液体种子 4.3 mL,培养温度 26.6 °C,重复试验 3 次,见图 4,漆酶活力分别为 $1.432 2 \times 10^4$ 、 $1.527 6 \times 10^4$ 、 $1.473 5 \times 10^4$ U,漆酶活力的实测平均值为 $1.477 8 \times 10^4$ U,与模型的预测值 $1.494 3 \times 10^4$ U 较为接近,进一步说明回归模型的拟合度较好。同时,与初始发酵培养条件产生的酶活 $0.125 8 \times 10^4$ U 相比提高了约 11.75 倍。

4 结 语

1)选取初始加水量、接种量、培养温度为自变量,利用中心组合试验设计方法,通过方差分析,得

到各因素对漆酶活力影响的显著性程度,并确定出预测模型的回归方程。

2)借助 SAS V8.0 软件,利用复相关系数确定模型的拟合度较好,通过响应面分析和等高线图分析,确定模型具有稳定点,且该稳定点为极大值点,运用岭脊分析得到各因素的编码值,从而确定毛云芝菌利用桑叶和麸皮固体发酵的最优条件为:装量为 10 g 干料的 250 mL 三角瓶中加蒸馏水 38 mL,接液体种子 4.3 mL,培养温度 26.6 °C。

3)利用最优培养条件进行验证试验,结果显示回归模型的预测值与试验值比较接近。说明回归方程能较真实地反映各因素的影响,建立的模型与实际情况拟合度较好,因此利用响应面法优化毛云芝菌固体发酵培养条件是可行的。

参考文献(References):

- [1] 王希春,周晔燕,钱和. 高溶栓活性豆豉固态发酵工艺的响应面优化[J]. 食品科技,2007,(1):121—125.
WANG Xi-chun, ZHOU Ye-yan, QIAN He. Study on the solid state fermentation of Dou-chi with response surface analysis[J]. *Food Science and Technology*, 2007,(1):121—125. (in Chinese)
- [2] Pandey A, Selvakumar P, Soccol C R, et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes[J]. *Current Sci India*, 1999,77:149—162.
- [3] Pandey A, Azmi W, Singh J, et al. Types of fermentation and factors affecting it[J]. *Biotechnology: Food Fermentation, Educational Publishers & Distributors*, 1999, 77:383—426.
- [4] Couto S R, Toca-Herrera J L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(6): 558—569.
- [5] Rodríguez Couto S, Toca Herrera J L. Industrial applications of laccases: a review[J]. *Biotechnol Adv*, 2006,24: 500—513.
- [6] 赵敏,杨谦,宋小双,等. 真菌漆酶分子生物学研究进展[J]. 林产化学与工业,2005,25(1):115—120.
ZHAO Min, YANG Qian, SONG Xiao-shuang, et al. Advances of research on molecular biology of Laccase from fungi [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2005,25(1):115—120. (in Chinese)
- [7] Shin K S, Lee Y J. A novel extracellular peroxidase of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus* [J]. *Mycologia*, 2000,92: 537—544.
- [8] Shin K S, Lee Y J. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000,384: 109—115.
- [9] Madhavi S, Revankar S S Lele. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006,22: 921—926.
- [10] Couto S R, Sanroman M A N. Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions, application to lissamine green B decolourization[J]. *Journal of Food Engineering*, 2005,71:208—213.
- [11] Comez J, Pazos M, Couto S R, et al. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions[J]. *Journal of Food Engineering*, 2005,68: 315—319.
- [12] Hatvani N, Mecs I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process[J]. *Process Biochemistry*, 2001,37:491—496.
- [13] Maulin P S, Reddy C V, Banerjee R, et al. Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* sp. MPS-001 and *Aspergillus spp.* MPS-002)[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40:445—451.
- [14] 刘淑珍,钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究[J]. 微生物学报,2003,43(1):73—78.
Liu Shu-zhen Qian Shi-jun. Purification and properties of Laccase from *Basidiomycete* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003,43(1):73—78. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)