

响应面法优化黑曲霉产葡萄糖氧化酶发酵条件

范新蕾, 肖成建, 顾秋亚, 罗 玮, 余晓斌*

(江南大学 生物工程学院 / 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了提高葡萄糖氧化酶的产量,通过响应面法对诱变后的黑曲霉菌株的发酵条件进行优化,首先利用 Plackett-Burman 设计筛选出对酶活影响最显著的因素:牛肉膏蛋白胨、吐温-60 和磷酸氢二铵;继而用最陡爬坡实验逼近最大影响区域;最后利用 Box-Behnken 设计及其响应面分析确定最优的发酵培养基 (g/L): 蔗糖 87.5, 牛肉膏蛋白胨 3.15, NH_4NO_3 1.88, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.34, KH_2PO_4 0.25, Tw-60 30.47, 玉米粉 12.5, 培养基优化后的发酵酶活为 87.5 U/mL, 与优化前 (45.27 U/mL) 相比提高了 93.28%。在 7 L 发酵罐中对显著影响因素吐温-60 的不同添加时间进行对比,确定对数期流加吐温-60 可以显著提高发酵的酶活,发酵后酶活为 92.88 U/mL。

关键词: 葡萄糖氧化酶;响应面法;黑曲霉

中图分类号:Q 815 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)10—1096—05

Optimization of Glucose Oxidase Fermentation with *Aspergillus niger* by Response Surface Methodology

FAN Xinlei, XIAO Chengjian, GU Qiuya, LUO Wei, YU Xiaobin*

(School of Biotechnology / Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: For the purpose of improving the production of glucose oxidase, response surface methodology (RSM) has been employed to optimize the fermentation medium to improve glucose oxidase production by mutational *Aspergillus niger*. Firstly, a Plackett-Burman design was used to investigate the effects of different factors in the fermentation medium, with three most significant factors being identified as: beef extract peptone, Tw-60 and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Secondly, the steepest ascent procedure was employed to define the optimal response region for these three factors. Finally, the Box-Behnken method was employed to design the reaction system and the optimal fermentation medium for production of glucose oxidase consisted of the following (g/L): sugar 87.5, beef extract peptone 3.15, NH_4NO_3 1.88, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.34, KH_2PO_4 0.25, Tw-60 30.47, corn flour 12.5. Glucose oxidase production after optimization was increasing by a factor of about 93.28% from 45.27 U/mL to 87.5 U/mL. The different adding time of Tw-60 was investigated in 7 L fermentor. The result shows that adding Tw-60 to broth in logarithmic phase can improve glucose oxidase

收稿日期: 2014-02-26

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRPⅢA24)。

* 通信作者: 余晓斌(1965—), 男, 安徽芜湖人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。

E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

production remarkably, the total glucose oxidase activity reached 92.88 U/mL.

Keywords: glucose oxidase, response surface methodology, *Aspergillus niger*

葡萄糖氧化酶(简称 GOD)广泛存在于生物界,它能催化氧化 β -D-葡萄糖生成 D-葡萄糖- δ -内酯和过氧化氢,D-葡萄糖- δ -内酯在有氧的条件下会自发转化为葡萄糖酸^[1-2]。葡萄糖氧化酶有广泛的商业价值,它可以应用于食品、医药、生物等各个领域^[3]。在食品中,加入葡萄糖和葡萄糖氧化酶^[2],可以达到除氧的效果,从而达到抑制杂菌生长、延长食物的保存期的目的。在制药行业可以用于制作血糖和尿糖试纸,用于检测葡萄糖的含量^[4]。目前葡萄糖氧化酶的获得主要来自于真菌类的发酵菌株,如黑曲霉和青霉^[6-7]。

作者以黑曲霉 PCTC-8 作为出发菌株,利用响应面实验设计确定最优的发酵培养基,目的在于提高菌株产葡萄糖氧化酶的能力^[8-9]。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 黑曲霉活化培养基(PDA) 马铃薯 200(加水 1 L,煮沸 30 min,用两层纱布过滤,补水至 1 L),葡萄糖 20 g/dL,琼脂 20 g/dL。

1.1.2 种子培养基(g/L) 蔗糖 70,蛋白胨 10, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4, Tw-60 15,玉米粉 15,自然 pH。

1.1.3 发酵培养基(g/L) 葡萄糖 100,硫酸铵 15,蛋白胨 5, Tw-60 15,玉米粉 15,碳酸钙 15, pH 5.5。

1.2 酶活方法测定

在有氧条件下,葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖生成葡萄糖酸和 H_2O_2 , H_2O_2 和邻联茴香胺在辣根过氧化物酶作用下显色。利用分光光度计在 525 nm 处测定其吸光值,根据酶活和吸光值的关系测定葡萄糖氧化酶的活性^[10]。37 °C 下,每 1 min 内催化产生 1 μmol H_2O_2 所需酶量做为 1 个酶活单位。

1.3 胞内酶活测定方法

将发酵液于 8 000 r/min 下离心 15 min,取 2 g 左右湿菌丝体稀释至 10 mL,在功率为 35%(总功率为 1 800 w),超声 1 s 间歇 2 s 的条件下超声处理 25 min,测其酶活,即为胞内酶活。

1.4 培养基优化方法

1.4.1 Plackett-Burman 设计 Plackett-Burman 实

验是一种非常简便快捷的二水平实验方法,仅需较少的实验组别就可以从众多影响因素中筛选出显著影响因素,本实验在前期单因素实验的基础上利用 Plackett-Burman 设计对发酵培养基中磷酸氢二铵、磷酸二氢钾、牛肉膏蛋白胨、吐温-60、蔗糖、碳酸钙、硝酸铵、玉米粉 8 个影响因素进行考察,每个因素分为高低两个水平^[11]。

1.4.2 最陡爬坡实验 当 Plackett-Burman 实验结果筛选出对葡萄糖氧化酶产量影响显著的因素后,设定步长,快速逼近最佳区域。

1.4.3 Box-Behnken 实验设计 根据最陡爬坡实验结果确定显著影响因素质量浓度的取值区间,然后利用 Design-Expert 软件进行 Box-Behnken 实验设计,并对其结果进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 设计筛选显著影响因素

通过对培养基成分的单因素优化实验确定出最适宜的碳源、氮源以及无机盐,然后采用 Plackett-Burman 设计确定对葡萄糖氧化酶合成影响最显著的因素,以下将从 8 个影响因素(外加 3 个空白因素)中确定。每个因素有高水平 and 低水平 2 个水平,高水平是低水平的 1.5 倍,实验设计及其设计结果如表 1~2。

根据表 2 中的结果,利用 Design-Expert 软件对各因素及其水平进行主效应分析,筛选出影响最显著的因素为吐温-60,牛肉膏蛋白胨,磷酸氢二铵。由于葡萄糖氧化酶多数存在于胞内,而吐温-60 作为表面活性剂可以改善细胞通透性,从而促进胞内酶活的释放,达到提高酶活的目的,以下将对 3 个显著影响因素进行优化。

2.2 最陡爬坡实验结果

响应面拟合方程需要在响应因素的临近区域才能显示其真实情况,故而先通过最陡爬坡试验逼近最大酶活区域^[11]。根据 Plackett-Burman 设计筛选出显著影响因素,并设计其步长,其余因素选 Plackett-Burman 试验中高水平 and 低水平的中间值。以下实验选用 Plackett-Burman 试验中的 1/5 步长进行爬坡试验设计,实验设计及其结果如表 3 所示。

表 1 Plackett–Burman 设计筛选各因素及其水平
Table 1 Factors levels of the Plackett–Burman design

因子	名称	质量浓度/(g/L)		低水平	高水平
		实际低值	实际高值		
A	碳酸钙	30	45	−1	+1
B	磷酸氢二铵	0.4	0.6	−1	+1
C	磷酸二氢钾	0.2	0.3	−1	+1
D	硝酸铵	1.5	2.3	−1	+1
E	玉米粉	10	15	−1	+1
F	牛肉膏蛋白胨	5	7.5	−1	+1
G	吐温−60	15	22.5	−1	+1
H	蔗糖	70	105	−1	+1
I	空白因素			−1	+1
J	空白因素			−1	+1
K	空白因素			−1	+1

表 2 Plackett–Burman 实验设计的结果
Table 2 Results of the Plackett–Burman design

序号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	全酶活/ (U/mL)
1	−1	−1	−1	+1	−1	+1	+1	−1	+1	+1	+1	50.67
2	+1	+1	−1	+1	+1	+1	−1	−1	−1	+1	−1	31.81
3	+1	+1	−1	−1	−1	+1	−1	+1	+1	−1	+1	35.58
4	−1	+1	+1	+1	−1	−1	−1	+1	−1	+1	+1	28.52
5	−1	+1	+1	−1	+1	+1	+1	−1	−1	−1	+1	50.16
6	+1	−1	−1	−1	+1	−1	+1	+1	−1	+1	+1	45.46
7	−1	−1	+1	−1	+1	+1	−1	+1	+1	+1	−1	40.28
8	+1	−1	+1	+1	+1	−1	−1	−1	+1	−1	+1	32.75
9	+1	−1	+1	+1	−1	+1	+1	+1	−1	−1	−1	51.11
10	+1	+1	+1	−1	−1	−1	+1	−1	+1	+1	−1	44.05
11	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	32.75
12	−1	+1	−1	+1	+1	−1	+1	+1	+1	−1	−1	34.16

表 3 最陡爬坡实验设计及其结果
Table 3 Experimental design of steepest ascent path and results

序号	吐温/(g/L)	牛肉膏蛋白胨/(g/L)	磷酸氢二铵/(g/L)	全酶活/(U/mL)
1	22.5	5.5	0.50	57.21
2	24.0	5.0	0.46	59.86
3	25.5	4.5	0.42	56.56
4	27.0	4.0	0.40	50.45
5	28.5	3.5	0.36	57.51
6	30.0	3.0	0.32	69.27
7	31.5	2.5	0.28	68.20

由以上结果可知最高酶活在第 6 组实验附近，故而将第 6 组做为中心点，即吐温−60 30 g/L 牛肉膏蛋白胨 3 g/L,磷酸氢二铵 0.32 g/L。

2.3 响应面实验设计确定显著影响因素的最优值
根据最陡爬坡试验确定的中心点,确定响应面中各因素及其水平,采用 Box–Behnken 设计。利用

Design-Experts 软件对表 6 的结果进行多元回归分析,得到的二阶回归方程为

$Y = 83.05 + 6.39A + 13.08B + 6.88C - 2.41AB - 0.54C - 4.31BC - 7.88A^2 - 8.82B^2 - 6.48C^2$, 其中 Y 为葡萄糖氧化酶的酶活。

根据回归方程绘制出响应面分析图。由图 1 可以看出,曲面具有最高值点,即二阶回归方程有极大值,方程在极值点处对应条件为最佳发酵条件。利用 Design-Experts 软件对回归方程求得最大值,也就是牛肉膏蛋白胨,磷酸氢二铵,吐温-60 的质量浓度分别为 3.15、0.34、30.47 g/L,实验模型预测的最大值为 89.16 U/mL。

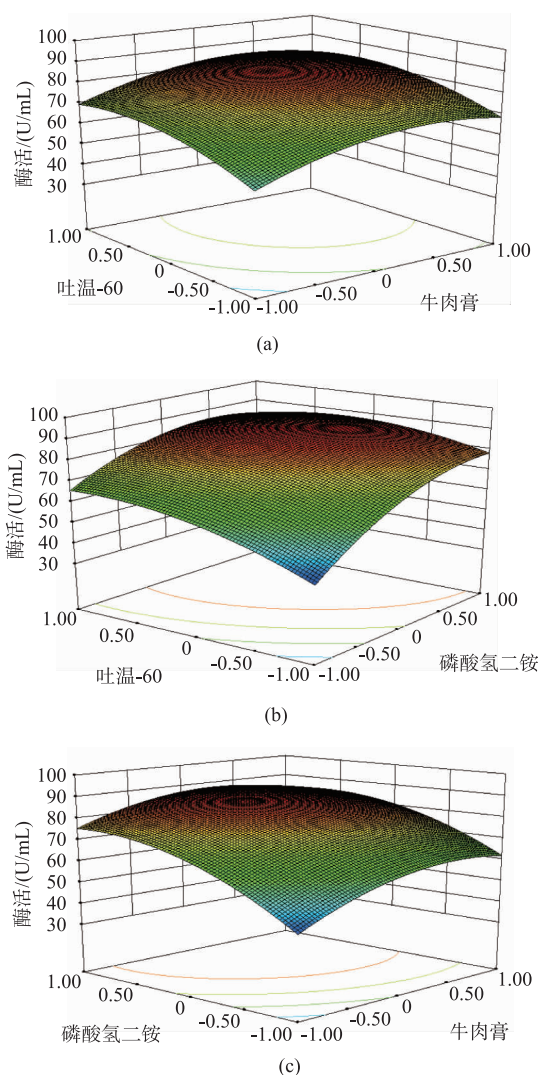


图 1 各因素交互影响酶活的曲面图

Fig. 1 Response surface plot for the alternative effects of factors on enzyme activity

2.4 验证试验

在 250 mL 挡板摇瓶中利用优化的发酵培养基对该模型的预测值进行实验验证,4 组平行实验的结果依次为 87.17、88.65、86.33、87.65 U/mL,其平均值为 87.5 U/mL,与模型预测值基本吻合,这能够有力地说明该实验选用的模型是合理的^[1]。优化后葡萄糖氧化酶的活力较优化前(45.27 U/mL)相比提高了 93.28%。

2.5 7 L 发酵罐中考察吐温-60 添加时间对产酶的影响

由响应面优化结果可知,吐温-60 是影响黑曲霉产葡萄糖氧化酶的最显著因素,但由于吐温对于菌体具有一定毒性,其添加时机的不同会对菌体生长及产酶造成影响。拟分别在发酵前、对数生长期、稳定期添加吐温-60。在 7 L 发酵罐中考察发酵前(0 h)添加吐温-60、发酵稳定期(32 h)添加吐温-60 以及发酵对数期(8~24 h)流加添加吐温-60 3 种添加方式对黑曲霉产 GOD 的影响。溶氧设定为 30%,转速的最高值为 800 r/min,溶氧与转速相偶联。

由图 2 可知,就不同添加时间而言,对数期流加吐温更有利于菌体酶活的提高,发酵前次之,稳定期加入效果最差。稳定期、对数期、前期添加吐温对应的最高酶活分别为 42.87、92.88、62.18 U/mL。另外,在发酵前期一次性添加吐温更易起泡,泡沫溢顶容易造成染菌,而对数生长期缓慢流加可有效控制起泡情况。综上所述,因而选择在对数生长期流加吐温对于菌体产酶无疑是最为有利的。

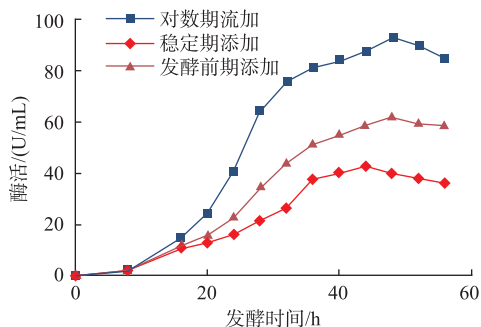


图 2 不同时间添加吐温对酶活的影响

Fig. 2 Influence of different TW-60 adding time on the enzyme activity

吐温-60 作为一种表面活性剂对于菌体的影响主要体现在它对菌体细胞膜通透性的改变,在不影响菌体生长繁殖的情况下加入一定量吐温-60 可明显增大细胞膜的通透性。吐温-60 通过拮抗脂肪酸

合成,导致磷脂合成不足,从而导致细胞膜的通透性改变^[12]。由图3的产酶数据可知,在发酵0 h一次性添加吐温-60将会对菌体造成较大的毒害作用,菌体生长及后续产酶都会受到不利影响,因而酶活偏低;而稳定期的菌体的活力较强,吐温-60对菌体的伤害较小,且稳定期群体生长速率下降,导致吐温-60对细胞膜的作用下降,胞内积累的葡萄糖氧化酶反馈抑制菌体持续产酶,从而导致酶活不高;在对数生长期缓慢流加吐温无疑对于细胞的生长和产酶都是较为有利的,流加操作既能解决高浓度吐温-60对菌体细胞的毒害作用,又能持续的改变

细胞膜的通透性,便于胞内酶活的释放,解除产物抑制,从而提高 GOD 产量。

3 结 语

作者利用 PB 实验确定出对发酵影响最大的3个因素:牛肉膏蛋白胨、磷酸氢二铵、吐温-60,然后进行爬坡实验逼近响应面的中心区域,最后通过 BB 实验确定3个主要因素的最优值:牛肉膏蛋白胨 3.15,磷酸氢二铵 0.34,吐温-60 30.47。优化后发酵酶活为 87.5 U/mL,与优化前相比提高了 93.28%。

参考文献:

- [1] 杨超,李春震,谭天伟. 响应面法优化黑曲霉产葡萄糖氧化酶条件[J]. 北京化工大学学报,2011,38(1):97-100.
YANY Cao,LI Chunzhen,TAN Tianwei. Optimization of glucose oxidase production by fermentation with *Aspergillus niger* using a response surface method[J]. **Journal of Beijing University of Chemical Technology**,2011,38(1):97-100.(in Chinese)
- [2] LIU Jianzhong,WENG Liping,ZHANG Qianling,et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,2003,19:317-323.
- [3] 刘虎军,罗玮,范新蕾,等. 黑曲霉中葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(6):615-621.
LIU Hujun,LUO Wei,FAN Xinlei,YU Xiaobin,et al. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* PCTC in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(6):615-621.(in Chinese)
- [4] Bankar S B,Bule M V,Singhal R S,et al. Glucose oxidase—an overview[J]. **Biotechnology Advances**,2009,27(4):489-501.
- [5] 谭莹,童群义. 均匀设计优化葡萄糖氧化酶发酵培养基[J]. 食品工业科技,2012,33(6):233-235.
TAN Ying,TONG Qunyi. Optimization of fermentation medium of glucose oxidase by uniform design methodology [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2012,33(6):233-235.(in Chinese)
- [6] Sukhacheva M V,Davydova M E,Netrusov A I. Production of *Penicillium funiculosum* 433 glucose oxidase and its properties[J]. **Applied Biochemistry and Microbiology**,2004,40(1):25-29.
- [7] 刘超,袁建国,王元秀,等. 葡萄糖氧化酶的研究进展[J]. 食品与药品,2010,12(7):285-289.
LIU Chao,YUAN Jianguo,WANG Yuanxiu,et al. Progress on Glucose Oxidase [J]. **Food and Drug**,2010,12 (7):285-289.(in Chinese)
- [8] Bankar S B,Bule M V,Singhal R S,et al. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase[J]. **Food and Bioprocess Technology**,2009,2(4):344-352.
- [9] Liu J Z,Weng L P,Zhang Q L,et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2003,19(3):317-323.
- [10] Singh O V. Mutagenesis and analysis of mold *Aspergillus niger* for extracellular glucose oxidase production using sugarcane molasses[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2006,135(1):43-57.
- [11] 山琳,张卫兵,梁琪,等. 响应面法优化米曲霉产 β -半乳糖苷酶固体发酵培养基[J]. 食品工业科技,2013,34(17):189-192.
SHAN Lin,ZHANG Weibing,LIANG Qi,et al. Optimization solid state culture medium to produce β -galactosidase from *Aspergillus Oryzae* by response surface methodology[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2013,34(17):189-192.(in Chinese)
- [12] 魏娜,李柏林,欧杰. 细胞膜通透性调节在发酵代谢中的重要性[J]. 食品科技,2006,31(9):14-17.
WEI Na,LI Bailin,OU Jie. Role of cell membrane permeability control on fermentation metabolic [J]. **Food Science and Technology**,2006,31(9):14-17.(in Chinese)