

# 响应面法优化黑曲霉产葡萄糖氧化酶条件

杨超 李春震 谭天伟\*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘要:** 运用响应面法对黑曲霉(*Aspergillus niger*)产葡萄糖氧化酶以及发酵条件进行了优化。根据单因素实验结果,利用 Plackett-Burman 设计对影响其产酶相关因素进行评估并筛选出具有显著效应的3个因素:葡萄糖、玉米浆和碳酸钙。用最陡爬坡试验逼近以上3个因子的最大响应区域后,采用 Box-Behnken 设计以及响应面分析法,确定其优化后发酵条件为(g/L):葡萄糖 172.11、玉米浆 11.05、碳酸钙 52.29、牛肉蛋白胨 3.5、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  0.5、KCl 0.15、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125, 220 r/min, 30℃培养48 h。优化后的葡萄糖氧化酶酶活达786.3 U/g,比在种子培养基中酶活350.5 U/g提高了2倍左右。

**关键词:** 黑曲霉; 葡萄糖氧化酶; 响应面法

**中图分类号:** Q815

## 引言

葡萄糖氧化酶(GOD)广泛地分布在动物、植物和微生物的体内,能在有氧条件下催化 $\beta$ -D-葡萄糖生成葡萄糖酸和过氧化氢。

葡萄糖酸系列保健产品的传统的发酵生产工艺存在高污染高耗能,将逐步被酶法新工艺所取代<sup>[1]</sup>。目前国内利用新工艺生产所需的葡萄糖氧化酶主要依靠进口,所以葡萄糖氧化酶的国产化将是新工艺普及的瓶颈所在。黑曲霉由于含有大量的葡萄糖氧化酶,故而能高效地将葡萄糖转化为葡萄糖酸,目前在葡萄糖酸的发酵生产中广泛使用黑曲霉作为发酵菌种<sup>[2]</sup>。同样,黑曲霉也被用来发酵生产葡萄糖氧化酶,但是目前酶活普遍较低,多在2~7 U/mL<sup>[3-5]</sup>。

本文首次通过前期单因素实验对影响黑曲霉产葡萄糖氧化酶的碳源氮源进行了单因素筛选得出最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为玉米浆,后利用响应面法(RSM)<sup>[6]</sup>对黑曲霉产葡萄糖氧化酶发酵条件进行了优化。运用 Plackett-Burman 设计<sup>[7]</sup>、最陡爬坡

实验<sup>[8]</sup>以及 Box-Behnken<sup>[8]</sup>设计和 RSM 法得到黑曲霉产葡萄糖氧化酶发酵培养基。所有实验设计和结果的统计分析由 Minitab 15.0 统计软件辅助完成。

## 1 实验部分

### 1.1 菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*),实验室保存。

### 1.2 培养基

种子培养基(100 mL):葡萄糖 5 g、KCl 0.02 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.015 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.012 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.06 g、酵母浸粉 0.3 g、大豆蛋白胨 0.2 g、琼脂粉 2 g。

### 1.3 黑曲霉的培养条件

取培养3 d以上含成熟孢子的斜面,用接种环刮下孢子,放到装有玻璃珠的适量无菌水的摇瓶中,摇床振荡30 min将孢子打散,用灭菌过的脱脂棉或纤维滤纸过滤掉菌丝,即得到单孢子悬浮液。显微镜计数,数量级维持在 $10^7$  mL<sup>-1</sup>。

接种量为10%,装液量为50 mL(250 mL三角瓶),30℃、220 r/min,培养48 h。所有培养基116℃,灭菌25 min。

### 1.4 葡萄糖氧化酶酶活分析方法

利用酶联显色反应体系结合酶标仪测定540 nm吸光度<sup>[9]</sup>。单位时间内催化1  $\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需要酶量为一个酶活单位。比酶活为每g干菌体所含酶活单位。

收稿日期: 2010-04-06

基金项目: 国家“973”计划(2007CB707804);国家自然科学基金(20876012);北京市自然科学基金(2071002)

第一作者: 男,1986年生,硕士生

\* 通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

## 2 结果与讨论

### 2.1 Plackett-Burman 设计筛选影响产酶因子

经过之前单因素等预实验确定的各个因素的水平,采用 Plackett-Burman 设计从 8 个影响因素(加入 3 个空白因素)中筛选出具有显著影响因素。每个因素取 2 个水平:即高水平和低水平。实验设计及结果如表 1~2 所示。

表 1 Plackett-Burman 实验设计各因素水平  
Table 1 Factors levels of the Plackett-Burman design

因子	名称	单位	实际低值	实际高值	低水平	高水平
A	葡萄糖	g/L	50.00	200.00	1	-1
B	牛肉蛋白胨	g/L	2.00	5.00	1	-1
C	玉米浆	g/L	5.00	10.00	1	-1
D	$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	g/L	0.30	0.60	1	-1
E	$\text{CaCO}_3$	g/L	40.00	50.00	1	-1
F	KCl	g/L	0.10	0.20	1	-1
G	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g/L	0.10	0.15	1	-1
H	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g/L	0.10	0.15	1	-1
I	空白因素	g/L			1	-1
J	空白因素	g/L			1	-1
K	空白因素	g/L			1	-1

表 2 Plackett-Burman 实验设计结果  
Table 2 Results of Plackett-Burman design

序号	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	酶活/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	119.5
2	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	355.5
3	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	220.4
4	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	244.5
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	204.8
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	252.0
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	239.9
8	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	202.2
9	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	239.7
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	166.1
11	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	175.2
12	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	187.1

针对以上结果,利用 Minitab15.0 软件对实验因子及其对应的结果进行主效应分析表明,葡萄糖,玉米浆和碳酸钙为 3 个影响最为显著的因素,综合考

虑,对这 3 个因素进行下一步的优化。

### 2.2 最陡爬坡实验结果

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,所以应先逼近最大酶活区域后再建立有效的拟合方程。根据 Plackett-Burman 法筛选出的显著因子效应大小设计它们的步长,进行最陡爬坡试验是必要的,以期寻找到最大酶活区。其它因素选用 Plackett-Burman 实验中“1”和“-1”水平的平均值。本实验采用 Plackett-Burman 法的 1/5 步长进行实验设计。实验设计和结果如表 3 所示。

表 3 最陡爬坡试验设计和结果  
Table 3 Experimental design and results of steepest ascent

实验序号	$\rho/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$			酶活/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
	葡萄糖	玉米浆	碳酸钙	
1	200	10.0	50.0	458.5
2	170	11.0	52.0	521.9
3	140	12.0	54.0	261.3
4	110	13.0	56.0	250.7
5	80	14.0	58.0	282.1
6	50	15.0	60.0	107.4
7	20	16.0	62.0	64.6

由以上结果可知,最大酶活产量在第 2 次实验附近,故选其做为中心点,葡萄糖、玉米浆、碳酸钙质量浓度分别为 170 g/L、11 g/L 和 52 g/L。

### 2.3 响应面设计确定显著影响因子的最佳值

根据最陡爬坡确定的实验因素中心点,设计的响应面因素及水平如表 4 所示,采用 Box-Behnken 设计,其结果如表 5 所示。

表 4 响应面设计的因素和水平  
Table 4 Range of different factors invested in RSM

编码	因素	水平		
		-1	0	1
A	$\rho_{\text{葡萄糖}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	200	170	140
B	$\rho_{\text{玉米浆}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	12	11	10
C	$\rho_{\text{碳酸钙}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	54	52	50

利用软件 Minitab15.0 对实验结果进行分析,得到二次线性回归方程为

$$Y(\text{GOD}) = 801.4 + 23.725A - 24.100B - 24.075C - 173.738A^2 - 227.587B^2 - 209.088C^2 - 24.175AB + 12.025AC + 14.475BC$$

表 5 Box-Behnken 响应面实验设计  
Table 5 Box-Behnken design and response value

实验序号	水平			酶活/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
	葡萄糖	玉米浆	碳酸钙	
1	0	-1	1	405.9
2	0	1	1	679.1
3	-1	0	-1	444.8
4	0	-1	-1	452.0
5	1	0	1	844.7
6	1	-1	0	502.3
7	0	0	0	416.4
8	0	1	-1	880.4
9	0	0	0	466.3
10	1	1	0	366.6
11	1	0	-1	388.5
12	0	0	0	333.9
13	-1	1	0	450.8
14	-1	-1	0	463.0
15	-1	0	1	369.9

对结果进行方差分析表明,二次项的  $AA$ 、 $BB$ 、 $CC$  影响是显著的,其余项的影响不显著。出回归方程达到 0.008 的显著统计程度,说明回归方程具有较好的拟合度。因此,可以用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。决定系数为 93.31%,即回归方程中所有自变量的变化可以解释 93.31% 的因变量变化。这主要是是因为黑曲霉葡萄糖氧化酶破壁提取过程的影响因素很多,未计入方程的变量与回归方程的变量之间总会有交互作用,交互作用的累积对回归方程造成一定影响;另一方面是由于实验的过程中总会有不可避免的随机误差。根据回归方程求一阶偏导得  $Y$  极大值是在:  $A=0.0702$ ,  $B=-0.0584$ ,  $C=-0.0576$ ,也就是在葡萄糖,玉米浆,碳酸钙质量浓度分别为 172.11 g/L、11.05 g/L 和 52.29 g/L 时存在最大酶活为 801.4 U/g。在该条件下,对模型预测值进行实验验证结果为 786.3 U/g(3 次平均值),与模型预测值基本吻合,这能够有效地说明该实验选用的模型是合理的。

通过 Minitab 15.0 软件对上述回归方程绘制响应面曲线如图 1,分别表示在碳酸钙、玉米浆和葡萄糖取“0”水平时其余两个因素对酶活的影响。由图 1 可以看出,3 个因素的影响都很显著,表现为其坡度均很陡,与实验结果相符,存在极值的条件位于其

峰顶处。

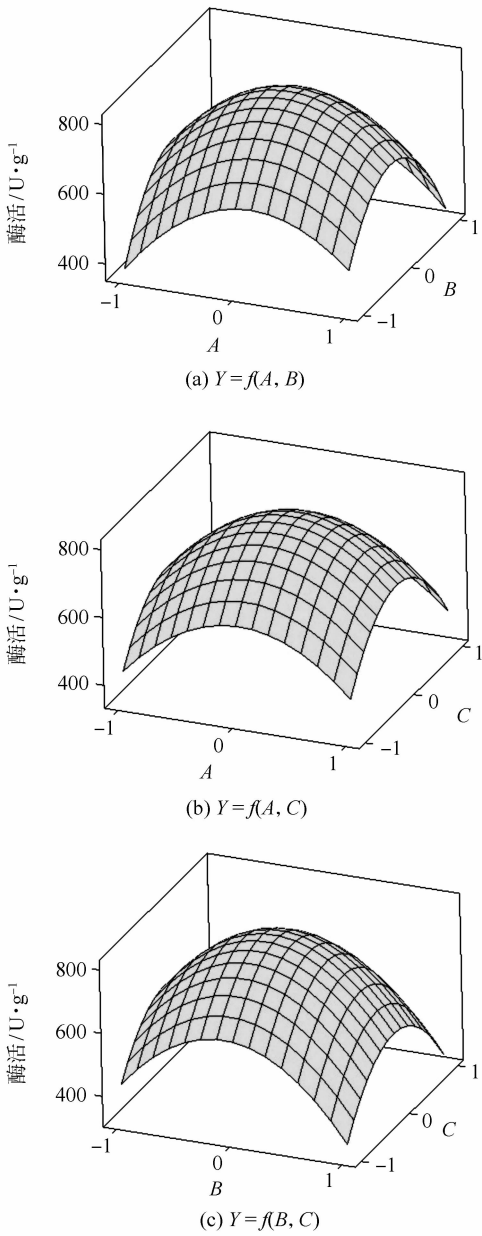


图 1 葡萄糖(A)、玉米浆(B)和碳酸钙(C)对酶活影响的响应曲面图

Fig. 1 Surface layer of the effects of glucose (A), corn steep liquor (B), and  $\text{CaCO}_3$  (C) on GOD production

### 3 结论

利用 P-B 设计和响应面法结合,对黑曲霉的产葡萄糖氧化酶条件进行优化后,得到最优发酵条件为(g/L): 葡萄糖 172.11, 玉米浆 11.05, 碳酸钙 52.29, 牛肉蛋白胨 3.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  0.5, KCl 0.15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125, 220 r/min, 30 ℃ 培养 48 h。优化后葡萄糖氧化酶的酶活

为可达 786.3 U/g, 比在种子培养基中的酶活提高了 2 倍。

#### 参考文献:

- [1] 周红伟, 姜锡瑞, 段刚. 酶法生产葡萄糖酸钙的新工艺[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7): 99-101.  
Zhou H W, Jiang X R, Duan G. A novel enzymatic process for calcium glucose production [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(7): 99-101. (in Chinese)
- [2] 黄腾华. 葡萄糖酸钙和葡萄糖酸钠发酵[J]. 发酵科技通讯, 2006, 35(3): 22-24.  
Huang T H. Calcium gluconate and sodium gluconate fermentation[J]. Fermentation Technology Communication, 2006, 35(3): 22-24. (in Chinese)
- [3] Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture[J]. Appl Microbiol, 2000, 89(1): 85-89.
- [4] Hatzinikolaou D G, Macris B J. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* [J]. Enzyme Microb Technol, 1995, 17: 530-534.
- [5] Lu T B, Peng X Y, Yang H Y, et al. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase [J]. Enzyme Microb Technol, 1996, 19: 339-342.
- [6] 杨实权, 张喜成, 刘军峰, 等. 响应面法优化酿酒酵母产油脂条件[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 91-95.  
Yang S Q, Zhang X C, Liu J F, et al. Response surface methodology to optimize lipid production conditions by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology, 2010, 37(1): 91-95. (in Chinese)
- [7] He Y Q, Tan T W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125 [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43: 9-14.
- [8] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 306-310.  
Liu D X, Ning X B, Zhang J L. Optimization of growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* via response surface methodology [J]. Microbiology, 2008, 35(2): 306-310. (in Chinese)
- [9] Luque R, Orejas M, Perotti N I, et al. pH control of the production of recombinant glucose oxidase in *Aspergillus nidulans* [J]. Appl Microbiol, 2004, 97: 332-337.

## Optimization of glucose oxidase production by fermentation with *Aspergillus niger* using a response surface method

YANG Chao LI ChunZhen TAN TianWei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Response surface methodology (RSM) has been employed to optimize the culture medium for glucose oxidase (GOD) production by *Aspergillus niger*. Firstly, according to the results of a mono-factor experiment, a Plackett-Burman design was used to investigate the effects of different factors in the ferment medium, with the three statistically significant factors being identified as: glucose, corn steep liquor and  $\text{CaCO}_3$ . 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. The results of the experiments were analyzed by RSM with Minitab 15.0 software. The optimal fermentation medium for production of GOD consisted of the following (g/L): glucose 172.11, corn steep liquor 11.05,  $\text{CaCO}_3$  52.29, beef peptones 3.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5, KCl 0.15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125, stirring rate of 220 r/min, with incubation at 30 °C for 48 h. GOD production after optimization was increased by a factor of about two, from 350.5 U/g to 786.3 U/g.

**Key words:** *Aspergillus niger*; glucose oxidase; response surface methodology