

响应面法优化斜卧青霉 Ju-A₁₀ 产 CMCase 的条件*

董锡文^{1,2} 杜春梅² 林建强^{1**} 曲音波¹

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)¹ (黑龙江省佳木斯大学 佳木斯 154007)²

摘要: 通过响应面分析法对 Ju-A₁₀ 利用不同植物纤维废弃物为碳源生产 CMCase 条件进行优化, 结果显示碳源分别为谷秸、麦秸和造纸废渣, 碳源水平分别在 9.77%、8.69%、9.97%, 300mL 三角瓶装液量分别为 64.7 mL、54.2 mL、40.8 mL 时, CMCase 为最高, 分别为 29.26 IU/mL、29.14 IU/mL、29.81 IU/mL。R² 分别达到了 0.9117、0.9246、0.8655, 说明发酵预测模型可靠性较高, 可应用于培养条件的优化。

关键词: 响应面分析法, 斜卧青霉, 优化, CMCase

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0031-05

Application of Response Surface Analysis (RSA) in Fermentation Condition Optimization of *Penicillium decumbens* Ju-A₁₀ for CMCase Production*

DONG Xi-Wen^{1,2} DU Chun-Mei² LIN Jian-Qiang^{1**} QU Yin-Bo¹

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)¹

(Jiamusi University, Heilongjiang Province, Jiamusi 154007)²

Abstract: Fermentation condition optimization of *P. decumbens* Ju-A₁₀ for production of CMCase using three kinds of plant cellulosic wastes as carbon sources was made using RSA method. The result was that CMCase was the highest when the level of carbon source was 9.77%, 8.69% and 9.97%, and liquid volume was 64.7 mL, 54.2 mL, 40.8 mL for carbon sources of millet straw, wheat straw and paper sludge, respectively. The value of CMCase was 29.26 IU/mL, 29.14 IU/mL, 29.81 IU/mL, respectively, in the above cases. The value of R² is 0.9117, 0.9246, 0.8655, respectively. It could be concluded that the fermentation models were quite reliable. The method can be applied in optimization of fungi fermentation medium.

Key words: Response surface analysis, *Penicillium decumbens*, Optimization, CMCase

响应面分析法 (Response Surface Analysis, RSA) 是常用的一种实验分析方法, 是综合实验分析和数学建模的经济合理的分析方法, 已得到广泛的认可并大量应用于微生物实验分析中^[1-3]。斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) Ju-A₁₀ 是纤维素酶高产菌株, 已进行了许多理论与应用方面的研究^[4-9], 为使其更好地应用于工业化生产, 本文利用 RSA 实验分析方法研究该菌利用不同废弃植物纤维性物质生产纤维素酶培养条件的优化。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

斜卧青霉 (*P. decumbens*) Ju-A₁₀ 由本实验室提供。

* 国家自然科学基金资助 (No. 30270044)

国家重点基础研究专项经费 (“973” 项目) (No. 2003CB716006, No. 2004CB719702)

** 通信作者 Tel: 0531-88364216, E-mail: jianqianglin@sdu.edu.cn

收稿日期: 2005-07-22, 修回日期: 2005-08-24

1.2 培养基

斜面培养基: 10% 麸皮浸出液, 琼脂 2%, 自然 pH。

摇瓶发酵培养基: 加浓的 Mandels 营养盐培养基^[4], 碳源是麦秸或谷秸的粉碎物或造纸废渣, 氮源与生长因子为 2% 的麸皮。

1.3 接种及培养

孢子悬液 ($\times 10^6$ 个孢子/mL) 接种, 每 300mL 三角瓶中加 1mL, 往复式摇床 120r/min, 30℃ 培养。

1.4 酶活测定方法

发酵液样品 10,000r/min 离心 30min, 上清液适当稀释后, 取 0.5mL, 加 1% 羧甲基纤维素钠 0.5mL, 50℃ 反应 5min, 100℃ 加热中止反应, 冷却至室温, 加蒸馏水至 25mL, DNS 法测定还原糖并计算酶活力单位^[10], 还原糖比色测定采用微板光谱仪, (SPECTRA MAX190, USA), 波长为 550nm。酶活力定义采用国际标准单位 (IU), 即每分钟释放 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位。

1.5 试验设计

试验采用 Box-Wilson 中心组合设计及响应面分析 (RSA)。碳氮比对真菌的生长具有显著的影响, 在氮源不变而足量^[7]的情况下, 改变碳源的比例, 将直接改变 C/N 比, 而装液量也是微生物生长的重要影响条件, 因此对碳源浓度和装液量 2 因素进行 5 水平试验设计, 试验的编码水平与编码设置如表 1。

表 1 试验的编码水平与编码设置

编码水平	谷	秸	麦	秸	造纸废渣	
	水平 (%)	装液量 (mL)	水平 (%)	装液量 (mL)	水平 (%)	装液量 (mL)
-1.414	8.6	38.8	7.6	21.8	8.6	25.9
-1	9.0	45.0	8.0	30.0	9.0	30.0
0	10.0	60.0	9.0	50.0	10.0	40.0
+1	11.0	75.0	10.0	70.0	11.0	50.0
+1.414	11.4	81.2	10.4	78.2	11.4	54.1

2 结果与讨论

2.1 不同碳源的设计及结果

根据表 1 的设计, 中心点采用 5 次重复进行碳源浓度和装液量的试验, 每组试验进行 2 次重复, 误差控制在 5% 以内, CMCase 为实验的平均值。不同碳源的试验结果见表 2~4。

表 2 谷秸粉为碳源的实验设计及结果

序 号	水 平 (%)		装瓶量 (mL)		Y_1/CMCase (IU/mL)
	X_1	编码值 x_1	X_2	编码值 x_2	
1	10	0	81.2	1.41	24.8
2	11	1	45	-1	18.6
3	10	0	60	0	28.6
4	11.4	1.41	60	0	16.7

续表 2

5	10	0	60	0	29.1
6	10	0	60	0	27.5
7	9	-1	45	-1	24.7
8	8.6	-1.41	60	0	22.8
9	10	0	38.8	-1.41	18.2
10	10	0	60	0	30.2
11	11	1	75	1	24.3
12	10	0	60	0	28.1
13	9	-1	75	1	26.1
R_1^2					0.9117

回归方程为: $Y_1 = 28.7 - 2.066 * X_1 + 2.054 * X_2 - 3.775 * X_1^2 + 1.075 * X_1 * X_2 - 2.900 * X_2^2$

表 3 麦秸粉为碳源的实验设计及结果

序 号	水 平 (%)		装瓶量 (mL)		$Y_1/CMCase$ (IU/mL)
	X_1	编码值 x_1	X_2	编码值 x_2	
1	9	0	78.2	1.41	22.2
2	10	1	30	-1	17.1
3	9	0	50	0	28.0
4	10.4	1.41	50	0	16.3
5	9	0	50	0	28.0
6	9	0	50	0	29.3
7	8	-1	30	-1	23.9
8	7.6	-1.41	50	0	24.6
9	9	0	21.8	-1.41	18.0
10	9	0	50	0	29.4
11	10	1	70	1	24.8
12	9	0	50	0	28.1
13	8	-1	70	1	25.7
R_2^2					0.9246

回归方程为: $Y_2 = 28.56 - 2.430 * X_1 + 1.930 * X_2 - 3.405 * X_1^2 + 1.475 * X_1 * X_2 - 3.580 * X_2^2$

表 4 造纸废渣为碳源的实验设计及结果

序 号	水 平 (%)		装瓶量 (mL)		$Y_1/CMCase$ (IU/mL)
	X_1	编码值 x_1	X_2	编码值 x_2	
1	10	0	54.1	1.41	22.1
2	11	1	30	-1	23.5
3	10	0	40	0	29.3
4	11.4	1.41	40	0	23.5
5	10	0	40	0	31.8
6	10	0	40	0	29.7
7	9	-1	30	-1	25.6
8	8.6	-1.41	40	0	24.9

续表 4

9	10	0	25.9	-1.41	20.7
10	10	0	40	0	28.7
11	11	1	50	1	27.1
12	10	0	40	0	29.4
13	9	-1	50	1	24.8
R_3^2					0.8655

回归方程为: $Y_3 = 29.78 - 0.222 * X_1 + 0.597 * X_2 - 2.178 * X_1^2 + 1.100 * X_1 * X_2 - 3.578 * X_2^2$

由表 2~4 可知,当谷秸、麦秸和造纸废渣三种碳源的水平分别在 10%、9% 和 10%,即碳氮比分别为 5:1、4.5:1、5:1,装液量分别在 60mL、50mL、40mL 时,其 CMCase 达最大值,中心点平均值分别为 28.7IU/mL、28.5IU/mL、29.78IU/mL。同时得到了 3 个预测模型及其复相关系数,其值分别为 $R_1^2 = 0.9117$, $R_2^2 = 0.9246$, $R_3^2 = 0.8655$,说明其模型的可靠性较高,可以用于发酵产酶预测。

2.2 响应面分析

将以上结果进行作图,得到不同碳源产 CMCase 的三维响应面分析图(图 1~3)。

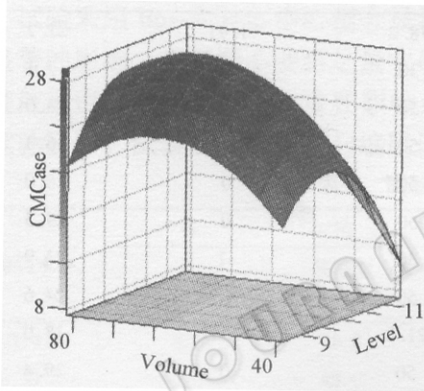


图 1 谷秸为碳源的响应面分析图

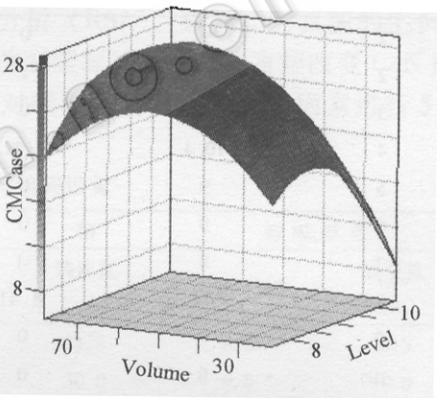


图 2 麦秸为碳源的响应面分析图

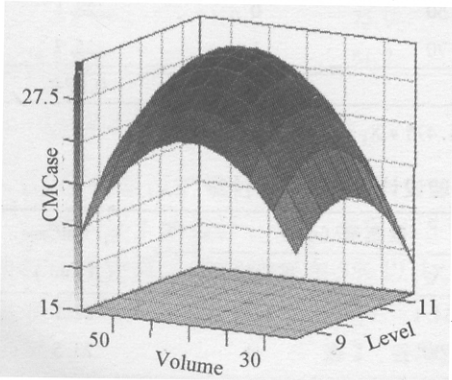


图 3 造纸废渣为碳源的响应面分析图

由图 1~3 可以看出,每个响应面都有一个最高点,即每个影响因子对于产酶都有一个最适条件,因此,可以在试验范围内进行最优点的寻取。

2.3 最优点的确定

将表 2~4 的结果利用 SAS 软件 (Statistical Analysis System (SAS), USA) 计算,可以得到不同碳源水平 (碳氮比) 和装液量的编码值,对其进行换算后得到不同碳源产 CMCase 的最佳优化条件如表 5。

表 5 碳源水平和装液量的寻优结果

碳 源	水平 (%)	装液量 (mL)	稳定 CMCase (IU/mL)
谷 秸	9.77	64.7	29.26
麦 秸	8.69	54.2	29.14
造纸废渣	9.97	40.8	29.81

由表5可以看出,优化后得到稳定的CMCase产量均高于设计中心点的平均值,此寻优结果可用于发酵生产。

3 结论

通过RSA法优化可知,Ju-A₁₀的发酵条件在不同的碳源利用中碳源水平和装液量对产CMCase的影响很大,在一定的发酵条件下,以谷秸、麦秸和造纸废渣为碳源,CMCase值可以分别达到29.26IU/mL、29.14IU/mL、29.81IU/mL,比发酵试验的均值有所提高,反映了Ju-A₁₀具有较高的产纤维素酶能力。

参考文献

- [1] 胡永红,沈树宝,欧阳平凯. 工业微生物, 2002, 32(1): 9~12.
- [2] 徐子钧,李 剑,梁凤来,等. 微生物学通报, 2004, 31(3): 85~87.
- [3] Greasham R L, Herber W K. Applied Microbial Physiology. London: Oxford University Press, 1997.
- [4] 曲音波,高培基,王祖农. 真菌学报, 1984, 3(4): 238~243.
- [5] 曲音波,高培基,王祖农. 微生物学报, 1988, 28(2): 121~130.
- [6] 曲音波,高培基,王祖农. 山东大学学报, 1987, 22(3): 97~104.
- [7] 曲音波,杜秉海,高培基. 工业微生物, 1992, 6(22): 1~6.
- [8] 杜秉海,曲音波,高培基. 现代微生物学进展. 武汉:武汉大学出版社, 1995. 237~244.
- [9] Wang D, Qu Y B, Gao P J. Biotechnol Lett, 1995, 17(6): 593~598.
- [10] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 北京:高等教育出版社, 1991. 22~24.