

粗糙脉孢菌产纤维素酶培养条件的优化

郭清华^{1,2}, 熊本涛^{1,2}, 陈少林^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 旱区生物质能研究中心, 陕西 杨陵 712100)

摘要:采用响应面优化法(RSM)与中心组合试验(CCD)对粗糙脉孢菌发酵产纤维素酶培养条件进行优化,以纤维素酶活力及蛋白浓度作为响应值,用 Design-Expert 设计温度、pH、转速 3 因素 20 次的响应面试验,建立回归模型,确定最佳的发酵条件是温度为 22.5℃、pH 为 6.25、转速为 200 r/min 时,羧甲基纤维素酶活性达到 1.23 mg/L,滤纸酶活性达到 1.55 mg/L,蛋白浓度达到 162.349 mg/L,可以提高粗糙脉孢菌产纤维素酶的能力。

关键词:响应面优化法;粗糙脉孢菌;纤维素酶

中图分类号:S763.15 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2018)02-0151-05

Optimization of Cellulase Production Conditions of *Neurospora*

GUO Qing-hua^{1,2}, XIONG Ben-tao^{1,2}, CHEN Shao-lin^{1,2*}

(1. College of Life Science, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Biomass Energy Center for Arid and Semi-arid Lands, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Response surface analysis method and central composite design was used to optimize the cellulase fermentation of *Neurospora crassa*. The activity of cellulase and protein concentration were used as the responses. A Design-Expert was adopted in which three factors and included three factors and twenty levels were included. A regression model was established. The optimal conditions were temperature 22.5℃, pH 6.25, rotational speed 200 r/min, under which CMCase, FPase, and protain concentration were 1.23 g/L, 1.55 g/L, and 162.349 mg/L, respectively, indicating that the cellulase production of *Neurospora crassa* was improved.

Key words: response surface analysis; *Neurospora crassa*; cellulase

丝状真菌再经长期的自然进化之后,成为降解植物生物质最有效的来源,也是目前商业化生产纤维素酶生产的主要菌种,如 *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*)^[1]。粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)作为一种模式生物已被研究几十年之久^[2],近些年来在纤维素降解以及糖转运蛋白方面取得了极其显著的成就^[3-5],并且含有里氏木霉(*Trichoderma reesei*)2 倍多的纤维素基因,可参与生物质降解^[6],而且国内外科学家亦从工业生产角度对粗糙脉孢菌进行研究,其中包括粗糙脉孢菌产乙醇发酵^[7]与蛋白表达^[8],其中山东大学曲音波教授对

粗糙脉孢菌黑色素分泌以及木糖发酵等做出了系统研究^[9-10],为使其更好地生产纤维素酶,本试验对其发酵条件进行进一步优化以提高其产量。

响应面分析法(response surface methodology, RSM)是一种寻找多因素系统中培养条件中最佳条件的数学统计方法,可以将多个变量影响的问题进行建模与分析,并根据其响应进行优化,与传统的单因素试验法(one variable at a time)、正交设计法(orthogonal design)等相比,具有缩短优化时间以及提高其可信度等优点,一般可以运用 placett-burman(PB)设计法或者 central composite design

收稿日期:2017-05-23 修回日期:2017-05-31

基金项目:西北农林科技大学引进人才启动项目。

作者简介:郭清华,女,在读硕士,研究方向:纤维素酶。E-mail:1429707005@qq.com

* 通信作者:陈少林,男,教授,研究方向:纤维素酶。E-mail:slc1916@icloud.com

(CCD)设计法^[11-12]。顾芮萌^[13]等利用响应面分析法对粗糙脉孢菌产纤维素酶培养基进行优化,并将酶活提高 2.08 倍;同时,响应面分析也被用作哈茨木霉培养基优化^[14]以及光叶蛋白提取工艺研究^[15]。本试验采用粗糙脉孢菌野生型菌 FGSC2498 作为研究对象,通过中心组合试验设计(CCD)优化试验中各因素影响提高纤维素酶活力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)野生型菌株 FGSC2489 购自 FGSC。

1.1.2 培养基 活化培养基(L):2% Vogel's salts,20 g 蔗糖,12 g 琼脂粉,自然 pH。

产酶培养基(L):2% Vogel's salts,20 g 微晶纤维素(Avicel),自然 pH。

Vogel's salts(L):3.76 g CaCl₂,126.72 g C₆H₅Na₃O₇,250 g KH₂PO₃,100 g NH₄NO₃,10 g MgSO₄·7H₂O,5 mL trace elements,2.5 mL 0.1 g/L 生物素溶液。

Trace elements(L):50 g C₆H₈O₇·H₂O,0.5 g Na₂MoO₄·2H₂O,50 g ZnSO₄·7H₂O,10 g Fe(NH₄)(SO)₂·6H₂O,2.5 g CuSO₄·5H₂O,0.5 g MnSO₄·H₂O,0.5 g H₃BO₃。

1.1.3 仪器与设备 TECAN infinite M200 PRO 酶标仪,上海南荣 NRY-2112 摇床,MAPADA UV-1800 紫外分光光度计,BIO-RAD T100 Thermal Cycler。

1.2 方法

1.2.1 粗糙脉孢菌培养方法 把整个发酵过程分成:菌丝生长阶段(利用蔗糖-Vogel's 培养基培养粗糙脉孢菌菌丝)和纤维素酶诱导阶段(利用 Avicel-Vogel's 培养基诱导纤维素酶),有利于提高纤维素酶的得率。具体方法如下:

在 250 mL 锥形瓶装入 50 mL 蔗糖-Vogel's 液体培养基,接入适当体积的孢子悬液,使孢子悬液终浓度 OD₆₀₀=0.04,于 30℃、200 r/min,暗光培养 24 h,将菌丝过滤后,接入 50 mL/250 mL Avicel-Vogel's 培养基发酵产酶。

1.2.2 纤维素酶活性及蛋白浓度测定 总蛋白的浓度测定(Bradford 试剂盒法):取 10 μL 上清液加入 96 酶标板微孔中,再加入 100 μL Coomassie Brilliant Blue dye,置于 Tecan 酶标仪,混匀后,静止反应 5 min,在 595 nm 波长处测量其 OD 值,以 BSA 标准曲线换算成蛋白质浓度。

FP 酶活的检测:在 96 孔板微孔中加入 90 μL

0.1 μmol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(pH 5.0),后加入 90 μL 上清液,最后再加入 1 张直径为 5 mm 的滤纸片,于水浴锅中 50℃反应 16 h。取 50 μL 上述反应液加入另一 96 微孔板孔的微孔中,再加入 100 μL DNS 反应液,在 PCR 仪 100℃反应 5 min。取 36 μL 上述反应液于酶标版,加入 160 μL 0.1 μmol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(pH 5.0),用酶标仪在 540 nm 波长测量其 OD 值,通过还原糖标准曲线计算其还原糖浓度和酶活。

CMC 酶活的检测:在 96 孔板微孔中加入 50 μL 2% CMC 溶液,然后再加入 50 μL 上清液接,于水浴锅中 50℃反应 30 min。再向上述反应液加入 100 μL DNS 溶液,在 PCR 仪 100℃反应 5 min。取 36 μL 上述反应液加入到酶标版的微孔中,最后加入 160 μL 0.1 μmol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(pH 5.0),用酶标仪在 540 nm 波长测量其 OD 值,通过还原糖标准曲线计算其还原糖浓度和酶活。

2 结果与分析

2.1 响应面分析法试验设计与结果

利用 Design Expert 8.0 软件的 CCD 试验设计,对温度、pH、转速等各因素进行设计,试验设计各因素水平如表 1 所示。

表 1 中心组合设计各因素水平

Table 1 Range of different factors investigated with CCD design						
因素	水平	$-1.468\ 7$ ($-\alpha$)	-1	0	+1	$+1.468\ 7$ ($+\alpha$)
温度	A	17.59	17.5	20	22.5	24.2
pH	B	5.57	5.75	6.0	6.25	6.42
转速	C	165.9	200	250	300	334

利用 Design Expert 8.0 软件进行响应面试验设计,对试验因素进行优化设计,分别以滤纸酶活(FPase)活性、羧甲基纤维素酶活(CMCase)活性以及蛋白浓度(protein concentration)为响应值,以温度、pH 值、转速为因变量,设计了 20 次试验以优化试验条件,得到的试验结果如表 2 所示,并对响应面曲面函数进行拟合。

通过 Design Expert 8.0 软件对表 2 数据进行分析,表 3 为方差分析结果。以蛋白浓度为响应值,对表 2 数据进行多元二次回归拟合,建立回归模型。回归方程为:

$$Y = 145.55 + 9.05A + 2.60B - 3.03C + 1.54AB - 5.01AC + 0.65BC + 1.55AA - 2.25BB - 0.39CC \quad (1)$$

以滤纸酶活性为响应值的回归方程为:

$$Y = 0.80 + 0.19A + 0.11143B - 0.17587C +$$

$$0.026\ 288AB-0.104AC+0.024\ 20BC-0.054\ 612AA$$
$$-0.117BB-0.024\ 39CC$$
$$(2)$$

$$Y=1.46+0.12A-6.520E-003B-0.070C-$$
$$9.986E-003AB-0.14AC+0.048BC-0.16AA-$$
$$0.11BB+7.635E-003CC$$
$$(3)$$

以羧甲基纤维素作为底物的酶活性相应值方程

为:

表 2 不同独立变量对响应值的影响

Table 2 Effect of different independent variables on response values

run	Space type	Factor1:Tem	Factor2:pH	Factor3: /(r·min ⁻¹)	CMCase: /(mg·L ⁻¹)	Protein: /(mg·L ⁻¹)	FPase: /(mg·L ⁻¹)
1	Center	20	6	250	0.927 552	147.111	1.438 18
2	Axial	15.795 5	6	250	0.300 78	134.54	1.111 47
3	Axial	20	6	334.09	0.473 275	140.841	1.251 54
4	Center	20	6	250	0.869 942	145.968	1.447 5
5	Factorial	22.5	5.75	300	0.358 852	138.437	1.240 73
6	Center	20	6	250	0.627 978	145.151	1.338 98
7	Factorial	17.5	5.75	300	0.195 163	136.802	1.005 67
8	Factorial	22.5	5.75	200	0.953 327	158.175	1.661 99
9	Factorial	22.5	6.25	200	1.237 5	162.349	1.552 04
10	Factorial	17.5	6.25	200	0.549 009	134.167	0.803 296
11	Factorial	17.5	5.75	200	0.480 951	132.183	0.880 879
12	Axial	24.204 5	6	250	0.971 324	167.817	0.915 11
13	Axial	20	5.579 55	250	0.273 362	135.079	1.167 08
14	Factorial	22.5	6.25	300	0.628 877	149.19	1.315 98
15	Axial	20	6.420 45	250	0.644 254	145.77	1.107 9
16	Axial	20	6	165.91	0.969 783	150.556	1.698 53
17	Center	20	6	250	0.931 814	149.611	1.625 36
18	Center	20	6	250	0.696 319	143.46	1.369 92
19	Factorial	17.5	6.25	300	0.470 99	137.437	1.128 44
20	Center	20	6	250	0.745 61	141.571	1.487 88

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variances for the developed regression equation

Source	Sun of Squares	<i>df</i>	Mean Square	<i>F</i> Value	<i>P</i> -value Prob> <i>F</i>	Significance level
Model	1.42	9	0.16	16.19	<0.000 1	Significant
A-Tem	0.50	1	0.50	51.35	<0.000 1	
B-pH	0.17	1	0.17	17.45	0.001 9	
C-rpm	0.42	1	0.42	43.48	<0.000 1	
AB	5.529E-003	1	5.529E-003	0.57	0.468 0	
AC	0.088	1	0.088	9.06	0.013 1	
BC	4.686E-003	1	4.686E-003	0.48	0.503 2	
A ²	0.043	1	0.088	4.42	0.061 7	
B ²	0.20	1	0.20	20.40	0.001 1	
C ²	8.547E-003	1	8.547E-003	0.88	0.369 6	
Residual	0.097	10	9.716E-003			
Lack of Fit	0.015	5	3.064E-003	0.19	0.955 1	Not
Pure Error	0.082	5	0.016			
Cor Total	1.51	19				

由表 3 可以看出,回归模型的 *F* 值为 16.19, $P<0.001$,表明此模型达到极显著水平;失拟项 (Lack of Fit)的 $P=0.955\ 1>0.05$,由此说明失拟项差异并不显著,本试验无失拟因素的存在,能准确反应实际情况,回归模型没有问题。而试验模型的决定系数 $R^2=1.42/1.51=0.940\ 39$,说明酶活及蛋白浓度与模型预测有很好的一致性,因此试验结

果可靠,此模型及回归方程可以对酶活及蛋白浓度进行分析及预测。回归方程中各项方差分析 *F* 检验值可以判断出本试验设计中各个自变量及其交互相对因变量的影响。由表 2、表 3 可得,温度与转速对响应值的影响最为显著,虽然 pH 对响应值的影响较弱,但仍是极其显著;而交叉项中,温度与转速有显著影响,而其余的 2 种交互相对结果的影响不

显著;二次项中 pH 对响应值的影响达到显著水平,而温度与转速对其影响不甚明显。

2.2 响应面分析

通过 Design-Expert 8.0 软件分析得到的响应面图,响应面图示根据试验因素因素温度及转速与响应值 CMC 酶活、FP 酶活、蛋白浓度构成三维曲面图。

由图 1~图 3 可知,温度与 pH 对响应值的影响不甚明显,并且可以得出温度为 22.5℃、pH 为 6.25、转速为 200 r/min 时,CMCase 达 1.23 mg/L,FPase 达 1.55 mg/L,蛋白浓度达162.349 mg/L,可以较高地提高粗糙脉孢菌产纤维素酶的能力。

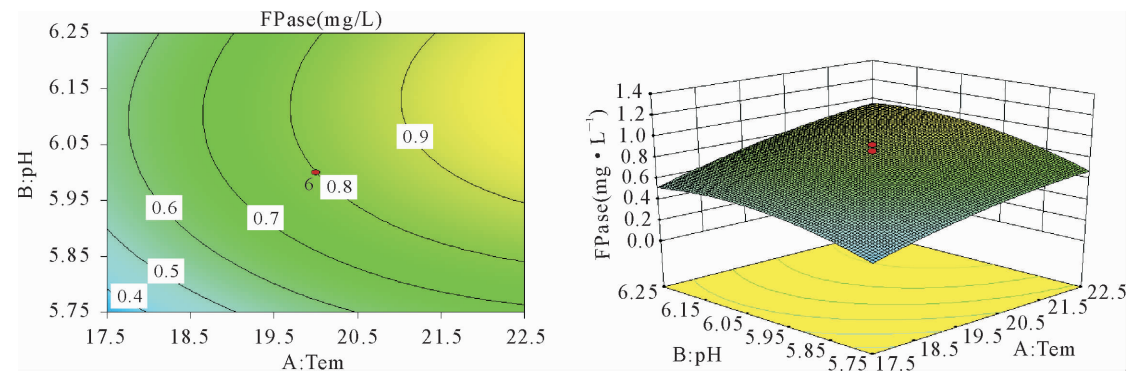


图 1 温度与 pH 对粗糙脉孢菌滤纸酶活的影响的等温线与响应面分析

Fig. 1 Surface and coutour plots of mutual-influence for temperature and pH on the yield of FPase activity

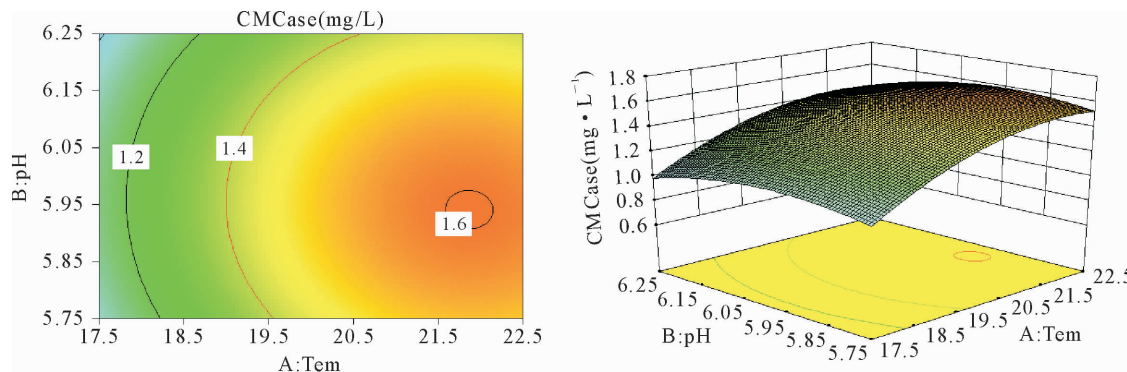


图 2 温度与 pH 对粗糙脉孢菌 CMC 酶活的影响的等温线与响应面分析

Fig. 2 Surface and coutour plots of mutual-influence for temperature and pH on the yield of CMCase activity

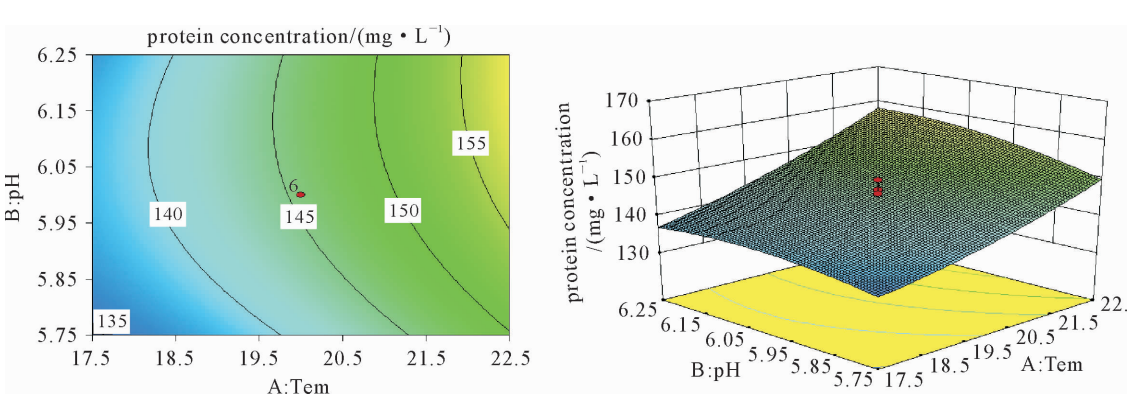


图 3 温度与 pH 对粗糙脉孢菌蛋白浓度的影响的等温线与响应面分析

Fig. 3 Surface and coutour plots of mutual-influence for temperature and pH on the protein concentration production

2.3 模型验证试验

表 4 为原始培养条件与优化后培养条件产酶结果对比,每个条件分别设置 3 个重复,初始产酶条件

为温度 25℃、转速为 200 r/min、pH 6.0。从表 4 可以看出,优化后培养条件将 CMCase 提高 34.4%,FPase 提高 60%,蛋白浓度提高 11.22%,极大地提高了 FP 酶活。

表 4 模型试验结果

Table 4 Results of modeling test

mg · L⁻¹

培养条件	CMCase	protein	FPase
原始培养条件	0. 915	145. 968	0. 970
优化培养条件	1. 230	162. 349	1. 550

3 结论与讨论

试验采用响应面分析法对粗糙脉孢菌这一模式菌株进行产纤维素酶发酵条件的优化,使其提高产纤维素酶的能力。根据响应面法设计的 3 因素 20 次试验的结果得出,温度为 20℃、pH 为 6. 25、转速为 200 r/min 时,可以较高地提高粗糙脉孢菌产纤维素酶的能力,此时 CMCase 达 1. 230 mg/L,FPase 达 1. 550 mg/L,蛋白浓度达 162. 349 mg/L。

在发酵条件试验的 3 个控制因素中,温度、转速对响应值的影响最为显著,其次是 pH,转速对响应值的影响比 pH 显著。转速可以影响发酵过程中的通气量,溶氧水平随着转速的提高而增加,溶氧水平可以极大促进粗糙脉孢菌发酵产酶。同时,随着转速升高,产生的作用力极易打断粗糙脉孢菌菌丝体,不利于发酵产酶^[16]。

本试验所使用的是摇瓶培养法,锥形瓶中条件控制较为欠佳,所以优化后的粗糙脉孢菌产纤维素酶能力的提高并不明显。而后期试验中计划将其接入发酵罐中,发酵罐中更为精密的控制条件及搅拌过程中更为充分的溶氧率,必能更好地提高粗糙脉孢菌产纤维素酶的能力。

参考文献:

[1] KUBICEK C P, MIKUS M, SCHUSTER A, *et al.* Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2(1): 19.

[2] DAVIS R H, PERKINS D D. *Neurospora*: a model of model microbes[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(3): 397-403.

[3] TIAN C, BEESON W T, IAVARONE A T, *et al.* Systems Analysis of Plant Cell Wall Degradation by the Model Filamentous Fungus *Neurospora crassa* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22157-62.

[4] ALLGAIER S, TAYLOR R D, BRUDNAYA Y, *et al.* Vaccine production in *Neurospora crassa* [J]. *Biologicals*, 2009, 37(3): 128.

[5] GALAZKA J M, TIAN C, BEESON W T, *et al.* Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 84.

[6] DUNLAP J C, BORKOVICH K A, HENN M R, *et al.* Enabling a community to dissect an organism; overview of the *Neurospora* functional genomics project [J]. *Advances in Genetics*,

2007, 57(12): 49.

[7] ALLGAIER S, TAYLOR R D, BRUDNAYA Y, *et al.* Vaccine production in *Neurospora crassa* [J]. *Biologicals*, 2009, 37(3): 128.

[8] ZHANG Z, QU Y, ZHANG X, *et al.* Effects of oxygen limitation on xylose fermentation, intracellular metabolites, and key enzymes of *Neurospora crassa*, AS3. 1602[M]// *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, 2007: 39-51.

[9] 李建波, 宋欣, 田敏, 等. 粗糙脉孢菌产黑色素条件优化及黑色素物理特性研究 [J]. *山东大学学报理学版*, 2004, 39(4): 120-124.

LI J B, SONG X, TIAN M, *et al.* Optimizing conditions of melanin production by *Neurospora crassa* and study of melanin physical character [J]. *Journal of Shandong University*, 2004, 39(4): 120-124. (in Chinese)

[10] 张潇, 朱冬青, 王丹, 等. 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 木糖发酵的研究 [J]. *微生物学报*, 2003, 43(4): 466-472.

ZHANG X, ZHU D Q, WANG D, *et al.* Study on xylose fermentation by *Neurospora crassa* [J]. *China Biotechnology*, 2003, 43(4): 466-472. (in Chinese)

[11] WU Q L, CHEN T, GAN Y, *et al.* Optimization of riboflavin production by recombinant bacillus subtilis RH44 using statistical designs [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(4): 783-794.

[12] 赵丽坤, 郭会灿. 微生物培养基优化方法概述 [J]. *石家庄职业技术学院学报*, 2008, 20(4): 50-52.

ZHAO L K, GUO H C. A methodological survey of the optimization of the microbial culture medium media [J]. *Journal of Shijiazhuang Vocational Technology Institute*, 2008, 20(4): 50-52. (in Chinese)

[13] 顾荫萌, 李勇昊, 田朝光. 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 纤维素酶液体发酵培养基的优化 [J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(3): 76-82.

GU R M, LI Y H, TIAN C G. The medium optimization of cellulase fermentation of by response surface methodology [J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(3): 76-82. (in Chinese)

[14] 姚琳, 杨谦. 哈茨木霉发酵生产 Monocillin I 的培养基优化研究 [J]. *西北林学院学报*, 2014, 29(2): 144-148.

YAO L, YANG Q. Optimization of the media for the culture of monocillin [J] by *Trichoderma harzianum* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2014, 29(2): 144-148. (in Chinese)

[15] 王丽, 苏印泉, 张强, 等. 光叶楮叶蛋白提取工艺优化和氨基酸分析研究 [J]. *西北林学院学报*, 2012, 27(2): 137-142.

WANG L, SU Y Q, ZHANG Q, *et al.* Optimization of extraction technology and amino acid analysis of protein extracted from *Broussonetia* leaf [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2012, 27(2): 137-142. (in Chinese)

[16] 史祥才, 李江华, 刘龙, 等. 搅拌转速和通气量对黑曲霉生产 β -甘露聚糖酶深层发酵培养的影响 [J]. *工业微生物*, 2013, 43(3): 32-37.

SHI X C, LI J H, LIU L, *et al.* Effects of agitation and aeration on production of β -mannanase by *Aspergrius niger* WB6002 [J]. *Industrial Microbiology*, 2013, 43(3): 32-37. (in Chinese)