



# 基于多元二次回归分析与正交设计优化青霉发酵 合成木质素过氧化物酶的培养基组成

樊亚娟 张志才\* 胡坤雅

(江苏大学 农产品加工工程研究院, 江苏 镇江 212013)

**摘要:** 用玉米秸秆作为基质, 以木质素过氧化物酶 (Lip) 酶活为指标, 以 SPSS 和 Matlab 软件和正交设计优化了青霉发酵的培养基组成和 pH 值. 首先通过单因素试验, 筛选了最适的培养基成分, 进一步通过正交实验利用 SPSS 软件求出培养基成分以及 pH 值对发酵合成 Lip 酶活影响的多元二次回归方程, 利用 Matlab 软件对方程求解得到最适培养基组成和 pH 值. 求解得到最适培养基组成为麦芽糖 0.24%、鱼粉蛋白脲 0.72%、玉米蛋白粉 0.24%、玉米秸秆添加量 3.0%, 培养基 pH 为 6.0, 最大 Lip 酶活为 1933.24U/mL, 是实验得到的最大 Lip 酶活的 2.4 倍.

**关键词:** 玉米秸秆; Lip; 正交实验; SPSS; Matlab

**中图分类号:** Q93

**MR 分类号:** 92C20; 92C30

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9626(2017)04-0505-09

## 0 引言

木质素是一种含有复杂大分子结构的无定型芳香类化合物<sup>[1]</sup>. 木质素稳定性较高, 自然降解速率缓慢<sup>[2]</sup>. 参与木质素降解的酶系主要有木质素过氧化物酶 (Lip)、锰过氧化物酶 (MnP)、漆酶 (Laccase). Lip 被认为是用于木质素氧化解聚的主要酶, 在过氧化氢存在条件下氧化酚类和非酚类木质素模型化合物<sup>[3]</sup>, 其重要特点是对底物没有特异性要求<sup>[4]</sup>. 在  $H_2O_2$  存在时, Lip 通过电子传递体攻击木质素分子, 通过夺取酚型或非酚型的苯环上的一个电子, 将其氧化成苯氧自由基, 继而以链式反应产生许多不同的自由基, 导致木质素分子中主要键断裂<sup>[5]</sup>. 国外学者如 Grzegorz Janusza 等认为促进 LiP 基因的高效表达, 实现 LiP 的工业化生产, 不但可以加快木素生物降解的进程, 而且对实现生物能的绿色转化具有重要意义, 为生物治理环境等开辟了新途径<sup>[6-9]</sup>.

本研究团队长期从事秸秆降解的研究, 2015 年丁洪雪通过抑制消减杂交与蛋白质组学技术分析基因转录与蛋白质翻译差异, 结果证明米曲霉 (*A.oryzae*CGMCC5992) 具有降解木质素

收稿日期: 2017-08-18

基金项目: 江苏省科技厅社会发展项目 (SBE2015730013)

作者简介: 樊亚娟 (1989-), 女, 山东枣庄人, 硕士研究生.

E-mail: 1226052640@qq.com

\* 通讯作者

的能力<sup>[10]</sup>；2016年夏丽莉利用米曲霉(*A.oryzae*CGMCC5992)液态发酵产出的含Lip的发酵液，与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>结合降解秸秆，在此降解条件下，玉米秸秆的糖得率显著提高，表明发酵液与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>结合可有效去除秸秆中的木质素<sup>[11]</sup>；2017年李金花研究米曲霉(*A.oryzae*CGMCC5992)发酵液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>预处理的玉米秸秆纤维素酶催化反应的动力学，修正Michaelis-Menten模型，构建阻遏动力学模型以描述非均相反应体系中的酶水解动力学，揭示纤维素的降解机理<sup>[12]</sup>。这些研究为揭示米曲霉产LiP降解秸秆的机制奠定了理论基础。

国内外学者通过添加不同的碳源、氮源、无机盐及金属离子等培养基成分进而提高酶活，研究不同物质对酶活的影响<sup>[13-15]</sup>，为进一步研究做出了贡献，因此对培养基组成的研究是有必要的。本实验利用SPSS、Matlab软件和正交设计研究青霉发酵合成Lip的培养基组成能够得到更高的Lip酶活，为进一步研究Lip的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的秸秆产自河南省嵩县，105°烘干至恒重，粉碎、过100目筛，备用。  
青霉菌种本实验室自行筛选，保存。

1.2 菌种制备

1.2.1 试管斜面菌种

将青霉接种于PDA试管斜面，28°培养箱中培养5天左右，待孢子由白色转为绿色时于4°冰箱保藏备用。

1.2.2 摇瓶菌种培养液制备

在250mL锥形瓶中加入2g麸皮、2g葡萄糖、0.5g鱼粉蛋白胨、100mL水，121°高压蒸汽灭菌20min，接种青霉菌种，28°、150转/分钟条件下摇床培养两天。

1.2.3 发酵培养液制备

按照试验设计方法添加各物质，121°高压蒸汽灭菌20min，以5%的接种量接入摇瓶菌种培养液，于28°培养箱中培养，于第三天取样测Lip酶活。

表 1 正交实验因素与水平表 \*  
Table 1 Factors and Levels of Orthogonal Experiment

水平	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	0	0	0	0	0	0.6	4.0
2	0.06	0.24	0.18	0.36	0.06	1.2	4.5
3	0.12	0.48	0.36	0.72	0.12	1.8	5.0
4	0.18	0.72	0.54	1.08	0.18	2.4	5.5
5	0.24	0.96	0.72	1.44	0.24	3.0	6.0

\*:X1-X6: 单位为 %

### 1.3 正交试验设计

在前期单因素实验的基础上(数据未显示), 选择麦芽糖( $X_1$ )、甘油( $X_2$ )、鱼粉蛋白胨( $X_3$ )、硝酸钾( $X_4$ )、玉米蛋白粉( $X_5$ )、玉米秸秆( $X_6$ )、培养基 pH( $X_7$ ), 利用 SPSS 软件设计  $L_{49}(5^7)$  正交实验, 以 Lip 酶活为指标, 考察各因素对青霉发酵降解秸秆木质素的影响. 因素与水平显示在见表 1.

### 1.4 木质素过氧化物酶酶活测定

在超净台中取发酵第 3 天的发酵液, 离心取上清液为粗酶液.

木质素过氧化物酶的酶活测定: 准确移取 3.4 mL 250 mmol/L 酒石酸钠缓冲液于容积为 4 mL 的比色皿中, 加入 0.1 mL 10 mmol/L 藜芦醇, 准确加入 30° 水浴的待测酶液 0.4 mL, 快速加入 0.1 mL 浓度为 10 mmol/L 的  $H_2O_2$  溶液启动反应, 在波长 310 nm 测定吸光度 1 min 的增加 ( $OD_{310}$ ). 一个酶活力单位 (U) 定义为, 一分钟内 30° 条件下将 1  $\mu$ mol 藜芦醇氧化成藜芦醛所需的酶量.

Lip 酶活性计算公式:

$$Lip = \frac{\Delta OD_{310} \div 1cm}{9300 mol^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}} \times \frac{10^6 \mu mol}{mol} \times \frac{10^{-3} L}{mL} \times 4 mL \div \frac{400}{10^{-6}} \div 1 min \times \frac{100 mL}{1000 L} = 1075 * \Delta OD_{310} U/L.$$

所有试验重复三次, 试验结果取三次结果的平均值.

### 1.5 数据分析

正交试验结果, 考虑培养基成分之间和培养条件之间的交互作用, 采用下列公式回归分析:

$$Y = C + \sum_{i=1}^7 X_i + \sum_i^5 X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 X_i \times X_j, \quad (1)$$

这里 C: 为常数项; 回归分析用 SPSS 软件; 用 Matlab 软件对回归方程求解.

## 2 结果与分析

### 2.1 正交试验

正交试验设计是研究多因素多水平的又一种设计方法, 它是根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验, 这些有代表性的点具备了“均匀分散, 齐整可比”的特点, 可以为统计学分析提供大量可靠的数据. 本次试验采用  $L_{49}(5^7)$  正交表, 即 7 个因素, 5 个水平, 49 组循环的正交试验. 实验方案及结果显示在表 2.

表 2 正交试验结果 \*  
Table 2 Disposition of Orthogonal Experiment

RUN	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Lip
1	0.00	0.20	0.20	1.50	0.30	0.60	5.50	271.975
2	0.05	0.20	0.00	0.50	0.00	0.30	4.50	22.575
3	0.10	0.20	0.00	2.50	0.00	0.15	5.50	821.300
4	0.00	0.60	0.15	0.50	0.60	0.30	5.50	148.350
5	0.05	0.80	0.05	0.50	0.00	0.60	5.00	172.000
6	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	4.00	123.625
7	0.05	0.00	0.05	2.00	1.20	0.00	5.50	373.025
8	0.10	0.00	0.05	1.50	0.30	0.30	4.00	167.700
9	0.00	0.40	0.05	0.50	0.30	0.00	4.00	103.200
10	0.05	0.20	0.20	1.00	0.90	0.15	4.00	369.800
11	0.00	0.00	0.05	2.00	0.00	0.15	4.50	421.400
12	0.20	0.20	0.00	2.00	0.30	0.30	5.00	477.300
13	0.00	0.00	0.00	1.00	0.30	0.60	4.50	210.700
14	0.20	0.20	0.05	0.50	0.90	0.45	4.50	122.550
15	0.00	0.20	0.05	1.00	0.00	0.00	4.00	118.250
16	0.20	0.60	0.10	2.50	0.00	0.60	4.00	316.050
17	0.05	0.20	0.10	1.50	0.60	0.00	4.50	158.025
18	0.05	0.60	0.20	2.00	0.30	0.00	4.50	193.500
19	0.05	0.00	0.00	0.50	0.30	0.15	4.00	90.300
20	0.10	0.40	0.15	2.00	0.90	0.60	4.00	334.325
21	0.10	0.80	0.20	0.50	0.00	0.00	6.00	101.050
22	0.00	0.80	0.10	1.00	1.20	0.30	4.00	252.625
23	0.20	0.00	0.20	0.50	0.60	0.15	4.00	110.725
24	0.10	0.60	0.00	0.50	1.20	0.15	4.50	137.600
25	0.20	0.80	0.05	1.00	0.30	0.15	5.50	173.075
26	0.05	0.40	0.00	1.00	0.00	0.45	5.50	239.725
27	0.05	0.00	0.00	1.00	0.60	0.60	6.00	264.450
28	0.20	0.40	0.00	1.50	1.20	0.00	6.00	168.775
29	0.15	0.60	0.05	1.00	0.30	0.15	6.00	195.650
30	0.05	0.20	0.15	1.00	1.20	0.15	4.00	125.775

表 2 正交试验结果 \*(续)  
Table 2 Disposition of Orthogonal Experiment

RUN	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Lip
31	0.15	0.40	0.20	1.00	0.00	0.30	4.50	160.175
32	0.05	0.00	0.05	2.50	0.90	0.30	6.00	520.300
33	0.15	0.00	0.10	0.50	0.90	0.00	5.50	125.775
34	0.00	0.20	0.15	0.50	0.30	0.45	6.00	155.875
35	0.00	0.20	0.10	2.00	0.00	0.15	6.00	364.425
36	0.10	0.20	0.05	1.00	0.60	0.00	5.00	154.800
37	0.00	0.40	0.05	2.50	0.60	0.15	4.50	450.425
38	0.15	0.80	0.00	2.00	0.60	0.45	4.00	408.500
39	0.05	0.80	0.15	2.50	0.30	0.00	4.50	306.375
40	0.15	0.20	0.00	2.50	0.30	0.00	4.00	489.125
41	0.05	0.60	0.05	1.50	0.00	0.45	4.00	352.600
42	0.00	0.80	0.00	1.50	0.90	0.15	4.50	225.750
43	0.00	0.00	0.20	2.50	1.20	0.45	5.00	260.150
44	0.20	0.00	0.15	1.00	0.00	0.00	4.50	149.425
45	0.15	0.20	0.05	0.50	1.20	0.60	4.50	184.900
46	0.05	0.40	0.10	0.50	0.30	0.15	5.00	142.975
47	0.15	0.00	0.15	1.50	0.00	0.15	5.00	204.250
48	0.00	0.60	0.00	1.00	0.90	0.00	5.00	76.325
49	0.10	0.00	0.10	1.00	0.30	0.45	4.50	101.050

\*:X1-X6: 单位为 g； Lip 单位为 U/mL

2.2 SPSS 软件回归分析

正交试验设计是分析因式设计的主要方法，是一种高效率、快速、经济的实验设计方法。但是通常的正交试验是通过极差分析获得最佳条件。这种方法不全面，不能分析不同因素间的交互作用。为了更好的揭示各因素之间的交互作用，本论文探索了以响应值 Lip 活性作为因变量，以培养基成分麦芽糖、甘油、鱼粉蛋白胨、硝酸钾和玉米蛋白粉作为自变量采用多元二次线性回归分析了培养基成分对酶活性的作用。由于 pH 与 Lip 活性以及菌体合成 LiP 密切相关，但是与培养基成分交互作用不显著，玉米秸秆在培养基中只是诱导 Lip 的合成，而与培养基成分交互作用不显著，因此把 pH 和玉米秸秆浓度作为控制变量。因此用方程 (1) 拟合表 2 中的数据得到方程 (2)：

$$Y = -166.330 + 935.270X_1 - 7.046X_2 + 81.015X_3 + 216.462X_4 - 92.409X_5 +$$

$$\begin{aligned} &101.150X_6 + 26.175X_7 + 54.231X_1X_2 - 508.147X_1X_3 - 261.833X_1X_4 + \\ &30.740X_1X_5 + 166.933X_2X_3 - 33.781X_2X_4 + 110.766X_2X_5 - \\ &1153.386X_3X_4 + 1077.116X_3X_5 - 88.688X_4X_5 - 3785.862X_1^2 - \\ &14.360X_2^2 + 3006.006X_3^2 + 36.596X_4^2 + 63.517X_5^2, \end{aligned} \tag{2}$$

其中  $X_1$  ,  $X_2$  ,  $X_3$  ,  $X_4$  ,  $X_5$  ,  $X_6$  ,  $X_7$  分别代表麦芽糖、甘油、鱼粉蛋白胨、硝酸钾、玉米蛋白粉、玉米秸秆添加浓度、培养基 pH. 拟合的模型和系数项显著性总结在表 3. 表 3 显示回归模型的  $p=0.000<0.01$  ,  $F$  值为  $8.190>4$  说明回归分析达到了极显著水平, 方程 (2) 具有统计学意义.

表 3 方差分析表  
Table 3 Test of Between-Subjects Effects

项	系数	P 值	项	系数	P 值
X1	935.27	0.3	X2X3	166.933	0.797
X2	-7.046	0.969	X2X4	-33.781	0.667
X3	81.015	0.92	X2X5	110.766	0.398
X4	216.462	0.029	X3X4	-1153.386	0.000
X5	-92.409	0.519	X3X5	1077.116	0.034
X6	101.15	0.065	X4X5	-88.688	0.063
X7	26.175	0.204	X12	-3785.862	0.184
X1X2	54.231	0.934	X22	-14.36	0.938
X1X3	-508.147	0.88	X32	3006.006	0.261
X1X4	-261.833	0.4	X42	36.596	0.207
X1X5	30.74	0.954	X52	63.517	0.445

注: 模型  $p=0.000$  ,  $F$ - 值  $=8.190$

表 3 显示, 硝酸钾 ( $X_4$ ) 的  $p$  值最小, 且小于 0.05 , 说明硝酸钾单独作用对 LiP 酶活性作用最强, 且达到显著水平; 其次是玉米秸秆添加浓度 ( $X_6$ ) 单独作用相对较强. 不同培养基成分的交互作用中, 鱼粉蛋白胨和硝酸钾的交互作用对 LiP 活性影响最大, 达到极显著水平 ( $p=0.000<0.01$ ), 其系数项  $>0$ , 说明其交互作用有利于酶的合成. 鱼粉蛋白胨和玉米蛋白粉交互作用的影响, 达到显著水平 ( $p=0.034<0.05$ ), 其系数项  $>0$ , 说明其交互作用是促进作用. 同种培养基成分之间的交互作用均不显著.

2.3 Matlab 解方程 (2)

为了揭示 LiP 合成的最适培养基成分, 对方程 (2) 进行求解是必需的. 表 3 显示控制变量玉米秸秆添加浓度 ( $X_6$ ) 和 pH( $X_7$ ) 的系数均  $>0$  , 由于 LiP 酶活性与玉米秸秆含量和 pH 值在实验范围内呈正相关, 因此用表 1 中的玉米秸秆含量 3.0 和 pH6.0 代入方程 (2) , 得到方程

(3) :

$$Y = 294.17 + 935.270X_1 - 7.046X_2 + 81.015X_3 + 216.462X_4 - 92.409X_5 + 4.231X_1X_2 - 508.147X_1X_3 - 261.833X_1X_4 + 30.740X_1X_5 + 166.933X_2X_3 - 33.781X_2X_4 + 110.766X_2X_5 - 1153.386X_3X_4 + 1077.116X_3X_5 - 88.688X_4X_5 - 3785.862X_1^2 - 14.360X_2^2 + 3006.006X_3^2 + 36.596X_4^2 + 63.517X_5^2. \quad (3)$$

利用 Matlab 软件解方程 (3) , 在 Matlab 编辑窗口编辑下列程序:

```
function f1=f1(x)
```

```
a=294.17+935.270*x(1)-7.046*x(2)+81.015*x(3)+216.462*x(4)-92.409*x(5);
```

```
b=54.231*x(1)*x(2)-508.147*x(1)*x(3)-261.833*x(1)*x(4)+30.740*x(1)*x(5)+166.933*x(2)*x(3)-33.781*x(2)*x(4)+110.766*x(2)*x(5)-1153.386*x(3)*x(4)+1077.116*x(3)*x(5)-88.688*x(4)*x(5);
```

```
c=3785.862*x(1)^2-14.360*x(2)^2+3006.006*x(3)^2+36.596*x(4)^2+63.517*x(5)^2;
```

```
f1=-a-b-c;
```

上述程序保存为 f1 , 在命令窗口中输入:

```
x0=[0.24,0.96,0.72,1.44,0.24];
```

```
[x,fval]=fminsearch(@f1,x0)
```

```
Z=- fval
```

解得方程 Y 取最大值时,  $X_1$ - $X_5$  取值分别为  $1 \times 10^{52}$ ,  $-2.051 \times 10^{54}$ ,  $5.225 \times 10^{54}$ ,  $-1.385 \times 10^{55}$  和  $5.54 \times 10^{53}$ , 此时最大酶活性为  $1.5017 \times 10^{113}$ , 这个  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  和  $X_5$  已远远超出取值范围, 麦芽糖 ( $X_1$ )、鱼粉蛋白胨 ( $X_3$ ) 和玉米蛋白 ( $X_5$ ) 分别用最大值 0.24, 0.72 和 0.24 代替, 甘油 ( $X_2$ ) 和硝酸钾 ( $X_4$ ) 分别取最小值 0, 0.

在 Matlab 命令窗口中输入:

```
x=[0.24,0,0.72,0,0.24];
```

```
f1(x)
```

求得的最大 f1 为 1933.24. 即合成 LiP 的最适条件为: 麦芽糖 0.24%, 鱼粉蛋白胨 0.72%、玉米蛋白 0.24%、玉米秸秆 3.0%, pH6.0, 获得的最大 LiP 活性为 1933.237(U/L).

## 2.4 SPSS 和 Matlab 软件结合求极值通用型证明

为验证该方法的可靠性, 用 SPSS 软件回归响应面设计的运行结果, 利用 Matlab 软件解方程, 并与响应面分析结果比较. 2013 年刘丹<sup>[16]</sup> 用响应面设计研究尿素、 $\text{ZnSO}_4$  和  $\text{VB}_6$  对黄水 COD 值的影响, 得到如下方程 (4),

$$Y_{\text{COD}} = 6948.09 - 33225.43A - 70.43B - 89.17C + 56AB + 86AC + 0.66BC + 50317.39A^2 + 0.98B^2 + 1.25C^2. \quad (4)$$

解方程, 得  $A=0.30$ ,  $B=20.73$ ,  $C=19.79$ ,  $Y_{\text{COD}}=323$ , 则最优培养基组成为: 在 10% 黄水中添加 0.30g/L 尿素, 20.73mg/L  $\text{ZnSO}_4$  和 19.79 mg/L  $\text{VB}_6$ , 在该条件下, 黄水的 COD 最后降至 323mg/L.

用 SPSS 线性回归分析实验数据进行, 得到下列方程:

$$Y_{COD} = 6858.500 - 32635.000A - 74.583B - 85.233C + 56.000AB + 86.000AC + 0.660BC + 49333.333A^2 + 1.093B^2 + 1.153C^2. \quad (5)$$

用 Matlab 求解方程 (5), 得到  $A=0.30$ ,  $B=20.39$ ,  $C=19.87$ ,  $Y_{COD}=326$ , 则最优培养基组成为: 在 10% 黄水中添加 0.30g/L 尿素, 20.39mg/L  $ZnSO_4$  和 19.87 mg/L  $VB_6$ , 在该条件下, 黄水的 COD 最后降至 326mg/L, 与原文方程式与结果均相接近.

2013 年李佳少<sup>[17]</sup>应用响应面分析麦芽糖、酒石酸铵、 $CuSO_4$  固态发酵对 Lip 的影响, 得到如下方程 (6),

$$Y = -5.75427 + 5.99650A - 1.80920B + 92.53811C + 1.24187AB - 21.45105AC + 17.68875BC - 1.07505A^2 - 1.56550B^2 - 204.44264C^2, \quad (6)$$

解方程, 得  $A=1.57$ ,  $B=1.50$ ,  $C=0.21$ ,  $Y=6.62U/g DS$ , 则最优培养基组成为: 麦芽糖 1.57%、酒石酸铵 1.50%、 $CuSO_4$  0.21%, 预期酶活可达到 6.62U/g DS. 用 SPSS 对其实验数据进行回归分析, 得到下列方程 (7):

$$Y = -6.127 + 5.830A - 1.976B + 99.720C + 1.245AB - 21.450AC + 17.650BC - 1.035A^2 - 1.524B^2 - 222.426C^2. \quad (7)$$

用 Matlab 软件对上述方程求解, 得到  $A=1.40$ ,  $B=1.08$ ,  $C=0.20$ ,  $Y=6.83$ , 则最优培养基组成为: 麦芽糖 1.40%、酒石酸铵 1.08%、 $CuSO_4$  0.20%, 预期酶活可达到 6.83U/g DS, 与原文方程式与结果均相接近.

### 3 结 语

综上所述, 利用 SPSS 和 Matlab 软件与正交设计结合可以用于试验条件优化; 本实验采用此方法得到的青霉发酵合成 LiP 最适培养基组成和 pH 值为麦芽糖 0.24%、鱼粉蛋白胨 0.72%、玉米蛋白 0.24%、玉米秸秆含量 3.0g/mL 及 pH6.0. 不同响应面设计实验, 用 SPSS 软件求出方程式与 Matlab 解方程得到的结果与 Design-Expert 求得的方程及结果很近似, 说明我们利用 SPSS 和 Matlab 软件相结合不仅仅用于正交实验, 对于响应面实验分析也是适用的, 进而进一步说明了此实验方法的可行性.

### 参 考 文 献

- [1] Rai N, Yadav M, Yadav H S. Enzymatic characterisation of lignin peroxidase from luffa aegyptiaca fruit juice[J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2016, 7(03): 649.
- [2] 路瑶, 魏贤勇\*, 宗志敏等. 木质素的结构研究与应用 [J]. *化学进展*, 2013, 25(5):838-858.
- [3] Sharma A, Aggarwal N K, Yadav A. First report of lignin peroxidase production from alternaria alternata ANF238 isolated from rotten wood sample[J]. *Bioengineering and Bioscience*, 2016, 4(5):76-87.
- [4] 姜杰, 杨暖, 丁梦旋等. 木素过氧化物酶的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009, 25(11):30-33.



- [5] Vrsanska M, Voberkova S, Langer V, et al. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes[J]. *Molecules*, 2016, **21**(11):1553.
- [6] Grzegorz Janusza, Katarzyna H. Kucharzy, et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, **52**(1):1–12.
- [7] Furukawa T, Bello F O, Horsfall L. Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation[J]. *Frontiers in Biology*, 2014, **9**(6):448–471.
- [8] Kale S K, Deshmukh A G. 3D structure prediction of lignolytic enzymes lignin peroxidase and manganese peroxidase based on homology modelling[J]. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2016, **5**(1):1–11.
- [9] Sahadevan L D M, Misra C S, Thankamani V. Characterization of lignin-degrading enzymes (LDEs) from a dimorphic novel fungus and identification of products of enzymatic breakdown of lignin[J]. *Biotech*, 2016, **6**(1):1–16.
- [10] 丁洪雪, 张志才, 施德富等. 米曲霉固态发酵产锰过氧化物酶的条件优化 [J]. 饲料研究, 2015, (16):57–61.
- [11] Zhang Z, Xia L, Wang F, et al. Lignin degradation in corn stalk by combined method of  $H_2O_2$  hydrolysis and *Aspergillus oryzae* CGMCC5992 liquid-state fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, **8**(1):183.
- [12] Zhang Z C, Li J H, Wang F. Kinetics of Cellulase Saccharification of Corn Stover after Pretreatment by Lignin Peroxidase and  $H_2O_2$ [J]. *BioResources*, 2017, **12**(3):5462–5486.
- [13] Rueda □ López M, Cañas R A, Canales J, et al. The overexpression of the pine transcription factor PpDof5 in *Arabidopsis* leads to increased lignin content and affects carbon and nitrogen metabolism[J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, **155**(4):369–383.
- [14] 王凤娟, 李伟庆, 牟志美等. *Paraconiothyium variable* GHJ-4 木质素降解酶的酶学性质 [J]. 林业科学, 2017, **53**(1):94–100.
- [15] Kanwal H K, Reddy M S. Effect of carbon, nitrogen sources and inducers on ligninolytic enzyme production by *Morchella crassipes*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, **27**(3):687–691.
- [16] Zhang Z, Liu D, Feng F, et al. Optimization of the nutrition for biodegradation of vinasse by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology[J]. *Water Science and Technology*, 2013, **67**(4):772–779.
- [17] 李佳少. 米曲霉合成木质素过氧化物酶工艺条件及其分离纯化的研究 [D]. 江苏大学, 2013.

## Optimization of Lignin Degradation in Straw by *Penicillium* Based on Multiple Quadratic Regression Analysis and Orthogonal Test

FAN Ya-juan    ZHANG Zhi-cai    HU Kun-ya

(Institute of Agricultural Products Processing Engineering, Jiangsu  
University, Zhenjiang Jiangsu 212013 China)

**Abstract:** In this paper, corn stalks was treated by *Penicillium*. The effects of different fermentation conditions on lignin peroxidase activity were studied with lignin peroxidase activity as the indicator based on SPSS, Matlab analysis and Orthogonal test. On the basis of single factor, the optimum conditions are as follows: maltose 0.24%, fish meal peptone 0.72%, potassium nitrate 0.24%, corn gluten powder 3.0%, material concentration 6.0%, the maximum lignin peroxidase activity up to 1933.24 U/mL, which is 2.4 times of the highest Lip activity.

**Key words:** Corn stalk; Lignin peroxidase; Orthogonal experiment; SPSS; Matlab