

文章编号: 1673-1689(2007)01-0071-06

响应面法优化烯丙醇酮乙酸酯水解酶的产酶条件

白东栋¹, 吴坚平¹, 徐刚¹, 杨立荣^{1,2}

(1. 浙江大学 化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用响应面方法对一株能够选择性水解(R)-烯丙醇酮乙酸酯的菌株的发酵产酶培养基进行了优化。首先考察了不同碳、氮源的影响, 在此基础上通过 Plackett-Burman 设计法对发酵培养基主要因子进行筛选, 确定主要影响因子为橄榄油的质量浓度、黄豆饼的质量浓度和 K_2HPO_4 的质量浓度。用最陡爬坡实验逼近以上三因素最优水平, 并用中心组合设计以及响应面分析确定主要影响因子的最佳浓度。在优化培养条件下, 发酵液中酶产量从 94 U/L 提高到了 358 U/L, 增加了 281%。

关键词: 烯丙醇酮乙酸酯; Plackett-Burman 设计; 响应面法; 优化

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Optimization of the Production Conditions of HMPC Hydrolase Employing Response Surface Methodology

BAI Dong-dong¹, WU Jian-ping¹, XU Gang¹, YANG Li-rong^{1,2}

(1. Department of Chemical and Biochemical Engineering Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was employed to optimize culture medium for the production of a hydrolase which is useful for the enantioselective hydrolysis of racemic 4-hydroxy-3-methyl-2-(2-propenyl)-cyclopent-2-enone (rac-HMPC) acetate. The influences of carbon and nitrogen resource was investigated. Then a Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of different components in the culture medium. Olive oil, soy bean meal and K_2HPO_4 have significant influences on the hydrolase production. The path of steepest ascent was used to approach the optimal region of above three factors. The concentrations of three factors were optimized subsequently using central composite designs and response surface analysis. As the result, the production of hydrolase in shake flask increased from 94 U/L to 358 U/L with the optimal medium. The yield is increased by 281%.

Key words: HMPC acetate; Plackett-Burman design; response surface method; optimization

收稿日期: 2006-05-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20336010)和国家“973”计划项目(2003CB716008).

作者简介: 白东栋(1982-), 男, 江苏大丰人, 生物化工硕士研究生. Email: bdd0073517821@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨立荣(1962-), 男, 江苏扬州人, 教授, 博导. 主要从事生物催化与转化、多肽合成与应用化学研究. Email:

ylr@zju.edu.cn

拟除虫菊酯是一类重要的合成杀虫剂。迄今已商品化的拟除虫菊酯有 50 多种,在全球杀虫剂的销售额中占 20%。拟除虫菊酯具有广谱、高效、低毒等特性。丙烯菊酯是拟除虫菊酯杀虫剂家族中的主要成员,其有 8 种异构体,其中以(S)-烯丙醇酮的反式右旋(1R,3R)菊酸酯的活性最高^[1]。其关键手性中间体(S)-烯丙醇酮的制备主要有化学拆分法,不对称合成法和酶拆分法等。酶拆分法具有路线简单,成本低廉,副产物少以及易于产业化等优点。水解酶类如酯酶和脂肪酶等,已被广泛用于光学异构体的拆分上^[2],也可用于催化烯丙醇酮乙酸酯的不对称水解制备(S)-烯丙醇酮。

作者所在实验室从生产烯丙醇酮乙酸酯工厂周围的土样中筛选出一株具有立体选择性水解活力的菌株,它能够高选择性地催化(R)-烯丙醇酮乙酸酯的水解反应,当转化率达到 57% 时, ee_s (S 构型底物的对映体过量百分率)为 98%,从而得到(S)-烯丙醇酮乙酸酯,通过化学法水解后就可以得到高光学纯度的(S)-烯丙醇酮。

Plackett-Burman 设计法和响应面分析法是 20 世纪中后叶发展起来的优化试验条件统计学方法^[3],在微生物培养条件优化中已有广泛应用^[4,6]。为了提高该菌株的产酶量,作者应用该方法对其发酵培养基主要因子进行了筛选和优化。

1 材料与方法

1.1 试剂

橄榄油(化学纯),吐温-80(化学纯),正十六烷(色谱纯)均购于中国医药(集团)上海化学试剂公司,烯丙醇酮乙酸酯(纯度>98%);其它试剂均为化学纯。

1.2 培养基组成

种子培养基(g/L):蛋白胨 5.0 ,甘油 3.0 ,酵母

膏 2.0 ,蔗糖 3.0 (NH₄)₂SO₄2.0 ,K₂HPO₄2.0 ,NaCl 1.0 ,MgSO₄ 0.2 pH 7.0^[7]。

发酵培养基(g/L):橄榄油 10.0 ,黄豆饼 10.0 , (NH₄)₂SO₄ 2.0 ,K₂HPO₄2.0 ,NaCl 1.0 ,MgSO₄ 0.2 ; pH 7.0。

1.3 培养条件

种子培养:在装液量为 8% 的 250 mL 的三角瓶中进行,30℃,220 r/min 摇床中培养 18 h。

摇瓶培养:接种量为 10% ,100 mL 的摇瓶装液量为 20 mL ,培养 24 h ,其余条件同种子培养。

1.4 酶活的测定

取 10 mL 发酵液加入烯丙醇酮乙酸酯至 45 mmol/L ,在 30℃,220 r/min 下反应 30 min ,反应结束后加入 2 倍体积的乙酸乙酯萃取,4 000 r/min 离心 10 min ,取有机层气相分析。气相色谱仪 FULI-9790 ,柱温 120℃,进样器和检测器温度均为 230℃,FID ,载气(N₂)流量为 30 mL/min ,氢气流量为 30 mL/min ,空气流量为 300 mL/min ,十六烷为内标^[8]。酶活单位(U)定义为 30℃时,每分钟催化生成 1 μmol 烯丙醇酮所需要的酶量。

1.5 实验设计

1.5.1 Plackett-Burman(PB)设计筛选影响产酶的重要因素 PB 设计法是一种两水平的试验设计方法,它试图用最少试验次数使因素的主效果得到尽可能精确的估计,适用于从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素,供进一步研究用。与部分因子实验相比较,PB 法在筛选实验重要因子方面最为有效和准确^[9]。

选用 N=12 的 PB 设计,并预留 3 个虚拟变量作为误差分析。每个因素取两个水平,低水平为原始培养条件,高水平约取低水平的 1.5 倍,实验设计见表 1 ,各因素水平见表 2。使用 SAS8.01 对实验数据进行回归分析。

表 1 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计与结果

Tab. 1 Experimental design and results of the Plackett-Burman as N=12

实验号	X ₁ 黄豆饼	X ₂ MgSO ₄	X ₃ 虚拟	X ₄ K ₂ HPO ₄	X ₅ (NH ₄) ₂ SO ₄	X ₆ 虚拟	X ₇ 橄榄油	X ₈ NaCl	X ₉ 虚拟	X ₁₀ pH 值	Y ₁ /(U/L) 酶产量
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	320
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	328
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	310
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	306
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	288
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	310
7	万坊数据		1	1	-1	1	1	-1	1	-1	279

续表 1

实验号	X_1 黄豆饼	X_2 MgSO ₄	X_3 虚拟	X_4 K ₂ HPO ₄	X_5 (NH ₄) ₂ SO ₄	X_6 虚拟	X_7 橄榄油	X_8 NaCl	X_9 虚拟	X_{10} pH 值	$Y_1/(U/L)$ 酶产量
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	280
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	296
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	317
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	286
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	299

表 2 各因素水平及重要性评价
Tab. 2 Levels and effects of variables

代码	因素	低水平(g/L) (-1)	高水平(g/L) (1)	t 值	$Pr > t $	显著性
X_1	黄豆饼质量浓度	10	15	17	0. 037405	* *
X_2	MgSO ₄ 质量浓度	0. 2	0. 3	-2. 42857	0. 248668	
X_3	虚拟	-1	1	-	-	
X_4	K ₂ HPO ₄ 质量浓度	2	3	-9. 28571	0. 068296	* *
X_5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量浓度	2	3	-2. 42857	0. 248668	
X_6	虚拟	-1	1	-	-	
X_7	橄榄油质量浓度	10	15	-11. 28570	0. 056262	* *
X_8	NaCl 质量浓度	1	1. 5	3	0. 204833	
X_9	虚拟	-1	1	-	-	
X_{10}	pH	7	8	5	0. 125666	

1.5.2 最陡爬坡实验 由于响应面拟合方程只在考察的紧接领域才充分近似真实情形 ,在其他区域 ,拟合方程与被近似的函数方程毫无相似之处 ,拟合几乎是没有任何意义的。所以 ,必须首先逼近最大产酶区域。最陡爬坡实验以实验值变化的梯度方向为爬坡方向 ,根据各因素效应值的大小确定变化步长 ,能快速、经济地逼近最佳值区域^[6]。根据 Plackett-Burman 法筛选影响产酶的重要因素的结论 ,按文献 [10] 做最陡爬坡实验。

1.5.3 中心组合实验 逼近最佳产酶区域后 ,按文献 [11] 进行中心组合实验 ,收集数据得到各影响因素(即自变量)的二次多项式来估计反映变量的变化规律的反应曲面模型。设有 k 个因素 ,记为 $X_1, X_2, \dots, X_k$,反应变量为 Y ,则

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

式中 Y 为预测响应值 ,即酶产量(U/L) $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ 分别是截距和回归系数 , X_i, X_j 为编码转换后的自变量。

用统计软件 SAS8.01 对实验数据进行回归分析 ,并计算出因素的最佳点。

2 实验结果

2.1 酶种类的确定

脂肪酶和酯酶都能水解酯键。脂肪酶对于聚集态并且不溶的底物具有高活性 ,而酯酶对于水溶性的底物具有高活性。另外 ,脂肪酶优先水解长链的酯类 ,酯酶优先水解短链的酯类。在测定酶活的时候 ,不加吐温-80(助溶剂) ,底物呈聚集态且不溶 ,此时发酵液几乎无水解活力。而加入吐温-80 后 ,发酵液对底物具有高的水解活力。作者采用经典的脂肪酶水解活力检测方法——橄榄油乳化液法^[12]来判定此酶是否为脂肪酶 ,发现酶几乎无水解活力 ,远低于普通脂肪酶的水解活力。另外 ,由底物结构可知 ,烯丙醇酮乙酸酯为短链的酯类。所以 ,此菌所产酶为酯酶。

2.2 单因素优化碳、氮源

首先以种子培养基作为出发培养基对碳、氮源进行优化 ,优化结果见表 3 表 4。可以看出 ,在碳源优化中得到最佳碳源为 10 g/L 的橄榄油 ,此时酶产量最高。在氮源优化中 ,得到最佳氮源为 10 g/L 的黄豆饼 ,此时酶产量为最高。确定了橄榄油为最佳

碳源,黄豆饼为最佳氮源,质量浓度均为 10 g/L,发高幅度高达 223%。
酵液的酶活从最初的 94 U/L 提高到了 304 U/L,提

表 3 碳源影响
Tab. 3 Influences of carbon resource

碳源/ (g/L)	酶产量/ (U/L)	细胞干重/ (g/L)	碳源/ (g/L)	酶产量/ (U/L)	细胞干重/ (g/L)
对照	99	2. 84	h 硬脂酸(10)	163	2. 30
a 淀粉(10)	150	1. 92	i 油酸(10)	0	3. 18
b 蔗糖(10)	78	3. 52	j 棕榈酸(10)	191	1. 94
c 葡萄糖(10)	117	2. 65	k 月桂酸(10)	0	3. 55
d 甘油(10)	52	2. 69	l 辛酸(10)	0	0. 81
e 吐温-80(10)	255	2. 47	l(5)+d(5)	228	2. 43
f 橄榄油(10)	288	2. 30	l(5)+f(5)	251	2. 61
g 三油酸甘油酯(10)	43	3. 64	d(5)+f(5)	273	2. 61

注 :以上述质量浓度的碳源作为唯一碳源。

表 4 氮源影响
Tab. 4 Influences of nitrogen resource

碳源/ (g/L)	酶产量/ (U/L)	细胞干重/ (g/L)	碳源/ (g/L)	酶产量/ (U/L)	细胞干重/ (g/L)
对照	94	2. 76	α NH ₄) ₂ SO ₄ (10)	33	0. 60
A 牛肉膏(10)	102	2. 60	B(5)+E(5)	285	4. 16
B 蛋白胨(10)	177	4. 20	B(5)+α 3)+α 2)	108	4. 93
C 酵母膏(10)	210	3. 00	A(3)+B(5)+α 2)	81	3. 16
D 尿素(10)	29	0. 70	B(5)	167	2. 41
E 黄豆饼(10)	304	3. 50	B(5)+F(5)	159	2. 43
F KNO ₃ (10)	17	0. 60	B(5)+D(5)	206	2. 12

注 :以橄榄油为碳源,上述质量浓度的氮源作为唯一氮源。

2.3 PB 实验筛选重要因素

实验结果见表 5。由实验数据拟合得到的模型方程为

$$Y_1 = 301.583\ 3 + 9.916\ 667X_1 - 1.416\ 667X_2 - 0.75X_3 - 5.416\ 667X_4 - 1.416\ 667X_5 - 2.583\ 333X_6 - 6.583\ 333X_7 + 1.75X_8 + 6.75X_9 + 2.916\ 667X_{10}$$

因此 7 个因素(黄豆饼质量浓度,MgSO₄质量浓度,K₂HPO₄质量浓度,(NH₄)₂SO₄质量浓度,橄榄油质量浓度,NaCl 质量浓度,pH 值)的效应分别是 9.916 667,-1.416 667,-5.416 667,-1.416 667,-6.583 333,1.75,2.916 667。通过 SAS 软件分析可知 R²_{adj} 为 98%,说明响应面 98% 的变化可以由此模型解释。F 检验(P = 0.092 539)说明回归在统计学上是显著的。t 检验表明对产酶影响最大的 3 个因素是橄榄油质量浓度、黄豆饼质量浓度和 K₂HPO₄质量浓度。

2.4 最陡爬坡实验

爬坡由 Packett-Burman 实验的中心点开始,沿

着黄豆饼质量浓度增加,橄榄油和 K₂HPO₄质量浓度减小的方向移动(由 PB 实验拟合得到的方程知,黄豆饼质量浓度为正效应,橄榄油和 K₂HPO₄质量浓度为负效应)。X₁ 每次增加 2.48,X₄ 每次减少 0.27,X₇ 每次减少 1.65 为基本步长,步长的计算方法见文献[10]。爬坡实验的设计以及结果见表 5。可以看出,当黄豆饼的质量浓度为 17.46 g/L,K₂HPO₄的质量浓度为 1.96 g/L,橄榄油的质量浓度为 9.2 g/L 的时候,得到最大酶活为 343 U/L。这表明这个点在最大产酶响应面附近。

2.5 中心组合实验和响应面分析

根据最陡爬坡实验,中心组合实验在最优点的附近进行,以爬坡实验的条件 3 为中心点进行中心组合实验,选择三元二次正交的组合设计,含有 8 个析因点,6 个星号点,在中心点重复 6 次实验。以黄豆饼的质量浓度(X₁)、K₂HPO₄的质量浓度(X₄)、橄榄油的质量浓度(X₇)为自变量。各自变量水平见表 6,实验设计以及结果见表 7。

表 5 最陡爬坡实验设计以及结果

Tab. 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding response

	$X_1/(g/L)$	$X_4/(g/L)$	$X_7/(g/L)$	$Y/(U/L)$
(1)基点(PB 实验的中心点)	12. 5	2. 5	12. 5	
(2)原始步调单位(PB 实验质量浓度变化幅度)	2. 5	0. 5	2. 5	
(3)斜坡(PB 回归方程的系数)	9. 916 667	-5. 416 667	-6. 583 333	
(4)对应的质量浓度(2)*(3)	24. 791 668	-2. 708 334	-16. 458 333	
(5)新的步调单位(4)*0. 1	2. 48	-0. 27	-1. 65	
实验 1	12. 50	2. 50	12. 50	302
实验 2	14. 98	2. 23	10. 85	317
实验 3	17. 46	1. 96	9. 20	343
实验 4	19. 94	1. 69	7. 55	298
实验 5	22. 42	1. 42	5. 90	175

表 6 中心组合实验中变量以及水平

Tab. 6 Levels of the variables tested in central composite design

因 素	水 平					Δx_i
	-1. 682	-1	0	1	1. 682	
$X_1/(g/L)$	13. 295	15	17. 5	20	21. 700	2. 5
$X_4/(g/L)$	0. 659	1	1. 5	2	2. 341	0. 5
$X_7/(g/L)$	6. 977	8	9. 5	11	12. 023	1. 5

表 7 中心组合实验设计以及结果

Tab. 7 Experimental design and results of central composite design

序号	X_1	X_4	X_7	$Y/(U/L)$
1	-1	-1	-1	233
2	-1	-1	1	245
3	-1	1	-1	270
4	-1	1	1	283
5	1	-1	-1	291
6	1	-1	1	274
7	1	1	-1	266
8	1	1	1	302
9	-1. 682	0	0	180
10	1. 682	0	0	254
11	0	-1. 682	0	285
12	0	1. 682	0	343
13	0	0	-1. 682	216
14	0	0	1. 682	318
15	0	0	0	347
16	0	0	0	352
17	0	0	0	339
18	0	0	0	345
19	0	0	0	351
20	0	0	0	353

由实验数据拟合得到二次多项式方程为：

$$Y = 347.527\ 70 + 16.581\ 67X_1 + 12.853\ 92X_4 + 15.782\ 79X_7 - 44.259\ 47X_1X_1 - 9X_1X_4 - 0.75X_1X_7 - 9.964\ 73X_4X_4 + 6.75X_4X_7 - 26.581\ 76X_7X_7$$

由此方程绘出响应面图(见图 1~3),可以直观地看出最大酶产量约为 350 U/L 左右。

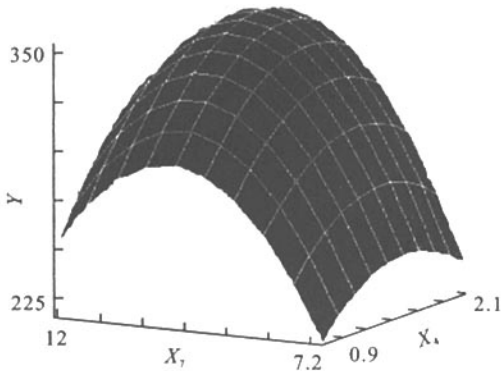


图 1 X_4 和 X_7 对水解酶产量的中心组合响应曲面

Fig. 1 Response surface plots of X_4 and X_7 on hydro-lase production

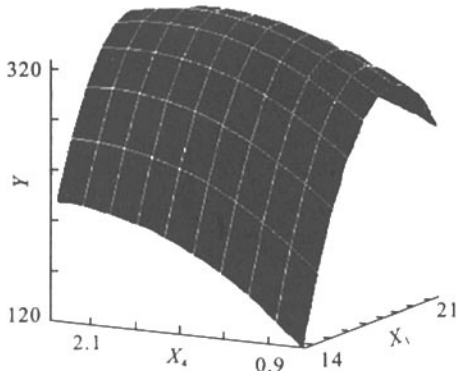


图 2 X_1 和 X_4 对水解酶产量的中心组合响应曲面

Fig. 2 Response surface plots of X_1 and X_4 on hydro-lase production

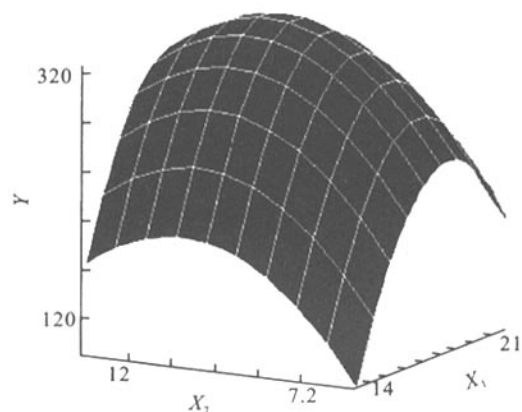


图3 X_1 和 X_7 对水解酶产量的中心组合响应曲面

Fig. 3 Response surface plots of X_1 and X_7 on hydrolytic enzyme production

通过 SAS 软件分析可知 R^2 为 93.35%, 说明响应面 93.35% 的变化可以由此模型解释。F 检验 ($P = 0.0001$) 说明回归在统计学上是显著的。因此可以用此方程代替真实实验点进行分析和预测。由 SAS 软件计算得, 最大响应值对应的 3 个因素黄

豆饼质量浓度 (X_1)、 K_2HPO_4 质量浓度 (X_4)、橄榄油质量浓度 (X_7) 分别为 17.8 g/L、1.78 g/L、10.2 g/L。此时得到的最大产酶量为 356 U/L。为了检验模型预测的准确性, 在最佳反应条件处进行实验, 得出实际产酶量为 358 U/L, 可见该模型可以较好地预测实际产酶情况。

3 结 论

使用 Plackett-Burman 实验和响应面法相结合的实验方法对烯丙醇酮乙酸酯水解酶产生菌的产酶条件进行了优化, 获得了产酶的优化培养基组成: 黄豆饼 17.8 g/L、橄榄油 10.2 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L、 K_2HPO_4 1.78 g/L、NaCl 1 g/L、 $MgSO_4$ 0.2 g/L; pH 7.0。在此条件下, 发酵液的酶产量由最初的 94 U/L 提高到优化后的 358 U/L, 提高幅度达到了 281%。

参考文献 (References):

- [1] 张一宾, 张峰. 农药 [M]. 北京: 中国物资出版社, 1997: 175.
- [2] 张玉彬. 生物催化的手性合成 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 234–270.
- [3] 胡良平. Windows SAS 6.12&8.0 实用统计分析教程 [M]. 北京: 军事医学出版社, 2000.
- [4] R. V. Muralidhar, R. R. Chirumamila, R. Marchant et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. *Biochemical Engineering Journal* 2001, 9: 17–23.
- [5] Murat Elibil, Dursun Ozer. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus* [J]. *Process Biochemistry* 2002, 38: 367–372.
- [6] 梅乐和, 胡升, 许静, 等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化 [J]. 浙江大学学报: 工学版, 2005, 38(10): 1355–1360.
- Mei Le-he, Hu Sheng, Xu Jing et al. Screening of *Bacillus subtilis* natto and optimization of nattokinase fermentation [J]. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)* 2005, 38(10): 1355–1360. (in Chinese)
- [7] 赵玉巧, 许建和. 不动杆菌生物合成新型羧酸酯酶的摇瓶培养条件优化 [J]. 高校化学工程学报, 2005, 19(4): 523–526.
- Zhao Yu-qiao, Xu Jian-he. Optimization of *Acinetobacter* sp. culture conditions in shake flasks for efficient biosynthesis of a novel carboxylesterase [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* 2005, 19(4): 523–526. (in Chinese)
- [8] 胡伟, 唐世平, 杨立荣, 等. 丙酮醇和丙酮乙酸酯对映体分析的气相色谱方法研究 [J]. 色谱, 2002, 20(4): 359–361.
- Hu wei, Tang Shi-ping, Yang Li-rong et al. Development of gas chromatographic method for chiral analysis of acrylic ketone alcohol and acrylic ketone acetate [J]. *Chinese Journal of Chromatography* 2002, 20(4): 359–361. (in Chinese)
- [9] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 1999, 20(2): 58–61.
- Chu Yi-wen. Optimal method and OPTI optimal software of microbial medium [J]. *World Notes on Antibiotics* 1999, 20(2): 58–61. (in Chinese)
- [10] 袁志发. 试验设计与分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 339–346.
- [11] B. S. Chu, S. Y. Quek, B. S. Baharin. Optimisation of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate [J]. *Food Chemistry* 2003, 80(3): 295–302.
- [12] Stellmach, B. Bestimmungs Methoden Enzyme [M], Trans: Qian, J. Y., Chinese Light Industry Press, Beijing, 1992.