

产低温脂肪酶菌株 CZW001 发酵培养基优化研究

王春雨 迟乃玉 张庆芳 窦少华*

(大连大学 生命科学与技术学院 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

摘要: 【目的】研究产低温脂肪酶菌株 CZW001 发酵培养基。【方法】在单因素试验的基础上, 采用 Plackett-Burman (P-B)设计、Box-Behnken (B-B)设计和响应面设计 (RSM), 在 20 °C、pH 8.0、160 r/min 发酵 2 d 条件下, 对发酵培养基进行优化。【结果】该菌株最适产酶培养基为(g/L): 葡萄糖 7.68, 橄榄油 21.93, 硫酸铵 2.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.27, 氯化钙 0.3, 氯化钠 20.0, 吐温-80 1.0。其最高酶活为 62.8 U/mL, 比优化前提高了 3.14 倍。【结论】通过对产低温脂肪酶菌株 CZW001 发酵培养基优化研究, 明显提高低温脂肪酶活力。

关键词: *Bacillus thuringiensis*, 低温脂肪酶, 发酵, 优化

Optimization of fermentation medium for low-temperature lipase-producing strain CZW001

WANG Chun-Yu CHI Nai-Yu ZHANG Qing-Fang DOU Shao-Hua*

(Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: [Objective] Research on the fermentation medium to produce low-temperature lipase strain CZW001. [Methods] Based on single factor test results, the liquid fermentation medium for the production of cold-active lipase by CZW001 was optimized using Plackett-Burman, Box-Behnken and response surface method under follow conditions: temperature 20 °C, pH 8.0, stirred velocity 160 r/min and fermentation time 2 d. [Results] The optimal fermentation medium of the strain is as follows (g/L): glucose 7.68, olive oil 21.93, (NH₄)₂SO₄

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306)

*通讯作者: Tel: 86-411-87402624; 信箱: doushaohua@dlu.edu.cn

收稿日期: 2012-11-05; 接受日期: 2012-12-17

2.0, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.27, CaCl_2 0.3, NaCl 20.0, Tween-80 1.0. Under these conditions, the highest total enzyme activity (62.8 U/mL) was obtained and increased by 3.14 times compared with the original value before optimization. **[Conclusion]** The study on optimizing the fermentation medium to produce low-temperature lipase strain CZW001 obviously improved the lipase enzyme activity at low temperature.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Low-temperature lipase, Fermentation, Optimization

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3), 又称甘油三酯水解酶, 是一类重要的工业酶, 可以在油水界面上催化甘油三酯水解生成脂肪酸和甘油, 以及甘油一酯和甘油二酯, 广泛存在于动物、植物各种组织及微生物中, 是最早研究的酶类之一^[1]。根据 Msergin 等^[2]的定义, 可以把最适酶活温度在 30 °C 左右, 在 0 °C 左右仍有一定催化活性的脂肪酶称为低温脂肪酶。而大多数低温脂肪酶是由低温微生物生产, 它们长期生活在低温环境中, 如南极、北极以及海洋底部等极端环境中。目前所发现的产低温脂肪酶的低温微生物大都属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)等^[3-4]。

工业上应用的脂肪酶主要是通过微生物发酵生产的。若生产中菌株产酶量不高, 可以对菌株的产酶条件进行优化, 从而提高产酶量。因此对菌株产酶条件的研究显得尤为重要。在脂肪酶产酶条件优化中, 通常采用全因子实验和部分因子实验。全因子试验中由于因子较多, 需要大量次数的实验; 而部分因子实验, 如正交实验设计不仅对影响因子数量有一定的限制, 而且数据利用率较低。Plackett-Burman (P-B)法是一种以不平衡块(Balanced incomplete blocks)为原理的试验设计, 它能够从众多的过程变量中快速、有效地筛选出最为重要的几个因素, 为进一步研究提供基础^[5]。与随机平衡实验和部分因子实验相比, Plackett-Burman 设计在筛选重要因子方面准确有效^[6]。响应面法(Response surface methodol-

ogy, RSM)有效地结合数学方法和统计分析, 通过对几个响应过程变量进行数学建模分析, 能定向地优化响应因子。因而本文章采用 P-B 法和响应面法(RSM)对菌株 CZW001 发酵培养基进行优化, 以提高产酶量。

1 材料与方法

1.1 菌株

苏云金芽胞杆菌 CZW001 筛选自海水、海泥样品(黄海大连长海县海域), 由国家海洋监控中心提供, 现由大连大学辽宁省海洋微生物生物工程技术研究中心保藏。该脂肪酶为低温脂肪酶, 最适温度为 25 °C。

1.2 培养基

Luria-Bertani (LB)培养基^[7](g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 琼脂 15, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, KH_2PO_4 2, FeSO_4 0.6, NaCl 20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, 橄榄油 (V/V) 20, Tween-80 2, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 1, NaCl 5, 琼脂 18, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 脂肪酶活性测定方法

酶活定义: 在 pH 8.0、25 °C 条件下作用 10 min, 每分钟分解橄榄油释放 1 μmol 脂肪酸铜所需的酶量。

取 3 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)和 1 mL 橄榄油, 放入水浴恒温磁力搅拌, 25 °C 预热 5 min, 加入 0.1 mL 酶溶液, 磁力搅拌 10 min, 立即加入 8 mL 苯, 继续搅拌 2 min, 终止反应, 同时萃取生成的脂肪酸。将溶液转移至离心管中。4 000 r/min 离心 10 min, 有机相和水相分离澄清。取上层有机相 4 mL 于小锥形瓶中, 加入 1 mL 显色剂, 磁力搅拌 3 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上层含有脂肪酸铜的苯溶液, 用分光光度计在 710 nm 波长测 *OD* 值。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的 P-B (Plackett-Burman)设计

2.1.1 P-B 因素水平及编码设计: 本设计以脂肪酶活力为评价指标, 因素水平及编码见表 1, 数据分析和模型建立由 Minitab 软件完成。

2.1.2 P-B 设计筛选重要影响因素: 由表 1 和 Minitab 软件得到 P-B 实验设计, 每组配方做 3 个平行样, 在 20 °C、160 r/min 条件下发酵 2 d, 每个样品测 3 次求平均酶活, 算出每组配方 3 个平行样的平均值, 得响应值表(表 2), 进而得到 P-B

设计的各因素水平及效应评价(表 3)。

由表 3 可以看出, 葡萄糖、橄榄油、硫酸镁影响菌株 CZW001 产酶的可信度大于 95%, 达到显著水平。

2.2 发酵培养基的最陡爬坡试验研究最大响应值区域

针对葡萄糖、橄榄油、硫酸镁 3 个因素的浓度进行最陡爬坡试验, 将葡萄糖和橄榄油的浓度按照步长逐步增大, 硫酸镁的浓度逐步减少以寻找最大响应区域。操作同上, 试验设计和结果如表 4 所示, 第 2 组实验中, 当葡萄糖 0.75%, 橄榄油 2.20%, 硫酸镁 0.03%时酶活达到最大值, 此后浓度继续变化酶活不断降低。所以以第 2 组实验作为中心组合实验的中心点。

2.3 发酵培养基的响应曲面实验设计

2.3.1 B-B (Box-Behnken) 中心组合实验设计: 响应面分析设计三因素三水平共 15 个试验点, 其中 12 个试验点为析因点, 3 个为零点, 零点实验重复 3 次用于估计试验误差。因素和水平设计见表 5, 操作同 2.1.2, 结果见表 6。数据分析和模型建立由 Minitab 软件完成。

表 1 因素和水平设计
Table 1 Design of factors and levels

代码 Code	因素 Factors	水平 Levels	
	参数 Parameters	-1	+1
A	葡萄糖 Glucose (%)	0.25	0.50
B	硫酸铵 Ammonium sulfate (%)	0.10	0.20
C	虚拟项 Virtual items	/	/
D	橄榄油 Olive oil (%)	1.75	2.00
E	磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate (%)	0.10	0.20
F	虚拟项 Virtual items	/	/
G	硫酸镁 Magnesium sulfate (%)	0.03	0.04
H	氯化钙 Calcium chloride (%)	0.02	0.03
I	虚拟项 Virtual items	/	/
J	氯化钠 Sodium chloride (%)	1.50	2.00
K	Tween-80 (%)	0.10	0.20

表2 $N=12$ 的 Plackett-Burman (P-B)实验设计与响应值表
Table 2 Experimental design and response of Plackett-Burman ($N=12$)

序号 Serial number	A	B	(C)	D	E	(F)	G	H	(I)	J	K	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	39.0
2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	40.5
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	40.0
4	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	35.5
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	31.0
6	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	56.2
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	42.8
8	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	43.3
9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	37.1
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	39.4
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	51.4
12	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	32.5

表3 Plackett-Burman 设计的各因素水平及效应评价
Table 3 Factor levels and effect estimates of Plackett-Burman design

代码 Code	因素 Factors (%)	水平 Levels		t 值 t value	Prob> t	重要性 Importance
		-1	+1			
A	葡萄糖 Glucose (%)	0.25	0.50	9.97	0.002	1
B	硫酸铵 Ammonium sulfate (%)	0.10	0.20	-5.59	0.011	4
D	橄榄油 Olive oil (%)	1.75	2.00	10.01	0.002	2
E	磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate (%)	0.10	0.20	-3.61	0.036	5
G	硫酸镁 Magnesium sulfate (%)	0.03	0.04	-6.05	0.009	3
H	氯化钙 Calcium chloride (%)	0.02	0.03	-1.09	0.354	7
J	氯化钠 Sodium chloride (%)	1.50	2.00	2.74	0.071	6
K	Tween-80 (%)	0.10	0.20	0.60	0.592	8

Note: $R^2=98.97\%$; Adj $R^2=96.24\%$.

表4 最陡爬坡实验设计及实验结果
Table 4 Experimental design and the results of steepest ascent

序号 Serial number	葡萄糖 Glucose (%)	橄榄油 Olive oil (%)	硫酸镁 Magnesium sulfate (%)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	0.50	2.10	0.04	48.2
2	0.75	2.20	0.03	62.5
3	1.00	2.30	0.02	45.6
4	1.25	2.40	0.01	42.3

表 5 因素和水平设计
Table 5 Design of factors and levels

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	+1
葡萄糖 Glucose	0.50	0.75	1.00
橄榄油 Olive oil	2.10	2.20	2.30
硫酸镁 Magnesium sulfate	0.02	0.03	0.04

表 6 $N=15$ 的 Box-Behnken 实验设计与响应值表
Table 6 Experimental design and response of Box-Behnken ($N=15$)

序号 Serial number	葡萄糖 Glucose (g/L)		橄榄油 Olive oil (g/L)		硫酸镁 Magnesium sulfate (g/L)		酶活 Enzyme activity (U/mL)
	X_1	Code X_1	X_2	Code X_2	X_3	Code X_3	
1	7.5	0	22	0	0.3	0	62.9
2	7.5	0	23	1	0.4	1	46.5
3	5.0	-1	21	-1	0.3	0	43.4
4	7.5	0	21	-1	0.2	-1	54.4
5	7.5	0	22	0	0.3	0	62.2
6	5.0	-1	22	0	0.2	-1	53.6
7	7.5	0	21	-1	0.4	1	38.0
8	10.0	1	22	0	0.2	-1	51.6
9	5.0	-1	22	0	0.4	1	44.4
10	7.5	0	23	1	0.2	-1	44.5
11	10.0	1	21	-1	0.3	0	53.2
12	10.0	1	23	1	0.3	0	45.0
13	7.5	0	22	0	0.3	0	62.1
14	5.0	-1	23	1	0.3	0	53.4
15	10.0	1	22	0	0.4	1	51.0

2.3.2 二次回归拟合与方差分析: 在 20 °C、pH 8.0、160 r/min 条件下发酵 2 d。运用 Minitab 软件对试验数据进行回归分析, 得出回归方程:

$$Y=62.4+0.75X_1+0.05X_2-3.03X_3-4.68X_1^2-8.96X_2^2-7.58X_3^2-4.55X_1X_2+2.15X_1X_3+4.6X_2X_3。$$

进行显著性检验和方差分析, 见表 7 和表 8。从表 7 显著性检验结果可以看出试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系, 三因素之间交互效应较大; 回归方程的相关系数 $R^2=99.29\%$, 表明该模型拟和程度良好, 试验设计可靠; 从表 8

中的方差分析结果可以看出, 方程的失拟项为 $0.100>0.05$, 表明失拟不显著, 模型稳定, 能很好地进行预测。

2.3.3 响应面分析: 根据响应面法分析数据绘出响应面及其等高线图, 直观反应出葡萄糖、橄榄油和硫酸镁及其交互作用对酶活的影响(图 1-6)。在响应面图中圆形等高线表示参数之间交互作用不显著, 椭圆型或马鞍型等高线表示参数之间交互作用显著。

表 7 回归系数显著性检验
Table 7 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

变量 Variable coefficient	系数估计 Coefficient estimation	标准误 Standard error	t 值 t value	Prob>t
X_1	0.750 0	0.373 7	2.007	0.101
X_2	0.050 0	0.373 7	0.134	0.899
X_3	-3.025 0	0.373 7	-8.096	0.000
X_1X_1	-4.675 0	0.550 0	-8.500	0.000
X_2X_2	-8.975 0	0.550 0	-16.318	0.000
X_3X_3	-7.575 0	0.550 0	-13.772	0.000
X_1X_2	-4.550 0	0.528 4	-8.610	0.000
X_1X_3	2.150 0	0.528 4	4.069	0.010
X_2X_3	4.600 0	0.528 4	8.705	0.000

Note: R^2 =99.29%; Adj R^2 =98.02%.

表 8 回归方程的方差分析
Table 8 Variance analysis for regression equation

方差来源 Variance source	自由度 Degrees of freedom	调整平方和 Adjustment sum of squares	调整均方 Adjustment mean square	F 值 F value	Prob>F
回归 Regression	9	782.679	86.964	77.86	0.000
线性 Linear	3	77.725	25.908	23.19	0.002
平方 Square	3	519.014	173.005	154.88	0.000
交互作用 Interaction	3	185.940	61.980	55.49	0.000
残差误差 Residual error	5	5.585	1.117		
失拟 Loss of quasi	3	5.205	1.735	9.13	0.100
纯误差 Pure error	2	0.380	0.190		
合计 Total	14	788.264			

由葡萄糖、橄榄油和硫酸镁交互影响的曲面图和等高线图响应面可以看出葡萄糖、橄榄油和硫酸镁的浓度与酶产量存在显著的相关性。葡萄糖与橄榄油交互作用影响酶产量最显著，硫酸镁与橄榄油交互作用影响酶产量效果次之，葡萄糖与硫酸镁交互影响酶产量较其它交互影响不显著。

2.3.4 最优条件的确定与验证: 用 Minitab 软件得

到优化图(图 7), 由图 7 可以得到最大酶活对应的各因素参数值, 预测最大酶活为 62.7 U/mL 时所对应的葡萄糖、橄榄油、硫酸镁浓度的编码值分别为 0.070 7、-0.070 7、-0.211 7, 根据编码值与实际值关系, 可得到最佳的浓度为葡萄糖 0.768%, 橄榄油 2.193%, 硫酸镁 0.028%。实测 3 次平均酶活为 62.8 U/mL, 与理论预测吻合良好, 表明采用响应面法优化得到的最佳条件准确可靠。

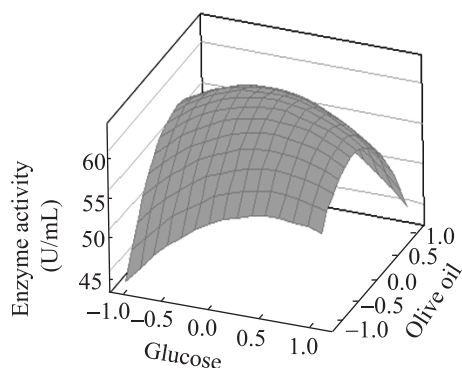


图1 葡萄糖与橄榄油交互影响酶活的曲面图

Fig. 1 The response surface plot for the effects of glucose and olive oil on the enzyme activity

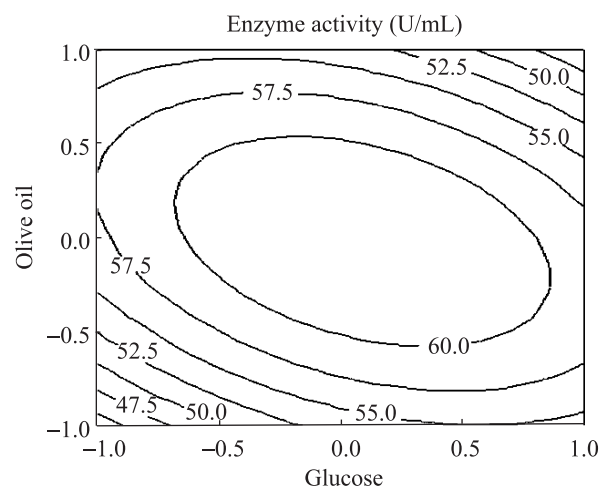


图2 葡萄糖与橄榄油交互影响酶活的等高线图

Fig. 2 The corresponding contour plot for the effects of glucose and olive oil on the enzyme activity

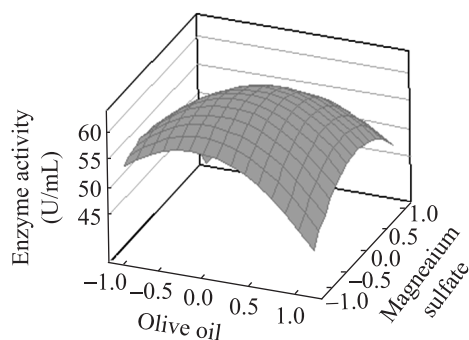


图3 硫酸镁与橄榄油交互影响酶活的等曲面图

Fig. 3 The response surface plot for the effects of magnesium sulfate and olive oil on the enzyme activity

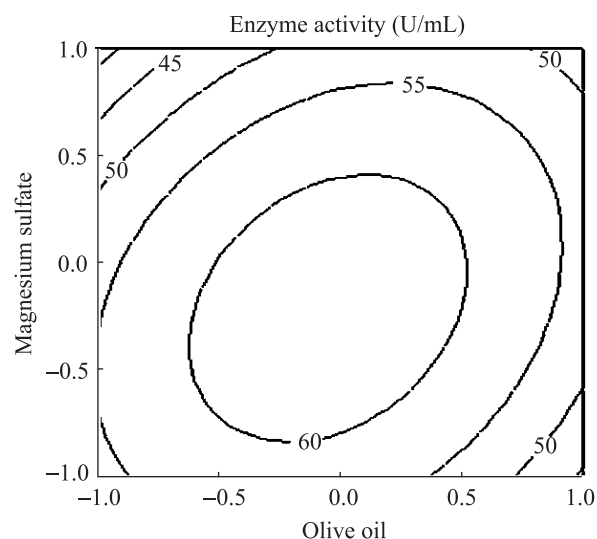


图4 硫酸镁与橄榄油交互影响酶活的等高线图

Fig. 4 The corresponding contour plot for the effects of magnesium sulfate and olive oil on the enzyme activity

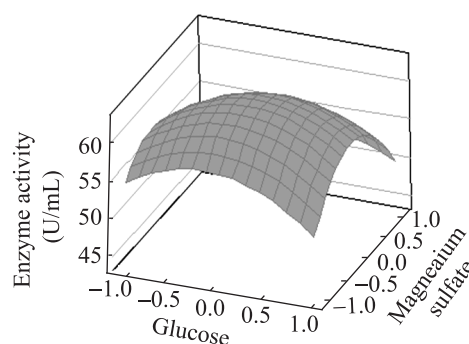


图5 葡萄糖与硫酸镁交互影响酶活的曲面图

Fig. 5 The response surface plot for the effects of glucose and magnesium sulfate on the enzyme activity

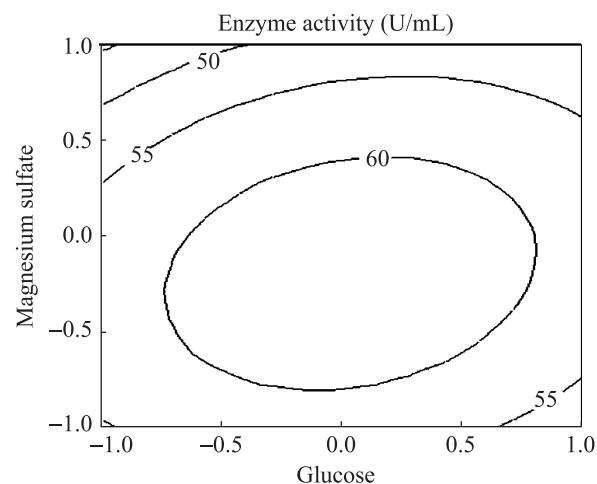


图6 葡萄糖与硫酸镁交互影响酶活的等高线图

Fig. 6 The corresponding contour plot for the effects of glucose and magnesium sulfate on the enzyme activity

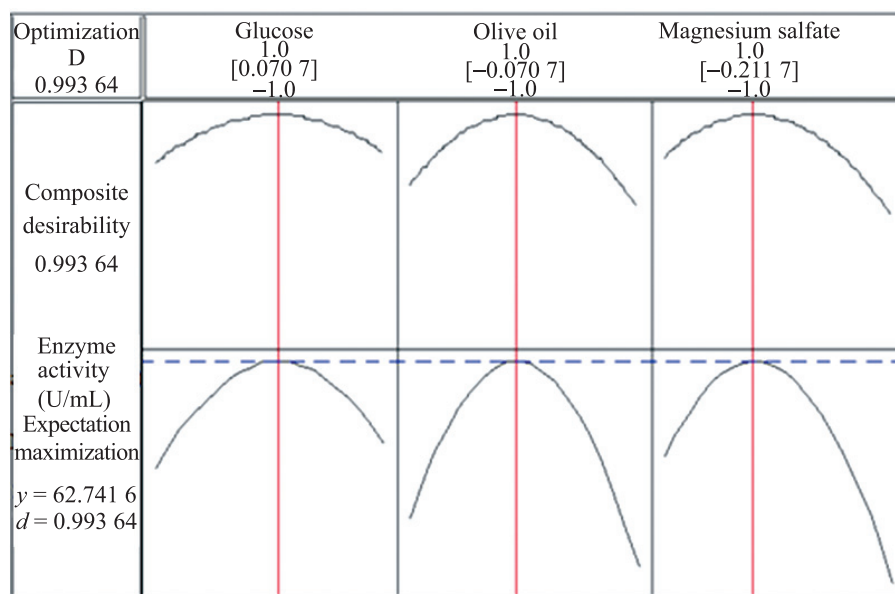


图 7 葡萄糖、橄榄油、硫酸镁的优化图

Fig. 7 Optimal graph about glucose and PVA-olive oil and magnesium sulfate

3 结论

以苏云金芽胞杆菌 CZW001 为目的菌, 在单因素基础上, 采用 Plackett-Burman (P-B) 设计、Box-Behnken (B-B) 设计和 Response surface method (RSM) 设计对培养基优化进行研究, 得到最佳培养基(g/L): 葡萄糖 7.68, 橄榄油 21.93, 硫酸铵 2.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.27, 氯化钙 0.3, 氯化钠 20.0, 吐温-80 1.0。其最高酶活达 62.8 U/mL, 比优化前提高了 3.14 倍。

菌株 CZW001 在 0 °C 能生长, 最适生长温度为 20 °C, 因此该菌株为适冷菌。如阎金勇等^[8]筛出 *Galactomyces geotrichum* Y25, 产酶条件优化后, 发酵周期为 101.95 h, 酶活为 34.65 U/mL; 陈晖等^[9]筛出 *Aspergillus* sp. F044, 最适温度 30 °C, 周期为 72 h, 酶活为 32.15 U/mL; 余琼等^[10]获得 *Pseudomonas* sp. YT34-8, 最适温度为 30 °C, 周期为 48 h, 酶活为 7.833 U/mL; 张搏等^[11]筛出 *Pseudomonas* sp. 26-2, 最适温度为 30 °C, 酶活为 15.5 U/mL。菌株 CZW001 最适温度为 25 °C,

周期为 2 d, 酶活为 62.8 U/mL, 与 *Galactomyces geotrichum* Y25^[8]、*Aspergillus* sp. F044^[9]、*Pseudomonas* sp. YT34-8^[10]和 *Pseudomonas* sp. 26-2^[11]相比, 具有耐低温、发酵周期短和酶活高等优点, 因此该菌株在食品、轻纺、化妆品、洗涤剂、有机合成以及医药等领域有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Qu YT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BT L2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(1): 102-110.
- [2] 林学政, 边际, 何培青. 极地微生物低温适应性的分子机制[J]. 极地研究, 2003, 15(1): 75-82.
- [3] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, et al. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4064-4069.

- [4] Han-Ki L, Min-Jung A. Purification and characterization of cold active lipase from *Psychrotrophic aeromonas* sp. LPB 4[J]. The Journal of Microbiology, 2003, 41(1): 22-27.
- [5] 高修功, 章克昌, 曹淑桂, 等. 假单胞菌产脂肪酶条件的初步探索[J]. 微生物学通报, 1997, 24(3): 152-155
- [6] Pereira MG, Mudge SM. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels[J]. Chemosphere, 2004, 54(3): 297-304.
- [7] Sambrook J, Frish EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual[M]. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 908.
- [8] 阎金勇, 杨江科, 闫云君. *Galactomyces geotrichum* Y25产脂肪酶条件的优化[J]. 生物加工过程, 2007, 5(2): 46-51.
- [9] 陈晖, 杨江科, 刘曼西, 等. 响应面法快速优化曲霉 *Aspergillus* sp. F044产脂肪酶培养条件[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 47-52.
- [10] 余琼, 梁运祥. 产低温脂肪酶假单胞菌的选育及产酶条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(5): 662-665.
- [11] 张搏, 杨江科, 苏华武, 等. 脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 23-26.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。