

响应面法优化枯草芽孢杆菌产脂肪酶的合成培养基^{*}

宋萍 戚小灵 胡燚 谢宁昌^{**}

(南京工业大学生物与制药工程学院 南京 210009)

摘要 对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CICC 20034利用合成培养基液体发酵产脂肪酶的条件进行了优化。首先采用单因子实验筛选出最适诱导剂为三丁酸甘油酯,氮源为尿素,碳源为葡萄糖,无机盐为 MgSO_4 。在此基础上,利用 Plackett-Burman设计对影响产酶因素的效应进行评价,筛选出具有显著效应的三丁酸甘油酯、尿素、 KH_2PO_4 和培养基起始 pH值 4个最显著的因素。用最陡爬坡路径逼近最大产酶区域后,利用响应面中心组合设计对显著因素进行优化,获得最适合成培养基组分为:葡萄糖 8 g/L,尿素 8.57g/L,三丁酸甘油酯 2.62%, KH_2PO_4 2.59 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, TritonX-100 0.5g/L, pH 9.47。优化后的 *B. subtilis* CICC 20034胞外脂肪酶活力达 0.483 U/ml,比初始酶活力 0.072 U/ml提高了 6.7倍。

关键词 脂肪酶 枯草芽孢杆菌 Plackett-Burman设计 响应面法 优化

中图分类号 Q815

脂肪酶 (EC 3.1.1.3)是一类水解和合成长链脂肪酸甘油酯的生物催化剂,广泛应用于油脂加工、洗涤、食品加工、医药、化妆品、皮革加工、饲料、造纸、有机合成、精细化工以及生物能源等领域^[1]。作为一种高效无污染的脱脂剂,脂肪酶在皮革脱脂工艺上尤其具有重要的用途,且在碱性条件下使得脂肪更易从皮中除去。与传统的皂化法、乳化法和溶剂法脱脂相比较,酶法脱脂皮板柔软、富有弹性、粒面毛孔清晰、毛发光亮柔软,对皮革质量有明显的提高^[2]。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)是产胞外脂肪酶的典型微生物,其脂肪酶因对碱性环境有较高的耐受力,应用潜力巨大^[3]。同时 *B. subtilis*具有分泌性强、细胞壁不含内毒素和发酵性能良好等特点,使得 *B. subtilis*倍受遗传工程界的重视,成为继大肠杆菌之后又一具有商业潜力的基因工程表达系统。但国内外报道 *B. subtilis*野生菌生产脂肪酶的产量都比较低^[4]。本文拟通过响应面优化策略,获得适合 *B. subtilis* CICC 20034发酵产脂肪酶的合成培养基,为 *B. subtilis* CICC 20034产脂肪酶的代谢调控研究奠定基础。

收稿日期: 2010-01-21 修回日期: 2010-04-16

^{*}国家自然科学基金重点项目 (20936002)、国家自然科学基金 (20906049)资助项目

^{**}通讯作者,电子信箱: biotech@njut.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* CICC 20034 (中国工业微生物菌种保藏中心)。

1.1.2 培养基 种子培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、NaCl 10。

初始发酵产酶培养基 (g/L): 葡萄糖 8、 KH_2PO_4 2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、TritonX-100 0.5、橄榄油 2% (v/v)、尿素 10。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养 自斜面取 1环菌接入装有 50 ml种子培养基的三角瓶中, 30℃、200 r/min培养 24 h。以 1.5%的接种量接入 250 ml装有 50 ml发酵产酶培养基的三角瓶中, 30℃、200 r/min发酵 14 h。

1.2.2 蛋白的测定 采用 Brandford法^[5],标准蛋白为牛血清白蛋白 (BSA)。

1.2.3 脂肪酶活力测定方法 采用以对硝基苯酚棕榈酸酯 (p-nitrophenyl palmitate, pNPP)为底物的分光光度法^[6]。配制 16.5 mmol/L pNPP的异丙醇溶液;该溶液与 A溶液按照 1:9 (v/v)混合,制成底物溶液。A溶液的配制: 50 mmol/L的磷酸缓冲 (pH7.0),其中含有

0.6% Triton X-100和0.1%的阿拉伯树胶。发酵液于4℃, 1000 g离心10 min,上清液作为粗酶液。在反应体系中加入240 μl底物溶液,10 μl适当稀释的酶液,在酶标仪中进行反应,反应温度为40℃,反应时间10 min,在410 nm处,测定吸光值。对照加10 μl一定稀释倍数的灭活酶液。酶活单位的定义(U):在40℃, pH 7.0条件下,每分钟催化pNPP水解生成1 μmol pNP所需的脂肪酶量。

2 结 果

2.1 单因子实验筛选最适诱导物、氮源、碳源及无机盐

2.1.1 最适诱导剂 改变初始产酶培养基中碳源的种类,分别以2% (v/v)的大豆油、玉米油、葵花籽油、橄榄油和三丁酸甘油酯为诱导剂进行最适诱导剂的筛选。实验结果如图1所示,在供试的5种碳源中,三丁酸甘油酯的效果普遍优于其它诱导剂,故选三丁酸甘油酯为发酵最适诱导剂。

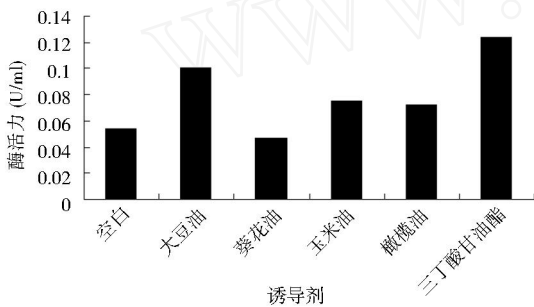


图 1 不同诱导剂对产酶的影响

Fig 1 Effect of various inducers on lipase production

2.1.2 最适氮源 以三丁酸甘油酯作为诱导剂,分别以含氮量为0.75%的尿素、NH₄H₂PO₄、NH₄NO₃、(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl等5种氮源进行最佳氮源的筛选。实验结果如图2所示,尿素的效果普遍优于其它氮源,因此选用尿素为发酵最适氮源。

2.1.3 最适碳源 以三丁酸甘油酯为诱导剂,尿素为氮源,分别以8g/L的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、乳糖和可溶性淀粉作为碳源进行最适碳源的筛选。实验结果如图3所示,在供试的6种碳源中,葡萄糖的效果普遍优于其它碳源,故选葡萄糖为发酵最适碳源。

2.1.4 最适无机盐 无机盐或矿质元素主要为微生物提供除碳、氮源以外的各种重要元素,一些微量元素也可作为酶的激活剂。以三丁酸甘油酯为诱导剂,尿素为氮源,葡萄糖为碳源,分别以1 mmol/L的CaCl₂、

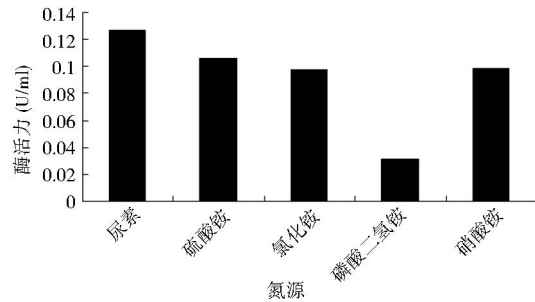


图 2 不同氮源对产酶的影响

Fig 2 Effect of various nitrogen sources on lipase production

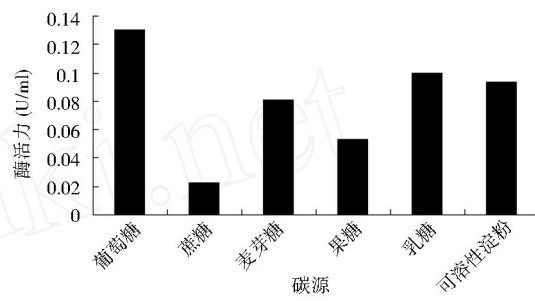


图 3 不同碳源对产酶的影响

Fig 3 Effect of various carbon sources on lipase production

BaCl₂、MnCl₂、CoCl₂代替MgSO₄作为无机盐进行筛选。以不加无机盐的产酶培养基为空白。实验结果如图4所示,MgSO₄对产酶有明显的促进作用。

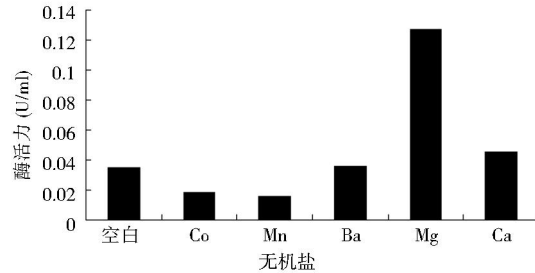


图 4 不同无机盐对产酶的影响

Fig 4 Effect of various salts on lipase production

2.2 Plackett-Burman设计筛选影响脂肪酶液体发酵的显著因素

影响*B. subtilis* CICC 20034液体发酵产酶的可能因素包括三丁酸甘油酯、葡萄糖、尿素、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O(各自的浓度)、培养基起始pH值、摇床转速、和发酵温度等。为对这8个因素进行全面考察,选用N = 12的Plackett-Burman设计,进行12组实验,并设2

个空白作为误差分析项。每个因素取高 (+1)低 (-1) 两个水平。运用 Statistical 8.0 软件分别计算各因素的效应值,并对各因素效应进行 t 检验,选择置信度较高的因素作为显著因素作进一步考察。

Plackett-Buman 设计及实验测得的酶活力结果见表 1,各因素所代表的参数、水平及因素效应评价见表 2。由表 2 可知,对产酶有显著影响 (置信度大于 95%) 的因素有三丁酸甘油酯、尿素、KH₂PO₄ 和培养基起始 pH 值。其中三丁酸甘油酯、KH₂PO₄ 和起始 pH 值对产酶呈现出正效应,尿素则呈现出较大的负效应。要提高产酶量,应适当提高三丁酸甘油酯、KH₂PO₄ 和起始 pH 值的浓度,降低尿素的浓度。其它因素对产酶影响不显著,维持在低水平。

表 1 N=12 的 Plackett-Buman 设计及结果
Table 1 Experimental design of Plackett-Buman and corresponding results

编码	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	酶活 (U/ml)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.168
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.172
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.112
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.117
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.280
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.164
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.153
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.150
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0.200
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.272
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.191
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.148

表 2 Plackett-Buman 设计的各因素水平
及效应评价 (α=0.05,置信度 95%)

Table 2 Factors, levels and effect estimates of Plackett-Buman design

代码	因素 (Factors) 参数	水平 (Levels)		效应	显著性检验		
		低 (-1)	高 (+1)		值	大于 t 的概率	Pr> t
X1	三丁酸甘油酯 (%)	1.5	2	0.0365	24	3333	0.0261*
X2	葡萄糖 (g/L)	8	12	0.0028	1	8889	0.3100
X3	尿素 (g/L)	10	15	-0.0665	-44	3333	0.0144*
X4	空白	-	-	0.0028	1	8889	0.3100
X5	KH ₂ PO ₄ (g/L)	1	2	0.0382	25	4444	0.0250*
X6	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0.25	0.5	0.0112	7	4444	0.0850
X7	培养基起始 pH	7	8	0.0502	33	4444	0.0190*
X8	摇床转速 (r/min)	200	250	-0.0062	-4	1111	0.1519
X9	空白	-	-	0.0045	3	0000	0.2048
X10	发酵温度 (°C)	30	37	-0.0165	-11	0000	0.0577

2.3 最陡爬坡实验确定响应面实验因素水平的中心点

响应面拟合方程只有在考察的邻近区域里才能较好地反映真实情形,所以,应先逼近最大产酶区域后再建立有效的拟合方程。根据 Plackett-Buman 法筛选出的显著因素效应大小设定它们的步长,进行最陡爬坡实验设计,寻找最大产酶区。

三丁酸甘油酯、尿素、KH₂PO₄、培养基起始 pH 值四者浓度的步长依次取 -0.10、0.2、0.2、0.2。最陡爬坡实验设计及实验测得的酶活力结果见表 3。由表 3 可知,最大产酶区在第 4 组实验附近,故以第 4 组的实验条件为响应面实验因素水平的中心点。

表 3 最陡爬坡实验设计及结果

Table 3 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

编码	X ₁	X ₃	X ₅	X ₇	酶活 (U/ml)
1	2.0	10	2.0	8.0	0.141
2	2.2	9.5	2.2	8.5	0.285
3	2.4	9.0	2.4	9.0	0.352
4	2.6	8.5	2.6	9.5	0.456
5	2.8	8.0	2.8	10.0	0.165
6	3.0	7.5	3.0	10.5	0.129

2.4 响应面 (central composite design type) 设计确定显著因素的最优水平

运用 Statistical 8.0 软件设计了 4 因素 5 水平共 26 个试验点的响应面中心组合实验,实验设计的因素及水平见表 4。响应面中心组合实验设计及实验测得的酶活结果见表 5。由 Statistical 8.0 软件拟合得响应量 Y[脂肪酶酶活 (U/ml)] 与自变量 (影响产酶的显著因素) 关系的多项式回归模型为: $Y = 0.478 + 0.0294X_1 - 0.1886X_1X_1 + 0.0341X_3 - 0.1166X_3X_3 - 0.0087X_5 - 0.1683X_5X_5 - 0.0191X_7 - 0.1711X_7X_7 - 0.0016X_1X_3 - 0.0836X_1X_5 - 0.0129X_1X_7 + 0.0049X_2X_5 - 0.0049X_3X_7 + 0.0161X_5X_7$ 。

表 4 响应面中心组合设计的因素及水平

Table 4 Factors and levels of response surface central composite design

代码	因素 参数	水平				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	三丁酸甘油酯 (%)	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0
X ₃	尿素 (g/L)	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
X ₅	KH ₂ PO ₄ (g/L)	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0
X ₇	培养基起始 pH	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5

表 5 响应面中心组合实验设计及结果

Table 5 Response surface central composite design and corresponding results

编号	X ₁	X ₃	X ₅	X ₇	酶活 (U/ml)
1	-1	-1	-1	-1	0.083
2	-1	-1	-1	1	0.077
3	-1	-1	1	-1	0.14
4	-1	-1	1	1	0.158
5	-1	1	-1	-1	0.136
6	-1	1	-1	1	0.094
7	-1	1	1	-1	0.222
8	-1	1	1	1	0.219
9	1	-1	-1	-1	0.216
10	1	-1	-1	1	0.136
11	1	-1	1	-1	0.103
12	1	-1	1	1	0.106
13	1	1	-1	-1	0.245
14	1	1	-1	1	0.224
15	1	1	1	-1	0.165
16	1	1	1	1	0.127
17	-2	0	0	0	0.066
18	2	0	0	0	0.146
19	0	-2	0	0	0.251
20	0	2	0	0	0.249
21	0	0	-2	0	0.18
22	0	0	2	0	0.113
23	0	0	0	-2	0.156
24	0	0	0	2	0.126
25	0	0	0	0	0.479
26	0	0	0	0	0.477

回归方程系数的估计见表 6。在 $\alpha = 0.05$ 水平上,该模型失拟不显著,回归高度显著。决定系数 (R^2 -square) =96.8%,表明 96.8%的酶活变化可由此模型解释,与实际情况拟合很好。该方程为 *B. subtilis* CICC 20034 发酵产脂肪酶提供了一个合适的模型,因此可用上述模型代替真实实验点对脂肪酶发酵进行分析和预测。

表 6 回归模型系数的估计

参数 (Term)	参数估计 (Estimate)	标准误差 (Std Err)	t 值	大于 t 的概率
X1	0.0294	0.0114	2.5801	0.0256
X1 XX1	-0.1886	0.0134	-14.1043	0.0000
X3	0.0341	0.0114	2.9894	0.0123
X3 XX3	-0.1166	0.0134	-8.7188	0.0000
X5	-0.0087	0.0114	-0.7675	0.4590
X5 XX5	-0.1683	0.0134	-12.5896	0.0000
X7	-0.0191	0.0114	-1.6738	0.1223
X7 XX7	-0.1711	0.0134	-12.7953	0.0000
X1 XX5	-0.0016	0.0140	-0.1164	0.9095
X1 XX5	-0.0836	0.0140	-5.9888	0.0001
X1 XX7	-0.0129	0.0140	-0.9220	0.3763
X3 XX5	0.0049	0.0140	0.3491	0.7336
X3 XX7	-0.0049	0.0140	-0.3491	0.7336
X5 XX7	0.0161	0.0140	1.1548	0.2726

运用 Statistical 8.0 对回归模型进行规范形分析,寻求最大产酶量的稳定点及对应的因素水平,结合图 5~图 10 给出的回归方程的三维响应面图可知,回归模型存在稳定点 (0.0904, 0.1459, -0.0492, -0.0636),对应的 X_1 、 X_3 、 X_5 、 X_7 实际取值为 (2.62, 8.57, 2.59, 9.47), Y 的最大估计值为 0.480 U/ml。即当三丁酸甘油酯、尿素和 KH_2PO_4 浓度分别为 2.62%, 8.57g/L 和 2.59g/L,培养基起始 pH 值为 9.47 时,该模型预测的最高酶活为 0.480 U/ml,而实际发酵酶活为 0.483 U/ml,进一步说明该模型能够较好地预测实际发酵情况。

优化后的 *B. subtilis* CICC 20034 脂肪酶液体发酵生产最佳培养基组成为:葡萄糖 8g/L,尿素 8.57g/L,三丁酸甘油酯 2.62%, KH_2PO_4 2.59g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, TritonX-100 0.5g/L, pH 9.47。

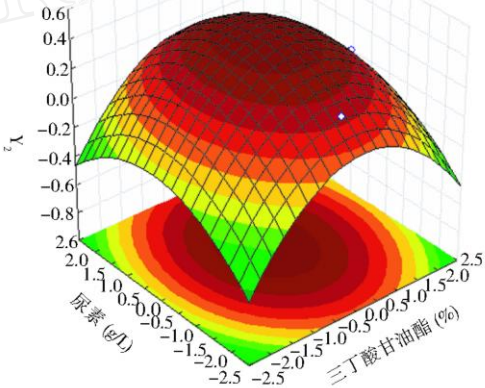


图 5 三丁酸甘油酯和尿素影响产酶量的响应面图

Fig 5 Surface for the effects of tributyrin vs urea on lipase production

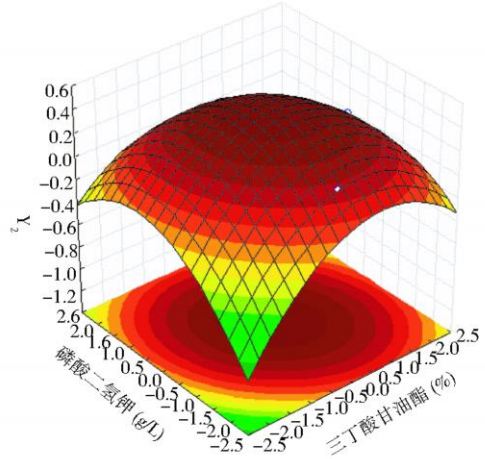


图 6 三丁酸甘油酯和 KH_2PO_4 影响产酶量的响应面图

Fig 6 Surface for the effects of tributyrin vs KH_2PO_4 on lipase production

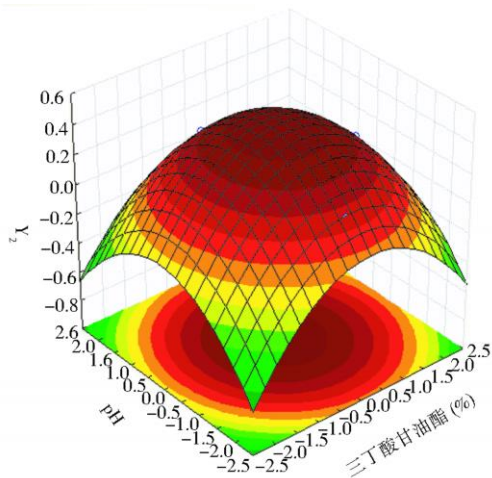


图 7 三丁酸甘油酯和 pH影响产酶量的响应面图
Fig 7 Surface for the effects of tributyrin vs pH on lipase production

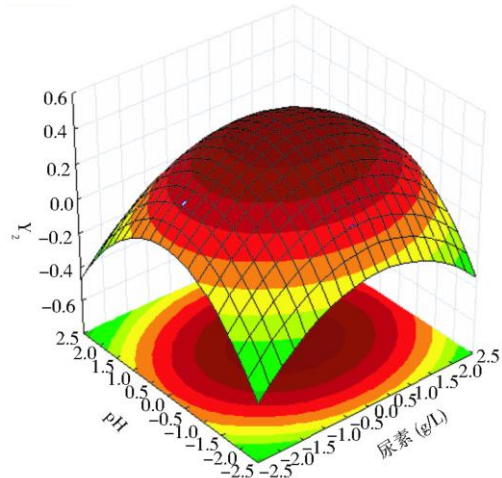


图 9 尿素和 pH影响产酶量的响应面图
Fig 9 Surface for the effects of urea vs pH on lipase production

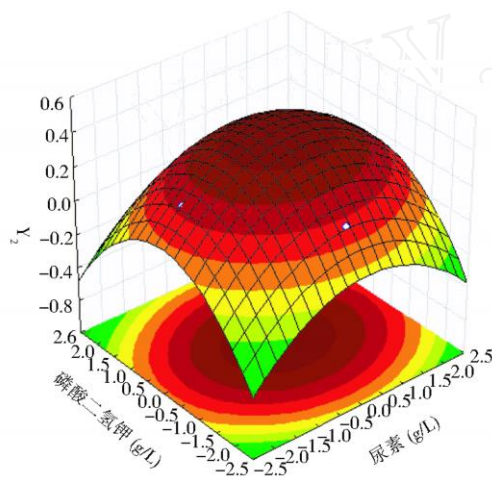


图 8 尿素和 KH_2PO_4 影响产酶量的响应面图
Fig 8 Surface for the effects of urea vs KH_2PO_4 on lipase production

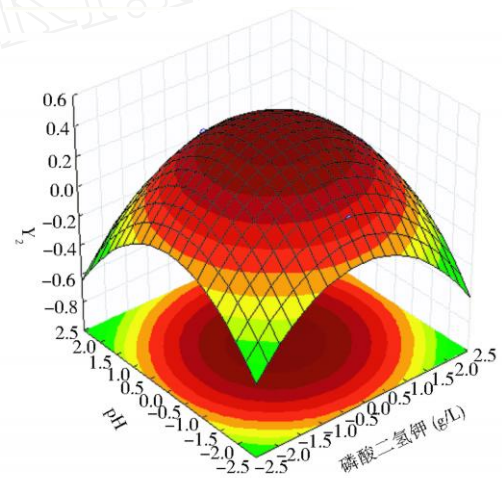


图 10 KH_2PO_4 和 pH影响产酶量的响应面图和等高线图
Fig 10 Surface for the effects of KH_2PO_4 vs pH on lipase production

3 讨论

*B. subtilis*产脂肪酶的量都比较低。He等^[7]的研究显示 *B. subtilis*野生菌 BCL1002和蛋白酶缺陷菌 BCL1009脂肪酶的最大产量都仅为 0.015 U/ml。Ma等构建了重组 *B. subtilis*能产 0.314 U/ml的胞内脂肪酶,而胞外脂肪酶只有 0.012 U/ml^[8]。带有 sadU^{h32} 突变基因的 *B. subtilis* BCL1033产酶量为 0.4 U/ml^[9], BCL1033产脂肪酶工程菌产酶量达 0.75 U/ml^[10]。

微生物产脂肪酶倾向于使用有机氮,如玉米浆、蛋白胨和牛肉膏等成分复杂的天然物质更有利于产酶,

因此大部分文献报道采用天然培养基^[1,11]。本文采用响应面优化所获得的合成培养基,脂肪酶酶活达 0.483 U/ml,较之初始酶活力 0.072 U/ml提高了 6.7倍,达到了野生 *B. subtilis*菌株产脂肪酶的最高水平。该培养基成分确定、简单,实验可重复性强,且脂肪酶产量高,为 *B. subtilis*产脂肪酶的营养、代谢等相关研究奠定了基础。

参考文献

[1] Shama R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, purification, properties of induced lipases. *Biotechnol Adv* 2001, 19: 627-

- 662
- [2] 牛冬云,张义正. 碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件的优化. 食品与发酵工业, 2002, 29(5): 28-31.
- Niu D Y, Zhang Y Z. Food and Fermentation Industries, 2002, 29(5): 28-31.
- [3] Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. Eur J Biochem, 1993, 216: 155-160.
- [4] Nthangeni M B, Patterson H G, Tonder A, et al. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. Enzyme Microb Technol, 2001, 28: 705-712.
- [5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976, 72: 248-254.
- [6] Tang L, Xia L. Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318. Appl Biochem Biotech, 2005, 125: 139-146.
- [7] He X S, Brückner R, Doi R H. The protease genes of *Bacillus subtilis*. Res Microbiol, 1991, 142, 797-803.
- [8] Ma J, Zhang Z, Wang B. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. Protein Expr Purif, 2006, 45: 22-29.
- [9] Steinmetz M, Kunst F, Dedonder R. Mapping of mutations affecting synthesis of exocellular enzymes in *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet, 1976, 148: 281-285.
- [10] Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. Eur J Biochem, 1993, 216, 155-160.
- [11] Eggert T, Pouderoyen G, Dijkstra B W. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. FEBS Lett, 2001, 502: 89-92.

Optimization of Lipase Production Conditions by *Bacillus subtilis* Using Surface Methodology

SONG Ping Q I Xiao-ling HU Yi X I E Ning-chang

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract The fermentation conditions of lipase production by *Bacillus subtilis* CICC 20034 were optimized. Initially, the most suitable substrate tributyrin, nitrogen source urea, carbon glucose, and MgSO_4 were selected according to single factorial experiments respectively. Based on the result, screening methodology Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of twelve factors related to lipase production and four statistically significant factors tributyrin, urea, KH_2PO_4 and pH were selected. The path of steepest ascent was used to approach the optimal region of lipase production subsequently. Then, the optimal combined concentration for maximum enzyme activity were further optimized by response surface methodology and determined as follows: tributyrin 2.62%, urea 8.57g/L, KH_2PO_4 2.59g/L and pH 9.47. The optimization of culture conditions of *B. subtilis* CICC 20034 led to a 6.7-fold increase in lipase production relative to initial result 0.072 U/ml, which indicate that single factor in combination with response surface methodology, is an effective method for optimization of lipase production conditions by *B. subtilis* CICC 20034.

Key words Lipase *Bacillus subtilis* Plackett-Burman design Response surface methodology Optimization