

# 响应面法优化醋酸钙不动杆菌菌株 23 的脂肪酶产酶条件\*

## The Lipase Production Optimization of *Acinetobacter calcoaceticus* 23 Using Response Surface Methodology

张 搏

ZHANG Bo

(广西科学院,广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:** 采用响应面法对醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 菌株 23 的发酵产脂肪酶培养基进行优化实验。实验首先考察该菌株产酶所需的最适碳源和氮源,然后用 Plackett-Burman 法设计实验确定影响产酶的主要因素,用最陡爬坡实验逼近最大响应区域,最后通过 Box-Behnken 方法进行二次回归分析得到最佳的产酶条件为:营养肉汤 18.4%、蛋白胨 9.18%、吐温 80 0.52%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%、橄榄油 1%、MgSO<sub>4</sub> 0.05%、CaCl<sub>2</sub> 0.05%、FeSO<sub>4</sub> 0.1%。在该优化条件下,发酵液的脂肪酶活力可以达到 15.2 U/ml,比优化前提高 3 倍。

**关键词:** 脂肪酶 醋酸钙不动杆菌 Plackett-Burman 设计 响应面 优化

**中图分类号:** Q814.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2008)04-0419-05

**Abstract** Response surface methodology (RSM) was employed to optimize culture medium for lipase production of *Acinetobacter calcoaceticus* 23. Firstly, the best carbon and nitrogen sources was investigated. Then a Plackett-Burman design was used to investigate the effects of different factor in the ferment medium, the 3 significant is broth, peptone, tween 80, and then steepest ascent procedures were employed to define optimal response region for these three factors. Finally, Box-Behnken was employed to design 17 experiments. The results of experiments was analyzed with Design-expert soft. The optimal lipase production medium is 18.4% nutrient broth, 9.18% tryptone, 0.52% tween 80, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% olive oil, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.05% CaCl<sub>2</sub>, 0.1% FeSO<sub>4</sub>, the yield of enzyme activity achieved 15.2 U/ml, the yield is increased by 3 times.

**Key words** lipase, *Acinetobacter calcoaceticus*, Plackett-Burman, response surface methodology, optimization

脂肪酶 (lipase EC3.1.1.3) 又称三酰基甘油酰基水解酶。目前已经发现假单胞菌、曲霉、青霉、微球菌等多种微生物可以生产脂肪酶<sup>[1-4]</sup>。细菌 28 个属、放线菌 4 个属、酵母菌 10 个属、真菌 23 个属均能生产脂肪酶<sup>[5]</sup>。不同来源脂肪酶水解不同甘油酯所表现出脂肪酸特异性极大,它不仅可以水解三脂酰甘油

生成二脂酰甘油和脂肪酸(其中的二脂酰甘油可进一步被水解为一脂酰甘油、甘油和游离脂肪酸),而且能够催化水解反应的逆反应——酯化反应,用于生物柴油的生产。酶法生产生物柴油技术具有产物提取简单、反应条件温和、甘油容易回收和无废物产生等优点<sup>[6]</sup>。除此之外,脂肪酶也广泛用于多个工业领域,如在洗涤剂中加入少量的脂肪酶,能够提高洗涤剂的去污能力并降低表面活性剂和三聚磷酸钠的用量,减少去污剂对环境的污染<sup>[7]</sup>;废水处理时加入一定量的脂肪酶,可以高效除去脂肪,减少废水处理

收稿日期: 2008-01-27

作者简介: 张 搏 (1981-), 男, 硕士, 主要从事微生物分子生物学方面的研究工作。

\* 广西科学院创新基金项目 (No. 桂科院研 0701) 资助。

的成本和降低二次污染<sup>[8]</sup>。

醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 是一种革兰氏阴性菌, 常见于污水中, 具有氨基青霉素抗性, 能够分泌胞外的脂肪酶, Han Soojin等<sup>[9]</sup>人发现该菌所产的胞外脂肪酶具有甲醇耐受性, 而对乙醇则不具耐受性。这一点使该脂肪酶在用于酯化反应生产生物柴油方面具有一定的应用潜力。

传统的脂肪酶产酶条件优化的单因素实验方法费时费力, 没有考虑因素的交互作用致使最优值并不可靠<sup>[10]</sup>。Plackett-Burman (PB)方法<sup>[11,12]</sup>广泛应用于微生物发酵培养基成分的优化和发酵工艺关键参数的筛选。PB方法通过对实验进行统计学设计和数据分析, 筛选出对目标值影响最大的关键因素, 从而可以大大减少优化过程考察的因素数和实验次数, 节省大量人力、财力、物力和时间。响应面分析法 (Response Surface Methodology, 简称 RSM) 是一种优化工艺条件的有效方法<sup>[13]</sup>, 与正交试验方法一样均建立在正交设计原理的基础上, 但是它采用更为合理的试验设计, 能以最经济的方式对试验进行全面研究。

迄今, 文献报道研究较多的是假单胞菌、曲霉、青霉、假丝酵母等菌株的脂肪酶, 尚未见醋酸钙不动杆菌属的脂肪酶用于生产生物柴油的相关报道。作者应用 Design-expert 7. 软件, 通过 RSM法对醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 菌株 23 的产脂肪酶条件进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 菌株 23 实验室保存。菌种采用分子生物学的方式对其种属进行鉴定, 其 gene bank 登录号为: EU330417

### 1.2 培养基

种子培养基: 蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, 橄榄油 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.2%,  $MgSO_4$  0.05%。

基础产酶培养基: 蛋白胨 1%, 蔗糖 2%,  $K_2HPO_4$  0.2%, 橄榄油 1%,  $MgSO_4$  0.05%,  $CaCl_2$  0.05%, 吐温 80 1%,  $FeSO_4$  0.1%。

### 1.3 发酵方式

将菌种接到种子培养基中培养 24h 后, 按 1: 50 的体积比吸取一定量的种子液到发酵产酶培养基中发酵 60h。培养温度为 37°C, 摇床转速为 150rpm/min

## 1.4 脂肪酶活力测定

脂肪酶活力测定采用分光光度计法<sup>[14]</sup>。A液是 16.5mmol/L 的对硝基苯棕榈酸酯 (P-NPP) 的异丙醇溶液, B液是含有 0.4% Triton X-100 和 0.1% 的阿拉伯树胶的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 值为 8.0)。测定时, 将相应的 A 液与 B 液按 1: 9 混和, 取 100 $\mu$ l 的发酵液加入 900 $\mu$ l 上述混合液中, 于 40°C 反应 10min 后, 用可见光 (410nm) 读光吸收值。在此条件下, 对硝基苯的消光系数是  $1.46 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$ 。酶活 (u) 定义为每分钟产生  $1 \mu\text{mol}$  P-NPP 所需的酶量, 定义为 1 个单位。

## 1.5 优化方法

本实验首先确定该菌株的产脂肪酶所需的最适碳源和氮源, 然后通过 Plackett-Burman 实验确定影响产酶的主要影响因素, 并在此基础上进行最陡爬坡实验逼近最大产酶区, 最后通过 Box-Behnken 方法进行响应面的实验, 确定出菌株的最佳产酶条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适碳源筛选

改变初始产酶培养基中的碳源种类, 分别以 1% 葡萄糖、麦芽浸膏、Yeast traction 可溶性淀粉、麦芽糖、营养肉汤为碳源进行最适碳源筛选的结果是, 以营养肉汤为碳源时发酵液脂肪酶活力最高。由图 1 可以看出, 在以上几种碳源中, 该菌株能够较好利用的顺序依次为: 营养肉汤、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、Yeast extraction 蔗糖、麦芽浸膏、酵母膏。

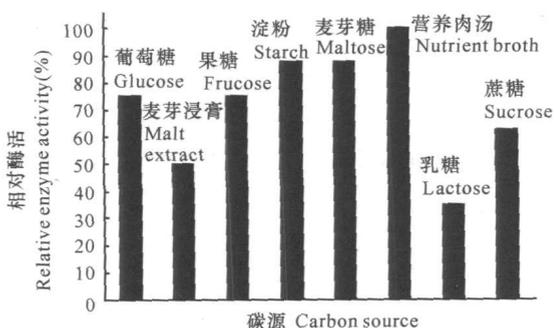


图 1 不同碳源对产酶的影响

Fig. 1 Effect of various carbon sources on lipase production

### 2.2 最适氮源筛选

以营养肉汤为碳源, 分别改用 2% 麦麸、Yeast traction 碳酸氢铵、硫酸铵、草酸铵、氯化铵、蛋白胨、醋酸铵为氮源进行最适氮源筛选的结果是, 以蛋白胨为氮源时发酵液脂肪酶活力最高。由图 2 可以看

出,在以上几种氮源中,该菌株能较好利用的顺序依次为: 蛋白胨 碳酸氢铵、醋酸铵、麦麸、Yeast extraction 草酸铵、硫酸铵、氯化铵。

### 2.3 影响产酶的主要因子筛选

依据已确定的碳源和氮源,选用  $N = 11$  的 Plackett-Burman 试验设计(见表 1和表 2),其中有两项为误差项,对可能影响产酶的 9 个因子<sup>[15]</sup>进行考察的结果(表 3)显示,对酶活产量有较大影响的因子依次为: 营养肉汤、蛋白胨、吐温、阿拉伯树胶、谷氨酸钠盐、初始 pH 值、硫酸亚铁,而橄榄油乳化液和发酵时间对产酶影响不大,其中阿拉伯树胶和吐温对产酶呈现出一定的负效应。这说明要提高菌株的产酶量,就要提高营养肉汤、蛋白胨的浓度,在发酵液中加入一定的阿拉伯树胶或吐温 80 提高发酵液

表 1 Plackett-Burman 实验设计各因素水平

Table 1 Factors levels of Plackett-Burman design

影响因子代码 Code	名称 Name	单位 Units	实际低值 Low	实际高值 High	低值代码 Low code	高值代码 High code
A	营养肉汤 Nutrient broth(%)	m/v	1.0	4.0	- 1	1
B	蛋白胨 Peptone(%)	m/v	1.0	4.0	- 1	1
C	橄榄油乳化液 Olive oil(%)	m/v	0.5	1.0	- 1	1
D	误差项 D Error term D				- 1	1
E	初始 pH 值 pH value	N/A	6.5	8.0	- 1	1
F	培养时间 Incubate time(h)	h	30	60	- 1	1
G	阿拉伯树胶 Gum Arabic(%)	m/v	0.5	1.5	- 1	1
H	误差项 H Error term H				- 1	1
J	谷氨酸钠盐 Glutamic acid Na salt(%)	m/v	0.5	1.5	- 1	1
K	吐温 80 Tween 80(%)	m/v	0.8	1.2	- 1	1
L	硫酸亚铁的磷酸盐缓冲液 Iron sulfate heptahydrate(%)	m/v	0.5	1.0	- 1	1

表 2 Plackett-Burman 实验结果

Table 2 Results of Plackett-Burman design

实验序号 No.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	酶活力 Enzyme activity(U/ml)
1	1	1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	1	- 1	1	12.2
2	1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	1	- 1	1	1	7.0
3	1	1	1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	1	- 1	6.45
4	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1	4.07
5	- 1	1	- 1	1	1	- 1	1	1	1	- 1	- 1	6.35
6	- 1	1	1	1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	1	4.4
7	1	- 1	1	1	- 1	1	1	1	- 1	- 1	- 1	4.5
8	- 1	- 1	1	- 1	1	1	- 1	1	1	1	- 1	5.6
9	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	1	- 1	1	1	1	0.5
10	1	1	- 1	1	1	1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	6.3
11	1	- 1	1	1	1	- 1	- 1	- 1	1	- 1	1	8.6
12	- 1	1	1	- 1	1	1	1	- 1	- 1	- 1	1	6.1

pH 值和增加谷氨酸钠盐有助于产酶

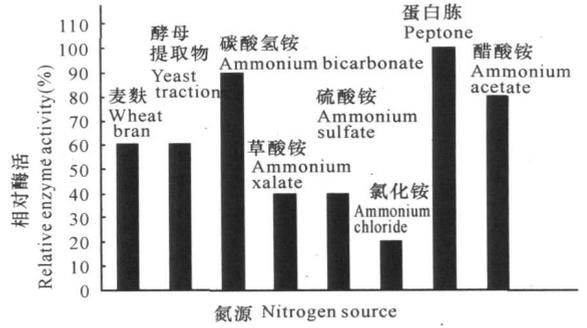


图 2 不同氮源对产酶的影响

Fig. 2 Effect of various nitrogen sources on lipase production

表 3 Plackett-Burman 实验各因素的影响效果

Table 3 Screening of important factors of Plackett-burman design

因子 Factor	效应度 Stdized effect	模型贡献率 Contribution(%)
A	3.01	31.66
B	1.92	12.95
C	-0.13	0.058
E	1.31	5.97
F	-0.28	0.27
G	-1.71	10.27
J	1.22	5.23
K	-1.93	13.04
L	0.92	2.98

2.4 最陡爬坡实验

最陡爬坡实验设计及结果如表 4 所示。表 4 结果显示,最大产酶区在第 4 次附近,故以实验 4 的条件为响应面实验因素水平的中心点。

2.5 响应面优化重要因素的最佳浓度

2.5.1 二次回归模型拟合及方差分析

采用正交试验  $3^3$  (表 5) 及 Box-Behnken 响应面实验设计 (表 6) 构建的模型 (线性回归方程) 为: 酶活 =  $15.364 - 0.4625 \times A - 1.46 \times B - 2.0175 \times C - 1.72 \times A \times B - 1.705 \times A \times C + 0.42 \times B \times C - 1.5395 \times A^2 - 3.7445 \times B^2 - 3.5795 \times C^2$

通过 Design-expert 软件<sup>[16]</sup>进行方差分析来验证回归模型及各参数的显著度结果如表 7 所示。

从表 7 可以看出,该模型的 P 值小于 0.05 而失拟项 P 值大于 0.1 (表明对结果影响不显著), 决定系数  $R^2$  为 0.8730, 精密度为 6.467 (大于 4), 说明该模型在被研究的整个回归区域拟合很好。可以使用该模型来分析响应值的变化。

表 4 最陡爬坡试验设计及结果

Table 4 Experimental plan and results of steepest accent

实验序号 No.	营养肉汤 Nutrient broth(%)	蛋白胨 Pepton(%)	吐温 Tween(%)	酶活 Enzyme activity(U/ml)
1	4	4	1.2	3.0
2	8	6	1	4.87
3	12	8	0.8	5.2
4	16	10	0.6	6.4
5	20	12	0.4	4.2
6	24	14	0.2	3.54
7	28	16	0.05	3.05

表 5 响应面设计的因素和水平

Table 5 Range of different factor invested in RSM

编码 Code	因素 Factor	水平 Level(%)		
		-1	0	1
A	营养肉汤 Nutrient broth	12	16	20
B	蛋白胨 Peptone	8	10	12
C	吐温 80 Tween80	0.4	0.6	0.8

表 6 Box-Behnken 响应面实验设计

Table 6 Box-Behnken design and response value

实验序号 No.	营养肉汤 Nutrient broth	蛋白胨 Peptone	吐温 80 Tween 80	酶活 Enzyme activity(U/ml)
1	1	1	0	6.72
2	-1	0	-1	10.8
3	0	-1	1	6.64
4	0	0	0	15.24
5	0	-1	-1	12.44
6	-1	0	1	11.1
7	-1	-1	0	10
8	0	1	-1	8.6
9	1	0	-1	12.8
10	-1	1	0	10.6
11	0	0	0	13.5
12	0	0	0	12.6
13	1	0	1	6.28
14	0	1	1	4.48
15	0	0	0	14.48
16	0	0	0	13
17	1	-1	0	13

表 7 响应面方差分析

Table 7 ANOVA of RSA for lipase production

因素 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F	P(Prob> F)
模型 Model	210.8	9	23.42	5.35	0.0190
A	1.71	1	1.71	0.39	0.5518
B	17.05	1	17.05	3.89	0.0891
C	32.56	1	32.56	7.43	0.0295
AB	11.83	1	11.83	2.70	0.1443
AC	11.63	1	11.63	2.65	0.1473
BC	0.71	1	0.71	0.16	0.7002
A <sup>2</sup>	9.98	1	9.98	2.28	0.1750
B <sup>2</sup>	59.04	1	59.04	13.47	0.0008
C <sup>2</sup>	53.95	1	53.95	12.31	0.0099
失拟项 Lack of fit	2.19	3	0.73	0.10	0.9542

2.5.2 响应面交互作用分析与优化

通过 Design-expert 软件<sup>[16]</sup>, 由上述线性回归方程式绘制的响应面曲线 (图 3 图 4 图 5) 显示, 这个模型的响应值存在最大值, 为 14.82U/ml, 此时这 3 个因子的代码值为: A= 0.58 B= -0.41 C= -0.4, 即营养肉汤、蛋白胨、吐温 80 的浓度分别为 18.32%、9.18%、0.52%。在该条件下进行验证实验得到实际发酵酶活为 15.2U/ml, 与模型预测值基本吻合, 这进一步说明该模型是合理有效的。图 3 图 4 中的等高线呈椭圆形, 而图 5 中的等高线呈圆形表明蛋白胨和营养肉汤两因素的交互作用及吐温与营养肉汤两因素的交互作用显著, 而蛋白胨与吐温的交互作用不显著。

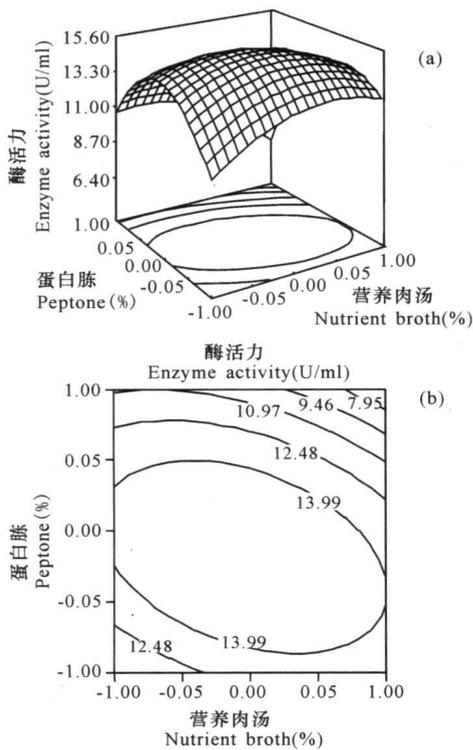


图3 营养肉汤和蛋白胨交互影响脂肪酶产量的三维表面(a)及等高线(b)

Fig. 3 3D response surface plot(a) and contour plot(b) of the effects of A and B on lipase production

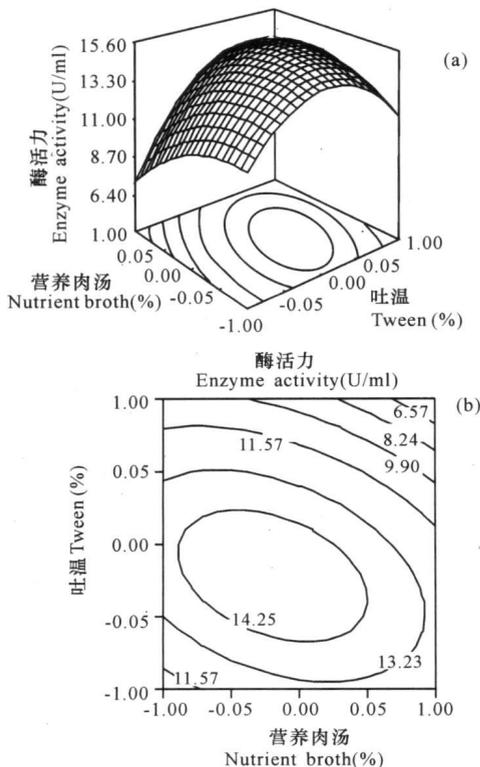


图4 营养肉汤和吐温交互影响脂肪酶产量的三维表面(a)及等高线(b)

Fig. 4 3D response surface plot(a) and contour plot(b) of the effects of A and C on lipase production

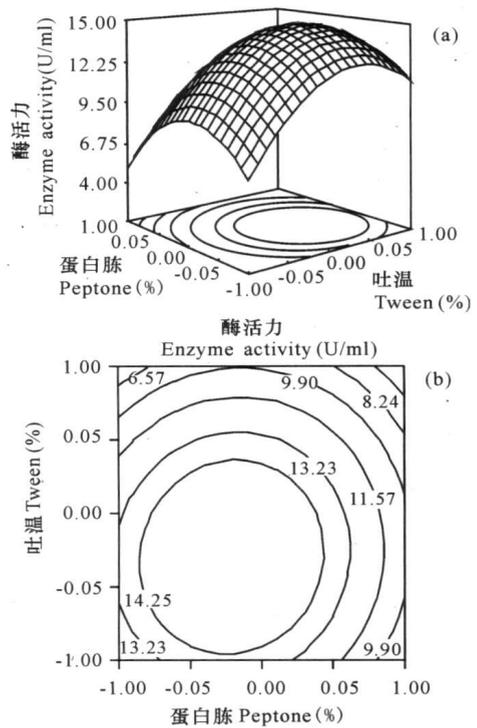


图5 蛋白胨和吐温交互影响脂肪酶产量的三维表面(a)及等高线(b)

Fig. 5 3D response surface plot(a) and contour plot(b) of the effects of B and C on lipase production

### 3 结论

本次实验得出醋酸钙不动杆菌菌株2的产脂肪酶的最佳发酵条件为: 营养肉汤 18.32%、蛋白胨 9.18%、吐温 80.0.52%、 $K_2HPO_4$  0.2%, 橄榄油 1%,  $MgSO_4$  0.05%,  $CaCl_2$  0.05%,  $FeSO_4$  0.1%。在该发酵条件下, 发酵液的酶活力达 15.2U/ml, 比在基础产酶培养基中的产酶量提高了3倍, 该菌株的活力与已知的一些假单胞菌原始菌株活力相当。说明 Plackett-Burman 设计与响应面分析方法 (RSM) 相结合可以快速、有效地从众多影响脂肪酶发酵的因素中筛选出比较重要的影响因素并实现其水平优化, 优化结果与实际发酵情况吻合较好。

#### 参考文献:

- [1] Lizumi T, Nakamura K, Fukase T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp KW I256 [J]. Agriculture Biological Chemistry, 1990, 51(45): 14532-14581.
- [2] 任丽红, 周应揆. 脂肪酶产生菌的筛选及一株黑曲霉产脂肪酶最适条件研究 [J]. 工业微生物, 1996, 26(1): 232-261.

(下转第 430 页 Continue on page 430)

- [15] Martinez E A, Silva J B A, Giulietti M, et al. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1193-1198.
- [16] Sampaio F C, Torre P, Passos F M L, et al. Influence of inhibitory compounds and minor sugars on xylitol production by *Debaryomyces hansenii* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 136: 165-181.
- [17] Rodrigues R C L B, Felipe M G A, Silva J B A, et al. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non-volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation [J]. *Braz J Chemistry Engineering*, 2001, 18: 299-311.
- [18] Duarte L C, Carvalheiro F, Tadeu J, et al. The combined effects of acetic acid, formic acid and hydroquinone on *Debaryomyces hansenii* physiology [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 129-132: 461-475.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 423 页 Continue from page 423)

- [3] 郑毅, 黄建忠, 施巧琴. 中温碱性脂肪酶的研究 [J]. *工业微生物*, 1996, 26(3): 152-181.
- [4] 陈守文, 徐柔, 章克昌. 微生物的脂肪酶合成调节 [J]. *微生物通报*, 1998, 25(4): 202-204.
- [5] 张树政. 酶制剂工业 (下) [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 655-670.
- [6] 张呈平, 杨建明, 吕剑. 生物柴油的合成和使用研究进展 [J]. *工业催化*, 2005, 13(5): 9-13.
- [7] 吴松刚, 施巧琴, 郑毅, 等. 碱性脂肪酶催化特性和安全性的研究 [J]. *化工科技市场*, 2003, 6: 28-30.
- [8] Dharmstithi S, Kuhasuntisuk B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602 biochemical properties and application for wastewater treatment [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 21: 75-80.
- [9] Han Soojin, Jung Ho Back, Moon Young Yoon, et al. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from acinetobacter species SY-01 [J]. *Biochimie*, 2003, 85: 501-510.
- [10] Weuster-Botz D. Experimental design for fermentation media development statistical design or global random search [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90: 473-483.
- [11] Myers W R. Response surface methodology [M]. *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*. New York: Marcel Dekker, 2003: 858-869.
- [12] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments [J]. *Biometrika*, 1946, 33: 305-325.
- [13] 陈魁. 试验设计与分析 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1996: 94-180.
- [14] 唐良华, 苏敏, 薛建平, 等. *Penicillium* sp 脂肪酶的发酵及催化生成生物柴油的研究 [J]. *生物技术*, 2006, 5(16): 67-70.
- [15] Wiyada Mongkoltharuk, Waerawee Prob-narong, Sithiwat Lertsiri, et al. Growth and lipase production of a psychrotrophic *Acinetobacter calwoaceticus* in an MSG-containing medium [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2004, 50: 29-33.
- [16] 代文亮, 程龙, 陶文沂. 响应面法在紫杉醇产生菌发酵前体优化中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(11): 66-72.

(责任编辑: 邓大玉)