

陈 璨, 张 菊, 常云霞, 等. 响应面法优化耐热植酸酶产生菌发酵培养基[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 391–393.

响应面法优化耐热植酸酶产生菌发酵培养基

陈 璨¹, 张 菊², 常云霞¹, 葛红莲¹, 张 怡², 王永立¹, 陈 龙¹

(1. 周口师范学院生命科学与农学院, 河南周口 466001; 2. 周口师范学院植物遗传与分子育种重点实验室, 河南周口 466001)

摘要:在单因素法初步优化试验基础上, 进行了 Plackett – Burman 试验、最陡爬坡试验以及响应面分析(采用 Box – Behnken 法)进一步优化了菌株 zk1266 的发酵产酶培养基, 得到最佳培养基组分为: 胰蛋白胨 3.06%, 葡萄糖 3.85%, 氯化钾 0.27%, 氯化钠 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, 用此培养基对菌株进行培养, 菌株所产耐热植酸酶酶活为 141.26 U/mL。菌株产酶能力比优化前有了较大提高。

关键词:植酸酶; Plackett – Burman 设计; Box – Behnken 设计; 响应曲面

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 – 1302(2014)07 – 0391 – 03

植酸酶(phytase)是催化植酸及植酸盐水解成磷酸(或磷酸盐)、肌醇的一类酶^[1–3]。因其可解决植酸带来的环境及营养问题, 植酸酶已成为饲料、酶制剂及食品添加剂领域的研究热点^[4–6]。植酸酶可代替饲料原料中所添加的大量无机磷(磷酸钙等), 不仅可以解决我国磷资源供应不足的问题, 还可以减少生产无机磷的工厂数量^[7]。用添加植酸酶的饲料喂养动物可有效减少其粪便中的磷含量, 进而可解决因磷含量过多导致的土壤板结及水质下降等问题, 改善农村农田环境。工业制备植酸酶时, 在高温制粒这一环节中, 植酸酶的热稳定性较差, 严重影响植酸酶的工业化生产, 因此进行耐热植酸酶筛选显得十分重要。笔者所在试验室筛选到 1 株耐热植酸酶产生菌。本研究以响应面法优化其发酵培养基, 提高其耐热植酸酶的活力, 旨在为植酸酶工业化生产奠定基础。

收稿日期: 2013 – 10 – 26

基金项目: 周口师范学院青年科研基金(编号: 2012QNA04)。

作者简介: 陈 璨(1985—), 男, 河南周口人, 硕士, 讲师, 主要从事分子与微生物学研究。E-mail: chenc02@126.com。

通信作者: 陈 龙, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: chenlongzg@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 zk1266 分离自农村堆肥。

1.2 培养基

液体种子培养基: 葡萄糖 5%, 牛肉膏 2%, 氯化钠 0.05%, 蒸馏水定容至 100 mL, pH 值自然。初始产酶发酵培养基: 葡萄糖 5%, 牛肉膏 2%, 氯化钠 0.05%, 氯化钾 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 蒸馏水定容至 100 mL, pH 值自然。

1.3 方法

1.3.1 酶活测定方法 装液量 100 mL, 接种量 6%, 45 °C 180 r/min 培养 50 h 后测酶活, 每组做 3 个平行, 结果取平均值。参照叶冰等的酶活测定方法^[8]测定植酸酶活性。

1.3.2 Plackett – Burman 试验设计 进行 Plackett – Burman 试验设计, 筛选出对酶活影响显著的因子。装液量 100 mL, 接种量 6%, 45 °C 180 r/min 培养 50 h 后测酶活, 每组做 3 个平行, 结果取平均值。

1.3.3 最陡爬坡试验 根据 Plackett – Burman 试验筛选出 agarose[J]. Biochim Biophys Acta, 1966, 114(2): 326–337.

[30] Baumann M J, Murphy L, Lei N, et al. Advantages of isothermal titration calorimetry for xylanase kinetics in comparison to chemical – reducing – end assays[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 410(1): 19–26.

[31] Mohn W W, Stewart G R. Bacterial metabolism of chlorinated dehydroabietic acids occurring in pulp and paper mill effluents[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3014–3020.

[32] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes; a review[J]. Bioresource Technology, 2003, 89(1): 17–34.

[33] 聂国兴, 王俊丽, 明 红. 木聚糖酶的应用现状与研发热点[J]. 工业微生物, 2008, 38(1): 53–59.

[34] Uysal H, Bilgili N, Elgün A, et al. Effect of dietary fibre and xylanase enzyme addition on the selected properties of wire – cut cookies[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 1074–1078.

[24] Ninawe S, Kuhad R C. Use of xylan – rich cost effective agro – residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(5): 1141–1148.

[25] Gomes J, Gomes I, Steiner W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties[J]. Extremophiles, 2000, 4(4): 227–235.

[26] 许 安, 姚建铭, 余增亮. 离子注入改良维生素 C 二步发酵混合菌研究(I) 2 – 酮基 – L – 古龙酸高产菌系 IPPM – 1028 的选育[J]. 工业微生物, 1998, 28(4): 21–24.

[27] Li S C, Yao J M, Yu Z L. Studies on mutation breeding of high – yielding xylanase strains by low – energy ion beam implantation[J]. Plasma Science and Technology, 2007, 9(2): 248–251.

[28] 包怡红, 刘伟丰, 董志扬. 耐碱性木聚糖酶在短小芽孢杆菌中高效分泌表达的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(5): 37–43.

[29] Naber J E, Schepman A M J, Rörsch A. The binding of deoxyribonucleases of *Escherichia coli* to deoxyribonucleic acid immobilized in

的显著因子效应大小,设计它们的步长,进行最陡爬坡试验,确定试验因素中心点,找到产酶活性最高的区域。参照“1.3.1”节的方法测酶活性。

1.3.4 响应面分析 采用 Box - Behnken 法,根据最陡爬坡试验确定的试验因素中心点设计响应面因素及水平。采用 Minitab 15 软件对数据进行分析,得到二次线性回归方程,分析各因素的主效应、交互效应,在一定水平范围内求最佳值,最后通过试验来验证模型的预测值与实际值是否吻合、模型是否合理。参照“1.3.1”节的方法测酶活性。

2 结果与分析

2.1 Plackett - Burman 试验设计结果

采用 Plackett - Burman 设计,从 6 个影响因素中筛选出具有显著影响的因素。每个因素取 2 个水平:即高水平(+1)、低水平(-1)。由表 1 可知,葡萄糖、胰蛋白胨、氯化钾是影响显著的因素。

表 1 Plackett - Burman 试验设计各因素水平

因子代码	变量	低值 (-1)	高值 (+1)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
X_1	葡萄糖	2.000	5.00	7.51	0.002 *
X_2	胰蛋白胨	1.000	4.00	7.14	0.002 *
X_3	氯化钠	0.050	0.10	-1.17	0.307
X_4	氯化钾	0.200	0.45	-5.17	0.007 *
X_5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.050	0.10	0.20	0.850
X_6	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005	0.01	-0.21	0.844
X_7	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.020	0.05	2.55	0.063

注: $R^2=97.26\%$ 。

2.2 最陡爬坡试验

根据 Plackett - Burman 试验筛选出的显著因子的效应大小设计它们的步长,进行最陡爬坡试验,结果如表 2 所示。由表 2 可知,发酵产酶的酶活最高值在第 3 次试验附近,故选其作为中心点(胰蛋白胨、葡萄糖、氯化钾分别为 3.0%、4.0%、0.3%)。

表 2 最陡爬坡试验

试验号	胰蛋白胨 (%)	葡萄糖 (%)	氯化钾 (%)	植酸酶活力 (U/mL)
1	1.0	2.0	0.5	57.87
2	2.0	3.0	0.4	96.43
3	3.0	4.0	0.3	136.35
4	4.0	5.0	0.2	89.56

通过 Plackett - Burman 试验设计,采用 Box - Behnken 法,以植酸酶酶活为响应值,试验设计及试验结果见表 3、表 4,利用 Minitab 15.0 软件对结果进行二次回归分析。得到回归方程为:

$$Y = -1\,421.89 + 644.86X_1 + 302.11X_2 - 77.59X_3 - 83.07X_1^2 - 27.14X_2^2 - 246.02X_3^2 - 34.96X_1X_2 + 4.76X_1X_3 + 51.29X_2X_3。$$

式中: Y 代表植酸酶酶活力, X_1 代表胰蛋白胨含量, X_2 代表葡萄糖含量, X_3 代表氯化钾含量。

从表 5 可知,回归方程 P 值为 0.003,为非常显著。模型失拟项 P 值为 $0.105 > 0.05$,不显著,证明模型的选择相对合

表 3 响应面优化因素与水平设计

水平	胰蛋白胨含量 (%)	葡萄糖含量 (%)	氯化钾含量 (%)
-1	2.5	3	0.1
0	3.0	4	0.3
1	3.5	5	0.5

表 4 Box - Behnken 设计结果

序号	胰蛋白胨	葡萄糖	氯化钾	植酸酶活力 (U/mL)
1	0	0	0	137.21
2	0	-1	-1	116.35
3	1	0	-1	113.02
4	0	1	1	110.47
5	-1	1	0	97.24
6	0	1	-1	86.92
7	0	0	0	141.06
8	1	0	1	106.36
9	0	-1	1	98.87
10	-1	-1	0	71.48
11	1	1	0	78.01
12	0	0	0	142.14
13	-1	0	1	105.08
14	1	-1	0	122.17
15	-1	0	-1	113.65

表 5 响应面方差分析结果

来源	自由度	顺序平方和	调整平方和	调正均方	<i>F</i>	<i>P</i>
回归	9	6 117.70	6 117.70	679.74	18.00	0.003
线性	3	303.45	303.45	101.15	2.68	0.158
平方	3	4 170.28	4 170.28	1 390.09	36.81	0.001
交互	3	1 643.98	1 643.98	547.99	14.51	0.007
残差	5	188.84	188.84	37.77		
失拟	3	175.41	175.41	58.47	8.71	0.105
纯误差	2	13.43	13.43	6.72		
合计	14	6 306.54				

$R^2 = 97.01\%$

适。回归系数 $R^2=0.970\,1$,大于 0.9,证明模型相关度很好。所以,能采用此模型分析响应值变化。通过 Minitab 15.0 软件绘制响应面曲线图并进行可视化分析,对相关变量间的交互作用及最优点进行了进一步分析。图 1 显示了 3 组以植酸酶酶活为响应值的变化趋势图,通过其等高线图能够直观反映出 2 个变量之间交互作用的显著程度。由图 1 可知,葡萄糖与氯化钾这一组交互作用最强。由图 1 响应面立体图可知,响应值存在最大值,经软件分析,得到植酸酶酶活预测值最大时的培养基浓度为:胰蛋白胨 3.06%,葡萄糖 3.85%,氯化钾 0.27%,预测酶活最大值为 140.91 U/mL。对优化结果(胰蛋白胨 3.06%,葡萄糖 3.85%,氯化钾 0.27%,氯化钠 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%)进行 3 次验证试验,植酸酶酶活平均值为 141.26 U/mL,与理论预测值基本吻合,表明该模型是合理的,与发酵产酶培养基未进行优化时菌株产植酸酶酶活 85.02 U/mL 相比,有较大提高。

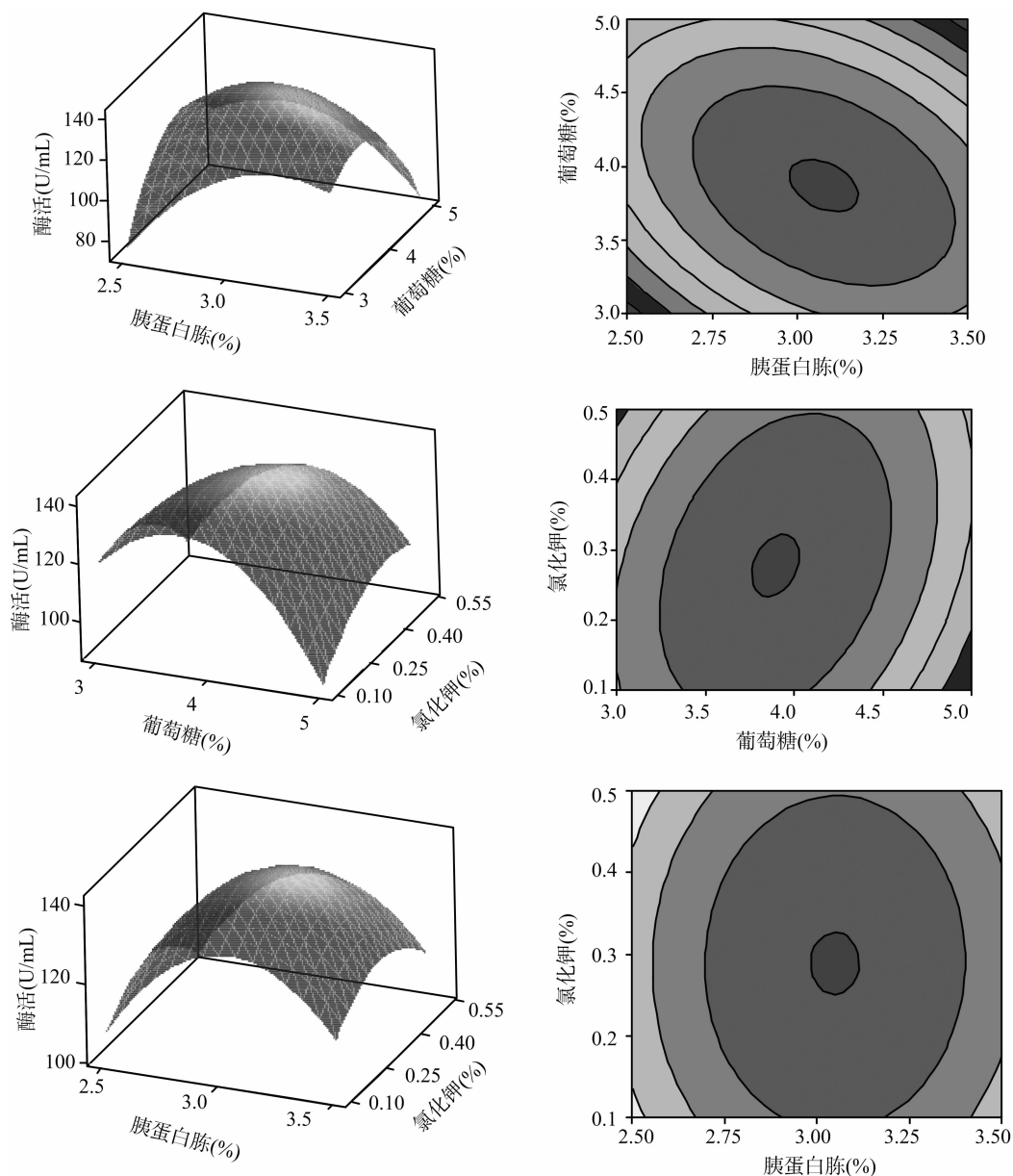


图1 响应面分析曲面图、等高线图

3 结论

本研究表明,培养基最佳成分为:胰蛋白胨 3.06%,葡萄糖 3.85%,氯化钾 0.27%,氯化钠 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, 用此培养基对菌株进行培养,菌株所产耐热植酸酶酶活为 141.26 U/mL。经过对产酶培养基进行优化后,菌株 zk1266 的发酵产酶活力有了较明显的提高。45℃下,本试验所用菌株 zk1266 能正常生长,若用其进行放大培养及进一步的工业生产,可以减少生产中污染杂菌的概率。

参考文献:

[1] Mullaney E J, Ullah A H. The term phytase comprises several different classes of enzymes [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 312 (1): 179 - 184.

[2] Wodzinski R J, Ullah A. Phytase [J]. Advances in Applied Microbiology, 1996, 42: 263 - 302.

[3] 陈育如, 刘友芬, 郭月霞, 等. 秸秆降解微生物在不同培养基中的产植酸酶特性 [J]. 江苏农业科学, 2008 (2): 210 - 212.

[4] Cao L, Wang W M, Yang C T, et al. Application of microbial phytase in fish feed [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40 (4): 497 - 507.

[5] 周建琴, 刘菊香. 聚乙烯醇复合固定化植酸酶方法研究 [J]. 中国酿造, 2009 (11): 112 - 115.

[6] 董其国, 徐 稳, 王 恬. 不同剂量植酸酶对生长育肥猪生产性能和饲料养分利用率的影响 [J]. 江苏农业科学, 2010 (4): 215 - 218.

[7] 张 莉, 赵 耘, 王郡美. 植酸酶在饲料工业中的应用及其研究进展 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2006 (8): 7 - 9.

[8] 叶 冰, 王运吉, 张冬花. 植酸酶毕赤酵母基因工程菌高密度发酵 [J]. 大连轻工业学院学报, 2002, 21 (3): 193 - 196.