

响应面设计优化醋酸杆菌产乙醇脱氢酶发酵培养基

肖仔君,黄国清,钟瑞敏

(广东韶关学院英东食品科学与工程学院,广东 韶关 512005)

摘要: 利用响应面分析法优化醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基。在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 中心组合试验设计,选定碳源、氮源和生长因子 3 个因素为响应因子,以乙醇脱氢酶的酶活为响应值建立二次回归方程,相关系数 $R^2=0.9652$,在分析各个因素的显著性和交互作用后,确定了醋酸杆菌产乙醇脱氢酶最优的培养基,即碳源 15.1 g/L、氮源 7.0 g/L、生长因子 272.5 mL/L,在此条件下,乙醇脱氢酶活力理论响应值为 0.352 U/mL,验证值为 0.349 U/mL。

关键词: 醋酸杆菌 *Acetobacter sp.* CCTCC M209061; 乙醇脱氢酶; 响应面; 培养基优化

中图分类号:Q93-3;Q55 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2010)07-0017-04

Optimization of Fermentation Medium for Alcohol Dehydrogenase Produced from *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 by Response Surface Methodology

XIAO Zi-jun, HUANG Guo-qing and ZHONG Rui-min

(Food Science and Engineering College, Shaoguan College, Shaoguan, Guangdong 512005, China)

Abstract: Fermentation medium for ADH produced from *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 was optimized by response surface analysis (RSA). Based on single factor experiment, three factors including carbon source, nitrogen source and growth factors were selected as response factors by use of Box-Behnken center-composite experimental design and enzyme activity of ADH was used as response value to establish the quadric regression equation (the correlation coefficient $R^2=0.9652$). The optimum fermentation medium for ADH production from *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 was determined as follows through the analysis of the significance and the interaction of each factor: 15.1 g/L carbon source, 7.0 g/L nitrogen source, and 272.5 mL/L growth factor. Under the above conditions, the theoretical value of the enzyme activity of ADH was 0.352 U/mL and the verified value was 0.349 U/mL.

Key words: *Acetobacter sp.* CCTCC M209061; alcohol dehydrogenase (ADH); response surface; fermentation medium optimization

乙醇脱氢酶 (Alcohol Dehydrogenase, ADH) 是生物体内重要的氧化还原催化剂之一,是一种广泛专一性的含锌金属酶,能够催化乙醇氧化生成乙醛,乙醛经乙醛脱氢酶 (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) 继续氧化生成乙酸^[1]。随着生物技术的发展,乙醇脱氢酶在生物催化、生物医学和工业生产等领域都有较为广泛的应用。例如,利用乙醇脱氢酶作为生物催化剂合成一些原料以及中间产物^[2];可以利用检测血清中乙醇脱氢酶的活性来诊断肝脏疾患^[3];利用含有乙醇脱氢酶的微生物进行果酒、果醋的生产^[4-5];在食品工业中,借助于乙醇脱氢酶氧化的产物乙醛与单宁作用,去涩退苦^[6]。

目前,在动物、植物、微生物、真核生物以及原核细菌中都已发现醇脱氢酶,且在微生物中广泛存在。由于微生物的发酵周期短,培养基廉价,以及酶制剂可以实现大规模的生产,因此,从微生物细胞中提取 ADH 并制成酶制

剂具有广阔的市场前景。

发酵培养基的优化是提高 ADH 产量、降低生产成本的重要途径之一。响应面分析法 (RSA) 是综合试验分析和数学建模最经济合理的试验,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的关系,对影响产量的各因子水平及其交互作用进行优化与评价,并在一定的范围内求出最佳值^[7]。本试验利用 Box-Behnken 响应面分析法对筛选得到的 1 株高产 ADH 的醋酸杆菌的培养基进行了优化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与培养基

菌株:醋酸杆菌 (*Acetobacter sp.*) CCTCC M209061, 韶关学院英东食品科学与工程学院食品微生物教研室。

基金项目 广东省科技攻关项目(项目编号 2009B020312017) 韶关市科技项目(项目编号) 韶科[2009]80。

收稿日期:2010-05-12

作者简介:肖仔君(1973-),男,主要从事食品生物技术和生物催化与生物转化的研究。

通讯作者:黄国清。

基础培养基:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,pH 6.0,西红柿汁 50 mL/L(v/v),于 121 °C 灭菌 20 min。

斜面培养基:西红柿汁 50 mL/L(v/v),琼脂 15 g/L,葡萄糖 10 g/L,酵母浸膏 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,于 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.2 仪器和设备

超声波细胞粉碎机(JY92- ,浙江宁波);紫外可见分光光度计(721 型,上海棱光);超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州)、培养箱(PYX-250Z-B,科力)等。

1.1.3 试剂

酵母浸膏、蛋白胨购于广东环凯生物有限公司,其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 醋酸杆菌培养

将醋酸杆菌菌株接种于斜面基础培养基,在 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h,再将醋酸杆菌株接于液体基础培养基,于 30 °C 恒温摇床中培养 24 h。

1.2.2 醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的单因素试验

①不同碳源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响

分别用 10 g/L 葡萄糖,5 g/L 蔗糖,5 g/L 麦芽糖和 5 g/L 乳糖替代基础培养基中的碳源,其他成分不变,以 5 %的接种量将醋酸杆菌分别接入各种不同碳源的培养基中,30 °C、150 r/min 培养 24 h,在 600 nm 下测其 OD 值,并取 50 mL 发酵液离心后,提取粗酶液,测其酶活,研究不同的碳源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基的影响。

②不同浓度的碳源(葡萄糖)对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基的影响

配制含不同浓度(2 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L)的葡萄糖,基础培养基中其他成分不变,以 5 %的接种量将醋酸杆菌分别接入含有不同葡萄糖的浓度的培养基中,30 °C、150 r/min 培养 24 h,在 600 nm 下测其 OD 值,并取 50 mL 发酵液离心后,提取粗酶液测酶活,研究不同浓度葡萄糖对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基的影响。

③不同氮源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响

分别用 10 g/L 蛋白胨,10 g/L 酵母浸膏,混合氮源(5 g/L 蛋白胨与 5 g/L 酵母浸膏、10 g/L 蛋白胨与 10 g/L 酵母浸膏)替代基础培养基中的氮源,基础培养基中其他成分保持不变,以 5 %的接种量将醋酸杆菌分别接入各种含有不同氮源的培养基中,30 °C、150 r/min 培养 24 h,在 600 nm 下测其 OD 值,并取 50 mL 发酵液离心后,提取粗酶液,测其酶活,研究不同的氮源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基的影响。

④不同浓度的生长因子对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基的影响

配制含不同浓度(0、50 mL/L、100 mL/L、200 mL/L、300 mL/L、400 mL/L)的西红柿汁,混合氮源(5 g/L 蛋白

胨与 5 g/L 酵母浸膏),基础培养基中其他成分不变,按照 5 %的接种量将醋酸杆菌分别接入含有不同浓度西红柿汁的培养基中,30 °C、150 r/min 培养 24 h,在 600 nm 下测其 OD 值,并取 50 mL 发酵液离心后,提取粗酶液,测其酶活,研究不同浓度的西红柿汁对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基的影响。

1.2.3 产乙醇脱氢酶培养基优化试验设计

在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,选定碳源、氮源和生长因子 3 个因素为响应因子(表 1),乙醇脱氢酶的酶活为响应值,通过数据分析确定产乙醇脱氢酶最优培养基。

表1 试验设计的因素与水平

水平 编码	A 碳源(g/L)	B 氮源(g/L)	C 西红柿汁(mL/L, v/v)
-1	5.0	5.0	100
0	12.5	7.5	200
1	20.0	10.0	300

1.2.4 乙醇脱氢酶粗酶液的制备^[8]

取培养对数期(24 h)细胞培养液在 3000 r/min 离心 25 min,沉淀用 pH 8.0、20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,收集湿菌体细胞。称取 6 g 湿菌体细胞,以固液比为 1:5 悬浮于 pH 8.0、20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液,在冰水浴中进行超声破碎(200 W、4 s×90 次、间隙 5 s),再进行离心(6000 r/min,15 min,4 °C)除去细胞碎片,细胞碎片再超声处理 1 次,同条件下离心,合并 2 次破碎离心后的上清液即 ADH 胞内粗酶液。合并后的上清液加入饱和度 100 %的硫酸铵溶液,得到 40 %~70 %饱和度的硫酸铵溶液,在 4 °C 下静置 2 h,将硫酸铵沉淀后的溶液离心(8000 r/min,20 min,4 °C)。倒出上清液,沉淀用适量的 0.1 mol 的磷酸缓冲液(pH7.4)溶解并装入已处理过的透析袋中,透析袋浸入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.4)中,每隔 1~2 h 换 1 次透析袋外的缓冲液,最好静置定容至 50 mL,测其蛋白质含量和 ADH 的活力。

1.2.5 乙醇脱氢酶活性的测定^[7-8]

参照 WOOD 氏法,取 0.5 mL McIlvaine 缓冲液 pH 4.0,10 %TrironX-100 溶液 0.1 mL,1.0 mol/L 乙醇溶液 0.1 mL,粗酶液 0.2 mL,0.1 mol/L 铁氰化钾溶液 0.1 mL 于 25 mL 比色管中,25 °C 保温 5 min,然后加入硫酸铁-Dupanol 溶液 0.5 mL,加入 3.5 mL 蒸馏水混合后,在 25 °C 条件下放置 20 min(同时做空白对照)后,用 722 型紫外分光光度计测定 660 nm 处光密度。

酶活力单位定义:在上述 OD 值条件下,1 min 氧化 1 μmol 的乙醇为 1 个酶活力单位;4.0 光密度等于氧化 1 μmol 的乙醇。

2 结果与讨论

2.1 醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的单因素试验

2.1.1 不同碳源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响

选用发酵工业常用的碳源,以相同的含碳量(1%)为标准,30℃培养24h,获得湿菌体细胞,破碎后测酶活,其结果见表2。

表2 不同碳源对醋酸杆菌菌体生长及产酶的影响

碳源	OD ₆₀₀	酶活 (U/mL)
葡萄糖	0.542	0.206
蔗糖	0.527	0.181
麦芽糖	0.519	0.176
乳糖	0.526	0.182

由表2中的结果可以得出,培养基中的碳源对醋酸杆菌ADH的活性和菌体生物量的影响很大。以葡萄糖为碳源时,1mL发酵液中细胞酶活较高,菌液的OD值也相对高,因此,以葡萄糖作为碳源进行后续的研究。

2.1.2 不同浓度葡萄糖对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响

以葡萄糖为碳源时,控制培养基中起始碳源分别为2g/L、5g/L、10g/L、15g/L、20g/L,30℃培养24h,获得湿菌体细胞,破碎测酶活,其结果见表3。

表3 葡萄糖浓度对醋酸杆菌菌体生长及产乙醇脱氢酶的影响

葡萄糖浓度(g/L)	OD ₆₀₀	酶活 (U/mL)
2	0.365	0.183
5	0.487	0.198
10	0.542	0.206
15	0.563	0.208
20	0.568	0.207

表3结果表明,在所考察的碳源浓度范围内,随着培养基中碳源浓度的不断增大,醋酸杆菌在600nm下的OD值增大,但在碳源浓度为5~20g/L范围,1mL发酵液中的酶活变化不大。

2.1.3 不同氮源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响

表4为不同氮源对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响结果,由表4可以看出,复合氮源比单一氮源对醋酸杆菌的OD₆₀₀值和酶活的影响较大。

表4 不同氮源对醋酸杆菌菌体生长及产酶的影响

氮源	OD ₆₀₀	酶活 (U/mL)
10g/L 蛋白胨	0.542	0.206
10g/L 酵母浸膏	0.563	0.210
5g/L 蛋白胨和 5g/L 酵母浸膏	0.568	0.211
10g/L 蛋白胨和 10g/L 酵母浸膏	0.581	0.213

2.1.4 生长因子对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响

在前期的研究中,当培养基中添加西红柿汁时,对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶有较大的影响,因此,研究了培养基中添加不同浓度的西红柿汁对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶活力的影响,结果见表5。

由表5可以看出,在所考察的西红柿汁添加量的范围内,随着西红柿汁添加量增加,600nm下醋酸杆菌的OD值随之增大,但与没有添加西红柿汁的相比,添加生

表5 添加不同量的西红柿汁对醋酸杆菌生长及其产乙醇脱氢酶的影响

西红柿汁 (mL/L)	OD ₆₀₀	酶活 (U/mL)
0	0.552	0.189
50	0.568	0.211
100	0.572	0.215
200	0.576	0.217
300	0.582	0.216
400	0.584	0.217

长因子后的培养基中乙醇脱氢酶的活力有所增加。

2.2 响应面法优化醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的培养基

响应面分析法是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法,其中最常用的是Box-Behnken的中心组合设计原理,根据此原理,以脱氢酶酶活为响应值选取葡萄糖、氮源(酵母浸膏:蛋白胨按照1:1的方式)和西红柿汁3个对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶影响较大的因素,设计了3因素3水平共17个试验点的响应面分析实验。其具体实验方案及结果见表6。

表6 醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基响应面分析方案及结果

编号	A	B	C	Y 比活力 (U/mL)
1	0	0	0	0.343
2	0	-1	1	0.332
3	0	0	0	0.342
4	1	-1	0	0.313
5	1	0	1	0.341
6	-1	1	0	0.291
7	1	0	-1	0.262
8	0	1	1	0.322
9	-1	-1	0	0.243
10	0	0	0	0.346
11	-1	0	1	0.283
12	1	1	0	0.301
13	-1	0	-1	0.227
14	0	1	-1	0.296
15	0	-1	-1	0.284
16	0	0	0	0.331
17	0	0	0	0.341

根据实验结果,对实验数据进行多项拟合回归,以乙醇脱氢酶的比活力为因变量,以碳源葡萄糖、氮源(酵母浸膏:蛋白胨为1:1),生长因子西红柿汁为自变量建立回归方程: $Y=0.32+0.022A+4.75 \times 10^{-3} B+0.026C-0.015AB+5.75 \times 10^{-3} AC-5.500 \times 10^{-3} BC-0.042 A^2-0.012 B^2-0.02 C^2$;并对回归方程进行方差分析,结果见表7。

该方程表达了脱氢酶酶活与所选的3个因素之间的关系。回归方程的决定系数 R^2 为0.9652。当“Prob>F”值<0.05,即表示该项指标显著,“Prob>F”值<0.01,即表示该项指标高度显著。从表3的分析结果来看,乙醇脱氢酶与试验中3个因素的回归方程的F值为21.56,方程显著。整体模型的“Prob>F”值<0.001,表明该二次方程模型高度显著。西红柿汁和葡萄糖对醋酸杆菌产乙醇脱

表7 回归方程各项的方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F	显著性
模型	0.021	9	2.341E-03	21.56	0.0003	**
A	3.741E-03	1	3.741E-03	34.46	0.0006	**
B	1.805E-04	1	1.805E-04	1.66	0.2382	
C	5.460E-03	1	5.460E-03	50.29	0.0002	**
AB	9.000E-04	1	9.000E-04	8.29	0.0237	*
AC	1.323E-04	1	1.323E-04	1.22	0.3062	
BC	1.210E-04	1	1.210E-04	1.11	0.3262	
A ²	7.401E-03	1	7.401E-03	68.17	<0.0001	**
B ²	5.739E-04	1	5.739E-04	5.29	0.0551	
C ²	1.757E-03	1	1.757E-03	16.18	0.0050	*
残差	7.600E-04	7	1.086E-04			
失拟项	6.308E-04	3	2.103E-04	6.51	0.0510	
净误差	1.292E-04	4	3.230E-05			
总离差	0.022	16				

注: *为显著(Prob<0.05); **为高度显著(Prob<0.01)。

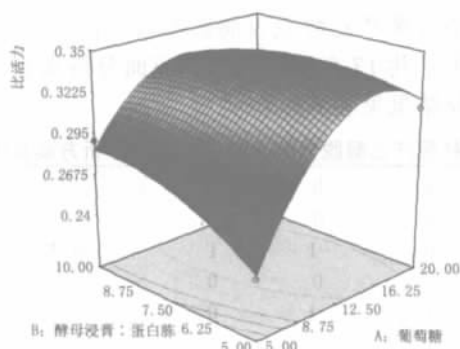


图1 响应面法(A,B)立体分析图

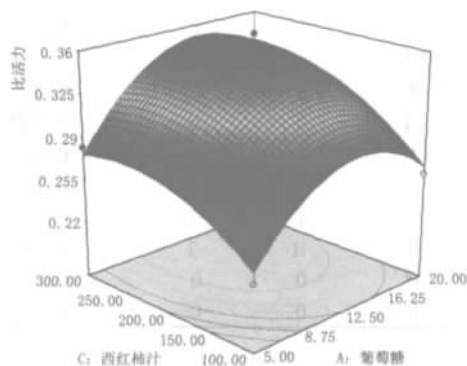


图2 响应面法(A,C)立体分析图

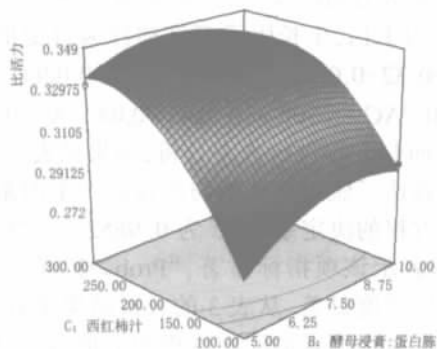


图3 响应面法(B,C)立体分析图

交互项中碳源与氮源交互显著,二次项中,碳源影响高度显著,生长因子影响显著。在所选取的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序为:西红柿汁>葡萄糖>氮源,同时,图1~3直观地反映了各因素交互作用对响应值的影响。比较3组图可知,生长因子(西红柿汁)对醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的影响最为显著,表现为曲线较陡;其次是碳源和氮源;失拟项 $p>0.05$,表明该方程可以接受,可以利用该回归方程确定最优的产乙醇脱氢酶的培养基成分。

2.3 醋酸杆菌产乙醇脱氢酶培养基成分的确定

通过软件 Design-Expert 7.0 求解方程,给出了产乙醇脱氢酶最优培养基组成为:葡萄糖 15.080 g/L,氮源(蛋白胨和酵母浸膏)7.043 g/L,西红柿汁 272.500 mL/L,此时醋酸杆菌中乙醇脱氢酶的酶活为 0.352 U/mL。考虑到实际操作的限制性,培养基中的各种成分修正为:葡萄糖 15.1 g/L,氮源(蛋白胨和酵母浸膏)7.0 g/L,西红柿汁 272.5 mL/L。为检验结果的可靠性,将醋酸杆菌接入到修正后的培养基中于相同条件下培养,破碎细胞后,测其酶活为 0.349 U/mL,与理论预测值基本吻合。因此,可利用响应面分析法得到乙醇脱氢酶。

3 结论

应用 Box-Behnken 中心组合实验设计方法,优化了醋酸杆菌发酵生产乙醇脱氢酶的培养基。结果表明,醋酸杆菌产乙醇脱氢酶的最优培养基为:葡萄糖 15.1 g/L,氮源(蛋白胨和酵母浸膏)7.0 g/L,西红柿汁 272.5 mL/L。

参考文献:

- [1] Sun H., Plapp B. Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family [J]. Journal of Molecular Evolution, 1992, 34 (6): 522-535.
- [2] Xiao Z., Zong M., Lou W. Highly enantioselective reduction of 4-(trimethylsilyl)-3-butyne-2-one to enantiopure (R)-4-(trimethylsilyl)-3-butyne-2-ol using a novel strain *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(23): 5560-5565.
- [3] 胡建强, 刘凤兰. 血清乙醇脱氢酶活性测定及临床应用 [J]. 天津医科大学学报, 2001, 7 (001): 110-111.
- [4] 徐晶, 邓勇. 山楂果醋发酵工艺的试验研究 [J]. 中国农业大学学报, 2002, 7 (002): 81-84.
- [5] 周秉辰. 食醋生产中醋酸菌乙醇脱氢酶的活性与产酸速率关系的研究 [J]. 中国酿造, 2009, (011): 58-59.
- [6] 张海生, 陈锦屏. 柿饼加工中脱涩和反涩机理的研究 [J]. 食品工业科技, 2003, 24 (012): 39-40.
- [7] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27 (001): 38-41.
- [8] 潘丽军, 余赞, 郑志等. 米根霉乳酸脱氢酶的特性研究 [J]. 食品科学, 2003, 24 (011): 23-26.

氢酶影响高度显著,氮源(蛋白胨:酵母浸膏)影响不显著,