

响应面法分析微量元素对 ALDC 酶活力的影响

赵春海, 阚振荣

(河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 考察了微量元素对乙酰乳酸脱羧酶活的影响, 通过单因子实验确定微量元素的最佳产酶浓度, 进一步通过回归方法计算出微量元素的理论最佳产酶浓度, 并用响应面分析法确定微量元素的最佳配比: 微量元素配比为 Mg^{2+} 0.022 g/L, Mn^{2+} 0.00076 g/L, Zn^{2+} 0.00296 g/L, 酶活提高了 3 倍。

关键词: 乙酰乳酸脱羧酶; 微量元素; 响应面

中图分类号: Q55; TQ925.7; TS262.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)07-0081-03

Response Surface Method to Analyze the Effects of Trace Elements on ALDC Activity

ZHAO Chun-hai and KAN Zhen-rong

(Life Science College of Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: The effects of trace elements on ALDC activity were investigated and the optimal trace elements concentration was confirmed through single factor experiments. Furthermore, the optimal theoretical trace elements concentration was calculated through retrogressive method. And the optimal proportioning of trace elements was verified as follows by response surface method: Mg^{2+} 0.022 g/L, Mn^{2+} 0.00076 g/L and Zn^{2+} 0.00296 g/L, which could improve enzyme activity three times of the original value. (Tran. by YUE Yang)

Key words: acetolactate decarboxylase (ALDC); trace elements; response surface

啤酒发酵中, 产生的双乙酰对啤酒口味有不良的影响, 如果超过 0.15 mg/L 就会产生类似馊饭的味道。啤酒的风味物质中双乙酰起主要作用, 其含量直接影响啤酒的风味成熟, 把双乙酰的量降到阈值以下是风味成熟阶段的主要目的, 也是熟化阶段的时间限制因素^[1, 2]。

α -乙酰乳酸脱羧酶(α -ALDC)能催化 α -乙酰乳酸(α -Acetolactate)脱羧后生成乙偶姻和 CO_2 , 它能较快地除去前体物 α -乙酰乳酸, 使之不形成双乙酰。如将 ALDC 酶制剂在啤酒主发酵阶段或熟化阶段加入, 可大大缩短啤酒熟化期, 从而提高设备的利用率和节省能源。

微生物在生长繁殖和产酶过程中, 需要无机盐维持细胞的渗透压, 并合成核酸等生命物质; 某些微量元素如锰、锌、钡等对其生理活性物质(酶的活性中心或辅酶)的组成或生理活性作用的调节物(酶的激活剂)的作用有重要影响, 本文研究了微量元素对 ALDC 产生的激

活作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* B226-5 (本实验室))。

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 5, 牛肉膏 5, pH7.2;

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 15, 蛋白胨 8.4, 酵母膏 4, 牛肉膏 15, 糊精 15, 柠檬酸 2.5, $(NH_4)_2SO_4$ 8.4, pH7.0。

1.1.3 主要试剂与设备

肌酸 α -乙酰氧基- α -甲基-乙酰乙酸乙酯 (Aldrich 公司产品); MES[乙-(N-吗啉)-乙磺酸] (Sigma 公司产

河北省重点攻关课题, 课题编号: 94245509D

收稿日期: 2005-01-29

作者简介: 赵春海(1979-), 男, 河北廊坊人, 硕士研究生。

品),Brij35 (ubrich 公司产品),其他试剂均为国产分析纯。

高速冷冻离心机(美国 Bakman 产品),721-分光光度计(上海分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定

酶活力测定与相关溶液及底物配制见参考资料^[3], 以及各因素对酶活影响参考资料^[4]。

1.2.2 激活率的计算方法

激活率=(加入微量元素酶活/对照酶活-100 %)

1.2.3 实验方法

微量元素对 ALDC 的影响 ,以一定接种量加入分别装有不同浓度的微量元素发酵培养基中培养 ,离心收集菌体 ,破壁测酶活力。

2 结果与讨论

2.1 单一金属离子的影响

分别选用 6 种微量元素 ,各以不同浓度加入发酵培养基中 ,以空白为对照样 ,测定酶活力并计算激活率 ,结果见表 1 ,表 2。

表 1 不同微量元素对酶活的影响

Mg ²⁺ (g/L)	激活率 (%)	Mn ²⁺ (g/L)	激活率 (%)	Zn ²⁺ (g/L)	激活率 (%)
0.015	60.60	0.0005	199.40	0.001	93.16
0.02	141.00	0.0006	257.90	0.002	126.45
0.025	173.50	0.0007	288.10	0.003	143.52
0.03	138.46	0.0008	276.79	0.004	124.78
0.035	105.1	0.0009	22.64	0.005	105.12

表 2 不同微量元素对酶活的影响

Ca ²⁺ (g/L)	激活率 (%)	Ba ²⁺ (g/L)	激活率 (%)	Co ²⁺ (g/L)	激活率 (%)
0.0025	42.45	0.005	10.58	0.04	52.65
0.004	76.41	0.01	25.00	0.05	51.43
0.007	117.90	0.0015	15.37	0.06	44.28
0.01	106.60	0.002	5.77	0.07	-1.42
0.02	104.70	0.003	-2.88	0.08	-7.14

从上述可以看出 ,6 种微量元素在低浓度时有明显的激活作用 ,但当浓度升高到一定值时便对酶活产生抑制作用。6 种微量元素中镁、锰、锌 3 种离子对酶活影响较大 ,故对这 3 种离子作进一步试验。

2.2 单因子线性回归试验

从镁、锰、锌离子浓度与激活率的关系可知 :其符合 $y= ax^2+bx+c$ 的方程 (y 表示激活率 , x 表示镁离子浓度)。回归分析见表 3 ,表 4。

从方差结果 , 镁离子对酶活影响显著 , r^2 值表明方程模拟准确 ,方程的失拟性小。

表 3 回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性	相关系数
回归方差	0.438	2	0.219	19.538	0.048	$r^2=0.951$
残 差	0.022	2	0.11			
总方差	0.46	4				

表 4 回归系数取值

项目	常数项	一次项	二次项
系 数	-2.406	347.720	-6680.000
显著性	0.69	0.025	0.027

由表 4 得 , $y= -6680.00x^2+347.720x-2.406$; 从方程可以求出当 $x=0.026$ 时 , y 有最大值。同样的方法可以求出锰、锌的最佳浓度。

锰的回归方程为 $y=-8592857.143x^2+12751.00x-3.135$, $x_{\text{锰}}= 0.00074$ 。

锌的回归方程为 $y=-10122142.875x^2+62957.857x+41.076$, $x_{\text{锌}}=0.0323$ 。

2.3 多因子实验^[5 6]

在线性回归的理论最佳浓度基础上 , 根据 Box-Behnken 设计实验 ,见表 5。

表5 实验因素与水平

名称	浓度 (g/L)				
镁 (x_1)	-1 (0.020)	0 (0.025)	1 (0.030)		
锰 (x_2)	-1 (0.00070)	0 (0.00075)	1 (0.00080)		
锌 (x_3)	-1 (0.025)	0 (0.030)	1 (0.035)		

15 个实验可以分为两类 :一是析因点 ,自变量取值在 x_1 , x_2 , x_3 ;二是零点 ,用以估计实验误差。响应面实验安排及结果见表 6 ,回归方差分析见表 7 ,回归系数取值见表 8。经回归拟合后 ,各实验因子对响应值的影响可以用以下函数表示 :

$$Y=a_0+a_1x_1+ a_2x_2+ a_3x_3+ a_{11}x_1^2 +a_{22}x_2^2 +a_{33}x_3^2+a_{12}x_1x_2+a_{23}x_2x_3+a_{13}x_1x_3$$

表6 响应面实验安排及结果

实验编号	镁离子	锰离子	锌离子	激活率 (%)
1	-1	-1	0	213.40
2	-1	0	-1	289.00
3	-1	0	1	251.20
4	-1	1	0	197.56
5	0	-1	-1	179.26
6	0	-1	1	151.22
7	0	1	-1	147.56
8	0	1	1	145.12
9	1	-1	0	123.17
10	1	0	-1	156.09
11	1	0	1	135.37
12	1	1	0	117.07
13	0	0	0	319.51
14	0	0	0	339.02
15	0	0	0	310.97

表 7 回归方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性	相关系数
回归方差	2.532	9	0.281	51.655	0.000	$r^2=0.989$
残差	0.027	5	0.005			
总方差	2.559	14				

从表 7 可以看出,用上述回归方程描述各因子与响应面之间的关系时,其因变量与全体子变量之间的关系是显著的。方程的失拟性很小,因此可以用该方程代替实验进行分析。

表 8 回归系数取值

名称	系数	显著性	名称	系数	显著性
a_0	2.360	0.000	a_{22}	-0.54	0.000
a_1	-0.334	0.000	a_{33}	-0.373	0.000
a_2	-0.08607	0.04	a_{12}	0.07964	0.174
a_3	-0.0525	0.100	a_{23}	0.0225	0.569
a_{11}	-0.27	0.01	a_{13}	0.0175	0.655

分别对 x_1 x_2 x_3 求偏导得:

$$-0.54 x_1 + 0.07964 x_2 + 0.0225 x_3 - 0.334 = 0 \quad (1)$$

$$0.07964 x_1 - 1.08 x_2 + 0.0175 x_3 - 0.08607 = 0 \quad (2)$$

$$0.0225 x_1 - 0.746 x_3 + 0.0175 x_2 - 0.0525 = 0 \quad (3)$$

由以上 3 个方程可以解得 $x_1 = -0.58973$ $x_2 = 0.21878$ $x_3 = -0.08303$ 。

根据表 1 的对应关系可以求得 3 种元素的最佳配比浓度:分别是 $Mg^{2+}0.022$ g/L $Mn^{2+}0.00076$ g/L $Zn^{2+}0.00296$ g/L。

2.4 验证实验

分别以优化微量元素的单因子、多因子和空白进行

发酵实验,结果见表 9。

表 9 验证实验

项目	空白	单因子			多因子
		镁	锰	锌	
酶活(u/mL)	0.060	0.183	0.189	0.124	0.251
激活率(%)		205.00	215.00	106.97	318.33

3 小结

进行微量元素单因子实验,确定出影响显著的元素及合适的浓度,并用回归方法确定出其理论浓度分别为 $Mg^{2+}0.026$ g/L $Mn^{2+}0.00074$ g/L $Zn^{2+}0.0323$ g/L;之后利用响应面法算出 3 种离子的配比及最佳浓度分别为 $Mg^{2+}0.022$ g/L $Mn^{2+}0.00076$ g/L $Zn^{2+}0.00296$ g/L,通过实验表明优化的理论数值合理。

参考文献:

- [1] 张博润,刁爱坡,何秀萍. α -乙酰乳酸脱羧酶的研究进展及其应用前景[J]. 微生物学通报,1997,24(4):214-243.
- [2] 蒙健宗,李晓明,王青艳,等. 高密度培养基工程大肠杆菌生产 α -乙酰乳酸脱羧酶[J]. 广西科学,2001,8(4):284-286.
- [3] 阚振荣,张元亮. α -乙酰乳酸脱羧酶产生菌的分离和筛选[J]. 河北大学学报(自然科学版),1997,17(1):47-50.
- [4] 阚振荣,田新生. α -乙酰乳酸脱羧酶稳定性的初步研究[J]. 食品与发酵,2002,28(9):23-25.
- [5] 永红,沈树宝,欧阳平凯.响应面分析法用于微生物培养基浓度的优化[J].工业微生物,2002,32(1):9-12.
- [6] 欧宏宇,贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J].天津轻工业学院学报,2001(1):14-17.

(上接第 80 页)

扰。

3 样品分析

从超市购得 4 瓶山东某厂生产的啤酒,采用标准加入法^[5]测定了啤酒中甲醛的含量及其回收率。实验方法:分别移取 10 mL 啤酒于 5 支 50 mL 容量瓶中,分别加入甲醛标准液 0.8 mL,10 mL,12 mL,14 mL 后稀释至刻度,以此作为待测样品液。实验时分别加入样品液 1 mL,用空白液作参比,在 612 nm 处测吸光度 A_0 A_T ,以 $\log(A_0/A_T)$ 对 $C_{\text{甲醛}}$ 进行线性回归计算,即可求得甲醛含量(见表 2)。

从表 2 看出,本法可以消除基体物质(如乙醇)干扰,提高测定方法的准确度。

参考文献:

- [1] 宫菁,刘敏.甲醛污染对人体健康影响及控制[J].环境与健康,2001,18(6):414-415.

表 2 样品中甲醛的测定结果 (μ g/mL)

样 品	结果平均值 ($n=3$)	相对标准偏差 (RSD, %)	加入量	实测量	回收率 (%)
1	0.60	2.61	0.48	0.493	102.7
2	0.67	3.73	0.48	0.468	97.5
3	0.75	2.81	0.48	0.485	101.0
4	0.72	3.73	0.48	0.475	98.9

- [2] MEDVEDORICI A,DAVID V,DAVID F et al.Optimization in the formaldehyde determination at sub-ppm level from acetals by HPLC-DAD[J].Anal Lett,1999,32(3):581-592.
- [3] 樊静,唐尧基,冯素玲.催化荧光动力学法测定织物中痕量甲醛[J].分析化学,2002,30(8):942-946.
- [4] FELGE K,REID T.Determination of Formaldehyde by capillary electrophoresis in the presence of a dihydroxyacetone matrix[J]. J Chromatogr A,1996,730(1/2):333-336.
- [5] 化工企业空气中有害物质测定方法编写组.化工企业空气中有害物质测定方法[M].北京:化学工业出版社,1983.296.