

3-苯氧基苯甲酸降解酶产生条件的优化

夏 闻, 姚 开*, 贾冬英, 刘书亮
(四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065)

摘 要:采用 Plackett-Burman 法考察了 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、3-苯氧基苯甲酸浓度和初始 pH、装液量及接种量 8 个因素对产酸克雷伯氏菌生成 3-苯氧基苯甲酸降解酶的影响, 并利用 Box-Behnken 实验设计及响应面分析对其产酶条件进行了优化。结果表明, 培养基中 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度、培养基装液量和接种量对菌体产生 3-苯氧基苯甲酸降解酶的影响具有显著性; 当培养基中 K_2HPO_4 浓度为 2.0g/L、 KH_2PO_4 浓度为 0.5g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为 0.2g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度为 0.9g/L、3-苯氧基苯甲酸浓度为 200mg/L、初始 pH 为 7.2、250mL 锥形瓶装液量为 56.6mL、接种量(种子液 OD_{600} 为 1.000)为 5.9% (v/v) 时, 3-苯氧基苯甲酸降解酶的活力可达 25.72U/mL。

关键词:3-苯氧基苯甲酸, 降解酶, 优化条件, 响应面分析

Optimization of production conditions for 3-phenoxybenzoic acid degrading enzyme

XIA Wen, YAO Kai*, JIA Dong-ying, LIU Shu-liang

(College of Light Industry and Food, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The effects of eight factors, which include the concentrations of K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ and 3-phenoxybenzoic acid, initial pH, medium volume and inoculum volume, on the production of 3-phenoxybenzoic acid degrading enzyme from *Klebsiella oxytoca* were studied by Plackett-Burman design. And the production condition for the enzyme was optimized by Box-Behnken design and response surface analysis. The results showed that $(NH_4)_2SO_4$ concentration, medium volume and inoculum volume could significantly influence the activity of 3-phenoxybenzoic acid degrading enzyme. The optimal condition for producing the enzyme was as follows: K_2HPO_4 2g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.9g/L, 3-phenoxybenzoic acid 200mg/L, initial pH 7.2, medium volume 56.6mL in a 250mL conical flask and inoculum volume of 5.9%. Under this condition, the activity of the enzyme reached the maximum of 25.72U/mL.

Key words: 3-phenoxybenzoic acid; degrading enzyme; optimum condition; response surface analysis

中图分类号: TS201.2*5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)10-0181-04

3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)是拟除虫菊酯类农药的降解产物^[1-2], 对真菌的毒性大于农药本身, 且与拟除虫菊酯原药不同, 它可以在土壤中迁移, 对环境的危害性更大^[3-4]。目前, 对 3-PBA 生物降解的研究多采用微生物降解法。然而大量研究已经证实, 酶较之产生该种酶的微生物更能忍受异常的环境条件, 其对某些物质的降解效果远高于微生物降解法^[5]。基于此, 本文采用响应面法对产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)产生 3-PBA 降解酶的条件进行了优化, 研究结果可为进一步深入研究 3-PBA 的酶法降解奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 由茶园土壤分离得到, 经鉴定为产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*), 其对氯氰菊酯的耐受

性为 1000mg/L; 活化培养基 营养琼脂培养基, 121℃ 灭菌 20min 后加入 3-PBA(用无水乙醇溶解), 使其含量为 1000mg/L; 种子培养基 蛋白胨 10g/L、酵母膏 5g/L、NaCl 5g/L, pH7.2, 121℃ 灭菌 20min; 发酵培养基 $(NH_4)_2SO_4$ 1.5g/L、 KH_2PO_4 0.5g/L、 K_2HPO_4 1.5g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L、NaCl 0.5g/L, pH7.2, 121℃ 灭菌 20min 后定量加入 3-PBA 的乙醇溶液; 3-PBA 纯度为 99%, 上海西域公司。

紫外可见分光光度计, 冷冻离心机, 培养箱, 摇床, 高压蒸汽灭菌器等。

1.2 粗酶液制备

将活化后的产酸克雷伯氏菌接种于一定体积的种子培养基中, 35℃ 培养 24h 后按一定比例($OD_{600} = 1.000$)接种于定量的发酵培养基(250mL 锥形瓶)中, 35℃ 摇床(140r/min)培养 96h。培养液于 4℃、7500r/min 离心 10min, 弃去上清液, 用 4℃ 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤沉淀的菌体, 经离心和重悬后, 超声破碎细胞, 再于 4℃、11000r/min 离心 10min, 得到粗酶液。

收稿日期: 2009-01-15 * 通讯联系人

作者简介: 夏闻(1985-), 女, 研究生, 主要从事食品安全方面的研究。

基金项目: 国家自然科学基金(20472058)。

表2 Plackett-Burman 实验设计与结果

实验号	A	B	(C)	D	E	(F)	G	H	(I)	J	K	Y
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	15.01
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	21.33
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	12.37
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	12.52
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	18.92
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	20.15
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	18.44
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	10.46
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	11.23
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	18.55
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	10.64
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	12.34

1.3 降解酶活力测定

取 0.3mL 粗酶液,加入 2.7mL 3-PBA 含量为 100mg/L、pH 为 7.5 的磷酸缓冲液中,混合均匀,于 35℃ 恒温水浴中反应 30min 后,加入 0.2mL 1.0mol/L 的盐酸溶液,终止酶反应^[6]。以蒸馏水代替粗酶液作为空白对照。用等体积的乙酸乙酯萃取酶反应液中残留的 3-PBA,稀释一定倍数后于最大吸收波长 290nm 处测其吸光值,根据标准曲线方程($y = 0.0207x - 0.0123$)计算 3-PBA 的含量。将在上述条件下每分钟降解 1.0 μ g 3-PBA 所需要的粗酶液定义为一个降解酶活力单位(U/mL)。

1.4 Plackett-Burman 实验

本实验选用 N = 12 的实验设计,以 3-PBA 降解酶活力为指标,考察培养基中 K_2HPO_4 (A)、 KH_2PO_4 (B)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D)、 $(NH_4)_2SO_4$ (E) 及 3-PBA 浓度(G)、培养基初始 pH(H)、装液量(J)、接种量(K)对 3-PBA 降解效果的影响。用 SARS 软件对实验数据进行处理,比较各因素的 T 值与可信度,选择 $P < 0.1$ 的因素作为主效应因素。

1.5 响应面分析实验

采用最陡爬坡实验快速逼近最佳区域,确定响应面分析的中心点及其实验方案,拟合数据,得到多元二次回归方程^[7]。通过分析各因素的主效应和交互效应,确定 3-PBA 降解酶产生的优化条件。

2 结果与讨论

2.1 影响降解酶活力的主要因素

以 3-PBA 降解酶活力为响应值(Y),每个因素取两个水平,另设 3 个空白项以考察实验误差。各因素水平的效应值及显著性分析见表 1, Plackett-Burman 实验设计及结果见表 2。可以看出,培养基中 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度、培养基装液量和接种量对 3-PBA 降解酶活力的影响显著,其可信度在 90% 以上($P < 0.1$),可作为主要因素进一步考察其影响。而其它因素的取值则根据其效应(T)的正负和大小确定,正效应的因素均取较高值,据此可以确定的部分发酵条件为:培养基中 K_2HPO_4 的浓度为 2.0g/L、 KH_2PO_4 为 0.5g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为 0.2g/L、3-PBA 浓度为 200mg/L、初始 pH 为 7.2。

表1 各因素水平的效应值及显著性

因素	水平		T	P
	1	-1		
A K_2HPO_4 (g/L)	2	1.5	0.29	0.794
B KH_2PO_4 (g/L)	1	0.5	-0.59	0.595
D $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	0.5	0.2	-1.40	0.255
E $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	2.5	1.5	-2.82	0.067
G 3-PBA (mg/L)	200	100	0.53	0.635
H 初始 pH	7.2	6.8	0.19	0.860
J 装液量 (mL)	50	30	4.25	0.024
K 接种量 (%)	5	2	2.98	0.058

2.2 响应面分析中心点的确定

依据 Plackett-Burman 实验结果设计主要因素的最陡爬坡路径,其中装液量、接种量有显著正效应,应增加; $(NH_4)_2SO_4$ 浓度有显著负效应,应减小。根据这 3 个因素效应大小的比例设定它们的变化方向及步长,实验设计及结果见表 3。可以看出,第 4 组实验条件下的降解酶活力最高,因此以第 4 组的水平作为响应面实验的中心点,即 250mL 锥形瓶中培养基装液量为 60mL、接种量(种子液 OD_{600} 为 1.000)为 6% (v/v)、 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度为 0.9g/L。

2.3 降解酶产生的优化条件

依据 Plackett-Burman 实验设计及其结果,选择培养基装液量、接种量和 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 ,降解酶活力作为响应值(Y),利用 SARS 软件进行 Box-Behnken 实验设计,结果见表 4。对实验数据进行回归和方差分析,建立二次响应面回归模型,寻求最优因素水平,其结果见表 5。可以看出,装液量和接种量的线性项,装液量、接种量和 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度的平方项均对 3-PBA 降解酶的活力具有显著影响;模型的 P 值小于 0.0005,说明此模型高度显著;相关系数 R^2 为 0.9871,调节系数 Adj R^2 为 0.9638,表明二次回归方程的拟合程度好,预测值与实测值之间具有高度的相关性,可以用于预测降解酶的活力。

利用 SARS 软件对实验数据进行拟合,所得多元二次回归方程为: $Y = 25.67 - 1.175X_1 - 1.06875X_2 + 0.12125X_3 - 1.68375X_1^2 - 0.25X_1X_2 + 0.615X_1X_3 - 3.31625X_2^2 - 0.0475X_2X_3 - 1.39625X_3^2$

表3 最陡爬坡实验设计及结果

实验号	X ₁ 装液量 (mL)	X ₂ 接种量 (%, v/v)	X ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Y 降解 酶活力 (U/mL)
1	45	4.5	1.8	14.74
2	50	5.0	1.5	18.63
3	55	5.5	1.2	21.82
4	60	6.0	0.9	23.01
5	65	6.5	0.6	18.39

表4 Box-Behnken 实验结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 酶活力 (U/mL)
1	50	5	0.9	22.55
2	50	7	0.9	21.08
3	70	5	0.9	20.76
4	70	7	0.9	18.29
5	60	5	0.6	22.25
6	60	5	1.2	21.97
7	60	7	0.6	20.04
8	60	7	1.2	19.57
9	50	6	0.6	23.98
10	70	6	0.6	20.34
11	50	6	1.2	23.61
12	70	6	1.2	22.43
13	60	6	0.9	25.78
14	60	6	0.9	25.36
15	60	6	0.9	25.87

为了得到最佳培养条件,对多元二次回归方程分别求其一阶偏导,解方程得到的极值点为: X₁ = -0.3434, X₂ = -0.1479, X₃ = -0.0297, 进而得到 3-PBA 降解酶活力的最大预测值为 25.95U/mL, 此时装液量、接种量、(NH₄)₂SO₄ 浓度的最佳值分别为 56.6mL、5.9% (OD₆₀₀ = 1.000)、0.9g/L。

表5 Box-Behnken 实验方差分析表

方差来源	df	SS	F	P
X ₁	1	11.0450	56.6919	0.0006
X ₂	1	9.1378	46.9026	0.0010
X ₃	1	0.1176	0.6036	0.4723
X ₁ ²	1	10.4677	53.7289	0.0007
X ₂ ²	1	40.6062	208.4240	0.0001
X ₃ ²	1	7.1982	36.9470	0.0017
X ₁ X ₂	1	0.2500	1.2832	0.3086
X ₁ X ₃	1	1.5129	7.7654	0.0385
X ₂ X ₃	1	0.0090	0.0463	0.8380
模型	9	74.2906	42.3688	0.0003
R ²		98.71%		
Adj R ²		96.38%		

利用 SARS 软件绘出响应面分析图,如图 1~图 3 所示。从中可以看出,装液量、接种量及 (NH₄)₂SO₄ 浓度与酶活力之间存在相关性,其中装液量和接种量对降解酶活力的影响最为显著;当接种量和 (NH₄)₂SO₄ 浓度固定在最佳水平时,3-PBA 降解酶活力随着装液量的增加先增大后减小,装液量为 56.6mL 时,酶活力最强;当装液量和 (NH₄)₂SO₄ 浓度固定在最佳水平时,接种量由 5% 增至 5.9%,3-PBA 降解酶活力随之提高,而当进一步增加接种量时,降解酶活力反而下降。

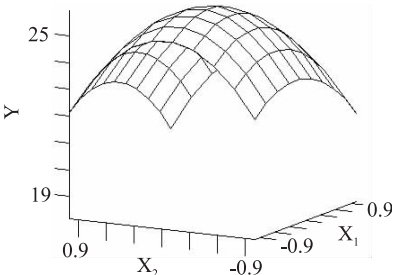


图1 Y = f(X₁, X₂) 响应面立体分析图

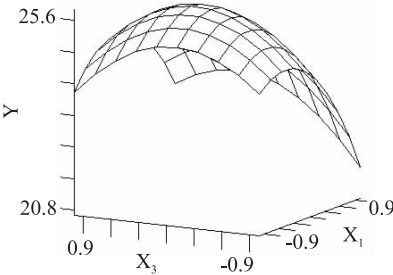


图2 Y = f(X₁, X₃) 响应面立体分析图

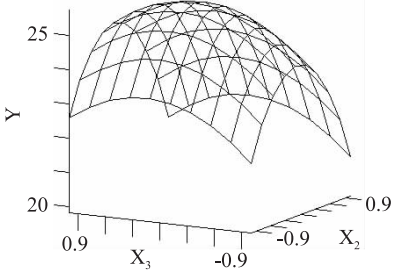


图3 Y = f(X₂, X₃) 响应面立体分析图

验证实验结果显示,在此优化条件下得到 3-PBA 降解酶活力为 25.72U/mL,与预测值(25.95U/mL)接近,可见该模型可以较好地预测优化培养条件下 3-PBA 降解酶的活力。而且与优化前 12.38U/mL 相比,降解酶活力大约提高了 2 倍。

3 结论

通过 Plackett-Burman 设计与响应面法相结合的实验方法并借助 SARS 软件进行优化实验设计及数据分析,实现了对 3-PBA 降解酶产生条件的优化。当培养基中 K₂HPO₄ 浓度为 2g/L、KH₂PO₄ 浓度为 0.5g/L、MgSO₄ · 7H₂O 浓度为 0.2g/L、(NH₄)₂SO₄ 浓度为 0.9g/L、3-PBA 浓度为 200mg/L 及初始 pH7.2, 250mL 锥形瓶装液量为 56.6mL、接种量(种子液 OD₆₀₀ 为 1.000)为 5.9% (v/v) 时,3-PBA 降解酶的活力可达到 25.72U/mL,较之优化前大约提高了 2 倍。

参考文献

[1] Halden, R.U, Tepp, et al. Degradation of 3- phenoxy- benzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (POB) and two modified *Pseudomonas* strains [J] . Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (8) : 3354-3359.

[2] 许育新, 李晓慧, 秦华, 等. 3-苯氧基苯甲酸降解菌的分离及降解特性研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32 (5) : 62-67.

[3] 谢文军, 周健民, 王火焰, 等. HPLC 法测定土壤中 3-苯氧基苯甲酸[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26 (2) : 608-611.

[4] Edord Topp, M Humayoun Akhtar. Identification and

控制 NH_4^+ 的浓度对 解淀粉芽孢杆菌产中温 α -淀粉酶的影响

李志鹏,余晓斌*,张 翠

(江南大学生物工程学院,工业生物技术教育部重点实验室,江苏无锡 214122)

摘 要:在解淀粉芽孢杆菌生产中温 α -淀粉酶的发酵过程中,利用人造沸石与膨润土吸附菌体代谢过程中产生的 NH_4^+ 对于提高酶活力是有利的。实验表明,添加1.5%人造沸石(40~60目)、添加2%人造沸石(20~40目)、添加2%膨润土时都能够有效地提高酶活力,其中添加1.5%的人造沸石(40~60目)可提高20%。

关键词:沸石,淀粉酶,铵根离子

Effects of controlling ammonium in *Bacillus amyloliquefaciens* on α -amylase fermentations

LI Zhi-peng, YU Xiao-bin*, ZHANG Cui

(School of Biotechnology, Jiangnan University, The Key Laboratory of Industrial Biotechnology,
Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The addition of synthetic zeolite and bentonite is very useful to control the NH_4^+ level in fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* to product α -amylase. The experiment indicated, when the concentration of synthetic zeolite (40~60 mesh) 1.5%, the synthetic zeolite (20~40 mesh) and bentonite was 2%, it could effectively increase the yield of the enzyme. The addition of 1.5% of synthetic zeolite (40~60 mesh) can increase 20% yield of the enzyme over the uncontrolled experiments.

Key words: zeolite; amylase; ammonium

中图分类号: TS201.2⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)10-0184-03

铵根离子的水平对于淀粉酶发酵有很大的影响。低水平的铵根离子对于 α -淀粉酶合成是不利的,过多的铵根离子也会对酶合成产生抑制作用(某些情况会完全抑制)。除了外加铵根离子以外,培养基中营养过于丰富造成的铵根离子大量积累也会对 α -淀粉酶的合成产生抑制,培养基中存在复合氮源如玉米浆,则更是如此^[1-2]。在发酵过程中,由于对数期菌体的大量合成, NH_4^+ 浓度会下降,但在发酵后期菌体代谢产生的大量 NH_4^+ 会对 α -淀粉酶的合成产生抑制;同样,控制 NH_4^+ 浓度过低也会抑制酶的合成。因而控制 NH_4^+ 在一个适当的范围内是十分必要的^[3]。沸石是1756年由瑞典矿物学家F.A.F.

Cronstedt发现的新矿物,它是Zeolite一族多孔的碱金属和碱土金属盐的总称,其具有无限扩展的三维晶体结构。目前,人们发现的天然沸石有近50余种,其分子式通式为 $\text{M}^{n+} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$,式中:M为碱金属和碱土金属阳离子^[4]。沸石易吸持单价阳离子,这是因为静电引力高的水化阳离子较难接近沸石中的阳离子M。沸石对单价离子的选择性也随离子水化半径的减小而增大,故沸石对 NH_4^+ 具有较高的选择性^[5]。由于沸石对 NH_4^+ 有较大的吸附作用,而 NH_4^+ 对菌体合成又有很大的影响,但沸石在发酵工业中的应用在国内尚未有报道。本实验通过在发酵培养基中添加不同浓度的人造沸石以及膨润土以控制菌体代谢产生的 NH_4^+ ,从而达到提高菌体合成与分泌淀粉酶能力的目的。

1 材料与方法

收稿日期:2009-01-06 *通讯联系人

作者简介:李志鹏(1984-),男,硕士研究生,研究方向:微生物发酵。

characterization of a *Pseudomonas* strain capable of metabolizing phenoxybenzoates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(5): 1294-1300.

[5] 王兆守,刘丽花,陈小兰,等.拟除虫菊酯类农药降解菌及降解酶的研究概况[J].微生物学通报,2008,35(5):825-829.

[6] 林淦,姚威.阴沟肠杆菌w-1粗酶液对氯氟氰菊酯的降解效果及其作用机理[J].江苏农业科学,2006(3):191-193.

[7] Myers R H, Montgomery D C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments [M]. New York: Wiley, 2002.