

研究论文

 α -氯丙酸脱卤酶发酵培养基的响应面法优化王能强¹, 吴坚平², 邹小明³, 王 普⁴, 杨立荣²⁽¹⁾ 湖南科技大学生命科学院, 湖南 湘潭 411201; ⁽²⁾ 浙江大学材化学院, 浙江 杭州 310027;⁽³⁾ 井冈山大学生命科学院, 江西 吉安 343009; ⁽⁴⁾ 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 通过 Plackett-Burman 设计和响应面分析方法对 *Pseudomonas* W20 菌株产脱卤酶的培养基组成进行优化。得出影响产酶的 3 个重要的培养基成分为: 尿素、葡萄糖和 KH_2PO_4 , 且其最适浓度分别为 1.19 、 $18.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此时脱卤酶活力达到了 $10.57 \text{ U} \cdot (\text{g 干菌体})^{-1}$, 比优化前提高了 23.77% 。

关键词: α -氯丙酸; 脱卤酶; Plackett-Burman 设计; 响应面

中图分类号: Q 93.9; TQ 92

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 01-0176-05

Optimization of fermentation conditions for α -chloropropionic acid dehalogenases production based on response surface analysis

WANG Nengqiang¹, WU Jianping², ZOU Xiaoming³, WANG Pu⁴, YANG Lirong²⁽¹⁾ School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, Hunan, China;⁽²⁾ School of Material Science & Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China;⁽³⁾ School of Life Science, Jinggangshan University, Ji'an 343009, Jiangxi, China;⁽⁴⁾ School of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China)

Abstract: Two level factorials designs of Plackett-Burman were constructed to select the *Pseudomonas* W20 fermentation medium components of α -chloropropionic acid dehalogenases. Three important components were urea, glucose and KH_2PO_4 . The optimized levels of these factors were determined by the response surface analysis. The results showed that the optimum concentrations of urea, glucose and KH_2PO_4 were $1.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $18.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The enzyme activity increased by 23.77% under the optimized condition.

Key words: α -CPA; dehalogenase; Plackett-Burman design; response surface

引 言

α -氯丙酸 (α -CPA) 是合成多种除草剂的重要中间体, 如新燕灵、茅草枯等。 α -CPA 具有光学活性, 只有以 (S)- α -CPA 合成的产品才具有较高的生理活性或药理作用, 而传统制备工艺都是以 α -CPA 消旋体来生产的。使用时, 不仅活性较低,

而且会加剧环境污染, 所以开发一种高效拆分 α -CPA 消旋体的方法很有必要。尽管通过酯的不对称水解、光学活性胺或其他手性前体经催化反应等方法可生产 (S)- α -CPA, 但需要使用昂贵的试剂, 合成步骤多, 所得产物的光学纯度不高、得率低, 不适于工业生产。利用微生物产生的专一性脱卤酶, 将 (R)- α -CPA 转化为乳酸, 而 (S)- α -CPA

保留下来，可实现从 α -CPA 消旋体生产光学纯 (S)- α -CPA^[1-2]。

利用脱卤酶的立体选择性进行 α -CPA 消旋体拆分，获得纯 (S)- α -CPA，国外已有一些涉及机理和应用方面的研究^[3-4]，但生产工艺研究较少，自 Taylor 等^[1]报道以来，国内外还未见有新的报道。本文对实验室保藏的对 α -CPA 有高效脱卤能力的微生物菌株 *Pseudomonas* W20 发酵生产脱卤酶的条件进行研究，为 (S)- α -CPA 生产打下基础，填补国内在这方面研究的空白。

1 实验材料与方法

1.1 菌株

Pseudomonas W20 菌株，本实验室保存。

1.2 培养基

斜面培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0。

种子培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.2, KH_2PO_4 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, MgSO_4 0.098, 适量微量元素液和维生素液, pH7.5。培养基经湿热灭菌后加入微孔膜过滤的 α -CPA 钠盐, 其终浓度为 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。微量元素液 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, H_3BO_3 0.003, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04; 维生素液 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): 生物素 2.7, 叶酸 2.3, 烟酸 5.8, 核黄素 5.5, 泛酸 5.0, 对氨基苯甲酸 5.9, 维生素 B₆ 10.0。

发酵培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 20.0, 尿素 1.0, 酵母膏 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.2,

KH_2PO_4 1.5, 无水 MgSO_4 0.098, 微量元素液 $10.0 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$, 维生素液 $5.0 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 培养方法

斜面培养: 从原斜面上用接种环挑取 1 环接种到新鲜斜面上, 30℃ 培养 48 h。

种子培养: 从斜面上挑取 1 环于种子培养基中, 30℃, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 48 h。

发酵培养: 按 5% 接种量移取种子培养液于发酵培养基中, 30℃, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 48 h。

1.4 细胞破碎及粗酶提取

菌体培养 48 h 后离心收集细胞 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min)。将收集到的细胞用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液洗两次。20 kHz 超声破碎 10 min, 离心, 所得上清液即为粗酶液^[5]。

1.5 菌体生长量的测定

比浊法和重量法测定。

1.6 酶活力测定

取一定量粗酶液于 50 ml 的三角瓶中, 添加终浓度为 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -CPA, 置于 30℃、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中反应, 在底物转化率小于 5% 范围内测定反应液中氯离子浓度。氯离子的测定采用硝酸汞滴定法^[6]。酶活定义为每分钟产生 $1 \mu\text{mol}$ 氯离子所需的酶量为一个活力单位 (U)。

2 实验结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 实验

实验采用 $N=12$ Plackett-Burman 实验设计对影响产脱卤酶的 8 个因素进行了研究, 其实验设计与结果见表 1, 各因素的水平与分析结果见表 2。

表 1 Plackett-Buman 实验设计和响应值
Table 1 Plackett-Burman experiment design and its response

Run	Experimental parameter								Enzymatic activity Y /U · (g dry cells) ⁻¹
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	7.24
2	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	2.74
3	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	2.35
4	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	5.06
5	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2.62
6	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	9.30
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.57
8	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	8.57
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	4.97
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	3.17
11	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4.12
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	9.56

表 2 各因素的主要效应
Table 2 Main effect of factors

	Experimental parameter	Level		T- test	Probability of> T	Prominence
		−1	+1			
X ₁	glucose/g · L ^{−1}	15. 0	25. 0	2. 887449	0. 063144	3
X ₂	urea/g · L ^{−1}	0. 5	1. 5	6. 072672	0. 008964	1
X ₃	yeast extract/g · L ^{−1}	0. 2	0. 8	0. 697084	0. 535913	7
X ₄	KH ₂ PO ₄ /g · L ^{−1}	1. 0	2. 0	4. 747648	0. 017729	2
X ₅	Na ₂ HPO ₄ /g · L ^{−1}	2. 0	4. 4	−0. 8679	0. 449304	6
X ₆	MgSO ₄ /g · L ^{−1}	0. 05	0. 15	0. 057698	0. 957617	8
X ₇	vitamin solution/ml · L ^{−1}	2. 0	8. 0	2. 537056	0. 084898	4
X ₈	trace element solution/ml · L ^{−1}	5. 0	15. 0	2. 113423	0. 12496	5

由表 2 的分析结果可知, 在实验的 8 个因素中, 葡萄糖、尿素和 KH₂PO₄ 对产酶的影响比较显著, 可考虑作为主要因素进行下一步实验。

2.2 响应面分析实验设计筛选重要因素的最优浓度水平

2.2.1 响应面分析实验 由 Plackett-Burman 实验分析结果知葡萄糖 (X₁)、尿素 (X₂) 及 KH₂PO₄ (X₄) 等 3 个因素对产酶的影响比较显著。因此, 本实验通过二次回归的旋转中心结合设计, 对这 3 个显著因素进行寻优, 以脱卤酶活力 [U · (g 干菌体)^{−1}, 下同] 为响应值, 对应于因变量 Y。实验设计及实验结果见表 3 和表 4。葡萄糖的浓度 ξ_1 对应于自变量 X₁; 尿素的浓度 ξ_2 对应于自变量 X₂; KH₂PO₄ 的浓度 ξ_3 对应于自变量 X₄。

表 3 响应面三因素五水平实验设计
Table 3 Experiment design of 3 factors and 5 levels of response surface method

Factor	Symbol		Level ^①				
	Coded	uncoded	−1. 68	−1	0	1	1. 68
glucose/g · L ^{−1}	X ₁	ξ_1	11. 6	15. 0	20. 0	25. 0	28. 4
urea/g · L ^{−1}	X ₂	ξ_2	0. 5	0. 7	1. 0	1. 3	1. 5
KH ₂ PO ₄ /g · L ^{−1}	X ₄	ξ_3	1. 0	1. 2	1. 5	1. 8	2. 0

① X₁ = (ξ_1 − 20) / 5; X₂ = (ξ_2 − 1. 0) / 0. 298; X₄ = (ξ_3 − 1. 5) / 0. 298.

2.2.2 二次回归拟合及方差分析 根据表 4 的实验结果, 采用逐步回归的方法进行回归分析得到回归方程式为

$$Y = 8.52 - 1.41X_1 + 1.39X_2 + 0.12X_4 - 1.12X_1^2 - 1.04X_2^2 + 0.11X_4^2 + 0.48X_1X_2 - 0.57X_1X_4 - 0.24X_2X_4$$

所拟合的全变量二次回归方程的标准差 S =

0. 9135, 决定系数 $R^2 = 0. 9159$, 说明回归方程的拟合程度较好。由表 5 方差分析可知, 回归模型的 F 检验极显著, 说明所拟合的二次回归方程合适。

表 4 响应面分析实验设计及结果
Table 4 Experiment design and results of response surface method

Run	Glucose X ₁	Urea X ₂	KH ₂ PO ₄ X ₄	Enzymatic activity Y /U · (g dry cells) ^{−1}
1	1	1	1	5. 38
2	1	1	−1	7. 76
3	1	−1	1	2. 79
4	1	−1	−1	3. 11
5	−1	1	1	9. 98
6	−1	1	−1	8. 98
7	−1	−1	1	8. 23
8	−1	−1	−1	7. 35
9	−1. 68	0	0	6. 12
10	1. 68	0	0	3. 88
11	0	−1. 68	0	2. 74
12	0	1. 68	0	7. 71
13	0	0	−1. 68	7. 76
14	0	0	1. 68	9. 21
15	0	0	0	8. 21
16	0	0	0	8. 52
17	0	0	0	8. 48
18	0	0	0	8. 59
19	0	0	0	8. 87
20	0	0	0	8. 54

由响应面回归分析和回归方程拟合可以绘出响应面图形, 见图 1~图 3。

表 5 方差分析表
Table 5 Analysis of mean square deviation

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	P-value
X_1	505.9753	1	505.9753	606.34324	0.00000
X_2	490.9255	1	490.9255	588.30814	0.00000
X_4	3.5708	1	3.5708	4.27917	0.06544
X_1^2	338.3886	1	338.3886	405.51313	0.00000
X_2^2	292.1517	1	292.1517	350.10441	0.00000
X_4^2	3.1865	1	3.1865	3.81861	0.07920
X_1X_2	34.6678	1	34.6678	41.54473	0.00007
X_1X_4	48.8071	1	48.8071	58.48874	0.00002
X_2X_4	8.7570	1	8.7570	10.49409	0.00888
regression	90.8892	9	10.0988	$F_2=12.102$	0.00045
residual	8.3447	10	0.8345		
lack of fit	8.1206	5	1.6241	$F_1=36.228$	0.00000
error	0.2241	5	0.0448		
sum	99.2339	19			

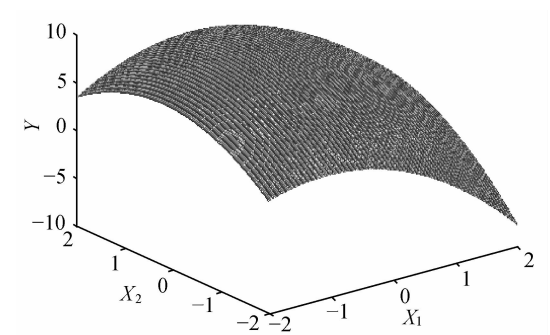


图 1 $Y=f(X_1, X_2)$ 响应面分析图 ($X_4=0$)
Fig. 1 $Y=f(X_1, X_2)$ response surface stereogram

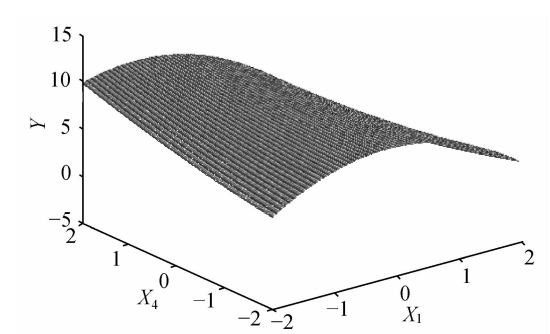


图 2 $Y=f(X_1, X_4)$ 响应面分析图 ($X_2=0$)
Fig. 2 $Y=f(X_1, X_4)$ response surface stereogram

由图可知，葡萄糖与尿素对酶活力的影响较大。随着葡萄糖浓度的增加，脱卤酶活力先增大后减小，尿素对酶活力的影响与葡萄糖的相似。图 1 说明葡萄糖与尿素对酶活力的影响呈正相关性，随着浓度的增大，脱卤酶活力先增大后减小。

2.2.3 优化最佳条件的获取 为了确证各因素的最佳点，对已回归的非线性模型方程求一阶偏导，

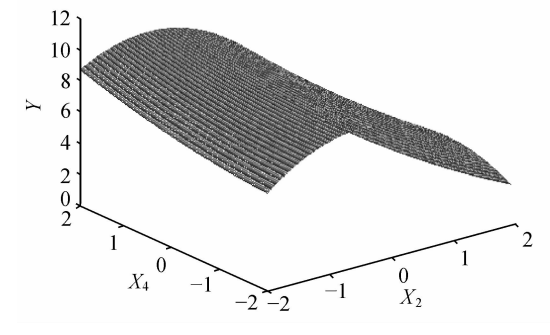


图 3 $Y=f(X_2, X_4)$ 响应面分析图 ($X_1=0$)
Fig. 3 $Y=f(X_2, X_4)$ response surface stereogram

并令其等于零，可以得到曲面的最大点，求导方程整理得

$$\begin{cases} -1.41 - 2.24X_1 + 0.48X_2 - 0.57X_4 = 0 \\ 1.39 - 2.08X_2 + 0.48X_1 - 0.24X_4 = 0 \\ 0.12 + 0.22X_1 - 0.57X_1 - 0.24X_2 = 0 \end{cases}$$

在回归方程中，求解得 $X_1 = -0.32$ ； $X_2 = 0.64$ ； $X_4 = -0.68$ 。最后求得葡萄糖、尿素、 KH_2PO_4 的最适浓度分别为： $\xi_1 = 18.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $\xi_2 = 1.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\xi_3 = 1.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 方程的验证 由于以上最佳条件未包括在响应面优化的 20 个实验中，需进一步确认计算结果。因此实验中按响应面法优化的结果配制培养基，即葡萄糖、尿素和 KH_2PO_4 的浓度分别为 $18.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，在 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下发酵产酶 48 h，然后测定酶活，同时将未优化之前实验条件的结果作为对照，发现脱卤酶的酶活力提高了 23.77%，由原来的 $8.54 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $10.57 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 结 论

(1) 通过 Plackett-Burman 实验发现, 在 α -氯丙酸脱卤酶发酵过程中发酵培养基的 8 个因素对产酶的影响显著性顺序为: 尿素 $>$ KH_2PO_4 $>$ 葡萄糖 $>$ 维生素液 $>$ 微量元素液 $>$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $>$ 酵母抽提物 $>$ MgSO_4 。

(2) 通过二次回归的旋转中心结合设计对影响产酶显著的 3 个因素: 葡萄糖、尿素、 KH_2PO_4 进行了进一步优化, 采用响应面方法对实验结果进行分析, 得出葡萄糖、尿素、 KH_2PO_4 的最适浓度分别为: $18.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 此时脱卤酶活力达到了 $10.57 \text{ U} \cdot (\text{g 干菌体})^{-1}$, 比优化前提高了 23.77%。

References

- [1] Taylor S C. S-2-Chloropropionic acid by biotransformation// Opportunities in Biotransformations. New York: Society of

Chemical Industry, 1990: 170-176

- [2] Faber K. Biotransformations in Organic Chemistry. 3rd ed. Berlin: Springer, 1997: 293-297
- [3] Little M, Wiliams P A. A bacterial halohydrase: its purification, some properties and its modification by specific amino acid reagents. *Eur. J. Biochem.*, 1971, **21**: 99-109
- [4] Weightman A J, Weightman A L, Sister J H. Stereospecificity of 2-monochloropropionate dehalogenation by the two dehalogenases of *Pseudomonas putida* PP3: evidence for two diferent dehalogenation mechanisms. *J. Gen. Microbiol.*, 1982, **128**: 1755-1762
- [5] Vyazmensky M, Geresh S. Substrate specificity and product stereochemistry in the dehalogenation of 2-haloacids with the crude enzyme preparation from *Pseudomonas putida*. *Enzyme and Microbial. Tech.*, 1998, **22** (5): 323-328
- [6] State Environmental Protection Administration of China, the Examination Write Committee of Water and Waste Water. Analytical Methods for the Examination of Water and Waste Water. 3rd ed. Beijing: China Environmental Science and Technology Press, 1989: 290-292