

海藻糖合成酶基因工程菌玉米浆培养基配方优化

Optimization of corn steep liquor medium for trehalose synthase gene engineering bacteria by response surface methodology

姜博¹ 谢定¹ 郑瑞娜¹ 杨倩园¹ 谢艳萍² 盛敏²

JIANG Bo¹ XIE Ding¹ ZHENG Rui-na¹ YANG Qian-yuan¹ XIE Yan-ping² SHENG Ming²

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114; 2. 湖南汇升生物科技有限公司, 湖南耒阳 421800)

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Huisheng Bio-Technology Co. Ltd, Leiyang, Hunan 421800, China)

摘要:以玉米浆作为重组大肠杆菌培养基的主要碳源和氮源,在单因素优化的基础上,选择玉米浆、MgSO₄和微量元素 3 个因素对玉米浆培养基进行响应面设计,采用 Box-Behnken 试验设计和响应面分析法,确定基因工程菌最佳的玉米浆培养基配方。结果表明,最佳的玉米浆培养基配方为:玉米浆 26 g/L, MgSO₄ 2.1 g/L, 微量元素 7 mL/L。该条件下,重组大肠杆菌产海藻糖合成酶活达到 120.5 U/mL。试验证明了玉米浆作为重组大肠杆菌培养基唯一的碳源和氮源生产海藻糖合成酶的可行性。

关键词:玉米浆;海藻糖合成酶;重组大肠杆菌;培养基

Abstract: Corn steep liquor was used as the sole carbon and nitrogen source for recombinant *E. coli* culture medium. Based on the single factor optimization, three factors of corn steep liquor, MgSO₄ and trace elements were chosen to design the response surface of corn steep liquor medium components. With Box-Behnken experimental design and response surface analysis, the optimum components of corn steep liquor medium were determined. The results showed that the optimum medium components were 26 g/L for corn steep liquor, 2.1 g/L for MgSO₄ and 7 mL/L for trace elements. Under these conditions, the activity of trehalose synthase produced by recombinant *E. coli* reached 120.5 U/mL. The experiment proved that this medium is feasible, in which corn steep liquor was the sole carbon and nitrogen source of trehalose synthase.

Keywords: corn steep liquor; trehalose synthase; recombinant *E. coli*; medium

海藻糖是由两分子葡萄糖通过 $\alpha, \alpha-1, 1$ 糖苷键构成的一种非还原性二糖^[1]。化学性质非常稳定,高温下不会发生美拉德褐变^[2]。不仅如此,海藻糖在生物体内既可以作为结构成分,又能提供能量,是良好的应激代谢产物,以其优良的抗逆保护作用而备受瞩目^[3-4]。

海藻糖的生产方法有天然生物提取法、微生物发酵法、化学合成法、转基因法和酶转化法 5 大类^[5]。其中酶转化法合成海藻糖以淀粉、葡萄糖或麦芽糖等碳水化合物为底物,能有效降低生产成本,易于工业化生产而被广泛关注。

利用重组大肠杆菌生产海藻糖合成酶,培养基的配方是影响成本的关键因素。目前,海藻糖合成酶基因工程菌多用酵母粉、甘油作为氮源,而工业级的酵母浸粉平均价格在 4 万/t,成本较高。中国玉米种植面积排世界第二,玉米淀粉是玉米深加工的主要产品^[6]。玉米浸泡水的量约是淀粉生产量的 1.5 倍,玉米浆就是将玉米浸泡水浓缩到固形物含量在 50%~70%的产物,是玉米淀粉加工过程中的副产物^[7]。中国玉米淀粉年产量约 1 200 万 t^[8]。目前玉米浆的市场价格在 1 000~3 000 元/t,成本低廉,来源广泛^[9]。玉米浆中含有较多的蛋白质、氨基酸、无机盐和糖类等,营养丰富,已有青霉素的大规模生产用玉米浆作为培养基的报道^[10],但尚未见其用于海藻糖合成酶相关菌发酵培养的报道。

本研究以玉米浆为培养基的主要成分,通过单因素试验和响应面试验对海藻糖合成酶基因工程菌玉米浆培养基进行优化研究,尝试用廉价的玉米浆替代酵母粉、甘油等成本较高的培养基成分进行海藻糖合成酶生产,旨在为工业化生产提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种

海藻糖合成酶基因工程菌 pET28(+)-BL21(DE3):由

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:2015JJ2010);衡阳市创新创业人才团队计划(编号:2016)

作者简介:姜博,男,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:谢定(1962-),男,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: cslg5148495@126.com

收稿日期:2016-09-24

本实验室构建和保藏;

Top10 质粒:含有灰色链霉菌海藻糖合成酶基因,长沙金斯瑞生物公司。

1.1.2 原料和培养基

玉米浆(干):总氮含量 5.3%,华北制药康欣有限公司;

种子培养基(LB培养基):胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、葡萄糖 1 g/L、酵母粉 5 g/L, pH=7.0;

玉米浆发酵培养基:玉米浆 25 g/L、MgSO₄ 2.0 g/L、微量元素 6.0 mL/L;

微量元素:FeSO₄ · 7H₂O 10 g/L、CuSO₄ · 5H₂O 1.0 g/L、MnSO₄ · 4H₂O 0.5 g/L、ZnSO₄ · 7H₂O 2.25 g/L、Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.23 g/L、CaCl₂ 2 g/L、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.1 g/L 用 5 mol/L 浓盐酸溶解并储存于棕色试剂瓶中;

胰蛋白胨、酵母粉:生化试剂,广东环凯微生物科技有限公司;

其他化学试剂均为国药分析纯。

1.1.3 主要仪器和设备

超声波细胞粉碎机:SCIENTZ-II D型,宁波新芝生物科技有限公司;

高效液相色谱仪:LC-20AD型(RID-20A示差折光检测器),岛津制作所;

电子天平:FA1004型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备 冷冻保藏的菌种经斜面活化后接入 50 mL(含有终浓度为 50 mmol/L 的卡拉霉素)的种子培养基中,37 °C,200 r/min 震荡培养 12 h,然后按 5%的接种量接入 100 mL(含有终浓度为 50 mmol/L 的卡拉霉素)的玉米浆培养基中,继续震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的乳糖作为诱导剂,在 25 °C,200 r/min 诱导 20 h。取发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,用 pH=7.5 的磷酸缓冲液洗涤两次后重悬,冰浴超声,超声工作条件:功率 300 W,工作 3 s,间隔 5 s,时间 30 min。超声破碎后 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为粗酶液。

1.2.2 酶活测定方法 粗酶液按体积比 1:20 加入到 10% 用 pH=7.5 磷酸缓冲液配制的麦芽糖溶液中,35 °C 反应 30 min 后沸水浴灭酶 5 min,离心取上清液用 HPLC 法检测海藻糖含量。

酶活力单位定义:上述反应条件下每分钟生成 1 μmol 海藻糖所需的酶量定义为 1 U。

色谱条件:氨基柱(Agela Innoval NH₂, 5 μm, 4.6 × 250 mm);流动相:乙腈/水=80/20(体积比);流速:1.0 mL/min;检测器:视差折光检测器;进样量:10 μL;检测池温度:35 °C。

1.2.3 玉米浆发酵培养基的优化

(1) 玉米浆浓度对海藻糖合成酶酶活的影响:在培养基其他条件不变的情况下设置不同的玉米浆浓度(5,10,15,20,25,30 g/L)37 °C,200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 后加

入乳糖诱导剂 25 °C,200 r/min 诱导 20 h 制得粗酶液,然后测定酶活力。

(2) MgSO₄ 浓度对海藻糖合成酶酶活的影响:在培养基其他条件不变的情况下设置不同的 MgSO₄ 浓度梯度(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 g/L)37 °C,200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 后加入乳糖诱导剂 25 °C,200 r/min 诱导 20 h 制得粗酶液,然后测定酶活力。

(3) 微量元素浓度对海藻糖合成酶酶活的影响:在培养基其他条件不变的情况下设置不同的微量元素浓度梯度(2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0 mL/L)37 °C,200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 后加入乳糖诱导剂 25 °C,200 r/min 诱导 20 h 制得粗酶液,然后测定酶活力。

(4) 响应面优化培养基:在单因素的基础上确定玉米浆、MgSO₄ 和微量元素的最佳浓度,然后通过响应面设计对最佳培养基成分进行优化以获得最佳配比。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

由图 1~3 可知,海藻糖合成酶酶活最高的培养基单因素组成和浓度为玉米浆 25 g/L、MgSO₄ 2.0 g/L、微量元素 6.0 mL/L。

2.2 响应面优化玉米浆培养基

在单因素的基础上根据 Box-Behnken 设计原理,以海藻糖合成酶酶活为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计三因素三水平试验,共有 15 个试验点,其中析因点有 12 个,零点有 3 个以估计误差。因素水平见表 1,试验设计方案与响应值结果见表 2。

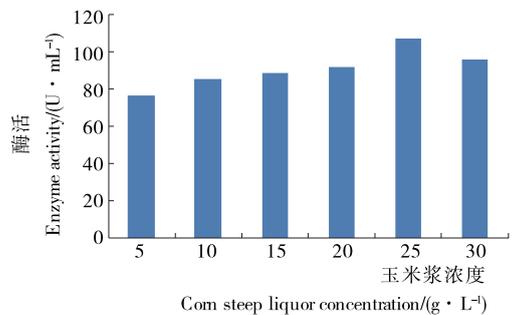


图 1 玉米浆浓度对海藻糖合成酶酶活的影响
Figure 1 Effects of corn steep liquor concentrations on trehalose synthase activity

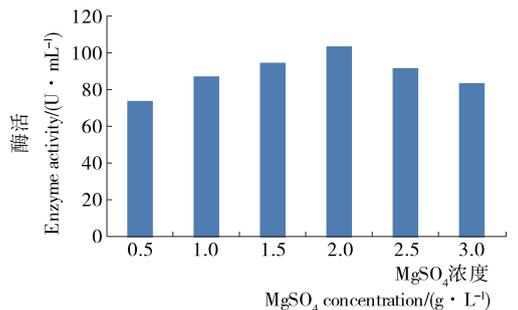


图 2 MgSO₄ 浓度对海藻糖合成酶酶活的影响
Figure 2 Effects of MgSO₄ concentrations on trehalose synthase activity

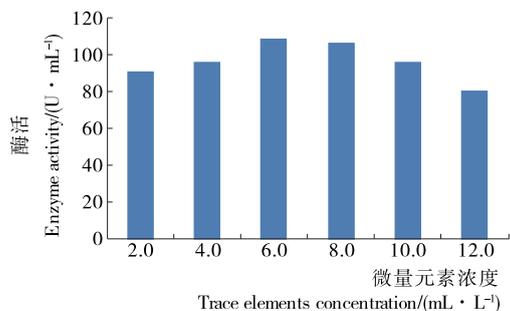


图 3 微量元素浓度对海藻糖合成酶活的影响

Figure 3 Effects of trace elements concentrations on trehalose synthase activity

表 1 Box-Behnken 因素水平

Table 1 Box-Behnken factors and levels

水平	A 玉米浆/ (g · L ⁻¹)	B MgSO ₄ / (g · L ⁻¹)	C 微量元素/ (mL · L ⁻¹)
-1	20	1.5	4.0
0	25	2.0	6.0
1	30	2.5	8.0

表 2 Box-Behnken 设计方案及响应值结果

Table 2 Box-Behnken design and response results

试验编号	A	B	C	酶活/(U · mL ⁻¹)
1	0	0	0	121.3
2	1	0	1	110.6
3	-1	0	1	104.8
4	0	0	0	118.4
5	0	1	-1	103.1
6	-1	1	0	92.9
7	-1	-1	0	77.6
8	0	-1	1	96.8
9	0	1	1	107.2
10	0	0	0	120.3
11	0	-1	-1	87.8
12	1	1	0	100.1
13	1	0	-1	105.6
14	-1	0	-1	95.5
15	1	-1	0	95.1

2.2.1 响应面方差分析 利用 Design-Expert 8.0.6 对试验结果进行二次多元回归拟合,对表 2 中的数据进行方差分析后得到模型的二次多项回归方程为:

$$Y=120.00+5.07A+5.75B+3.43C-2.57AB-1.08AC-1.22BC-11.59A^2-16.99B^2-4.29C^2。(1)$$

对此模型进行方差分析见表 3。

由表 3 可知,模型的 P 值为 0.000 1<0.01,而失拟项 P=0.341 6>0.05,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占的比例小,表明响应值 Y 与回归方程的关系是极显著的。从表 3 中还可以看出在此模型中 A、B、C、AB、A²、B²、C² 均显著,AC、BC 不显著。

表 3 回归模型方差分析[†]

Table 3 Analysis of Variance in Regression Model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2 078.46	9	230.94	64.71	0.000 1	**
A	206.04	1	206.04	57.73	0.000 6	**
B	264.50	1	264.50	74.11	0.000 3	**
C	93.85	1	93.85	26.29	0.003 7	**
AB	26.52	1	26.52	7.43	0.041 5	*
AC	4.62	1	4.62	1.30	0.306 7	—
BC	6.00	1	6.00	1.68	0.251 3	—
A ²	495.77	1	495.77	138.91	<0.000 1	**
B ²	1 065.51	1	1 065.51	298.55	<0.000 1	**
C ²	67.87	1	67.87	19.02	0.007 3	**
残差	17.84	5	3.57			
失拟项	13.50	3	4.50	2.07	0.341 6	
纯误差	4.34	2	2.17			
总变异	2 096.31	14				

[†] ** 表示差异极显著, P<0.01; * 表示差异显著, P<0.05; — 表示差异不显著, P>0.05。

2.2.2 回归模型的优化 交互项 AC 和 BC 对响应值的影响不显著,因此对回归模型进行手动优化,优化结果见表 4。

经手动优化后的回归方程为:

$$Y=120.00+5.07A+5.75B+3.43C-2.57AB-11.59A^2-16.99B^2-4.29C^2。(2)$$

由表 4 可知,失拟项不显著(P=0.338 7>0.05),而模型的 P 值<0.000 1,表明模型高度显著;同时软件的复相关系数 R 的 R²=0.986 4,校正后的 R²(adj)=0.972 8,这表明该模型拟合程度良好,试验误差小,该模型可以对发酵产海藻糖合成酶进行分析和预测;从上面的结果可以看到,玉米浆、MgSO₄ 和微量元素均是生产海藻糖合成酶的关键因素,其中玉米浆和 MgSO₄ 有较大程度的相互作用,在所选因素水平

表 4 去掉交互项 AC 和 BC 后的优化结果[†]

Table 4 Optimization results after removal of AC and BC

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2 067.84	7	295.41	72.63	<0.000 1	**
A	206.04	1	206.04	50.66	0.000 2	**
B	264.50	1	264.50	65.03	<0.000 1	**
C	93.85	1	93.85	23.07	0.002 0	**
AB	26.52	1	26.52	6.52	0.037 9	*
A ²	495.77	1	495.77	121.90	<0.000 1	**
B ²	1 065.51	1	1 065.51	261.98	<0.000 1	**
C ²	67.87	1	67.87	16.69	0.004 7	**
残差	28.47	7	4.07			
失拟项	24.13	5	4.83	2.22	0.338 7	
纯误差	4.34	2	2.17			
总变异	2 096.31	14				

[†] ** 表示差异极显著, P<0.01; * 表示差异显著, P<0.05。

范围内,各因素对酶活影响的主次顺序为: $MgSO_4 >$ 玉米浆 $>$ 微量元素。

图4为AB因素的三维响应曲面图和等高线图。由图4可知,在微量元素一定时,酶活随着玉米浆和 $MgSO_4$ 浓度的增加都是先增后减,可以看出玉米浆和 $MgSO_4$ 的交互作用比较显著,这与表4的结果一致。从AB两因素的响应面等高线图可知,最大椭圆表示在该圆上取值,酶活最低,产量最小;而最小椭圆取值,酶活最高,产量最大。大小椭圆之间酶活逐渐递进。

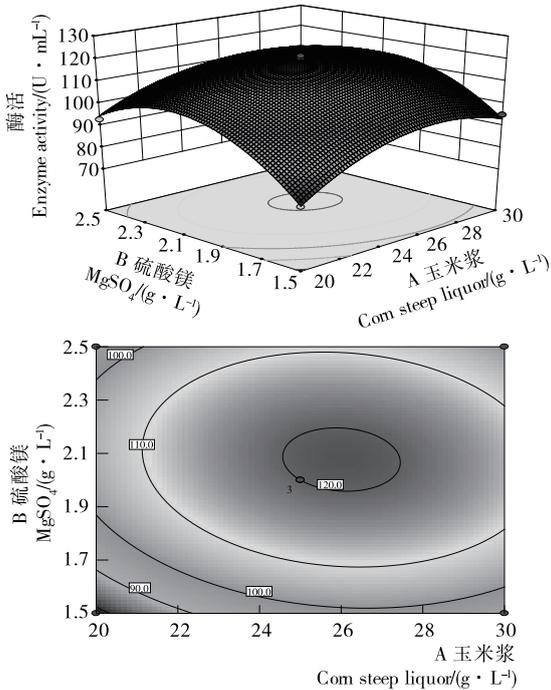


图4 玉米浆和 $MgSO_4$ 对海藻糖合成酶活的影响
Figure 4 Effects of corn steep liquor and $MgSO_4$ on trehalose synthase activity

2.2.3 最佳条件的预测和验证 通过 Design-Expert 8.0.6 软件对经手动优化的二次回归方程求解。响应值 Y 物理意义是海藻糖合成酶酶活,因而优化标准设置为最大值,同时设置上限(响应值的上限设置为不可能达到的数值用来确定最佳响应值点,此次试验响应值最大上限设为 200(200 近似为麦芽糖完全转化为海藻糖的理论极限酶活),得到最优培养基配方只有一种:玉米浆 26.01 g/L, $MgSO_4$ 2.08 g/L, 微量元素 6.80 mL/L。预测酶活达到 121.6 U/mL。考虑到实际操作的可行性,对配方进行取整验证,玉米浆 26 g/L, $MgSO_4$ 2.1 g/L,微量元素 7 mL/L 在此条件下进行 3 次验证性实验,测得海藻糖合成酶酶活平均值为 120.5 U/mL,与理论值基本吻合,因此该模型可以较好地预测实际培养情况。

3 结论

试验证明,Box-Behnken 设计法能有效地筛选出重要影响因素并实现条件优化。经上述方法优化,产海藻糖合成酶的玉米浆培养基配方为:玉米浆 26 g/L, $MgSO_4$ 2.1 g/L,微量元素 7 mL/L。用最佳培养基配方培养重组大肠杆菌产海藻糖合成酶酶活力为 120.5 U/mL,与响应面分析值接近。

由此可见,使用玉米浆作为重组大肠杆菌产海藻糖合成酶的培养基唯一碳源和氮源是可行的,而且玉米浆成本低廉,这就为使用玉米浆培养基进行大规模发酵提供了依据。

参考文献

- [1] 李镭,丁宏标,余晓斌,等.海藻糖酶法合成途径及其酶基因的重组表达研究[J].生物技术通报,2007(3):80-83.
- [2] OHTAKE Satoshi, WANG Y John. Trehalose: current use and future applications[J]. Pharm Sci, 2011, 100: 2 020-2 053.
- [3] ELBEIN A D, PAN Tian-yuan, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule [J]. Glycobiology, 2003, 13: 17R-27R.
- [4] 宋晓丽,石东升,温佳文,等.海藻糖的生物合成途径及其生物学功能[J].食品与发酵工业,2013,39(8):167-171.
- [5] 刘建龙,王瑞明,杨连生.海藻糖的生产方法[J].现代工业,2005,25(1):23-25.
- [6] 佚名.2013/14年度世界玉米供需(美国农业部月度预测)[J].农业展望,2014(1):7.
- [7] 尤新.玉米的综合利用及深加工[J].北京:中国轻工业出版社,1995:90-93.
- [8] 华渤文.产琥珀酸大肠杆菌工程菌的构建及其发酵研究[D].武汉:湖北工业大学,2014:47.
- [9] 李坤朋,许雅洁,赵锦芳,等.大肠杆菌利用玉米浆发酵产L-乳酸的研究[J].中国酿造,2012,31(12):64-67.
- [10] 任晓冬.重组嗜热酯酶工程菌的发酵工程研究[D].长春:吉林大学,2005:57.

(上接第92页)

参考文献

- [1] 杜春宽.弓形夹的改进设计及等强度设计[J].煤炭技术,2015,34(2):233-235.
- [2] 张建中,李坤,张树君,等.可移动切断机的设计与仿真[J].食品与机械,2011,27(5):131-133.
- [3] 陶义,王宗彦,吴淑芬,等.基于TRIZ矛盾分析法重型卡车弹簧车架轻量化设计研究[J].机械设计与制造,2015(3):188-191.
- [4] CONG H, TONG L H. Grouping of TRIZ Inventive Principles to facilitate automatic patent classification[J]. Expert Systems with Applications, 2008, 34(1): 788-795.
- [5] 候磊,芮延年,朱兴满.基于TRIZ理论的干燥过滤器夹紧装置结构优化设计[J].机械设计与制造,2011(7):240-242.
- [6] 李正峰,王吴光,陈玉梅.基于TRIZ理论的锤式破碎机新型锤头研究[J].矿山机械,2015,43(12):87-89,91.
- [7] 杜春宽.一种新型弓形夹:中国,CN201420873822[P].2014-12-30.
- [8] 李正峰,杜春宽,王新琴.基于TRIZ理论的套筒联轴器改进设计[J].机械传动,2016(3):85-87.
- [9] 马军,彭博,路迪,等.高空作业车工作装置整体性能有限元优化设计研究[J].机械设计,2015,32(6):56-60.
- [10] CHANDRA SAKARA N, HAISLER W E. Finite element analysis of hertz contact program fiction[J]. finite elements in analysis and design, 2003, 41(2): 117-127.