

响应面法优化重组枯草芽孢杆菌发酵生产青霉素 G 酰化酶

仇晶晶, 陈 玮, 丁 明, 张漫莉, 赵辅昆

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 利用响应面法优化重组枯草芽孢杆菌 pAUB-BmPGA/BS168 发酵生产青霉素 G 酰化酶的条件。通过 Plackett-Burman 设计法对碳源、氮源、无机盐、温度等 19 个因素对发酵产青霉素 G 酰化酶的影响进行评价。筛选出发酵温度和酵母膏为影响产酶的显著因素。采用了中心组合设计实验对两种显著影响因素进行了优化, 应用响应面分析确定了显著因素的最佳水平。结果表明, 当温度为 34℃, 酵母膏为 8.8 g/L 时, 最终的酶活达到 28.2 U/mL, 比初始发酵条件提高了 1.19 倍。在最佳条件利用 15 L 的发酵罐对重组枯草芽孢杆菌进行扩大培养, 最终酶活可达 51.0 U/mL, 相对于摇瓶发酵又有大幅度的提高。

关键词: 青霉素 G 酰化酶; 枯草芽孢杆菌; 响应面; 发酵

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A

0 引 言

青霉素 G 酰化酶 (Penicillin G Acylase, EC 3.5.1.11, 简称 PGA) 是一类重要的医药工业用酶, 广泛应用于 β -内酰胺类抗生素生产领域。PGA 可以催化裂解青霉素 G 和头孢霉素 C 生产 6-氨基青霉烷酸 (6-amino penicillanic acid, 6-APA) 和 7-氨基头孢烷酸 (7-aminodeacetoxycephalosporanic acid, 7-ADCA)。PGA 还能够催化以上反应的逆反应, 即在酸性条件下催化 D-氨基酸类似物与 β -内酰胺母核 (如 6-APA, 7-ADCA) 缩合产生新型 β -内酰胺抗生素^[1-5]。

巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 来源的青霉素 G 酰化酶 (BmPGA) 是工业上广泛应用的一种酶制剂。利用枯草芽孢杆菌表达系统可以高效分泌表达 BmPGA, 提取工艺简单, 是大规模生产 BmPGA 的重要途径。已报道的 BmPGA 表达量可达 40.0 U/mL^[6-7]。响应面分析法 (response surface analysis, RSA) 可在多因素作用的生化过程中, 快速找出显著因素, 逼近最大响应区间, 拟合出数学模型方程, 并分析回归方程寻求最优工艺参数, 解决多

变量问题。RSA 是一种实用性强, 精度高的统计学方法, 被成功应用于科学研究的许多领域^[8-9]。

本文报道了利用响应面分析法优化分泌表达青霉素 G 酰化酶的重组枯草芽孢杆菌发酵产酶条件, 并且在最佳工艺条件下利用 15L 发酵罐对其重组菌进行扩大培养, 较大幅度地提高了青霉素 G 酰化酶的产量, 为进一步将该重组菌株应用于工业生产打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

分泌表达巨大芽孢杆菌来源青霉素 G 酰化酶的重组枯草芽孢杆菌 pAUB-BmPGA/BS168 由本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂

蛋白胨, 酵母膏, 可溶性淀粉 (南京化学试剂有限公司), NIPAB 为本实验室自制, 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基

种子培养基 (LB 培养基): 蛋白胨 10 g/L, 酵母

膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, 卡那霉素 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

初始发酵培养基: 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, NH_4Cl 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, 可溶性淀粉 20 g/L, 卡那霉素 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶培养

将菌种通过平板划线法接种至 LB 固体培养基, 培养 12 h, 挑取单克隆接种至 3 mL LB 培养基中培养 12 h 后接种至含 50 mL 发酵培养基的 250 mL 的锥形瓶中, 摇床 250 r/min, 37 $^\circ\text{C}$, 培养 36 h, 测定酶活力。

1.2.2 发酵罐培养

15 L 机械搅拌不锈钢发酵罐(镇江东方生物工程设备 2000 型)中装入 10 L 优化后的发酵培养基, 灭菌后, 按 2% 接种量接入种子液, 34.1 $^\circ\text{C}$ 连续培养, 通气量为 10 L/min, pH 为 7.0。

1.2.3 青霉素 G 酰化酶的酶活测定方法

NIPAB 法^[3]: 取 10 μL 酶稀释液加入 500 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 预热 15 min 的 NIPAB(2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸)溶液中, 37 $^\circ\text{C}$, 反应 4 min 后加入 500 μL , 95% 乙醇终止反应。测定 405 nm 光吸收值。以磷酸缓冲液代替酶液作为空白对照。酶活定义: 上述条件下 1 min 水解产生 1 μmol 的 NABA(6-硝基 3-氨基-苯甲酸)所需青霉素 G 酰化酶的量为一个酶活单位。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳

发酵上清液与 2 \times loading buffer 按 1:1 的比例混合, 沸水浴 5 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取 20 μL 上清液上样至 12% SDS-PAGE 胶, 80 V 电压进行浓缩, 120 V 电压进行分离。

1.2.5 Plackett-Burman 实验设计

根据文献报道和前期预实验结果, 采用 Plackett-Burman^[5-7] 两水平法对碳源、氮源、无机盐、温度等 19 个因素进行考察, 确定最佳配方, 其实验因素、水平如表 1。本阶段试验设计、数据分析和模型建立皆由 Minitab 15 软件辅助完成。

1.2.6 最陡爬坡实验

根据 Plackett-Burman 实验得出的一次拟合方程安排最陡爬坡实验^[8]。一次拟合方程中, 各变量的系数决定爬坡方向和变化步长, 如果系数为负, 则该因素水平应为递减, 反之为递增, 系数越大变化步越长。

表 1 Plackett-Burman 设计因素水平

因素	水平		
	-1	1	
X ₁	蛋白胨/(g/L)	15.00	20.00
X ₂	酵母膏/(g/L)	10.00	12.00
X ₃	淀粉/(g/L)	9.00	12.00
X ₄	空白	—	—
X ₅	KH_2PO_4 /(g/L)	0.90	1.20
X ₆	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	1.00	1.30
X ₇	NH_4Cl /(g/L)	4.00	6.00
X ₈	NaCl /(g/L)	4.00	6.00
X ₉	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.80	1.20
X ₁₀	CaCl_2 /(g/L)	0.10	0.13
X ₁₁	空白	—	—
X ₁₂	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.03	0.05
X ₁₃	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.01	0.02
X ₁₄	Li_2SO_4 /(g/L)	0.05	0.08
X ₁₅	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.03	0.05
X ₁₆	空白	—	—
X ₁₇	初始 pH	7.0	7.5
X ₁₈	温度/ $^\circ\text{C}$	35	40
X ₁₉	发酵时间/h	24	36
X ₂₀	摇床转速/(r/min)	220	250
X ₂₁	种子时间/h	4	6
X ₂₂	接种量/%	2	5

1.2.7 中心组合设计实验^[10]

以最陡爬坡实验得到的中心点, 进行中心组合设计实验, 每个因素取 5 个水平, 以(-1.41421, -1, 0, 1, 1.41421)编码实验。对 PB 试验确定的显著因素安排响应面分析试验^[4]。本阶段实验设计、数据分析和模型建立皆由 Design-expert 7.0 辅助完成。

1.2.8 实验验证

按照中心组合实验所确定的各因素的最优组合配制发酵培养基, 进行摇瓶实验, 重复做 3 次, 最终的实验结果取这三次实验的平均值, 验证模型的可靠性。

2 结果

2.1 Plackett-Burman 实验设计筛选显著因素

Plackett-Burman 实验方案和结果如表 2。用 Minitab 15 软件对试验数据进行分析, 得到各因素对响应值 Y(酶活力 U/mL)的影响效果, 如表 3。

表2 Plackett-Burman 实验设计与结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀	X ₂₁	X ₂₂	酶活/(U/mL)
1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	16.71
2	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	22.33
3	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	20.78
4	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	24.71
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	19.60
6	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	14.64
7	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	22.43
8	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	15.73
9	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	11.28
10	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	33.08
11	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	16.98
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	25.08
13	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	20.78
14	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	22.47
15	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	10.53
16	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	24.54
17	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	16.03
18	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	15.55
19	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	19.20
20	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	16.30
21	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	19.79
22	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	15.65
23	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	19.56
24	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	22.81

表3 实验设计结果分析

项	效应	系数	系数标准误差	T值	P值
因素		19.440	0.148	131.06	0.005
X ₁	2.615	1.308	0.148	8.81	0.072
X ₂	-4.830	-2.415	0.148	-16.28	0.039
X ₃	0.822	0.411	0.148	2.77	0.221
X ₄	-1.713	-0.857	0.148	-5.78	0.109
X ₅	0.957	0.478	0.148	3.22	0.191
X ₆	-0.237	-0.118	0.148	-0.80	0.571
X ₇	-0.635	-0.317	0.148	-2.14	0.278
X ₈	0.703	0.352	0.148	2.37	0.254
X ₉	1.118	0.559	0.148	3.77	0.165
X ₁₀	-0.252	-0.126	0.148	-0.85	0.552
X ₁₁	-0.255	-0.128	0.148	-0.86	0.548
X ₁₂	-0.728	-0.364	0.148	-2.46	0.246
X ₁₃	-0.660	-0.330	0.148	-2.22	0.269
X ₁₄	0.210	0.105	0.148	0.71	0.608
X ₁₅	-1.182	-0.591	0.148	-3.98	0.157
X ₁₆	-0.372	-0.186	0.148	-1.25	0.429
X ₁₇	1.397	0.698	0.148	4.71	0.133
X ₁₈	-5.728	-2.864	0.148	-19.31	0.033
X ₁₉	1.837	0.918	0.148	6.19	0.102
X ₂₀	0.685	0.342	0.148	2.31	0.260
X ₂₁	-1.970	-0.985	0.148	-6.64	0.095
X ₂₂	-3.358	-1.679	0.148	-11.32	0.056

 $R^2 = 0.9783$

从表3中可以看到 $P(X_2)$, $P(X_{18})$ 均小于 0.05, 说明, 这两个因素是显著影响因素, 并且 $R^2 = 0.9783$, 其表明该模型拟合较好。

2.2 最陡爬坡实验

最陡爬坡实验(steepest ascent design, SAD)是一种沿着响应面有最大或最小增量的方向逐步的移动, 以便寻找到各因素变化的最优的区域的方法。选取 Plackett-Burman 实验设计所确定的主要影响因素酵母膏和发酵温度, 按照实验值变化的梯度方向为爬坡方向, 各个因素变化步长依据因素效应值大小和正负确定。在本实验中, 其它的非显著因素都按照效应的正负取值, 正效应取高水平, 负效应取低水平。实验过程和结果如表4。

表4 最陡爬坡实验过程和结果

实验序号	酵母膏/(g/L)	温度/°C	酶活/(U/mL)
初始0	12	40	—
步长△	-1	-2	—
0	12	40	10.64
0+△	11	38	10.63
0+2△	10	36	22.42
0+3△	9	34	23.65
0+4△	8	32	22.14
0+5△	7	30	21.63

通过表 4 可以看出,青霉素 G 酰化酶的酶活在 $0+2\Delta$ 时有明显的上升,在 $0+3\Delta$ 能达到最高值,随后在 $0+4\Delta$ 酶活下降,这说明培养基的最佳组合在 $0+2\Delta$ 和 $0+4\Delta$ 之间。所以选取 $0+3\Delta$ 作为后面实验的中心点。

2.3 中心组合设计实验

依据 Plackett—Burman 实验设计和最陡爬坡实验所确定的显著影响因素以及最佳的取值范围,进行中心组合设计实验,实验中两个因素所取的范围见表 5,中心组合设计实验设计和结果见表 6。

表 5 中心组合设计实验因素与水平

因素	水平				
	-1.41421	-1	0	1	1.41421
酵母膏/(g/L)	7.586	8	9	10	10.414
温度/ $^{\circ}\text{C}$	31.2	32	34	36	36.8

表 6 中心组合设计实验设计和结果

实验序号	X_1 /(g/L)	X_2 / $^{\circ}\text{C}$	酶活/(U/mL)
1	1.414 214	0	22.00
2	0	0	27.52
3	0	1.414 214	22.11
4	-1	1	25.53
5	0	0	27.94
6	1	1	22.10
7	0	0	28.25
8	1	-1	23.20
9	-1	-1	23.00
10	0	0	27.43
11	0	-1.414 21	22.35
12	-1.414 21	0	24.24
13	0	0	28.45

注:酶活的单位为 U/mL, X_1 为酵母膏, X_2 为温度

通过软件 minitab15 对表 6 的结果进行分析,分析的结果见表 7、表 8。

表 7 中心组合设计实验分析结果

项	系数	系数标准误差	T	P
因素	27.9180	0.2622	106.465	0.000
X_1	-0.7997	0.2073	-3.858	0.006
X_2	0.1363	0.2073	0.658	0.532
X_1X_1	-2.2034	0.2223	-9.911	0.000
X_2X_2	-2.6484	0.2223	-11.913	0.000
X_1X_2	-0.9075	0.2932	-3.095	0.017

$R^2=0.9510$

注:其中 X_1 代表酵母膏; X_2 代表温度

表 8 回归方程的方差分析结果

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
回归	5	81.7807	81.7807	16.3561	47.57	0.000
线性	2	5.2652	5.2652	2.6326	7.66	0.017
平方	2	73.2213	73.2213	36.6106	106.48	0.000
交互作用	1	3.2942	3.2942	3.2942	9.58	0.017
残差误差	7	2.4067	2.4067	0.3438		
失拟	3	1.6164	1.6164	0.5388	2.73	0.178
纯误差	4	0.7903	0.7903	0.1976		
合计	12	84.1874				

表 7 所示,模拟方程中常量项 P 值为 <0.01 ,说明该模型是显著的; X_1X_2 的 P 值 <0.05 ,说明这两个因素之间有明显的相互作用。 $R^2=0.9510$,表明该模型可以用来解释 95.10% 的实验结果。表 8 显示,该模拟方程失拟项的 P 值大于 0.05,这说明该拟合的回归方程失拟不显著,能够很好地拟合该实验,因此该模型拟合度较高。经过回归拟合得到以下的回归方程:

$$Y=27.9180-0.7997X_1+0.1363X_2-$$

$$2.2034X_1X_1-2.6484X_2X_2-0.9075X_1X_2$$

两个因素间交互作用对酶活响应的影响曲面如图 1 所示,该响应曲面图等高线如图 2 所示。

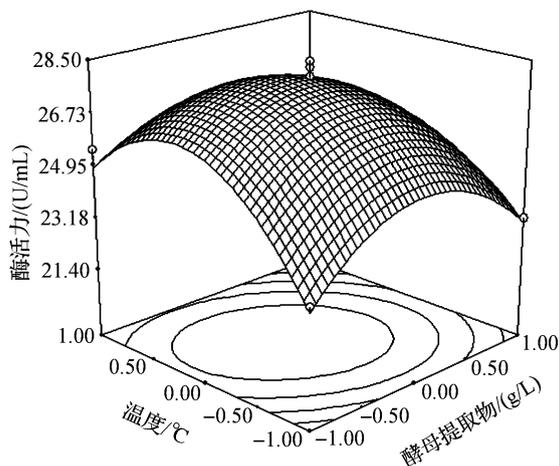


图 1 酵母膏和温度的响应面图

如图 2 所示,酵母膏和温度的交互作用对于酶活的影响比较显著,为了进一步验证最佳组合值,对中心组合设计实验所拟合的回归方程顶点进行预测求得的 $X_1=-0.193$; $X_2=0.055$,即对应酵母膏为 8.8 g/L,温度为 34°C 时,预测酶活最高值为 28 U/mL。

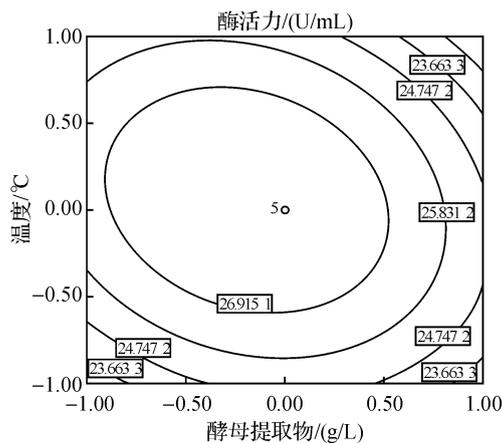


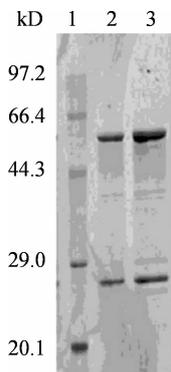
图2 酵母膏和温度的等高线

2.4 验证实验

为了验证该模型的准确性,笔者按照上述所给出的最优培养基组合进行3次试验取平均值,测得酶活值为28.2 U/mL,表明优化预测值与实际实验值拟合度可以,达到了99%,说明该模型的正确性。酶活为优化前的酶活(12.88 U/mL)的2.19倍,比活力为34 U/mg。

2.5 重组青霉素酰化酶的 SDS-PAGE

青霉素 G 酰化酶是一种异二聚体蛋白质,包含了一个小的 α 亚基(23.8 kD)和一个较大的 β 亚基(62.2 kD)^[11]。利用 SDS-PAGE 验证目的蛋白,结果如图3所示,目的蛋白条带附合理论值。并且,电泳图中仅含有少量的杂蛋白,表明分泌表达的青霉素 G 酰化酶达到较高的纯度,大大地简化了后续的纯化工作。



泳道1:低分子量标准蛋白;泳道2,3:BmPGA

图3 发酵上清液的 SDS-PAGE

2.6 发酵罐扩大培养

发酵罐扩大培养相对于摇瓶发酵可以提供更充足的通气量,同时也提高了温度,pH等参数的可控性,可以进一步提高菌体生物量和酶的表达量。在响应面分析法优化获得的培养条件基础上进行15 L发酵罐扩大培养实验,结果如图4所示,发酵过程前

10 h,菌体密度变化较小,处于停滞期;10~24 h 菌体生长迅速,青霉素 G 酰化酶也得到了大量的表达,当发酵达到39 h时,菌体密度和青霉素 G 酰化酶的表达量均达到了最高值,酶活的最高值达到51 U/mL。随后随着时间的变化,酶活和菌体密度的变化很微小,基本处于了静止期。酶活表达量较摇瓶最佳产酶量又增加了80%。

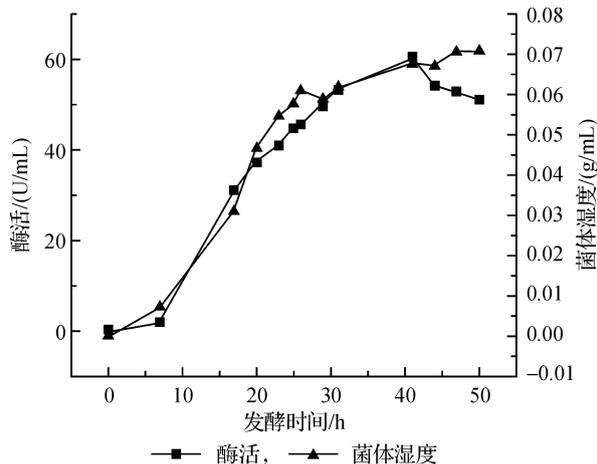


图4 发酵时间与PGA酶活、菌体湿度的关系

3 结论

本实验应用响应面法来优化枯草芽孢杆菌产青霉素 G 酰化酶的发酵条件,通过 Plackett-Burman 实验从19种因素中筛选出了主要的影响因素:温度和酵母膏,随后通过最陡爬坡实验和中心组合实验对这两种主要影响因素进行了优化。最终确定的发酵条件为:蛋白胨20 g/L,酵母膏8.8 g/L,可溶性淀粉12 g/L, KH_2PO_4 1.2 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, NH_4Cl 4.0 g/L, NaCl 6.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, Li_2SO_4 0.08 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L,发酵温度为34°C,摇床转速250 r/min,接种量2%,种子时间4 h和初始的发酵pH为7.5。在该条件下,发酵36 h后,摇瓶中发酵液的最初酶活可以达到28.2 U/mL,较优化前提高了2.19倍。随后又在15 L的发酵罐中装入10 L的优化好的发酵培养基进行了扩大培养,当发酵的时间为39 h左右时最终发酵液中的酶活可以达到51 U/mL,相对于摇瓶情况下又提高了将近1倍。在发酵罐培养条件下,发酵上清液中青霉素 G 酰化酶的酶活得到极大的提高,可能是因为在发酵罐中发酵温度、培养基pH值和培养基中溶氧量能够得到很好的控制,一直维持在细菌最优生长条件,使得

枯草芽孢杆菌菌体能够大量的表达目的蛋白。本实验基本确定了重组枯草芽孢杆菌在小型发酵罐中高效表达青霉素 G 酰化酶的发酵工艺,为进一步工业化放大奠定了基础。

参考文献:

- [1] Elander R P. Industrial production of beta-lactam antibiotics [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61: 385-92.
- [2] Anuj K Chandel, L Venkateswar Rao, M Lakshmi Narasu, et al. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42: 199-207.
- [3] Skrob F, Becka S, Plhacova K, et al. Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM4824[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 738-744.
- [4] 施晓赓,王永红,张嗣良,等. NIPAB 法测定亲霉素 G 酰化酶活力的分析和改进[J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(9): 659-661.
- [5] 代志凯,张翠,阮征. 试验设计和优化及其在发酵

- 培养基优化中的应用[J]. *微生物学报*, 2010, 37(6): 894-903.
- [6] 杨冀艳,胡磊,许杨. Plackett-Burman 设计和响应面法优化荷叶总黄酮的提取工艺[J]. *食品科学*, 2009, 30(6): 29-33.
- [7] Li Yin, Cui Fengjie, Liu Zhiqiang, et al. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1381-1388.
- [8] Douglas C Montgomery. *Design and Analysis of Experiments*[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2007: 405-458.
- [9] Li C, Bai J H, Cai Z L. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus* using responsible surface methodology[J]. *J Biotechnol*, 2002, 93: 27-34.
- [10] 罗璇,钟晓凌,王金华,等. 红酵母产类胡萝卜素提取工艺的优化研究[J]. *生物技术*, 2007, 17(4): 86-88.
- [11] Flores G, Soberón X, Osuna J. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase [J]. *Protein Science*, 2004, 13: 1677-1683.

Optimization of Penicillin G Acylase Production by Recombinant *Bacillus Subtilis* via Response Surface Analysis

QIU Jing-jing, CHEN Wei, DING Ming, ZHANG Man-li, ZHAO Fu-kun

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Response surface methodology and design is used to optimize the fermentation conditions for Penicillin G acylase production by recombination *bacillus subtilis*. Initial screening via the Plackett-Burman method and design reveals that the fermentation temperature and yeast extract are the most significant among 19 factors. Further optimization with central design and response surface analysis predicts that the final enzyme activity can reach 28.2 U/mL when the temperature is 34°C and the yeast extract is 8.8 g/L. The enzyme activity of the optimization conditions is 2.19 times more than the initial conditions. In accordance with the optimization conditions, we use the 15 L fermentor to expand fermenting and find that the highest PGA activity of the fermentation liquid can reach 51 U/mL, which is improved more significantly than when it is in the flask.

Key words: Penicillin G acylase; *bacillus subtilis*; response surface analysis; fermentation

(责任编辑:许惠儿)