

基于支持向量机的重组大肠杆菌产脂肪酶 MAS1 的发酵建模与优化

肖阳¹, 王永华^{2,3}, 杨博^{1*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (3. 广东优酶生物制造研究院有限公司, 广东佛山 528226)

摘要: 该研究以来源于海洋放线菌 (*Streptomyces* sp.) W007 脂肪酶 MAS1 为研究对象, 将其在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达并优化了发酵条件。首先, 通过单因素实验确定重组大肠杆菌表达脂肪酶的最佳诱导时间为对数生长期后期, 最佳异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 浓度为 0.6 mmol/L, 最佳诱导 pH 值为 6.5, 最佳诱导温度为 20 °C。然后, 用 R 语言 rsm 包设计 Box-Behnken 试验, 并在 7 L 发酵罐中进行发酵试验以得到 Box-Behnken 实验数据。最后, 通过支持向量机 (Support Vector Machines, SVM)-遗传算法 (Genetic Algorithm, GA) 计算得到重组大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达脂肪酶 MAS1 的最优发酵条件: IPTG 浓度为 0.65 mmol/L、诱导温度 23 °C、诱导 pH 值为 6.7 时, 理论脂肪酶 MAS1 酶活力为 2 276.99 U/mL。在 7 L 发酵罐中, 使用优化后的发酵条件进行重组大肠杆菌 BL21 (DE3) 培养时, 得到最大脂肪酶 MAS1 酶活力为 2 316.02 U/mL, 比未优化之前 (1 733.33 U/mL) 提高了 33.61%。上述结果表明 SVM-GA 在重组大肠杆菌发酵条件优化方面具有较好的性能, 为脂肪酶 MAS1 的高效制备提供了一定的研究依据。

关键词: 脂肪酶 MAS1; 发酵优化; 支持向量机; 遗传算法

文章编号: 1673-9078(2023)01-59-68

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0136

Modeling and Optimization of Fermentation by Lipase MAS1-producing Recombinant *Escherichia coli* Based on Support Vector Machine

XIAO Yang¹, WANG Yonghua^{2,3}, YANG Bo^{1*}

(1.School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3.Guangdong Youmei Institute of Intelligent Bio-manufacturing, Foshan 528226, China)

Abstract: In this study, the lipase MAS1 from marine actinomycetes (*Streptomyces* sp.) W007 was used as the research object, which was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and associated fermentation conditions were optimized. First of all, the optimal induction time for the expression of lipase in recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) was determined by the single factor experiments to be the late logarithmic growth phase, with the optimal Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration being 0.6 mmol/L, the optimal induction pH being 6.5, and the optimal induction temperature being 20 °C. Then, the Box-Behnken test was designed by the R language rsm package, and was conducted in a 7 L fermentor to obtain the data. Finally, the optimal fermentation conditions for the expression of lipase MAS1 in the recombinant *E. coli* BL21(DE3) were calculated by support vector machine (SVM)-genetic algorithm (GA): the optimized IPTG concentration, induction temperature and induction pH were 0.65 mmol/L, 23 °C and 6.7, respectively, which led to the theoretical enzyme activity of lipase MAS1 as 2 276.99 U/mL. In the 7-L fermentor, the maximum enzyme activity of lipase MAS1 was 2 316.02 U/mL under the optimized fermentation

引文格式:

肖阳,王永华,杨博.基于支持向量机的重组大肠杆菌产脂肪酶 MAS1 的发酵建模与优化[J].现代食品科技,2023,39(1):59-68

XIAO Yang, WANG Yonghua, YANG Bo. Modeling and optimization of fermentation by lipase MAS1-producing recombinant *Escherichia coli* based on support vector machine [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 59-68

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (31725022)

作者简介: 肖阳 (1997-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: 779412726@qq.com

通讯作者: 杨博 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程及生物催化, E-mail: yangbo@scut.edu.cn

conditions for culturing recombinant *E. coli* BL21(DE3). The above research results show that the SVM-GA exhibits good performance during the optimization of fermentation conditions for recombinant *E. coli*, which provides a research basis for the efficient preparation of lipase MAS1.

Key words: lipase MAS1; fermentation optimization; support vector machine; genetic algorithm

脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 具有催化水解、酯化、酯交换等多种功能^[1-3]和特异的底物选择性、高效的催化效率等特性^[4], 在造纸、油脂加工、制药、皮革加工等工业领域广泛利用^[5]。目前, 大多数已报道的脂肪酶均表现出对 sn-1 和 sn-3 位的偏好性, 只有极少数来源于南极假丝酵母 (*Candida antarctica*)、洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和海洋放线菌 (*Streptomyces* sp.) W007^[6]的脂肪酶表现出具有非区域选择性^[7]。来源于海洋放线菌 (*Streptomyces* sp.) W007 的脂肪酶 MAS1 具有耐受甲醇及高温等特点, 可高效催化合成富含 *n*-3 PUFA 甘油三酯^[8-10]和生物柴油等^[11-13]。徐婉莉等^[11]利用固定化脂肪酶 MAS1 在叔丁醇体系中催化黑兵蝇幼虫油甘油解形成月桂酸单甘酯, 其底物转化率最高为 97.88%, 月桂酸单甘酯的含量最高为 70.8%。汪秀妹等^[12]在真空环境下, 利用固定化脂肪酶催化多不饱和脂肪酸与 sn-甘油-3-磷脂酰胆碱酯化成对人体具有多种益处的溶血卵磷脂, 其 sn-甘油-3-磷脂酰胆碱转化率为 93.12%, 溶血卵磷脂含量为 90.77 mol%。吕雯等^[13]利用固定化脂肪酶 MAS1 酯化大豆油脱臭馏出物与甲醇形成生物柴油, 生物柴油产率为 97.08%。

目前, 重组脂肪酶 MAS1 主要在毕赤酵母中进行异源表达, 蓝东明等^[14]通过共表达 PDI、HAC1 和免疫球蛋白结合蛋白的策略成功使 MAS1 活力提高了 1.7 倍, 随后通过发酵条件优化, 最终在发酵 144 h 时, 发酵液上清中酶活力达到 440 U/mL。瞿曼等^[15]通过单因素实验优化了毕赤酵母表达 MAS1 的诱导温度和诱导 pH, 并进行了双碳源流加策略的优化, 酶活力较原来提高了 4.83 倍。大肠杆菌表达系统相比毕赤酵母表达系统具有发酵周期短发酵成本低等优点, 以大肠杆菌作为脂肪酶 MAS1 异源表达系统有望满足产业化应用的不同需求, 然而通过统计学方法进行发酵条件优化的研究还鲜有报道。

统计学方法如响应面、正交设计^[16]、神经网络、支持向量机 (Support Vector Machines, SVM) 应用于微生物发酵条件已证明具有十分重要的价值。名晓东等^[17]用响应面方法在摇瓶水平优化了重组大肠杆菌产卤代烷脱卤酶培养基成分, 优化后的卤代烷脱卤酶酶活力比优化前提高了 93.78%。Rani 等^[18]采用正交实验优化了拟根孢霉 MTCC 1467 产木聚糖酶的发酵

参数, 优化后木聚糖产率提高了 65.1%。然而微生物发酵过程是非线性的^[19], 响应面、正交试验设计等得到的线性模型拟合效果较差, 而神经网络、SVM 等算法因具有较强的非线性拟合能力而在发酵条件优化中更有价值。Sathish 等^[20]用神经网络算法和遗传算法 (Genetic Algorithm, GA) 优化了枯草芽孢杆菌 RSP-GLU 产谷氨酰胺酶发酵条件, 将谷氨酰胺酶的产量提高了 47%。

虽然神经网络算法在发酵建模领域被广泛应用, 但是神经网络算法仍然无法解决收敛速度慢、易陷入局部最小值等问题^[21]; 关于神经网络算法的神经元个数的选取也没有特定的标准, 因缺乏对神经网络结构的了解, 使得所建立的神经网络模型出现缺乏泛化能力和过拟合的问题^[22]; 神经网络算法对于数据样本的大小也有一定的要求, 当数据样本比较小时, 神经网络算法拟合效果较差^[19]。基于结构风险最小化的 SVM 利用简单的统计学理论解决了上述问题, 它的非线性拟合性更强, 且更加适合小样本数据模型的构建^[23], 可通过引入最小二乘法提高了模型的训练速度^[24], 因而被广泛应用于数学模型的构建和自动控制等领域。Zhu 等^[25]通过粒子群优化 (Particle Swarm Optimization, PSO) 算法优化了基于最小二乘支持向量机 (Least Squares Support Vector Machines, LSSVM) 构建的海洋溶菌酶发酵模型, 将优化后的模型进行了广义预测控制, 将酶活性提高了 20%, 酶产率提高了 30%。GA 基于自然选择和遗传学的机制, 通过计算机模拟选择、交叉和变异的过程以求解优化问题的最优解, 是一种集概率、随机和引导搜索机制的优化算法^[26]。SVM 和 GA 的结合, 可通过 SVM 来描述各种因素间复杂的关系, 在此基础上用 GA 找出最优解。Gao 等^[27]将 SVM 与实数编码遗传算法 (Real-code Genetic Algorithm, RGA) 相结合, 成功使发酵过程中的青霉素滴度提高了 22.88%。

目前, 脂肪酶 MAS1 已被证明可以合成多种对人体有益的成分, 例如具有杀菌功效的月桂酸单甘酯^[11]和对人体有多种益处的溶血卵磷脂^[12]等; 在清洁能源领域, 脂肪酶 MAS1 也可以催化油脂产业的废料高效转化成生物柴油^[13]。因此脂肪酶 MAS1 在未来具有十分广泛的应用前景, 但已报道的由毕赤酵母发酵的脂肪酶 MAS1 产量较低, 难以满足下游应用行业的需求。为了降低生产成本和促进脂肪酶 MAS1 的产业化, 本

研究利用大肠杆菌异源表达脂肪酶 MAS1，基于 Box-Behnken 实验设计得到发酵数据，建立了重组大肠杆菌表达脂肪酶 MAS1 发酵模型。利用 GA 对诱导温度、诱导 pH 和 IPTG 浓度等发酵条件进行优化，以获得重组大肠杆菌高效表达 MAS1 的发酵条件，为重组脂肪酶工业化应用提供研究基础，其建模和优化流程如图 1 所示。

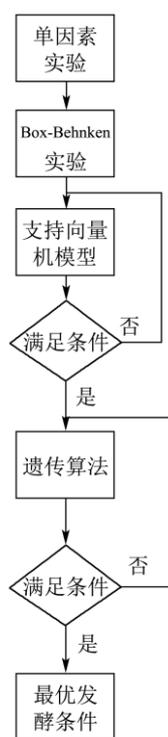


图 1 MAS1 发酵建模与优化流程

Fig.1 The flow chart of the MAS1 fermentation modeling and optimization

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

重组大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 由华南理工大学生物化工实验室构建和保藏。

1.1.2 生化试剂

酵母粉、蛋白胨购自广东环凯生物科技有限公司；葡萄糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等购自国药集团化学试剂有限公司；氨苄青霉素钠购自生工生物工程（上海）股份有限公司；橄榄油购自上海麦克林试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

7 L 发酵罐，上海保兴生物设备工程有限公司；H1850R 台式高速冷冻离心机，湘仪离心机仪器有限公司；SCIENTZ-IIID 超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；ZHSY-50WE 水浴恒温振荡培

养箱，上海知楚仪器有限公司；IS-A 叠加式恒温振荡器，苏州捷美电子有限公司；SPX-150 生化培养箱，中仪国科（北京）科技有限公司；UV-8000 型双光束紫外可见分光光度计，上海元析仪器有限公司。

1.1.4 培养基

固体培养基（1 L）：5 g 酵母粉、10 g 胰蛋白胨、10 g NaCl、18 g 琼脂粉，补加终浓度为 100 μg/mL 氨苄青霉素钠。

摇瓶种子液培养基（1 L）：5 g 酵母粉、10 g 胰蛋白胨、10 g NaCl，补加终浓度为 100 μg/mL 氨苄青霉素钠。

发酵培养基（1 L）：10 g 无水葡萄糖（单独灭菌），11.5 g 酵母粉，19.5 g 蛋白胨，4 g (NH₄)₂SO₄、0.94 g 一水柠檬酸，18 g K₂HPO₄·3H₂O，3 g KH₂PO₄，1.2 g MgSO₄（单独灭菌），微量元素 1 mL。

微量元素溶液（1 L）：2.8 g FeSO₄·7H₂O、1.71 g MnSO₄·H₂O、2.8 g CoSO₄·7H₂O、1.13 g CaCl₂、0.2 g CuCl₂·2H₂O、0.14 g ZnCl₂。

1.2 方法

1.2.1 OD₆₀₀ 检测

将取得的发酵液用纯水稀释适当倍数，于 UV-8000 紫外分光光度计下测定其吸光度。

1.2.2 种子液制备方法

将保藏于 -80 °C 冰箱的 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 活化于含 100 μg/mL 氨苄抗性的 LB 固体培养基上，37 °C 过夜培养。接种单菌落到 5 mL LB 培养液中，37 °C、200 r/min 培养 12 h。将上述的培养液按 1% (V/V) 的接种量接种至含有 150 mL LB 液体培养基中，37 °C、180 r/min 振荡培养至对数生长中后期，OD₆₀₀=3~6。

1.2.3 发酵罐培养条件

7 L 发酵罐装液量为 3 L，接种量为 5% (V/V)，分批培养温度为 37 °C，通气量为 3 L/min，发酵过程中溶氧不低于 20%，流加氨水调节 pH 值为 7.0。分批培养 4 h 后开始流加葡萄糖，葡萄糖流速控制在 12.5 g/h。在对数生长期添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG），发酵 22 h 时停止补料。诱导阶段每 3 h 取样，测定细胞湿重和酶活。诱导时间分别设置为对数生长前期（2 h）、对数生长中期（4 h）、对数生长后期（7 h）；诱导温度分别设置为 15、20、25、30 和 37 °C；诱导 pH 值分别设置为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0；IPTG 终浓度分别设置为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L。

1.2.4 细胞破碎

取 15 mL 发酵液，于 4 °C、8 000 r/min 下离心 5 min，倒掉上清液。菌体用等体积 pH 值 7.5 的

10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液重悬, 随后再次离心, 重复两次后, 用 15 mL pH 值 7.5 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液重悬菌体, 于 200 W 下超声破壁 15 min。将破碎液于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 所得上清液即为 MAS1 粗酶液。

1.2.5 MAS1 水解酶活检测

称取 4 g 橄榄油乳化液于 50 mL 具塞三角瓶中, 随后加入 5 mL 20 mmol/L pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲溶液, 设置一个空白组和三个平行组。向空白组中加入 15 mL 无水乙醇, 与平行组放置于 65 °C、150 r/min 的水浴锅中预热 5 min。随后向反应体系中加入稀释适当倍数的 1 mL 酶液, 反应 10 min, 平行组分别加入 15 mL 无水乙醇将酶液灭活。待冷却到室温之后, 用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液滴定, 并记录滴定体积。水解酶活计算方法如下:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 50 \times n_1}{0.05} \times \frac{1}{10} \quad (1)$$

式中:

X: 样品的酶活力, U/mL;

V₁: 滴定样品所用 NaOH 的体积, mL;

V₂: 滴定空白时所消耗的 NaOH 的体积, mL;

c: 滴定所用 NaOH 的体积, mL;

50: 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液 1.00 mL 相当于脂肪酶 50 微摩尔;

10: 反应时间, min;

n₁: 稀释倍数。

1.2.6 发酵液中菌体湿重的测定

取 2 mL 发酵过程中的发酵液于 4 °C、12 000 r/min 下离心 3 min, 去上清, 所得菌体于分析天平上称重, 重复测三次。

1.2.7 实验设计与预测模型的建立

本文采用 R 语言 rsm 包设计 Box-Behnken 实验, 采用 MATLAB 2020a 软件的 LIBSVM 和 LIBSVM-Faruto Ultimate 工具箱构建 SVM 模型。在构建模型的过程中, 以诱导 pH、诱导温度、诱导物 IPTG 终浓度作为自变量, 以发酵液中 MAS1 酶活力作为因变量构建 SVM 模型, 使用从实验中收集的发酵数据训练出该模型, 以获得 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 的发酵预测模型。

1.2.7.1 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 生长曲线的绘制

将 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 按方法 1.2.3 于 37 °C 下进行培养, 培养过程中不诱导, 每隔 1 h 取发酵液样品, 按方法 1.2.1 测 OD₆₀₀。

1.2.7.2 单因素试验设计

以 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 为出发菌株, 以诱导温度 (15、20、25、30、37 °C)、诱导 pH 值 (6、

6.5、7、7.5、8) 和 IPTG 浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L) 为单因素进行试验。

1.2.7.3 响应面实验设计

采用 R 语言 rsm 包设计 Box-Behnken 响应面实验, 以 1.2.7.2 三因素得到最优水平为基础, 设计三因素三水平试验设计表。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiments design

水平	温度/°C	pH 值	IPTG 终浓度/(mmol/L)
-1	15	6.0	0.4
0	20	6.5	0.6
1	25	7.0	0.8

1.2.7.4 SVM 最优 c 值和 g 值的确定

在 SVM 模型构建过程中, 有两个参数的选择会影响到 SVM 模型的精度, 一个是惩罚系数 c 值, 另一个参数为 SVM 径向基核函数 g 值。c 值过大或过小会造成模型泛化能力的减弱, g 值的大小会影响到支持向量的数目, 进而影响到支持向量机的训练与预测的速度^[28]。本研究采用了 MATLAB 2020a 的 LIBSVM-FarutoUltimate 工具箱的 SVMcgForClass 函数对 SVM 模型的 c 值和 g 值求最优解。为了约束寻优范围, 将 c 值和 g 值的范围约束在 -2~2 之间。

1.2.7.5 SVM 模型的构建

使用 MATLAB 2020a 的 LIBSVM 工具箱进行模型的构建。将 Box-Behnken 实验得到的数据随机划分为 2 组, 分为训练集和测试集。训练集包含 12 组数据用以训练 SVM 模型, 测试集包含 3 组数据用以验证 SVM 模型。其关键参数 c 和 g 值采用 1.2.7.4 得到的最优结果。由于本研究构建的模型为支持向量回归模型, 因此“-S”参数选择 3, p 设为 0.1, 考虑到变量较多, 故核函数选择了径向基核函数。

1.3 GA 求解 SVM 模型的最优解

采用 MATLAB 2020a 的 GA 工具箱对上述构建好的 SVM 模型求其最优解。遗传算法的初始种群设置为 50, 交叉概率为 0.8, 终止代数为 100, 以 1.2.7.5 得到的 SVM 模型作为适应度函数, 以 1.2.7.2 得到的单因素实验数据所确定的诱导温度、诱导 pH 值及 IPTG 浓度的水平作为变量范围, 其余为默认参数, 通过选择、变异、交叉操作进行参数寻优。

1.4 数据处理

以上实验均设置 3 组平行, 采用 Microsoft Excel 2019 软件计算所有数据的平均值和标准差。采用 Origin 2018 软件作图, R 语言进行分析, 显著性水平 p < 0.05。

2 结果与讨论

2.1 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 生长曲线的绘制

由图 2 可知, BL21(DE3)/pET22b-MAS1 的对数生长前期、中期、后期分别为发酵 2 h、4 h、7 h 左右。

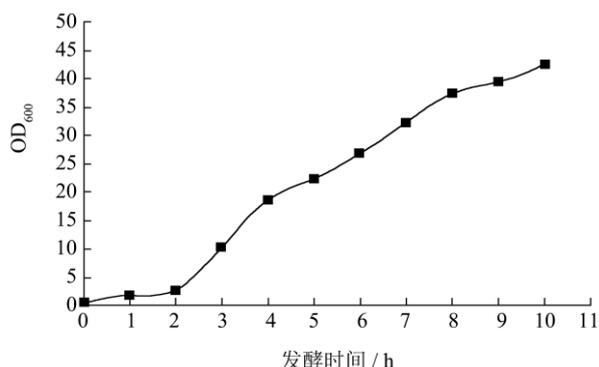


图 2 BL21 (DE3) /pET22b-MAS1 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of BL21(DE3)/pET22b-MAS1

2.2 诱导时间对 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 产 MAS1 的影响

Seyfi 等^[29]在以葡萄糖为碳源的培养基中用大肠杆菌 Rosetta-gami B(DE3)生产重组蝎蛋白时, 分别在对数生长前期、对数生长中期和对数生长后期进行诱导, 结果发现在对数生长前期和中期蛋白含量表达不高, 但在对数生长后期进行诱导时, 重组蝎蛋白的表达量达到最大, 为 3.5 g/L。因此分别选择了在 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 的对数生长前期 (2 h)、对数生长中期 (4 h) 和对数生长后期 (7 h) 添加 IPTG 进行诱导, 以探究不同对数生长时期诱导对 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 发酵表达 MAS1 的影响。

由图 3a 和图 3c 可知, 在对数生长前期和中期进行诱导, 最大细胞湿重分别只能达到 76.31 和 95.33 g/L, 均低于在对数生长后期诱导达到的最大细胞湿重 141.27 g/L。同时葡萄糖的积累量随着发酵时间的延长也在快速增长, 在发酵至 22 h 时, 在对数生长前期诱导和对数生长中期诱导时葡萄糖分别积累至 38.61 g/L 和 28.93 g/L, 可能是在对数生长前期和中期进行诱导时, 细胞生物量未达到足够高的密度, 部分细胞未形成完整的碳链骨架, 此时添加 IPTG 会影响细胞正常的生理功能, 造成细胞代谢活力下降, 对葡萄糖的利用率降低, 造成未代谢的葡萄糖在发酵液中大量积累。如图 3b, 在对数生长后期进行诱导, 有利于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 细胞的生长和目的蛋白的表达, 当发酵至 13 h, 此时酶活力达到了 1 733.33 U/mL,

比对数生长前期和对数生长中期诱导分别提高了 153.66% 和 77.47%。结果表明, 在 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 对数生长后期进行诱导可以提高 MAS1 的表达水平。

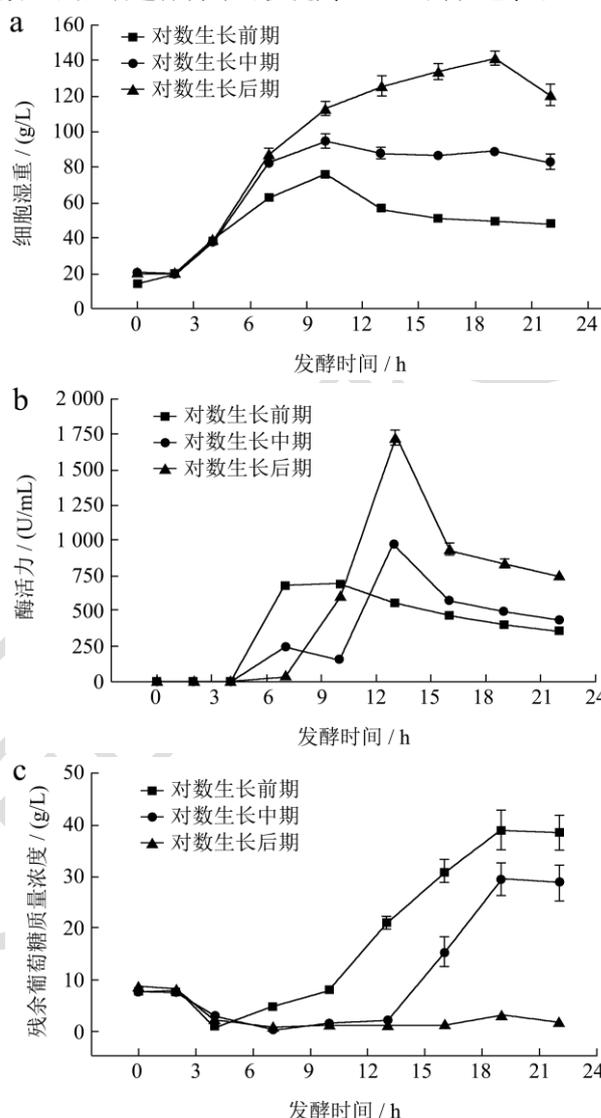


图 3 诱导时间对 BL21 (DE3) /pET22b-MAS1 发酵过程的影响

Fig.3 The effect of induction time on the fermentation process of BL21(DE3)/pET22b-MAS1

注: a: 不同诱导时间对菌体湿重的影响; b: 不同诱导时间对酶活的影响; c: 不同诱导时间对发酵液中残糖含量的影响。

2.3 诱导物 IPTG 浓度对于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 表达 MAS1 的影响

IPTG 作为乳糖的类似物, 在重组大肠杆菌表达外源蛋白过程中具有十分重要的作用。其浓度的高低可以影响到重组大肠杆菌表达外源蛋白的效率。舒畅等^[30]利用大肠杆菌 BL21(DE3)发酵生产谷氨酰胺转氨酶时, 分别添加终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 结果发现当 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L

时, 谷氨酰胺转氨酶比酶活达到最大, 为 1.32 U/mg。本实验在 25 °C、pH 值 7.0、对数生长后期诱导的条件下, 分别添加终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG, 探究了不同诱导浓度对 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 表达 MAS1 的影响。由图 4a、4b 和 4c 可知, 随着 IPTG 浓度的增大, 对细胞生长的抑制作用增强, 当 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时, 最大细胞湿重只达到 99.81 g/L, 葡萄糖积累量也随时间的增加而迅速增长至 31.41 g/L。而在 0.2 mmol/L 条件下, 最大细胞湿重可达 122.51 g/L, 酶活力最高为 936.67 U/mL, 葡萄糖积累量呈现平稳增长趋势, 发酵至 22 h 时, 残糖量为 10.36 g/L。当 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时, 发酵 13 h 酶活力达到了最大, 为 2 063.47 U/mL。这一结果表明 IPTG 诱导物为 0.6 mmol/L 有利于 MAS1 的表达。

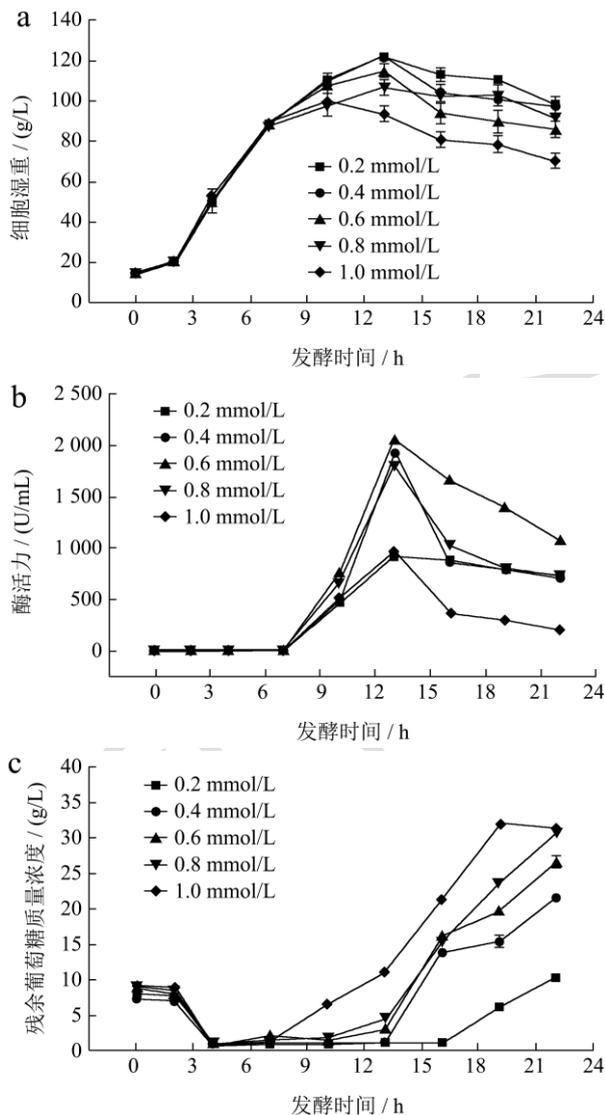


图 4 IPTG 浓度对于 BL21 (DE3)/pET22b-MAS1 发酵过程的影响
Fig.4 The influence of IPTG concentration on the fermentation process of BL21(DE3)/pET22b-MAS1

注: a: 不同诱导物 IPTG 浓度对菌体湿重的影响; b: 不

同诱导物 IPTG 浓度对酶活的影响; c: 不同诱导物 IPTG 浓度对发酵液中残糖含量的影响。

2.4 诱导 pH 值对于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 表达 MAS1 的影响

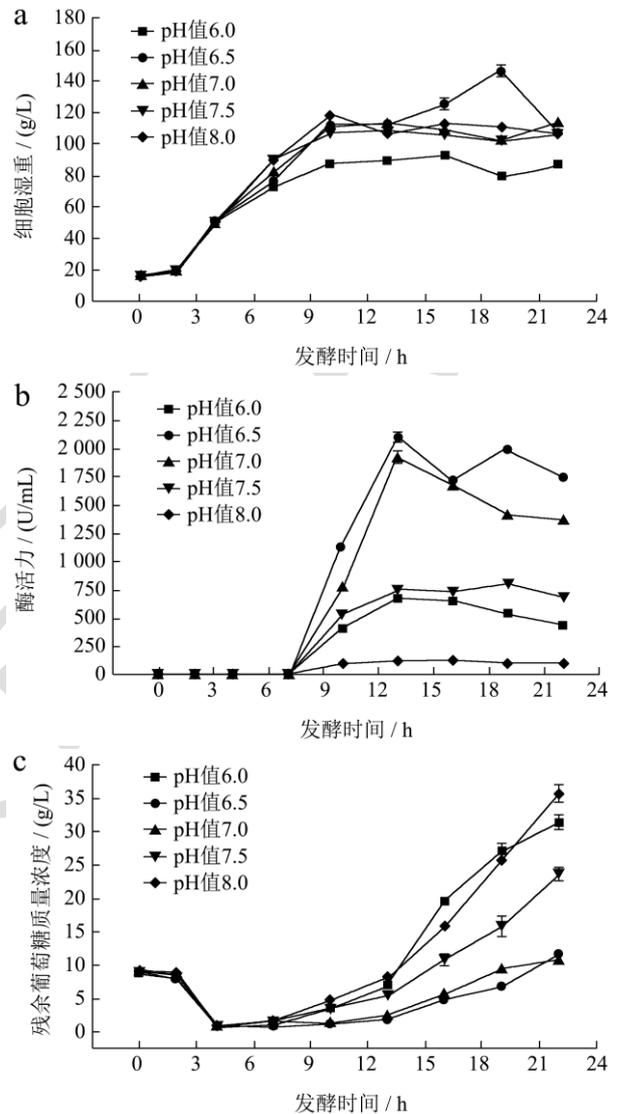


图 5 诱导 pH 对 BL21 (DE3)/pET22b-MAS1 发酵过程的影响
Fig.5 The effect of induced pH on the fermentation process of BL21(DE3)/pET22b-MAS1

注: a: 不同诱导 pH 浓度对菌体湿重的影响; b: 不同诱导 pH 浓度对酶活的影响; c: 不同诱导 pH 浓度对发酵液中残糖含量的影响。

pH 值作为发酵过程当中重要的参数, 它可以影响到重组大肠杆菌细胞的生长和蛋白的表达。当外部环境的 pH 值发生变化时会造成细胞内部的 pH 值也发生改变, 从而影响到细胞内部分代谢酶的活性进而造成细胞内部生理状态的改变, 因此维持发酵过程当中 pH 值恒定对于发酵具有十分重要的意义^[31]。Shahzadi 等^[32]

在优化大肠杆菌产纤维素酶的发酵条件时,发现当诱导 pH 值大于或小于 7 时,重组纤维素酶表达量都会降低,可见诱导 pH 值对重组菌表达蛋白具有重要的影响。分别控制诱导 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,探究了不同 pH 值下 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 发酵表达 MAS1 的影响。由图 5a、5b 和 5c 可知,当诱导 pH 值为 6.5 时,细胞湿重和酶活力均达到最大,分别为 146.83 和 2 103.69 U/mL,葡萄糖的积累速率显著慢于其他诱导 pH 值下葡萄糖的积累速率,发酵至 22 h 时,葡萄糖残余含量仅为 11.63 g/L。当 pH 值为 6.0 和 7.0 时,最大细胞湿重分别为 93.5 g/L 和 113.5 g/L,最大酶活力分别为 688.42 U/mL 和 1 909.58 U/mL,均显著低于 pH 值 6.5 条件下的最大细胞湿重和最大酶活力。于此同时 pH 值 6.0 条件下,葡萄糖快速积累,发酵至 22 h 时葡萄糖残余含量为 31.34 g/L。这一结果说明诱导 pH 值为 6.5 时更有利于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 表达 MAS1。

2.5 诱导温度对于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1

表达 MAS1 的影响

温度对于大肠杆菌的生长和外源蛋白的表达具有重要的影响,较高的温度有利于大肠杆菌的生长,较低的温度有利于大肠杆菌表达外源蛋白^[33]。因此,常见的大肠杆菌发酵控温工艺,多采用在生长阶段维持较高的温度,而在诱导阶段维持较低的温度。另外,低温条件下诱导可以提高质粒在大肠杆菌中的稳定性^[31]。Liang 等^[34]在探究重组大肠杆菌产丙酮酸氧化酶变温发酵策略时,发现当诱导温度为 37 °C 时,大肠杆菌生长速度最快,但丙酮酸氧化酶活性仅为 890 U/L,而诱导温度分别为 28 °C 和 32 °C 时,丙酮酸氧化酶活性达到 1 099 U/L 和 1 189 U/L。本研究在对数生长后期添加 0.6 mmol/L IPTG、诱导 pH 维持 6.5 条件下,分别维持诱导温度为 15、20、25、30、37 °C。由图 6b 可知,最佳诱导温度为 20 °C,酶活达到最高为 2 011.56 U/mL。如图 6a 和 6c,当温度逐渐升高时,BL21(DE3)/pET22b-MAS1 最大湿重是逐渐增长的,在 25 °C 下培养时细胞湿重最大为 126.67 g/L,但是超过 25 °C 时,最大湿重呈现下降的趋势;当诱导温度为 37 °C 时,最大细胞湿重仅为 88.36 g/L,且葡萄糖积累的速率开始加快,发酵至 22 h 时,发酵液中的葡萄糖含量积累至 44.5 g/L,同时最大酶活力也仅为 110.6 U/mL,可能是因为高于 25 °C 诱导时 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 表达蛋白质和生长速度快,这增加了细胞的代谢负担。Paul 等^[35]发现较高温下诱导重组大肠杆菌表达麦芽糊精葡萄糖苷酶会产生较

多包涵体,从而导致大肠杆菌生长速率的下降。当诱导温度为 15 °C 时,最大湿重仅为 85.61 g/L,仅为 20 °C 诱导下最大湿重的 72.55%,说明诱导温度过低时不利于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 的生长,发酵至 22 h 时,发酵液中的葡萄糖残余含量为 44.2 g/L,且最大酶活为 873.74 U/mL。这一结果说明,低温有利于 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 表达 MAS1,但是温度过低则会导致 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 生长受到抑制并且影响到 MAS1 的表达。

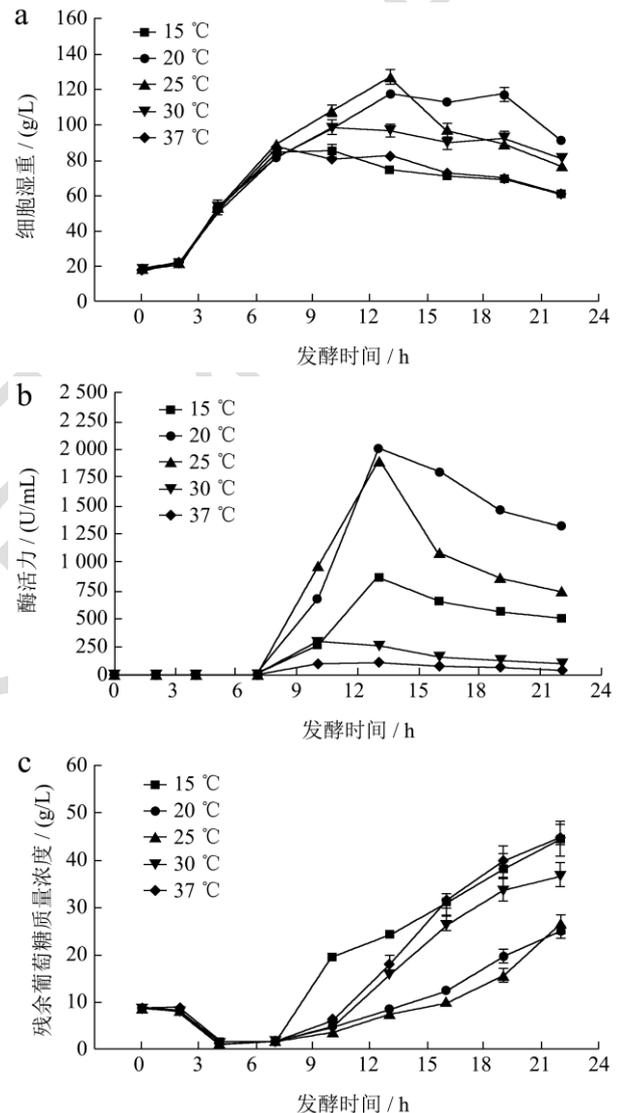


图 6 诱导温度对 BL21 (DE3)/pET22b-MAS1 发酵过程的影响

Fig.6 The influence of induction temperature on the fermentation process of BL21(DE3)/pET22b-MAS1

注: a: 不同诱导温度浓度对菌体湿重的影响; b: 不同诱导温度浓度对酶活的影响; c: 不同诱导温度浓度对发酵液中残糖含量的影响。

2.6 SVM 模型的构建

利用 R 语言的 rsm 包设计了 Box-Behnken 实验方

案, 随后依据 Box-Behnken 实验方案得到了对应的数据。利用 MATLAB 2020a 软件的 Mapminmax 函数对 Box-Behnken 实验方案结果进行归一化处理, 然后用 randperm 随机函数将数据集随机分为两组, 其中测试集函数由 12 组实验数据构成, 测试集由 3 组实验数据构成。通过 MATLAB 2020a 软件的 LIBSVM-FarutoUltimate 工具箱的 SVMcgForClass 函数对 SVM

模型的 c 值和 g 值进行寻优, 确定 c 值和 g 值分别为 1.5157 和 0.33。随后使用 MATLAB 2020a 的 Libsvm 工具箱构建 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 产 MAS1 的 SVM 模型。由表 2 和表 3 可知, 训练集的平均相对误差为 4.26%, 测试集的平均相对误差为 3.32%, 综合训练集和测试集误差来看, SVM 模型预测结果与实验结果平均相对误差为 4.07%, 拟合效果较好。

表 2 SVM 模型训练数据样本设计与实验结果

Table 2 SVM model training data sample design and experimental results

试验号	pH	T/°C	IPTG/(mmol/L)	U 实际值/(U/mL)	U 预测值/(U/mL)	相对误差/%
1	7	15	0.6	1 571.81 ±20.83	1 628.12	3.60 ±1.37
2	6	15	0.6	1 073.42 ±19.36	1 129.63	5.27 ±1.90
5	7	20	0.4	1 898.64 ±27.21	1 871.52	1.41 ±1.41
7	7	20	0.8	2 056.24 ±23.47	1 999.85	2.73 ±1.11
8	6	20	0.8	1 458.21 ±17.63	1 514.75	3.89 ±1.26
9	6.5	15	0.4	1 423.42 ±26.54	1 497.82	5.26 ±1.96
10	6.5	25	0.4	1 727.03 ±19.82	1 905.64	10.36 ±1.27
11	6.5	15	0.8	1 511.54 ±26.55	1 531.22	1.78 ±1.33
12	6.5	25	0.8	2 125.71 ±30.87	2 069.41	2.63 ±1.41
13	6.5	20	0.6	2 172.01 ±34.29	2 061.22	5.08 ±1.50
14	6.5	20	0.6	2 005.03 ±36.12	2 061.22	2.84 ±1.85
15	6.5	20	0.6	2 200.04 ±34.66	2 061.21	6.29 ±1.48

表 3 SVM 模型测试数据样本设计与实验结果

Table 3 SVM model testing data sample design and experimental results

试验号	pH	T/°C	IPTG/(mmol/L)	U 实际值/(U/mL)	U 预测值/(U/mL)	相对误差/%
3	7	25	0.6	2 183.72 ±30.55	2 127.34	2.56 ±1.36
4	6	25	0.6	1 641.31 ±21.69	1 697.71	3.45 ±1.37
6	6	20	0.4	1 437.32 ±24.31	1 493.74	3.96 ±1.76

2.7 GA 寻优

从 MATLAB 2020a 软件的 GA 工具箱对 SVM 模型寻优结果 (如图 7) 来看, 当迭代至 66 代时, GA 找到了最优结果: BL21(DE3)/pET22b-MAS1 发酵产 MAS1 的最佳发酵条件为诱导 pH 值 6.73、诱导温度 22.923 °C、诱导物 IPTG 浓度 0.648 mmol/L, 预测此时 MAS1 的酶活达到了最大为 2 276.99 U/mL。

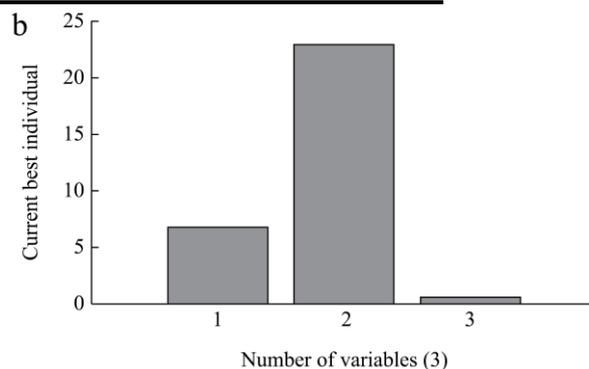
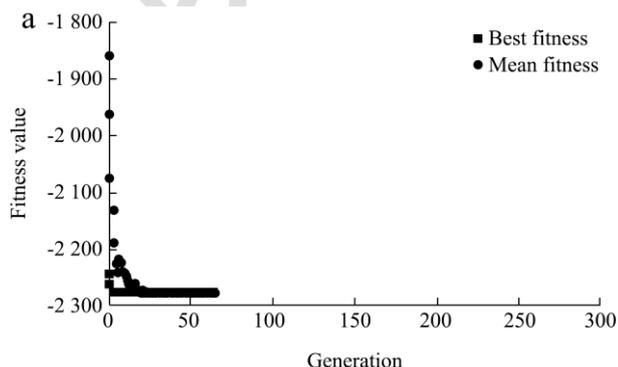


图 7 遗传算法寻优结果图

Fig.7 Genetic algorithm optimization result graph

注: a: 遗传算法寻优轨迹; b: 遗传算法寻优值。

2.8 模拟结果的验证

对 SVM 和 GA 得到的 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 发酵产 MAS1 的最佳发酵条件进行发酵验证, 设置诱导 pH 值 6.7、诱导温度 23 °C、诱导物 IPTG 浓度为

0.65 mmol/L, 重复三次, 实验结果分别为 2 310.32、2 307.44、2 330.29 U/mL。图 8 的电泳结果表明了该策略具有可行性。王鲜芳等^[36]将用 SVM 建立了谷氨酸动态时变发酵模型, 用免疫遗传算法 (Immune Genetic Algorithm, IGA) 对一些关键操作变量进行了优化, 在发酵 28 h 时谷氨酸浓度达到了 12.05 g/L, 比

未优化前提高了 29.57%。Zhang 等^[37]用 SVM 建立了以纤维素乙醇废水为原料红酵母发酵模型, 采用 GA 对 SVM 模型寻优, 最终将生物量和脂质分别提升至 11.87 和 2.18 g/L。说明了 SVM-GA 算法可在发酵条件优化中良好应用。

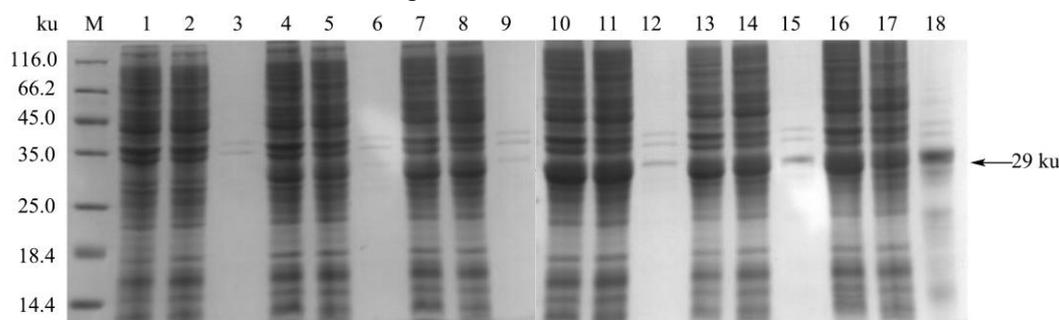


图 8 MAS1 的 SDS-PAGE 检测

Fig.8 SDS-PAGE detection of MAS1

注: M 为标准蛋白的 marker; 泳道 1~18 分别为 IPTG 诱导 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h 和 15 h 的总菌裂解液蛋白样品、裂解液上清液样品、裂解液沉淀样品。

3 结论

本研究通过对 BL21(DE3)/pET22b-MAS1 产 MAS1 的发酵条件进行模型构建, 使用 GA 对三个重要的发酵参数进行了优化。研究表明, 通过 SVM-GA 优化后的最佳发酵条件为诱导 pH 值 6.7、诱导温度 23 °C、诱导物 IPTG 浓度为 0.65 mmol/L, 优化后 MAS1 酶活力达到了 2 316.02 U/mL, 较优化前提高了 33.61%。本研究通过一系列的发酵条件优化, MAS1 的发酵表达水平有了明显的提高, 丰富了 MAS1 发酵条件优化的手段。目前在发酵罐进行的发酵条件优化限于诱导时间、诱导 pH、诱导物 IPTG 浓度和诱导温度, 后续可进行补料策略的优化以进一步提升 MAS1 的表达水平, 为实现 MAS1 的工业化应用奠定基础。

参考文献

- [1] Maruyama T, Nakajima M, Ichikawa S, et al. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2000, 77(11): 1121-1126
- [2] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C [J]. Science, 1984, 224(4654): 1249-1251
- [3] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(7): 3194-3201
- [4] Knez Z, Laudani C G, Habulin M, et al. Exploiting the pressure effect on lipase-catalyzed wax ester synthesis in dense carbon dioxide [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(6): 1366-1375
- [5] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251
- [6] Yuan D, Lan D, Xin R, et al. Screening and characterization of a thermostable lipase from marine *Streptomyces* sp. strain W007 [J]. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2016, 63(1): 41-50
- [7] Ranganathan S V, Narasimhan S L, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 3975-3981
- [8] Wang X, Li D, Qu M, et al. Immobilized MAS1 lipase showed high esterification activity in the production of triacylglycerols with n-3 polyunsaturated fatty acids [J]. Food Chemistry, 2017, 216: 260-267
- [9] Wang X, Li D, Wang W, et al. A highly efficient immobilized MAS1 lipase for the glycerolysis reaction of n-3 PUFA-rich ethyl esters [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2016, 134: 25-31
- [10] Wang X, Qin X, Li D, et al. One-step synthesis of high-yield biodiesel from waste cooking oils by a novel and highly methanol-tolerant immobilized lipase [J]. Bioresource Technology, 2017, 235: 18-24
- [11] Xu W, Xu L, Liu X, et al. An effective strategy for the production of lauric acid-enriched monoacylglycerol via enzymatic glycerolysis from black soldier fly (*Hermetia*

- illucens) larvae (bsfl) oil [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(9): 2781-2792
- [12] Wang X, Qin X, Li X, et al. An efficient synthesis of lysophosphatidylcholine enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by immobilized MAS1 lipase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(1): 242-249
- [13] Lv W, Wu C, Lin S, et al. Integrated utilization strategy for soybean oil deodorizer distillate: synergically synthesizing biodiesel and recovering bioactive compounds by a combined enzymatic process and molecular distillation [J]. ACS Omega, 2021, 6(13): 9141-9152
- [14] Lan D, Qu M, Yang B, et al. Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces* sp. strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2016, 22: 62-67
- [15] 瞿曼.脂肪酶 MAS1 的基因克隆、表达及其性质研究[D]. 广州:华南理工大学,2016
- [16] 郑杰.试验设计与数据分析:基于 R 语言应用[M].广州:华南理工大学出版社,2016
- [17] 名晓东,郭自涛,陈剑雄,等.重组大肠杆菌产卤代烷脱卤酶的发酵条件优化[J].食品与发酵工业,2022,48(13):16-24
- [18] Rani G B, Chiranjeevi T, Chandel A K, et al. Optimization of selective production media for enhanced production of xylanases in submerged fermentation by *Thielaviopsis basicola* MTCC 1467 using L16 orthogonal array [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2014, 51(10): 2508-2516
- [19] 高学金,齐咏生,王普.生物发酵过程的建模、优化与故障诊断[M].北京:科学出版社,2016:277
- [20] Sathish T, Prakasham R S. Enrichment of glutaminase production by *Bacillus subtilis* RSP-LU in submerged cultivation based on neural network-genetic algorithm approach [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2010, 85(1): 50-58
- [21] Zhu X, Rehman K U, Wang B, et al. Modern soft-sensing modeling methods for fermentation processes [J]. Sensors, 2020, 20(6):1771
- [22] Datta A, Augustin M J, Gupta N, et al. Impact localization and severity estimation on composite structure using fiber bragg grating sensors by least square support vector regression [J]. IEEE Sensors Journal, 2019, 19(12): 4463-4470
- [23] Wang B, Shahzad M, Zhu X, et al. A non-linear model predictive control based on grey-wolf optimization using least-square support vector machine for product concentration control in l-lysine fermentation [J]. Sensors, 2020, 20(11):3335
- [24] Luo C, Huang C, Cao J D, et al. Short-term traffic flow prediction based on least square support vector machine with hybrid optimization algorithm [J]. Neural Processing Letters, 2019, 50(3): 2305-2322
- [25] Zhu X, Zhu Z. The generalized predictive control of bacteria concentration in marine lysozyme fermentation process [J]. Food Science & Nutrition, 2018, 6(8): 2459-2465
- [26] Giordana A, Neri F. Genetic algorithms in machine learning [J]. AI Communications, 1996, 9(1): 21-26
- [27] Gao X J, Pu W, Qi Y S, et al. An optimal control strategy combining svm with rga for improving fermentation titer [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2010, 18(1): 95-101
- [28] 周志华,王珏.机器学习及其应用 2009[M].北京:清华大学出版社,2009
- [29] Seyfi R, Babaeipour V, Mofid M R, et al. Expression and production of recombinant scorpion as a potassium channel blocker protein in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, 66(1): 119-129
- [30] 舒畅,罗水忠,蔡静,等.重组大肠杆菌产谷氨酰胺转氨酶的发酵条件优化 [J].食品工业科技,2016,37(12):183-189
- [31] 肖硕,洪华珠,彭建新.基因工程菌中重组质粒的稳定性研究进展[J].生物技术通报,2008,4:9-12
- [32] Shahzadi I, Al-Ghamdi M A, Nadeem M S, et al. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum* [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 7145
- [33] Glick B R. Metabolic load and heterologous gene expression [J]. Biotechnology Advances, 1995, 13(2):247-261
- [34] Liang J, Zhao J, Wang Z, et al. Temperature gradient-based high-cell density fed-batch fermentation for the production of pyruvate oxidase by recombinant *E. coli* [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(2): 188-193
- [35] Paul S, Chaudhuri T K. Chaperone mediated solubilization of 69-kDa recombinant maltodextrin glucosidase in *Escherichia coli* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(1): 35-41
- [36] 王鲜芳,潘丰.基于 IGA-SVM 的发酵过程建模及优化控制 [J].计算机工程与应用,2008,28:187-192
- [37] Zhang L H, Chao B, Zhang X. Modeling and optimization of microbial lipid fermentation from cellulosic ethanol wastewater by *Rhodotorula glutinis* based on the support vector machine [J]. Bioresource Technology, 2020, 301

现代食品科技