

响应面法优化 *Alcaligenes* sp. 产脂肽生物破乳剂培养基的研究

刘佳, 黄翔峰*, 陆丽君, 闻岳, 杨殿海, 周琪

(同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要 生物破乳剂是应用于石油开采业中的新型破乳剂之一, 本研究对筛选得到的一株破乳剂产生菌(鉴定为 *Alcaligenes* sp.) 产生的脂肽类生物破乳剂进行了发酵培养基的优化, 采用 SAS 软件的响应面回归方法对培养基中主要因素进行了研究, 试验结果表明, 在碳源石蜡为 4.76%、氮源牛肉膏为 0.12%、磷源 K_2HPO_4/KH_2PO_4 为 0.53/0.8% 时, 破乳剂的产生量为最大, 比优化前提高了近一倍。

关键词: 生物破乳剂; 脂肽; 产碱杆菌; 响应面

生物表面活性剂是由微生物代谢作用产生的具有亲水基、亲油基的表面活性物质。生物破乳剂是生物表面活性剂的一种, 对原油乳状液具有破乳作用, 因此在石油开采业中具有特殊的应用价值和意义^[1,2]。由于生物破乳剂具有化学法难以合成的基团、无毒易降解、用量少效率高等特点, 目前生物破乳剂的开发与研究已是石油开采业中的研究热点之一^[3,4,5], 而生物破乳剂的培养基优化是降低生物破乳剂的成本的重要途径, 目前采用较多的方法有响应面法、正交试验法、均匀设计法^[6,7,8]。响应面法(Response surface methodology, RSM) 是一种优化过程的综合技术, 采用该法可以建立连续变量曲面模型和回归方程, 可同时对影响因变量的各因子水平及其交互作用进行优化与评价, 是降低开发成本、优化生产条件、提高产量质量的一种有效方法, 该法已经广泛地应用于生物表面活性剂发酵条件的优化研究中^[9,10]。

本研究采用响应面分析法对一株破乳剂产生菌的培养基进行了优化, 优化后生物量提高达 100%, 为后续生物破乳剂的扩大化生产提供了基础。

1 材料与方法

1.1 生物破乳剂及其产生菌

本研究所用菌种为从受石油污染的土壤中筛选得到的一株具有高效破乳能力的菌株, 并命名为

XJ-T-1, 经 VITEK2 compact 系统鉴定、16S rDNA 同源性分析及生理生化试验鉴定, 确定为产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)^[11,12], 研究发现该菌的破乳效果优于化学破乳剂, 且具有石油降解能力, 鉴定及其性质研究见文献[13]。具体筛选过程、发酵培养基及培养条件见文献[14]。

1.2 响应面法优化培养基组成

1.2.1 Plackett-Burman 二水平实验设计

采用单因素试验对 XJ-T-1 的发酵培养基分别对碳源、氮源、磷源等组分进行筛选和水平优化研究, 以对 XJ-T-1 全培养液活性高和生物量大为依据, 筛选确定了 8 个因素和其所对应的最优水平。石蜡、 $NaNO_3$ 、牛肉膏、 K_2HPO_4/KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、微量元素、丁二酸钠、柠檬酸钠 8 个因素的最优水平分别为 (100mL): 3mL、0.6g、0.15g、0.3/0.45g、0.015g、0.075 mL、0.02g、0.02g。采用 Plackett-Burman 实验设计了 8 因素 2 水平的试验设计, 每个因素取高低两种水平, 实验共有 15 个实验点, 其中 12 个为析因点, 3 个为零点。试验结果以生物量为响应值, 选择可信度大于 90% 的因素作为响应面设计的变量, 最终筛选出对生物破乳剂产量促进明显的主要因素。

1.2.2 Box-Behnken 响应面分析

Box-Behnken 提出的中心组合设计适用于 2 至 5

基金项目: 上海市科委基金资助项目“石油开采业生物表面活性剂开发研究”(项目编号 051258038); 上海市科委登山行动计划“石油开采业生物破乳剂应用关键技术研究”(项目编号 06DZ22007)。

作者简介: 刘佳(1982~), 女, 博士研究生, 研究方向为环境工程微生物。

*通讯作者, Tel: 021-65982592, E-mail: hxf@mail.tongji.edu.cn。

个因素的优化设计和试验,通过2水平试验设计得到的三个重要因素,根据Box-Behnken的中心组合实验设计原理,进一步进行3因素3水平的响应面分析试验,然后运用SAS的RSREG(响应面回归)过程,建立二次响应面回归模型,并对拟合的回归方程分析决定最优工艺参数,确定最优响应因子水平。

1.3 测试方法

1.3.1 生物量的测定

将全培养液于10000r/min离心20min(GL-20B型冷冻离心机),离心菌体用无菌水冲洗后再次离心,冲洗两遍溶解于相同体积的蒸馏水中,稀释25倍后,在580nm下测得吸光度值,用 OD_{580} 表征生物量,每个样品测定三次。

1.3.2 表面张力

全培养液的表面张力采用淄博华坤电子仪器有限公司生产的表面张力仪(DT-102)测得,每个样品测定三次。

1.3.3 生物破乳剂破乳能力评价

依据石油行业标准SY/T 5281-2000原油破乳剂使用性能检测方法(瓶试法)。原油乳状液的制备参见文献[13,14]。

2 结果与讨论

2.1 生物破乳剂有效成分的分析

Alcaligenes sp. (XJ-T-1)在石蜡发酵培养基内随培养时间变化的表面张力和生物量如图1所示。由图1可见,该菌生物量增加的同时,表面张力逐渐降低,表面活性逐渐增强,可见该菌产生的生物破乳剂为生长相关型。

取培养时间超过5d的XJ-T-1的全培养液,在原油乳状液中脱水率可达90%以上,具有很高的破乳活性;对全培养液进行离心得到上层液和离心菌体,研究发现离心菌体的破乳效果可达80%以上;对离心菌体进行烘干和灭菌处理,破乳效果仍稳定维持在80%以上。可见,*Alcaligenes* sp. (XJ-T-1)产生的破乳剂为胞壁结合型的稳定性极佳的生物破乳剂。采用索式抽提、硅胶柱层析、薄层层析法和红外光谱法分别对该菌产生的生物破乳剂进行了分离、提纯和鉴定,结果为脂肽类生物表面活性剂(另文发表)。由于该物质为胞壁结合型,结构较为复

杂,市场上尚未见标准物质出售,因此对该物质有效成分浓度的直接测定尚未找到有效方法,但由于该物质是生长相关型的,产量与菌株*Alcaligenes* sp. 细胞生长紧密结合,且研究发现 OD_{580} 与细胞干重相关性较好,因此采用操作简捷、准确的 OD_{580} 对胞壁结合型的脂肽类生物破乳剂加以表征。

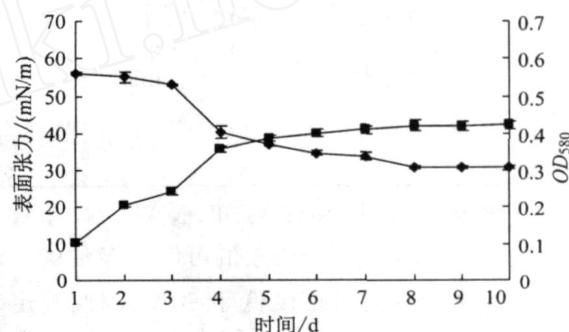


图1 XJ-T-1生物量与表面张力
随培养时间的变化

- ◆ - 表面张力 - ■ - 生物量

2.2 Plackett-Burman 试验

采用N=16的Plackett-Burman试验设计分析石蜡、 $NaNO_3$ 、牛肉膏、 K_2HPO_4/KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、微量元素、丁二酸钠、柠檬酸钠8个因素对破乳剂产量的主效应,其他因素不变,以 OD_{580} 为响应值。其试验设计与结果见表1,利用SAS软件对Plackett-Burman实验的各因素的主效应分析结果见表2。

表1 N=16的Plackett-Burman试验设计和
响应值

RUN	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	Y值(OD_{580})
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.184
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	0.670
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	0.210
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	0.472
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	0.279
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	0.671
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	0.300
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.755
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.284
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	0.819
11	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	0.252
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.813
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0.307
14	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.916
15	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	0.320
16	1	1	1	1	1	1	1	1	0.901

表 2 Plackett-Burman 试验回归分析结果

变量(variables)		水平(levles)		自由度 (DF)	平方和 (TSS)	均方差 (Mean Square)	F 值 (F value)	显著性 Pr > F	重要性排序 (significance)
符号	因素	低(-)	高(+)						
X1	石蜡	1	4	1	0.9414	0.9414	132.87	<0.0001	1
X2	NaNO ₃	0.4	0.8	1	0.0007	0.0007	0.10	0.7599	7
X3	牛肉膏	0.1	0.2	1	0.0347	0.0347	4.90	0.0625	3
X4	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	0.2/0.3	0.4/0.6	1	0.0717	0.0717	10.12	0.0155	2
X5	MgSO ₄	0.01	0.02	1	0.0036	0.0036	0.51	0.4973	4
X6	微量元素	0.05	0.1	1	0.0000	0.0000	0.00	0.9886	8
X7	丁二酸钠	0.01	0.025	1	0.0034	0.0034	0.48	0.5112	5
X8	柠檬酸钠	0.01	0.025	1	0.0016	0.0016	0.22	0.6511	6
Model				8		0.1321	18.65	0.0005	
Error				7		0.0071			
Total				15					

由表 2 的分析结果可知,碳源、牛肉膏和 K₂HPO₄/KH₂PO₄ 这三个因素的可信度都在 90 % 以上,其余 5 个因素的可信度低于 90 %,因此确定碳源、牛肉膏、K₂HPO₄/KH₂PO₄ 这三个因素作为主要影响因素进行下一步研究。另外,模型的显著性在 95 % 以上,因此对本研究模拟可以很好的解释。

2.3 响应面分析试验设计筛选重要因素

以 PB 实验确定的可信度大于 90 % 的 3 个重要因素作为自变量,其他可信度较小的因素因对产酶无太大影响,维持在较低水平的质量分数,以全培养液稀释 25 倍的 OD₅₈₀ 为响应值,采用三因素三水平的 Box-Behnken 响应面分析法进一步对培养基进行优化,设计表见表 3,试验结果见表 4。

表 3 Box-Behnken 实验因素水平

Level	X1/石蜡 (%)	X2/牛肉膏 (%)	X3/ K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (%)
- 1	3	0.1	0.3/0.45
0	4	0.2	0.4/0.6
1	5	0.3	0.5/0.75

表 4 Box-Behnken 试验设计表及其试验结果

Factor	X1	X2	X3	Y(OD ₅₈₀)
1	- 1	- 1	0	0.440
2	- 1	1	0	0.519
3	1	- 1	0	0.750
4	1	1	0	0.653
5	0	- 1	- 1	0.636
6	0	- 1	1	0.800
7	0	1	- 1	0.584
8	0	1	1	0.671
9	- 1	0	- 1	0.482
10	1	0	- 1	0.545
11	- 1	0	1	0.546
12	1	0	1	0.805
13	0	0	0	0.776
14	0	0	0	0.889
15	0	0	0	0.648

以生物量 OD₅₈₀ 为响应值,根据表 4 中的试验结果,利用 SAS 软件的响应面回归对其进行二次回归分析,回归方程的方差分析见表 5 所示,回归方程为:

$$Y = - 2.60025 + 1.02275X_1 + 4.32625X_2 + 2.91375X_3 - 0.129375X_1 * X_1 - 0.44X_2 * X_1 - 5.1125X_2 * X_2 + 0.49X_3 * X_1 - 1.925X_3 * X_2 - 4.7125X_3 * X_3$$

表 5 回归方程的方差分析结果

Source	DF	SS	t	Pr > t
X1	1	0.396074	2.58	0.0493
X2	1	2.949972	1.47	0.2024
X3	1	3.960743	0.74	0.4950
X1 * X1	1	0.043495	- 2.97	0.0310
X1 * X2	1	0.417886	- 1.05	0.3406
X1 * X3	1	4.349496	- 1.18	0.2927
X2 * X2	1	0.417886	1.17	0.2938
X2 * X3	1	4.17886	- 0.46	0.6644
X3 * X3	1	4.349496	- 1.08	0.3281

从表 5 的方差分析结果中可知二次响应面模型各项在模型中的显著概率水平,在显著水平 $\alpha = 0.10$ 时,只有 X1 和 X1 * X1 在模型中是显著的。对该模型中的三因子显著性检验的结果见表 6 所示。

表 6 三因子显著性检验结果

Factor	DF	SS	MS	F value	Pr > F
X1	4	0.152494	0.038123	5.46	0.0455
X2	4	0.023827	0.005957	0.85	0.5487
X3	4	0.060614	0.015154	2.17	0.2090

从表 6 对三个因子的检验中,可看出 X1 在 0.1 水平上是显著的,显著水平为 0.0455,而 X2、X3 不显著。纵上所述,在显著水平 $\alpha = 0.10$ 时,X2、X3 是不显著的,而只有 X1 和 X1 * X1 是显著的。对该模型中的线性项显著性检验的结果见表 7 所示。

表7 模型中线性项分析

	DF	TSS	R-Square	F value	Pr > F
Linear 线性	3	0.119623	0.4866	5.71	0.0453
Quadratic 二次项	3	0.072473	0.2948	3.46	0.1075
Crossproduct 交叉项	3	0.018830	0.0766	0.90	0.5034
Total Regress 总回归	9	0.210926	0.8579	3.36	0.0979

由表7中可知,一次项的Pr值为0.0453,在模型中是显著的,二次响应面回归模型是显著的,Pr值为0.0979。另外,拟合不足检验概率为0.9315,说明拟合不足是不显著的,因此该模型可以很好的解释。

2.4 响应面的典型分析

响应面的典型分析是对原始数据进行标准化处理后的分析,由于原始数据就是标准化的数据,所以输出没有变化,说明预测值是一个稳定点,从表8中可知,稳定点坐标为 $X_1 = 4.76051$, $X_2 = 0.117992$, $X_3 = 0.532548$,在稳定点的最大预测值为 $Y = 0.865244$ 。即TR-1培养基优化过程中,在碳源石蜡为4.76%、氮源牛肉膏为0.12%、磷源 K_2HPO_4/KH_2PO_4 为0.53/0.8%时,破乳剂的产生量为最大。

表8 响应面的典型分析结果(临界值)

Factor	Coded	Uncoded
X_1	0.760510	4.760510
X_2	-0.820077	0.117992
X_3	1.325480	0.532548/0.798822

表9 响应面的典型分析结果(特征向量)*

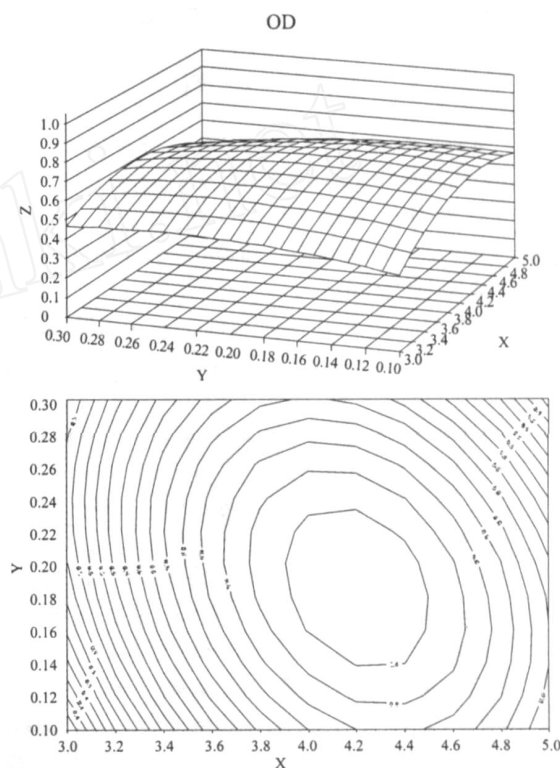
Eigenvalues	X_1	X_2	X_3
-0.028556	0.310327	-0.612546	0.726969
-0.058935	-0.012774	0.761968	0.647489
-0.140133	0.950544	0.210220	-0.228635

*该分析结果是针对的Coded的数据进行的分析。

表9反应了特征向量与特征值之间的关系。由表9可知,对应于最大特征值(-0.140133)的特征向量方向的最大分量同 X_2 有关,次大特征值(-0.058935)与 X_2 有关,最小特征值(-0.028556)同 X_3 有关,而第三个特征值比前两个小,这表明响应面对于该因子 X_3 的改变不灵敏。因此,可将 X_3 的值固定在最小值,即为0.3,为方便作图,将 X_1 、 X_2 、 Y 分别用 X 、 Y 、 Z 代替,得到两因子的二次曲面模型为:

$$Z = -2.15025 + 1.16975 * X + 3.74875 * Y - 0.129375 * X * X - 0.44 * X * Y - 5.1125 * Y * Y$$

由此模型得到 $Z = f(X, Y)$ 的响应面立体分析图和等高线图,如图2所示。

图2 $Z = f(X, Y)$ 响应面立体分析图和相应等高图

2.5 验证试验

在以上优化培养基结果的基础上进行验证试验,采用三次重复摇瓶试验,验证试验测定的生物量 OD_{580} 的平均值为0.875,生物量比优化前得到的0.423提高了近100%,预测值0.865与试验值之间的良好拟合性可以证实该模型具有有效性。

3 结论

3.1 本研究对筛选得到的一株 *Alcaligenes* sp. 采用响应面分析法对培养基进行了优化,采用 Plackett-Burman 设计了2水平8因素的试验,最终确定了碳源、牛肉膏、 K_2HPO_4/KH_2PO_4 这三个因素作为主要影响因素。

3.2 采用响应面分析法(RSM)确定了3个主要因素的最优水平,碳源石蜡为4.76%、氮源牛肉膏为0.12%、磷源 K_2HPO_4/KH_2PO_4 为0.53/0.8%。

3.3 在优化后的培养基中,测得实际得到的生物量

的平均值为 0.875,比优化前的 0.423 提高了近 100%,验证试验表明该模型具有有效性。后续研究将以此为基础,考察发酵罐中进行发酵的参数确定。

参 考 文 献

- [1] Kosaric N, Duvnjak Z, Cairns L W. De-emulsification of complex petroleum emulsions by use of microbial biomass. *Environmental Progress*, 1987, 6(1): 33~38
- [2] Kosaric N. Biosurfactants in industry. *Pure & Appl Chem*, 1992, 64(11): 1731~1737
- [3] Das M. Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species. *Bioresource Technology*, 2001, 79(4): 15~22.
- [4] Nadarajah N, Singh A, Ward O P. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18(5): 435~440
- [5] Park S H, Lee J H, Ko S H, *et al.* Demulsification of oil-in-water emulsions by aerial spores of a *Streptomyces* sp. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(17): 1389~1395
- [6] Rodrigues L, Teixeira J, Oliveria R, *et al.* Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*, 2006, 41(1): 1~10
- [7] Amezcua-Vega C, Poggi-Varaldo H M, Esparza-Garcia F, *et al.* Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresource Technology*, 2007, 98(1): 237~240
- [8] Wu J Y, Yeh K L, Lu W B, *et al.* Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolate from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*. 2008, 99(5): 1157~1164
- [9] 欧宏宇,贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用. *天津轻工业学院学报*, 2001, 1: 14~39
- [10] 邓祖新. SAS 系统和数据分析. 北京: 电子工业出版社, 2002
- [11] Wilkinson M A, Cooper D G. Testing of microbial demulsifiers with heavy crude emulsions. *Biotechnology Letter*, 1985, 7(6): 406~408
- [12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001. 180~181
- [13] 陆丽君,黄翔峰,刘佳,等. 一株高效生物表面活性剂产生菌的筛选鉴定及其性能研究. *工业微生物*, 2008, 38(5), 出版中
- [14] 黄翔峰,闻岳,陆丽君,等. 破乳菌种 TR-1 的筛选与破乳性能实验研究. *油田化学*, 2006, 23(2): 136~150

Optimization of fermentation conditions for lipid bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. using response surface methodology

LIU Jia, HUANG Xiang-feng, LU Li-jun, WEN Yue, YANG Dian-hai, ZHOU Qi

(College of Environmental Science & Engineering, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai, 200092)

Abstract In the oil exploration industry, de-emulsification of emulsion plays an important role in increasing oil usage ratio and decreasing the erosion of treatment facilities. In this paper, one bacterial strain with the function of high de-emulsification ratio was successfully isolated from the contaminated oilfield soil through microbial incubation and selection methods, which was identified as *Alcaligenes* species. With the aid of SAS 8.0 software the main variables of the culture medium was analyzed by the means of response surface methodology. The stationary point was given with the optimal concentration as follows: carbon source 4.76%, nitrogen source 0.12%, phosphate 0.53/0.8%. As a result, the biomass was increased by 100%.

Key words bio-demulsifier; lipopeptide; *Alcaligenes* sp; response surface methodology