

# 响应面法优化 $\beta$ -聚苹果酸 发酵培养基的研究

程媛媛, 郑谊丰, 王丽燕, 周华\*, 韦萍

(南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 210009)

**摘要:** 采用响应面法对出芽短梗霉菌发酵制备  $\beta$ -聚苹果酸的培养基进行优化。使用 Plackett-Burman (P-B) 实验设计对培养基中相关因素进行评价, 筛选出有显著影响效应的因素。通过最陡爬坡实验、中心复合实验设计及响应面分析确定主要影响因素的最佳浓度及回归模型, 并经实验验证模型的可行性。优化后三种显著影响因素: 葡萄糖、丁二酸铵和碳酸钙, 最佳浓度分别为: 110.91、3.66、45.30 g/L,  $\beta$ -聚苹果酸的发酵产量达到 41.36 g/L, 较优化前的 20.74 g/L 提高了 199%。

**关键词:**  $\beta$ -聚苹果酸, 出芽短梗霉菌, 响应面, 优化

## Medium optimization for the production of poly( $\beta$ -malic acid) using response surface methodology

CHENG Yuan-yuan, ZHENG Yi-feng, WANG Li-yan, ZHOU Hua\*, WEI Ping

(Institute of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Reports on the optimization of poly( $\beta$ -malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* BSO<sub>4</sub> using a response surface approach. First, Plackett-Burman design was adopted to select the most important nutrients influencing the yield of PMLA. After identifying three critical factors, the optimal region of PMLA production was found by steepest ascent approach. Then response surface methodology was used to develop a mathematical model also to identify the optimum concentrations of the key nutrients for higher PMLA production and confirm its validity experimentally. The analysis indicated that PMLA production was increased significantly by 199%, from 20.74 g/L to 41.36 g/L where concentrations of glucose, succinate ammonium and calcium carbonate were at 110.91, 3.66, 45.30 g/L.

**Key words:** poly( $\beta$ -malic acid); *Aureobasidium pullulans*; response surface methodology; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)05-0197-03

聚苹果酸 (poly( $\beta$ -malic acid), PMLA) 是以 L-苹果酸 (L-malate, MLA) 为唯一单体构成的水溶性高分子聚合物, 因其良好的水溶性和生物降解性<sup>[1-2]</sup>, 在医药和日化领域有广泛的应用前景<sup>[3-4]</sup>。PMLA 首先由 Shimada 等<sup>[5]</sup> 从圆弧青霉菌中分离得到, 有  $\alpha$ - $\beta$  和  $\alpha$ ,  $\beta$  三种构型, 微生物发酵一般得到  $\beta$  型<sup>[6]</sup>。PMLA 可由多种黏菌和丝状真菌合成<sup>[7]</sup>, 据报道短梗霉菌生产 PMLA 的能力较强, 产量随菌株性质的不同而变化, 产量范围为每升发酵液 12g 到 60g 聚苹果酸钠盐或钙盐<sup>[8]</sup>。Nagata 等<sup>[6]</sup> 使用 *Aureobasidium sp.* 生产胞外聚合物 PMLA 的产量可达 47g/L, 刘双江等<sup>[9]</sup> 使用 *Aureobasidium pullulans* 可得

发酵液中 PMLA 的产量约为 9.8g/L, 而 *P. polycephalum* 生产 PMLA 的产量则仅为 3.3g/L<sup>[10]</sup>。目前发酵法制备 PMLA 总体发酵水平偏低, 无法满足规模化应用的需要。本文针对 *Aureobasidium pullulans* BSO<sub>4</sub> 发酵制备 PMLA 体系, 选用响应面法进行培养基成分优化, 以期提高 PMLA 的发酵产量, 为 PMLA 的应用奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* BSO<sub>4</sub> 本实验室保藏; 斜面培养基 PDA 培养基; 种子培养基 (g/L) 葡萄糖 80, 磷酸二氢钾 0.1, 丁二酸铵 3, 丁二酸 2, 硫酸镁 0.04, 七水合硫酸锌 0.005, 玉米浆 0.5, pH4.5; 摇瓶培养基 (g/L) 葡萄糖 120, 丁二酸铵 3, 磷酸二氢钾 0.1, 柠檬酸 2, 一水合硫酸锰 0.05, 七水合硫酸锌 0.01, 玉米浆 0.5, 碳酸钙 40 (单独灭菌), pH4.5。

#### 1.2 实验方法

收稿日期: 2010-05-04 \* 通讯联系人

作者简介: 程媛媛 (1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵优化。

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目 (08KJB530005)。

1.2.1 培养方法 种子培养:挑取一环斜面菌种接种于 50mL/250mL 的摇瓶中活化 3d 后,按 4% 的接种量转接入另一种子培养基中,24℃ 220r/min 摇床培养 3d。摇瓶培养:4% 的接种量接至 100mL/500mL 的摇瓶培养基中,24℃ 220r/min 摇床培养 216h。

### 1.2.2 分析测定

1.2.2.1 残糖测定 发酵液经离心(8000r/min, 20min)除去菌体和沉淀,取上清液使用 SBA-40C 型生物传感分析仪测定。

1.2.2.2 PMLA 的测定 取上清液加入等体积的 1mol/L 硫酸水解过夜,采用 Goodban 法<sup>[11]</sup>测定,据标准曲线计算 PMLA 的浓度。

### 1.2.3 培养基优化方法

1.2.3.1 Plackett-Burman(P-B)实验设计 P-B 实验设计可快速筛选出影响显著的因素。以葡萄糖(A)、丁二酸铵(B)、磷酸二氢钾(C)、柠檬酸(D)、一水合硫酸镁(E)、七水合硫酸锌(F)、玉米浆(G)、碳酸钙(H)为培养基成分因素,对各因素分别取正、负两水平,正水平为负水平的 1.25 倍,本实验选用 N = 12 的 P-B 实验设计,各因素的编码水平见表 1,采用 STATISTICA 8.0 软件进行数据分析。

表 1 Plackett-Burman 实验设计及 PMLA 产量

实验号	因素								PMLA 产量(g/L)
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	33.75
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	22.84
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	25.68
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	19.82
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	12.73
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	36.74
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	29.12
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	38.59
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	38.06
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	12.06
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	37.75
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	20.74

1.2.3.2 最陡爬坡实验 据 P-B 实验结果筛选出关键因素。起显著正效应的关键因素,取最高值,反之取其最低值。根据关键因素水平高低选取适当步长,以快速逼近产量最高组,其他因素取值则根据各自效应的正负和大小确定。进行最陡爬坡实验,得 PMLA 产量最高的一组实验点(中心点)。

1.2.3.3 中心复合实验 为进一步检验关键因素对 PMLA 生产的影响,实验选取三因素标准中心复合实验设计,设葡萄糖、丁二酸铵、碳酸钙的浓度分别为  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ ,每个中心点取高、中、低三水平,同时增加 4 组中心实验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Plackett-Burman 实验

表 2 显示各变量水平及 P-B 实验结果的方差分析。Coeff. 值决定各实验因子的影响程度,绝对值大表明对产量的提高有积极的意义;而绝对值小或为零则表明所起作用较小或不起作用。P 值作为检验每个 Coeff. 值意义的工具,可显示 Coeff. 值随机变化

的概率。分析可知碳酸钙的影响最大,丁二酸铵次之,且均为正效应( $P < 0.05$ ),应增加二者的量;葡萄糖的 P 值为负,相应的应将量减少。

表 2 Plackett-Burman 实验水平及其主效应分析

因素	水平(g/L)		t 值	P 值	F 值	Coeff. 值
	-1	1				
A	120	180	-5.2850	-0.0132	27.9464	-4.3333
B	2	3	0.1880	0.8636	0.0350	0.1533
C	3	4.5	4.0177	0.0277	16.1419	3.2933
D	0.1	0.15	-0.5668	0.6114	0.3200	-0.4633
E	0.05	0.1	-0.0161	0.9881	0.0003	-0.0133
F	0.01	0.02	1.9540	0.1457	3.8180	1.6017
G	0.5	0.75	0.0120	0.9910	0.0002	0.0100
H	40	60	8.9036	0.0030	79.2738	7.2983

### 2.2 最陡爬坡实验

根据 P-B 实验结果进行主效应分析。选定葡萄糖、丁二酸铵和碳酸钙三个关键因素进行最陡爬坡实验。由表 3 数据可知,PMLA 产量随关键因素浓度的改变而变化,产量最高的为第 3 组,可达 43.06g/L,说明该组实验的葡萄糖、丁二酸铵和碳酸钙浓度接近最优。故选第 3 组为中心点,用于培养基组成的进一步优化。

表 3 最陡爬坡实验设计及结果

实验号	葡萄糖(g/L)	丁二酸铵(g/L)	碳酸钙(g/L)	PMLA 产量(g/L)
1	120	3.0	40	39.31
2	116	3.4	42	40.80
3	112	3.8	44	43.06
4	108	4.2	46	37.19
5	104	4.6	48	38.20
6	100	5.0	50	29.73

### 2.3 中心复合实验

按表 4 设计进行中心复合实验及表面响应分析。分析结果如表 5, $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  的 P 值均小于 0.05,表明对 PMLA 产量的影响是统计显著的;而  $X_1 X_2$  为边界显著( $P < 0.1$ )。以上因素在建立模型时需加以

表 4 中心复合实验及结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	PMLA 产量(g/L)
1	104.00	2.80	34.00	38.35
2	104.00	2.80	54.00	37.24
3	104.00	4.80	34.00	34.54
4	104.00	4.80	54.00	35.70
5	120.00	2.80	34.00	34.93
6	120.00	2.80	54.00	36.47
7	120.00	4.80	34.00	38.01
8	120.00	4.80	54.00	35.99
9	98.55	3.80	44.00	37.24
10	125.45	3.80	44.00	34.40
11	112.00	2.12	44.00	36.18
12	112.00	5.48	44.00	33.00
13	112.00	3.80	27.18	36.05
14	112.00	3.80	60.82	36.26
15(C)	112.00	3.80	44.00	43.80
16(C)	112.00	3.80	44.00	43.61
17(C)	112.00	3.80	44.00	41.38
18(C)	112.00	3.80	44.00	42.63

表5 中心复合实验结果参数值

参数	截距	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>
Coeff.	42.72	-0.74	-0.59	0.37	-6.29	-2.74	-1.64	1.67	-0.40	-0.16
Std.Err.	0.72	1.30	0.79	0.86	2.36	0.84	0.87	1.74	1.55	1.03
t 值	59.22	-1.14	-1.50	0.86	-5.32	-6.54	-3.77	1.92	-0.52	-0.31
P 值	<0.01	0.29	0.17	0.41	<0.01	<0.01	0.01	0.09	0.62	0.76

考虑。其他因素的 P 值均大于 0.1,对产量的影响不明显。建模时可忽略。由此可得 PMLA 产量预测的二次关联表达式为:

$$y_{pred} = 41.41 - 0.67x_2 - 1.72x_1^2 - 2.15x_2^2 - 1.60x_3^2 + 0.93x_1x_2 \quad \text{式(1)}$$

相关性系数 R<sup>2</sup> 与模型的可信度一致: R<sup>2</sup> 越大,可信度越高。由软件分析得 R<sup>2</sup> = 0.9032,表明方程(1)可解释 90.32% 的 PMLA 产量变化,拟合较好。当固定一个关键因素值在中心点时,可得另外两因素的三维响应面图,显示各实验因素的响应关系及其在产量最高时的最优水平<sup>[12]</sup>。图 1 中 a~c 分别显示当前研究的响应面点与另两关键因素之间的关系。通过典型相关性分析,预测产量最高可达 42.81g/L,此时葡萄糖、丁二酸铵、碳酸钙的最佳浓度分别为: 110.91、3.66、45.30g/L。经实验验证,PMLA 的实际平均产量可达 41.36g/L,与模型预测值基本相当。

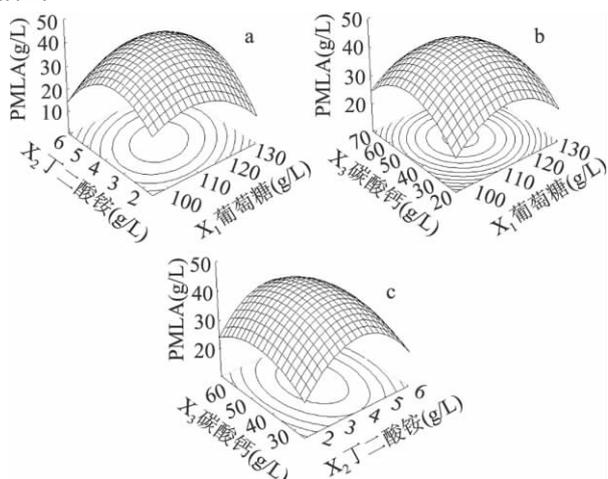


图1 PMLA 生产的响应面图

注: a.丁二酸铵和葡萄糖的关系; b.碳酸钙和葡萄糖的关系; c.碳酸钙与丁二酸铵的关系。

### 3 结论

首次将响应面分析法应用于出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* BSO<sub>4</sub> 制备 PMLA 的发酵培养基体系。分析表明葡萄糖、丁二酸铵和碳酸钙三因素对发酵产量影响较大,优化后三者最佳浓度分别为: 110.91、3.66、45.30g/L,出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* BSO<sub>4</sub> 发酵分泌 PMLA 的水平从 20.74g/L 提高到 41.36g/L,较发酵前产量提高了 199%。PMLA

的积累明显提高,为 PMLA 的进一步研究应用奠定了基础。

### 参考文献

[1] 戈进杰.生物降解高分子材料及其应用[M].北京:化学工业出版社 2002:80-81.

[2] Mimaud V J, Barbaud C, Caruelle J P, et al. Bioactive functionalized polymer of malic acid for bone repair and muscle regeneration [J]. *Biomater Sci Polymer Edn*, 2000, 11 (9): 979-991.

[3] Manabu F, Natalya M K, Alexander V L, et al. Inhibition of laminin-8 in vivo using a novel poly(malic acid)-based carrier reduces glioma angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2006 (9): 183-191.

[4] Portilla-Arias J A, Garcí a - Alvarez M, Martí nez de Ilarduya A, et al. Synthesis, Degradability, and Drug Releasing Properties of Methyl Esters of Fungal Poly(β L-malic acid) [J]. *Macromolecular Bioscience* 2008(8): 540-550.

[5] Shimada K, Matsushima K, Fukumoto J, et al. Poly-(L)-malic acid, a new protease inhibitor from penicillium cyclopium [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969, 35: 619-624.

[6] Nagata N, Nakahara T, Tabuchi T. Fermentative production of poly(β - malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium sp.* [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57(4): 638-642.

[7] Rathberger K, Reisner H, Willibald B H, et al. Comparative synthesis and hydrolytic degradation of poly(L - malate) by myxomycetes and fungi [J]. *Mycol Res*, 1999, 103: 513-520.

[8] 土肥義治, A 斯泰因比歇尔. 陈国强主译. 生物高分子[M]. 第3a卷. 北京: 化学工业出版社 2004: 79-109.

[9] Liu S-J, Steinbüchel A. Investigation of poly(β - L - malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 46: 273-278.

[10] Lee B-S, Holler E. Effects of culture conditions on β-poly(L - malate) production by *Physarum polycephalum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 647-652.

[11] Goodban A E. Rapid method for determination of malic acid [J]. *Analytical Chemistry*, 1957, 29(2): 283-287.

[12] Haider M A, Pakshirajan K. Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statistically designed experiments [J]. *Appl Biochem Biotechnol* 2007, 141: 377-390.

《食品工业科技》愿为企业铺路、搭桥!