

絮凝活性菌株培养条件的 响应面优化

李明珠, 王玉田*, 张莉力, 赵卉双

(辽宁医学院食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121001)

摘要:选取对甘薯淀粉具有明显絮凝效果的活性菌株,利用响应面分析法对其培养条件进行优化。在单因素实验的基础上,采用Box-Behnken中心组合实验设计,以初始pH、接种量、培养温度和培养时间四个因素为响应因子,絮凝率为响应值分析各因子与絮凝率之间的影响关系。最终建立二次回归方程为 $Y_1 = -103.602 + 5.166X_1 + 5.848X_2 + 8.312X_3 + 0.0580X_4 - 1.028X_1X_1 - 0.14X_1X_2 + 0.263X_1X_3 + 0.0185X_1X_4 - 0.141X_2X_2 - 0.097X_2X_3 - 0.003X_2X_4 - 0.166X_3X_3 - 0.002X_3X_4 - 0.0006X_4X_4$,并得到相关系数 $R^2 = 0.9550$,对各因子的显著性及交互作用分析后,确定了最佳培养条件为:初始pH6.0、接种量8%、培养温度27℃、培养时间48h。在此培养条件下絮凝率的理论值为48.72%,重复验证值为48.65%。

关键词:絮凝活性菌株,响应面法,培养条件

Optimization of culture conditions of flocculating activity strains by response surface methodology

LI Ming-zhu, WANG Yu-tian*, ZHANG Li-li, ZHAO Hui-shuang

(Food Science and Engineering College, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract:Select a strain which has significant flocculation activity towards sweet potato starch,the culture conditions for this flocculation activity strain were optimized by response surface analysis. Based on single-factor experiment,four response factors including initial pH,inoculation,cultivating temperature and cultivating time were selected as response factors and flocculation rate was used as response value,which figured out the relationship between factors and flocculation rates with Box-Behnken central composite experiment. Finally the quadratic regression equation was built: $Y_1 = -103.602 + 5.166X_1 + 5.848X_2 + 8.312X_3 + 0.0580X_4 - 1.028X_1X_1 - 0.14X_1X_2 + 0.263X_1X_3 + 0.0185X_1X_4 - 0.141X_2X_2 - 0.097X_2X_3 - 0.003X_2X_4 - 0.166X_3X_3 - 0.002X_3X_4 - 0.0006X_4X_4$ and the correlation coefficient was $R^2 = 0.9550$. By analyzing the significant impact and the interaction of each factor,the optimum culture conditions were determined as follows:initial pH of 6.0,inoculation of 8%,cultivating temperature of 27℃,cultivating time of 48h. Under this culture conditions,the theoretical value of the flocculation rate was 48.72% and the verified value was 48.65%.

Key words:flocculation activity of strain; response surface method; culture conditions

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)05-0170-04

絮凝是使水中或液体中悬浮微粒集聚变大,或形成絮团,从而加快粒子的聚沉,达到固-液分离的目的,这一现象或操作称作絮凝,在此过程中用到的助剂称为絮凝剂。目前使用的絮凝剂可分为金属盐类、有机高分子絮凝剂、无机高分子絮凝剂和微生物絮凝剂^[1]。微生物絮凝剂是一类由微生物在生长过程中产生的,可使液体中不易降解的固体悬浮颗粒凝聚、沉淀的特殊高分子代谢产物,其化学成分主要是

糖蛋白、蛋白质、多糖和核酸等物质^[2-3]。日本科学家在二十世纪七十年代从酞酸酯生物降解过程中发现了具有絮凝作用的微生物培养液^[4]。此后,生物絮凝剂被广泛研究,许多具有絮凝活性的菌株如霉菌、酵母菌、细菌和放线菌都已经可以从土壤和废水中分离筛选出来^[5],并广泛应用于污水处理、给水和饮用水及乳化液的油水分离^[6],而应用于甘薯淀粉生产的报道却很少。本实验采用对甘薯淀粉有很好絮凝效果的活性菌株为研究菌株,对该絮凝活性菌株培养过程中影响絮凝率的4个主要因素(初始pH、接种量、培养时间、培养温度)进行单因素实验,在此基础上进行Box-Behnken中心组合实验设计,经过响应面法优化分析得到二次回归方程的预测模型,探求最佳

收稿日期:2011-06-13 * 通讯联系人

作者简介:李明珠(1987-),男,硕士,研究方向:食品生物技术。

基金项目:肉制品深加工关键技术研究与新产品开发(2010402004);
辽宁医学院博士启动基金。

培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

絮凝活性菌株 由本实验室从酸浆中分离纯化所得;甘薯 购于锦州市农贸市场;蛋白胨、酵母粉、牛肉膏等 均为生化试剂;葡萄糖、乙酸钠、硫酸锰等 均为分析纯。

组织捣碎机、低速离心机、分析天平、双人无菌操作台、紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;PHS—3B型精密pH计 上海雷磁仪器厂;数显立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;生化培养箱 上海医用分析仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 淀粉乳制备 选取新鲜无病害的甘薯,清理其表面杂物,清水冲洗干净后,切成小块,按料液比1:3于组织捣碎机中搅拌粉碎10min,用4~6层纱布过滤除去甘薯渣混匀备用。

甘薯汁培养基:将甘薯清洗干净,去皮切成小块,按1:5比例加水煮沸20min,用纱布过滤后取滤液4000r/min离心10min,取上清液分装灭菌备用。

1.2.2 絮凝率的测定^[7] 在25mL量筒中加入25mL淀粉乳,摇匀,静置2min。加入2mL混匀的乳酸菌培养液,混合、搅拌,静置沉降3min,在液面下3mL处取样。用紫外可见分光光度计在波长550nm处测定吸取上清液吸光度,以未接菌的空白培养基代替上清液作对照实验,絮凝率公式如下:

$$\text{絮凝率}(\%) = (A - B) / A \times 100\%$$

其中:A—空白上清液的吸光度;B—样品上清液的吸光度。

1.2.3 单因素实验 根据影响絮凝率的主要因素和微生物发酵过程中的控制条件,结合实际生产需要选择初始pH、接种量、培养时间、培养温度四个因素进行单因素实验,按照1.2.2的方法测定絮凝率,结果取每组三次平行实验的平均值。

1.2.4 培养条件的优化实验设计 在单因素实验的基础上采用Box—Behnken中心组合实验设计,以初始pH、接种量、培养时间和培养温度为响应因子,絮凝率为响应值,借助SAS8.0进行结果分析,确定最佳培养条件。实验因素和水平见表1。

表1 响应面分析的因素与水平

Table 1 Factors and levels of Box—Behnken experimental design

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 初始pH	5	6	7
X ₂ 接种量(%)	6	8	10
X ₃ 培养温度(°C)	25	27.5	30
X ₄ 培养时间(h)	36	48	60

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 初始pH对絮凝率的影响 将接种量为6%的5组发酵培养基的pH分别调整至4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,于25°C的条件下静止培养48h后测定絮凝率,结果如图1所示。

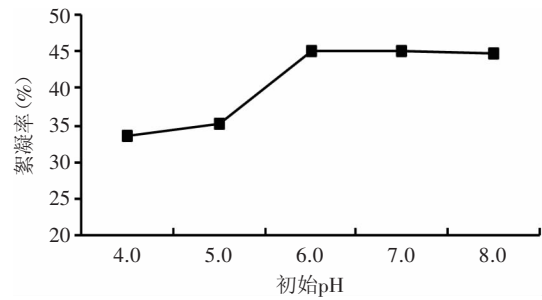


图1 初始pH对絮凝率的影响

Fig.1 Effect of pH on the flocculating activity

图1表明,当发酵液的初始pH在5.0~6.0之间时随着初始pH的增大,絮凝率也会相应增大;当初始pH超过6.0时,随着初始pH的增高絮凝率不再增加,甚至有下降的趋势。由于培养基的初始pH直接影响细菌的生长状态,进而影响絮凝的产生,所以初始pH过高或过低均对絮凝不利。

2.1.2 接种量对絮凝率的影响 取培养24h的种子液,分别按4%、6%、8%、10%、12% (v/v)接种至5组发酵培养基中,初始pH调至7.0,于25°C的条件下静止培养48h,测定絮凝率,结果如图2所示。

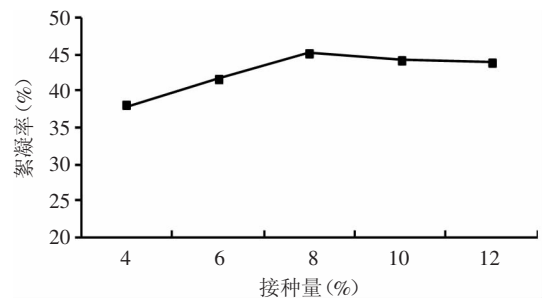


图2 接种量对絮凝率的影响

Fig.2 Effect of inoculation amount on the flocculating activity

图2表明,接种量4%时絮凝率最低,随着接种量的增加絮凝率逐步升高,在接种量为8%~12%之间时絮凝率趋于平缓。当接种量较少时,发酵液中的菌体数量少,絮凝率就会较低;而增大接种量会造成不必要的浪费且会对发酵不利,影响絮凝率。

2.1.3 培养温度对絮凝率的影响 将接种量为6%的6组发酵培养基pH调至7.0分别于15、20、25、30、35、40°C下培养48h,测定絮凝率,结果如图3所示。

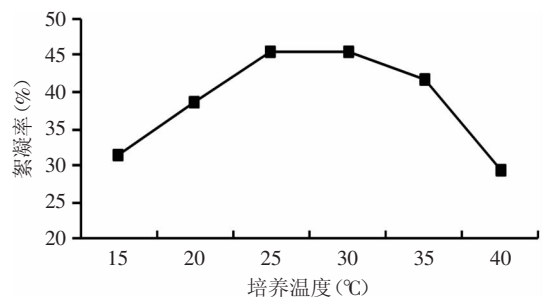


图3 培养温度对絮凝率的影响

Fig.3 Effect of temperature on the flocculating activity

图3表明温度对絮凝率的影响较大,在25~30°C范围内,发酵液的絮凝率最大,即活性菌株的最适生长温度范围。当温度高于30°C时,由于絮凝因子在高

温的情况下可能变性失活, 丧失絮凝活性, 所以絮凝率就会随着温度的升高而降低。

2.1.4 培养时间对絮凝率的影响 将接种量为6%的5组发酵培养基pH调至7.0, 在25℃下分别培养24、36、48、60、72h后测定絮凝率, 结果如图4所示。

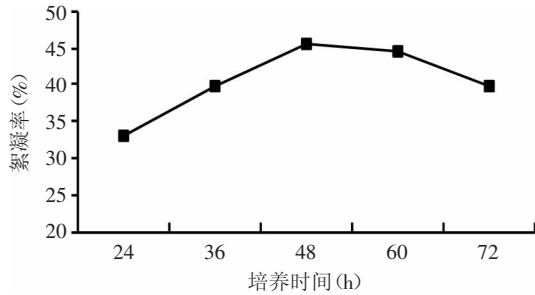


图4 培养时间对絮凝率的影响

Fig.4 Effect of incubation time on the flocculating activity

图4表明, 培养时间在48h左右发酵液的絮凝率最大。初始一段时间发酵液的絮凝率随着培养时间的延长而增大, 继而在一定时间段内保持稳定, 随后因为营养物质的消耗及菌体产生的废弃物积累抑制菌体的生长, 影响絮凝活性物质的效用导致絮凝率的下降。

2.2 响应面法优化培养条件

2.2.1 模型的建立与显著性检验 按照SAS8.0中的Box-Behnken中心组合设计法得到的响应面具体实验方案及结果, 如表2所示。

表2 响应面分析实验方案与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and responding value

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	絮凝率 (%)
1	-1	-1	0	0	47.12
2	-1	1	0	0	47.72
3	1	-1	0	0	47.03
4	1	1	0	0	46.51
5	0	0	-1	-1	47.62
6	0	0	-1	1	48.23
7	0	0	1	-1	47.02
8	0	0	1	1	47.35
9	-1	0	0	-1	47.81
10	-1	0	0	1	48.11
11	1	0	0	-1	46.94
12	1	0	0	1	48.13
13	0	-1	-1	0	47.13
14	0	-1	1	0	47.65
15	0	1	-1	0	47.84
16	0	1	1	0	46.43
17	-1	0	-1	0	47.94
18	-1	0	1	0	45.56
19	1	0	-1	0	46.70
20	1	0	1	0	46.95
21	0	-1	0	-1	48.03
22	0	-1	0	1	48.55
23	0	1	0	-1	47.98
24	0	1	0	1	48.24
25	0	0	0	0	48.80
26	0	0	0	0	48.75
27	0	0	0	0	48.86

根据实验结果, 对实验数据进行多元回归拟合分析, 建立全模型回归方程:

$$Y = -103.602 + 5.166X_1 + 5.848X_2 + 8.312X_3 + 0.0580X_4 - 1.028X_1X_1 - 0.14X_1X_2 + 0.263X_1X_3 + 0.0185X_1X_4 - 0.141X_2X_2 - 0.097X_2X_3 - 0.003X_2X_4 - 0.166X_3X_3 - 0.002X_3X_4 - 0.0006X_4X_4;$$

并对回归方程进行方差分析, 结果见表3。

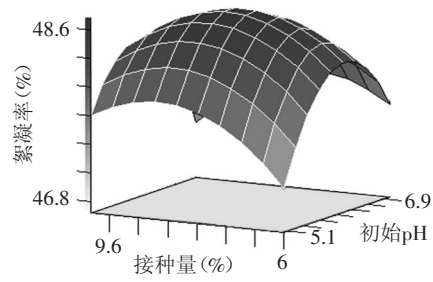
表3 回归方程各项的方差分析

Table 3 Results of variance analysis for regression equation

来源	均方	平方和	F值	Prob>F	显著性
X ₁	0.333	0.333	5.313	0.040	*
X ₂	0.052	0.052	0.829	0.381	-
X ₃	1.688	1.688	26.89	<0.001	**
X ₄	0.859	0.859	13.69	0.003	*
X ₁ X ₁	5.635	5.635	89.82	<0.001	**
X ₁ X ₂	0.314	0.314	4.998	0.045	*
X ₁ X ₃	1.729	1.729	27.56	<0.001	**
X ₁ X ₄	0.198	0.198	3.156	0.101	-
X ₂ X ₂	1.698	1.698	27.06	<0.001	**
X ₂ X ₃	0.931	0.931	14.84	0.002	*
X ₂ X ₄	0.017	0.017	0.269	0.613	-
X ₃ X ₃	5.773	5.773	92.02	<0.001	**
X ₃ X ₄	0.020	0.020	0.312	0.586	-
X ₄ X ₄	0.045	0.045	0.714	0.415	-
模型	15.97	1.141	18.18	<0.001	**

注: *为显著(Prob<0.05); **为极显著(Prob<0.001)。

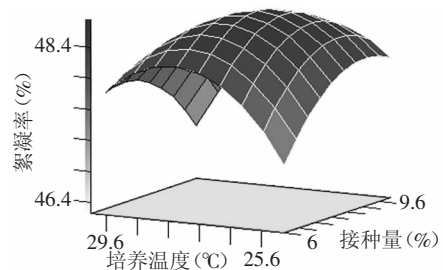
表3的分析结果表明, 初始pH与培养时间对絮凝率的影响显著, 培养温度的影响极显著, 接种量的影响不显著; 交互项中初始pH与接种量、接种量与培养温度交互显著, 初始pH与培养温度交互极显著; 二次项中初始pH、培养温度与接种量影响极显著。絮凝率与四个因素的回归模型F值为18.18, “Prob>F”值<0.001,



培养温度(℃)=27.5 培养时间(h)=48

图5 初始pH与接种量的响应面图

Fig.5 Response surface stereogram versus pH and inoculation amount



初始pH=6 培养时间(h)=48

图6 接种量与培养温度的响应面图

Fig.6 Response surface stereogram versus inoculation amount and temperature

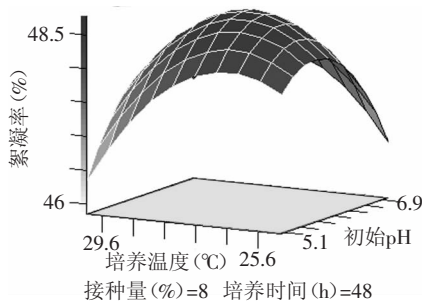


图7 初始pH与培养温度的响应面图

Fig.7 Response surface stereogram versus pH and temperature

表明二次方程模型达到极显著水平,可以很好地反映絮凝率与各因素之间的关系。回归方程的决定系数 R^2 为0.9550,表明回归模型和预测值之间有较好的拟合度,因此该模型可用于预测絮凝率的实际情况。

根据回归方程,做出响应面图,结果见图5~图7。

由图5~图7的响应面图可知,响应值存在最大值。在图5中,絮凝率随着初始pH的增加表现出先上升后下降的趋势,影响絮凝率的主要影响因子是初始pH;由图6可知,在一定初始pH范围内,絮凝率随着温度的降低而逐渐升高,温度在26.4~28℃范围内絮凝率出现最大值;在图7中,絮凝率随培养温度发生的变化比较明显,曲线陡峭。但是絮凝率随着接种量的变化不太明显,交互作用中培养温度对絮凝率的影响较接种量显著。

2.2.2 最优培养条件的预测与检验 通过回归模型的预测,得到絮凝活性菌株的最优培养条件为初始pH5.81、接种量8.24%、培养温度26.71℃、培养时间48.14h,预测响应值为48.72%。为验证响应面法的可靠性,采用上述培养条件进行6次验证实验,考虑到

(上接第169页)

3.4 正交实验中以葡萄糖、牛肉膏和 NH_4Cl 作为优化菌株产内切 β -1,3-葡聚糖酶的实验因素,发现对产酶的影响主次因素是:葡萄糖>牛肉膏> NH_4Cl ,从而得到裂褶菌产内切 β -1,3-葡聚糖酶的最佳培养基配方为:葡萄糖2%,牛肉膏0.3%, NH_4Cl 0.1%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4$ 0.05%。

参考文献

[1] 李兆兰. 裂褶多糖的结构研究[J]. 南京大学学报:自然科学版,1994,30(3):482-486.
 [2] Kikumoto S, Yamamoto O, Komatsu N. Method of producing neoschizophyllan having novel pharmacological activity[J]. United States Patent, 1978(4):661.
 [3] Prokop A, Rapp P, Wanger F. Production purification and characterization of an extracellular endo- β -1,3-glucanase from a eukaryote of schizophyllum commune ATCC 38548 defective in exo- β -1,3-glucanase formation[J]. Can J Microbiol, 1995, 40: 18-23.
 [4] Chernin L, Chet I. Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: Dick R P and Burns R G eds., Enzyme in the Environment[J]. New York: Marcel Dekker, 2002:

实际操作性,将培养条件修正为初始pH6.0、接种量8%、培养温度27℃、培养时间48h。实际测得絮凝率为48.65%,与理论值误差约0.1%。因此,响应面法得到的最优培养条件数据准确可靠,具有实际操作价值。

3 结论

通过单因素实验和Box-Behnken实验设计以及响应面分析对絮凝活性菌株的培养条件进行优化,得到的最优培养条件为初始pH6.0、接种量8%、培养温度27℃、培养时间48h。得到的回归方程模型极显著,对实验拟合度较好。

参考文献

[1] 王艳,苗康康,胡登卫,等. 絮凝剂的研究进展[J]. 化工时刊,2010,24(8):53-58.
 [2] 毛艳丽,闫永胜,刘瑞群,等. 微生物絮凝剂及其产生菌的研究新进展[J]. 微生物学通报,2008,35(10):1616-1620.
 [3] 王卫平,朱凤香,陈晓暘,等. 微生物絮凝剂的研究进展及其应用前景[J]. 安徽农学通报,2009,15(19):45-48.
 [4] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Conditions for production of microbial cell flocculent by *Aspergillus sojae* AJ7002[J]. Agric Biol Chem, 1976, 40(7):1314-1347.
 [5] 曾常华,林波. 新型微生物絮凝剂的研究进展[J]. 环境科学与管理,2007,32(2):54-57.
 [6] 高孟臣,张馨予,曲东旭. 浅谈微生物絮凝剂(MBF)物质组成和应用[J]. 山西建筑,2010,36(16):147-148.
 [7] Vinderola, Medici, G Perdigón. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria C G[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96:230-243.
 [8] Chet I, Chernin L. Biocontrol, microbial agents in soil// Bitton G ed, Encyclopedia of environmental microbiology[J]. New York: John Wiley and Son Inc, 2002:450-465.
 [9] 郑文科,乔长晟,郝利民,等. 四种生长因子对裂褶菌胞外多糖产量影响的优化研究[J]. 食品工业科技,2009,30(5):181-183,187.
 [10] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社,1982.
 [11] Jianguang Luo, Jun Liu, Chunling Ke. Optimization of medium composition for the production of exopolysaccharides from *Phellinus baumii* Pilát in submerged culture and the immunostimulating activity of exopolysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(3):409-415.
 [12] Katarfna Kolenová, Mária Vršanská. Purification and characterization of two minor endo- β -1,4-xylanases of *Schizophyllum commune*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(7):903-910.
 [13] S G Jonathan, I O Fasidi. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria[J]. Food Chemistry, 2001, 75(3):303-307.