

响应面法优化可得然胶发酵培养基

袁方¹,赵双枝^{2,3,*},苏理^{2,3},张彦昊^{2,3},郭宏明⁴

(1.齐鲁工业大学食品与生物工程学院,山东济南 250353;

2.山东省食品发酵工业研究设计院,山东济南 250013;

3.山东省食品发酵工程重点实验室,山东济南 250013;

4.泰兴市一鸣生物制品有限公司,江苏泰兴 225433)

摘要:可得然胶是细菌在氮源限制条件下生成的水不溶性胞外多糖。发酵培养基的各组分分配比对可得然胶的产量有极大的影响。因此,优化发酵培养基对提高可得然胶产量有重要意义。本文采用响应面分析法对可得然胶的发酵培养基进行优化设计。通过Plackett-Burman实验进行重要因素筛选,得出影响可得然胶产量的主要因素为:蔗糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 MgSO_4 和玉米浆。利用最陡爬坡实验逼近响应区域,应用Box-Behnken实验设计和响应面法分析优化得到最佳的发酵培养基为:蔗糖61g/L、 MgSO_4 1g/L、玉米浆2.5mL/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.4g/L、 KH_2PO_4 1.4g/L、 CaCO_3 1.4g/L。发酵结果(47.73g/L)与优化之前(35.2g/L)的可得然胶产量进行比较,优化后的产量提高了35.6%。

关键词:可得然胶,响应面,优化,培养基

Optimization of fermentation medium for curdlan by response surface methodology

YUAN Fang¹, ZHAO Shuang-zhi^{2,3,*}, SU Li^{2,3}, ZHANG Yan-hao^{2,3}, GUO Hong-ming⁴

(1. QILU University of Technology-School of Food & Bioengineering, Jinan 250353, China;

2. Shandong Food Ferment Industry Research & Design Institute, Jinan 250013, China;

3. Shandong Food & Fermentation Engineering Research Major Laboratory, Jinan 250013, China;

4. Taixing Yiming Biological Products Co., Ltd., Taixing 225433, China)

Abstract: Curdlan is a water insoluble exopolysaccharide produced by bacteria under nitrogen-limiting conditions. Curdlan production is great impacted by distribution ratio for each group of fermentation medium wall. Thus optimization of fermentation medium is important to curdlan production. The fermentation medium of curdlan were optimized by the response surface methodology. First, Plackett-Burman design was adopted to screen out the important factors affecting the output of curdlan: sucrose, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 and corn syrup. Then the path of the steepest ascent was utilized to approach the optimal region. At last, the optimized medium was obtained by Box-Behnken design and response surface methodology. Under the condition (sucrose 61g/L, MgSO_4 1g/L, corn syrup 2.5mL/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.4g/L, KH_2PO_4 1.4g/L, CaCO_3 1.4g/L), the result of fermentation (47.73g/L) was increased by about 35.6% compared with the previous condition (35.2g/L).

Key words: curdlan; response surface methods; optimization; medium

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)24-0150-05

微生物多糖是微生物在代谢过程中天然合成的聚合物^[1],具有安全、无毒等优良的理化性质及其他方面的特性。因此,在生物多糖领域中微生物多糖是近数十年来的研究热点^[2]。

可得然胶(curdlan)最初是由日本大阪大学的原田教授^[3]通过一株名为 *Alcaligenes faecalis* Var—*mgxgenes* 10C3的细菌发酵得到的细胞外多糖。1996年美国FDA批准并允许可得然胶作为一种直接的添加剂用于食品行业^[4]。我国从1999年开始把可得然胶作为食品添加剂开发的重点^[5],2006年,我国批准可

得然胶作为新型的食品添加剂。

提高产量是发酵生产的关键,培养基配方对可得然胶产量影响较大,因此培养基优化工作非常必要^[6]。国内对可得然胶培养基优化方面的研究报道较少。李卫旗等^[7]通过对可得然胶产生菌株的诱变,获得1株遗传性状稳定,可得然胶产量为29.1g/L的菌株。詹晓北等^[8]通过研究发现,培养基中 NH_4Cl 浓度提高到3.6g/L时,可得然胶的产量可达30.5g/L。近几年来,对可得然胶的研究主要集中于应用方面,对基础发酵方面的研究报道较少。本文主要从提高多糖产量的角度出发,通过对可得然胶发酵培养基的优化,以期获得更高的得率。

由于发酵培养基是由多成分组成,且各成分之

收稿日期:2013-07-30 *通讯联系人

作者简介:袁方(1989-),男,在读硕士研究生,研究方向:微生物多糖。

间可能相互影响^[9],因此单靠单因素和正交实验很难快速得到较好较严密的结果。本研究将PB筛选和响应面分析联合应用于可得然胶发酵培养基的优化,即采用PB设计方法考察6个实验因素,通过统计学筛选出4个关键因素,进一步利用Box-Behnken中心组合设计对这4个关键因素进行响应面优化分析,再通过实验验证,获得最佳发酵培养基配方。从而使可得然胶的产量得到较大幅度的提高,降低了生产成本,提高了工作效率,为可得然胶的工业化大生产奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

菌种 山东省食品发酵工业研究设计院保藏的一株粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*);蔗糖 分析纯,天津广成化学试剂厂;蛋白胨、牛肉膏、琼脂 均为生物试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠 分析纯,天津福晨化学试剂厂;磷酸二氢钾、硫酸镁、磷酸氢二铵 均为分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司;玉米浆 试剂级,山东寿光巨能金玉米公司;碳酸钙 分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;95%乙醇 食品级,山东众信集团酒精分公司。

3924托盘天平 北京大栅栏天平厂;YXQ02手提式压力蒸汽灭菌锅 山东安得医疗科技有限公司;YX600W卧式压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗器械有限公司;TDL-5-A离心机 上海安亭科学仪器厂;SW-59-278洁净工作台 廊坊鹏彩精细化工有限公司;GNP-9080隔水式恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司;PHS-25 pH计 上海大普仪器有限公司;HZQ-Y振荡培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 斜面培养基:蔗糖10g/L,牛肉膏3g/L,蛋白胨5g/L,NaCl 5g/L,玉米浆1.5mL/L,琼脂15g/L,调节pH至7.0。

种子培养基:蔗糖20g/L,(NH₄)₂HPO₄ 5g/L,KH₂PO₄ 1.5g/L,MgSO₄ 1g/L,玉米浆1.5mL/L,CaCO₃ 3g/L,调节pH至7.2。

基础发酵培养基:蔗糖40g/L,(NH₄)₂HPO₄ 1.6g/L,KH₂PO₄ 1.4g/L,MgSO₄ 0.7g/L,玉米浆1.7mL/L,CaCO₃ 1.4g/L,调节pH至7.0。

1.2.2 斜面菌种制备 将保存的菌种用划线的方法接种到新鲜的斜面培养基上,放置于恒温培养箱中,30℃培养3d。

1.2.3 种子培养 取一环活化好的斜面菌种,接入到装有80mL种子培养基的500mL三角瓶中,30℃,200r/min,摇床培养24h,即为种子液。

1.2.4 发酵培养 按5%的接种量,将种子液接入到装有80mL发酵培养基的500mL三角瓶中,30℃,200r/min,摇床培养5d。

1.2.5 可得然胶得率测定方法 发酵液于离心机中5000r/min离心20min,移出上清液,沉淀中加入2倍体积的95%乙醇,充分混合,使多糖凝聚沉淀,3000r/min离心5min,对沉淀用95%乙醇清洗一次,烘

干后称重。

1.2.6 可得然胶得率的计算 取100mL发酵液,根据1.2.5得率测定方法,进行得率计算。公式如下:

$$N=W/V$$

式中: N —得率,g/L; W —所取发酵液中多糖干重,g; V —所取发酵液体积,L。

1.3 实验设计

1.3.1 P-B实验设计 参考他人研究结果^[10-11]及本实验室前期研究结果^[12-13],选用 $N=12$ 的Plackett-Burman实验设计,对蔗糖、(NH₄)₂HPO₄、KH₂PO₄、MgSO₄、玉米浆、CaCO₃进行考察,另外取5个虚拟项进行误差估计,并取3组实验中心点作为对照。每个因素取2个水平,高水平编码为+1,低水平编码为-1,实验中心点编码为0,以可得然胶的得率为响应值,各因素取值水平见表1。

表1 Plackett-Burman实验因素与水平
Table 1 Levels and factors of Plackett-Burman

因素	水平		
	-1	0	+1
A 蔗糖(g/L)	40	50	60
B (NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	1.6	2.0	2.4
C KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.4	1.7	2.0
D MgSO ₄ (g/L)	0.7	0.85	1.0
E CaCO ₃ (g/L)	1.4	1.7	2.0
F 玉米浆(mL/L)	1.7	2.1	2.5

1.3.2 最陡爬坡实验设计 在最陡爬坡实验在Plackett-Burman实验设计得到的多元一次方程的基础上,根据其系数的正负及大小,来确定爬坡的方向和步长,正因素增加用量,负因素减少用量^[14]。设计主要因素蔗糖、(NH₄)₂HPO₄、MgSO₄、玉米浆的最陡爬坡实验。

1.3.3 响应面分析实验 根据Box-Behnken实验的实验原理,利用Design Expert 8.0软件,在爬坡实验结果的基础上,以蔗糖、MgSO₄、玉米浆、(NH₄)₂HPO₄为因子,以可得然胶得率为指标,进行4因素3水平实验,因素水平表见表2。

表2 Box-Behnken实验因素与水平
Table 2 Levels and factors of Box-Behnken

因素	水平		
	-1	0	+1
A 蔗糖(g/L)	50	60	70
B (NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	2.0	2.4	2.8
D MgSO ₄ (g/L)	0.85	1.0	1.15
F 玉米浆(mL/L)	2.1	2.5	2.9

1.4 数据处理

利用Design Expert 8.0进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman实验

按照 $N=12$ 的Plackett-Burman设计进行实验,每组3个平行,响应值为3组平行实验得率的平均值。

Plackett-Burman实验设计及响应值见表3,各因素效应及显著性分析见表4。

表3 Plackett-Burman实验设计与结果

Table 3 Plackett-Burman experimental design and results

实验号	A	B	C	D	E	F	Y 得率(g/L)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	35.2
2	-1	1	1	1	-1	-1	30.2
3	-1	-1	-1	1	-1	1	32.4
4	1	-1	1	1	1	-1	39.6
5	-1	1	-1	1	1	-1	36.3
6	0	0	0	0	0	0	39.7
7	1	-1	-1	-1	1	-1	42.4
8	1	1	1	-1	-1	-1	45.6
9	-1	1	1	-1	1	1	37.2
10	1	1	-1	-1	-1	1	50.4
11	0	0	0	0	0	0	40
12	-1	-1	1	-1	1	1	40.1
13	1	1	-1	1	1	1	48.3
14	1	-1	1	1	-1	1	41.2
15	0	0	0	0	0	0	40.2

表4 各因素效应值及显著性分析

Table 4 Various factors effect value and significance analysis

方差来源	效应	F值	p值	显著性
模型		15.59	0.0005	
A	9.35	64.28	<0.0001	**
B	2.85	5.97	0.0403	*
C	-1.85	2.52	0.1513	不显著
D	-3.82	10.71	0.0113	*
E	1.48	1.62	0.2391	不显著
F	3.38	8.42	0.0199	*
		$R^2=0.9212$	$R^2_{Adj}=0.8621$	

注:**, $p<0.01$,极显著;*, $p<0.05$,显著;表7同。

6个因素对响应值的影响大小依次是:A>D>F>B>C>E,即蔗糖>MgSO₄>玉米浆>(NH₄)₂HPO₄>KH₂PO₄>CaCO₃,其中A(蔗糖)、B((NH₄)₂HPO₄)、D(MgSO₄)和F(玉米浆)对可得然胶的影响显著,因此以上4个因素是影响可得然胶得率最重要的因素,而其他成分对可得然胶产量影响不显著^[15]。

多元回归方程: $Y=39.92+4.68A+1.43B-0.93C-1.91D+0.74E+1.69F$ 。模型的决定系数 $R^2=92.12\%$,表明该模型拟合较好,具有较高的可信度。且整体模型的 p 值<0.001,表明该多元回归方程高度显著^[16]。

2.2 最陡爬坡实验

响应面拟合方程只有在邻近区域内才能更接近真实情况,在其他区域内的拟合方程毫无意义。因此快速逼近最大响应区域才能有效地建立响应面拟合方程^[17]。由PB实验分析可知,A、B和F在方程中系数为正,是显著正因素,在最陡爬坡实验中其用量应增加;D在方程中系数为负,是显著负因素,在最陡爬坡实验中其用量应减少。由于其他因素的影响效应非

常小,所以将其维持原始水平,对A、B、D、F进行最陡爬坡实验,根据效应的大小来确定爬坡步长,以尽快逼近最大响应区域,实验设计与结果见表5。

表5 最陡爬坡实验设计与结果

Table 5 Design and results of the steepest ascent experiment

实验号	A(g/L)	B(g/L)	D(g/L)	F(mL/L)	得率(g/L)
1	40	1.6	1.3	1.7	27.7
2	50	2.0	1.15	2.1	37.0
3	60	2.4	1.0	2.5	46.8
4	70	2.8	0.85	2.9	41.9
5	80	3.2	0.7	3.3	39.6

2.3 Box-Behnken实验设计和响应面分析

由表5可知,最优条件在第3组附近,因此将其作为后续响应面实验的中心点。根据最陡爬坡实验确定的Box-Behnken设计的中心点,设计4因素3水平实验。Box-Behnken实验设计及结果见表6,为使拟合方程具有旋转性和通用性,中心点重复5次。

以可得然胶得率为响应值,根据表6的实验结

表6 Box-Behnken实验设计与结果

Table 6 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A	B	D	F	y: 得率(g/L)
1	-1	1	0	0	39.2
2	1	-1	0	0	40.8
3	0	1	0	1	43.2
4	0	0	0	0	46.8
5	0	0	1	-1	44.7
6	0	0	1	1	43.5
7	0	0	0	0	47.5
8	-1	0	-1	0	39.7
9	1	1	0	0	41.2
10	-1	0	1	0	37.3
11	0	0	-1	1	45.8
12	1	0	1	0	41.7
13	-1	-1	0	0	38.3
14	0	0	0	0	47.9
15	1	0	0	1	40.9
16	1	0	-1	0	41.7
17	1	0	0	-1	40.3
18	0	-1	0	-1	46.2
19	0	1	-1	0	45.5
20	0	0	0	0	46.7
21	0	-1	1	0	44.1
22	0	0	-1	-1	44.7
23	0	-1	-1	0	44.3
24	0	1	0	-1	46.6
25	0	1	1	0	43.7
26	-1	0	0	1	39.5
27	0	-1	0	1	46.3
28	-1	0	0	-1	38.5
29	0	0	0	0	47.3

果,用Design Expert 8.0软件对数据进行二次回归分析。得到的回归方程为 $y=47.24+1.18A-0.56D-0.15F-0.05B+0.6AD-0.1AF-0.12AB-0.57DF-0.4DB-0.87FB-6.14A^2-1.44D^2-F^2-1.1B^2$ 。方程的回归系数检验与方差分析见表7。

表7 回归方程方差分析表

Table 7 Analysis results of regression and variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	272.29	14	19.45	26.82	<0.0001	**
A	16.57	1	16.57	22.84	0.0003	**
D	3.74	1	3.74	5.16	0.0395	*
F	0.27	1	0.27	0.37	0.5516	
B	0.03	1	0.03	0.041	0.8418	
AD	1.44	1	1.44	1.99	0.1807	
AF	0.04	1	0.04	0.055	0.8177	
AB	0.063	1	0.063	0.086	0.7734	
DF	1.32	1	1.32	1.82	0.1983	
DB	0.64	1	0.64	0.88	0.3635	
FB	3.06	1	3.06	4.22	0.0591	
A ²	244.27	1	244.27	336.78	<0.0001	**
D ²	13.39	1	13.39	18.46	0.0007	**
F ²	6.48	1	6.48	8.93	0.0098	**
B ²	7.84	1	7.84	10.8	0.0054	**
残差	10.15	14	0.73			
失拟性	9.16	10	0.92	3.69	0.1097	不显著
纯误差	0.99	4	0.25			
总离差	282.45	28				
		$R^2=0.9640$		$R^2_{Adj}=0.9281$		

根据表7的分析可以看出,模型的相关方差 $R^2=96.4%$,调整后的 $R^2=96.15%$,说明通过Design Expert 8.0软件设计出的模型与实际实验的拟合很好,该模型可以很好地预测可得然胶发酵培养基组分与得率之间的关系。且整体模型的 $p<0.0001$,表明该二次方程模型极其显著,可以用来对响应值进行预测,从而获得最佳的培养基组成。

根据表7的检验结果,A(蔗糖)和D($MgSO_4$)对得率影响均显著,F(玉米浆)和B($(NH_4)_2HPO_4$)的影响不显著。二次项影响显著且系数为负,说明抛物面开口向下,有最大值。

利用Design Expert 8.0软件,以得率最大为目标进行培养基优化。得到的最终优化结果为:蔗糖60.88g/L、 $MgSO_4$ 0.97g/L、玉米浆2.48mL/L、 $(NH_4)_2HPO_4$ 2.41g/L,此时预测的得率最大值为47.96g/L。

为了更直观地描述4个因素对响应值的影响,做出模型分析图,见图1~图6。响应面分析图是特定的响应值y与因素A、B、D、F构成的三维空间在二维平面上的等高图。在每个分析图中,对2个因素进行分析,其余2个因素固定在零水平,可以直观地反映出各因素的交互作用及对响应值的影响。

图1~图6中几个曲面的极值点不明显,但可较直观地看出各因素及其交互作用对可得然胶得率的影响,具有一定的参考价值。

响,具有一定的参考价值。

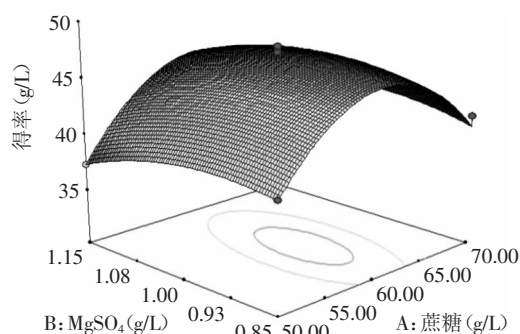


图1 (蔗糖、硫酸镁)响应面分析图

Fig.1 Response surface analysis chart (sucrose, $MgSO_4$)

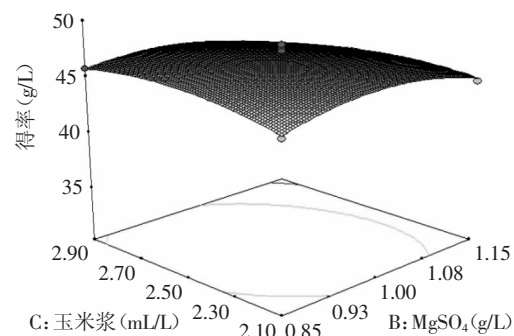


图2 (硫酸镁、玉米浆)响应面分析图

Fig.2 Response surface analysis chart ($MgSO_4$, corn syrup)

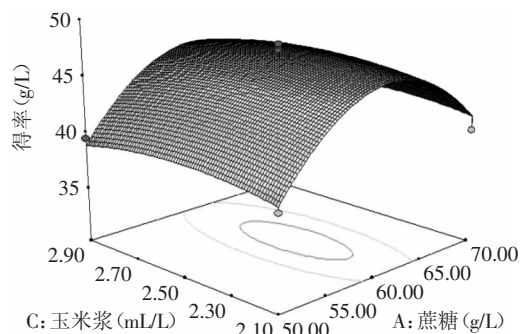


图3 (蔗糖、玉米浆)响应面分析图

Fig.3 Response surface analysis chart (sucrose, corn syrup)

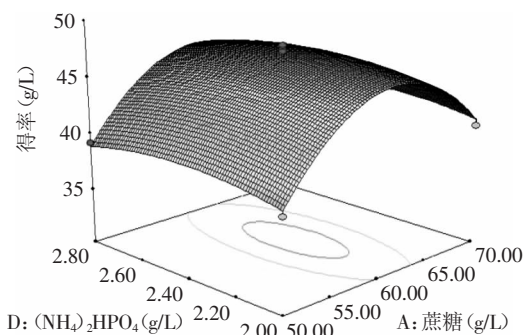


图4 (蔗糖、磷酸氢二铵)响应面分析图

Fig.4 Response surface analysis chart (sucrose, $(NH_4)_2HPO_4$)

图1~图3表明玉米浆对可得然胶得率影响的显著性不明显,而蔗糖和 $MgSO_4$ 对得率的影响较为显著。

著, 过高或过低的蔗糖和 $MgSO_4$ 用量都会使可得然胶的得率降低, 其中蔗糖的影响更为显著, 蔗糖和 $MgSO_4$ 的用量有最适值。图5表明 $(NH_4)_2HPO_4$ 对可得然胶得率影响不明显。图6进一步验证了玉米浆和 $(NH_4)_2HPO_4$ 对可得然胶得率的影响均不显著, 与方差分析结果吻合。

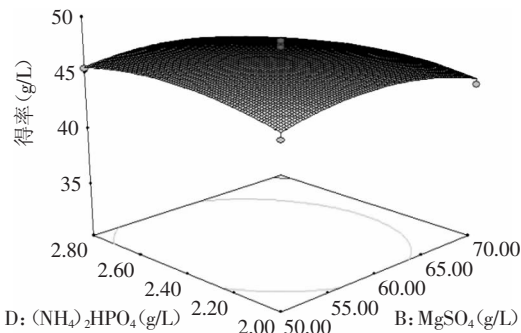


图5 (硫酸镁、磷酸氢二铵) 响应面分析图

Fig.5 Response surface analysis chart ($MgSO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$)

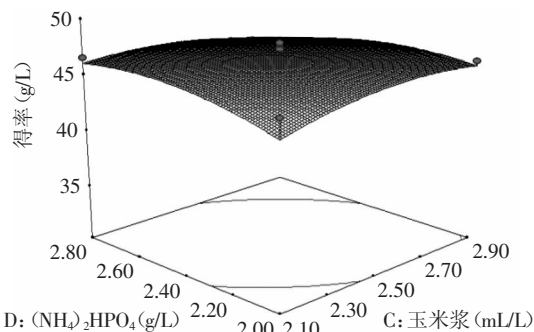


图6 (玉米浆、磷酸氢二铵) 响应面分析图

Fig.6 Response surface analysis chart (corn syrup, $(NH_4)_2HPO_4$)

2.4 最佳培养基条件验证

为了验证实验设计的可靠性, 对上述的优化条件进行3次验证实验, 并根据实际情况, 将配方调整为蔗糖61g/L、 $MgSO_4$ 1g/L、玉米浆2.5mL/L、 $(NH_4)_2HPO_4$ 2.4g/L, 由于其他因素的影响效应非常小, 所以将其维持原始水平, 即 KH_2PO_4 1.4g/L、 $CaCO_3$ 1.4g/L。可得然胶平均产量为47.73g/L, 与预测值十分接近。说明利用响应面法寻求最佳培养基的方法是完全可行的, 可得然胶的得率也得到了很大的提高。

3 结论

通过对可得然胶发酵培养基进行响应面优化研究, 最终确定最佳的发酵培养基组分为: 蔗糖61g/L、 $MgSO_4$ 1g/L、玉米浆2.5mL/L、 $(NH_4)_2HPO_4$ 2.4g/L、 KH_2PO_4

1.4g/L、 $CaCO_3$ 1.4g/L, 可得然胶的得率高达47.73g/L, 比优化前提高了35.6%, 比他人研究结果^[8]提高了56.49%。

参考文献

- [1] 王磊. 微生物多糖—热凝胶发酵工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2002.
- [2] 曹稳, 张宝善, 苏风贤. 凝胶多糖及其应用的研究进展[J]. 陕西农业科学, 2007, 6: 127-130.
- [3] Harada T, Misaki A, Saito H. Curdlan: a bacterial gel-forming beta-1, 3-glucan[J]. Arch Biochem Biophys, 1968, 124(1): 292-298.
- [4] Zheng Z Y, Lee J W, Zhan X B, et al. Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis*[J]. Biotechnol Bioproc Eng, 2007, 11: 359-365.
- [5] 叶锋, 周玉杰, 张建安, 等. 凝胶多糖制备及应用研究进展[J]. 现代化工, 2007, 27(2): 125-128.
- [6] Kim M K, Ryu KE, Choi WA, et al. Enhanced production of (1-3)-beta-D-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species[J]. Biochemistry Engineering, 2003, 16: 163-168.
- [7] 李卫旗, 何国庆. 60Co gamma射线诱变选育热凝胶多糖高产菌株的研究[J]. 核农学报, 2003, 17(5): 343-346.
- [8] 孙永生, 王磊, 詹晓北, 等. 氮源 NH_4Cl 浓度对粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)发酵生产热凝胶的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 328-331.
- [9] 李寅, 高海军, 陈坚. 高细胞密度发酵技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 56-68.
- [10] 董学前. 微生物发酵生产可得然胶的研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [11] 刘惠. 微生物胞外多糖—热凝胶发酵和干燥工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [12] 赵双枝, 吉武科, 张彦昊. 放射性土壤杆菌产可得然胶最佳条件的研究[J]. 山东食品发酵, 2010, 3: 28-32.
- [13] 张海龙, 赵双枝, 董学前. 放射性土壤杆菌产可得然胶液体发酵工艺研究[J]. 中国食物与营养, 2011, 2: 42-45.
- [14] 陈正杰, 朱婉萍, 张书衍, 等. 新型抗真菌代谢产物发酵条件的响应面优化[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2011, 45(10): 1868-1876.
- [15] 薛正莲, 高理所, 赵世光, 等. L-天冬氨酸-beta-脱羧酶发酵条件的响应面优化[J]. 工业微生物, 2011, 41(6): 11-14.
- [16] 葛洪, 张占军, 房诗宏, 等. 棉籽粕多菌种固体发酵条件的响应面优化研究[J]. 饲料工业, 2011, 32(24): 57-61.
- [17] 白卫东, 沈棚, 钱敏, 等. 响应面优化花生酸奶发酵工艺研究[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(4): 51-54.

欢迎光临我们的网站

www.spgykj.com