

响应面法优化酿酒酵母产油脂条件

杨实权 张喜成 刘军锋 王芳 谭天伟 邓利*

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京市生物加工过程重点实验室 生物炼制教育部工程研究中心 北京 100029)

摘要: 运用响应面法对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)产油脂以及发酵条件优化进行了研究。首先根据单因素实验结果,利用 Plackett-Burman 设计对影响其产油脂相关因素进行评估并筛选出具有显著效应的 3 个因素:柠檬酸, CaCl_2 和初始 pH 值。接着用最陡爬坡试验逼近以上 3 个因子的最大响应区域后,采用 Box-Behnken 设计以及响应面分析法,确定其优化后发酵条件为(w/v):葡萄糖 15%,蛋白胨 0.2%,酵母浸粉 0.4%,柠檬酸 0.471%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CaCl_2 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, 初始 pH 值为 6.74, 180 r/min, 30°C 培养 96 h。优化后的油脂产率(干重)达到 14.55%, 比在种子培养基中油脂产率 4.76%提高了 2 倍左右。

关键词: 酿酒酵母, 油脂, 响应面法, 优化

Response Surface Methodology to Optimize Lipid Production Conditions by *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Shi-Quan ZHANG Xi-Cheng LIU Jun-Feng WANG Fang
TAN Tian-Wei DENG Li*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, The Key Laboratory of Bioprocess of Beijing, The Biorefinery Research and Engineering Center of the Ministry of Education of China, Beijing 100029, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was employed to optimize culture medium for lipid production of *Saccharomyces cerevisiae*. Firstly, according to the results of mono-factors experiment, a Plackett-Burman design was used to investigate the effects of different factors in the ferment medium, three statistically significant factors are: citric acid, CaCl_2 , initial pH value, and then steepest ascent procedures was employed to define optimal response region for these three factors. Finally, Box-Behnken was employed to design. The results of experiments was analyzed by RSM with Minitab15.0 soft. The optimal lipid production medium is: glucose 15%, peptone 0.2%, yeast extraction 0.4%, citric acid 0.471%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CaCl_2 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, initial pH value 6.74, 180 r/min, 30°C for 96 h. Lipid production (dry weight) after optimization is increased from 4.76% to 14.55%. The yield of lipid is increased by about 2 times.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Lipid, Response surface methodology, Optimization

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2007CB707804, 2007CB714304); 国家自然科学基金项目(No. 20876012, 20876011); 北京市自然科学基金(No. 2071002); 北京市教育委员会共建项目专项资助

* 通讯作者: Tel: 86-10-64414543; 邮箱: dengli@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2009-06-12; 接受日期: 2009-09-01

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

微生物油脂, 又称单细胞油脂, 是指某些微生物包括酵母菌、霉菌和藻类等在内过量贮存的脂肪酸甘油酯^[1]。微生物细胞通常仅含 2%–3% 油脂, 但少数微生物含油脂率却可达 70% 以上^[2], 所以高含油脂量使微生物油脂实际开发成为可能。现在用于生产多不饱和脂肪酸的微生物主要为藻类、细菌和真菌, 由于细菌产量低, 所以目前主要集中在藻类和真菌^[3]。而对于产油脂酵母来说, 目前已研究过富含油脂的酵母主要有: 棕酵母、假丝酵母 (*Candida*)、油脂酵母 (*Endomyces vernali*) 等, 含油脂量达 30%–70%^[4]。而酿酒酵母是与人类关系最广泛的一种酵母, 不仅因为传统上它用于制作面包和馒头等食品及酿酒, 在现代分子和细胞生物学中用作真核模式生物, 其作用相当于原核的模式生物大肠杆菌。目前少有文献对酿酒酵母产油脂进行研究, 并且研究酿酒酵母中的油脂产量对于提高酿酒酵母的使用价值也具有一定意义。

本文首次通过前期实验对影响酿酒酵母产油脂的单因素条件进行了筛选和水平分析, 后利用响应面法 (RSM)^[5] 对酿酒酵母的产油脂发酵条件进行了优化。运用 Plackett-Burman 设计^[6]、最陡爬坡实验^[7] 以及 Box-Behnken 设计^[8] 和 RSM 法得到酿酒酵母产油脂发酵培养基。所有实验设计和结果的统计分析由 Minitab 15.0 统计软件^[9] 辅助完成。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YS58, 中国科学院微生物研究所张博润研究员赠送。

1.2 培养基及培养条件

种子培养基 (YPD): 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母浸粉 10 g/L。

Plackett-Burman 实验和 RSM 实验发酵培养基 (g/L): 按照实验设计配置培养基, 取活化好的菌株到种子培养基, 30°C、180 r/min 培养 26 h 后, 以 10% (V/V) 的接种量接入发酵培养基, 装液量为 50 mL (250 mL 三角瓶), 30°C、180 r/min 培养。所有培养基 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 油脂产量分析方法

采用反复冻融以及超声波破壁和有机溶剂提取相结合方法。按照实验设计把培养后的发酵菌液离心后水洗, 反复冻融后在超声波下再次破壁, 烘干后用研钵研成粉末状后分装试管, 加入体积比为 2:1 的三氯甲烷、甲醇, 混匀后离心取三氯甲烷层, 挥发除去三氯甲烷后即得油脂, 利用差重法计算油脂产量。油脂得率 (%) 计算: 油脂重/菌体干重 $\times 100\%$ ^[10]。每个样品测 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 设计筛选影响产油脂因子

经过之前单因素等预实验确定的各个因素的水平, 采用 Plackett-Burman 设计从 9 个影响因素中筛选出具有显著影响因素。每个因素取 2 个水平: 即高水平和低水平。如表 1 和表 2 所示。

针对以上结果, 利用 Minitab 15.0 软件进行实验结果分析, 结果表明, 柠檬酸、CaCl₂ 和初始 pH 值为 3 个影响最为显著的因素, 综合考虑, 对这 3 个因素进行下一步的优化。

表 1 Plackett-Burman 实验设计各因素水平
Table 1 Factors levels of Plackett-Burman design

因子代码 Code	名称 Name	单位 Units	实际低值 Low	实际高值 High	低值代码 Low code	高值代码 High code
A	Glucose (%)	M/V	10.000	15.000	-1	1
B	Peptone (%)	M/V	0.200	0.400	-1	1
C	Citric acid (%)	M/V	0.400	0.700	-1	1
D	MgSO ₄ ·7H ₂ O (%)	M/V	0.100	0.200	-1	1
E	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (%)	M/V	0.050	0.200	-1	1
F	CaCl ₂ (%)	M/V	0.010	0.030	-1	1
G	FeSO ₄ ·7H ₂ O (%)	M/V	0.005	0.020	-1	1
H	Initial pH value	N/A	6.000	7.000	-1	1
J	Incubate time (h)	h	96.000	120.000	-1	1
K	Error term K				-1	1
L	Error term L				-1	1

表 2 Plackett-Burman 实验设计结果
Table 2 Results of Plackett-Burman design

实验序号 No.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	油脂产量 Lipid production (%)
1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	6.98
2	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	5.61
3	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	5.43
4	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	4.46
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.40
6	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	7.79
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	4.30
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	7.05
9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5.48
10	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	7.17
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	5.75
12	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	5.60

2.2 最陡爬坡实验设计及其结果

响应面拟合方程只有在考察的临近区域里才能充分近似真实情况, 所以应先逼近最大产油脂区域后再建立有效的拟合方程^[11]。因此根据 Plackett-Burman 法筛选出的显著因子效应大小设计它们的步长, 进行最陡爬坡试验是必要的, 以期寻找到最大产油脂区。其他因素选用 Plackett-Burman 实验中“1”和“-1”水平的平均值。本实验采用 Plackett-Burman 法的 1/4 步长进行实验设计。实验设计和结果如表 3 所示。

表 3 最陡爬坡试验设计和结果
Table 3 Experimental design and results of steepest ascent

实验序号 No.	柠檬酸 Citric acid (%)	CaCl ₂ (%)	初始 pH 值 Initial pH value	油脂产量 Lipid production (%)
1	0.550	0.020	6.50	11.67
2	0.475	0.025	6.75	13.24
3	0.400	0.030	7.00	9.91
4	0.325	0.035	7.25	10.05
5	0.250	0.040	7.50	9.60
6	0.175	0.045	7.75	9.46

由以上结果可知, 最大油脂产量在第 2 次实验附近, 故选其做为中心点, 柠檬酸、CaCl₂、pH 值分别为 0.475%、0.025%和 6.75。

2.3 响应面设计确定显著影响因子的最佳值

根据最陡爬坡确定的实验因素中心点, 设计的响应面因素及水平如表 4 所示, 本文采用 Box-Behnken 设计, 其结果如表 5 所示。

表 4 响应面设计的因素和水平
Table 4 Range of different factor invested in RSM

编码 Code	因素 Factors	水平 Level		
		-1	0	1
A	Citric acid (%)	0.400	0.475	0.550
B	CaCl ₂ (%)	0.020	0.025	0.030
C	Initial pH value	6.500	6.750	7.000

表 5 Box-Behnken 响应面实验设计
Table 5 Box-Behnken design and response value

实验序号 No.	柠檬酸 Citric acid (%)	CaCl ₂ (%)	初始 pH 值 Initial pH value	油脂产量(%) Lipid production
1	0	1	1	9.60
2	1	1	0	10.07
3	0	0	0	13.88
4	-1	1	0	11.65
5	-1	0	1	10.62
6	0	1	-1	12.43
7	1	-1	0	10.08
8	-1	0	-1	10.25
9	1	0	1	9.90
10	0	-1	1	12.85
11	0	0	0	14.05
12	0	-1	-1	11.55
13	0	0	0	15.08
14	-1	-1	0	10.68
15	1	0	-1	11.95

利用软件 Minitab 15.0 对实验结果进行分析, 得到二次线性回归方程如下: Y (油脂产量) = $14.34 - 0.28*A - 0.02*B - 0.08*C - 2.45A^2 - 1.46B^2 - 1.46C^2 - 0.45AB - 0.35AC - 1.23BC$

对结果进行方差分析, 如表 6 所示。

表 6 响应面实验的方差分析结果(1)
Table 6 ANOVA results of factors and model in the response surface experiment (1)

项 Item	系数 Module	系数标准误差 Standard error	<i>T</i>	<i>P</i>
Constants	14.3367	0.3985	35.980	<0.0001
<i>A</i>	-0.2775	0.2440	-1.137	0.3070
<i>B</i>	0.0212	0.2440	0.087	0.9340
<i>C</i>	-0.0762	0.2440	-0.312	0.7670
<i>A*A</i>	-2.4521	0.3592	-6.827	0.0010
<i>B*B</i>	-1.4646	0.3592	-4.078	0.0100
<i>C*C</i>	-1.4596	0.3592	-4.064	0.0100
<i>A*B</i>	-0.4450	0.3451	-1.290	0.2540
<i>A*C</i>	-0.3500	0.3451	-1.014	0.3570
<i>B*C</i>	-1.2275	0.3451	-3.557	0.0160

表 6 响应面实验的方差分析结果(2)
Table 6 ANOVA results of factors and model in the response surface experiment (2)

来源 Source	自由度 DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	<i>F</i>	<i>P</i>
Regression	9	41.4200	41.4200	4.6022	9.66	0.011
Linear	3	0.6662	0.6662	0.2221	0.47	0.719
Square	3	33.4447	33.4447	11.1482	23.41	0.002
Interaction	3	7.3091	7.3091	2.4364	5.12	0.055
Residual error	5	2.3815	2.3815	0.4763		
Lack of fit	3	1.5383	1.5383	0.5128	1.22	0.481
Pure error	2	0.8433	0.8433	0.4216		
Total	14	43.8015				

从表 6(1)可以看出,二次项的 *A*A* 影响是非常显著的, *B*C*、*B*B*、*C*C* 影响是显著的,其余项的影响不显著。从表 6(2)可以看出回归方程已达到 0.011 的显著统计程度,失拟项 $>>0.05$,说明回归方程具有较好的拟合度。因此,可以用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。决定系数 $R^2 = 94.56\%$,即回归方程中所有自变量的变化可以解释 94.56%的因变量变化,这主要是是因为微生物油脂提取过程的影响因素很多,未计入方程的变量与回归方程的变量之间总会有交互作用,由于未计入方程的变量较多,故交互作用的累积对回归方程造成一定影响;另一方面是由于实验的过程中总会有不可避免的随机误差。根据回归方程求一阶偏导得 *Y* 极大值是在: $A = -0.058$, $B = 0.030$, $C = -0.033$,也就是在柠檬酸、 CaCl_2 和 pH 值分别为 0.471%、0.025% 和 6.74 时存在最大油脂产量,为 14.34%。在该条件下,对模型预测值进行实验验证结果为 14.55% (3 次平均值),与模型预测值基本吻合,这能够有效说明该实验选用的模型是合理的。通过 Minitab 15.0 软件对上述回归方程绘制响应面曲线如图 1、2、3。

3 讨论

微生物油脂做为当前的研究热点,已经引起广大研究者的重视。但是国内外研究大都集中在高产油脂菌株中,也就是含油脂量在干重 20%以上的微生物,如浅白色隐性酵母、粘红酵母等^[12],而对于

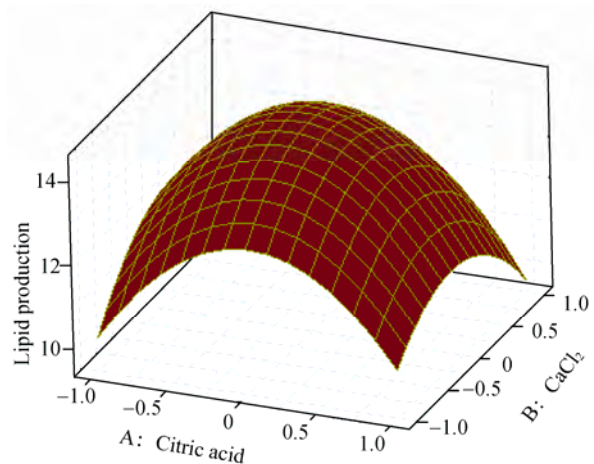


图 1 柠檬酸和 CaCl_2 对产油脂量影响的响应曲面图
Fig. 1 Surface layer of the mutual-affecting of citric acid and CaCl_2 on lipid production

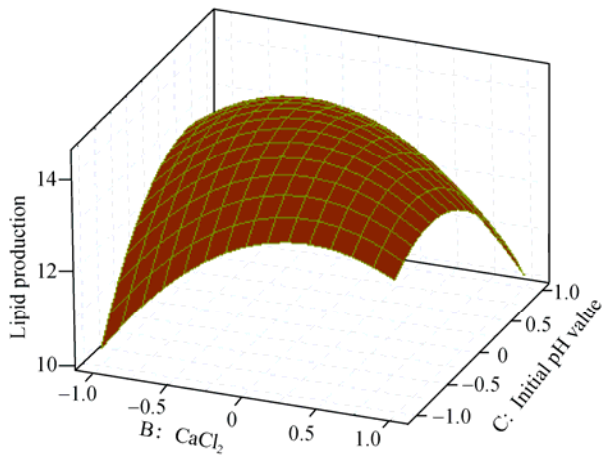


图2 CaCl_2 和初始 pH 值对产油脂量影响的响应曲面图
Fig. 2 Surface layer of the mutual-affecting of CaCl_2 and initial pH value on lipid production

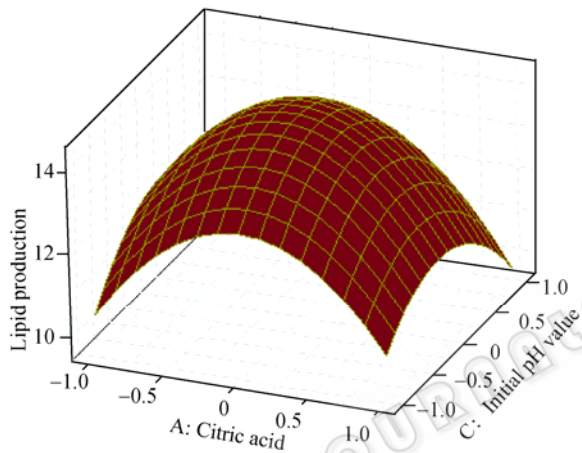


图3 柠檬酸和初始 pH 值对产油脂量影响的响应曲面图
Fig. 3 Surface layer of the mutual-affecting of citric acid and initial pH value on lipid production

酿酒酵母来说, 则很少见到研究其产油脂的相关报道。本实验首次对酿酒酵母的产油脂进行了研究, 并且利用响应面法得出酿酒酵母产油脂发酵条件为: 葡萄糖 15%, 蛋白胨 0.2%, 酵母浸粉 0.4%, 柠檬酸 0.471%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CaCl_2 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, 初始 pH 值为 6.74, 转速为 180 r/min, 30°C 培养 96 h。在该发酵条件下, 产油脂量为 14.55%, 比在种子培养基中的产油脂量 4.76% 提高了 2 倍左右, 说明 Plackett-Burman 设计与响应面分析方法(RSM)相结合可以快速、有效地从众多影响产油脂发酵的因素中筛选出比较重要的影响因素并实现其水平优化, 优化结果与实际发酵情况吻合较好。

本实验只是从培养基方面优化了酿酒酵母油脂产量, 还没有达到高产油脂微生物的标准。如果能

够对其发酵产油脂过程中的油脂生物合成和积累代谢调控的关键酶特性及其编码基因, 如苹果酸酶(Mae)基因的克隆、序列分析、表达与调控等进行研究^[13], 那么利用基因工程手段构建高产油脂的酿酒酵母菌株也是有可能的。同时提高酿酒酵母中的油脂产量对于利用其构造基因工程菌来产生物柴油(脂肪酸酯类)也具有探索性意义, 研究酿酒酵母中的产油量也是对其的进一步研究开发起到了启发性意义。

最后, 由于酿酒酵母在日常生产生活中应用极其广泛, 酿酒酵母细胞作为发酵生产其他产品后的废弃物也存在一定的回收利用价值, 如可以提取其中的油脂, 用于生产功能性多不饱和脂肪酸、生物柴油原料等, 也可直接用于饲料、肥料, 提取麦角固醇、多糖类物质、核酸、蛋白等, 达到综合利用的目的。

参考文献

- [1] 武双, 华艳艳, 仲崇斌, 等. 色醇对斯达氏油脂酵母产油脂能力的影响. 微生物学通报, 2008, **35**(2): 200–203.
- [2] Ratledge C, James PW. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002(51): 1–51.
- [3] 薛飞燕, 张栩, 谭天伟. 微生物油脂的研究进展及展望. 生物加工过程, 2005, **3**(1): 23–27.
- [4] 梁西爱, 董文宾, 苗晓洁, 等. 微生物油脂的生产工艺及其影响因素. 食品研究与开发, 2006, **27**(3): 46–47.
- [5] 郑媛, 王跃军, 孙谧. 海洋侧孢短芽孢杆菌 *Brevibacillus laterosporus* Lh-1 产抗菌肽 R-1 的培养条件优化. 微生物学通报, 2009, **36**(3): 398–403.
- [6] Yao-Qiang He, Tian-Wei Tan. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006(43): 9–14.
- [7] 熊智强, 徐平, 涂国全. 利用响应面法优化红谷霉素发酵培养基. 微生物学通报, 2006, **33**(4): 5–9.
- [8] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件. 微生物学通报, 2008, **35**(2): 306–310.
- [9] Hong Gao, Mei Liu, Jintao Liu, et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(17): 4012–4016.
- [10] 张玲, 李植峰, 谭亚芳, 等. 一种简便、快速的真菌油脂提取方法. 生物技术, 1999, **9**(6): 43–44.
- [11] 岳珂, 陈振明, 开雷, 等. 响应面法优化解脂假丝酵母 *Candida lipolytica* 产脂肪酶发酵条件. 科技通报, 2008, **24**(6): 810–814.
- [12] 蒲海燕, 贺稚非, 刘春芬, 等. 微生物功能性油脂研究概况. 粮食与油脂, 2003(11): 12–14.
- [13] 谢必峰. 能源微生物油脂的研究进展及产业化研究对策. 江苏食品与发酵, 2008(4): 6–10.