

利用响应面法优化 ϵ -聚赖氨酸 发酵培养基

张超* 张克峰 侯书国 马永山

(山东建筑大学市政与环境工程学院 山东 济南 250101)

摘要: 采用响应面法对白色链霉菌 ZC7 发酵合成 ϵ -聚赖氨酸的培养基进行优化研究。采用 Plackett-Burman 法对 8 个因素进行了筛选, 结果表明, 葡萄糖、酵母膏和硫酸铵的浓度对 ϵ -聚赖氨酸产量影响较大。用最陡爬坡试验及 Box-Behnken 设计进一步优化, 利用 Design-Expert 软件进行二次回归分析, 得到各因素的最佳浓度为: 葡萄糖 37.22 g/L, 酵母膏 6.9 g/L, 硫酸铵 6.55 g/L。在此优化条件下 ϵ -聚赖氨酸的产量达到 8.11 g/L, 较单因素试验最高值提高 24.6%。

关键词: 白色链霉菌, ϵ -聚赖氨酸, 优化, 响应面

Medium optimization of ϵ -polylysine production by response surface analysis

ZHANG Chao* ZHANG Ke-Feng HOU Shu-Guo MA Yong-Shan

(School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan, Shandong 250101, China)

Abstract: In order to enhance the concentration of ϵ -polylysine (ϵ -PL) with *Streptomyces albulus* ZC7, response surface methodology were used to optimize the fermentation medium. A Plackett-Burman design was used to evaluate the influence of eight factors firstly. Results showed that the concentration of glucose, yeast extract and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ played important roles in influencing the content of ϵ -PL. Then, the path of steepest ascent and the Box-Behnken design were adopted for further optimization, and the optimum concentration levels and the relationships among these factors was found out by quadratic regression model equation with Design-Expert statistic methods, the optimal concentration of the variables were determined as: glucose 37.22 g/L, yeast extract 6.9 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.55 g/L. Under such conditions, the concentration of ϵ -PL was increased to 8.11 g/L, which was 24.6% higher than the maximum value in the single factor tests.

Keywords: *Streptomyces albulus*, ϵ -poly-L-lysine, Optimization, Response surface methodology

随着人们对食品安全性的认识 and 要求的逐步提高, 化学合成防腐剂受到严峻挑战, 食品防腐剂的天然化已成为今后的发展趋势。 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)是目前天然防腐剂中具有优良防腐性能和巨大商业潜力的微生物类食品防腐剂。它是日本酒井平一和岛昭二两位博士在大量筛选有价值的放线菌时发现的一种新型聚合物^[1], 经过进一步研究发现其具有强烈的抑菌能力, 可以作为防腐剂用于食品的保鲜^[2]。这种新型防腐剂安全无毒, 在人体内可分解为赖氨酸, 赖氨酸又是人体必须的 8 种氨基酸之一, 符合消费者的健康需求^[3-4]。

为了考察培养基成分对 ϵ -PL 产量的影响, Shih 等人应用中心组合设计(CCD)优化了 *Streptomyces albulus* IFO 14147 生成 ϵ -PL 的培养基, 结果表明葡萄糖 23.86 g/L、酵母膏 2.86 g/L、硫酸铵 0.14 g/L 时, ϵ -PL 产量最高, 达到 8.13 g/L^[5]。余明洁采用响应面分析法对 ϵ -PL 发酵培养基的成分进行了优化, 产量由 1.64 g/L 提高到 2.48 g/L^[6]。

在试验条件优化方面, 传统的单因素实验方法费时费力, 而且没有考虑因素的交互作用致使最优值并不可靠。Plackett-Burman (PB)方法广泛应用于微生物发酵培养基成分的优化和发酵工艺关键参数的筛选, 通过对试验进行统计学设计和数据分析, 筛选出对目标值影响最大的关键因素, 可大大减少优化过程考察的因素数和实验次数。响应面分析法(Response surface methodology, 简称 RSM)是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法。通过局部实验回归拟合因素与结果间的全局函数关系, 从而得到准确有效的实验结论, 能在整个考察区域上确定各个因素的最佳组合及最优响应值。现已广泛应用于优化培养基、工艺条件等生物技术领域。

作者在济南黄河边的土壤中筛选出一株 ϵ -PL 高产菌 MD7, 初步鉴定为白色链霉菌, 诱变后对突变株 ZC7 的发酵培养基进行工艺优化, 即采用 PB 设计方法考察 8 个培养基条件, 筛选得出 3 个关键因素, 再利用最陡爬坡试验及 Box-Behnken 响应面设计确定主要影响因素的最佳浓度, 以提高 ϵ -PL 产

量。所有试验设计、数据处理及模型建立皆采用 Design-Expert 软件进行。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种: 白色链霉菌 *Streptomyces albulus* ZC7 由本实验室筛选并保藏。

1.1.2 培养基: (1) 贝特纳斜面培养基: 葡萄糖 1.0%, 蛋白胨 0.2%, 酵母浸膏 0.1%, 琼脂 1.5%, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, pH 7.5。(2) 液体培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, Na_2HPO_4 0.8, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂: 葡萄糖、酵母膏、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠为中国医药(集团)上海试剂公司产品; 硫酸铵和甲基橙为中国金山化工厂(上海)产品。

1.2 发 酵 方 法

菌株经斜面活化后, 从斜面培养基上取一环孢子接入到 40 mL 的发酵培养基中(250 mL 三角瓶), 30 °C 摇床培养 24 h, 取 2 mL 种子液分别加入到 3 个三角瓶中, 30 °C 摇床培养 72 h。测定三角瓶中发酵液 ϵ -PL 产量, 取其平均值, 确定不同条件对 ϵ -PL 产量的影响。

1.3 分 析 方 法

1.3.1 pH 测定: PHSJ-4A 型数字 pH 计。

1.3.2 发酵液中 ϵ -PL 含量的测定: 发酵上清液 2 mL 与 2 mL (1 mmol/L)甲基橙水溶液混合加入试管, 30 °C 振荡 30 min, 4 000 r/min 离心 15 min, 将上清液稀释一定倍数后于 465 nm 处测 OD 值^[7]。

1.4 试 验 设 计

1.4.1 Plackett-Burman 试验设计: Plackett-Burman 设计法是一种两水平的试验设计方法, 适用于从众多考察因素中快速有效地筛选出最重要的几个因素, 试图用最少试验次数达到使因素的主效果得到尽可能精确的估计。对于 N 次实验至多可研究(N-1)个因素, 其中(N-4)个实际因素, 3 个虚构变量用以估计误差^[8]。每个因素取高低两个水平, 对某个因素高低水平的差值不能过大, 以防掩盖了其他因素的

重要性, 本实验中设定高水平为低水平的 2 倍。根据单因素实验结果, 选取 8 种培养基成分, 进行 12 次实验, 响应值为 ϵ -PL 产量。自变量、编码和水平因素见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平及编码
Table 1 The two levels of variables used in the Plackett-Burman design

变量 Variables	因素 Factor (g/L)	低水平 Low level (-)	高水平 High level (+)
X_1	Glucose	20.00	40.00
X_2	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	0.04
X_3	Na ₂ HPO ₄	1.00	2.00
X_4	KH ₂ PO ₄	1.00	2.00
X_5	Yeast extract	8.00	16.00
X_6	(NH ₄) ₂ SO ₄	8.00	16.00
X_7	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	1.00
X_8	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.02
X_9, X_{10}, X_{11}	Virtual variables	-	+

1.4.2 最陡爬坡试验: 根据 PB 试验结果设计最陡爬坡试验路径, 按一定的梯度减少酵母膏和硫酸铵在培养基中的浓度, 并按一定的梯度增加葡萄糖在培养基中的浓度, 其余 5 个因素均取初始浓度, 检测最终发酵液中 ϵ -聚赖氨酸产量的变化, 从而确定此 3 因素的最适浓度范围^[9]。

1.4.3 Box-Behnken 设计: Box-Behnken 设计适用于 2-5 个因素的优化试验。以 PB 试验筛选得到的对发酵液 ϵ -PL 产量影响显著的因素作为设计因素, 以最陡爬坡试验得出的浓度作为中心点, 根据相应的试验表进行试验后, 使用 Design-Expert 软件对试验结果进行响应面分析^[10](表 2)。

表 2 Box-Behnken 试验因素水平及其编码
Table 2 Levels of variables used in the Box-Behnken design

Variables	Level (g/L)		
	-1	0	1
(A) Glucose	30	36	42
(B) (NH ₄) ₂ SO ₄	3	6	9
(C) Yeast extract	3	6	9

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 试验设计结果与分析

Plackett-Burman 试验设计结果见表 3。采用 Design-Expert 软件对表 3 中的 ϵ -PL 产量数据进行回归分析, 得到各影响因子的偏回归系数及其显著性(表 4)。结果表明, 葡萄糖、酵母膏和硫酸铵对 ϵ -PL 产量影响较大。其中, 葡萄糖的浓度对 ϵ -PL 产量的影响是正效应, 酵母膏和硫酸铵的浓度对 ϵ -PL 产量的影响是负效应。

表 3 Plackett-Burman 试验设计结果
Table 3 Plackett-Burman experiment design and response values

Serial number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	ϵ -PL (g/L)
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	0.87
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	0.77
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	2.67
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	1.51
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	0.68
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	1.97
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	2.65
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	2.48
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	5.03
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	2.87
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	2.53
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.12

表4 偏回归系数及影响因子的显著性分析
Table 4 Partial regression coefficients and analyses of their significance

Variables	Regression coefficient	$E(x_1)$	Contribution (%)	Significance
X_1	0.530	1.050	21.030	3
X_2	0.075	0.150	0.430	7
X_3	0.240	0.490	4.570	5
X_4	-0.110	-0.220	0.930	6
X_5	-0.680	-1.360	35.010	1
X_6	-0.610	-1.210	28.090	2
X_7	0.260	0.510	4.990	4
X_8	-0.036	-0.071	0.097	8

2.2 中心试验点的确定

如表5所示,随着葡萄糖、酵母膏和硫酸铵浓度的变化,发酵液中的 ϵ -PL产量先上升后下降,当葡萄糖、酵母膏和硫酸铵浓度分别为36、6和6 g/L时,所对应的发酵液中的 ϵ -PL产量达到最大值,以此浓度作为中心点,进行下一步优化试验。

表5 最陡爬坡试验设计及其结果
Table 5 The path of steepest ascent experiment design and response values

Serial number	Glucose (g/L)	Yeast extract (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	ϵ -PL (g/L)
1	30	8	8	2.88
2	33	7	7	3.63
3	36	6	6	4.83
4	39	5	5	4.01
5	42	4	4	3.86
6	45	3	3	3.13

2.3 最佳发酵培养基的确定

以葡萄糖、酵母膏及硫酸铵3个重要因素为自变量,各因素编码水平如表2所示,Box-Behnken试验设计及结果如表6所示。

试验数据使用Design-Expert软件进行二次回归拟合后,得到以下回归方程: $Y_{\epsilon\text{-PL}}=8.1+0.72A+0.13B+0.34C+1.05AB-0.79AC+0.81BC-1.66A^2-1.62B^2-0.54C^2$ 。其中,A、B和C分别代表葡萄糖、硫酸铵和酵母膏的浓度,单位是g/L(表7)。方差分析显著性检验表明, $R^2=97.71\%$,方程回归性显著。预测模型的使用条件为葡萄糖30-45 g/L、硫酸铵3-8 g/L、酵母膏3-8 g/L,在此条件下可以用该模型对发酵液中的 ϵ -PL产量进行预测。

表6 Box-Behnken 试验设计表及其结果
Table 6 Box-Behnken experiments design and response values

Serial number	Glucose (A)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (B)	Yeast extract (C)	ϵ -PL (g/L)
1	-1	-1	0	4.65
2	1	-1	0	4.27
3	-1	1	0	3.27
4	1	1	0	7.09
5	-1	0	-1	4.19
6	1	0	-1	6.94
7	-1	0	1	6.44
8	1	0	1	6.03
9	0	-1	-1	6.51
10	0	1	-1	4.69
11	0	-1	1	5.57
12	0	1	1	6.99
13	0	0	0	7.81
14	0	0	0	8.27
15	0	0	0	8.47
16	0	0	0	8.19
17	0	0	0	7.75

表7 回归分析结果
Table 7 Results of regression equation analysis

Source	Sum of squares	Mean square	F value	Prob(P)>F
Model	40.85	4.54	33.15	<0.0001
A	4.19	4.19	30.60	0.0009
B	0.14	0.14	1.01	0.3492
C	0.91	0.91	6.63	0.0368
A ²	4.42	4.42	32.31	0.0007
B ²	2.51	2.51	18.34	0.0036
C ²	2.63	2.63	19.20	0.0032
AB	11.59	11.59	84.66	<0.0001
AC	11.00	11.00	80.33	<0.0001
BC	1.22	1.22	8.93	0.0203
Lack of fit	0.58	0.19	2.02	0.2536

利用Design-Expert软件对回归模型进行响应面分析,得到各响应面立体分析图(图1-图3)。对回归方程求解,得模型极值点,即葡萄糖、硫酸铵和酵母膏的最佳浓度分别为37.22、6.55和6.9 g/L时,响应值Y达到最大值,即发酵液的 ϵ -PL产量最高为8.23 g/L。

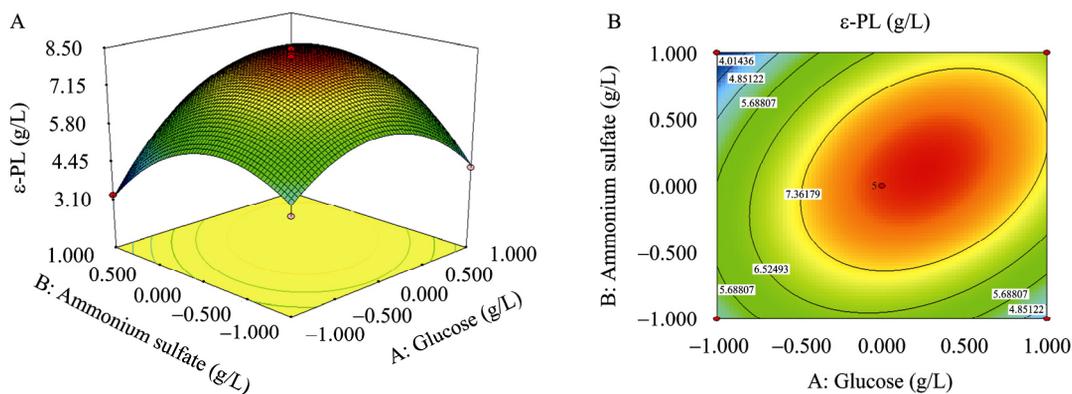


图 1 葡萄糖和硫酸铵对 ϵ -PL 产量交互影响的三维曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 1 Surface (A) and contour plots (B) of mutual-influence for glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the yield of ϵ -PL

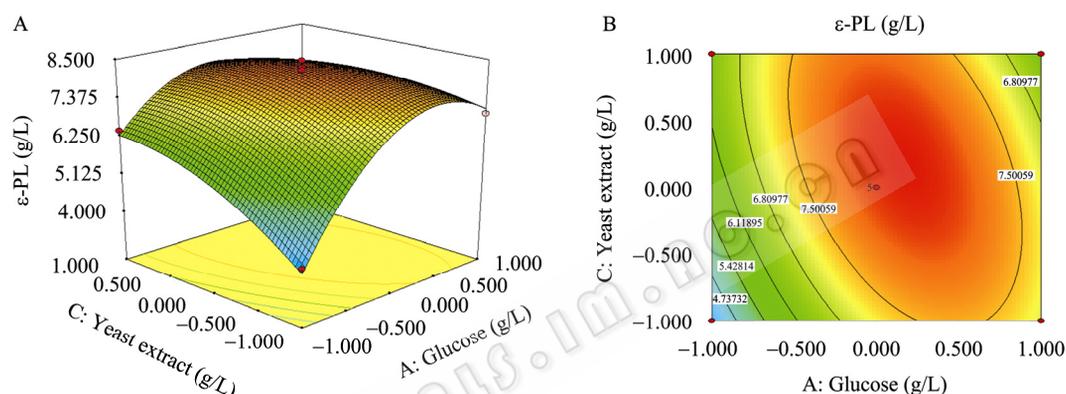


图 2 葡萄糖和酵母膏对 ϵ -PL 产量交互影响的三维曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 2 Surface (A) and contour plots (B) of mutual-influence for glucose and yeast extract on the yield of ϵ -PL

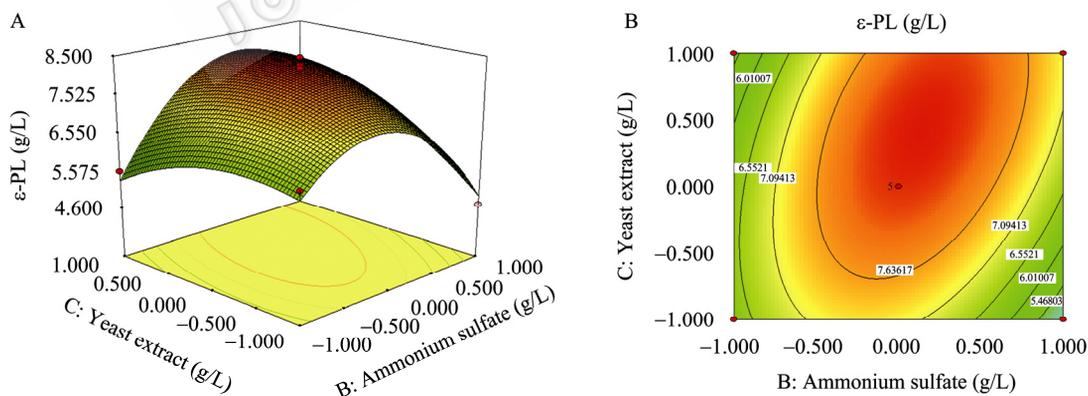


图 3 硫酸铵和酵母膏对 ϵ -PL 产量交互影响的三维曲面图(A)和等高线图(B)

Fig. 3 Surface (A) and contour plots (B) of mutual-influence for yeast extract and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the yield of ϵ -PL

2.4 优化结果验证

为了检验模型的准确性,在预测最佳培养基配方条件下进行发酵试验 3 次,所得的实际发酵液 ϵ -PL 产量平均为 8.11 g/L,与预测值 8.23 g/L 接近,

可见该模型能较好的预测实际发酵情况。

3 讨论

采用 Plackett-Burman 法对 8 个因素进行了筛选,

结果表明,葡萄糖、酵母膏和硫酸铵对 ϵ -聚赖氨酸产量影响较大。在此基础上,再用最陡爬坡试验及 Box-Behnken 设计进一步优化,利用 Design-Expert 软件进行二次回归分析,得到各因素的最佳浓度为:葡萄糖 37.22 g/L、酵母膏 6.9 g/L、硫酸铵 6.55 g/L。在优化条件下 ϵ -PL 的产量达到 8.11 g/L,较单因素实验最高值提高 24.6%。

通过试验证明, PB、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 设计的结合是一种很好的试验设计组合,能在最短时间内,快速优化培养基成分或确定发酵工艺的关键参数,响应值较单因素试验或正交试验有明显的提高。虽然 Design-Expert 软件不如 SAS 强大,但容易上手,操作简单,可方便地进行 PB 设计和响应面优化分析,使用该软件进行数据处理得到的结果非常可信,可以满足试验对数据处理的要求。

参 考 文 献

- [1] Yoshida T, Nagasawa T. ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 21-26.
- [2] Hiraki J. ϵ -Polylysine, its development and utilization[J]. Fine Chem, 2000, 29(2): 18-25.
- [3] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya SI, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -Polylysine as a preservative in food[J]. Regul Tox Pharmacol, 2003, 37(2): 328-340.
- [4] 马涛,周大宇. ϵ -聚赖氨酸对月饼表皮防腐效果的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 215-218.
- [5] Shih IL, Shen MH. Optimization of cell growth and poly (ϵ -lysine) production in batch and fed-batch cultures by *Streptomyces albulus* IFO 14147[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(7): 1644-1649.
- [6] 余明洁,田丰伟,范大明,等. 高产 ϵ -聚赖氨酸白色链霉菌的复合诱变选育研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 99-101, 104.
- [7] 曹伟锋,谭之磊,袁国栋,等. ϵ -聚赖氨酸测定方法的改进[J]. 天津科技大学学报, 2007, 22(2): 9-11, 32.
- [8] Xu CP, Kim SW, Hwang HJ, et al. Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2002, 36(2): 127-131.
- [9] Montgomery DC. Design and analysis of experiments[M]. New York: John Wiley & Sons, 1991: 45-50.
- [10] Viswanathan P, Surlikar NR. Production of α -amylase with *Aspergillus flavus* on Amaranthus grains by solid-state fermentation[J]. Basic Microbiol, 2001, 41(1): 57-64.

书 讯

父亲和我们

——纪念中国首批青霉素的研制者和命名者樊庆笙教授百年诞辰

本书作者樊真美以女儿的视角叙述了父亲坎坷的不平凡的一生,也记录了儿女们受父母的影响和教育曲折的成长过程。凸显了父亲这样一个老一代知识分子赤诚的爱国之心,为实现强国梦付出毕生心血的奉献精神 and 历经磨难的不屈不挠的奋斗精神。

本书由北京时代文献出版社出版。

定价: 38 元

邮费: 1 本 5.5 元, 2 本 7 元, 3 本 9 元(一律加挂号费 3 元)

需购者请与作者樊真美联系。

地址: 南京嫩江路 20 号四季园 23 号 402 室

邮编: 210036

电话: 010-83418856