

# 响应面法优化普鲁兰多糖发酵培养基

李慧颖, 张月清, 马晓燕, 王雪静, 于宏伟, 程书梅\*

(河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071000)

**摘要:** 通过对出芽短梗霉生长的培养基进行优化, 以提高普鲁兰多糖的产量。首先采用单因素试验筛选出有显著效应的3个因素, 再利用响应面 Box-Behnken 设计优化显著因素的水平。结果表明: 碳源(蔗糖)添加量、氮源(酵母浸膏)添加量和金属离子对粗普鲁兰多糖的产量都有显著影响( $P < 0.05$ ), 蔗糖添加量和酵母浸膏添加量的交互作用相对明显, 蔗糖添加量和金属离子以及酵母浸膏添加量和金属离子的交互作用不显著。优化的培养基组成为: 蔗糖添加量 56.63g/L、酵母浸膏添加量 3.74g/L、金属离子选择  $Mg^{2+}$ , 此条件下粗普鲁兰多糖产量为 60.358g/L。

**关键词:** 普鲁兰; 蔗糖; 酵母浸膏; 金属离子; 响应面法

## Optimization of Fermentation Medium for Pullulan Production by Response Surface Methodology

LI Hui-ying, ZHANG Yue-qing, MA Xiao-yan, WANG Xue-jing, YU Hong-wei, CHENG Shu-mei\*

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

**Abstract:** The aim of this study is to optimize the fermentation medium for enhancing pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. Important medium components affecting pullulan production were identified by one-factor-at-a-time analysis and further optimized by response surface analysis based on a Box-Behnken design. Sucrose (carbon source) and yeast extract (nitrogen source) concentration and metal ion type had significant effects on pullulan production ( $P < 0.05$ ). There was a significant interaction effect between sucrose and yeast extract concentration, but no significant interaction effects were observed between metal ion type and sucrose or yeast extract concentration. The optimized fermentation medium was composed of 56.63 g/L sucrose, 3.74 g/L yeast extract and  $Mg^{2+}$ , resulting in a pullulan yield of 60.358 g/L.

**Key words:** pullulan; sucrose; yeast extract; metal ion; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0221-04

普鲁兰多糖(pullulan)又称茁霉多糖, 是由类酵母真菌出芽短梗霉产生的一种黏性胞外多糖, 也是一种葡聚糖胶。它是由葡萄糖分子按  $\alpha$ -1,4-糖苷键结合成麦芽三糖, 两端再以  $\alpha$ -1,6-糖苷键同另外的麦芽三糖结合, 如此反复连接而成的直链高分子多聚糖<sup>[1-2]</sup>。这种独特的连接模式赋予了普鲁兰许多特殊的物理性质, 如黏附能力、形成纤维的能力、形成薄且阻气的可降解薄膜的能力<sup>[3]</sup>等, 因此, 普鲁兰多糖被广泛应用于食品、药品、化工及环境修复等领域。目前已被制成多种商业化产品, 食品包装薄膜、胶囊<sup>[4]</sup>、血浆替代品、黏合剂、聚凝剂、乳化剂、重金属清除剂等<sup>[5-6]</sup>。另外, 普鲁兰多糖在基础研究中还可作为一个定义明确的模型物质, 有很大的应用价值。

影响普鲁兰多糖产量的因素很多, 但从培养基组成看, 就有碳源、氮源和金属离子。通过单因素试验虽

然可以确定各个因素的最优添加量, 但无法确定各因素之间的交互作用, 且单因素试验的准确性有待考究, 因此, 另一种通过参数之间的相互作用而确定其最优配比的统计学方法——响应面法(response surface methodology, RSM)应运而生, 并被广泛应用于微生物发酵<sup>[7]</sup>。本实验在单因素试验的基础上借助设计软件 Design Expert 7.1.3, 采用 Box-Behnken 响应面法对影响普鲁兰多糖产量的主要的培养基参数进行优化, 建立数学模型, 采用紫外分光光度法和荧光光谱法<sup>[8]</sup>对提取产物进行分析定量, 以期生产中提高普鲁兰产量提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

收稿日期: 2011-10-12

作者简介: 李慧颖(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为现代生物制药技术。E-mail: huiying-aza@163.com

\* 通信作者: 程书梅(1970—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: shumeicheng2002@yahoo.com.cn

生产菌株: 出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*), 本实验室保存菌株。

### 1.1.2 培养基

斜面保存培养基(g/L): 葡萄糖 75、酵母浸膏 3、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  5、 $\text{NaCl}$  1、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2、琼脂 20, pH 5.5。

种子与活化培养基(g/L): 葡萄糖 75、酵母浸膏 3、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  5、 $\text{NaCl}$  1、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, pH 5.5。

发酵培养基(g/L): 蔗糖 50、酵母浸膏 5、 $\text{NaCl}$  1、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2, pH 5.5。

以上培养基灭菌条件:  $121^\circ\text{C}$  灭菌 15~20min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌种活化

从保藏斜面中挑取一环出芽短梗霉菌, 接入装有 100mL 活化培养基的锥形瓶中,  $28^\circ\text{C}$ 、200r/min 恒温培养 24h。

### 1.2.2 普鲁兰多糖发酵

无菌操作取 1mL 活化的菌悬液于装有 100mL 发酵培养基的锥形瓶中,  $28^\circ\text{C}$ 、200r/min 摇床连续培养 8d, 每天定时取样测定, 记录结果。

### 1.2.3 粗普鲁兰多糖含量测定

每天定时从发酵培养基中抽取 5mL 发酵液于 10mL 离心管中, 5000r/min 离心 30min 后, 去 4mL 上清液, 并向其中加入 8mL 的 95% 乙醇溶液, 振荡混匀, 置  $4^\circ\text{C}$  冰箱中隔夜保存。然后再 5000r/min 离心 30min, 弃上清, 将沉淀于  $80^\circ\text{C}$  干燥箱中干燥至恒质量, 称量并记录。

### 1.2.4 单因素试验

分别以发酵培养基中碳源种类(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖)、目标碳源质量浓度(40、45、50、55、60g/L)、氮源种类(酵母浸膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、玉米浆)、目标氮源质量浓度(1、3、5、7、9g/L)及金属离子种类( $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ )为自变量, 以粗普鲁兰多糖产量为评价指标, 确定提高粗普鲁兰多糖产量的主要因素及其添加量。每个单因素试验都以时间为不变参数, 每 24h 测一次粗普鲁兰多糖的产量, 记录到 192h, 将测得的产量制成曲线图并加以比较。

### 1.2.5 响应面法设计试验<sup>[9-14]</sup>

根据单因素试验结果, 以粗普鲁兰多糖产量为指标进行 RSM 试验设计。选取对粗普鲁兰多糖产量影响最大的 3 个因素为自变量, 分别以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  表示, 以 +1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低 3 个水平, 按方程  $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$  对自变量进行编码,  $X_i$  为自变量的真实值,  $X_0$  为试验中心点处自变量的真实值,  $\Delta X$  为自变量的变化步长,  $X_i$  为自变量的编码值。利用

统计软件 Design Expert 对试验数据进行回归分析, 预测粗普鲁兰多糖产量最高的最佳参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 碳源的选择

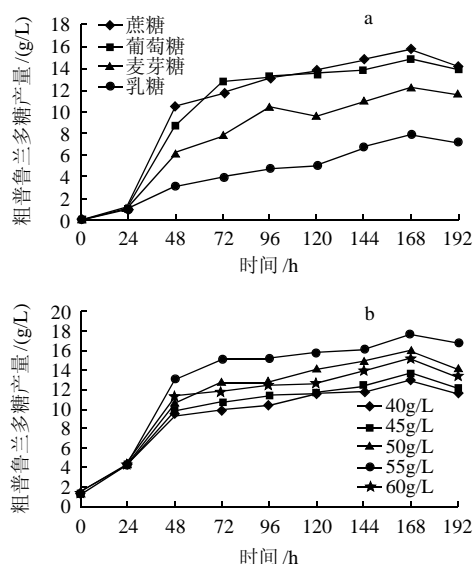


图1 不同种类碳源的比较及不同蔗糖添加量的对比

Fig.1 Effect of carbon source type and sucrose concentration on pullulan production

由图1可知, 以蔗糖作为碳源时, 粗普鲁兰多糖产量最高, 且可观察到, 培养基黏稠度也是添加蔗糖的最好, 所以选择蔗糖最为发酵培养基的碳源, 其添加量选择 50、55、60g/L 3 个梯度进行后续实验。

#### 2.1.2 氮源的选择

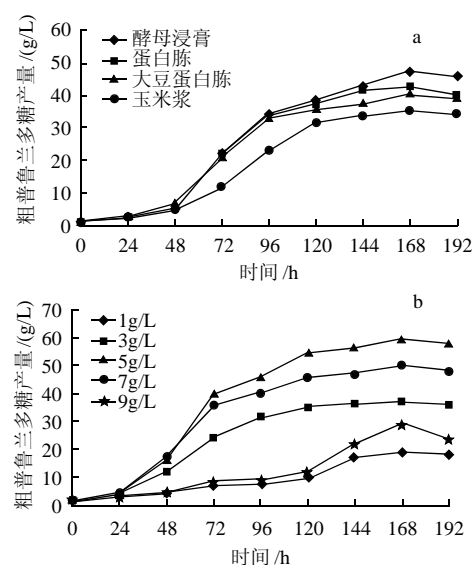


图2 不同种类氮源的比较及不同酵母浸膏添加量的对比

Fig.2 Effect of nitrogen source type and sucrose concentration on pullulan production

由图2可知,以酵母浸膏为氮源时,普鲁兰产量最高,所以选择酵母浸膏最为氮源,其添加量选3、5、7g/L 3个梯度进行后续实验。

2.1.3 金属离子的选择

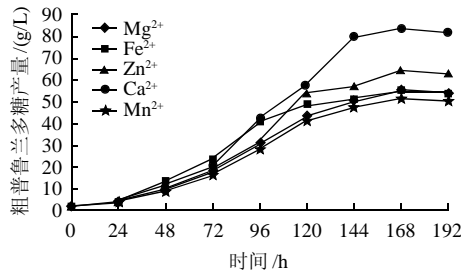


图3 不同种类金属离子的比较

Fig.3 Effect of metal ion type on pullulan production

由图3可知,  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  这3种金属离子添加后粗普鲁兰多糖产量较高。

2.2 响应面试验设计方案及结果

依据单因素的试验结果,进行响应面法 Box-Behnken 模型试验设计。因素水平编码和试验设计与数据分析见表1。

表1 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 1 Box-Behnken design scheme and corresponding results

试验号	$X_1$ 蔗糖添加量/(g/L)	$X_2$ 酵母浸膏添加量/(g/L)	$X_3$ 金属离子	粗普鲁兰多糖产量/(g/L)
1	0(55.00)	0(5.00)	0( $Fe^{2+}$ )	57.750
2	0	+1(7.00)	+1( $Zn^{2+}$ )	31.875
3	+1(60.00)	-1(3.00)	0	56.150
4	1	0	-1( $Mg^{2+}$ )	43.000
5	-1(50.00)	-1	0	40.875
6	+1	+1	0	22.625
7	0	0	0	57.500
8	0	+1	-1	23.000
9	0	0	0	53.500
10	+1	0	+1	45.625
11	0	0	0	55.000
12	0	-1	-1	48.375
13	0	0	0	58.250
14	-1	0	+1	36.625
15	0	-1	+1	52.250
16	-1	0	-1	31.375
17	-1	+1	0	21.125

利用 Design Expert 软件对表1 试验数据进行多项式拟合,以蔗糖添加量( $X_1$ )、酵母浸膏添加量( $X_2$ )、金属离子( $X_3$ )为自变量,以粗普鲁兰产量( $Y$ )为因变量建立回归方程。

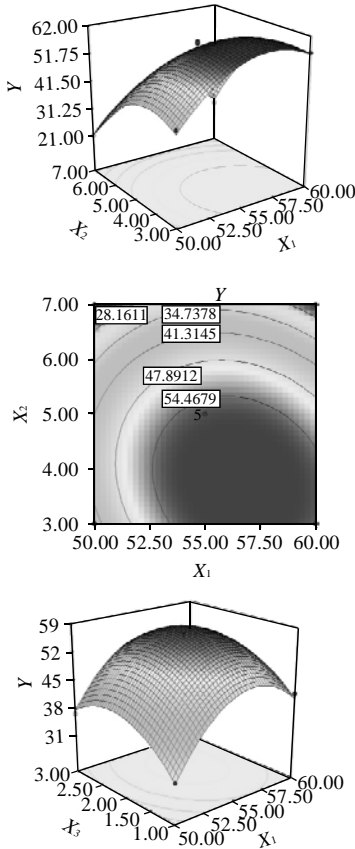
2.3 响应面分析及条件优化

表2 响应面试验结果的方差分析

Table 2 Analysis of variance for the fitted regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	$F$	$P$
模型	2776.99	9	308.55	75.19	< 0.0001
$X_1$	174.85	1	174.85	42.61	0.0003
$X_2$	1225.74	1	1225.74	300.60	< 0.0001
$X_3$	53.17	1	53.17	12.96	0.0087
$X_1X_2$	47.44	1	47.44	11.56	0.0114
$X_1X_3$	1.72	1	1.72	0.42	0.5377
$X_2X_3$	6.25	1	6.25	1.52	0.2570
$X_1^2$	460.90	1	460.90	112.31	< 0.0001
$X_2^2$	486.01	1	486.01	118.43	< 0.0001
$X_3^2$	193.62	1	193.62	47.18	0.0002
剩余	28.73	7	4.10		
失拟	11.90	3	3.97	0.94	0.4990
误差	16.82	4	4.21		
总和	2805.72	16			

从表2可知,因变量与3个自变量之间的线性关系均显著( $P < 0.05$ ),尤以 $X_2$ 为极显著( $P < 0.01$ );但从交互作用来看, $X_1$ 与 $X_2$ 的交互作用显著,而 $X_1$ 与 $X_3$ 、 $X_2$ 与 $X_3$ 之间的交互作用不显著。其中,失拟项  $P = 0.4990 > 0.05$ ,表明该方程可以接受。可以利用回归方程确定最优的产普鲁兰多糖的培养基成分。



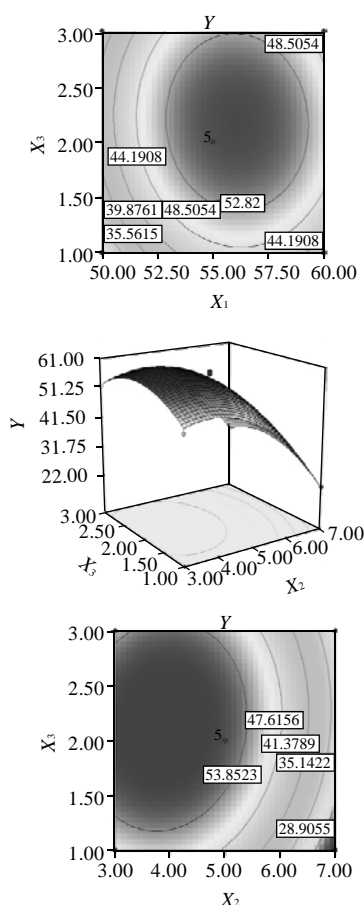


图4 蔗糖、酵母浸膏添加量、金属离子交互作用影响普鲁兰产量的响应面图

Fig.4 Response surface and contour plots showing the interaction effects of sucrose and yeast extract concentration and metal ion type on pullulan production

图4直观的反映出各因素的交互作用对粗普鲁兰多糖产量的影响。从中也可以看出,  $X_1X_2$  间有显著的交互作用, 而  $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$  间交互作用不显著。所以蔗糖与酵母浸膏的添加量是影响粗普鲁兰多糖产量的最显著因素, 金属离子次之。通过手动调整优化响应面, 去掉交互作用不显著的  $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$  两项, 提高回归方程的拟合效果, 简化后得到回归方程为:  $Y = -1424.17500 + 48.69187X_1 + 39.61094X_2 + 29.70313X_3 - 0.34438X_1X_2 - 0.41850X_1^2 - 2.68594X_2^2 - 6.78125X_3^2$ , 并对其进行求解, 得出粗普鲁兰多糖的最大产量为 61.2985g/L。粗普鲁兰多糖发酵培养基的最优配方为: 蔗糖添加量为 56.63g/L、酵母浸膏添加量为 3.74g/L、金属离子选择  $Mg^{2+}$ 。

## 2.4 验证实验

按照试验优化结果进行验证性实验, 最终得到粗普鲁兰多糖的产量为 60.3582g/L, 略低于由 Design Expert

软件分析得到的预测值 61.2985g/L。排除实验误差等客观因素造成的影响, 可以证明试验模型合理, 其实验结果也很理想。

## 3 结论

将蔗糖添加量、酵母浸膏添加量及金属离子的种类作为 Box-Behnken 设计的自变量, 以粗普鲁兰多糖的产量作为因变量, 通过响应面分析的结果表明: 蔗糖添加量、酵母浸膏添加量及金属离子对粗普鲁兰多糖的产量的影响都达到了极显著的水平, 且蔗糖添加量与酵母浸膏添加量之间有显著的交互作用。普鲁兰发酵培养基中的最优化配比为: 蔗糖添加量 56.63g/L、酵母浸膏添加量 3.74g/L、金属离子选择  $Mg^{2+}$ , 且普鲁兰多糖发酵的优化数学模型在实验范围内可准确测定粗普鲁兰多糖的产量。

## 参考文献:

- [1] 许勤虎, 徐勇虎, 闫雪冰, 等. 普鲁兰多糖及应用进展研究[J]. 山西食品工业, 2003(2): 19-21.
- [2] 杨西江, 徐田华, 徐玲. 普鲁兰多糖的应用及研究生产现状[J]. 发酵科技通讯, 2010(4): 25-28.
- [3] REKHA M R, SHARMA C P. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective[J]. Trends Biomater Artif Organs, 2007, 20(2): 116-121.
- [4] 刘谋泉, 孔美兰. 普鲁兰多糖软胶囊囊壳生产工艺及稳定性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 57-59.
- [5] 卢辉官, 彭景, 廖康杰. 普鲁兰的特性及其在食品和医学上的应用[J]. 生物学杂志, 2010, 27(3): 93-95.
- [6] IYER A, MODY K H, JHA B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide[J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 38: 220-222.
- [7] 季洪飞, 许杨, 李燕萍. 采用响应面法优化红曲霉固态发酵产红曲色素培养条件的研究[J]. 食品科技, 2008(8): 9-13; 27.
- [8] KUANCHEN C, DEMIRCI A, CATCHMARK J M. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86: 853-861.
- [9] 柳志强, 李晓宇. 响应面法优化海洋细菌 *Bacillus* sp. YP07 淀粉酶发酵条件研究[J]. 中国酿造, 2011(2): 64-66.
- [10] LI Qian, LIU Chenguang. Optimization of synthesis process for oleoyl-alginate ester by response surface methodology[J]. 食品科学, 2011, 32(10): 6-11.
- [11] 张益波, 赵艺, 柴玉爽. 统计学分析方法在普鲁兰发酵培养基优化中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2011(3): 403-409.
- [12] 高梅莹, 莫新迎, 王宁. 响应面法优化酒精酵母产海藻糖发酵培养基[J]. 中国酿造, 2009(10): 117-120.
- [13] BAE S, SHODA M. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design[J]. Biotechnol Bioengin, 2005, 90: 20-28.
- [14] 崔玉海, 童群义. 响应面法优化短梗霉多糖培养条件[J]. 食品与发酵工业, 2003(3): 66-69.