

响应面法优化普鲁兰多糖发酵工艺条件

戎蓉,欧杰*

上海海洋大学食品学院,上海水产品加工与贮藏工程技术研究中心,上海 201306

摘要: 为了提高普鲁兰多糖的产量,本文利用响应面分析法对普鲁兰多糖的发酵工艺条件进行优化。在前期单因素实验的基础上,通过 Plackett-Burmen 实验确定时间、转速、初始 pH 为影响出芽短梗霉发酵产普鲁兰多糖的三个显著因素。在此基础上进行 Box-Behnken 实验和响应面法分析来确定最佳的发酵条件。最终确定优化条件为温度 25 °C,时间 5.5 d,转速 240 r/min,初始 pH 6.6,装液量 30 mL,接种量 2%。优化后的普鲁兰多糖产量达到 26.31 mg/mL,与预测值 26.68 mg/mL 接近,比初始产量 16.13 mg/mL 提高了 63.1%。

关键词: 响应面法;普鲁兰多糖;发酵工艺

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)05-0659-05

Optimization of Fermentation Technological Conditions for Pullulan Production by Response Surface Method

RONG Rong, OU Jie*

College of Food Science and Technology/Shanghai Ocean University; Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China

Abstract: To improve the Pullulan production, the response surface method (RSM) was used to optimize the fermentation technological conditions of pullulan producing strain in this study. On the basis of single factor tests, Plackett-Burmen experiment was employed with six factors and showed culture time, agitation speed and initial pH were three significant factors. Then the optimized technological conditions were obtained by Box-Behnken RSM. The optimum fermentation technological conditions were determined, namely, 25 °C culture temperature; 5.5 d culture fermentation time; 240 r/min culture agitation speed, initial pH 6.6, 30 mL loaded liquid and 2 % (V/V) inoculum concentration. Under these fermentation technological conditions, the predicted maximal pullulan production was 26.31 mg/mL which closed to the predicted value 26.68 mg/mL, it had increased by about 63.1% compared with the previous condition 16.13 mg/mL.

Keywords: Response surface method; Pullulan; fermentation technology

普鲁兰多糖是由素有“黑酵母”之称的出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)经发酵产生的一种天然的、类似葡聚糖、黄原胶的胞外水溶性粘质多糖^[1],它是先由葡萄糖按 α -1,4糖苷键结合成麦芽三糖,在其两端再以 α -1,6糖苷键将麦芽三糖结合,如此反复连接而形成的一种线性高分子物质^[2]。

我国在20世纪80年代左右开始对普鲁兰多糖进行研究,但由于出芽短梗霉细胞形态极其多样化等条件的制约,目前对普鲁兰多糖的研究还存在诸多难题^[3]。出芽短梗霉在其发酵过程中会进行许多变种,其可呈现酵母状细胞,膨大细胞,厚垣孢子和菌丝等多种形态^[4],这些细胞合成有用代谢产物的能力有差异,而其发酵过程中的一些发酵条件如温度、转速、初始pH值、时间等等都在很大程度上影响这些细胞形态的转化。Nishat Sharma等^[5]人经研究表明出芽短梗霉的发酵温度的变化值从25~30 °C以及100 r/min到350 r/min之间不同的转速值的变化对普鲁兰多糖产量的影响都较大。K.R. Sugumaran等^[6]人经过研究表明在发酵过程中,前7天普鲁兰的多糖产量呈上升趋势,而在之后继续培养过程中产量则逐渐下降,在144 h产量达到最大值。孔维甲等人经过试验表明在最适pH条件下,出芽短梗霉生长繁殖以酵母状细胞或膨大细胞为主,而pH2.2或pH7.0时出芽短梗霉形成分生组织状结构,使其具有不同的产普鲁兰多糖的能力^[7]。在发酵过程中,发酵产量的高低由菌种的遗传物质决定,发酵所需的营养成分提供给了菌种能发挥其性能的必要条件。但遗传基因的表达也受到发酵条件的影响,发酵过程中的各种物理化学因素都会对菌种产生影响^[8]。因此,对发酵过程中一些物理化学参数进行合理的调控是对于提高代谢产物的发酵产量的一个有利措施^[9]。因此优化出较为合

收稿日期: 2015-03-15

修回日期: 2015-04-27

基金项目: 上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 戎蓉(1990-),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术. E-mail:1026989282@qq.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:jou@shou.edu.cn

适的发酵条件是提高普鲁兰多糖产量的必要途径。

目前国内外主要利用响应面法对发酵产普鲁兰多糖的培养基进行优化^[10], 常帆等人利用响应面法优化出芽短梗霉As3.933产普鲁兰多糖的发酵培养基, 使其产量从初始的17.32 mg/mL提高到22.29 mg/mL, 提高了28.7%的产量^[11]。而利用此方法对其发酵工艺条件进行优化选择的较少。

本文就针对温度、转速、初始pH值、装液量、时间、接种量这六个主要的发酵工艺条件进行 Plackett-Burman 实验设计和响应面法分析, 利用这种优化试验条件的统计学方法, 实现用较少的实验数据推算出目标值的最优条件, 最终有效提高优化效率^[12,13]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*): IFO4464 购于上海市工业微生物研究所, 由本实验室保存于 PDA 斜面培养基上。

1.1.2 培养基 固体培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)

种子培养基 (g/L): 蔗糖 59.8、(NH₄)₂SO₄ 0.7、K₂HPO₄ 5.0、MgSO₄ 0.3、NaCl 1.5、KCl 0.5 酵母膏 2.5、pH 自然、1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

液体培养基 (g/L): 蔗糖 59.8、(NH₄)₂SO₄ 0.7、K₂HPO₄ 5.0、MgSO₄ 0.3、NaCl 1.5、KCl 0.5 酵母膏 2.5、pH 自然、1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 仪器及设备 灭菌锅 (上海博讯实业有限公司 YXQ-LS-18SI), 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 H-2050R-1), 振荡培养箱 (上海知楚仪器 ZQLY-300), pH 计 (METTLER TOLEDO 320S)。

1.2 分析方法

1.2.1 总糖的测定 培养一定时间后, 于 4500 r/min 下离心 20 min, 然后取上清液加入 2 倍体积的无水乙醇, 在 4 °C 下静置 24 h, 将沉淀物放于 3000 r/min 下离心 10 min, 用乙醇再洗, 60 °C 下烘干至恒重, 此为普鲁兰多糖粗品, 用蒽酮比色法测量其中多糖的量^[14]。

1.2.2 Plackett-Burman 实验设计 实验在前期单因素实验的基础上, 以普鲁兰多糖产量为响应值选用 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计对 6 种因子 (温度、转速、初始 pH 值、装液量、时间、接种量) 进行考察, 另外取 5 个虚拟项进行误差估计。每个因子取 2 个水平, 高水平编码为+1, 低水平编码为-1。各因子水平取值见表 1。用 Design-Expert 8.0.6 进行数据处理。

表 1 Plackett-Burman 实验分析水平表

Table 1 Values of coded levels used for the Plackett-Burman experimental design

因素 Factors	水平 Levels	
	-1	+1
X1 装液量(mL)	30	60
X2 转速(r/min)	150	240
X3 温度(°C)	25	30
X4 初始 pH	4	9
X5 时间 (d)	3	8
X6 接种量(%)	2	8

1.2.3 响应面分析实验 根据 Box-Behnken 实验原理, 用 Design-Expert 8.0.6 软件, 在 Plackett-Burman 实验结果的基础上进行三因素三水平实验。

2 结果与分析

2.1 Plackett-Burman 实验

根据 Plackett-Burman 实验设计, 按照 N=12 进行实验。Plackett-Burman 实验设计及响应值见表 2, 各因素效应值及显著性分析见表 3。

利用 Design Expert 8.0.6 软件对 Plackett-Burman 设计的结果进行方差分析得出, 对普鲁兰多糖产量产生显著性影响的因子为时间、初始 pH 和转速, 其中时间和转速为显著正效应, 初始 pH 值为显著负效应, 且根据表中的 P 值分析可知时间、初始 pH 和转速的三因素的置信度均在 90% 以上, 因此可将这

三个因素作为下一步研究对象,其他因素定为非显著因素,它们的取值则根据各因素效应的正负和大小,正效应的因素均取较高值,负效应的因素均取较低值。

表 2 Plackett-Burman实验设计与结果

Table 2 Design and results for the Plackett-Burman experiment

序号 Order	X1	X2	X3	X4	X5	X6	普鲁兰多糖 (mg/mL)	Pullulan
1	1	-1	1	1	1	-1	19.03	
2	-1	1	1	-1	1	1	25.14	
3	1	1	1	-1	-1	-1	27.65	
4	1	1	-1	-1	-1	1	22.37	
5	-1	1	1	1	-1	-1	15.93	
6	-1	-1	1	-1	1	1	22.00	
7	1	1	-1	1	1	1	23.93	
8	1	-1	-1	-1	1	-1	21.90	
9	-1	-1	-1	1	-1	1	11.10	
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	19.10	
11	1	-1	1	1	-1	1	3.33	
12	-1	1	-1	1	1	-1	31.47	

表 3 因素效应值及显著性分析

Table 3 Values of effect size and analysis of significance for factors

来源 Source	估计 Estimate	F 值 F-value	概率 Probability>F	显著性 Significance
Model	20.25	6.71	0.0271	
X1	-0.54	0.26	0.6322	6
X2	4.17	15.23	0.0114	1
X3	-1.40	1.72	0.2473	5
X4	-2.78	6.78	0.0481	3
X5	3.67	11.77	0.0186	2
X6	-2.27	4.50	0.0872	4

注: R-Squared=0.8895, Adj R-Squared=0.7570

2.2 Box-Behnken 实验

通过以上Plackett-Burman实验,确定了时间、初始pH和转速为影响普鲁兰多糖产量的显著因素。为了得到这三个因素对普鲁兰多糖发酵的确切影响情况及其最佳配比,下面需要利用Design-Expert 8.0.6软件,使用Box-Behnken试验方法对这三个因素进行考查。实验因素水平的选取见表4,Box-Behnken实验设计及结果见表5。

表 4 Box-Behnken 实验因素与水平

Table 4 Values of coded levels used for the Box-Behnken experimental design

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A:转速 (r/min)	180	210	240
B:初始 pH	4	6	8
C:时间 (d)	3	5	7

表 5 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 5 Design and results for the Box-Behnken experiment

因素 Factors	因素 1 Factor 1	因素 2 Factor 2	因素 3 Factor 3	普鲁兰多糖(mg/mL) Pullulan
	A:转速(r/min) Rotate speed	B:初始 pH Initial pH	C:时间(d) Days	
1	0	0	0	32.48
2	0	1	1	21.07
3	-1	0	0	16.30
4	0	0	0	29.29
5	1	0	1	22.73
6	0	0	0	32.47
7	0	0	0	26.87
8	-1	0	1	24.61
9	0	0	0	26.93
10	-1	0	0	23.75
11	1	0	0	20.14
12	1	0	-1	17.16
13	-1	0	-1	19.30
14	0	-1	-1	7.77
15	0	-1	1	14.62
16	0	1	-1	15.90
17	1	-1	0	12.01

用Design-Expert 8.0.6软件对Box-Behnken实验结果进行二次回归分析,得到的回归方程为:普鲁兰多糖产=29.61-1.49×A+1.91×B+2.86×C+3.89×A×B+0.065×A×C-0.42×B×C-2.72×A²-8.83×B²-5.93×C²。

由表6可知,根据该模型的F值和P值得出该模型具有高度显著性[Probability>F)=0.0032]。模型的相关系数为R²=92.70%,说明该模型与实际实验拟合的很好,能很好地预测普鲁兰多糖发酵条件与多糖产量的关系;而分析表B²、C²和C具有显著性,其他项的系数均不显著,说明试验因子C在所选范围内和二次项B²、C²对响应值都有很大关系,A、B在设定的范围内对普鲁兰多糖产量的影响不显著。校正决定系数(Adj R-Squared)为0.8330,说明该模型能解释83.3%响应值的变化;而本模型的信噪比(Adeq Precision)为9.087,一般来说,模型的信噪比大于4就可以说明这个模型是比较好的,从而进一步说明该模型合理可靠。

表 6 Box-Behnken试验方差分析

Table 6 Analysis of variance for response surface quadratic model

来源 Source	平方和 Sum of squares	df	均方 Mean squares	F值 F-value	概率 Probability>F	显著性 significance
Model	728.51	9	80.95	9.87	0.0032	
A	17.76	1	17.76	2.17	0.1846	
B	29.11	1	29.11	3.55	0.1016	
C	65.55	1	65.55	7.99	0.0255	
AB	60.68	1	60.68	7.40	0.0298	
AC	0.017	1	0.017	2.061E-003	0.9651	
BC	0.71	1	0.71	0.086	0.7778	
A ²	31.24	1	31.24	3.81	0.0919	
B ²	328.59	1	328.59	40.07	0.0004	
C ²	148.26	1	148.26	18.08	0.0038	
Residual	57.40	7	8.20			
CorTotal	785.91	16				

注: R-Squared=0.9270, Adj R-Squared=0.8330, Adeq Precisor=9.087

根据Box-Behnken设计结果,利用Design-Expert 8.0.6软件对模型进行响应面分析,得到响应面立体分析图(图1)。每个响应面分别代表着两个独立变量之间的相互作用。由图可知,时间、初始pH和转速与普鲁兰多糖的产量存在显著相关性,其中时间和初始pH值对普鲁兰多糖产量的影响较为显著。在一定范围内,随着时间的增加和初始pH的提高,普鲁兰多糖的产量明显增加。但随着时间和初始pH的进一步增加,普鲁兰多糖产量会有不同程度的下降。并且由相应的等高线图可以看出,时间与初始pH的等高线图接近圆形,交互作用是不显著的,而时间与转速、初始pH与转速的等高线图呈椭圆形,交互作用显著。

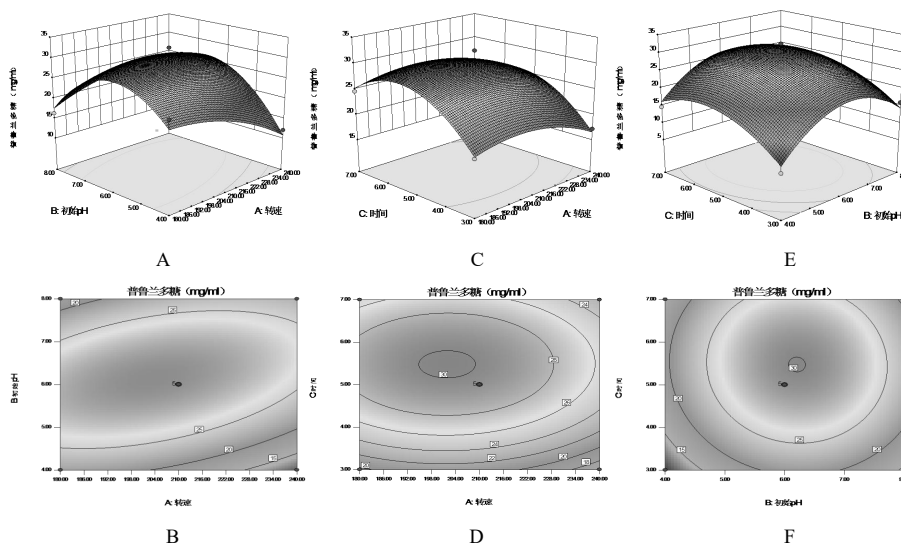


图 1 响应面法分析

AB 为初始 pH 和转速之间的相互作用; CD 为时间和转速之间的相互作用; EF 为时间和初始 pH 之间的相互作用

Fig.1 Response surface method for pullulan production

AB:The interaction between initial pH and speed; CD:The interaction between time and speed; EF:The interaction between time and initial pH

2.3 最佳发酵条件的验证

为了证实实验结果的可靠性,对上述优化条件进行了验证性实验,进行3组平行实验,结果测得普鲁兰多糖产量为26.31 mg/mL,与模型预测值一致(相对误差0.99%)。

3 结论

通过对普鲁兰多糖发酵条件进行 Plackett-Burman 设计和响应面法分析,最终确定优化条件为温度 25 °C, 时间 5.5 d, 转速 240 r/min, 初始 pH 6.6, 装液量 30 mL, 接种量 2%。优化后的普鲁兰多糖产量达到 26.31 mg/mL, 比初始产量 16.13 mg/mL 提高了 63.1%。

4 讨论

本实验利用响应面分析法优化普鲁兰发酵工艺条件,实验得出的预测结果与验证实验结果接近,具有很好的重现性,可见该模型可以较好的预测普鲁兰多糖实际发酵情况。并且考虑到各参数之间的相互影响,通过响应面优化将三个主要影响因素同时进行最佳条件的选择,更加高效地达到优化的效果,使普鲁兰多糖的产量大幅上升达到 26.31 mg/mL,该产量在已有研究报道中仍是具有优势的数据,高于 Jianxiong Kang^[15]等人之前的研究报道中的产量。因此,采用响应面分析法优化普鲁兰多糖发酵工艺条件是行之有效的。

参考文献

- [1] Rajeeva G, Singh R, Kumar G. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan[J]. African Journal of Biotechnology, 2010,9(47):7989-7997
- [2] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase[J]. Carbohydrate Polymers, 2010,80:401-407
- [3] 郭法利,欧杰,马晨晨,等.出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)生物合成普鲁兰多糖的研究进展[J].广东农业科学,2013,40(13):113-115
- [4] 孔维甲,徐琼,靳建忠,等.环境pH诱导出芽短梗霉细胞多形化[J].微生物学杂志,2011,31(2):7-12
- [5] Sharma GS, Anirban RC. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2013,93:95-101
- [6] Sugumaran KR, Gowthami E, Swathi B, et al. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate[J]. Carbohydrate Polymers, 2013,92:697-703
- [7] Vipul DP, Girish KJ, Simin M. Khanda. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2013,95:540-549
- [8] Anirban RC, Saluja P, Prasad GS. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*[J]. Carbohydrate Polymers, 2011,83:1547-1552
- [9] Qian X, Loong-Tak L, Tong QY. Properties of pullulan-based blend films as affected by alginate content and relative humidity[J]. Carbohydrate Polymers, 2012,87:227-234
- [10] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Pullulan: Microbial sources, production and applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2008,73:515-531
- [11] 常帆,薛文娇,安超,等.利用响应面法优化出芽短梗霉As3.933产普鲁兰多糖发酵培养基[J].化学与生物工程,2013,30(5):42-45
- [12] 周喻,吴文惠,苏同伟,等.响应面法优化海洋镰刀腐皮菌产出 HMG-CoA 还原酶抑制剂的培养条件[J].微生物学通报,2014,41(8):1516-1524
- [13] Eriola B, Ezekiel AT. Modeling and optimization of bioethanol production from breadfruit starch hydrolyzate vis-a-vis response surface methodology and rtificial neural network[J]. Renewable Energy, 2015,74:87-94
- [14] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997:26-27
- [15] Kang JX, Chen XJ, Chen WR, et al. Enhanced production of pullulan in *Aureobasidium pullulans* by a new process of genome shuffling[J]. Process Biochemistry, 2011,46:792-795