

文章编号:1673-1689(2007)03-0095-05

响应面法优化 β -胡萝卜素液体发酵培养基

廖春丽, 余晓斌, 刘海丽

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 用响应面法对三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)液体发酵 β -胡萝卜素的培养基进行了优化。首先用快速登高路径逼近 β -胡萝卜素最大产量区域, 然后根据快速登高法的实验结果进行响应面实验。运用逐步回归分析法, 获得 β -胡萝卜素产量与柠檬酸、棉籽油、黄豆粉的最优回归方程, 且分析了各因子间的交互效应。最后, 通过岭脊分析(Ridge max)得到 β -胡萝卜素产量最大值时的组合为: 柠檬酸 3.10 g/dL、棉籽油 11.28 g/dL、黄豆粉 2.54 g/dL。 β -胡萝卜素产量可达 1.02 g/L, 比优化前提高了 25%。

关键词: β -胡萝卜素; 三孢布拉霉; 响应面方法; 交互效应; 岭脊分析

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Optimize the Submerged Fermentation Media of β -Carotene by Using Response Surface Methodology

LIAO Chun-li, YU Xiao-bin, LIU Hai-li

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the fermentation medium of β -carotene production by *Blakeslea trispora*. In the first optimization step, the path of steepest ascent was used to approach the optimal region of the β -carotene production. Then The response surface experiment was perform, according to the result of steepest ascent. The optimal regression equation model which expressed the relationship between the production and citric acid, cottonseed oil, and soybean powder was established by the stepwise regression analysis, and the mutual effects were analyzed. Eventually, the optimal conditions for β -carotene production (1.02 g/L) were determined by ridge analysis as follows: citric acid 3.10 g/dL, cottonseed oil 11.28 g/dL, and soybean powder 2.54 g/dL.

Key words: β -carotene; *Blakeslea trispora*; response surface methodology; mutual effect; ridge analysis

β -胡萝卜素(β -carotene)是自然界中存在最广泛的色素之一, 是VA的前体, 并具有较强的抗氧化

收稿日期: 2006-07-23.

基金项目: 江南大学青年科学基金资助项目(101000-52210468).

作者简介: 廖春丽(1980-), 女, 河南淮滨人, 食品添加剂剂硕士研究生. Email: liaoliao8178@yahoo.com.cn

通讯作者: 余晓斌(1964-), 男, 安徽芜湖人, 教授, 工学博士, 博导, 主要从事酶工程的研究. Email: xbyu@sytu.edu.cn

化作用,在食品、保健品、化妆品以及医药领域具有重要用途^[1]。而发酵法生产 β 胡萝卜素由于具有工艺安全、低成本以及强着色力等优势而在国内外倍受关注。

培养条件的优化是降低 β 胡萝卜素生产成本的最重要的途径之一^[2]。由于三孢布拉霉是异宗结合菌,其生物合成的调控受多种因素的约束,因此培养基的组成对 β 胡萝卜素产量有着非常重要的影响。通常用单因子法和正交试验设计法优化发酵培养基,但它们都无法找到整个区域上各个因素的最佳组合和响应值的最优值^[3]。而响应面分析法则试验次数少、周期短、求得的回归方程精度高、可研究几种因素间的交互作用。在本研究中,作者首先用快速登高路径逼近最大产量区域,然后进行响应面实验,最后通过岭脊分析确定了 β 胡萝卜素产量最大时的最佳组合条件, β 胡萝卜素产量提高了25%。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验菌株 三孢布拉霉:正菌+,负菌-,作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基

1) 起始摇瓶培养基(组分 g/dL):玉米粉 1.60,柠檬酸 3.30,葡萄糖 0.48,棉籽油 10.00,黄豆粉 2.10, KH_2PO_4 0.20,玉米浆粉 0.26, VB_1 0.000 1;其它无机盐,自来水配制成 25 mL。pH 7。

2) 优化摇瓶培养基(组分 g/dL):玉米粉 1.40,柠檬酸 3.10,葡萄糖 0.48,棉籽油 11.28,黄豆粉 2.54, KH_2PO_4 0.20,玉米浆粉 0.26, VB_1 0.000 1;其它无机盐,自来水配制成 25 mL。pH 7。

1.2 分析测定方法

1.2.1 β 胡萝卜素的提取 摇瓶发酵结束后, β 胡萝卜素菌体沸水浴 5 min,抽滤得半干的菌体,然后在冻干机里冻干。称量菌体干重,用研钵磨碎后,再用石油醚提取。

1.2.2 β 胡萝卜素的测定 把石油醚抽提的滤液稀释成适当的浓度(其颜色深度与 β 胡萝卜素的含量成线性关系),用分光光度计在 450 nm 处测 OD 值,用标准曲线计算出 β 胡萝卜素产量^[4]。

1.3 试验设计

1.3.1 快速登高法实验 快速登高法实验是以实验值变化的梯度方向为登高方向,根据各因素效应值的大小确定变化步长,能快速、经济地逼近最佳值区域^[5]。以柠檬酸(Z_1)、棉籽油(Z_2)、黄豆粉

(Z_3)、玉米粉(Z_4)的质量浓度为自变量, β 胡萝卜素产量(Y)为目标函数。根据实验设计要求,对试验因子的设计水平进行线性编码代换,以便把因变量 Y 对自变量的回归关系转化为 Y 对因子空间中坐标轴 X 上编码值的关系。以试验因子(自变量)编码值拟定试验设计方案,做3次重复试验。具体的编码公式如下:

$$\begin{cases} Z_{0j} = (Z_{1j} + Z_{2j}) / 2 \\ \Delta j = (Z_{2j} - Z_{1j}) / 2 \\ X_j = (Z_j - Z_{0j}) / \Delta j \end{cases}$$

其中, Z_{2j} 、 Z_{1j} 、 Z_{0j} 、 Δj 和 X_j 分别表示第 j 个自然因素 Z_j 的上水平、下水平、零水平、变化区间和编码因素。

1.3.2 响应面实验 逼近最大产量区域后,进行响应面实验。用响应面实验结果来建立多项式回归模型,多项式回归模型表达式为:

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^4 b_j X_j + \sum_{i < j} b_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^4 b_{jj} X_j^2$$

其中, b_0 常数项; b_j 一次项回归系数; b_{ij} 交互回归系数; b_{jj} 二次项回归系数。

2 结果与分析

2.1 快速登高法试验

作者用快速登高法,快速、经济地逼近柠檬酸(Z_1)、棉籽油(Z_2)、黄豆粉(Z_3)、玉米粉(Z_4)最佳值区域,为接下来的响应面实验奠定基础。

根据文献[6],在胡萝卜素的液体发酵培养基中,柠檬酸(Z_1)、棉籽油(Z_2)、黄豆粉(Z_3)、玉米粉(Z_4)这4种成分的质量浓度是影响产量的主要因素。对每一个因素选择适当的零水平和相对狭窄的变化区间,具体设计见表1。

表1 试验因素水平表

Tab. 1 Experimental factors and lever value

试验因素	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
下水平(-1)	3.0	9	1.9	1.4
零水平 0	3.3	10	2.1	1.6
上水平(+1)	3.6	11	2.3	1.8
变化区间 Δj	0.3	1	0.2	0.2

根据表1中的因素水平,用一次回归正交设计中的部分实施来安排试验,再根据实验结果,算出编码空间中一次回归的回归系数 b_1 、 b_2 、 b_3 、 b_4 ,进而确定各因素的步长变化 $e b_j$,最后根据各因素的步长变化在同一梯度上进行6次试验,试验设计和结果见表2。

表 2 快速登高法试验设计和结果
Tab. 2 Result and design of steepest ascent

试验号	因素编码				Y
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	-1	0.75
2	1	-1	-1	1	0.80
3	-1	1	-1	1	0.74
4	1	1	-1	-1	0.75
5	-1	-1	1	1	0.75
6	1	-1	1	-1	0.75
7	-1	1	1	-1	0.82
8	1	1	1	1	0.78
回归系数 b _j	1.25	5.25	6.50	0.50	
步长变化 eb _j	0.058	0.243	0.3	0.023	
整理化 eb _j	0.06	0.24	0.30	0.02	
进一步试验号					
1	3.00	11.00	2.3	1.4	0.72
2	3.06	11.24	2.6	1.4	0.90
3	3.12	11.48	2.9	1.4	0.85
4	3.16	11.72	3.2	1.4	0.78
5	3.22	11.96	3.5	1.4	0.77
6	3.28	12.20	3.8	1.4	0.76

注:由于 X₄ 的 eb_j 为 0.02, 变化太小影响不显著, 所以把 X₄ 定在 1.4。

由表 2 的试验结果可知, 最优发酵条件在 2 和 3 之间, 故以它们的条件为后续实验中心点。

2.2 响应面实验优化培养基

根据快速登高法的实验结果, 以处理 2、3 条件为中心点实施响应面实验。分别选取柠檬酸、棉籽油、黄豆粉的质量浓度 3.10、11.30、2.60 g/dL 为中心点进行响应面实验, 实验设计及结果见表 3。

表 3 响应面实验方案与结果

Tab. 3 Result and design of response surface analysis

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	0	0.77
2	-1	1	0	0.88
3	1	-1	0	0.89
4	1	1	0	0.67
5	0	-1	-1	0.76
6	0	-1	1	0.90
7	0	1	-1	0.93
8	0	1	1	0.60
9	-1	0	-1	0.77
10	1	0	-1	0.87

续表 3

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
11	-1	0	1	0.81
12	1	0	1	0.68
13	0	0	0	0.98
14	0	0	0	1.06
15	0	0	0	0.99

2.2.1 最优回归方程的确定 采用 SAS 软件, 用强迫引入法和逐步回归法拟合柠檬酸、棉籽油、黄豆粉质量浓度 3 个因子与β胡萝卜素产量的回归方程。

1) 强迫引入法: 用强迫引入法建立回归方程得

$$Y_1 = 1009.67 - 14.25X_1 - 29.63X_2 - 42.63X_3 - 111.08X_1^2 - 84.25X_1X_2 - 59.25X_1X_3 - 95.33X_2^2 - 115.00X_2X_3 - 117.33X_3^2$$

该方程的复相关系数为 0.98, 修正复相关系数为 0.94, 表明该方程各因子与实验结果的拟合效果非常好, 能很好地反映实际情况。

2) 逐步回归法: 采用逐步回归法建立回归方程得:

$$Y_1 = 1009.67 - 14.25X_1 - 29.63X_2 - 42.63X_3 - 111.08X_1^2 - 95.33X_2^2 - 117.33X_3^2$$

由上式可知, 该方程所包括的自变量大为减少, 可操作性较好, 利于实际应用, 同时并未因自变量的减少而对因变量的回归贡献明显减少(决定系数仅由 0.96 减至 0.95)。所以把该回归方程作为最后确定的最优回归方程。

2.2.2 试验因子间交互效应分析

1) 棉籽油与柠檬酸的交互效应: 棉籽油、柠檬酸含量与产量的回归方程为:

$$Y_{12} = 1009.67 - 14.25X_1 - 29.63X_2 - 111.08X_1^2 - 84.25X_1X_2 - 95.33X_2^2$$

棉籽油、柠檬酸的质量浓度与产量的关系见图 1。由图 1 可知, 当柠檬酸的质量浓度在 2.94~3.10 g/dL 时, 棉籽油质量浓度在 11.00~11.30 g/dL 时, 柠檬酸质量浓度与棉籽油质量浓度的作用相辅相成, β胡萝卜素产量随棉籽油、柠檬酸质量浓度的增加而增大。当柠檬酸质量浓度为 3.10 g/dL, 棉籽油质量浓度为 11.28 g/dL 时, β胡萝卜素产量可达 1.01 g/L。

2) 黄豆粉与棉籽油的交互效应: 黄豆粉质量浓度、棉籽油质量浓度与产量的回归方程为:

$$Y_{23} = 1009.67 - 29.63X_2 - 42.63X_3 - 95.33X_2^2 - 115.00X_2X_3 - 117.33X_3^2$$

黄豆粉质量浓度、棉籽油质量浓度与β胡萝卜

素产量的关系见图2。

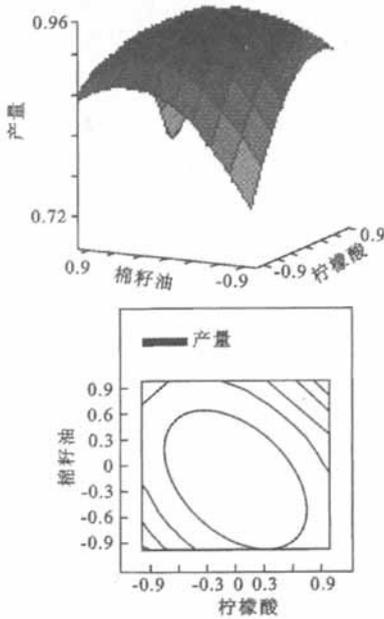


图1 响应面法(Z_1, Z_2)立体曲面图和相应等高线图
 Fig.1 3D surface map and corresponding contour map of response surface methodology on Z_1 and Z_2

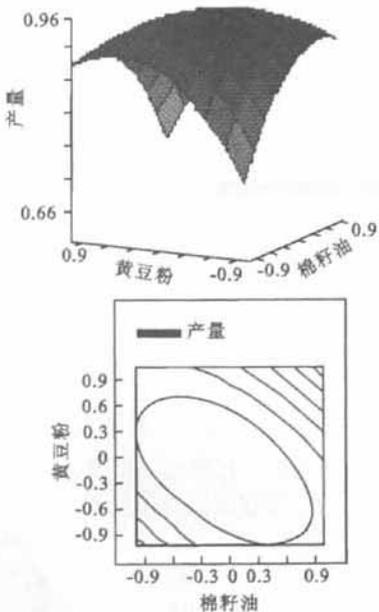


图2 响应面法(Z_2, Z_3)立体曲面图和相应等高线图
 Fig.2 3D surface map and Corresponding contour map of response surface methodology on Z_2 and Z_3

由图2可知,当黄豆粉质量浓度在2.30~2.56 g/dL范围内,棉籽油质量浓度在11.00~11.30 g/dL时,黄豆粉质量浓度与棉籽油质量浓度的作用相辅相成,随 β -胡萝卜素产量黄豆粉、棉

籽油质量浓度的增加而增大。当黄豆粉质量浓度为2.54 g/dL,棉籽油质量浓度为11.30 g/dL时, β 胡萝卜素产量可达1.01 g/L。

3) 柠檬酸与黄豆粉的交互效应:柠檬酸、黄豆粉质量浓度与产量的回归方程为:

$$Y_{13} = 1009.67 - 14.25X_1 - 42.63X_3 - 111.08X_1^2 - 59.25 X_1 X_3 - 117.33X_3^2$$

柠檬酸、黄豆粉质量浓度与 β -胡萝卜素产量的关系见图3。

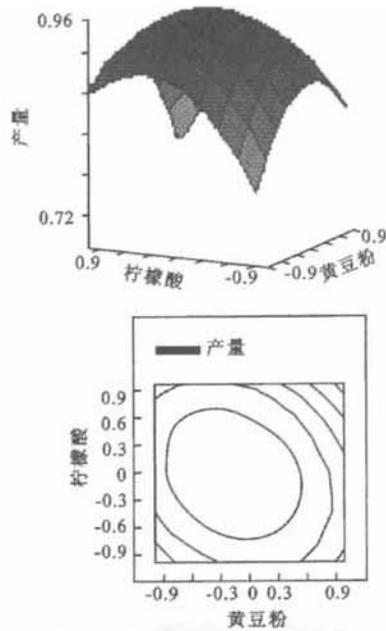


图3 响应面法(Z_1, Z_3)立体曲面图和相应等高线图
 Fig.3 3D surface map and Corresponding contour map of response surface methodology on Z_1 and Z_3

由图3可知,当黄豆粉质量浓度为2.54 g/dL,柠檬酸质量浓度为11.30 g/dL时, β 胡萝卜素产量可达1.01g/L。黄豆粉质量浓度在2.30~2.54 g/dL,柠檬酸质量浓度在2.94~3.10 g/dL时,黄豆粉质量浓度与柠檬酸质量浓度的作用相辅相成, β 胡萝卜素产量随黄豆粉、柠檬酸质量浓度的增加而增大。

2.2.3 最佳组合方案确定 由于试验因子不但存在着主效应,而且某些因子之间同时还存在着交互效应,因此很难从主效应和交互效应分析中找到最佳技术组合。作者根据求得的最优回归方程和实验结果,通过岭脊分析(Ridge max)得到 β 胡萝卜素产量最大值时的组合为:柠檬酸3.10 g/dL、棉籽油11.28 g/dL、黄豆粉2.54 g/dL。此条件下 β -胡萝卜素产量可达1.02 g/L。以此最佳组合做3次重复试验,结果分别为1.01 g/L、1.03 g/L、1.02

g/L,平均值为 1.02 g/L,与预测值吻合。说明采用作者所报道的实验方法能很好地反映实际情况。

3 结 论

1) 快速登高法以实验值变化的梯度方向为登高方向,快速、经济地逼近 β -胡萝卜素的最佳产量区域,确定出响应面实验的中心点为:柠檬酸 3.10 g/dL、棉籽油 11.30 g/dL、黄豆粉 2.60 g/dL。

2) 采用强迫引入法和逐步回归法对响应面实验数据进行分析,由 SAS 软件拟合出了柠檬酸、棉

籽油、黄豆粉对 β -胡萝卜素产量的最优回归方程

$$Y_1 = 1009.67 - 14.25X_1 - 29.62X_2 - 42.63X_3 - 111.08X_1^2 - 95.33X_2^2 - 117.33X_3^2$$

3) 由试验因子间的互作效应分析得出,各因子都有一定的取值范围,只有在合理配合下才能获得较好的结果。通过岭脊分析(Ridge max)得到 β -胡萝卜素产量最大值的发酵培养基组合为:柠檬酸 3.10 g/dL、棉籽油 11.28 g/dL、黄豆粉 2.54 g/dL。此条件下 β -胡萝卜素产量可达 1.02 g/L。此组合经实验验证,能很好地反映实际情况。

参考文献(References):

- [1] Nabae K, Ichihara T, Hagiwara A. A 90-day oral toxicity study of beta-carotene derived from *Blakeslea trispora*, a natural food colorant in F344rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(7): 11; 27-33.
- [2] 王岁楼, 张平之. β -胡萝卜素的生物合成与发酵促进剂[J]. 生物学杂志, 2000, 17(3): 4-5.
Wang Suilou, Zhang Pingzhi. The biosynthesis of β -carotene and fermentation promoter[J]. *Journal of Biology*, 2000, 17(3): 4-5. (in Chinese)
- [3] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20(2): 58-61.
CHU Yi-wen. microbial culture medium optimization and OPTI optimization software[J]. *World Notes on Antibiotics*, 1999, 20(2): 58-61. (in Chinese)
- [4] 谭新国, 汪家松, 丁滨, 等. 三孢布拉霉发酵生产 β -胡萝卜素[J]. 中南民族学院学报, 1997, 16(3): 18-19.
Tan Xinguo, Wang Jiasong, Ding Bin, et al. Research on β -carotene fermentation by *Blakeslea trispora*[J]. *Journal of South-Central College for Nationalities(Natural Sciences)*, 1997, 16(3): 18-19. (in Chinese)
- [5] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002: 183-186.
- [6] 陈涛, 陈宗胜, 马国华, 等. 三孢布拉氏霉发酵生产 β -胡萝卜素的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(2): 79-81.
Chen Tao, Chen Zong-sheng, Ma Guo-hua, et al. Studies on production of β -carotene with *Blakeslea trispora*[J]. *Microbiology*, 1998, 25(2): 79-81. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)