

Geotrichum penicillatum 生产酯类 风味物质发酵条件的优化

阮文权 陈 坚 孙胜利 伦世仪

(生物工程学院)

摘要 *G. penicillatum* 是一株能生产水果香味的微生物,酯类是其香味的主体。采用响应面分析方法对影响 *G. penicillatum* 产酯的主要因素进行了摇瓶实验研究,确定了培养基的最佳组成,用此培养基发酵,乙酸乙酯(产物酯中代表性成分之一)产量提高了 9.6%;还得到了在摇瓶条件下预测酯产量与菌体生长量的两个多项式数学模型。

主题词 *G. penicillatum*; 酯; 优化/发酵培养基; 响应面

中图分类号 TQ920.6

0 前 言

风味物质已被广泛地应用于食品、饲料、化妆品和医药工业。目前,世界上风味芳香物质的年产值约为 70 亿美元,占据了 25% 的食品添加剂市场^[1],且逐年增长,然而在现今生产的风味化合物中,85% 是通过化学合成法得到的。化学合成的风味物质存在严重缺陷,因而用生物技术法生产风味物质的前景越来越广。采用生物技术生产风味物质有二条途径^[2]:一是将适当的前体物进行酶转化,即利用微生物分泌的酶将前体物质转化成具有高附加值的产品;二是将简单的营养物质(如糖和氨基酸)用微生物进行发酵生产风味物质。研究表明,微生物发酵能生产四大类化合物:萜烯类、内酯类、吡嗪类和酯类。

G. penicillatum 是一株能产酯的微生物,形态类似于假丝酵母,生长特性与霉菌相似,属霉菌类^[3]。作者采用响应面分析方法对影响 *G. penicillatum* 产酯的几个主要因素进行摇瓶实验研究,确定了培养基的最佳组成和最佳 pH 值,用此培养基摇瓶发酵,乙酸乙酯(产物酯中代表性成分之一)产量提高了 9.6%;在响应面分析过程中还得到了预测酯产量与菌体生长量的两个多项式数学模型。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养条件

收稿日期:1996-03-11

1.1.1 菌种 *Geotrichum penicillatum* (帚状地霉)。

1.1.2 培养基与培养条件 菌种保存培养基 葡萄糖、酵母膏和蛋白胨组成的完全培养基。发酵培养基 葡萄糖、蛋白胨、酵母膏等,其中酵母膏的加入量为4g/L,其他由实验确定。培养条件 500ml的三角瓶中装液100ml,接种量10%,培养温度30℃,摇床转速100r/min,发酵4d。

表1 因素与水平的取值表

因素	编码	因素取值	水平
葡萄糖 (g/L)	X_1	+1	150
		0	100
		-1	50
蛋白胨 (g/L)	X_2	+1	10
		0	6
		-1	2
pH	X_3	+1	7.0
		0	5.5
		-1	4.0

1.2 实验设计

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理^[4],设计了三因素三水平的响应面分析实验,共有15个实验点,其中12个为析因点,3个为零点,零点实验进行3次,以估计误差。以葡萄糖、蛋白胨、pH三个因素为自变量,以总酯产量及菌体量为响应值,实验因素与水平的选取如表1。

1.3 分析方法

菌体量测定 0.2ml 发酵液中加入一定量的生理盐水,在波长为660nm 可见光处读OD值,与标准曲线对照得到菌体干量。

酯类测定 10ml 发酵液在3000r/min 下离心10min,取上清液2ml,用0.5ml 二氯甲烷萃取,吸取萃取液0.5 μ l 进气相色谱仪。色谱条件为:恒温(30℃,5min)后程序升温(2℃/min)至150℃,氢火焰检测器,检测器温度230℃,进样器温度210℃,辛烷作内标,保留时间法确定样品成分,积分面积法确定样品组分的浓度。本研究中乙酸乙酯是产物酯中有代表性的一种物质,下面的分析均以乙酸乙酯为例。

响应面分析 实验以随机次序进行,重复2次,实验获得的酯产量与菌体生长量的平均值用 SAS' RSREG (Response surface regression) 程序进行分析^[5],并由此给出响应面分析图和方差分析表。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶发酵条件的优化

近10年来,响应面分析(Response Surface Analysis)方法已被广泛应用于发酵过程实验的设计,以期能以最经济的方式(如用很少的实验次数和时间)对实验进行全面、科学的研究,取得明确的、有目的的结论。摇瓶培养是发酵生产研究的第一步,涉及到培养基的多种组分和多个环境因素,利用表面响应法的特点,即通过将多因子试验中因子与试验结果的关系函数化,进行函数面的分析,可对摇瓶发酵条件进行优化。

根据表1对实验因素与水平的设计,采用不同的葡萄糖浓度、蛋白胨浓度和pH值,作者进行了15次实验,每次实验得到的总酯产量及菌体量见表2。采用回归方程 $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3$,在由表2数据用 SAS' RSREG 程序计算出回归方程中各系数(结果见表3)的基础上,对乙酸乙酯产量和菌体生长量二回归模型分别进行数学分析,即对模型方程求偏导,并令其等于零,可得到曲面的稳定点,即最大点,结果见表4。从表4可以发现:达到最大乙酸乙酯产量和菌体生

长量时所需的葡萄糖、蛋白胨及 pH 值基本相近,说明 *G. penicillatum* 发酵过程中乙酸乙酯的生产与菌体的生长密切相关;综合考虑乙酸乙酯生产、菌体生长及培养基的配制,得 *G. penicillatum* 摇瓶发酵最佳培养条件为:葡萄糖 125g/L、蛋白胨 9g/L、酵母膏 4g/L, pH6.0.

表 2 响应面分析实验结果(g/L)

编号	X_1	X_2	X_3	酯	菌体干量
1	-1	-1	0	0.2240	8.57
2	-1	0	-1	0.2970	8.91
3	-1	0	+1	0.3101	9.03
4	-1	+1	0	0.3210	9.37
5	0	-1	-1	0.2380	9.68
6	0	-1	+1	0.2640	9.81
7	0	+1	-1	0.3631	10.05
8	0	+1	+1	0.3727	10.45
9	+1	-1	0	0.2500	9.53
10	+1	0	-1	0.3432	9.85
11	+1	0	+1	0.3570	9.97
12	+1	+1	0	0.3831	9.96
13	0	0	0	0.3510	10.09
14	0	0	0	0.3620	10.47
15	0	0	0	0.3491	10.30

表 3 回归系数取值

系数	乙酸乙酯	菌体
a_0	3.540×10^{-1}	1.287×10
a_1	2.265×10^{-2}	4.288×10^{-1}
a_2	5.799×10^{-2}	2.800×10^{-1}
a_3	7.813×10^{-3}	9.625×10^{-2}
a_{11}	-2.107×10^{-2}	-7.433×10^{-1}
a_{22}	-3.844×10^{-2}	-1.858×10^{-2}
a_{33}	-6.142×10^{-3}	-1.033×10^{-1}
a_{12}	9.025×10^{-3}	-9.250×10^{-2}
a_{13}	1.750×10^{-4}	0
a_{23}	-4.100×10^{-3}	6.750×10^{-2}

对回归模型的进一步分析和计算发现:两模型的 F 值均大于 $f_{0.01}(9,5)$, 线性相关系数分别达到了 0.996 和 0.955

表 4 回归模型的数学分析(g/L)

响应值变量	葡萄糖	蛋白胨	pH	计算值	点的类型
乙酸乙酯	127.7	9.2	6.06	0.3867	最大值
菌体	111.8	9.3	6.61	10.49	最大值

(见表 5),说明方程的因变量与全体自变量之间的线性关系显著,相比较而言乙酸乙酯有更大的显著性;由于两个方程的失拟项很小(表 6),所得回归方程有较好的代表性,可用回归方程对实验进行分析和预测。从表 6 还可看出,两方程一次项和二次项的数值较大,说明各个具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系,且各个因子之间的交互作用不显著。

为了进一步验证最佳摇瓶培养条件,作者采用上述条件进行了实验,结果乙酸乙酯产量达到了 0.3847g/L,比没优化前提高了 9.6%。

表 5 回归方程的方差分析

方差来源	自由度	平方和	乙酸乙酯 均方差	F 值	平方和	菌体 均方差	F 值
回归	9	3.857×10^{-2}	4.286×10^{-3}	192	4.33	0.481	23
残差	5	1.113×10^{-4}	2.226×10^{-2}		0.103	0.0205	
总离差	14	3.869×10^{-2}			4.434		
线性相关系数			0.996			0.955	

$$f_{0.01}(9,5) = 10.2$$

表 6 回归方程各项的方差分析表

方差来源	自由度	均方	乙 酸 乙 酯 F 值	显著性	均方	菌 体 F 值	显著性
一次项	3	1.050×10^{-2}	216.4	**	0.724	19.98	*
二次项	3	2.229×10^{-3}	46.0	*	0.702	19.38	*

续表 6

方差来源	自由度	均方	乙酸乙酯 F值	显著性	均方	菌体 F值	显著性
交互项	3	1.311×10^{-4}	2.7		0.0175	0.483	
失拟项	3	4.767×10^{-6}	0.098		0.0101	0.278	
误差	2	4.850×10^{-5}			0.036		

$f_{0.01}(3,2) = 99.2$ $f_{0.05}(3,2) = 19.2$ $f_{0.1}(3,2) = 9.16$

2.2 摇瓶发酵条件下酯产量和菌体生长量的预测

根据两个回归模型,作出响应面分析的等高线图以确认葡萄糖、蛋白胨和 pH 分别对 *G. penicillatum* 摇瓶发酵中乙酸乙酯产量和菌体生长量的影响情况。由于 pH 在三个因素中的影响最小,因此在作等高线图时将 pH 点固定,以便突出二个主要的因素——葡萄糖和蛋白胨对乙酸乙酯产量和菌体生长量的影响,见图 1,2。由此可见:葡萄糖是影响菌体生长

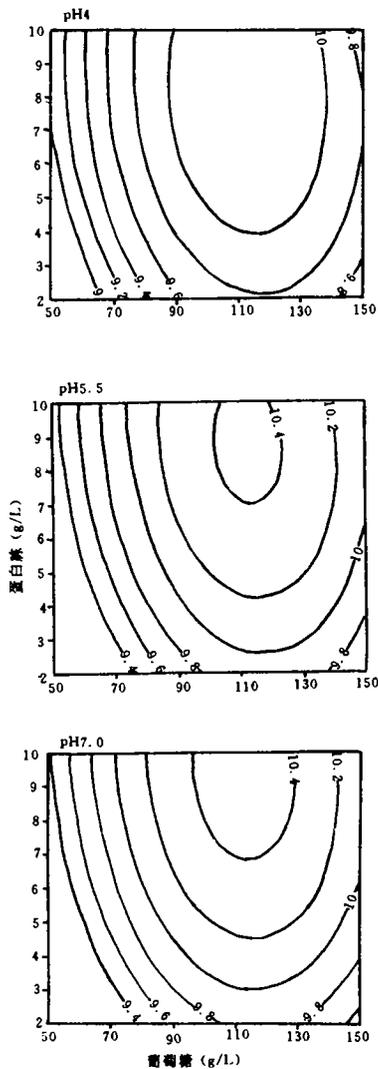


图 1 菌体生长的响应面分析图

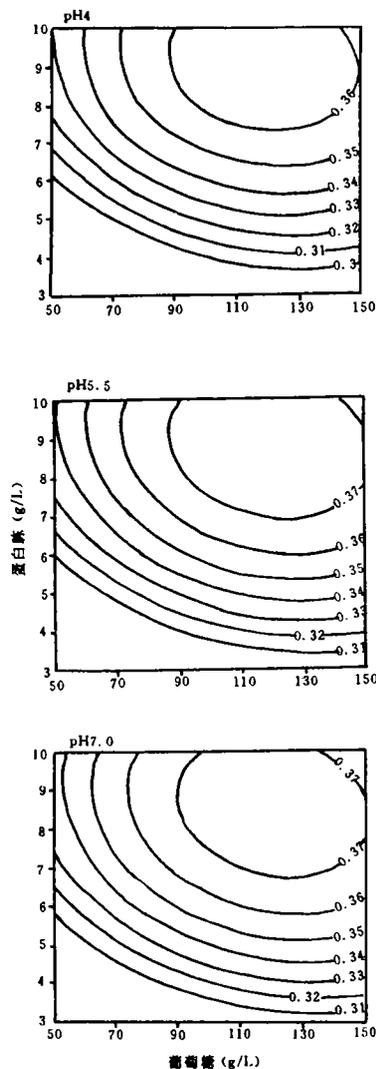


图 2 乙酸乙酯响应面分析图

的最重要因素,在一定的葡萄糖浓度(100~125g/L)和蛋白胨浓度(7~10g/L)内,可获得较大的菌体量;蛋白胨对酯(乙酸乙酯)的影响很大,其加量多少是酯产量高低的主要因素,酯产量高时的葡萄糖和蛋白胨浓度范围分别是110~140g/L和7~10g/L。

在响应面分析的基础上,采用回归模型进行计算,可以预测不同摇瓶发酵条件下 *G. penicillatum* 的酯产量和菌体生长量。表7是作者采用不同葡萄糖浓度、蛋白胨浓度和pH进行的4次实验结果,同时还给出了在实验条件下采用模型计算得到的预计值。从表7可以看出,在各种实验条件下,无论是酯产量还是菌体生长量,实验值与模型计算值均相当吻合,说明本研究得到的试验因子与响应值之间的回归模型在预测 *G. penicillatum* 摇瓶发酵实验结果有较好的准确性,得到的最佳培养基配方是合理的,为下一步的上罐发酵和随程萃取发酵打下了基础。

表7 回归模型的实验验证

实验数	葡萄糖 (g/L)	蛋白胨 (g/L)	pH	乙酸乙酯		菌体 量	
				预计值	实验值	预计值	实验值
1	140	1.0	7.0	0.3827	0.3775	10.14	9.51
2	125	0.9	6.0	0.3862	0.3847	10.42	10.33
3	110	0.7	5.0	0.3673	0.3621	10.35	10.29
4	80	0.4	4.0	0.2888	0.2741	9.63	9.81

参 考 文 献

- 1 Drawert F. Bioflavour '87', ed. P. Schreier, Berlin, 1988. 3~30
- 2 Janssens L, De Pooter H L, et al. Process Biochemistry, 1992, 27: 195~215
- 3 Janssens L, et al. Bioflavour '87', ed. P. Schreier, et al, Berlin, New York, 1988. 453~463
- 4 Box G E P, Behnken D W. Technometrics, 1960, 2: 455~476
- 5 SAS Institute Inc., The RSREG Procedure, In SAS/STAT User's Guide, Version 6. Vol 2(4th edn.), SAS Institute Inc., Cary, NC., 1989. 1457~78

Optimization of Fermentation Medium for the Production of Esters by *Geotrichum penicillatum*

Ruan Wenquan Chen Jian Sun Shengli Lun Shiyi

(School of Biotechnology)

Abstract Production of flavor compounds with pleasant fruity odour and containing esters as main ingredient can be carried out by *G. penicillatum* fermentation. By using Response Surface Analysis (RSA) method, effects of main factors on the production was optimized. In the optimal culture condition, production of esters could increase 9.6%. The production of esters and dry cell weight predicted by two models were also obtained.

Subject-words *G. penicillatum*; Esters; Optimization / Fermentation medium; RSA