

响应面法在发酵培养基优化中的应用

刘志祥, 曾超珍

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院 湖南 长沙 410004)

摘要: 介绍了响应面法的原理和实验设计的方法, 并对其在优化发酵培养基中的应用做了详细的综述。

关键词: 响应面法; 发酵培养基; 优化

中图分类号: TQ 920.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0127-03

响应面法(RSM)是采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对函数响应面和高线的分析, 能够精确地研究各因子与响应值之间的关系, 寻求最优工艺参数, 解决多变量问题的一种统计方法^[1]。它可用在描述单个试验变量对响应值的影响、确定试验变量之间的相互关系、描述所有试验变量对响应值的综合影响。RSM是一种适用性强的试验设计方法, 不仅包括试验设计、建模、因子效应评估以及寻求因子水平最佳操作条件等功能, 而且具有数据统计处理功能, 显示出了其它试验方法如正交试验、因子试验、田口试验方法等所不具备的优点, 该法不但具备试验次数少, 周期短、精度高等优点^[2], 而且可以建立连续变量曲面模型; 同时, 对影响试验指标的各因子水平及其交互作用进行优化和评价, 可快速有效地确定多因子系统的最佳条件^[3-5]。RSM已经在食品、医药、生物工程、农业、天然物提取等领域广泛的应用。

1 响应面法在培养基优化中的试验设计

利用微生物发酵生产各种有用代谢产物, 其培养基成分种类繁多, 各成分间的相互作用也错综复杂, 因而, 微生物培养基的优化工作就显得尤为重要。数学统计中的多种优化方法已开始广泛地应用于微生物发酵培养基的优化工作中, 其中以响应面法的效果最为显著。响应面法优化培养基的试验设计步骤为: ①利用 Plackett-Burman(PB)试验确定主要影响因素; PB设计法是一种两水平的试验设计方法。它试图用最少的试验次数达到使因素的主效果尽可能精确的估计, 适用于从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素

供进一步研究^[6]。②最陡爬坡法确定主要影响因素的水平; 为了建立有效的响应面拟合方程, 用最陡爬坡法逼近影响因素的最佳值区域, 它以试验值变化的梯度方向为爬坡方向, 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^[7]。③BBD(Box-Behnken)或CCD(Central Composite Design)设计进行试验分析; BBD或CCD方法确定试验点, 通过统计分析软件, 寻求最佳的试验条件以及因素间的交互作用。

2 响应面法在培养基优化中的应用

2.1 BBD设计在培养基优化中的应用

江英英等^[8]采用PB设计对发酵生产 γ -氨基丁酸(GABA)的培养基中相关影响因素的效应进行评价, 并筛选出了有显著效应的葡萄糖、碳氮比、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 浓度, 然后用BBD设计及响应面分析确定了主要影响因素的最佳培养基条件, GABA的产量达到6.02 g/L。比优化前的4.35 g/L提高了38%。王飞等^[9]采用RSM对北虫草液体发酵培养基的3种主要成分蔗糖、蛋白胨和 KH_2PO_4 进行三因素三水平BBD试验设计优化, 采用多元二次回归方程拟合3种因素与多糖产量之间的函数关系。通过岭脊分析, 获得培养基中3因素最佳浓度为: 蔗糖3.23%, 蛋白胨1.05%, KH_2PO_4 0.08%, 培养液多糖含量为 1.977970×10^{-2} g/mL。汤蕾等^[10]采用RSM对冬虫夏草菌CS-wx液态发酵生产核苷类物质的3种主要培养基成分—麦芽糖、葡萄糖和蛋白胨进行三因素三水平BBD试验设计优化, 通过岭脊分析获得对核苷类物质含量有显著影响的因素最佳浓度为: 麦芽糖2.17%, 葡萄糖2.95%, 蛋白胨2.74%, 通过HPLC法检测腺苷含量为1.02 mg/g, 较原始培养基腺苷含量0.85 mg/g提高了20%。尹利等^[11]用BBD法对洋葱假单胞菌G-63液体发酵产脂肪酶条件进行了优化, 脂肪酶活力提高了3.3倍; 曹小红等^[12]用响应面法对Bacillus natto TK-1发酵产脂肽的培养基进行优化, 脂肽的产量提高了约30%。

2.2 二因素CCD在培养基优化中的应用

第一作者简介: 刘志祥(1978-), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向为天然产物提取与植物生物技术。E-mail: liuzx0927@yahoo.com.cn。
基金项目: 中南林业科技大学引进高层次人才科研启动基金资助项目(1010254); 中南林业科技大学青年科学基金资助项目(07002B)。

收稿日期: 2008-11-11

于雷等^[13]使用 RSM 对 L-乳酸发酵培养基中氮源进行优化,采用二因素五水平设计,共 13 次试验。确定了 L-乳酸发酵培养基中玉米浆 32.23 g/L、酵母粉 3.17 g/L 时,乳酸的实际最大产量为 103.71 g/L,酵母粉的用量由 2% 下降到 0.3%。熊智强等^[14]利用 RSM 优化红谷霉素发酵培养基,利用全因子试验设计筛选出对链霉菌 702 产红谷霉素重要影响因子黄豆饼粉和工业蛋白胨,应用最陡爬坡试验法接近重要因子的最优水平,然后应用二因素四水平中心复合设计确定重要因子的最优水平。优化后的培养基为:玉米淀粉 20 g,玉米粉 20 g,葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 0.3 g,蛋白胨 9 g,黄豆饼粉 23 g,硝酸钾 2.5 g,硫酸铵 2.5 g,豆油 5 mL,氯化钠 3 g,碳酸钙 6 g。范雷法等^[15]运用 RSM 优化姬松茸液体发酵培养基中红糖和酵母膏浓度,采用二因素五水平中心组合设计。结果表明 红糖浓度为 20.24 g/L、酵母膏浓度为 2.055 g/L 时,菌丝体生物量最高,达 2.279 g/L;红糖浓度为 20.8 g/L、酵母膏浓度为 2.23 g/L 时,胞外多糖产量最高,达 0.749 g/L。王立东等^[16]应用二因素五水平中心组合设计法优化葡萄糖和豆饼粉的浓度,当葡萄糖 27.2 g/L、豆饼粉 31.8 g/L 时武夷菌素效价有最大值。在优化的培养基上武夷菌素的效价可提高到 6 643 $\mu\text{g/mL}$ 。周丹等^[17]采用二因素四水平中心组合设计法及响应面分析法对富硒金针菇菌株液体发酵培养基进行优化,确定了主要影响因素的最佳浓度为玉米淀粉 28.8 g/L,豆饼粉 14.2 g/L。

2.3 三因素 CCD 在培养基优化中的应用

黄丽金等^[18]采用 RSM 对唾液链球菌嗜热亚种增殖培养基进行了优化。以 MRS 培养基作为基础培养基,采用 PB 设计法,对 12 种乳酸菌生长促进因子以及培养基的初始 pH 等 13 个因素对唾液链球菌嗜热亚种 STX2 生长的影响进行评价。筛选出 CaCl_2 、豆粕水解液、pH 为 STX2 的生长强化因子,然后用三因素五水平旋转中心组合设计及响应面分析法确定强化因子的最佳浓度以及最佳的培养基初始 pH 值。在优化培养基中,STX2 的菌体浓度达到 $6.8 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$,比优化前的 $1.5 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ 提高了 4.5 倍。赵颖等^[19]采用 RSM 对类胡萝卜素产生菌红酵母的液体发酵培养基进行了优化。用 PB 方法确定主要影响因素为酵母膏、硫酸铵和蔗糖。经三个因素五水平中心组合试验及响应面分析优化,得到优化发酵培养基组成为:酵母膏 4.173 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 13.594 g/L,蔗糖 60.533 g/L, MgSO_4 0.3 g/L, K_2HPO_4 0.10 g/L,核黄素 0.004 g/L。在此条件下红酵母产类胡萝卜素的最大产量为 15.291 mg/L,较原始培养基提高了 58.65%。王亚军等^[20]采用 RSM 优化面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* FL-1) 培养基,通过三因素五水平响应面法建立了生物量和蔗糖、硫酸铵及

酵母浸出物浓度之间关系,优化最佳发酵培养基:115.5 g/L 蔗糖,10.0 g/L 硫酸铵,25.0 g/L 酵母浸出物。

2.4 四因素 CCD 在培养基优化中的应用

胡升等^[21]用 RSM 对 *Bacillus subtilis* 液体发酵生产纳豆激酶的培养条件进行了优化。首先用 PB 方法对相关影响因素的效应进行评价并筛选出了有显著正效应的胰蛋白胨和有显著负效应的种龄、发酵温度和 Na_2HPO_4 浓度等 4 个因素,最后由四因素四水平中心组合试验及响应面分析确定了主要影响因素的最佳条件。纳豆激酶液体发酵的最佳培养基为:胰蛋白胨 22.7 g/L,木糖 20 g/L; Na_2HPO_4 5.37 g/L; NaH_2PO_4 1 g/L; CaCl_2 0.2 g/L; MgSO_4 0.5 g/L; 最佳发酵条件为: pH 7.0; 发酵温度 30 $^\circ\text{C}$; 种龄 9 h; 接种量 4%; 装液量 25 mL/250 mL。在此条件下,纳豆激酶液体发酵产量从 1 005.73 IU/mL 提高到 1 314.48 IU/mL。刘建峰等^[22]采用 RSM 对影响豆粕固态发酵中蛋白质水解的 4 个主要因素:料水比、加酶量、发酵时间和接种量进行了研究,通过四因素五水平响应面法分析得到当料水比 1 : 1.00,加酶量 2.55%,发酵时间 65 h,接种量 1.00% 时,水解度可达 13.3%,比优化前提高了 56%。廖春丽^[23]用 RSM 对三孢布拉霉液体发酵产生 β 胡萝卜素的培养基进行了优化。通过四因素四水平响应面法分析得到适宜的发酵培养基组成,使其胞外多糖产量可达到 8.3 mg/mL,转化率为 20.75%。

2.5 五因素 CCD 在培养基优化中的应用

Muralidhar R V^[25]使用响应面法比较两种不同的碳源——葡萄糖和橄榄油对胞外脂肪酶产量的影响。用来生产脂肪酶的介质组分通过中心组合设计(五因素五水平)进行优化。结果发现使用葡萄糖作碳源时脂肪酶的最大产率为 17.30 U/mL。而使用橄榄油作碳源时脂肪酶的最大产量为 47.25 U/mL,由此可以看出,含有橄榄油的基质更适合用来发酵生产酯脂肪酶 (*C. cylindracea* lipase)。

3 结语

近年来,微生物发酵产生代谢物的研究越来越多,由于培养基的内在条件(培养基组成、浓度等)及外在条件(发酵温度、时间、通气量等)都会影响微生物的生长与代谢产物的积累。因此对于发酵培养基条件的优化成为了研究的热点。响应面法是一种有效的统计方法,可以在更广泛的范围内考虑因素的组合、预测响应值,比一次次的单因素分析方法和正交试验更有效,因此响

应面法会更加广泛应用于发酵培养基工艺条件优化的研究中。

参考文献

[1] 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 抗生素杂志分册, 1999, 20(2): 58-61.

[2] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3):91-94.

[3] Ambat P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface methods[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 331-335.

[4] Ratnam B V V, Narasimha Rao M, Dmodar Rao M, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003, 19: 523-526.

[5] Trupkin S, Levin S, Fordhiassin F. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2003, 30: 682-690.

[6] Miller A, Sitter R R. Using the folded-over 12-run plachett-buman design to consider interactions[J]. Technometrics, 2001, 3: 44-54.

[7] Montgomery D C. Design and Analysis of Experiments(3rd ed)[M]. New York: John Wiley & Sons, 1991.

[8] 江英英, 李海星, 曹郁生. 响应面法优化 γ -氨基丁酸发酵培养基[J]. 食品科技, 2007(5): 44-45.

[9] 王飞, 刘露, 陈明辉. 响应面法优化北虫草多糖液体发酵培养基[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2218-2224.

[10] 汤蕾, 余晓斌, 郝学财. 应用响应面法优化虫草发酵核苷类物质[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 60-62.

[11] 尹利, 阎金勇, 杨江科. 等. 响应面法优化洋葱假单胞菌产脂肪酶液

体发酵工艺[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 11-15.

[12] 曹小红, 蔡萍, 李凡. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肪酶培养基[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 59-65.

[13] 于雷, 雷霆, 裴晓林. 等. L-乳酸发酵培养基中氮源的优化[J]. 食品科技, 2007(6): 49-52.

[14] 熊智强, 徐平, 涂国全. 利用响应面法优化红谷霉素发酵培养基[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 5-9.

[15] 范雷法, 潘慧娟, Soccol CR. 等. 响应面法优化姬松茸液体发酵培养基中红糖和酵母膏浓度[J]. 食用菌学报, 2005, 12(3): 27-31.

[16] 王立东, 张克诚, 石义萍. 等. 应用响应面法优化武夷菌素发酵培养基[J]. 西南师范大学学报, 2006, 32(3): 90-95.

[17] 周丹, 刘世玲, 边银丙. 响应面法优化富硒金针菇菌株发酵培养基的研究[J]. 食用菌学报, 2006, 13(1): 33-36.

[18] 黄丽金, 陆兆新, 袁勇军. 响应面法优化唾液链球菌嗜热亚种增殖培养基[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5): 27-31.

[19] 赵颖, 罗璇, 钟晓凌. 响应面法优化产类胡萝卜素红酵母液体发酵培养基的研究[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(12): 39-42.

[20] 王亚军, 姚善泾, 吴天星. 响应面法优化 *Saccharomyces cerevisiae* FL-1 培养基[J]. 化学反应工程与工艺, 2003, 19(4): 300-305.

[21] 胡升, 梅乐和, 姚善泾. 响应面法优化纳豆激酶液体发酵[J]. 食品与发酵工业, 2002, 29(1): 13-17.

[22] 刘建峰, 葛向阳, 梁运祥. 响应面法优化豆粕固态发酵工艺的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(6): 87-91.

[23] 廖春丽, 余晓斌, 刘海丽. 响应面法优化 β -胡萝卜素液体发酵培养基[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 95-99.

[24] 郑忠辉, 刘三震, 黄益丽. 等. 海洋细菌 1202 菌株产胞外多糖的适宜条件[J]. 厦门大学学报, 2003, 42(5): 661-664.

[25] Muralidhar R V. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001(9): 17-23.

The Application of Response Surface Method in Optimization of Fermentation Medium

LIU Zhi-xiang, ZENG Chao-zhen

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: In this paper, the principle and the method of experimental design of the response surface method(RSM) were introduced, and their applications in optimization fermentation medium were summarized detailedly.

Key words: Response surface method (RSM); Fermentation medium; Optimization

禽流感 预防

- 1 加强禽类疾病的监测，一旦发现禽流感疫情，动物防疫部门立即按有关规定进行处理。养殖和处理的所有相关人员做好防护工作。
- 2 加强对密切接触禽类人员的监测。当这些人员中出现流感样症状时，应立即进行流行病学调查，采集病人标本并送

- 至指定实验室检测，以进一步明确病原，同时应采取相应的防治措施。
- 3 接触人禽流感患者应戴口罩、戴手套、穿隔离衣。接触后应洗手。
- 4 要加强检测标本和实验室禽流感病毒

- 毒株的管理，严格执行操作规范，防止医院感染和实验室的感染及传播。
- 5 注意饮食卫生，不喝生水，不吃未熟的肉类及蛋类等食品；勤洗手，养成良好的个人卫生习惯。
- 6 药物预防对密切接触者必要时可试用抗流感病毒药物或按中医药辨证施防。