

响应面优化 L-赖氨酸培养基

Optimization of L-lysine medium by response surface methodology

滕国生^{1,2,3} 刘勇^{1,2} 武丽达^{1,2} 范春艳^{1,2}
TENG Guo-sheng^{1,2,3} LIU Yong^{1,2} WU Li-da^{1,2} FAN Chun-yan^{1,2}
王金枝^{1,2} 关兵^{1,2} 史淑辉^{1,2} 佟毅^{1,2}
WANG Jin-zhi^{1,2} GUAN Bing^{1,2} SHI Shu-hui^{1,2} TONG Yi^{1,2}

(1. 吉林中粮生化有限公司, 吉林 长春 130012; 2. 玉米深加工国家工程研究中心, 吉林 长春 130012; 3. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

(1. Jilin COFCO Biochemistry CO., Ltd., Changchun, Jilin 130012, China;

2. National Engineering Research Center of Corn Processing, Changchun, Jilin 130012, China;

3. School of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun, Jilin 130012, China)

摘要:通过 Plackett-Burman 试验设计、最陡爬坡试验以及响应面分析法,对 L-赖氨酸棒杆菌菌株发酵赖氨酸培养基进行优化。利用 Plackett-Burman 试验设计来确定影响 L-赖氨酸得率的主要因素,结果表明:NaCl、MgSO₄·7H₂O、玉米浆对 L-赖氨酸得率的影响最大。利用最陡爬坡试验确定最大响应区域,在该基础上利用响应面分析法中的 Box-Behnken 设计,确定培养基的最佳条件为 NaCl 2.72%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 玉米浆 21.13 g/L。在该条件下,L-赖氨酸的理论得率为 104.75 g/L,实际得率为 104.60 g/L,比优化前的 87.93 g/L 提高 18.96%。

关键词:玉米浆;L-赖氨酸;Plackett-Burman 设计;最陡爬坡试验

Abstract: Plackett-Burman design, steepest ascent design and response surface methodology were used to optimize fermentation medium of L-lysine. Plackett-Burman design method was applied to evaluate the main significant factors, and the result had shown that sodium chloride, magnesium sulfate and corn steep liquor were the major factors. Then, the Box-Behnken design and response surface methodology we used to confirm the optimum parameters with NaCl 2.72%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, and corn steep liquor (CSL) 21.13 g/L, which were proceeded based on the greatest response area of NaCl, MgSO₄·7H₂O and corn steep liquor. Under the optimal conditions, the theoretical yield was gotten of L-lysine of 104.75 g/L, but the experimental yield was 104.60 g/L that was increased

18.96% level than before optimization.

Keywords: corn steep liquor; L-lysine; Plackett-Burman design; steepest ascent design

赖氨酸是合成人和动物组织蛋白质的必需物质,是激素、体内酶、抗体等重要功能性物质的主要成分,人体和动物自身不能合成赖氨酸,必须从食物中摄取,而植物中含有的赖氨酸很少,被称为植物中第一限制性氨基酸^[1,2]。国内外市场对赖氨酸的需求都非常大,主要用于饲料生产,约占 90% 左右,食品添加剂和强化剂占 5% 左右,还有 5% 用于医药中间体方面^[3]。由 25~30 个赖氨酸残基聚合而成的 ϵ -多聚赖氨酸是一种良好的食品防腐剂^[4]。赖氨酸的市场需求迅速增长拉动了 L-赖氨酸的生产,未来几年,中国食品工业赖氨酸的市场需求平均年增长将在 10% 左右^[5]。随着用赖氨酸生产各种药物的需求量的增加,中国赖氨酸需求量目前估计在 8 万 t/年左右^[6]。赖氨酸的生产方法主要有提取法、化学合成法、酶法、微生物发酵法^[6]。微生物发酵产生的赖氨酸均为 L-型,而生物所能利用的赖氨酸也为 L-型。因此,微生物发酵法是目前工业生产 L-赖氨酸最主要的方法^[7]。

玉米浆为生产玉米淀粉的副产物,含有大量的糖类、多肽、生长素、可溶性蛋白质、游离氨基酸等其他有机物,是微生物发酵氨基酸的良好氮源^[8-10]。玉米浆中很多成分是发酵生产氨基酸的前体成分,在氨基酸发酵中提供氮源和生长因子,玉米中的生物素、限制性氨基酸对多种氨基酸发酵的影响都很大^[11]。玉米浆价格低廉,来源丰富,利用玉米浆发酵氨基酸有利于提高玉米浆的生物价值,降低工业生产氨基酸的成本。

响应面法是工艺优化常用的试验设计方法^[12-14]。

作者简介:滕国生(1978—),男,长春工业大学讲师,博士。
E-mail:gshteng@163.com

通讯作者:佟毅

收稿日期:2015-04-15

Plackett-Burman 确定出主次因素。最陡爬坡法能够快速寻找各变量变化最优区域。这 3 种试验设计方法常用于微生物培养基的优化^[15-18]。本试验拟运用 Design Experts 7.0 分析软件,将 Plackett-Burman(PB)方法和响应面法应用于 L-赖氨酸发酵培养基成分的优化和发酵工艺关键参数的筛选,以期进一步提高 L-赖氨酸产量,降低工业生产氨基酸的成本。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

L-赖氨酸棒杆菌株(代号:ATCC14067):由吉林大学生命科学学院提供。

1.1.2 试 验 试 剂

KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、苏氨酸、CaCO₃、NH₄Cl、NaCl:分析纯,北京化工厂。

1.1.3 试 验 仪 器

紫外分光光度计:UVMINI-1240 型,日本岛津株式会社;

恒温摇床,SPX-150-Z 型,中国上海跃进医疗器械厂。

1.1.4 培 养 基

种子培养基:葡萄糖 20 g/L,玉米浆 20 g/L, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%,CaCO₃ 4%, pH 7.0~7.2, 0.75 kg/cm² 灭菌 20 min。

发酵培养基:葡萄糖 40 g/L,玉米浆 40 g/L, KH₂PO₄ 0.02%, NH₄Cl 6%, NaCl 1.8%, 苏氨酸 0.06%, CaCO₃

6%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, pH 7.0~7.2, 0.75 kg/cm² 灭菌 20 min。

1.2 培 养 方 法

菌株经斜面活化后,取一环接入到含有 40 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,于 30 ℃ 中以 200 r/min 震荡培养 24 h。取 5 mL 培养后溶液接种到含有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,于 30 ℃ 以 200 r/min 震荡培养 48 h。将发酵液于 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清液测定其中 L-赖氨酸含量。每组相同发酵培养基平行试验 3 次,含量取平均值。

1.3 L-赖氨酸含量测定

采用茚三酮比色法^[19]测定 L-赖氨酸浓度,配制浓度为 500 μg/L 的 L-赖氨酸标准溶液,分别取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 于干净的具塞比色管中,加水至 1.0 mL,再加入 1.0 mL 茚三酮试剂,摇匀后塞紧管塞,沸水浴 5 min 后冷却至室温,每管再加入 50% 乙醇 8.0 mL,于 530 nm 处测定 OD 值。以 L-赖氨酸含量为横坐标,OD 值为纵坐标做标准曲线。得到线性回归方程为 $Y = 1.866x + 0.018$ ($R^2 = 0.9990$)。以样品代替标准溶液,通过方程计算其 L-赖氨酸含量。

1.4 试 验 设 计

1.4.1 Plackett-Burman 设计 本试验选取 8 种培养基成分,选用 N=8 的 Plackett-Burman 设计。根据预试验,设定每个因素的高水平约为低水平的 2 倍,试验 12 次,响应值为 L-赖氨酸含量。PB 设计因素水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

水平	A 葡萄糖/(g·L ⁻¹)	B NH ₄ Cl/%	C 玉米浆/(g·L ⁻¹)	D K ₂ HPO ₄ /%	E NaCl/%	F 苏氨酸/%	G CaCO ₃ /%	H MgSO ₄ ·7H ₂ O/%
-1	20	3	25	0.01	1.0	0.03	4	0.01
+1	40	6	40	0.02	1.8	0.06	6	0.02

1.4.2 最陡爬坡试验 根据 PB 设计的结果,由各因素效应值的大小确定变化的步长。正效应取高水平,负效应取低水平。按一定的梯度增加或者减少各因素的水平值,检测发酵液中 L-赖氨酸含量的变化,含量最高组的水平值即为响应面分析的中心组。

1.4.3 响应面分析方法 根据 PB 设计筛选出的 3 个显著因素作为试验因素,根据最陡爬坡试验筛选出的浓度作为中心点,采用响应面中的 Box-Behnken 设计方法。

1.4.4 数据分析 采用 Design Expert 7.0 软件对数据进行回归分析,得最优组合。

2 结 果 与 分 析

2.1 Plackett-Burman 设计结果与分析

采用 Design Expert 7.0 软件对表 2 进行分析,得到各影响因子的偏回归系数及其显著性结果,见表 3。在 8 个因素中,C、E、H 因素即 NaCl、MgSO₄·7H₂O、玉米浆对 L-赖氨酸的得率影响显著(P<0.05),故将 NaCl、MgSO₄·7H₂O、

玉米浆确定为主要影响因素,且 NaCl、MgSO₄·7H₂O 为正效应,玉米浆为负效应。故在下一步试验中,应该在 NaCl、MgSO₄·7H₂O 的高水平基础上增加其含量,在玉米浆的低水平基础上减少其含量。对于影响不显著的因素,正效应因素与负效应因素分别取+1 水平和-1 水平。

2.2 最陡爬坡试验结果与分析

根据 PB 试验结果中因素 NaCl、MgSO₄·7H₂O、玉米浆效应的大小确定最陡爬坡试验变化的方向和步长。由表 4 可知,5 组试验中,第 4 组的 L-赖氨酸含量最高,故选择第 4 组的水平为下一步响应面设计的中心点,即 NaCl 2.6%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、玉米浆 19.5%。

2.3 响应面设计结果与分析

Box-Behnken 设计因素及水平取值见表 5。

通过 Design Expert 7.0 软件对表 6 数据进行处理,得到回归方程为:

$$R = 103.94 + 3.57A + 2.28B + 1.06C + 2.60AB - 0.82AC - 0.66BC - 10.31A^2 - 4.96B^2 - 1.13C^2 \quad (1)$$

表 2 Plackett-Burman 试验设计及结果
Table 2 The Plackett-Burman design and results

试验号	A	B	C	D	E	F	G	H	赖氨酸含量/ (g · L ⁻¹)
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	69.91
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	74.54
3	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	71.95
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	87.93
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	85.50
6	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	76.37
7	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	83.56
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	76.72
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	66.39
10	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	77.75
11	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	78.18
12	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	67.65

表 3 Plackett-Burman 设计各因素的偏回归系数及其显著性
Table 3 Partial regression coefficients and significance of factors in Plackett-Burman design

因素	估计值	标准误差	F 值	Pr>F	排序
A	-1.725 8	0.758 3	5.18	0.107 3	7
B	-1.625 8	0.758 3	4.60	0.121 4	8
C	-2.464 2	0.758 3	10.56	0.047 5	3
D	1.075 8	0.758 3	2.01	0.251 0	5
E	3.422 5	0.758 3	20.37	0.020 3	1
F	-2.374 2	0.758 3	9.80	0.052 0	4
G	-1.050 8	0.758 3	1.92	0.259 9	6
H	3.134 2	0.758 3	17.08	0.025 7	2

表 4 最陡爬坡试验设计及结果
Table 4 Steepest ascent design and results

试验号	NaCl/%	MgSO ₄ · 7H ₂ O/%	玉米浆/ (g · L ⁻¹)	赖氨酸含量/ (g · L ⁻¹)
1	1.4	0.02	25.0	96.34
2	1.8	0.03	22.5	97.60
3	2.2	0.04	22.0	104.94
4	2.6	0.05	19.5	105.62
5	3.0	0.06	17.0	100.15

表 5 Box-Behnken 设计因素水平表
Table 5 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	ANaCl/%	B MgSO ₄ · 7H ₂ O/%	C 玉米浆/(g · L ⁻¹)
-1	2.0	0.04	14.5
0	2.6	0.05	19.5
+1	3.2	0.06	24.5

对此模型进行方差分析(表 7)可知:拟合度 $R^2 = 0.973 7$,说明该试验提取得率的试验值与预测值之间有很好的拟合度; $P < 0.01$ 说明该模型极其显著;失拟量为 2.22 说明失拟量相对于纯误差不显著;信噪比为 $12.603 > 4$ 表明该模型有足够的信噪比;该模型的 F 值为 20.56,失拟项不显著。综上表明,该模型预测值与试验值的差异很小可用于指导试验。

在此模型中 A、B、AB、A²、B² 均显著,C、AC、BC、C² 不显著,同时各因素的均方值可以反映出各个因素对试验指标的重要性。均方值越大表明其对试验指标的影响越大。从表 7 的均方值可以看出影响赖氨酸得率因素的主次顺序为:A>B>C,即 NaCl>MgSO₄ · 7H₂O>玉米浆。

表 6 Box-Behnken 设计及结果
Table 6 The Box-Behnken design and results

试验号	A	B	C	赖氨酸含量/(g · L ⁻¹)
1	1	0	-1	96.72
2	0	1	-1	98.18
3	0	1	1	99.83
4	0	-1	-1	94.54
5	0	0	0	103.56
6	1	-1	0	85.75
7	-1	1	0	86.39
8	0	0	0	105.50
9	1	1	0	97.75
10	-1	0	-1	86.99
11	-1	0	1	89.91
12	1	0	1	96.37
13	0	-1	1	98.82
14	-1	-1	0	84.77
15	0	0	0	102.75

表 7 回归模型的方差分析[†]

Table 7 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr>F	显著性
模型	640.80	9	71.20	20.56	0.002 0	**
A	101.75	1	101.75	29.38	0.002 9	**
B	41.72	1	41.72	12.05	0.017 8	*
C	9.03	1	9.03	2.61	0.167 3	—
AB	26.94	1	26.94	7.78	0.038 5	*
AC	2.67	1	2.67	0.77	0.419 8	—
BC	1.73	1	1.73	0.50	0.511 4	—
A ²	392.35	1	392.35	113.29	0.000 1	**
B ²	90.96	1	90.96	26.26	0.003 7	**
C ²	4.72	1	4.72	1.36	0.295 6	—
残差	17.32	5	3.46			
失拟项	13.32	3	4.44	2.22	0.325 2	—
纯误差	3.99	2	2.00			
总误差	658.11	14				

† “*”表示差异显著, $P < 0.05$;“**”表示差异极显著, $P < 0.01$;“—”表示不显著。

各因素交互作用对L-赖氨酸得率的相应曲面和等高线图见图1~3。由图1~3可知,NaCl与MgSO₄·7H₂O的交互作用显著。当玉米浆的含量一定时,随着培养基中NaCl和MgSO₄·7H₂O含量的增加,L-赖氨酸的得率先逐渐增加后逐渐降低,在NaCl和MgSO₄·7H₂O分别为2.66%,0.04%时达到最大值,此时L-赖氨酸得率为101.32g/L。当MgSO₄·7H₂O含量一定时,玉米浆与NaCl的交互作用并不显著;而当NaCl含量一定时,玉米浆与MgSO₄·7H₂O的交互作用也不显著。显示玉米浆的添加量对L-赖氨酸的得

率影响不大,随着玉米浆含量的增加,L-赖氨酸的得率均略微有所增加,但增加的幅度都不大。

经过Design Experts 7.0软件的响应面优化设计,分析优化得到的最佳条件为NaCl 2.72%,MgSO₄·7H₂O 0.05%,玉米浆 21.13g/L,在此条件下,L-赖氨酸的理论得率为104.75g/L。通过对此最优模型进行3次验证,结果分别为104.52,104.97,104.60g/L,平均值为104.70g/L,与模型的理论值基本符合,说明该模型能够较好的预测实际发酵中L-赖氨酸的得率。

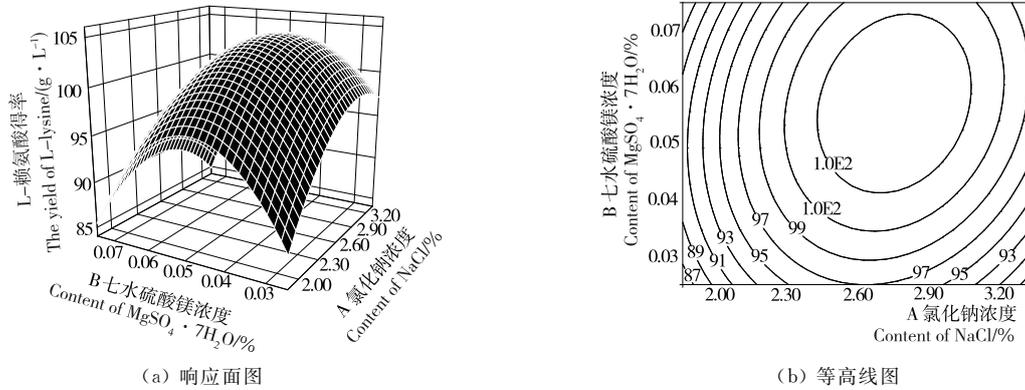


图1 NaCl与MgSO₄·7H₂O交互影响L-赖氨酸得率的响应面图和等高线图

Figure 1 Response surface plot and contour plot of effect of sodium chloride and magnesium sulfate on L-lysine yield

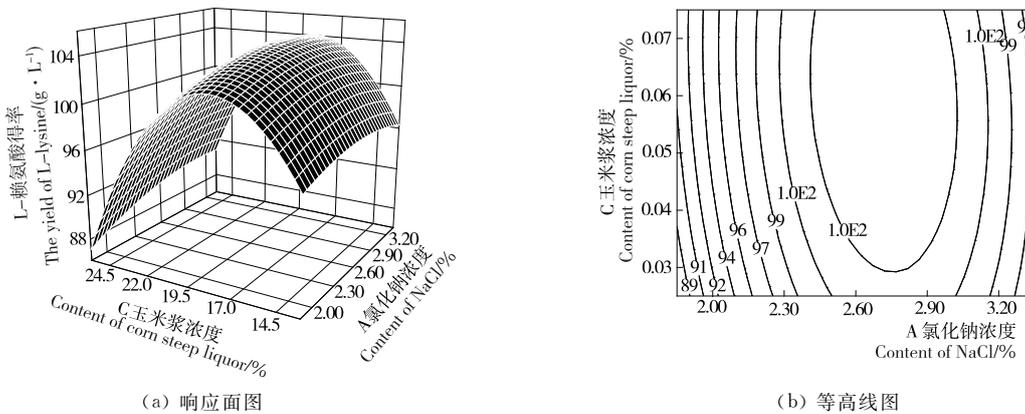


图2 NaCl与玉米浆交互影响L-赖氨酸得率的响应面图和等高线图

Figure 2 Response surface plot and contour plot of effect of sodium chloride and corn starch on L-lysine yield

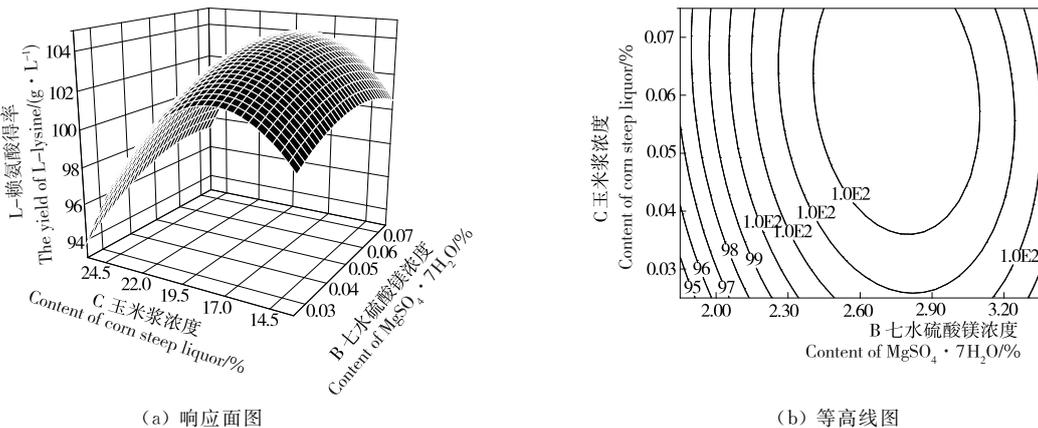


图3 MgSO₄·7H₂O与玉米浆交互影响L-赖氨酸得率的响应面图和等高线图

Figure 3 Response surface plot and contour plot of effect of magnesium sulfate and corn starch on L-lysine yield

3 结论

本试验运用 Design Experts 7.0 分析软件,先通过 Plackett-Burman 方法和响应面法确定了影响 L-赖氨酸得率的主要因素为 NaCl、MgSO₄·7H₂O 和玉米浆,再通过爬坡试验和 Box-Behnken 设计方法,确定 3 个主要因素物质的添加量分别为 2.72%,0.05% 和 21.13 g/L,理论 L-赖氨酸得率为 104.75 g/L。经 3 次验证实验,平均值为 104.60 g/L,与理论值相符。此实际值与优化前的 87.93 g/L 相比,提高了 18.96%。因此,利用响应面分析方法优化 L-赖氨酸棒杆菌株产 L-赖氨酸的方法是可行的,同其它微生物发酵方法相比,此种方法降低了葡萄糖的含量,可以充分利用玉米浆所含营养物质,降低生产成本,更适宜工业生产。

参考文献

- 陈银芳,张伟国. L-赖氨酸高产菌的选育及发酵培养基的优化[J]. 生物技术,2009,19(4):36~40.
- 李倩. L-赖氨酸盐酸结晶过程研究[D]. 石家庄:河北科技大学,2010.
- 玄恩锋. 赖氨酸的生产及发展前景分析[J]. 化工时刊,2001(2):47~48.
- 莫树平,王惠惠,柏建玲,等. ϵ -聚赖氨酸复合防腐剂对常见致病菌和污染菌的抑制作用[J]. 食品与机械,2012,28(6):109~111.
- 王钧成,王文凤. L-赖氨酸发酵生产研究进展[J]. 发酵科技通讯,2010,39(4):39~43.
- 许朝阳,朱敏宜. 赖氨酸的生产及发展建议[J]. 安徽化工,2003(5):14~15.
- 张军华. 微生物发酵法生产 L-赖氨酸的研究进展[J]. 生物加工过程,2012,10(2):73~77.
- 庞巧兰,李庆刚. 玉米浆对青霉素发酵生产的影响[J]. 中国医药工业杂志,2006,37(8):528~530.
- 李文友,赵学明. 玉米浆为有机氮源的 L-乳酸发酵的研究[J]. 化工时刊,2006,20(9):61~63.
- 张乐,刘龙,李江华,等. 玉米浆对丁二酸发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(3):301~307.
- 左莹,张萍,张惠. 玉米浆在氨基酸发酵工业中的作用[J]. 中国酿造,2013,23(11):18~22.
- 宋慧,苗敬芝,唐仕荣. 响应曲面优化超滤分离花生粕活性肽的工艺[J]. 食品与机械,2011,27(6):83~86.
- 韩丹妮,谢定. 响应面法优化稻壳中木聚糖的提取工艺[J]. 食品与机械,2011,27(6):114~118.
- 唐华丽,熊汉国,王玮. 响应面法优化葡萄籽多酚提取工艺[J]. 食品与机械,2012,28(6):147~149.
- 代志凯,张翠,阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物通报,2010,37(6):894~903.
- 钟环宇,徐建军,江波. 利用响应面分析法优化 γ -氨基丁酸发酵培养基[J]. 无锡轻工大学学报,2004,23(3):19~22.
- 张建国,陈晓明,熊双丽. 响应面分析优化 ϵ -聚赖氨酸发酵培养基[J]. 食品与机械,2010,26(4):19~22.
- 于晓丹,马霞,王可,等. 利用响应面法优化 γ -聚谷氨酸发酵培养基[J]. 中国酿造,2010(11):132~135.
- 李桂玲,李欢庆,刘从彬. 谷物中赖氨酸含量测定方法的探析[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2006,27(5):66~67.

欢迎订阅 2016 年《中国酿造》杂志

《中国酿造》创刊于 1982 年,由中国商业联合会主管,中国调味品协会及北京食品研究院主办的综合性科技期刊。历次被评为中文核心期刊(2014 版)、中国科技核心期刊,被中国知网、万方数据库、中文科技期刊数据库,美国《化学文摘》(CA)、美国《乌利希期刊指南》(UPD)、英国《食品科学技术文摘》(FSTA)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、中国科学评价研究中心(RCCSE)数据库等全文收录。

《中国酿造》重点刊登调味品、酿酒、生物工程技术、生物化工、食品生物技术等研究方向的新工艺、新技术、新设备以及分析检测、安全法律法规及标准、综合利用、质量保障体系等方面的基础理论、应用研究及综述文章。主要栏目有:研究报告、专论综述、创新与借鉴、经验交流、分析与检测、产品开发、酿造文化、海外文摘等。

《中国酿造》为月刊,大 16 开,每期 200 页,25 元/期,全年 300 元(免邮费)。

订阅方式:

直接联系北京中酿杂志社订阅:

电 话:010-83152308/83152738、010-63026114

邮 箱:zgnzzz@163.com

网上订阅:登陆中国酿造主页 www.chinabrewing.net.cn 全

全国各地邮政局(所)均可订阅:

邮发代号 2-124

国内统一连续出版物号 CN 11-1818/TS

国际标准连续出版物号 ISSN 0254-5071

汇款方式:

银行转账:开户行:建行陶然亭支行

账 户:北京中酿杂志社

账 号:1100 1189 5000 5250 0191

邮局汇款:北京市西城区禄长街头条 4 号《中国酿造》编辑部

邮 编:100050

欢迎订阅、投稿、刊登广告!