



引用格式:刘培洋,刘芳,蔡亚慧,等.产 $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 培养基组分优化研究[J].轻工学报,2018,33(3):30-38.

中图分类号:TS201.3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.03.004

文章编号:2096-1553(2018)03-0030-09

# 产 $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 培养基组分优化研究

## Research on the optimization of medium components of $\gamma$ -polyglutamic acid-producing *Bacillus amyloliquefaciens* LDJ11

刘培洋<sup>1</sup>,刘芳<sup>1</sup>,蔡亚慧<sup>1</sup>,许平辉<sup>2</sup>,张继冉<sup>1</sup>,吴坤<sup>1</sup>

LIU Peiyang<sup>1</sup>,LIU Fang<sup>1</sup>,CAI Yahui<sup>1</sup>,XU Pinghui<sup>2</sup>,ZHANG Jiran<sup>1</sup>,WU Kun<sup>1</sup>

1. 河南农业大学 生命科学学院,河南 郑州 450002;

2. 新乡博凯生物技术有限公司,河南 新乡 453300

1. College of Life Science, He'nan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Xinxiang Biocar Biotech Co., Ltd., Xinxiang 453300, China

### 关键词:

$\gamma$ -聚谷氨酸;解淀粉芽孢杆菌;培养基组分;响应面优化

### Key words:

$\gamma$ -polyglutamic acid; *Bacillus amyloliquefaciens*; medium components; response surface methodology

**摘要:**为了提高解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的 $\gamma$ -聚谷氨酸产量,在前期单因素试验的基础上,采用 Plackett-Burman 试验设计方案,从初始发酵培养基组分中挑选出影响 $\gamma$ -聚谷氨酸产量最显著的 3 个因素,进而采用最陡爬坡试验方法逼近 $\gamma$ -聚谷氨酸最高产量区域,并设计三因素三水平的 Box-Behnken 试验,以获得解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的最优培养基组分.结果表明:产 $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的最优培养基组分为:谷氨酸钠 84.53 g/L,柠檬酸钠 12 g/L,甘油 30 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  21.67 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.07 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.06 g/L. 在此配方下,解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的实际 $\gamma$ -聚谷氨酸平均产量可达 37.048 g/L,是优化前产量(26.730 g/L)的 1.39 倍,并与理论预测最大值 36.450 g/L 非常接近.

收稿日期:2018-01-05

基金项目:河南省科技攻关项目(162102310094)

作者简介:刘培洋(1990—),男,河南省濮阳市人,河南农业大学硕士研究生,主要研究方向为发酵工程.

通信作者:吴坤(1963—),男,河南省驻马店市人,河南农业大学教授,博士,主要研究方向为发酵工程.

**Abstract:** In order to increase  $\gamma$ -polyglutamic acid production of *Bacillus amyloliquefaciens* LDJ11, based on the previous single-factor test, the Plackett-Burman test design was adopted. Three most significant factors that affected the yield of  $\gamma$ -polyglutamic acid were selected from the initial medium components. The steepest limbing test method was used to approach the maximum  $\gamma$ -polyglutamic acid production area, and then the optimization of the medium components was obtained through a three-factor and three-level Box-Behnken test. The results showed that the optimal medium components for  $\gamma$ -polyglutamic acid-producing *Bacillus amyloliquefaciens* LDJ11 were: sodium glutamate 84.53 g/L, sodium citrate 12 g/L, glycerol 30 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  21.67 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.07 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.06 g/L. Under this condition, the actual yield of  $\gamma$ -polyglutamic acid produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LDJ11 was 37.048 g/L, which was 1.39 times of the initial medium component yield (26.730 g/L), and it was very close to the theoretical prediction of 36.450 g/L.

## 0 引言

$\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -polyglutamic acid, 简称 $\gamma$ -PGA)是一种可由微生物发酵代谢合成的胞外多肽<sup>[1]</sup>,最早由 G. Ivanovics 等<sup>[2]</sup>于1937年在炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)的外荚膜中发现。 $\gamma$ -聚谷氨酸由 D-或(和)L-谷氨酸通过 $\alpha$ -氨基和 $\gamma$ -羧基间的 $\gamma$ -酰胺键脱水缩合而成<sup>[3]</sup>。以培养基中是否需要添加谷氨酸单体为指标,可把产 $\gamma$ -聚谷氨酸菌株分为两类,即谷氨酸依赖型菌株和谷氨酸非依赖型菌株<sup>[4]</sup>。由于谷氨酸非依赖型菌株合成 $\gamma$ -聚谷氨酸的产量很低,现阶段多采用谷氨酸依赖型菌株发酵生产 $\gamma$ -聚谷氨酸<sup>[5]</sup>。 $\gamma$ -聚谷氨酸作为一种兼具水溶性、生物可降解性、生物相容性、超强的吸附性和无毒性的谷氨酸聚合物,在化工、生物医学、食品行业、环境保护、化妆品行业等多领域具有十分广阔的应用前景<sup>[6]</sup>。

目前,发酵生产 $\gamma$ -聚谷氨酸培养基的优化研究大多以枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌为主,针对解淀粉芽孢杆菌的报道较少。而解淀粉芽孢杆菌以单因素优化得到的初始培养基,不能反映出2个或3个组分之间一定规律的交互作用关系,这使其具有一定的局限性,且 $\gamma$ -聚谷氨酸的最高产量还有待进一步的提高。近年

来,已有学者在通过响应面设计法优化发酵培养基和物质提取等方面取得良好的结果<sup>[12-13]</sup>,该方法在生物学领域更是得到广泛的应用。响应面设计法 RSM(response surface methodology)是一种综合性试验方法<sup>[7]</sup>,它通过对响应曲面图和等高线图的分析,拟合多元二次回归方程求极值,进而得到最优的工艺条件<sup>[8-10]</sup>。响应面设计法经济有效,既可以在进行最少试验次数的条件下求得最优试验参数,还能完善单因素试验法和正交试验设计法的不足<sup>[11]</sup>。本研究拟在前期单因素试验的基础上选用产 $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11,对其发酵培养进行响应面设计优化,探寻解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 最优发酵培养基组分添加量,进一步提高 $\gamma$ -聚谷氨酸的产量,以期为 $\gamma$ -聚谷氨酸工业化生产和应用提供新的理论依据,供业界参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌种** 解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 (*Bacillus amyloliquefaciens* LDJ11),由河南农业大学生命科学院实验室筛选、诱变、分离并保藏。

**1.1.2 菌种培养基** LB 斜面培养基:胰蛋白胨粉 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,NaCl 10 g/L,琼脂粉 20 g/L,pH 值 7.0~7.5。

LB 种子培养基:胰蛋白胨粉 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.0 ~ 7.5.

初始发酵培养基:谷氨酸钠 40 g/L, 柠檬酸钠 12 g/L, 甘油 30 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  9 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.15 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.06 g/L, pH 值 7.0 ~ 7.5.

以上培养基均用去离子水配制, pH 均用 6 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液调节, 分装封口后于 121 °C 条件下高压灭菌 20 min.

**1.1.3 主要仪器和试剂** 主要仪器:101-1A 电热鼓风干燥箱, 北京中兴伟业仪器有限公司产; PHS-3C pH 计, 上海伟业仪器厂产; FA2004 电子天平, 上海上平仪器有限公司产; LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂产; TGL-20B 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂产; ALPHAI-4LD-PLUS 真空冷冻干燥机, 德国 CHRIST 公司产; HZQ-QZ 全温振荡器, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司产; SJ-CJ-2FD 双人单面洁净工作台, 苏杰集团安泰公司产; DW-86L386 超低温保存箱, 青岛海尔电器有限公司产.

主要试剂:胰蛋白胨粉、酵母浸粉, 英国 Oxoid 公司产; 琼脂粉, 北京索莱宝科技有限公司产; 谷氨酸钠(味精, 纯度  $\geq 99\%$ ), 河南莲花味精股份有限公司产; 柠檬酸钠,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , 均为分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司产;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司产;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (分析纯), 天津市华东试剂厂产; 甘油, 无水乙醇, 均为分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司产; HCl, NaOH, 均为分析纯, 洛阳昊华化学试剂有限公司产.

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌种培养方法** 斜面培养:将菌种划线接种于斜面培养基上, 于 37 °C 条件下培养

12 h.

种子培养:从斜面培养基中刮取一环菌种, 接入液体种子培养基(250 mL 三角瓶装液量为 50 mL)中, 于 37 °C, 180 r/min 条件下恒温振荡培养 12 h.

摇瓶发酵培养:以 3% 的接种量吸取种子培养液, 接种于初始发酵培养基(250 mL 三角瓶装液量为 50 mL)中, 于 37 °C, 180 r/min 条件下恒温振荡培养 48 h.

**1.2.2  $\gamma$ -聚谷氨酸产量测定** 将摇瓶发酵液 pH 值调至 3 左右, 以 8000 r/min 离心 30 min 去除菌体, 收集上清液并调回原 pH 值. 取一定量的上清液, 添加 4 倍体积的无水乙醇, 适当搅拌得到沉淀, 静置过夜(10 h). 以 6000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 再加适量超纯水将沉淀复溶, 经透析脱盐后, 于 -80 °C 条件下冷冻干燥得到  $\gamma$ -聚谷氨酸粉末状提取物, 称重即得  $\gamma$ -聚谷氨酸产量.

## 1.3 响应面试验设计

**1.3.1 Plackett-Burman 试验设计** 以  $\gamma$ -聚谷氨酸产量作为统计分析对象, 利用 Design-Expert V8.0.6 软件设计  $N = 11$  的 Plackett-Burman 试验方案, 选取初始发酵培养基中的 9 个因素(谷氨酸钠(A), 柠檬酸钠(B), 甘油(C),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (D),  $\text{CaCl}_2$ (E),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (F),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (G),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (H),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (I))进行研究, 每个因素选取高低(+1, -1)两个水平, 高水平(+1)取低水平(-1)的 1.5 倍, 并余两个虚拟因素(K, L)作误差分析项, 且每组 3 个平行, 试验结果取其平均值, 试验因素水平与编码见表 1. 根据所得结果分析各因素对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响效果, 并进行显著性( $P < 0.05$ )分析, 从而得到显著影响  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的培养基组分.

**1.3.2 最陡爬坡试验设计** 由于 Box-Behnken 试验设计的响应面拟合方程主要反映临近最大



表4 Plackett-Burman 试验结果的统计分析

Table 4 Statistical analysis of Plackett-Burman design experiments

分析对象	平方和	df	均方和	估计值	F 值	P 值	影响顺序
模型	211.38	9	23.49	28.90	138.55	0.007 2**	
A	185.49	1	185.49	3.93	1 094.24	0.000 9**	1
B	0.62	1	0.62	0.23	3.68	0.195 2	6
C	1.75	1	1.75	-0.38	10.33	0.084 7	4
D	18.31	1	18.31	1.24	108.02	0.009 1**	2
E	1.10E-003	1	1.10E-003	9.58E-003	6.50E-003	0.943 1	9
F	0.68	1	0.68	0.24	4.04	0.182 3	5
G	0.46	1	0.46	0.20	2.72	0.241 0	7
H	3.97	1	3.97	-0.57	23.40	0.040 2*	3
I	0.10	1	0.10	0.09	0.56	0.533 1	8

注:决定系数  $R^2 = 0.998 4$ , 修正系数  $\text{Adj } R^2 = 0.991 2$ ; \*\* 表示该因素差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \* 表示该因素差异显著 ( $P < 0.05$ )

由表4可知, Plackett-Burman 试验模型的  $P = 0.007 2$ , 表明该试验模型是极显著的, 且回归系数和调整值都大于 0.99, 表明以上数据可以显著地模拟该模型, 各因素水平设计合理. 甘油和  $\text{CaCl}_2$  的估计值为负值, 表明对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量呈负影响效应; 其他因素的估计值均为正值, 表明对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量呈正影响效应. 谷氨酸钠和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的  $P$  值均小于 0.01, 表明这两个因素对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响极显著,  $\text{CaCl}_2$  的  $P$  值小于 0.05, 表明其对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响显著. 由此可知, 影响  $\gamma$ -聚谷氨酸产量最显著的因素为谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$ , 其培养基组分影响大小的顺序为: 谷氨酸钠  $> (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{CaCl}_2$ . 所以, 选取谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  进一步利用响应面法进行浓度优化, 以确定最优培养基组分.

## 2.2 最陡爬坡试验结果

在 Plackett-Burman 试验结果的基础上, 选取谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  3 个组分继续进行最陡爬坡试验. 谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  表现为正效应, 取高水平;  $\text{CaCl}_2$  表现为负效应, 则取低水平. 最陡爬坡试验设计与结果见表5. 随着谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  3 个显著因素

的变化,  $\gamma$ -聚谷氨酸产量呈现开口向下的抛物线走势, 在第9组试验时达到最高点, 为 35.736 g/L. 因此, 选取9号试验条件作为 Box-Behnken 试验设计方案的中心点, 即谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  的质量浓度分别为 84 g/L, 21.5 g/L 和 0.07 g/L.

## 2.3 Box-Behnken 试验结果

Box-Behnken 试验设计与结果见表6, 回归模型系数的显著性检验结果和 Box-Behnken 试验回归方程方差分析结果分别见表7和表8.

由表8可知, 该模型  $P$  值 ( $P = 0.003 8$ ) 小于 0.01, 表明该模型是极显著的, 试验中决定系数  $R^2$  为 0.923 0, 表明该模型预测值与试验值有较高的拟合程度, 且修正系数  $\text{Adj } R^2$  为 0.824 1, 表明该模型可解释 82.41% 的解淀粉芽孢杆菌发酵产  $\gamma$ -聚谷氨酸的模型. 该模型失拟项  $P$  值差异不显著 ( $0.076 1 > 0.05$ ), 表明该试验误差小, 数据拟合状况较好. 通过试验结果的显著性分析, 模型的一次项  $X_1$  显著, 二次项  $X_1^2, X_2^2, X_3^2$  极显著, 交互项  $X_1 X_3$  也显著, 表明该模型3个试验因素之间存在一定的交互作用, 各因素间对  $\gamma$ -聚谷氨酸的影响并不是呈现简单的线性关系.

通过 Design-Expert V8.0.6 软件对试验结

表5 最陡爬坡试验设计与结果

Table 5 Experimental design and results of steepest climbing test

试验号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	$\gamma$ -聚谷氨酸产量/(g·L <sup>-1</sup> )
1	60	12	30	13.5	0.5	0.5	0.1	0.15	0.06	26.920
2	63	12	30	14.5	0.5	0.5	0.1	0.14	0.06	26.973
3	66	12	30	15.5	0.5	0.5	0.1	0.13	0.06	28.464
4	69	12	30	16.5	0.5	0.5	0.1	0.12	0.06	29.782
5	72	12	30	17.5	0.5	0.5	0.1	0.11	0.06	32.104
6	75	12	30	18.5	0.5	0.5	0.1	0.10	0.06	32.623
7	78	12	30	19.5	0.5	0.5	0.1	0.09	0.06	33.374
8	81	12	30	20.5	0.5	0.5	0.1	0.08	0.06	33.658
9	84	12	30	21.5	0.5	0.5	0.1	0.07	0.06	35.736
10	87	12	30	22.5	0.5	0.5	0.1	0.06	0.06	31.291
11	90	12	30	23.5	0.5	0.5	0.1	0.05	0.06	30.115
12	93	12	30	24.5	0.5	0.5	0.1	0.04	0.06	27.969

表6 Box-Behnken Design 试验设计与结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$\gamma$ -聚谷氨酸产量/(g·L <sup>-1</sup> )
1	0	1	-1	34.860
2	0	-1	1	34.498
3	0	0	0	35.874
4	1	1	0	35.356
5	1	-1	0	34.415
6	0	0	0	36.479
7	0	0	0	36.345
8	-1	0	-1	34.920
9	0	1	1	34.068
10	1	0	-1	33.563
11	-1	0	1	33.012
12	0	0	0	36.728
13	-1	-1	0	32.475
14	0	-1	-1	34.277
15	0	0	0	36.301
16	-1	1	0	34.329
17	1	0	1	35.169

果进行回归模型系数的显著性检验和回归方程方差分析,结果见表7和表8。进行二次多项式回归拟合得到 $\gamma$ -聚谷氨酸产量( $Y$ )的回归方程为

$$Y = -1447.50934 + 22.71598 \times X_1 + 50.2831 \times X_2 - 598.045 \times X_3 - 0.076083 \times X_1 X_2 + 29.28333 \times X_1 X_3 -$$

表7 回归模型系数的显著性检验结果

Table 7 Significance test results of regression model coefficients

因素	回归系数	df	标准差	-95%置信下限	+95%置信上限
$X_1$	0.47	1	0.18	0.04	0.90
$X_2$	0.37	1	0.18	-0.06	0.80
$X_3$	-0.11	1	0.18	-0.54	0.32
$X_1 X_2$	-0.23	1	0.26	-0.84	0.38
$X_1 X_3$	0.88	1	0.26	0.27	1.49
$X_2 X_3$	-0.25	1	0.26	-0.86	0.36
$X_1^2$	-1.23	1	0.25	-1.82	-0.64
$X_2^2$	-0.97	1	0.25	-1.56	-0.38
$X_3^2$	-0.95	1	0.25	-1.54	-0.36

表8 Box-Behnken 试验回归方程方差分析结果

Table 8 Statistical analysis results of regression equation of Box-Behnken design experiments

方差来源	平方和	df	均方和	F值	P值
模型	22.27	9	2.47	9.33	0.0038**
$X_1$	1.77	1	1.77	6.69	0.0362*
$X_2$	1.09	1	1.09	4.10	0.0827
$X_3$	0.10	1	0.10	0.36	0.5679
$X_1 X_2$	0.21	1	0.21	0.79	0.4049
$X_1 X_3$	3.09	1	3.09	11.64	0.0113*
$X_2 X_3$	0.26	1	0.26	0.97	0.3582
$X_1^2$	6.38	1	6.38	24.04	0.0017**
$X_2^2$	3.97	1	3.97	14.96	0.0061**
$X_3^2$	3.79	1	3.79	14.29	0.0069**

注:决定系数 $R^2=0.9230$ ,修正系数 $\text{Adj } R^2=0.8241$ ,拟失项 $P=0.0761$ ;\*\*表示该因素差异极显著( $P<0.01$ );\*表示该因素差异显著( $P<0.05$ )

$$25.3250 \times X_2 X_3 - 0.13674 \times X_1^2 - 0.97095 \times X_2^2 - 9.4870 \times X_3^2$$

根据上述回归方程和对试验结果的方差分析,借助 Design-Expert V8.0.6 软件绘制出双因子响应面三维曲面图和相应等高线图(见图1—图3),以便更直观地表现各因素的交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量最大值的影响. 每个响应面图都直观地呈现某个因素取零水平时其余两个因素对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响情况. 等高线越接近圆形,代表两个因素交互作用越不

显著;等高线越是接近椭圆形,则代表两个因素交互作用越显著<sup>[15]</sup>.

由图1a)可知,当  $\text{CaCl}_2$  的质量浓度取零水平时,谷氨酸钠和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量影响呈现凸型的抛物面形状,即随着谷氨酸钠和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  两个因素的变化, $\gamma$ -聚谷氨酸产量呈现先增大后减小的变化趋势,谷氨酸钠引起的响应面坡度比  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  引起的坡度更为陡峭. 图1b)所示的等高线在谷氨酸钠区域排列更为紧密,表明

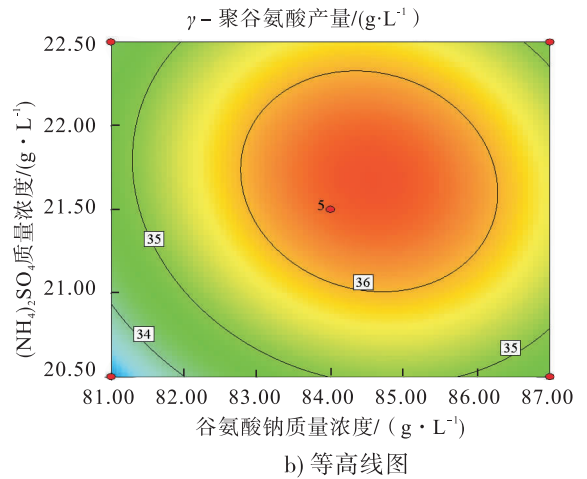
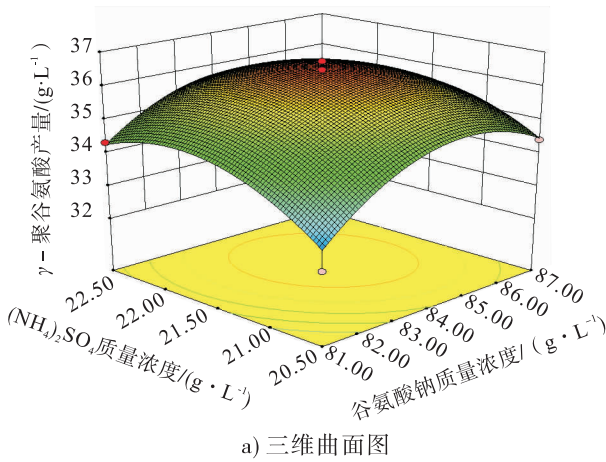


图1 谷氨酸钠和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量影响的三维曲面图和等高线图

Fig. 1 3D surface graph and contour map of effect of sodium glutamate and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  interaction on the yield of  $\gamma$ -PGA

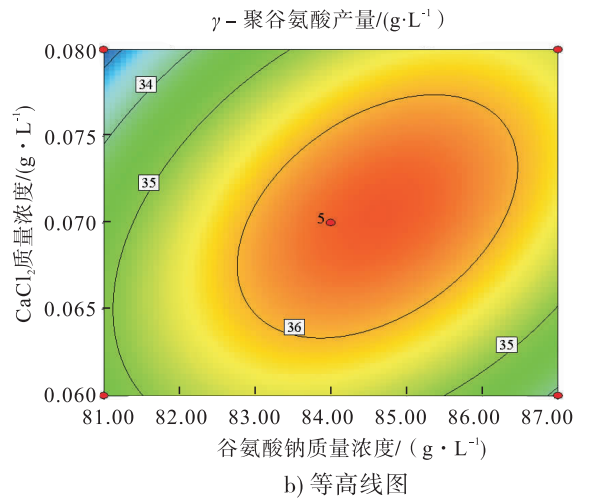
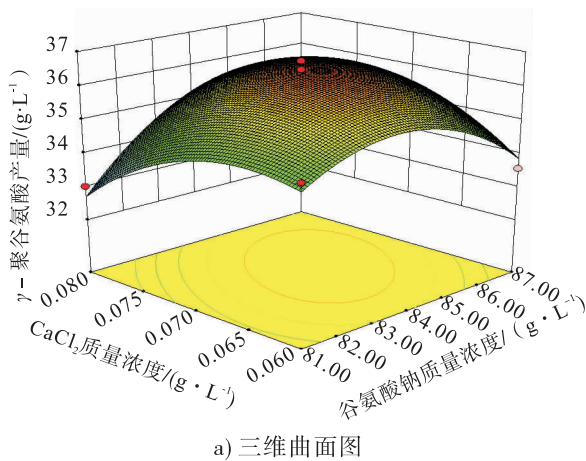


图2 谷氨酸钠和  $\text{CaCl}_2$  交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量影响的三维曲面图和等高线图

Fig. 2 3D surface graph and contour map of effect of sodium glutamate and  $\text{CaCl}_2$  interaction on the yield of  $\gamma$ -PGA



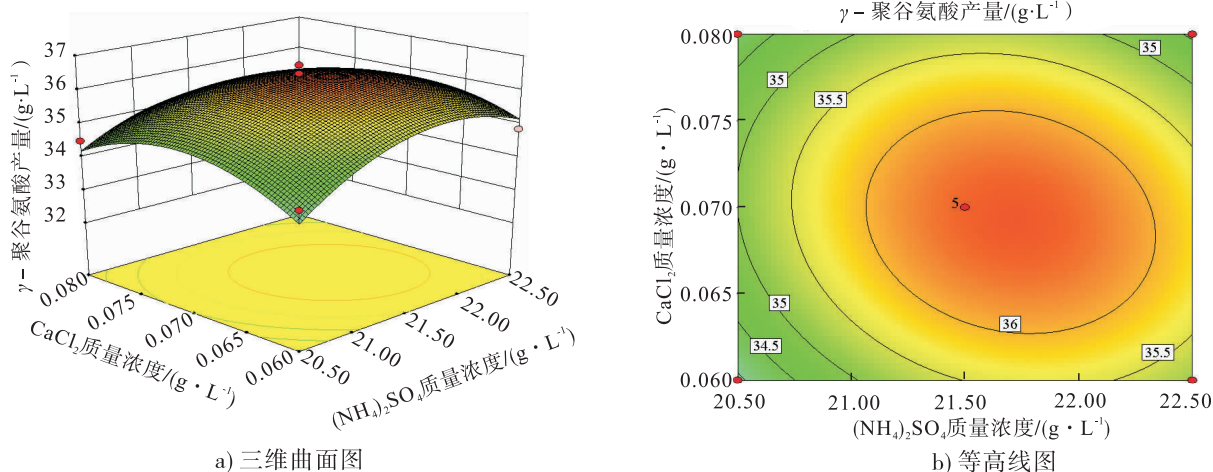


图3  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量影响的三维曲面图和等高线图

Fig. 3 3D surface graph and contour map of effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{CaCl}_2$  interaction on the yield of  $\gamma$ -PGA

谷氨酸钠对于  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响比  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  更大,等高线图近似圆形,表示谷氨酸钠和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响并不显著.图 2a)和图 3a)的响应面图与图 1a)的响应面图变化趋势相同,这表明在一个因素取零水平时,另外两个因素的交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响都呈现抛物线型的变化趋势, $\gamma$ -聚谷氨酸产量均先增大后减小且都有最高值点,而谷氨酸钠引起的响应面坡度比  $\text{CaCl}_2$  引起的坡度更为陡峭, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  引起的响应面坡度比  $\text{CaCl}_2$  引起的坡度更为陡峭.图 2b)的等高线在谷氨酸钠区域排列更为紧密,表明谷氨酸钠对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响比  $\text{CaCl}_2$  更大,等高线图呈现椭圆形,表明谷氨酸钠和  $\text{CaCl}_2$  的交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响显著;图 3b)的等高线在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  区域排列更为紧密,表明  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响比  $\text{CaCl}_2$  的更大,等高线图近似圆形,表明  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  的交互作用对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响不显著,这与回归模型中的方差统计分析结果一致.

为了准确计算 3 个因素的最优组分比例,对拟合获得的回归方程  $Y=f(X_1, X_2, X_3)$  中的 3 个因素分别求一阶偏导,并令其等于 0,整理得

$$\begin{cases} 0.27348 \times X_1 + 0.076083 \times X_2 - \\ 29.28333 \times X_3 = 0 \\ 0.076083 \times X_1 + 1.9419 \times X_2 + \\ 25.3250 \times X_3 = 0 \\ 29.28333 \times X_1 - 25.3250 \times X_2 - \\ 18.9740 \times X_3 = 0 \end{cases}$$

解以上方程组得:  $X_1 = 84.53$ ,  $X_2 = 21.67$ ,  $X_3 = 0.07$ . 将其代入回归方程,解得  $\gamma$ -聚谷氨酸产量理论预测最大值为  $36.450 \text{ g/L}$ . 因此,经响应面优化后的产  $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 最优发酵培养基组分为:谷氨酸钠  $84.53 \text{ g/L}$ , 柠檬酸钠  $12 \text{ g/L}$ , 甘油  $30 \text{ g/L}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $21.67 \text{ g/L}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0.07 \text{ g/L}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $0.1 \text{ g/L}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.5 \text{ g/L}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   $0.5 \text{ g/L}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0.06 \text{ g/L}$ .

## 2.4 验证试验

为了验证模型预测的准确性和优化培养基对促进解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 发酵生产  $\gamma$ -聚谷氨酸的效果,按照上述最优发酵培养基组分



进行了6次解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 发酵生产  $\gamma$ -聚谷氨酸的平行试验,所得  $\gamma$ -聚谷氨酸产量稳定在 36.5~37.7 g/L 之间,平均产量可达 37.048 g/L。试验值与预测值非常接近,表明该回归方程能够较为真实地预测上述3个显著因素对  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的影响。该结果同优化前产量 26.730 g/L 相比,提高了 1.39 倍。

### 3 结论

本研究在前期单因素试验的基础上,通过 Plackett-Burman 试验挑选出影响解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 发酵生产  $\gamma$ -聚谷氨酸最显著的3个因素,即谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$ ;进而通过最陡爬坡试验确定  $\gamma$ -聚谷氨酸产量最高时这3个因素的中心点,即谷氨酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  的质量浓度分别为 84 g/L, 21.5 g/L 和 0.07 g/L;最后通过响应面试验,拟合出该模型的回归方程、三维曲面图和等高线图,拟合得出最优发酵培养基组分:谷氨酸钠 84.53 g/L,柠檬酸钠 12 g/L,甘油 30 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  21.67 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.07 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.06 g/L。在此配方下,解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的实际  $\gamma$ -聚谷氨酸平均产量为 37.048 g/L,是优化前产量(26.730 g/L)的 1.39 倍,并与拟合方程解得的理论预测最大值 36.450 g/L 非常接近。

本研究利用响应面法将复杂的未知函数关系用二次多项式来拟合,准确找出了各显著影响  $\gamma$ -聚谷氨酸产量的因素,探究了各因素间的交互作用,得到了产  $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的最优发酵培养基组分。因此,利用响应面法对产  $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 的培养基进行优化是一种切实可行的方法,并且为  $\gamma$ -聚谷氨酸的进一步深入、放大研

究提供了新的理论依据和参考。

### 参考文献:

- [1] 刘晓鸥,李睿颖,徐勇虎,等. 聚谷氨酸的生物合成及应用前景[J]. 食品工程,2009(1):23.
- [2] IYANOVICS G, BRUCKNER V. Chemische und immunologische studien uber den mechanismus der milzbrandinfektion und immunitat die chemische struktur der kapelsubstanz des milzbrandbacillus und der serologisch identischen spezifischen substanz des *Bacillus mesentericus* [J]. Zeitschrift für Immunitäts for Schung, 1937 (90):304.
- [3] YOON S H, DO J H, LEESY, et al. Production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis* [J]. Biotechnology Letters, 2000(22):585.
- [4] 曹名锋,金映虹,解慧,等.  $\gamma$ -PGA 的微生物合成、相关基因及应用展望[J]. 微生物学通报, 2011(3):388.
- [5] 张海群,张智维,刘婷.  $\gamma$ -聚谷氨酸产生菌发酵培养基的响应面法优化研究[J]. 粮油食品科技, 2015(1):79.
- [6] 程艳玲,赵玉娥,王海玉. 生物降解型聚谷氨酸的研究进展[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2008(2):45.
- [7] 王普,孙立明,何军邀. 响应面法优化热带假丝酵母 104 菌株产羧基还原酶发酵培养基[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6):863.
- [8] 侯学敏,李林霞,张直峰,等. 响应面法优化薄荷总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013(6):124.
- [9] BOX G E P, WILSON K B. On the experimental attainment of optimum conditions[J]. Journal of the Royal Statistical Society, 1951(1):1.
- [10] 王永菲,王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005, 14(3):236.

- domain sequence analysis [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 50(3):1351.
- [13] 杨莹, 管敬喜, 谢林君, 等. 广西毛葡萄产区野生葡萄酒酵母种群分布与系统进化分析[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(7):1123.
- [14] 张俊杰, 杨旭, 郭晨, 等. 不同葡萄品种栽培土壤中酵母菌的组成及差异分析[J]. *酿酒*, 2017, 44(1):76.
- [15] 张俊杰, 杨旭, 焦健, 等. 不同株系赤霞珠葡萄表皮酵母菌的多样性研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(6):126.
- [16] 刘爱国. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒酿酒酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2008.
- [17] 刘爱国, 刘延琳, 王泽举, 等. 宁夏葡萄自然发酵过程中酵母菌的分子生物学鉴定[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(11):204.

(上接第38页)

- [11] BOX G E P. *Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building* [M]. New York: Wiley, 1990.
- [12] MONTGOMERY D C. *实验设计与分析* [M]. 6版. 傅钰生, 张健, 王振羽, 等译. 北京:人民邮电出版社, 2009:366.
- [13] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. *河南教育学院学报(自然科学版)*, 2011(4):34.
- [14] 范洪臣, 李艳华, 梁金钟, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产 $\gamma$ -PGA的条件[J]. *生物加工过程*, 2008, 6(3):17.
- [15] 王允祥, 吕凤霞, 陆兆新. 杯伞发酵培养基的响应曲面法优化研究[J]. *南京农业大学学报*, 2004(3):89.