

4-乙基愈创木酚生产菌株 D-31 培养条件的优化

肖 澎¹, 李 慧¹, 吴重德¹, 黄 钧¹, 周荣清^{1,2,*}

(1. 四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065;

2. 皮革化学与工程教育部重点实验室, 四川成都 610065)

摘 要:应用 Plackett-Burman 设计法筛选出影响枯草芽孢杆菌 D-31 菌体生长的主要因素是温度、可溶性淀粉及 KCl 的浓度。在此基础上通过陡坡实验进一步逼近最佳响应面区域,再应用 Box-Behnken 设计及响应面分析优化,结果表明:最适培养条件为可溶性淀粉 27.70g/L, KCl 6.66g/L, 酵母膏 50g/L, pH 8, 接种量 3%, 36.9℃。在最优培养条件下, 培养 24h, OD_{600nm} 从 1.24 提高到了 10.32, 菌体浓度从 6.27×10^8 CFU/mL 提高到了 5.17×10^9 CFU/mL, 分别提高了 8.32 倍和 8.25 倍, 发酵液用于将阿魏酸 (FA, 浓度 1g/L) 转化为 4-乙基愈创木酚 (4-EG) 的研究, 其 4-EG 产量从 9.48mg/L 提高到了 36.94mg/L, 转化率提高了 3.9 倍。

关键词:枯草芽孢杆菌, Plackett-Burman 设计法, 4-乙基愈创木酚

Optimization of culture condition for a strain D-31 producing 4-ethylguaiacol

XIAO Peng¹, LI Hui¹, WU Chong-de¹, HUANG Jun¹, ZHOU Rong-qing^{1,2,*}

(1. College of Light Industry, Textile&Food, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Key Laboratory for Leather Chemistry and Engineering of the
Education Ministry, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The important factors influencing the growth of *Bacillus subtilis* D-31, which were selected by Plackett-Burman design were temperature, starch soluble, and KCl. Then steepest ascent path was applied to approach the optimal region and the optimum levels of these three main factors were further optimized by Box-Behnken design and response surface analysis. The results showed that the OD_{600nm} of the broth increased from 1.24 to 10.32 and the concentration of *Bacillus subtilis* D-31 was significantly increased by 8.25 times from 6.27×10^8 CFU/mL to 5.17×10^9 CFU/mL under the optimal culture conditions (starch soluble 27.70g/L, yeast extract 50g/L, KCl 6.66g/L, pH 8, temperature 36.9℃ and inoculum concentration 3%). The culture obtained was used to convert ferulic acid (FA) into 4-ethyl guaiacol (4-EG) and the yield of 4-EG was increased by 3.9 times from 9.48mg/L to 36.94mg/L.

Key words: *Bacillus subtilis*; Plackett-Burman design; 4-ethyl guaiacol

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)13-0244-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.13.044

Bacillus subtilis 为革兰氏阳性细菌^[1], 酶系丰富、能充分利用各种底物^[2], 代谢产物种类丰富, 已在发酵食品和酶制剂工业中广泛使用^[3-4]。连宾等^[5]从分离的嗜热性细菌中发现了 *B. subtilis* 是酱香大曲的主要产香微生物, 嗜热细菌的代谢产物和美拉德反应是制曲过程中, 特征性酱香组分形成的主要途径。杨帆等^[6]从茅台的高温大曲中筛选的 *B. lincheniformis* 及 *B. subtilis* 皆能分泌乙偶姻、四甲基吡嗪等茅台酒的特征风味组分, 初步确定了这些微生物对其大曲

风味的贡献。应用生物方法合成香味组分具有周期短, 反应条件温和, 价格低廉, 无污染, 生产成本低等优点, 已引起许多研究者重视^[7]。稳定期的菌体浓度及生理状态是影响次级代谢产物的产率和转化率的重要因素之一。因此开发 *Bacillus sp* 的高密度的培养技术将有助于其工业化生产, 如 VuolantoA 等^[8]开发 *B. subtilis* 基因工程菌高密度培养方法, 提高了植酸酶发酵水平, 李亚玲等^[9]通过对培养基的优化, 获得高密度生物方法降低了 *B. subtilis* 微生态制剂的生产成本。

响应面分析法 (response surface methodology, RSM) 是一种有效的优化方法^[10-11], 可用于研究各因素及其交互作用在工艺过程中对响应值的影响, 精确地表述因素和响应值之间的关系, 已被广泛地用

收稿日期: 2014-02-19 * 通讯联系人

作者简介: 肖澎 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物及酶应用技术的研究。

基金项目: 国家自然科学基金 (31171742)。

于同时存在多因素影响的实验优化上^[12-14]。本研究基于前期研究成果的结果,采用 Plackett-Burman 设计、最陡爬坡实验和响应面分析相结合的方法,优化了 *B.subtilis* D-31 的培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 *B.subtilis* D-31,本实验室分离保藏菌株;种子培养基 营养肉汤培养基;初始培养基 葡萄糖 5g/L、蛋白胨 10g/L,NaCl 5g/L,pH7。

Spectrumlab22PC 可见分光光度计 Perkin ElmerTM,美国;TGL16M 高速冷冻离心机 湘麓离心机仪器有限公司;QYC-2112 型恒温振动培养器 上海福玛实验设备有限公司;PHS-3C PH 计 上海福玛实验设备有限公司。

1.2 培养方法

种子培养:挑取一环斜面菌种接种于 50mL/250mL 的种子培养中,37℃ 活化 12h。摇瓶培养:以 3% 的接种量接至初始培养基中,以转速 120r/min,37℃ 培养 24h。

1.3 测定方法

菌体浓度测定:取 10mL 培养 24h 的发酵液,离心(10000r/min),无菌水洗涤收集的菌团 2~3 次,重新悬于 10mL 无菌水中,适当稀释后,在波长 600nm 条件下,测定菌液的 OD 值。

1.4 实验设计

1.4.1 单因素实验 假设各因素之间不存在交互作用,每次实验只改变培养条件的 1 个因素,其他 5 个因素保持不变,对碳源、氮源、无机盐、初始 pH、温度、接种量等 6 个因素进行逐个优化。

1.4.2 Plackett-Burman 设计筛选 在单因素实验的基础上,应用 minitab 软件,采用 Plackett-Burman 考察可溶性淀粉含量、酵母膏、KCl、培养温度、培养基初始 pH、接种量等 6 个影响生长因素,每个因素取高、低两个水平,高水平约为低水平的 1.5~2 倍。另设三列为虚拟变量,在实验中为空,以考察实验误差。OD_{600nm} 为响应值,设定 3 个平行实验,实验因素和水平表见表 1。

表1 PB 设计因子及水平
Table 1 Factors and levels of PB design

因素	水平	
	-1	+1
A 可溶性淀粉(g/L)	15	30
B 酵母膏(g/L)	35	50
D KCl(g/L)	2.5	7.5
E 初始 pH	6	8
G 温度	30	38
H 接种量(%)	3	4

1.4.3 最陡爬坡实验 对 Plackett-Burman 设计结果进行分析,根据效应值的正负来判断重要因素的爬坡方向,以各效应值之间的比值来初步确定变化步长^[15],逼近最大响应区域。其他因素的取值由各因素效应值的正负和大小决定,正效应的因素取高水

平值,负效应的因素取低水平值。
1.4.4 Box-Behnken 实验设计 根据最陡爬坡实验结果,显著因素以中心点为零水平,高水平 and 低水平分别比零水平高于或低于一个实际步长。用 minitab 软件设计 Box-Behnken 响应面实验^[16]并进行数据处理。其因素水平选取见表 2。

表2 Box-Behnken 设计因子及水平
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	编码水平		
	-1	0	+1
X ₁ 可溶性淀粉(g/L)	24	27	30
X ₂ KCl(g/L)	6	6.5	7
X ₃ 温度(℃)	32	36	40

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

通过单因素实验,在不考虑因素之间交互作用情况下,初步得出最佳培养基成分及培养条件:可溶性淀粉 15g/L、酵母膏 35g/L、KCl 2.5g/L, pH8, 反应温度 37℃,接种量 3%。

2.2 Plackett-Burman 设计筛选结果

在单因素实验的基础上,通过 Plackett-Burman 设计,创建出实验次数 N = 12 的实验,对 9 个因素(6 个实际因素,3 个虚拟因素)进行考察。每个因素取高水平 and 低水平两个水平,以 OD_{600nm} 为响应值,实验设计及结果见表 3。

采用 Minitab 16 处理表 3 的数据结果如表 4 所示。可溶性淀粉含量及培养温度是影响高密度培养的主要因素,KCl 为次要影响因素。同时,除接种量因素对生长具有负效应外,其余影响因素皆具有正效应。进一步采用最陡爬坡实验研究可溶性淀粉、KCl、温度的影响规律。

2.3 最陡爬坡实验

Plackett-Burman 实验回归分析证实了可溶性淀粉、KCl 和温度是 3 个主要影响因素,且对 *B.subtilis* D-31 的生长均是正影响。增加可溶性淀粉、KCl 的含量,且同时提高温度,考察发酵液 OD 值的变化趋势,逼近最大响应区域。实验设计和结果如表 5 所示。最佳因素组合的浓度条件为第 3 组,故以第 3 组条件为后续实验的中心点进行响应面分析。

表5 最陡爬坡实验设计结果
Table 5 Result of steepest ascent experiment

序号	可溶性淀粉(g/L)	KCl(g/L)	温度(℃)	OD _{600nm}
1	21	5.5	28	6.61
2	24	6	32	8.32
3	27	6.5	36	10.42
4	30	7	40	9.18
5	33	7.5	44	8.9
6	36	8	48	6.73

2.4 Box-Behnken 实验设计及结果

通过最陡爬坡实验确定了重要影响因素的实验

表3 Plackett-Burman 设计及其结果
Table 3 Design and result of Plackett-Burman

实验号	A	B	(C)	D	E	(F)	G	H	(J)	Y
1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	9.29
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	7.70
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	4.93
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	7.56
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	10.97
6	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	7.01
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	10.29
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	8.54
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	6.96
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	11.24
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	8.97
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.73

表4 Plackett-Burman 实验各因素的回归分析结果
Table 4 Regression analysis of Plackett-Burman

因素	效应	T 检验	p	重要性排列
A 可溶性淀粉(g/L)	1.72500	2.88	0.035	2
B 酵母膏(g/L)	0.42500	0.71	0.510	4
D KCl(g/L)	1.14167	1.90	0.115	3
E 初始 pH	0.35167	0.59	0.583	5
G 温度	3.56833	5.95	0.002	1
H 接种量(%)	-0.04167	-0.07	0.947	6

范围。以菌体浓度为响应值,采用 Box-Behnken 设计了 3 因素 3 水平共 15 个实验点的响应面分析实验,其中 12 个为析因点,3 个为零点,零点实验进行了 3 次用来估计误差。实验方案与结果如表 6 所示。

表6 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 6 Design and result of Box-Behnken

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	OD _{600nm}
1	-1	-1	0	9.11
2	+1	-1	0	9.20
3	-1	+1	0	9.26
4	+1	+1	0	9.74
5	-1	0	-1	7.07
6	+1	0	-1	7.50
7	-1	0	+1	8.32
8	+1	0	+1	8.68
9	0	-1	-1	7.25
10	0	+1	-1	7.32
11	0	-1	+1	8.74
12	0	+1	+1	8.96
13	0	0	0	9.90
14	0	0	0	9.97
15	0	0	0	10.06

数据分析得出回归方程系数、显著性检验,方差分析结果,分别如表 7~表 8 所示。由此可知菌体浓度与可溶性淀粉、KCl 含量、温度的关系呈现方程(1)所述关系:

$$Y = 9.97667 + 0.17X_1 + 0.1225X_2 + 0.695X_3 - 0.41208X_1^2 - 0.23708X_2^2 - 1.67208X_3^2 + 0.0975X_1X_2 - 0.0175X_1X_3 + 0.0375X_2X_3$$
 (1)

对回归方程一阶求导,联立方程组解得 X₁ = 0.2323, X₂ = 0.3131, X₃ = 0.2121,通过换算公式^[15]可得到最优条件,可溶性淀粉含量为 27.69g/L, KCl 为 6.66g/L,温度为 36.85℃。代入回归方程可以得到菌体的理论 OD 值为 10.09。考虑到实际操作的可性,将其最优理论培养条件修正为:可溶性淀粉含量为 27.70g/L, KCl 为 6.66g/L,温度为 36.9℃。

表7 回归系数显著性分析
Table 7 Significance analysis of regression coefficients

项	系数	系数标准误	T 值	p 值	显著性
常量	9.97667	0.08172	122.087	0.000	+
X ₁	0.17000	0.05004	3.397	0.019	+
X ₂	0.12250	0.05004	2.448	0.058	
X ₃	0.69500	0.05004	13.888	0.000	+
X ₁ ²	-0.41208	0.07366	-5.594	0.003	+
X ₂ ²	-0.23708	0.07366	-3.219	0.024	+
X ₃ ²	-1.67208	0.07366	-22.700	0.000	+
X ₁ X ₂	0.09750	0.07077	1.378	0.227	
X ₁ X ₃	-0.01750	0.07077	-0.247	0.815	
X ₂ X ₃	0.037500	0.07077	0.530	0.619	

注:R² = 0.9933, AdjR² = 0.9813。

由表 7 显著性分析可知,3 个因素对菌体生长的影响排序:温度 > 可溶性淀粉 > KCl。X₁、X₃、X₁²、

表 8 回归方程的方差分析
Table 8 Variance analysis of the regression equation

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	p
回归	9	14.9110	14.9110	1.6568	82.70	0.000
线性	3	4.2155	4.2155	1.4052	70.14	0.000
平方	3	10.6507	10.6507	3.5502	177.22	0.000
交互作用	3	0.0449	0.0449	0.0150	0.75	0.569
残差误差	5	0.1002	0.1002	0.0200		
失拟	3	0.0873	0.0873	0.0291	4.52	0.186
纯误差	2	0.0129	0.0129	0.0064		
合计	14	15.0112				

X_2^2 、 X_3^2 对 Y 的影响显著,各因素间呈二次关系。相关系数 R^2 为 0.9933,调整后为 0.9813,均大于 0.8,该模型能解释 98.13% 菌液生长 OD 值的变化,表明可以用该回归方程对实验结果进行分析和预测。由表 8 可知,模型的失拟项 $p=0.186>0.05$,模型失拟不显著,说明菌浓的实际值与预测值有较好的拟合度,回归模型适合,不需要回归议程调整,可以用于枯草芽孢杆菌 D-31 高密度培养优化的预测。根据上述拟合回归方程作曲面图,两两因素之间均有较为明显的交互作用,见图 1~图 3。

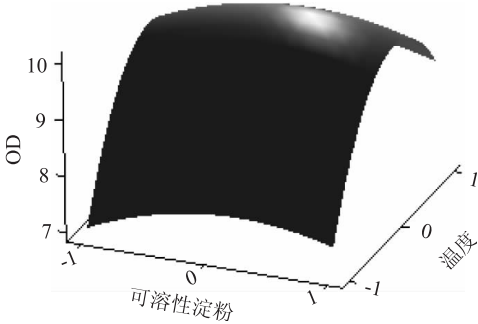


图 1 可溶性淀粉和温度交互作用对菌体生长的响应曲面图
Fig.1 Response surface for the effect of starch soluble and temperature on the growth of the strain D-31

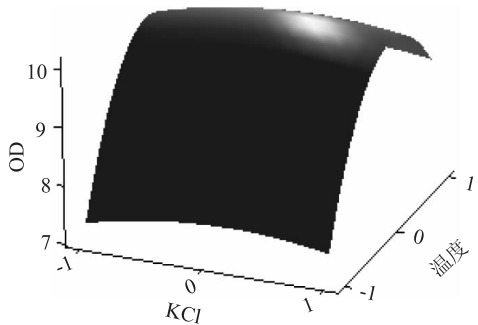


图 2 KCl 和温度交互作用对菌体生长的响应曲面图
Fig.2 Response surface for the effect of KCl and temperature on the growth of the strain D-31

2.5 验证实验

求解回归方程并考虑实际情况,得到的最优条件为可溶性淀粉含量为 27.70g/L, KCl 为 6.66g/L, 温度为 36.9℃。以该最佳条件进行 3 次平行实验,得到的 OD_{600nm} 的平均值为 10.32,与预测值 10.09 基本一致,误差在 5% 内,说明响应面分析方法可靠,与实际

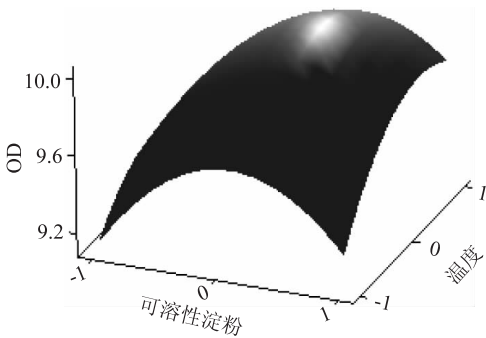


图 3 淀粉和 KCl 交互作用对菌体生长的响应曲面图
Fig.3 Response surface for the effect of starch soluble and KCl on the growth of the strain D-31

情况拟合较好。通过培养条件的优化, *B. subtilis* D-31 的菌浓 OD 从 1.24 提高为 10.32,活菌浓度由 6.27×10^8 CFU/mL 提高到 5.17×10^9 CFU/mL,为优化前的 8.25 倍。发酵液用于将阿魏酸 (FA) 浓度 1g/L 转化为 4-乙基愈创木酚 (4-EG) 的研究,产量从 9.48mg/L 提高到了 36.94mg/L,转化率为原来的 3.9 倍。

3 结论

本研究对 *B. subtilis* D-31 的高密度培养条件进行优化。在单因素的基础上,对 Plackett-Burman 设计实验数据进行分析,结果表明可溶性淀粉、温度和 KCl 对菌体生长的影响较为显著。通过最陡爬坡实验逼近最大响应区域,确定响应面的中心点为可溶性淀粉 27g/L, KCl 6.5g/L, 温度 36℃。利用响应面法综合考虑这 3 个主要影响因素对菌体生长的影响,建立回归模型,并对实验数据进行分析,确定最佳培养条件为可溶性淀粉含量为 27.70g/L, KCl 为 6.66g/L, 温度为 36.9℃, 菌液 OD 可达到 10.32,与预测值 (10.09) 的误差在 5% 之内,活菌浓度由 6.27×10^8 CFU/mL 提高到 5.17×10^9 CFU/mL,是优化前的 8.25 倍。发酵液用于将阿魏酸 (FA) 浓度 1g/L 转化为 4-EG 的研究,产量从 9.48mg/L 提高到了 36.94mg/L,转化率为原来的 3.9 倍,为进一步开发食品香味成分的生物制备方法奠定了基础。

参考文献

[1] Obagwu J, Korsten L. Integrated control of citrus and blue (下转第 252 页)

- [3]任娇艳,赵谋明,崔春,等.基于响应面分析法的草鱼蛋白酶解工艺[J].华南理工大学学报:自然科学版,2006,34(3):95-100.
- [4]周燕芳,刘丹凡.草鱼酶解条件的研究[J].食品研究与开发,2012,33(9):83-85.
- [5]Ren J Y,Zhao M M,Shi J,et al.Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology [J]. LWT - Food Science and Technology,2008,41(9):1624-1632.
- [6]Wasswa J,Tang J,Gu X H,et al.Influence of the extent enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idel*) skin [J]. Food Chemistry,2007,104(4):1698-1704.
- [7]Wang L Z,Yang B,Du X Q.Extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idel*) skin [J]. Food Process Engineering,2009,32(5):743-751.
- [8]任娇艳,赵谋明,崔春,等.草鱼源抗氧化肽的响应面法优化制备及活性评价[J].食品工业科技,2009,30(7):69-73.
- [9]王天林.酶法水解草鱼鱼肉蛋白最适条件的研究[J].农产品加工·创新版,2009(8):21-23.
- [10]李莹,黄开红,周剑忠,等.水产蛋白酶解制备鲜味肽[J].食品科学,2012,33(13):248-253.
- [11]Korhonen H,Pihlanto A.Bioactive peptides:production and functionality [J]. International Dairy Journal, 2006, 16 (9): 945-960.
- [12]全拓.肉类食品的风味改良与开发[J].肉类研究,2010(12):3-8.
- [13]廖兰,赵谋明,崔春,等.肽与氨基酸对食品滋味贡献的研究进展[J].食品与发酵工业,2009,35(12):107-112.
- [14]刘甲.呈味肽的研究及其在调味品中的应用[J].肉类研究,2010,24(5):88-92.
- [15]徐静,张井,郑晓杰,等.毛虾风味液态调味基料的制备[J].食品科学,2009,30(24):494-496.
- [16]Nagodawithana T W.Savory flavors.In Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients [C]. New York: John Wiley & Sons,1994:135-168.
- [17]Bhaskar N,Benila T,Radha C.Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease [J]. Bioresource Technology,2008,99(2):335-343.
- [18]张水华.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2010:187-189.
- [19]袁晓晴,戴志远,叶婧,等.鳙鱼鱼肉蛋白的酶解工艺研究[J].食品科技,2009,34(2):136-139.
- [20]周燕芳,刘锦浩.木瓜蛋白酶水解鳙鱼[J].食品研究与开发,2010,31(3):55-57.
- [21]吴祥庭.优化水酶法提取鲢鱼鱼油的酶解条件[J].食品科学,2006,27(11):270-273.
- [22]何国庆,丁立孝.食品酶学[M].北京:化学工业出版社,2005.

(上接第247页)

- molds using *Bacillus subtilis* in combination, with sodium bicarbonate or hot water[J].Postharvest Biology and Technology, 2003,281:87-194.
- [2]惠明,窦丽娜,田青,等.枯草芽孢杆菌的应用研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(27):1162-1162.
- [3]马明,杜金华.枯草芽孢杆菌酶在工业生产中的应用[J].山东科学,2006,19(3):35-38.
- [4]李明,双宝,李海涛,等.枯草芽孢杆菌的研究与应用[J].东北农业大学学报,2009,40(9):111-114.
- [5]连宾,张永玲,任铁,等.茅台酒曲嗜热细菌的研究[J].贵州科学,1993,11(1):75-81.
- [6]杨帆,林琳,王和玉,等.茅台大曲中3株芽孢杆菌代谢产物的比对分析[J].酿酒科技,2011,8:42-43.
- [7]陈朋,李红玉,刘超群.微生物转化合成香兰素[J].现代生物医学进展,2010,10(2):385-388.
- [8]Vuolanto A,Weymarn N,Kerovuo J,et al.Phytase production by high cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letters,2001,23(10):761-766.
- [9]李亚玲,赵玉洁,谢凤行.枯草芽孢杆菌 H4 培养条件的优化[J].天津农业科学,2009,15(4):20-23.
- [10]Li H,Qiu T,Gao D,et al.Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 [J]. Amino Acids,2010,38(5):1439-1445.
- [11]李艳华,梁金钟,范洪臣.响应面法优化 γ -聚谷氨酸发酵培养基的研究[J].食品科技,2008,33(3):45-48.
- [12]Xiao Z,Liu P,Qin J,et al.Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2007,74(1):61-68.
- [13]Chen Q,He G,M A Ali.Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology [J]. Enzyme and Microbial Technology,2002,30(5):667-672.
- [14]Yuan L,Li Y,Wang Y,et al.Optimization of critical medium components using response surface methodology for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105 (3): 232-237.
- [15]赵伟,陈晨,刘倩.利用 Minitab 优化耐高温淀粉酶发酵培养条件[J].中南大学学报:自然科学版,2010,41(5):1652-1657.
- [16]Box,G E,Behnken D W.Some new three level designs for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960, 2 (4):455-475.