

# 响应面法对 *Bacillus natto* TK-2 产聚- $\gamma$ -谷氨酸( $\gamma$ -PGA)发酵培养基的优化

曹小红, 哈志瑞, 王春玲, 廖振宇, 鲁梅芳

(天津科技大学食品工程与生物技术学院 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津, 300457)

**摘 要** 通过 Plackett-Burman 设计和响应面分析对 *B. natto* TK-2 发酵产  $\gamma$ -PGA 的培养基进行了优化。首先通过 Plackett-Burman 设计从 6 个因素中筛选出了有显著影响的葡萄糖、味精、 $\text{CaCl}_2$  等 3 个因素; 然后通过最陡爬坡和 Box-Behnken 设计进一步优化, 并利用 SAS 软件进行回归分析, 得到以上 3 个因素的最佳浓度分别为 (g/L): 葡萄糖 21.4, 味精 25.1,  $\text{CaCl}_2$  2.6。在优化后的培养基下,  $\gamma$ -PGA 的产量比优化前提高了 34.01%。

**关键词** 响应面法, *Bacillus natto* TK-2,  $\gamma$ -PGA, 优化

聚- $\gamma$ -谷氨酸( $\gamma$ -polyglutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是一种可由微生物合成的氨基酸聚合物, 它由谷氨酸单体以  $\alpha$ -氨基和  $\gamma$ -羧基肽键的形式缩合而成的一种水溶性极高的多聚氨基酸<sup>[1]</sup>, 具有生物可降解性, 可食用且对人体和环境无毒害<sup>[2,3]</sup>。因此, 近年来  $\gamma$ -PGA 及其降解产物在食品、化妆品、药物载体<sup>[4]</sup>、水处理<sup>[5]</sup>、防冻剂<sup>[6]</sup>等领域的应用受到国内外广泛关注。本论文选用的产  $\gamma$ -PGA 的纳豆枯草芽孢杆菌, 由天津科技大学菌种保藏中心提供, 在实验过程中将其命名为 *Bacillus natto* TK-2(简称 TK-2)。以石瑜<sup>[7]</sup>报道的培养基为初始发酵培养基, 对  $\gamma$ -PGA 进行了分离纯化, 并由红外光谱和核磁共振对其结构进行了鉴定, 其结构与 Fa Liang<sup>[8]</sup>等报道相似。在此基础上, 采用响应面法<sup>[9,10]</sup>对其发酵培养基进一步优化, 以期提高  $\gamma$ -PGA 的产量。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

*Bacillus natto* TK-2, 从日本高桥佑藏研究所生产的纳豆素中分离得到, 实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂糖 20.0, pH7.2~7.4。

一级种子培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH7.0。

二级种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨

10.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.6, pH7.0。

初始发酵培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 蛋白胨 30.0, 味精 20.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  3.5,  $\text{CaCl}_2$  4.0, pH7.5。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基的优化设计

##### 1.2.1.1 Plackett-Burman 设计

通过单因素试验发现, 影响 *Bacillus natto* TK-2 产  $\gamma$ -PGA 的主要因素有: 蛋白胨, 葡萄糖, 味精,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ 。用 Plackett-Burman 设计对以上 6 个因素进行全面考察, 选用  $N=12$  的 P-B 设计, 如表 1 所示。试验结果用 SAS 软件进行数据分析。

##### 1.2.1.2 最陡爬坡试验接近最大响应面区域

根据 Plackett-Burman 试验分析的结果筛选出影响  $\gamma$ -PGA 产量的显著因素, 并以各显著因素的正负效应确定下一步试验的最陡爬坡路径(包括变化方向和变化步长), 快速的逼近最佳区域。试验设计及结果见表 2 和表 3。

##### 1.2.1.3 响应面试验设计

通过 Plackett-Burman 试验确定出了影响  $\gamma$ -PGA 产量的主要因素, 进而由最陡爬坡实验确定接近响应值区域显著因素的浓度, 接下来利用 Box-Behnken 设计进一步优化, 其结果见表 4。每个因素有 3 个水平, 在中心点上有 3 个重复, 以  $\gamma$ -PGA 的产量为响应值, 试验数据用 SAS 软件进行多项式回归分析, 通过回归拟合后得到一个试验因子对响应值影响的二阶经验模型:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$$

式中,  $Y$  为预测响应值即  $\gamma$ -PGA 产量,  $\beta$  为回归系数,  $x_i$  为自变量的编码水平, 它与自变量  $X_i$  之间的

第一作者: 博士, 教授。

收稿日期: 2007-07-09, 改回日期: 2007-10-12

关系是:  $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$

其中,  $X_0$  为实验中心点处的自变量值,  $\Delta X_i$  为自变量的变化步长。

### 1.2.2 培养条件

挑取斜面培养的 *B. natto* TK-2 两环至装有 20 mL 一级种子培养基的 100 mL 三角瓶中, 37℃, 170 r/min, 振荡培养 24 h。从一级种子培养基中取 1 mL 接入到装有 50 mL 二级种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 37℃, 170 r/min 振荡培养 12 h, 再从种子液中取 2 mL 接入到装有 50 mL 初始发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 37℃, 170 r/min 振荡培养 24 h。

### 1.2.3 $\gamma$ -PGA 的测定

发酵结束后, 取发酵液 10 mL 在 12 000 r/min, 4℃ 条件下离心 20 min, 在上清液中缓慢加入 5 倍体积的 95% 的预冷乙醇提取。将混合物振荡后离心

(10 000 r/min, 10 min), 沉淀物用去离子水溶解, 再加 2~4 倍体积的预冷丙酮提取。将混合物振荡后离心 (10 000 r/min, 10 min), 取沉淀物于 105℃ 衡重 2 h 后称其干重。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 设计筛选影响 $\gamma$ -PGA 产量的重要因素

根据单因素试验选取对  $\gamma$ -PGA 产量有影响的 6 个因素, 每个因素选高低 2 个水平, 见表 2, 其中高水平是低水平的 1.25 倍, 以  $\gamma$ -PGA 的产量作为响应值 (Y)。试验设计及结果如表 1 所示 (每组试验有 3 个重复, 以平均值为准)。分别计算各因素效应, 并进行重要性评价, 结果见表 2。

表 1 Plackett-Burman 试验设计及结果

| 序号 | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | $X_5$ | $X_6$ | $X_7$ | $X_8$ | $X_9$ | $X_{10}$ | Y 值 ( $\gamma$ -PGA) / g · L <sup>-1</sup> |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|--|
| 1  | 1     | -1    | 1     | -1    | -1    | -1    | 1     | 1     | 1     | -1       | 19.75                                      |
| 2  | 1     | 1     | -1    | 1     | -1    | -1    | -1    | 1     | 1     | 1        | 18.02                                      |
| 3  | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | -1    | -1    | -1    | 1     | 1        | 18.35                                      |
| 4  | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | -1    | -1    | 1     | 1        | 17.85                                      |
| 5  | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | -1    | -1    | -1       | 16.73                                      |
| 6  | 1     | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | -1    | -1       | 16.59                                      |
| 7  | -1    | 1     | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | 1     | -1       | 17.68                                      |
| 8  | -1    | -1    | 1     | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1    | 1        | 20.45                                      |
| 9  | -1    | -1    | -1    | 1     | 1     | 1     | -1    | 1     | 1     | -1       | 17.93                                      |
| 10 | 1     | -1    | -1    | -1    | 1     | 1     | 1     | -1    | 1     | 1        | 17.35                                      |
| 11 | -1    | 1     | -1    | -1    | -1    | 1     | 1     | 1     | -1    | 1        | 16.55                                      |
| 12 | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1    | -1       | 17.65                                      |

表 2 Plackett-Burman 试验水平及其主效应分析

| 因素    | 符号 | 营养物/%                           | 水平   |         | $t$ 值     | $Pr >  t $ | 排序 |
|-------|----|---------------------------------|------|---------|-----------|------------|----|
|       |    |                                 | 低(-) | 高(+)    |           |            |    |
| $X_1$ |    | 蛋白胨                             | 3    | 3.75    | -4.163 64 | 0.150 058  | 5  |
| $X_2$ |    | 葡萄糖                             | 2.5  | 3.125   | -12.781 8 | 0.049 705  | 1  |
| $X_3$ |    | 味精                              | 2    | 2.5     | 11.654 35 | 0.054 491  | 3  |
| $X_4$ |    | MgSO <sub>4</sub>               | 0.35 | 0.437 5 | 4.345 455 | 0.143 995  | 4  |
| $X_5$ |    | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.35 | 0.437 5 | -0.236 36 | 0.852 238  | 6  |
| $X_6$ |    | CaCl <sub>2</sub>               | 0.35 | 0.437 5 | -12.672 7 | 0.050 132  | 2  |

由表 2 可知, 对 *Bacillus natto* TK-2 产  $\gamma$ -PGA 有显著影响 (可信度 > 90%) 的因素包括葡萄糖, 味精及 CaCl<sub>2</sub>。其中, 葡萄糖和 CaCl<sub>2</sub> 有显著负效应, 味精有显著正效应。因此, 后面的试验主要考察这 3 个因素, 且应当适当增加味精含量, 减少葡萄糖和 CaCl<sub>2</sub> 的含量。

### 2.2 最陡爬坡试验接近最大响应面区域

从表 2 可知, 在影响  $\gamma$ -PGA 产量的各主要因素中, 葡萄糖和 CaCl<sub>2</sub> 有显著负效应, 味精有显著正效应。根据这 3 个因素效应大小的比例设定它们的变

化方向和步长。其他各因素分别取各自的低水平进行试验, 试验设计及结果见表 3。

表 3 最陡爬坡试验设计及结果

| 序号 | 葡萄糖/% | 味精/% | CaCl <sub>2</sub> /% | Y 值 ( $\gamma$ -PGA) / g · L <sup>-1</sup> |
|----|-------|------|----------------------|--|
| 1  | 2.5   | 2.0  | 0.35                 | 18.68                                      |
| 2  | 2.3   | 2.2  | 0.30                 | 19.23                                      |
| 3  | 2.1   | 2.4  | 0.25                 | 24.18                                      |
| 4  | 1.9   | 2.6  | 0.20                 | 21.06                                      |
| 5  | 1.7   | 2.8  | 0.15                 | 16.39                                      |
| 6  | 1.5   | 3.0  | 0.10                 | 13.17                                      |

由表 3 知,随着 3 个重要因素的不同变化, $\gamma$ -PGA 的产量的变化趋势是先上升后下降,其中第 3 组培养基对应的发酵液产  $\gamma$ -PGA 的产量达到最大值,响应变量接近最大响应区域,所以以第 3 组条件为中心点进行响应面分析。

### 2.3 Box-Behnke 试验设计筛选重要因素的最优水平

以葡萄糖,味精及  $\text{CaCl}_2$  三个重要因素为自变量,各因素编码水平如表 4 所示。Box-Behnke 试验设计及试验结果如表 5 所示。

表 4 Box-Behnke 试验因素水平

| 营养物                | 编号    | 水平   |      |      |
|--------------------|-------|------|------|------|
|                    |       | -1   | 0    | 1    |
| 葡萄糖/%              | $X_1$ | 1.9  | 2.1  | 2.3  |
| 味精/%               | $X_2$ | 2.2  | 2.4  | 2.6  |
| $\text{CaCl}_2$ /% | $X_3$ | 0.20 | 0.25 | 0.30 |

表 5 Box-Behnke 试验设计及结果

| 序号 | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | Y 值 ( $\gamma$ -PGA)/g · L <sup>-1</sup> |
|----|-------|-------|-------|--|
| 1  | -1    | -1    | 0     | 21.01                                    |
| 2  | -1    | 1     | 0     | 22.94                                    |
| 3  | 1     | -1    | 0     | 22.24                                    |
| 4  | 1     | 1     | 0     | 21.38                                    |
| 5  | 0     | -1    | -1    | 22.84                                    |
| 6  | 0     | -1    | 1     | 21.81                                    |
| 7  | 0     | 1     | -1    | 23.87                                    |
| 8  | 0     | 1     | 1     | 23.11                                    |
| 9  | -1    | 0     | -1    | 22.39                                    |
| 10 | 1     | 0     | -1    | 21.06                                    |
| 11 | -1    | 0     | 1     | 21.48                                    |
| 12 | 1     | 0     | 1     | 22.15                                    |
| 13 | 0     | 0     | 0     | 24.02                                    |
| 14 | 0     | 0     | 0     | 24.04                                    |
| 15 | 0     | 0     | 0     | 24.14                                    |

注:  $x_1 = (X_1 - 2.1)/0.2$ ,  $x_2 = (X_2 - 2.4)/0.2$ ,  $x_3 = (X_3 - 0.25)/0.05$

以  $\gamma$ -PGA 的产量为响应值,利用 SAS 软件对表 5 的结果进行回归拟和,得到二阶回归方程为:

$$Y = 24.066\ 67 - 0.123\ 75X_1 + 0.425\ X_2 - 0.201\ 25\ X_3 - 1.655\ 833X_1^2 - 0.697\ 5X_1X_2 + 0.5X_1X_3 - 0.518\ 333X_2^2 + 0.067\ 5X_2X_3 - 0.890\ 833X_3^2$$

表 6 和表 7 分别是该回归方程的方差分析和模型的可信度分析。从这 2 个表格可以看出,大于 F 值的概率为 0.005774,说明此模型的可信度较高,可以选择。同时,在模型各参数中,除  $X_1$ ,  $X_3$  和  $X_1X_3$  对  $\gamma$ -PGA 的产量无影响外,其他各项均有较显著的影响(可信度 > 90%)。

此外,从模型的可信度分析表 7 中得到复相关系

数的平方  $R^2 = 0.958\ 8$ ,校正后的  $R^2 = 0.884\ 7$ ,说明模型可以解释 95.88% 的试验所得  $\gamma$ -PGA 的变化。Y 的变异系数  $CV = 1.664\ 577$ ,较低,说明试验的可靠性较高。综上说明回归方程给 TK-2 发酵产  $\gamma$ -PGA 提供了合适的模型。

表 6 回归方程的方差分析

| 方差来源     | 自由度 | 总偏差平方和   | 平均偏差平方和  | F 值      | 大于 F 值的概率 |
|----------|-----|----------|----------|----------|-----------|
| $X_1$    | 1   | 0.122513 | 0.122513 | 0.868339 | 0.394188  |
| $X_2$    | 1   | 1.445000 | 1.455000 | 10.24181 | 0.023988  |
| $X_3$    | 1   | 0.324013 | 0.324013 | 2.296522 | 0.190098  |
| $X_1^2$  | 1   | 10.12351 | 10.12351 | 71.75299 | 0.000377  |
| $X_2^2$  | 1   | 1.946025 | 1.946025 | 13.79295 | 0.045338  |
| $X_3^2$  | 1   | 1        | 1        | 7.087758 | 0.021996  |
| $X_1X_2$ | 1   | 0.992010 | 0.992010 | 7.031129 | 0.13799   |
| $X_1X_3$ | 1   | 0.018225 | 0.018225 | 0.129174 | 0.044791  |
| $X_2X_3$ | 1   | 1.516310 | 1.516310 | 10.74724 | 0.73397   |
| 模型       | 9   | 16.42713 | 1.825237 | 12.93684 | 0.005774  |
| 误差项      | 5   | 0.705442 | 0.141088 |          |           |
| 所有项      | 14  | 17.13257 |          |          |           |

表 7 模型的可信度分析

|                |           |
|----------------|-----------|
| 平均值            | 22.565 33 |
| 复相关系数 $R^2$ /% | 95.88     |
| 校正后的 $R^2$ /%  | 88.47     |
| 模型误差的平方根       | 0.375 617 |
| Y 的变异系数(CV)    | 1.664 577 |

### 2.4 响应面分析及最佳培养成分确定

利用 SAS 软件对回归模型进行响应面分析,得到各响应面立体分析图,见图 1、图 2、图 3。由图及软件分析可知,回归方程存在稳定点。通过岭脊分析知  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  的编码值分别为 (-0.182 23, 0.533 82, -0.204 51),即葡萄糖,味精,  $\text{CaCl}_2$  的最佳浓度分别为(g/L):21.4,25.1 和 2.6。此时,响应值 Y 达到最大值,即  $\gamma$ -PGA 的产量最多,为 24.2069 g/L。以此浓度配制发酵培养基,分批发酵进行试验验证,得到  $\gamma$ -PGA 的产量均值为 23.99 g/L,这与预测值 24.2069 g/L 是基本吻合的。同时,与初始发酵培养基所产生的  $\gamma$ -PGA 相比提高了 34.01%。

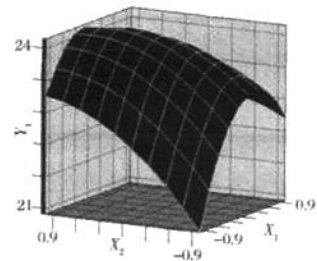


图 1  $Y = f(X_1, X_2)$  响应面立体分析图

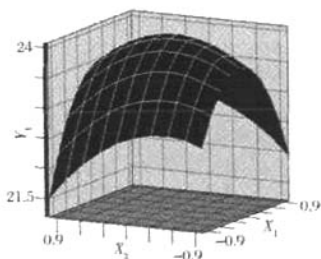


图2  $Y=f(X_1, X_3)$ 响应面立体分析图

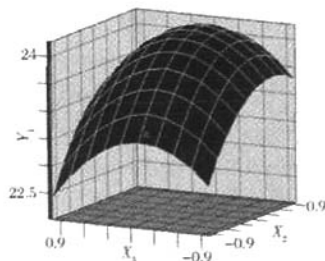


图3  $Y=f(X_2, X_3)$ 响应面立体分析图

### 3 结论

响应面分析法试验次数少、周期短,求得的回归方程精确度高,可以研究几个因素的交互作用,是降低生产成本,优化培养条件的一种有效方法。近年来受到越来越多的重视,并成功运用到农业、生物、食品等领域。本文通过 Plackett-Burman 设计从影响 *Bacillus natto* TK-2 产  $\gamma$ -PGA 的各发酵培养基中筛选出了葡萄糖,味精和  $\text{CaCl}_2$  3 个重要因素,并用 Box-Behnken 设计实现了条件优化。优化后的发酵培养基为(g/L):葡萄糖 21.4,蛋白胨 30.0,味精 25.1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5,

$\text{CaCl}_2$  2.6, pH7.5。在此优化培养基下, $\gamma$ -PGA 的产量达到 24.20g/L,比优化前提高了 34.01%。

### 参考文献

- 1 Makoto Ashiuchi, Tohru Kamei, Haruo Misono. Poly- $\gamma$ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 23: 101~106
- 2 Ing Lung Shih, Yi Tsong Van. The production of poly-( $\gamma$ -glutamate acid) from microorganisms and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2001, 79: 207~225
- 3 Shih I L, Van Y T, Chang Y N. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly-( $\gamma$ -glutamate acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 213~220
- 4 Chun Li, Robert A Newman, Qing Ping Wu, et al. Biodistribution of paclitaxel and poly(L-glutamate acid)-paclitaxel conjugate in mice with ovarian OCa-1 tumor [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2000, 46: 416~422
- 5 Makoto Taniguchi, Koujiko, Ayako Shimauchi. Proposals for waste water treatment by applying flocculating activity of cross-linked poly- $\gamma$ -glutamate acid [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99: 245~251
- 6 Ing Lung Shih, Yi Tsong Van, Yi Yuan Sau. Antifreeze activities of poly-( $\gamma$ -glutamate acid) produced by *Bacillus licheniformis* [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25: 1709~1712
- 7 曹小红, 石瑜, 王春玲, 等. *Bacillus natto* TK-2 产  $\gamma$ -聚谷氨酸的絮凝活性的研究 [J]. 环境保护科学, 2007, 5(刊登中)
- 8 Hsiang Fa Liang, Ting Fan Yang, Chin Tsung Huang, et al. Preparation of nanoparticles composed of poly-( $\gamma$ -glutamate acid)-poly(lactide) block copolymers and evaluation of their uptake by HepG2 cells [J]. Journal of Controlled Release, 2005, 105: 213~225
- 9 Thompson D R. Response surface experimentation [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1982, 6: 155~159
- 10 Dale B McDonald, Walter J Grantham, Wayne L Tabor, et al. Global and local optimization using radial basis function response surface models [J]. Applid Mathematical Modelling, 2007, 31: 2095~2110

## Medium Optimization by Response Surface Methodology for Poly- $\gamma$ -glutamic Acid Production from *Bacillus natto* TK-2

Cao Xiaohong, Ha Zhirui, Wang Chunling, Liao Zhenyu, Lu Meifang

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**ABSTRACT** By using Plackett-Burman and response surface methodology, we studied the medium optimization of poly- $\gamma$ -glutamic acid production from *Bacillus natto* TK-2. A Plackett-Burman design was first used to evaluate the influence of six related factors, and glucose, glutamine,  $\text{CaCl}_2$  were affirmed the important factors in the medium. Then, the path of steepest ascent and the Box-Behnken design were used for further optimization on these three factors. By solving the quadratic regression model equation, the optimal concentrations of the variables were determined as: glucose 2.14%, glutamine 2.51%,  $\text{CaCl}_2$  0.26%. Under the optimal culture condition, the yield of the  $\gamma$ -PGA increased by 34.01%. Key words Response Surface Methodology, *Bacillus natto* TK-2,  $\gamma$ -PGA, Optimization

**Key words** Response Surface Methodology, *Bacillus natto* TK-2,  $\gamma$ -PGA, optimization