

微生物降解棉酚的响应面分析优化

何 涛, 滕 达, 张海军, 武书庚, 齐广海, 王建华

(中国农业科学院饲料研究所, 北京, 100081)

摘 要 利用 SAS 软件的 Plackett-Burman 设计法对微生物固态发酵脱毒棉酚的发酵参数进行筛选, 得出 3 个影响较大的重要因素, 即料水比、发酵时间、装料量, 再用 SAS 软件二次响应面分析法进行回归分析, 得到了各因素的优化水平值, 经过响应面法的优化, 脱毒率提高近 20%。

关键词 棉酚, 响应面法, 产朊假丝酵母, 优化

我国是世界上主要产棉大国, 年产棉籽 800 余万吨, 棉籽中棉仁约占 50%~55%, 棉仁中含蛋白质 35%~38%, 提油后的棉籽饼粕中粗蛋白质含量可达 36%~44%。但是由于含有对畜禽有毒害作用的游离棉酚^[1], 动物摄入游离棉酚过量会导致中毒^[2], 所以目前我国棉籽饼粕饲料的利用率不足 30%^[3], 而其中所含丰富的蛋白质资源也未能得到充分利用。

棉籽饼粕中游离棉酚的脱毒方法很多。热处理法是采用高温高压条件使毒害作用强的游离棉酚大部分转化为无毒的结合棉酚; 常用化学脱毒法是添加硫酸盐(硫酸亚铁、硫酸铜), 盐中的金属离子与棉粕中游离棉酚形成络合物, 使棉酚中醛基和羟基失去活性, 达到脱毒目的; 萃取法是采用 2 种溶剂混合从棉籽中分别提取油和棉酚, 达到脱除棉酚的目的; 生物法是利用微生物降解将棉酚转化为其他无毒物质, 达到脱酚目的, 这方面的研究目前在国内最为活跃。不同脱毒方法的脱毒效果差异很大, 选择合适的脱酚方法可以达到更好的脱毒效果, 能够提高棉籽饼粕的饲料利用率。研究适宜的工业化生产方法脱除或钝化棉籽饼粕中的游离棉酚, 使之变成优质蛋白饲料^[4], 对促进饲料工业的发展具有重大的现实意义。

固态发酵工艺参数优化现多采用正交试验法进行, 但它只能处理离散的水平值, 应用于实际生产中不免会有诸多局限性。响应面分析法是数学与统计学相结合的产物, 由于采用了合理的实验设计, 运用多元二次方程来拟合因素和响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺, 与以往的正交设计与均匀设计相比, 具有精度高, 预测性好的优点^[5]。本试验应用该方法对棉酚的微生物发酵脱毒进行了研究, 优化了其脱毒发酵工艺。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 原 料

棉粕(棉酚含量为 1 820 mg/kg, 粗蛋白含量为 36.64%, 粉碎, 过 20 目), 麸皮。

1.1.2 菌 种

产朊假丝酵母(*Candida utilis*) CU101, 中国农业科学院饲料研究所基因工程室提供。

1.1.3 斜面活化培养基

马铃薯琼脂培养基。

1.2 方 法

1.2.1 斜面菌种活化

将斜面保藏菌种接入马铃薯琼脂斜面, 28℃ 恒温培养 48h。

1.2.2 种子液制备

将活化后的菌种接入马铃薯葡萄糖液体培养基, 28℃ 恒温摇床 48h 后作为固态发酵种子液。

1.2.3 固 态 发 酵

发酵基料为棉粕和麸皮, 装于 150 mL 三角瓶中, 其他发酵条件按实验设计而定。

1.2.4 棉酚含量测定

GB/T 5009.148—2003“饲料中游离棉酚的测定方法”。

1.2.5 饲料中氨基酸的测定

GB/T 18246—2000。

1.3 实验设计

首先采用 Plackett-Burman 实验设计法, Plackett-Burman 是一种部分析因法, 通过统计分析筛选出众多因素中对试验结果有显著影响的因素^[6], 然后在 Plackett-Burman 实验的基础上, 采用 Box-Behnken^[7]设计, 以挑选出的关键因素为自变量, 棉酚脱毒率为响应值, 根据 SAS 提供实验表进行实验后,

第一作者: 硕士(齐广海, 王建华研究员为通讯作者)。

收稿日期: 2007-10-19, 改回日期: 2008-01-31

再对数据进行二次回归拟合,得到包括一次项、平方项和交互项的二次方程,分析各因素的主效应和交互效应,最后得到各自变量的最佳值。

1.4 统计分析

采用 SAS8.0 对数据进行拟合和方差分析。

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 设计法筛选重要影响因素^[8]

表 1 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计及响应表

RUN	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	Y ₁ (脱毒率)/%
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.65
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0.80
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0.74
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0.71
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.74
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.69
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	0.79
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	0.66
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0.64
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.60
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.70
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.67

运用 SAS 软件对表 1 的实验设计进行回归分析,并进行方差分析检验,结果列于表 2 中。从表 2 可以看出,可信度>90%的几个因素为:料水比、发酵

实验中选用 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计,试验设计的每个因素取 2 个水平,高水平约取低水平的 1.5 倍,对 5 个因素,即麸皮量、装料量、接种量、发酵时间、料水比进行研究,另外 5 个为虚拟变量,用于估计误差,实验设计及结果见表 1,SAS 分析结果见表 2。

时间和装料量,其中料水比、发酵时间呈正效应,装料量呈负效应,而其他几个因素的可信度均<90%。

表 2 Plackett-Burman 试验因素水平及其主效应分析

变量符号	因素	水平		t 值	Pr > t	重要性排列
		低	高			
X ₁	麸皮量/%	25	37.5	-0.333 33	0.795 167	
X ₂	料水比	1:0.7	1:1.05	17.666 67	0.0359 97	*
X ₃	接种量/%	10	15	3	0.2048 33	
X ₄	发酵时间/g	48	72	9.666 667	0.065 624	*
X ₅	装料量/g	30	45	-8.333 33	0.076 031	*

2.2 响应面分析确定因素最佳浓度

通过 Plackett-Burman 确定了影响发酵的最主要 3 个因素,针对响应面的分析,所确定的重要因素的水平及实验设计见表 3 和表 4。

表 3 Box-Behnken 实验因素水平

变量名称	符号	水平		
		-1	0	1
料水比	X ₁	1:0.75	1:0.9	1:1.05
时间/h	X ₂	48	60	72
装料量/g	X ₃	30	45	60

以棉酚脱毒率为响应值,根据表 4 中 Box-Behnken 设计的实验结果,利用 SAS 软件对其进行二

次回归分析,回归方程(predictive model for Y)

$$Y_1 = 0.836\ 667 + 0.026\ 25 \times X_1 + 0.012\ 5 \times X_2 - 0.028\ 75 \times X_3 - 0.0483\ 33 \times X_1 \times X_1 + 0.007\ 5 \times X_1 \times X_2 + 0.005 \times X_1 \times X_3 - 0.0408\ 33 \times X_2 \times X_2 + 0.002\ 5 \times X_2 \times X_3 - 0.023\ 333 \times X_3 \times X_3$$

该方程表达了棉酚脱毒率与所选 3 个因素之间的变化关系。模型的可信度分析见表 6,复相关系数 $R^2 = 97.30\%$,说明模型与实际情况拟合较好。由方差分析表 5 中看出方程的一次项与二次项具有较高的显著性,说明响应值与试验因子之间不是简单的线性关系。交互项的 F 值较小,表明 3 因素之间的相互影响较小。失拟项 $P = 0.123\ 618 > 0.1$ 说明失拟

不显著,因此可以用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。

表 4 Box-Behnken 实验设计表及其实验结果

实验序号	X_1	X_2	X_3	Y_1 (脱毒率)/%
1	-1	-1	0	0.72
2	-1	1	0	0.73
3	1	-1	0	0.75
4	1	1	0	0.79
5	0	-1	-1	0.80
6	0	-1	1	0.72
7	0	1	-1	0.82
8	0	1	1	0.75
9	-1	0	-1	0.76
10	1	0	-1	0.81
11	-1	0	1	0.71
12	1	0	1	0.78
13	0	0	0	0.83
14	0	0	0	0.84
15	0	0	0	0.84

表 5 回归方程的方差分析

Source	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	Pr > F
X_1	1	0.005513	0.005513	34.81579	0.001989
X_2	1	0.00125	0.00125	7.894737	0.037559
X_3	1	0.006613	0.006613	41.76316	0.001321
$X_1 \times X_1$	1	0.008626	0.008626	54.47773	0.000718
$X_1 \times X_2$	1	0.000225	0.000225	1.421053	0.286718
$X_1 \times X_3$	1	0.0001	0.0001	0.631579	0.462814
$X_2 \times X_2$	1	0.006156	0.006156	38.88259	0.001553
$X_2 \times X_3$	1	0.000025	0.000025	0.157895	0.707498
$X_3 \times X_3$	1	0.00201	0.00201	12.69636	0.01616
模型	9	0.028542	0.003171	20.02924	0.002082
(一次项)	3	0.013375	0.004458	28.15789	0.001474
(二次项)	3	0.014817	0.004939	31.19298	0.001159
(交叉乘积项)	3	0.00035	0.000117	0.736842	0.573597
误差项	5	0.000792	0.000158		
(失拟项)	3	0.000725	0.000242	7.25	0.123618
(纯误差 r)	2	0.000067	0.000033		
所有项	14	0.029333			

表 6 模型的可信度分析

复相关系数 R^2 / %	97.30
校正后的 R^2 / %	92.44
模型误差的平方根(Root MSE)	0.012 583
Y 的变异系数 CV	1.620 136

2.3 响应面分析及最优培养基成分确定

通过回归方程来绘制分析图,考察所拟合的相应

曲面的形状。响应面立体图如图 1、图 2 和图 3 所示。规范分析结果如表 7 所示。

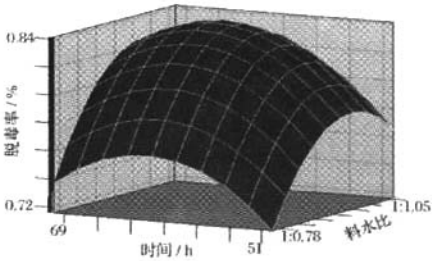


图 1 $Y=f(X_1, X_2)$ 响应面立体分析图

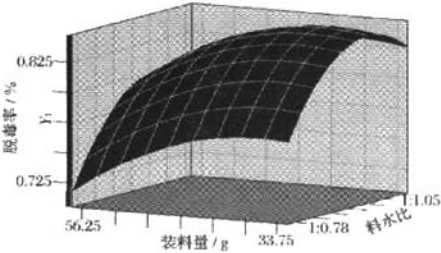


图 2 $Y=f(X_1, X_3)$ 响应面立体分析

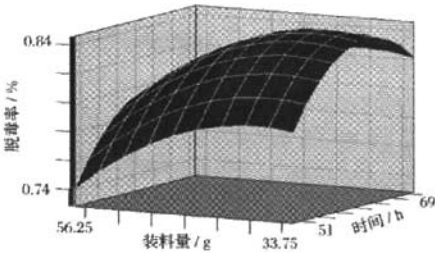


图 3 $Y=f(X_2, X_3)$ 响应面立体分析图

表 7 响应面规范分析

试验因子	X_1	X_2	X_3	估计值	稳定点类型
关键值	0.2928	0.1941	-0.9362	85.99%	
最大值		最优值	0.94	62.33	30.96

从图及软件分析,回归方程存在稳定点,稳定点是最大值,通过岭脊分析(ridge analysis)得到极大值所对应的各主要因素(X_1, X_2, X_3)的编码值分别为(0.2928, 0.1941, -0.9362)见表 7,此时 Y 的最大估计值为 85.99%,3 个主因素取值分别为料水比 1 : 0.94,发酵时间 62.33h,装料量 30.96g,在以上条件下进行验证试验,实验重复 3 次,平均值均在 85%左右。优化发酵后棉粕的氨基酸分析见表 8。

表 8 优化条件下发酵物氨基酸结果的测定 %

氨基酸	未发酵棉粕	发酵棉粕
天门冬氨酸(Asp)	2.52	2.56
苏氨酸(Thr)	0.91	1.02
丝氨酸(Ser)	1.32	1.34
谷氨酸(Glu)	5.60	5.71
甘氨酸(Gly)	1.11	1.10
丙氨酸(Ala)	0.98	1.05
缬氨酸(Val)	1.26	1.29
异亮氨酸(Ile)	0.81	0.90
亮氨酸(Leu)	1.60	1.71
酪氨酸(Tyr)	0.78	0.84
苯丙氨酸(Phe)	1.45	1.46
组氨酸(His)	1.06	1.05
赖氨酸(Lys)	1.14	1.21
精氨酸(Arg)	3.16	2.77
脯氨酸(Pro)	1.04	1.09
蛋氨酸(Met)	0.36	0.28
半胱氨酸(Cys)	0.29	0.35
色氨酸(Trp)	0.32	0.29

3 结 论

应用 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 中心组合实验设计方法,借助 SAS 统计软件^[9]优化了棉粕的微生物固态发酵工艺。实验结果表明,在选取的 5 个影响因素中,料水比、发酵时间和装料量 3 个因素的可信度>90%,其他几个因素的可信度都较低,进一步的响应面分析表明,料水比 1:0.94,发酵时间 62.33h,装料量 30.96g/150 mL 时,棉酚的脱毒率为一最大值 85.99%,比之前脱毒率提高将近 20%。本研究在开发利用棉籽粕作为饲料蛋白源方面,具有良

好的应用前景,但有关适应工业化大批量生产的微生物脱毒技术,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Rahma E H, Narasingo Rao M S. Gossypol removal and Functional Properties of Protein Produced by Extraction of Glanded Cottonseed with Different Solvents[J]. Journal of Food Science, 1984, 49 (23):1 057~1 060
- 2 Robinson P H, Getachew G, De Peters E J. Influence of Variety and Storage for up to 22 Days on Nutrient Composition and Gossypol level of Pima Cottonseed (*Gossypium* spp.)[J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 91 (12):149~156
- 3 王红云,高占峰,付才.棉籽饼粕脱毒方法研究进展[J].河北农业科学,2004,8(1):67~68
- 4 李爱科.我国主要饼粕类饲料资源开发及利用技术进展.动物营养研究进展[J].北京:中国农业科学出版社,2004.56~59
- 5 Tompson D R. Response Surface Experimentation[M]. Food Proc Pres, 1982.155
- 6 Plackett R L,Burman J P. The design of optimum multi-factorial experiments[J]. Biometrika,1946,33:305~325
- 7 Box G E P, Behnken D W. Some new three level designs for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, (2) :455~476
- 8 曹小红,蔡萍,李凡,等.利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基[J].中国生物工程杂志,2007,27(4):59~65
- 9 倪勤. SAS 最优化软件速成[M].北京:科学出版社,1998.158~167

Bio-detoxification Optimization for Gossypol in Cottonseed Meal by Method of Response Surface Analysis

He Tao, Teng Da, Zhang Haujun, Wu Shugeng, Qi Guanghai, Wang Jianhua,

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT Plackett-burman and response surface analysis method were applied to optimize fermentation of biodegradation of gossypol in cottonseed meal. The results indicated the detoxification rate was mainly influenced by water and material ratio, material addition, and fermentation time by Plackett-burman. In the second step, the levels of those three main factors were further optimized by using Box-Behnken design. The optimal levels of the variables were: water and material ratio 1:0.94, material addition 30.96g, fermentation time 62.33h. Under the optimal conditions, the detoxification rate increased by 15%. Moreover, the experiment values from optimized three batches fermentation was quite close to the expected values.

Key words gossypol, response surface analysis, *candida utilis*, optimization