

## Box-behnken 设计优化富硒酵母培养条件参数的研究

印宏绯, 沈 昌, 顾振新, 韩永斌

(南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放试验室, 江苏 南京, 210095)

**摘 要** 以糙米汁、麦芽汁和豆芽汁为天然培养基, 研究了培养条件对菌体及总硒产量的影响, 采用 Box-behnken 设计对富硒酵母培养条件进行了优化。经过回归分析建立了总硒产量对培养条件的二次回归模型, 其回归方程的决定系数达到 0.997。得到的优化培养条件为培养温度为 27.43 ℃、pH 值为 5.78、装液量为 89.73 mL, 总硒产量最大预测值达到 4.48 mg/L, 是优化前的 1.27 倍。

**关键词** Box-behnken 设计, 酵母, 硒, 培养条件

硒是生物体内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性中心元素, 该酶具有清除对机体有害的自由基和防止细胞膜氧化受损的重要作用<sup>[1]</sup>, 缺硒可能导致癌症<sup>[2]</sup>、免疫机能低下<sup>[3,4]</sup>等多种疾病的发生。由于无机硒安全性差, 直接补充无机硒的方式逐渐被淘汰。酵母菌体营养丰富, 还具有很强的富硒能力。研究表明, 酵母通过生物合成法将无机硒转化为有机硒是一种安全有效的途径<sup>[5]</sup>。国外于 1970 年代末已研究硒酵母富硒, 但硒含量不高, 国内报道的富硒酵母一般是直接将酿酒酵母或稍做筛选再在添加有亚硒酸钠的发酵培养基中获得。但是对富硒酵母培养条件以及对菌体、硒产量及其两者相关性缺乏系统研究, 且对培养条件的优化多限于正交设计, 因而不能反映诸因素对产量的综合效应。Box-behnken 响应面法(response surface methodology, RSM)是近年来条件优化常用的试验设计方法, 适用于多因素 3 水平试验设计, 使用方便, 优选条件预测性好。本文以糙米汁、麦芽汁和豆芽汁为天然培养基, 研究了培养条件对酵母菌体、硒产量的影响, 并采用 Box-behnken 设计对富硒酵母培养条件进行了优化, 以期为深入研究和规模化生产富硒酵母提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌种及材料

发酵菌种: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室保藏。

粳米: 购自南京溧水; 麦芽: 由宝应麦芽厂提供;

黄豆芽: 购自南京卫岗农贸市场。

### 1.2 培养基组成

斜面及种子培养基: PDB 培养基(马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, pH 自然)。

发酵培养基: 将 12 Brix 糙米汁、12 Brix 麦芽汁、2 Brix 豆芽汁按 4:4:2 的比例进行配制。

### 1.3 培养方法

斜面试管菌种转接于三角瓶中, 160 r/min 条件下摇瓶培养 24 h 后, 再按 10% 的接种量接种于发酵培养基, 160 r/min 条件下培养 48 h。

### 1.4 试验设计

#### 1.4.1 单因素实验

抗性筛选的基础上, 以 15 μg/mL Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 作为无机硒源, 对培养温度、培养基 pH 和装液量分别进行水平优化。培养温度的优化浓度范围为 20~36℃; 培养基 pH 值的优化浓度范围为 2.5~7.5; 装液量的优化浓度范围为 40~100 mL。

#### 1.4.2 响应面实验

根据单因素试验结果, 以总硒产量为响应指标, 以培养温度、培养基 pH 和装液量为考察因素, 通过 Design expert 6.0 软件对实验数据进行回归分析, 预测酵母菌富硒的优化培养条件。

### 1.5 测定指标与方法

#### 1.5.1 酵母菌生物量

酵母发酵液于 4 000 r/min 离心 15 min, 用蒸馏水冲洗菌体以 4 000 r/min 再次离心 15 min, 将菌体冻干至恒重, 每处理重复 3 次。

#### 1.5.2 硒产量

3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐法<sup>[6]</sup>。

#### 1.5.2.1 硒含量标准曲线绘制

取 1 μg/mL 的硒标准溶液 0 mL, 2 mL, 6 mL, 10

第一作者: 硕士研究生(顾振新教授为通讯作者)。  
收稿日期: 2007-12-19, 改回日期: 2008-04-18

mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL 移入分液漏斗, 加水至 35 mL, 加入 1 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 摇匀, 调 pH 至 2~3, 加 4 mL 0.5% 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐溶液, 置暗处反应 30 min, 调节 pH 至中性, 加 10 mL 甲苯萃取, 弃水层, 在 420 nm 长处测定吸光度, 绘制标准曲线。

#### 1.5.2.2 总硒量

称取样品 0.2 g, 置于 150 mL 圆底烧瓶中, 加 5 mL 混合消化液[(V 浓硫酸): (V 高氯酸): (V 浓硝酸) = 10: 4: 5], 170℃ 加热消化 30 min 至溶液无色透明。冷却后加入 2 mL 5% EDTA-2Na 溶液, 定容至 50 mL, 静置过夜。测定方法同标准曲线测定。

#### 1.5.2.3 无机硒含量

称取样品 0.1 g, 加 20 mL 蒸馏水沸水浴 1 h, 定容至 50 mL, 过滤。测定方法同标准曲线测定。

有机硒含量 = 总硒含量 - 无机硒含量

表 1 培养温度对酵母菌体产量及总硒产量的影响(pH 5, 50 mL)

指标	培养温度/℃					
	20	24	26	28	30	34
菌体产量/g · L <sup>-1</sup>	9.06 ± 0.23 <sup>b</sup>	9.39 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.24 ± 0.03 <sup>ab</sup>	9.24 ± 0.17 <sup>ab</sup>	9.17 ± 0.01 <sup>ab</sup>	7.80 ± 0.08 <sup>c</sup>
总硒产量/mg · L <sup>-1</sup>	3.34 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.60 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.80 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.86 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.59 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.06 ± 0.03 <sup>d</sup>
有机硒比率/%	87.19 ± 0.16 <sup>e</sup>	88.33 ± 0.13 <sup>d</sup>	90.21 ± 0.14 <sup>c</sup>	91.34 ± 0.02 <sup>a</sup>	91.00 ± 0.20 <sup>b</sup>	90.23 ± 0.06 <sup>c</sup>

注: 不同字母表示差异显著(P < 0.05)。

#### 2.1.2 初始 pH 值对酵母菌体产量及总硒产量的影响

由表 2 可知, 在培养基初始 pH2.5~7.5, 酵母菌体产量以 pH3.5、pH4.5 和 pH5.5 时为最高, 表明酵母菌适宜生长的 pH 范围较宽, 而酵母菌的富硒量以 pH5.5 时为最大, 有机硒的比率在 pH4.5~6.5

范围内最高。可见, 酵母富集硒的最适 pH 值为 5.5, 这与范秀英等<sup>[8]</sup>的研究结果相近。H<sup>+</sup> 浓度变化会使组成原生质半渗透膜的胶体所带的电荷发生变化, 引起原生质膜对培养基中 Se<sup>4+</sup> 的渗透性的改变, 从而影响酵母菌对硒的吸收<sup>[9]</sup>。

表 2 初始 pH 值对酵母菌体产量及总硒产量的影响(28℃, 50 mL)

指标	pH 值					
	2.5	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5
菌体产量/g · L <sup>-1</sup>	8.80 ± 0.17 <sup>bc</sup>	9.31 ± 0.27 <sup>a</sup>	9.36 ± 0.20 <sup>a</sup>	9.06 ± 0.14 <sup>ab</sup>	8.47 ± 0.18 <sup>c</sup>	7.93 ± 0.16 <sup>d</sup>
总硒产量/mg · L <sup>-1</sup>	2.88 ± 0.02 <sup>e</sup>	2.77 ± 0.02 <sup>f</sup>	3.35 ± 0.04 <sup>c</sup>	3.75 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.96 ± 0.03 <sup>d</sup>
有机硒比率/%	82.17 ± 0.02 <sup>d</sup>	85.33 ± 0.21 <sup>c</sup>	90.12 ± 0.17 <sup>a</sup>	90.27 ± 0.23 <sup>a</sup>	90.22 ± 0.26 <sup>a</sup>	88.13 ± 0.07 <sup>b</sup>

#### 2.1.3 装液量对酵母菌体产量及总硒产量的影响

在装液量为 40 mL~120 mL 的范围内, 酵母菌体产量随装液量的增加总体呈下降趋势(表 3)。较多的装液量使培养基中溶氧不足, 抑制了酵母菌体的

增殖及酵母对硒的富集<sup>[8]</sup>。在装液量为 60 mL 和 80 mL 时, 硒的产量最高, 而有机硒的比率在装液量 80 mL 时最大。由此可见, 适合酵母富硒的培养基装液量为 80 mL。

表 3 装液量对酵母菌体产量及总硒产量的影响(pH 5, 28℃)

指标	装液量/mL				
	40	60	80	100	120
菌体产量/g · L <sup>-1</sup>	9.38 ± 0.04 <sup>a</sup>	9.25 ± 0.09 <sup>ab</sup>	9.19 ± 0.11 <sup>ab</sup>	9.25 ± 0.09 <sup>ab</sup>	9.05 ± 0.04 <sup>b</sup>
总硒产量/mg · L <sup>-1</sup>	3.53 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.87 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.74 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.53 ± 0.12 <sup>b</sup>	3.35 ± 0.04 <sup>c</sup>
有机硒比率/%	90.17 ± 0.13 <sup>d</sup>	91.02 ± 0.21 <sup>b</sup>	91.62 ± 0.22 <sup>a</sup>	90.82 ± 0.05 <sup>b</sup>	90.45 ± 0.08 <sup>c</sup>

$$\text{有机硒比率}/\% = \frac{\text{有机硒含量}}{\text{总硒含量}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 培养温度对酵母菌体产量及总硒产量的影响

由表 1 可知, 酵母菌的总硒产量、菌体产量及有机硒比率均随着培养温度的增加呈先增加后降低的趋势, 这与吴宝强<sup>[7]</sup>的研究结果一致。酵母菌体产量在培养温度 24~30℃ 最高, 总硒产量在培养温度为 26℃ 及 28℃ 时最高, 表明温度的变化对硒的富集影响较大, 在培养温度为 28℃ 时, 有机硒的比率最高。酵母菌体量与总硒产量呈正相关, 相关系数为 83.5%, 表明酵母菌硒富集量主要取决于酵母菌生物量的增加。综合以上分析可知, 酵母富硒的最适温度为 28℃。

2.2 富硒酵母总硒产量响应面优化

对富硒酵母培养温度(A)、培养基 pH 值(B)和装液量(C)进行了三因素三水平响应面分析试验,试验设计与结果见表 4。

表 4 Box-behnken 设计及总硒产量的实测值和预测值

序 号	温度 /℃	pH 值	装液量 / mL	总硒产量/mg·L <sup>-1</sup>	
				实际值	预测值
1	- 1(24)	- 1(4)	0(70)	2.77	2.75
2	1(32)	- 1	0	3.12	3.16
3	- 1	1(7)	0	3.81	3.77
4	1	1	0	3.17	3.19
5	- 1	0(5.5)	- 1(40)	3.75	3.80
6	1	0	-1	3.85	3.83
7	- 1	0	1(100)	4.08	4.10
8	1	0	1	3.94	3.90
9	0(28)	- 1	- 1	3.23	3.21
10	0	1	- 1	3.78	3.78
11	0	-1	1	3.44	3.44
12	0	1	1	3.89	3.92
13	0	0	0	4.46	4.42
14	0	0	0	4.38	4.42
15	0	0	0	4.42	4.42
16	0	0	0	4.42	4.42
17	0	0	0	4.42	4.42

以总硒产量为响应指标,利用 Design Expert 软件对表 4 进行二次多元回归拟合,得到总硒产量对编码自变量 A、B 和 C 的二次多项回归方程:

$$Y = -36.33 + 1.80A + 5.10B + 0.03C - 0.03A^2 - 0.34B^2 - 8.23 \times 10^{-5}C^2 - 0.04AB - 4.82 \times 10^{-4}AC - 5.12 \times 10^{-4}BC$$

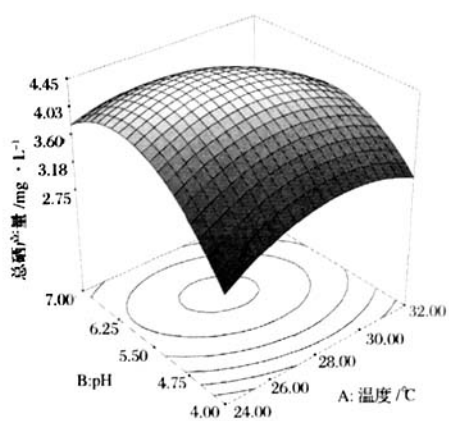


图 1 温度和 pH 交互作用对总硒产量影响

当 pH 值为 5.5 时,培养温度和装液量之间的交互作用显著,当装液量较小时,适当增加培养温度有

回归诊断表明,决定系数( $R^2$ )为 0.9970,信噪比(Adequate. Precision)为 49.73。这表明方程的拟合度和可信度均很高,可用于预测总硒产量。

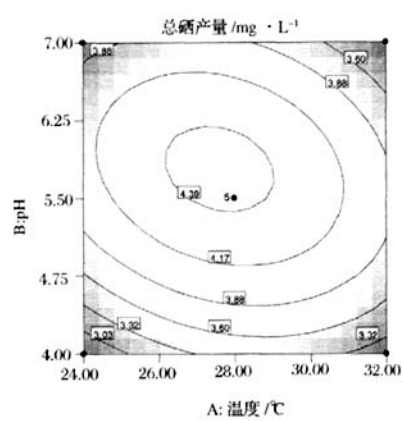
回归模型方差分析(表 5)表明,对总硒产量所建立的回归模型极显著( $P < 0.01$ ),培养温度及培养基初始 pH 值、培养温度和装液量之间交互作用分别显著,而培养基 pH 值和装液量之间的交互作用不显著。

表 5 回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模 型	4.41	9	0.49	254.99	<0.0001
A	0.15	1	0.15	7.66	0.0278
B	0.55	1	0.55	285.83	<0.0001
C	0.07	1	0.07	36.13	0.0005
A <sup>2</sup>	0.83	1	0.83	430.11	<0.0001
B <sup>2</sup>	2.45	1	2.45	1272.81	<0.0001
C <sup>2</sup>	0.02	1	0.02	12.00	0.0105
AB	0.25	1	0.25	127.71	<0.0001
AC	0.01	1	0.01	6.95	0.0336
BC	2.13E-003	1	2.13E-003	1.10	0.3281
残 差	0.01	7	1.92E-003		
总变异 1	4.43	16			

$R = 0.9984, R^2 = 0.9970, \text{Adjusted. } R^2 = 0.9930, \text{Adequate. Precision} = 49.73$

等高线的形状反映出交互效应的强弱大小,椭圆形表示 2 因素交互作用显著<sup>[10]</sup>。从图 1 的等高线可以直观地看出,在装液量为 70 mL 时,培养温度及培养基 pH 值对总硒产量的交互作用极显著。随着培养温度及培养基 pH 值的提高,总硒产量均呈现出先增大后减小的趋势。



利于增加总硒产量。随着装液量的增加,总硒产量也显著增加(图 2)。

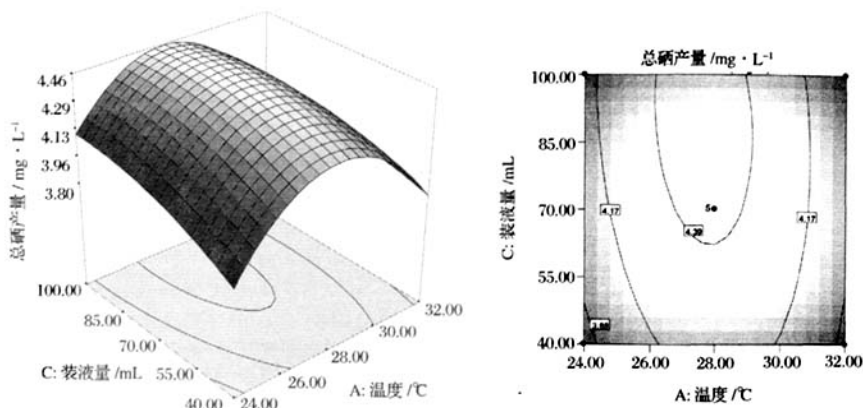


图2 温度和装液量交互作用对总硒产量影响

由图3分析可得,在28℃的培养条件下,pH值和装液量之间的交互作用不显著,当pH值达到5.5左右时,总硒产量达到最大,而当pH值达最佳水平后,装液量的增加仍有利于增加总硒产量。

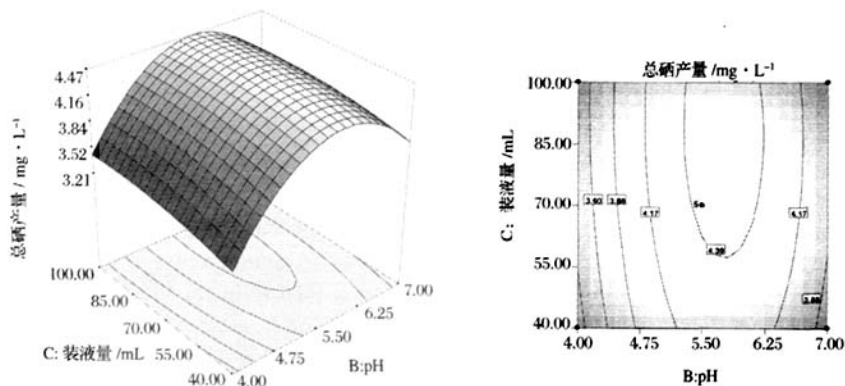


图3 pH值和装液量交互作用对总硒产量影响

### 2.3 验证性试验

验证性试验结果(表6)表明,酵母在培养温度为27.43℃、初始pH值为5.78和装液量为89.73 mL时,菌体中总硒产量达到4.35 mg/L,是优化前的1.23倍,其中有机硒含量在90%以上,说明利用酿酒酵母生产富硒酵母具有较大的潜力。

表6 验证性试验设计及结果

处 理	温度/℃	pH 值	装液量/mL	总硒产量/mg · L <sup>-1</sup>	有机硒比率/%
优化前培养条件	28	5.0	60	3.53	91.13
单因素优化条件	28	5.5	60	3.87	91.02
响应面优化条件	27	5.8	90	4.35	91.11

## 3 结 论

通过单因素试验和响应面试验设计考察了培养温度、培养基初始pH值和装液量等培养条件对菌体产量、总硒产量及有机硒比率的影响。结果表明,以15 μg/mL Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>作为无机硒源,在培养温度为27.43℃、pH值为5.78、装液量为89.73 mL的培养条件下,总硒产量达到4.35 mg/L,比优化前产量提

高了23.23%,有机硒比率达到90%以上。

### 参 考 文 献

- 1 Tanguy S, Boucher F, Besse S. Trace elements and cardioprotection, increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion induced arrhythmias[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 1998, 12:28~38
- 2 Combs G F. Selenium as a cancer-protective agent[M]. Belgium: The Bulletin of Selenium-Tellurium Develop-

- ment Association, 1997, 1~4
- 3 Bologna R, Indacochea F, Shor-Posner G. Selenium and immunity in HIV-1 infected pediatric patients [J]. Journal of Nutritional immunology, 1994, (3): 41~49
  - 4 Kiemdjian S L, Roy M, Wishe H I. Supplement with selenium and human cell funtion. II: Effect on cytotoxic, lymphocytes and natural killer cells [J]. Biological Trace Element Research, 1994, 41(1): 115
  - 5 Suhajda A, Hegoczki J, Janzso B, Pais I, et al. Preparation of selenium yeast I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2000, (14): 43~47
  - 6 陈家华. 现代食品分析新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
  - 7 吴宝强. 高生物量富硒酵母的选育与培养条件的初步研究[J]. 广西大学硕士论文, 2005
  - 8 范秀英, 郭雪娜, 傅秀辉. 高生物量富硒酵母的选育及培养条件初步优化[J]. 生物工程学报, 2003, 19(6): 720~724
  - 9 Teresa P C, Yolanda M, Carmen G. Evaluation of selective uptake of selenium (Se (IV) and Se (VI)) an antimony (Sb (III) and Sb (V)) species by baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) [J]. Analytica Chimica Acta, 1997, (345): 249~255
  - 10 Farooq A M, Imran T, Khaled A S. Response surface methodology: A neural network approach [J]. European Journal of Operational Research, 1997, (101): 65~73

## Optimization of Mixotrophic Culture Parameters of Selenium-enriched Yeast with Box-behnken Design

Yin Hongfei, Shen Chang, Gu Zhenxin, Han Yongbin

(The Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**ABSTRACT** In this article, germinated brown rice juice, beerwort and soybean sprout juice were utilized as the natural media and the culture conditions of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), which affects the accumulation of biomass yield and total Se yield were optimized with Box-behnken design. The regression equation expressing the relationship between total Se yield and culture conditions was established by manual analysis. The R-squared in the model of regression equation was 0.997, meaning the established equation could predict the total Se yield well at the range of factors in this design. It was indicated that the optimum culture conditions were found to be temperature 27.4℃, initial pH value 5.8, volume 89.73 mL. Under those conditions, it was predicted that the highest production of total Se was 4.48 mg/L, which was 1.27 times higher than initial yield before optimization.

**Key words** Box-behnken design, yeast, Se, culture conditions

信息窗

### 法国葡萄酒行业引入新世界酿酒科技

为了与新世界葡萄酒国家展开竞争,法国葡萄酒行业将进行一次大革命,废除旧法规,采用新世界酿造技术。

法国政府公布了一份长达 16 页的葡萄酒行业五年计划,计划指出,法国葡萄酒行业将从三个方面进行改革。

第一,酿酒技术及酒标改革。法国葡萄酒标将以“Vignobles de France”(法国葡萄酒)字样代替“VIN DE TABLE”(日常餐酒)。酒标上还会注明酿酒葡萄品种及年份,同时采用成本较低的新世界酿酒技术,如使用橡木片陈酿、添加单宁、以山梨酸作为防腐剂、加入浓缩的葡萄浆来增加葡萄酒的甜味等。第二,地区葡萄酒(VIN DE PAYS)将改为 IGP(受保护的地域标识)。第三,以(AOP 原产地命名保护品牌)取代现有 AOC(原产地控制命名)体系。

法国国家葡萄酒行业组织 Viniflor,主席 Georges Malpel 说:“将适当保留一些传统,同时要从小作坊向大生产转变。”

过去,法国一直引导世界葡萄酒潮流,如今出口量大跌,低于意大利、西班牙。虽然目前法国酒出口额占国际市场的 35%,但这全靠高档香槟、波尔多、勃艮地葡萄酒拉动。随着中国、印度等葡萄酒国家兴起,法国将面临更大的竞争压力。因此说法国葡萄酒行业改革势在必行。