

响应面法优化隐甲藻 LS1057 产二十二碳六烯酸发酵条件

孙中贯¹, 刘咏², 姚建铭³

(1. 枣庄学院生命科学学院, 山东枣庄 277160;

2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009;

3. 中国科学院合肥物质科学研究院等离子体物理研究所, 安徽合肥 230031)

摘要:为了提高一株隐甲藻藻株 LS1057 的二十二碳六烯酸产量, 对发酵培养基进行了优化。采用 Plackett-Burman 实验设计法考察发酵培养基中各组分对二十二碳六烯酸产量的影响, 结果表明: 葡萄糖、酵母膏、 KH_2PO_4 的浓度对二十二碳六烯酸的产量影响显著。再用最陡爬坡路径逼近最大响应区域, 并结合 Box-Behnken 实验设计和响应面分析法对 3 个显著因素进行回归分析, 得到优化的发酵培养基组成: 葡萄糖 79.76g/L、酵母膏 14.0g/L、 KH_2PO_4 0.5g/L、海盐 20.0g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0g/L、 KNO_3 8.0g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L 和 M 液 (M 液: V_{B_1} 0.6g/L, V_{B_2} 0.1mg/L) 1% (V/V)。采用该法优化培养基, 经摇瓶发酵实验供试藻株的二十二碳六烯酸产量达到了 1.811g/L, 较优化前提高了 71.33%。利用 70L 发酵罐的分批补料发酵实验对优化后的结果做了进一步的验证, 发酵结束后二十二碳六烯酸终产量为 2.112g/L。实验结果表明响应面法优化得到的发酵培养基利于隐甲藻 LS1057 发酵生产二十二碳六烯酸。

关键词: 隐甲藻, 发酵, 优化, 响应面法, 二十二碳六烯酸

Fermentation optimization by response surface methodology for enhanced yield of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* LS1057

SUN Zhong-guan¹, LIU Yong², YAO Jian-ming³

(1. College of Life Science, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China;

2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

3. Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: In order to improve the yield of DHA of *Cryptocodinium cohnii* LS1057, the fermentation medium was optimized. Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of medium components on the yield of DHA by *C. cohnii* LS1057. The results showed that glucose, yeast extract and KH_2PO_4 were the most important factors that influenced the yield of DHA. Based on the experimental results, the path of steepest ascent was undertaken to approach the optimal region of these factors, central composite design and response surface analysis were subsequently employed for further optimization. The optimal medium for *C. cohnii* LS1057 was obtained, which was composed of 79.76g/L glucose, 14.0g/L yeast extract, 0.5g/L KH_2PO_4 , 20.0g/L sea salt, 5.0g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.0g/L KNO_3 , 0.2g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and solution M (0.6g/L V_{B_1} , 0.1mg/L V_{B_2}) 1% (V/V). Under the optimum conditions, the maximum yield of DHA reached 1.833g/L in theory and 1.811g/L in the experiment, with an increase of 71.33% compared to the original medium components. The DHA yield of 70 L fermentor reached 2.112g/L under such optimum conditions. The experimental results showed that the conditions optimization by the response surface method were better for enhanced yield of DHA by *C. cohnii* LS1057.

Key words: *Cryptocodinium cohnii*; fermentation; optimization; response surface methodology; docosahexaenoic acid

中图分类号: TS202.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)05-0258-06

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, 简称 DHA), 有脑黄金之称, 是一种对人体非常重要的多不饱和脂肪酸, 属于 Omega-3 不饱和脂肪酸家族中

的重要成员。而动物和人体不能自身合成二十二碳六烯酸, 必须从外界摄入^[1]。二十二碳六烯酸具有健脑、提高记忆力和视力的作用, 尤其可以促进胎儿脑细胞发育和婴幼儿脑细胞生长, 防治老年性痴呆及动脉粥样硬化、脑血栓等心脑血管疾病, 受到食品界和医疗界的广泛关注^[2]。二十二碳六烯酸传统的

收稿日期: 2013-08-22

作者简介: 孙中贯 (1984-), 男, 硕士, 助教, 研究方向: 食品发酵技术。

来源是从鱼油中获取,但由于受到原料、生产周期等诸多限制因素的影响,很难满足生产消费的需求。利用隐甲藻发酵生产二十二碳六烯酸具有发酵周期短、培养方式简单、产品质量稳定等优点,且隐甲藻发酵产生的油脂中几乎不含影响婴幼儿生长发育的二十碳五烯酸(EPA),已被批准添加到婴幼儿的食品和营养品中^[3-4]。但因藻种二十二碳六烯酸产量较低,满足不了工业化生产的要求,使其应用受到限制。二十二碳六烯酸的生物合成是一个复杂的过程,为了提高其产量可以从多方面入手,寻找适合藻株生长代谢的营养源以及发酵方式是一条可行的途径。

已报道的有关隐甲藻发酵生产二十二碳六烯酸培养基的研究,都是对单一营养源^[5-9]或多种营养源进行考察和评价^[10],尚未有应用响应面法对培养基中各营养组分进行综合考察和研究的报道。笔者在前期工作中诱变得一株遗传性状稳定的隐甲藻藻株 LS1057,本实验在前人研究的基础上结合预实验,从优化营养源入手,利用 SAS9.2 统计软件综合考察和评价了隐甲藻 LS1057 发酵生产二十二碳六烯酸发酵培养基中的各组分,对主要影响因素进行优化;并对优化结果进行了中试发酵实验验证。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*) LS1057,由本实验室采用亚硝基胍诱变得^[11];菌种活化培养基 葡萄糖 5.0g/L,酵母膏 1.0g/L,海盐 20.0g/L,蒸馏水配制;种子培养基 葡萄糖 10.0g/L,酵母膏 3.0g/L,海盐 16.0g/L,蒸馏水配制;发酵培养基 葡萄糖 30.0g/L,酵母膏 6.0g/L,海盐 16.0g/L, MgSO₄·7H₂O 5.0g/L, KH₂PO₄ 0.1g/L, KNO₃ 5.0g/L, FeSO₄·7H₂O 0.2g/L, M 液 1% (V/V), 采用蒸馏水定容,调整 pH 为 7.0; M 液 V_{B1} 0.6g/L, V_{B12} 0.1mg/L; 扩大培养基 葡萄糖 8.0g/L, 酵母膏 2.5g/L, 海盐 20.0g/L, 蒸馏水配制; 种子罐培养基 葡萄糖 10.0g/L, 酵母膏 3.0g/L, 海盐 20.0g/L, MgSO₄·7H₂O 5.0g/L, KNO₃ 8.0g/L, FeSO₄·7H₂O 0.2g/L 和 M 液 1% (V/V), 采用自来水定容, 调整 pH 为 6.5; M 液 V_{B1} 0.6g/L, V_{B12} 0.1mg/L。发酵罐培养基 采用优化后的培养基, 葡萄糖浓度改为优化后浓度的一半, 其余培养基成分不变。二十二碳六烯酸标准品 美国 SIGMA 公司, 纯度 ≥99%; 泡敌(甘油聚氧丙烯醚) 非离子型, 江苏省海安石油化工厂; 维生素 B₁、维生素 B₁₂ 生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 海盐 德国 AB 速溶生态盐; 其他试剂 均为分析纯。DL-5-B 型低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂; DZF-6030B 真空干燥箱 东莞市豪邦工业设备有限公司; XFH-75CA 型电热式压力蒸汽灭菌器 深圳市鼎鑫宜实验设备有限公司; GC-14C 气相色谱仪(配有氢火焰离子化检测器(FID)和 N2000 色谱工作站) 日本岛津公司; GUJS-70L 型机械搅拌不锈钢发酵罐 镇江东方生物工程设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养方法 菌种活化: 种子液为低温黑

暗条件下甘油管保存的种液, 250mL 三角瓶, 装液量 20% (V/V), 接种量 2% (V/V), 25℃、100r/min 振荡培养 72h。液体种子培养: 种子液为菌种活化培养液, 250mL 三角瓶, 装液量 20% (V/V), 接种量 2% (V/V), 25℃、100r/min 振荡培养 72h; 摇瓶发酵培养: 种子液为摇瓶液体种子培养液, 500mL 三角瓶, 装液量 10% (V/V)、接种量 10% (V/V), 26℃、150r/m 条件下振荡培养 216h。摇瓶扩大培养: 种子液为菌种活化培养液, 1000mL 三角瓶, 装液量 30% (V/V), 接种量 10% (V/V), 28℃、150r/min 振荡培养 72h。

1.2.2 生物量的测定 50mL 样液装入预先称重的离心管中, 4000r/min 离心 5min, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 50℃ 真空干燥, 在干燥器内冷却后称重, 直至恒重。

$$\text{细胞干重}(m_d/g/L) = \frac{W \times 1000}{V}$$

式中: W-细胞干燥后的重量(g); V-所量取的发酵液体积(mL)。

1.2.3 油脂含量的测定 采用 Soxhlet 法^[12]提取菌体中的总油脂。称取一定量的干菌体加入适量的石英砂于研钵中进行研磨, 研磨至菌体成粉末状用滤纸包好后, 50℃ 真空干燥至恒重, 称重后进行提取。提取试剂: 正己烷, 虹吸速率: 8~12 次/h。水浴温度: 85℃, 提取时间 12h。分别称量提取前后纸包的重量。

$$\text{油脂质量分数}(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100$$

式中: W₁-提取前纸包重(g); W₂-提取后纸包重(g); W₀-干菌体重(g)。

1.2.4 二十二碳六烯酸含量的测定

1.2.4.1 油脂的甲酯化 取 50mg 油脂, 置于 100mL 的磨口烧瓶中, 加入 0.5mol/L 氢氧化钾的甲醇溶液 2mL, 于 60℃ 水浴 30min 进行皂化, 冷却后加入 2mL 三氟化硼-乙醚(体积比为 1:1) 溶液, 60℃ 水浴 10min, 冷却后加入 5mL 正己烷振荡, 然后加入 5mL 饱和食盐水, 静置分层后取上层正己烷相, 抽取上层可直接进样。

1.2.4.2 脂肪酸检测 气相色谱法, 色谱条件为: FID 检测器, 毛细管色谱柱 DB-23 (30m × 0.32mm), 载气是纯度为 99.99% 的氮气, 分流比 1:70。进样口温度 200℃, 检测器温度 250℃, 进样量 1μL。采用程序升温, 140℃ 保持 3min, 10℃/min 升温, 升温至 250℃, 保持 15min, 每个样 29min, 为保持数据的准确性, 每个样品进样两次, 取平均值。在同一色谱条件下, 用已知的二十二碳六烯酸标准品色谱峰的保留时间与样品脂肪酸甲酯组分色谱峰的保留时间对照进行分析。

1.2.5 发酵液中还原糖的检测 采用 DNS 法^[13]对发酵液中的还原糖含量进行测定。

1.3 响应面法(Response Surface Analysis, RSA) 的实验设计

1.3.1 Plackett-Burman 设计实验 从发酵培养基各种成分中筛选出对二十二碳六烯酸产量影响比较显著的因素。利用 SAS 统计软件对实验结果进行各个

因素的显著性分析;采用多元线性回归模型中的逐步回归法^[14]拟合显著因素与产量之间的线性方程。拟合的方程为: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$,式中 Y 为二十二碳六烯酸的产量(g/L), $X_1, X_2 \dots X_n$ 为显著因素, β_0 为截距, $\beta_1, \beta_2 \dots \beta_n$ 为线性系数, n 为显著因素的个数^[15]。对发酵培养基的 8 种成分进行考察,每个因素选高(+1)和低(-1)2个水平,根据预实验的结果和 Plackett-Burman 实验设计的要求,Plackett-Burman 实验的因素和水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素水平范围

Table 1 Factors and levels in the Plackett-Burman design

实验因素	水平(g/L)	
	-1	+1
X_1 葡萄糖	30	40
X_2 酵母膏	6	8
X_3 海盐	16	20
X_4 七水硫酸镁	5	8
X_5 磷酸二氢钾	0.1	0.2
X_6 硝酸钾	5	8
X_7 七水硫酸亚铁	0.2	0.3
X_8 M 液(% ,V/V)	1	1.4

1.3.2 最陡爬坡实验设计 对 Plackett-Burman 实验的因素作显著性分析,找出显著因素。根据拟合函数回归系数的符号和大小来设计显著因素的最陡上升路径,其他因素的取值则根据各因素效应的正负和大小,正效应的因素均取较高值,负效应的因素均取较低值^[16]。实验组数由经验来定,步长由显著因素的效应值确定。通过使主要因素同时朝响应值增大的方向变化,找出峰值,从而逼近最大响应区域。

1.3.3 Box-Behnken 法设计实验 三因素三水平的中心组合实验共需 15 次实验。拟合出的一个二次多项式方程是描述响应变量与自变量的经验模型,对于三因素系统,模型可表述为: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{33} X_3^2$,式中 X_1, X_2, X_3 为对响应值影响显著的 3 种培养基组分的质量浓度, Y 为预测响应值,即二十二碳六烯酸的产量(g/L), β_0 为常数项, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 为线性系数, $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ 为平方系数, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ 为交互作用系数^[17]。综合最陡爬坡实验的结果,根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,响应面实验因素水平见表 2。用 SAS(Version 9.2)对实验数据进行回归性分析,用 t 检验验证回归系数的显著性,用 F 检验评价模型方程的显著性,方程的拟合性由确定系数 R^2 确定。

表 2 响应面分析实验因素水平表

Table 2 Factors and level value of response surface analysis

实验因素	水平(g/L)		
	-1	0	+1
X_1 葡萄糖	50	70	90
X_2 酵母膏	10	14	18
X_5 磷酸二氢钾	0.3	0.5	0.8

1.4 模型验证

用 SAS(Version 9.2)对多元函数进行拟合和方差分析。对 Y 进行岭峭分析,可确定出其极值点^[18]。再按照计算所得到的参数进行验证实验,以检验模型的重复性和可靠性,确定最后的优化结果。

1.5 中试发酵实验验证

1.5.1 发酵实验方法

1.5.1.1 种子罐培养 种子液为摇瓶扩大培养液,发酵罐体积 30L,培养体积 15L。121℃ 灭菌 25min,灭菌前加入 5mL 泡敌。接种量 10%(V/V),罐温 28℃,罐压 0.05MPa,搅拌转速 100r/min,通气量 30L/min, pH6.5 用质量分数为 20% 柠檬酸进行调节,培养时间 72h。

1.5.1.2 发酵条件 发酵罐体积 70L,装液量 40L。121℃ 灭菌 25min,灭菌前加入 10mL 泡敌。接种量 5L,培养体积 45L,罐温 30℃,96h 后调至 25℃,罐压 0.1MPa,搅拌转速 150~300r/min,通气量 50~90L/min, pH6.5 用质量分数为 20% 柠檬酸进行调节。搅拌转速与通气量根据溶氧量进行调节,从接种后开始,每隔 12h 取样,直至发酵结束。培养时间为 216h。

1.5.2 分批补料发酵策略 在摇瓶发酵实验的基础上,进行分批补料发酵实验。根据发酵液中剩余葡萄糖的浓度,确定葡萄糖的补加时间。发酵开始时,发酵培养基中葡萄糖的质量分数为 3.5%,在发酵过程中当发酵液中的葡萄糖质量分数接近 0.5% 时,以补料的最大速度进行葡萄糖的添加,添加量为发酵液体积的 2%(V/V)。以此种方式进行葡萄糖的添加,葡萄糖的最终使用量不超过 80g/L(以发酵体积计)。补加的葡萄糖质量分数为 50%。

2 结果与分析

2.1 影响二十二碳六烯酸摇瓶发酵的显著因素的筛选

选用 $n = 12$ 的设计方案,对发酵培养基的 8 种成分进行考察,Plackett-Burman 实验设计与结果见表 3。运用 SAS9.2 软件对各因素效应进行 t 检验,选择影响二十二碳六烯酸摇瓶发酵的显著性因素,各因素的效应分析结果见表 4。从表 4 中可以看出,培养基成分及接种量对二十二碳六烯酸产量的影响显著性的排序为:葡萄糖 > 酵母膏 > KH_2PO_4 > KNO_3 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ > 海盐 > M 液 > $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。其中,对二十二碳六烯酸产量有显著($p < 0.05$)影响的因素为 X_1 (葡萄糖)、 X_2 (酵母膏)、 X_5 (KH_2PO_4),利用多元线性回归模型中的逐步回归法拟合($p < 0.05$)得到的线性方程为: $Y = 1.200667 + 0.092833X_1 + 0.057333X_2 + 0.048333X_5$,方程的决定系数 $R^2 = 0.9649$,表明该回归方程拟合良好。从方程可以看出三个显著因素均具有正效应,故应适当增加这三者的质量浓度,做进一步的考察。 X_3 (海盐)、 X_4 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、 X_6 (KNO_3)、 X_7 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、 X_8 (M 液)对二十二碳六烯酸产量的影响并不显著,根据 Plackett-Burman 实验确定的效应值符号,各非显著因素的取值分别为:海盐 20.0g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0g/L、 KNO_3 8.0g/L、

表4 Plackett-Burman 实验因素水平及其效应评价

Table 4 Levels and effects of eight factors after Plackett-Burman design optimization

实验号	变量	因素	效应	t 值	Pr > t	显著性排序
X ₁		葡萄糖	0.185667	6.620327	0.007	1
X ₂		酵母膏	0.114667	4.088676	0.0264	2
X ₃		海盐	0.037333	1.331197	0.2752	6
X ₄		七水硫酸镁	-0.052	-1.85417	0.1608	5
X ₅		磷酸二氢钾	0.096667	3.446849	0.0410	3
X ₆		硝酸钾	0.054333	1.937367	0.1481	4
X ₇		七水硫酸亚铁	-0.016	-0.57051	0.6083	8
X ₈		M 液	-0.02467	-0.87954	0.4439	7

FeSO₄·7H₂O 0.2g/L、M 液 1% (V/V)。

表3 Plackett-Burman 实验设计及响应值表

Table 3 Plackett-Burman test design and results (cellulase activity)

实验号	因素								二十二碳六烯酸产量 (g/L)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1.188
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.186
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1.229
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1.243
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1.372
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1.489
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1.126
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1.041
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1.080
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1.283
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1.146
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.025

2.2 最陡爬坡实验研究最大响应值的响应区域

响应面拟合方程只有在考察的临近区域里才能充分近似真实情况,因此应先使得显著因素的水平尽量逼近二十二碳六烯酸的最大产量区域再建立有效的拟合方程,最陡爬坡实验可以满足这一要求。根据 Plackett-Burman 实验设计法筛选出的显著因子的效应大小设计它们的步长,进行最陡爬坡实验设计,寻找二十二碳六烯酸的最大产量区。实验设计及结果如表 5 所示。二十二碳六烯酸的最大产量区在第 4 次实验附近,以实验 4 的条件为响应面实验因素水平的中心点,进行响应面实验设计。

2.3 Box-Behnken 法确定显著因素的最优水平

采用 Box-Behnken 响应面实验设计确定显著因素的最优水平,实验设计与结果见表 6。15 个实验点分为两类:一类是析因点,共 12 个;一类是零点(实验点 13, 14, 15)为区域的中心点。零点重复 3 次,用于估计实验的误差。

根据表 6 的实验结果,以二十二碳六烯酸产量 Y 值为效应值,由 SAS9.2 软件拟合得到的回归方程模型为: $Y = 1.779667 + 0.217875X_1 + 0.036625X_2 -$

$0.02625X_5 - 0.222958X_1^2 - 0.08475X_1X_2 + 0.034X_1X_5 - 0.148458X_2^2 - 0.0915X_2X_5 - 0.133708X_5^2$ 。回归模型方差分析见表 7,系数估计见表 8。

表5 最陡爬坡实验设计与结果

Table 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

实验号	葡萄糖 (g/L)	酵母膏 (g/L)	磷酸二氢钾 (g/L)	二十二碳六烯酸产量 (g/L)
1	40	8	0.2	1.208
2	50	10	0.3	1.437
3	60	12	0.4	1.585
4	70	14	0.5	1.682
5	80	16	0.6	1.467
6	90	18	0.8	1.329

表6 Box-Behnken 响应面设计及实验结果

Table 6 Response surface Box-Behnken design and corresponding response

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	二十二碳六烯酸产量 (g/L)
1	-1	-1	0	1.064
2	-1	1	0	1.291
3	1	-1	0	1.695
4	1	1	0	1.583
5	0	-1	-1	1.376
6	0	-1	1	1.530
7	0	1	-1	1.648
8	0	1	1	1.436
9	-1	0	-1	1.290
10	1	0	-1	1.632
11	-1	0	1	1.146
12	1	0	1	1.624
13	0	0	0	1.779
14	0	0	0	1.786
15	0	0	0	1.774

方程自变量平方项的符号皆为负值,即抛物线的开口向下,因此存在对应的极大值点。由方差分析可知,大于 F 值的概率为小于 0.0001,表明回归方

程模型的显著性及可靠性极好,不同处理间的差异非常显著;而且模型的调整决定系数 $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9889$,表明了相应模型可以解释 98.89% 的总体变异情况,只有 1.11% 的变异无法用模型来解释,回归模型有高度的相关性^[19-20]。可以用这个模型对二十二碳六烯酸的产量进行分析和预测。联合响应面回归分析和回归方程绘制的响应面图形如下(图 1~图 4):

表 7 回归模型的方差分析

Table 7 Analysis of variance(ANOVA) of quadratic polynomial model

来源	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	Pr > F
模型	9	0.753316	0.083702	139.53	<0.0001
误差项	5	0.002999	0.0006		
拟合项	3	0.002927	0.000976	26.85092	0.0361
纯误差项	2	0.000073	0.000036		
合计	14	0.756315			

表 8 回归方程系数显著性检验表

Table 8 Significance test of regression coefficient

项	估计值	t 值	Pr > t
X_1	0.217875	25.16048	<0.0001
X_2	0.036625	4.229502	0.0083
X_5	-0.02625	-3.03138	0.0290
X_1^2	-0.22296	-17.492	<0.0001
X_1X_2	-0.08475	-6.92048	0.0010
X_1X_5	0.034	2.776358	0.0391
X_2^2	-0.14846	-11.6472	<0.0001
X_2X_5	-0.0915	-7.47167	0.0007
X_5^2	-0.13371	-10.49	0.0001

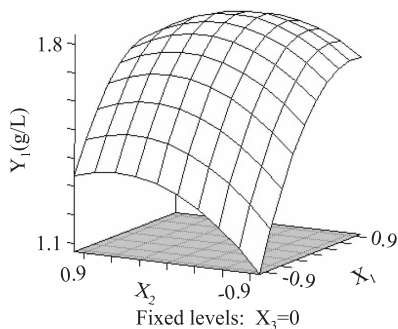
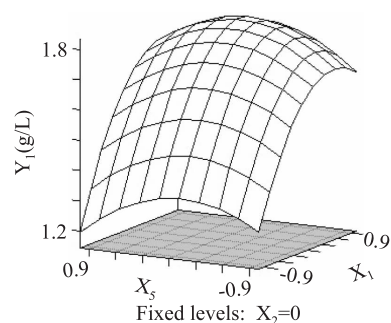
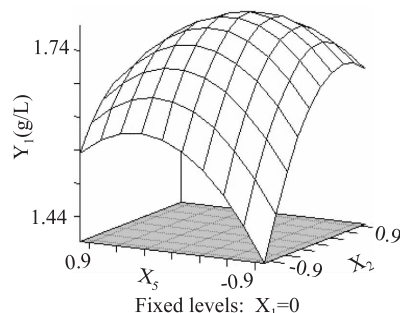
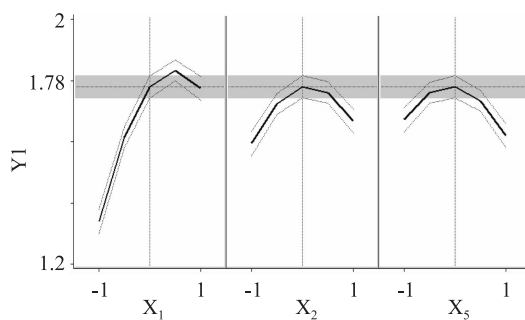


图 1 葡萄糖与酵母膏交互影响二十二碳六烯酸产量的预测响应面图

Fig.1 Response surface plot for the interaction effects of glucose and yeast extract on the yield of DHA

通过观察上述图系,可以得出:回归方程存在稳定点,即最大值点。对 Y 进行岭脊分析,得到极大值所对应的各显著因素 X_1 、 X_2 、 X_5 的编码值分别为 0.488、0.000、0.000,即葡萄糖浓度为 79.76g/L,酵母膏浓度为 14g/L, KH_2PO_4 浓度为 0.5g/L,在此点预测的二十二碳六烯酸的产量为 1.833g/L。 X_1 、 X_2 、 X_1 、 X_5 和 X_2 、 X_5 的等高线都是椭圆,表明元素间的交互作用显著^[20]。

2.4 验证实验

图 2 葡萄糖与 KH_2PO_4 交互影响二十二碳六烯酸产量的预测响应面图Fig.2 Response surface plot for the interaction effects of glucose and KH_2PO_4 on the yield of DHA图 3 酵母膏与 KH_2PO_4 交互影响二十二碳六烯酸产量的预测响应面图Fig.3 Response surface plot for the interaction effects of yeast extract and KH_2PO_4 on the yield of DHA图 4 葡萄糖、酵母膏和 KH_2PO_4

影响二十二碳六烯酸产量的预测剖面图

Fig.4 Prediction profiler of glucose, yeast extract and KH_2PO_4 on the yield of DHA, respectively

为检验模型预测的准确性,在优化条件下进行 5 组发酵实验,所测的二十二碳六烯酸的产量分别为 1.810、1.815、1.807、1.814、1.809g/L,平均产量为 1.811g/L,与模型预测值非常接近,表明设计模型能很好地预测实际的发酵情况。

2.5 中试发酵实验

在优化后的摇瓶发酵培养基条件下,对突变株 LS1057 进行了 70L 发酵罐的分批补料发酵实验。共进行了 3 次中试发酵实验,三次发酵的平均发酵水平为:菌株生物量达到 28.13g/L,总油脂含量为 23.49%,二十二碳六烯酸终产量为 2.112g/L,比摇瓶发酵的 1.811g/L 提高了 16.62%。实验结果表明经

响应面法优化得到的发酵培养基能有效的提高隐甲藻 LS1057 生产二十二碳六烯酸的产量。

3 结论

运用 Plackett - Burman 实验设计, 对影响藻株 LS1057 代谢产生二十二碳六烯酸的发酵培养基组分进行了评价和分析, 筛选出葡萄糖、酵母膏、K₂HPO₄ 为主要影响因素。然后通过最陡爬坡实验逐步改变三者的浓度, 逼近最佳响应面区域; 最后根据 Box - Behnken 中心组合设计原理, 并结合响应面的分析结果, 确定了优化的培养基组成为: 葡萄糖 79.76g/L, 酵母膏 14.0g/L、KH₂PO₄ 0.5g/L、海盐 20.0g/L、MgSO₄ · 7H₂O 5.0g/L、KNO₃ 8.0g/L、FeSO₄ · 7H₂O 0.2g/L 和 M 液(M 液: V_{B1} 0.6g/L, V_{B12} 0.1mg/L) 1% (V/V)。二十二碳六烯酸的发酵产量由原来的 1.057g/L^[11] 提高到 2.112g/L, 增长了 99.81%。同时, 回归方程所得到的最大预测值与验证值非常接近, 说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响, 建立的模型与实际情况是比较吻合的, 因此采用响应面法优化发酵培养基组成是提高二十二碳六烯酸产量的有效途径之一。

参考文献

[1] Ward O P, Singh A. Omega - 3/6 fatty acids: alternative sources of production [J]. Process Biochemistry, 2005, 40 (12): 3627-3652.

[2] Sijtsma L, De Swaaf M E. Biotechnological production and applications of the ω - 3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid [J]. Microbiol Biotechnol, 2004, 64 (2): 146-153.

[3] Mendes A, Reis A, Vasconcelos R, et al. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production; a review [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21 (2): 199-214.

[4] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production [J]. Biochimie, 2004, 86 (11): 807-815.

[5] 王永华, 梁世中, 杨博. 碳、氮源对隐甲藻油脂和 DHA 积累的影响 [J]. 中国油脂, 2001, 26 (6): 58-60.

[6] Wang Jufang, Wu Haizhen, Liang Shizhong, et al. Effect of nitrogen sources on the growth and docosahexaenoic acid accumulation in *Cryptocodinium cohnii* [J]. Marine Science

Bulletin, 2002, 4 (1): 87-92.

[7] 王永华, 梁世中, 杨博, 等. 隐甲藻发酵产 DHA 最佳无机盐浓度的确定 [J]. 中国油脂, 2002, 27 (2): 26-28.

[8] Behrens P W, Thompson J M, Apt K, et al. Production of high levels of DHA in microalgae using modified amounts of chloride and potassium [J]. WO Patent, PCT/US2004/032383, 2005.

[9] 荣辉, 黄惠琴, 鲍时翔. 几种不同碳、氮源对隐甲藻生长及二十二碳六烯酸产量的影响 [J]. 生物技术通报, 2007, 18 (6): 968-970.

[10] 王菊芳, 梁世中, 吴振强, 等. 碳氮比对隐甲藻 (*Cryptocodinium cohnii*) 总脂及 DHA 含量的影响 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2000, 28 (10): 28-31.

[11] 孙中贯, 刘咏, 姚建铭, 等. 高产二十二碳六烯酸隐甲藻的选育及其发酵条件研究 [J]. 食品科学, 2013, 34 (5): 202-206.

[12] 吴国锋, 李国全, 马永强. 工业发酵分析 [J]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 22-23.

[13] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 97-100.

[14] 阮敬. SAS 统计分析从入门到精通 [M]. 北京: 人民邮电出版社, 2009: 168-172.

[15] 凌宏志, 葛菁萍, 平文祥, 等. 响应面法优化黑曲霉 HDF05 产 β-葡萄糖苷酶过程参数 [J]. 生物工程学报, 2011, 27 (3): 419-426.

[16] 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): 863-868.

[17] Guo Ying, Xu Jingliang, Zhang, et al. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 8784-8789.

[18] 冯培勇, 钟旭生, 杨立红, 等. 利用响应面法优化茶薪菇产纤维素酶的发酵条件 [J]. 食品科学, 2009, 30 (7): 162-165.

[19] Wang Zhiwen, Liu Xunli. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8245-8251.

[20] 毋锐琴, 杜双奎, 李志西, 等. 细菌纤维素发酵培养基的优化及超微观结构分析 [J]. 生物工程学报, 2008, 24 (6): 1068-1074.

(上接第 257 页)

[9] 曾元儿. 中国药典化学分析简明手册 [M]. 广州: 中山大学出版社, 2010: 350.

[10] 李宗, 陈在敏, 廖雷生, 等. 菊花中绿原酸的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24 (6): 329-330.

[11] Sun QL, Hua S, Ye JH, et al. Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from Tongxiang County in China [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9 (25): 3817-3821.

[12] Yang JH, Di QQ, Zhao J. Effect of microwave irradiation on chemical profile of extracts during the extraction of organic compounds from *Astragalus* slices [J]. Asia - pacific Journal of

Chemical Engineering, 2012, 7: 418-426.

[13] Ma YQ, Chen JC, Liu H, et al. Effect of Ultrasonic Treatment on the Total Phenolic and Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peel [J]. Toxicology and Chemical Food Safety, 2008, 73 (8): 115-120.

[14] 徐菊茂. 杭白菊中黄酮类成分的提取动力学研究 [J]. 中国药业, 2012, 21 (16): 31-32.

[15] 张志伟, 张双灵, 高振红. 微波辅助菊花茶饮料的研制 [J]. 农产品加工·学刊, 2007, 118 (11): 57-58.

[16] 叶倩. 绿茶和菊花茶饮料色泽褐变机理和控制技术研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.