

洋葱假单胞菌乳糖酸发酵条件的优化

郑 艳, 匡立学, 李 超, 张玉龙*
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要: 以选育的洋葱假单胞菌 NTG-15-03 为生产菌株, 通过单因素和回归正交设计试验考察菌株种龄、接种量、发酵时间、发酵液初始 pH 值对乳糖酸产量的影响。结果表明: 在 pH7.0、种龄 24h、接种量 2%、发酵时间 106h 的条件下, 该菌株的乳糖酸产量为 10.08g/L。

关键词: 乳糖酸; 响应面分析; 发酵

Optimization of Fermentation Conditions for Lactobionic acid Production by *Burkholderia cepacia*

ZHENG Yan, KUANG Li-xue, LI Chao, ZHANG Yu-long*
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The fermentation conditions of *Burkholderia cepacia* NTG-15-03 for the production of lactobionic acid were optimized using one-factor-at-a-time method and response surface analysis based on quadratic regression orthogonal design. The optimal fermentation conditions for the production of lactobionic acid were fermentation pH of 7.0, seed age of 24 h, inoculation amount of 2% and fermentation time of 106 h. Under these conditions, the yield of lactobionic acid was up to 10.08 g/L.

Key words: lactobionic acid; response surface analysis; fermentation

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0181-04

乳糖酸(lactobionic acid, LA)是由一分子半乳糖和一分子葡萄糖酸通过醚键连接起来的一种新型的多羟基有机酸^[1]。它可以作为双歧因子、矿物质吸收的促进剂、甜味剂、酸味剂、器官移植的保存剂等^[2-3], 广泛的应用于食品加工、医药和精细化工领域。尽管乳糖酸具有多种生理功能, 但在我国并没有实现商业化生产。目前在美国和欧洲, 乳糖酸的生产主要是采用化学合成法^[4]。由于该方法在氧化过程中常伴有多种副产物生成, 因此生产成本相对较高。微生物发酵法生产乳糖酸的研究始于 20 世纪末, 但尚未实现产业化。我国在此方面的研究尚属空白。

本实验以选育的洋葱假单胞菌(*Burkholderia cepacia*) NTG-15-03 为出发菌株, 通过单因素及回归正交设计试验对其发酵条件进行初步研究, 以期对乳糖酸的发酵生产提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

洋葱假单胞菌由沈阳农业大学食品微生物实验室分

离, 编号为菌株 NTG-15-03。

乳糖酸 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Prominence LC-20A 高效液相色谱系统 日本岛津公司; Anke TDL-40B 精密离心机 上海安亭科学仪器厂; SHA-C 水浴恒温振荡器 常州国华仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基的制备

斜面培养基: 乳糖 10g、蛋白胨 5g、K₂HPO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、琼脂 20g、蒸馏水 1L, pH 7.2~7.4, 121℃ 灭菌 20min。

发酵培养基: 乳糖 10g、玉米浆 10g、蛋白胨 1g、NaCl 2g、K₂HPO₄ 1g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.5g, pH 7.2~7.4, 121℃ 灭菌 20min。

1.3.2 菌种的活化

将低温保藏的洋葱假单胞菌 NTG-15-03 接种至新配制的斜面培养基上, 30℃ 恒温培养 2d。将菌种反复活化 3 次后, 置于冰箱中保藏。

收稿日期: 2011-05-15

作者简介: 郑艳(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zhengyan0403@163.com

* 通信作者: 张玉龙(1955—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农业资源利用。E-mail: ylzsau@163.com

1.3.3 乳糖酸的发酵

将活化好的种子培养液接种至含有 100mL 发酵培养基的三角瓶中, (30 ± 1) °C 恒温振荡培养 96h。

1.3.4 乳糖酸含量的测定

采用 HPLC 法测定^[6], 固定相: NH₂P-50 柱; 检测器: RID-10A 示差折光检测器; 流动相: 乙腈和 40mmol/L Na₂HPO₄-20mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH 5.0, 体积比 6:4, 在 0.8mL/min、40°C 条件下泵入。

1.3.5 回归正交试验设计

中心组合试验设计和结果分析方法: 在 Minitab 15 软件中, 按照 Minitab → 统计 → DOE → 响应曲面 → 创建响应曲面设计 → 中心复合的顺序, 对以上 4 个因素进一步优化, 进行四因素三水平的 31 组中心组合设计试验, 设计试验的中心编码为 0、0、0、0, 试验的实际浓度选取单因素试验中乳糖酸产量最高的单因素数值, 即种龄 20h、接种量 2%、pH 7.0、培养时间 96h。

按照确定的各因素编码水平和试验设计方法设计中心复合试验, 各因素编码水平见表 1。

表 1 中心复合试验的编码及水平
Table 1 Factors and levels of central composite design

| 因素 | 编码及水平 | | |
|-----------------------|-------|----|-----|
| | -1 | 0 | 1 |
| X ₁ pH | 6 | 7 | 8 |
| X ₂ 种龄/h | 16 | 20 | 24 |
| X ₃ 接种量/% | 1 | 2 | 3 |
| X ₄ 发酵时间/h | 86 | 96 | 106 |

2 结果与分析

2.1 菌株种龄对乳糖酸产量的影响

将种龄分别为 12、16、20、24、28h 的菌株种子以 2% 的接种量接种至 pH 7.2 的发酵培养基中, 4d 后测定发酵液中乳糖酸的含量, 结果见图 1。

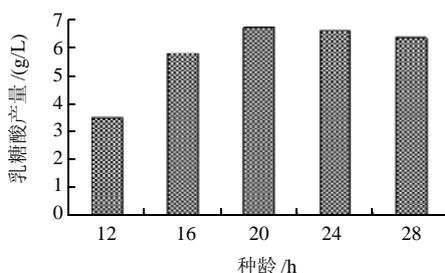


图 1 菌株种龄对乳糖酸产量的影响
Fig.1 Effect of seed age on the yield of lactobionic acid

由图 1 可知, 随着种龄的增加, 乳糖酸产量呈现出先升后降的趋势。以种龄为 20h 的种子接种, 发酵液中乳糖酸含量最高。

2.2 接种量对乳糖酸产量的影响

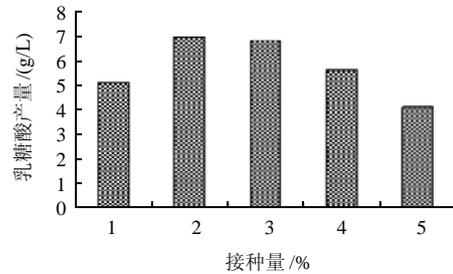


图 2 接种量对乳糖酸产量的影响
Fig.2 Effect of inoculation amount on the yield of lactobionic acid

接种量的大小直接影响乳糖酸的发酵产量, 合适的接种量不仅可以提高产物的合成速率, 也有利于减少染菌机会。以种龄为 20h 细胞作为种子, 分别以 1%、2%、3%、4%、5% 的接种量接种至 pH 7.2 的发酵培养基中, 发酵 4d, 测定乳糖酸含量。由图 2 可知, 接种量为 2% 时发酵液中乳糖酸的产量最高; 随着接种量的增加乳糖酸的产量开始下降, 这主要是由于过大的接种量使得菌体细胞的数量增殖过快, 营养消耗过多, 进而影响到代谢产物的生成量。

2.3 pH 值对乳糖酸产量的影响

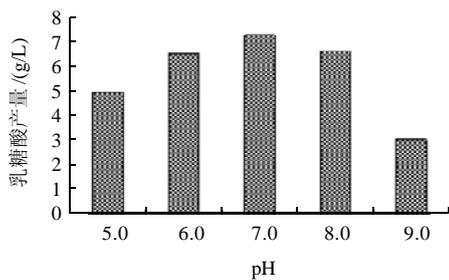


图 3 发酵液初始 pH 值对乳糖酸产量的影响
Fig.3 Effect of initial fermentation pH on the yield of lactobionic acid

不同的发酵初始 pH 值不仅可以影响营养物质的可给性, 同时也会影响代谢过程中酶的催化活性, 进而影响到乳糖酸的产量。实验以种龄为 20h 细胞作为种子, 以 2% 的接种量接种至不同 pH 值的发酵培养基中, 发酵 4d, 测定乳糖酸产量。由图 3 可知, 在发酵液初始 pH 值为 7.0 时, 乳糖酸产量最高, 因此确定该菌株的发酵初始 pH 值为 7.0。

2.4 发酵时间对乳糖酸产量的影响

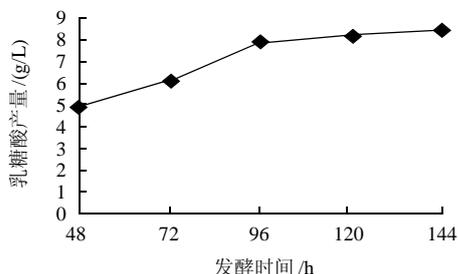


图4 发酵时间对乳糖酸产量的影响

Fig.4 Effect of fermentation time on the yield of lactobionic acid

根据以上试验对种龄、接种量、pH 值分别选择最优值，其他条件保持不变，分别发酵48、72、96、120、144h 考察发酵时间对乳糖酸产量的影响。由图4可知，随着时间的延长，乳糖酸产量增加，自96h 以后，随着时间的延长，乳糖酸产量基本保持不变。

2.5 回归正交试验

2.5.1 中心复合试验结果

表2 中心复合试验结果

Table 2 Central composite design matrix and results

| 试验号 | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | Y 乳糖酸产量/(g/L) |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 4.32 |
| 2 | -1 | -1 | 1 | -1 | 3.46 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.62 |
| 4 | -1 | 1 | -1 | 1 | 9.47 |
| 5 | -1 | 1 | -1 | -1 | 4.51 |
| 6 | 1 | 1 | 1 | -1 | 3.28 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5.65 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.39 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.51 |
| 10 | 1 | 1 | -1 | 1 | 9.32 |
| 11 | -1 | 0 | 0 | 0 | 8.65 |
| 12 | 0 | -1 | 0 | 0 | 8.07 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.48 |
| 14 | -1 | -1 | -1 | -1 | 4.83 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.41 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 1 | 9.50 |
| 17 | 1 | -1 | 1 | -1 | 2.96 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.44 |
| 19 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4.18 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | -1 | 6.90 |
| 21 | 1 | 1 | -1 | -1 | 4.79 |
| 22 | -1 | -1 | -1 | 1 | 8.83 |
| 23 | 1 | -1 | 1 | 1 | 4.98 |
| 24 | 0 | 1 | 0 | 0 | 8.90 |
| 25 | -1 | 1 | 1 | 1 | 5.67 |
| 26 | -1 | 1 | 1 | -1 | 3.32 |
| 27 | -1 | -1 | 1 | 1 | 5.46 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8.44 |
| 29 | 1 | -1 | -1 | 1 | 6.87 |
| 30 | 1 | 0 | 0 | 0 | 8.18 |
| 31 | 0 | 0 | -1 | 0 | 8.40 |

利用 Design Expert 软件对表2 实验数据进行二次多项回归拟合，获得乳糖酸产量对 pH 值、种龄、接种量、发酵时间的二次多项回归方程：

$$Y = 8.51328 - 0.07222X_1 + 0.14333X_2 - 1.38500X_3 + 1.37944X_4 - 0.14877X_1^2 - 0.07877X_2^2 - 2.27377X_3^2 - 2.27377X_4^2 + 0.06063X_1X_2 - 0.07812X_1X_3 - 0.27438X_1X_4 + 0.02312X_2X_3 + 0.38688X_2X_4 - 0.29688X_3X_4$$

对二次多项回归方程进行显著性验证和方差分析，结果见表3、4。

表3 二次模型中回归系数的显著性检验

Table 3 Significance test of each regression coefficient in the established quadratic regression model

| 项 | 系数 | 系数标准误 | t 值 | P 值 | 显著水平 |
|-------------------------------|----------|--------|--------|-------|------|
| 常量 | 8.51328 | 0.1789 | 47.600 | 0.000 | ** |
| X ₁ | -0.07222 | 0.1421 | -0.508 | 0.618 | |
| X ₂ | 0.14333 | 0.1421 | 1.009 | 0.328 | |
| X ₃ | -1.38500 | 0.1421 | -9.746 | 0.000 | ** |
| X ₄ | 1.37944 | 0.1421 | 9.707 | 0.000 | ** |
| X ₁ ² | -0.14877 | 0.3743 | -0.398 | 0.696 | |
| X ₂ ² | -0.07877 | 0.3743 | -0.210 | 0.836 | |
| X ₃ ² | -2.27377 | 0.3743 | -6.075 | 0.000 | ** |
| X ₄ ² | -2.27377 | 0.3743 | -0.972 | 0.346 | |
| X ₁ X ₂ | 0.06063 | 0.1507 | 0.402 | 0.693 | |
| X ₁ X ₃ | -0.07812 | 0.1507 | -0.518 | 0.611 | |
| X ₁ X ₄ | -0.27438 | 0.1507 | -1.820 | 0.087 | |
| X ₂ X ₃ | 0.02312 | 0.1507 | 0.153 | 0.880 | |
| X ₂ X ₄ | 0.38688 | 0.1507 | 2.567 | 0.021 | * |
| X ₃ X ₄ | -0.29688 | 0.1507 | -1.970 | 0.066 | |

注：**，极显著性差异(P < 0.01)；*，显著性差异(P < 0.05)。下同。

由表3 可知，因素 X₃、X₄、X₃² 对乳糖酸产量的曲面效应影响极显著，X₂X₄ 对乳糖酸产量的曲面效应影响显著，其他对乳糖酸产量的影响不显著。说明四因素均不同程度的对响应值产生显著或极显著的影响，原回归方程可化简为：

$$Y = 8.51328 - 1.38500X_3 + 1.37944X_4 - 2.27377X_3^2 + 0.38688X_2X_4$$

表4 中心复合试验结果进行拟合的二次模型方差分析

Table 4 Variance analysis for the yield of lactobionic acid under various fermentation conditions

| 类型 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著水平 |
|------|-----|---------|---------|-------|-------|------|
| 回归 | 14 | 130.625 | 9.3303 | 25.67 | 0.000 | ** |
| 线性 | 4 | 69.243 | 17.3108 | 47.62 | 0.000 | ** |
| 平方 | 4 | 56.207 | 14.0517 | 38.66 | 0.000 | ** |
| 交互作用 | 6 | 5.174 | 0.8624 | 2.37 | 0.078 | |
| 残差误差 | 16 | 5.816 | 0.3635 | | | |
| 纯误差 | 6 | 0.036 | 0.0060 | | | |
| 合计 | 30 | 136.440 | | | | |

由表4 可知，模型回归效果极显著，多元相关系

数为 $R^2 = 0.9574$ ，说明该模型对实验实际情况拟合较好，可用来进行响应值的预测，试验设计方案正确。

2.5.2 回归模型实验验证

经过实验设计和结果分析得到优化培养条件：菌株种龄 24h、接种量 2%、发酵时间 106h、pH7.0。在此培养条件下洋葱假单胞菌发酵生产乳糖酸，得到的乳糖酸产量为 10.08g/L，与模型预测值 10.20g/L 之间的误差小于 5%。

3 结 论

本实验研究了发酵液初始 pH 值、接种量、种龄、发酵时间对洋葱假单胞菌 NTG-15-03 菌株发酵生产乳糖酸产量的影响。单因素试验和回归正交设计试验结果表明：在 pH 7.0、种龄 24h、接种量 2%、发酵时间 106h 的条件下乳糖酸的产量为 10.08g/L。

参考文献：

- [1] DHARIWAL A, MAVROV V, SCHROEDE I. Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimisation of process variables using response surface methods (RSM) [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 42(1/2): 64-69.
- [2] ROLAND L, MAGDALENA O, MARCEL Z. Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of lactobionic acid as an example[J]. *Biocat Biotransf*, 2004, 22(2): 97-104.
- [3] HUA Ling, NORDKVIST M, NIELSEN P M, et al. Scale-up of enzymatic production of lactobionic acid using the rotary jet head system[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(4): 842-849.
- [4] KUUSISTOA J, TOKAREVA A V, MURZINA E V. From renewable raw materials to high value-added fine chemicals: catalytic hydrogenation and oxidation of *D*-lactose[J]. *Catalysis Today*, 2007, 121(1/2): 92-99.
- [5] MIRESCUA A, PRÜß E U. A new environmental friendly method for the preparation of sugar acids via catalytic oxidation on gold catalysts[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2007, 70(1/4): 644-652.
- [6] MURAKAMI H, KAWANO J, YOSHIKUNI H, et al. Screening of lactobionic acid producing microorganisms[J]. *J Appl Glycosci*, 2002, 49(4): 469-477.
- [7] DRULIOLLE H, KOKOH K B, BEDEN B. Selective oxidation of lactose to lactobionic acid on lead-adatoms modified platinum electrodes in $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ buffered medium[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1995, 385(1): 77-83.
- [8] 韩秀慧, 尹伟伦, 王华芳. 二次回归正交设计在微型月季组织培养中的应用[J]. *林业科学*, 2004, 40(4): 189-192.
- [9] 孙艳辉, 董英. 响应面法以豆渣为基质发酵纳豆菌[J]. *食品科学*, 2007, 28(4): 208-211.
- [10] 王惠, 吴兆亮, 童应凯, 等. 应用二次回归正交旋转组合设计优化黄霉素发酵培养基[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(6): 19-22.
- [11] 郑艳, 村上洋, MIKAMI F. 生物转化乳糖酸的研究[J]. *食品科技*, 2004(12): 16-17.
- [12] 郑艳, 管艺菲. 乳糖酸高产菌株的选育及发酵条件的初步研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 39-41.
- [13] 张晓娜, 周素梅, 王世平. 二次回归正交旋转组合设计对麦数中阿拉伯木聚糖酶解工艺的优化[J]. *食品科学*, 2008, 29(1): 141-145.