

文章编号:1009-038X(2004)03-0019-04

利用响应面分析法优化 γ -氨基丁酸发酵培养基

钟环宇, 许建军, 江波

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 通过响应面分析的方法对发酵生产 γ -氨基丁酸(GABA)的培养基进行优化. 利用二水平正交试验考察葡萄糖、豆饼粉、玉米浆、 K_2HPO_4 、吐温-80、起始 pH 值和谷氨酸钠(MSG)对发酵生产 GABA 的影响. 利用极差分析找出主要影响因子:分别为豆饼粉、玉米浆和葡萄糖. 利用中心组合设计与响应面分析进一步考察主要影响因子并确定了最佳培养基的组成. 在优化培养基中, GABA 产量增加约 4 倍, 达到 3.63 g/L, 实验值与预测值基本相符.

关键词: γ -氨基丁酸(GABA); 培养基优化; 响应面分析法(RSA)

中图分类号:TS 201.24

文献标识码:A

Culture Medium Optimization for γ -Aminobutyric Acid Production by Response Surface Analysis

ZHONG Huan-yu, XU Jian-jun, JIANG Bo

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Response surface analysis (RSA) was applied to optimize the culture medium for γ -Aminobutyric Acid(GABA) production. In the first optimization step, the influence of glucose, soybean flour, corn steep liquor, K_2HPO_4 , Tween-80, initial pH and monosodium glutamate (MSG) on GABA production was evaluated using a fractional factorial design. The significant factors at the analysis range are: soybean flour, corn steep liquor and glucose. Using the yield of GABA as the optimization index, the optimal medium components were determined by a central composite design and response surface analysis. Under the optimal conditions, the experimental values agreed with the predicted values. The yield of GABA increased nearly 4 times to 3.63 g/L.

Key words: γ -aminobutyric acid (GABA); culture medium optimization; response surface analysis (RSA)

γ -氨基丁酸(GABA)是一种天然存在的活性氨基酸,在动物的脑、脊髓和肝脏等器官内分布较为集中. GABA 作为重要的神经递质,具有降血压、改

善脑部血液循环、精神安定、健肾利肝等生理活性^[1]. GABA 作为一种新型食品功能性因子正越来越引起人们的注意. 富含 GABA 的食品具有很好

收稿日期:2003-08-26; 修回日期:2003-11-21.

作者简介:钟环宇(1977-),男,吉林延吉人,食品科学与工程硕士研究生.

的免疫保健作用,可以作为一种功能性食品,其研究开发也因此受到重视^[2,3]. GABA 的制备除化学合成法外,主要是通过微生物酶作用底物谷氨酸而产生.大肠杆菌具有很高的谷氨酸脱羧酶的活性,利用这一特性,有人提出固定化大肠杆菌细胞生产 GABA,并达到较高的转化率^[4,5].然而将大肠杆菌制备的 GABA 应用于食品,存在种种安全隐患.

一些乳酸菌如短乳杆菌、植物乳杆菌也有脱羧酶的活力^[6,7].而乳酸菌是一类广泛应用于食品工业的重要微生物,是一种普遍认为是安全的细菌,因此可以利用乳酸菌开发富含 GABA 的食品.目前国内外对发酵生产 GABA 的研究主要集中在大肠杆菌上,对乳酸菌发酵生产 GABA 的研究很少.本实验通过筛选得到一支高产 GABA 的乳酸菌 SYFS 1.009^[8],在对其发酵特性研究的基础上,研究了发酵生产 GABA 的工艺参数,并通过响应面分析的方法对其培养基进行了优化.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳酸菌菌种:江南大学食品科学研究所保藏的乳酸菌株 SYFS 1.009.琼脂斜面传代物在 4℃ 保存,每 4 周转接一次.

GABA 标样:纯度 99.9%(购自 Sigma 公司);L-谷氨酸钠,碳酸钙,混合纤维素酯微孔滤膜 0.45 μm(上海新亚净化仪器厂生产).

日立 835-50 型氨基酸自动分析仪,2619#树脂(阳离子交换柱 D 2.6 mm×150 mm),53℃ 分析. Ag1100 液相色谱仪(安捷公司制造),C18 柱(D 4.0 mm×100 mm),OPA(邻苯二甲醛)柱前衍生测定氨基酸.

722 型分光光度计(上海第三分析仪器厂制造).

1.2 培养基及培养条件

菌种斜面保藏培养基(组分 g/L):酵母膏 10,葡萄糖 15,碳酸钙 15,琼脂 15.

日本 24# 乳酸菌培养基(组分 g/L):牛肉膏 5,酵母膏 5,葡萄糖 10,乳糖 5,蛋白胨 10,NaCl 5,琼脂 20. pH 6.8.

发酵种子培养基:MRS 液体培养基.

250 mL 三角瓶中装入 100 mL 发酵培养基,取经活化培养 14 h 的种子液,内含 108~109 CFU/mL(平板计数),接种量 1%,接种后于 30℃ 恒温培

养箱中静置培养 48 h.

1.3 指标分析

培养 48 h 待发酵结束后测定最终 pH 值.发酵液中的游离 GABA 分别由纸层析法定性和氨基酸自动分析仪定量分析.

发酵液中氨基酸定性^[9]分析:采用纸层析法.用新华一号层析纸(杭州新华纸业生产),展开相为正丁醇:冰醋酸:水(体积比为 60:15:25),展开后自然晾干溶剂,85℃ 显色 15 min.显色剂为 0.5%茚三酮.分别配制 1 mg/mL GABA 和 L-谷氨酸作定性参比.

发酵液中氨基酸定量分析:采用氨基酸自动分析仪法.25 mL 发酵液中加入 10 mL 10%的三氯乙酸(TCA),震荡均匀^[10].稀释后,经 0.45 μm 膜过滤,过滤清液经氨基酸自动分析仪分析.

2 实验设计

2.1 二水平正交试验

根据对乳酸菌 SYFS 1.009 发酵特性的研究,初步确定所要考察的 7 种组分:葡萄糖、豆饼粉、玉米浆、K₂HPO₄、MSG、吐温-80 和初始 pH 值.若用全因子设计则为七因子二水平的 2⁷ 设计,需 128 次试验,实现起来较困难.与全因子实验设计相比,正交试验能在不丢掉主要信息的前提下,大大减少实验次数,根据极差分析能估计因子的主效,且根据实验数据拟合的一次多项式能有效地确定下一步的实验方向,将次要因素固定在较好水平,进一步考察主要因素.

2.2 响应面试验

Box 及其合作者于 20 世纪 50 年代提出并完善了响应面分析法,后广泛应用于化学、化工、农业、机械、食品工业等领域^[11,12].

采用响应面分析方法(Response Surface Analysis, RSA)对 SYFS 1.009 的培养基的组成进行了优化.根据二水平正交试验的结果选取 3 个主要因素进行响应面实验设计,并用国际上最常用的统计软件 SAS 8.1 对实验数据进行回归分析.通过微分方法计算预测的最佳点^[13].

3 结果与分析

3.1 二水平正交试验确定各因子的影响顺序

二水平正交试验安排、GABA 产量与极差分析见表 1.

表 1 二水平正交试验安排、GABA 产量与极差分析

Tab. 1 Experimental design, results and intuitive analysis of two-level orthogonal design

实验号	葡萄糖 质量浓度/ (g/L)	豆饼粉 质量浓度/ (g/L)	玉米浆 质量浓度/ (g/L)	K ₂ HPO ₄ 质量浓度/ (g/L)	MSG 质量浓度/ (g/L)	吐温-80 质量浓度/ (g/L)	起始 pH	GABA 质量浓度/ (g/L)
1	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (2)	1 (5)	1 (0)	1 (6.0)	1.075
2	1	1	1	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (6.8)	0.780
3	1	2 (20)	2 (15)	1	1	2	2	1.207
4	1	2	2	2	2	1	1	1.691
5	2 (15)	1	2	1	2	1	2	1.216
6	2	1	2	2	1	2	1	0.752
7	2	2	1	1	2	2	1	0.716
8	2	2	1	2	1	1	2	1.457
K ₁	4.753	3.823	4.028	4.214	4.491	5.439	4.234	
K ₂	4.141	5.071	4.866	4.680	4.403	3.455	4.660	
极差= K _{max} -K _{min}	0.612	1.248	0.838	0.466	0.088	1.984	0.426	

由极差分析的结果可知,对于 GABA 的生产,因子影响顺序依次为:吐温-80>豆饼粉>玉米浆>葡萄糖>起始 pH >K₂HPO₄>MSG. 其中吐温-80 的添加对 GABA 的产量有很大的抑制作用,所以将吐温-80 固定在 1 水平上,即不添加吐温-80. 起始 pH 值、K₂HPO₄与 MSG 分别选取在各自的好水平上,即起始 pH 值为 6.8、K₂HPO₄质量浓度为 10 g/L、MSG 质量浓度为 5 g/L. 通过响应面分析法(RSA)重点考察豆饼粉、玉米浆和葡萄糖 3 个因素.

3.2 响应面分析(RSA)试验

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理^[11],设计了三因素三水平的响应面分析(RSA)试验,共有 15 个试验点,以豆饼粉、玉米浆、葡萄糖 3 个因素为自变量,以 GABA 产量为响应值,试验因素与水平的选取见表 2.

表 2 因素与水平取值表

Tab. 2 Assigned concentrations of variables at different levels in Box-Behnken design

因素		水平		
		-1	0	+1
豆饼粉质量浓度/(g/L)	X ₁	5	20	35
玉米浆质量浓度/(g/L)	X ₂	2	10	18
葡萄糖质量浓度/(g/L)	X ₃	3	8	13

15 个试验点可分为两类:其一是析因点,自变量取值在 X₁, X₂, X₃ 所构成的三维顶点,共有 12 个析因点;其二是零点,为区域的中心点,零点试验

重复 3 次,用以估计实验误差,每次试验得到的 GABA 产量见表 3.

表 3 响应面分析试验安排与 GABA 产量

Tab. 3 Experimental design and results of Box-behnken design for GABA production

实验号	豆饼粉 (X ₁)	玉米浆 (X ₂)	葡萄糖 (X ₃)	GABA 产量 Y/(g/L)
1	-1	-1	0	0.211
2	-1	1	0	1.690
3	1	-1	0	2.895
4	1	1	0	2.765
5	0	-1	-1	0.270
6	0	-1	1	0.966
7	0	1	-1	0.734
8	0	1	1	1.452
9	-1	0	-1	0.680
10	1	0	-1	0.136
11	-1	0	1	0.984
12	1	0	1	1.922
13	0	0	0	3.452
14	0	0	0	3.585
15	0	0	0	3.604

以 GABA 产量为响应值,运用 SAS 程序进行回归拟合后,各试验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$Y_1 = 3.547 + 0.519125X_1 + 0.287375X_2 + 0.438X_3 - 0.790875X_1^2 - 0.40225X_1X_2 + 0.3705X_1X_3 - 0.865875X_2^2 + 0.0055X_2X_3 - 1.825625X_3^2$$

运用 SAS 程序对回归方程进行方差分析(见表 4), 可以看出: $f_{0.01}(9, 5) > F_{\text{回归}} > f_{0.05}(9, 5)$, 说明回归方程在 $f_{0.05}$ 的水平上显著, 根据 $R^2 = 0.9335$, 说明模型能解释 93.35% GABA 质量浓度的变化, 因此回归方程给菌株 SYFS 1.009 发酵生产 GABA 提供了一个合适的模型. 图 1 为计算得到的 RSA 图形, 可以看到拟合面具有真实的最大值.

表 4 回归方程的方差分析

Tab. 4 Variance analysis of regression equation

方差来源	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值	相关系数 (R^2)
模型	9	21.14644	2.349605	7.800071*	0.9335
误差	5	1.506143	0.301229		
总计	14	22.65259			

注: $f_{0.05}(9, 5) = 4.78$; * $f_{0.01}(9, 5) = 10.15$.

为了进一步验证最佳点的值, 对回归方程取一阶偏导等于零并整理得:

$$0.519 - 1.582X_1 - 0.402X_2 + 0.3705X_3 = 0$$

$$0.287 - 0.402X_1 - 1.732X_2 + 0.0055X_3 = 0$$

$$0.438 + 0.37X_1 + 0.0055X_2 - 3.652X_3 = 0$$

解得: $X_1 = 0.428$, $X_2 = 0.067$, $X_3 = 0.165$

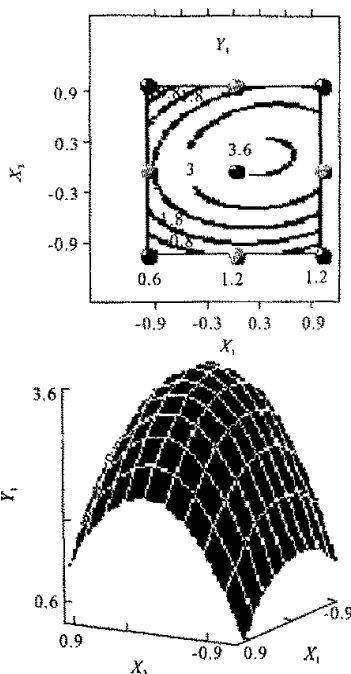
代入回归方程, 解得预测的 GABA 的最优产量 $Y = 3.66$ g/L. 即: 培养基中豆饼粉质量浓度为 26.42 g/L, 玉米浆质量浓度为 10.54 g/L, 葡萄糖质量浓度为 8.82 g/L, 考虑到实际操作便利, 确定培养基的最优配方为: 豆饼粉质量浓度为 26 g/L, 玉米浆质量浓度为 10 g/L, 葡萄糖质量浓度为 9 g/L.

为了证实预测的结果, 用以上得到的最优配方重复实验 3 次, 平均 GABA 产量为 3.63 ± 0.12 g/L, 预测值 $Y = 3.66$ g/L 与实验值之间良好的拟合性证实了模型的有效性, 回归方程为 GABA 的发酵提供了一个合适的模型.

参考文献:

- [1] 茅原紘. 近年のGABA生理機能研究——脳機能改善作用、高血圧作用を中心[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 1-3.
- [2] 陈曾三. 富含 γ -氨基丁酸米糠制法[J]. 粮食与油脂, 2001, (5): 45-46.
- [3] 曾原. 富含米胚芽的开发利用[J]. 杭州食品科技, 1997, 46(3): 22-26.
- [4] 赵景联. 固定化大肠杆菌细胞生产 γ -氨基丁酸的研究[J]. 生物工程学报, 1989, 5(2): 124-128.

(下转第 50 页)

图 1 GABA 产量与豆饼粉和葡萄糖的关系 ($X_2 = 0$)Fig. 1 Response surface plot of GABA production (Y_1) as a function of soybean flour (X_1) and glucose (X_3)

4 结论

实验证明响应面分析法对培养基优化是非常有效的. 二水平正交试验用很少的实验对多个因素进行考察, 通过极差分析对各个因素的效应进行评价, 能有效地找出主效因素, 分别为豆饼粉、玉米浆和葡萄糖, 其它因素分别固定在各自的最优水平上. 通过响应面实验对 3 个主要因素进一步优化, 找出最佳值.

经过响应面方法优化的最佳培养基配方组成为 (g/L): 豆饼粉 26, 玉米浆 10, 葡萄糖 9, K_2HPO_4 10, MSG 5. 起始 pH 值 6.8. 在此优化的培养基中菌株 SYFS 1.009 的 GAB 质量浓度由最初的 0.92 g/L 提到 3.63 g/L, 提高了近 4 倍.

量分数)时的膨胀率和抗融性比 0.35%时都有所下降,加入量0.40%时,抗融性虽然最好,但体系的膨胀率下降,而且硬度增加太大也不利于感官评价,因此复配胶的最佳用量为 0.35%(质量分数)。

参考文献:

- [1] 许时婴,葛宇,王璋.冰淇淋复配稳定剂的开发及其稳定机理研究[J].无锡轻工业学院学报,1994,13(4):274-279.
- [2] 胡国华,陈明.瓜儿豆胶在冰淇淋中的应用[J].冷饮与速冻食品工业,2002,8(3):33-35.
- [3] 梁英红.黄原胶在冰淇淋在生产中的应用[J].食品科技,2002,(2):120-123.
- [4] 袁博,许时婴,冯忆梅.稳定剂和乳化剂对低脂冰淇淋品质的影响[J].无锡轻工大学学报,2003,22(2):79-82.
- [5] 李基红.冰淇淋生产工艺与配方[M].北京:中国轻工业出版社,2000.
- [6] Nagar G, Clowes G, Tudorica C M, *et al.* Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2003,55(2):89-93.
- [7] Adapa S, Dingeldein H, Schmidt K A. Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers [J]. *J Dairy Sci*, 2000,83:2224-2229.
- [8] Guinaro J X, Zoumas Morse C, Mori L, *et al.* Sugar and fat effects on sensory properties of ice cream [J]. *Journal of food science*, 1997,62(5):1087-1093.
- [9] Schmidt k, Lundy A, Reynolds J, *et al.* Carbohydrate or protein based fat mimicker effect on ice milk properties [J]. *J of Food Sci*, 1993,58:761-763.
- [10] Roland, Lance G Philips, Kathryn J Boor. Effects of fat replacers on the sensory properties, color, melting, and hardness of ice cream [J]. *J Dairy Sci*, 1999,82:2094-2100.

(责任编辑:朱明)

(上接第 22 页)

- [5] 章汝平,何立芳.用后道味精母液提取谷氨酸后的废液生产 γ -氨基丁酸[J].长沙电力学院学报(自然科学版),1998,13(4):433-435.
- [6] Seppo Salminen, Atte Von Wright. Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1998.
- [7] 三枝贵代,冈田忠司. The effect of defatting with organic solvent on accumulation of 4-aminobutyric acid (GABA) in the rice germ [J]. 日本食品科学工学会誌, 2001,38(3):61-66.
- [8] 许建军,江波,许时婴.生物合成 γ -氨基丁酸的乳酸菌的筛选[J],食品科技,2002,(10):7-10.
- [9] Bernard Fried, Joseph Sherma. Thin-Layer Chromatography, Techniques and Applications[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1986.
- [10] Yoshie Ueno, Kiyoshi Hayakawa, Saori Takahashi, *et al.* Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005 [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1997,61(7):1168-1171.
- [11] Thompson D R. Response surface experimentation [J]. *J Food Proc Pres*, 1982, (6):155.
- [12] 葛宇,许时婴,王璋.响应面优化冰淇淋复配稳定剂配方研究[J].食品科学,1995,16(11):5-9.
- [13] 吴有炜.试验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2003.

(责任编辑:李春丽)