

# 响应面法对产甘露醇发酵乳杆菌发酵条件的优化

徐春泽, 王泽南, 占子奇, 苟林, 蒋艳

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要:** 为提高发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentation*) LS33 发酵产甘露醇的产率, 对其发酵条件进行了研究。在单因素试验结果的基础上, 采用响应面法进行试验设计, 利用 Design Expert 7.0 软件建立果糖质量浓度、初始 pH 和温度的二次回归模型。确定 LS33 发酵产甘露醇的最佳参数为: 果糖质量浓度 75 g/L、初始 pH 6.9、温度 42 °C、接种量 10%、摇床转速 120 r/min。此条件下甘露醇产率为 53.66%, 较优化前 (45.12%) 提高了 18.93%。

**关键词:** 甘露醇; 发酵乳杆菌; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2012)2-168-171

## Optimization of Fermentation Conditions for Producing Mannitol in *Lactobacillus fermentation* by Response Surface Methodology

XU Chun-ze, WANG Ze-nan, ZHAN Zi-qi, GOU Lin, JIANG Yan

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** In order to increase the mannitol productivity of (*Lactobacillus fermentation*) LS33, the fermentation conditions of LS33 were researched. Response surface methodology was used to design experiment on the basis of single factor experiment results, a quadratic regression model of fructose concentration, initial pH value and temperature was established by Design Expert 7.0. The optimal fermentation conditions were determined as follows: fructose concentration 75 g/L, initial pH value 6.9, temperature 42 °C, inoculums size 10% and shaker speed 120 r/min, under these conditions, the mannitol productivity was 53.66%, increased by 18.93% than before (45.12%).

**Key words:** mannitol; *Lactobacillus fermentation*; response surface methodology

甘露醇 (mannitol), 又叫 D-甘露糖醇, 山梨醇的同分异构体, 是一种天然的六碳糖醇, 最早发现存在于南瓜、蘑菇、洋葱、海藻中<sup>[1,2]</sup>。研究表明, 甘露醇具有不吸湿, 甜度适宜, 低热量, 无毒副作用, 不提高血糖, 不致龋齿等特点, 可做糖尿病人、肥胖病人的甜味剂<sup>[3,4]</sup>。

微生物转化是一种制备甘露醇的方法, 现已发现许多微生物可利用碳水化合物为底物合成甘露醇<sup>[5,6]</sup>。到目前为止, 以应用乳酸菌生产甘露醇的研究报道较多, 基本集中在高产菌种的筛选和培养基组成的研究上。2000 年德国的 Korakli 等报道了从含酵母的面团分离的旧金山乳杆菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*) 在培养基中能将果糖 100% 转化为甘露醇<sup>[7]</sup>。2002 年芬兰的 Von Warm N 等人研究比较了十种异型发酵乳酸菌的休止细胞以果糖为底物发酵生产甘露醇的能力, 同时也对简化培养基进行了研究<sup>[8]</sup>。袁其朋等用发酵

乳杆菌 (*Lactobacillus fermentation 101*) 转化甘露醇, 通过加入 CaCO<sub>3</sub> 控制 pH 来提高甘露醇收率<sup>[9]</sup>。但目前报道中尚未见有通过试验设计建立数学模型优化乳酸菌产甘露醇的发酵条件, 来提高甘露醇产率。

本试验采用诱变后获得的一株产甘露醇发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentation*) LS33, 通过单因素试验和响应面试验<sup>[10]</sup>优化其发酵条件, 为甘露醇工业化生产提供试验研究基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种与培养基

发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentation*) LS33 由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供发酵乳杆菌 CICC-20660 原始菌株, 经由本实验室微波和硫酸二乙酯诱变处理筛选。

斜面保藏培养基 (g/L): 酪蛋白胨 10、牛肉膏 10、酵母膏 5、葡萄糖 5、乙酸钠 5、柠檬酸二胺 2、磷酸氢二钾 2、硫酸镁 0.2、硫酸锰 0.05、碳酸钙 20、琼脂 15、pH 6.8。

MRS 种子培养基 (g/L): 酪蛋白胨 10、牛肉膏

收稿日期: 2011-11-04

基金项目: 安徽省教育厅重点项目 (Kj2010A276)

作者简介: 徐春泽 (1985-), 硕士研究生, 研究方向为食品资源综合利用

通讯作者: 王泽南

10、酵母膏 5、葡萄糖 20、乙酸钠 5、柠檬酸二胺 2、磷酸氢二钾 2、硫酸镁 0.2、硫酸锰 0.05、pH 6.8。

MRS 发酵培养基 (g/L): 酪蛋白胨 10、牛肉膏 10、酵母膏 5、果糖 50、葡萄糖 50、乙酸钠 5、柠檬酸二胺 2、磷酸氢二钾 2、硫酸镁 0.2、硫酸锰 0.05、pH 6.8。

### 1.2 仪器与设备

752 紫外可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; PHS-3B 精密级数字式酸度计, 上海虹益仪器仪表有限公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌种培养

斜面培养: 36 °C 恒温培养箱中培养 1~2d; 种子培养: 36 °C、pH 6.8、80 r/min 条件下振荡培养 16 h; 发酵培养: 接种量 10%, 36 °C, pH 6.8, 80 r/min 条件下振荡培养 48 h。

#### 1.3.2 单因素试验

以 48 h 发酵液中的甘露醇产率作为评价指标, 对果糖质量浓度 (30、50、70、90、110 g/L)、接种量 (1%、5%、10%、15%、20%)、初始 pH (5.6、6.2、6.8、7.4、8.0)、温度 (28、32、36、40、44 °C)、摇床转速 (0、40、80、120、160 r/min) 5 个因素进行单因素试验筛选, 考察对甘露醇产率的影响。初始试验条件为: 果糖质量浓度 50 g/L、接种量 10%、初始 pH 6.8、温度 36 °C、摇床转速 80 r/min, 后续因素的试验将前一个因素的较佳条件代入以置换初始条件。

#### 1.3.3 响应面设计

在单因素试验结果基础上, 采用 Design Expert 7.0 软件, 根据 Box-Benhnken 试验设计原理, 选取影响较大的因素, 以 48 h 甘露醇产率为响应值设计试验, 获得 LS33 发酵产甘露醇的最佳条件。

#### 1.3.4 计算

甘露醇产量: 采用分光光度法测定<sup>[11]</sup>

$$\text{甘露醇产率} \% = \frac{\text{甘露醇产量}(\text{g/L})}{\text{果糖质量浓度}(\text{g/L})} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 果糖质量浓度对甘露醇产率的影响

由图 1 可知, 甘露醇产率随果糖质量浓度增大呈先升后降的趋势, 果糖质量浓度达到 70 g/L 时, 甘露醇产率最大。峰值过后, 当溶液中果糖浓度继续增加时, 乳酸菌生长的抑制作用也增加, 影响了甘露醇转化, 所以甘露醇产率有所下降。因此选择果糖浓度 70

g/L 为较佳参数。

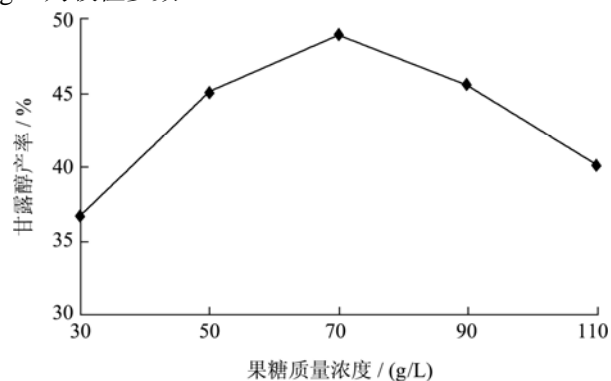


图1 果糖质量浓度对甘露醇产率的影响

Fig.1 Effect of fructose concentration on mannitol productivity of *Lactobacillus fermentum* strain LS33

#### 2.1.2 接种量对甘露醇产率的影响

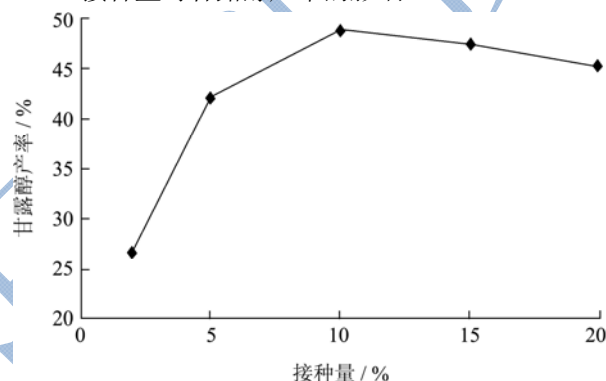


图2 接种量对甘露醇产率的影响

Fig.2 Effect of inoculum size on mannitol productivity of *Lactobacillus fermentum* strain LS33

由图 2 可知, 甘露醇产率随接种量增加呈先上升后缓慢下降的趋势, 接种量为 10% 时, 甘露醇产率最高。随着接种量的增大, 菌体生长过快, 代谢产物积累过多, 容易抑制后期菌体的生长, 影响甘露醇转化。从经济性考虑, 选择接种量 10% 为较佳参数, 不再进行响应面优化。

#### 2.1.3 初始 pH 对甘露醇产率的影响

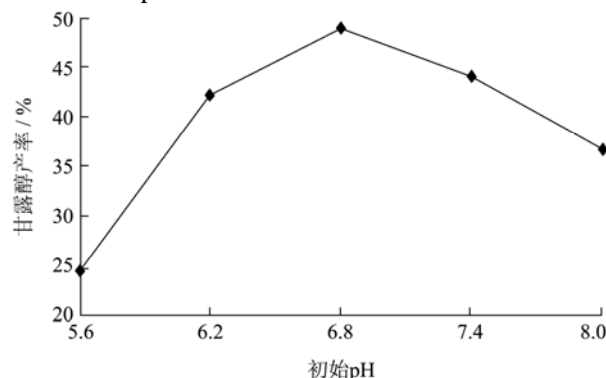


图3 初始pH对甘露醇产率的影响

Fig.3 Effect of original pH on mannitol productivity of *Lactobacillus fermentum* strain LS33

由图 3 可知,甘露醇产率随初始 pH 的增加呈先升后降趋势,初始 pH 为 6.8 时,甘露醇产率最高。说明接近于中性的环境最适宜该菌株的生长。因此选择初始 pH 6.8 为较佳参数。

2.1.4 温度对甘露醇产率的影响

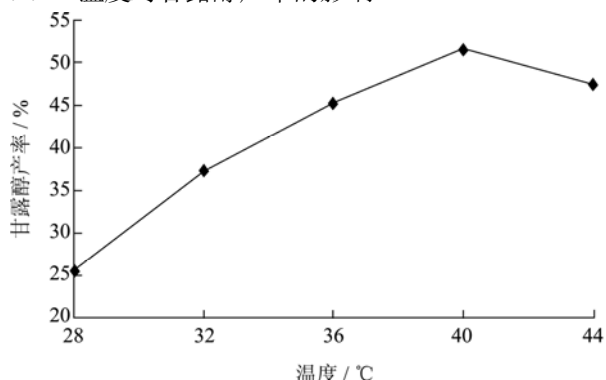


图4 温度对甘露醇产率的影响

Fig.4 Effect of temperature on mannitol productivity of

*Lactobacillus fermentum* strain LS33

由图 4 可知,甘露醇产率随温度的增加呈先升后降趋势,温度为 40 °C 时,甘露醇产率最高。温度较低时,酶活力将受到限制,影响了甘露醇转化;而过高的温度易使酶失活,菌体容易衰老,导致发酵周期缩短,影响了甘露醇最终产率。因此选择温度 40 °C 为较佳参数。

2.1.5 摇床转速对甘露醇产率的影响

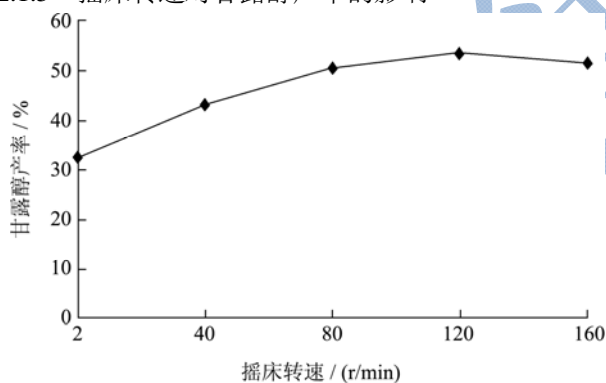


图5 摇床转速对甘露醇产率的影响

Fig.5 Effect of shaker speed on mannitol productivity of

*Lactobacillus fermentum* strain LS33

由图 5 可知,甘露醇产率随摇床转速增加呈缓慢上升后趋于平缓的趋势,摇床转速为 120 r/min 时,甘露醇产率最高。静止发酵时,发酵液粘度较大,菌体易于沉积,影响甘露醇转化;而随着摇床转速增加,发酵液流体湍动程度增大,气相间的传质和液相中的传质过程加快,对菌体生长和产物的转化有利。从显著性考虑,选择摇床转速 120 r/min 为较佳参数,不再进行响应面优化。

2.2 响应面优化发酵条件<sup>[12]</sup>

2.2.1 响应面试验设计及结果

综合单因素试验结果,进一步对果糖质量浓度、初始 pH 和温度 3 个因素进行优化。以这 3 个因素为自变量,以甘露醇产率为响应值,根据 Box-Behnken 试验设计原理,设计中心组合试验。各因素设定水平及编码表见表 1,试验设计方案及结果见表 2。

表 1 响应面因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of response surface design

编码值	果糖质量浓度/(g/L)	初始 pH	温度/°C
	A	B	C
-1	50	6.2	36
0	70	6.8	40
1	90	7.4	44

表 2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken

试验号	A	B	C	甘露醇产率/%
1	-1	-1	0	42.65
2	-1	1	0	43.85
3	1	-1	0	45.21
4	1	1	0	49.67
5	0	-1	-1	47.45
6	0	-1	1	48.34
7	0	0	0	53.36
8	0	0	0	54.02
9	-1	0	-1	46.02
10	1	0	-1	47.52
11	-1	0	1	46.95
12	1	0	1	51.22
13	0	0	0	53.22
14	0	0	0	52.98
15	0	0	0	53.78
16	0	1	-1	49.85
17	0	1	1	50.05

利用 Design Expert 7.0 软件,以果糖质量浓度、初始 pH 和温度为响应变量,以甘露醇产率为响应值对表 2 数据进行多元二次回归拟合,得到回归模型方程为:  $Y=53.47+1.77A+1.22B+0.71C+0.81AB+0.69AC-0.17BC-4.56A^2-3.57B^2-0.98C^2$

回归方程的方差分析结果见表 3。

由表 3 可知,回归模型极显著 ( $P < 0.001$ ),失拟项不显著 ( $P = 0.0752 > 0.05$ ),表明回归方程拟合程度良好;决定系数  $R^2 = 0.9834$ ,说明因变量与考察的自变量之间的线性关系显著;模型校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9620$ ,即该模型能解释响应值变化的 96.2%,又信噪比=19.184,均说明模型可信度较高。综上所述,使

用该模型可以较好的对响应值（甘露醇产率）进行分析和预测。

表 3 回归方程方差分析结果

**Table 3 Analysis of variances for the developed regression equation**

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	203.22	9	22.58	46.06	<0.0001	**
A	25.03	1	25.03	51.05	0.0002	**
B	11.93	1	11.93	24.34	0.0017	**
C	4.09	1	4.09	8.34	0.0234	*
AB	2.66	1	2.66	5.42	0.0528	
AC	1.92	1	1.92	3.91	0.0884	
BC	0.12	1	0.12	0.24	0.6373	
A <sup>2</sup>	87.59	1	87.59	178.67	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	53.54	1	53.54	109.22	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	4.07	1	4.07	8.31	0.0236	*
残差	3.43	7	0.49			
失拟项	2.72	3	0.91	5.08	0.0752	
误差项	0.71	4	0.18			
总和	206.65	16				

$R^2=0.9834, R^2_{Adj}=0.9620, \text{信噪比}=19.184$

注: \*\*.差异极显著, P<0.01; \*.差异显著, P<0.05.

表 3 中, 一次项 A、B 及二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup> 表现为极显著, C 和 C<sup>2</sup> 为显著, 表明它们对响应值影响极大。根据表 3, 各影响因素主次顺序为: A(果糖质量浓度)>B(初始 pH)>C(温度)。

2.2.2 响应面分析

利用 Design Expert 7.0 软件对二次回归模型进行规范分析, 果糖质量浓度、初始 pH、温度之间交互作用对甘露醇产率的影响见图 6~8。

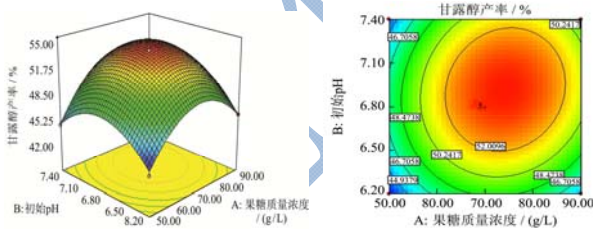


图 6 果糖质量浓度与初始 pH 对甘露醇产率影响的响应面和等高线图

**Fig.6 Response surface and contour plots for the effects of fructose concentration and original pH on mannitol productivity**

等高线的形状可以反映出因素之间交互效应的强弱, 圆形表示两因素不显著, 而椭圆则表示较为显著<sup>[13]</sup>。比较三组图可知: 果糖质量浓度、初始 pH 对甘露醇产率的影响比较显著, 曲线较陡; 而温度对甘露

醇产率的影响相对较小, 曲线较为平缓, 其数值的增加减少, 对响应值的变化较小。

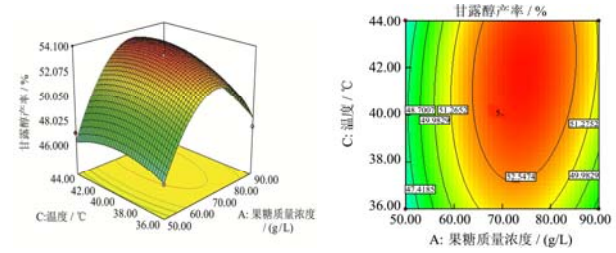


图 7 果糖质量浓度与温度对甘露醇产率影响的响应面和等高线图

**Fig.7 Response surface and contour plots for the effects of fructose concentration and temperature on mannitol productivity**

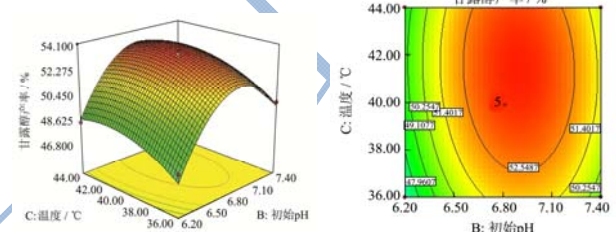


图 8 初始 pH 与温度对甘露醇产率影响的响应面和等高线图

**Fig.8 Response surface and contour plots for the effects of original pH and temperature on mannitol productivity**

2.2.3 最佳发酵条件

由 Design 软件可求出回归模型极值点, 即最佳发酵条件: 果糖质量浓度 74.87 g/L、初始 pH 6.91、温度 41.73 °C, 此条件下, 甘露醇的理论产率为 53.95%。为检验响应面法的可靠性, 在最佳发酵条件下进行验证实验, 考虑到实际操作, 将最佳条件修正为: 果糖质量浓度 75 g/L、初始 pH 6.9、温度 42 °C。此条件下进行 3 次平行实验, 甘露醇平均产率为 53.66%, 与预测值接近, 说明回归方程能比较真实地模拟各因素对甘露醇产率的影响, 因此, 用该回归模型优化甘露醇的发酵条件是可行的。

3 结论

通过单因素试验和响应面法对发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentation*) LS33 产甘露醇的发酵条件进行优化, 建立了果糖质量浓度、初始 pH 和温度 3 个因素对甘露醇产率的二次回归方程模型, 经检验, 模型准确有效, 可以用该模型分析预测各因素对甘露醇产率的影响。由单因素试验和响应面优化模型确定 LS33 发酵产甘露醇的最佳发酵条件为: 果糖质量浓度 75 g/L、初始 pH 6.9、温度 42 °C、接种量 10%、摇床转速 120 r/min。在此条件下, 得到甘露醇产率为 53.66%, 较优化前 (45.12%) 提高了 18.93%。试验

结果和预测值很接近, 可以为进一步放大试验提供参考。

### 参考文献

- [1] Song S, Vieille C. Recent advances in the biological production of mannitol [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, (84): 55-62
- [2] Ruperez P, Toledano G. Celery by-products as a source of mannitol [J]. *Eur Food Res Technol*, 2003, 216: 224-226
- [3] 郑建仙. 功能性糖醇[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [4] Beak H, Lee Y, Hyun H. Molecular cloning and sequence analysis of a mannitol dehydrogenase gene and isolation of mdh promoter from *Candida magnolia* [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32: 1089-1094
- [5] 汪园. 利用生物技术生产甘露醇的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2006, 22(3): 291-293
- [6] Lee J, Oh D, Song H, et al.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  supplementation increases mannitol production by *Candida magnolia* [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 291-294
- [7] Korakli M, Schwarz E, Wolf G, et al. Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. *Food Sci.*, 2000, 22: 1-4
- [8] Weymarn N, Von Kiviharju K, Leisola M. High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor [J]. *Journal of Industry Microbiology & Biotechnology*, 2002, 29: 44-49
- [9] 袁其朋, 马润宇. 甘露醇微生物转化的研究. *微生物学通报*, 1999, 4: 265-267
- [10] 王永菲, 王成国. 响应面法的理论和应用[J]. *中央民族大学学报*, 2005, 14(3): 236-240
- [11] 蒋华, 陈卫, 赵建新等. 分光光度法测定乳酸菌发酵体系中甘露醇的含量[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(4): 105-107
- [12] 刘鹏, 王泽南, 张仕发等. 从梗孢酵母发酵产赤藓糖醇的响应面优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(5): 69-74
- [13] 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