

短乳杆菌生产 γ -氨基丁酸培养基的优化

冯宇, 高年发, 张颖, 潘超强, 宋磊

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: γ -氨基丁酸 (GABA) 也称氨酪酸, 是一种重要的抑制性神经递质, 它参与多种代谢活动, 具有很高的生理活性。本实验采用单因素、正交设计和 SAS 响应面分析的方法对以 MRS 为基础的 GABA 发酵培养基进行了优化, 确定了葡萄糖为最适碳源, 黄豆粉和玉米浆为混合氮源, 并确定了葡萄糖、黄豆粉和玉米浆的最佳发酵培养基添加量, 使 GABA 产量达到了 27.12 g/L, 比原始培养基的 14.03 g/L 提高了 93.30%。

关键词: γ -氨基丁酸; 短乳杆菌; 培养基优化; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2010)1-34-4

Optimization of Fermentation Medium for γ -Aminobutyric Acid Production by *Lactobacillus brevis*

FENG Yu, GAO Nian-fa, ZHANG Ying, PAN Chao-qiang, SONG Lei

(Key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education, College of Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Gamma-aminobutyric acid (GABA) has many physiological functions and is a major inhibitory neurotransmitter in mammalian nervous systems. Fermentation medium for GABA production, based on MRS medium, was optimized using single factor test, orthogonal design and Response Surface analysis method. The best carbon source and nitrogen source were determined as glucose and the mixture of soybean and corn steep liquor, respectively. Under the optimum conditions, the content of GABA in optimum fermentation medium reached 27.12 g/L, which was 93.30% higher than that of original fermentation medium (14.03 g/L).

Key words: Gamma-aminobutyric acid; *Lactobacillus brevis*; Medium optimization; Response Surface analysis

γ -氨基丁酸 (GABA) 也称氨酪酸, 是一种非蛋白质组成成份的天然氨基酸, 广泛存在于自然界中, 是目前研究较为深入的一种重要的抑制性神经递质, 它参与多种代谢活动, 具有降血压、调节心律失常、改善睡眠、抗焦虑、改善脂质代谢、防止动脉硬化等功效, 因此受到越来越多的科学工作者的关注^[1-4]。

GABA 的生产方法主要有化学合成、植物富集和生物合成三种。生物合成一般以大肠杆菌为菌株, 但其存在安全卫生方面的隐患^[5]。乳酸菌中同样拥有谷氨酸脱羧酶, 可以催化底物谷氨酸钠 (MSG) 来合成 GABA, 而且被普遍应用于食品医药行业当中, 比较安全^[6]。

本实验采用单因素、正交设计和 SAS 响应面分析的方法, 对以 MRS 为基础的 GABA 发酵培养基进行

收稿日期: 2009-08-25

作者简介: 冯宇 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与生化药

学

通讯作者: 高年发教授

了优化, 确定了廉价发酵培养基的组成, 使 GABA 产量达到 27.12 g/L。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 菌种

本实验室保藏菌种 *Lactobacillus brevis* TCCC 13007, 分离自酸菜。

1.1.2 培养基

液体 MRS 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉提取物 10, 酵母提取物 5, 葡萄糖 10, 乙酸钠 5, 柠檬酸二胺 2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然, 高压灭菌备用。

优化后发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 21.75, 麸皮 18.26, 玉米浆 25.88, 硫酸锰 0.25, MSG 50, pH 5.0。

1.1.3 仪器

安捷伦 1200 高效液相色谱仪和 Kromasil C₁₈ 高效液相色谱柱。药品试剂均为分析纯, 乙腈为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 发酵方法

将高层琼脂中的菌体接入 50 mL MRS 培养基中, 30 °C活化培养 16 h, 以 5%接种量接入发酵培养基中, 30 °C静置发酵 72 h。

1.2.2 GABA检测方法

1.2.2.1 高效液相色谱法

发酵液5000 r/min离心后, 取上清液10 μL, 加入衍生缓冲液100 μL、衍生剂(2,4-二硝基氟苯) 100 μL, 定容缓冲液790 μL于1.5 mL离心管中, 混匀, 60 °C水浴1 h, 20 μL进样。用Kromasil C18柱, 流速0.8 mL/min, 360 nm检测。流动相为乙腈、醋酸钠溶液和水, 梯度洗脱。

1.2.3 培养基优化方法

采用单因素、正交设计和响应面分析法。

2 结果与讨论

2.1 碳源对发酵生产GABA的影响

GABA生物合成的底物为MSG, 所以在发酵过程中加入5%的MSG。分别以葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖等为唯一碳源, 添加量为1%, 其他发酵培养基成分以液体MRS培养基为基础, 进行发酵。30 °C静置培养 3 d, 检测发酵液中GABA的含量, 结果见表1。结果显示, 葡萄糖作为此株短乳杆菌发酵培养基的碳源最为适合, 无论是菌体量还是GABA产量都优于其他碳源。

表 1 碳源对发酵培养液中 GABA 含量和菌体量的影响

Table 1 Effects of carbon source on content of GABA in

fermentation broth and biomass

碳源	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	酵母膏	蔗糖	可溶性淀粉
OD ₆₀₀	1.05	0.852	0.977	0.866	0.92	0.847
GABA(g/L)	14.03	13.22	12.15	10.34	13.69	10.56

2.2 氮源对发酵生产 GABA 的影响

进行氮源优化时葡萄糖添加 1%, MSG 添加 5%, 各种氮源含氮量以以下数据计算: 玉米浆 4.5%、黄豆粉 8%、麸皮 12.08%, 所以添加量分别为: 玉米浆 5.9%、黄豆粉 3.3%、麸皮 12.08%。从实验结果看出黄豆粉和玉米浆产量较高, 结果见表 2。

对麸皮、玉米浆和黄豆粉做进一步优化, 考察混合配比后的发酵结果, 见表 3。结果显示, 复合氮源的添加对于 GABA 产量的提高有很大帮助。原因可能是营养成分的充足供给适合短乳杆菌的生长, 菌体活

力提高。分析玉米浆和黄豆粉的成分可以发现, 玉米浆主要为微生物成长提供必要的维生素: 烟酸、叶酸、泛酸、硫胺素等。而黄豆粉的氨基酸和金属离子的含量相对较高。葡萄糖作为可快速利用的碳源为短乳杆菌的生长和 GABA 生产提供能量来源。

表 2 氮源对发酵培养液中 GABA 含量的影响

Table 2 Effects of nitrogen source on content of GABA in

fermentation broth

氮源	玉米浆	黄豆粉	麸皮
GABA(g/L)	11.33	10.21	7.36

表 3 复合氮源对发酵过程中 GABA 含量的影响

Table 3 Effects of complex nitrogen on content of GABA in

fermentation broth

氮源	麸皮+玉米浆	黄豆粉+玉米浆	麸皮+黄豆粉
GABA(g/L)	13.55	15.40	11.30

2.3 正交试验设计优化发酵培养基

以葡萄糖为碳源, 黄豆粉和玉米浆为混合氮源, MSG添加5%, 其他营养成分以液体MRS培养基为基础进行正交设计L₂₇(3⁸)。因素水平表和实验结果表分别为表4和表5。

表5的极差分析显示, 葡萄糖添加量对于GABA的产量影响是最大的, 主要成分对GABA产量的影响顺序为: 葡萄糖>黄豆粉>玉米浆。而磷酸氢二钾、柠檬酸钠、醋酸钠、硫酸镁的添加与否都不会对实验结果造成很大影响。其原因可能是麸皮和玉米浆足以提供菌体生长和发酵所需的无机盐, 因此不用再额外添加。因此, 正交试验给出的发酵培养基组成是(w/v): 葡萄糖1.3%、黄豆粉3.3%、玉米浆3%、硫酸锰0.025%, MSG添加5%。

由于最佳的培养基组成在试验中没有进行, 所以根据正交试验给出的最佳培养基成分进行发酵, 产量为24.86 g/L, 高于23号试验。比初始培养基产量提高了77.19%。

表 4 因素与水平表 单位: %

Table 4 Factors and levels of the orthogonal test

水平	葡萄 糖	黄豆 粉	玉米 浆	磷酸氢 二钾	柠檬 酸钠	醋酸 钠	硫酸 镁	硫酸 锰
1	0.7	2.7	3	0	0	0	0	0
2	1	3.3	4	0.2	0.2	0.2	0.058	0.025
3	1.3	3.8	5	0.3	0.3	0.3	0.12	0.05

表5 正交实验结果及极差分析结果

Table 5 Analysis of the orthogonal experimental results

试验号	葡萄糖	黄豆粉	玉米浆	磷酸氢二钾	柠檬酸钠	醋酸钠	硫酸镁	硫酸锰	结果
1	1	1	1	1	1	1	1	1	17.80
2	1	1	1	1	2	2	2	2	21.56
3	1	1	1	1	3	3	3	3	20.37
4	1	2	2	2	1	1	1	2	22.16
5	1	2	2	2	2	2	2	3	19.63
6	1	2	2	2	3	3	3	1	18.13
7	1	3	3	3	1	1	1	3	18.93
8	1	3	3	3	2	2	2	1	17.60
9	1	3	3	3	3	3	3	2	19.30
10	2	1	2	3	1	2	3	1	19.70
11	2	1	2	3	2	3	1	2	19.14
12	2	1	2	3	3	1	2	3	21.09
13	2	2	3	1	1	2	3	2	18.51
14	2	2	3	1	2	3	1	3	21.72
15	2	2	3	1	3	1	2	1	22.21
16	2	3	1	2	1	2	3	3	21.10
17	2	3	1	2	2	3	1	1	19.56
18	2	3	1	2	3	1	2	2	20.11
19	3	1	3	2	1	3	2	1	18.37
20	3	1	3	2	2	1	3	2	21.65
21	3	1	3	2	3	2	1	3	20.14
22	3	2	1	3	1	3	2	2	22.79
23	3	2	1	3	2	1	3	3	22.81
24	3	2	1	3	3	2	1	1	22.74
25	3	3	2	1	1	3	2	3	21.86
26	3	3	2	1	2	1	3	1	21.88
27	3	3	2	1	3	2	1	2	20.28
K1	19.5	20.0	21.0	20.7	20.1	21.0	20.3	19.8	
K2	20.3	21.2	20.4	20.1	20.6	20.1	20.6	20.6	
K3	21.4	20.1	19.8	20.5	20.5	20.1	20.4	20.9	
极差	1.9	1.2	1.2	0.6	0.5	0.8	0.3	1.1	

2.4 响应面法确定最佳值域

由正交试验极差分析结果确定出影响GABA产量的最显著因素为葡萄糖、黄豆粉和玉米浆。因此,本实验以GABA产量为响应值,葡萄糖、黄豆粉和玉米浆为自变量分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 表示。按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码。 x_i 为自变量编码值, X_i 为自变量真实值, X_0 为自变量中心值, ΔX 为自变量的变化步长。可得 $x_1 = (X_1 - 1.8) / 0.5$, $x_2 = (X_2 - 3.3) / 0.5$, $x_3 = (X_3 - 2.5) / 0.5$ 。因子编码和自变量水平见表6,实验结果见表7。

表6 试验因素水平及编码

Table 6 Levels and ecodes of factors

因素	编码	水平		
		-1	0	1
葡萄糖	x_1	1.3	1.8	2.3
黄豆粉	x_2	1.8	3.3	3.8
玉米浆	x_3	2	2.5	3

表7 Box-Behnken试验设计及响应值

Table 7 Designs and responses of Box-Behnken

Run 1	X1	X2	X3	Y1
1	-1	-1	0	23.80
2	-1	1	0	24.00
3	1	-1	0	25.92
4	1	1	0	26.00
5	0	-1	-1	24.50
6	0	-1	1	24.50
7	0	1	-1	24.82
8	0	1	1	25.30
9	-1	0	-1	23.60
10	1	0	-1	25.70
11	-1	0	1	24.50
12	1	0	1	26.60
13	0	0	0	26.70
14	0	0	0	26.80
15	0	0	0	26.40

2.5 回归模型的建立和方差分析

通过 SAS 的响应面回归分析过程进行数据分析,并建立二次响应面回归分析,结果见表 8。

表8 方差分析表

Table 8 ANOVA of the results

方差来源	自由度	平方和	均方	F	Pr > F
模型	9	16.72269	1.858077	23.61162	0.001408
一次项	3	9.5476	3.182533	40.44222	0.000626
二次项	3	7.113893	2.371298	30.1334	0.001257
交互项	3	0.0612	0.0204	0.259234	0.852141
误差	5	0.393467	0.078693		
失拟项	3	0.3068	0.102267	2.36	0.311473
误差项	2	0.086667	0.043333		
总和	14	17.11616			

由表 8 可知,回归模型 F 检验显著($P_{\text{model}} < 0.01$),其决定系数 R^2 为 0.9770, 离回归标准差为 0.280523,表明此模型拟合度良好。回归方程的一次项、二次项的均方差和系数都较大,而交互项较小,说明这三个因素交互作用较小。

表9 回归方程中回归系数的估计值

Table 9 Estimate values of regression coefficient in the regression equation

模型项	参数估计	标准差	t	Pr > t
X1	1.04	0.09918	10.48599	0.000136
X2	0.175	0.09918	1.764469	0.137927
X3	0.285	0.09918	2.873564	0.034849
X1*X1	-0.691667	0.145989	-4.7378	0.00516
X1*X2	-0.03	0.140262	-0.21389	0.839085
X1*X3	8.882E-16	0.140262	6.33E-15	1
X2*X2	-1.011667	0.145989	-6.92975	0.00096
X2*X3	0.12	0.140262	0.855544	0.431328
X3*X3	-0.841667	0.145989	-5.76528	0.002205
R-square	决定系数	97.70%		
RMSE	离回归标准差	0.280523		

表 9 可知，拟合二次多项回归方程为： $Y_1 = 26.63333 + 1.04 X_1 + 0.175 X_2 + 0.285 X_3 - 0.691667 X_1^2 - 0.03 X_1 X_2 + 8.88 \times 10^{-16} X_1 X_3 - 1.011667 X_2^2 + 0.12 X_2 X_3 - 0.841667 X_3^2$ 。

对全变量的二次回归模型进行规范分析，考察所拟合的相应曲面形状。关键因素与响应值的相互作用可通过图 1-图 3 的响应面分析立体图反映出来。从图中可以看出，三个关键因素在所确定的浓度范围内对 GABA 的产率的影响都是显著的，但存在一定的差别。为进一步验证最佳点的值，将所得回归方程对各自变量取一阶偏导等于零，可得到三元一次方程组，求解该方程组可得到模型极值坐标为： $X_1 = 0.75000$ ， $X_2 = 0.08578$ ， $X_3 = 0.17540$ 。相当于葡萄糖：2.18%，黄豆粉：3.63%，玉米浆：2.59%。此时模型预测的最大产量为 27.06 g/L。

为了验证模型预测的准确性，在最佳发酵条件下进行了发酵试验，所得产量为 27.12 g/L，说明该模型能够很好地预测实际发酵情况。

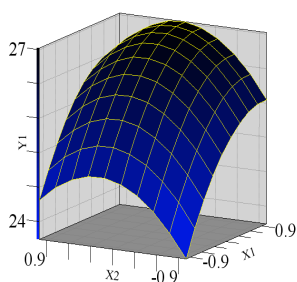


图1 响应面法 (X1、X2) 立体分析图

Fig.1 Surface Plot for X1, X2

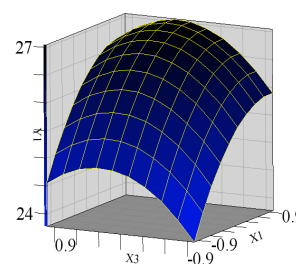


图2 响应面法 (X1、X3) 立体分析图

Fig.2 Surface Plot for X1, X3

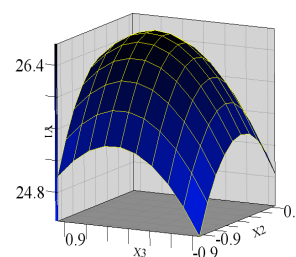


图3 响应面法 (X2、X3) 立体分析图

Fig.3 Surface Plot for X2, X3

2.6 底物MSG添加量对发酵生产GABA的影响

生物合成GABA的过程是谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸脱羧的过程，因此本实验在优化了发酵培养基碳氮源的基础上以 (w/v)：3%、4%、5%、6%、7%的比例加入MSG，考察发酵液中GABA含量的变化。结果见图4。

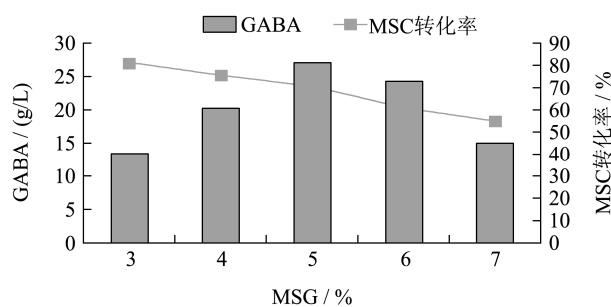


图4 MSG添加量对发酵液中GABA含量的影响

Fig.4 Effect of MSG on content of GABA in fermentation broth

图4表明，MSG添加量为5%的时候GABA产量最高，达到27.12 g/L。而MSG的转化率是随着添加量的增大而减小，可能与谷氨酸脱羧酶的活性或者细胞膜通透性有关，有待进一步考察。本实验发酵培养基中MSG的添加量定为5%。

3 结论

本实验对从酸菜中筛选到的一株产GABA的短乳杆菌进行了单因素、正交设计和Box-Behnken响应面法

(下转第62页)