

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)发酵生产 γ -聚谷氨酸过程中培养基组分的优化

张文^{1,2} 张树清^{1,2*} 马晓彤¹ 何翠翠¹

(1 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081 2 农业部植物营养实验室 北京 100081)

摘要 通过摇瓶培养的方法,对纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) ZW-2 发酵生产 γ -聚谷氨酸过程中的培养基组分进行优化,从而提高 γ -聚谷氨酸的产量。在单因素试验优化的基础上,利用 Design-Export 软件,采用 Plackett-Burman 试验设计筛选培养基组分中对产 γ -聚谷氨酸影响最显著的因子,然后通过爬坡实验逼近 γ -聚谷氨酸产量的最大区域,最后运用三因素三水平的 Box-Behnken Design 实验设计对关键因子进一步优化求得产 γ -聚谷氨酸的最佳条件。结果表明,获得最佳产量时关键因子的最优组合为:谷氨酸钠(68.76g/L)、氯化铵(1.16g/L)和磷酸氢(二钾)(2.16g/L),在此条件下,6 组验证试验的平均产量为 36.421g/L,是优化前的 1.54 倍。纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) ZW-2 发酵生产 γ -聚谷氨酸培养基组分的优化过程中,采用 Plackett - Burman Design 和 Box-Behnken Design 相结合的方法,效果显著,经济有效。

关键词 γ -聚谷氨酸 Design-export 软件 响应面法

中图分类号 Q939.99

γ -聚谷氨酸(γ -Poly glutamic acid,简称 γ -PGA)是一种由微生物(主要为芽孢杆菌类)发酵产生的胞外多肽^[1],是目前发现仅有的可由微生物聚合而得到的四种聚合氨基酸(聚天冬氨酸、 γ -聚谷氨酸、聚鸟氨酸、 ϵ -聚赖氨酸)之一。 γ -聚谷氨酸最早于 1933 年在炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)^[2] 外荚膜中发现,1942 年 Bovarnick 等^[3]首次发现枯草芽孢杆菌能够产生 γ -聚谷氨酸,此后,尤其是进入 21 世纪之后,微生物发酵法生产 γ -聚谷氨酸的研究受到了越来越多研究者的关注。 γ -聚谷氨酸作为一种生物可降解的水溶性新型高分子材料^[4],其优良的性能已经在医药、食品、日化、轻工业和食品等许多领域得到了广泛的应用^[5],成为了一种公认的极具发展潜力的绿色生物化学产品。

响应面设计方法(response surface methodology, RSM),又称为响应面法、响应曲面法,是 Box 和 Wilson 在 1951 年开发的用于化学过程因子优化的一种综合性方法^[6]。该方法将数学模型与实验分析相结合,采

用二次多元回归方程拟合响应值与因素以及因素与因素之间的函数关系,通过对响应曲面和等高线的分析得到最优的工艺参数^[7]。该方法能在有限的实验次数下评价各因子对生物过程的影响,摸清各因子交互作用的程度,最后求得其最优条件,从而弥补以前微生物培养基优化过程中单因素实验与正交试验设计等方法不足^[8]。为此,笔者以本实验室自筛菌种——纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) ZW-2 为发酵菌种,在单因素实验优化的基础上运用响应面优化法对产 γ -聚谷氨酸的培养基组分进行优化,为进一步放大研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种为纳豆芽孢杆菌 ZW-2,由本实验室筛选、分离并保藏。

固体培养基(质量浓度,g/L):蛋白胨:10,酵母粉:5,氯化钠:10,琼脂 18,蒸馏水,pH7.4。

种子培养基(质量浓度,g/L):葡萄糖:10,蛋白胨:10,酵母粉:5,氯化钠:10,蒸馏水,pH7.4。

收稿日期:2013-09-17 修回日期:2013-10-18

* 通讯作者,电子信箱:zhangshuqing@caas.cn

发酵培养基(质量浓度,g/L):葡萄糖:40,谷氨酸钠:50,酵母粉:3,氯化铵:2,磷酸氢二钾:3,硫酸镁:0.3,氯化钙:0.4,蒸馏水,pH7.4

1.2 菌种形态

该菌种的细胞呈杆状、革兰氏阳性,大小约为 $0.6 \times 1.5 \sim 0.8 \times 3.0 \mu\text{m}$;菌落为圆形、表面色暗、粗糙、不透明、边缘不整齐。该菌生长在葡萄糖琼脂培养基上的细胞染色均匀,运动、好氧;形成长圆形、中生内生孢子,芽孢囊不膨大或稍有膨大。该菌生长最高温度 $40 \sim 45^\circ\text{C}$,最低生长温度 $5 \sim 10^\circ\text{C}$,最适生长温度 $28 \sim 30^\circ\text{C}$,最适 pH 为 $6.0 \sim 8.0$ 。

1.3 培养方法

斜面培养:斜面划线接种后放于 30°C 恒温培养箱中培养 24h。种子培养:用接种针取 1~2 环斜面菌接入种子培养基,250ml 三角瓶的装液量为 80ml,在 30°C ,180r/min 的条件下培养 24h。

摇瓶发酵:用移液枪将种子液按 2% (V/V) 的接种量接入发酵培养基中,250ml 三角瓶的装液量为 80ml,在 37°C ,180r/min 的条件下培养 72h。

1.4 γ -聚谷氨酸的提取

将发酵液 pH 调至 3 左右,以 12 000r/min 的转速离心 25min,收集上清液;加入 3 倍体积的无水乙醇,低温(4°C)静置过夜,倾去上清液得粗品;用适量蒸馏水溶解粗品,调节 pH 至 7 左右,在 4°C 条件下,用透析袋透析脱盐,将透析液放入 -70°C 冰箱冷冻,然后进行真空冷冻干燥,得到纯的 γ -聚谷氨酸白色粉末。

1.5 实验方法

1.5.1 Plackett-Burman 实验设计 此方法是由 Plackett 和 Burman 在 1946 年提出^[9]一种近饱和的两水平实验设计方法。该方法基于非完全平衡原理,试图用最少的实验次数使各因素的主效应得到尽可能精确的估计^[10],适于从众多的考察因子中快速、有效地筛选出具有显著影响的因素并排除影响不显著的因素,为优化研究提供技术支持^[11]。

实验在单因素实验优化的基础上选取培养基的七种组分进行研究,其中碳源(葡萄糖)、无机氮源(氯化铵)、有机氮源(酵母粉)、谷氨酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、氯化钙分别编码为 A,B,C,D,E,F,G,每种组分取两个水平:高水平(+1)和低水平(-1),其实验因素水平及编码见表 1 所示。

1.5.2 最陡爬坡实验 响应面拟合方程只在考察接近最佳值(γ -聚谷氨酸最高产量)区域才能充分模拟真

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平及编码

Table1 Factor levels and encode table of Plackett-burman experiment							
变量	葡萄糖	氯化铵	酵母粉	谷氨酸钠	磷酸氢二钾	硫酸镁	氯化钙
编码值	A	B	C	D	E	F	G
水平(-1)	40	2	3	50	3	0.3	0.4
水平(+1)	60	3	4	60	4	0.5	0.6

实情形,因此首先需要通过最陡爬坡实验逼近最佳值区域,才能进行有效的响应面分析^[12]。最陡爬坡法以 Plackett-Burman 实验结果为依据,根据主要因素估计值确定因素的正负效应,估计值为正则为正效应,反之则为负效应;根据各因素效应值的大小确定变化步长,正效应的因素选取较高值,负效应的因素选取较低值;根据各因素效应值的正负性确定爬坡方向,找出其峰值,从而以最快的速度逼近最大产 γ -聚谷氨酸的区域^[13],即为下一步响应面分析的中心点。

1.5.3 Box-Behnken Design 实验 Box-Behnken Design 实验是在 Plackett-Burman 实验结果充分分析的基础上,在最陡爬坡实验确定的最佳区域内,利用响应面设计软件进行合理的实验设计并通过实验得到相应的结果,采用二次多元回归方程来拟合各因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[14]。该方法即具有实验次数少、周期短,求得的回归方程精确度高等优点,并且能够同时研究几个因素之间的交互作用,因此,该方法在微生物发酵等领域得到了广泛的应用^[15]。

实验采用 Design-Export 软件在最陡爬坡实验的基础上进行 Box-Behnken Design 实验设计,以谷氨酸钠、氯化铵和磷酸氢二钾为自变量,分别编码为 A,B,C,以 γ -聚谷氨酸的产量为响应值设计三因素三水平的响应面分析实验,其编码前后的自变量水平见表 2 所示。

表 2 Box-Behnken Design 实验因素水平编码

Table 2 Factor levels and encode table of Box-Behnken Design experiment				
变量	编码	水平		
		-1	0	1
谷氨酸钠(g/L)	A	66	68	70
氯化铵(g/L)	B	1	1.2	1.4
磷酸氢二钾(g/L)	C	2	2.2	2.4

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 实验

运用 Design-export 软件进行 Plackett-Burman 实验

设计,每组3个平行,响应值为 γ -聚谷氨酸产量,选用数据见表3所示,其实验结果统计分析见表4所示。实验次数 $N=12$ 的设计进行实验,其实验设计及结果

表3 Plackett – Burman 实验设计及结果

Table 3 Design and results of Plackett-burman experiment

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	聚谷氨酸产量(g/L)
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	34.23
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	28.40
3	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	32.50
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	27.67
5	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	26.69
6	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	30.83
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	27.07
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	33.59
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	34.52
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	29.30
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	31.79
12	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	28.84

表4 Plackett – Burman 实验结果的统计分析

Table 4 Statistical Analysis of Plackett-burman experiment

	平方和	自由度	均方和	估计值	F 值	P 值	影响顺序
模型	87.55	7	12.51	30.45	70.35	0.0005	
A(葡萄糖)	1.35	1	1.35	-0.34	7.61	0.0509 *	4
B(氯化铵)	6.29	1	6.29	-0.72	35.4	0.004 **	3
C(酵母粉)	0.79	1	0.79	0.26	4.42	0.1034	5
D(谷氨酸钠)	72.47	1	72.47	2.46	407.62	< 0.0001 **	1
E(磷酸氢二钾)	6.44	1	6.44	-0.73	36.21	0.0038 **	2
F(硫酸镁)	0.095	1	0.095	-0.089	0.54	0.5044	7
G(氯化钙)	0.11	1	0.11	0.097	0.64	0.4680	6

Note: $R^2=0.9919$; $Adj R^2=0.9778$; **means highly significant difference ($P<0.01$); * means significant difference ($P<0.05$)

由表4可以看出,该模型的 P 值为0.0005,说明这些数据有99.95%的概率可以用此模型来解释,回归系数(R^2)及其调整值($Adj R^2$)均大于90%,且相差不大,说明Plackett-Burman实验设计的各因素水平合理,综上所述,该模型可以显著地模拟该组数据。

从表4中可以看出,氯化铵、谷氨酸钠和磷酸氢二钾对 γ -聚谷氨酸的产量具有极显著的影响($P\leq 0.01$),其影响顺序为:谷氨酸钠>磷酸氢二钾>氯化铵,并且从估计值中可以看出谷氨酸钠对 γ -聚谷氨酸的产量有显著的正效应;而氯化铵和磷酸氢二钾有显著的负效应。由此可见,与其他因素相比,前提物质(谷氨酸钠)对 γ -聚谷氨酸发酵的影响程度最大,并且具有正效应,即谷氨酸钠含量越高,越有利于 γ -聚谷氨酸的合成,这与张艳丽等^[16]对谷氨酸依赖型 γ -聚谷氨酸产生菌的描述相符;无机盐(磷酸氢二钾)是微生物发酵中不可

或缺的营养物质,其主要是作为某些生理活性物质的组成以及生理活性物质的调节剂,并且具有调节培养基的渗透压、pH、氧化还原电位等作用^[17],但是 γ -聚谷氨酸产生菌对它需求量不高,因此必须合理控制其用量;此外,无机氮源对 γ -聚谷氨酸发酵具有显著的负效应,这说明该菌对无机氮源的消耗较少,有机氮源(酵母粉)中含有的各种无机元素和生长因子基本满足该菌的生长。

2.2 最陡爬坡实验

根据Plackett-Burman实验的实验结果,选取谷氨酸钠、氯化铵和磷酸氢二钾进行爬坡实验,按照谷氨酸钠浓度逐步提高,氯化铵和磷酸氢二钾浓度逐步降低,其他因子选取低水平浓度的方法进行爬坡实验,寻找 γ -聚谷氨酸产量的最大响应值,实验设计与结果见表5所示。

表 5 爬坡实验

Table 5 Steepest ascent design

Run	葡萄糖 (g/L)	谷氨酸钠 (g/L)	酵母粉 (g/L)	氯化铵 (g/L)	磷酸氢二钾 (g/L)	氯化钙 (g/L)	硫酸镁 (g/L)	聚谷氨酸产量 (g/L)
1		60		2	3			29.269
2		62		1.8	2.8			30.692
3		64		1.6	2.6			30.896
4	40	66	3	1.4	2.4	0.4	0.3	32.159
5		68		1.2	2.2			34.806
6		70		1	2.0			32.686

从表 5 中可以看出,随着三个重要因素的趋势性变化, γ -聚谷氨酸产量呈先上升后下降的趋势,并且在第 5 组实验的条件下, γ -聚谷氨酸产量达到最高。因此,选取第 5 组实验条件(即谷氨酸钠、 NH_4Cl 和 K_2HPO_4 的浓度分别为 68g/L,1.2g/L,2.2g/L)作为响应面设计因素水平的中心点。

2.3 Box-Behnken Design 实验

根据最陡爬坡实验的实验结果,运用 Design-export 软件采用 Box-Behnken Design 实验设计,以 γ -聚谷氨酸产量为响应值,寻找培养基中谷氨酸钠、氯化铵和磷酸氢二钾的最佳浓度。Box-Behnken Design 实验的实验设计及结果见表 6,Box-Behnken Design 实验结果方差分析见表 7。

表 6 Box-Behnken Design 实验设计及结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken

Design experiment				
Run	A	B	C	聚谷氨酸产量(g/L)
1	-1	0	-1	29.895
2	1	0	1	31.95
3	0	1	1	30.813
4	0	0	0	36.051
5	0	0	0	36.012
6	-1	-1	0	31.174
7	0	-1	-1	33.799
8	0	0	0	35.671
9	0	1	-1	33.401
10	1	-1	0	34.933
11	1	1	0	33.871
12	1	0	-1	34.357
13	-1	1	0	29.564
14	0	-1	1	33.612
15	-1	0	1	30.901
16	0	0	0	36.194
17	0	0	0	36.302

由表 7 可知,该模型 P 值($P < 0.0001$)小于 0.01,说明不同处理之间差异极显著,表明用回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其应变变量与全体自变

表 7 Box-Behnken Design 结果的统计分析

Table 7 Statistical Analysis of Box-Behnken

Design experiment					
	平方和	df	均方和	F 值	P 值
模型	84.578	9	9.398	49.999	$< 0.0001^{**}$
A(谷氨酸钠)	23.042	1	23.042	122.592	$< 0.0001^{**}$
B(氯化铵)	4.306	1	4.306	22.908	0.0020^{**}
C(磷酸氢二钾)	2.180	1	2.180	11.598	0.0114^{*}
AB	0.075	1	0.075	0.399	0.5475
AC	2.912	1	2.912	15.494	0.0056^{**}
BC	1.441	1	1.441	7.668	0.0277^{*}
A^2	24.162	1	24.162	128.551	$< 0.0001^{**}$
B^2	6.738	1	6.738	35.848	0.0005^{**}
C^2	14.799	1	14.799	78.735	$< 0.0001^{**}$

Note; $R^2 = 0.9847$; Adj $R^2 = 0.9650$; Lack of fit $P = 0.0535$; ** means highly significant difference ($P < 0.01$); * means significant difference($P < 0.05$)

量之间的线性关系显著,并且 R^2 值为 0.9847,说明该模型与实际实验拟合很好,调整后的 R^2 (Adj R^2) 为 0.9650,即表明该模型可以解释 96.50% 的发酵产 γ -聚谷氨酸水平的变化,此外,该模型拟合方程的失拟项 P 值为 $0.0535 > 0.05$,失拟项差异不显著,说明该方程对实验拟合情况好,实验误差小,可以很好的分析将来的数据,综上所述,用该模型模拟变量与响应值之间关系的可靠性较强。

用 Design-export 软件将表 6 中的数据进行二次多项式回归拟合后,实验因子谷氨酸钠、氯化铵和磷酸氢二钾对响应值的影响可用以下回归方程表示:

$$R = -3383.88 + 86.57744 \times A + 81.95563 \times B + 366.6725 \times C + 0.3425 \times AB - 2.13312 \times AC - 15.0063 \times BC - 0.59888 \times A^2 - 31.625 \times B^2 - 46.8687 \times C^2$$

其中 A 代表谷氨酸钠;B 代表氯化铵;C 代表磷酸氢二钾。

为了更直观的观察三因素之间的交互作用及确定 γ -聚谷氨酸产量的最高点,根据上述回归方程及回归模

型方差分析表,利用 Design-expert 软件绘出双因子效应响应面分析图及其等高线(见图 1 到图 3)。每个响应面分别代表着在保持 1 个变量为最优条件下,其他两个独立变量之间相互作用对 γ -聚谷氨酸产量的影响。

由图 1-图 3 的立体分析图可以看出,在一个变量确定的情况下,其他的两个因素之间对 γ -聚谷氨酸产量的影响基本呈抛物线型关系,且均有一个极大值点,

变化趋势都是先增大后减小。从等高线图中可以看出图 1 等高线为近似圆形,而图 2、图 3 呈近似马鞍形,说明图 1 中两因素(氯化铵和谷氨酸钠)的交互作用不显著,而图 2 和图 3 中所代表的磷酸氢二钾和氯化铵以及磷酸氢二钾和谷氨酸钠之间的交互作用显著,这与回归模型中的方差分析结果一致。

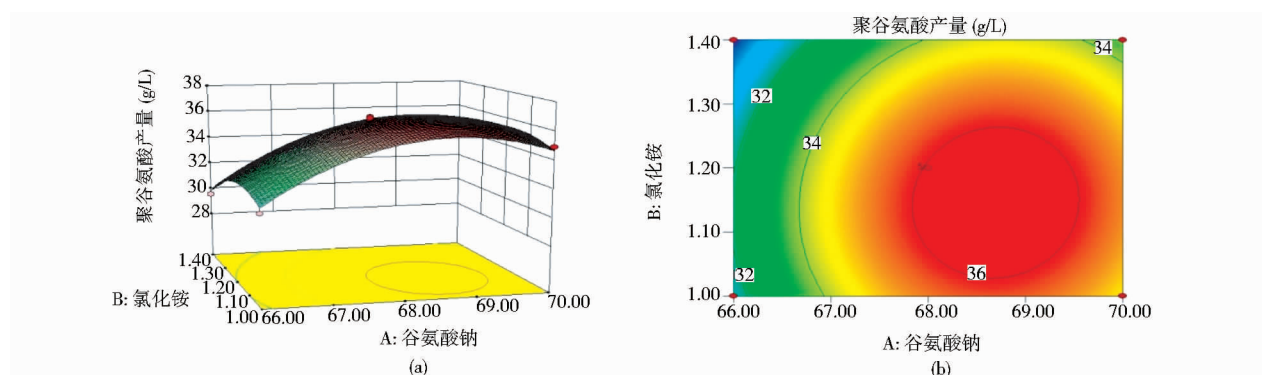


图 1 谷氨酸钠与氯化铵相互作用对 γ -聚谷氨酸产量影响的三维曲面图和等高线图
Fig. 1 3d Surface figure and contour map plots of mutual-influence for sodium glutamate and NH_4Cl on the yield of γ -PGA

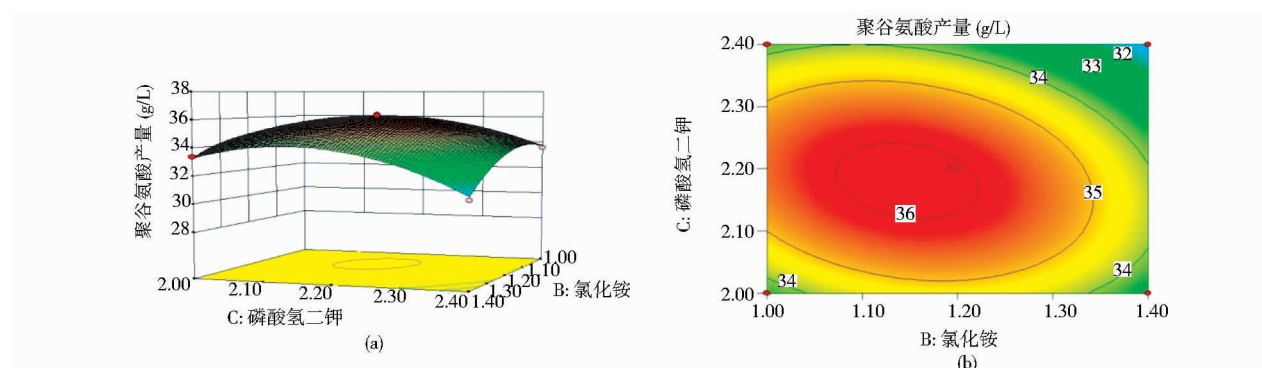


图 2 磷酸二氢钾与氯化铵相互作用对 γ -聚谷氨酸产量的响应面分析图和等高线图
Fig. 2 3d Surface figure and contour map plots of mutual-influence for K_2HPO_4 and NH_4Cl on the yield of γ -PGA

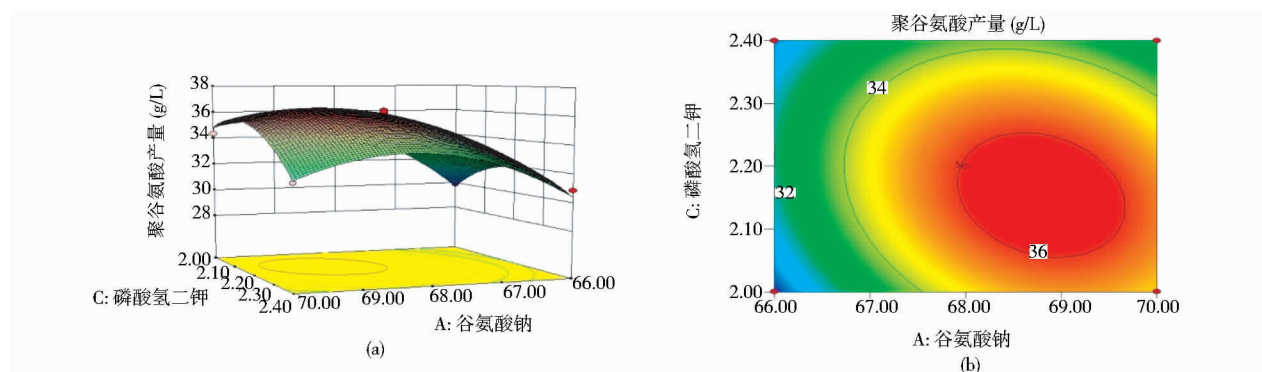


图 3 谷氨酸钠与磷酸二氢钾相互作用对 γ -聚谷氨酸产量的响应面分析图和等高线图
Fig. 3 3d Surface figure and contour map plots of mutual-influence for sodium glutamate and K_2HPO_4 on the yield of γ -PGA

通过分析响应面分析图和等高线图并对方程求一阶偏导数,并令其为0可得到曲面的稳定点,即最大值点:A:68.76;B:1.16;C:2.16。在此条件下 γ -聚谷氨酸产量的理论预测值可达36.5018g/L。

2.4 验证实验

为检验响应曲面法所得结果的可靠性,采用上述

优化条件进行了6组纳豆芽孢杆菌 ZW-2 产 γ -聚谷氨酸平行实验,其验证试验的实验结果见表8所示。从表8中可以看出 γ -聚谷氨酸的平均产量为36.421g/L,与预测值接近,该结果是单因素优化实验结果(γ -聚谷氨酸的产量为23.67g/L)的1.54倍,这说明该模型所得实验结果具有较强的实践意义。

表8 验证实验

Table 8 The verifying experiment

Run	葡萄糖 (g/L)	谷氨酸钠 (g/L)	酵母粉 (g/L)	氯化铵 (g/L)	磷酸氢二钾 (g/L)	氯化钙 (g/L)	硫酸镁 (g/L)	聚谷氨酸产量 (g/L)
1								36.325
2								35.968
3	40	68.76	3.00	1.16	2.16	0.40	0.30	36.762
4								36.536
5								36.702
6								36.235

3 结 论

(1)本文在单因素优化实验基础上,通过 Placket-Burman 试验设计法筛选出对 γ -聚谷氨酸产量影响最大的3个因素:谷氨酸钠、氯化铵和磷酸氢二钾。

(2)在 Placket-Burman 试验设计法的基础上,通过最陡爬坡实验筛选出逼近 γ -聚谷氨酸产量最大区域的3个重要影响因素在发酵培养基中的含量:谷氨酸钠含量为68g/L;氯化铵含量为1.2g/L;磷酸氢二钾的含量为2.2g/L;

(3)通过 Box-Behnken Design 实验设计,得到回归方程和双因子效应响应面分析图及其等高线图,通过分析响应面分析图和等高线图并对方程求最大值得到 γ -聚谷氨酸产量最高的三种主要因素的最佳组合,进而得到纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*) ZW-2 产 γ -聚谷氨酸的最佳培养基组成:葡萄糖40g/L;谷氨酸钠68.76g/L;氯化铵1.16g/L;磷酸氢二钾2.16g/L;氯化钙0.4g/L;硫酸镁0.3g/L,此时 γ -聚谷氨酸的预测产量为36.5018g/L。通过实验进行验证,验证试验的结果(γ -聚谷氨酸的平均产量为36.421g/L)显示响应面优化后 γ -聚谷氨酸的产量大约是优化前的1.54倍,这说明该模型所得的预测结果具有较强的实践意义。

参考文献

[1] 吕忠良. γ -聚谷氨酸(γ -PGA)的分离纯化研究. 杭州:浙江大学材料与化学工程学院,2008.
Lv Z L. Study on separation and purification of poly- γ -glutamic

acid from broth. Hangzhou: Zhejiang University, Department of Materials Sciences and Chemical Engineering,2008.
[2] Meynell G G, Meynell E. The biosynthesis of poly d-glutamic acid, the capsular material of *Bacillus anthracis*. J GEN Microbiol, 1966.43(1):p.119-138.
[3] Bovarnick M. The formation of extracellular d-glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*, J Biol Chem, 1942,145:415-424.
[4] 游庆红,张新民,陈国广,等. γ -聚谷氨酸的生物合成及应用. 现代化工,2002,22(12):56-59.
You Q H, Zhang X M, Chen G G, et al. Biosynthesis and application of poly(γ -glutamic acid). Modern Chemical Industry, 2002,22(12):56-59.
[5] 吴学超,曹新江,冀志霞,等. 聚 γ -谷氨酸高产菌的选育与培养基优化. 微生物学通报,2008,35(10):1527-1531.
Wu X C, Cao X J, Yi Z X, et al. Screening of poly- γ -glutamic acid high productive strain and optimization of fermentation medium. Microbiology, 2008,35(10):1527-1531.
[6] GEP Box, KB Wilson. On the experimental attainment of optimum conditions. Journal of the Royal Statistical Society, 1951, 13(1):1-45.
[7] 王永菲,王成国. 响应面法的理论与应用. 中央民族大学学报(自然科学版),2005,14(3):236-240.
Wang Y F, Wang C G. The application of response surface methodology. Journal of the CUN (Natural Sciences Edition), 2005,14(3):236-240.
[8] 张泽志,韩春亮,李成未. 响应面法在实验设计与优化中的应用. 河南教育学院学报(自然科学版),2011,20(4):34-37.
Zhang Z ZH, Han CH L, Li CH W. Application of response surface method in experimental design and optimization. Journal of Henan Institute of Education (Natural Science Edition), 2011,20(4):

- 34-37.
- [9] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika*, 1946, 33(4) :305-325.
- [10] 郝晓财,余晓斌,刘志钰,等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用. *食品研究与开发*, 2006, 27(1) :38-41.
- Hao X C, Yu X B, Liu ZH Y, et al. The application of response surface methodology in optimization of microbial media. *Food Research and Development*, 2006, 27(1) :38-41.
- [11] Fernanda F, Béal C, Corrieu G. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, 2001, 43(3) :189- 198.
- [12] 张晓萍,杨静,勇强,等. 响应面优化法在纤维素酶合成培养基设计上的应用. *林产化学与工业*, 2010, 30(3) :29-34.
- Zhang X P, Yang J, Yong Q, et al. Statistical optimization of process parameters on cellulase production. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2010, 30(3) :29-34.
- [13] 潘春梅,樊耀亭,赵攀. 发酵法产氢培养基的响应面分析优化. *农业生物技术科学*, 2008, 24(1) :38-44.
- Pan CH M, Fan Y T, Zhao P. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by clostridium sp. *Fanp2. Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(1) :38-44.
- [14] 曹小红,蔡萍,李凡,等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(4) :59-65.
- Cao X H, Cai P, Li F, et al. Medium optimization for lipopeptide produced by *Bacillus natto* TK-1 using response surface methodology. *China Biotechnology*, 2007, 27(4) :59-65.
- [15] 汪彬彬,车振明. Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 实验设计法优化华根霉产糖化酶发酵培养基的研究. *食品科技*, 2011, 36(5) :41-45.
- Wang B B, Che Z M. Optimization of rhizopus fermentation medium for glucoamylase production by Plackett and Box-Behnken Design. *Food Science and Technology*, 2011, 36(5) :41-45.
- [16] 张艳丽,高华,刘小红. 微生物合成的聚谷氨酸及其应用. *生物技术通报*, 2008, 4:58-62.
- Zhang Y L, Gao H, Liu X H. Biosynthesis and application of polyglutamic acid. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 4:58-62.
- [17] 王勇,伊玉森,张远征. 无机盐及微量元素对谷氨酸发酵的影响. *发酵科技通讯*, 2004, 33(3) :2-3.
- Wang Y, Yi Y S, Zhang Y ZH. *FAJIAO KEJI TONGXUN*, 2004, 33(3) :2-3.

The Optimization Research of Fermentation Medium of γ -Polyglutamic Acid(γ -PGA) Produced by *Bacillus natto*

ZHANG Wen^{1,2} ZHANG Shu-qing^{1,2} MA Xiao-tong¹ HE Cui-cui¹

(1 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081, China)

(2 Plant Nutrition Laboratory, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China)

Abstract Optimization of fermentation medium for *Bacillus natto* ZW-2 to produce γ - polyglutamic acid (γ -PGA) was studied to increase the yield of γ -polyglutamic with the shaking-flask culture. With Design-Expert software, Plackett-Burman Design was used to evaluate the effect of the factors on *Bacillus natto* ZW-2 to produce γ -PGA based on single-factor optimization experiment. Then steepest ascent experiments was designed to approach the maximum production area of γ -PGA. At last, Box-Behnken experiment was used to get the optimal fermentation medium. The results showed that the optimal composition was sodium glutamate 68.76g/L, NH_4Cl 1.16g/L, K_2HPO_4 2.16g/L. On this condition the average yield of the verifying experiment was 36.421g/L, which was 1.54 times the original medium. Plackett-Burman design and Box-Behnken Design were simultaneously used in the optimization of the fermentation of *Bacillus natto* ZW-2 to produce γ -PGA, which was proved to be effective and economical.

Key words γ - polyglutamic acid Design-export Software Response surface methodology