

利用响应面法优化丙酮酸发酵培养基

张健 高年发

(天津市工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津,300222)

摘 要 采用响应面法对丙酮酸产生菌光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) TP19 的发酵培养基进行了优化。用 Plackett-Burman 方法对影响发酵各因素的效应进行评价,筛选出有显著效应的 3 个因素:硫酸铵、葡萄糖和烟酸;通过中心组合实验及响应面分析优化了这 3 个主要因素。采用优化后的条件进行摇瓶发酵,丙酮酸产量为 42.4 g/L。进行 5L 自控发酵罐发酵,丙酮酸产量为 44.8 g/L,比优化前提高了 16.2%。

关键词 响应面设计法,光滑球拟酵母,丙酮酸,发酵

丙酮酸是最重要的 α -氧代羧酸之一。它不仅生物能量代谢中具有十分重要的作用,而且是合成多种有用化合物的前体,因而在化工、制药和农用化学品等工业及科学研究中有着广泛的用途^[1]。随着丙酮酸应用范围的不断扩大,丙酮酸的市场需求也在不断增长。目前,工业上生产丙酮酸的方法主要是酒石酸脱水脱羧法^[2]。该法虽然操作简单易行,但存在底物转化率低、成本高、环境污染严重等缺点,因而限制了丙酮酸的推广应用。而发酵法生产丙酮酸成本低廉、产品纯度高、反应条件温和、环境污染较小,是扩大丙酮酸应用领域的根本途径,具有广阔的前景,已成为研究的热点^[3]。

本实验室在近几年研究工作中,选育出 1 株丙酮酸高产菌株 *Torulopsis glabrata* TP19,在此基础上,利用响应面分析法对该菌株的发酵培养基进行了优化。旨在提高丙酮酸的产量,降低生产成本,为后续放大实验提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) TP19($\text{NA}^- + \text{Bio}^- + \text{TPP}^- + \text{Pdx}^-$),天津科技大学有机酸教研室保藏菌种。

1.2 培养基

种子培养基:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 10 g/L,玉米浆 5 mL/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

发酵培养基:葡萄糖 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L,烟酸 8 mg/L,盐酸硫胺素 20 $\mu\text{g/L}$,生物素 10 $\mu\text{g/L}$,盐酸吡哆醇

0.5 mg/L,金属离子母液 5 mL/L。

金属离子母液: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g, ZnCl_2 5g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 2 mol/L HCl 溶解后定溶至 1L。

1.3 培养方法

种子培养:取新鲜斜面菌种 1 环,接入 50 mL 种子培养基(500 mL 锥形瓶)中,30℃,200 r/min 振荡培养 18 h。

发酵:以 10% 的接种量接入发酵培养基,30℃,200 r/min 培养 12 h 后加入已干热灭菌的 CaCO_3 30 g,60 h 时取样测量丙酮酸含量。5 L 发酵罐采用 10% 接种量,装液量 3L,通风量 1 L/(L·min),发酵温度 30℃,通过调节搅拌转速控制溶氧(DO)值为 80%。自动流加 8 mol/L NaOH 溶液控制发酵液 pH 为 5.0 ± 0.05 ,发酵过程中自动补加已灭菌的泡敌迅速消泡,培养 60 h 后测发酵液中的丙酮酸含量。

1.4 分析方法

采用高效液相色谱法。取 10 mL 丙酮酸发酵液,离心(4 000 r/min,10 min)除去菌体,取 5 mL 离心后的上清液置于 500 mL 容量瓶中,加入 5 mL 0.01 mol/L 的 H_2SO_4 进行酸解,使有机酸游离出来,定容并取适量以 0.45 μm 孔径的滤膜过滤即得到待测液。采用反相色谱柱 ODS-2 HYPERSIL(250mm \times 4.6 mm, 5 μm),以 0.05 mol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (用 H_3PO_4 调 pH 2.6)作为流动相,流速 1 mL/min,在波长 215 nm 下检测。

1.5 实验设计

1.5.1 Plackett-Burman 实验设计^[4-6]

实验中选用 N=12 的 PB 设计,把每个因素设计成高(+1)和低(-1)2 个水平。金属离子母液按已优化配方恒定 5 mL/L。实验设计见表 1,各因素所代表的参数、水平见表 2。

第一作者:硕士,助理研究员。

收稿日期:2006-05-17,改回日期:2006-06-20

表 1 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计与结果

序号	因 素								丙酮酸含量 /g·L ⁻¹
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	32.5
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	36.3
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	36.9
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	35.0
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	38.5
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	40.2
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	36.8
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	33.4
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	32.6
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	35.3
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	34.1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	31.8

在中心点的值,Δ*x_i* 为自变量变化步长。用标准多项式回归方法,对实验数据进行拟合,便得 1 到一个二次多项式,该方程为描述响应量(应变量) 自变量关系的经验模型。对于 2 因子系统,模型可描述为:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

式中, Y 为预测响应值,β₀ 为截距,β_{*i*} 为线性系数,β_{*ii*} 为平方系数,β_{*ij*} 为交互作用系数。

用 SAS 8.01 程序对实验数据进行回归拟合,并对拟合方程作显著性检验及方差分析。所得拟合方程(2)分别对各自变量求偏导数,得到方程(3)。

$$\frac{dY}{dX_i} = 0 \quad (3)$$

1.5.2 中心组合实验^[7~9]

采用中心组合设计(central composite design , CCD),对 PB 实验筛选到的关键因子进一步研究,以获得影响该菌发酵产丙酮酸的优化培养基。自变量按下式进行编码变换:

$$X_i = (x - x_0)/\Delta x_i; i = 1, 2, 3, \cdots, K \quad (1)$$

式中, X_{*i*} 为自变量 *x_i* 的编码值, *x₀* 为自变量 X_{*i*}

2 结果与讨论

2.1 影响纳丙酮酸发酵的重要因素

按表 1 设计进行了 2 轮重复实验,发酵 60 h 取样测定丙酮酸,并取 2 次测量的平均值计算各因素效应,进行重要性评价,见表 2。

表 2 各因素的主要效应

实验因素		水平		T-test	Pr > t	重要性排序
		-1	+1			
X ₁	葡萄糖/g·L ⁻¹	80	100	4.115 738	0.025 987	2
X ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄ /g·L ⁻¹	8	10	7.489 294	0.004 931	1
X ₃	KH ₂ PO ₄ /g·L ⁻¹	1	1.5	2.091 605	0.127 582	4
X ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O/g·L ⁻¹	0.5	1.5	0.607 24	0.586 569	8
X ₅	烟酸/mg·L ⁻¹	6	7.5	3.508 498	0.039 24	3
X ₆	盐酸硫胺素/μg·L ⁻¹	20	25	1.551 836	0.218 503	6
X ₇	生物素/μg·L ⁻¹	10	15	-0.742 18	0.511 803	7
X ₈	盐酸吡哆醇/mg·L ⁻¹	0.4	0.6	-1.754 25	0.177 662	5

由表 2 可知,对丙酮酸发酵过程有显著影响(可信度大于 90 %)的因素包括硫酸铵、葡萄糖和烟酸。由各因素效应还可看出,要提高产酶量,应该提高硫酸铵浓度,葡萄糖浓度和烟酸浓度。

表 3 中心组合实验中变量及其水平

因素	水 平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X ₂ /g·L ⁻¹	8.318	9	10	11	11.682
X ₁ /g·L ⁻¹	83.18	90	100	110	116.82
X ₅ /mg·L ⁻¹	5.818	6.5	7.5	8.5	9.182

2.2 响应面实验优化发酵条件

通过二次回归的旋转中心结合设计,对 PB 实验筛选到的 3 个显著因素进行寻优,以丙酮酸的产量为响应值,对应于因变量 Y。因为有 3 个自变量,为使

拟合响应方程具有旋转性和通用性,选择中心点实验数为 6,星号臂长 γ= 1. 682。各自变量水平见表 3,实验设计及结果见表 4。

表 4 中心组合实验设计及结果

批次	因 素			丙酮酸(Y) /g·L ⁻¹
	X ₂	X ₁	X ₅	
1	-1	-1	-1	37.9
2	-1	-1	1	38.2
3	-1	1	-1	39.8
4	-1	1	1	40.5
5	1	-1	-1	39.3
6	1	-1	1	40
7	1	1	-1	40.2
8	1	1	1	41.7
9	-1.681 79	0	0	39.8
10	1.681 79	0	0	41.8
11	0	-1.681 79	0	38.2
12	0	1.681 79	0	42.4
13	0	0	-1.681 79	39.5

续表 4

批次	因 素			丙酮酸(Y) /g·L ⁻¹
	X ₂	X ₁	X ₅	
14	0	0	1.681 79	39.8
15	0	0	0	41.3
16	0	0	0	41.2
17	0	0	0	41.5
18	0	0	0	41.6
19	0	0	0	41.4
20	0	0	0	41.4

$$X_2 = (x_2 - 10)/1, X_i = (x_i - 100)/10;$$

$$x_5 = (x_5 - 7.5)/1$$

通过 SAS 8.01 软件对表 2 实验数据进行二次多项回归拟合,获得回归方程为:

$$Y = 41.416 + 0.598X_2 + 1.015X_1 + 0.27X_5 - 0.31X_2^2 - 0.2X_2X_1 + 0.15X_2 - 0.49X_1^2 + 0.15X_1X_5 - 0.72X_5^2$$

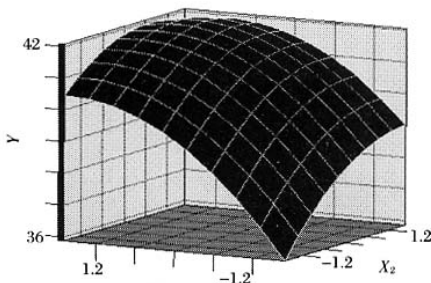
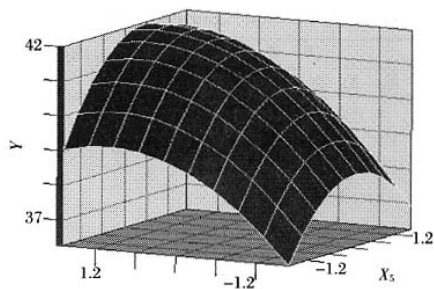
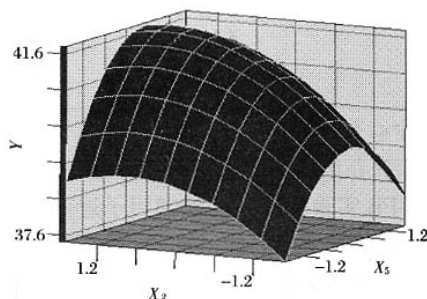
该二次回归方程的方差分析结果见表 5。

表 5 丙酮酸浓度二次多项模型的方差分析表

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
Model	9	31.274 06	3.474 895	20.399 27	0.000 1
Error	10	1.703 441	0.170 344		
Total	19	32.977 5			

由该方程的方差分析可见,该模型极显著($F = 20.39927 > F_{0.01}(9, 10) = 4.94$),确定系数 $R_2 = 94.83\%$,表明模型与实际情况拟合很好。因此该模型可用于分析和预测发酵过程中丙酮酸的产量。

图 1~图 3 为响应面分析的立体图,从图中可直观地看出各因子对响应值的影响变化趋势,而且回归模型确实存在最大值。求解方程 3 组成的方程组,可得模型极值点坐标: $X_2 = 0.749 8(10.75 \text{ g/L})$, $X_1 = 0.938 3(109.38 \text{ g/L})$, $X_5 = 0.363 3(7.86 \text{ mg/L})$,此时模型预测的最大值为 42.2 g/L 。为了检验模型预测的准确性,在优化的条件下进行发酵实验,所得丙酮酸产量分别为 42.4 g/L ,可见该模型能较好地预测实际发酵情况。

图 1 $Y = f(X_1, X_2)$ 响应面立体图图 2 $Y = f(X_1, X_5)$ 响应面立体图图 3 $Y = f(X_2, X_5)$ 响应面立体图

3 结 论

通过优化发现,在丙酮酸的发酵过程中, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、葡萄糖、烟酸起着重要作用,是显著因素。优化后发酵培养基为:葡萄糖 109.38 g/L , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 10.75 \text{ g/L}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 1.25 \text{ g/L}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} 1 \text{ g/L}$,烟酸 7.86 mg/L ,盐酸硫胺素 $22.5 \mu\text{g/L}$,生物素 $12.5 \mu\text{g/L}$,盐酸吡哆醇 0.5 mg/L ,金属离子母液 5 mL/L 。在此发酵培养基的基础上,进行 500 mL 摇瓶发酵,丙酮酸的产量为 42.4 g/L 。进行 5 L 自控发酵罐发酵,丙酮酸的产量为 44.8 g/L ,比优化前提高了 16.2% 。

采用优化的丙酮酸摇瓶发酵培养基,摇瓶发酵产量已达较高水平,这说明该菌株具有很好的生产丙酮酸的潜力,响应面法优化发酵条件卓有成效。罐上产量与已报道的先进水平(发酵 56 h 产丙酮酸 $69.4 \text{ g/L}^{[10]}$)还有差距,相信通过优化上罐条件,控制溶氧,采用补料发酵解除高初糖浓度对产酸的抑制等手段,可进一步提高丙酮酸产量。

参 考 文 献

- 1 Uchio R, Kikuchi K, Hirose Y. Process for producing pyruvic acid by fermentation[P]. USPatent, 3 993 543. 1976
- 2 Howard J W, Fraser W A. Preparation of pyruvic acid [J]. Org Synth Coll, 1932(1):475~480

- 3 Li Y Chen, J Lun S Y. Biotechnological production of pyruvic acid [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57: 451~459
- 4 Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments [J]. Biometrika, 1946, 33: 305~325
- 5 Rama Mohan Reddy, Reddy P, Seenayya G. Production of thermostable α -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: Screening of nutrients using Plackett-Burman design [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1999, 21: 175~179
- 6 Chuanbin Liu, Yan Liu, Wei Liao, et al. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25: 877~882
- 7 Xin Chen, Yin Li, Guocheng Du et al. Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21: 593~599
- 8 Adinarayana K, Ellaiah P. Response surface optimization of the critical medium components for this production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. [J]. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, 2002, 5: 272~277
- 9 Chakravarti, R. & Sahai, V. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods [J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 481~486
- 10 Li Y, Chen J, Lun S Y. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 101~106

Application of Response Surface Methodology in Medium Optimization for Pyruvic Acid Production

Zhang Jian Gao Nianfa

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

ABSTRACT The fermentation medium of (*Torulopsis glabrata*) TP19 producing pyruvic acid was optimized by using response surface methodology (RSM). In the first step of optimization, with Plackett-Burman design, ammonium sulfate, glucose and nicotinic acid were found to be the important factors affecting pyruvic acid production significantly. In the second step, a 2^3 central composite design and RSM were applied to determine the optimal concentration of each significant variable. The optimized medium allowed pyruvic acid yield to 42.4 g/L in flask-shaking batch fermentation to 44.8 g/L in 5L fermentor and was increased by 16.2 %.

Key words response surface methodology, *Torulopsis glabrata*, pyruvic acid, fermentation

政策法规标准

《蜜饯通则》有望出台

《蜜饯通则》国家标准专家审定会,日前在北京召开。标准起草单位是中国焙烤食品糖制品工业协会、中国食品工业发酵研究院、广东家宝集团有限公司、广东雅仕利集团有限公司、福建东方食品集团、北京红螺集团、北京御食园食品有限公司、河北怡达食品有限公司、河北石家庄永兴果脯厂、山东滕州荆河酒业果脯厂、山西维之王食品有限公司。

会议认为:标准起草工作组在制标过程中进行了行业调研,国内相关标准查询,样品分析测试、数据统计分析及广泛征求意见等工作。在大量研究的基础上,经反复多次修改标准草案,最后提出标准送审稿。制标基础工作扎实,所提供的资料和数据完整,依据充分,文本编写规范,符合制标程序。

该标准密切结合我国生产实际情况,制定的各项指标合理,体现了科学性、先进性和可操作性原则,达到了国内先进水平。经与会专家认真审议,原则通过标准送审稿,形成标准报批稿,作为“推荐性国家标准”按程序上报。