

重组大肠杆菌厌氧发酵产丁二酸培养条件的优化*

姜 岷,王益娜,陈可泉,马江锋,李 建,刘忠敏

(南京工业大学制药与生命科学学院,材料化学工程国家重点实验室,江苏 南京,210009)

摘 要 采用 Plackett-Burman 设计法(Plackett-Burman, PB)对影响 *Escherichia coli* NZN111(*sfcA*)厌氧发酵生产丁二酸的 11 个因子进行了筛选。结果表明,影响该菌厌氧发酵生产丁二酸的主要影响因子为乙酸钠、 $MgCO_3$ 、接种量、诱导剂 IPTG 加入时间和发酵周期。在此基础上采用响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)对这 5 个因子的影响进行了研究,得出多元二次回归方程拟合的 5 种因素与丁二酸产量间的函数关系,并根据优化结果与实验验证,当初始葡萄糖浓度为 22 g/L,乙酸钠 1 g/L, $MgCO_3$ 17 g/L,接种量 10%,IPTG 初始时加入,发酵周期 76 h 时,丁二酸产量从原始发酵培养条件下的 11.84 g/L 提高到 15.64 g/L,收率从 53.8% 提高到 71.1%。

关键词 *E. coli* NZN111,丁二酸,Plackett-Burman 设计法,响应曲面法

丁二酸又称琥珀酸,是生物炼制产品中重要的平台化合物,微生物发酵法生产丁二酸具有利用可再生资源、固定温室气体 CO_2 等优点,近年来越来越引起人们的关注^[1~3]。目前利用野生菌生产丁二酸虽然获得了较高的产量和生产速率,但在发酵过程中对培养基成分要求较高,原料成本比较昂贵,这些问题限制了发酵法生产丁二酸的工业化进程。

大肠杆菌具有培养条件简单,代谢网络明确,易改造,易操作等特点已成为生物法合成丁二酸的研究热点。其中 Stols 等人将大肠杆菌中 NAD^+ 依赖的苹果酸酶过量表达于 NZN111 后几乎进行单一的丁二酸发酵,初始 20 g/L 葡萄糖产生 12.8 g/L 丁二酸,收率达到 64%。Hong 等人选择还原性糖山梨醇作为碳源,当以 CO_2 为气相时,20 g/L 山梨醇发酵产生 10 g/L 丁二酸,收率达到 50%^[4~7]。本实验室通过将苹果酸酶过量表达于 *E. coli* NZN111 中,能够在厌氧条件下发酵生产丁二酸,现对其培养条件进行优化。

运用统计学方法筛选关键影响因子,构建产物数学模型已经应用于很多领域,其中运用数学软件进行发酵条件优化具有很多优势^[8~9]。本研究采用 Plackett-Burman 设计法和响应曲面法对重组大肠杆菌厌氧发酵产丁二酸的培养条件进行优化,找出影响丁二酸产量的关键因子,为进一步研究丁二酸的代谢分析奠定基础。

第一作者:博士,副研究员。

* 国家高科技发展计划“863”(No. 2006AA02Z235),国家自然科学基金资助(No. 20606017),国家自然科学基金重点项目(No. 20336010),江苏省高校自然科学基金研究计划(No. 05KJB180043)

收稿日期:2008-03-20,改回日期:2008-06-23

1 材料与amp;方法

1.1 生产菌株

E. coli NZN111 (F - $\Delta pfl:: Cam, ldhA:: Kan$)/pTrc99a-*sfcA*(材料化学工程国家重点实验室构建并保藏)。

受体菌 *E. coli* NZN111 由 David P. Clark 教授(Southern Illinois University)惠赠,其中编码丙酮酸甲酸裂解酶的 *pfl* 基因和乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因分别被带有氯霉素和卡那霉素抗性基因的片断插入失活。表达载体 pTrc99a-*sfcA* 由材料化学工程国家重点实验室构建并保藏,其中带有氨苄青霉素抗性的基因。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 为 7.0。

1.2.2 初始发酵培养基

葡萄糖 22 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,NaCl 10 g/L, $MgCO_3$ 15 g/L,乙酸钠 1.5 g/L,氨苄青霉素 100 $\mu g/mL$,氯霉素和卡那霉素硫酸盐各 30 $\mu g/mL$,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)0.01mmol/L。

Plackett-Burman 实验发酵培养基按照表 1 所示进行配制,pH 为 7.0。

响应面实验发酵培养基按照表 2 所示配制,pH 为 7.0。

1.2.3 培养方法

培养基在 121 $^{\circ}C$ 条件下灭菌 15 min。有氧培养条件为 37 $^{\circ}C$,180 r/min。选择有氧条件下处于对数

生长期后期的菌种接入装有 30 mL 培养基的血清瓶 (100 mL) 中,向培养基中通入经过 0.22 μm 滤器后的 CO₂ 气体 2 min,30 ℃,150 r/min 厌氧培养。

1.3 丁二酸含量的测定

采用高效液相色谱法 (HPLC),见参考文献 [10]。

1.4 实验设计

实验设计、数据分析及模型建立皆采用 Statistica 软件来进行。

1.4.1 Plackett-Burman 实验设计

根据大肠杆菌厌氧发酵所需营养元素的一般原则以及微生物发酵影响因素的一般规律,结合相关的文献报道和前期的单因子实验,确定各因子的实验水平如表 1 所示。

1.4.2 响应曲面 (RSM) 实验设计

筛选出影响重组大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的关键影响因子后,采用旋转中心组合设计 (Central

Composite Rotatabl Design, CCRD) 法,对其关键因子进一步研究,以获得影响该菌厌氧发酵产丁二酸的最佳培养条件。由 Plackett-Burman 实验结果可知,影响重组大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的关键影响因子为乙酸钠、MgCO₃、接种量、IPTG 加入时间和发酵周期。以这 5 个因子作为变量,采用旋转中心组合设计的各因子的实验水平如表 2 所示。

表 1 Plackett-Burman 实验因子水平及编码

序号	变量	符号	编码水平	
			-1	1
1	蛋白胨 /g · L ⁻¹	X ₁	10	20
2	酵母膏 /g · L ⁻¹	X ₂	5	10
3	氯化钠 /g · L ⁻¹	X ₃	5	10
4	乙酸钠 /g · L ⁻¹	X ₄	1.5	3
5	碳酸镁 /g · L ⁻¹	X ₅	15	25
6	IPTG 浓度 /mmol · L ⁻¹	X ₆	0	0.01
7	CO ₂ 通气时间 /min	X ₇	2	4
8	转接 OD ₆₀₀	X ₈	2.6	3.9
9	接种量 /%	X ₉	2	10
10	IPTG 加入时间 /h	X ₁₀	0	16
11	发酵周期 /h	X ₁₁	48	72

表 2 旋转中心组合设计实验因子水平及其编码表

编码值	(X ₁)乙酸钠/g · L ⁻¹	(X ₂)碳酸镁/g · L ⁻¹	(X ₃)接种量/%	(X ₄)IPTG加入时间/h	(X ₅)发酵周期/h
2	2.5	20	30	28	90
1	2.0	18	20	22	78
0	1.5	16	10	16	66
-1	1.0	14	4	6	54
-2	0.5	12	2	0	42

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 实验设计方法确定产丁二酸的关键因子

通过 Plackett-Burman 实验设计来确定产丁二酸的关键影响因子,以丁二酸的产量为响应值,实验结果和各因子的效应及重要性评价见表 3 和表 4。

表 3 Plackett-Burman 实验设计与结果

序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	丁二酸产量 /g · L ⁻¹
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	13.63
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	12.32
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	13.13
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	12.91
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	10.90
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	9.30
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	11.30
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	8.76
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	11.00
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	12.24
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	13.23
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10.81

表 4 因子及其效应

序号	变量	系数	SS	显著性
1	蛋白胨 /g · L ⁻¹	0.255 36	0.782 51	
2	酵母膏 /g · L ⁻¹	0.069 42	0.057 84	
3	NaCl /g · L ⁻¹	-0.122 36	0.179 66	
4	乙酸钠 /g · L ⁻¹	-0.428 44	2.202 71	+
5	MgCO ₃ /g · L ⁻¹	-0.737 62	6.528 96	+
6	IPTG 浓度 /mmol · L ⁻¹	0.035 64	0.015 25	
7	CO ₂ 充气时间 /min	0.050 36	0.030 44	
8	转接 OD ₆₀₀	-0.254 56	0.777 63	
9	接种量 /%	0.641 95	4.945 14	+
10	IPTG 加入时间 /h	0.470 91	2.661 06	+
11	发酵周期 /h	0.839 05	8.448 11	+

2.2 响应曲面法优化产丁二酸的培养条件

2.2.1 产丁二酸多元二次模型方程的建立和检验

以乙酸钠、 $MgCO_3$ 、接种量、IPTG 加入时间和发

酵周期为自变量,丁二酸产量为响应值,设计旋转中心组合实验,设计及其结果见表5。

表5 旋转中心组合实验设计及其结果

序号	(X_1)乙酸钠 /g·L ⁻¹	(X_2)碳酸镁 /g·L ⁻¹	(X_3)接种量 /%	(X_4) IPTG 加入 时间/h	(X_5)发酵周期 /h	丁二酸产量 /g·L ⁻¹
1	-1	-1	-1	-1	1	13.56
2	-1	-1	-1	1	-1	11.51
3	-1	-1	1	-1	-1	13.05
4	-1	-1	1	1	1	13.64
5	-1	1	-1	-1	-1	13.78
6	-1	1	-1	1	1	13.30
7	-1	1	1	-1	1	14.88
8	-1	1	1	1	-1	14.34
9	1	-1	-1	-1	-1	13.34
10	1	-1	-1	1	1	12.26
11	1	-1	1	-1	1	14.00
12	1	-1	1	1	-1	13.09
13	1	1	-1	-1	1	14.14
14	1	1	-1	1	-1	11.68
15	1	1	1	-1	-1	14.17
16	1	1	1	1	1	14.18
17	-2	0	0	0	0	13.92
18	2	0	0	0	0	12.98
19	0	-2	0	0	0	9.86
20	0	2	0	0	0	13.14
21	0	0	-2	0	0	13.07
22	0	0	2	0	0	14.52
23	0	0	0	-2	0	15.66
24	0	0	0	2	0	14.54
25	0	0	0	0	-2	11.84
26	0	0	0	0	2	15.43
27	0	0	0	0	0	14.48

对实验数据进行回归分析,得出丁二酸产量的模型方程为:

$$Y = 15.1441 - 0.1161X_1 + 0.5251X_2 + 0.5437X_3 - 0.4398X_4 + 0.4940X_5 - 0.3480X_1^2 - 0.8359X_2^2 - 0.4089X_3^2 + 0.1739X_4^2 - 0.3018X_5^2 - 0.1924X_1X_2 + 0.0261X_1X_3 - 0.1319X_1X_4 - 0.0251X_1X_5 + 0.0605X_2X_3 - 0.0369X_2X_4 + 0.0042X_2X_5 + 0.3422X_3X_4 - 0.1008X_3X_5 + 0.0789X_4X_5$$

对回归方程中影响作用显著的因子进行方差分析,其中影响不显著的因子暂不予考虑。结果见表6。

表6 回归方程中显著影响因子的方差分析

	自由度	均方	F值	P值
X_2	1	6.487 14	9.726 54	0.020 618
X_2^2	1	14.953 63	22.420 86	0.003 208
X_3	1	5.459 5	8.185 84	0.028 761
X_5	1	5.742 05	8.609 40	0.026 145

方程的回归系数为 $R^2=0.90439$,说明所拟合的

方程较合适。通过方差分析可知,模型方程的一次项系数影响显著,交互项影响不显著。

2.2.2 产丁二酸响应曲面交互作用分析与优化

由于发酵过程中 $MgCO_3$ 、接种量和发酵周期对丁二酸产量的影响比较显著,响应曲面实验结果中这3种因素的响应曲面图及其等高线图见图1~图3,其中取无水乙酸钠浓度为1 g/L, IPTG 加入时间为0。

由以上的响应曲面图及等高线图可知,3因素的交互作用并不显著。当 $MgCO_3$ 的浓度为16.5~17 g/L,接种量为10%~12%、发酵周期为72~78 h时,理论上将获得最大的丁二酸产量。

为了计算上的方便,不显著的影响因子不予考虑,当乙酸钠为1 g/L, $MgCO_3$ 17 g/L,接种量10%, IPTG 初始时加入,发酵周期76 h时,丁二酸的产量理论上为最大值。经实验验证,得到的丁二酸产量为15.64 g/L,而在原始发酵条件下,丁二酸产量为

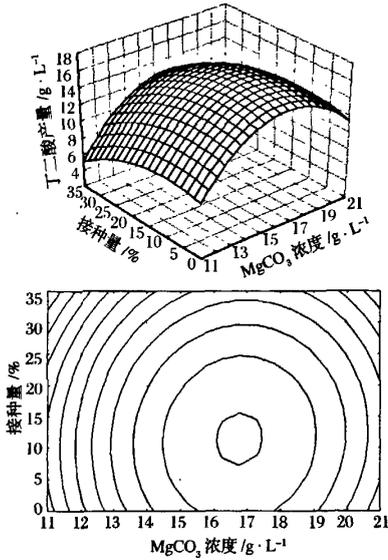


图1 碳酸镁与接种量交互作用影响丁二酸产量的曲面图和等高线图

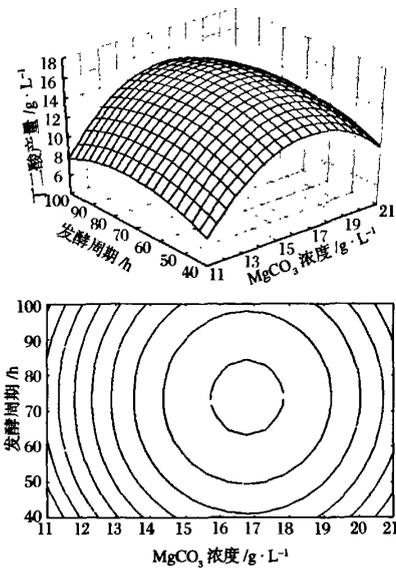


图2 碳酸镁与发酵周期交互作用影响丁二酸产量的曲面图和等高线图

11.84 g/L,与前者相比,丁二酸收率(定义为1g葡萄糖产丁二酸的质量,表示为百分数)从53.8%提高到71.1%。

3 结论

采用 Plackett-Burman 设计法和响应曲面法确定影响重组大肠杆菌 NZN111 厌氧发酵生产丁二酸的主要影响因子,并得出 5 种因素与丁二酸产量间的多元二次回归方程,通过实验验证,当初始葡萄糖浓

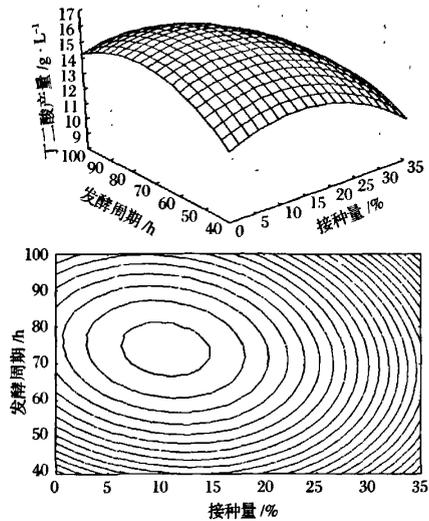


图3 接种量与发酵周期交互作用影响丁二酸产量的曲面图和等高线图

度为 22 g/L,乙酸钠 1 g/L, $MgCO_3$ 17 g/L,接种量 10%,IPTG 初始时加入,发酵周期 76 h 时,丁二酸产量达到 15.64 g/L,收率为 71.1%。

相对野生型丁二酸生产菌株, *E. coli* NZN111 存在产量相对较低、发酵周期较长的问题。今后研究的重点将对大肠杆菌进行代谢分析并进一步改造,提高其生产性能,达到丁二酸的高效生产。

参 考 文 献

- 1 Zeikus J G, Jain M K, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51:545~552
- 2 Willke T, Vorlop K D. Industrial Bioconversion of Renewable Resources as an Alternative to conventional Chemistry [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 66:131~142
- 3 Song H, Lee S Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39:352~361
- 4 Stols L, Donnelly M I. Expression of Ascaris suum Malic Enzyme in a Mutant *Escherichia coli* Allows Production of Succinic Acid from Glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, 65:153~158
- 5 Stols L, Donnelly M I. Production of Succinic Acid through overexpression of NAD-dependant malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63:2 695~2 700
- 6 Hong S H, Lee S Y. Metabolic flux analysis for succinic

- acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 74:89~95
- 7 Hong S H, Lee S Y. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58:286~290
- 8 Jasmine I, Lata A, Saurabh S, et al. A statistical method for enhancing the production of succinic acid from *Escherichia coli* under anaerobic conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97:1 443~1 448
- 9 Lata A, Jasmine I, Saxena K, et al. Statistical Optimization for Succinic Acid Production from *E. coli* in a Cost-Effective Medium[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 142:158~167
- 10 陈可泉, 韦萍, 蔡婷, 等. 反相高效液相色谱在发酵制备琥珀酸中的应用[J]. *生物加工过程*, 2005, 3(2):50~52

Optimization of the Culture Conditions for Succinic Acid Production by Anaerobic Fermentation of Recombinant *Escherichia coli*

Jiang Min, Wang Yina, Chen Kequan, Ma Jiangfeng,
Li Jian, Liu Zhongmin

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of eleven factors for succinic acid production by *Escherichia coli* NZN111(sfcA). The results showed the following key factors: sodium acetate, magnesium carbonate, inoculum size, time length of adding IPTG and incubation period. Based on these results, response surface methodology (RSM) was applied for further optimizing these parameters in order to find out the optimum concentration levels. The concentration of succinic acid could reach 15.64g/L, compared to the initial 11.84 g/L, and the yield was enhanced from 53.8 % to 71.1 % with the initial glucose concentration of 22 g/L, 1 g/L of acetate, 17 g/L of magnesium carbonate, 10 % of inoculum size, IPTG initially added and incubation period of 76 h.

Key words *E. coli* NZN111, succinic acid, Plackett-Burman design, response surface methodology

行业动态

广西检验检疫局“厌氧菌活菌计数培养平板”获国家专利

广西检验检疫局技术中心发明的“厌氧菌活菌计数培养平板”被授予国家专利权。

厌氧菌是正常菌群的主要组成部分,广泛存在于人体皮肤和腔道的深部黏膜表面,它可引起人体任何组织和器官的感染。在组织缺血、坏死,或者需氧菌感染的情况下,导致局部组织的氧浓度降低,即发生厌氧菌感染。其引起病症如气性坏疽、破伤风、肉毒中毒等。按其耐氧程度的不同,可分为专性厌氧菌、微需氧厌氧菌和兼性厌氧菌。

在实际工作中有2种情况需要作厌氧菌活菌计数,一种情况是有益微生物制剂的质量监测,如确定光合细菌菌型中有效活菌数、检测乳酸菌发酵产品活菌含量等;另一种情况是对有害微生物的监测,如检测糖类、淀粉类原料或蔬菜、茶叶产品中的亚硫酸盐还原梭菌。目前对厌氧菌活菌计数通用的做法是采用一定的外围装置如厌氧罐、厌氧箱或厌氧袋,也可以在培养皿之外采取一定的除氧措施,如用化学试剂进行反应除氧、或抽真空再充 N₂ 或 CO₂ 气体除氧等,但这些做法成本较高且操作较繁琐,遇到需要光照培养(如光合细菌的培养)的情况时,就更不适应。特别是需要的外围设备包括厌氧罐和厌氧箱等,价格昂贵,每套设备从5000元至40万元不等。

为解决这些难题,科研人员经过多年的反复对比实验,终于发明了厌氧菌活菌计数培养平板,其特征是用硬质透明材料(玻璃或有机玻璃或硬质透明塑料)制成厚度很小的长方形薄板盒,盒的一长端开口,口外配以封口盖,每个成本只需5元。经专家评审,本实用新型的厌氧菌活菌计数培养平板计数结果准确,结构简单,操作简便,成本低,无须外围设备如厌氧罐或厌氧箱等,也无需抽气充气或采取其他化学除氧措施,应用范围广泛,除培养常规厌氧菌之外,还可培养需要光照的厌氧菌,如光合细菌。因而获得了实用新型专利技术。

另一项研究成果“光合细菌的固定化方法”也已经过国家知识产权局的专利公示,有望再获国家专利权。