

*Actinobacillus succinogenes* NJ113 厌氧发酵产丁二酸培养条件的优化\*

姜 岷, 苏 溧, 陈可泉, 蔡 婷, 王倩楠

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009)

**摘 要** 采用 Plackett-Burman 设计法(Plackett-Burman, PB), 对影响 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 厌氧发酵生产丁二酸的 11 个因子进行了筛选。结果表明, 影响该菌厌氧发酵产丁二酸的主要因子为葡萄糖、酵母膏、玉米浆。在此基础上, 采用响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)对这 3 个因子的影响进行了研究, 得出丁二酸产量的数学模型, 通过对二次多项回归方程求解, 得到 3 因子的最优用量: 葡萄糖 107 g/L, 酵母膏 16 g/L, 玉米浆 12 g/L, 在优化条件下培养 48 h, 丁二酸的产量由原始培养条件下的 62 g/L 增到 84 g/L, 收率从 62% 提高到 78.5%, 生产强度达 1.75 g/(L·h)。

**关键词** *Actinobacillus succinogene* NJ113, 丁二酸, Plackett-Burman 设计, 响应曲面法

丁二酸, 又名琥珀酸, 是一种常见的天然有机酸, 广泛存在于人体、动物、植物和微生物中<sup>[1]</sup>。丁二酸是生物炼制产品工程中最重要碳四平台化合物, 可作为许多重要的中间产物和专业化学制品, 传统生产方法采用的是从丁烷经顺丁烯二酸酐通过电解生产, 生产污染大, 成本高, 这严重制约了丁二酸这一大宗化学品的发展潜力<sup>[2]</sup>。丁二酸发酵的工业潜能早在 1980 年就被认识到<sup>[3]</sup>, 随着石油资源日益枯竭和生物法制备丁二酸的技术进步, 利用生物转化法大规模生产丁二酸引起越来越多的国家的重视, 近年来已成为全球研究的热点<sup>[4,5]</sup>。美国能源部在 1990 年代提出了替代性原料生产计划, 投资 700 万美元, 联合了 Argonne National Laboratory 等 4 个国家实验室进行丁二酸的生物转化和提取的攻关计划, 目前原始菌种中 *Bacterium* 130Z 的产量最高, 达 80 g/L 左右, 此菌诱变菌的产量可达 110 g/L, 此外, 两者的生产强度分别为 1.1 g/(L·h) 和 1.3 g/(L·h)<sup>[6,7]</sup>。日本 Mitsubishi 与 Ajinomoto 公司也在从事丁二酸生物法制备的研究工作<sup>[8]</sup>。目前国内也有一些科研单位在利用生物法制备丁二酸, 但与国外的研究水平相比存在较大的差距<sup>[9,10]</sup>。本实验室筛选并保存了 1 株产琥珀酸放线杆菌 NJ113, 对该菌株代谢产物的研究表明, 该菌具有良好的丁二酸生产性能。研究旨在通过响应曲面来优化发酵培养基, 为丁二酸的高效制备打下良好的基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 生产菌株

*Actinobacillus succinogenes* NJ113 (CGMCC NO. 1716), 南京工业大学制药与生命科学学院实验室筛选并保存。

## 1.2 培养基

## 1.2.1 平板培养基(g/L)

葡萄糖 2.5 (分消), 酪蛋白 17, NaCl 5,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.5, 琼脂 20, pH 7.5, 121℃ 灭菌 15 min。

## 1.2.2 种子培养基(g/L)

葡萄糖 10 (分消), 酵母膏 5,  $NaHCO_3$  10,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  9.6,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  15.5, pH 7.0, 121℃ 灭菌 15 min。

## 1.2.3 原始发酵培养基(g/L)

葡萄糖 100 (分消), 酵母膏 10, 富马酸二钠 1,  $KH_2PO_4$  3,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.3,  $CaCl_2$  0.3, NaCl 1, 玉米浆 5,  $MgCO_3$  40, pH 7.0, 121℃ 灭菌 15 min。

Plackett-Burman 实验发酵培养基: 按照实验设计表 2 配置。

RSM 实验发酵培养基: 按照实验设计表 5 配置。

## 1.3 血清瓶培养方法

将保存于 -70℃ 冰箱的菌种, 接种到平板 37℃ 厌氧培养箱活化培养 12h, 然后转接到种子培养基中, 摇床转速 120 r/min, 37℃ 下培养 12h 作为种子; 种子按一定接种量接入发酵培养基中, 摇床转速 180 r/min, 在 37℃ 下培养 48 h。

## 1.4 丁二酸含量的测定

采用高效液相色谱方法进行检测(色谱柱: Pre-vail organic acid 5 u; 流动相: 25 mmol/L  $KH_2PO_4$ ;

第一作者: 博士, 副教授。

\* 国家自然科学基金项目(20606017), 江苏省高校自然科学基金研究计划项目(05KJB180043)

收稿日期: 2006-12-12

pH2.5;流动相流速:1 mL/min;紫外检测波长:215 nm;柱温:室温;进样量:20  $\mu$ L)。

1.5 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。

1.5.1 Plackett-Burman 实验设计

根据放线杆菌生长所需营养要素的一般原则以及微生物发酵影响因子的一般规律,结合相关的文献报道和笔者的前期实验,确定各因子的试验水平。自变量及其代号、编码和水平见表 1。

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	葡萄糖/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>1</sub>	80	100
2	酵母膏/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>2</sub>	12.5	17.5
3	MgCO <sub>3</sub> /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>3</sub>	40	60
4	玉米浆/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>4</sub>	5	10
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>5</sub>	1.5	3
6	富马酸二钠/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>6</sub>	1	1.5
7	NaCl/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>7</sub>	1	1.5
8	MgCl <sub>2</sub> $\cdot$ 6H <sub>2</sub> O/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>8</sub>	0	0.3
9	CaCl <sub>2</sub> /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	X <sub>9</sub>	0.3	0.45
10	温度/℃	X <sub>10</sub>	37	41
11	初始 pH	X <sub>11</sub>	7.0	8.0

表 2 N=12 的 Plackett-Burman 实验设计与结果

序号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	丁二酸产量/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	65.12
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	74.58
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	70.87
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	65.52
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	74.32
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	74.34
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	72.88
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	64.85
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	65.22
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	65.21
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	71.89
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	63.98

表 3 因子及其效应

序号	变量	系数	SS/%	显著性
1	葡萄糖/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	1.56667	7.363 3	+
2	酵母膏/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	8.16333	199.920 0	+
3	MgCO <sub>3</sub> /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	-0.27000	0.218 7	
4	玉米浆/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.99333	2.960 1	+
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.14000	0.058 8	
6	富马酸二钠/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.22333	0.149 6	
7	NaCl/g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	-0.04000	0.004 8	
8	MgCl <sub>2</sub> $\cdot$ 6H <sub>2</sub> O /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	0.53667	0.864 0	
9	CaCl <sub>2</sub> /g $\cdot$ L <sup>-1</sup>	-0.17000	0.086 7	
10	温度/℃	-0.49000	0.720 3	
11	初始 pH	-0.48333	0.700 8	

1.5.2 响应曲面(RSM)实验设计

由 Plackett-Burman 实验设计筛选出影响 *A. succinogenes* NJ113 产丁二酸的关键因子以后,采用旋转中心组合设计(Central Composite Rotatable Design,CCRD)法,对其显著影响因子进行进一步研究,以获得影响该菌厌氧发酵产丁二酸的最佳培养条件。

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman 实验设计方法确定厌氧发酵产丁二酸的关键因子

选取丁二酸产量为响应值,按实验设计进行 3 次重复实验,取 3 次测量的平均值,结果见表 2,分别计算各因子效应及重要性评价,结果见表 3。

由表 3 的回归系数显著性可知,葡萄糖、酵母膏、玉米浆的 SS%均大于 95%,说明这 3 个因子对丁二酸的产量影响显著,需要进一步实验确定最佳用量;而其他因子在 95%的概率水平上差异均不显著,即对丁二酸产量影响不显著,在下一步的培养基优化中可不予考虑,表 3 中系数为正的取高水平浓度,系数为负的取低水平浓度。

2.2 响应面优化 *A. succinogenes* NJ113 产丁二酸的培养

2.2.1 *A. succinogenes* NJ113 产丁二酸模型方程的建立及检验

由 PB 实验可知,影响 *A. succinogenes* NJ113 产丁二酸的显著影响因子为葡萄糖、酵母膏和玉米浆,选择这 3 个因子为研究对象,以丁二酸产量为响应值,设计旋转中心组合实验,各因子编码及实验水平见表 4,实验设计及结果见表 5。

表 4 旋转中心组合设计实验因子水平及其编码表

编码值	(X <sub>1</sub> )葡萄糖 /g·L <sup>-1</sup>	(X <sub>2</sub> )酵母膏 /g·L <sup>-1</sup>	(X <sub>3</sub> )玉米浆 /g·L <sup>-1</sup>
1.682	123.64	19.20	18.41
1	110	17.5	15
0	90	15	10
-1	70	12.5	5
-1.682	56.36	10.80	1.59

表 5 中心组合实验设计及其结果

序号	编 码			丁二酸的产量/g·L <sup>-1</sup>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>
1	-1	-1	-1	57.80
2	-1	-1	1	60.54
3	-1	1	-1	60.20
4	-1	1	1	56.03
5	1	-1	-1	72.96
6	1	-1	1	77.10
7	1	1	-1	78.09
8	1	1	1	78.53
9	-1.682	0	0	41.58
10	1.682	0	0	78.75
11	0	-1.682	0	59.03
12	0	1.682	0	79.03
13	0	0	-1.682	63.33
14	0	0	1.682	78.68
15(C)	0	0	0	78.84
16(C)	0	0	0	78.85

运用 Statistica 软件对表 5 中 16 个实验点的响应值进行回归分析,得出丁二酸产量模型方程的回归

系数,代入方程中得:

$$Y_1 = 78.69 + 19.72X_1 - 12.44X_1^2 + 5.58X_2 - 6.17X_2^2 + 4.24X_3 - 4.77X_3^2 + 2.17X_1X_2 + 1.50X_1X_3 - 2.65X_2X_3$$

由回归方程的一次项和二次项系数的数值大小可以看出,发酵培养基中的葡萄糖和酵母膏成分对丁二酸产量的影响要大于玉米浆的影响,同时交叉项系数相差不大,表明各因子间的交互作用显著。回归方程各项的方差分析见表 6。

表 6 回归方程各项的方差分析

	自由度	均方	F 值	P>F
一次项	3	318.8856	16.813723	0.102653
二次项	3	106.4743	5.614017	0.1263497
交互项	3	1.9895	0.314693	0.6067217
误差	1	18.9658		
总误差	6			

$$R_2 = 0.9139$$

回归方程的决定系数  $R_2 = 0.9139$ ,且 F-检验极显著,说明所拟合的回归方程合适,对实验拟合情况较好。

### 2.2.2 A. succinogenes NJ113 产丁二酸响应面交互作用分析及优化

上述回归方程所作出的响应曲面图及其等高线见图 1~图 3,各因子及其交互作用对响应值的影响结果可通过该组图直观反映出来。

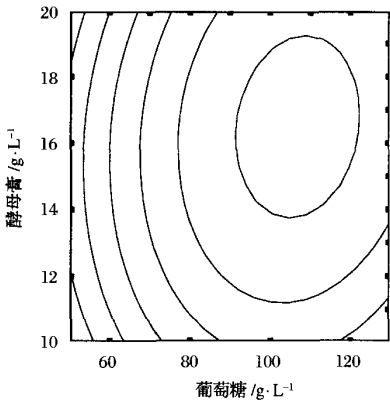
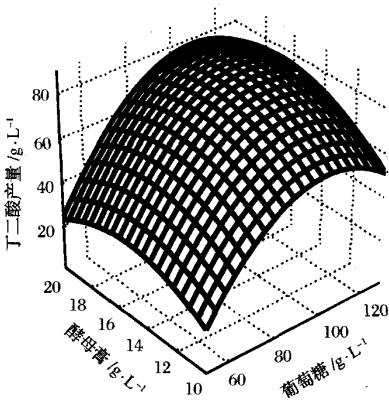


图 1 葡萄糖与酵母膏交互影响丁二酸产量的曲面图及等高线

图 1~图 3 所示的响应面图证实了拟合面有真实的最大值,即各具体因子都有一个最适宜的浓度。对上述丁二酸产量的回归方程求导,然后求解所得的方程组,可得模型极值点坐标为:  $X_1 = 0.864$ ,  $X_2 =$

$0.509$ ,  $X_3 = 0.438$ ,即葡萄糖 107.27 g/L、酵母膏 16.27 g/L、玉米浆 12.19 g/L。此时,模型预测的最大丁二酸产量为 84.12 g/L。为了实验操作的方便,取葡萄糖 107g/L、酵母膏 16g/L、玉米浆 12g/L 为实

验研究的最佳用量。在此条件下经 3 次重复试验验证,丁二酸产量分别为 83.33 g/L, 84.18 g/L 和 83.89 g/L, 实验值与模拟值相差均在 5% 以内, 证实了丁二酸产量模型的可靠性。另外, 做 3 批在原始培养条件下的发酵实验, 平均产量为 62 g/L, 与前者对

比, 丁二酸平均收率从 62% 增到 78.5% (丁二酸收率定义为丁二酸产量与初始葡萄糖浓度的百分比), 优化后生产强度达到 1.75 g/(L·h) (生产强度定义为单位时间单位体积内丁二酸的产量)。

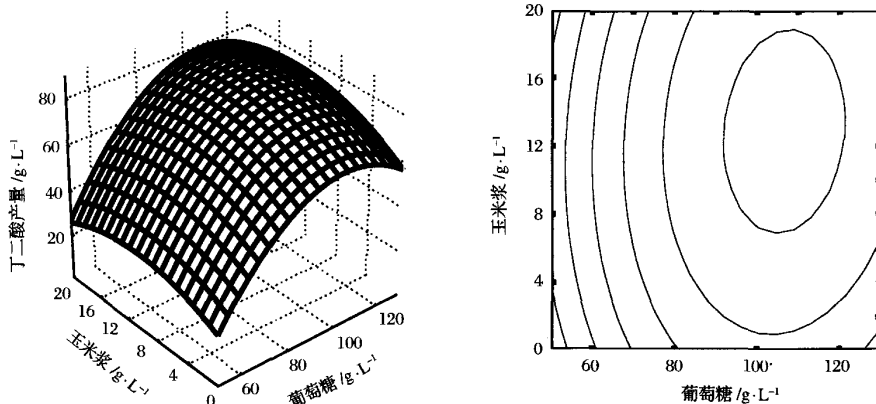


图 2 葡萄糖与玉米浆交互影响丁二酸产量的曲面图及等高线

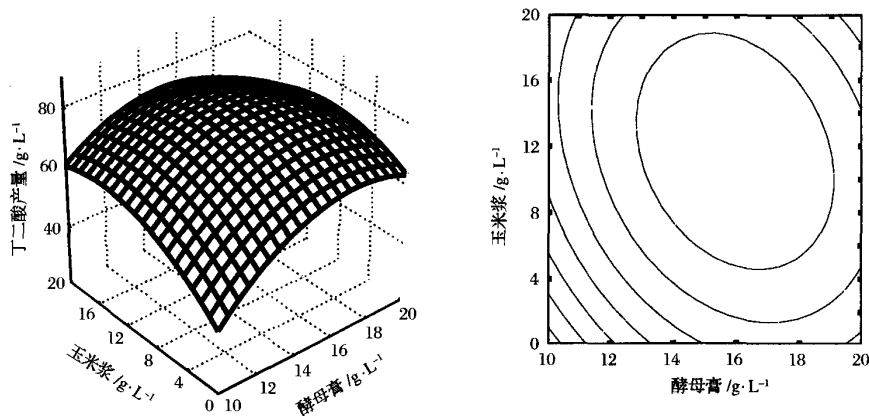


图 3 酵母膏与玉米浆交互影响丁二酸产量的曲面图及等高线

### 3 结 论

应用 Plackett-Burman 实验设计, 对影响 *A. succinogenes* NJ113 发酵产丁二酸的诸多因子进行评价, 筛选出显著影响丁二酸产量的因子为葡萄糖、酵母膏、玉米浆; 通过响应曲面法研究以上 3 个显著影响因子, 得到 *A. succinogenes* NJ113 发酵产丁二酸的数学模型, 并利用统计学方法对该模型进行了显著性检验, 对该模型求导并解方程组可得, 在葡萄糖为

107.27 g/L, 酵母膏为 16.27 g/L, 玉米浆为 12.19 g/L 时, 可获得最大的丁二酸产量, 模型预测值为 84.12 g/L。实际操作中取葡萄糖 107 g/L、酵母膏 16 g/L、玉米浆 12 g/L 进行实验, 其他成分用量为: 富马酸二钠 1.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.3 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.3 g/L, NaCl 1 g/L,  $\text{MgCO}_3$  40 g/L, 初始 pH 7.0, 37℃ 血清瓶培养 48h, 丁二酸平均产量可达 84 g/L, 比原始培养条件下的产量提高了 35%, 达到了国际先进水平, 且生产强度为目前报道中最高, 为工业高效制备丁二酸打下了良好的基础。

## 参考文献

- 1 G Zeijus, M K Jain, P Elankovan. Biotechnology of succinic acid production and market for derived industrial products[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 525~545
- 2 T Willke, K D Vorlop. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry [J]. App Microbiol Biotechnol, 2004, 66 (2): 131~142
- 3 Y Wakai, T Shimazaki, S Hara. Formation of succinate during fermentation of sake mash and grape must[J]. Hakkokogaku, 1980, 58: 363~368
- 4 Guttler M V, Jain M K, Soni B K. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods for obtaining variants. 1998, US Patent: 5,723, 322
- 5 Song Hyohak, Lee Sang Yup. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39 (3): 352~361
- 6 CS Millard, YP Chao, JC Liao, et al. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *E. coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (5): 1 808~1 810
- 7 L Stols, MI Donnelly. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *E. coli* [J]. Mutant Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (7): 2 695~2 701
- 8 Inui M, Murakami S, Okino S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate production under oxygen deprivation conditions[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004, 7: 182~196
- 9 张洪勋, 罗海峰, 庄绪亮. 琥珀酸发酵研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30 (5): 102~106
- 10 白冬梅, 杜国民, 沈非, 等. 反相 HPLC 同时测定产琥珀酸放线杆菌发酵液中的有机酸与葡萄糖[J]. 分析试验室, 2004, 23(3): 15~18

## Optimization of the Culture Conditions for the Production of Succinic Acid by Anaerobic Fermentation of *Actinobacillus succinogenes* NJ113

Jiang Min, Su Li, Chen Kequan, Cai Ting, Wang Qiannan

(College of Pharmaceutical Engineering and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of the eleven factors which influence the production of succinic acid by anaerobic fermentation of *Actinobacillus succinogenes* NJ113. The significant ones among the eleven factors were determined as follows: glucose, yeast extract and corn steep liquid (CSL). The response surface methodology (RSM) was used to optimize the three factors. By solving the quadratic regression model equation, the optimal conditions of these variables were determined as: glucose 107g/L, yeast extract 16g/L, CSL 12g/L. After culturing under the optimized condition for 48 hours, the concentration of succinic acid increased from original 62g/L to 84g/L, the yield increased from original 62% to 78.5% with the productivity of 1.75 g/(L·h).

**Key words** *Actinobacillus succinogenes* NJ113, succinic acid, Plackett-Burman design, response surface methodology

行业动态

### 天冠集团纤维乙醇项目建设进展顺利

天冠集团 3 000t 纤维乙醇项目进展顺利。目前,项目已完成投资 2 700 多万元,与其配套的酶车间和试验优选楼主体工程完成并通过验收,生产酶的主体设备已安装就位,纤维乙醇车间公用工程施工完毕。该项目于 2006 年 10 月正式开工建设,预计 2007 年 10 月投料生产。项目投产后,预计年销售收入将达 1 650 万元。每年将消化玉米秆类纤维质原料 18 000t,当地附近农民可望增加 360 万元的收入。

据了解,秸秆造乙醇的大规模工业化生产,不仅使废物得到科学利用,减少焚烧秸秆带来的大气污染,还可有效增加农民收入。更重要的是,可有效解决燃料乙醇生产的非粮替代问题,对国家的能源开发和促进“三农”问题解决具有重要的战略意义。

(天冠集团厂李瑞、陈铁供稿)