

## 利用 SAS 软件优化丙酮丁醇梭状芽孢杆菌产丁醇的发酵条件

刘兴旺, 赵洪坤, 杜连祥, 路福平, 邱 强

(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** 通过单因素优化实验、Plackett-Burman 实验和 Box-Behnken 响应面实验对影响丙酮丁醇梭状芽孢杆菌产丁醇能力的主要因素进行优化, 得到了回归方程:  $Y_2 = 8.583\ 367 - 0.002\ 125 \times X_7 - 0.416\ 5 \times X_8 + 0.297\ 567 \times X_9 + 0.070\ 692 \times X_{10} - 0.550\ 233 \times X_7^2 - 0.037\ 9 \times X_7 \times X_8 - 0.001\ 775 \times X_7 \times X_9 - 0.053\ 75 \times X_7 \times X_{10} + 0.037\ 529 \times X_8^2 - 0.182\ 675 \times X_8 \times X_9 + 0.032\ 475 \times X_8 \times X_{10} + 0.126\ 754 \times X_9^2 - 0.069 \times X_9 \times X_{10} - 0.588\ 208 \times X_{10}^2$ 。对回归方程进行岭峰分析, 得到了丙酮丁醇梭状芽孢杆菌的优化培养条件, 即装液量为 310 mL, 种龄为 18 h, 静态培养, 接种量为 6%, 温度为 37℃, 初始 pH 值 5.5, 在此基础上进行 7 L 发酵罐扩大培养, 优化前和优化后的分批发酵结果相比, 优化后 7 L 罐最佳浓度的产量为 10.55 g/L, 比原产量 8.02 g/L 提高了 31.25%, 比有关文献报道的产量高出 11.64% [3]。

**关键词** 丙酮, 丁醇, 气相色谱, Plackett-Burman, Box-Behnken, 岭峰分析

丙酮丁醇发酵是丙酮丁醇梭状芽孢杆菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 在嫌氧条件下将葡萄糖代谢为丙酮、丁醇等溶剂的生物化学过程 [4]。从 20 世纪 20 年代起, 世界各国就投入了大量精力进行研究。其后, 由于石油化工的发展, 丙酮以及丁醇可以廉价地供给, 该发酵法就此暂时消失。但是, 丁醇作为一种大宗化工原料, 市场很大, 国内年需求量约 50 万 t 以上。随着石油资源日益紧缺, 以生物法为原料, 发酵法生产丙酮、丁醇的技术重新显示出其优势。因为生物柴油是一种可再生的清洁能源, 而向生物柴油中添加丁醇, 可以有效地改善其自身存在的燃烧性能上的缺点 [5]。

有关采用固定化技术 [6], 用糖蜜作为发酵培养基 [7] 等提高丁醇产量的研究已均有报道, 但丁醇产量都不到 10 g/L。文中通过利用 SAS 软件 [1] 对丙酮丁醇梭状芽孢杆菌产丁醇能力的培养条件进行了优化, 产量有了显著的提高。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌 种

丙酮丁醇梭状芽孢杆菌 [8] (*Clostridium acetobutylicum*) CICC 8012, 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 种子培养基、摇瓶培养基、发酵培养基

均为 50 g 过 40 目筛的玉米粉加 1 000 mL 自来

水, 混合均匀, 煮沸后煮 1 h 成糊状, 分装于 500 mL 三角瓶中。自然 pH, 121℃ 灭菌 30 min。

#### 1.2.2 培养方法

(1) 菌种先在沸水浴下热处理 [9] 1~2 min, 再于 35~39℃ 下厌氧培养。

(2) 初始 pH 为 6, 装液量 270 mL, 采用静态培养, 接种量 10%, 温度 37℃、种龄 22 h, 转接至发酵培养基, 发酵周期为 78 h。

### 1.3 主要仪器设备

HYG-FJ 生物反应摇瓶柜, 上海欣蕊自动化设备有限公司。7L 发酵罐, 上海高机生物工程有限公司。高效气相色谱分析仪, 美国安捷伦科技公司。pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)公司。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 生物量的测定

采用核酸量方法 [10] 测定。

#### 1.4.2 酸 度

取 5 mL 发酵液加热除去样液中的 CO<sub>2</sub>, 以酚酞为指示剂, 用 0.02 mol/L NaOH 滴定。

#### 1.4.3 pH 值

采用 pH 计测定。

#### 1.4.4 丁醇测定方法

摇瓶发酵 72 h, 此时丁醇产量最高, 测丁醇产量, 每组 3 个平行, 取平均值。

培养基中含有大量的水, 在进行气相色谱分析前需对发酵液进行预处理。预处理方法: 在培养过程中, 每隔 8 h 取样测定丁醇含量, 将发酵液在 12 000 r/min 下离心 15 min, 取 400 μL 上清液, 再准确地

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2007-07-03, 改回日期: 2007-08-29

加入 400  $\mu\text{L}$  内标物(乙酸乙酯)。气相色谱参数如下:色谱柱(Porapak)柱长 1.5 m;内径 3 mm;检测器 FID (220  $^{\circ}\text{C}$ );柱温 180  $^{\circ}\text{C}$ ;进样温度 220  $^{\circ}\text{C}$ ;载气压力  $\text{N}_2$  (40 mL/min)、 $\text{H}_2$  (50 mL/min)、空气 (40 mL/min);内标物为乙酸乙酯。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素优化

通过对装液量、种龄、培养方式、温度、接种量、初始 pH 进行单因素实验,确定了因素水平的范围,如图 1~图 6 所示。结果表明,发酵 72 h 时,最佳装液量为 310 mL、种龄为 18 h、采用静态培养、温度为 36  $^{\circ}\text{C}$ 、接种量为 7%、初始 pH 值为 5.5 时,实验效果较佳。将此定为 Plackett-Burman 的实验中心点,进行进一步的研究。

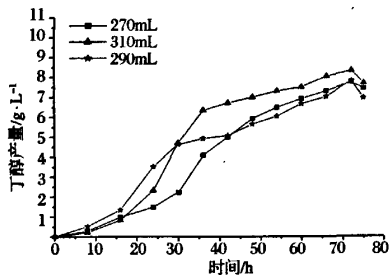


图1 装液量对丁醇产量的影响

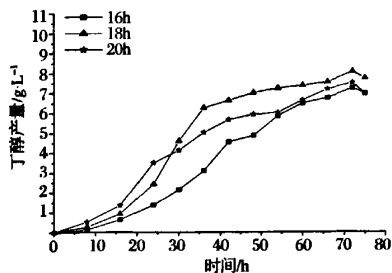


图2 种龄对丁醇产量的影响

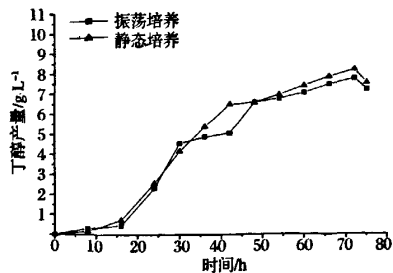


图3 培养方式对丁醇产量的影响

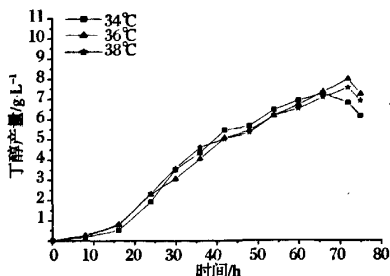


图4 温度对丁醇产量的影响

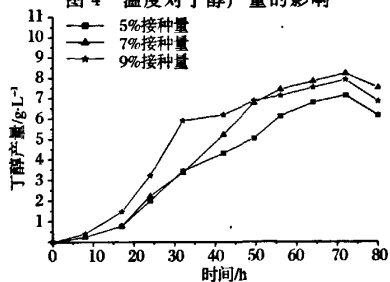


图5 接种量对丁醇产量的影响

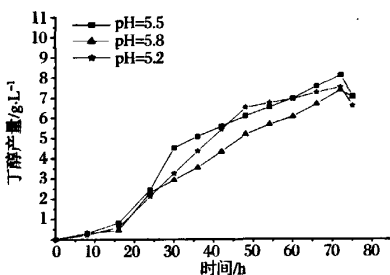


图6 初始 pH 值对丁醇产量的影响

### 2.2 Plackett-Burman 实验

通过 Plackett-Burman 实验设计,对装液量 ( $X_1$ )、接种时间 ( $X_2$ )、培养方式 ( $X_3$ )、温度 ( $X_4$ )、接种量 ( $X_5$ )、初始 pH 值 ( $X_6$ ) 6 个因素进行考察,以此确定影响丁醇产量的主要因素。每个因素分别取 2 个水平,响应值为  $Y_1$  (丁醇产量),其中间歇振荡培养时为每 8 h 振荡 1 次。实验设计及响应值见表 1,各因素实验参数估计分析结果见表 2。

6 个因素中,  $Pr > |t|$  的值小于 0.05, 可视为对响应值有显著性影响,从表 2 可看出,  $X_1$ 、 $X_3$  均大于 0.05, 说明对响应值没有显著性影响,因此,将装液量和培养方式定为单因素实验的最优值。选择其他 4 个因素进一步做响应面实验。根据单因素优化实验和 Plackett-Burman 实验确定响应面的因素及水平见表 3。

表1 实验设计和响应值表

实验点	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$Y_1/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	-1	-1	-1	1	1	1	6.970 0
2	1	-1	-1	-1	-1	1	5.052 6
3	-1	1	-1	-1	1	-1	6.253 1
4	1	1	-1	1	-1	-1	5.792 9
5	-1	-1	1	1	-1	-1	5.482 2
6	1	-1	1	-1	1	-1	4.958 0
7	-1	1	1	-1	-1	1	6.705 1
8	1	1	1	1	1	1	7.862 4

表2 各因素参数估计值

因素	水 平			$P_r >  t $
	-1	1	$t$ 值	
$X_1$	290mL	310mL	-7.777 53	0.081 407
$X_2$	16h	20h	18.505 13	0.034 369
$X_3$	间歇振荡	静态发酵	4.186 803	0.149 258
$X_4$	34℃	38℃	13.993 31	0.0454 17
$X_5$	5%	9%	13.422 65	0.047 34
$X_6$	5.2	5.8	18.296 48	0.034 76

表3 因素水平取值

因素	编码值		
	-1	0	1
$X_7$ (接种时间)/h	16	18	20
$X_8$ (接种量)/%	5	7	9
$X_9$ (温度)/℃	34	36	38
$X_{10}$ (初始 pH 值)	5.2	5.5	5.8

### 2.3 实验优化

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 4 因素 3 水平的响应面分析实验点为 27 个, 响应值  $Y_2$  为丁醇产量。4 因素 3 水平实验设计与结果见表 4。通过中心组合实验分析得知, 一次项的  $P=0.000 1<0.1$ , 二次项的  $P=0.000 1<0.1$  对  $Y_2$  有显著影响; 失拟项的  $P=0.107 79>0.1$ , 没有显著性意义, 数据中没有异常点, 不需要引入更高次数的项, 模型恰当。

### 2.4 建立二次响应面回归模型

回归方程为:

$Y_2=8.583 367-0.002 125 \times X_7-0.416 5 \times X_8+0.297 567 \times X_9+0.070 692 \times X_{10}-0.550 233 \times X_7^2-0.037 9 \times X_7 \times X_8-0.001 775 \times X_7 \times X_9-0.053 75 \times X_7 \times X_{10}+0.037 529 \times X_8^2-0.182 675 \times X_8 \times X_9+0.032 475 \times X_8 \times X_{10}+0.126 754 \times X_9^2-0.069 \times X_9 \times X_{10}-0.588 208 \times X_{10}^2$ 。可信度分析见表 5, 其中  $R^2=95.82\%$ , 说明模型的拟合程度很好。

表4 实验设计及响应值结果

实验号	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$Y_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	-1	-1	0	0	8.431 9
2	-1	1	0	0	7.688 1
3	1	-1	0	0	8.487 7
4	1	1	0	0	7.592 3
5	0	0	-1	-1	7.613 3
6	0	0	-1	1	7.837 7
7	0	0	1	-1	8.502 8
8	0	0	1	1	8.451 2
9	-1	0	0	-1	7.332 9
10	-1	0	0	1	7.611 5
11	1	0	0	-1	7.383 2
12	1	0	0	1	7.445 9
13	0	-1	-1	0	8.723 2
14	0	-1	1	0	9.351 8
15	0	1	-1	0	8.505 3
16	0	1	1	0	8.402 7
17	-1	0	-1	0	7.762 3
18	-1	0	1	0	8.537 0
19	1	0	-1	0	7.831 2
20	1	0	1	0	8.598 8
21	0	-1	0	-1	8.550
22	0	-1	0	1	8.653 8
23	0	1	0	-1	7.391 5
24	0	1	0	1	7.623 1
25	0	0	0	0	8.513 7
26	0	0	0	0	8.622 6
27	0	0	0	0	8.613 8

表5 可信度分析

模 型	
Mean (均值)	8.150407
R-square(复相关系数的平方)	95.82%
Adj R-square (调整后的决定系数)	90.95%
RMSE(模型误差平方根)	0.16445
CV(变异系数)	2.017689

### 2.5 典型分析

由响应面回归方程可知, 存在稳定点, 但其特征值有正有负, 响应曲面是鞍面(图略), 说明该稳定点是鞍点, 没有惟一最佳值, 因此还需做岭峰分析, 进一步确定最佳响应值。通过岭峰分析, 极大值  $Y=9.261 92$ , 所对应的各主要因素( $X_7, X_8, X_9, X_{10}$ )的编码值分别为(0.011 93, -0.703 14, 0.710 95, -0.000 91), 即接种时间约为 18h、接种量约为 6%、温度约为 37℃、初始 pH 值约为 5.5, 此时发酵液中丁醇产量最高。在以上优化条件下进行验证试验, 共进行 3 次, 丁醇产量平均值为 9.377 4 g/L, 接近预测值。证实了模型预测值与实验值之间有良好的拟合性, 也证实了模型的有效性。所以培养条件定为装液量

310mL、静态发酵、接种时间为18h、接种量为6%、温度为37℃、初始pH值5.5。

## 2.6 基于响应面优化条件的分批发酵

依据响应面优化条件进行7L罐扩大培养,添加4.7L5%玉米粉液体培养基,用种龄为18h、体积比6%的量加入0.3L的种子培养液,采用静态培养,温度为37℃,初始pH值5.5的条件下发酵。分批发酵过程如图7所示,在7L罐最佳浓度的产量10.55 g/L比原产量8.02 g/L提高了31.25%,比有关文献报道高出11.64%,证明了在此优化条件下,丙酮丁醇梭状芽孢杆菌生产丁醇能力与响应面分析结果相符,而且产量得到了有效的提高。

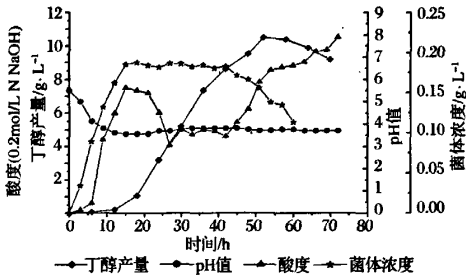


图7 7L罐分批发酵实验结果

发酵过程按照酸度升降变化分为3个时期:升酸期、减酸期和平衡期。升酸期,氧化作用多于还原作用,酸度迅速上升,约在12~15h酸度最高;10h左右,开始生成丁醇。酸度上升的同时,pH值迅速下降,由于蛋白质及水解产物的缓冲作用,pH值直到发酵结束不再发生太大的变化,基本上保持在一个恒

定范围;随着酸度上升到最大,菌体数量也达到最大,酸被还原,由此进入减酸期,维持约15h,酸度一直降到最大值的50%左右,其速率与上升时相近。实验表明,如果没有正常的减酸期,丁醇产量会明显偏低;平衡期约15h,到发酵后期,酸度曲线略有回升。从减酸期开始,丁醇含量迅速提高,在52h丁醇含量达到最大值(10.55 g/L)。

## 参考文献

- 倪勤. SAS最优化软件速成[M]. 北京:科学出版社, 1998
- 吴有炜. 实验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社, 2002
- 林赛珍,徐敏. 丙酮丁醇梭菌发酵产氢工艺研究[J]. 药物生物技术, 2006, 13(2): 136~139
- 陈驹声,陆祖祺. 发酵法丙酮和丁醇生产技术[M]. 北京:化学工业出版社, 1991. 238~239
- 徐子钧,李剑,马建芳. 生物柴油耦联丙酮丁醇发酵的初步研究[J]. 生物加工过程, 2007, 5(1): 27~32
- 县永平. 丙酮丁醇梭菌固定化技术用于丙酮丁醇发酵的研究[J]. 西北师范大学学报, 2001, 37(3): 70~73
- 马光庭,李伏生. 糖蜜发酵生产丙酮丁醇的研究[J]. 工业微生物, 1999, 29(2): 28~31
- Han S K, Shin H S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, 29: 569
- Quneshi N, Meagher M M, Huang J C, et al. Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by prevaporation using silicalite-silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum* [J]. Journal of Membrane Science, 2001, 187: 93
- 苑琳. 嗜碱性芽孢杆菌产高碱性蛋白酶发酵培养基及发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 32~34

## Conditions Optimization for Butanol of *Clostridium acetobutylicum* by SAS Software

Liu Xingwang, Zhao Hongkun, Du Lianxiang, Lu Fuping, Qiu Qiang

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

**ABSTRACT** The main characters of *Clostridium acetobutylicum* influencing the production capacity of Butanol were optimized by using single factor optimization experiment and SAS<sup>[1]</sup> software combined with the Plackett-Burman design and Box-Behnken design<sup>[2]</sup>. A regression equation was obtained:

$$Y_2 = 8.583367 - 0.002125 \times X_7 - 0.4165 \times X_8 + 0.297567 \times X_9 + 0.070692 \times X_{10} - 0.550233 \times X_7 \times X_7 - 0.0379 \times X_7 \times X_8 - 0.001775 \times X_7 \times X_9 - 0.05375 \times X_7 \times X_{10} + 0.037529 \times X_8 \times X_8 - 0.182675 \times X_8 \times X_9 + 0.032475 \times X_8 \times X_{10} + 0.126754 \times X_9 \times X_9 - 0.069 \times X_9 \times X_{10} - 0.588208 \times X_{10} \times X_{10}$$
 The ridge analysis was then used to determine the optimal levels of the main factors. The results showed that the optimum fermentation conditions were as follows: 310 mL liquid medium in a flask of 500 mL, inoculums time 18 h, static culture, inoculums size 6%, culture temperature 37℃ and the initial pH 5.5. Under the optimized conditions, the concentration of Butanol in 7 L fermentor increased from 8.01 g/L to 10.55 g/L, which was 31.25% higher than the production of Butanol before optimization and 11.64% higher than other related report<sup>[3]</sup>.

**Key words** acetone, butanol, gas chromatography, plackett-burman design, box-behnken design, ridge analysis