

# 利用响应面法优化 L-苏氨酸发酵条件

黄金, 黄磊, 谢希贤, 陈宁

(天津科技大学生物工程学院, 天津, 300457)

**摘要** 采用响应面设计方法对 *E. coli* TRFC 苏氨酸发酵培养基及培养条件进行了优化。用部分因子分析法研究了原始发酵培养基及培养条件对响应值的影响程度, 发现蔗糖的质量浓度及接种量对苏氨酸产量的影响显著。利用最陡爬坡实验、中心旋转组合设计结合响应面分析确定了蔗糖的质量浓度及接种量 (58.739 g/L, 3.46%)。在优化条件下进行 5L 发酵罐实验, L-苏氨酸的产量达到 121.20 g/L, 比未优化条件下提高了 12.43%。

**关键词** 响应面法, L-苏氨酸, 优化, 数学模型

L-苏氨酸是人与动物体内所必需的一种氨基酸, 自身不能合成, 必须从食物中摄取, 被广泛应用于饲料工业、保健食品和医药工业<sup>[1,2]</sup>。微生物发酵法生产 L-苏氨酸是目前主要的工业生产方法。目前, 国际上 L-苏氨酸发酵产酸最高水平可稳定达到 100 g/L 左右<sup>[3]</sup>。响应面优化方法是利用合理的实验设计、实验结果结合多元二次回归方程来拟合影响因子与响应值之间的函数关系, 寻求最优的工艺参数以解决多变量问题带来的工艺优化难题, 目前已经广泛运用于发酵法生产生物产品的工艺优化<sup>[4,5]</sup>。但应用响应面法优化 L-苏氨酸发酵条件的研究在国内外尚未见报道。本研究以 L-苏氨酸生产菌为发酵菌种, 通过部分因子分析法 (FFD)<sup>[6]</sup>、最陡爬坡逼近法及中心组合设计法 (CCD)<sup>[7]</sup> 确定发酵条件以提高 L-苏氨酸产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

L-苏氨酸生产菌 TRFC, 天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌株。

### 1.2 培养基

斜面培养基 (g/L): 蔗糖 2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 酵母粉 5, 蛋白胨 5, 琼脂 20, pH 值 7.0~7.2。

种子培养基 (g/L): 蔗糖 40,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 酵母粉 2, pH 值 7.0。

初始发酵培养基 (g/L): 酵母粉 2, 蔗糖 70,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1, pH 值 7.0。

### 1.3 培养方法

见参考文献[8]。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 菌体生长

吸取样品菌液, 用蒸馏水稀释一定倍数, 以蒸馏水作为空白对照, 采用 752 分光光度计于 1 cm 光程比色皿中测定  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 。

#### 1.4.2 蔗糖浓度测定

采用蒽酮-硫酸法。

#### 1.4.3 L-苏氨酸含量

采用高效液相分析系统柱前衍生测定。色谱分离条件: 柱温: 33℃; 检测波长: 360 nm; 流动相总流量: 1 mL/min。

### 1.5 实验设计

#### 1.5.1 部分因子实验设计 (Fractional Factorial Design, FFD)

根据前期实验结果, 笔者在第一轮实验过程中考察了酵母粉、蔗糖、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、pH 值和接种量对产酸的影响。采用 6 因素 2 水平的 1/4 部分因子实验设计, 通过逐步回归分析, 获得最优多元回归方程。

#### 1.5.2 最陡爬坡实验设计

根据拟合的回归方程模型的系数符号和大小来设计显著影响因素的最陡爬坡路径, 其他因素则根据效应系数的正负来确定, 正系数选取最高值, 而负系数则选取最低值。设计合适的步长使响应值快速逼近最大响应区间。

#### 1.5.3 中心旋转组合设计 (Central Composite Rotatable Design, CCD)

采用中心旋转组合设计法对最陡爬坡实验确定的中心区域进行考察, 对影响 TRFC 发酵生产 L-苏

第一作者: 博士研究生(陈宁为通讯作者)。

收稿日期: 2007-07-12, 改回日期: 2007-08-29

氨酸的显著影响因素进行研究。

## 1.6 验证实验

通过将优化实验所得的实验数据与响应面模型进行拟合便可得到模型中的各个系数。在对该多元函数进行简单的性状分析便可确定其极值点以及取得极值的相应的自变量取值。取值进行验证实验,进行可靠性分析,得到最后的优化结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 影响因素的筛选

表 1 部分因素实验设计及实验结果

序号	$X_1/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (酵母粉)	$X_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (蔗糖)	$X_3/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	$X_4/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	$X_5$ (接种量)	$X_6$ (pH)	$Y/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (L-苏氨酸)
1	2(-1)	70(-1)	2(-1)	2(-1)	0.05(-1)	7.0(-1)	107.80
2	3(+1)	70	2	2	0.1(+1)	7.0	105.35
3	2	105(+1)	2	2	0.1	7.5(+1)	97.78
4	3	105	2	2	0.05	7.5	99.85
5	2	70	3(+1)	2	0.1	7.5	111.34
6	3	70	3	2	0.05	7.5	115.76
7	2	105	3	2	0.05	7.0	107.61
8	3	105	3	2	0.1	7.0	107.53
9	2	70	2	3(+1)	0.05	7.5	107.32
10	3	70	2	3	0.1	7.5	99.55
11	2	105	2	3	0.1	7.0	97.61
12	3	105	2	3	0.05	7.0	108.45
13	2	70	3	3	0.1	7.0	95.25
14	3	70	3	3	0.05	7.0	119.24
15	2	105	3	3	0.05	7.5	95.83
16	3	105	3	3	0.1	7.5	93.67

从结果可以看出,在表 1 中当酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  总体处于低水平时比处于高水平时的 L-苏氨酸产量低很多,它们对于产酸属于正效应因素。在初始发酵培养基及培养条件的基础上应增加这些组分的浓度或提高相应培养条件水平,这说明初始发酵培养基中富含氨基酸等营养物质的酵母粉及作为菌体生长促进剂的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  不能满足菌体生长和产酸的需要。而蔗糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、接种量和 pH 恰恰相反属于负效应因素。通过表 2 回归分析结果中方程 t 系数值亦可鉴定此结论。

表 2 中列出了多元回归方程各项系数、各因素对产量影响的显著性、显著的概率范围及重要程度。对方程进行方差分析可知,方程回归显著,其中 98.25% 的数据可以用此方程解释(确定系数  $R^2 = 0.98$ );蔗糖浓度和接种量在 95% 水平上对产酸的影响显著,其他因素在此水平上不显著; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度和 pH 取 -1 水平值,酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  质量浓度

用 SAS8.1(Statistical Analysis System, USA) 软件 FFD 设计模块选取初始发酵培养基(g/L):酵母粉 2、蔗糖 70、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2、接种量 5%、发酵过程 pH 控制在 7.0。发酵 42h L-苏氨酸产量为 107.80(g/L),在此基础上寻找重要影响因素。实验设计及实验结果见表 1。初始发酵培养基及培养条件定义为 -1 水平,较高水平定义为 +1 水平。回归分析结果见表 2。

取 +1 水平值。进一步推知应在发酵培养基中应逐渐减少蔗糖的质量浓度和接种量(在 -1 水平上),选取蔗糖质量浓度和接种量为中心旋转组合实验的研究对象进行后续实验。

表 2 部分因素实验设计的回归分析结果

Regression term	Coefficient	t	$\text{Pr} >  t $	Importance
Constant term	-472.46			
$X_1$	+117.84	+2.55953	0.124721	4th
$X_2$	+4.10	-4.72528	0.041986	2nd
$X_3$	-11.86	+1.99725	0.183879	6th
$X_4$	-18.65	-3.20162	0.085265	3rd $R^2 = 0.98$
$X_5$	+123.3	-4.76962	0.041256	1st
$X_6$	+88.24	-2.46019	0.133033	5th

### 2.2 中心实验点的确定

在确定了发酵培养基(g/L)酵母粉 3、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2、pH 值 7.0 后,针对蔗糖质量浓度和接种量进行最陡爬坡实验,显著因素的变化方向、步长和实验结果如表 3 所示。

表 3 最陡爬坡实验设计及结果

序号	$X_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (蔗糖)	$X_5$ (接种量)	$Y/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (L-苏氨酸)
1	66	0.045	105.39
2	62	0.040	119.25
3	58	0.035	121.48
4	54	0.030	112.35
5	50	0.025	115.13
6	46	0.020	110.19
7	42	0.015	105.60
8	38	0.010	100.72

作为负效应因素,蔗糖质量浓度和接种量的减少无疑会逐渐靠近最大响应区域。蔗糖和接种量减少的步长分别为  $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和 0.5%。从表 3 中实验 3 在

蔗糖质量浓度  $58\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和 3.5% 接种量时 L-苏氨酸产量达到最大值,然后不断降低。选取接近最大响应区域的 3 号实验,以其因素取值为 CCD 实验的中心点。

### 2.3 最佳发酵条件的确定

运用 SAS 软件中心旋转组合实验模块,进行 2 因素 5 水平中心组合实验。实验的设计及响应值结果如表 4 所示。

根据表 4 的实验结果,用 SAS 响应面分析软件进行多元回归分析,回归分析结果如表 5 所示。经回归拟合后,蔗糖和接种量对响应值的影响可用二次回归数学模型表示:

表 4 中心旋转组合实验设计及结果

序号	$X_2/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (蔗糖)	$X_5$ (接种量)	$Y(\text{L-苏氨酸})/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
			Observed	Predicted
1	54(-1)	0.03(-1)	112.35	113.39
2	54	0.04(+1)	109.52	110.98
3	62(+1)	0.03	118.77	116.48
4	62	0.04	119.25	117.28
5	52.34(-1.414)	0.035(0)	109.93	107.89
6	63.66(+1.414)	0.035	110.55	114.53
7	58(0)	0.028(-1.414)	117.74	118.47
8	58	0.042(+1.414)	116.73	117.09
9	58	0.035	121.48	120.86
10	58	0.035	121.49	120.86
11	58	0.035	122.01	120.86
12	58	0.035	119.87	120.86
13	58	0.035	119.73	120.86

表 5 回归模型及方差分析结果

Source	自由度	Sum of square	Mean Square	F	Pr > F
Model	5	222.144 3	44.428 86	8.483 352	0.006 971
Error	7	36.660 27	5.237 182		
Total	12	258.804 6			
R-square		85.83%			

$$Y = -955.106 + 35.546 12X_2 + 1 794.687X_5 - 0.314 329X_2^2 + 41.375X_2X_5 - 612 69.93X_5^2$$

对此数学模型的方差分析结果(表 5)表明,相关系数达到 0.86,说明模型对实际情况的拟合较好。因此可用回归方程对最优发酵条件进行预测。

对响应曲面(图 1)进行岭脊分析,使用 ridge max 命令解出响应值 Y 的最大值 121.153 及其对应的自变量  $X_2 = 58.739(+0.184 82)$ ,  $X_5 = 0.034 6(-0.076 43)$ 。

### 2.4 验证实验

在 5L 罐上对 2.3 确定的各因素最优发酵条件

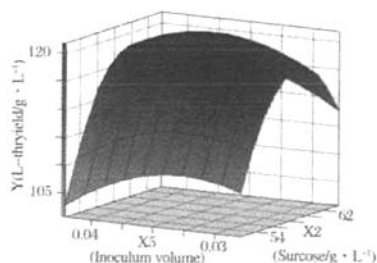


图 1 中心旋转组合响应面

进行验证实验,发酵 42h,以高效液相柱前衍生效测定发酵液中 L-苏氨酸的产量,平均产酸达到 121.20

g/L。与 2.3 数学模型预测的最大产量符合,说明利用响应面优化得到的最优发酵培养基中及最优培养条件下得到的响应值基本符合回归分析所拟合的数学模型,预测模型可应用于 *L*-苏氨酸发酵条件的优化。

### 3 结 论

在 FFD 实验结果的基础上,探讨了影响 *L*-苏氨酸发酵的显著性条件因素,确定蔗糖质量浓度和接种量对 *L*-苏氨酸产量具有显著影响。通过最陡坡试验和中心旋转组合设计建立了显著因素与响应值 *L*-苏氨酸产量之间的数学模型并进行回归分析,结合岭脊分析及验证实验得到最优发酵条件,优化的发酵培养基组成为(g/L):酵母粉 3,蔗糖 58.739,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1, pH 值 7.0;最优的接种量应为 3.46%。在此条件下 *L*-苏氨酸产量稳定达到 121.20 g/L,比未优化前提高了 12.43%,发酵产酸达到国内领先水平,达到或接近世界领先水平。

### 参 考 文 献

- 1 Vladimir G Debabov. The threonine story[J]. Adv Bio-chem Eng Biotechnol, 2003,79:113~136
- 2 Debabov. Method for preparing strains which produce amino acids[P]. U. S. A. 4278765, 1981
- 3 Kazuyuki Okamoto, Masato Ikeda. Development of an industrially stable process for *L*-Threonine Fermentation by an *L*-Methionine-Auxotrophic Mutant of *Escherichia coli* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89 (1):87~89
- 4 Chauhan, Kishor, Ujjval Trivedi, et al. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Lactic Acid Production Using Date Juice [J]. J Microbiol Biotechnol, 2006, 16(9):1 410~1 415
- 5 Bandi Srinivasulu, Yoonjung Kim, Yongkeun Chang, et al. Construction of *asm2* Deletion Mutant of *Actinosynnema pretiosum* and Medium Optimization for Ansamitocin P-3 Production Using Statistical Approach [J]. J Microbiol Biotechnol, 2006, 16(9):1 338~1 346
- 6 李 屠,白景华,蔡昭铃,等.细菌素发酵培养基的优化及动力学初步分析[J].生物工程学报,2001,17(2):187~192
- 7 Montgomery D C. Design and Analysis of Experiments [M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1991
- 8 冯志彬,王东阳,陈宁,等.氮源对 *L*-苏氨酸发酵的影响[J].中国生物工程学报,2006,26(11): 54~58

1 Vladimir G Debabov. The threonine story[J]. Adv Bio-

## Optimization of *L*-threonine Acid Production by Response Surface Methodology

Huang Jin, Huang Lei, Xie Xixian, Chen Ning

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**ABSTRACT** Optimal medium composition and culture conditions for *L*-threonine production via *E. coli* TR-FC fermentation was studied by Response Surface Methodology (RSM). The impact of initial medium constituents and conditions on *L*-threonine production were investigated by Fractional Factorial Design (FFD), discovering that both sucrose and inoculum volume have a substantial influence on *L*-threonine production. The optimal concentrations of sucrose and inoculum volume was defined as 58.739 g/L and 3.46% by the steepest ascent design, Central Composite Rotatable Design (CCD) and Response Surface Analysis. The *L*-threonine yield was promoted by 12.43 % from 107.80 g/L to 121.20 g/L in a 5L fermentor under optimized conditions.

**Key words** response surface methodology, *L*-threonine acid optimization, mathematical model