

响应面优化产琥珀酸放线杆菌生产丁二酸

申乃坤^{1,2}, 秦艳², 王青艳², 谢能中², 米慧芝², 朱绮霞², 廖思明^{1,2}, 黄日波^{1,2}

1 广西大学生命科学与技术学院 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西 南宁 530005

2 广西科学院 非粮生物质酶解国家重点实验室 国家非粮生物质能源工程技术研究中心 广西生物炼制重点实验室, 广西 南宁 530007

申乃坤, 秦艳, 王青艳, 等. 响应面优化产琥珀酸放线杆菌生产丁二酸. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1473-1483.

Shen NK, Qin Y, Wang QY, et al. Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1473-1483.

摘要: 丁二酸是一种重要的 C4 化合物平台, 可以合成一系列重要化合物。文中对产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 发酵生产丁二酸培养基成分进行优化。通过单因素和 Plackett-Burman 试验设计筛选出影响丁二酸发酵的重要参数, 采用最陡爬坡实验逼近最大丁二酸生产区域后, 利用 Box-Behnken 设计确定重要参数的最佳水平。筛选结果表明, 影响丁二酸产量的重要参数是葡萄糖、酵母提取物和碱式碳酸镁浓度。最佳条件为(g/L): 葡萄糖 70.00, 酵母提取物 9.20, 碱式碳酸镁 58.10。优化后丁二酸产量达到 47.64 g/L。与初始条件 (36.89 g/L) 相比, 丁二酸浓度提高了 29.14 %。在最佳工艺条件下得到的试验结果与模型预测值很吻合, 说明建立的模型是有效的。

关键词: 产琥珀酸放线杆菌 GXAS137, Plackett-Burman 试验, 响应面分析, 丁二酸

Received: April 23, 2013; **Accepted:** May 22, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31160023), Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2013GXNSFBA019102), Science foundation of Guangxi Academy of Science (No. 13YJ22SW), BaGui Scholars Program Foundation.

Corresponding author: Ribo Huang. Tel: +86-771-2503902; Fax: +86-771-2503908; E-mail: rbhuang@gxas.cn

国家自然科学基金 (No. 31160023), 广西自然科学基金 (No. 2013GXNSFBA019102), 广西科学院基金 (No. 13YJ22SW), 八桂学者建设工程专项经费资助。

Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology

Naikun Shen^{1,2}, Yan Qin², Qingyan Wang², Nengzhong Xie², Huizhi Mi², Qixia Zhu², Siming Liao^{1,2}, and Ribo Huang^{1,2}

1 Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, Guangxi, China

2 National Non-grain Bio-energy Engineering Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: Succinic acid is an important C4 platform chemical in the synthesis of many commodity and special chemicals. In the present work, different compounds were evaluated for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* GXAS137. Important parameters were screened by the single factor experiment and Plackett-Burman design. Subsequently, the highest production of succinic acid was approached by the path of steepest ascent. Then, the optimum values of the parameters were obtained by Box-Behnken design. The results show that the important parameters were glucose, yeast extract and MgCO₃ concentrations. The optimum condition was as follows (g/L): glucose 70.00, yeast extract 9.20 and MgCO₃ 58.10. Succinic acid yield reached 47.64 g/L at the optimal condition. Succinic acid increased by 29.14% than that before the optimization (36.89 g/L). Response surface methodology was proven to be a powerful tool to optimize succinic acid production.

Keywords: *Actinobacillus succinogenes* GXAS137, Plackett-Burman design, response surface methodology, succinic acid

丁二酸 (又名琥珀酸) 是一种重要的 C4 平台化合物, 广泛应用于食品、医药、香料等工业, 可以取代苯合成 250 种以上的化工产品^[1]。传统生产丁二酸的方法是以石油为原料用化学法进行炼制合成。而随着石油资源日益枯竭以及生产过程污染严重等问题出现, 化学法合成受到限制。微生物发酵法生产丁二酸以其环境友好性、可利用废弃的生物质资源、能够固定温室气体 CO₂ 等优点, 成为近年来国内外的研究热点^[2]。

在众多的产琥珀酸微生物中, 瘤胃微生物产琥珀酸放线杆菌以其高产量 (最高可达 110 g/L^[3])、高耐受性等优势, 成为最具发展前景的丁二酸产生菌之一。影响产琥珀酸放线杆菌发酵的因素众多, 培养基中的碳源、氮源、无机盐及 pH 调节剂等对丁二酸产生有重大影响。Vieille 等^[4]为了考察琥珀酸放线杆菌代谢途径而设计了合成培养基 AM3,

对所含的氮源、无机盐、维生素及生物素等进行了优化。Tang 等^[5]对 CO₂ 浓度对丁二酸发酵的影响进行研究, 结果表明: MgCO₃ 不仅可以对发酵 pH 值进行调节, 而且可以提供发酵所需 Mg²⁺, 丁二酸浓度最高可达 56.1 g/L, 仅比人为通入 CO₂ 丁二酸浓度 (61.92 g/L) 低 7.03%。姜岷等^[6]在分批条件下考察了葡萄糖对丁二酸发酵的底物抑制问题, 以 Na₂CO₃ 作为 pH 调节剂, 采用分批补料方式进行发酵, 消耗 60 g/L 葡萄糖, 能积累 45.27 g/L 丁二酸。丁二酸发酵过程中缺少还原力, Zeikus 等^[7-8]通过向培养基中添加中性红作为电子供体可以提高丁二酸产量。

由以上分析可知: 影响丁二酸发酵的因素众多, 很难用常规方法对影响丁二酸发酵的主要因素进行优化, Plackett-Burman (P-B) 试验和响应面优化试验是比较常见的发酵条件优化的实验设

计,在生化、微生物工程等方面的应用也越来越多^[9-12]。文中对前期筛选到的丁二酸高产菌株 *Actinobacillus succinogenes* GXAS137^[13] 发酵培养基进行了优化,利用 P-B 试验和响应面分析对影响丁二酸发酵的主要因子进行了优化和筛选,再对实验结果进行统计学设计和数据分析,筛选出对目标值影响较大的关键因素;进一步通过响应面设计对丁二酸发酵条件进行优化研究。优化后丁二酸浓度可达 47.64 g/L,居国内先进水平。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* GXAS137^[13],由本实验室分离获得,保藏号为: CCTCC M 2011399。

1.1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 酵母提取物 5, 蛋白胨 5, NaCl₂, NaH₂PO₄ 8.5, K₂HPO₄ 15.5, NaHCO₃ 2, 半胱氨酸盐酸盐 1, pH 自然, 115 °C 灭菌 15 min。

原发酵培养基 (g/L): 碳源 60, 酵母提取物 10, 蛋白胨 10, NaCl 5, (NH₄)₂SO₄ 1, MgCl₂·6H₂O 0.5, CaCl₂ 0.5, MgCO₃ 50。

碳源试验培养基: 除不同碳源外其余与原发酵培养基相同。

氮源试验培养基: 对氮源进行优化时,只添加要考察的氮源,原培养基中的氮源 (酵母提取物或蛋白胨) 不再添加,其余与原发酵培养基相同。

pH 缓冲剂试验培养基: 除 pH 缓冲剂外其余与原发酵培养基相同,需要对 pH 值进行调节,在 1.3 L 发酵罐中进行。

糖类等其他碳源 121 °C 分消 15 min 后单独加入。固体 CaCO₃、碱式 MgCO₃ 在灭菌前加入发酵

培养基中,其他碱液以流加形式加入,控制 pH 在 7.0。

1.1.3 主要仪器及试剂

所用试剂均为国产分析纯或生化试剂;高效液相色谱 (HPLC) 采用美国戴安公司 U-3000 色谱; DG250 小型厌氧工作站 (Don Whitley Scientific); 1.3 L 发酵罐 (Eppendorf BioFlo/CelliGen 115)。

1.2 方法

1.2.1 培养与发酵条件

将甘油保藏的菌种接种到液体种子培养基进行活化,37 °C 培养 15 h 后,按 8% (V/V) 接种量接种于装有 100 mL 发酵培养基的三角摇瓶 (容积为 250 mL) 中进行发酵,置 37 °C、CO₂ 培养箱发酵 48~60 h,进行产物分析。

1.3 L 发酵罐 (Eppendorf BioFlo/CelliGen 115) 中进行厌氧发酵,装液量 0.8 L,培养基成分和三角摇瓶发酵相同。接种量 8% (V/V),发酵温度 37 °C,搅拌转速 150 r/min,通气为 100% CO₂,通气量为 0.2 mL/min。

1.2.2 分析测定方法

有机酸测定^[14]: HPLC 法,戴安 Utimat3000,自动进样器,色谱柱: AminexHPX-87H 300 mm×7.8 mm,流动相 5 mmol/L H₂SO₄, pH 2.5,柱温 45 °C,进样量 10 μL,流速 0.6 mL/min,紫外检测器波长 210 nm。

残糖测定: HPLC 法,采用紫外与示差检测器联用的检测方法,示差检测器温度 50 °C。

样品处理: 发酵液在室温下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,然后用孔径为 0.22 μm 的无菌滤膜过滤,用高效液相色谱 (HPLC) 检测发酵液丁二酸及残糖浓度。

生物量测定: 将发酵液用去离子水稀释适当倍数,使 A₆₆₀ 值在 0.2~0.8 之间,用紫外可见分光

光度计测定。生物量 = $A_{660} \times \text{稀释倍数}$ 。

丁二酸产率 (%) 定义为每消耗 1 g 葡萄糖所产生丁二酸的克数^[15]。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对丁二酸产量的影响

碳源的主要作用是构成细胞物质和提供微生物生长发育所需的能量, 以及提供合成代谢所需的碳源。因此碳源对丁二酸发酵有重要的影响, 不同菌株利用碳源能力不同, 分别在发酵培养基中添加 40 g/L 的不同碳源, 考察碳源对丁二酸产量的影响, 发酵 48 h 后, 分析测定样品, 每组设 3 个平行, 结果取平均值 (以下同)。

从图 1 可以看出以甘露醇为碳源时丁二酸产量最高 (31.36 g/L), 丁二酸与主要副产物的比例也最高 (丁二酸/乙酸=6.2); 其次为葡萄糖 (28.68 g/L, 丁二酸/乙酸=5.45)、麦芽糖 (24.34 g/L, 丁二酸/乙酸=3.72)、果糖 (22.69 g/L, 丁二酸/乙酸=3.54)、蔗糖 (21.72 g/L, 丁二酸/乙酸=2.85)、木糖 (18.43 g/L, 丁二酸/乙酸=3.43); 而以葡萄糖为碳源时生物量最高 (OD_{660} =9.8), 其次为甘露醇 (7.6)、麦芽糖 (6.0)、果糖 (5.6)、蔗糖 (5.1)、木糖 (4.7); 这可能与碳源还原性大小有关, 琥珀酸放线杆菌发酵生产丁二酸过程中, 还原力严重不足, 1 mol 葡萄糖可以生成 2 mol 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP), 同时可以生成 2 mol NADH, 而 2 mol PEP 生成 4 mol 的丁二酸则需要 4 mol 的 NADH, 因此, 通常情况下, 产琥珀酸放线杆菌在厌氧发酵产丁二酸的过程中常含有乙酸、甲酸等不需要消耗 NADH 合成的代谢产物, 由此来维持胞内的氧化还原电位平衡^[16-17]。而甘露醇和葡萄糖还原性较其他碳源强^[18], 所以, 丁二酸产量较高, 副产物较少。综合考虑丁二酸产量及成本等因素, 选择葡萄糖作为丁二酸发酵的碳源。

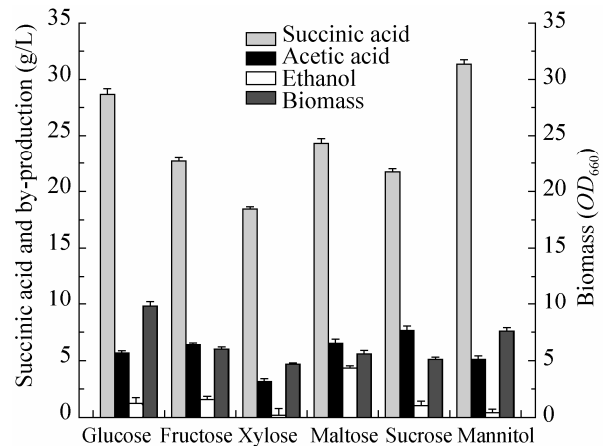


图 1 不同碳源对丁二酸发酵的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on the production of succinic acid.

2.2 不同氮源对丁二酸产量的影响

氮源是构成菌体物质和一些代谢产物的必需营养元素, 氮源可分为无机氮源和有机氮源两类, 无机氮源特点是成分简单, 利用速度快, 主要包括氨水、铵盐或硝酸盐、尿素等。氮源除可以提供微生物所需的氮源外, 还可以稳定和调节发酵的 pH 值; 有机氮源成分复杂, 利用速度较慢, 主要包括酵母提取物、蛋白胨、玉米浆、豆饼粉、花生饼粉等, 除提供氮源外, 还提供大量的无机盐及生长因子。以 40 g/L 的葡萄糖为碳源, 氮源浓度为 5 g/L, 有机氮源选取酵母提取物、蛋白胨、玉米浆, 无机氮源选取硫酸铵、尿素, 进行发酵, 发酵 48 h 后, 分析测定样品。

从图 2 中可以看出最适氮源为酵母提取物, 其次为玉米浆, 无机氮源生长和发酵很差, 这可能是因为琥珀酸放线杆菌本身不能合成生物素、烟酸、甲硫氨酸等生长因子^[19], 需要在培养基中添加, 而酵母提取物中可以满足琥珀酸放线杆菌需求, 菌体生长和丁二酸产量最高, 选择酵母提取物作为丁二酸发酵的氮源。

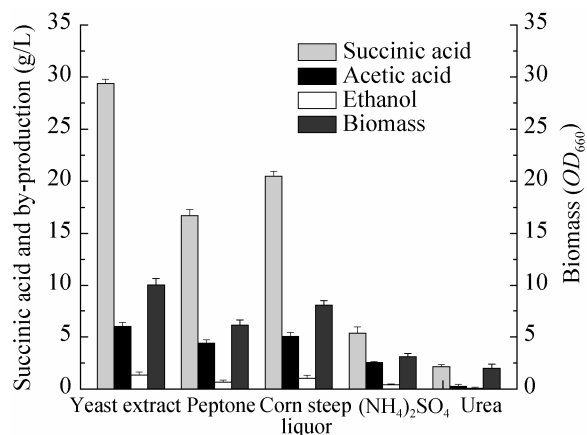


图2 不同氮源对丁二酸发酵的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on the production of succinic acid.

2.3 不同 pH 缓冲剂对丁二酸产量的影响

产琥珀酸放线杆菌发酵最佳 pH 为 7.0。在发酵过程中,有机酸的积累会导致 pH 下降,需要添加 pH 调节剂来维持环境的中性水平,有关研究表明^[20-21],pH 值是丁二酸发酵的关键因素之一,因此,需要选择合适的 pH 调节剂用于丁二酸生产。由于 NaOH (10 mol/L)、氨水 (14 mol/L)、Na₂CO₃ (2.5 mol/L) 需要进行流加,发酵在 1.3 L 发酵罐进行分批发酵培养,装液量为 0.8 L,接种量 5%。搅拌转速 150 r/min, pH 控制在 6.5~7.2,温度 37 °C, CO₂ 通气量 0.25 L/min。

从图 3 可以看出,氨水对菌株生长有一定的毒性,菌体生长和发酵受到明显抑制,主要是因为细胞膜对 NH₄⁺ 有较高的通透性, NH₄⁺ 的渗入会造成胞内 pH 水平发生变化,细胞需要更多的能量将 NH₄⁺ 泵出,当能量供给不足时,影响细胞无法正常的生长代谢,最终导致死亡^[22]。CaCO₃ (40 g/L) 的溶解能力差,不能将 pH 维持在适合菌体生长的水平,发酵过程中 pH 不断降低,至发酵结束, pH 降至 5.7,影响菌体生长; Na₂CO₃ 或 NaOH 控制发酵 pH 时,随着产酸的进行, Na⁺ 浓度逐渐升高,

细胞代谢过程中 Na⁺ 有十分重要的作用,它能够影响跨膜 pH 梯度、细胞渗透压以及胞内 pH 调控水平,但当 Na⁺ 浓度高于 4 g/L 时,产琥珀酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succinicproduces* 最高 OD₆₆₀ 值呈现下降趋势,丁二酸的产量也随之下^[23]。在发酵过程中采用含 Na⁺ 调节剂,则 Na⁺ 不断积累。至发酵中后期,发酵液中 Na⁺ 浓度均处于较高水平,造成高渗环境。这对菌体有较大的负面作用,使细胞不能正常代谢,最终导致衰亡。而以 MgCO₃ 控制 pH 时,整个发酵过程中 pH 从初始的 7.1 逐渐下降到发酵终了时的 6.5 左右,菌体生长情况良好,丁二酸产量较高,不易发生絮凝结块现象。这是因为 Mg²⁺ 是许多酶的激活剂,在丁二酸合成途径中的关键酶——PEP 羧化激酶需要 Mg²⁺ 作为辅助因子^[24-25],而 PEP 羧化激酶是合成产物丁二酸的关键酶,能够促进 PEP 转化为草酰乙酸 (OAA),进一步合成目标产物丁二酸。同时, Mg²⁺ 也能够提高胞内高能化合物的储备,为胞内代谢以及胞内外的物质运输提供更多能量支持。因此,选择 MgCO₃ 作为丁二酸发酵的 pH 缓冲剂。

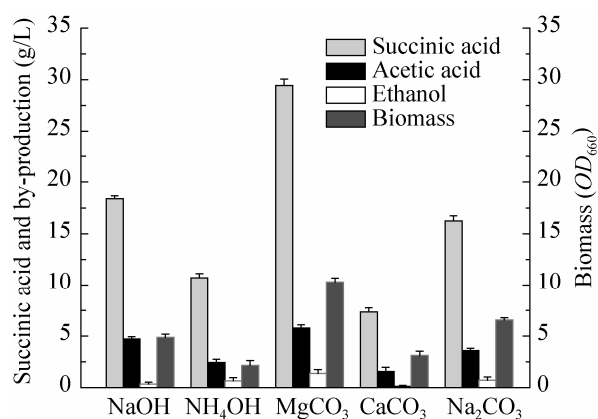


图3 pH 缓冲剂对丁二酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of different pH neutralizing agents on the production of succinic acid.

2.4 影响丁二酸发酵重要因素的筛选

根据单因素试验结果和有关文献, Plackett-Burman 试验选用试验次数 N-12 的设计, 对 9 个因素进行考察, 并余留 2 个空项以估计实验误差。每个因素取 2 个水平, 以丁二酸浓度 (g/L) 的平均值 Y 为响应值, 每组试验设置 3 个平行。Plackett-Burman 实验设计因素及水平见表 1, 实验设计矩阵见表 2, 对表 2 进行统计分析, 结果见表 3。

“Prob> F ”小于 0.05, 表明因素显著。“Model Prob> F ”等于 0.0093, 表明模型是重要的。因此, 葡萄糖、酵母提取物和碳酸镁浓度对丁二酸浓度有重要的影响。通过表 4 的分析, 我们选择了“Prob> F ”小于 0.05 的 3 个因素 X_2 、 X_3 、 X_4 (即葡萄糖、酵母提取物和碱式碳酸镁浓度) 是影响丁二酸发酵的重要因素。

2.5 最陡爬坡试验

最陡爬坡实验设计及结果如表 5 所示。结果显示, 丁二酸最高产量在第 3 次附近, 故以实验 3 的条件为响应面实验因素水平的中心点。

表 1 Plackett-Burman 设计实验参数和水平

Table 1 Factors levels of Plackett-Burman design

Code	Variables	Level (-1)	Level (+1)
X_1	NaCl (g/L)	1.00	1.20
X_2	Glucose (g/L)	40.00	50.00
X_3	Yeast extract (g/L)	4.00	6.00
X_4	MgCO ₃ (g/L)	40.00	50.00
X_5	KH ₂ PO ₄ (g/L)	3.00	4.00
X_6	MnCl ₂ (g/L)	0.60	0.80
X_7	CH ₃ COONa (g/L)	1.00	1.20
X_8	CaCl ₂ (g/L)	2.00	2.50
X_9	MgCl ₂ (g/L)	2.00	2.50

表 2 Plackett-Burman 试验设计表和结果^a

Table 2 Experimental design of Plackett-Burman and corresponding results

Run	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	Y
1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	29.37±0.41
2	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	30.18±0.33
3	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	31.54±0.52
4	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	30.13±0.27
5	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	32.39±0.31
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1	30.86±0.40
7	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	32.09±0.18
8	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	31.14±0.44
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	29.24±0.25
10	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	28.73±0.32
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	30.39±0.27
12	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	28.99±0.36

a: each value is an average of three parallel replicates.

表 3 单变量方差分析

Table 3 Univariate analysis of variance

Source	Degree of freedom (DF)	Sum of squares (SS)	Mean square (MS)	F value	Prob>F ^b
Model	9	12.68	4.23	9.67	0.0049
Error	2	3.50	0.44		
Total error	11	16.17			

b: values of "Prob > F" less than 0.05 indicate model terms are significant. The model *F*-value of 9.67 implies the model is significant. There is only a 0.49% chance that a "Model *F*-Value" this large could occur due to noise^[26-28].

表 4 参数估计和各因素影响^c

Table 4 Parameter estimation and effects of different factors

Variables	Degree of freedom	Coefficient estimate	Standard error	Prob>F	Order
Intercept	1	12.68	0.19	0.0049	0
X ₁	1	-0.10	0.19	0.3645	9
X ₂	1	8.09	0.19	0.0026	1
X ₃	1	2.26	0.19	0.0498	3
X ₄	1	2.33	0.19	0.0487	2
X ₅	1	0.28	0.19	0.1379	4
X ₆	1	-0.24	0.19	0.1568	6
X ₇	1	0.21	0.19	0.2100	7
X ₈	1	-0.26	0.19	0.2263	5
X ₉	1	-0.18	0.19	0.1419	8

c: values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case X₂, X₄, X₃ are significant model terms.

表 5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Experimental design of steepest ascent and corresponding results

Run	Glucose (g/L)	Y E (g/L)	MgCO ₃ (g/L)	Y
1	50.00	6.00	50.00	30.44±0.31
2	55.00	8.00	55.00	33.60±0.24
3	60.00	10.00	60.00	36.89±0.40
4	65.00	12.00	65.00	34.81±0.37
5	70.00	14.00	70.00	32.87±0.19
6	75.00	16.00	75.00	25.78±0.28

Y E: yeast extract.

2.6 应用响应面分析法确定重要因素的最佳水平

2.6.1 试验因素水平设计

运用 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 以最陡爬坡实验得到的中心点对 Plackett-Burman 实验确定的 3 个显著性影响因子各取 3 水平。本项实验安排响应面试验各个因素水平如表 6 所示。

2.6.2 实验设计及结果

根据响应面分析试验软件设计了 3 因素 3 水平共 15 个实验点进行响应面分析, 试验安排及结果见表 7。15 个试验点分为两类, 一类是析因点, 共 12 个; 一类是零点(试验点 13, 14, 15)为区域

表 6 响应面分析实验参数水平

Table 6 Factors and levels of response surface central composite design

Variables		Level		
Code	Factors	Low (-1)	Center (0)	High (+1)
X_1	Glucose (g/L)	55.00	60.00	65.00
X_2	Y E (g/L)	8.00	10.00	12.00
X_3	MgCO ₃ (g/L)	55.00	60.00	65.00

Y E: yeast extract.

的中心点。零点重复 3 次，用于估计试验的误差。

根据表 7 的试验结果，以丁二酸浓度 Y 值为响应值，对数据进行回归分析，试验因子对响应值的影响可得到如下方程： $Y=45.92+5.25X_1-1.02X_2-1.93X_3-2.35X_1^2-2.88X_2^2-3.50X_3^2+0.06X_1X_2-0.36X_1X_3+0.09X_2X_3$ 。

决定系数 $R^2=0.9884$ ，说明方程的拟合度很好，可以用该回归方程代替真实试验点结果进行分析。回归方程的方差分析还表明，一次项和二次项对响应值的影响是十分显著的，交互项的影响不明显，试验因子与响应值之间不是线性关系。对响应面实验进行方差分析，结果见表 8。

表 8 的方差分析结果表明，“Model Prob>F”等于 0.0003 远小于 0.05，说明模型是显著的。一般认为，决定系数 R^2 大于 0.9，表明预测值能与试验值具有高度相关度^[15]。在本试验中， $R^2=0.9884$ ，表明仅有不到 2% 的丁二酸产量变异不能由该模型解释。

图形能够提供一种形象的观测响应值和试验参数水平关系的方法^[29]。通过上面多元回归方程做响应曲面曲线图，结果见图 4~6。由响应面的规范分析可知，回归模型存在最大稳定点。 Y 的最大估计值为 47.59，最佳点为 $X_1=2.00$ 、 $X_2=-0.16$ 、 $X_3=-0.38$ 即葡萄糖浓度为 70g/L，酵母提取物浓度为 9.2 g/L，碱式碳酸镁浓度为 58.1 g/L，此点丁二酸浓度为 47.59 g/L。

表 7 Box-Bohnkon 试验设计表和结果

Table 7 Experimental design of Box-Bohnkon and corresponding results

Run	X_1	X_2	X_3	Y
1	-1	-1	0	36.78±0.27
2	-1	1	0	34.98±0.36
3	1	-1	0	46.28±0.41
4	1	1	0	44.70±0.25
5	0	-1	-1	43.26±0.34
6	0	-1	1	38.22±0.47
7	0	1	-1	40.68±0.26
8	0	1	1	36.00±0.23
9	-1	0	-1	35.45±0.34
10	1	0	-1	47.56±0.40
11	-1	0	1	33.30±0.33
12	1	0	1	43.97±0.19
13	0	0	0	45.96±0.27
14	0	0	0	46.23±0.35
15	0	0	0	45.56±0.31

表 8 Box-Bohnkon 试验方差分析结果

Table 8 Univariate analysis of variance of Box-Bohnkon experimental

Term	DF	SS	MS	F	Pr>F
Model	9	343.180	38.130	47.15	0.0003
X_1	1	220.500	220.500	272.66	0.0001
X_2	1	8.360	8.360	10.34	0.0236
X_3	1	29.880	29.880	36.94	0.0017
X_1*X_1	1	20.410	20.410	25.23	0.0040
X_1*X_2	1	0.012	0.012	0.015	0.9074
X_1*X_3	1	0.520	0.520	0.64	0.4597
X_2*X_2	1	30.640	30.640	37.89	0.0016
X_2*X_3	1	0.032	0.032	0.04	0.8492
X_3*X_3	1	45.120	45.120	55.80	0.0007
Lack of fit	3	4.040	0.810	11.19	0.0831

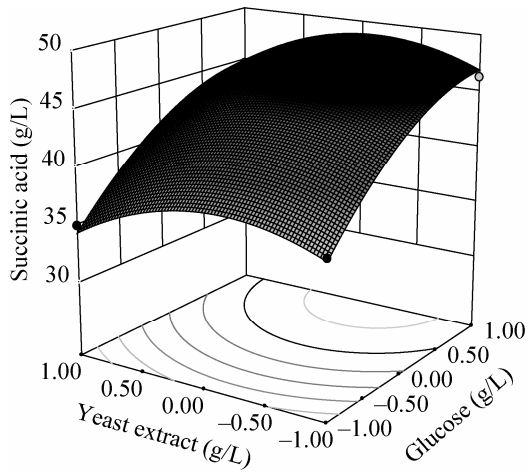


图 4 葡萄糖和酵母提取物浓度对丁二酸产量影响的响应面图

Fig.4 Surface layer of the mutual-affecting of glucose and yeast extract concentration on succinic acid yield.

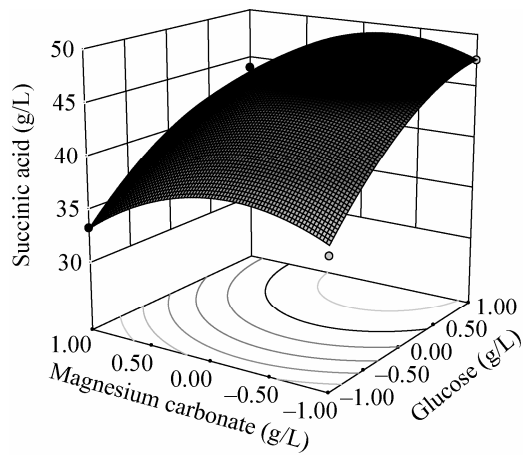


图 5 葡萄糖和碳酸镁浓度对丁二酸产量影响的响应面图

Fig.5 Surface layer of the mutual-affecting of glucose and magnesium carbonate concentration on succinic acid yield.

2.7 发酵罐验证试验

对最佳点进行 3 次 1.3 L 发酵罐验证试验, 发酵过程残糖、生物量、丁二酸及其主要副产物乙

酸的浓度变化见图 7。丁二酸发酵结果平均值 47.64 g/L, 丁二酸得率为 68.06%, 表明预测值与验证试验很接近, 说明回归方程能够比较真实地反映各筛选因素对丁二酸发酵的影响。

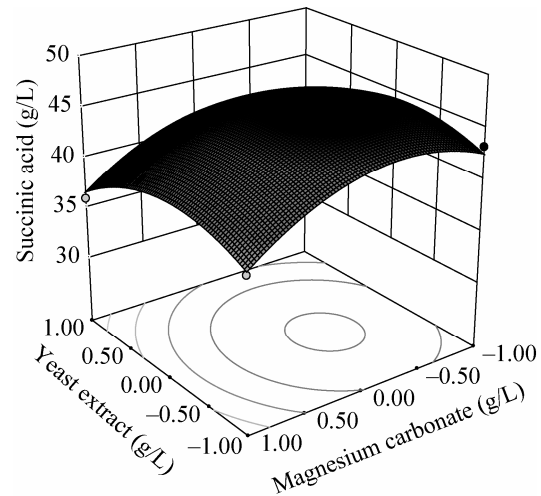


图 6 酵母提取物和碳酸镁浓度对丁二酸产量影响的响应面图

Fig.6 Surface layer of the mutual-affecting of yeast extract and magnesium carbonate concentration on succinic acid yield.

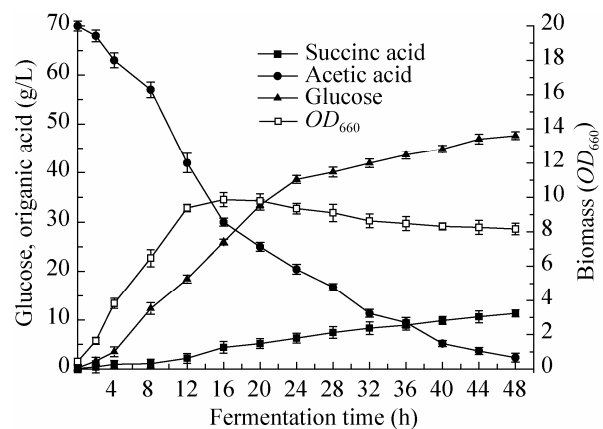


图 7 1.3 L 发酵罐验证试验发酵结果

Fig.7 Demonstration test results of 1.3 L fermentor.

3 结论

通过单因素试验确定适合琥珀酸放线杆菌产丁二酸的碳源、氮源、pH 调节剂分别为葡萄糖、酵母提取物和碱式碳酸镁,再利用 Plackett-Burman 试验设计筛选影响丁二酸发酵的重要参数,采用最陡爬坡实验逼近最大丁二酸生产区域后,利用 Box-Behnken 设计确定重要参数的最佳水平。筛选结果表明,影响丁二酸产量的重要参数及其最佳浓度分别为:葡萄糖 70.00 g/L,酵母提取物 9.20 g/L,碱式碳酸镁 58.10 g/L。优化后丁二酸产量达到 47.64 g/L。与初始条件 (36.89 g/L) 相比,丁二酸浓度提高了 29.14%。在最佳工艺条件下得到的试验结果与模型预测值很吻合,说明建立的模型是有效的。表明采用响应面法优化发酵工艺是提高丁二酸发酵浓度的有效途径之一。该菌株是一株很有应用开发潜力的丁二酸生产菌株。

REFERENCES

- [1] Bechthold K, Bretz S, Kabasci R, et al. Succinic acid: a new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chem Eng Technol*, 2008, 31(5): 647–654.
- [2] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51(5): 545–552.
- [3] Guettler MV, Jain MK, Rumler D. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants: US 5573931A. 1996-11-12.
- [4] McKinlay J B, Zeikus J G, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Microbiol*, 2005, 71(11): 6651–6656.
- [5] Zhu W, Zhu LW, Tang YJ, et al. Significance of CO₂ donor on the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 87–96.
- [6] Fang XJ, Li J, Jiang M, et al. Substrate inhibition of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* NJ113. *Chin J Proc Eng*, 2010, 10(5): 976–980 (in Chinese).
- 方晓江, 李建, 姜岷, 等. *Actinobacillus succinogenes* NJ113 产丁二酸过程中的底物抑制. *过程工程学报*, 2010, 10(5): 976–980.
- [7] Park DH, Laivenieks M, Zeikus JG, et al. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Appl Environ. Microbiol*, 1999, 65(7): 2912–2917.
- [8] Park DH, Zeikus JG. Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *J Bacteriol*, 1999, 181(8): 2403–2410.
- [9] Shen NK, Wang QY, Huang RB, et al. Enhancing ethanol production by using thermophilic yeast by response surface methodology. *Chin J Biotech*, 2010, 26(1): 42–47 (in Chinese).
- 申乃坤, 王青艳, 黄日波, 等. 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇. *生物工程学报*, 2010, 26(1): 42–47.
- [10] Huang YT, Wu SL, Du LX. The optimization for alcohol very gravity fermentation from corn meshing. *Sci Technol Food Ind*, 2002, 23(8): 66–69 (in Chinese).
- 黄宇彤, 伍松陵, 杜连祥. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化. *食品工业科技*, 2002, 23(8): 66–69.
- [11] Zhang YJ, Li Q, Xing JM, et al. Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM). *Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(2): 103–110.
- [12] Aghaie E, Pazouki M, Hosseini MR, et al. Response surface methodology (RSM) analysis of organic acid production for Kaolin beneficiation by *Aspergillus niger*. *Chem Eng J*, 2009, 147(2/3): 245–251.
- [13] Shen NK, Qin Y, Huang RB, et al. Screening, identification and preliminary fermentation of a high succinic acid production strain. *China Biotechnol*, 2012, 32(10): 57–62 (in Chinese).
- 申乃坤, 秦艳, 黄日波, 等. 一株丁二酸高产菌株的筛选鉴定及初步发酵研究. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(10): 57–62.

- [14] Pil K, Maris L, Zeikus J Gregory, et al. Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(2): 1238–1241.
- [15] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour Technol*, 2008, 99(6): 1736–1742.
- [16] McKinlay JB, Shachar-Hil Y, Zeikus JG, et al. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ^{13}C -labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng*, 2007, 9: 177–192.
- [17] McKinlay JB, Shachar-Hil Y, Zeikus JG, et al. A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production. *BMC Genomics*, 2010, 11: 680–695.
- [18] Lin H, Bennett GN, San KY. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(3): 87–93.
- [19] Xi YL, Chen KQ, Jiang M, et al. Effect of biotin and similar compound on succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a chemically defined medium. *Biochem Eng J*, 2012, 69: 87–92.
- [20] Lee PC, Lee WG, Kwon S, et al. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H_2/CO_2 supply and glucose concentration. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 24: 549–554.
- [21] Samuelov NS, Lamed R, Zeikus JG, et al. Influence of $\text{CO}_2\text{-HCO}_3$ level and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 3013–3019.
- [22] Yang ZN, Jiang M, Li J, et al. Effects of different neutralizing agents on succinate production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113. *Chin J Biotech*, 2010, 26(11): 1500–1506 (in Chinese).
杨卓娜, 姜岷, 李建, 等. 不同 pH 调节剂对产琥珀酸放线杆菌 NJ113 发酵产丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2010, 26 (11): 1500–1506.
- [23] Pyung CL, Woo GL, Sang YL, et al. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. *Process Biochem*, 1999, 35: 49–55.
- [24] Sergio B, Mauricio T, Maris L, et al. Comparative kinetic effects of Mn (II), Mg (II) and the ATP/ADP ratio on phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein J*, 2007, 26(4): 265–269.
- [25] Carolina S, Andrea P, Rodrigo E, et al. Electrostatic interactions play a significant role in the affinity of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase for Mn^{2+} . *Biochimie*, 2010, 92(7): 814–819.
- [26] Singh A, Bishnoi NR. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. *Ind Crops Prod*, 2013(41): 221–226.
- [27] Serra A, Strehaiano P, Taillandier P. Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Int J Food Microbiol*, 2005, 104: 257–265.
- [28] Hacker RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 1946, 33: 305–325.
- [29] Sharma S, Malik A, Satya S. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05. *J Hazard Mater*, 2009, 164(2/3): 1198–1204.

(本文责编 郝丽芳)