

响应面法优化

产酸丙酸杆菌丙酸发酵条件的研究

刘寅^{1,2}, 张永光¹, 张汝兵¹, 张帆¹, 秦博^{1,2}, 朱建航^{1,*}

(1.中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物燃料重点实验室, 山东青岛 266101;

2.中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:采用 Box-Behnken 设计和响应面分析法(Response surface methodology, RSM), 以产酸丙酸杆菌发酵甘油产丙酸的 3 个关键因素(培养温度、pH 和接种量)为自变量, 以丙酸产量为响应值, 对上述因素的最佳水平范围进行了探讨与优化。实验结果表明, 培养温度和 pH 对丙酸产量有显著性影响, 并据此建立了相关的数学模型。得到的工艺参数的优选结果是: 培养温度为 29.75℃、pH 为 6.61、接种量为 6.15% (v/v), 丙酸产量最大预测值为 17.96g/L。经过优化, 丙酸产量提高了 27.9%, 实验值与预测值基本相符。

关键词:产酸丙酸杆菌, 丙酸, Box-Behnken 设计, 响应面法

Optimization of fermentation conditions for the production of propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici* using response surface methodology

LIU Yin^{1,2}, ZHANG Yong-guang¹, ZHANG Ru-bing¹, ZHANG Fan¹, QIN Bo^{1,2}, ZHU Jian-hang^{1,*}

(1.Key Laboratory of Biofuel, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences,

Qingdao 266101, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) based on a three-factor Box-Behnken design of experiments was used to optimize the propionic acid yield. The critical factors selected for the investigation were temperature, pH and inoculum size. The objectives of this work were to locate optimum levels of those process parameters, and to find out the interaction among them for enhancement of the propionic acid yield. The results showed that the effect of culture temperature and pH on the propionic acid yield were significant. The optimized parameters were temperature of 29.75℃, pH of 6.61, inoculum size of 6.15% (v/v). Under those conditions, it was predicted that the highest yield of propionic acid was 17.96g/L. After optimization, the propionic acid yield increased by 27.9%, and the experimental data basically in line with the predicted values.

Key words: *Propionibacterium acidipropionici*; propionic acid; Box - Behnken design; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0167-04

丙酸及其衍生物是一类重要的工业原料, 可以广泛应用于食品、医药、饲料等行业, 作为食品添加剂、防腐剂、香料及医药前体使用^[1-3]。2006 年全球丙酸总生产能力约为 32 万 t, 主要集中于美国、英国、德国等国。而我国丙酸年产量不足 200t, 主要依赖于进口^[4]。丙酸生产方法包括化学合成法和发酵

法。化学合成法是以石油化工产品为原料, 在高温高压条件下使用催化剂合成的。而微生物发酵法由于原料可再生、对环境友好等优点越来越受到青睐。利用丙酸菌进行丙酸发酵时, 对发酵条件进行优化是必要的。目前, 国内外关于丙酸发酵条件的优化的报道比较多, 但主要是考察单个因素对丙酸产量的影响, 如 pH^[5]、温度和碳源^[6]等, 综合考虑发酵条件中多个因素对丙酸产量影响的报道却很少。多因素优化实验可以采用响应面法或正交实验法。响应面法(response surface methodology, RSM)是利用合理的实验设计并通过实验得到一些数据, 然后采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关

收稿日期: 2010-01-11 * 通讯联系人

作者简介: 刘寅(1979-), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 生物工程(发酵工程)。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2009AA02Z210); 青岛市科技攻关计划(07-2-1-25-nsh)。

系,最终通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[7]。响应面法不仅能考察发酵条件中的各个关键因素,而且能同时考察各种显著影响因素之间交互作用对优化结果的影响,从而得到最优的发酵条件^[8-9]。本文采用三因素三水平 Box-Behnken 实验设计,综合考察了温度、pH 和接种量对丙酸产量的影响。利用“Design-Expert 7.1.6”软件中的功能进行实验设计及结果分析,探讨影响丙酸发酵的各种因素及其相互作用,以期获得较高的丙酸产量,为工业化生产提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

Propionibacterium acidipropionici CGMCC1.2225/1.2230 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;种子培养基(g/L) 酵母提取物 10.0、胰酶大豆肉汤 5.0、K₂HPO₄ 2.5、KH₂PO₄ 1.5, pH7.0, 121℃ 灭菌 15min;发酵培养基(g/L) 酵母提取物 10.0、胰酶大豆肉汤 5.0、K₂HPO₄ 2.5、KH₂PO₄ 1.5、甘油 40, pH7.0 (随实验不同有所变化), 121℃ 灭菌 15min。

Bugbox 厌氧工作站 英国 Ruskin 公司; Varian 450-GC 气相色谱仪 美国 Varian 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

1.2.1.1 种子培养 向装有 100mL 培养基的定制的 250mL 摇瓶中充入纯氮气,丁基橡胶塞密封后 121℃ 灭菌 20min。以 5% 的接种量接种, 30℃, 150r/min 培养 48h。

1.2.1.2 厌氧摇瓶培养 摇床转速 150r/min, 温度分别设置为 27、30、33、36℃, pH 分别控制在 5.5、6.0、6.5、7.0, 接种量分别为 2.5、8、10% (v/v), 培养 192h。

1.2.2 丙酸测定 采用气相色谱法对发酵液中的丙酸进行定量。色谱柱: FFAP 毛细管柱 (25m × 0.25mm × 0.20μm); 升温程序: 80℃ 保持 1min; 以 25℃/min 升至 120℃, 0min; 以 30℃/min 升至 135℃, 0min; 以 15℃/min 升至 180℃, 保持 1min; 汽化室温度: 240℃; 检测器温度: 250℃。

1.2.3 响应面法优化发酵条件

1.2.3.1 单因素实验 以 *P. acidipropionici* CGMCC1.2225 为实验菌种, 选取不同接种量、温度和 pH 分别进行单因素考察。

1.2.3.2 Box-Behnken 实验设计 单因素实验结果显示: 温度、pH 和接种量是影响 *P. acidipropionici* CGMCC1.2225 丙酸产量的关键因素。利用 Design-Expert 7.1.6 软件进行 Box-Behnken 实验设计, 各因素与水平见表 1, 每个因素三个水平, 中心点有五个重复。

表 1 Box-Behnken 实验因素水平表

因素	-1	0	1
A 温度(℃)	27	30	33
B pH	6.0	6.5	7.0
C 接种量(% ,v/v)	2	5	8

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 温度对丙酸产量的影响 由表 2 可知, 丙酸的量随着发酵温度的变化而变化, 在 30℃ 之前, 随着温度的上升, 丙酸的量有所增加, 在 30℃ 时达到最大, 随后随着温度的升高丙酸产量下降, 这可能与菌体最适生长温度有关, 且温度对丙酸合成的关键酶的活性有一定的影响。

表 2 培养温度对丙酸产量的影响(pH7.0, 接种量 2%)

温度(℃)	丙酸产量(g/L)
27	14.37 ± 0.36
30	16.07 ± 0.56
33	15.03 ± 0.72
36	14.47 ± 0.45

2.1.2 pH 对丙酸产量的影响 由表 3 可知, pH 对丙酸发酵的影响很大, 在近中性的 pH (6.5~7.0) 范围内, 丙酸产量较高, 当 pH 为 6.5 时丙酸产量最高。当 pH 下降到 6.0 以下时, 丙酸产量迅速下降, 这是因为有机酸发酵时, 发酵液 pH 的下降会强烈抑制菌体生长和有机酸的合成, 丙酸发酵时也不例外。

表 3 pH 对丙酸产量的影响(30℃, 接种量 2%)

pH	丙酸产量(g/L)
5.5	11.42 ± 0.18
6.0	12.99 ± 0.35
6.5	15.93 ± 0.52
7.0	15.12 ± 0.48

2.1.3 接种量对丙酸产量的影响 由表 4 可知, 丙酸产量随着接种量的增加而变化, 呈现出先上升后下降的趋势。当接种量由 2% 增加到 5% 时, 丙酸产量达到最高, 这可能是因为增大接种量, 导致了菌体生长加快和发酵周期缩短, 从而减少了菌体生长及其他代谢过程对底物需求的缘故。但是当接种量进一步增加时, 丙酸产量没有增加反而有所降低, 这可能是因为过高的接种量使得菌体生长过快, 底物更多地用于菌体合成, 从而减少了丙酸的合成。

表 4 接种量对丙酸产量的影响(30℃, pH6.5)

接种量(% ,v/v)	丙酸产量(g/L)
2	14.84 ± 0.37
5	16.59 ± 0.66
8	15.11 ± 0.45
10	14.94 ± 0.33

2.2 Box-Behnken 实验结果

对培养温度(A)、培养基 pH(B) 和接种量(C) 进行了三因素三水平响应面分析实验, 实验设计与结果见表 5。

以丙酸产量为响应指标, 利用 Design-Expert 7.1.6 软件对表 4 进行二次多元回归拟合, 得到丙酸产量对编码自变量 A、B 和 C 的二元多次回归方程:

$$Y = -756.24 + 14.084A + 169.33B + 1.78C - 0.18A^2 - 11.64B^2 - 0.05C^2 - 0.51AB - 0.03AC - 0.04BC$$

回归诊断表明, 决定系数(R²) 为 0.9954, 信噪比(Adequate.Precision) 为 40.294, 这表明方程的拟合度与可信度均很高, 实验误差较小, 能够对丙酸发酵过程进行预测与分析。

回归模型方差分析(表 6) 显示, 对丙酸产量所建立的回归模型极显著(P < 0.01), B、C、AB、A²、B²、C²

对丙酸产量的影响极为显著 ($P < 0.01$)；AC 对丙酸产量的影响显著 ($P < 0.05$)；A 和 BC 对丙酸产量的影响不显著 ($P > 0.05$)。其中培养温度与 pH、培养温度与接种量之间的交互作用显著，而 pH 与接种量之间的交互作用不显著。

表 5 Box-Behnken 实验设计与结果

实验号	A	B	C	丙酸产量(g/L)	
				实际值	预测值
1	-1	-1	0	11.15	11.30
2	1	-1	0	12.69	12.81
3	-1	1	0	15.37	15.25
4	1	1	0	13.84	13.68
5	-1	0	-1	15.02	15.10
6	1	0	-1	15.45	15.57
7	-1	0	1	16.44	16.32
8	1	0	1	15.86	15.78
9	0	-1	-1	12.98	12.74
10	0	1	-1	15.25	15.29
11	0	-1	1	13.63	13.59
12	0	1	1	15.64	15.87
13	0	0	0	17.71	17.77
14	0	0	0	17.92	17.77
15	0	0	0	17.76	17.77
16	0	0	0	17.87	17.77
17	0	0	0	17.57	17.77

表 6 回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	66.10	9	7.34	168.10	<0.0001
A	2.450E-003	1	2.450E-003	0.056	0.8196
B	11.64	1	11.64	266.42	<0.0001
C	1.03	1	1.03	23.57	0.0017
AB	2.36	1	2.36	53.93	0.0002
AC	0.26	1	0.26	5.84	0.0464
BC	0.017	1	0.017	0.39	0.5537
A ²	10.68	1	10.68	244.55	<0.0001
B ²	35.67	1	35.67	816.33	<0.0001
C ²	0.97	1	0.97	22.25	0.0022
残差	0.31	7	0.044		
总变异	66.41	16			

注: $R = 0.9977$, $R^2 = 0.9954$, Adjusted. $R^2 = 0.9895$, Adequate. Precision = 40.294.

响应面优化模型中 A、B、C 交互作用对丙酸产量 Y 的影响见图 1~图 3。

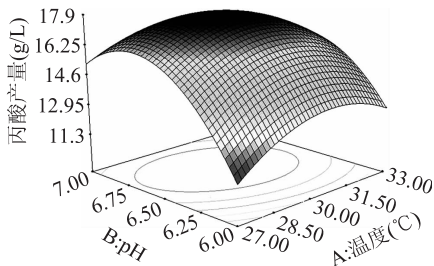


图 1 温度与 pH 交互作用对丙酸产量的影响

从图 1 和表 6 可以看出，培养温度和 pH 对丙酸产量的交互作用极显著。当培养温度不变时，随着 pH 的提高，丙酸产量呈现出先增加后减少的趋势；当 pH 恒定，丙酸产量随着温度的提高也呈现出先增

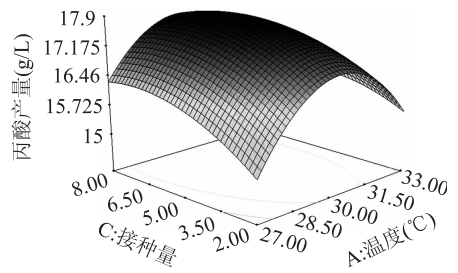


图 2 温度与接种量交互作用对丙酸产量的影响

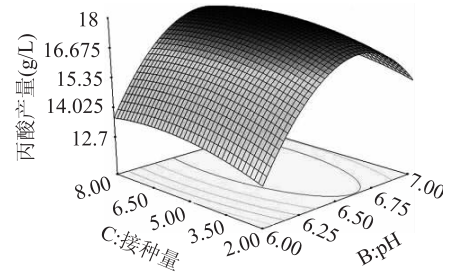


图 3 pH 与接种量交互作用对丙酸产量的影响

加后减少的趋势。

从图 2 和表 6 分析可知，培养温度和接种量之间的交互作用显著。温度不变，随着接种量的增大，丙酸产量逐渐增加，当接种量为 5% 左右时，丙酸产量达到最大，而后随着接种量的增加丙酸产量的变化不明显。当接种量恒定时，随着 pH 的提高，丙酸产量呈现出先增加后减少的趋势。

从图 3 和表 6 可以看出，pH 与接种量之间的交互作用不显著，所以可以忽略它们之间的交互作用。

最后可以根据“Design-Expert 7.1.6”软件中的 Optimization 分析得出优化结果，即获得较高丙酸产量的发酵条件为：培养温度为 29.75°C、pH 为 6.61、接种量为 6.15%，丙酸的预测值为 17.96g/L。

2.3 验证性实验

验证性实验结果见表 7，产酸丙酸杆菌在培养温度为 29.75°C、pH 为 6.61 和接种量为 6.15% 的条件下，发酵液中丙酸含量最高达到 18.23g/L，比优化前提高了 27.9%，这说明响应面法可以有效地优化丙酸发酵条件，从而提高丙酸产量。

表 7 验证性实验设计与结果

处理	温度(°C)	pH	接种量(%)	丙酸产量(g/L)
优化前条件	32	7.0	2	14.25
单因素优化条件	30	6.5	5	16.76
响应面优化条件	29.75	6.61	6.15	18.23

3 结论

通过单因素实验，确定了影响丙酸发酵的关键因素(培养温度、pH 和接种量)。然后通过响应面实验设计考察和研究了培养温度、pH 和接种量对丙酸发酵效率的影响，并据此建立了以丙酸产量为响应指标的二次多项式数学模型。最后根据此模型进行了发酵工艺参数优化，优化结果为：培养温度为 29.75°C、pH 为 6.61 和接种量为 6.15% (v/v)。发酵条件经优化后，丙酸产量增加到 18.23g/L，比优化前提高了 27.9%。

参考文献

- [1] 管秀君, 丁文光, 胡望月. 丙酸的生产工艺及应用前景[J]. 齐鲁石油化工, 2004, 32(1): 32-35.
- [2] 赵紫华, 仪宏, 朱文众, 等. 丙酸发酵的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2004(6): 14-18.
- [3] 张华峰, 康慧. 微生物发酵法生产丙酸[J]. 饲料工业, 2004, 25(8): 29-33.
- [4] 何坤荣. 美国丙酸市场[J]. 国际化工信息, 2003(4): 32-33.
- [5] Feng XH, Xu H, Yao J, et al. Kinetic Analysis and pH-Shift Control Strategy for Propionic Acid Production with *Propionibacterium Freudenreichii* CCTCC M207015 [J]. Applied

- Biochemistry and Biotechnology, DOI 10.1007/s12010-008-8300-6.
- [6] Coral J, Karp SG, Porto de Souza Vandenberghe L, et al. Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* in Different Carbon Sources [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 151: 333-341.
- [7] 顾骏, 叶蕊芳, 郑黎. 他克莫司发酵培养基的响应面优化设计[J]. 工业微生物, 2008, 38(2): 06-36.
- [8] Venkata Dasu V, Panda T. Optimization of microbiological parameters for enhanced grise of ulvin production using response surface methodology [J]. Bioprocess Engineering, 2002, 22: 45-49.
- [9] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27: 38-41.

(上接第 71 页)

为 15° 、 17° 、 18° 、 23° 附近均有强峰吸收, 这说明它们的结晶型都为 A 型, 在水解过程中玉米淀粉并没有发生晶型的转变。酸解使玉米淀粉在 $2\theta = 15^\circ$ 、 17° 、 18° 和 23° 的衍射峰更加尖锐, 且峰面积增加, 这是由于: 一、无定型结构水解, 结晶区比例增大; 二、无定型区淀粉链的分离允许部分链重排, 形成更完美的结晶结构。酸醇水解后玉米淀粉在 $2\theta = 23^\circ$ 的峰面积增加显著, 说明酸醇水解使淀粉链断裂成短链易于重排成晶格小的微晶。由表 2 可知, 相对结晶度随水解率增加而增大。

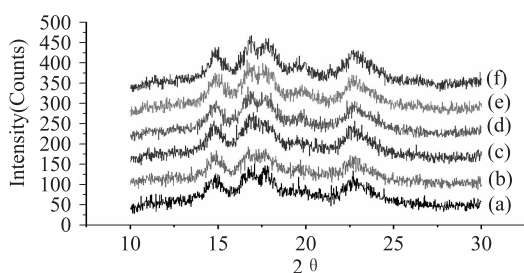


图9 玉米原淀粉及酸醇水解淀粉的 X-射线衍射图

表2 玉米原淀粉及酸醇水解淀粉的结晶度

编号	水解率 (%)	结晶度 (%)
a	原淀粉(0)	39.00
b	1.76	40.12
c	7.83	42.61
d	15.85	44.00
e	26.17	51.70
f	34.68	56.22

3 结论

本文以玉米淀粉为原料经酸醇水解制备玉米淀粉微晶。实验测定了水解过程中淀粉的水解率, 并对不同水解率的淀粉颗粒形貌、偏光十字、溶解度及 X 射线衍射进行了测定。结果表明: 65% 乙醇浓度水解率较其它乙醇浓度水解率大; 随盐酸添加量增加, 水解率呈逐渐上升趋势; 6h 是水解率转折点, 先逐渐上升, 后增加缓慢; 随温度升高, 水解率呈快速上升趋势。在盐酸 1.72%、温度 70°C 、65% 乙醇浓度、25% 淀粉浓度和反应 6h 时制得较理想淀粉微晶, 其水解率为 26.17%。反应后晶体形态仍为 A 型

且相对结晶度随水解率增加而增大。同一水解率的淀粉, 其溶解度均随温度升高而逐渐增加。随水解率逐渐提高, 淀粉颗粒形貌逐渐呈片晶状, 后为碎片; 颗粒无定型区先水解, 内部比较紧密的无定型区域和缺陷结晶结构接着被水解, 从而导致颗粒破裂; 部分偏光十字消失, 与扫描电镜分析结果一致。

参考文献

- [1] Gross, Akiva, Haralampu, et al. Microcrystalline starch-based product and use in foods [P]. US Patent, 5962047, 1996.
- [2] Haralampu S G. Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS₃ [J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 41(3): 285-292.
- [3] Bullock N R, Norton G. Biotechniques to assess the fermentation of resistant starch in the mammalian gastrointestinal tract [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 38(3): 225-230.
- [4] Whistler, Roy L. Subgranular crystalline starch as fat substitute [P]. US Patent: 5445678. 1993.
- [5] 刘廷奇, 于九皋. 微晶淀粉 [J]. 高分子通报, 2002(6): 24-32.
- [6] Robin J P, Mercier C, Charbonniere R, et al. Lintnerized Starches Gel Filtration and Enzymatic Studies of Insoluble Residues from Prolonged Acid Treatment of Potato Starch [J]. Cereal Chem, 1974, 51: 389-406.
- [7] Stephen G Ring, Paul Colonna, Kenneth J I' Anson, et al. The Gelation and Crystallization of Amylopectin [J]. Carbohydr Res, 1987, 162: 277-293.
- [8] Lin J H, Lee S Y, Chang Y H. Effect of acid-alcohol treatment on the molecular structure and physicochemical properties of maize and potato starches [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53: 475-482.
- [9] Michel Dubois, K A Gilles, J K Hamilton, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances [J]. ANALYTICAL CHEMISTRY, 1956, 28(3).
- [10] H W Leach, L D McCowen, T J Schoch; Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches [J]. Cereal Chem, 1959, 36: 534-544.