

姚浩轲,方亚坤,周 配,等.微生物法生产甘油酸发酵培养基的优化[J].江苏农业科学,2018,46(3):255-258.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.064

微生物法生产甘油酸发酵培养基的优化

姚浩轲,方亚坤,周 配,刘宇鹏,张海燕

(河南大学生命科学学院,河南开封 475004)

摘要:利用新筛选的葡糖杆菌属菌株日本葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter japonicus*) CGMCC12425 氧化甘油生产甘油酸。单因素试验表明,甘油浓度、氮源浓度和金属离子浓度对发酵影响较显著;利用响应面分析法对培养基成分进行优化,建立各因素对甘油酸产量的数学模型;在甘油 140.870 g/L、蛋白胨 9.590 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 0.512 \text{ g/L}$ 条件下甘油酸的最大估计值为 51.220 g/L,优化后甘油酸产量(51.360 g/L)比优化前(37.620 g/L)提高 36.52%,与预测的极值基本符合。

关键词:微生物法;甘油酸;甘油;葡糖杆菌;响应面分析法;培养基优化

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0255-03

随着各方面技术的发展,生物柴油作为可替代的能源已经开始应用于生活的各个方面,然而在生物柴油生产的过程中会有 10% 左右的副产物甘油^[1]。甘油是含有多个羟基的三碳化合物,是甘油三酯的骨架成分。甘油在很多方面具有重要的用途,例如化妆方面甘油可以作为保湿剂,在食品和药品方面可以作为添加剂。同时,甘油在涂料、汽车、烟草和纺织方面也具有重要的作用^[2]。然而由于生物柴油的大量生产致使甘油的价格出现很大的波动,这也使得许多化学和生物方面的研究者须要付出更多的努力来探索将甘油转化成具有更高价值的化学物质^[3-4],其中氧化甘油生产甘油酸(2,3-二羟基丙酸)就是一条重要的途径。甘油酸是一种三碳有机酸,作为一种化学成分存在于自然界的大部分植物体内,同时在人体内也存在甘油酸的衍生物。甘油酸在食品和医药行业具有重要的作用^[5],例如,作为添加剂添加在食品中可以改善食品的口感;由于甘油酸的生物可降解性优于其他高聚物,因此可以用于药物的运输载体;并且 D-甘油酸能使人体内胃部细胞在受到乙醇刺激后增强活力,从而促进乙醇分解代谢,因此可以作为解酒药的成分^[6]。

据报道,甘油酸和甘油酸衍生物也具有重要的生物学活性^[7]。例如在狗体内的甘油酸具有增加胆固醇活性和使肝兴奋的功能,甘油酸衍生出的酯类低聚物具有抗胰蛋白酶活性^[8]。因此,采用微生物转化甘油来生产甘油酸既可充分利用生物柴油生产过程中的废弃物,同时又具有很大的市场潜力。本研究采用微生物转化法转化甘油生产甘油酸,该方法具有环境温和、产量高、方法简便、产物具有立体选择性等优点。本研究对甘油酸发酵培养基成分进行单因素试验,然后

利用正交设计试验来确定最佳的培养基成分。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

1.1.1 菌株 葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter japonicus*) CGMCC12425,由笔者所在实验室从腐烂的水果中分离获得,现保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基 (1)种子培养基:葡萄糖 0.5%、蛋白胨 0.5%、酵母粉 0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%,pH 值 6.5~7.0。(2)初始发酵培养基:甘油 15.00%、蛋白胨 0.90%、酵母粉 0.10%、 K_2HPO_4 0.01%、 KH_2PO_4 0.09%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10%、 CaCO_3 2.00%,pH 值 6.5~7.0。(3)优化后发酵培养基:甘油 14.087 0%、蛋白胨 0.959 0%、硫酸锰 0.051 2%、 KH_2PO_4 0.090 0%、 K_2HPO_4 0.010 0%、 CaCO_3 2.000%,pH 值 6.5~7.0。上述培养基中种子培养基是在 115℃ 下灭菌 30 min,发酵培养基在 121℃ 下灭菌 30 min。每个试验作 3 个平行样,取平均值并计算误差。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 种子培养条件:30℃、200 r/min,装液量 30 mL/250 mL,恒温摇床培养 24 h。发酵培养条件:30℃、220 r/min,装液量 30 mL/250 mL,恒温摇床培养 3 d,每个试验作 3 个平行样,取平均值并计算误差。

1.2.2 检测方法 采用 HPLC 法测定发酵液中甘油酸、二羟基丙酮、甘油的含量^[9-10]。检测条件:1515 泵、2489 紫外检测器(检测波长 210 nm)、2414 示差检测器、1500 柱温箱、2707 自动进样器。色谱柱型号 Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm,9 μm);柱温 60℃;流动相 5 mmol/L H_2SO_4 和 20% 乙腈;流速 0.3 mL/min;进样量 20 μL。

1.2.3 响应面分析 使用 SAS 8.0 软件进行发酵培养基的优化。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 值对发酵结果的影响

甘油酸是一种三碳有机酸,在发酵过程中产生甘油酸会导致发酵液的 pH 值偏低,从而影响菌体的生长及酶活性,进

收稿日期:2016-09-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:31400608);河南大学科研项目(编号:xjxc20140009);河南省科技厅攻关项目(编号:152102210255);河南省高校青年骨干教师资助计划(编号:2014GGJS-157);河南省博士后科研基金。

作者简介:姚浩轲(1993—),女,河南巩义人,硕士研究生,主要从事发酵工程研究。E-mail:975312795@qq.com。

通信作者:张海燕,博士,副教授,主要从事生物工程研究。E-mail:zhanghy150@sina.com。

而影响甘油酸的产生。本试验采用在发酵液中添加碳酸钙和碱式碳酸镁来调节发酵液中的 pH 值,使 pH 值的范围控制在 5.0 左右,对照组不作任何处理。碳酸钙和碱式碳酸镁的添加量为 20 g/L,按照“1.2.1”节的培养方式进行培养,按照“1.2.2”节对发酵结果进行检测,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,与对照组相比当发酵液中添加碱式碳酸镁时甘油酸和二羟基丙酮(DHA)几乎不产生,然而当添加碳酸钙来调节发酵液的 pH 值时,发现甘油酸产量增加,此时甘油酸的产量可达 37.62 g/L,说明在试验过程中添加碳酸钙可以促进产物的产生。因此,在以下试验中选择碳酸钙调节发酵液的 pH 值。

2.2 不同起始甘油浓度对发酵结果的影响

高的甘油浓度会抑制菌体的生长,但同时也可以抑制副产物 DHA 的产生。本试验探索不同起始甘油浓度对发酵结果的影响,选出最佳的甘油浓度。试验过程中选取的起始甘油浓度梯度为 50、100、150、200、250 g/L,发酵培养基的其他成分保持不变,按照“1.2.1”节的培养方式进行培养,按照“1.2.2”节对发酵结果进行检测,试验结果如图 2 所示。

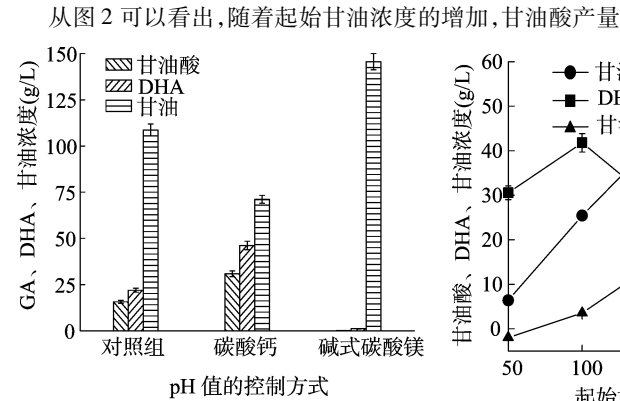


图1 不同 pH 值调节方式对发酵结果的影响

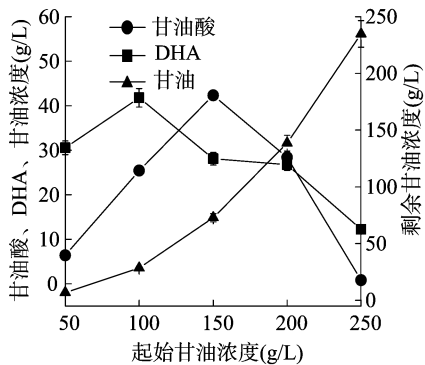


图2 不同甘油浓度对发酵结果的影响

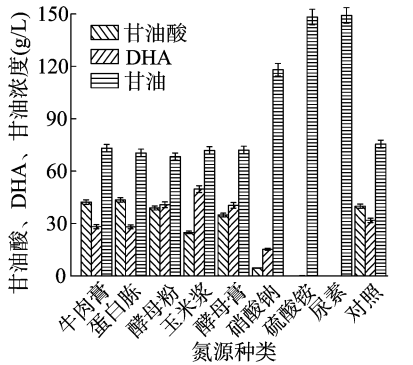


图3 不同氮源种类对发酵结果的影响

2.4 不同金属离子对发酵结果的影响

金属离子可以影响不同酶的活性,从而影响产物的产生,本试验分别选取硫酸锌、硫酸铁、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸铜、硫酸镁为金属离子,以不添加金属离子的空白发酵液为对照组,金属离子的添加量为 1 g/L,其他成分保持不变,按照“1.2.1”节的培养方式进行培养,按照“1.2.2”节对发酵结果进行检测,结果如图 4 所示。

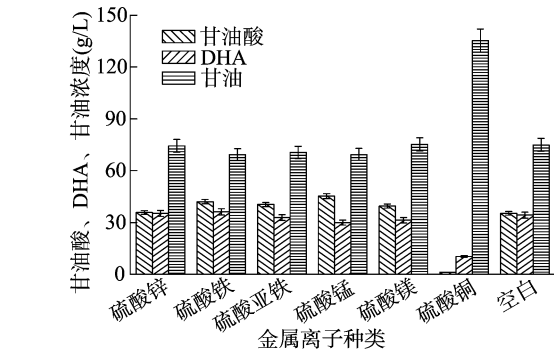


图4 不同金属离子对发酵结果的影响

从图 4 可以看出,当添加金属离子时某些金属离子会促进产物的产生,其中 Mn^{2+} 可以促进产物甘油酸的产生。可能

先增加后减少,在起始甘油浓度为 150 g/L 时甘油酸的产量达到最大,此时甘油酸的产量为 42.33 g/L。并且此时副产物 DHA 的产量也相对较小,当甘油浓度超过 150 g/L 后甘油酸的产量开始下降,达到 250 g/L 时甘油酸几乎不再产生,可能是由于较高的甘油浓度在抑制副产物产生时更抑制了菌体的生长。因此,选择 150 g/L 起始甘油浓度为最佳的浓度。

2.3 不同氮源种类对发酵结果的影响

本研究分别选取牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、玉米浆、酵母膏、硫酸铵、硝酸钠和尿素为氮源,以酵母粉和蛋白胨混合氮源为对照组,保持发酵培养基中含氮量一致,其他成分不变,按照“1.2.1”节的培养方式进行培养,按照“1.2.2”节对发酵结果进行检测,试验结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,与有机氮源相比添加无机氮源会更有利于产物的产生,主要因为菌体对无机氮源的利用较差,在仅含无机氮源的培养基中菌体几乎不生长(数据未列出)。然而与对照组相比在保证氮含量一致的情况下添加蛋白胨更利于产物甘油酸的产生,同时与对照相比副产物的产量也有所下降,此时甘油酸的产量最高,可以达到 43.53 g/L。说明蛋白胨更易于被菌体利用,更易于产物的产生。

是由于 Mn^{2+} 更易于提高醇脱氢酶和醛脱氢酶的活性。此时甘油酸的产量最高,可以达到 45.25 g/L。

2.5 响应面法优化发酵培养基

通过单因素及正交试验(数据未列出)发现,甘油、蛋白胨、硫酸锰浓度对甘油酸的产量有明显影响,为研究这些因素之间的相互作用,设计响应面分析试验,考察甘油、蛋白胨浆、硫酸锰浓度对甘油酸发酵的影响,优选 3 个主要因素的适宜浓度范围。以甘油、蛋白胨、硫酸锰浓度 3 个因素为自变量,以甘油酸浓度为响应值,设计 3 个因素 3 个水平试验,培养基其他因素不变,培养基浓度及编码设置见表 1。

表 1 响应面法优化发酵培养基试验因素和水平

编码值	因素		
	X_1 : 甘油浓度 (g/L)	X_2 : 蛋白胨浓度 (g/L)	X_3 : 硫酸锰浓度 (g/L)
-1	10	0.5	0.2
0	15	1.0	0.5
1	20	1.5	0.8

采用 Box - Behnken 中心组合设计,分别进行 15 组试验,结果见表 2。用 Design - Expert 8.0 统计分析软件进行多元回归分析,主要分析结果见表 3。由表 3 可看出, X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、

X_2X_3 、 X_3^2 影响显著 ($P < 0.05$), 其他二次项及交互项的影响并不显著 ($P > 0.05$)。经过回归拟合后, 各因子对响应值的影响可以用回归方程表示为 $Y = 50.7800 - 4.3300X_1 - 0.7875X_2 + 0.6750X_3 - 11.5338X_1^2 - 1.0275X_1X_2 + 0.9075X_1X_3 - 3.1438X_2^2 + 2.2575X_2X_3 - 4.1188X_3^2$ 。式中: Y 表示甘油酸含量 (g/L)。

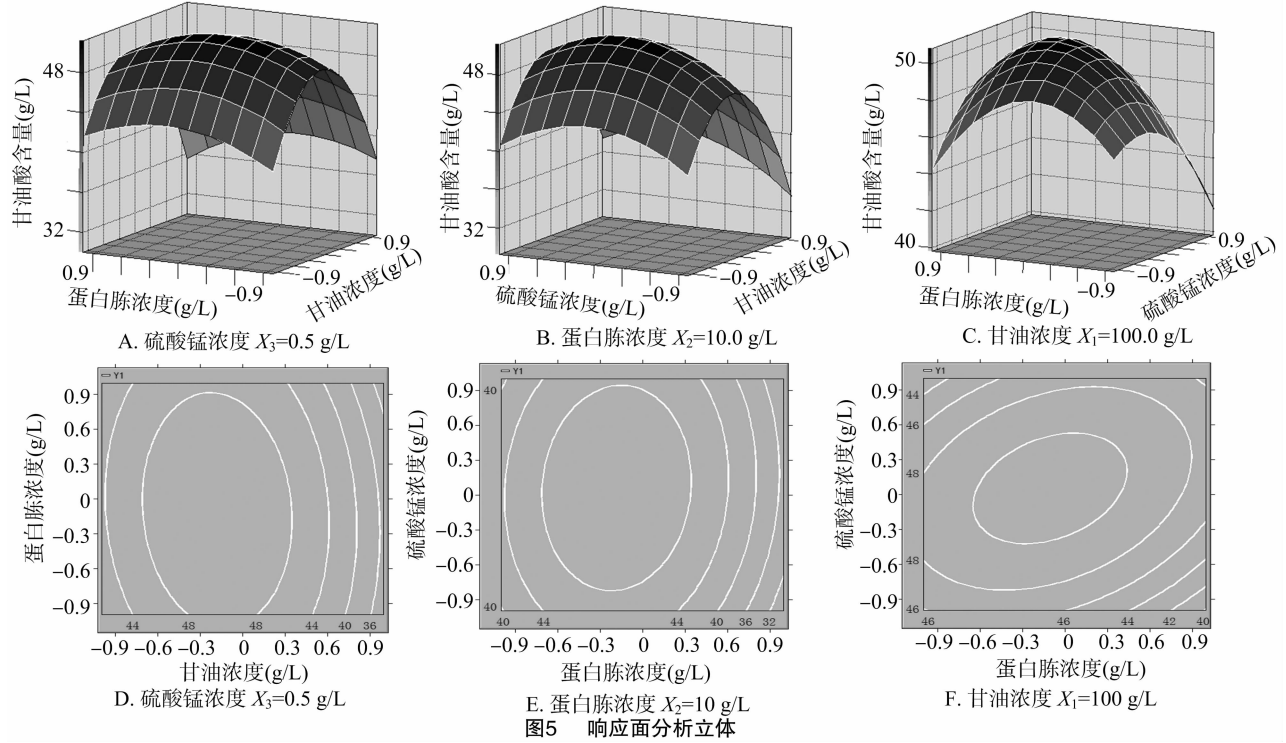
表 2 响应面法优化发酵培养基试验方案与结果

试验号	X_1	X_2	X_3	Y : 甘油酸含量 (g/L)
1	-1	-1	0	41.21
2	-1	1	0	40.26
3	1	-1	0	34.00
4	1	1	0	28.94
5	0	-1	-1	45.06
6	0	-1	1	42.12
7	0	1	-1	40.40
8	0	1	1	46.49
9	-1	0	-1	39.50
10	1	0	-1	29.63
11	-1	0	1	38.81
12	1	0	1	32.57
13	0	0	0	50.58
14	0	0	0	50.55
15	0	0	0	51.21

表 3 回归方程的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	149.991 2	149.991 2	144.197 4	0.000 1
X_2	1	4.961 3	4.961 3	4.769 6	0.080 7
X_3	1	3.645 0	3.645 0	3.504 2	0.120 1
X_1^2	1	491.178 1	491.178 1	472.204 9	0.000 1
X_1X_2	1	4.223 0	4.223 0	4.059 9	0.100 0
X_1X_3	1	3.294 2	3.294 2	3.167 0	0.135 3
X_2^2	1	36.491 7	36.491 7	35.082 1	0.002 0
X_2X_3	1	20.385 2	20.385 2	19.597 8	0.006 8
X_3^2	1	62.636 7	62.636 7	60.217 2	0.000 7
模型	9	731.785 5	81.309 5	78.168 7	0.000 1
误差	5	5.200 9	1.040 2		
总差	14	736.986 4			

该拟合方程的回归系数高达 0.992 9, 说明该模型适用于甘油酸产量高低的理论预测。根据上述回归方程描绘出响应面分析图及等高线图 (图 5) 以确认甘油、蛋白胨、硫酸锰浓度对甘油酸含量的影响。随着甘油、蛋白胨、硫酸锰浓度的增加, 甘油酸的产量也增加, 达到一定值后甘油酸的产量不再增加, 因此可以找出 3 种浓度的最佳组合。3 种因素对甘油酸产量影响的顺序分别为甘油浓度 > 蛋白胨浓度 > 硫酸锰浓度。利用 SAS 软件进行脊岭分析, 进一步研究 3 个因素的最佳浓度。通过分析可得出, 回归模型存在最大值点, 此时甘油酸的产量最高, 可达 51.22 g/L。3 个因素的取值分别为甘油



浓度: 140.870 g/L; 蛋白胨浓度: 9.590 g/L; 硫酸锰浓度: 0.512 g/L。

按照响应面优化后的培养基组合进行重复验证试验, 试验进行 5 个平行样, 最后得到的甘油酸的平均产量为 51.360 g/L, 比优化前 (37.620 g/L) 提高 36.52%, 与响应面预测的极值基本符合。

3 结论

目前, 国外甘油酸微生物法生产的报道较多的菌株普遍是葡糖杆菌属的菌株, 例如弗拉多葡萄糖酸杆菌 (*G. frateurii*)、弱氧化葡萄糖酸杆菌 (*G. suboxydans*)、氧化葡萄糖酸杆菌 (*G. oxydans*) 等, 然而国内尚未有微生物法生产甘油

余 艳,伍国勇. 基于灰色关联的安徽省耕地资源利用效率及其影响因素分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):258-262.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.065

基于灰色关联的安徽省耕地资源利用效率 影响因素分析

余 艳¹, 伍国勇²

(1. 贵州师范学院经济与政治学院, 贵州贵阳 550018; 2. 贵州大学中国喀斯特地区乡村振兴研究院, 贵州贵阳 550025)

摘要:在四阶段 DEA-Tobit 的基础上,以耕地资源利用效率值为参考序列,以选取的 2015 年安徽省 16 市的耕地资源利用效率影响因素为比较序列,运用灰色关联模型和主成分分析法,分析各耕地资源利用效率影响因素与耕地资源利用效率的关联度和主要因素贡献率。结果表明,各影响因素对耕地资源利用效率的影响顺序为农业劳动人数 > 有效灌溉率 > 年末耕地面积 > 耕地复种指数 > 人均耕地面积 > 主要农作物播种面积 > 农业化肥施用量 > 农药使用量 > 农业机械总动力 > 人均 GDP。主成分分析法中内因占权重最大,贡献率为 62.763%,外因贡献率为 17.797%,全部因素对问题的解释程度为 80.559%。其中内因中的影响顺序为劳动力投入 > 土地投入 > 资本投入,外因中耕地的自然环境影响大于人文经济的环境影响。

关键词:灰色关联;耕地利用效率;影响因素;主要因素;次要因素;安徽省

中图分类号: F323.211 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0258-05

耕地是农业生产的基本要素^[1]。“18 亿亩耕地红线”的目标在研究和修编《全国土地利用总体规划纲要(2006—

收稿日期:2017-06-06

基金项目:2014 年贵州大学重点学科项目(编号:GDZT201401);2015 年贵州省教育厅基地项目(编号:2015JD014);2016 年贵州省科技厅软科学项目;2017 年贵州大学农林经济管理国内一流学科建设项目(编号:GNYL[2017]002)。

作者简介:余 艳(1986—),女,河南固始人,硕士,讲师,研究方向为农业经济理论与政策。E-mail:516850250@qq.com。

酸的报道,本试验利用筛选出的新菌株日本葡萄糖酸杆菌 CGMCC12425 氧化甘油生产甘油酸。通过单因素试验和正交设计试验确定对发酵影响相对较大的因素,然后利用响应面分析法确定发酵培养基的最佳配方为:甘油 140.870 g/L、蛋白胨 9.590 g/L、硫酸锰 0.512 g/L、KH₂PO₄ 0.900 g/L、K₂HPO₄ 0.100 g/L、CaCO₃ 20.000 g/L、pH 值 6.5~7.0,优化后比优化前甘油酸的产量增加 36.52%。

参考文献:

- [1]Habe H,Fukuoka T,Kitamoto D,et al. Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2009,81(6):1033-1039.
- [2]Habe H,Fukuoka T,Kitamoto D,et al. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2009,84(3):445-452.
- [3]Habe H, Shimada Y, Yakushi T, et al. Microbial production of glyceric acid,an organic acid that can be mass produced from glycerol [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75 (24): 7760-7766.
- [4]Sato S, Morita T, Kitamoto D, et al. Change in product selectivity

2020)》首次被提出。这也是我国积极应对未来人口增长、三化发展、耕地减少、粮食短缺的理性发展思路^[2]。目前我国农村耕地也面临着工业污染、肥力消失、政策不利这三大困境,这不仅威胁着我国粮库的安全,也存在着粮食质量安全方面的隐患。因此,用科学的方法分析耕地资源利用效率的影响因素,分清主要因素与次要因素,不仅为耕地资源的合理分配,也为稳定区域经济发展、保障社会稳定提供了方向。

学者在这个领域的研究主要集中在用 DEA-Tobit 两段法评价某地区的耕地效率和分析影响因素,文章虽多,但大多

during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol[J]. AMB Express,2013,3(1): 20-26.

- [5]Habe H,Shimada Y,Fukuoka T,et al. Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,2009,73(8):1799-1805.
- [6]Habe H,Sato S,Fukuoka T,et al. Effect of glyceric acid calcium salt on the viability of ethanol-dosed gastric cells[J]. Journal of Oleo Science,2011,60(11):585-590.
- [7]Sato S, Morita T, Fukuoka T, et al. Microbial resolution of DL-glyceric acid for L-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2015, 119(5):554-557.
- [8]Habe H,Fukuoka T,Sato S,et al. Synthesis and evaluation of dioleoyl glyceric acids showing antitrypsin activity [J]. Journal of Oleo Science,2011,60(6):327-331.
- [9]刘宇鹏,郑 璞,孙志浩,等. 采用离子排斥色谱法分析发酵液中的琥珀酸等代谢产物[J]. 食品与发酵工业,2006,32(12):119-123.
- [10]方亚坤,靳魁奇,刘宇鹏,等. 离子排斥色谱法分析发酵液中甘油酸等代谢产物[J]. 食品与发酵工业,2015,41(7):171-174.