

[文章编号] 1003—4684(2021)02-0039-07

响应面法优化巴氏醋杆菌的耐酸醇营养盐培养

严子云, 陈 雄, 李 欣

(发酵工程教育部重点实验室, 湖北省工业发酵协同创新中心,
湖北省工业微生物重点实验室, 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 从 26 种微量元素中筛选出 5 种对巴氏醋杆菌有促进作用的生长因子, 分别为精氨酸、赖氨酸、胞嘧啶、谷氨酰胺和叶酸, 均以 0.10 g/L 的添加量复配加入营养盐培养基中, 最大生物量提高 26%。进行单因素实验确定最优添加量。利用 Plackett-Burman 实验、最陡爬坡实验和响应面实验进一步优化培养基成分, 证实营养盐、赖氨酸和叶酸对巴氏醋杆菌的生长影响显著。通过回归方程 ($R^2=96.42\%$), 预测当培养基成分分配比为营养盐 5.0 g/L、精氨酸 0.10 g/L、赖氨酸 0.46 g/L、胞嘧啶 0.70 g/L、谷氨酰胺 0.20 g/L、叶酸 0.16 g/L 时, 巴氏醋杆菌在体积分数为 9% 的乙醇和 1% 的乙酸胁迫条件下的最大生物量可达 0.45 g/L。经过 3 次平行验证试验, 最大生物量为 0.45 g/L, 比未优化前的营养盐培养基提高了 32%, 与模型预测结果相吻合。

[关键词] 巴氏醋杆菌; 微量元素; 响应面法; 营养盐

[中图分类号] Q815 [文献标识码] A

国内白醋生产多采用液态深层发酵法^[1]。该工艺有培养基成分简单(乙醇、营养盐和水), 发酵周期短, 醇酸转化率高, 产酸率高等优点^[2]。该工艺中, 营养盐的组分非常关键。营养盐中含有醋酸菌生长所必需的生长因子, 其品质高低直接影响到醋酸菌的发酵产酸水平和醋酸品质^[3-5]。但现阶段中国市场上使用最广泛的醋酸菌培养基是进口的弗林斯醋酸菌发酵营养盐, 国产营养盐与之相比还是存在着微弱的不足^[6]。

醋酸菌是一种特殊的微生物^[7], 在醋酸发酵开始前就需要添加高浓度的初始乙醇, 所以提高醋酸菌的乙醇耐受性对于工业生产时提高乙酸的产量至关重要^[8-9]。醋酸菌的生长速率很大程度上取决于乙醇浓度^[10-11], 乙醇浓度过高会产生抑制作用, 醋酸菌的生长速度会减缓, 生长周期也会延长^[12-13]。发酵过程中乙酸积累过多, 会对醋酸菌产生毒性作用, 严重影响发酵的结果^[14-15]。醋酸发酵过程中, 培养基中的自由氨基酸是醋酸菌很好的氮源^[16-17]。研究发现, 氨基酸对处于恶劣环境下的细胞生长和存活起着至关重要的作用^[18-19]。目前关于氨基酸对醋酸菌的影响的研究仅仅停留在生物量和产酸率上, 而且是进行的单一氨基酸的实验, 没有进行多因素的复配实验, 对于耐受性的研究更是寥寥无几。

基于以上分析, 笔者采用响应面法优化营养盐

培养基, 确定最佳微量元素的最适添加量, 使巴氏醋杆菌在乙醇胁迫和乙酸胁迫条件下的生物量和产酸量得到较大的提高。

1 材料与方法

1.1 菌株和原料

巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)由功能酵母与酿造微生物实验室保藏; 营养盐 AC001, 由安琪酵母公司提供。

1.2 培养基

富集培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母浸粉 10 g/L, pH 自然, 115℃ 灭菌 20 min; 种子培养基: 葡萄糖 10 g/L, 酵母浸粉 10 g/L, pH 自然, 115℃ 灭菌 20 min; 初始发酵培养基: 营养盐 2.0 g/L, 精氨酸 0.10 g/L, 赖氨酸 0.10 g/L, 胞嘧啶 0.10 g/L, 谷氨酰胺 0.10 g/L, 叶酸 0.10 g/L, pH 自然, 115℃ 灭菌 20 min。

1.3 菌种活化及培养方法

将平板保藏的巴氏醋杆菌单菌落匀一环接种到 50 mL 的液体富集培养基, 于 32℃、200 r/min 的恒温培养振荡器中培养 24 h, 活化得到一级种子。再按 10% 的接种量将一级种子液接种至 50 mL 液体种子培养基, 32℃、200 r/min 活化 48 h, 得到二级种子。将二级种子按 5% 的接种量接种到液体营养

[收稿日期] 2020—10—17

[第一作者] 严子云(1994—), 男, 湖北宜昌人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为微生物发酵

[通信作者] 李 欣(1979—), 男, 湖北荆州人, 湖北工业大学讲师, 研究方向为微生物发酵

盐培养基,置于 32℃、200 r/min 恒温培养振荡器进行摇瓶发酵。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量的测定 取发酵液 2 mL,23℃、8000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入 2 mL 去离子水重悬菌体。以去离子水为对照,在紫外可见分光光度计 600 nm 处进行比色测定。

1.4.2 总酸的测定 取 1 mL 巴氏醋杆菌发酵液于 100 mL 锥形瓶中,加入 1 滴 0.05% 酚酞作指示剂,将标定的 0.05 mol/L NaOH 溶液加入碱式滴定管中,然后滴定样品至淡粉色,30 s 内颜色不褪去,即达到滴定终点,总酸量计算公式如下:

总酸量 = $\frac{(V - V_0) \times C_{NaOH} \times 60}{V_{样}}$

式中:V 为发酵液样品滴定所消耗的 NaOH 溶液的体积,mL;V₀ 为以空白培养基为对照滴定所消耗 NaOH 溶液的体积,mL;C_{NaOH} 为 NaOH 溶液的浓度,mol/L;V_样 为样品的体积(mL),60 为醋酸的分子质量(g/mol)。

1.4.3 乙醇的测定 乙醇标样配置:吸取 50 μL 无水乙醇到 100 mL 容量瓶中,加入去离子水准确定容至 100 mL。

待测样品处理:取 1 mL 发酵液加入 4 mL 去离子水中稀释 5 倍,然后取 0.25 mL 稀释后的样品加入 4.75 mL 去离子水中稀释至 20 倍。生物传感仪定标后,便可进样品测定乙醇含量。

1.4.4 巴氏醋杆菌半抑制浓度 IC₅₀ 的测定 配置 0.2% 营养盐培养基 2000 mL,按照 0、3%、6%、9%、12%、15% 的乙醇浓度梯度和 0、1%、2%、3%、4%、5% 的乙酸浓度梯度配置成 50 mL 的发酵培养基,取二级种子液 5 mL 接入 50 mL 培养基中,置于 32℃、200 r/min 恒温培养振荡器进行摇瓶发酵,取样时间点为 0、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h,分光光度计测出生物量。以 0 乙醇浓度和乙酸浓度的培养基作为空白对照组,比较其结果得出结论,确定乙醇 IC₅₀ 和乙酸 IC₅₀ 的浓度以及取样时间点。

1.4.5 Plackett-Burman(PB)实验设计 Plackett-Burman 实验设计是一种多因素两水平的实验设计方案,能以最少的实验次数筛选出响应值影响最显著的变量。利用 Design-Expert 把每个因素设计成高(+1)、低(-1)2 个水平,高水平为低水平的 2 倍,以巴氏醋杆菌的生物量作为响应值进行随机组合实验,用 Expert 8.0.6 对实验结果进行显著性分析。

1.4.6 最陡爬坡实验设计 根据 PB 实验筛选出来的 3 个对巴氏醋杆菌生物量影响显著的因素及其正

负效应,在合适的范围内取值设计最陡爬坡试验,以快速逼近最大响应区域。

1.4.7 响应面分析实验设计 根据最陡爬坡试验确定的中心点,利用 Design-Expert 进行中心组合的实验设计,将最陡爬坡试验中的 3 个显著因素分别标记为 X₁、X₂、X₃,以发酵培养 60 h 后巴氏醋杆菌的生物量作为响应值,标记为 Y。将 3 个显著因素分为 5 个不同水平,0 对应响应面中心点,1 和-1 分别对应高水平和低水平,1.68 和-1.68 对应更高值和更低值。以这 5 个不同水平进行随机组合实验,用 Expert 8.0.6 对实验结果进行响应面分析。

1.4.8 数据处理 所有试验数据为至少三个平行试验的平均值,采用 Origin 9.0 和 Expert 8.0.6 对试验进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 巴氏醋杆菌生长半抑制浓度 IC₅₀ 的确定

半抑制浓度指微生物在胁迫条件下与非胁迫条件下生物量之比等于 50% 时所对应的浓度,IC₅₀ 值可以反映巴氏醋杆菌对乙酸或乙醇的耐受程度。

2.1.1 乙醇 IC₅₀ 的确定 乙醇含量为 0 的对照组培养基中,巴氏醋杆菌在稳定期时的最大生物量为 0.45 g/L,3% 乙醇浓度对巴氏醋杆菌的生长有很明显的促进作用,在乙醇消耗完后进入稳定期,最大生物量为 0.65 g/L。6% 乙醇浓度在巴氏醋杆菌生长前期有微弱的抑制作用,在对照组进入稳定期之后,有缓慢生长的趋势,发酵终点最大生物量为 0.48 g/L。9% 乙醇浓度对巴氏醋杆菌有明显的抑制作用,在 48 h 进入稳定期时的生物量为 0.25 g/L,约为对照组的一半。12% 乙醇浓度的实验组在 48 h 的生物量为 0.15 g/L,在 60 h 后有缓慢生长的趋势,但过于延长了巴氏醋杆菌的生长周期。乙醇浓度为 15% 时,巴氏醋杆菌会停止生长甚至凋亡。因此确定乙醇 IC₅₀ 的体积分数为 9%,取样时间点为 48 h,后续实验均加入 9% 乙醇。

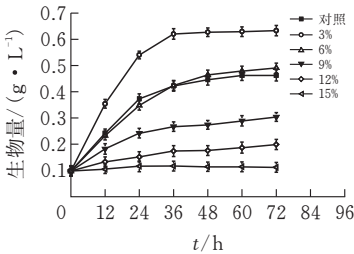


图 1 巴氏醋杆菌乙醇耐受 IC₅₀ 的确定

2.1.2 乙酸 IC₅₀ 的确定 1% 乙酸体积分数前期会抑制巴氏醋杆菌的生长,但在 24 ~ 48 h 之间巴

氏醋杆菌有明显的生长迹象,在 60 h 的生物量为 0.23 g/L,约为对照组生物量的一半,乙酸体积分数大于 1%时对巴氏醋杆菌的生长有明显抑制作用,甚至导致凋亡。因此确定乙酸 IC50 的体积分数为 1%,取样时间点为 60 h,后续实验均加入体积分数为 1%的乙酸。

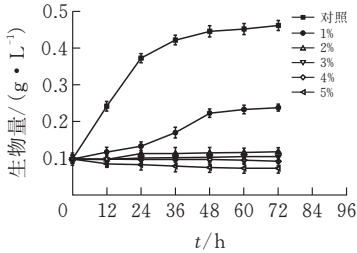


图 2 巴氏醋杆菌乙酸耐受 IC50 的确定

2.2 营养盐浓度优化

营养盐中含有巴氏醋杆菌生长所必需的碳源、氮源、盐类和生长因子,因此营养盐的添加浓度会直接影响到巴氏醋杆菌的生长水平和产酸水平。本实验用营养盐培养基代替传统葡萄糖、酵母浸粉培养基。浓度过低,不能满足巴氏醋杆菌的生长需求;浓度过高,则会增加生产的成本或者造成不必要的浪费。分别以 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%营养盐配置培养基,微量元素的添加量不变,115℃灭菌 20 min 后加入 9%乙醇和 1%乙酸。32℃、200 r/min 摇床培养 60 h,取样测定生物量和总酸含量(图 3)。

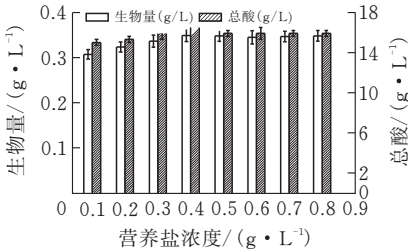


图 3 营养盐浓度对巴氏醋杆菌在醇酸胁迫下的影响

营养盐浓度的增加对巴氏醋杆菌在醇酸胁迫下生长的影响较小,在 1.0~4.0 g/L 的浓度区间,随着浓度的加大,生物量和醋酸产量随之增加,在 4.0 g/L 浓度营养盐培养基中生物量最大为 0.38 g/L。继续增大浓度发现,生物量和醋酸产量几乎保持不变,说明 4.0 g/L 浓度的营养盐已经能够满足巴氏醋杆菌的生长需求。因此选择 4.0 g/L 的营养盐浓度作为最佳浓度。

2.3 微量元素浓度的优化

本实验对精氨酸、赖氨酸、胞嘧啶、谷氨酰胺、叶氨酸这 5 个单因素进行优化,其添加量初步定为氨基酸 0.50 g/L、嘧啶 0.50 g/L、维生素 0.10 g/L,复配时添加量均为 0.10 g/L。32℃、200 r/min 摇床培

养 60 h,取样测定生物量和总酸含量,选取促生长作用最明显,产酸量最高的添加量,其对巴氏醋杆菌生长和产酸的影响分别如图 4 所示。

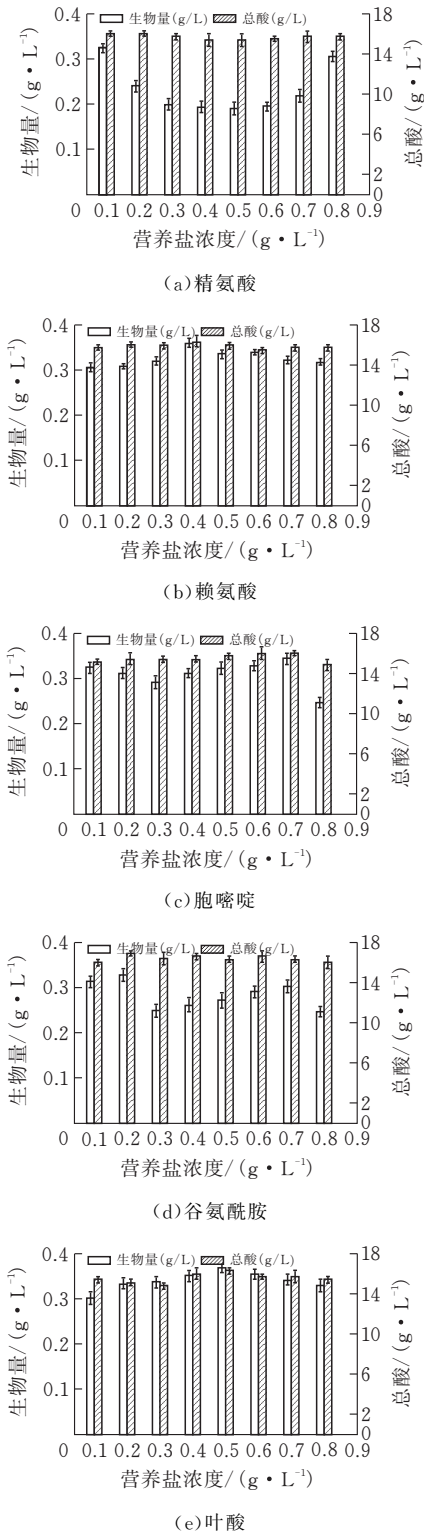


图 4 不同浓度微量元素对巴氏醋杆菌在醇酸胁迫下的影响

由图 4a 可知,精氨酸的添加对巴氏醋杆菌产酸能力无明显影响,但对巴氏醋杆菌的生长影响较大。添加量为 0.10 g/L 时,其生物量最大达到 0.33 g/L,总酸量为 16 g/L。随着添加量的增加,生物量反

而减少,在 0.30~0.60 g/L 范围内,生物量基本保持在 0.20 g/L 左右不变。添加量增加至 0.70 g/L 时,生物量又开始增加,并在 0.80 g/L 浓度时生长到 0.31 g/L 左右。说明精氨酸的添加量并不是越大促生长作用就越明显,反而在 0.30~0.60 g/L 范围内时,有微弱的抑制作用,因此选择 0.10 g/L 的精氨酸浓度作为最佳浓度。

由图 4b 可知,赖氨酸浓度对巴氏醋杆菌生长和产酸的影响呈现出峰型分布趋势,在 0.10~0.40 g/L 时,随着赖氨酸浓度的增大其生物量和总酸量也随之增大,但是随着添加量的继续增大生物量和总酸却开始逐步下降。赖氨酸浓度在 0.40 g/L 时生物量最大为 0.36 g/L,产酸量最大为 16.3 g/L。因此选择 0.40 g/L 的赖氨酸浓度作为最佳浓度。

由图 4c 可知,胞嘧啶浓度在 0.10~0.30 g/L 之间时,巴氏醋杆菌的生物量在随着浓度的增大而减少,产酸量有少量增加。继续增大浓度后,生物量呈现出上升趋势,并在 0.70 g/L 时生物量达到最大为 0.35 g/L,总酸也达到最大的 16 g/L。在胞嘧啶浓度为 0.80 g/L 时,对生长有明显的抑制作用,产酸量也随之减少。因此选择 0.70 g/L 的胞嘧啶浓度作为最佳浓度。

由图 4d 可知,谷氨酰胺浓度为 0.20 g/L 时,生物量和总酸量达到最大为 0.36 g/L 和 17 g/L。由图 7 可知,谷氨酰胺的添加对巴氏醋杆菌在胁迫条件下的促生长效果并不佳,但其对于巴氏醋杆菌产酸能力的影响较为显著,因此选择 0.20 g/L 的谷氨酰胺浓度作为最佳浓度。

由图 4e 可知,叶酸浓度对巴氏醋杆菌生长的影响呈现峰型分布趋势,随着叶酸浓度从 0.06 g/L 增加到 0.14 g/L,生物量也随之增加,并在 0.14 g/L 时达到最大 0.37 g/L,继续增大浓度后,生物量又逐渐减少。其对巴氏醋杆菌产酸量的影响在 0.06 g/L 到 0.10 g/L 之间随着浓度增加而减少,在 0.10 g/L 到 0.14 g/L 又增加,在 0.14 g/L 时最大产酸量为 16.4 g/L,在 0.16 g/L 到 0.20 g/L 之间,产酸量维持在 15.8 g/L 左右。因此选择 0.14 g/L 的叶酸浓度作为最佳浓度。

综合考虑生物量水平和产酸水平,整合所有单因素浓度的优化结果,得到巴氏醋杆菌的初优培养基为 4.0 g/L 营养盐、0.10 g/L 精氨酸、0.40 g/L 赖氨酸、0.70 g/L 胞嘧啶、0.20 g/L 谷氨酰胺和 0.14 g/L 叶酸。在此基础上通过后续的 PB 实验和响应面实验对培养基进行进一步的优化。

2.4 Plackett-Burman 实验结果

本次 Plackett-Burman 实验选择了 4.0 g/L 营

养盐、0.10 g/L 精氨酸、0.40 g/L 赖氨酸、0.70 g/L 胞嘧啶、0.20 g/L 谷氨酰胺和 0.14 g/L 叶酸作为实验的高水平。

表 1 N = 12 的 Plackett-Burman 实验设计及结果

试验号	因素						生物量/ (g · L ⁻¹)
	A	B	C	D	E	F	
1	-1	1	1	1	1	-1	0.41
2	1	1	-1	-1	-1	1	0.45
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.38
4	-1	1	1	-1	1	1	0.44
5	1	1	-1	1	1	-1	0.45
6	1	1	1	-1	-1	-1	0.43
7	-1	-1	1	-1	1	1	0.42
8	1	-1	1	1	1	-1	0.43
9	-1	-1	-1	1	-1	1	0.40
10	1	-1	1	1	-1	1	0.46
11	1	-1	-1	-1	1	-1	0.43
12	-1	1	-1	1	1	-1	0.39

A—营养盐,B—精氨酸,C—赖氨酸,D—胞嘧啶,E—谷氨酰胺,F—叶酸

由表 2 可知,营养盐、精氨酸、赖氨酸、胞嘧啶表现为正效应,谷氨酰胺、叶酸表现为负效应。贡献值排在前三位的分别为营养盐、赖氨酸和叶酸,其中可信度大于 95% 的因素为营养盐和叶酸,且表现较为显著,赖氨酸的可信度大于 85%,可信度较高。因此确定选定营养盐、赖氨酸、叶酸为主要影响因素进行下一步最陡爬坡实验。

表 2 各因素水平、效应值及显著性分析

因素	水平		效应	贡献值/%	P 值
	低	高			
A 营养盐/(g · L ⁻¹)	2.0	4.0	1.01	53.52	0.0121
B 精氨酸/(g · L ⁻¹)	0.05	0.10	0.16	2.78	0.3604
C 赖氨酸/(g · L ⁻¹)	0.20	0.40	0.37	9.35	0.1209
D 胞嘧啶/(g · L ⁻¹)	0.35	0.70	0.25	1.76	0.4543
E 谷氨酰胺/(g · L ⁻¹)	0.10	0.20	-0.14	0.93	0.6302
F 叶酸/(g · L ⁻¹)	0.07	0.14	-0.59	20.47	0.0247

2.5 最陡爬坡实验结果

根据表 2 Plackett-Burman 实验确定的显著影响因素为营养盐、赖氨酸和叶酸,其效应值分别为 4.0 g/L、0.40 g/L 和 0.14 g/L,试验设计及结果见表 3。

表 3 最陡爬坡实验及结果 g/L

试验号	营养盐	赖氨酸	叶酸	生物量
1	8.00	0.60	0.22	0.43
2	7.00	0.55	0.20	0.42
3	6.00	0.50	0.18	0.43
4	5.00	0.45	0.16	0.46
5	4.00	0.40	0.14	0.44
6	3.00	0.35	0.12	0.40
7	2.00	0.30	0.10	0.38
8	1.00	0.25	0.08	0.33

由表 3 可知,最高生物量对应的培养基配方出

现在第 4 组,因此选择第 4 组作为响应面的中心点,即营养盐 5.0 g/L,赖氨酸 0.45 g/L,叶酸 0.16 g/L。

2.6 响应面分析实验结果

中心组合试验因素及水平见表 4,实验设计和结果见表 5,方差分析见表 6。

表 4 中心组合实验因素及水平

因素	水平				
	−1.68	−1	0	1	1.68
X ₁ 营养盐/(g·L ^{−1})	1.64	3.00	5.00	7.00	8.36
X ₂ 赖氨酸/(g·L ^{−1})	0.20	0.30	0.45	0.60	0.70
X ₃ 叶酸/(g·L ^{−1})	0.11	0.13	0.16	0.19	0.21

表 5 中心组合实验设计及结果

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 生物量/(g·L ^{−1})
1	0	0	0	0.45
2	−1	1	−1	0.38
3	1	−1	1	0.41
4	0	0	0	0.45
5	−1	1	1	0.40
6	0	−1.68	0	0.39
7	0	0	0	0.45
8	1.68	0	0	0.43
9	0	1.68	0	0.40
10	0	0	0	0.45
11	−1.68	0	0	0.41
12	0	0	−1.68	0.40
13	−1	−1	−1	0.38
14	0	0	1.68	0.41
15	1	1	1	0.42
16	1	−1	−1	0.41
17	0	0	0	0.45
18	−1	−1	1	0.39
19	0	0	0	0.44
20	1	1	−1	0.39

表 6 方差分析表

方差来源	方差	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	0.78	9	0.07	29.91	0.0001
X ₁	0.18	1	0.18	18.79	0.0015
X ₂	0.01	1	0.05	0.84	0.3796
X ₃	0.02	1	0.04	6.33	0.0306
X ₁ X ₂	0.02	1	0.03	0.012	0.9159
X ₁ X ₃	0.03	1	0.03	0.012	0.9159
X ₂ X ₃	0.04	1	0.03	3.80	0.0799
X ₁ ²	0.19	1	0.19	33.51	0.0002
X ₂ ²	0.16	1	0.16	15.38	0.0001
X ₃ ²	0.20	1	0.20	9.97	0.0001
残差	0.05	10	0.03		
失拟项	0.01	5	0.03	4.66	0.0583
总和	0.83	19			

根据表 6 实验结果通过 Design-Expert 进行响应面分析,建立多元二次回归方程:

$$Y=0.45+0.0077X_1+0.0016X_2+0.0044X_3+0.0025X_1X_2+0.0025X_1X_3+0.0045X_2X_3-0.0099X_1^2-0.021X_2^2-0.017X_3^2$$

方程的方差分析结果见表 6,模型 $P<0.01$,失拟项不显著,表明回归方程拟合程度良好。决定系数 R^2 为 0.9642,说明因变量与考察的自变量之间的线性关系显著。因此,使用该模型可以较好地对巴氏醋杆菌的生物量进行分析和预测。

2.7 培养基最佳配方的确定及验证实验

根据 2.6 响应面分析实验得到的回归方程绘制出响应面分析图(图 9)。该回归方程的抛物线图形开口均向下,说明回归方程存在最大值,即响应面覆盖了最大值所在的区域。由 Design-Expert 分析得到最适培养基中三个显著影响因素对应的实际值分别为:营养盐 5.0 g/L、赖氨酸 0.46 g/L、叶酸 0.16 g/L。综上所述,最适培养基的组分为:营养盐 5.0 g/L、精氨酸 0.10 g/L、赖氨酸 0.46 g/L、胞嘧啶 0.70 g/L、谷氨酰胺 0.20 g/L、叶酸 0.16 g/L。将最适培养基成分带入上述回归模型方程,预测巴氏醋杆菌在 9%(体积分数)乙醇和 1%(体积分数)乙酸胁迫条件下最大生物量可达 0.45 g/L。

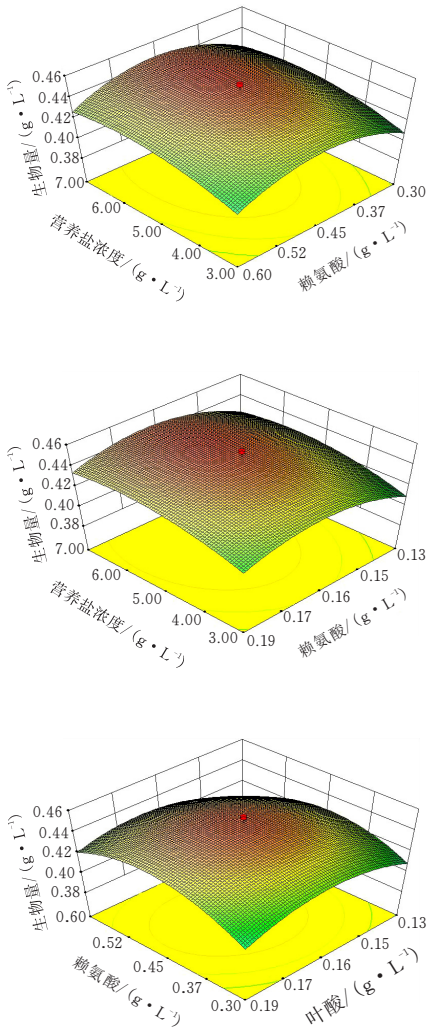


图 5 各因素间相互作用响应面分析图

使用上述优化后的培养基进行摇瓶验证实验。实验分为两组,生长组设置对照组为 5.0 g/L 营养

盐培养基,优化后的培养基为实验组,以此来验证对生长的影响;耐性组在接种前加入 9%的乙醇和 1%的乙酸,来验证对耐性的影响。两组实验的生物量及醋酸产量分别如图 6 所示。

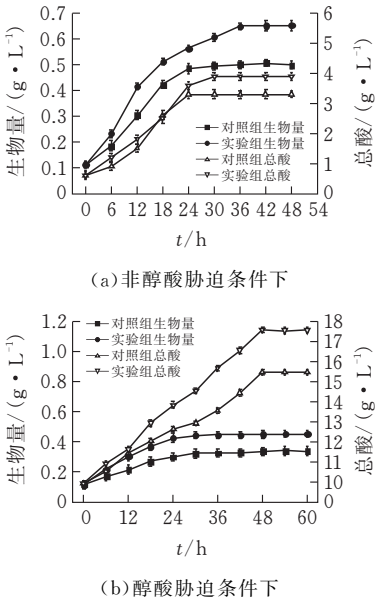


图 6 优化培养基对巴氏醋杆菌生长和产酸的影响

由图 6a 可知,实验组发酵结束时的最大生物量为 0.65 g/L,比对照组未添加微量元素的 5.0 g/L 营养盐培养基的最大生物量提高 30%,醋酸产量提高 18%,比未优化前的初始营养盐培养基提高 54%。由图 6b 可知,实验组在发酵终点的生物量为 0.45 g/L 左右,比对照组提高了 32%,与模型预测结果相吻合,醋酸产量比对照组提高了 14%。

3 结 论

对 5 种有促生长作用的微量元素进行单因素优化预试验,确定其最佳浓度分别为:营养盐 4.0 g/L、精氨酸 0.10 g/L、赖氨酸 0.40 g/L、胞嘧啶 0.70 g/L、谷氨酰胺 0.20 g/L、叶酸 0.14 g/L。在此基础上利用 Plackett-Burman 实验,最陡爬坡实验和响应面分析实验对巴氏醋杆菌的发酵培养基进行优化,最终得到的最适发酵培养基组分为:营养盐 5.0 g/L、精氨酸 0.10 g/L、赖氨酸 0.46 g/L、胞嘧啶 0.70 g/L、谷氨酰胺 0.20 g/L、叶酸 0.16 g/L。对优化后的培养基进行摇床发酵验证,在此最优培养基中发酵 60 h 的最大生物量和最大产酸量,比 5.0 g/L 的纯营养盐培养基提高了 30%和 18%;在醇酸胁迫条件下的最大生物量和最大产酸量,比 5.0 g/L 的纯营养盐培养基提高了 32%和 14%。

[参 考 文 献]

[1] 张月阳,李海峰,曹健,徐孟孟.高耐受性醋酸菌的研究

和应用进展[J].中国酿造,2017,36(11):11-14.

[2] 王斌,陈福生.醋酸菌的分类进展[J].中国酿造,2014,33(12):1-10.

[3] 阳飞,覃凌云,张华山,等.醋酸菌分类及其应用研究进展[J].中国调味品,2015,440(10):144-147+156.

[4] 李欣,黄芳,常旭,等.醋酸菌的营养特性分析及研究进展[J].食品研究与开发,2018,39(15):219-224.

[5] 醋酸菌生长的营养需求及产酸的促进作用研究[J].中国调味品,2004(6):3-6.

[6] Bilgi E, Bayir E, Sendemir-Urkmez A, et al. Optimization of bacterial cellulose production by gluconacetobacter xylinus using carob and haricot bean[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016: 2-10.

[7] Yuan Y, Feng F, Chen L, et al. Directional isolation of ethanol-tolerant acetic acid bacteria from industrial fermented vinegar[J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(3):573-578.

[8] Zheng Y, Zhang K, Wang C, et al. Improving acetic acid production of acetobacter pasteurianus AC2005 in hawthorn vinegar fermentation by using beer for seed culture[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(11):102-106.

[9] 董书阁,管斌,熊三玉,等.利用响应面分析法优化醋酸菌 AD1 的发酵条件[J].食品与发酵工业,2007(3): 78-81.

[10] 聂志强,汪越男,郑宇,等.传统食醋酿造过程中微生物群落的多样性及功能研究进展[J].中国酿造,2012(7):1-6.

[11] 李明元,张波,张子沛,等.底酸(乙酸)浓度对醋酸菌产酸量的影响[J].中国调味品,2009(1):50-51.

[12] Liu M, Zhong C, Zhang Y M, et al. Metabolic investigation in gluconacetobacter xylinus and its bacterial cellulose production under a direct current electric field[J]. other, 2016, 7(8):613.

[13] 张晓辉,吴广泉,张庆宇,等.提升耐高酸醋酸菌发酵酸度的工艺研究[J].安徽农学通报,2020,388(6): 32-33.

[14] 亓正良,杨海麟,张玲,等.高酸度醋发酵工艺研究[J].食品与生物技术学报,2010(6):117-121.

[15] 张晓辉,吴广泉,王静,等.Frings 醋酸发酵营养盐替代试验研究[J].安徽农学通报,2014,20(Z2):136-138.

[16] 武斌,李丽,赵良启.醋酸菌培养条件的优化及醋酸分批发酵[J].食品与药品,2007(1):11-14.

[17] 刘晓栋,余跃惠,张鸿翼.醋酸菌培养条件研究[J].化学工程师,2007,21(1):17-19.

[18] Yassine F, Bassil N, Flouty R, et al. Culture medium pH influence on gluconacetobacter physiology[J]. Carbohydr polym, 2016, 146:282-291.

[19] Chen Y, Bai Y, Li D, et al. Correlation between ethanol resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(6):837-847.

Response Surface Methodology to Optimize the Nutrient Medium of Acetobacter Pasteurianus

YAN Ziyun, CHEN Xiong, LI Xin

(Key Laboratory of Fermentation Engineering of the Ministry of Education, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068 China)

Abstract: From 26 kinds of trace elements, 5 kinds of factors that can promote the growth of Acetobacter pasteurianus were selected, namely arginine, lysine, cytosine, glutamine and folic acid, all with 0.10 g/L. The added amount was compounded and added to the nutrient medium, and the maximum biomass increased by 26%. A single factor experiment was carried out to determine the initial optimal addition amount, and the Plackett Burman experiment, the steepest climbing experiment and the response surface experiment were used to further optimize the medium composition. It was confirmed that nutrients, lysine and folic acid had a significant effect on the growth of Acetobacter pasteurianus. Through the regression equation ($R^2=96.42\%$), it was predicted that when the medium composition ratio is 5.0 g/L, arginine 0.10 g/L, lysine 0.46 g/L, cytosine 0.70 g/L, and glutamine with 0.20 g/L and 0.16 g/L folic acid, the maximum biomass of Acetobacter pasteurium can reach 0.45 g/L under the stress of 9% (V/V) ethanol and 1% (V/V) acetic acid. After 3 parallel verification experiments, the maximum biomass was 0.45 g/L, which was 32% higher than the nutrient medium before optimization, which was consistent with the model prediction results.

Keywords: acetobacter pasteurianus; trace elements; response surface methodology; nutrients

[责任编辑：张 众]

(上接第 28 页)

A Multi Focus Image Fusion Method Based on Improved Focus Region Detection

WANG Chenxi, WANG Shuqing, LIU Yifan, QING Yihui, XIA Yaowei

(School of Electrical and Electronic Engineering, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China)

Abstract: Aiming at the problem that it is easy to misjudge the focus area of the source image with complex image information in the multi focus image fusion algorithm, based on the traditional improved Laplace component absolute and SML algorithm, this paper proposes an improved focus area detection F-SWNL algorithm by combining the advantages of NSML algorithm in gradient direction detection and the advantages of SWML algorithm in noise suppression. At the same time, filter is used to remove the isolated points and smooth the edge of the focus area, and the designed fusion rules are used to fill the empty areas in the focus area. Finally, the fusion image is obtained. The experiment shows that the proposed algorithm can guarantee the excellent image fusion effect. At the same time, it also greatly reduces the time required for image fusion.

Keywords: Focus area; SML; F-SWNL; Filter processing; hole filling

[责任编辑：张岩芳]