

## 研究报告

## 数理统计方法优化单细胞蛋白发酵培养基研究

李永泉 贺筱蓉 赵小立 翁醒华 周红军

(杭州大学生命科学学院, 杭州 310028)

**摘要** 采用正交试验和中心组合设计相结合的数理统计方法,在 2L 发酵罐中对紫云英汁液培养单细胞蛋白发酵培养基进行筛选、优化,试验结果表明较优培养基为:初糖 2.3%,酵母粉 0.16%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%, $\text{MgSO}_4$  0.05%。酵母浓度最高达 10.46g/L,基质生长得率为 0.55g 菌体/g 基质,基质转化率为 83%。研究结果同时说明采用数理统计方法设计实验,工作量小,效率高,结果准确。

**关键词** 正交试验,中心组合设计,紫云英汁液,单细胞蛋白发酵

一个优良的培养基配方必须经过实验室到中试阶段再到工业生产过程反复不断的摸索和完善。但由于发酵培养基成份众多,且各因素常存在交互作用,很难建立理论模型;另外,由于测量数据常包含较大的误差,也影响了培养基优化过程的准确评估,因此培养基优化工作的量大且复杂。本研究使用数理统计方法来精心设计和分析实验,通过建立回归方程,得到优化结果。结果表明,可以通过较小的试验样本搜集到富含信息的数据,计算求得因素和效应之间的精确关系,从而提高研究效率。

本课题系“植物叶蛋白开发应用”的一个子课题。紫云英叶蛋白提取后,留下的汁液含糖 10% 以上,就浙江省而言,紫云英种植面积 2000 万亩,按亩产 1.5t 计,以糖形式储存的生物量有 3000 万 t,按 50% 转化率计,可得 1500 万 t 酵母蛋白,因此本研究对天然植物资源开发应用有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

阿保利假丝酵母 (*Candida arbora*) As 2.566

### 1.2 紫云英汁液

压榨得到,经测定含糖 10%,氨基氮化

物 2.66%,稀释 5 倍后作发酵原料用,此时含糖 2%,含氨基氮化物 0.532%。

### 1.3 培养基和培养条件

**1.3.1 种子培养基 (g):** 葡萄糖 2.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1125, 尿素 0.375,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.075, 酵母粉 0.10,  $\text{MgSO}_4$  0.05,  $\text{H}_2\text{O}$  100ml, 自然 pH 值, 30℃, 250ml 三角瓶装液 30ml, 摇瓶培养 20—24h。

**1.3.2 斜面培养基:** 种子培养基加 2.0% 琼脂, 自然 pH 值, 30℃ 培养 20—24h。

**1.3.3 基本发酵培养基 (g):** 酵母粉 0.10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15,  $\text{MgSO}_4$  0.05, 紫云英汁液 100ml, 自然 pH 值, 30℃, 通风量 1:1(VV<sub>m</sub>), 发酵 24h。

**1.3.4 发酵液糖浓度测定:** DNS 法<sup>[1]</sup>。

**1.3.5 发酵液酵母浓度测定:** 细胞干重法和浊度法<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基正交试验

在发酵培养基的众多组份中,往往只有少数组份起决定作用。本研究首先采用  $L_9(3^4)$  表对培养基组份进行正交试验,通过方差分析筛选出主要影响因素。

本课题得到浙江省科委的资助  
1994-08-27 收稿

正交试验因素和水平见表1,表内初糖浓度主要由紫云英汁液提供。试验结果及其极差分析见表2,方差分析见表3。

表1 培养基正交试验因素水平表

因素水平	A: 初糖浓度(%)	B: 酵母粉(%)	C: MgSO <sub>4</sub> (%)	D: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)
1	1.0	0.05	0.01	0.15
2	1.5	0.10	0.05	0.20
3	2.0	0.15	0.1	0.25

表2 培养基正交试验结果及其极差分析

试验组别	试验因素(%)				试验结果		
	A	B	C	D	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> +T <sub>2</sub>
1	1.0	0.05	0.01	0.15	3.55	4.10	7.65
2	1.0	0.10	0.05	0.20	6.44	5.67	12.11
3	1.0	0.15	0.1	0.25	6.24	6.28	12.52
4	1.5	0.05	0.1	0.20	5.65	6.12	11.77
5	1.5	0.10	0.01	0.25	7.14	6.32	13.46
6	1.5	0.15	0.05	0.15	7.47	7.03	14.50
7	2.0	0.05	0.05	0.25	6.23	6.89	13.12
8	2.0	0.10	0.1	0.15	8.07	7.21	15.28
9	2.0	0.15	0.01	0.20	8.76	8.24	16.96
K <sub>1</sub>	32.28	32.54	38.07	37.43	59.55	57.82	117.37
K <sub>2</sub>	39.73	40.85	39.73	40.84			
K <sub>3</sub>	45.36	43.96	39.57	39.10			
$\bar{K}_1$	5.38	5.42	6.35	6.24			
$\bar{K}_2$	6.62	6.81	6.62	6.81			
$\bar{K}_3$	7.56	7.33	6.60	6.52			
极差R	2.18	1.91	0.27	0.57			

表3 培养基正交试验的方差分析

变异来源	自由度	平方和	方差	F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
区组	1	0.16	0.15	0.57	4.46	8.65
A因素	2	14.35	7.18	25.64	4.46	8.65
B因素	2	11.65	5.83	20.82	4.46	8.65
C因素	2	0.28	0.14	0.50	4.46	8.65
D因素	2	0.97	0.49	1.75	4.46	8.65
误差	8	2.23	0.28			
总计	17	29.64				

从表2极差分析可知,培养基较优组合为:初糖浓度2.0%,酵母粉0.15%,MgSO<sub>4</sub>0.05%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2%。培养基各组份和菌体浓度的相应关系并非直线相关。

上述结果通过摇瓶验证,平均菌体浓度为8.91g/L,残糖浓度为0.34%,因此底物生长得率为0.537g菌体(干重)/g基质,基质转化率为83%。

表3的方差分析表明<sup>[3]</sup>,初糖浓度和酵母粉浓度影响极其显著,而MgSO<sub>4</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>磷酸盐影响甚微。因为培养液紫云英汁液本来就含有一定量的磷元素和微量元素,而初糖和酵母粉分别提供碳源和氮源,碳氮比恰当与否是单细胞蛋白发酵培养组份合理与否的决定因素。

### 2.2 中心组合设计试验

正交试验筛选出初糖浓度和酵母粉浓度两个关键因素,因涉及因素少,故可采用中心组合设计<sup>[4]</sup>对培养基继续优化,并通过回归分析建立菌体浓度和因素之间相应关系的数学模型,从而计算最优比例。设X<sub>1</sub>为初糖浓度,X<sub>2</sub>为酵母粉浓度,Z为步长。选择初糖浓度2.0%,酵母粉浓度0.15%为二次设计的中心点,初糖浓度的间距取0.3%,酵母粉浓度间距取0.03%,则:

$$Z_1 = \frac{\text{选择初糖浓度} - 2.0\%}{0.3\%}$$

$$Z_2 = \frac{\text{选择酵母粉浓度} - 0.15\%}{0.03\%}$$

试验设计及其结果见表4。

考虑菌体浓度与初糖浓度、酵母粉浓度并非直线相关,同时考虑到X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>的交互作用,因此可建立数学模型如下:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1^2 + a_4X_2^2 + a_5X_1X_2 \quad (1)$$

在保证F > F<sub>0.05</sub> = 4.35的统计检验显著前提下,对方程(1)利用表4的实验数据,采用最小二乘法进行拟合,结果得到回归方程:

$$Y = 29.9 + 18.8X_1 + 236X_2 - 7.5X_1^2 - 1320X_2^2 + 99X_1X_2 \quad (2)$$

方程(2)和表4实验结果误差为5.8%,表明回归方程拟合得很好。

对上述回归方程(2)进行求导,可知,当X<sub>1</sub> = 2.3%, X<sub>2</sub> = 0.16%时有极大值Y<sub>max</sub> =

10.72g/L, 此结果在2L发酵罐中验证, 5批平均菌体浓度为10.46g/L, 残糖浓度为0.396%, 基质转化率为83%, 基质生长得率为0.55g菌体(干重)/g基质。

表4 中心组合设计及其试验结果

试验罐批	$Z_1$	$Z_2$	$X_1$ : 初糖浓度(%)	$X_2$ : 酵母粉浓度(%)	菌体浓度(干重)(g/L)
10	-1	-1	1.70	0.12	8.40
11	+1	-1	2.30	0.12	8.10
12	-1	+1	1.70	0.18	6.68
13	+1	+1	2.30	0.18	10.09
14	$-\sqrt{2}$	0	1.58	0.15	7.07
15	$+\sqrt{2}$	0	2.42	0.15	9.45
16	0	$-\sqrt{2}$	2.0	0.11	7.87
17	0	$+\sqrt{2}$	2.0	0.19	7.45
18	0	0	2.0	0.15	10.03
19	0	0	2.0	0.15	10.44

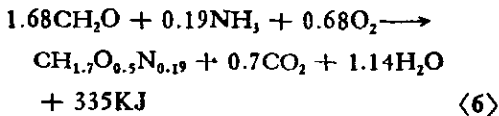
表5 假丝酵母 *Candida arbora* 化学成份

组成成份	蛋白质	糖类	脂类	核酸	灰份	C	N	P	S	金属元素
含量(%)	40	38	8	8	6	48	7.5	1.5	0.3	1.0

$$C:N = 48:7.5 = 6.4:1, \quad (5)$$

考虑到发酵过程中碳源等基质除了用于合成菌体外, 还用于维持菌体的呼吸能耗产生 $CO_2$ , 因此发酵培养基的C:N应大于6.4:1。

Moo-Yong<sup>[6]</sup>对酵母单细胞蛋白发酵的生化反应过程曾提出以下计量表达式:



据(6)式可以算出培养基的碳氮比:

$$C:N = 1.68 \times 12:0.19 \times 14 = 7.58:1 \quad (7)$$

(5)式的结果和(3)、(4)式比较非常接近, 事实上(3)、(4)式所表征的碳氮比是一个表观值, 因为计算紫云英汁液本身所含的氮源只算人0.532%的氨基酸, 其实紫云英汁液内还含有较丰富的维生素族氮化物, 因此实际的(3)、(4)两式C:N值要比表观值低一点, 因而(7)式值和(4)式实际值更为接近。

### 2.3.3 多因子试验解决的两个问题:

## 2.3 结果讨论

2.3.1 本研究采用数理统计方法, 两次设计耦合对发酵培养基进行优化, 得到令人满意的结果。对两次设计的实验结果进行碳氮比分析清楚地显示了每次设计的贡献。

以葡萄糖计, 碳源折算为碳元素的比例系数为0.40, 而氮源折算为氮元素的比例系数为 $1/6.25 = 0.16^{[5]}$ 。

$$\text{则: 正交试验结果 } C:N = 2.0 \times 0.40 / [(0.532 + 0.15) \times 0.16] = 7.33:1 \quad (3)$$

$$\text{中心组合设计结果 } C:N = 2.3 \times 0.40 / [(0.532 + 0.16) \times 0.16] = 8.31:1 \quad (4)$$

可见两次比较中心组合设计结果C:N提高。

2.3.2 本研究室对假丝酵母 *Candida arbora* 的组成分析见表5。

由表5可知, 假丝酵母 *Candida arbora* 的

(1) 哪些因子对响应具有最大(或最小)的效应, 哪些因子间具有交互作用。

(2) 感兴趣区域的因子组合情况, 并对独立变量进行优化。

本研究利用正交试验筛选因子, 中心组合设计优化因子间的组合, 很好地解决了以上问题。由于采用了合理的试验设计, 试验数量和所费时间均很经济, 对试验进行全面研究, 通过回归二次方程科学地提供了局部和整体的关系。通过计算机对响应关系数学模型的模拟, 可以更进一步优化试验结果, 因此, 不失为发酵培养基优化的较有价值的探索。

## 参 考 文 献

- [1] 大连轻工业学院, 天津轻工业学院, 无锡轻工业学院. 工业发酵分析, 北京: 轻工业出版社, 1980, 16--21.
- [2] Atsubiko shinmyo, Mitsuo Okazaki, Gyozo Terui. J Ferment Technol, 1968, 46(9): 562--578.
- [3] 袁洪平. 生物统计学, 杭州: 浙江教育出版社, 1991,

233—250.

[4] 虞榭. 工业微生物, 1989, 19(6): 21.

[5] 北京大学生物系. 生物化学实验指导, 北京: 高等教

育出版社, 1979, 93.

[6] M. Moo-Yong. Can J Chem Eng. 1975, 53(2): 113—118.

## STUDY ON THE STATISTICAL METHODS TO OPTIMIZE SCP FERMENTATION MEDIUM OF ASTRAGATUS SINICS JUICE

Li Yongquan He Xiaorong Zhao Xiaoli Wen Xinghua Zhou Hongjun

(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310028)

**Abstract** Orthogonal test and central combination design was coupled to optimize SCP fermentation medium of Astragatussinics juice. The experiment results showed that, the optimum medium was 2.3% initial glucose, 0.16% yeast extract,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%, the cell density was 10.46g/L, the biomass yield factor was 0.55 and the substrate conversion ratio was 83%. The study process also illustrated that the statistical method decreased experimental times compared with conventional method and became simplified.

**Key words** Orthogonal test, central combination design, Astragatus sinics juice, SCP fermentation