

# 数学统计法快速优化假单胞菌脂肪酶发酵条件

高修功 王 超 章克昌

(无锡轻工大学生物工程系 无锡 214036)

**摘要** 应用快速有效的数学统计方法对 *Pseudomonas* sp. H18 的脂肪酶发酵条件进行了优化。采用 Plackett-Burman 设计对影响产酶的重要因素进行了筛选,然后利用响应面分析(RSA)法对这些产酶重要影响因素进行了优化,各因素的最佳水平通过 Box 的 complex algorithm 法得以确定。

**关键词** 统计, 优化, Plackett-Burman 方法, 脂肪酶, 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)

**分类号** Q 939

---

1996-06-03收稿

影响脂肪酶发酵的因素除了培养基组成外,还包括发酵温度、摇瓶转速等条件,可变因子较多。通常用于优化发酵条件的统计方法,如逐因子实验、全因子实验等,在因子较多时需要太多的实验次数,有时甚至难以做到;而部分因子实验(如正交实验)、回归分析等方法对所研究因子的个数有一定的限制,如果所选择的因子恰好不太重要,那么所做研究的意义将不大。

Plackett-Burman法<sup>[1]</sup>是一种以不完全平衡块(balanced incomplete blocks)为原理的实验设计,它能够从众多的过程变量中快速、有效地筛选出最为重要的几个因素,供进一步详细研究用。Williams<sup>[2]</sup>将其与随机平衡实验、部分因子实验相比较,认为 Plackett-Burman法在筛选实验重要因子方面最为有效和准确。另外该方法还具有数据处理简单、可适用于任意多个实验因子等优点。

响应面分析(Response Surface Analysis, RSA)法<sup>[3]</sup>是一种用于优化试验条件的数学统计方法。虽然它与过去推广的“正交试验法”均建立在正交设计原理的基础上,但较后者更为有效。由于它采用了更为合理的试验设计,能以最经济的方式,以很少的试验数量和时间对试验进行全面研究,科学地提供局部与整体之间的关系,从而能取得更为明确的、有目的性的结论。

本文首先采用 Plackett-Burman 法对影响 *Pseudomonas* sp. H18 菌株脂肪酶发酵的重要影响因素进行了筛选,然后用 RSA 法对筛选出的产酶重要影响因素进行了优化,确定了最适产酶条件与产酶培养基组成。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*Pseudomonas* sp. H18, 本实验室经土壤筛选及紫外线和亚硝基胍诱变获得<sup>[4]</sup>。

### 1.2 发酵

#### 1.2.1 培养基

斜面种子培养基: 肉汁胨固体培养基。

液体种子培养基: 肉汁胨液体培养基。

发酵产酶出发培养基: 见文献[4]。

1.2.2 培养方法: 挑取一环新鲜的斜面种子, 接入液体种子培养基中, 30℃、150r/min 条件下培养 24h。然后取 1ml 液体种子于发酵产酶培养基中, 在一定温度和摇床转速下摇瓶发酵 72h。发酵液离心(3000r/min, 20min), 取上清液测定酶活。

### 1.3 脂肪酶水解活力测定

橄榄油乳化法<sup>[5]</sup>。以在 40℃、pH 9.0 的条件下, 水解橄榄油每分钟产生 1μmol 游离脂肪酸所需的酶量定义为一个单位(u)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Plackett-Burman 法筛选产酶重要影响因素

选用 N = 12 的 Plackett-Burman 实验设计对 8 个因素(包括培养条件及培养基组成)进行研究, 另外剩余的 3 个因素(对于 N 次的试验设计至多可以研究 N - 1 个因素<sup>[1]</sup>)作为空项。每一个因素取两个水平: 低水平“-”即为出发培养基组成及原始培养条件(发酵温度, 30℃; 起始 pH, 9.0; 摇瓶转速, 150r/min), 高水平“+”取低水平的 1.25 倍。实验设计及结果如表 1 所示, 各因素所代表的参数、水平及分析结果见表 2。结果分析参见 Stowe 和 Mayer 的方法<sup>[6]</sup>。

由分析结果可以看出, 可信度大于 80% 的几个因素均为培养基组成成分, 它们对产酶影响顺序为: 玉米浆 > K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> > 豆饼粉 > NaNO<sub>3</sub> > 可溶性淀粉; 而发酵条件(包括发酵温度、培养基起始 pH 和摇瓶转速)影响的可信度均小于 70%。

### 2.2 响应面分析(RSA)优化培养基组成

以可信度高于 90% 的三个因素(豆饼粉、玉米浆、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)为自变量, 发酵酶活为响应值, 采用响应面分析法在三因素三水平上对培养基组成进行优化。其它可信度较小的因素说明对产酶无明显影响, 维持在较低水平上, 即: 可溶性淀粉, 1.0%; NaNO<sub>3</sub>, 0.5%; 温度, 32℃; 培养基起始 pH, 9.0; 摇瓶转速, 150r/min。实验因

表1 N=12的Plackett-Burman实验设计与结果

序号	A	B	(C)	D	E	(F)	G	H	(I)	J	K	酶活(u/ml)
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	75.1
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	69.9
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	73.1
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	72.5
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	75.1
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	69.6
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	73.4
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	80.3
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	73.7
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	79.4
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	79.6
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65.7

表2 各因素、水平及其影响效果

因 素		水 平		效 果	相对重要性
代码	参 数	低(-)	高(+)	(+)-(-)	t 检 验
A	发酵温度(℃)	32	35	-0.7	0.79
B	培养基起始pH	9.0	9.5	-1.0	1.13
(C)	空项	...	...	0.1	
D	摇瓶转速(r/min)	150	180	0.4	0.45
E	豆饼粉(%)	2.0	2.5	2.5	2.82
(F)	空项	...	...	1.5	
G	玉米浆(%)	2.0	2.5	6.4	7.23
H	可溶性淀粉(%)	1.0	1.5	1.5	1.69
(I)	空项	...	...	0.3	
J	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	0.50	0.75	3.7	4.18
K	NaNO <sub>3</sub> (%)	0.50	0.75	1.8	2.03

素与水平的选取如下:

豆饼粉(X<sub>1</sub>): - 1:2.0% 0:2.5%  
1:3.0%

玉米浆(X<sub>2</sub>): - 1:2.0% 0:2.5%  
1:3.0%

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(X<sub>3</sub>): - 1:0.5% 0:0.75%  
1:1.0%

将实验数据进行回归拟合,可得到响应值(Y)与各因子(X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>)之间的下列函数关系:

$$Y = 88.33 + 0.78X_1 + 6.88X_2 + 4.48X_3 - 4.47X_1^2 - 7.87X_2^2 - 5.02X_3^2 - 1.80X_1X_2 + 0.40X_1X_3 + 1.55X_2X_3$$

由方差分析得出,用上述回归方程描述各

因子与相应值之间的关系时,其因变量与所有自变量之间的线性关系是显著的[F> f<sub>0.01</sub>(9, 5)],线性相关系数达0.988;进一步检验回归方程各项的方差也得出,方程的失拟项很小,因此可以用该回归方程代替真实试验点对实验结果进行分析和预测。另外从回归方程各项的方差分析还得出,方程的一次项、二次项的影响均为高度显著,而且交互项的作用也是显著的,这说明各因子对响应值的影响并不是简单的线性关系,而且各因子之间存在一定的交互作用。

分析上述回归方程可知,豆饼粉浓度的变化对产酶影响不显著,而玉米浆和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>浓度的变化对产酶有显著的影响,二者相比玉米浆的影响更为显著。为了确定各组分准确的用

表3 模型预测值与实际发酵情况比较

培养基	酶活 (u/ml)	
	实测值	预测值
原始培养基	62.1	59.0
优化培养基	87.5	91.0

量,用 Box 的 complex algorithm 法<sup>[7]</sup>对上述回归方程在  $-2 < X_i < 2$  ( $i = 1, 2, 3$ ) 的范围内求取最大值,解得各组分的取值为:  $X_1B = 0.012$ ,  $X_2 = 0.485$ ,  $X_3 = 0.552$ , 相当于: 豆饼粉, 2.51%; 玉米浆, 2.74%;  $K_2HPO_4$ , 0.87%。此时酶活最高水平为 91.1u/ml。

为了检验回归模型的准确性,实验中在上述最佳组成培养基及原始组成培养基中重新发酵并实际测定酶活力,模型预测值与实际测定值比较见表3。可以看出该模型能够较好地预测实际发酵情况。

综上所述, H18 菌株脂肪酶发酵生产最佳培养基组成为: 豆饼粉 2.51%; 玉米浆 2.74%; 可溶性淀粉 1.0%;  $K_2HPO_4$  0.87%;  $NaNO_3$  0.5%。最佳发酵条件为: 发酵温度 32℃; 培养基起始

pH9.0; 摇瓶转速 150r/min。

由以上的实验结果可以看出, Plackett-Burman 设计与响应面分析 (RSA) 法相结合可以快速、有效地从众多影响脂肪酶发酵的因素中筛选出比较重要的影响因素并实现其水平优化, 优化结果与实际发酵情况吻合较好。

### 参 考 文 献

- [1] Plackett R L, Burman J P. *Biometrika*, 1946, 33: 305~325.
- [2] Williams K R. *Ind Eng Chem*, 1963, 55: 29.
- [3] Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. *Statistics for Experimenters*, New York: John Wiley and Sons, 1978, 510~539.
- [4] 高修功, 章克昌, 曹淑桂等. 微生物学通报, 1997, 24(3): 152~155.
- [5] Yamada K, Ota Y, Machida H. *Nippon Nogei-kagaku Kaishi*, 1962, 36: 860.
- [6] Stowe R A, Mayer R P. *Ind Eng Chem*, 1966, 58(2): 36~40.
- [7] Box M J. *Computer J*, 1965, 8: 42~52.

## STATISTICAL METHODS FOR RAPID OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION BY *PSEUDOMONAS* SP.

Gao Xiugong Wang Chao Zhang Kechang

(Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** Statistical methods and optimization techniques were used to determine the optimum fermentation conditions for lipase production by *Pseudomonas* sp. H18 in shake flask cultivation. A Plackett-Burman design was used to screen the important variables, which were thence grouped and studied by the Response Surface Analysis (RSA) method. The optimum levels of these variables were established by the complex algorithm of Box.

**Key words** Statistical methods, Optimization, Plackett-Burman design, Lipase, *Pseudomonas* sp.