

## 均匀设计在L-异亮氨酸发酵中的应用

刘党生 王 鹏 李福德 李建梅

(沈阳药学院微生物研究室, 沈阳)

本试验用均匀设计方法考查了9种培养基组成对L-异亮氨酸产生菌钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*) A11发酵的影响, 获得优化配比为: 葡萄糖12%, 硫酸铵2%, 磷酸二氢钾0.1%, 磷酸氢二钾0.45%, 硫酸镁0.055%, 生物素1 $\mu$ g, 硫胺素15 $\mu$ g, 硫酸亚铁2ppm, 硫酸锰2ppm, 碳酸钙4%, pH7.0~7.2。在此条件下, 菌株A11可产生L-异亮氨酸15.1mg/ml。与正交设计相比, 均匀设计具有试验次数少, 工作效率高和便于分析因素影响等优点。

**关键词** 均匀设计; L-异亮氨酸; 发酵

L-异亮氨酸属于人体必需氨基酸, 目前国内外有许多关于L-异亮氨酸发酵条件研究的报道, 但仅限于运用正交设计的方法, 尚未有采用均匀设计方法的报告。均匀设计是方开泰等<sup>[1]</sup>将数论与多元统计相结合而建立起来的一种试验方法。与正交设计法相比, 它具有许多突出的优点如 (1) 每个因素每个水平只做一次试验, 而且试验次数与水平数相同; (2) 水平数增加时, 试验次数按水平数增加的量而增加; (3) 可以用计算机给出定量方程式, 便于分析发酵条件对产量的影响; (4) 可以大大地减少试验次数, 提高工作效率, 降低成本。本试验运用均匀设计方法考察了L-异亮氨酸产生菌All的发酵培养基组成, 通过微机进行数据分析处理后, 获得了培养基组成的优化配比。

### 材料与 方法

#### (一) 材料

1. 菌株: L-异亮氨酸产生菌钝齿棒状杆菌 (*Corynebacterium crenatum*)

All(以下简称All), 由谷氨酸产生菌钝齿棒状杆菌T<sub>0-13</sub>获得。L-异亮氨酸生物测定指示菌是钝齿棒状杆菌No.5(Lle<sup>-</sup>)。L-亮氨酸生物测定指示菌是钝齿棒状杆菌No.8(leu<sup>-</sup>)。

#### 2. 培养基及培养条件

(1) 斜面培养基组成(%): 葡萄糖0.5, 酵母膏0.5, 蛋白胨1.0, 氯化钠0.25, 琼脂2, pH7.0—7.2。

(2) 基本培养基组成(%): 葡萄糖0.5、硫酸铵0.15、尿素0.15、磷酸二氢钾0.1、磷酸氢二钾0.3, 硫酸镁0.01、硫酸锰2ppm、硫酸亚铁2ppm、生物素3 $\mu$ g、硫胺素20 $\mu$ g、琼脂粉2.0、pH7.0—7.2。

(3) 发酵培养基组成(%): 除葡萄糖5、硫酸铵2、碳酸钙3、及不加琼脂粉外, 其余组成配比与基本培养基的相同。

(4) 培养条件: All菌斜面在32 $^{\circ}$ C培养24h, 取一环菌接种到含7.5ml发酵培养基的125ml摇瓶中, 在32 $^{\circ}$ C振荡培养72h。

本文于1990年6月9日收到。

(二) 分析方法

1. 生物测定法：分别制备 L-异亮氨酸营养缺陷型和 L-亮氨酸营养缺陷型的基本培养基混菌平板，待凝固后，依次放入直径为0.5cm的滤纸片，用微量进样器取一定量的发酵液上清液，滴加到滤纸片上，并同时加入标准品作对照，32℃培养 12h，观察生长情况，从而确定有关氨基酸的产生情况。

2. 比色法：取发酵液上清液定量点在层析滤纸上，在展开剂（正丁醇：醋酸：水=4:1:1）中展开，取出风干后，均匀地喷上显色剂（0.5%茚三酮的丙酮溶液），置75℃烘箱中显色20min，取出后将L-异亮氨酸的斑点剪下，同时剪下一块面积大小相仿的空白纸作为对照，加入5ml洗脱液（0.4%饱和硝酸铜的甲醇溶液），浸泡70min，用721型分光光度计在506nm处测定吸收值，计算出L-异亮氨酸的产量。

实 验 结 果

(一) 葡萄糖、硫酸铵、尿素对菌株

All的L-异亮氨酸产量的影响

采用三因素七水平七组试验的方式考察了这三种组份对菌株 All 发酵的影响。三种培养基成份的水平数见表 1。

表 1 葡萄糖、硫酸铵和尿素的水平表  
Table 1 Levels of glucose, ammonium sulfate and urea

因素 Factor	水平 Level (%)	1	2	3	4	5	6	7
	葡萄糖 Glucose(x <sub>1</sub> )		8.0	9.0	10	11	12	13
硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (x <sub>2</sub> )		2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
尿素Urea(x <sub>3</sub> )		0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30

将上面三种培养基组成的水平按均匀设计表排列，配制不同的培养基，试验结果见表 2。

第 7 组试验回归不显著，故省略，但这并不影响整个试验结果。采用逐步回归法用微机处理上述数据，处理后的数据结果见表 3。

由表 3 的结果得方程(1)。

表 2 葡萄糖、硫酸铵和尿素的均匀设计与结果  
Table 2 Test design of glucose, ammonium sulfate and urea and result

水平 Level (%)	因素 Factor	Glucose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Urea	实测值 Measured value	预测值 Predicted value (mg/ml)
		x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>		
1		8.0	3.0	0.10	7.33	7.31
2		9.0	5.0	0.25	5.96	6.01
3		10	7.0	0.05	6.15	6.12
4		11	2.0	0.20	9.59	9.56
5		12	4.0	0	8.97	9.02
6		13	6.0	0.15	6.47	6.45
7		14	8.0	0.30	4.82	/

$$Y = -9.105 + 3.672x_1 - 0.768x_2 - 4.914x_3 - 0.159x_1^2 \quad (1)$$

R(相关系数) = 0.9999, S(标准差) = 0.092, F(置信度) = 344.03 > F<sub>(1,6)</sub><sup>0.05</sup> =

225。

方程(1)经F检验为比较显著。各因素对产量影响的大小取决于标准回归系数的绝对值。在本试验中，各因素对产量影

表 3 用逐步回归法处理的数据结果

Table 3 Results treated by stepwise regression

变量 Variable	回归系数 Coefficient	标准回归系数 Standard coefficient
$B_0$	-9.105	
1	3.672	4.478
2	-0.768	-0.936
3	-4.914	-0.300
1×1	-0.159	-4.075

$> x_3$  (尿素)。

对方程(1)偏导求极值, 可得以下结果: 在试验浓度范围内  $x_1$  (葡萄糖) $_{max} = 11.55$ ,  $x_2$  (硫酸铵)与  $x_3$  (尿素)则应选择一较低值。由此安排优化试验, 试验及结果见表4。

根据以上结果, 选择的优化配比为葡萄糖12%、硫酸铵2.0%、尿素0%。

响的顺序为:  $x_1$  (葡萄糖)  $> x_2$  (硫酸铵)

表 4 葡萄糖、硫酸铵和尿素的优化组合与结果

Table 4 Optimized compositions of glucose, ammonium sulfate and urea and results

因素 Factor	Glucose $x_1$	$(NH_4)_2SO_4$ $x_2$	Urea $x_3$	实测值 Measured value (mg/ml)	预测值 Predicted value
水平 Level(%)					
1	12	2.0	0.1	9.06	10.0
2	12	2.0	0	10.0	10.5

(二) 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、生物素、硫酸素及碳酸钙对产量的影响

考察了无机盐类及生长因子等对菌株 A1 的L-异亮氨酸产量的影响。这6种培养基组成的水平表见表5。

采用六因素十水平十组试验的方式,

将上面6种培养基的组成的水平按均

表 5 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、生物素、硫酸素及碳酸钙的水平

Table 5 Levels of potassium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, magnesium sulfate, biotin, thiamine and calcium carbonate

因素 Factor	$KH_2PO_4$ $x_1$	$K_2HPO_4$ $x_2$	$MgSO_4$ $x_3$	Biotin $x_4$ ( $\mu g$ )	Thiamine $x_5$ ( $\mu g$ )	$CaCO_3$ $x_6$
水平 Level(%)						
1	0.10	0	0.010	1.0	10	0.5
2	0.15	0.05	0.015	1.5	15	1.0
3	0.20	0.10	0.020	2.0	20	1.5
4	0.25	0.15	0.025	2.5	25	2.0
5	0.30	0.20	0.030	3.0	30	2.5
6	0.35	0.25	0.035	3.5	35	3.0
7	0.40	0.30	0.040	4.0	40	3.5
8	0.45	0.35	0.045	4.5	45	4.0
9	0.50	0.40	0.050	5.0	50	4.5
10	0.55	0.45	0.055	5.5	55	5.0

匀设计表排列, 配制不同的培养基, 试验结果见表6。

采用逐步回归法用微机处理上述数据, 处理后的结果见表7。

由表7的结果得方程(2)

$$Y = 14.64 - 7.44x_1 + 2.73x_2 + 15.52x_3$$

$$- 0.00528x_5 - 35.65x_1^2 + 15.20x_2^2 - 0.06x_4^2 + 0.00046x_5^2 \quad (2)$$

$$R(\text{相关系数}) = 0.9999, \quad S(\text{标准差}) = 0.063, \quad F(\text{置信度}) = 5022.9 > F_{(1,8)}^{0.05} =$$

239

方程(2)经F检验为比较显著。根据

表 6 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、生物素、硫胺素及碳酸钙的均匀设计与结果  
Table 6 Test design of potassium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, magnesium sulfate, biotin, thiamine and calcium carbonate and results

因素 Factor 水平 Level(%)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub> x <sub>3</sub>	Biotin x <sub>4</sub> (μg)	Thiamine x <sub>5</sub> (μg)	CaCO <sub>3</sub> x <sub>6</sub>	实测值 Measured value (mg/ml)	预测值 Predicted value (mg/ml)
1	0.10	0.05	0.020	3.0	40	5.0	11.94	11.95
2	0.15	0.15	0.035	3.5	20	4.5	11.25	11.21
3	0.20	0.25	0.050	2.5	55	4.0	12.07	12.09
4	0.25	0.35	0.010	5.0	35	3.5	10.60	10.62
5	0.30	0.45	0.025	2.0	15	3.0	12.81	12.79
6	0.35	0	0.040	4.5	50	2.5	5.48	5.45
7	0.40	0.10	0.055	1.5	30	2.0	5.75	5.76
8	0.45	0.20	0.015	4.0	10	1.5	3.86	3.88
9	0.50	0.30	0.030	1.0	45	1.0	3.02	2.98
10	0.55	0.40	0.045	3.5	25	0.5	2.05	2.07

表 7 用逐步回归法处理的结果  
Table 7 Results treated by stepwise regression

变量 Variable	回归系数 Coefficient	标准回归系数 Standard coefficient
B <sub>0</sub>	14.46	
1	-7.44	-0.266
2	2.73	0.098
3	15.52	0.056
5	-0.00528	-0.00189
1 × 1	-35.65	-0.844
2 × 2	15.20	0.254
4 × 4	-0.06	-0.137
5 × 5	0.00046	0.00011

标准回归系数的绝对值，各因素对产量影响的顺序为： $x_1$ (磷酸二氢钾)  $>$   $x_2$ (磷酸氢二钾)  $>$   $x_3$ (硫酸镁)  $>$   $x_5$ (硫胺素)  $>$   $x_4$ (生物素)  $>$   $x_6$ (碳酸钙)。

对方程(2)偏导求极值，得以下结果， $x_1$ (磷酸二氢钾)<sub>max</sub> = 0.1， $x_2$ (磷酸氢二钾)<sub>min</sub> = -0.09， $x_4$ (生物素)<sub>max</sub> = 0， $x_5$ (硫胺素)<sub>min</sub> = 57。根据试验的特点和已取得的结果，在试验的水平范围内， $x_2$ (磷酸氢二钾)， $x_3$ (硫酸镁)选择较高浓度， $x_4$ (生物素)， $x_5$ (硫胺素)选择较低浓度， $x_6$ (碳酸钙)对产量影响较小。由此安排优化试验，试验结果见表8。

表 8 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、生物素、硫胺素和碳酸钙的优化组合与结果  
Table 8 Optimized composition of potassium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, magnesium sulfate, biotin, thiamine and calcium carbonate and results

因素 Factor 水平 Level(%)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub> x <sub>3</sub>	Biotin x <sub>4</sub> (μg)	Thiamine x <sub>5</sub> (μg)	CaCO <sub>3</sub> x <sub>6</sub>	实测值 Measured value (mg/ml)	预测值 Predicted value (mg/ml)
1	0.1	0.45	0.055	1.0	15	4.0	15.1	17.8
2	0.1	0.45	0.050	1.0	15	4.0	14.7	17.7

根据表8的试验结果，选择第1组为优化配比。综合以上结果，运用均匀设计所选出的优化培养基组成为：葡萄糖12%、硫酸铵2%、磷酸二氢钾0.1%、磷酸氢

二钾0.45%、硫酸镁0.055%、生物素1μg、硫胺素15μg、硫酸亚铁2ppm、硫酸锰2ppm、碳酸钙4%、pH7.0—7.2。在此条件下，菌株All可产L-异亮氨酸15.1

mg/ml。

## 讨 论

在微生物发酵条件试验中, 目前主要采用的是正交设计方法。所选择的点在试验范围内具有“均匀分散、整齐可比”的特点。为了保证这两个特点, 用正交设计安排的试验次数必须是水平数的平方<sup>[2]</sup>。

均匀设计舍弃了正交设计“整齐可比”的特点, 而让试验点在试验范围内充分“均

匀分散”、每因素每水平只做一次试验, 而且试验次数与水平数相等, 利用微机对数据进行多元统计处理给出定量方程式预测优化条件, 解决了数据分析较正交设计复杂这一问题, 我们在试验中分别采用了三因素七水平和六因素十水平两种试验方式, 如果用正交设计法来进行试验则分别要做49次和100次不同的试验, 而运用均匀设计则只分别做7次和10次试验, 这样不仅大大地提高了工作效率, 而且还降低了劳动强度及成本。

## 参 考 文 献

[1] 方开泰: 应用数学期刊, 4:363—372, 1980。

[2] 沈阳药学院等: 高等数学, 上海科学技术出版社, p. 404, 1981。

## Application of Uniform Design in L-isoleucine Fermentation

Liu Dangsheng Wang Peng Li Fude Li Jianmei  
(Lab. of Microbiology, Shenyang College of Pharmacy, Shenyang)

Uniform design was employed in our paper to test the influences of nine medium substrates on the fermentation of L-isoleucine producer *Corynebacterium crenatum* All. The optimum medium compositions were as follows: glucose 12%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.45%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.055%, biotin 1 $\mu\text{g}$ , thiamine 20 $\mu\text{g}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2ppm,  $\text{CaCO}_3$  4%, pH7.0—7.2. Under these conditions the amount of L-isoleucine produced by All was up to 15.1mg/ml.

Uniform design, compared with orthogonal design, has advantages of less times of test, higher work efficiency and easier description of factor influences.

## Key words

Uniform design; L-isoleucine; fermentation