

盐生盐杆菌 B 培养条件的优化研究

郭爱莲¹, 徐金贵¹, 侯 洵², 陈 烽²

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 中国科学院 西安光学精密机械研究所, 陕西 西安 710068)

摘要:利用 Plackett-Burman 设计筛选出影响盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*) B 培养条件的重要因素, 然后利用正交试验设计对这些重要因素加以优化。结果表明, 盐生盐杆菌 B 的最适培养条件为: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, KCl 2.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg/L, NaCl 200 g/L, 柠檬酸钠 2 g/L, 酪蛋白氨基酸 5 g/L, 甘油 10 g/L, pH 6.5, 温度 38℃, 摇瓶转速 180 r/min, 光照培养。

关键词: Plackett-Burman 设计; 正交试验设计; 优化; 盐生盐杆菌 B; 培养条件

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-274 X (2003)01-0087-04

Plackett-Burman 设计是一种以不完全平衡模块(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。William^[1]将其与随机平衡实验、部分因子实验相比较, 认为 Plackett-Burman 设计在筛选实验重要因子方面最为有效和准确。

正交试验设计是一种研究与处理多因素的科学方法。它利用一套规格化的表格——正交表, 科学合理地安排实验。其特点是在实验的全部组合中, 仅挑选部分有代表性的水平组合进行实验, 通过部分实施了解全面实验情况, 从中找出较优的处理组合。

盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*), 在含高盐浓度(2.5~5.2 mol/L NaCl)的培养基中生长良好。该菌的一个重要特征是其细胞膜上含有细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)和脂类组成的紫膜(purple membrane)。BR 既具有质子泵功能, 又是一种比光合作用更简单的光能转换器^[2]。因而, 在光学计算机高速开关和光学信息存贮及处理等分子电子器件、光能电池、生物芯片等领域中具有广泛的应用前景。目前, 有关 BR 的报道多集中在对其结构与性质的研究上, 而对其产生菌的培养条件研究得较少。盐生盐杆菌具有生长速度慢、生长周期长等缺点, 这极大地限制了紫膜的产量。因而, 如何加快其

生长速度, 增加菌体数量, 以提高紫膜的产量, 则显得极为重要。影响盐生盐杆菌生长的因素较多, 如果对这些因素单独进行实验, 则工作量很大, 如果利用正交试验设计, 则易受到研究因子个数的限制, 而且有时由于所选的因素也不太重要, 而使研究的意义不大^[3]。因而, 本文首先利用 Plackett-Burman 设计对所选的影响盐生盐杆菌 B 生长的因素进行筛选得出重要因素, 然后利用正交试验设计对这些重要因素进行优化, 确定出最适的培养条件。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*) CGMCC 1.1959, 系产紫膜菌株。编号 B。

1.1.2 培养基 斜面种子培养基, 液体种子培养基以及出发种子培养基均采用 CM^[4]培养基的改良配方。其成分如下:

NaCl 230 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 g, KCl 2 g, 柠檬酸钠 3 g, 酪蛋白氨基酸 7.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg, 酵母膏 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.5, 加 2% 的琼脂。

1.2 实验方法

1.2.1 Plackett-Burman 设计^[5] 选取不同的

收稿日期: 2001-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(69907006)

作者简介: 郭爱莲(1945-), 女, 山东日照人, 西北大学教授, 从事微生物学研究。

NaCl、酵母膏、酪蛋白氨基酸、柠檬酸钠等 11 个因素采用 $N=16$ 的 Plackett-Burman 设计表进行实验。

1.2.2 正交试验设计^[6] 根据经验知,NaCl、柠檬酸钠、酪蛋白氨基酸和甘油 4 个因素间交互作用极小,故选用 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验。

1.2.3 培养方法 将菌种接入液体种子培养基,38℃,振荡培养 120 h,以 10% 的接种量接入各三角瓶。每种设计中的各次实验均同步进行。培养 6 d,用 721 型分光光度计测量 OD_{660} 值。

2 结果与讨论

2.1 盐生盐杆菌 B 的生长特点和评价指标

盐生盐杆菌在光照的条件下,利用光能生长紫膜,并通过 BR 光驱动质子泵作用产生膜两侧电化学势能来维持其生命活动。Oesterhet^[7] 等人认为,盐生盐杆菌的紫膜是在对数生长后期、给以光照的条件下形成的。菌体数量的多少可通过测量菌液的 OD_{660} 值的大小来确定。因而,如果能在到达对数生

长期时增大菌体数量,则能收获大量紫膜。所以,可以通过测量菌体数量来间接预测紫膜产量。

2.2 Plackett-Burman 设计初选生长重要因素

1) 选用 $N=16$ 的 Plackett-Burman 设计对 11 个因素进行研究,另外剩余的 4 个因素(对于 N 次实验设计最多可以研究 $N-1$ 个因素)为空项,作为误差分析项。每个因素取两个水平:低水平“—”,常为出发培养基组成及原始培养条件;高水平“+”,依据经验选取,一般不超过低水平的 2 倍。实验结果见表 1。各因素所代表的参数、水平及结果分析见表 2。结果分析参照文献[5]的方法。

2) 由表 2 的结果分析可知,可信度大于 80% 的因素为影响盐生盐杆菌 B 生长的重要因素。它们分别是 NaCl、柠檬酸钠、酪蛋白氨基酸、甘油和摇瓶转速。其他小于 80% 的因素不是重要因素,其水平取低水平,不做进一步的研究。在这 5 个重要因素中,NaCl、酪蛋白氨基酸和柠檬酸钠均以低水平为好,而甘油和摇瓶转速则以高水平为好,摇瓶转速取 180 r/min。

表 1 Plackett-Burman($N=16$)设计表和实验结果

Tab. 1 Plackett-Burman Design ($N=16$) and Results

实验号	A	B	C	D	E	F	(G)	(H)	I	J	K	L	M	(N)	(O)	评价指标(OD_{660})
1	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	0.050
2	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	0.025
3	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	0.039
4	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	0.214
5	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	0.360
6	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	0.345
7	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	0.367
8	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	0.054
9	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	0.384
10	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	0.430
11	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	0.522
12	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	0.035
13	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	0.046
14	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	0.034
15	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	0.396
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.045

2.3 正交试验设计结果及其分析^[6]

1) 对于 Plackett-Burman 设计筛选的 5 个重要因素中,除摇瓶转速取 180 r/min 而不做进一步的研究外,另外的 4 个重要因素,根据经验知,各因素间的交互作用极小,故采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行研究。

表头设计及实验结果见表 3。由表 3 的计算结果可看出:各因素的最优水平为 NaCl 200 g/L,柠檬酸钠 2 g/L,酪蛋白氨基酸 5 g/L,甘油 10 g/L。由此,初步确定最优组合为: $A_2B_3C_2D_3$ 。

表 2 因素、水平及其影响效果
Tab. 2 Factors, Levels and Results

代 码	因 素 参 数	水 平		效 果 (+)-(-)	相对重要性 <i>t</i> 检验
		高(+)	低(-)		
A	NaCl	230 g/L	250 g/L	-0.131 7	2.390 2 90%
B	MgSO ₄ · 7H ₂ O	20 g/L	25 g/L	0.035 0	0.635 2
C	酵母膏	10 g/L	15 g/L	0.047 0	0.853 0
D	KCl	2.0 g/L	3 g/L	-0.004 7	0.085 3
E	柠檬酸钠	3.0 g/L	3.5 g/L	-0.127 3	2.310 3 90%
F	酪蛋白氨基酸	7.5 g/L	10 g/L	-0.091 5	1.660 6 80%
(G)	空 项	0.041 2	
(H)	空 项	0.041 7	
I	甘 油	0 g/L	2 g/L	0.105 8	1.920 2 80%
J	蛋白胨	0 g/L	5 g/L	0.016 5	0.299 5
K	蔗 糖	0 g/L	10 g/L	0.026 0	0.471 9
L	pH	6.5	7.2	0.002 5	0.062 5
M	摇瓶转速	90 r/min	180 r/min	0.237 5	4.310 3 98%
(N)	空 项	0.080 0	
(O)	空 项	0.048 0	

表 3 L₉(3⁴)正交表与实验结果
Tab. 3 Orthogonal Table of L₉(3⁴) and Results

实验号	A	B	C	D	评价指标 (OD ₆₆₀)
	NaCl	柠檬酸钠	酪蛋白氨基酸	甘 油	
1	1(170 g/L)	1(2.5 g/L)	1(2.5 g/L)	1(5.0 g/L)	0.489
2	1(170 g/L)	2(3.0 g/L)	2(5.0 g/L)	2(7.5 g/L)	0.598
3	1(170 g/L)	3(2.0 g/L)	3(7.5 g/L)	3(10 g/L)	0.723
4	2(200 g/L)	1(2.5 g/L)	2(5.0 g/L)	3(10 g/L)	0.846
5	2(200 g/L)	2(3.0 g/L)	3(7.5 g/L)	1(5.0 g/L)	0.645
6	2(200 g/L)	3(2.0 g/L)	1(2.5 g/L)	2(7.5 g/L)	0.628
7	3(230 g/L)	1(2.5 g/L)	3(7.5 g/L)	2(7.5 g/L)	0.558
8	3(230 g/L)	2(3.0 g/L)	1(2.5 g/L)	3(10 g/L)	0.640
9	3(230 g/L)	3(2.0 g/L)	2(5.0 g/L)	1(5.0 g/L)	0.612
K1	1.810	1.893	1.757	1.746	
K2	2.119	1.883	2.056	1.784	T=5.739
K3	1.810	1.963	1.926	2.209	
R	0.309	0.080	0.299	0.463	

注:K1, K2, K3 分别是各水平的和, R 为极差, T 为评价指标的总和。

2) 方差分析。由表 4 可看出, 因素 D(甘油)对盐生盐杆菌 B 菌体生长的影响极其显著, 因素 A(NaCl), C(酪蛋白氨基酸)对盐生盐杆菌 B 菌体生长影响显著, 而因素 B(柠檬酸钠)对盐生盐杆菌 B 菌体生长影响不显著。因而, 在实验中应考虑甘油、NaCl 和酪蛋白氨基酸等对盐生盐杆菌 B 菌体生长的影响。

2.4 培养基的优化组合

结合 Plackett-Burman 设计的结果分析和正交实验设计的结果分析知, 盐生盐杆菌 B 的最优培养条件为: MgSO₄ · 7H₂O 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, KCl 2.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 50 mg/L, NaCl 200 g/L, 柠檬酸钠 2 g/L, 酪蛋白氨基酸 5 g/L, 甘油 10 g/L, pH 值 6.5, 温度为 38℃, 摇瓶转速 180 r/min, 光照

培养。

2.5 优化组合结果的验证

将正交实验设计法筛选出的最优组合 $A_2B_3C_2D_3$, 正交实验设计中相对最好组合 $A_2B_1C_2D_3$

和出发培养基做平行实验。接种量 10%, 在 38℃, 180 r/min, 光照条件下培养 6 d, 分别测量 OD_{660} , 结果分别是 0.90, 0.87 和 0.67。该结果表明, $A_2B_3C_2D_3$ 为最优组合。

表 4 正交试验方差分析表

Tab. 4 Variance analysis table of orthogonal test

变异来源	df	SS	MS	Fa	$F_{0.1}$	$F_{0.05}$
A(NaCl)	2	0.021 2	0.010 6	17.677*	$F_{0.05(2,2)}=19$	
C(酪蛋白氨基酸)	2	0.015 0	0.007 5	12.500*	$F_{0.1(2,2)}=9$	
D(甘油)	2	0.044 0	0.022 0	36.667**		
e(误差)	2	0.001 2	0.000 6			
总和	2	0.081 4				

注: (1) 在计算过程中, 由于 B 因素(柠檬酸钠)的极差($R=0.080$)、均方差($MS=0.000 6$)值相对于因素 A(NaCl), C(酪蛋白氨基酸)和 D(甘油)的极差、均方差很小, 故对 B 不做方差分析; (2) 本实验采用除效应很大的因素 A, C, D 值以外的部分作为误差项, 所以对误差估计便大, 故采用 10% 和 5% 两个显著水平, 判别标准为: $Fa > F_{0.05}$, 因素影响特别显著, 记为 **; $F_{0.10} < Fa < F_{0.05}$, 因素影响显著, 记为 *; $Fa < F_{0.10}$, 影响不显著。

3 小 结

本实验首先采用 Plackett-Burman 设计从影响盐生盐杆菌 B 菌体生长的 11 个因素中快速初选出重要因素, 舍弃了次要因素, 然后利用正交试验设计进一步确定和优化了这些重要因素, 获得满意的效果, 为该菌的进一步研究打下了基础。

参考文献:

- [1] WILLIAMS K R. Comparing screening designs [J]. Ind Eng Chm, 1963, 55: 29-32.
 [2] STOECKENIUS W, BOGMOLNI R A. Bacteriorhodopsin and related pigments of Halobacteria [J].

Annu Rev Biochem, 1982, 52: 587-616.

- [3] 高修功, 王超, 章克昌. 数学统计法快速优化假单胞菌脂肪酶发酵条件 [J]. 微生物学通报, 1998, 25(2): 94-97.
 [4] GOCHNAUER M B, KUSHNER D J. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria [J]. Can J Microbiol, 1969, 15(10): 1 157-1 165.
 [5] STOW R A, MAYER R P. Efficient screening of process variables [J]. Ind Eng Chem, 1966, 58 (2): 36-40.
 [6] 李春喜, 王文材. 生物统计学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 198-204.
 [7] OESTERHELT D, STOCKENIUS W. Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fraction into red and purple [J]. Meths Enzymol, 1974, 31: 667-678.

(编辑 徐象平)

A study of optimizing culture condition of *Halobacterium halobium* B

GUO Ai-lian¹, XU Jin-gui¹, HOU Xun², CHEN Feng²

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Xi'an Insitute of Optics and Precision Mechanics, Academy Sinica, Xi'an 710068, China)

Abstract: The important fators which affect culture conditions of *Halobacterium halobium* B were screened by Plackett-Burman design. Then by using orthogonal test, these important factors were optimized. Results showed that the best culture conditions of *Halobacterium halobium* B were $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g/L; Yeast extract, 10 g/L; KCl, 2.5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg/L; NaCl, 200 g/L; tyigodium citrate, 2 g/L; casamino acid, 5 g/L; glycerol, 10 g/L; pH, 6.5; temperature, 38℃; shake speed, 180 r/min and illumination.

Key words: Plackett-Burmam design; orthogonal test; optimize; *Halobacterium halobium* B; culture condition