

正交设计在柠檬酸发酵研究中的应用

广州食品厂 涂桂洪 何翠琼*

毛主席关于以阶级斗争为纲把国民经济搞上去的指示，鼓舞着我们厂广大工人、干部和工程技术人员，在现有的设备条件下，大干技术革命和技术革新，充分挖掘企业潜力，进一步提高柠檬酸的产量。

根据正交设计的原理和方法，对浅盘发酵添加液中影响柠檬酸产量的C、N、P诸因素进行了研究，并优选出一个较适合的工艺条件。结果表明，这种新工艺的柠檬酸产量比旧工艺提高了近30%，简化了培养基配方，节约了生产原料。

试验过程及试验结果的分析

一、试验材料 试验在底部面积为63.5Cm²的中性玻璃瓶中进行，使用东莞糖厂的甘蔗糖蜜作培养基中的C源，该糖蜜含糖51%、总氮为0.7%，配制培养基均用化学纯试剂。

二、试验过程及结果 取试验菌种接种于盛有60ml内含C4.5%，KH₂PO₄ 0.01%，NH₄NO₃ 0.2%和PH为6.0培养液的玻璃瓶中(为防止酵母感染另加CuSO₄ 50r/ml)，30°C静置培养24~28小时，待菌膜形成后慢慢加入200ml添加液，30°C继续培养7天。发酵结束后，测定柠檬酸总量。

实践证明，添加液的组成和对比对黑曲霉(*Asp.niger*)积累柠檬酸起着重要的作用。今根据正交设计的方法对添加液中的几个组分进行优选，同时对黑曲霉川柠1—2及以此为出发菌株经自然分离和氮氛处理而得的NS66、NM47等五株菌种进行综合比较试验。所取因素及水平如表1。

实验中忽略各因素间交互作用。根据所取因素及水平，选用L25(5⁴)正交表安排了25组试验，各组重复一次。试验结果列于表2。为便于计算，将总酸的实测值乘以 $\frac{1}{10}$ ，取小数点后第一位，小数点后第二位四舍五入，得简化值。以后用简化值参与各项运算。

*張木炎、梁艳华及种子室、化驗室的同志曾协助工作。

表 1 正交试验的因素及水平排列*

水 因 素 平	列号	A	B	C	D	E	F
	因素	菌种	糖%	NH ₄ NO ₃ %	KH ₂ PO ₄ %	CuSO ₄ r/ml	CaCO ₃ %
1	NS66	18	0.3	0.4	120	0	
2	NM47	15	0.6	0.2	60	0.9	
3	NM5	27	0.9	0.3	30	0.6	
4	NM113	21	1.2	0	0	1.2	
5	川樟 ₁₋₂	24	0	0.1	90	0.3	

*各因素的水平随机排列

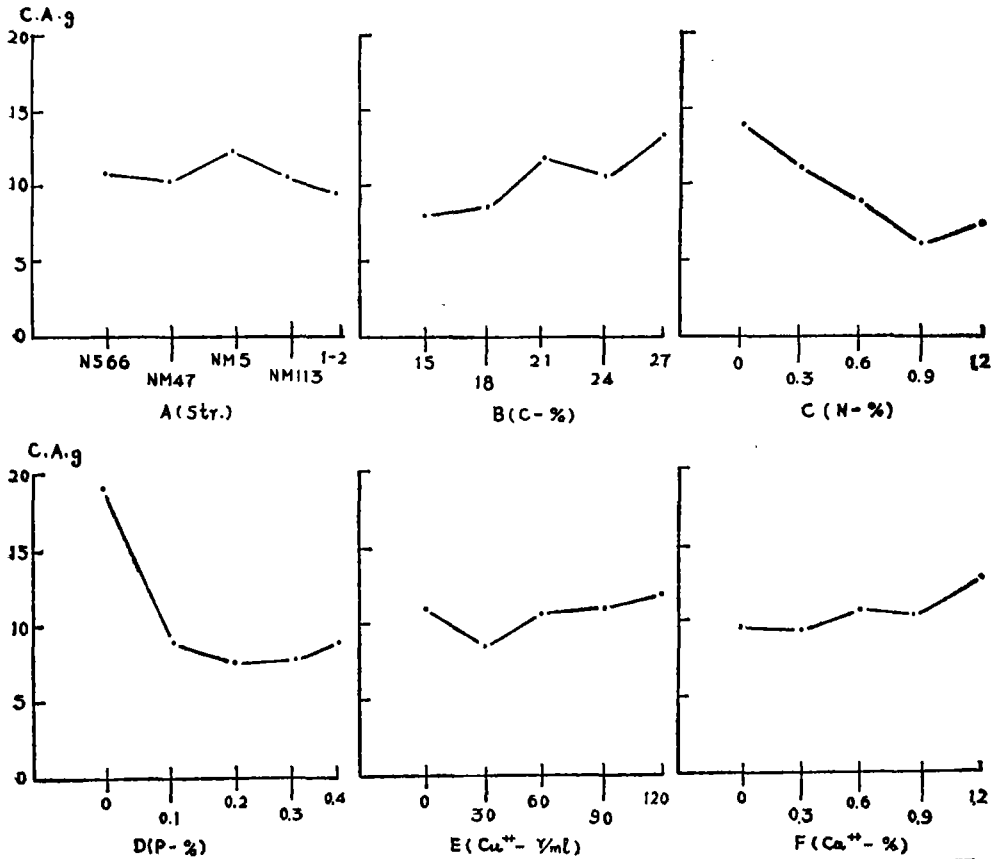


图 1 各因素对柠檬酸产量的影响

三、试验结果的分析 本实验是从提高柠檬酸产量的角度出发而进行的，因而在对实验结果进行分析时，把柠檬酸量作为考察的主要技术指标。

以该因素相应水平二次试验的平均产酸为纵座标、因素水平为横座标，在座标纸上作成图象，如图 1 所示。

从图 1 即可大致看出各因素对柠檬酸产量的影响。为了给出这种影响的显著性水平而作进一步的分析。

表 2 试验结果(柠檬酸总量, g)

試驗号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
結果													
实	1	8.35	3.76	4.78	21.06	16.14	3.3	12.0	8.77	18.08	9.16	6.54	21.0
测	2	7.35	3.64	3.90	20.86	17.44	3.32	10.7	8.77	18.08	8.18	6.48	20.4
值	Σ	15.7	7.4	8.58	41.92	33.58	6.62	22.7	17.54	39.16	17.34	13.02	41.4
簡	1	0.8	0.4	0.5	2.1	1.6	0.3	1.2	0.9	1.8	0.9	0.7	2.1
化	2	0.7	0.4	0.4	2.1	1.7	0.3	1.0	0.9	1.8	0.8	0.7	2.0
值	Σ	1.5	0.8	0.9	4.2	3.3	0.6	2.2	1.8	3.6	1.7	1.4	4.1

試驗号	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
結果													
实	1	12.17	21.28	3.24	17.36	20.84	6.15	4.35	21.22	6.16	11.06	3.32	2.5
测	2	11.52	20.68	3.08	17.05	22.54	5.38	5.06	23.12	6.53	11.36	3.1	2.4
值	Σ	23.69	41.96	6.32	34.42	43.38	11.53	9.41	44.34	12.69	22.42	6.42	4.9
簡	1	1.2	2.1	0.3	1.7	2.1	0.6	0.4	2.1	0.6	1.1	0.3	0.3
化	2	1.2	2.1	0.3	1.7	2.3	0.5	0.5	2.3	0.7	1.1	0.3	0.2
值	Σ	2.4	4.2	0.6	3.4	4.4	1.1	0.9	4.4	1.3	2.2	0.6	0.5

根据

$$s_i = \frac{1}{a^2} \sum_{t=1}^a k_t^2 - \frac{1}{nc} \left(\sum_{t=1}^n X_t^2 \right)$$

式中, s_i 为该列号的平方和 a 为因素水平数, 本实验 $a=5$ c 为重复试验数, 本实验 $c=2$ n 为试验号数, 本实验 $n=25$ 。

容易算出各列的平方和, 误差项之平方和(s_e)由下式给出,

$$s_e = \sum_{j=1}^a \sum_{t=1}^n x_{jt}^2 - \sum_{t=1}^n s_t$$

将计算结果列成方差分析表, 见表 3。

表 3 方差分析表*

方差来源	平方和	自由度	方差	F值	显著性
B	2.1	4	0.525	0.34	
C	10.2	4	2.55	1.65	△
D	10.0	4	2.5	1.62	△
A	0.7	4	1.54		
E	0.6	4			
F	0.9	4			
误差	54.93	25			
总和	79.43	49			

*有关平方和、自由度、方差等计算参考中国科学院数学研究所,《常用数理统计方法》。
本实验 A、E、F 三因素之平方和显著地小, 与误差项合并求方差。

分析结果表明,

1、本实验所考察的六个因素中, N与P在所取水平范围内, 对于柠檬酸生成的影响是显著的, C次之。方差分析的结果指出, 这种判断有80%以上的把握;

2、五株菌种的产酸水平相差无几, 以NM5为高;

3、 CuSO_4 、 CaCO_3 在所取水平范围内对柠檬酸的生成没有明显的影响。

综合上述分析, 对于柠檬酸生产的最佳条件应是: 菌株 NM5, C27%, CuSO_4 120r/ml, 不需添加任何营养盐。

四、分析结果的验证 为了证实上述结果, 将新、旧工艺对照各做十个试验, 结果列于表 4。

表4. 新旧工艺比较试验结果*

工 艺	試驗号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ
	总酸 g											
新工艺		21.6	21.7	21.3	22.8	22.0	22.8	22.2	21.8	23.2	22.8	222.2
旧工艺		17.3	18.25	18.35	16.4	17.7	15.1	18.5	17.5	16.9	16.0	172.0

*新工艺: NM5, C27%, CuSO₄120r/ml

旧工艺: 川榨1-2, C18%, NH₄NO₃0.1%, CuSO₄50r/ml

表中的结果指出, 新工艺明显优于旧工艺, 其柠檬酸产量比旧工艺提高了近30%, 同时简化了培养基、节省了生产原料。

简 要 结 论

1. 正交设计是进行科学实验的一个好方法, 它同样适用于柠檬酸的发酵研究。特别是对于一个经诱变处理而发生变异的新菌株, 需要重新考察其生理特性和营养要求时, 采用正交设计方法可大大减少试验次数、缩短实验时间, 结论也比较可靠。本实验为把数理统计方法的普遍原理运用在柠檬酸发酵研究的具体实践中提供了一个成功的例子。

2. 对浅盘发酵添加液进行的正交试验结果表明: i) 在本实验所考察的诸因素中, N与P是影响柠檬酸产量的重要因素。由于无机氮源(NH₄NO₃)的增加, 柠檬酸产量成直线下降; 当P的加入量为0.1%时可使柠檬酸减产50%以上。ii) 糖在一定范围内随着其浓度的增加柠檬酸的产量也增加。考虑到发酵液中的残糖可回收再利用, 适当地提高添加液中的糖浓度对于增加柠檬酸的产量是有益的。iii) 为更有效地防止发酵过程中酵母的感染, CuSO₄用量可增加至120r/ml, 对柠檬酸的生成没有抑制作用。

3. 生产柠檬酸的最适工艺条件是: 菌株NM5, C27%, CuSO₄120r/ml, 不需添加任何营养盐。这种新工艺, 其柠檬酸产量比旧工艺提高了近30%。