

利用 SAS 软件优化 L-乳酸发酵培养基

徐子钧¹ 李 剑¹ 梁凤来¹ 马建芳² 刘如林^{1*}

(南开大学生命科学学院 天津 300071)¹ (天津南开戈德集团 天津 300071)²

摘要: 利用 SAS 软件中二水平设计和响应面分析法较系统地研究了乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) M7 发酵培养基, 得到了在一定条件下乳酸产量随牛肉膏、柠檬酸二铵、吐温 80 含量的变化规律, 并根据分析结果优化了发酵培养基, 简化了基本配方, 产量可提高 15%。

关键词: SAS, Plackett-Burman 设计法, 响应面分析, 培养基优化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0085-03

SAS Application in Studies on Medium Optimization of Lactic Acid Fermentation

XU Zi-Jun¹ LI Jian¹ LIANG Feng-Lai¹ MA Jian-Fang² Liu Ru-Lin^{1*}

(College of life sciences, Tianjin 300071)¹ (Tianjin Nankai Guard Co., Ltd, Tianjin 300071)²

Abstract: The optimum medium for *Lactobacillus* M7 was systematically studied with SAS system. Firstly, the prime factors affecting lactic acid yield were selected by means of Plackett-Burman design; secondly, the prime factors were optimized by response surface analysis. Under the optimum level determined, the yield is increased by 15%.

Key words: SAS, Plackett-Burman design, Response surface analysis, Culture medium optimization

对发酵培养基优化是多因素多水平实验设计, 单靠正交试验或均匀设计难以得到好的培养基配方^[1]。SAS (Statistical Analysis System) 软件是包括数据的统计分析、运筹问题的科学计算等大量模块的集成软件系统。二水平设计的“Plackett-Burman 设计”可通过正交设计以最小的实验次数来考察 2~47 个因素。响应面分析通常是建立一个包括各因素的一次项、平方项和任何两个因素之间的一级交互作用项的数学模型。两种设计的先后应用, 既经济省力, 优化效率又高, 且处理数据由计算机完成。数据中隐含的规律用立体图直观表示出来, 并用数学模型描述, 从而揭示深层次的规律^[2]。本文采用该方法对 L-乳酸发酵培养基进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 菌种

Lactobacillus sp. M₇ 为复合诱变后筛选的 L-乳酸高产菌株, 本实验室保藏。

1.2 基础培养基

MRS 培养基, 参见文献[3]。

1.3 乳酸发酵与检测

将乳酸菌从斜面上挑取 1 环接种于 50mLMRS 种子培养基中, 37℃ 静置培养 24h 后以 10% 接种量接种于含有相当于 1/2 糖含量 CaCO₃ 的发酵培养基中, 37℃ 静置培养 72h。

发酵液中葡萄糖和 L (+) -乳酸含量用 SBA-40C 酶膜生物传感分析仪测定。

* 联系人 E-mail: meor@eyou.com Tel: (022) 23505967

收稿日期: 2003-08-28, 修回日期: 2003-10-20

1.4 培养基优化^[2]

用 SAS 软件中二水平设计筛选重要影响因素，再用响应面分析法对重要因素的水平进行优化。

1.4.1 二水平设计：选 10 个因素、试验次数为 24 的 Plackett-Burman 设计，可考察各因素的主效应和交互作用的一级作用。

1.4.2 响应面分析：根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理，由二水平设计确定的 3 因素各取 3 水平。设计了 3 因素 3 水平共 15 个试验点的响应面分析。

2 结果与讨论

2.1 二水平设计

用 SAS 软件的二水平设计分析各因素的主效应，即其他因素不变时，某单个因素的变化对响应值的影响。实验结果表明牛肉膏、柠檬酸二铵、吐温 80 对 *Lactobacillus* M7 产酸有显著影响。因此，利用响应面分析对牛肉膏、柠檬酸二铵、吐温 80 3 个培养基组分进行更深入研究。

2.2 响应面分析

2.2.1 实验设计与结果：二水平设计试验确定了 3 因素，即牛肉膏 (x1)、柠檬酸二铵 (x2)、吐温 80 (x3)。根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理，3 因素各取 3 水平，设计了 3 因素 3 水平共 15 个试验点的响应面分析实验，在中心值重复 3 次实验。所得数据分析见表 1，可见一次项对 y 有显著影响，交叉乘积项有一定影响^[4]；失拟项的 $p = 0.02683$ ，没有显著性意义，数据中没有异常点，不需要引入更高次数的项，模型恰当。

表 1 回归方程的方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 偏差平方和 | 平均偏差平方和 | F 值 | 大于 F 值的概率 |
|------------|-----|----------|----------|----------|-----------|
| X1 | 1 | 6.66125 | 6.66125 | 22.44104 | 0.005163 |
| X2 | 1 | 7.80125 | 7.80125 | 26.28158 | 0.003687 |
| X3 | 1 | 0.005 | 0.005 | 0.016844 | 0.901795 |
| X1 * x1 | 1 | 0.65391 | 0.65391 | 2.202654 | 0.197868 |
| X1 * x2 | 1 | 2.4025 | 2.4025 | 8.093768 | 0.036039 |
| X1 * x3 | 1 | 1.69 | 1.69 | 5.693431 | 0.06269 |
| X2 * x2 | 1 | 0.507756 | 0.207756 | 1.710577 | 0.247811 |
| X2 * x3 | 1 | 0.04 | 0.04 | 0.134756 | 0.728576 |
| X2 * x3 | 1 | 1.787756 | 1.787756 | 6.022762 | 0.057643 |
| Model (模型) | 9 | 21.20517 | 2.35613 | 7.937551 | 0.017256 |
| 一次项 | 3 | 14.4675 | 4.8225 | 16.24649 | 0.005197 |
| 平方项 | 3 | 2.605167 | 0.868389 | 2.92551 | 0.138954 |
| 交叉乘积项 | 3 | 4.1325 | 1.3775 | 4.640651 | 0.065821 |
| 误差 | 5 | 1.484167 | 0.296833 | | |
| 失拟项 | 3 | 1.4575 | 0.485833 | 36.4375 | 0.02683 |
| 纯误差 | 2 | 0.026667 | 0.013333 | | |
| 所有项 | 14 | 22.68933 | | | |

2.2.2 建立二次响应面回归模型：模型的可信度分析见表 2。

回归方程为： $Y = 4.406019 + 2.92037 * X1 + 0.5375 * X2 + 26 * X3 - 0.748148 * X1 * X1 + 1.033333 * X1 * X2 - 8.666667 * X1 * X3 - 0.370833 * X2 * X2 - 1 * X2 * X3 - 69.58333 * X3 * X3$ 。模型可信度分析见表 2，其中复相关系数的平方 $R^2 = 0.9346$ ，说明由

这3个因素及其二次项能解释 y 变化的 93.46%，模型拟合程度很好^[4,5]。

2.2.3 响应因子水平的优化：由图1的响应面立体图可看出 X_1 、 X_2 和 X_3 存在极值点，对 y 进行岭分析， y 取最大值时各因素的优化水平如表3。分析可知，3个因素的最优实验点 (X_1 , X_2 , X_3) 代

码值 (0.68815, 0.70443, -0.17389)，即 (1.766%，0.341%，0.0826%)，此时 Y 取最大值 10.4472%。软件中还提供数字形式的优化，可对响应因子的水平优化得到各组合，并预测各组合下的响应值 Y 。分析后从中选择一组，结果见表4。

表2 模型可信度分析

| | |
|-----------------------|----------|
| Mena (均值) | 8.273333 |
| R-square (复相关系数的平方) | 0.9346 |
| Adj. R-square (复相关系数) | 0.8168 |
| RMSE (模型误差的平方根) | 0.544824 |
| CV (变异系数) | 6.585304 |

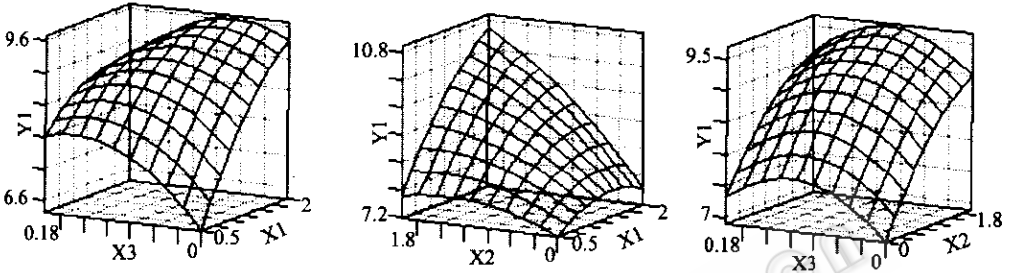


图1 响应面分析的立体图

表3 响应面的岭分析

| 估计响应值 | 标准误差 | 因变量 | 岭类型 | 临界值 X 的代码值 | | |
|---------|---------|-----|---------|------------|---------|---------|
| | | | | X1 | X2 | X3 |
| 10.4472 | 0.31286 | Y | Maximum | 0.68815 | 0.70443 | -0.1738 |

表4 影响因子的优点

| 影响因子 | X1 | X2 | X3 |
|------|---------|---------|------|
| 设定值 | 1.6067% | 0.1963% | 0.1% |

预料响应值： $Y = 10.3675\%$ ，其期望值为 87.25%。与上述设计的培养基配方相比，更加经济，且乳酸产量处于同一水平，所以最终确定为 M，菌株的发酵培养基配方。由此可得到最优配方：含有 120 g/L 葡萄糖的玉米糖化液中加入牛肉膏 1.6067 g/L，柠檬酸二铵 1.936 g/L，吐温 0.1%，与基本配方相比，大大简化了成分和提高了产量 (表5) 平均产酸水平可达 9.7%，比原配方产量提高 15%。

表5 最优培养条件下乳酸菌 M₁ 发酵乳酸的产量

| 批次 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------|-----|------|------|------|
| MRS 培养基 (g/L) | 99 | 80 | 78 | 90 |
| 优化培养基 (g/L) | 100 | 94 | 93 | 102 |
| 产酸提高 (%) | 11 | 17.5 | 19.2 | 13.0 |

参考文献

[1] 杨波涛, 渝州大学学报 (自然科学版), 2000, 17 (1): 14 ~ 19.
 [2] 胡良平. Windows SAS 6.12&8.0 实用统计分析教程. 北京: 军事医学科学出版社, 2001. 563 ~ 588.
 [3] 凌代文, 东秀珠编. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 85 ~ 86.
 [4] 庄绪亮, 张洪勋. 化工冶金, 2000, 21 (1): 93 ~ 97.
 [5] Kari Kyla-nikkilä. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (9): 3835 ~ 3841.