

# 响应面方法在优化微生物培养基中的应用

郝学财<sup>1,2</sup>,余晓斌<sup>1,2</sup>,刘志钰,王蓓

(1.江南大学生物工程学院,无锡 214036 2.工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

**摘要** 多种统计优化方法已被成功地运用于微生物培养基优化工作中,本文根据响应面分析法的基本原理,针对响应面方法的优点、试验设计的方法以及实验数据的处理进行了简述,并结合里氏木霉 RutC-30 发酵生产纤维素酶培养基成分的确定说明了响应面方法的具体应用。

**关键词** SAS; 响应面; 优化; 里氏木霉

## THE APPLICATION OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY IN OPTIMIZATION OF MICROBIAL MEDIA

HAO Xue- cai<sup>1,2</sup>, YU Xiao- bin<sup>1,2</sup>, LIU Zhi- yu, WANG Bei

1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**Abstract** : Statistical methods and optimization techniques have been widely used to determine microbial media. According to the principle of the response surface analysis, the advantages of response surface methodology (RSM), the method of experimental design and data handling are discussed in this paper. The concrete application of RSM was illuminated through the decision of medium ingredients for producing cellulase by *Trichoderma reesei* RutC-30.

**Key words** SAS; response surface; optimization; *Trichoderma reesei*

利用微生物发酵生产各种有用代谢产物,其培养基成分种类繁多,各成分间的相互作用也错综复杂。因而,微生物培养基的优化工作就显得尤为重要,数学统计中的多种优化方法已开始广泛地应用于微生物发酵培养基的优化工作中,其中以响应面方法的效果最为显著。响应面方法(Response Surface Methodology,简称 RSM)是利用合理的试验设计并通过实验得到的一定数据,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法。RSM 在优化研究中应用频繁,是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量、解决生产过程中的实际问题的一种有效方法,它已广泛地应用于农业、生物、食品、化学、制造等领域<sup>[1]</sup>。

## 1 常用的培养基优化设计方法

通常优化发酵培养基的方法是单次单因子法和正交试验设计法。采用单次单因子法时,只是讨论一种因素的影响,由于考察因素间经常存在交互作用,使得该方法并非总能获得最佳的优化条件<sup>[2]</sup>。正交试验设计则注重如何科学合理地安排试验,可同时考虑几种因素,寻找最佳因素水平组合,但它

不能在给出的整个区域上找到因素和响应值之间的一个明确的函数表达式即回归方程,从而无法找到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值。因此,人们期望找到一种试验次数少、周期短,求得的回归方程精度高、能研究几种因素间交互作用的回归分析方法,响应面分析方法则在很大程度上满足了这些要求<sup>[3]</sup>。

## 2 响应面方法的应用实例

利用 SAS 软件来进行培养基的优化具体可以分为 4 个步骤,以下就结合里氏木霉 RutC-30 发酵生产纤维素酶培养基成分的确定来说明响应面方法的具体应用。

### 2.1 确定主要因素

确定要考察的过程中的关键因素,即研究范围内主要影响发酵过程和产品产量的重要因素。如果预先不知道哪些是重要因素,可以通过极差试验或 Plackett-Burman 试验来确定这些因素。为了简单起见,用 RSM 来研究的因素一般为 2~3 个;当然 RSM 也可以研究多变量问题,但其结果比较复杂。在里氏木霉 RutC-30 发酵生产纤维素酶的研究中,通过 Plackett-Burman 试验来确定主要因素。

### 2.1.1 Plackett- Burman 设计法

Plackett- Burman ( PB) 法是一种近饱和的 2 水平试验设计方法。它基于非完全平衡块原理,能用最少试验次数估计出因素的主效应,以从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素供进一步研究。本文根据对里氏木霉 RutC- 30 发酵特性的研究,及以前的研究和文献报道<sup>[5]</sup>,选用实验次数 N = 8 的实验设计,对 Avicel(X1)、玉米浆粉(X2)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(X3)、麸皮(X4)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(X5)、酵母粉(X6)6 个因素进行考察,每个因素分别取两个水平,高水平取低水平的 1.25 倍,响应值为滤纸酶活(Y)。实验设计及实验结果见表 1。

表 1 N = 6 的 Plackett- Burman 实验设计与响应值表

实验号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	酶活 (U/mL)
1	-1	-1	-1	1	1	1	3.87
2	1	-1	-1	-1	-1	1	4.45
3	-1	1	-1	-1	1	-1	3.82
4	1	1	-1	1	-1	-1	5.19
5	-1	-1	1	1	-1	-1	2.73
6	1	-1	1	-1	1	-1	3.98
7	-1	1	1	-1	-1	1	2.24
8	1	1	1	1	1	1	4.52

### 2.1.2 根据 Plackett- Burman 实验结果筛选主要因素

采用 SAS 进行各因素主效应分析结果见表 2。

从表 2 可以看出,6 个因素中对响应值影响的显著性顺序为:Avicel >(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>>麸皮>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>>玉米浆粉>酵母粉。而且 Avicel、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、麸皮、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 这 4 个因素的可信度都在 90 % 以上,另外 2 个因素可信度则低于 90 %。在作响应面实验时,考察因素超过 3 个会使实验次数显著增加(3 个因素做 15 次实验,4 个因素做 27 次实验)。在 4 个因素显著因素中 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的影响相对差一些,因此,把 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及玉米浆粉、酵母粉固定在较好水平上。选择其他 3 个因素进一步做响应面实验。

表 2 各因素的主要效应

因素	(百分含量)	水 平		t 值	Pr >  t	重要性
		-1	1			
X1 Avicel		1	1.25	22.83333	0.027863	1
X2 玉米浆粉	0.6	0.75	3.235294	0.199657	5	
X3 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	0.25	-16.0833	0.039532	2	
X4 麸皮	2	2.5	7.583333	0.083468	3	
X5 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	0.25	6.583333	0.095968	4	
X6 酵母粉	0.06	0.075	-2.66667	0.228401	6	

### 2.2 确定因素水平

响应面拟合方程只在考察的紧接邻域里才充分近似真实情形,在其他区域拟合方程与被近似的函数方程毫无相似之处,几乎无意义。所以,要先逼近最佳值区域后才能建立有效的响应面拟合方程。可以通过做单因素试验或由菌种的特性和发酵工艺来确定因素水平的范围。最陡爬坡法以实验值变化的梯度方向为爬坡方向,根据各因素效应值的大小确定变化步长,能快速、经济地逼近最佳值区域<sup>[6]</sup>。

由 Plackett- Burman 实验可知,在里氏木霉 RutC- 30 产纤维素酶的液体发酵中 Avicel、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、麸皮这 3 个因素对产酶有重要的影响,其中 Avicel 和麸皮有显著正效应,应增加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 有显著负效应,应减小。根据这 3 个因素效应大小的比例设定它们的变化方向及步长进行实验,设计及结果如表 3 所示。可见,最优发酵条件在处理 3 与处理 4 之间,故以处理 3 的条件为响应面实验的中心点。

表 3 最陡爬坡实验设计及其实验结果

实验号	Avicel(%)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	麸皮(%)	酶活(IU/mL)
1	1.2	0.2	2	4.87
2	1.6	0.15	2.5	5.23
3	2	0.1	3	5.62
4	2.4	0.05	3.5	5.54

根据 Plackett- Burman 实验和最陡爬坡实验来确定实验因素与水平,3 因素的水平分别选取 Avicel:1.5 %,2 %,2.5 %;(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:0.05 %,0.1 %,0.15 %;麸皮:2.5 %,3 %,3.5 %,具体如表 4:

表 4 响应面分析试验因素水平表

因 素	水 平		
	-1	0	1
Avicel	1.5 %	2 %	2.5 %
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05 %	0.1 %	0.15 %
麸皮	2.5 %	3 %	3.5 %

### 2.3 确定实验点

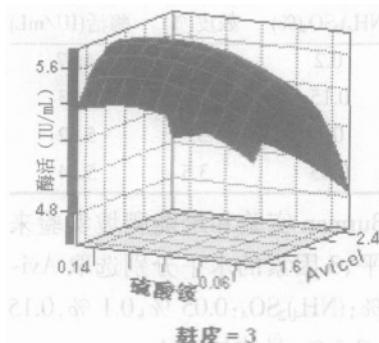
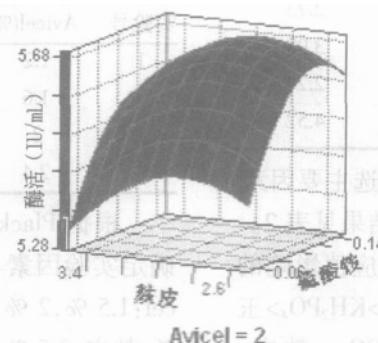
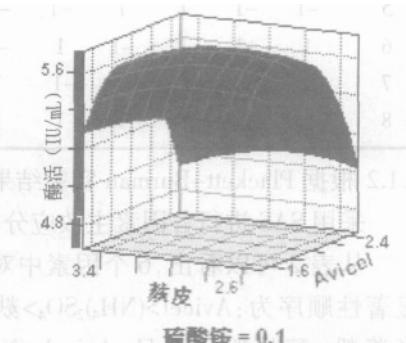
采用适当的试验设计,确定实验的试验点,试验设计强调试验点要尽量减少总的实验次数。试验点确定之后,按随机性原则对每个实验点进行实验,获得一定的数据,以便于进行统计分析。

根据 Box- Behnken 的中心组合实验设计原理,进一步进行三因素三水平的响应面分析实验,15 个实验点给出的实验结果如表 5 所示。15 个实验点可以分为两类,其一是析因点,自变量取值在 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 所构成的三维顶点,共有 12 个析因点;其

二是零点,为区域的中心点,零点试验重复3次,用以估计试验误差。

表 5 实验方案与结果

实验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	酶活(U/mL)
1	-1	-1	0	5.26
2	-1	1	0	5.42
3	1	-1	0	4.57
4	1	1	0	4.70
5	0	-1	-1	5.46
6	0	-1	1	5.21
7	0	1	-1	5.62
8	0	1	1	5.43
9	-1	0	-1	5.19
10	1	0	-1	4.92
11	-1	0	1	5.30
12	1	0	1	4.71
13	0	0	0	5.68
14	0	0	0	5.59
15	0	0	0	5.75

图 1 响应面法(X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>)立体分析图图 2 响应面法(X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>)立体分析图图 3 响应面法(X<sub>1</sub>, X<sub>3</sub>)立体分析图

从表 6 中可以看出,用上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其因变量和自变量之间的线性关系是显著的,决定系数为 96.63 %,说明回归方程的拟合程度很好。

表 6 回归方程偏回归系数的估计值

参数	自由度	参数估	标准误	t 值	大于 t 的概率
x1	1	-0.28375	0.040664	-6.97796	0.00093
x2	1	0.08375	0.040664	2.059573	0.094485
x3	1	-0.0675	0.040664	-1.65995	0.157818
x1*x1	1	-0.542917	0.059855	-9.07046	0.000272
x2*x1	1	-0.0075	0.057507	-0.13042	0.90132
x2*x2	1	-0.142917	0.059855	-2.3877	0.062566
x3*x1	1	-0.08	0.057507	-1.39113	0.222914
x3*x2	1	0.015	0.057507	0.260837	0.804621
x3*x3	1	-0.100417	0.059855	-1.67765	0.154257
Root MSE				0.119713	
R-square				0.9663	

## 2.4 数据分析

用适当的统计分析方法和计算机程序,对实验数据进行分析,由分析得来的结果将用于下一步的过程优化,常用的统计分析软件有 SAS、SPSS 等。本试验以 SAS 为例,来说明 RSM 的用法。

以滤纸酶活为响应值,根据表 5 的试验结果,用 SAS 统计分析软件进行多元回归分析<sup>[7]</sup>,所得的主要分析结果见表 6、表 7。从方差分析表中可以看出,方程一次项、二次项的影响都是显著的,交互项作用影响不显著,故交互项可以省略,也可以看出各具体实验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。经回归拟合后,实验因子对响应值的影响可用回归方程表示为:

$$Y = -5.8275 + 8.119167 * X_1 + 13.10833 * X_2 + 2.275 * X_3 - 2.171667 * X_1 * X_1 - 57.16667 * X_2 * X_2 - 0.401667 * X_3 * X_3$$

根据上述回归方程作出响应面分析图,见图 1~3。

表 7 方差分析表

回归项	自由度	平方和	复相关系数平方	F 值	大于 F 的概率
一次项	3	0.736675	0.4328	17.13	0.0095
平方项	3	0.881446	0.5178	20.50	0.0068
交互项	3	0.026725	0.0157	0.62	0.6373
总回归	9	1.644846	0.9663	12.75	0.0130

## 2.5 寻取最优值

为确定各因素的最佳取值,通常可以有两种方法。其一,根据 Box 的 Complex Algorithm 法拟合方程存在极值的必要条件即  $y$  分别对  $X_1, X_2, X_3$  的偏导为零,对拟合出的二次方程求导,得出方程组,然后解方程组即可。此方法繁琐且解出的结果可能是响应曲面的鞍点,而不一定是最值或最小值。其

# 仿生物嗅觉传感技术在卷烟品牌识别中的应用

骆德汉<sup>1</sup>,谭辉平<sup>2</sup>

(1.广东工业大学信息学院,广州 510643 2.广东轻工职业技术学院,广州 510643)

**摘要** 正品卷烟与假冒品牌卷烟在感观上几乎没什么差别,很难通过肉眼观测或凭人鼻闻嗅来识别。近年发展的仿生物嗅觉传感技术在食品工业的产品分类中获得较好的应用。本文在介绍生物嗅觉传感机理的基础上,概述了仿生物嗅觉传感的基础理论,给出了基于仿生物嗅觉传感技术的气味识别系统(电子鼻)的软硬件结构及设计思想,并探讨了仿生物嗅觉传感技术在香烟品牌识别中的应用。

**关键词** 嗅觉传感,阵列传感器,仿生物嗅觉传感技术,卷烟品牌识别

## APPLICATION OF BIONIC OLFACTORY TECHNOLOGY IN CIGARETTE BRAND IDENTIFICATION

LUO De-han<sup>1</sup>, TAN Hui-ping<sup>2</sup>

(1. School of Information Engineering, University of Guangdong Technology 510643 2. Guangdong Industry Technical College 510643)

**Abstract** : There is little difference between counterfeit and genuine cigarettes and it is almost impossible to identify the fake cigarettes by looking at their shapes or via smelling aroma by human nose. In recent years the Bionic Olfactory Technology was developed and applied to food industry for classification. In this study we present the basic theory and technology of bionic olfactory and their application in the cigarettes brand recognition. The preliminary investigation was to identify four type cigarettes in

二,可以利用 SAS 软件进行岭脊分析<sup>[8]</sup>,只需使用 ridge max(求最小值是用 ridge min)命令就可以轻松解出,比第一种方法简单的多,所以本作者极力推荐大家用此法。在本例中,通过岭脊分析后,得出回归模型存在最大值点, Y 的最大估计值为 5.69,各因素的取值分别为: Avicel 为 1.87%、硫酸铵为 0.12%、麸皮 2.87%,在以上优化条件下进行验证试验,共进行 5 批次 250mL 摆瓶试验,结果分别为 5.62、5.58、5.75、5.59、5.46,试验平均值为 5.60。证明预测值 5.69 与试验平均值 5.60 是非常接近的。

## 3 总结

现在许多研究工作表明,合理地使用优化方法,尤其是 Plackett-Burman 和响应面分析法,在微生物培养基的优化工作中能取得良好的效果。RSM 是一种有效的统计技术,它是利用实验数据,通过建立数学模型来解决受多种因素影响的最优组合问题。通过对 RSM 的研究表明,研究工作者和产品生产者可以在更广泛的范围内考虑因素的组合,以及对响应值的预测,而均比一次次的单因素分析方法更有效。

RSM 有许多方面的优点,但它仍有一定的局限性。首先,如果将因素水平选的太宽,或选的关键因素不全,将会导致响应面出现吊兜和鞍点。因此事

先必须进行调研,查询和充分的论证;其次,通过回归分析得到的结果只能对该类实验作估计;第三,当回归数据用于预测时,只能在因素所限的范围内进行预测。即使如此, RSM 仍不失为一种研究多因素问题强有力工具。希望通过介绍 RSM 技术,能帮助更多的研究工作者利用 RSM 技术,方便有效地解决工作中的设计与数据处理问题。

## 参 考 文 献 :

- [1] Thompson D R. Response surface experimentation [J]. *Food Proc Pres*, 1982, (6): 155.
- [2] 褚以文.微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件 [J]. *国外医药抗生素分册*, 1999, 20 (2): 58-61.
- [3] 慕运动.响应面方法及其在食品工业中的应用 [J]. *郑州工学院学报*, 2001, 22(3): 91-94.
- [4] 余晓斌,具润漠.里氏木霉液体发酵法生产纤维素酶 [J]. *食品与发酵工业*, 1997, 24 (1): 20-251.
- [5] 余晓斌,具润漠.分批与流加发酵法生产纤维素酶的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 1999, 25 (1): 16-19.
- [6] Montgomery D C. *Design and Analysis of Experiments* (3rd ed.). New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [7] 高惠璇. *SAS/STAT 软件使用手册* [M]. 北京: 中国统计出版社, 1997.
- [8] 吴有炜. *试验设计与数据处理* [M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002.

收稿日期 2005-05-27