

产 Monacolin K 红曲霉筛选及响应面法 优化发酵条件

黄群¹, 麻成金¹, 余佶¹, 王敬敬¹, 高耀富²

(1. 吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000; 2. 湘西自治州边城醋业科技有限责任公司, 湖南 吉首 416003)

摘要: 采用紫外分光光度法初筛、高效液相色谱(HPLC)法复筛, 从湘西原香醋醋醅中筛选产 Monacolin K 红曲霉, 应用 Box-behnken 中心组合试验设计建立数学模型, 进行响应面分析优化发酵条件。结果表明, 初筛获得 7 株具有产 Monacolin K 能力的红曲霉, 复筛选择产 Monacolin K 能力达 157mg/L 的 M3 菌株为优势菌株。响应面分析结果显示, 最优发酵条件为: 初始 pH5.3、发酵温度 25℃、摇瓶转速 112r/min、发酵时间 10.5d, 在此条件下发酵液的 Monacolin K 质量浓度达 354.68mg/L。

关键词: 湘西原香醋; 红曲霉; Monacolin K; 菌株筛选; 发酵条件

Screening of Monacolin K-producing *Monascus* and Fermentation Condition Optimization by Response Surface Methodology

HUANG Qun¹, MA Cheng-jin¹, YU Ji¹, WANG Jing-jing¹, GAO Yao-fu²

(1. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China;

2. Xiangxi Biancheng Vinegar Science and Technology Co. Ltd., Jishou 416003, China)

Abstract: The purpose of this study was to isolate high monacolin K-producing *Monascus* from Xiangxi natural savory vinegar by primary UV spectrophotometric screening and secondary high performance liquid chromatographic (HPLC) screening. The primary screening resulted in 7 *Monascus* strains capable of producing monacolin K, out of which strain M3 with the highest monacolin K-producing ability (achieving a concentration of 157 mg/L in fermentation broth) was isolated through the secondary screening. Further, fermentation conditions optimization for monacolin K production by strain M3 was carried out based on a mathematical model established using Box-Behnken central composite design. The optimal fermentation conditions were found to be: initial pH of 5.3, culture temperature of 25℃, shaking speed of 112 r/min and fermentation time of 10.5 days. Under the optimal fermentation conditions, the yield of monacolin K reached up to 354.68 mg/L.

Key words: Xiangxi natural savory vinegar; *Monascus*; monacolin K; strain screening; fermentation conditions

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0177-06

有 200 多年历史的湘西原香醋为湖南省地方特产, 为调味、保健之佳品, 在湘、鄂、渝、黔四省(市)边区享有盛誉^[1-2]。湘西原香醋芬香浓郁, 醋香、酯香自然和谐, 酸味柔和, 口感醇厚等特有品质取决于其种类丰富、比例协调的风味化合物。传统酿造工艺为自然固态制曲、液态发酵, 参与微生物种类丰富^[3-4], 红曲霉为制曲过程中生长的主要微生物之一, 分泌红曲色素赋予香醋红棕透明的诱人色泽, 同时产生抑菌物质、酶类、胆固醇生物合成抑制剂、麦角固醇等多种代谢产物^[5]。自 20 世纪 70 年代末, 日本 Endo 等^[6]发现了红曲霉代谢产物中的降胆固醇活性物质 Monacolin K 及

其类似物, 有力地促进了红曲霉的研究与应用。目前有关红曲霉发酵生产 Monacolin K 的研究尚处起步阶段, 要进行液态深层发酵规模化生产低桔霉素、高红曲色素或 Monacolin K, 需在优势菌株筛选与发酵工艺优化上取得突破^[7-8]。Monacolin K 能调节血脂、降低血压、抑制胆固醇, 调节人体免疫功能, 甚至抑瘤抗癌, 被认为是目前最佳的血脂调节物^[9-10]。本实验采用紫外分光光度法初筛、高效液相色谱(HPLC)法复筛, 从湘西原香醋固态醋醅中筛选高产 Monacolin K 优势红曲霉菌株, 应用 Box-Behnken 设计、回归分析优化菌株高产 Monacolin K 发酵条件, 为实现湘西原香醋多菌种混合

收稿日期: 2011-06-09

基金项目: 2009 年度湖南科技计划项目(2009CK3047)

作者简介: 黄群(1977—), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: huangqunlaoshi@126.com

制曲、改善产品保健功能等提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

自然制曲 7d 醋醅，采自湘西自治州边城醋业科技有限责任公司制曲车间；玉米粉、大米粉为食用级。

甲醇、乙腈均为色谱纯；99% 乙醇、 KH_2PO_4 、 NaNO_3 、 MgSO_4 、葡萄糖、甘油、蛋白胨均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SPX-250B-Z 型恒温生化培养箱、GZX-9146MBE 型电热恒温鼓风干燥箱 上海博讯实业有限公司；XS-2B-301 型电子显微镜 江南光电集团有限公司；VS-1300-U 型洁净工作台 苏州净化设备厂；Agilent1100 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司。

1.3 培养基

斜面(平板)培养基：大米粉 2%、玉米粉 2%、蛋白胨 1%、 KH_2PO_4 0.25%、琼脂 1.5%，pH6.0。增殖培养基：麦芽膏 1%、氨基青霉素 0.1%，pH3.0。液体种子培养基：大米粉 0.5%、玉米粉 0.5%、甘油 7%、葡萄糖 2%、 KH_2PO_4 0.25%、 NaNO_3 0.5%。液体发酵培养基^[11]：大米粉 0.5%、玉米粉 0.5%、甘油 7%、葡萄糖 2%、 KH_2PO_4 0.25%、 NaNO_3 0.5%、 MgSO_4 0.1%。

1.4 红曲霉分离

挑选 10g 肉眼可见红曲霉的醋醅放入 250mL 三角瓶中，加入约 50mL 无菌生理盐水，振摇 30min，制成菌悬液，取 2mL 菌悬液接种于 30mL 增殖培养基中，25、100r/min 培养 2d。增殖液经适当稀释，涂布分离平板，25 恒温培养 5~6d^[12]。选择早期菌落为白色，后期呈红色、黄色或灰色的霉菌菌落转接斜面培养基。

1.5 红曲霉液体发酵

试管菌种培养：将所筛菌种接种于斜面培养基，25 恒温培养 6d。种子液制备：500mL 三角瓶装液量 200mL，八层纱布包扎，25、100r/min 恒温培养 4d。液体发酵培养：500mL 三角瓶装液量 200mL，八层纱布包扎，25、100r/min 恒温培养 8d。

1.6 发酵液 Monacolin K 定性测定

紫外分光光度法：发酵液经 2000r/min 离心 20min 后，取上清液，以蒸馏水为空白对照，用紫外分光光度计测定吸光度，扫描波长 226~260nm^[12-13]。根据特征吸收峰初筛获得具有产 Monacolin K 能力的菌株。

HPLC 法：色谱柱：Kromasil C_{18} (250mm × 46mm, 5 μm)，检测波长 238nm；进样体积 10 μL ；柱温 35；流动相：V(甲醇):V(水)= 87:13，流速 1mL/min，发酵液经 0.45 μm 微滤膜过滤，测定发酵液 Monacolin K 质量浓度。

1.7 发酵条件优化

以发酵液 Monacolin K 质量浓度为评价指标进行单

因素试验，因素水平设计为：在发酵温度 24、摇瓶转速 80r/min、发酵时间 10d 的条件下，发酵液初始 pH 值设为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5；发酵液初始 pH5.5、摇瓶转速 80r/min、发酵时间 10d 的条件下，发酵温度设为 20、24、28、32、36；发酵液初始 pH5.5、发酵温度 28、发酵时间 10d 的条件下，摇瓶转速设为 40、80、120、160、200r/min；发酵液初始 pH5.5、发酵温度 28、摇瓶转速 120r/min 的条件下，发酵时间设为 6、8、10、12、14、16d。

在单因素试验基础上，应用 Box-Behnken 设计 4 因素 3 水平试验，以发酵液 Monacolin K 含量为指标进行相应面分析优化红曲霉高产 Monacolin K 发酵条件。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

用紫外分光光度法对分离所得 25 株红曲霉进行初筛，结果表明，有 7 株红曲霉的发酵液在 246、237、229nm 处有特征吸收峰，说明具有产 Monacolin K 的能力^[8-9]；其余 18 株没有特征吸收峰，可初步判断这些菌株不产生 Monacolin K。初筛菌株经液体发酵培养进行复筛，HPLC 检测发酵液 Monacolin K 质量浓度，结果如表 2 所示。不同菌株产 Monacolin K 能力差异较大，M3、M4、M7 等 3 株发酵液的 Monacolin K 质量浓度均超过 100mg/L，其中 M3 菌株产 Monacolin K 能力最大，达 157mg/L，故在后续发酵条件优化中选择 M3 为优势菌株。

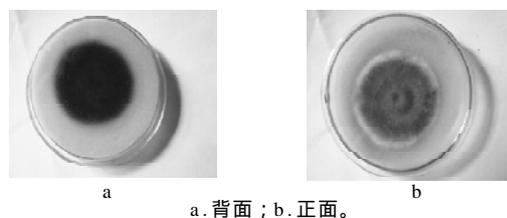
表 1 初筛菌株产 Monacolin K 质量浓度

Table 1 Monacolin K yield from preliminarily screened strains

菌株编号	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
发酵液 Monacolin K 质量浓度/(mg/L)	53	70	157	113	96	46	128

2.2 形态观察

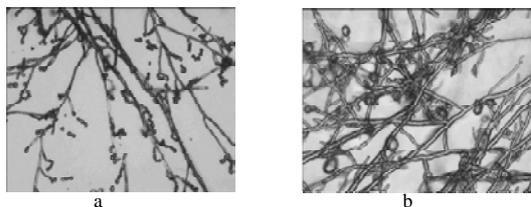
将 M3 菌株接种于平板培养基，25 恒温培养 7d 后，菌落形态如图 1 所示。菌落隆起，初为白色，成熟后正面为白色；背面为红色，无褶皱，无辐射纹，菌落边缘整齐，气生菌丝初白色，成熟后为红色。在光学显微镜下观察菌丝、分生孢子和子囊孢子形态，有横隔，分生孢子链 2~6 个(图 2)。



a. 背面；b. 正面。

图 1 菌株 M3 菌落形态

Fig.1 Colonial photographs of strain M3



a. 菌丝体放大倍数为 400 ; b. 分生孢子放大倍数为 600。

图2 菌株 M3 菌丝体和分生孢子镜检结果

Fig.2 Mycelium and conidiophore of strain M3

2.3 单因素试验结果

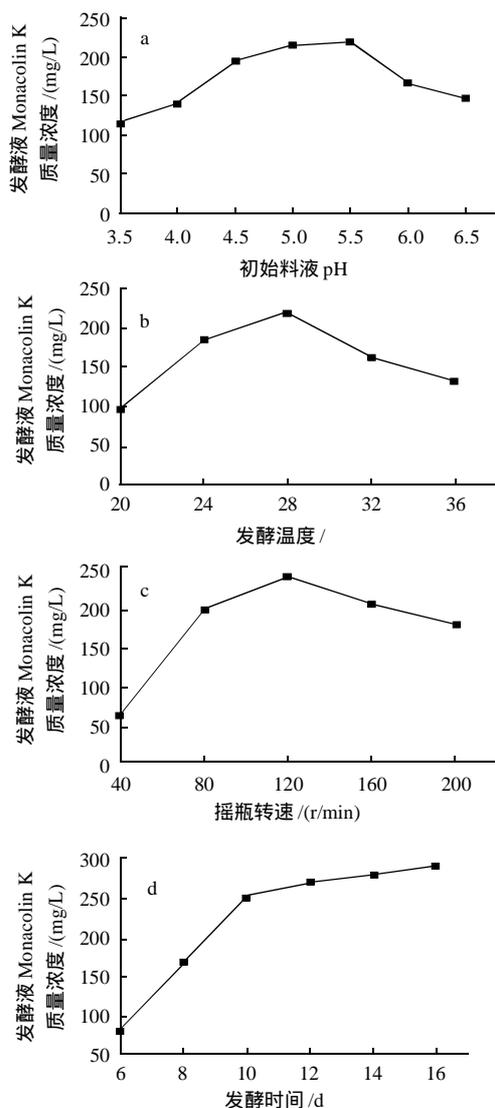


图3 单因素试验对发酵液 Monacolin K 含量的影响

Fig.3 Effect of four fermentation conditions on monacolin K concentration in fermentation broth investigated by one-factor-at-a-time experiments

由图3可知,在偏酸性的初始条件下, Monacolin K 产量相对较高, pH5.5 后逐渐下降。温度对红曲霉产 Monacolin K 较为敏感,在 20 ~ 28 范围内发酵液

Monacolin K 质量浓度随温度升高而逐渐增加,此后反而下降。红曲霉为好气性微生物,保证发酵液中溶解氧、使溶解氧分布均匀是菌体生长繁殖的重要条件,加大摇瓶转速能增加溶解氧含量,但因菌体呈现团块状生长或因机械损伤加大而影响其自由蔓延,导致生长缓慢而产量降低,摇瓶转速以 80 ~ 160r/min 为宜。Monacolin K 属典型的次级代谢产物,发酵液 Monacolin K 质量浓度随发酵时间延长而增加,在 6 ~ 10d 之间迅速增加,后期趋于平缓。

2.4 发酵条件优化

2.4.1 Box-Behnken 试验设计与结果

根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理^[14-15],按方程 $X_i = \frac{x_0 - x_j}{j}$ 进行编码(X_i 表示编码值; x_0 表示试验中心点处自变量真实值; x_j 为自变量真实值; j 表示自变量变化步长), 1、0、-1 分别代表编码值,以 Monacolin K 质量浓度为响应值,试验因素水平设计见表 2,结果见表 3。

表2 Box-Behnken 试验设计因素水平

Table 2 Coded values and corresponding actual values of variables involved in Box-Behnken experimental design

编码值	因素			
	x_1 初始 pH	x_2 发酵温度/°C	x_3 摇瓶转速/(r/min)	x_4 发酵时间/d
1	4.5	24	80	8
0	5.0	28	120	10
-1	5.5	32	160	12

表3 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	Monacolin K 质量浓度/(mg/L)
1	-1	-1	0	0	250.65
2	-1	1	0	0	334.65
3	1	-1	0	0	278.63
4	1	1	0	0	301.94
5	0	0	-1	-1	271.86
6	0	0	-1	1	248.31
7	0	0	1	-1	331.75
8	0	0	1	1	266.29
9	-1	0	0	-1	344.83
10	-1	0	0	1	230.24
11	1	0	0	-1	284.26
12	1	0	0	1	301.74
13	0	-1	-1	0	262.35
14	0	-1	1	0	281.57
15	0	1	-1	0	319.79
16	0	1	1	0	317.13
17	-1	0	-1	0	279.84
18	-1	0	1	0	301.18
19	1	0	-1	0	272.96
20	1	0	1	0	287.36
21	0	-1	0	-1	342.31
22	0	-1	0	1	188.10
23	0	1	0	-1	315.34
24	0	1	0	1	338.35
25	0	0	0	0	336.76
26	0	0	0	0	328.71
27	0	0	0	0	330.52

2.4.2 模型的建立及显著性检验

利用 SAS8.1 软件对表 3 中试验结果进行二次线性回归拟合，得到数学模型：

$$Y_1 = 331.9967 - 1.208333X_1 + 26.96583X_2 + 10.8475X_3 - 26.44333X_4 - 22.10625X_1^2 - 15.1725X_1X_2 - 1.735X_1X_3 + 33.0175X_1X_4 - 14.29X_2^2 - 5.47X_2X_3 + 44.305X_2X_4 - 25.5925X_3^2 - 10.4775X_3X_4 - 22.71875X_4^2.$$

由表 4 可看出，模型极显著($P < 0.0001$)，因变量与自变量之间的线性关系显著($R^2 = 0.9681$)，模型调整复相关系数 $R^2_{Adj} = 0.9308$ ，说明该模型能解释 93.08% 响应值的变化，拟合程度较好，失拟项不显著($P > 0.05$)，说明所得二次回归方程高度显著，能很好地对响应值进行预测^[14]。一次项 X_2 、 X_3 、 X_4 ，二次项及交互项 X_1X_4 、 X_2X_4 表现为极显著，说明它们对响应值影响极大且所考察因素对响应值影响并非简单的一次线性关系。由响应面分析 F 值可知，发酵条件对 Monacolin K 质量浓度影响因素显著性主次顺序为：发酵温度 > 发酵时间 > 摇瓶转速 > 初始 pH 值。

表 4 回归方程统计分析结果

Table 4 Results of statistical regression analysis

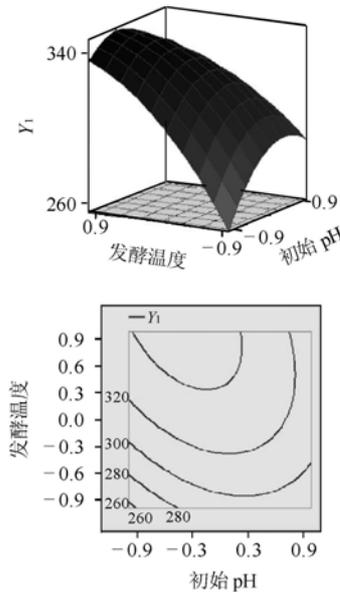
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
模型	37595.34	14	2685.381	25.99094	< 0.0001	**
X_1	17.52083	1	17.52083	0.169579	0.687747	
X_2	8725.874	1	8725.874	84.45494	< 0.0001	**
X_3	1412.019	1	1412.019	13.66648	0.003053	**
X_4	8390.999	1	8390.999	81.21378	< 0.0001	**
X_1X_2	920.819	1	920.819	4.526323	0.054797	
X_1X_3	12.0409	1	12.0409	0.059188	0.811894	
X_1X_4	4360.621	1	4360.621	42.20505	< 0.0001	**
X_2X_3	119.6836	1	119.6836	1.158379	0.302965	
X_2X_4	7851.732	1	7851.732	75.9944	< 0.0001	**
X_3X_4	439.112	1	439.112	4.250024	0.061601	**
X_1^2	2606.327	1	2606.327	25.2258	0.000298	**
X_2^2	1089.089	1	1089.089	10.54094	0.006999	**
X_3^2	3493.206	1	3493.206	33.80962	< 0.0001	**
X_4^2	2752.755	1	2752.755	26.64303	0.000236	**
残差	1239.838575	12	103.319881			
失拟	1204.166508	10	120.416651	6.75	0.1358	
净误差	35.672067	2	17.836033			
总离差	38835.18	26				
相关系数(R^2)	0.9681					
调整复相 关系数 (R^2_{Adj})	0.9308					

注：**，极显著($P < 0.01$)；*，显著($0.01 < P < 0.05$)。

2.4.3 发酵条件的响应面分析与优化

通过 SAS8.1 软件分析得到响应面及等高线图，各个因素交互作用对响应值的影响可以直观的反映出来，其中等高线的形状可反映出交互效应的强弱，椭圆形表

示两因素交互作用显著，圆形则与之相反^[16-17]，具体响应面图形分析结果见图 4~9。

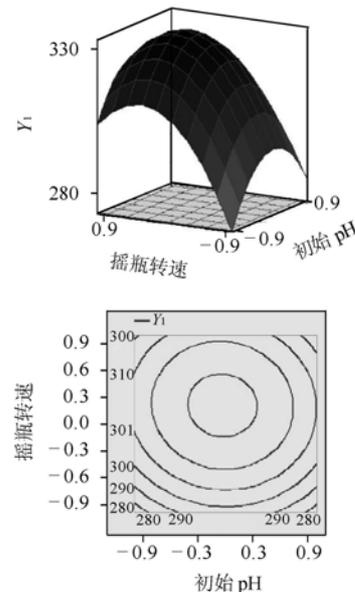


固定水平：摇瓶转速 = 0；发酵时间 = 0。

图 4 $Y_1 = f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线图

Fig.4 Response surface and contour plots for the interactive effects of initial pH and fermentation temperature on monacolin K production

由图 4 可知，固定摇瓶转速、发酵时间条件下；发酵温度设定于某值时，随着初始 pH 值逐渐增大，Monacolin K 质量浓度均呈先增加后减少的趋势，由等高线图中因素轴向等高线变化密集度可知，发酵温度对 Monacolin K 质量浓度影响强于初始 pH 值。

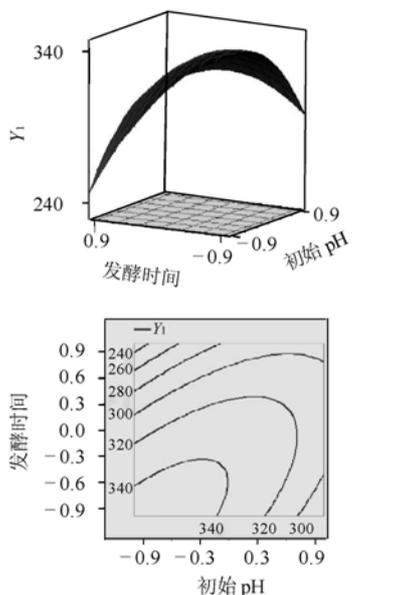


固定水平：发酵温度 = 0；发酵时间 = 0。

图 5 $Y_1 = f(X_1, X_3)$ 的响应面和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots for the interactive effects of initial pH and shaking speed on monacolin K production

由图 5 可知, 固定发酵温度、发酵时间条件下, 摇瓶转速设定于某值时, 随着初始 pH 值逐渐增大, Monacolin K 质量浓度出现先增加后减少的现象, 两因素交互作用出现最高点。由等高线图中等高线图形形状近似圆形可知, 两因素交互作用不显著, 由图形中因素轴向等高线变化密集度可知, 摇瓶转速对 Monacolin K 质量浓度影响强于初始 pH 值。

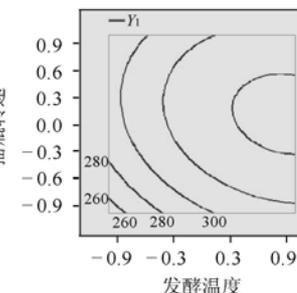
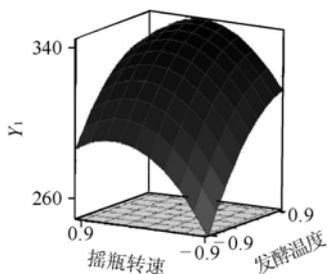


固定水平: 发酵温度=0; 摇瓶转速=0。

图 6 $Y_1 = f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots for the interactive effects of initial pH and fermentation time on monacolin K production

由图 6 可知, 固定发酵温度、摇瓶转速条件下, 当 pH 值较高时, 随着发酵时间的延长, Monacolin K 质量浓度先增加后又逐渐减少; 当发酵时间较短时, 随着 pH 值的逐渐增大 Monacolin K 质量浓度逐渐减少。等高线图表现为椭圆形, 说明两因素交互作用明显, 由等高线图中因素轴向等高线变化密集度可知, 发酵时间对 Monacolin K 质量浓度影响强于初始 pH 值。

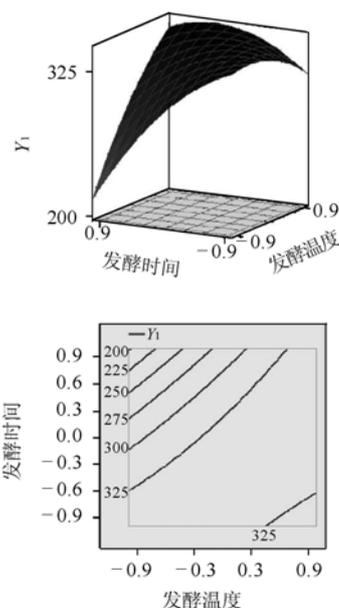


固定水平: 初始 pH=0; 发酵时间=0。

图 7 $Y_1 = f(X_2, X_3)$ 的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots for the interactive effects of fermentation temperature and shaking speed on monacolin K production

由图 7 可知, 固定初始 pH 值、发酵时间条件下, 当发酵温度由高向低逐渐变化时, Monacolin K 质量浓度出现先增加后减少的变化现象, 两因素交互作用出现质量浓度值最高点。由等高线图中等高线形状近似圆形可知, 两因素交互作用不显著, 由图形中因素轴向等高线变化密集度可知, 发酵温度对 Monacolin K 质量浓度影响强于摇瓶转速。

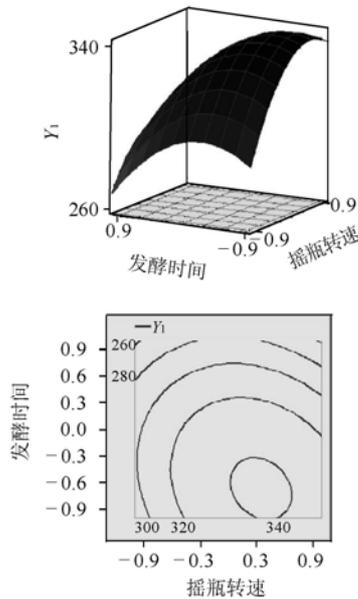


固定水平: 初始 pH=0; 摇瓶转速=0。

图 8 $Y_1 = f(X_2, X_4)$ 的响应面和等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots for the interactive effects of fermentation temperature and fermentation time on monacolin K production

由图 8 可知, 固定初始 pH 值、摇瓶转速条件下, 当发酵温度设定于某温度时, 随着发酵时间逐渐延长, Monacolin K 质量浓度出现先增加后减少的变化现象。由等高线图可知, 发酵温度与发酵时间交互作用显著, 由因素轴向等高线变化密集情况可以得出, 发酵时间对 Monacolin K 质量浓度影响强于发酵温度。



固定水平：初始 pH=0；发酵温度=0。

图9 $Y_1 = f(X_2, X_3)$ 的响应面和等高线图

Fig.9 Response surface and contour plots for the interactive effects of shaking speed and fermentation time on monacolin K production

由图9可知，固定初始pH值、发酵温度条件下，当摇瓶转速由低向高逐渐变化，发酵时间亦由低向高逐渐变化，Monacolin K质量浓度出现先增加后减少的现象，两因素交互作用出现质量浓度值最高点。由等高线图中等高线形状近似圆形可知，两因素交互作用不显著，由图形因素轴向等高线变化密集度可知，发酵时间对Monacolin K质量浓度影响强于摇瓶转速。

为确定最佳点，再对数学回归模型求一阶偏导，得出优化条件： $X_1 = -0.497709$ 、 $X_2 = 0.723951$ 、 $X_3 = 0.210007$ 、 $X_4 = -0.286154$ ，此时 $Y_1 = 346.9807$ 。利用编码公式将上述编码值转变为实际参数为：初始pH 5.24885、发酵温度25.1042℃、摇瓶转速111.6000r/min、发酵时间10.57231d，考虑实际操作性，调整确定优化工艺为：初始pH5.3、发酵温度25℃、摇瓶转速112r/min、发酵时间10.5d。经验证实验，在此条件下发酵液的Monacolin K质量浓度达354.68mg/L。

3 结论

通过紫外分光光度法初筛、高效液相色谱(HPLC)法复筛，从湘西原香醋固态醋醅中筛选产Monacolin K红曲霉，应用Box-behnken中心组合试验设计建立数学模型，进行响应面分析优化发酵条件。分离所得25株红曲霉中7株具有Monacolin K产生能力，复筛表明M3

菌株产Monacolin K能力最大，选择为发酵条件优化的优势菌株。响应面分析法优化M3菌株产Monacolin K发酵条件为：初始pH5.3、发酵温度25℃、摇瓶转速112r/min、发酵时间10.5d，在此条件下发酵液Monacolin K质量浓度达354.68mg/L。在本试验范围内建立的二次线性回归模型准确可靠，试验预测值与实际值拟合较好，可为实现湘西原香醋多菌种混合制曲、改善产品保健功能提供参考，对实现传统酿造工艺现代化有一定实用价值。

参考文献：

- [1] 黄群, 麻成金, 余信, 等. 湘西原香醋香气成分的GC-MS分析[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 260-261.
- [2] 麻成金, 黄群, 余信, 等. 河溪香醋优势糖化黑曲霉筛选及产酶条件的研究[J]. 中国调味品, 2006(3): 17-20.
- [3] 高耀富, 黄群, 余信, 等. 湘西原香醋优势酵母筛选[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 326-328.
- [4] 黄群, 麻成金, 余信, 等. 河溪香醋优势醋酸菌筛选[J]. 中国调味品, 2006(7): 19-24.
- [5] 童群义. 红曲霉产生的生理活性物质研究进展[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 163-167.
- [6] ENDO A, MONACOLIN K. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. Journal of Antibiotics, 1979, 2(8): 852-854.
- [7] 麻成金, 黄群, 傅伟昌, 等. 红曲霉紫外诱变选育及其发酵特性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 181-184.
- [8] 赵树欣, 汤卫华, 乔长晟. 添加酵母破壁液提高红曲霉Monacolin K产率[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 119-121.
- [9] 王雅芬, 袁康培. 低产桔霉素红曲霉菌种的选育研究[J]. 食品科学, 2003, 24(8): 93-96.
- [10] 戴德慧, 郭爱莲, 蒋家新. He-Ne激光对红曲霉M₃的原生质体诱变育种[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 75-78.
- [11] 付海平. 产Monacolin K红曲霉的筛选及其发酵条件的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004: 15.
- [12] OU Hsinping, WANG Chiun C, LAI Lihshih. Thermal degradation kinetics analysis of Monacolin K in *Monascus*-fermented products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(1): 292-296.
- [13] 王伟平, 王莉平, 彭其安, 等. 红曲霉菌种选育及固态发酵法生产Monacolin K研究[J]. 中国酿造, 2006(8): 21-23.
- [14] JOSHI S, YADAV S, DESAI A J. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(2): 122-127.
- [15] DWEVEDI A, KAYASTHA A M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(10): 2667-2675.
- [16] RANDONESE R, MACKA M, HUGHES J, et al. The use of Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 27(6): 995-1007.
- [17] 吴竹青, 陈景, 黄群, 等. 响应面法优化雪莲果酒发酵工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 182-187.