文章编号: 1673-1689(2011)03-0403-07

统计学分析方法在普鲁兰发酵培养基优化中的应用

张益波[1], 赵艺[2], 柴玉爽[1], 韩微[1], 薛雪[1],
王菲[1], 王爱敏[1], 逯家辉[1], 滕利荣*[1]
(1. 吉林大学 生命科学学院 吉林长春 130012; 2. 吉林大学 珠海学院 广东 珠海 519041)

摘 要: 为了得到普鲁兰发酵的最佳培养基,在单因子实验的基础上, 应用 Plackett-Burman 设计法对影响普鲁兰发酵的基本培养基组分中的关键因子进行了优选,并进| 步采用响应面分析法(Response Surface Methodology, RSM)对影响普鲁兰产量的关键因素最佳水平范围作了深入的研究。实验结果表明:影响普鲁兰产量的关键因素为:葡萄糖、酵母粉和 NaCl 的浓度。通过 RSM 模型的拟合和推算得到在葡萄糖、酵母粉和 NaCl 质量浓度分别 5.675、0.405、0.0815 g/dL 时, 此时模型预测发酵最佳的产量为 32.071 44 g/L, 验证值为 32.16 g/L,预测值与验证值之间吻合较好, 比原始培养基提高了约 5 倍。

关键词: 普鲁兰产生菌;Plackett-Burman 设计法; 响应面法(RSM)
中图分类号: Q 939 文献标识码: A

Statistical Optimization of Fermentation Medium for *Pullulan* by *Aureobasidium pullulans*

ZHANG Yi-bo[1], ZHAO Yi[2], CHAI Yu-shuang[1], HAN Wei[1], XUE Xue[1],
WANG Fei[1], WANG Ai-ming[1], LU Jia-hui[1], TENG Li-rong*[1]
(1. College of Life Science, Jilin University, Chang chun 130012, China; 2. Zhuhai College, Jilin University, Guangdong Zhuhai, 519041, China)

Abstract: In order to obtain the optimal medium composition for Pullulan production, statistical method was used to investigate the medium components for pullulan concentration by Aureobasidium pullulans in this study First, the Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of six variables including glucose, yeast extract, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ and NaCl. Subsequently, a three-level three-factor Box-Benhnken design was employed to determine the maximum Pullulan production at optimum concentration of glucose, yeast extract and NaCl. The optimal values of the three parameters determined by RSM were glucose 5.675%, yeast extract 0.405% and NaCl 0.0815%. The Pullulan production was 32.1g/L, and the actual experimental result was 32.16g/L. They were in well agreement and it is 5.0 folds of the

收稿日期: 2010-05-17
基金项目:: 吉林大学国家级生物实验教学示范中心创新基金项目(ZXCX2006012)。
作者简介: 张益波(1982-), 男, 江苏宿迁人, 博士研究生, 主要从事生物技术制药的研究。
Email: zhangyb08@mails.jlu.edu.cn
* 通信作者: 滕利荣(1954-), 男, 吉林扶余人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物技术制药研究。
Email: tenglr@jlu.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Pullulan production before optimization.

Key words: *Aureobasidium pullulans*, plackett-burman design, response surface analysis methodology (RSM)

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)是一种多形态真菌,在其酵母状细胞内可分泌一种短梗霉多糖,又称普鲁兰(Pullulan)[1],其分子由麦芽三糖以α-1,6-糖苷键连接而成。由于普鲁兰具有可食性、无毒害、无污染、可塑性好等特点,在食品,医药,轻工业生产等方面具有广泛的应用前景[2,4]。在国外,普鲁兰的研究和生产早已成为热点[5],中国内普鲁兰的发酵生产研究处于起步阶段,对普鲁兰发酵进行培养基的优化的研究较少。为了获得较高的普鲁兰产量和普鲁兰发酵过程中培养基因子之间的影响进行研究,我们进行了统计学分析方法的优化。

Plackett-Burman设计法是一种两水平的实验设计的经典方法。它可以利用最少的实验次数,从众多的考察因素中快速有效地筛选出主要的因子,被广泛地用于因子主效应的估计中[6]。响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)是一种优化生物过程的综合技术,该法可以建立连续变量曲面模型,在建立可靠模型的基础上对影响生物产量的因子水平及其交互作用进行优化与评价,它可快速有效的确定生物过程的最佳条件,该法在各种探索工艺的优化实践中被广泛应用[7-10]。

本研究利用Plackett-Burman和响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)等统计学的实验设计方法确定及优化普鲁兰菌深层发酵的培养基,以期得到最佳的培养基,增加普鲁兰产生菌发酵过程中的普鲁兰产量,为后续放大发酵培养和普鲁兰的广泛应用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验菌株

菌种:普鲁兰产生菌 ATCC16623,购于ATCC。

1.2 主要试剂

蒽酮,浓硫酸,葡萄糖,酵母粉等试剂均为分析纯,购于国药集团。

1.3 培养基

固体培养基:PDA培养基。

液体培养基(g/dL):葡萄糖5,磷酸二氢钾0.6,酵母粉0.3,硫酸铵0.06,七水合硫酸镁0.02,氯化钠0.05,pH6.0,120 ℃灭菌30 min。

1.4 实验仪器

SHB-III型循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸公司产品,PX-150-Z恒温摇床:上海跃进医疗器械厂生产,SANYO全自动高温灭菌器:日本,101A-2E电热恒温干燥箱:上海实验仪器厂生产,电子分析天平(d=0.001 g):德国赛多利斯公司产品,752紫外可见分光光度计:上海分析仪器厂产品。

2 实验方法

2.1 普鲁兰产量的计算

将深层发酵得到的发酵液抽滤、离心后留上清液;4 ℃,体积分数80%醇沉过夜,离心去上清液,不容物烘干后用适量的水溶解,使用蒽酮-硫酸法[11]测定普鲁兰的含量。

2.2 实验设计

2.2.1 起始发酵培养基的确定 以葡萄糖5 g/dL,KH_2PO_4 0.6 g/dL,酵母粉0.3 g/dL,$(NH_4)_2SO_4$ 0.06 g/dL,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/dL,NaCl 0.05 g/dL为基本培养基进行单因子碳源、氮源种类和浓度,无机盐浓度的优化研究。发酵条件为[12]:接种体积分数为4%,发酵温度为28 ℃,摇床转速为120 r/min,发酵96 h。

2.2.2 影响普鲁兰产量主要因素的确定 用Plackett-Burman试验设计确定起始培养基中6种成分对普鲁兰产量的影响进行研究,以回归分析的方法确定影响较大的因子。依据已确定的起始发酵培养基,选取培养基的6种成分作为6个因素进行考察。本试验采用N=12 Plackett-Burman设计,并余留2个空项作为误差分析[13]。

2.2.3 中心组合优化培养基的确定 根据Box-Benhnken的中心组合实验设计原理的实验分析结果[15],采用响应面分析法在三因子三水平上对普鲁兰的发酵工艺进行优化。选取响应值为普鲁兰产量,自变量为显著因子水平,得到响应面的二阶经验模型:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ii} x_{2i} \quad (1)$$

式中:Y为模型响应值,即普鲁兰常量,b为

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

回归系数, x_i 为自变量的编码水平, 它与自变量真实值 X_i 的关系为:

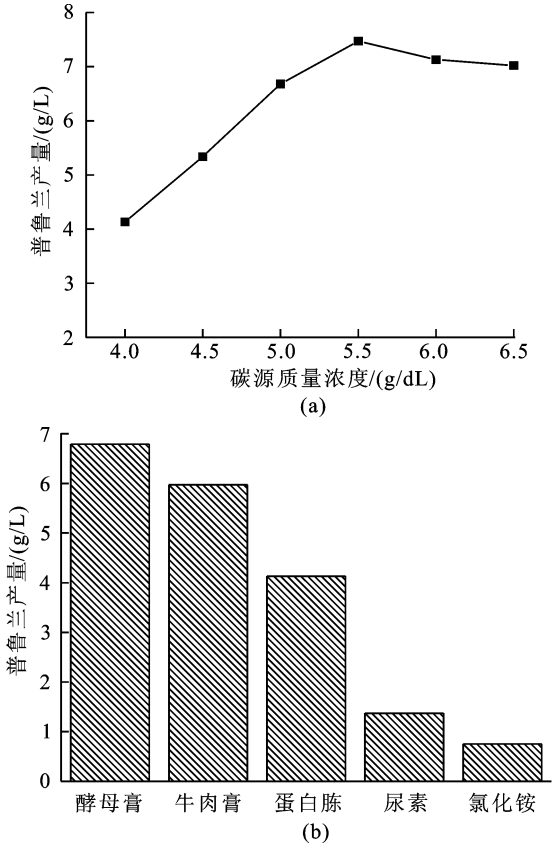
$$x_i = (X_i + X_{i0}) / \Delta X_i \quad (2)$$

式中: X_{i0} 为实验中心点处自变量的真实值, ΔX_i 为自变量变化步长。

3　结果与讨论

3.1　单因子实验结果

3.1.1　碳源和氮源种类的选择　培养基其它成分和含量不变选取不同种类的碳源和氮源进行实验。



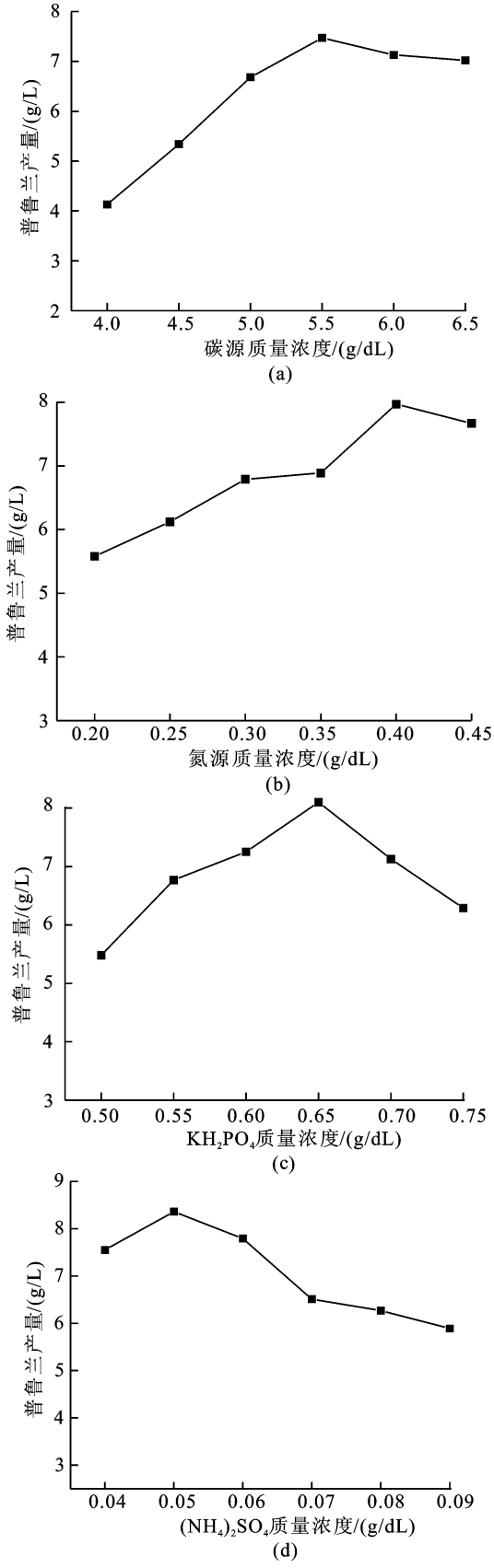
(a) 不同种类的碳源对普鲁兰产量的影响; (b) 不同种类的氮源对普鲁兰产量的影响

图 1　碳源和氮源种类对普鲁兰产量的影响

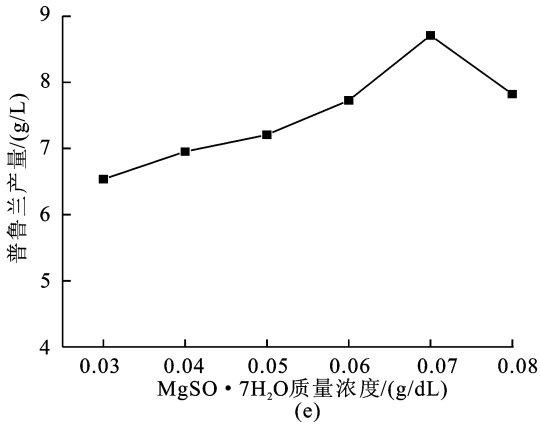
Fig. 1　Effects of carbon and nitrogen sources on *Pullulan* production

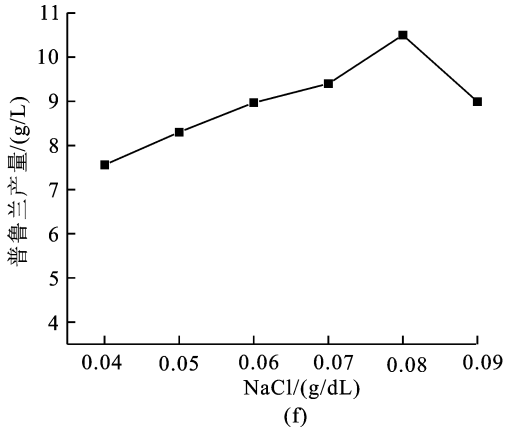
从图 1(a) 中可以看出在其它培养基成分不变的情况下, 同等质量浓度的不同碳源在普鲁兰产生菌的发酵培养过程中, 葡萄糖作为碳源对普鲁兰的产量最有利, 所以实验中选择葡萄糖为碳源。从图 1(b) 中可以看出在其它培养基成分不变的情况下, 同等质量浓度的不同氮源在普鲁兰产生菌的发酵培养过程中, 酵母粉作为碳源对普鲁兰的产量最有利, 所以实验中选择酵母粉为碳源。

3.1.2　培养基浓度单因子优化的结果　以优化后的培养基种类进行培养基质量浓度选择的单因子实验。实验中分别选择合适的范围对葡萄糖、酵母粉、KH_2PO_4、$(NH_4)_2SO_4$、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 NaCl 的质量浓度进行了研究, 研究结果见图 3。



© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net





(a) 葡萄糖质量浓度对普鲁兰产量的影响; (b) 酵母粉质量浓度对普鲁兰产量的影响; (c) KH_2PO_4 质量浓度对普鲁兰产量的影响; (d) $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度对普鲁兰产量的影响; (e) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度对普鲁兰产量的影响; (f) NaCl 质量浓度对普鲁兰产量的影响

图 2 培养基质量浓度单因子对普鲁兰产量的影响

Fig. 2 Effects of medium concentration on *Pullulan* production

由图 2(a) 中可以看出随着葡萄糖质量浓度的增加, 普鲁兰的产量表现为现增加后减小, 当葡萄糖质量浓度为 5.5 g/dL 时, 普鲁兰的产量达到最大值 7.47 g/L。故选择葡萄糖质量浓度为 5.5 g/dL。图 2(b) 中可以看出随着酵母粉浓度的增加, 普鲁兰的产量表现为现增加后减小, 当酵母粉质量浓度为 0.40 g/dL 时, 普鲁兰的产量达到最大值 7.97 g/L。故选择酵母粉质量浓度为 0.40 g/dL。图 2(c) 中可以看出随着 KH_2PO_4 浓度的增加, 普鲁兰的产量表现为现增加后减小, 当 KH_2PO_4 浓度为 0.65% 时, 普鲁兰的产量达到最大值 8.1 g/L。故选择 KH_2PO_4 质量浓度为 0.65 g/dL。图 2(d) 中可以看出随着 $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度的增加, 普鲁兰的产量表现为现增加后减小, 当 $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度为 0.05 g/dL 时, 普鲁兰的产量达到最大值 8.36 g/L。故选择 $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度为 0.05 g/dL。图 2(e) 中可以看出随着 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度的增加, 普鲁兰的产量表现为现增加后减小, 当 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度为 0.07 g/dL 时, 普鲁兰的产量达到最大值 8.712g/L。故选择 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度为 0.07 g/dL。图 2(f) 中可以看出随着 NaCl 质量浓度的增加, 普鲁兰的产量表现为现增加后减小, 当 NaCl 质量浓度为 0.08 g/dL 时, 普鲁兰的产量达到最大值 10.5 g/L。故选择 NaCl 质量浓度为 0.08 g/dL。

3.2 影响普鲁兰产量主要因素确定的结果(Plackett - Burman Design)

应用 SAS 实验设计工具箱设计 8 因子的 12 次的 Plackett-Burman 试验安排见表 1, 分析过程采用统计学上的 t-检验。利用 SAS V9.0 软件进行试验设计、数据分析。

表 1 N= 12 Plackett-Burman 试验设计与结果

Tab. 1 Results of Plackett-Burman design experiments

实验号	变量质量浓度/(g/dL)								普鲁兰产量/(g/L)
	葡萄糖 *A*	酵母粉 *B*	$(NH_4)_2SO_4$ *C*	KH_2PO_4 *D*	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ *E*	NaCl *F*	空白 *G*	空白 *H*	
1	8.25	0.4	0.75	0.65	0.07	0.08	–	–	21.41
2	8.25	0.6	0.5	0.975	0.07	0.08	–	–	22.87
3	5.5	0.6	0.75	0.65	0.105	0.08	–	–	10.49
4	8.25	0.4	0.75	0.975	0.07	0.12	–	–	18.76
5	8.25	0.6	0.5	0.975	0.105	0.08	–	–	21.69
6	8.25	0.6	0.75	0.65	0.105	0.12	–	–	19.83
7	5.5	0.6	0.75	0.975	0.07	0.12	–	–	6.350
8	5.5	0.4	0.75	0.975	0.105	0.08	–	–	6.980
9	5.5	0.4	0.5	0.975	0.105	0.12	–	–	2.330
10	8.25	0.4	0.5	0.65	0.105	0.12	–	–	17.89
11	5.5	0.6	0.5	0.65	0.07	0.12	–	–	11.65
12	5.5	0.4	0.5	0.65	0.07	0.08	–	–	10.88

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

实验中照表 1 的安排进行 Plackett – Burman 实验, 应用 12 种不同质量浓度的培养基进行普鲁兰产生菌的发酵培养, 分别得到对应的普鲁兰产量, 对 Plackett-Burman 的试验结果进行多项式的回归分析得到的方程如下:

$$Y = 14.26 + 6.148A + 1.219B - 0.2908C - 1.098D - 1.059E - 1.459F + 0.0675G - 0.0825H$$。

方程拟合的相关性为 $R^2 = 98.26\%$, 表明此多项式方程很好的模拟和解释了 Plackett-Burman 的实验结果。对普鲁兰发酵产量的 Plackett – Burman 实验 t-检验结果见表 2。

表 2　Plackett – Burman 试验各因素参数的 t 检验分析结果

Tab. 2　Regression analysis and t test of the Plackett – Burman design experiments

各因素质量浓度/(g/dL)		效应	t- 值	$Pr > \|t\|$
葡萄糖	A	1.2295	12.0969	0.00122
酵母粉	B	0.24383	2.39905	0.09596
$(NH_4)_2SO_4$	C	– 0.05817	– 0.5723	0.60719
KH_2PO_4	D	– 0.2195	– 2.15964	0.11962
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	E	– 0.21183	– 2.08421	0.12849
NaCl	F	– 0.29183	– 2.87132	0.06398

培养基 6 个成分的 t-检验结果表明: 葡萄糖的浓度对普鲁兰产量影响非常显著($P = 0.001\,216$), 其次培养基中的 NaCl($P = 0.063\,981$) 和酵母粉($P = 0.095\,956$) 的浓度对普鲁兰的产量影响显著, 其它因子的影响不显著。由 t 检验的结果分析看出, 适当增加这 3 种培养基成分的质量浓度对普鲁兰的产量是有利的。

3.3　中心组合实验结果

3.3.1　*预测模型的建立和回归分析检验*　以单因子实验和 Plackett – Burman 实验结果进行三因素三水平的中心组合实验, 实验方案及对应的发酵普鲁兰产量结果见表 3。

表 3　中心组合实验设计和结果

Tab. 3　Results of the Box Behnken design experiments

实验号	葡萄糖/(g/dL) X_1	酵母粉/(g/dL) X_2	NaCl/(g/dL) X_3	普鲁兰产量 Y/(g/L)
1	5.1	0.36	0.080	25.01
2	5.1	0.44	0.080	28.38
3	5.9	0.36	0.080	29.18
4	5.9	0.44	0.080	28.31
5	5.5	0.36	0.076	27.18
6	5.5	0.36	0.084	27.13
7	5.5	0.44	0.076	26.88
8	5.5	0.44	0.084	30.16
9	5.1	0.40	0.076	25.64
10	5.9	0.40	0.076	28.11
11	5.1	0.40	0.084	25.88
12	5.9	0.40	0.084	31.57
13	5.5	0.40	0.080	31.54
14	5.5	0.40	0.080	31.59
15	5.5	0.40	0.080	31.47

用 SAS V9.0 的实验设计工具箱对实验数据进行回归拟合, 并对拟合方程和相关的因子作显著性 t-检验及方差分析, 可以得到响应面方程和普鲁兰产量的最佳发酵培养条件, 应用 Matlab7.5 进行响应面和等高线直观分析图形的制作。

经过 SASV9.0 对中心组合数据进行处理, 得到二次响应面回归方程为:

$$Y = 31.533 + 1.532\,5X_1 + 0.653\,75X_2 + 0.866\,25X_3 - 1.925\,42X_1X_1 - 1.06X_1X_2 + 0.805X_1X_3 - 1.887\,92X_2X_2 + 0.832\,5X_2X_3 - 1.807\,9X_3X_3$$

式中: Y 为响应值普鲁兰产量, X_1、X_2 和 X_3 分别为葡萄糖、酵母粉和 NaCl 浓度的编码值。同时对拟合模型进行方差分析, 模型的方差分析结果见表 4。

表 4　Box-Behnken 试验设计回归分析结果

Tab. 4　Regression analysis of the Box-Behnken design experiments

方差来源	自由度/ DF	平方和/ SS	均方/ MS	F 值/ F	$Pr > F$
X_1	1	0.187 884	0.187 884	44.693 1	0.001 13
X_2	1	0.0341 91	0.0341 91	8.133 22	0.035 75
X_3	1	0.060 031	0.060 031	14.279 9	0.012 91
X_1X_1	1	0.136 882	0.136 882	32.561	0.002 31
X_1X_2	1	0.044 944	0.044 944	10.691 1	0.022 21
X_1X_3	1	0.025 921	0.025 921	6.165 97	0.055 63
X_2X_2	1	0.131 602	0.131 602	31.304 9	0.002 52
X_2X_3	1	0.027 722	0.027 722	6.594 44	0.0501 6
X_3X_3	1	0.120 685	0.120 685	28.708 1	0.003 04
模型	9	0.718 032	0.079 781	18.978 0	0.002 37

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

续表 4

方差来源	自由度/ *DF*	平方和/ *SS*	均方/ *MS*	*F* 值/ *F*	*Pr*> *F*
线性	3	0.282 107	0.094 036	22.368 7	0.002 52
平方	3	0.337 338	0.112 446	26.748 2	0.001 66
交互	3	0.098 587	0.032 862	7.817 16	0.024 66
参差	5	0.021 019	0.004 204		
失拟	3	0.020 947	0.006 982	192.172	0.005 18
误差	2	0.000 073	0.000 036		
离差	14	0.739 052			

从模型的方差分析结果(表 4)可以看出模型的 P(Pr> F)值为 0.002 365, 说明模型回归非常显著说明模型拟和得较好。此外, 模型的预测值和真实值相关性高, 模型的线性、平方和交互项回归均非常显著[P(Pr> F) < 0.05]相关系数为 R^2 = 97.16%。这些结果表明了拟合的二次响应面方程很好的解释了中心组合实验, 可以用其代替真实试验点进行普鲁兰发酵培养最优条件的预测。方程中的各个因子对响应值的影响关系可以通过 t-检验进行研究, 表 6 给出了回归模型的系数显著性检验的结果。模型系数的显著性 t-检验结果表明, 回归方程的一次项 X_1 和平方项 X_1X_1、X_2X_2、X_3X_3 对模型的影响非常显著[P(Pr> F) < 0.01], 同时回归方程的一次项 X_2、X_3 和交互项 X_1X_2 对模型的影响显著[P(Pr> F) < 0.05]。说明了模型的因子和响应值变化相对复杂性, 不是简单的线性关系, 曲面效应显著。

3.3.2 *普鲁兰产量的响应面分析与优化* 由拟合的二次项方程在给定的因子范围内使用 Matlab 9.0 作图可以得到用于分析的响应面和等高线直观图, 由于 X_1X_2 交互项的影响显著, 图 3 给出了 X_1、X_2 项对模型的交互作用的分析图。

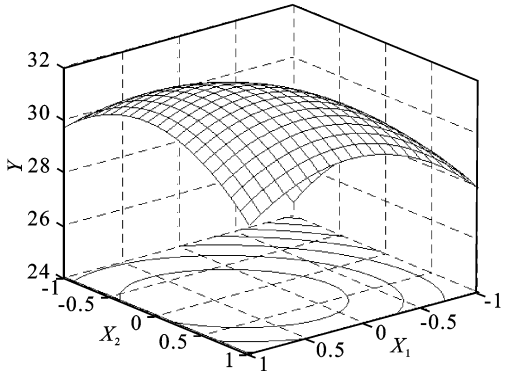


图 3 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线分析图

Fig. 3 $Y=f(X_1, X_2)$ **of responsive surfaces and contours plots**

从图中可以看出, 在编码值为-1~ 0 之间时, 随着 X_1(葡萄糖)和 X_2(酵母粉)的增加, 响应值 Y 增加后缓慢减少。X_1 在低浓度时, 随着 X_2 的增加, Y 值先增加后减小表现了非线性的关系, 在 X_1(葡萄糖)编码值在 0.5 以上时, X_2(酵母粉)增大时, 响应值 Y 先增加后减少也表现了很强的非线性的关系, 这与 t 检验分析的结果中出的 X_1X_2 交互项对模型的影响显著(P= 0.022 21)相对应。

响应面的最高点和等高线的中心点在此范围内, 可以知道在所选的区域有最大的 Y 值。同时由二次响应面方程可以得到极值点的编码值为: X_1 = 0.438 714, X_2= 0.130 984, X_3 = 0.367 401; 即为葡萄糖质量浓度为 5.675 g/dL, 酵母粉质量浓度为 0.405 g/dL, NaCl 质量浓度 0.0815 g/dL, 此时最大的响应值 Y(普鲁兰产量)为 32.071 44 g/L。

3.4 验证实验

为了对模型拟合和推算的结果进行准确性的检验, 配置模型推算的最优普鲁兰发酵培养基进行发酵实验, 三次实验的平均结果为 32.16 g/L。与计算值的相对误差为 0.276%, 在模型的允许的误差范围之内。说明上述的统计学方法对普鲁兰生产的培养基优化是合理可行的, 模型能较好地预测实际发酵情况和结果, 得到的推算结果可是在实际生产中应用。

4 结 语

1) 本文在单因子培养实验的基础上确定了培养基的碳氮源种类和各种培养基成分的基本配比。通过 Plackett - Burman 试验对 6 个因子进行了相关因素的筛选, 发现了对普鲁兰具有显著影响的是葡萄糖, 酵母粉和 NaCl。增加这 3 种成分的含量对普鲁兰的发酵生产是非常有利的。

2) 以单因子确定的最优浓度为响应面分析的中心点, 进行三因素三水平的响应面分析实验, 对实验的结果进行二次回归曲线的合理拟合, 并用统计学的方法进行分析, 寻找到了对普鲁兰产量影响较大的因子。经过响应面分析得到了最优的培养基结果为: 葡萄糖质量浓度为 5.675 g/dL, 酵母粉质量浓度为 0.405 g/dL, NaCl 质量浓度 0.0815 g/dL, $(NH_4)_2SO_4$ 质量浓度为 0.05 g/dL, KH_2PO_4 质量浓度为 0.65 g/dL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 质量浓度为 0.07 g/dL, 此时普鲁兰的产量为 32.16 g/L, 普鲁兰的产糖量明显的提高。由此可见, 利用响应面法对普鲁兰的培养基进行优化不仅省时省力, 而且科学有效。本试验利用该方法建立的数学模型, 不

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

仅有利于数学统计分析, 更重要的是它能根据实际生产中培养基组分的特性, 选择培养基各组分的水平; 同时能够达到产物的最大产量, 对不同培养条件下发普鲁兰产量的预测, 有利于对普鲁兰产生菌发酵过程的控制, 为生产实际提供很好的指导作用。

参考文献(References) :

[1] Catley B J. Pullulan, relation between molecular weight and fine structure [J]. **FEB S Lett,** 1970, 10(3): 190- 193.

[2] Madlova A, Antosova M, PolakovicM, et al. Thermal stability of frectory transferees from aureobasidium pullulans[J]. **Chem Pap,** 2000, 54 (6a): 339- 344.

[3] 夏婷婷, 张益波, 付瑶, 等. 响应面法优化薰衣草油树脂的提取工艺[J], 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 786- 790.
XIA Ting-ting, ZHANG Yi-bo, Fu Yao, et al. Optimization of extraction process conditions of lavender oleoresin by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog,** 2009, 28(6): 786- 790. (in Chinese)

[4] Augustin J. Polysaccharide hydro lases of aureobasideum pullulans[J]. **Folia Microbiol,** 2000, 45 (2): 143- 146.

[5] West T P. Exopolysaccharide production by entrapped cells of the fungus aureobasidium pullulans A TCC201253 [J]. **J Basic Microbiol,** 2000, 40 (5): 39- 401.

[6] Yamazaki Kushida N, Oguchi A, Kikuchi H, et al. Response Surface Design and Analyses[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1987. 149- 205.

[7] 孟宪军, 刘学, 周艳. 树莓叶片中油树脂的提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 6- 9.
MENG Xian-jun, LIU Xue, ZHOU Yan. Study on processing technology of essential oleoresin from raspberry leaves[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog,** 2007, 26(3): 6- 9. (in Chinese)

[8] 金丽梅, 宋丽娜, 吴天法, 等. 溶剂法提取万寿菊籽油的工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2005, 12: 26- 28.
JIN Li-mei, SONG Li-na, WU Tian-fa, et al. Study on marigold seed oleoresin extracted with solvent method[J]. **Chemistry and Bioengineering,** 2005(12): 26- 28.

[9] Ramkrishna S, Swaminmhan T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculums age and size on surfactant production[J]. **Biochemical Engineering Journal,** 2004, 21: 141- 148.

[10] 段学辉, 颜淑芳, 彭云召, 等. 响应面法优化灰绿青霉 Penicillium glaucum NS16 产酶条件[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 464- 470.
DUAN Xue-hui, YANG Shu-fang, PENG Yun-zhao, et al. Optimization of fermentation condition for cellulase producing penicillium glaucum NS 16 by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog,** 2010, 29(3): 464- 470. (in Chinese)

[11] 滕利荣, 孟庆繁. 生物学基础实验教程[M]. 吉林科学技术出版社, 2004. 135- 139.

[12] 陈洁, 傅正生, 王长青, 等. 普鲁兰多糖在土豆淀粉废水中的发酵条件研究[J]. 食品工程, 2008, 6(1): 28- 31.
CHEN Jie, FU Zheng-sheng, WANG Chang-qin, et. al., Studies on the fermentation conditions of pullulan polysaccharide using potato starch waste water as substrate[J]. **Food Engineering,** 2008, 6(1): 28- 31. (in Chinese)

[13] STOWER A, MAYER R P. Efficient screening of process variables[J]. **Industrial and Engineering Chemistry,** 1966, 58 (2): 36- 40.

[14] Kalil S J, Maugeri F, Rodrigues M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. **Process Biochemistry,** 2000, 35: 539- 550.

[15] Box G E P, Hunter W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building[M]. New York: Wiley, 1990. 15- 36.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net