

L-亮氨酸发酵培养基优化试验

伍时华, 徐雅飞, 张健, 廖兰, 黄翠姬

(广西工学院 生物与化学工程系, 广西柳州 545006)

摘要: 应用 Plackett-Burman 设计试验从 L-亮氨酸基础发酵培养基的 10 种成分中筛选出 5 种重要成分, 然后应用响应面分析试验确定 5 种重要成分的最适用量。培养基优化后摇瓶分批发酵 72 h 产 L-亮氨酸 18.05 g/L。

关键词: L-亮氨酸; 发酵培养基; 优化; 响应面分析

中图分类号: TQ922 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)06-0692-05

Study on medium optimization of L-leucine fermentation

WU Shi-hua, XU Ya-fei, ZHANG Jian,
LIAO Lan, HUANG Cui-ji

(Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: Five main factors were screened by the Plackett-Burman design method from ten ingredients of L-leucine basic fermentation medium. Then, the best level of five factors was determined by response surface analysis. The strain TQ9806-1 could produce L-leucine 18.05 g/L after fermentation with optimum medium for 72 hours by flask-shaking batch fermentation.

Key words: L-leucine; fermentation medium; optimization; response surface analysis

L-亮氨酸是人与动物自身不能合成而必须依赖外源供给的八大必需氨基酸之一, 对维持人体健康和促进动物生长具有重要作用。由于目前发酵法生产 L-亮氨酸的菌种产酸偏低, 发酵周期长, 发酵副产物多, 分离纯化困难(刘建军等, 2004), 致使其产量低, 价格高, 使之尚主要用于配制复方氨基酸输液(宋超先等, 2004), 因此, 进行 L-亮氨酸菌种选育和发酵工艺条件优化, 提高 L-亮氨酸发酵水平, 具有重大研究意义。

近年来, 国内对发酵法生产 L-亮氨酸的研究报道较少, 而目前又尚未见到应用响应面分析法进行 L-亮氨酸发酵培养基优化的研究报道。但应用响应面分析法进行其他发酵培养基(Zheng 等, 2000; 钟环宇等, 2004; Ooijkaas 等, 1999; Li 等, 2002)或产物分离提取条件(魏安池等, 2006; 任凤莲等, 2006)

优化的研究报道较多, 且优化效果明显。

微生物发酵培养基的最佳组成, 是保证高产菌株的高产性能得以充分表达的物质基础。作者在 L-亮氨酸发酵培养基单因素试验(另文发表)的基础上, 参考有关文献(欧宏宇等, 2001; 惠大丰等, 1996; 胡良平, 2001; Wong, 1996)。首先应用 Plackett-Burman 设计试验法从 L-亮氨酸基础发酵培养基的 10 种成分中筛选出 5 种重要成分, 然后应用二次回归的旋转中心组合设计 5 因素 5 水平的响应面分析试验来确定 5 种重要成分的最适用量。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

(1) 黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)

收稿日期: 2006-06-21 修回日期: 2006-10-09

基金项目: 广西科学基金项目(GKQ0229012)资助 [Supported by Science Foundation of Guangxi(GKQ0229012)]

作者简介: 伍时华(1963-), 男, 广西岑溪市人, 副教授, 博士, 主要从事微生物育种与代谢控制发酵的研究。

TQ9806-1:由广西工学院发酵工程研究室提供,从黄色短杆菌 TQ9806 改良获得(伍时华等,2001)。(2)种子培养基:葡萄糖 25,玉米浆 20 mL/L,尿素 2.0(分消), KH_2PO_4 1.3, MgSO_4 0.4, MnSO_4 0.01, Met 0.3, VB11300 $\mu\text{g/L}$, V_H 200 $\mu\text{g/L}$ 。(3)发酵培养基(g/L):葡萄糖 130,玉米浆 40 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, NH_4Ac 20, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 0.4, MnSO_4 0.01, Met 0.4, Ile 0.05, Glu 0.4, VB1 300 μg , V_H 50 μg , CaCO_3 30(分消), pH7.0~7.2, 0.75 kg/cm² 蒸汽灭菌 20 min。

1.2 培养方法

种子培养方法:①菌种活化:取斜面保藏菌种划线接种于活化斜面,28℃恒温静置培养20~24 h。②种子培养:将1支(\varnothing 18 试管)生长良好的活化斜面种子用适量无菌水洗下,吸取1/4 菌液转入装有50 mL 种子培养基的500 mL 三角瓶中,8层纱布封口,置旋转摇床上,220 r/min,28℃恒温振荡培养至对数生长末期。

摇瓶发酵培养方法:将发酵培养基中被研究的成分(因素)设计成不同水平,其它成分及用量同基础发酵培养基;按10%接种量将种子液5 mL 接入装有45 mL 发酵培养基的500 mL 三角瓶中,8层纱布封口,置旋转摇床上,220 r/min,28℃下振荡培养72 h。

发酵分析方法:L-亮氨酸测定:用“纸色谱-薄层扫描测定法”测定(伍时华等,2003)。

2 结果与讨论

2.1 应用 P-B 设计试验筛选重要因素

2.1.1 试验条件分析 根据发酵培养基单因素试验结果,取葡萄糖等10种成分作为PB试验的10个因素 $X_1, X_2, X_3 \dots X_{10}$ 。每个因素取两个水平,高水平取低水平的1.25倍。以L-亮氨酸产量 $y(\text{g/L})$ 为响应值,筛选对产酸影响较大的主要因素。P-B设计试验因素、水平见表1。

表1 P-B设计试验的因素、水平及影响效果
Table 1 Factors, levels of P-B design test and their effect

因素 Factors	编码水平 Coded levels		T-检验 T-test	概率> T Prob> T	排列 Ranking
	- 1	+1			
X_1 葡萄糖 Glucose (g/L)	110	137.5	12.65	0.0502	2*
X_2 玉米浆 Corn syrup (mL/L)	35	43.75	13.85	0.0459	1**
X_3 醋酸铵 Ammonium acetate (g/L)	18	22.5	11.86	0.0536	3*
X_4 硫酸铵 Ammonium sulfate (g/L)	18	22.5	7.81	0.0811	5
X_5 蛋氨酸 Metione (g/L)	0.4	0.5	4.12	0.1513	
X_6 异亮氨酸 Isoleucine (mg/L)	50	63	-1.22	0.4381	
X_7 谷氨酸 Glutamic (g/L)	0.4	0.5	8.40	0.0755	4*
X_8 生物素 Biotin ($\mu\text{g/L}$)	50	62.5	2.33	0.2586	
X_9 磷酸氢二钾 Dipotassium hydrogen phosphate (g/L)	1	1.25	1.44	0.4582	
X_{10} 硫酸镁 Magnesium sulfate (g/L)	0.4	0.5	3.58	0.1732	

注:**置信水平95%;*置信水平90%。 Note:** Significant for a 95% confidence level; * Significant for a 90% confidence level.

2.1.2 试验设计及结果 用SAS安排P-B表头,进行试验。试验安排及结果如表2。SAS分析的输出结果,经整理后列入表1。从T-检验结果可知,玉米浆 X_2 、葡萄糖 X_1 、醋酸铵 X_3 、谷氨酸 X_7 、硫酸铵 X_4 这5个因素的可信度分别为95.41%,94.98%,94.64%,92.45%,91.89%,高于90%,说明这5个因素是对L-亮氨酸发酵产酸影响较大的重要因素。

2.2 应用响应面分析设计试验筛选重要因素的最优浓度水平

在发酵培养基优化试验中,二次回归的旋转中心组合设计是一种常用的响应面分析方法。每个因素取5个水平,以(-2,-1,0,+1,+2)编码。根据相应的

试验表进行试验后,对数据进行二次回归,得到一定水平范围内的响应面,最后分析响应面,求出最优值。

2.2.1 试验条件分析 通过PB试验已筛选出影响L-亮氨酸产量的5个重要因素是玉米浆、葡萄糖、醋酸铵、谷氨酸、硫酸铵。在此基础上用响应面分析法来寻找上述5个因素(自变量)的最优浓度水平,以L-亮氨酸产量(g/L)为响应值,对应于因变量 y 。响应面分析试验因素、水平列于表3。

葡萄糖的浓度(g/L) ξ_1 ,对应于自变量 X_1 。玉米浆的浓度(mL/L) ξ_2 ,对应于自变量 X_2 。醋酸铵的浓度(g/L) ξ_3 ,对应于自变量 X_3 。硫酸铵的浓度(g/L) ξ_4 ,对应于自变量 X_4 。谷氨酸的浓度(g/L) ξ_5 ,

表 2 Plackett-Burman 试验设计及响应值
Table 2 Plackett-Burman test design and its response value

试验号 Test No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	Y(g/L)
1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	14.90
2	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	14.73
3	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	15.15
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14.04
5	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	14.83
6	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	14.39
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	14.91
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	14.77
9	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	15.23
10	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	15.34
11	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	14.70
12	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	15.13

对应于自变量 X₅。编码变换为: X₁ = ξ₁ - 125/5, X₂ = ξ₂ - 40/5, X₃ = ξ₃ - 20/5, X₄ = ξ₄ - 20/5, X₅ = ξ₅ - 0.3/5。

2.2.2 试验设计及结果 运行 SAS 软件得到 5 因素 5 水平的响应面设计表头如表 4 所示。其他因素采用 PB 试验的低水平, 摇瓶发酵 72 h 的 L-亮氨酸产量列于表 4。

2.2.3 二次回归模型拟合及方差分析 SAS 软件分析的结果, 经整理后如表 5、6, 决定系数 R² = 0.9129,

说明回归方程的拟合程度良好。

表 3 响应面分析试验因素水平表

Table 3 Factors and their levels of response surface analysis

因素 Factor	水平 Level				
	-2	-1	0	+1	+2
X ₁ 葡萄糖 Glucose (g/L)	115	120	125	130	135
X ₂ 玉米浆 Corn syrup (mL/L)	30	35	40	45	50
X ₃ 醋酸铵 Ammonium acetate (g/L)	10	15	20	25	30
X ₄ 硫酸铵 Ammonium sulfate (g/L)	10	15	20	25	30
X ₅ 谷氨酸 Glutamic (g/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

表 4 响应面设计表及试验结果

Table 4 Table for response surface design and the test results

试验号 Test No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y(g/L)	试验号 Test No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y(g/L)
1	-1	-1	-1	-1	1	14.99	17	0	0	0	0	0	17.79
2	1	-1	-1	-1	-1	16.38	18	0	0	0	0	0	17.77
3	-1	1	-1	-1	-1	16.98	19	0	0	0	0	0	17.84
4	1	1	-1	-1	1	17.67	20	0	0	0	0	0	17.82
5	-1	-1	1	-1	-1	16.01	21	0	0	0	0	0	17.78
6	1	-1	1	-1	1	16.88	22	0	0	0	0	0	17.94
7	-1	1	1	-1	1	16.67	23	-2	0	0	0	0	15.75
8	1	1	1	-1	-1	16.81	24	2	0	0	0	0	16.05
9	-1	-1	-1	1	-1	15.06	25	0	-2	0	0	0	15.97
10	1	-1	-1	1	1	17.09	26	0	2	0	0	0	16.30
11	-1	1	-1	1	1	16.19	27	0	0	-2	0	0	17.02
12	1	1	-1	1	-1	15.80	28	0	0	2	0	0	17.15
13	-1	-1	1	1	1	15.08	29	0	0	0	-2	0	17.06
14	1	-1	1	1	-1	17.09	30	0	0	0	2	0	17.18
15	-1	1	1	1	-1	15.49	31	0	0	0	0	-2	17.21
16	1	1	1	1	1	17.85	32	0	0	0	0	2	16.92

由表 6 方差分析得知, 回归模型的 F-检验极显著, 说明所拟合的二次回归方程合适。回归方程的一次项(99.33%)和二次项(99.97%)F-检验极显著, 交互项(90.95%)F-检验显著。说明响应面分析所选 5 个因素的主效应显著。不同因素之间的交互效应不同, 其中 X₁ 与 X₂, X₁ 与 X₅, X₂ 与 X₅ 相互间

的交互作用较大, 响应面分析的立体图和等高线图见图 1~3。由图 1~3 可直观看出, 在 X₁, X₂, X₅ 的取值范围内有一最佳值与响应面的最大值相对应。结合表 7 可知, 当 X₁ = 0.871, X₂ = 0.1955, X₅ = 1.2146 时, L-亮氨酸的产量最大, 最大产量为 18.07。
2.2.4 二次拟合响应面的分析 对全变量二次回归

表 5 回归方程偏回归系数的估计值
Table 5 Estimated values of regressive coefficient in regression equation

参数 Parameter	参数估计值 Parameter estimated value	标准误差 Standard error	T 检验 T-test	概率> T Prob> T	参数 Parameter	参数估计值 Parameter estimated value	标准误差 Standard error	T 检验 T-test	概率> T Prob> T
β_0	17.835	0.177	101.000	0.000 0	β_{33}	-0.186	0.082	2.276	0.043 8
β_1	0.404	0.090	4.473	0.000 9	β_{14}	0.183	0.111	1.649	0.127 4
β_2	0.231	0.090	2.555	0.026 8	β_{24}	-0.179	0.111	-1.615	0.134 6
β_3	0.083	0.090	0.913	0.380 8	β_{34}	0.064	0.111	0.576	0.576 2
β_4	-0.104	0.090	-1.153	0.273 4	β_{44}	-0.177	0.082	-2.169	0.052 9
β_5	0.093	0.090	1.024	0.328 0	β_{15}	0.251	0.111	2.270	0.044 3
β_{11}	-0.482	0.082	-5.901	0.000 1	β_{25}	0.238	0.111	2.146	0.055 0
β_{12}	-0.218	0.111	-1.977	0.073 7	β_{35}	-0.040	0.111	-0.361	0.724 6
β_{22}	-0.424	0.082	-5.182	0.000 3	β_{45}	0.171	0.111	1.547	0.150 0
β_{13}	0.104	0.111	0.937	0.368 6	β_{55}	-0.191	0.082	-2.337	0.039 4
β_{23}	-0.085	0.111	-0.768	0.458 6					

注: Y 平均值:16.739 7; 误差标准差:0.442 7; 决定系数 R^2 :0.912 9。

Note: Mean value of Y:16.739 7; Standard deviation of error:0.442 7; Coefficient of determination R^2 :0.912 9.

表 6 方差分析表
Table 6 Table for variance analysis

方差来源 Source variance	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	F 值 F value	概率>F Prob>F
回归 Regression	20	22.597 7	5.766	0.002 4 a
一次项 Once item	5	5.828 4	5.949	0.006 7 a
二次项 Quadratic item	5	12.199 4	12.451	0.000 3 a
交互项 Alternating item	10	4.569 9	2.332	0.090 5 a
残差 Residual	11	2.155 6	—	—

注: 显著水平 90% Note: Significant at 90%

模型进行规范形式分析(canonical analysis, 又称典范形式分析), 考察所拟合响应曲面的形状。SAS 运行结果如表 7。

由响应面的规范分析可知, 回归模型存在稳定点, 稳定点为最大值。Y 的最大估计值为 18.07。根据表 7 各因素的对应值和 2.2.1 所列的 5 个公式, 可以计算出 5 个主要因素的最佳水平值, 分别为葡萄糖(ξ_1)129.36 g/L, 玉米浆(ξ_2)40.98 mL/L, 醋酸铵(ξ_3)22.06 g/L, 硫酸铵(ξ_4)23.59 g/L, 谷氨酸

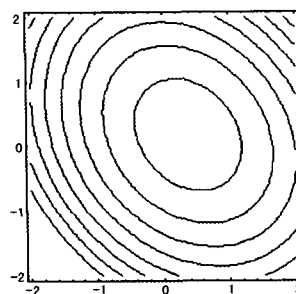
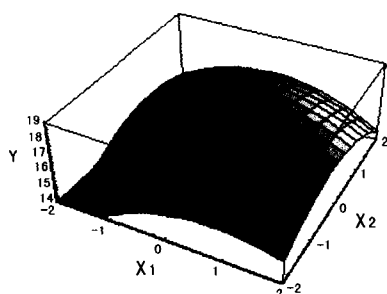


图 1 $Y=f(X_1, X_2)$ 响应面立体图和等高线图

Fig. 1 Three-dimensional and contour line figure of response surface analysis for $Y=f(X_1, X_2)$

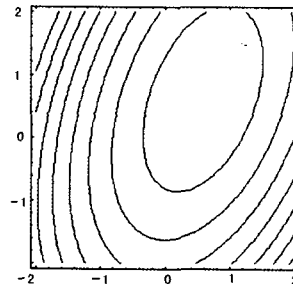
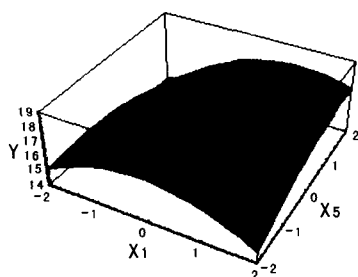


图 2 $Y=f(X_1, X_5)$ 响应面立体图和等高线图

Fig. 2 Three-dimensional and contour line figure of response surface analysis for $Y=f(X_1, X_5)$

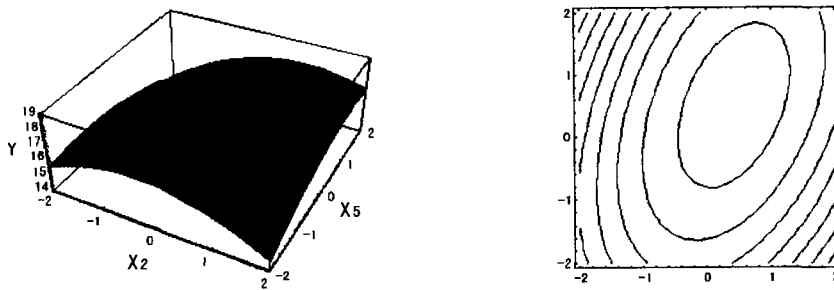
图 3 $Y=f(X_2, X_5)$ 响应面立体图和等高线图Fig. 3 Three-dimensional and contour line figure of response surface analysis for $Y=f(X_2, X_5)$

表 7 响应面的规范分析

Table 7 Canonical analysis of respond surface

因素 Factors	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	估计值 Estimated value	稳定点类型 Type of stable-point
临界值 (未编码) Critical value (Uncoded)	0.8710	0.1955	0.4122	0.7168	1.2146	18.07	最大值 Maximum value

表 8 验证试验结果

Table 8 Results of checking experiment

摇瓶编号 Flask No.	优化前 Before optimization					优化后 After optimization						
	1	2	3	4	5	平均值 Average	6	7	8	9	10	平均值 Average
L-亮氨酸产量 Yield of L-leucine (g/L)	16.95	17.06	16.93	16.89	17.01	16.97	18.05	18.15	17.93	18.02	18.09	18.05

(ξ_5)0.42 g/L。考虑到试验的实际情况,上述 5 个因素的实际水平分别取 130 g/L、41 mL/L、22 g/L、24 g/L 和 0.42 g/L。根据上述结果,优化后发酵培养基配比为 (g/L): 葡萄糖 130, 玉米浆 41 mL, NH_4Ac 22, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 24, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 0.4, MnSO_4 0.01, FeSO_4 0.01, Met 0.5, Glu 0.42, Ile 0.06, VB1 300 μg , V_H 50 μg , CaCO_3 20(分消)。

对优化后发酵培养基进行了验证试验,并与优化前作比较,摇瓶发酵 72 h 的试验结果列于表 8。

分析表 8 结果可知,由回归方程所得出的最高产酸量的预测值与验证试验的平均值很接近,说明回归方程能够比较真实地反映各筛选因素对 L-亮氨酸发酵产酸的影响。

3 小结

(1)应用 Plackett-Burman 设计试验法从 L-亮氨酸基础发酵培养基的 10 种主要成份中筛选出 5 种重要成分:玉米浆、葡萄糖、醋酸铵、谷氨酸、硫酸铵。

(2)应用响应面分析试验法确定玉米浆等 5 种重要成分的最适用量,从而优化出摇瓶分批发酵培

养基的最佳组成为 (g/L): 葡萄糖 130, 玉米浆 41 mL, NH_4Ac 22, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 24, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 0.4, MnSO_4 0.01, Met 0.4, Ile 0.05, Glu 0.42, VB1 300 μg , V_H 50 μg , CaCO_3 30(分消), pH7.0。

参考文献:

- Hui DF(惠大丰), Jiang CJ(姜长鉴). 1996. 统计分析系统 SAS 软件实用教程[M]. 北京:北京航空航天大学出版社:83.
- Hu LP(胡良平). 2001. Windows SAS 6.12 & 8.0 实用统计分析教程[M]. 北京:军事医学科学出版社:183.
- Liu JJ(刘建军), Zhao XY(赵祥颖), Tian YJ(田延军), et al. 2004. Application of L-Leucine and the breeding idea(L-亮氨酸的应用及其生产菌的育种思路)[J]. *Amino Acids & Biotic Resource* (氨基酸和生物资源), 26(1):49-52.
- Li C, Bai J, Cai Z, et al. 2002. Optimization of cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology[J]. *Biotechnol*, 93:27-34.
- Ou HY(欧宏宇), Jia SR(贾士儒). 2001. The application of SAS system in optimization of microbial culture conditions (SAS 软件在微生物培养基优化中的应用)[J]. *J Tianjin Univ Light Industry* (天津轻工业学报), 3:14-17.
- Ooijkaas L P, Wilkinson E C, Tramper J, et al. 1999. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs[J]. *Biotechnol Bioeng*, 64(1):92-100.

(下转第 701 页 Continue on page 701)

- Qi YC(齐迎春), Hu C(胡 诚), Tian GZ(田国政), *et al.*. 2001. Comparison analysis of nutritive composition from the stem and leaf of *Houttuynia cordata* (鱼腥草茎叶营养成分对比分析)[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research* (特产研究), 4:45-46.
- Qi YC(齐迎春), Tian GZ(田国政), Mou LQ(牟利权). 2002. Studies on dynamic changes of nutrients in *Houttuynia cordata* Thunb. cultivated in different seasons(不同季节鱼腥草营养成分的动态变化研究)[J]. *J Hubei Institute for Nationalities(Nat Sci)* (湖北民族学院学报自然科学版), 20(40):24-25.
- Qiao CZ(乔传卓), Wu MS(吴美枢), Dai FB(戴富宝), *et al.*. 1989. Studies on polyploid breeding of *Isatis indigotica* Fort (菘蓝多倍体育种的研究)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 31(9):678.
- Ren YC(任玉翠), Zhou YG(周彦钢), Ling WJ(凌文娟), *et al.*. 1998. Preparation of the nutritional liquid of the *Houttuynia cordata* (鱼腥草营养液的研制)[J]. *Food & Machinery* (食品与机械), 1:13-14.
- Wu SQ(吴三桥), Li XS(李新生), Zhou JJ(周建军). 2000. Determination of amino acids and other nutritious component in *Osmunda japonica* Thunb. and *Houttuynia cordata* Thunb. (蕺菜、蕺菜中氨基酸及其他营养素含量的测定)[J]. *Amino Acids & Biotic Res* (氨基酸和生物资源), 22(3):65-67.
- Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良), Yang RW(杨瑞武), *et al.*. 2003a. Variation of the chromosome number and cytotoxicity of *Houttuynia cordata* from China(国产蕺菜的染色体数目变异及核穿壁现象)[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 41(3):245-257.
- Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈 黎), *et al.*. 2002. Isozymes variations among the germplasm resource of *Houttuynia* in Sichuan(川产鱼腥草种质资源的同工酶分析)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), 25(10):695-698.
- Wu W(吴 卫), Zheng Y(郑有良), Chen L(陈 黎), *et al.*. 2002. RAPD analysis on the germplasm resources of herba *Houttuynia* (鱼腥草种质资源的 RAPD 分析)[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 37(12):986-992.
- Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈 黎), *et al.*. 2003. Analysis on genetic diversity of germplasm resources of *Houttuynia cordata* by ISSR marker(利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性)[J]. *World Sci Tech-Modern Trad Chin Med* (世界科学技术-中药现代化), 5(1):70-77.
- Yang XS(杨小生), Kang WY(康文艺), Liang DN(梁东妮). 2001. Health beverage including *Houttuynia cordata* Thunb. and *Ligustrum robustum* (鱼腥草苦丁茶保健饮料)[J]. *Food Sci Tech* (食品科技), 06:44-45.
- Yang YX(杨玉霞), Wu W(吴 卫), Zheng YL(郑有良). 2003. Study on comparative anatomy of different population of *Houttuynia* (蕺菜属不同居群间比较解剖学研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), 23(5):429-435.
- Zhu ZY(祝正银), Zhang SL(张士良). 2001. A new species of *Houttuynia* medicinal plants in Emeishan(峨眉山蕺菜属药用植物一新种)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 21(1):1-2.

(上接第 696 页 Continue from page 696)

- Ren FL(任凤莲), Gu FF(谷芳芳), Wu ML(吴梅林), *et al.*. 2006. Optimization of extraction for flavonoids from Hawthorn by response surface method(利用响应面分析法优化山楂中总黄酮提取条件)[J]. *Nat Product Res Development* (天然产物研究与开发), 18:126-129.
- Song CX(宋超先), Chen N(陈 宁), Xie YF(谢玉锋), *et al.*. 2004. Selection of L-leucine producing strain and study on its fermentation conditions(L-亮氨酸产生菌的选育及其发酵条件优化)[J]. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 3:61-65.
- Wei AC(魏安池), Dai LH(代丽红), Gu WY(谷文英). 2006. Optimization of extraction conditions for safflower yellow pigments by response surface methodology(响应面分析法优化黄色素提取工艺条件)[J]. *Food & Machinery* (食品与机械), 22(2):11-13, 52.
- Wu SH(伍时华), Li JS(李军生), Yu W(余 炜), *et al.*. 2003. A study of the method of determining the amount of L-leucine in fermented liquid(发酵液 L-亮氨酸的定量测定方法研究——纸色谱—薄层扫描测定法)[J]. *J Guangxi Univ Tech* (广西工学院学报), 14(3):1-4.
- Wu SH(伍时华), Zhang J(张 健), Fang J(方 杰), *et al.*. 2001. Studies on the breeding of high-yield L-leucine producing strain by protoplast fusion(原生质体融合技术选育 L-亮氨酸产生菌的研究)[J]. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 27(10):30-34.
- Wong MY. 1996. On the statistical analysis of bioassays[J]. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 49:191-197.
- Zhong HY(钟环宇), Xu JJ(许建军), Jiang B(江 波). 2004. Medium optimization for S-adenosyl-L-methionine production by recombinant *Pichia* using statistics-based experimental design(利用响应面分析法优化 γ -氨基丁酸发酵培养基)[J]. *J Wuxi Univ Light Industry* (无锡轻工大学学报), 23(3):19-22.
- Zheng Y, Das P K. 2000. Improved response surface method and its application to stiffened plate reliability analysis[J]. *Engineering Structures*, 22:544-551.