

# *Bacillus* sp. fmbJ224 发酵产新型抗菌肽培养基的优化研究 Media Optimization for the Novel Antimicrobial Peptide by *Bacillus* sp. fmbJ224

沈 娟 陆兆新\* 别小妹 吕凤霞 黄现青

SHEN Juan, LU Zhao-Xin\*, BIE Xiao-Mei, LÜ Feng-Xia and HUANG Xian-Qing

南京农业大学食品科技学院, 南京 210095

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**摘 要** 采用 Plackett-Burman 设计(Plackett-Burman Design, PB)法,对影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 产新型抗菌肽的 17 个因素进行了筛选。结果表明,影响该菌发酵产新型抗菌肽的主要培养基成分为葡萄糖、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、谷氨酸、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$ 。在此基础上,再采用响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)对其 5 个显著因子的最佳水平范围进行研究。通过对二次多项回归方程求解得知,在上述自变量分别为葡萄糖 8.13g/L、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6.14g/L、谷氨酸 4.2g/L、 $\text{CaCl}_2$  3.98mg/L、 $\text{MnSO}_4$  4.87mg/L 时,新型抗菌肽的产量从 1304.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$  提高到了 1487.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词** *Bacillus* sp. fmbJ224, 新型抗菌肽, Plackett-Burman 设计, 响应曲面法(RSM), 旋转中心组合设计

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0609-06

**Abstract** The novel antimicrobial peptide in submerged fermentation by *Bacillus* sp. fmbJ224 is strongly influenced by many internal and external factors, namely medium constituents and fermentation conditions. In this study, Plackett-Burman design was undertaken to evaluate the effects of the seventeen factors. By the statistical regression analysis, the significant factors affecting the novel antimicrobial peptide in submerged fermentation by *Bacillus* sp. fmbJ224 were determined as follows: glucose,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , glutamic acid,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ . In the second phase of the optimization process, a response surface methodology (RSM) was used to optimize the above critical internal factors, and to find out the optimization concentration levels and the relationships between these factors. By solving the quadratic regression model equation using appropriate statistic methods, the optimal concentration of the variables were determined as: 8.13g/L glucose, 6.14g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 4.2g/L glutamic acid, 3.98mg/L  $\text{CaCl}_2$ , 4.87 mg/L  $\text{MnSO}_4$ . The content of the novel antimicrobial peptide was increased from 1304.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 1487.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The experimental data under various conditions have validated the theoretical values.

**Key words** *Bacillus* sp. fmbJ224, novel antimicrobial peptide, Plackett-Burman design, response surface methodology (RSM), central composite rotatable design

随着人们对食品安全的日益重视,以天然防腐剂替代传统的防腐剂已成为当今国际食品添加剂发

展的主要方向。但由于大多数天然防腐剂抑菌谱窄,抑菌效果不够理想<sup>[1]</sup>,从而限制了它在食品中的

Received: March 1, 2005; Accepted: May 11, 2005.

This work was supported by a grant from High-Tech Fund of Jiangsu Province of China (No. BG2003311).

\* Corresponding author. Tel: 86-25-84395683; E-mail: fmb@njau.edu.cn

江苏省高新技术基金资助项目(No. BG 2003311)

广泛应用。本实验室在近几年研究工作中发现了一株 *Bacillus* sp. fmbJ 产生的抗菌肽具有很广的抑菌谱,对食品中主要的革兰氏阳性菌(蜡样芽孢杆菌,藤黄微球菌)、革兰氏阴性菌(荧光假单胞菌,大肠杆菌)和霉菌(黑根霉,黑曲霉,点青霉和总状毛霉)都具有显著的抑制效果。经研究表明该抗菌肽分子量为 1447kD,为一种新型的抗菌肽<sup>[2]</sup>。本研究旨在通过应用响应曲面来优化其发酵培养基,以提高该新型抗菌肽的含量(Antimicrobial Peptide Concentration, APC),为其进一步研究打下基础。

Plackett-Burman(PB)设计法是一种两水平的试验设计方法。它可以利用最少的试验次数,从众多的考察因素中快速有效地筛选出主要的影响因子,故而被广泛地用于因子主效应的估计中<sup>[3]</sup>。响应面法(Response surface methodology, RSM)是一种优化生物过程的综合技术,采用该法可以建立连续变量曲面模型<sup>[4-5]</sup>,可同时对影响生物产量的各因子水平及其交互作用进行优化与评价<sup>[6]</sup>。因此它可快速有效地确定多因子系统的最佳条件<sup>[7-8]</sup>。该法已经广泛地应用于各类培养基以及发酵条件的优化实践中<sup>[9-11]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

*Bacillus* sp. fmbJ 诱变菌株(*Bacillus* sp. fmbJ224)本实验室保存。

### 1.2 培养基及培养条件

**1.2.1 培养基:**基础种子培养基(g/L):牛肉膏 5, NaCl 5, 蛋白胨 10, 蒸馏水 1000mL, pH7.2~7.4。原始培养基:Landy 培养基<sup>[12]</sup>。Plackett-Burman 实验发酵培养基(g/L):按照实验设计表 1 配置,蒸馏水 100mL, pH7.0。RSM 实验发酵培养基(g/L):按照实验设计配置,蒸馏水 100mL, pH7.0。

**1.2.2 培养方法:**取斜面菌种到种子液培养基, 37℃, 130r/min, 培养 24h 后,以 5%(V/V)的接种量接入发酵培养基,装液量为 250mL 三角瓶装 100mL, 30℃~35℃, 150~180r/min 培养 72h。

### 1.3 抗菌肽含量的测定

抗菌肽含量的测定采用 HPLC 法,色谱条件:Agilent C<sub>18</sub> 柱(250nm×4.6mm);流动相:乙腈-水(体积比为 1:4),三氟乙酸 0.2%;流速:0.5mL/min;检测波长:230nm;柱温 25℃;进样量:20μL。经过 HPLC 得到的纯品作出峰面积与浓度之间的标准曲线,样品在 230nm 的峰面积代入标准曲线换算得到

抗菌肽的含量。

### 1.4 实验设计

**1.4.1 Plackett-Burman 实验设计:**根据芽孢杆菌生长所需营养要素的一般原则以及微生物发酵影响因素的一般规律,结合有关该方面的文献报道<sup>[13]</sup>和笔者的前期实验,本研究的实验设计、数据分析及模型建立皆采用 JMP 软件(version 4.0.5, SAS Institute Inc.)来进行,所选取的响应值为抗菌肽含量,自变量及其代号、编码和水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 实验因素水平及编码

Table 1 Level and code of variables chosen for Plackett-Burman design

Variable	Symbol	Coded levels	
		-1	1
Glucose (g/L)	X <sub>1</sub>	5	10
Saccharose (g/L)	X <sub>2</sub>	2	5
Maltose (g/L)	X <sub>3</sub>	2	5
Corn flour (g/L)	X <sub>4</sub>	2	5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (g/L)	X <sub>5</sub>	1	5
Yeast extract (g/L)	X <sub>6</sub>	1	2.5
Beef extract (g/L)	X <sub>7</sub>	1	2.5
Defatted soybean (g/L)	X <sub>8</sub>	1	2.5
Glutamic acid (g/L)	X <sub>9</sub>	3	7
L-phenylalanine (mg/L)	X <sub>10</sub>	2.5	5
KCl (g/L)	X <sub>11</sub>	0.25	0.5
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	X <sub>12</sub>	0.25	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	X <sub>13</sub>	0.5	1
CaCl <sub>2</sub> (mg/L)	X <sub>14</sub>	1	5
MnSO <sub>4</sub> (mg/L)	X <sub>15</sub>	2	6
CuSO <sub>4</sub> (mg/L)	X <sub>16</sub>	0.08	0.16
FeSO <sub>4</sub> (mg/L)	X <sub>17</sub>	0.075	0.15

上表中自变量编码方程为: $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$  式中  $x_i$  为自变量的编码值,  $X_i$  为自变量的实际实验水平值,  $X_0$  为实验水平中心点的实际值,  $\Delta X_i$  为单变量增量。

**1.4.2 响应曲面(RSM)实验设计:**筛选出影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽的关键因子以后,采用旋转中心组合设计(Central Composite Rotatable Design, CCRD)法,对其关键因子进行进一步研究,以获得影响该菌发酵产抗菌肽的最佳培养基。

由 Plackett-Burman 实验结果可知影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽的关键因子为葡萄糖、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、谷氨酸、CaCl<sub>2</sub>、MnSO<sub>4</sub>,因此在本阶段将这 5 个因子作为考虑的变量。诸因子实验水平编码分别为 2, 1, 0, 1, 2, 见表 2。

表 2 旋转中心组合设计实验因素水平及其编码表

Table 2 Level and code of variables for CCRD

Variable	Symbol		Coded level				
	Uncoded	Coded	-2	-1	0	+1	+2
Glucose/(g/L)	$X_1$	A	3	6	9	12	15
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ /(g/L)	$X_2$	B	1	3	5	7	9
Glutamic acid/(g/L)	$X_3$	C	2	4	6	8	10
$\text{CaCl}_2$ /(mg/L)	$X_4$	D	0.5	2.5	4.5	6.5	8.5
$\text{MnSO}_4$ /(mg/L)	$X_5$	E	1	3	5	7	9

In developing the regression equation, the six experimental variable were:  $A = (X_1 - 9) / 3$ ,  $B = (X_2 - 5) / 2$ ,  $C = (X_3 - 6) / 2$ ,  $D = (X_4 - 4.5) / 2$ ,  $E = (X_5 - 5) / 2$

## 2 结果与讨论

### 2.1 影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽的关键因素的确定

利用 JMP 软件对 Plackett-Burman 试验结果进行方差分析(见表 3),由表可知,该模型显著。通过回归系数显著性可知,葡萄糖( $P = 0.0102$ ), $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $P = 0.0003$ ),谷氨酸( $P = 0.0002$ ), $\text{CaCl}_2$ ( $P = 0.0005$ ), $\text{MnSO}_4$ ( $P = 0.0486$ )它们都在 95% 的概率水平上差异显著,其它因子对 95% 的概率水平上差异均不显著。因此,选择葡萄糖、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、谷氨酸、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$  作为影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽的关键因素,进一步研究它们对产抗菌肽的影响。其他可信度较小的因素对产抗菌肽无明显影响,在下一步的培养基优化中可不予考虑。

表 3 抗菌肽回归方程方差分析表

Table 3 ANOVA for the regression equation of antimicrobial peptide

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob > F
Model	2345238.1	17	137955	15.5388	< 0.0014
Error	53268.6	6	8878		
Cor total	2398506.7	23			

$R = 0.989$   $R^2 = 0.978$   $R_{\text{adj}}^2 = 0.915$

### 2.2 响应面优化 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽的培养基

**2.2.1 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽多元二次模型方程的建立及检验**:从以上 PB 实验可知,葡萄糖、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、谷氨酸、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$  影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽,选择以上 5 个因子为研究对象,以抗菌肽含量为响应值,设计旋转中心组合实验。根据实验设计表进行了 32 组实验,其结果见表 4。

表 4 旋转中心组合设计及其抗菌肽含量的实测值与预测值

Table 4 CCRD matrix of the variables and the actual and predicted values of APC

Trial No.	APC( $\mu\text{g/mL}$ )		Trial No.	APC( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Actual	Predicted		Actual	Predicted
1	515.70	532.09	17	523.81	478.28
2	161.02	138.74	18	458.95	390.11
3	1194.67	1174.91	19	540.02	499.56
4	418.42	449.00	20	702.16	628.26
5	357.62	374.51	21	1310.19	1343.02
6	728.51	795.74	22	1188.59	1041.38
7	576.51	646.27	23	560.29	522.53
8	181.29	212.37	24	438.69	362.08
9	315.06	296.65	25	722.43	754.25
10	515.70	547.63	26	965.64	819.45
11	631.23	665.69	27	1452.06	1418.09
12	805.53	801.31	28	1431.80	1418.09
13	266.41	337.53	29	1346.67	1418.09
14	690.00	722.44	30	1421.66	1418.09
15	116.43	151.40	31	1474.36	1418.09
16	73.87	159.17	32	1267.63	1418.09

通过 Design expert 软件对表 4 实验数据进行二次多项回归拟合,获得 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽对葡萄糖、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、谷氨酸、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$  多元回归方程为:

$$Y = 1418.09 - 22.04A + 32.17B - 75.14C - 40.11D + 16.30E - 245.97A^2 - 213.55B^2 - 56.47C^2 - 243.95D^2 - 157.81E^2 - 105.01AB + 69.54AC + 119.45AD - 6.71AE - 164.80BC - 48.01BD - 68.78BE - 42.18CD + 43.45CE - 49.02DE$$

式中, $Y$  为抗菌肽含量的预测值, $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ 、 $E$  分别为葡萄糖、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、谷氨酸、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$  的编码值。

从该方程的方差分析表 5 可见,该模型极显著( $P < 0.0001$ )失拟项在  $\alpha = 0.1$  水平上不显著( $P = 0.1453 > 0.1$ ),预测值与实测值之间具有高度的相关性( $R = 0.9892$ ),仅有约 6% 的抗菌肽变异不能由该模型解释( $R_{\text{adj}}^2 = 0.9395$ )。

上述方程的回归系数显著性检验表明:试验各因素对抗菌肽的曲面响应皆显著,谷氨酸对抗菌肽的线性效应显著;葡萄糖与  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,葡萄糖与  $\text{CaCl}_2$ ,葡萄糖与谷氨酸, $\text{NH}_4\text{NO}_3$  与谷氨酸, $\text{NH}_4\text{NO}_3$  与  $\text{MnSO}_4$  的交互作用影响显著,而其他两两交互效应不显著。

表5 抗菌肽二次多项模型方差分析表

Table 5 Variance analysis for the fitted quadratic polynomial of APC

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob > F
Model	5860000	20	293000	25.08	< 0.0001
Lack of fit	98421.36	6	16403.56	2.73	0.1453
Pure error	30080.12	5	6016.02		
Cor total	5987700	31			

$R = 0.9892$   $R^2 = 0.9785$   $R_{Adj}^2 = 0.9395$

2.2.2 *Bacillus* sp. fmbJ224 产抗菌肽响应面交互作用分析与优化: 多元二次回归方程所作出的响应曲面图及其等高线图见图 1~图 5, 各因素及其交互作用对响应值的影响结果可通过该组图直观反映出来。

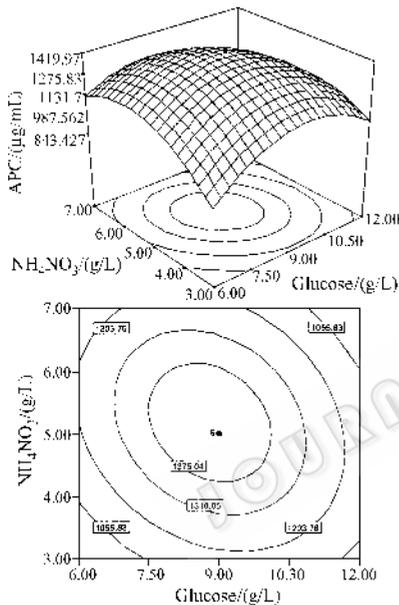
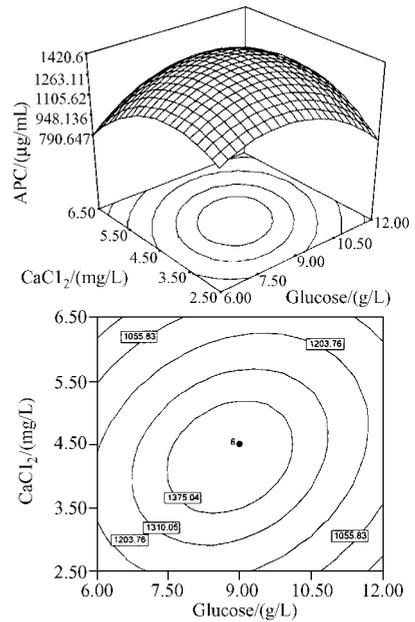
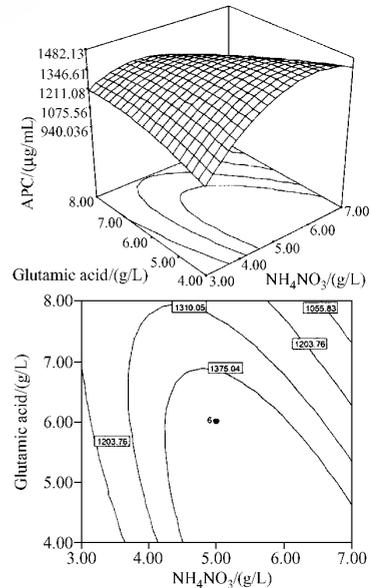
图1 葡萄糖与  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  交互影响抗菌肽的曲面图及等高线图Fig. 1 Response surface plot and its corresponding contour plot of APC versus glucose and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 

图 1 显示了  $\text{CaCl}_2$ 、谷氨酸和  $\text{MnSO}_4$  位于中心水平时,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和葡萄糖对 *Bacillus* sp. fmbJ224 菌株产生抗菌肽交互作用的 3-D 图及等高线图。由图可以看出此两因素交互作用较显著<sup>[14]</sup>。随着葡萄糖和  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度的升高, 抗菌肽的产量也逐步提高,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和葡萄糖似乎存在着协同效应, 即在一定浓度区域内, 只有两种物质浓度同时升高或同时降低时, 才能相对多地积累生成较多的抗菌肽。如图在本次试验水平范围内,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和葡萄糖的浓度在 4.25g/L ~ 6.10g/L 和 7.50g/L ~ 10.10g/L 范围内时, 抗菌肽含量可以达到本次实验中的最大值以上。这

图2 葡萄糖与  $\text{CaCl}_2$  交互影响抗菌肽的曲面图及等高线图Fig. 2 Response surface plot and its corresponding contour plot of APC versus glucose and  $\text{CaCl}_2$ 图3 谷氨酸与  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  交互影响抗菌肽的曲面图及等高线图Fig. 3 Response surface plot and its corresponding contour plot of APC versus glutamic acid and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 

充分说明了菌体的生长繁殖和产物合成需要合适的碳氮比,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  过多, 菌体生长过盛, 不利于产物的积累;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  过少, 则菌体繁殖量少, 从而影响产量。而葡萄糖浓度太高, 会加速菌体的呼吸, 以至培养基中的溶解氧不能满足需要, 使一些中间代谢产

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

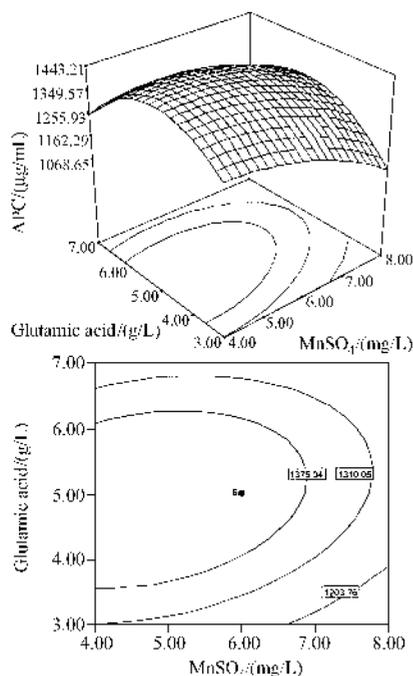


图4 谷氨酸与  $\text{MnSO}_4$  交互影响抗菌肽的曲面图及等高线图

Fig.4 Response surface plot and its corresponding contour plot of APC versus glutamic acid and  $\text{MnSO}_4$

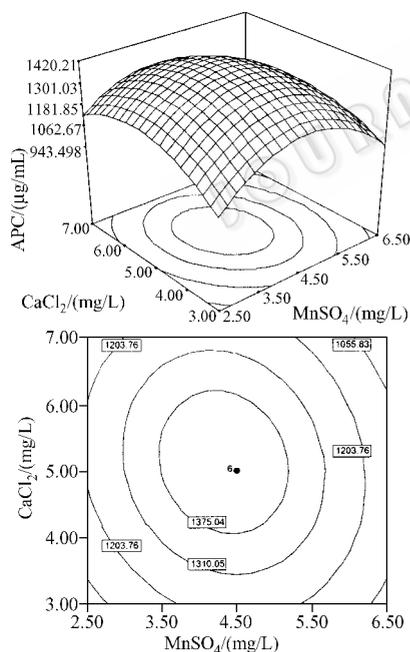


图5  $\text{CaCl}_2$  与  $\text{MnSO}_4$  交互影响抗菌肽的曲面图及等高线图

Fig.5 Response surface plot and its corresponding contour plot of APC versus  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MnSO}_4$

物不能完全氧化而积累在菌体或培养基中,导致 pH 值下降,影响某些酶的活性,从而抑制微生物的生长和产物的合成、积累。浓度太低又会引起菌体的衰老和自溶。

同样,如此的协同作用也表现在图 2 和图 5 中,即葡萄糖与  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$  与  $\text{CaCl}_2$  对 *Bacillus* sp. fmbJ224 菌株产抗菌肽的交互影响。 $\text{Ca}^{2+}$  虽然不参与细胞的组成,但能控制细胞透性,对微生物的生长有着重要的影响。而从图可知,葡萄糖与  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$  与  $\text{CaCl}_2$  分别保持在 7.45g/L ~ 10.10g/L、3.40mg/L ~ 5.15mg/L、3.45mg/L ~ 5.10mg/L、4.10 mg/L ~ 6.20 mg/L 范围内时,所能获得的抗菌肽产量不低于 1375.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

而图 3 显示了其它因子处于中心水平时,谷氨酸与  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  交互影响抗菌肽的曲面图及等高线图。由图可知,随着  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度的升高,抗菌肽的产量也逐步提高,这说明  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  作为一种速效氮源,有利于菌体的快速生长,同时培养液中留下的  $\text{SO}_4^{2-}$  使 pH 值不会偏碱性,有利于抗菌肽的积累。而谷氨酸随着  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度的增加,对抗菌肽产量的影响却逐渐减小,两者存在一定的拮抗性。如图示,欲获得最大的抗菌肽产量,所需  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  的浓度需在 4.25g/L ~ 7.00g/L 范围内,而谷氨酸的浓度则须在 4.00g/L ~ 6.90 g/L 范围内。

谷氨酸与  $\text{MnSO}_4$  对抗菌肽的交互影响效应见图 4。由图可见,随着谷氨酸浓度的增大,抗菌肽的含量增加,当其浓度在 3.55g/L ~ 6.25g/L 时,抗菌肽可达到本次实验的最大值,这表明谷氨酸可能是抗菌肽合成所需求的,其促进抗菌肽合成所需酶的大量产生,或者对酶的活性中心产生影响。 $\text{Mn}^{2+}$  能够促进脂肽类抗菌肽的产生,但从图可见,随着  $\text{MnSO}_4$  浓度的增加反而抑制了抗菌肽的产生,在 4.00mg/L ~ 6.80 mg/L 时,产生的抗菌肽可达到本次实验的最大值。

### 3 结论

培养基的内在条件(培养基的组成、浓度)及外在条件(发酵温度、时间、通气量等)都会影响微生物的生长与代谢产物的积累。为了提高 *Bacillus* sp. fmbJ224 发酵产抗菌肽产量的提高。本研究首先应用 Plackett-Burman 实验设计,对影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 发酵产抗菌肽的诸多因子进行了评价,筛选出了影响发酵产抗菌肽的主要内在因素,省时省力,快速有效。

在 Plackett-Burman 实验的基础上,通过响应曲面法对主要影响因子进行优化与评价,并能得到影响 *Bacillus* sp. fmbJ224 发酵产抗菌肽的二次多项数

学模型,并利用统计学方法对该模型进行了显著性检验。通过对该模型进行求导和解逆矩阵可知,在各因素分别为葡萄糖 8.13g/L、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6.14g/L、谷氨酸 4.2g/L、 $\text{CaCl}_2$  3.98mg/L、 $\text{MnSO}_4$  4.87mg/L 时,可获得大量的抗菌肽的含量,预测值为  $1482.31\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在此条件下再进行验证实验,得出抗菌肽的产量为  $1487.58\mu\text{g}/\text{mL}$ ,而在原来的 Landy 培养基上该抗菌肽产量为  $1304.21\mu\text{g}/\text{mL}$ ,产量提高显著。由此可见,应用 RSM 进行优化不仅经济有效,而且科学合理。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Xu BC (徐宝才). Research progress in natural antiseptics in food. *Food & Machinery*, 2001, **83** (3): 224 - 228
- [ 2 ] Bie XM, Lu ZX, Lu FX *et al.* Screening the main factors affecting extraction of the antimicrobial peptide from *Bacillus* sp. fmbJ using Plackett-Burman method. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (accepted 2004.12)
- [ 3 ] Yu X, Hallet SG, Sheppard J *et al.* Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Appl Microbiol. Biotechnol*, 1997, **47** 301 - 305
- [ 4 ] Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan. *Bioproc Eng*, 2000, **23** 451 - 455
- [ 5 ] Reddy PRM, Reddy G, Seenayya G. Production of thermostable pullulanase by *Clostridium* the rnosulfuro genes SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrients levels using response surface methodology. *Bioproc Eng*, 1999, **21** 497 - 503
- [ 6 ] Miller A, Sitter RR. Using the folded-over 12-run Plackett-Burman design to consider interactions. *Technometrics*, 2001, **3** 44 - 54
- [ 7 ] Ambat P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface methods. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, **17** 331 - 335
- [ 8 ] Ratnam BVV, Rao M Narasimha, Rao M Dmodar Rao *et al.* Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2003, **19** 523 - 526
- [ 9 ] Lai Ist, Pan CC, Tzeng BK. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Proc Biochem*, 2003, **38** 1314 - 1326
- [ 10 ] Azaola A, Bustamante P, Huerto S *et al.* Use of response surface methodology to describe biomass production of *Bifidobacterium infantis* in complex media. *Biotechnology Techniques*, 1999, **13** 93 - 95
- [ 11 ] Chen QH, He GQ, Mokhtar AMA. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. *Enzyme Microb Tech*, 2002, **30** : 667 - 672
- [ 12 ] Landy M, Warren GH, Rosenman SB *et al.* Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1948, **67** 539 - 541
- [ 13 ] Zhong QP (钟青萍), She SW (余世望), Liang SY (梁胜媛). Optimization of fermentation conditions of antimicrobial substances produced by *Bacillus natto*. *Journal of Biology*, 2001, **8** (6): 19 - 21
- [ 14 ] Muralidhar RV, Chirumamila RR, Marchant R *et al.* A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochem Eng J*, 2001, **9** : 17 - 13