

食药大型真菌抗氧化活性菌株的筛选 及其培养条件优化

Screening of strain with antioxidation activity from wild macrofungi and optimization on its fermentation conditions

柴新义 于士军 张微微 杜泽虎

CHAI Xin-yi YU Shi-jun ZHANG Wei-wei DU Ze-hu

(滁州学院生物与食品工程学院, 安徽 滁州 239000)

(School of Biology and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239000, China)

摘要:对 10 种野生食药大型真菌进行具有抗氧化活性菌株的筛选,并对高效抗氧化活性菌株进行发酵培养条件的优化,为将其投入工业化生产提供依据。以发酵粗提液的 DPPH 自由基清除率为指标,采用单因素和正交试验法优化大型真菌液体发酵的培养条件,并验证。结果表明,在供试的 10 种真菌中,有 4 株具有良好的抗氧化活性,占 40%,其中以木耳 *Auricularia auricular* CZSWXY0012 的抗氧化活性为最高。最优的发酵培养条件为:葡萄糖 25 g/L,酵母膏 2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, CuSO₄ 6 mg/L, K₂HPO₄ 3.2 g/L, pH 6.0, 温度 27 ℃, 装液量 100 mL/250 mL, 发酵培养 8 d。野生食药大型真菌为天然抗氧化剂的开发和利用提供了宝贵的资源。

关键词:大型真菌;抗氧化活性;DPPH 自由基;培养条件

Abstract: The objectives of the study were to screen the strain with a good antioxidation activity from 10 species of wild macrofungi and optimize the optimal conditions for antioxidant substance production. These results can provide some references for the breeding of *Auricularia auricular* and industrialization of its production. As material with 10 strains of wild fungi from the Langyashan in Anhui province, the strains with antioxidant substance producing were obtained by DPPH free radical scavenging rate of the broth. Shake flask culture was then used to get the optimum culture conditions based on the single factor and orthogonal experiments, which is finally examined. The results showed that there were four strains with producing antioxidation activity in the samples, accounting for 40%. The strain of

Auricularia auricular has especially the higher capacity of antioxidation activity. The formula of appropriated culture conditions were as follows: glucose 25 g/L, yeast extract 2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, CuSO₄ 6 mg/L, K₂HPO₄ 3.2 g/L, pH 6.0, 27 ℃, culture volume 100 mL/250 mL, and cultivation 8 d. The metabolites of the *Auricularia auricular* have good antioxidant activity, providing a new source of natural antioxidants development.

Keywords: macrofungi; antioxidant activity; DPPH free radical; fermentation condition optimization

人体在正常的代谢过程中,产生和消除自由基的量是动态平衡的。如果自由基过剩,则会导致生物大分子的氧化损伤,从而引发多种疾病^[1]。补充含抗氧化剂的营养物质可提高机体清除自由基的能力^[2]。寻找能有效清除人体过剩自由基的抗氧化活性物质来源,用来延缓衰老及治疗有关疾病已成为现代生物、食品、医药等研究领域的热点之一^[3-5]。食药大型真菌安全天然、营养丰富、风味独特,对提高人体的免疫功能、延缓衰老等方面起着重要作用^[6]。据估计全球约有大型真菌 14 万种,被描述的约 1.4~2.2 万种^[7],中国有大型真菌约 1~2 万种,已被描述的约 8 000 种^[8]。近 10 年,对大型真菌抗氧化活性的研究主要集中在成分分离和纯化方面^[9-11],而对大型真菌抗氧化活性物质的液体发酵生产条件的优化研究却未见报道。大型真菌通过液体发酵培养,短时间内就可以获得大量的活性物质,具有生产周期短,连续工业化生产的优势^[12-13],可通过优化发酵培养条件,提升抗氧化活性产物的产量^[14-15]。本研究以采集自安徽琅琊山自然保护区的 10 种野生食药大型真菌为供试菌株,拟开展具有高效抗氧化活性菌株的筛选工作,并对筛选出的目标菌株进行发酵培养条件的优化,以提高发酵液的抗氧化活性,为今后的工业化生产和进一步深入研究积累重要的参考资料。

基金项目:安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2015A239);滁州学院生物工程科技创新团队项目(编号:CZTD201104);滁州学院科研启动基金项目(编号:2014qd047)

作者简介:柴新义(1978-),男,滁州学院副教授,博士。

E-mail: xinyianhui@163.com

收稿日期:2015-07-26

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

供试菌株包括:木耳(*Auricularia auricular*)、假灰杯伞(*Pseudoclitocybe cyathiformis*)、较小红菇(*Russula minutus*)、小托柄鹅膏菌(*Amanita farinose*)、膜盖小皮伞(*Marsmus cohortales*)、毛木耳(*Auricularia polytricha*)、安络小皮伞(*Marasmiellus androsaceus*)、绒皮地星(*Geastrum velutinum*)、橙黄小皮伞(*Marasmius aurantiacus*)、绒柄小皮伞(*Marasmius confluens*),均采自安徽省琅琊山自然保护区,由滁州学院生物与食品工程学院微生物实验室分离保藏。

1.1.2 培养基

PDA培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL,pH 自然。此培养基主要用于大型真菌菌种的培养、活化、保存等。

液体菌种培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L, $MgSO_4$ 3 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, V_{B1} 10 mg/L,pH 自然。此培养基主要用于制备液体菌种。

液体发酵基本培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 2 g/L, $MgSO_4$ 0.2 g/L, $CuSO_4$ 6 mg/L, K_2HPO_4 3.2 g/L,pH 自然。此培养基主要作为抗氧化活性菌株发酵培养条件优化的基础培养基。

1.1.3 主要试剂

葡萄糖、蔗糖、乳糖、硫酸铵等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

二苯代苦味肼基自由基(DPPH 自由基):美国 Sigma 公司。

1.1.4 主要仪器设备

超净工作台:SW-CJ-1BU 型,苏州新区枫桥净化设备厂;

立式压力蒸汽灭菌锅:BXM-30R 型,上海博讯实业有限公司;

恒温培养振荡器(摇床):HZQ-A 型,常州冠军仪器制造有限公司;

电子天平:FA1104 型,上海精科天美科学仪器有限公司;

高速离心机:IEC Multi 型,美国热电集团。

1.2 方 法

1.2.1 菌丝体发酵液的制备 制备液体发酵培养基 3 000 mL,分装至 30 个 250 mL 的三角瓶中,每瓶装液量 100 mL,于 121 °C 灭菌 20 min。灭菌后,在超净工作台用直径为 1 cm 的打孔器取平板上的一种供试菌种 3 块,接入到上述已灭菌的 1 个三角瓶中,每一菌株做 3 个重复。接种后,置于 25 °C、转速 150 r/min 的恒温培养振荡器中培养 7 d,获得含有菌丝体的发酵液。

1.2.2 菌丝体发酵粗提液的制备 将上述发酵培养得到的 10 种菌丝体的发酵液分别用 8 层无菌纱布进行过滤。过滤后的液体放置于低温离心机中离心 20 min。取上清液,在无氧条件下通过除菌滤膜,获得各菌株菌丝体发酵培养的粗提液。

1.2.3 粗提液抗氧化活性的测定 以 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率为指标。参照文献[16]的方法进行 DPPH 自由基清除能力的测定。

1.2.4 液体菌种的制备 在 500 mL 的三角瓶中装入 200 mL 的液体种子培养基,将上述筛选获得的具有高效抗氧化活性的菌株接种到液体种子培养基中,在转速为 150 r/min,温度为 25 °C 的恒温振荡器中培养 72 h。4 °C 冰箱保存,备用。

1.2.5 高效抗氧化活性菌株发酵培养条件的优化

(1) 最适碳源的筛选:以液体发酵基础培养基为基础,分别选择蔗糖、葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、麸皮、果糖作为唯一碳源,添加量均为 20 g/L,按照 10%(体积比)的接种量进行接种,设置摇床转速 150 r/min,培养温度 25 °C,培养 7 d,分别测 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率,各处理 3 个重复。

(2) 最适氮源的筛选:分别选择 $NaNO_3$ 、 NH_4Cl 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、酵母膏、蛋白胨、尿素作为唯一氮源,添加量均为 2 g/L,按照 10%(体积比)的接种量进行接种,设置摇床转速 150 r/min,培养温度 25 °C,培养 7 d,分别测 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率,各处理 3 个重复。

(3) 最适起始 pH 值的确定:分别调节起始 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,按照 10%(体积比)的接种量进行接种,设置摇床转速 150 r/min,培养温度 25 °C,培养 7 d,分别测 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率,各处理 3 个重复。

(4) 最适装液量的确定:分别以 60、80、100、120、140、160、180 mL 装入 250 mL 的三角瓶中,按照 10%(体积比)的接种量进行接种,设置摇床转速 150 r/min,培养温度 25 °C,培养 7 d,分别测 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率,各处理 3 个重复。

(5) 最适培养温度的确定:按照 10%(体积比)的接种量进行接种,设置摇床转速 150 r/min,分别以 21、23、25、27、29、31、33 °C 培养 7 d,分别测 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率,各处理 3 个重复。

(6) 最适培养时间的确定:按照 10%(体积比)的接种量进行接种,设置摇床转速 150 r/min,分别培养 4、6、8、10、12、14、16 d,分别测 100%粗提液的 DPPH 自由基清除率,各处理 3 个重复。

在上述单因素试验结果的基础上,根据 DPS 7.55 版软件进行正交试验设计。选取最优的碳源、氮源、pH 值、温度、装液量 5 个因素,每个因素选取 4 个水平,设计 $L_{16}(4^5)$ 正交试验组合。各组合 3 个重复。

1.2.6 数据处理 运用 DPS 7.55 版软件对试验数据进行处理,通过多重比较分析处理间的差异。

2 结果与分析

2.1 高效抗氧化活性菌株的筛选

试验结果表明(表 1),在供试的 10 种野生食药大型真菌中,有 4 株具有一定的抗氧化活性,占 40%,4 株大型真菌清除 DPPH 自由基的能力存在差异,其中以木耳(菌株编号: CZSWXY0012)的清除率为最高(56.53%),且与其他菌株之

表 1 4 株野生大型真菌菌株对 DPPH 自由基的清除率[†]

Table 1 Four strains of antioxidant activity on DPPH free radicals clearance

菌种	菌株编号	DPPH 自由基清除率/%
木耳	CZSWXY0012	56.53±0.24 ^{aA}
毛木耳	CZSWXY0014	40.86±0.27 ^{bB}
安络小皮伞	CZSWXY0021	24.21±0.26 ^{cC}
橙黄小皮伞	CZSWXY0022	40.64±0.20 ^{bB}

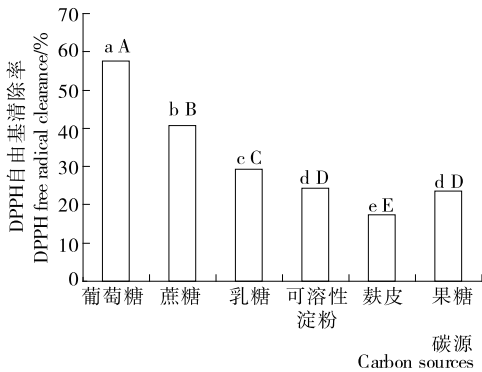
[†] 同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。

间差异极显著($P<0.01$)。因此,选择木耳 CZSWXY0012 进行发酵培养条件的优化研究。

2.2 液体发酵培养条件的优化

2.2.1 单因素试验结果与分析

(1) 最适碳源的筛选:不同单因素培养条件下木耳 CZSWXY0012 的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除能力不同。以葡萄糖为碳源时,发酵粗提液对 DPPH 自由基的清除率最高(57.66%),且与其他处理之间存在显著差异(图 1)。



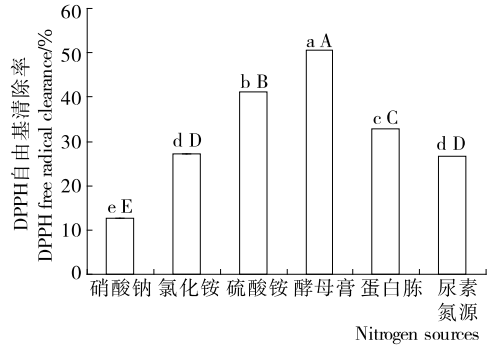
不同小写字母者表示差异达显著水平($P<0.05$),不同大写字母者表示差异达极显著水平($P<0.01$)

图 1 碳源对木耳菌株发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力的影响

Figure 1 Effect of different carbon sources on DPPH scavenging effect of fermentation of *Auricularia auricular*

(2) 最适氮源的筛选:以酵母膏作为发酵培养基的氮源时,粗提液对 DPPH 自由基的清除能力最强(50.63%),而且与其他处理之间存在极显著差异(图 2)。可见,木耳对不同氮源的吸收与利用程度不同,有些研究^[14-15,17]也表明有机氮源对大型真菌的影响优于无机氮源,这可能与有机氮源的组成成分有关,如有机氮源含有的蛋白质、肽类、游离的氨基酸和少量的糖类、脂肪和生长因子等成分,更利于真菌的吸收利用。

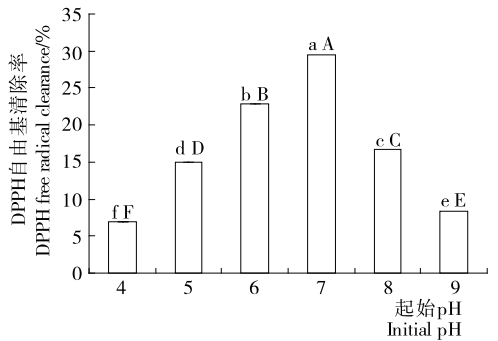
(3) 最适起始 pH 值的确定:不同起始 pH 值条件下,木耳 CZSWXY0012 的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除能力不同。以起始 pH 值 7.0 时,发酵粗提液对 DPPH 自由基的清除率最高,且与其他处理之间存在极显著差异(图 3),随



不同小写字母者表示差异达显著水平($P<0.05$),不同大写字母者表示差异达极显著水平($P<0.01$)

图 2 氮源对木耳菌株发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力的影响

Figure 2 Effect of different nitrogen sources on DPPH scavenging effect of fermentation of *Auricularia auricular*



不同小写字母者表示差异达显著水平($P<0.05$),不同大写字母者表示差异达极显著水平($P<0.01$)

图 3 起始 pH 对木耳菌株发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力的影响

Figure 3 Effect of different initial pH on DPPH scavenging effect of fermentation of *Auricularia auricular*

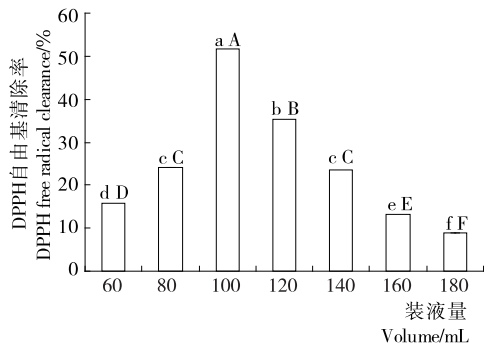
着 pH 值再增大或者减小时,发酵粗提液对 DPPH 自由基的清除率能力降低。有的研究^[17]表明,真菌抗氧化活性发酵培养的最适 pH 值是偏酸性的。

(4) 最适装液量的确定:在不同装液量的条件下,木耳 CZSWXY0012 的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除能力不同。以装液量为 100 mL/250 mL 时,发酵粗提液对 DPPH 自由基的清除率最高(51.67%),且与其他处理之间存在显著差异(图 4)。

(5) 最适培养温度的确定:在不同培养温度下获得的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率存在不同,随着培养温度的升高,发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率也在升高,在温度为 27 °C 时,木耳菌株发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率最高(54.94%),且与其他处理之间存在显著差异(图 5)。

(6) 最适培养时间的确定:在不同培养时间下获得的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率存在差异,随着培养时间的延长,获得的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率迅速增加,

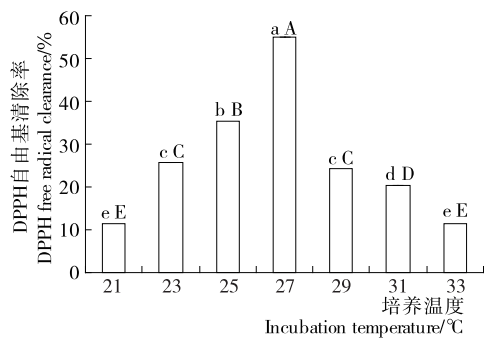
在发酵培养 8 d 时,木耳菌株的发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率最高(41.53%),且与其他处理之间存在显著差异(图 6)。随后,随着培养时间的延长,发酵粗提液对 DPPH 自由基清除率不断下降。



不同小写字母者表示差异达显著水平($P < 0.05$),不同大写字母者表示差异达极显著水平($P < 0.01$)

图 4 装液量对木耳菌株发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力的影响

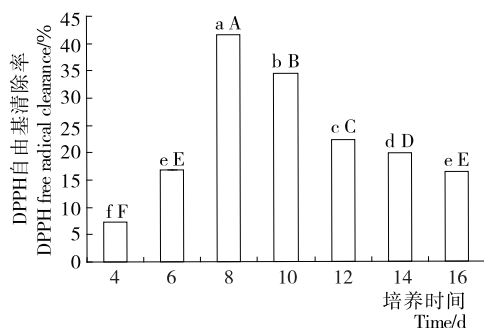
Figure 4 Effect of different volume on DPPH scavenging effect of fermentation of *Auricularia auricular*



不同小写字母者表示差异达显著水平($P < 0.05$),不同大写字母者表示差异达极显著水平($P < 0.01$)

图 5 培养温度对木耳菌株发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力的影响

Figure 5 Effect of different incubation temperature on DPPH scavenging effect of fermentation of *Auricularia auricular*



不同小写字母者表示差异达显著水平($P < 0.05$),不同大写字母者表示差异达极显著水平($P < 0.01$)

图 6 培养时间对木耳菌株发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力的影响

Figure 6 Effect of different incubation time on DPPH scavenging effect of fermentation of *Auricularia auricular*

2.2.2 正交试验优化结果 在上述单因素试验结果的基础上,根据 DPS 7.55 版软件进行正交试验设计。选取最优的碳源、氮源、pH 值、温度、装液量 5 个因素,每个因素选取 4 个水平,设计 $L_{16}(4^5)$ 正交试验组合(表 2)。

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因子和水平组合表

Table 2 Factor and level of $L_{16}(4^5)$ test

水平	A 碳源/ (g · L ⁻¹)	B 氮源/ (g · L ⁻¹)	C pH 值	D 温度/ °C	E 装液量/ mL
1	20	2.0	5	23	80
2	25	2.5	6	25	100
3	30	3.0	7	27	120
4	35	3.5	8	29	140

木耳发酵培养优化正交试验结果及数据处理见表 3。由表 3 可知,影响木耳 CZSWXY0012 发酵粗提液抗氧化活性的大小顺序依次为温度 > 氮源 > 装液量 > 碳源 > pH 值,说明温度对木耳菌丝体发酵粗提液抗氧化活性的影响最大,其次为氮源,而 pH 值对其影响相对较小。最优组合为 $A_2B_1C_1D_3E_2$,即葡萄糖 25 g/L,酵母膏 2 g/L,pH 6.0,温度 27 °C,装液量 100 mL/250 mL,该条件下验证得木耳 CZSWXY0012 发酵粗提液清除 DPPH 自由基能力达 96.18%。

表 3 不同正交试验组合对木耳发酵粗提液抗氧化活性的影响

Table 3 The result of the orthogonal tests of optimum fermented condition of *Auricularia auricular*

组合	A	B	C	D	E	DPPH 自由基清除率/%
1	1	1	1	1	1	83.86±0.22
2	1	2	2	2	2	85.82±0.10
3	1	3	3	3	3	81.07±0.07
4	1	4	4	4	4	76.68±0.26
5	2	1	2	3	4	96.10±0.08
6	2	2	1	4	3	50.87±0.22
7	2	3	4	1	2	67.86±0.32
8	2	4	3	2	1	74.10±0.11
9	3	1	3	4	2	84.54±0.24
10	3	2	4	3	1	69.63±0.25
11	3	3	1	2	4	79.58±0.33
12	3	4	2	1	3	42.29±0.13
13	4	1	4	2	3	74.50±0.57
14	4	2	3	1	4	52.98±0.12
15	4	3	2	4	1	59.09±0.19
16	4	4	1	3	2	84.88±0.06
\bar{x}_1	81.86	84.75	74.80	61.75	71.67	
\bar{x}_2	72.24	64.83	70.83	78.50	80.78	
\bar{x}_3	69.01	71.89	73.17	82.92	62.18	
\bar{x}_4	67.86	69.49	72.17	67.79	76.34	
R	14.00	19.92	3.97	21.17	18.60	

3 结论

在单因素试验的基础上,通过正交试验确定了木耳 CZSWXY0012 的最优组合工艺,即葡萄糖 25 g/L,酵母膏 2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, CuSO₄ 6 mg/L, K₂ HPO₄ 3.2 g/L, pH 6.0, 温度 27 ℃, 装液量 100 mL/250 mL, 发酵培养 8 d. 试验结果有望为工业化生产提供重要的技术参考. 下一步将对木耳菌丝体发酵粗提液中的具体抗氧化成分和含量开展研究.

参考文献

- [1] Halliwell B, Murcia M A, Chirico S, et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995, 35(1): 7-20.
- [2] Volpi N, Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺ mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma derived chondroitin sulfate[J]. Journal of Biochemistry, 1999, 125(2): 297-304.
- [3] 贾春风, 刘松雁, 陈梅香, 等. 紫薯发酵醋工艺优化及其抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 211-215.
- [4] 刘力, 李理. 酸浆水中 3 种菌株的产酸能力及抗氧化活性[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 11-15.
- [5] 曾伟, 丁利君, 黄聪华, 等. 黑曲霉发酵法辅助提取芒果黄酮及其抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 115-118.
- [6] 马玲. 3 种食用菌中多糖的提取与测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(2): 174.
- [7] Lindequist U, Niedermeyer T, Julich W D. The pharmacological

potential of mushrooms[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2005, 2(3): 285-299.

- [8] 陈康林, 卯晓岚, 黄明达. 中国抗肿瘤大型药用真菌图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 1-10.
- [9] Lee I K, Kim S E, Yeom J H, et al. Daldinan A, a novel isoindolinone antioxidant from the ascomycete *Daldinia concentrica* [J]. The Journal of Antibiotics, 2012, 65(2): 95-97.
- [10] Bai Ming-sheng, Wang Chen, Zong Shi-chun, et al. Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3 424-3 427.
- [11] Liu Kun, Wang Jun-li, Zhao Le, et al. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 58(8): 375-380.
- [12] Lee I K, Jung J Y, Kim Y H, et al. Phellinins B and C, new styrylpyrones from the culture broth of *Phellinus* sp. [J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(5): 263-266.
- [13] 李峻志, 吴小杰, 党永, 等. 大型真菌抗氧化活性物质的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(5): 455-465.
- [14] 张北红, 宋瑞清, 刘淑双, 等. 高效抗氧化大型真菌的筛选[J]. 菌物研究, 2010, 8(4): 213-218.
- [15] 杨建, 袁海生, 曹云. 5 种野生多孔菌提取物的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 40-44.
- [16] Tina S, Chi T H. Antioxidant activities of buckwheat extracts [J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 743-749.
- [17] 葛飞, 石贝杰, 高樱萍, 等. 一株高抗氧化活性银杏内生真菌 SG0016 的鉴定及其培养条件优化[J]. 西北植物学报, 2015, 35(2): 403-409.

(上接第 30 页)

- [8] 任佩, 金玉兰, 朴美子. 章鱼肠道产蛋白酶菌的筛选、产酶条件及酶学性质[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 189-193.
- [9] Ramamoorthy Sathish Kumar, Gnanakkan Ananthan, Antonyraj Selva Prabhu. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GACAS9 using response surface methodology-A statistical approach[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(1): 1-6.
- [10] Arastoo Badoei-Dalfard, Zahra Karami. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 89(1): 15-23.
- [11] Douglas C Montgomery. 实验设计与分析[M]. 汪仁官, 陈荣昭, 译. 北京: 中国统计出版社, 1998: 589-640.
- [12] 张智, 朱宏亮, 钮宏禹, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产蛋白酶的发酵条件[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 400-404.
- [13] 杨亚东, 解万翠, 杨锡洪, 等. 一株中性蛋白酶产生菌的发酵产酶及其生长特性[C]//“食品工业新技术与新进展”学术研讨会暨 2014 年广东省食品学会年会论文集. 广州: [出版者不详], 2014: 38-43.
- [14] He Shan, Wang Hong-qiang, Wu Bin, et al. Response surface methodology optimization of fermentation conditions for rapid

and efficient accumulation of macrolactin a by marine *Bacillus amyloliquefaciens* ESB-2 [J]. Molecules, 2013, 18(1): 408-417.

- [15] 张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 248-253.
- [16] 牛帅科, 杨自洁, 李艳. 蛹虫草菌的液态培养基优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 202-206.
- [17] Feng Yan-li, Shao Yan-chun, Zhou You-xiang, et al. Production and optimization of monacolin K by citrinin-free *Monascus pilosus* MS-1 in solid-state fermentation using nonglutinous rice and soybean flours as substrate[J]. Eur. Food Res. Technol., 2014(239): 629-636.
- [18] 李金良, 张莉李, 春燕海, 等. 洋链霉菌 GB-2 产西索米星发酵条件优化[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 208-212.
- [19] 宋一恒, 谢定, 钟海雁. 响应面法优化酵母富硒发酵条件[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 125-130.
- [20] 张建国, 陈晓明, 熊双丽. 响应面分析优化 ϵ -聚赖氨酸发酵培养基[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 19-23.
- [21] 张祁, 宁喜斌, 张继伦. 响应面法优化产蛋白酶海洋细菌的培养条件[J]. 中国生物工程, 2013, 33(8): 100-105.
- [22] 王璐, 李小溪, 古丽娜孜, 等. 响应面法优化马奶酒发酵条件的研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(2): 66-70.