

益生枯草芽孢杆菌 MA139 增殖培养基的优化

郭小华 陆文清 邓萍 黄德仕

(中国农业大学 农业部饲料工业中心, 北京 100094)

摘要 为得到益生芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* MA139 产芽孢的最佳的培养基,以摇瓶发酵的方法,用 Plackett-Burman 设计从 11 种原料中筛选出 4 种对芽孢产量有显著影响的因素,即玉米粉、大豆粉、蛋白胨和 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 然后针对这 4 个主要因素,用最陡爬坡试验及中心组合设计优化产芽孢的最佳培养基。结果表明,当培养基的配方为:玉米粉 3.17 g/L、大豆粉 5.80 g/L、蛋白胨 3.62 g/L、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.06 g/L、葡萄糖 5 g/L、尿素 3 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L 和 KH_2PO_4 3 g/L 时,MA139 发酵 36 h 细菌总数可以从 8.32×10^8 cfu/mL 提高到 3.10×10^9 cfu/mL,芽孢率达到 96%。试验表明通过统计优化培养条件可以有效提高 *B. subtilis* MA139 产芽孢的得率。

关键词 枯草芽孢杆菌;发酵;培养基优化;试验设计

中图分类号 Q 93-335;Q 939.124

文章编号 1007-4333(2006)03-0041-06

文献标识码 A

Medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* MA139 as a probiotic

Guo Xiaohua, Lu Wenqing, Deng Ping, Huang Deshi

(Ministry of Agriculture Feed Industry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Using shaking-flask fermentation in the laboratory, the ingredients influencing spore production of *Bacillus subtilis* MA139 were analyzed through the design of Plackett-Burman in Software JMP 5.0. The concentration of ingredients was optimized through path steepest ascent and sequent central composite design (CCD). The ingredients concentration was: corn meal 3.17 g/L, soybean meal 5.80 g/L, peptone 3.62 g/L, glucose 5 g/L, urea 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L and KH_2PO_4 3 g/L. The total bacterial counts were improved from 8.32×10^8 cfu/mL to 3.10×10^9 cfu/mL after medium optimization, and the spore rate reached 96%. This study suggests that the spore concentration can be improved by the experimental designs.

Key words *Bacillus subtilis*; fermentation; medium optimization; experimental designs

抗生素添加剂在动物日粮中广泛使用,但其弊端和危害日益体现出来^[1],而抗生素替代品的微生态制剂在畜牧业已得到应用^[2]。微生态制剂常用的细菌是乳酸菌,而芽孢杆菌作为动物肠道的外源菌群,也有广泛应用,它能够改善动物胃肠道的微生态平衡,促进动物生长,提高饲料利用率^[3-6]。优良的微生态制剂必须有足够的活菌数量^[7]。因此,为了尽量提高产品芽孢的数量,需要对其产芽孢的培养基进行系统优化,以降低生产成本,提高芽孢得率^[8]。

芽孢杆菌液体深层发酵培养基的优化一般采用

单因子试验以及结合均匀设计和正交设计的方法^[9-10]。目前趋向采用统计软件构建高效试验设计来进行微生物培养基的优化,通过对试验结果进行数学模拟和优化,可以简化试验步骤,提高准确性^[11-14]。本试验旨在以本试验室分离筛选得到的一株枯草芽孢杆菌 MA139 为出发菌株,优化产芽孢的最适培养基。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 MA139,本实验室自行分离和保

收稿日期:2005-10-27

作者简介:郭小华,博士研究生,E-mail:guoxh@mafic.ac.cn;陆文清,副教授,通讯作者,主要从事饲料微生物及酶学研究,E-mail:luwq@mafic.ac.cn

存。该菌株经中科院微生物所鉴定,其 16S rRNA 基因序列在 GenBank 的登录号为 DQ415893。该菌株具有饲用益生菌的应用潜力。

1.2 培养基

1) 种子及斜面保存培养基(SC 培养基)。成分为葡萄糖 5 g/L;蛋白胨 5 g/L;酵母粉 1 g/L;牛肉膏 3 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.005 g/L; pH 7.0。固体培养基则在液体培养基中添加 1.8% 的琼脂作为凝固剂。

2) 发酵培养基。分别按照 Plackett-Burman 设计、最陡爬坡试验设计和中心组合设计的方法来配制。

1.3 试剂和原料

玉米、大豆为市售,粉碎后过 20 目筛备用;试验中其他试剂均为分析纯。

1.4 培养条件

1) 种子培养条件。250 mL 三角瓶装种子培养基 50 mL,接斜面活化后的种子一环,37 °C,225 r/min 旋转振荡培养 20 h。

2) 发酵培养条件。250 mL 三角瓶装发酵培养基 50 mL,按照 4% 的接种量接种后在 37 °C,225 r/min 旋转振荡培养 36 h。

1.5 细菌总数和芽孢总数的测定

平板稀释法计数活菌数。芽孢计数则将稀释液放入 80 °C 水浴中处理 20 min 后培养计数。

1.6 培养基优化试验设计

1) Plackett-Burman 设计。

在优化初期利用 Plackett-Burman 设计法^[15],以葡萄糖(X_1)、可溶性淀粉(X_2)、玉米粉(X_3)、大豆粉(X_4)、 $(NH_4)_2SO_4$ (X_5)、尿素(X_6)、蛋白胨(X_7)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_8)、 KH_2PO_4 (X_9)、 $CaCl_2$ (X_{10})、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ (X_{11})等为试验因子,对这 11 种原料进行全面考察,并将其编码为 -1 和 +1 的高低二阶层,其所代表的质量浓度值见表 1。

选用 $n = 12$ 的 Plackett-Burman 设计,并加上 3 个中心点来筛选和探讨 11 个试验因子对细菌总数和芽孢总数的影响,每一个试验结果报告为 2 个重复试验的平均值(表 2)。

2) 最陡爬坡试验设计。

响应面拟合方程只有在考察的紧相邻域里才充分近似真实结果,故只有在最先逼近最大目标产物产量区域后才能建立有效的响应面拟合方程^[16]。以试验值变化的梯度方向为爬坡方向,根据各因素

效应值的大小确定变化步长,从而快速逼近产量最大值。根据 Plackett-Burman 设计的结果,来确定是否进行最陡爬坡试验。

表 1 Plackett-Burman 试验设计中各参数的编码值及其质量浓度

Table 1 Assigned concentration of each variable at different levels of Plackett-Burman design g/L

独立变量	编码水平	
	-1	+1
葡萄糖(X_1)	5	15
可溶性淀粉(X_2)	5	15
玉米粉(X_3)	5	15
大豆粉(X_4)	10	30
$(NH_4)_2SO_4$ (X_5)	2	6
尿素(X_6)	3	9
蛋白胨(X_7)	5	15
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_8)	0.5	1.5
KH_2PO_4 (X_9)	1	3
$CaCl_2$ (X_{10})	2	6
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (X_{11})	0.05	0.5

3) 中心组合设计。

根据 Plackett-Burman 设计筛选出的试验因子和最陡爬坡试验确定的逼近浓度,以 JMP5.0 软件设计中的 DOE 程序进行中心组合试验,拟合数据得到一个描述因变量(细菌总数)与自变量(培养基组分)关系的二阶经验模型^[11, 17]:

$$y = b_0 + b_i x_i + b_{ij} x_i x_j + b_{ii} x_i^2$$

式中: y 为预测响应值,即细菌总数($1g / N_{tot}$ (cfu/mL)); b 为回归系数; x_i 为自变量的编码水平。用 JMP5.0 软件对试验数据进行回归拟合,并对拟合方程作显著性检验和方差分析。

2 结果与讨论

2.1 影响芽孢杆菌增殖的重要因素

按照 Plackett-Burman 试验设计,在发酵 36 h 时取样测定发酵液当中的细菌总数(total number, N_{tot})和芽孢总数(spore number, N_s)。Plackett-Burman 试验设计结果见表 2 并对其进行一阶模式回归分析(表 3)。细菌总数和芽孢总数 2 种结果回归分析的检定系数分别为 0.96 和 0.94,说明回归分析能够确切的描述试验数据。根据分析结果,发现对

表 2 Plackett-Burman 试验设计结果 ($n = 12$)

Table 2 Plackett-Burman design

编号	变量水平											响应值	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	$\lg[N_{\text{tot}}/(\text{cfu}/\text{mL})]$	$\lg[N_s/(\text{cfu}/\text{mL})]$
1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	8.69	8.48
2	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	9.37	9.35
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.01	8.99
4	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	8.41	8.40
5	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	9.31	9.29
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8.43	8.32
7	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	9.25	9.24
8	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	9.07	9.06
9	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	8.23	8.18
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.05	9.05
11	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	8.30	8.26
12	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	9.15	9.15
13	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	9.06	8.94
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.02	9.01
15	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	8.79	8.74

B. subtilis MA139 发酵起主要作用有 4 种原料,即玉米粉、大豆粉、蛋白胨和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,并对 11 种原料成分归纳调整,作为下一步试验分析的依据。质量浓度调整说明见表 4。

2.2 最陡爬坡试验

选取对 *B. subtilis* MA139 发酵 4 种主要原料。对 Plackett-Burman 试验设计中得到的结果进行 t

检验,比较中心点水平的平均响应值与试验点处的平均响应值间的差异显著性。试验结果显示,中心点水平与试验点间在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著(P 值分别是 0.460 和 0.388),这就表明本试验设计中选取的中心点水平还没有接近最大的响应区域内,因此还必须进一步寻找中心点值,也就是最陡爬坡试验。

表 3 Plackett-Burman 试验设计回归分析结果

Table 3 Regression analysis of the Plackett-Burman design

cfu/L

截距参数	细菌总数 N_{tot}			芽孢总数 N_s		
	参数估计	t	P	参数估计	t	P
intercept	8.876	203.044	0.000	8.831	163.294	0.000
X_1	-0.147	-3.001	0.058*	-0.129	-2.136	0.122
X_2	0.003	0.068	0.950	-0.009	-0.152	0.889
X_3	-0.152	-3.103	0.053*	-0.163	-2.688	0.075*
X_4	-0.190	-3.888	0.030**	-0.221	-3.652	0.035**
X_5	-0.005	-0.102	0.925	-0.021	-0.345	0.753
X_6	-0.082	-1.671	0.193	-0.099	-1.640	0.200
X_7	-0.173	-3.547	0.038**	-0.159	-2.633	0.078*
X_8	0.088	1.807	0.168	0.108	1.778	0.173
X_9	0.097	1.978	0.142	0.106	1.750	0.178
X_{10}	-0.005	-0.102	0.925	-0.034	-0.565	0.612
X_{11}	0.157	3.205	0.049**	0.158	2.605	0.080*
	$P = 0.082, R_{S_Q} = 0.96$			$P = 0.125, R_{S_Q} = 0.94$		

注: *为 $P < 0.1$, **为 $P < 0.05$ 。

表4 Plackett-Burman 试验设计各因子结果的质量浓度分析

Table 4 Concentration of ingredients used after the Plackett-Burman design

试验因子	质量浓度/(g/L)		说 明
	调整前	调整后	
葡萄糖 (X_1)	5 ~ 15	5	对细菌总数和芽孢总数为负相关,对细菌总数影响达到显著水平,而对芽孢总数的影响不显著,为了减少试验因子,维持在低水平
可溶性淀粉 (X_2)	5 ~ 15	删除	无显著影响,可信度大于 20% ^[15] ,删除此因子
玉米粉 (X_3)	5 ~ 15	1 ~ 5	负显著,降低筛选浓度
大豆粉 (X_4)	10 ~ 30	1 ~ 10	负极显著,降低筛选浓度
(NH_4) ₂ SO ₄ (X_5)	2 ~ 6	删除	无显著影响,可信度大于 20%,删除此因子
尿素 (X_6)	3 ~ 9	3	不显著,负相关,可信度小于 20%,为减少试验因子,维持在低水平
蛋白胨 (X_7)	5 ~ 15	1 ~ 5	负显著,降低筛选浓度
MgSO ₄ · 7H ₂ O (X_8)	0.5 ~ 1.5	1.5	不显著,可信度小于 20%,为减少试验因子,维持在高水平
KH ₂ PO ₄ (X_9)	1 ~ 3	3	不显著,正相关, P 值相对较小,维持在高水平
CaCl ₂ (X_{10})	2 ~ 6	删除	不显著,可信度大于 20%,删除此因子
MnSO ₄ · H ₂ O (X_{11})	0.05 ~ 0.5	0.5 ~ 1.5	显著,正相关,提高筛选浓度

以回归系数最大的大豆粉 (X_4) 为基准,以每次减少浓度 1% 为基本步长()。处理 5 中的细菌总数和芽孢总数达到了最高,这一结果表明,处理 5 的玉米粉 (X_3)、大豆粉 (X_4)、蛋白胨 (X_7)、MnSO₄ · H₂O (X_{11}) 这 4 种物质浓度已在最优点附近,可以此浓度为中心点采用中心组合设计来对培养基作进一步的优化(表 5)。而且在 Plackett-Burman 设计及最陡爬坡试验中,细菌总数与芽孢总数的分析结果一致,故在以下的中心组合设计仅以发酵液的细菌总数作为考察目标。

2.3 中心组合设计

以最陡爬坡试验中处理 5 的玉米粉 (X_3)、大豆粉 (X_4)、蛋白胨 (X_7)、MnSO₄ · H₂O (X_{11}) 的浓度为

中心点进行优化,选择中心试验点为 3,星号臂长 = 1.547。各自变量水平见表 6,试验设计及结果见表 7。

分析结果表明(表 8),模型极显著 ($P < 0.01$),并且有很好的确定系数,RS_q = 0.93。这表明 *B. subtilis* MA139 细菌总数 93% 的可靠性可由模型来预测。并可以通过回归分析结果得出试验模型:

$$Y = 9.434 - 0.003 X_3 - 0.025 X_4 + 0.028 X_7 - 0.013 X_{11} - 0.006 X_3 X_4 - 0.02 X_3 X_7 - 0.009 X_4 X_7 - 0.012 X_3 X_{11} - 0.026 X_4 X_{11} - 0.03 X_7 X_{11} - 0.068 X_3 X_3 - 0.013 X_4 X_4 - 0.043 X_7 X_7 - 0.025 X_{11} X_{11}$$

自变量前的数值为回归模型对应项的 P 值。

表5 最陡爬坡试验设计及其结果

Table 5 Path steepest ascent

处理序号	培养基成分/(g/L)				结 果	
	玉米粉 (X_3)	大豆粉 (X_4)	蛋白胨 (X_7)	MnSO ₄ · H ₂ O (X_{11})	lg[N_{tot} / (cfu/ mL)]	lg[N_s / (cfu/ mL)]
1	5.00	10.00	5.00	0.50	9.33	9.28
2	4.52	9.00	4.52	0.61	9.37	9.30
3	4.08	8.00	4.08	0.72	9.13	9.12
4	3.64	7.00	3.64	0.83	9.34	9.29
5	3.20	6.00	3.20	0.94	9.43	9.40
6	2.76	5.00	2.76	1.05	9.39	9.34
7	2.32	4.00	2.32	1.16	9.10	9.01
8	1.88	3.00	1.88	1.27	9.17	9.15
9	1.44	2.00	1.44	1.38	9.06	8.95
10	1.00	1.00	1.00	1.50	8.91	8.84

表 6 中心组合设计各因子及其编码值

Table 6 Assigned concentration of each variable at different levels in central composite design

g/L

独立变量	编码水平				
	- 1.547	- 1	0	1	1.547
玉米粉 (X_3)	1.65	2.20	3.20	4.20	4.75
大豆粉 (X_4)	4.45	5.00	6.00	7.00	7.55
蛋白胨 (X_7)	1.65	2.20	3.20	4.20	4.75
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (X_{11})	0.55	0.69	0.94	1.19	1.32

根据 JMP 模型的分析结果以及二次回归方程可以得出,此模型具有最大响应值,极值分析结果见表 9。根据结果换算成 4 个主因素的实际浓度值,即玉米粉 3.17 g/L,大豆粉 5.80 g/L,蛋白胨 3.62 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.06 g/L。采用优化出的培养基,芽孢杆菌最终细菌浓度预测值为 2.84×10^9 cfu/mL。

为了检验模型预测的准确性,采用优化的培养基重复试验 3 次,发酵液当中平均细菌数为 2.91×10^9 cfu/mL,这表明实验值和实际值之间具有良好的拟合性,优化模型可靠。

2.4 优化结果验证

采用优化后的培养基与起始的种子培养基进行

对照,并对培养条件进行优化,结果表明,优化后的培养基提高了各阶段细菌总数的数量,在 36 h 时,优化后培养基可以使细菌总数从 8.32×10^8 cfu/mL 提高到 3.10×10^9 cfu/mL,并且在 36 h 时,芽孢率可以达到 96%。

3 结 论

通过 Plackett-Burman 设计、最陡爬坡试验及中心组合设计的方法确定了 *B. subtilis* MA139 发酵培养的最适培养基。优化后 *B. subtilis* MA139 的细菌浓度为 3.10×10^9 cfu/mL,芽孢率达到 96%,从而有效的提高了单位产芽孢的数量。

表 7 中心组合设计及其结果

Table 7 Central composite design

编号	变量水平				$\lg[N_s/(\text{cfu/L})]$	编号	变量水平				$\lg[N_s/(\text{cfu/L})]$
	X_3	X_4	X_7	X_{11}			X_3	X_4	X_7	X_{11}	
1	- 1	- 1	1	1	9.36	15	- 1	1	1	- 1	9.39
2	- 1	- 1	1	- 1	9.36	16	- 1	1	- 1	1	9.27
3	1.547	0	0	0	9.28	17	1	- 1	- 1	- 1	9.24
4	- 1.547	0	0	0	9.27	18	1	1	- 1	- 1	9.31
5	0	0	0	1.547	9.34	19	0	0	- 1.547	0	9.30
6	- 1	1	1	1	9.23	20	0	- 1.547	0	0	9.46
7	1	1	1	- 1	9.30	21	- 1	- 1	- 1	1	9.29
8	- 1	- 1	- 1	- 1	9.20	22	0	0	1.547	0	9.37
9	0	0	0	0	9.42	23	0	0	0	0	9.44
10	0	0	0	0	9.43	24	- 1	1	- 1	- 1	9.20
11	1	- 1	1	1	9.29	25	0	1.547	0	0	9.34
12	1	1	1	1	9.20	26	0	0	0	- 1.547	9.41
13	1	- 1	- 1	1	9.34	27	1	- 1	1	- 1	9.36
14	1	1	- 1	1	9.20						

表8 中心组合设计(CCD)回归分析结果

Table 8 Regression analysis of the central composite design

回归系数	参数估计	标准差	<i>t</i>	<i>P</i>	回归系数	参数估计	标准差	<i>t</i>	<i>P</i>
Intercept	9.434	0.015	638.810	0.000	Intercept	9.434	0.015	638.810	0.000
X_3	-0.003	0.007	-0.391	0.702	$X_3 X_{11}$	-0.012	0.007	-1.635	0.128
X_4	-0.025	0.007	-3.860	0.002	$X_4 X_{11}$	-0.026	0.007	-3.491	0.004
X_7	0.028	0.007	4.282	0.001	$X_7 X_{11}$	-0.030	0.007	-4.067	0.002
X_{11}	-0.013	0.007	-1.961	0.074	$X_3 X_3$	-0.068	0.009	-7.672	0.000
$X_3 X_4$	-0.006	0.007	-0.855	0.409	$X_4 X_4$	-0.013	0.009	-1.522	0.154
$X_3 X_7$	-0.020	0.007	-2.615	0.023	$X_7 X_7$	-0.043	0.009	-4.891	0.000
$X_4 X_7$	-0.009	0.007	-1.257	0.233	$X_{11} X_{11}$	-0.025	0.009	-2.805	0.016

$P < 0.0001$, $RS_q = 0.93$, $RSquare Adj = 0.85$

表9 响应面极值分析

Table 9 Critical value on the response surface

临界值				估计值	细菌总数 N_t / (cfu/mL)	稳定点模型
X_3	X_4	X_7	X_{11}			
-0.03	-1.2	0.42	0.12	9.454	2.84×10^9	最大值

参 考 文 献

- [1] Gustafson R H, Bowen R E. Antibiotic use in animal agriculture [J]. J Appl Microbiol, 1997, 83(5): 531-541
- [2] Fuller R. Probiotics in man and animals [J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66(5): 365-378
- [3] Adami A, Cavazzoni V. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic [J]. J Basic Microbiol, 1999, 39: 3-9
- [4] Alexopoulos C, Georgoulakis I E, Tzivara A, et al. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters [J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 2004, 88: 381-392
- [5] Kritas S K, Morrison R B. Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery [J]. Vet Rec, 2005, 156: 447-448
- [6] Zani J L, da Cruz F W, dos Santos A F, et al. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs [J]. J Appl Microbiol, 1998, 84: 68-71
- [7] Fuller R. Probiotics [J]. Soc Appl Bacteriol Symp Ser, 1986, 15: 1S-7S
- [8] 何明清. 动物微生态进展[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000
- [9] 吴晟旻, 范伟平. *B. licheniformis* NG521-1 发酵培养基优化的研究[J]. 南京工业大学学报, 2005(2): 25-29
- [10] 李野, 张小平, 张克强, 等. 蜡质芽孢杆菌 DL5L-2 发酵条件探讨及培养基优化[J]. 微生物学通报, 2005(2): 45-49
- [11] Ooijkaas L P, Wilkinson E C, Tramper J, et al. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs [J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 64(1): 92-100
- [12] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPT1 优化软件[J]. 国外医药: 抗生素分册, 1999(2): 58-66
- [13] 欧宏宇, 贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J]. 天津轻工业学院学报, 2001(1): 14-17
- [14] 胡永红, 沈树宝, 欧阳平凯. 响应面分析法用于微生物培养基浓度的优化[J]. 工业微生物, 2002(1): 9-12
- [15] Xu C P, Kim S W, Hwang H J, et al. Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3 [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2002, 36: 127-131
- [16] Montgomery D C. Design and analysis of experiments (3rd) [M]. New York: John Wiley & Sons, 1991
- [17] Manohar B, Divakar S. Applications of surface plots and statistical designs to selected lipase catalysed esterification reactions [J]. Process Biochem, 2004, 39: 847-853