

## 响应面优化低值豆粕液态制备多肽工艺

李玉珍<sup>1</sup>, 肖怀秋<sup>1</sup>, 杨涛<sup>2</sup>, 林亲录<sup>2</sup>

(1. 湖南化工职业技术学院 应用化学系, 湖南 株洲 412004; 2. 中南林业科技大学 食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 为优化低值豆粕液态发酵生产大豆多肽工艺, 应用 Minimum Run Equireplicated Res IV 析因设计进行了主效因子的筛选, 根据主效因子影响及变化方向进行爬陡坡试验, 最后, 应用二次旋转中心复合响应面设计对液态发酵多肽工艺进行了优化, 优化工艺条件为豆粕浓度 6.0%、pH 8.0、装瓶量 93.0 mL·300 mL<sup>-1</sup>。最优条件下模型预测多肽含量为 707.204  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 验证试验结果为 683.023  $\pm$  9.23  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=6$ )。

**关键词:** 豆粕; 大豆多肽; 中心复合设计; 响应面分析; 降维分析

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)04-0649-06

## Response Surface Methodology for Optimization of Soybean Peptide Production Technology from Low-valued Soybean Meal

LI Yu-zhen<sup>1</sup>, XIAO Huai-qiu<sup>1</sup>, YANG Tao<sup>2</sup>, LIN Qin-lu<sup>2</sup>

(1. Applied Chemistry Department of Hunan Chemical Industry and Vocational Technology College, Zhuzhou 412004, Hunan; 2. Food Science and Engineering College, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

**Abstract:** To investigate the optimal producing conditions of soybean peptide (SBP) from soybean meal (SBM) by liquid state fermentation (LSF), Minimum Run Equireplicated Res IV design was used to screen main factors affecting SBP production, steepest ascent experiment was adopted to approach the optimal region based the results from the factorial design. At last, quadratic rotating central composite design (QRCCD) was applied to optimize the SBP producing parameters. The optimal condition for SBP biosynthesis are 6.0% of SBM, pH 8.0 and media amount is 93.0 mL·300 mL<sup>-1</sup>. The predicted value and actual value of SBP are 707.204  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and 683.023  $\pm$  9.23  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=6$ ), respectively.

**Key words:** Soybean meal; Soybean peptide; Central composite design; Response surface methodology; Dimension reduction analysis

大豆多肽 (Soybean peptide, SBP) 也称大豆肽, 是大豆蛋白质经酶法水解后得到的产物, 具有原大豆蛋白所不具备的一些优良加工和生物学特性, 如溶解性好、保湿性高、热不凝固、无蛋白变性和酸不沉淀等加工特性<sup>[1]</sup> 以及消化利用率高、抗氧化、免疫调节、降血压、降胆固醇等生物学特性。研究表明, 多肽比游离氨基酸更易为机体利用, 其生物效价和营养价值比游离氨基酸更高, 在食品及保健品生产领域具有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。豆粕 (Soybean meal, SBM) 是大豆榨油后的加工副产物。目前, 主要用作饲料和畜禽养殖的植物源蛋白饲料, 精深加工程度低, 附加值不高。豆粕富含蛋白质且氨基酸模式合理, 为全价植物蛋白<sup>[3]</sup>, 但由于含有多种抗营养因子, 如大豆抗原蛋白 (为致敏因子) 和胰蛋白酶抑制剂等<sup>[2]</sup>, 制约了豆粕综合深度加工利用。豆粕蛋白质经限制酶解后, 大分子降解为小分子多肽、寡肽和氨基酸等, 消化吸收利用率得到改善。当前大豆肽主要通过酶解大豆分离蛋白 (Soybean protein isolated, SPI) 进行生产, 生产成本相对较高,

如果能利用低值豆粕作为原料生产大豆多肽, 生产成本将降低。目前, 大豆多肽主要以固态发酵法为主<sup>[4,6]</sup>, 液态发酵制备大豆肽文献报道相对较少<sup>[7]</sup>。响应面技术 (Response surface methodology, RSM) 是综合试验设计方法与数学建模理论, 通过局部优化试验回归拟合试验因素与响应值间的全局函数关系, 并对各因素水平及因素间交互作用进行优化与统计评价, 具有试验次数少, 结论可靠性高, 试验精度好, 节省人力和物力等优良属性<sup>[8]</sup>, 广泛用于工艺条件优化<sup>[9]</sup>。本试验以豆粕为原料, 用枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* Promax NTG<sub>24</sub>)<sup>[10]</sup> 进行单菌种液态发酵, 运用析因设计、爬陡坡试验以及响应面优化法对豆粕液态发酵生产多肽工艺进行优化, 为液态发酵制备大豆肽提供理论和技术支持, 也为豆粕精深加工提供借鉴。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

大豆粕, 市售, 脱脂备用。枯草芽孢杆菌

收稿日期: 2012-05-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31050012)。

第一作者简介: 李玉珍 (1981-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为蛋白质生物化学。E-mail: yuzhenli@163.com。

(*B. subtilis* Promax NTG<sub>24</sub>) 由课题组分离纯化得到<sup>[10]</sup>,其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 大豆多肽的测定 采用茚三酮法测定<sup>[11]</sup>。

标准曲线绘制:准确称取 0.0100 g 经干燥至恒重的甘氨酸样品溶解并定容到 10.00 mL。取 1.00 mL 定容到 50.00 mL 即得到 20.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  甘氨酸标准溶液。取标准溶液分别稀释成 2.00 ~ 16.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\Delta x = 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的甘氨酸标准系列溶液。取 2.00 mL 稀释液于试管中并加入 1.00 mL 显色剂,混匀后沸水浴中加热 15 min,冷却,加 5.00 mL 40% 乙醇混匀并静置 15 min,测定  $A_{570\text{nm}}$ 。以甘氨酸浓度为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制标准曲线,需做空白对照实验。

测定发酵液中大豆肽含量:取 3.00 mL 发酵液于离心管内,加 3.00 mL 20% 三氯乙酸,静置 15 min 后 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min。取 0.50 mL 上清液并定容至 50 mL,570 nm 处测定吸光值,根据标准曲线回归方程计算大豆肽含量。

1.2.2 液态发酵制备大豆肽条件优化 Minimum Run Equireplicated Res IV 析因设计:拟考察豆粕浓度( $x_1$ )、pH( $x_2$ )、发酵时间( $x_3$ )、接种量( $x_4$ )和装瓶量( $x_5$ )对液态发酵制备大豆肽的影响,通过模型分析找寻主效因子完成析因设计,试验因子与水平安排见表 1。

表 1 析因设计因素与水平

Table 1 Experimental variables and levels of factorial design

因素 Factor	编码水平 Coded level		实际水平 Actual level	
	-1	+1	低 Low	高 High
$X_1/\%$	$x_{-1}$	$x_{+1}$	2	6
$X_2$	$x_{-1}$	$x_{+1}$	5.0	8.0
$X_3/\text{h}$	$x_{-1}$	$x_{+1}$	24	48
$X_4/\%$	$x_{-1}$	$x_{+1}$	4	8
$X_5/\text{mL}\cdot 300\text{mL}^{-1}$	$x_{-1}$	$x_{+1}$	50	100

爬陡坡试验:响应面优化的拟合方程只在最优邻域才能充分近似真实条件,其他区域内拟合的方程与真实条件相差较远,甚至无实际意义<sup>[12]</sup>。为了使主效因子同时逼近最优邻域,以模型系数符号及大小设置步长及方向。根据析因设计结果,主效因子为豆粕浓度( $x_1$ )、pH( $x_2$ )和装瓶量( $x_3$ )。

二次旋转中心复合设计:采用二次旋转中心复合设计对爬陡坡试验中心区域进行优化,各因素设置 5 水平,即  $\pm r$  (上下星号臂),  $\pm 1$  (上下水平点) 和 0 (零水平,  $n = 6$ )。星号臂  $r = 1.68179$ 。用 De-

sign expert (Version 8.0.6, State-Ease Inc, Mininneapolis, MN, USA) 研究豆粕浓度( $x_1$ )、pH( $x_2$ )和装瓶量( $x_3$ )对大豆多肽生物合成的定量影响,因素水平见表 2。

表 2 二次旋转中心复合设计因素水平与编码

Table 2 Experimental levels and codes for QRCCD

水平 $Z_j$ Level $Z_j$	因素 Factor		
	$x_1/\%$	$x_2$	$x_3/\text{mL}\cdot 300\text{mL}^{-1}$
上星号臂 Upper asterisk arm( +1.68179)	7.0	9.0	120
上水平 Upper level( +1)	6.4	8.4	108
零水平 Central level(0)	5.5	7.5	90
下水平 Lower level( -1)	4.6	6.6	72
下星号臂 Lower asterisk arm( -1.68179)	4.0	6.0	60

$r = 1.68179$ <sup>[13]</sup>,  $z$  为编码值,  $x$  为试验值。零水平  $Z_{0j} = (Z_{1j} + Z_{2j})/2$ ,  $\Delta_j = (Z_{2j} - Z_{0j})/r$ , 编码线性变换  $x_j = |Z_j - Z_{0j}|/\Delta_j$ 。

Asterisk arm is 1.68179,  $Z$  is the coded level,  $x$  is the actual level.  $Z_{0j} = (Z_{1j} + Z_{2j})/2$ ,  $\Delta_j = (Z_{2j} - Z_{0j})/r$ , linear transformation by the formula,  $x_j = |Z_j - Z_{0j}|/\Delta_j$ 。

验证试验:模型确定的最优条件下重复 6 次试验,测定大豆多肽含量,试验结果表示为  $\bar{x} \pm sd$  ( $n = 6$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘氨酸标准曲线

如图 1 所示,甘氨酸浓度和吸光度之间的线性回归方程为  $\hat{y} = 0.0044x + 0.0191$ ,  $R^2 = 0.9947$ 。

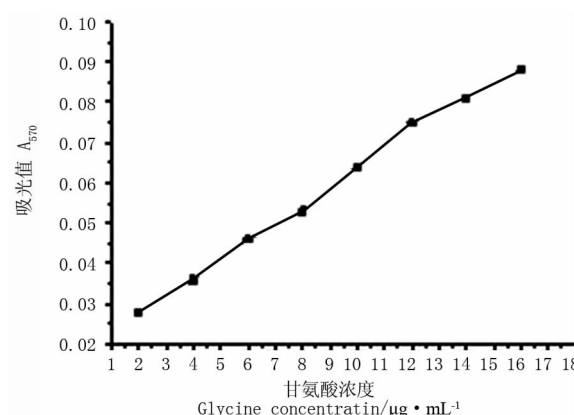


图 1 甘氨酸标准曲线

Fig. 1 The standard curve for glycine

根据标准曲线可求出发酵液中  $-\text{NH}_2$  含量。蛋白质每裂解一个肽链就可产生一个  $-\text{NH}_2$ , 因此, 利用茚三酮显色法可测定  $-\text{NH}_2$  总含量, 也可以测定小肽的含量<sup>[11]</sup>。利用标准曲线可以计算发酵产物中大豆多肽含量 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

2.2 Minimum Run Equireplicated Res IV 析因设计

考察了  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$  和  $x_5$  对大豆多肽生物合成的影响,结果如表 3 所示,第 5 组试验大豆多肽含量最高,为  $441.011\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,以此条件进行爬陡坡

试验。利用 Design expert 对试验结果进行回归分析,得到各因素影响的贡献率及显著性,由表 4 可知,豆粕浓度( $x_1$ )和装瓶量( $x_5$ )贡献率较高,对结果产生显著影响。

表 3 析因设计试验安排与结果  
Table 3 Arrangement and results of factorial design

试验序号 Experimental No.	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	大豆多肽含量 SBP concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	1	-1	1	1	-1	191.011
2	1	1	-1	-1	1	361.466
3	-1	1	1	1	1	145.557
4	-1	-1	1	1	-1	20.557
5	1	1	-1	1	1	441.011
6	1	1	1	-1	-1	338.739
7	-1	-1	-1	1	1	134.193
8	-1	-1	1	-1	-1	66.011
9	-1	1	-1	1	-1	122.83
10	-1	1	-1	-1	1	293.284
11	1	-1	1	-1	1	384.193
12	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	20.557

表 4 各因素显著性分析  
Table 4 Significant analysis of variables

	低水平 Lower level	高水平 Upper level	标准效应 Standard effect	贡献率 Contribution/%	$p$ 值 $p$ value
$x_1$	2	6	153.41	31.22	0.0286 *
$x_2$	24	48	112.23	16.71	0.0809
$x_3$	5.0	8.0	47.31	2.97	0.4108
$x_4$	4	8	-17.05	0.39	0.7610
$x_5$	50	100	139.74	25.90	0.0401 *

\* : $p < 0.05$  表示因素影响显著。\* : $p < 0.05$  means significant at 0.05 level.

数据线性拟合得到回归方程为  $\hat{y} = 209.95 + 76.70x_1 + 57.95x_2 + 24.43x_3 - 8.52x_4 + 72.16x_5$ 。模型显著( $p = 0.0361 < 0.05$ )。信噪比为 6.177,模型精度符合要求。当模型存在交互作用时不能根据回归模型系数绝对值表示因素影响大小,宜采用因子贡献率进行比较<sup>[4,13]</sup>。由表 4 可看出, $x_1$ 、 $x_5$  影响显著( $p < 0.05$ ), $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$  影响不显著( $p > 0.05$ )。 $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_5$  为正效应, $x_4$  为负效应。 $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_5$  贡献率

分别为 31.22%、16.71% 和 25.9%,贡献率之和为 73.83%,为主效应因子。爬陡坡试验拟进一步考察其对大豆多肽合成的影响。

2.3 爬陡坡试验

基于析因设计回归分析结果设定主效应因子爬坡方向及步长。由表 5 可看出,邻优区域在 1 号,大豆多肽含量最高( $577.375 \pm 18.24\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

表 5 爬陡坡试验设计与结果  
Table 5 Design and results of steepest ascent experiment

试验序号 Experimental No.	步长 Step	$x_1$	$x_2$	$x_3$	大豆多肽含量 SBP content/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	$x$	5.5	7.5	90	$577.375 \pm 18.24$
2	$x + \Delta x_i$	6.0	8.0	100	$236.466 \pm 10.07$
3	$x + 2\Delta x_i$	6.5	8.5	110	$350.102 \pm 12.34$
4	$x + 3\Delta x_i$	7.0	9.0	120	$395.557 \pm 11.61$
5	$x + 4\Delta x_i$	7.5	9.5	130	$304.648 \pm 10.73$
6	$x + 5\Delta x_i$	8.0	10.0	140	$134.193 \pm 6.14$

$\Delta x_1 = +0.5\%$ ;  $\Delta x_2 = +0.5$ ;  $\Delta x_3 = +10\ \text{mL}$

## 2.4 响应面优化结果与分析

2.4.1 数学模型的建立 对豆粕浓度( $x_1$ )、pH( $x_2$ )、装瓶量( $x_3$ )进行三因素三水平旋转中心复合设计,试验方案与结果见表6。多项式非线性回归拟合得到大豆多肽含量( $\hat{y}$ )对 $x_1$ 、 $x_2$ 和 $x_3$ 的回归方

程为  $\hat{y} = 689.17 + 66.07x_1 + 38.87x_2 + 46.89x_3 + 5.51x_1x_2 - 14.83x_1x_3 - 17.90x_2x_3 - 105.32x_1^2 - 93.16x_2^2 - 114.24x_3^2$ 。通过直接比较回归方程一次项系数绝对值大小结合模型方差分析可判定因子主次性<sup>[13]</sup>。因素主次顺序为 $x_1 > x_3 > x_2$ 。

表6 中心复合试验设计编码与水平

Table 6 Code and level of CCD

试验序号 Experimental No.	$x_1$	$x_2$	$x_3$	大豆多肽含量 SBP content/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
				实测值 Actual value	预测值 Predicted value
1	0.00	-1.68	0.00	288.19	360.31
2	1.00	-1.00	1.00	484.65	448.09
3	-1.00	-1.00	1.00	400.10	356.64
4	0.00	0.00	0.00	688.74	689.17
5	0.00	0.00	1.68	409.19	444.90
6	0.00	0.00	-1.68	243.28	287.18
7	1.68	0.00	0.00	461.47	502.38
8	0.00	0.00	0.00	689.287	689.17
9	-1.68	0.00	0.00	241.47	280.16
10	0.00	0.00	-1.00	692.38	689.17
11	-1.00	-1.00	0.00	236.47	197.40
12	0.00	0.00	0.00	690.47	689.17
13	0.00	1.68	0.00	483.56	491.05
14	1.00	-1.00	-1.00	396.01	348.17
15	0.00	0.00	0.00	696.83	689.17
16	-1.00	1.00	1.00	396.01	387.56
17	1.00	1.00	-1.00	485.57	472.74
18	-1.00	1.00	-1.00	319.65	299.91
19	0.00	0.00	0.00	691.01	689.17
20	1.00	1.00	1.00	518.28	501.06

2.4.2 模型方差分析与回归分析 由模型方差分析(表7)可看出,该模型极显著( $p < 0.0001$ ), $R^2$ 为0.9629,说明能解释总变异的96.29%,调整 $R^2$ 为

0.9252,C.V.为9.32%,信噪比为16.924,说明模型是可靠的,可用于多肽生产工艺的分析和预测。

表7 回归模型方差分析

Table 7 ANOVA for regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方和 Mean square	F 值 F value	p 值 Prob > F
回归模型 Model	5.104E+005	9	56709.06	28.84	<0.0001
残差项 Residual	19666.88	10	1966.69		
失拟项 Lack of fit	19623.89	5	3924.78	456.46	<0.0001
纯误差项 Pure error	42.99	5	8.60		
总误差项 Error Total	5.301E+005	19			
$R^2 = 0.9629$	调整 $R^2$ Adj $R^2 = 0.9295$	变异系数 C.V. = 9.32%	信噪比 Adep precision = 15.682		

由回归方程系数显著性检验(表 8)可知,模型一次项  $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$  影响极显著 ( $p < 0.01$ );交互项  $x_1x_2$ 、 $x_1x_3$  和  $x_2x_3$  不显著 ( $p > 0.05$ ),说明交互项作用

不明显;二次项  $x_1^2$ 、 $x_2^2$  和  $x_3^2$  影响极显著 ( $p < 0.01$ )。

表 8 回归方程系数显著性检验总表(全模型)  
Table 8 Significance test for regression coefficient

系数项 Factor	系数估算值 Coefficient estimate	自由度 df	标准误差 Standard error	95% 置信度 区间低端值 95% CI low	95% 置信度 区间低端值 95% CI high	p 值 Prob > F
Intercept	689.17	1	18.09	648.8739	729.4745	
$x_1$	66.07	1	12.00	39.32946	92.80616	0.0003 **
$x_2$	38.87	1	12.00	12.13193	65.60863	0.0089 **
$x_3$	46.89	1	12.00	20.15214	73.62884	0.0029 **
$x_1x_2$	5.51	1	15.68	-29.4226	40.44809	0.7324
$x_1x_3$	-14.83	1	15.68	-49.7661	20.10459	0.3665
$x_2x_3$	-17.90	1	15.68	-52.8346	17.03609	0.2802
$x_1^2$	-105.32	1	11.68	-131.354	-79.2957	<0.0001 **
$x_2^2$	-93.16	1	11.68	-119.188	-67.1303	<0.0001 **
$x_3^2$	-114.24	1	11.68	-140.273	-88.215	<0.0001 **

\*\* 差异极显著。 \*\* mean significant at 0.01 level.

2.4.3 降维分析 在观察某两因素同时对响应值的影响时可进行降维分析(dimension reduction analysis,DRA),并可得到该两因素影响的回归方程响应面图和等高线图(图 2~4)。在利用响应面图分析因素对响应值的影响时,如果响应曲面坡度比较平缓,则表明因素变化对响应值影响不大。如果坡度非常陡,则说明因素变化对响应值影响显著<sup>[14]</sup>。

等高线图中同一椭圆区域内数值是相同的,中心数值最大,向边缘逐渐变小。椭圆排列越致密说明因素对响应值影响越明显,等高线形状还可反映出交互效应强弱变化。椭圆形表示交互作用显著,而圆形则相反,此时交互效应可以忽略<sup>[15]</sup>。由图 2~4 可以看出,因素间交互作用非常弱。

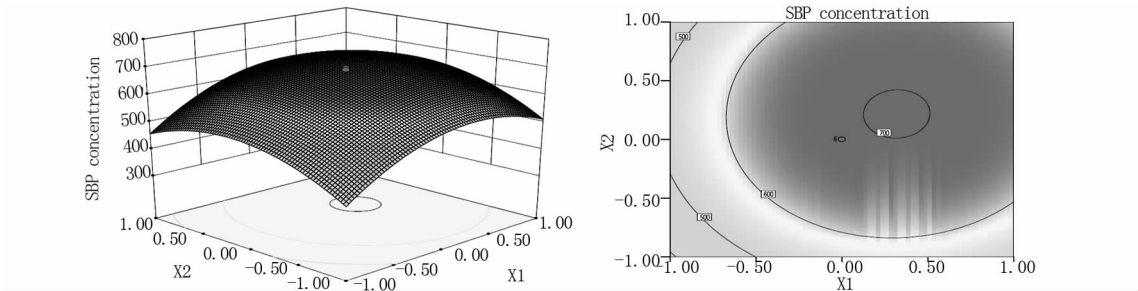


图 2  $\hat{y} = f(x_1, x_2)$  响应曲面和等高线图

Fig. 2 Response surface plot and contour for the function of  $\hat{y} = f(x_1, x_2)$

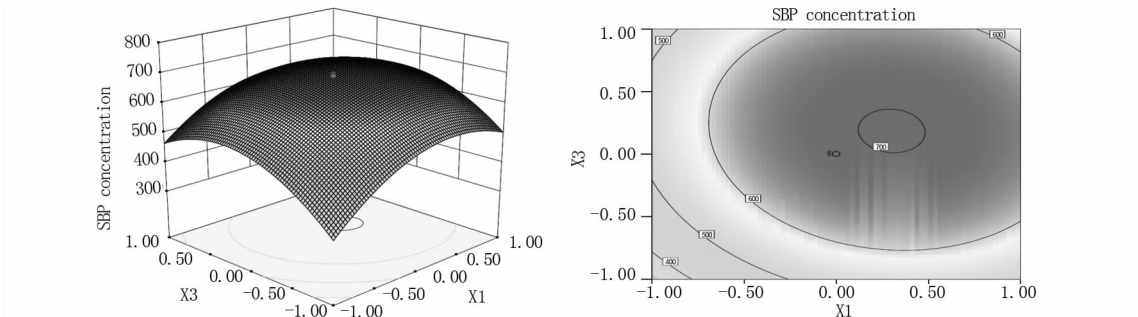


图 3  $\hat{y} = f(x_1, x_3)$  响应曲面和等高线图

Fig. 3 Response surface plot and contour for the function of  $\hat{y} = f(x_1, x_3)$

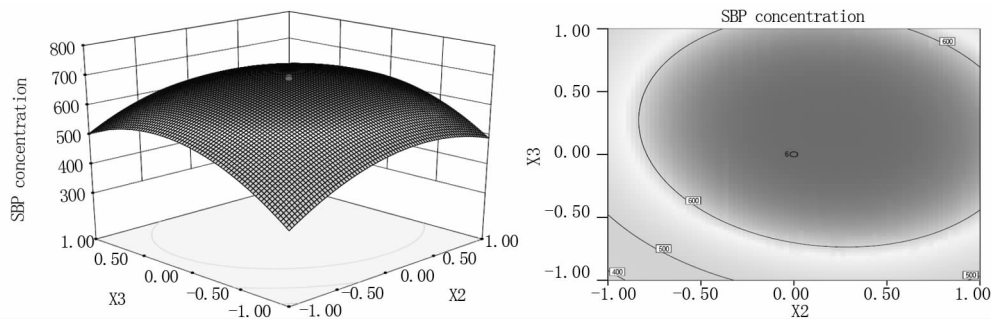


图4  $\hat{y} = f(x_2, x_3)$  响应曲面和等高线图

Fig.4 Response surfaceplot and contour for the function of  $\hat{y} = f(x_2, x_3)$

2.4.4 求最优解 为求解拟合回归方程最优解, 将因变量分别对各自变量求一阶偏导并令其为0, 即  $\frac{\partial y}{\partial x_i} = [\frac{\partial y}{\partial x_1}, \frac{\partial y}{\partial x_2}, \frac{\partial y}{\partial x_3}] = 0$ 。求解方程组即得到响应面函数驻点(最优试验条件), 即  $x_1 = 0.31, x_2 = 0.20, x_3 = 0.17$ 。换算得到具体水平为  $X_1 = 6.0208\%, X_2 = 7.836, X_3 = 93.0328 \text{ mL} \cdot 300 \text{ mL}^{-1}$ 。为操作方便, 将结果修约为  $X_1 = 6.0\%, X_2 = 8.0$  和  $X_3 = 93.0 \text{ mL} \cdot 300 \text{ mL}^{-1}$ 。优化条件下模型预测结果为  $707.204 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 验证试验结果为  $683.023 \pm 9.23 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (n=6)$ 。

### 3 结论

研究结果表明将析因设计、爬陡坡试验和二次旋转中心复合设计联用于枯草芽孢杆菌液态发酵豆粕生产大豆多肽的工艺条件优化是切实可行的。回归分析和方差分析证明所建立的模型是可靠的, 可用于大豆多肽生物合成的分析和预测。模型预测大豆肽含量为  $707.204 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 验证试验为  $683.023 \pm 9.23 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (n=6)$ 。

### 参考文献

- [1] 隋晓楠, 江连洲, 李扬. 大豆多肽的功能特性及在食品工业中的应用[J]. 中国食物与营养, 2010(3): 36-39. (Sui X N, Jiang L Z, Li Y. The nutritional properties and the physiological function of soybeans peptide and its application[J]. Food and Nutrition in China, 2010(3): 36-39.)
- [2] Refstie S, Sahlstr S, Brathen E, et al. Lactid acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic (*salmo salar*) [J]. Aquaculture, 2005, 246: 331-345.
- [3] 刘建峰, 葛向阳, 梁运祥. 响应面法优化豆粕固态发酵工艺的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(6): 87-89. (Liu J F, Ge X Y, Liang Y X. Study on optimization of soybean meal solid fermentation process by response surface analysis[J]. China Biotechnology, 2007, 27(6): 87-89.)
- [4] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. (Yuan Z F, Zhou J Y. Experimental design and analysis [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.)
- [5] 莫重文, 黄岗. 固态发酵法生产发酵豆粕的研究[J]. 中国油脂, 2007, 32(7): 38-40. (Mo Z W, Huang G. Production of fermented soybean meal by solid state fermentation[J]. China Oils and Fats, 2007, 32(7): 38-40.)
- [6] 卫琳, 宋俊梅, 宁维颖. 米曲霉固态发酵豆粕制备大豆肽的研究[J]. 粮食加工, 2009, 34(1): 34-36. (Wei L, Song J M, Ning W Y. Studies on fermentation conditions of soybean peptide by aspergillus oryzaer preparation by solid fermentation[J]. Grain Processing, 2009, 34(1): 34-36.)
- [7] 刘昊飞, 陈霞, 赵贵兴, 等. 豆粕生物肽的生产工艺研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 101-104, 108. (Liu H F, Chen X, Zhao G X, et al. Processing technology of biologic peptide from soybean meal[J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 101-104, 108.)
- [8] 肖怀秋, 李玉珍. 海金沙草粗多糖提取工艺的响应面优化[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(1): 79-83. (Xiao H Q, Li Y Z. Optimization of extraction of rough polysaccharide from *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. by response surface methodology[J]. Amino Acid & Biotic Resources, 2011, 33(1): 79-83.)
- [9] 肖怀秋, 李玉珍. 微生物培养基优化方法研究进展[J]. 酿酒科技, 2010(1): 90-94. (Xiao H Q, Li Y Z. Research progress in the optimization of microbial culture medium[J]. Liquor-making Science & Technology, 2010(1): 90-94.)
- [10] 肖怀秋, 林亲录, 李玉珍. 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Promax NTG<sub>24</sub> 发酵条件研究[J]. 中国食品添加剂, 2005(6): 33-37. (Xiao H Q, Lin Q L, Li Y Z. Studies on the fermentation conditions of *Bacillus subtilis* Promax NTG<sub>24</sub> [J]. China Food Additives 2005(6): 33-37.)
- [11] 管风波. 大豆多肽液态发酵工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2008(6): 14-17. (Guan F B. Optimization of condition for liquid state fermenting soybean peptide [J]. Cereals & Oils, 2008(6): 14-17.)
- [12] Davies O L. The design and analysis of industrial experiments (2<sup>nd</sup> edition) [M]. London: Longman Group Limited, 1978.
- [13] Montgomery D C. Design and analysis of experiments [M]. Australia: John Wiley & Sons Australia, Limited, 1999.
- [14] Yin G H, Dang Y L. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box-Behnken statistical design[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 603-610.
- [15] Dong C H, Xie X Q, Wang X L, et al. Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Food and Bioproducts Processing, 2009, 87(2): 139-144.