

# 一株产 L-赖氨酸菌株发酵培养基的响应面优化

周旭波, 庄楚周

(广东环西生物科技股份有限公司, 广东揭阳 515343)

**摘要:** 本试验优化了一株黄色短杆菌HXL109的发酵培养基以提高L-赖氨酸的产量。在研究葡萄糖、硫酸铵、豆饼水解液、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 七个单因素实验的基础上, 用Design Expert软件的Box-Behnken Design(BBD)建立响应面模型。结果表明: HXL109最佳产酸条件为: 葡萄糖89.48 g/L, 豆饼水解液30.77 g/L, 硫酸铵20.89 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  4.5 g/L。在此条件下L-赖氨酸的产量为142.65 g/L, 与预测值(143.67 g/L)吻合度较高。通过发酵对比实验可见, 用响应面分析法对该L-赖氨酸产生菌发酵培养基进行优化, 可获得最佳的工艺条件。

**关键词:** L-赖氨酸; 响应面; 对比实验

文章编号: 1673-9078(2012)8-1049-1053

## Optimization of the Fermentation Medium of a L-lysine-producing Strain by Response Surface Methodology

ZHOU Xu-bo, ZHUANG Chu-zhou

(Guangdong Huanxi Biological Technology Co., Ltd, Jieyang 515343, China)

**Abstract:** The fermentation medium of a L-lysine producing strain *Brevibacterium flavum* HXL109 to improve the L-lysine production was optimized. With the software Design Expert, a response surface model was established using the Box-Behnken design(BBD). The effects of glucose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , soybean cake hydrolysate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  on L-lysine yield were analyzed. The results showed that the optimum conditions for HXL109 to produce L-lysine were as follows: glucose 89.48g/L, soybean cake hydrolysate 30.77g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20.89g/L and  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  4.5g/L. Under these conditions, the result of confirmatory experiment (142.65g/L) was in good agreement with the predicted value (143.67g/L). A comparison study showed that the established regression model had good effectiveness in optimizing the fermentation medium of a L-lysine producing strain.

**Key words:** L-lysine; RSM; comparing experiment

L-赖氨酸是人体和动物所不能合成的八种必需氨基酸中最重要的一种<sup>[1]</sup>。L-赖氨酸是合成人和动物机体组织蛋白质的必需物质, 是激素、体内酶、抗体等重要功能性物质的主要成分, 是脑组织和脑神经的组成物质。由于其不能在人体内通过还原氨基化作用或转氨基作用生成, 只能通过从外界来获取, 同时它也是谷物中最缺乏的氨基酸, 因此, L-赖氨酸被认定为是第一限制性氨基酸<sup>[2]</sup>。

赖氨酸的作用非常广泛, 在医药工业领域、食品工业领域、畜牧饲料等方面都有着广泛的应用<sup>[3]</sup>。它对人体和动物调节体内代谢平衡、提高体内对谷类蛋白质的吸收、改善人类膳食营养和动物营养、促进生长发育均有重要作用。在八种必需基本氨基酸中, 赖氨酸是唯一的仅L-型成分才能有效利用的。在饲料领域里, L-赖氨酸是最重要的饲料添加剂<sup>[4]</sup>。在食品工业上, L-赖氨酸作为食品强化剂被广泛应用。它是合

成大脑神经再生性细胞、其它核蛋白以及血红蛋白等重要蛋白质所需的氨基酸。对于儿童来说L-赖氨酸显得更为重要, 它能促进钙的吸收, 加速骨骼生长, 促进智力发育、体格发育、提高血浆蛋白的含量以及对疾病的免疫力, 是儿童生长发育不可缺少的营养素<sup>[5]</sup>。在医药工业上, L-赖氨酸一般被用作氨基酸输液, 可以作为治疗铅中毒的药物、利尿的辅助治疗剂、血栓预防剂<sup>[6]</sup>。此外, L-赖氨酸还可消除四环素在治疗中的副作用等<sup>[7]</sup>。近年来研究还发现, L-赖氨酸对营养不良、乙型肝炎、支气管炎等病也有一定疗效<sup>[8]</sup>。

目前L-赖氨酸主要由发酵法生产, 世界上赖氨酸生产规模已仅次于谷氨酸而居氨基酸生产工业的第二位<sup>[9]</sup>。我国自20世纪70年代末就开始用国内自己诱变的菌种生产赖氨酸, 但只生产少量的食品添加剂。直到1986年年产1000t饲料级赖氨酸的广西赖氨酸厂建成投产, 拉开了我国工业化生产赖氨酸的序幕<sup>[10]</sup>, 短短几十年国内发酵法生产赖氨酸的工业化水平已取

收稿日期: 2012-05-18

得了飞速的发展,结束了我国赖氨酸长期依赖进口的历史。对于工业L-赖氨酸生产菌株来说,实现发酵过程的最优化,使菌种的潜力充分发挥,达到产能最高成本最低的目的,这是发酵技术的一个最高境界,也是倍受到广大研究者和生产者的普遍关注的研究。

本实验通过响应面法对一株赖氨酸产生菌(*Brevibacterium flavum*) HXL109的发酵培养基进行优化,提高该赖氨酸产生菌的发酵生产水平,为工业化发酵生产赖氨酸工艺的改进提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) HXL109为广东环西生物科技股份有限公司技术中心保藏菌种。

### 1.2 培养基

斜面培养基(g/L):葡萄糖 2,蛋白胨 1,牛肉膏 1,酵母膏 5,NaCl 2.5,琼脂 20,pH 7.0~7.2。

种子培养基(g/L):葡萄糖 30,硫酸铵 5, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,豆饼水解液 16,pH 7.0~7.2。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 120,硫酸铵 30, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  3.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.015, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.015,豆饼水解液 20,VH 140  $\mu\text{g}$ ,VB<sub>1</sub> 1 mg,Thr 20 mg,pH 7.2~7.5。

### 1.3 培养方法

种子培养:接1环生长良好的斜面种子至装有55 mL种子培养基的500 mL摇瓶中,置于旋转式摇床上(200 r/min),32 °C振荡培养30 h。

发酵:10 L发酵罐采用10%接种量,32 °C,发酵66 h;发酵过程中控制补糖、补硫酸铵,并连续带放。

### 1.4 单因素试验

#### 1.4.1 碳源的确定

选择120 g/L的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖作为碳源,其他同1.2发酵培养基,单因素试验选择合适的碳源。确定合适的碳源后,分别以60、90、120、150、180 g/L的浓度作为添加量,其他同1.2发酵培养基,进行单因素试验,确定合适的添加量。

#### 1.4.2 无机氮源的确定

选择30 g/L的醋酸铵、硝酸铵、硫酸铵作为无机氮源,以120 g/L葡萄糖为碳源,其他同1.2发酵培养基,单因素试验选择合适的氮源。确定合适的氮源后,分别以10、20、30、40、50 g/L的浓度作为添加量,其他同1.2发酵培养基,进行单因素试验,确定合适的添加量。

#### 1.4.3 豆饼水解液的确定

豆饼水解液营养成分丰富,是发酵生产不可缺少的营养物质,选择10、20、30、40、50 g/L浓度的豆饼水解液作为添加量,其他同1.2发酵培养基,确定最适的豆饼水解液添加量。

#### 1.4.4 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的确定

添加1.5、2.5、3.5、4.5、5.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,其他同1.2发酵培养基,确定最适  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  添加量;添加0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,其他同1.2发酵培养基,确定最适  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  添加量;添加0.01、0.015、0.02、0.025 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,其他同1.2发酵培养基,确定最适  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  添加量;添加0.01、0.015、0.02、0.025 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,其他同1.2发酵培养基,确定最适  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  添加量。

### 1.5 响应面优化试验

在单因素试验结果基础上,采用四因素三水平的Box-Behnken Design (BBD)响应面设计法<sup>[11-14]</sup>,以葡萄糖、豆饼水解液、硫酸铵和  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  为考察因素,分别以A、B、C、D表示,以L-赖氨酸的产量(g/L)为指标进行优化。

### 1.6 数据统计与分析

采用Design-Expert (Version 7.0.0)软件对响应面试验得到的数据进行线性回归和方差分析,模型及因素的显著性均通过F值考察(P<0.05),所有试验均做3个重复,结果以L-赖氨酸的产量(g/L)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 不同碳源对L-赖氨酸发酵的影响

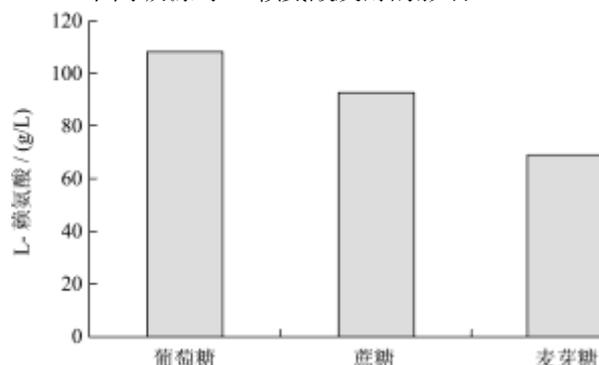


图1 不同碳源对L-赖氨酸发酵的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on yield of L-lysine

由图1可看出,不同碳源对L-赖氨酸发酵的影响不同,其中以葡萄糖为碳源,L-赖氨酸发酵产酸水平最高,为108.2 g/L,其次蔗糖,最低为麦芽糖,L-赖氨酸发酵产酸水平为68.9 g/L。因此,在L-赖氨酸发

酵中，以葡萄糖作为主要碳源比较合适。

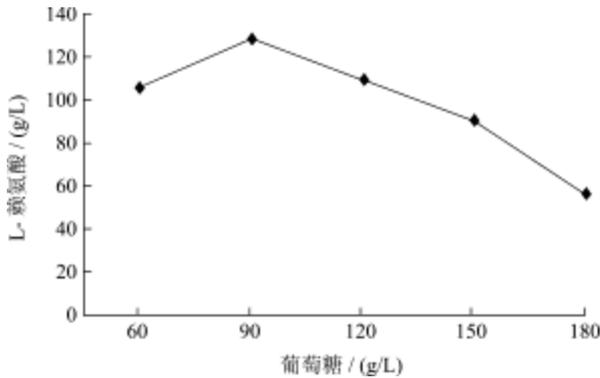


图2 葡萄糖对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.2 Effect of glucose concentration on yield of L-lysine

由图2可以看出，在赖氨酸发酵的初始，葡萄糖的浓度不宜过高，以90 g/L左右比较适宜。

2.1.2 不同氮源对 L-赖氨酸发酵的影响

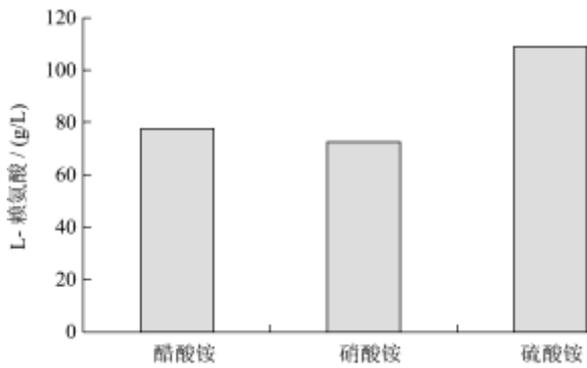


图3 不同氮源对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.3 Effect of nitrogen sources on yield of L-lysine

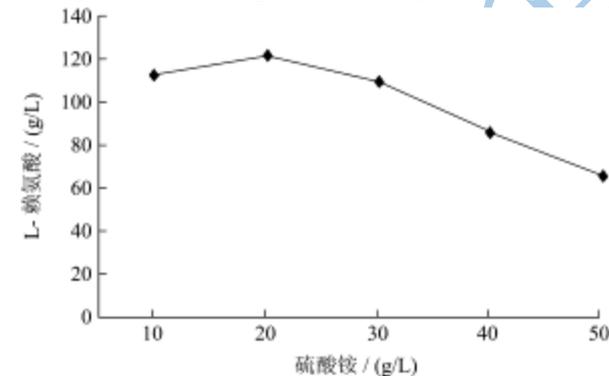


图4 硫酸铵对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.4 Effect of (NH4)2SO4 concentration on yield of L-lysine

在赖氨酸发酵过程中，氮源和碳源同样重要，除了氨水可提供部分氮源外，另外还需要其他无机氮源，这是因为仅用氨水补充氮源会造成发酵液 pH 值过高。由图3可看出，以硫酸铵为主要氮源比较合适，L-赖氨酸发酵产酸水平最高，为108.9 g/L，醋酸铵及硝酸铵相对较差。

由图4可以看出，在赖氨酸发酵的初始，硫酸铵的浓度不宜过高，以20 g/L左右比较适宜。

2.1.3 豆饼水解液的对对 L-赖氨酸发酵的影响

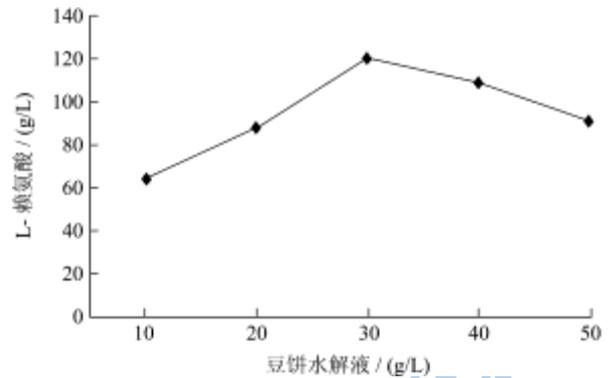


图5 豆饼水解液对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.5 Effect of soybean cake hydrolysate concentration on yield of L-lysine

由图5可以看出，豆饼水解液的浓度对 L-赖氨酸发酵有比较显著的影响，以30 g/L左右为比较适宜。

2.1.4 KH2PO4·3H2O、MgSO4·7H2O、FeSO4·7H2O、MnSO4·H2O 对 L-赖氨酸发酵的影响

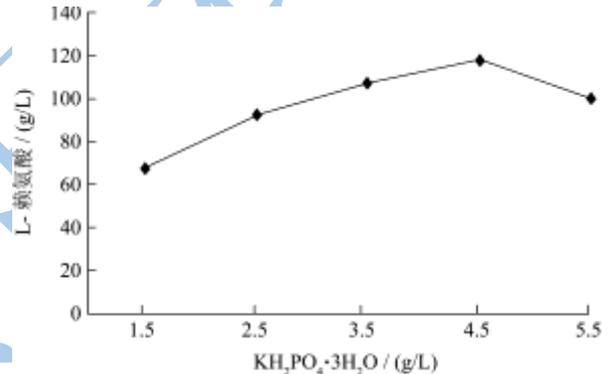


图6 KH2PO4·3H2O 对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.6 Effect of KH2PO4·3H2O concentration on yield of L-lysine

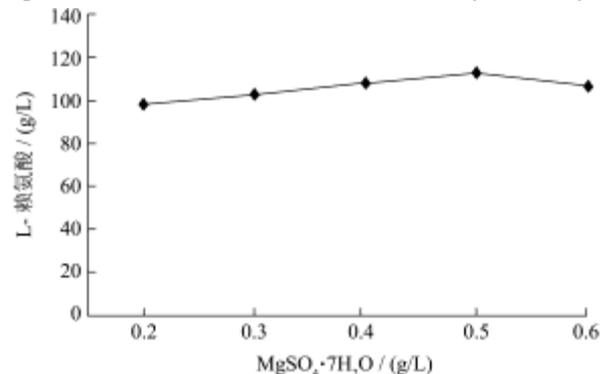


图7 MgSO4·7H2O 对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.7 Effect of MgSO4·7H2O concentration on yield of L-lysine

由图6可知，在 L-赖氨酸发酵中，KH2PO4·3H2O 的添加量以 4.5 g/L 为宜；由图7可知，在 L-赖氨酸发酵中，MgSO4·7H2O 的添加量以 0.5 g/L 为宜；由图8可知，FeSO4·7H2O 的添加量以 0.015 g/L 为宜；由图9可知，MnSO4·H2O 的添加量以 0.015 g/L 为宜。其中 KH2PO4·3H2O 浓度变化对 L-赖氨酸发酵的影响

比较显著,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$  的浓度对 L-赖氨酸发酵有一定影响。

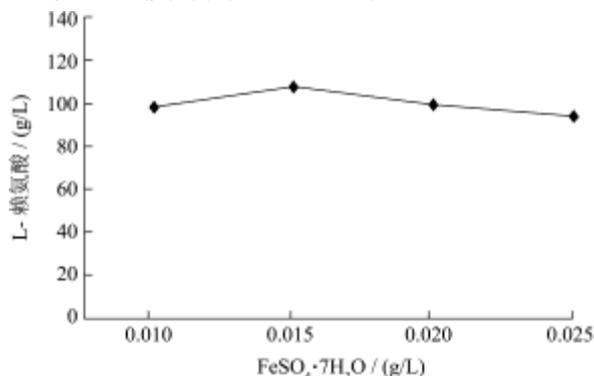


图 8  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.8 Effect of  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  concentration on yielded of L-lysine

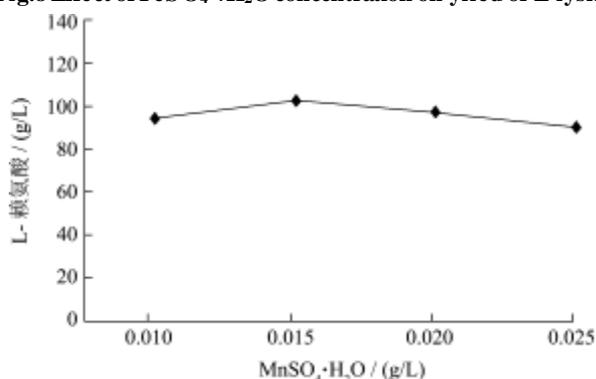


图 9  $MnSO_4 \cdot H_2O$  对 L-赖氨酸发酵的影响

Fig.9 Effect of  $MnSO_4 \cdot H_2O$  concentration on yield of L-lysine

### 2.2 响应面优化试验

根据单因素试验结果, 设定葡萄糖(A)在 80~100 g/L 之间, 豆饼水解液(B)在 20~40 g/L 之间, 硫酸铵(C)在 10~30 g/L 之间, 磷酸二氢钾(D)在 3.5~5.5 g/L 之间, 采用 Box-Behnken 响应面设计法进行优化。试验因素编码和水平如表 1 所示, 试验安排及结果如表 2 所示。

表 1 Box-Behnken 响应面设计试验因素水平和编码

Table 1 Factors and their coded levels in response surface design

| 编码 | A [葡萄糖/(g/L)] | B [豆饼水解液/(g/L)] | C [硫酸铵/(g/L)] | D [磷酸二氢钾/(g/L)] |
|----|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| -1 | 80            | 20              | 10            | 3.5             |
| 0  | 90            | 30              | 20            | 4.5             |
| 1  | 100           | 40              | 30            | 5.5             |

#### 2.2.1 二次回归拟合和方差分析

利用 Design Expert 软件对表 2 数据进行多元二次回归拟合, 回归方程如下:

(1) 响应值 L-lysine 浓度(g/L)与因素编码值(Coded Factors)之间的函数关系:

$$L\text{-lysine} = 143.43 - 1.36A + 3.57B + 1.51C - 0.15D$$

$$+ 0.12AB + 0.075AC - 0.53AD + 0.000BC + 0.72BD + 0.50CD - 12.79A^2 - 23.03B^2 - 8.39C^2 - 5.40D^2$$

(2) L-lysine 浓度(g/L)预测值与各因素实际值(Actual Factors)之间的函数关系:

$$L\text{-lysine} = -1245.54583 + 23.06542A + 13.73292B + 3.21333C + 50.00000D + 0.00125AB + 0.00075AC - 0.052500AD + 0.07250BD + 0.05000CD - 0.12787A^2 - 0.23025B^2 - 0.083875C^2 - 5.40000D^2$$

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface design and corresponding results

| 试验号 | A  | B  | C  | D  | L-lys/(g/L) |
|-----|----|----|----|----|-------------|
| 1   | 1  | 0  | -1 | 0  | 118.1       |
| 2   | 0  | 1  | 1  | 0  | 115.6       |
| 3   | 0  | -1 | 0  | 1  | 109.2       |
| 4   | -1 | 1  | 0  | 0  | 113.3       |
| 5   | 1  | 0  | 0  | -1 | 123.4       |
| 6   | 0  | 0  | -1 | 1  | 127.6       |
| 7   | -1 | 0  | 1  | 0  | 123.7       |
| 8   | 0  | 0  | 0  | 0  | 141.5       |
| 9   | 0  | 0  | 1  | 1  | 134.5       |
| 10  | -1 | 0  | 0  | -1 | 126.0       |
| 11  | 0  | 0  | 0  | 0  | 141.7       |
| 12  | 1  | 1  | 0  | 0  | 112.7       |
| 13  | 0  | 0  | -1 | -1 | 129.3       |
| 14  | -1 | -1 | 0  | 0  | 106.3       |
| 15  | 0  | 1  | 0  | -1 | 116.8       |
| 16  | 0  | -1 | -1 | 0  | 107.5       |
| 17  | 0  | 1  | -1 | 0  | 114.4       |
| 18  | -1 | 0  | 0  | 1  | 127.2       |
| 19  | 1  | 0  | 0  | 1  | 122.5       |
| 20  | 0  | 1  | 0  | 1  | 117.9       |
| 21  | -1 | 0  | -1 | 0  | 121.9       |
| 22  | 0  | -1 | 1  | 0  | 108.7       |
| 23  | 0  | 0  | 1  | -1 | 134.2       |
| 24  | 0  | 0  | 0  | 0  | 147.1       |
| 25  | 1  | -1 | 0  | 0  | 105.2       |
| 26  | 1  | 0  | 1  | 0  | 120.2       |
| 27  | 0  | -1 | 0  | -1 | 111.0       |

由表 3 可知, 该回归模型(p 值<0.0001)高度显著, 失拟项(p 值=0.7754)不显著, 说明模型拟合得较好。由表 4 可见, 其复相关系数的平方  $R^2=0.9672$ , 说明由这 4 个因素及其二次项能解释 Y 变化的 97.67%, 模型拟合程度很好<sup>[15]</sup>。这些结果表明了模型的预测值和真实值高度相关, 可以用其代替真实试验点进行发酵培养最优条件的预测。

表 3 回归模型的方差分析

**Table 3 Analysis of variance for fitted regression model equation**

| 方差来源   | 平方和     | 自由度 | 均方和     | F 值    | (Prob>F)  |
|--|---------|-----|---------|--------|-----------|
| Model(模型)  | 3271.89 | 14  | 233.71  | 35.87  | <0.0001** |
| A-glucose  | 22.14   | 1   | 22.14   | 3.40   | 0.0901    |
| B-soy bean   | 152.65  | 1   | 152.65  | 23.43  | 0.0004**  |
| C-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>    | 27.30   | 1   | 27.30   | 4.19   | 0.0632    |
| D-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O | 0.27    | 1   | 0.27    | 0.04   | 0.8421    |
| AB   | 0.06    | 1   | 0.06    | 0.01   | 0.9236    |
| AC   | 0.02    | 1   | 0.02    | 0.003  | 0.9541    |
| AD   | 1.10    | 1   | 1.10    | 0.17   | 0.6880    |
| BC   | 0.00    | 1   | 0.00    | 0.00   | 1.0000    |
| BD   | 2.10    | 1   | 2.10    | 0.32   | 0.5804    |
| CD   | 1.00    | 1   | 1.00    | 0.15   | 0.7021    |
| A <sup>2</sup>                                       | 872.11  | 1   | 872.11  | 133.87 | <0.0001** |
| B <sup>2</sup>                                       | 2827.47 | 1   | 2827.47 | 434.01 | <0.0001** |
| C <sup>2</sup>                                       | 375.20  | 1   | 375.20  | 57.59  | <0.0001** |
| D <sup>2</sup>                                       | 155.52  | 1   | 155.52  | 23.87  | 0.0004**  |
| 误差   | 78.18   | 12  | 6.51    |        |           |
| 失拟项  | 57.99   | 10  | 5.80    | 0.57   | 0.7754    |
| 纯误差  | 20.19   | 2   | 10.09   |        |           |
| 所有项  | 3350.07 | 26  |         |        |           |

表 4 模型可置信度分析

**Table 4 Fit Statistics for the model**

|           |        |                |         |
|-----------|--------|----------------|---------|
| Std. Dev. | 2.55   | R-Squared      | 0.9767  |
| Mean      | 121.39 | Adj R-Squared  | 0.9494  |
| C.V. %    | 2.10   | Pred R-Squared | 0.8867  |
| PRESS     | 379.45 | Adeq Precision | 21.4788 |

2.2.2 响应因子水平的优化

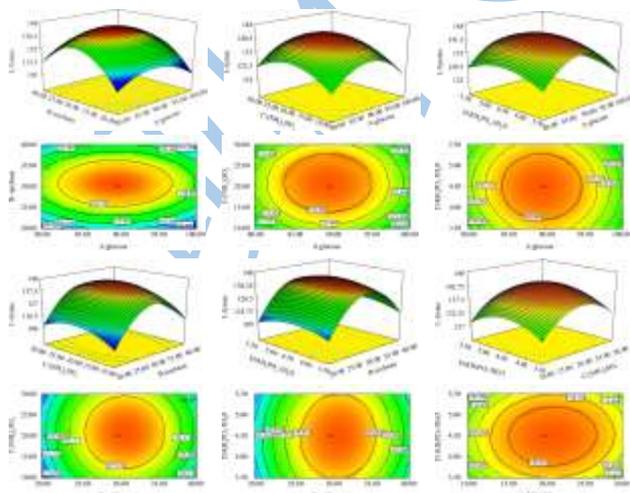


图 10 响应面立体图及等高线图

Fig.10 Response surface and contour plots

根据模型做出相应的响应曲面和等高线见图 10。通过该组动态图对任何两因素交互影响 L-lysine 产量的效应进行分析与评价,从而确定最佳因素水平。从图 10 中可以看到葡萄糖与豆饼水解液、葡萄糖与硫酸铵、葡萄糖与磷酸二氢钾、豆饼水解液与硫酸铵、豆饼水解液与磷酸二氢钾、硫酸铵与磷酸二氢钾两两交互作用的响应曲面图及等高线图,等高线图形状近乎呈圆形或椭圆形,表明每两个自变量之间的交互效应较弱,对模型响应值的变化影响相对较复杂。

从图 10 中可以直观的看出,实验因素对响应值的影响变化趋势,以及回归模型确实具有最大响应值。利用设计软件进行岭脊分析,可以得到最优培养基为:葡萄糖的浓度为 89.48 g/L,豆饼水解液的浓度为 30.77 g/L,硫酸铵的浓度为 20.89 g/L,磷酸二氢钾的浓度为 4.5 g/L,此时 L-lysine 产量最大预测值为 143.67 g/L。为验证回归模型的可靠性,以响应面实验得到的最优培养基进行了 3 次平行验证实验,试验得到的 L-lysine 产酸平均值为 142.65 g/L,与预测值(143.67 g/L)吻合度较高,说明模型能较好地预测实际发酵情况。优化后的发酵培养基使菌株 HXL109 的 L-lysine 产量提高了 31.4%。

3 结论

在单因素分析的基础上,采用响应面分析法考察葡萄糖、豆饼水解液、硫酸铵和磷酸二氢钾 4 个因素对 L-lysine 产量的影响,根据 BBD 原理设计了 4 因素 3 水平共 27 个实验。用 Design Expert 软件处理实验数据,得到了产酸的回归模型以及取得模型最优值时各因素的水平。经检验证明该模型是合理可靠的,能够较好地预测 L-lysine 的发酵产量。综合单因素试验和响应面优化试验,最终确定了最佳的发酵培养基为:葡萄糖 89.48 g/L,豆饼水解液 30.77 g/L,硫酸铵 20.89 g/L,磷酸二氢钾 4.5 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸亚铁 0.015 g/L,硫酸锰 0.015 g/L, VH 140 μg/L, VB<sub>1</sub> 1 mg/L, Thr 20 mg/L。优化后,经 3 批试验验证,验证试验平均值与预测值接近,L-lysine 产量比优化前提高了 31.4%。因此,利用响应面分析方法对黄色短杆菌 HXL109 产赖氨酸发酵培养基进行优化是可行的。

参考文献

[1] 张伟国,顾正华.L-赖氨酸高产菌选育的研究[J].食品与发酵工业,2001,27(8):17-20  
 [2] 李倩.L-赖氨酸盐酸盐结晶过程研究[D].河北科技大学,2010

- [3] 骆超超.发酵谷物中产赖氨酸益生菌的筛选及其应用[D].东北农业大学,2010
- [4] 魏爱英,葛玉萍.L-赖氨酸的代谢途径到工业生产[J].发酵科技通讯,2011,2:31-34
- [5] Thein DJ, Hurt W C. Lysine as a prophylactic agent in the treatment of recurrent herpes simplex labialis [J]. Oral Surg, 2004, 58: 659-666
- [6] 田金宝,贾晓波,杨志恒,赵献潮. L-赖氨酸的应用、生产及市场展望[J].氨基酸和生物资源,2004,1:44-46
- [7] 朱晓彤.氨基酸与深加工产品的生产及应用[J].医药中间体及其化工原料,2004,2:17-24
- [8] 朱汪群,孙复华,黄继红.赖氨酸市场前景及发展论述[J].发酵科技通讯,2006,2:39-42
- [9] 张军华.微生物发酵法生产 L-赖氨酸的研究进展[J].生物加工过程,2012,2:73-78
- [10] 王均成,王文凤.L-赖氨酸发酵生产研究进展[J].发酵科技通讯,2010,39(4):39-43
- [11] Box.G.E.P.&Behnken.D.W.;Technometrics.(2).455:476.1960
- [12] 宫衡,李小明,伦世仪.响应面法优化赖氨酸发酵培养基[J].生物技术,1995,5(4):13-15
- [13] 徐春泽,王泽南,占子奇,等.响应面法对产甘露醇发酵乳杆菌发酵条件的优化[J].现代食品科技,2012,28(2):168-171
- [14] 诸景光,罗立新.基于响应面法的 Epthilone 发酵优化[J].现代食品科技,2009,25(7):771-775
- [15] Kari Kyla- nikkila. Metabolic engineering of Lactobacillus helveticus CNRZ32 for production of pure L-(+)-Lactic acid [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 3835-3841