

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.04.033

# 利用响应面优化固态发酵生产 毛叶山桐子脱脂果渣发酵饲料

刘曦南北, 孙意冉, 唐琳, 陈放

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室,  
能源植物生物燃油制备及利用国家地方联合工程实验室, 成都 610064)

**摘要:** 文章利用响应面法对毛叶山桐子发酵饲料的发酵条件进行了优化. 实验菌种采用了产朊假丝酵母, 实验材料为毛叶山桐子的脱脂果渣. 首先利用单因素实验对五个影响发酵的指标进行了研究, 然后在单因素的基础上利用 Plackett-Burman 实验设计筛选出其中显著的三个因子并利用 Box-Behnken 响应面设计对其进行优化. 优化后的条件为发酵温度 30℃, 料液比 1:1.2, 接种量 10.5%, 硝酸铵添加量 8.8%, 发酵时间 4d. 经优化条件发酵后, 毛叶山桐子脱脂果渣发酵饲料的粗蛋白由发酵前的 8.49% 提升到 19.13%, 脱脂果渣的营养组成变得更加合理.

**关键词:** 毛叶山桐子脱脂果渣; 发酵饲料; 响应面; 固态发酵

**中图分类号:** Q939.96/S816.6      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0863-07

## Optimization of response surface for fermented feed in *Idesia polycarpa* residues through solid-state fermentation

LIU Xi-NanBei, Sun Yi-Ran, TANG Lin, CHEN Fang

(National and Local Joint Engineering Laboratory for Energy Plant Bio-oil Production and Application,  
Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education,  
college of Life sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** In this study, response surface methodology (RSM) was performed the optimization of the fermentation of *Idesia polycarpa* residues, and *Candida utilis* was selected for solid-state fermentation. Five influences of the fermentation were studied by one-factor tests, and the Plackett-Burman experiment subsequent confirmed three main influences for Box-Behnken RSM design. Optimized conditions of the fermentation as follow: residues with ratio of solid to liquid 1:1.2,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  additive amount 8.8%, and *Candida utilis* inoculation 10.5% fermented in 30℃ for 4 days. Fermentation results showed that, the crude protein content of fermented feed increased from 8.49% to 19.13%, and the nutrition ratio of products became more reasonable. This study suggests that *Idesia polycarpa* residues have a real potential in the modern farming by the solid-state fermentation.

**Keywords:** *Idesia polycarpa* residues; Fermented feed; Response surface; Solid-state fermentation

收稿日期: 2016-04-10

基金项目: 四川省科技创新苗子工程(2015MZGC005)

作者简介: 刘曦南北(1988-), 浙江湖州人, 硕士研究生, 主要研究方向为天然产物. E-mail: z3121280@163.com

通讯作者: 陈放. E-mail: chengfang@scu.edu.cn.

## 1 引言

毛叶山桐子 (*Idesia polycarpa* Maxim. var. *vestita* Diels) 属于大风子科山桐子属落叶乔木, 是山桐子的变种, 多分布于陕西、四川、甘肃、浙江等地, 是一种价值较高的油料作物, 其油富含亚油酸和维生素 E<sup>[1-3]</sup>, 可供食用<sup>[4]</sup> 和生生产物柴油<sup>[5]</sup>. 同时, 毛叶山桐子果实中主要包括脂肪酸、酚类、糖甙等物质, 具有抗菌、抗氧化等功效, 具有较高的研究价值<sup>[6]</sup>. 在实际研究中, 人们对毛叶山桐子油的开发和利用关注度较高, 而对于在生产加工过程中所产生的毛叶山桐子脱脂果渣关注得比较少, 目前与其相关的研究工作也非常少. 因此, 对毛叶山桐子脱脂果渣进行开发利用, 提高其经济价值, 将其变废为宝是具有实际意义的.

近些年来, 微生物发酵饲料在畜牧业中得到了广泛应用<sup>[7]</sup>. 发酵技术在饲料生产中有着非常好的效果, 粕类原料通过发酵作用可改变其理化性质, 降解抗营养因子, 提高营养吸收率, 增加动物适口性, 将原料转化为优质饲料<sup>[8]</sup>. 固态发酵是指以固体基质进行发酵且没有或接近没有可自由流动水的一种发酵方式, 这一技术在很早之前就被人们所掌握. 固态发酵是一种环境友好型的技术手段, 其耗能低, 污染小, 能够很好的处理固体废渣<sup>[9,10]</sup>. 产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 属于国家规定的发酵菌种, 它能够有效地将无机氮转化为有机氮, 在发酵过程中可产生大量生物活性物质<sup>[11]</sup>, 另外, 相对于其它种类的酵母, 产朊假丝酵母可产生更多的小分子蛋白<sup>[12]</sup>, 能够更好地提升饲喂对象的品质. 因此, 本研究选择了产朊假丝酵母固态发酵的方式来处理毛叶山桐子脱脂果渣, 将其从废料转变为优质发酵饲料, 从而避免资源浪费并解决未处理脱脂果渣对环境的污染问题. 在实验中, 考虑到产朊假丝酵母可以利用铵盐和硝酸盐作为氮源, 同时为了避免一些氮源如硫酸铵等对培养基 PH 的改变, 我们最终选择了性价比较高且对发酵条件影响较小的硝酸铵作为发酵所用氮源.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

2.1.1 脱脂果渣 实验所用新鲜毛叶山桐子脱脂果渣由广元山桐子能源公司提供, 无可见霉变污染.

2.1.2 发酵菌种 发酵菌种产朊假丝酵母 (*Can-*

*ida utilis*) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC).

2.1.3 培养基 YPD 培养基: 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (液体培养); 酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基 (固体培养). 在实际实验中, 为了简化实验流程, 以等量蔗糖替代了葡萄糖, 应用效果良好.

2.1.4 药品与试剂 蔗糖, 酵母粉, 蛋白胨均为生化试剂 (BR), 硝酸铵, 浓硫酸, 硫酸铜, 硫酸钾, 无水碳酸钠, 溴甲酚绿, 甲基红, 氢氧化钠, 盐酸, 重铬酸钾, 无水乙醇, 石油醚等均为分析纯试剂.

2.1.5 主要实验仪器 SMP500-15859-SBRE 酶标仪 (Molecular Devices, American), BSP-250 生化培养箱 (上海博讯医疗设备厂, 上海), SPH-211B 摇床 (上海世平实验设备有限公司, 上海), JL-100 万能粉碎机 (上海广沙工贸有限公司, 上海), RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂, 上海), 相关玻璃器皿购自成都凌云玻璃仪器厂 (成都).

### 2.2 方法

2.2.1 脱脂果渣处理 为了方便后续研究, 脱脂果渣以粉碎机粉碎后过 40 目筛, 于阴凉避光处储存储备用. 取用时于 121℃ 灭菌, 并于 55℃ 烘干至含水量低于 13%.

2.2.2 菌种活化复壮 将保存的菌种转接至液体培养基, 参照文献培养条件, 进行适当修改后进行培养<sup>[13]</sup>. 为了快速的获取种子液, 在实验中增加了接种比例, 挑取 2 环活化复壮后的菌接入 50mL 液体培养基进行培养. 之后以连续取样的方式在酶标仪上测得产朊假丝酵母的生长曲线 (见图 1), 最终根据所得生长曲线, 收获接种后培养 4 小时的菌液作为所需种子液.

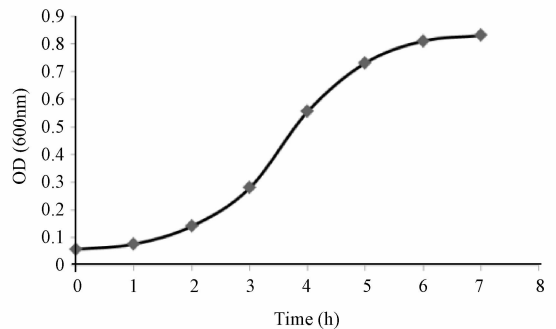


图 1 产朊假丝酵母的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Candida utilis*

2.2.3 菌蛋白测定 吸取 1mL 种子液于 5500r/min 离心 5min, 弃去上清, 以无菌水重悬, 重复 2

次,收集沉淀,干燥至恒重后称重,测定其蛋白含量.经测定,种子液中蛋白含量以质量计约为0.005g/mL,后续实验中按接种量减去其蛋白对实验结果的影响.

2.2.4 残余硝酸铵测定 发酵成品中残余硝酸铵的检测参考蒸馏后滴定法(F\_NCP\_FL\_0040)进行.

2.2.5 固体发酵方法 每次取一定量种子液转接到装有5g已灭菌且于55℃烘干固体发酵培养基的100mL三角瓶中,加入一定量的无菌水和硝酸铵,在一定温度条件下置于生化培养箱中进行发酵.

2.2.6 粗蛋白测定 按常量凯氏定氮法(GB/T 6432-1994)进行,检测结果以百分含量计.

2.2.7 粗脂肪的测定 采用索氏抽提法(GB/T 6433-2006/ISO 6492:1999)对发酵成品中的粗脂肪进行测定,检测结果以百分含量计.

2.2.8 实验优化设计 本次实验中 Plackett-Burman 实验和 Box-Behnken 响应面优化实验的方法设计及结果分析均以 Design-Expert 8.0 软件进行.所有的实验组均包含一个样品组和一个平行组,每次测定均重复3次,取其均值作为实验结果.

### 3 结果与分析

#### 3.1 未发酵脱脂果渣粗脂肪和粗蛋白的含量测定

经测定,未发酵毛叶山桐子脱脂果渣中,粗脂肪的含量为13.30%,粗蛋白的含量为8.49%,同时,脱脂果渣中还含有大量的多糖和纤维,其营养成分组成并不适合直接用于饲喂,但是适合作为微生物发酵过程中所需碳源和培养基质.

#### 3.2 单因素实验结果

单因素实验包括发酵时间,发酵温度,料液比,接种量和硝酸铵添加量对发酵的影响5个实验.其中硝酸铵添加量、接种量及料液比均以饼粕质量计.

3.2.1 最适硝酸铵添加量 硝酸铵添加量分别为6%,8%,10%,12%的样品分别以初始料液比1:1,初始接种量10%,初始发酵时间4d于30℃培养箱进行培养.在发酵结束后,为保证硝酸铵的吸收利用,避免残余硝酸铵对动物产生未知的影响,我们对样品中残余硝酸铵进行了检测,发现在硝酸铵添加量为10%和12%的样品中出现了不同程度的硝酸铵残余,为保证硝酸铵的充分吸收利用,确定了最佳硝酸铵添加量为8%.

3.2.2 最适发酵温度 以初始料液比1:1,初始接种量10%,硝酸铵添加量8%,初始发酵时间4天分别于26℃,28℃,30℃,32℃培养箱进行发酵,研究发现,产朊假丝酵母对毛叶山桐子脱脂果渣的发酵在26~32℃都可进行,在30℃时其粗蛋白含量最高,为18.75±0.21%,但是在26℃和32℃的条件下发酵都不是很理想.因此确定其最佳发酵温度为30℃.

3.2.3 最适发酵时间 以初始料液比1:1,初始接种量10%,硝酸铵添加量8%,在30℃培养箱中分别培养3,4,5,6d,结果见表3.通过表3可以发现,第四天和第五天的发酵情况比较接近,粗蛋白含量分别为(18.62±0.23)%和(18.57±0.14)%,菌类生长进入了最佳时期,而到了第六天可能因为菌体过度生长,种内竞争激烈,同时消耗了大量营养物质,因此我们后续实验的最佳发酵时间定为4天.

3.2.4 最适料液比 料液比分别为1:0.5,1:1,1:1.5,1:2的样品以初始接种量5%,硝酸铵添加量8%,在30℃培养箱中培养4d.通过结果我们发现,在水分过于充足的条件下,发酵过程并不能很好进行,在料液比为1:1时粗蛋白含量达到峰值18.78±0.13%,因此确定最佳料液比为1:1.

3.2.5 最适接种量 接种量分别为5%,10%,20%,30%的样品以料液比为1:1,硝酸铵添加量8%,在30℃培养箱中培养4d,发现接种量为10%的样品在发酵中的表现最佳,粗蛋白含量为19.04±0.29%.因此,确定最佳接种量为10%.

表1 Plackett-Burman 设计因素水平和编码

Tab. 1 Design of Plackett-Burman experimental factors and codes

编码 Code	影响因素 Factor	编码水平 Code Level	
		低水平(-1)	高水平(+1)
A	硝酸铵添加量/%	6	8
B	接种量/%	10	20
C	发酵时间/d	4	5
D	发酵温度/℃	28	30
E	料液比/S·L <sup>-1</sup>	1:0.5	1:1

#### 3.3 Plackett-Burman 实验分析

在单因素实验的基础上,我们以粗蛋白为响应值(R)设计了PB实验,见表1,PB实验结果见表

3,通过 Design-Expert 8.0 软件对结果分析可知,相对于其它两个因素,接种量,料液比,硝酸铵加入量三个影响因素对结果的影响极为显著,见表 4,因此,后续实验将在发酵时间 4d,发酵温度 30℃的条件下对接种量,料液比,硝酸铵加入量三个影响因素的相互影响及其对发酵过程的影响进行研究.

表 2 响应面实验设计因素水平和编码  
Tab. 2 Design of RSM experimental factors and codes

编码 Code	影响因素 Factor	编码水平 Code Level		
		-1	0	1
A	料液比(S/L)	1 : 0.5	1 : 1	1 : 1.5
B	硝酸铵添加量(%)	6	8	10
C	接种量(%)	5	10	20

表 3 Plackett-Burman 实验结果

Tab. 3 Results of Plackett-Burman experiment

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R 值	17.34	14.94	18.59	16.61	14.77	16.01	14.02	15.60	13.28	15.11	19.2	14.69

表 4 Plackett-Burman 实验结果分析

Tab. 4 Results assay of Plackett-Burman experiment

影响因素 Factor	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	协同因素 Coef	标准误差 Standard error	F	P
Model	49.14	6	19.10	0.22	14.32	0.0052
N	4.81	1	0.63	0.22	8.41	0.0338
Inoculation	6.16	1	-0.72	0.22	10.78	0.0219
Time	1.61	1	-0.37	0.22	2.82	0.1539
Temperature	0.96	1	0.28	0.22	1.68	0.2510
S/L	33.33	1	1.67	0.22	58.28	0.0006
虚拟项	2.25	1	-0.43	0.22	3.94	0.1039

表 5 响应面实验设计方法及结果

Tab. 5 RSM design and results

序号 NO.	编码 Code			粗蛋白含量(%) CP
	A	B	C	
1	-1	0	1	15.8
2	0	0	0	19
3	-1	0	-1	14.6
4	0	1	1	17.7
5	0	-1	1	15.2
6	-1	1	0	16.4
7	0	0	0	19.4
8	0	0	0	19.2
9	-1	-1	0	14.4
10	1	0	1	17
11	0	0	0	18.6
12	0	0	0	18.9
13	0	-1	-1	15.4
14	1	-1	0	15.9
15	0	0	-1	16.5
16	1	0	-1	17.1
17	1	1	0	18.3

表 6 二元回归方程的方差分析

Tab. 6 analysis of variance of binary regression equations

来源	离差平方和	自由度	平均方差	F	P
Source	Sum of squares	df	Mean square		
Model	44.07	9	4.90	74.43	<0.0001
A	6.30	1	6.30	95.78	<0.0001
B	8.00	1	8.00	121.61	<0.0001
C	0.55	1	0.55	8.38	0.0232
AB	0.040	1	0.040	0.61	0.4611
AC	0.42	1	0.42	6.42	0.0390
BC	0.49	1	0.49	7.45	0.0294
A2	8.52	1	8.52	129.51	<0.0001
B2	7.65	1	7.65	116.22	<0.0001
C2	9.13	1	9.13	138.78	<0.0001
Residual	0.46	7	0.066		
Lack of fit	0.093	3	0.031	0.34	0.8021
Pure error	0.37	4	0.092		
Cor Total	44.53	16			

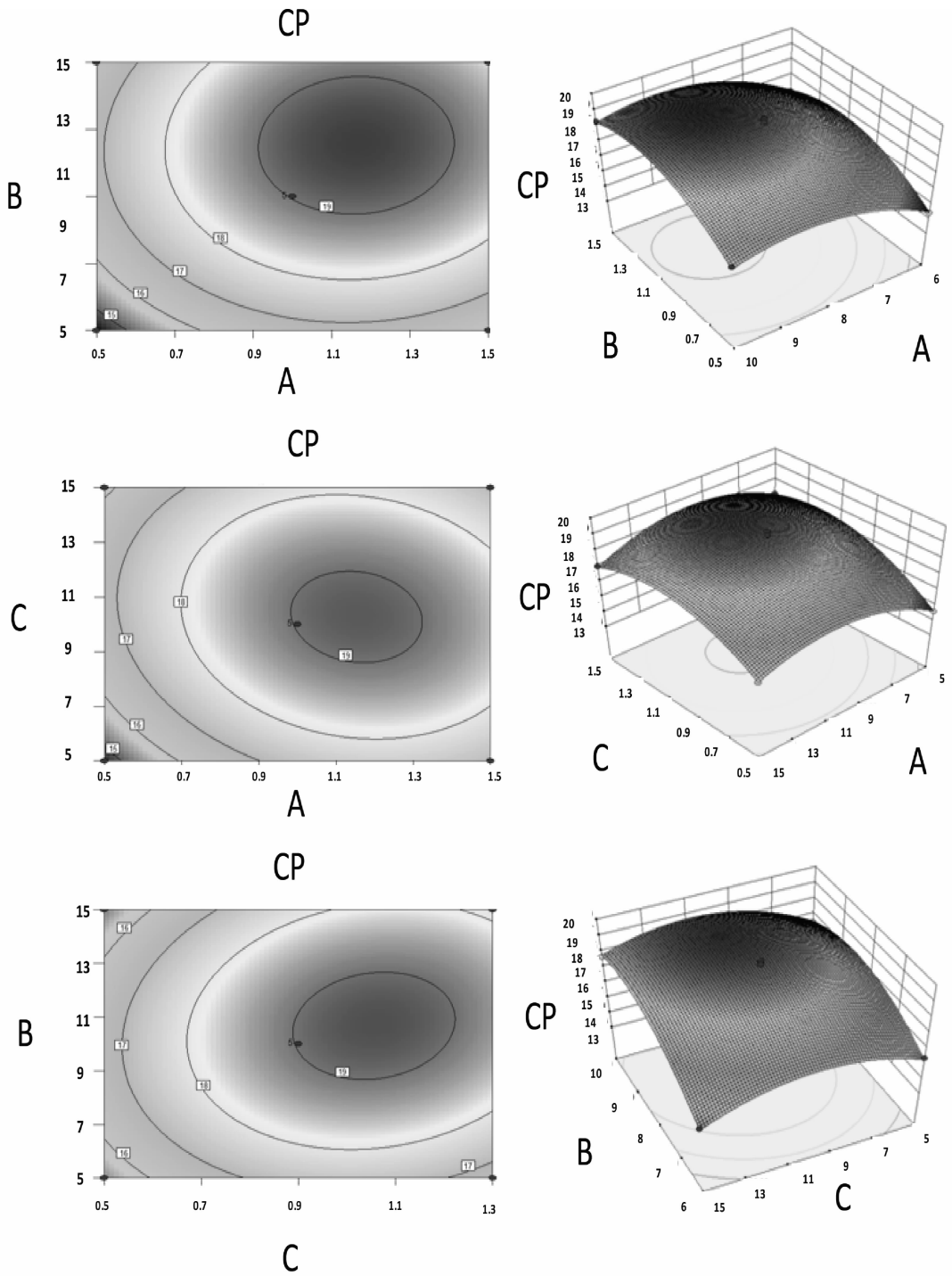


图 2 料液比、硝酸铵添加量和接种量对发酵结果影响的等高线和响应面图

A: 料液比(%); B: 硝酸铵添加量(%); C: 接种量(%); CP: 粗蛋白含量(%)

Fig. 2 Response surface and contour graphs of the ratio of solid to liquid, additive amount of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and inoculation effect on crude protein during fermentation

A: Ratio of solid to liquid; B: Additive amount of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (%); C: Inoculation (%); CP: Crude protein content (%)

### 3.4 响应面实验结果

响应面法 (Response surface methodology, RSM) 是实验设计和条件优化常用的一种设计方法, 本研究在 PB 实验的基础上, 以接种量, 料液比, 硝酸铵加入量三个最为显著的影响因素作为研

究对象进行三因素三水平的响应面法进行条件优化, 实验设计方法见表 2, 运用 Design-Expert 8.0 软件, 以粗蛋白作为响应值 R 对响应面结果进行统计分析, 分析结果见表 5. 由表 5 可知, A, B,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  对发酵结果的影响极显著 ( $P < 0.001$ ), AC,

BC 对发酵结果的影响非常显著( $P < 0.05$ ), 说明了接种量, 料液比, 硝酸铵加入量是发酵过程中重要

因素, 其中料液比, 硝酸铵加入量对发酵的影响最大。

表 7 响应面实验结果方差分析

Tab. 7 analysis of variance of experimental results of RSM

参数 parameter	数值 Value	参数 parameter	数值 Value
标准差 Std. Dev	0.26	复相关系数 R-squared	0.9897
均值 Mean	17.02	校正相关系数 Adj R-squared	0.9764
变异系数 C. V. %	1.51	预测相关系数 Pred R-squared	0.9539
预测残差平方 PRESS	2.05	信噪比 Adeq Precision	23.168

之后利用 Design-Expert 8.0 软件对模型的可信度进行了分析, 结果见表 6. 实验的拟合方程为:  $CP = 19.02 + 0.89A + 1.00B + 0.26C + 0.100AB - 0.33AC + 0.35BC - 1.42A^2 - 1.35B^2 - 1.47C^2$ . 从表 5 和表 6 中可以看到, 回归模型极显著 ( $P < 0.001$ ), 同时, 失拟项不显著 ( $P = 0.80 > 0.05$ ), 表明了模型中并没有异常数据, 回归方程拟合度良好. 表 7 为响应面实验结果的方差分析, 其中回归的方程的复相关系数 R-Squared 为 0.9897, 表明 98.97% 的粗蛋白变化可用此模型来解释, 与实际情况拟合度较好. 模型的校正相关系数为 0.9764, 与预计校正相关系数 0.9539 接近, 变异系数为 1.51%, 信噪比为 23.168, 这些都说明了该模型的可信度较高, 适用于本次发酵实验.

利用 Design-Expert 8.0 软件对回归模型进行规范分析所得的三维响应面图和等高线图见图 1, 图 2 和图 3. 回归模型规范分析所给出的优化法案为料液比 1 : 1.15, 硝酸铵添加量 8.79%, 接种量 10.51%, 粗蛋白预期值为 19.37%, 为了简化操作过程, 降低操作误差, 将最优条件调整为料液比 1 : 1.2, 硝酸铵添加量 8.5%, 接种量 10.5%. 根据最优条件进行发酵实验以验证模型的有效性, 重复 3 次取平均值, 测得发酵后毛叶山桐子固态发酵脱脂果渣的粗蛋白含量为 19.13%, 相对偏差为 1.24%, 与预测值接近. 之后, 为验证该方法应用的可行性, 对反应体系进行了适当放大, 以上述优化条件进行 150g 托盘发酵实验, 所得产品粗蛋白含量为 18.65%, 接近小瓶发酵的结果, 说明此方法在适当调整后可较好地应用于毛叶山桐子发酵饲料的生产.

## 4 讨 论

目前, 毛叶山桐子脱脂果渣作为毛叶山桐子油生产的副产品并没有得到很好的利用, 通常被当作

废料闲置, 不仅污染环境, 而且是对资源极大的浪费. 事实上, 毛叶山桐子脱脂果渣拥有较高的开发价值和潜力, 最近有研究表明, 其含有山桐子属的重要活性物质, 可用于美白和抗氧化<sup>[14]</sup>. 响应面是近年来常用于实验条件优化的一种实验方法, 对于具有多个影响因素的实验, 响应面可以用很少的实验次数稳定高效地获得最佳实验方法<sup>[15,16]</sup>. 实验中, 利用响应对利用毛叶山桐子脱脂果渣生产发酵饲料的相关影响因素进行了优化, 在以优化条件发酵后, 脱脂果渣的性状得到了很大的提升. 有研究表明, 通过发酵, 一些抗营养因子和一些难以吸收的大分子蛋白可被降解为适合机体吸收和利用的小分子肽<sup>[17]</sup>. 在本次实验中, 通过无机氮源的添加及发酵条件优化, 脱脂果渣中的粗蛋白提升了约 224%, 由未发酵时的 8.49% 提高到了 19.13%. 同时我们发现, 脱脂果渣中氨基酸的组成有明显变化, 经过发酵, 各必需氨基酸的量均有不同程度的提升. 养殖工业中有着重要的作用的限制性氨基酸包括赖氨酸, 苏氨酸和蛋氨酸均有明显提升<sup>[18,19]</sup>, 其中赖氨酸提升了 51.16%, 苏氨酸提升了 34.78%, 蛋氨酸提升 103.70%. 此外, 脱脂果渣中粗脂肪在发酵后, 从之前的 13.34% 降到了 6.34%, 也使得毛叶山桐子脱脂果渣发酵饲料的营养结构更加合理. 以上研究证明, 以毛叶山桐子脱脂果渣生产发酵饲料是可行且合理的, 同时也说明了毛叶山桐子脱脂果渣具有进一步开发利用的价值和潜力.

而对于毛叶山桐子脱脂果渣中的抗营养因子的相关研究尚未见诸报道, 因此我们将在后续实验中结合动物实验对其做进一步研究和探讨.

## 参考文献:

- [1] 周桂香, 吴方全, 李成焰, 等. 四川省广元市毛叶山桐子资源的开发利用 [J]. 四川林业科技, 2009,

- 30; 70.
- [2] 马兴旗,李文修. 绿化新秀—毛叶山桐子 [J]. 林业实用技术, 2005, 12: 42.
- [3] 左蕾蕾. 毛叶山桐子用于保健食品的可行性研究初探 [J]. 轻工科技, 2014, 2014: 10.
- [4] 董娜,唐晓姗,唐琳. 毛叶山桐子性别相关 ISSR 分子标记的筛选与分析 [J]. 四川大学学报:自然科学版, 2016, 53: 465.
- [5] 力晓蓉. 毛叶山桐子生物学特性及油脂食用安全性的研究通过鉴定 [J]. 预防医学情报, 1985, 1985: 290.
- [6] Yang F X, Su Y Q, Li X H, *et al.* Preparation of biodiesel from *Idesia polycarpa* var. *vestita* fruit oil [J]. *Industrial Crops & Products*, 2009, 29: 622.
- [7] 华婉,叶扬,王战国,等. 山桐子油的提取分离及理化性质研究 [J]. 四川大学学报:自然科学版, 2016, 53: 181.
- [8] 杨朝福. 水冬瓜果实的化学成分及其抑菌活性研究 [D]. 西北农林科技大学, 2008.
- [9] 姜传慧. 微生物发酵饲料的发展及应用 [J]. 养殖与饲料, 2015, 2015: 29.
- [10] 邓露芳,范学珊,王加启. 微生物发酵粕类蛋白质饲料的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38: 25.
- [11] Pandey A. Solid-state fermentation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 13: 81.
- [12] Singhania R R, Patel A K, Soccol C R, *et al.* Recent advances in solid-state fermentation [J]. *Biochem Eng J*, 2008, 44: 13.
- [13] 李加友,蔡丽阳,于建兴等. 饲用产朊假丝酵母的发酵培养条件研究 [J]. 饲料工业, 2012, 33: 57.
- [14] Moftah O A S, Grbavcic S, Žuža M *et al.* Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation [J]. *Appl Biochem Biotec*, 2012, 166: 348.
- [15] 何东东. 产朊假丝酵母的发酵及功能性质研究 [D]. 天津商业大学, 2010.
- [16] Ye Y, Jia R R, Tang L, *et al.* In Vivo Antioxidant and Anti-Skin-Aging Activities of Ethyl Acetate Extraction from *Idesia polycarpa* Defatted Fruit Residue in Aging Mice Induced by D-Galactose [J]. *Evid-Based Compl Al*, 2014, 2014: 746.
- [17] Goswami S, Ghosh S, Chakraborty S. Reliability analysis of structures by iterative improved response surface method [J]. *Struct Saf*, 2016, 60: 56.