

# 产纤溶酶海洋枯草芽孢菌的液体发酵 条件优化<sup>△\*</sup>

温健, 潘诗翰, 郑鑫, 鄢凯舟, 梁智群\*

(广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁, 530004)

**摘要:**目的 采用响应面法对高产纤溶酶海洋菌株 Y-6-A 的液体发酵条件进行优化, 以进一步提高产酶量并考察该法的有效性。**方法** 先采用单因素实验考查各因素对菌株产酶的影响, 并在此基础上利用 Plackett-Burman 设计筛选到影响菌株产酶的主要因素, 接着通过最陡爬坡实验逼近酶活最高区域, 最后根据 Box-Behnken 中心组合实验设计对各显著因子进行优化。**结果** 最终得到影响产酶的因素有 4 个: 可溶性淀粉、黄豆粕粉、温度和转速, 最佳发酵条件为: 可溶性淀粉 46.1 g/L, 黄豆粕粉 23.3 g/L, 温度 31.2 °C, 转速 184 r·min<sup>-1</sup>, 在此发酵条件下得到的酶活为 3 606.23 IU/mL, 经 3 次验证实验测得的酶活稳定在 3 580.32 ± 14.82 IU/mL, 较优化前提高了 22.4%, 此外, 实验值与预测值之间的相对误差为 0.63%。**结论** 响应面的优化结果比较理想, 经优化后能较好提高酶活。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 纤溶酶; 液体发酵; plackett-Burman(PB)设计; 响应面法

**中图分类号:** TS201.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-3461(2015)03-035-11

## Optimization of liquid fermentation conditions of marine *Bacillus subtilis* for producing the fibrinolytic enzyme

WEN Jian, PAN Shi-han, ZHENG Xin, YAN Kai-zhou, LIANG Zhi-qun\*

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract: Objective** To optimize the liquid fermentation conditions of marine *Bacillus subtilis* for high production of fibrinolytic enzyme. **Methods** The impact of single factors on fibrinolytic enzyme production was studied, and through the Plackett-Burman design, the most significant effect on fibrinolytic enzyme production was obtained. The highest fibrinolytic activity area was investigated by steepest climbing experiments. The different levels of the most four significant factors were optimized through central composite designs by Box-Behnken. **Results** Four factors effected fibrinolytic enzyme production significantly including soluble starch, soybean meal, temperature and speed. The optimal fermentation condition of strain Y-6-A was determined for 4.61% soluble starch, 2.33% soybean meal, temperature at 31.2°C, rotate at 184 r/min. Under the optimal conditions, the enzyme activity was 3606.06IU/mL. Three times validation experiments showed that the activity of fibrinolytic enzyme was stable at 3580.14.82IU/mL, and the optimized enzyme activity was 22.4% higher than before. In addition, relative error between the actual value and predictive value was 0.7%. **Conclusion** The optimization results was reasonable, and the enzyme activity could be improved at a certain level by response surface analysis.

\* <sup>△</sup>基金项目: 国家自然科学基金项目(21062001)资助

作者简介: 温健(1989-), 男, 硕士研究生。E-mail: heimaweijian@163.com

\* 通讯作者: 梁智群(1959-)男, 博士生导师。研究方向为食品微生物技术。

收稿日期: 2014-09-22

**Key words:** *Bacillus subtilis*; fibrinolytic enzyme; Liquid-state fermentation; Plackett-Burman (PB) design; response surface methodology

血栓病是指由血栓形成及血栓栓塞而引发的一系列疾病,其发病率已位居各疾病之首,并有向低龄化发展的趋势,是严重危害人类生命健康的常见病和多发病,为当前研究的重点和热点之一<sup>[1-3]</sup>。溶栓疗法是治疗血栓病的主要手段,目前已批准用于临床的药物主要有链激酶(SK)、尿激酶(UK)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)等<sup>[4-6]</sup>,但大多存在缺陷,因而国内外正致力于从微生物中寻找新型溶栓剂,其所具有的特异性强、半衰期长、低价高效的特性是目前比较理想的溶栓剂<sup>[7]</sup>,但从现有的研究上看,目前的相关研究主要集中在陆地上的微生物种类,而对具有独特生理生化性质<sup>[8]</sup>的海洋微生物则涉足较少,目前已报道有刘晨光<sup>[9]</sup>从海洋中筛选到 1 株假单胞菌,并对其所产的纤溶酶进行纯化及性质研究,此外就是广西大学食品研究所对 1 株筛选自北海淤泥中的枯草芽孢杆菌进行的系列研究<sup>[10-12]</sup>,而采用响应面法对产纤溶酶的海洋微生物进行条件优化的报道则更少,根据现有研究结果,该菌优化后酶活为国内纤溶酶研究中最高,同时具有长达 22 h 的药效时间,并对陈旧性血栓具有独特的疗效。

响应面分析法是借助合理的实验设计及数据统计分析,通过建立二次响应面回归模型,寻找最优因子水平及响应值的 1 种统计学方法<sup>[13]</sup>,其在微生物的培养条件优化中得到了广泛的应用<sup>[14-17]</sup>,根据本课题组的前期研究表明,本海洋纤溶酶高产菌株更适合液体发酵<sup>[18]</sup>。而对来源于海洋的产纤溶酶菌株采用响应面法进行液体发酵优化的研究较少,因此对纤溶酶高产菌株 Y-6-A 的液体发酵条件进行 Plackett-Burman 设计及响应面分析,通过最优发酵条件的确定,从而实现酶活的进一步提高,并为相关类似研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 菌种

海洋枯草芽孢杆菌(marine *Bacillus subtilis*) Y-6-A,广西大学生命科学与技术学院食品研究所保藏。

### 1.2 实验试剂

牛血纤维蛋白原, sigma 公司;凝血酶、尿激酶,中国药品生物制品检定所;琼脂糖, GENE TECH COMPANY LIMITED;其他试剂均为分析纯。

### 1.3 培养基

种子培养基(g/L):酵母膏 5,蛋白胨 10,葡萄糖 5, NaCl 5, pH=7.0~7.2

液体基础发酵培养基(g/L):可溶性淀粉 40, 黄豆粕粉 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3.5, CaCl<sub>2</sub> 0.25, 吐温 801.5, pH=5.5。

### 1.4 主要仪器

SPX-250 生化培养箱(上海跃进医疗仪器厂);HH4-数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);HVE-50 自动灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司);BZ10 型带表卡尺(贵州西南工具厂);回转式恒温调床柜(上海欣蕊自动设备有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 培养方法

种子液培养:将斜面保藏的菌种接入 50 mL 的种子培养基中(50 mL/250 mL), 37 °C, 160 r/min 振荡培养 18 h, 此时菌种已达对数生长期后期。

液体发酵培养:将 4% 的种子液接入 50 mL 的液体发酵培养基中(50 mL/250 mL), 30 °C, 180 r/min 恒温振荡培养 96 h。

### 2.2 纤溶酶酶活的测定方法

根据 AStrup 的方法进行改进,采用纤维蛋白板法<sup>[11]</sup>进行测定。

### 2.3 单因素实验

分别对碳源(2.5%)、氮源(2.5%)、转速、温度、初始 pH、发酵时间、接种量、种龄这 8 个因素进行单因素实验。

### 2.4 响应面优化实验

#### 2.4.1 Plackett-Burman(PB)实验

选择 N=12 的 PB 设计,考察 8 个因素对液体发酵产酶的影响大小,每个因素取 2 个水平,低水平为最佳水平,高水平则约为低水平的 1.25 倍,采用 Design-Expert 8.0.6 进行回归分析,具体

见表 1。

#### 2.4.2 最陡爬坡实验设计

根据 PB 实验得到的 4 个最显著因子进行设计,最陡爬坡实验以实验值变化的梯度方向为爬坡方向,以 PB 实验中的步长来确定爬坡实验的中的步长,从而确定最接近最大产酶的区域。

#### 2.4.3 中心组合实验设计

根据 PB 实验结果及最陡爬坡实验确定四因素三水平,通过 Design-Expert8.0.6 软件进行

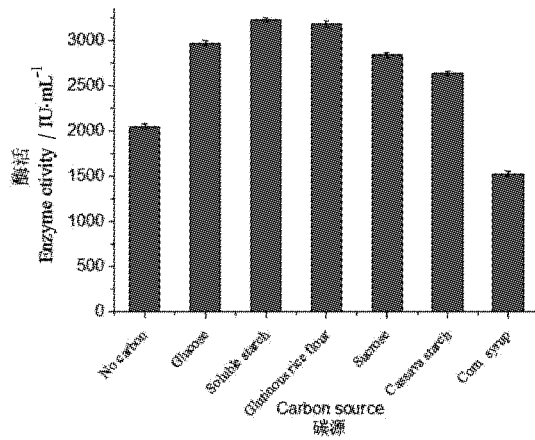


图 1 不同碳源和对产酶的影响

Fig. 1 Effect of different carbon sources on enzyme production

根据图 1 可知,以黄豆粕粉作氮源进行碳源优化,可溶性淀粉作碳源时具有最高酶活,其次为糯米粉,但两者相差不大,需作进一步的浓度梯度

#### 3.1.2 不同碳源、氮源浓度对产酶的影响

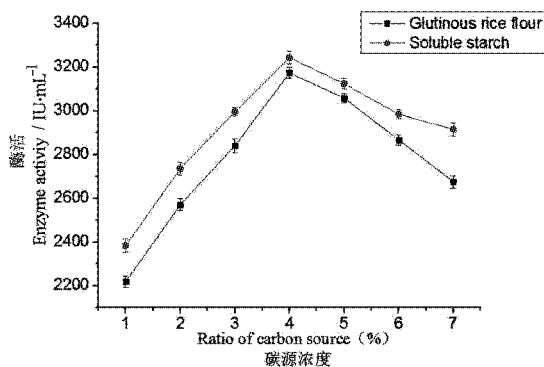


图 3 不同碳源浓度对发酵产酶的影响

Fig. 3 Effect of different carbon concentrations on enzyme production

Box-Behnken 设计,该设计有 29 个试验点,其中 24 个为析因点,5 个为零点,最后根据软件分析得到的最优结果对预测值进行验证,每组重复 3 次取平均值。

## 3 结果与讨论

### 3.1 单因素实验

#### 3.1.1 不同碳源、氮源对产酶的影响

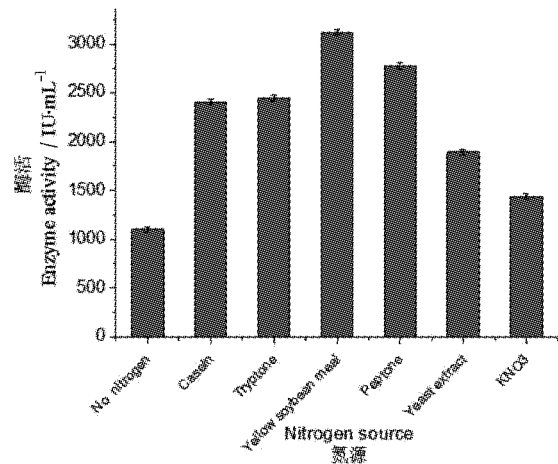


图 2 不同氮源和对产酶的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on enzyme production

研究,由图 2 可知,以可溶性淀粉作碳源进行氮源优化,黄豆粕粉作氮源时具有最高酶活,其次为蛋白胨,但两者的酶活较接近,需进一步研究。

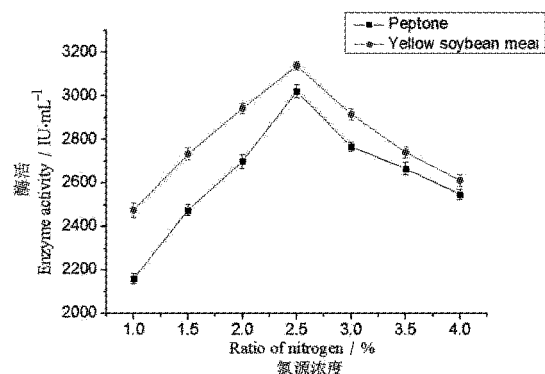


图 4 不同氮源浓度对发酵产酶的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen concentrations on enzyme production

由图 3 可知,随着可溶性淀粉和糯米粉浓度的升高,其发酵液酶活均先增大后减小,并都在浓度为 4% 时具有最大酶活,同时在相同浓度下,可溶性淀粉作碳源时的酶活均高于糯米粉,该结果

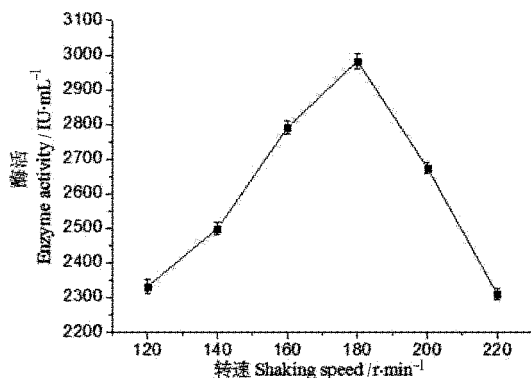


图 5 摇床转速对产酶的影响

Fig. 5 Effect of shaking speed on enzyme production

由图 5 可以看出,当摇床转速在 180 r/min 时,菌株 Y-6-A 的酶活最高,转速高于或低于 180 r/min 其酶活均有所下降,其原因可能是低转速导致溶氧不足,而高转速则易使菌体破碎;由图

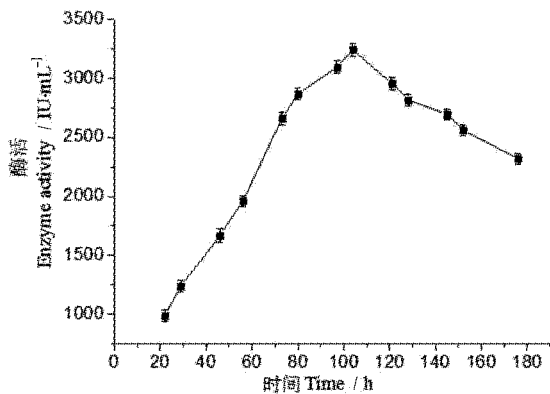


图 7 发酵时间对产酶的影响

Fig. 7 Effect of cultivation time on enzyme production

如图 7 所示,在发酵时间为 80 h 前,菌体的发酵酶活增长速度很快,但超过 104 h 后其酶活开始下降,因此将菌株 Y-6-A 的最佳发酵时间为 104 h;由图 8 可知,低接种量因对培养基的利用不充分而酶活较低,但过大的接种量又易造成种间竞争而不利于产酶,因而由实验结果可知 4% 的接种量是最佳接种量,

### 3.1.5 种龄、初始 pH 对产酶的影响

表明可溶性淀粉对产酶的作用效果要优于糯米粉,是最佳碳源,同理,由图 4 可知,黄豆粕粉对产酶的效果要优于蛋白胨,为最佳氮源。

### 3.1.3 转速、温度对产酶的影响

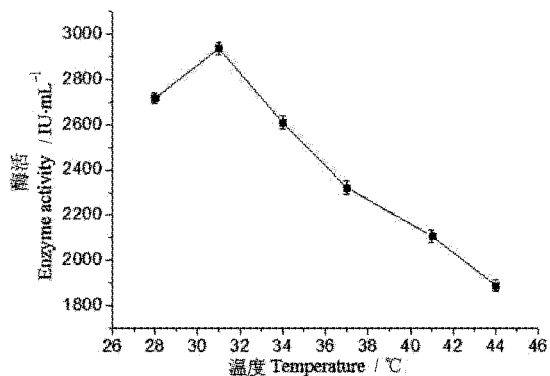


图 6 温度对产酶的影响

Fig. 6 Effect of temperature on enzyme production

6 可知,温度对菌体产酶影响较大,当温度为 31 °C 时具有最大酶活,故该温度为最佳发酵温度。

### 3.1.4 发酵时间、接种量对产酶的影响

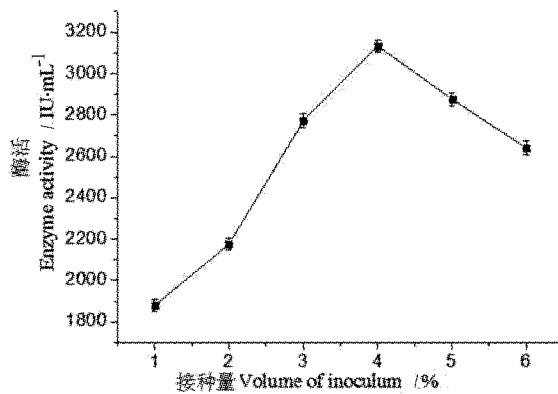


图 8 接种量对产酶的影响

Fig. 8 Effect of volume of inoculum on enzyme production

由图 9 可以看出随着种龄的增加,纤溶酶的酶活先增加后减小,其原因与接入的菌体所处的生长时期有较大关系,根据最终结果选择 18 h 时的菌体作种子液进行发酵,由图 10 可以看出,初始 pH 在 5.5 时发酵液的酶活最高,而 pH 高于 5.5 的 pH 发酵环境菌体产酶不利,因此发酵液的最佳初始 pH 应为 5.5。

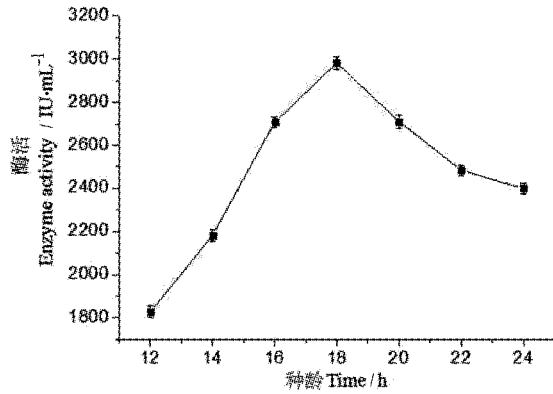


图9 种龄对发酵产酶的影响

Fig. 9 Effect of seed age on enzyme production

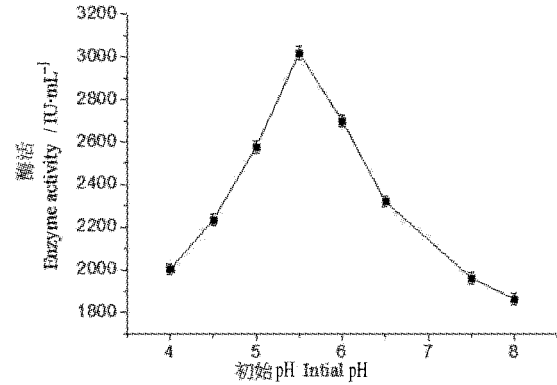


图10 初始 pH 对产酶的影响

Fig. 10 Effect of initial pH on enzyme production

### 3.2 Plackett-Burman(PB)实验

根据单因素实验结果,得到各考察因素的最佳添加量,并根据该结果进行 PB 设计,PB 设计的

因素表及实验设计分别见表 1 和表 2,软件分析结果见表 3。

表 2 Plackett-Burman 实验设计及结果  
Table 2 PB design and corresponding results

序号	A	B	C	D	E	F	G	H	酶活/IU·mL <sup>-1</sup>
1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	3772.98
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2153.58
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2850.66
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2302.19
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	3128.15
6	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	2513.66
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	2281.66
8	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2330.82
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3872.56
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2401.70
11	1	-1	1	1	-1	1	1	1	2168.77
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	2768.96

表 3 PB 实验参数评估表  
Table 3 Coefficient estimates of variables PB design

标号	变量	水平值			统计分析		
		-1	+1	效应	F 值	P 值	显著性
model	-	-	-	-	23.08	0.0129	*
A	转速	180	220	-282.96	46.11	0.0065	*
B	温度	31	39	-308.53	54.82	0.0051	*
C	碳源	4	5	-282.72	46.03	0.0065	*
D	氮源	2.5	3.1	-169.14	16.48	0.0270	*
E	初始 pH	5.5	6.9	-124.26	8.89	0.0585	
F	发酵时间	104	130	63.66	2.33	0.2240	
G	接种量	4	5	-68.57	2.71	0.1984	
H	种龄	28	22.5	-112.17	7.25	0.0743	

注:  $P \leq 0.0001$ , 为高度显著, 用 \*\* 表示,  $P \leq 0.05$ , 为显著, 用 \* 表示,  $P > 0.05$ , 为不显著。

Note:  $P \leq 0.0001$ , highly significant, as \*\*,  $P \leq 0.05$ , significant, as \*,  $P > 0.05$ , insignificant.

根据 Plackett-Burman 设计,运用 Design-Expert 软件进行分析后得到结果如表 3 所示,其中模型的  $p$  值为 0.012 9,小于 0.05 表明该模型显著,可以利用该方程确定显著因素的爬坡方向,同时根据表 3 结果可知,对菌株 Y-6-A 液体发酵产酶影响显著且大小排序为为温度(0.005 1) $>$ 转速(0.006 5)=碳源(0.006 5) $>$ 氮源(0.027 0),该结果表明影响菌体液体发酵的主要影响因素为碳源、氮源、转速、温度,而由各因素在模型方程中对应系数为负值可知这四者为负效应,在进行爬坡

实验时需按其各自的步长依次减小进行实验设计。

### 3.3 最陡爬坡实验设计

由 PB 实验设计结果得到影响产酶的 4 个最显著因素,并根据模型方程中各因素系数确定将 4 个主要因素按其对应步长逐步减小,其设计及结果见表 4,其中第 2 组实验具有最高酶活,故在之后的响应面设计中将转速 180r/min、温度 31℃、碳源 40 g/L、氮源 25 g/L 作为实验中心点。

表 4 最陡爬坡实验设计及实验结果

Table 4 Experimental design and results of steepest ascent

序号	A 转速/ $r \cdot \min^{-1}$	B 温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 碳源/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	D 氮源/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	酶活/ $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	200	34	45	28	3057.76
2	180	31	40	25	3502.63
3	160	28	35	22	2782.98
4	140	25	30	19	2338.65

### 3.4 响应面实验设计

#### 3.4.1 Box-Behnken(B-B)中心组合设计

在 PB 实验及最陡爬坡实验的基础上,利用

Design-Expert 8.0.6 进行四因素三水平的 B-B 中心组合设计,其因素设计表见表 5,实验结果见表 6。

表 5 因素水平编码

Table 5 Coding of factors and level

实验因子	单位	代号	编码水平		
			-1	0	+1
转速	/ $r \cdot \min^{-1}$	x1	160	180	200
温度	/ $^{\circ}\text{C}$	x2	28	31	34
碳源	/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	x3	30	40	50
氮源	/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	x4	20	25	30

#### 3.4.2 回归模型建立与方差分析

利用软件对表 6 的实验结果进行二次多元回归拟合,最终得到以下方程:

$$Y=3484.11+241.98x_1+104.91x_2+236.87x_3-$$

$$127.45x_4-107.11x_1x_2-95.59x_1x_3+82.5x_1x_4-226.89x_2x_3-276.87x_2x_4-408.14x_3x_4-676.79x_{12}-538.66x_{22}-301.23x_{32}-560.96x_{42}$$

具体分析结果见表 7。

表 6 Box—Behnme 实验设计表  
Table 6 The table of Box—Behnme experimental design

实验号	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	酶活(Y)
1	-1	1	0	0	2 297
2	1	-1	0	0	2 462.75
3	-1	-1	0	0	1 823.02
4	-1	0	0	-1	2 240.22
5	0	0	0	0	3 561.61
6	1	1	0	0	2 508.28
7	1	0	0	-1	2 608.55
8	0	1	-1	0	2 797.02
9	0	-1	-1	0	2 173.84
10	0	-1	1	0	2 950.57
11	0	0	0	0	3 508.82
12	0	-1	0	-1	2 068.31
13	0	0	0	0	3 282.90
14	0	1	0	1	2 133.4
15	-1	0	1	0	2 608.55
16	0	1	0	-1	2 822.37
17	0	-1	0	1	2 486.81
18	0	1	1	0	2 666.17
19	1	0	-1	0	2 581.29
20	1	0	0	1	2 422.86
21	0	0	1	1	2 367.46
22	1	0	1	0	2 910.43
23	0	0	-1	1	2 605.82
24	-1	0	-1	0	1 897.03
25	0	0	0	0	3 539.83
26	0	0	0	0	3 527.41
27	0	0	1	-1	3 462.52
28	0	0	-1	-1	2 068.31
29	-1	0	0	1	1 724.55

在统计学上,模型显著性检验  $P < 0.05$ ,表明模型建立有意义,本实验的模型值小于 0.000 1,表明模型高度显著;此外由表 7 可以看出因素一次项( $x_1$ 、 $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_4$ )与因素二次项( $x_{12}$ 、 $x_{22}$ 、 $x_{32}$ 、 $x_{42}$ )对结果的影响是高度显著的,而交互项中  $x_1 x_2$  较显著,其他则除  $x_1 x_4$ 、 $x_1 x_3$  外均高度显著,表明各个具体实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系,而是呈二次抛物面关系<sup>[19]</sup>;失拟项是用来表

示模型与实验拟合的差异程度,本设计失拟项  $P$  值为 0.803 2  $> 0.05$ ,表明无失拟因素存在;回归方程的相关系数  $R^2 = 0.985$ ,校正决定系数  $R^2$  ( $Adj$ ) = 0.97  $> 0.80$ ,表明该模型只有 3% 的变异,进一步说明该模型的拟合度好,因而可以利用该模型方程代替实验点对结果进行初步分析与预测<sup>[20]</sup>。

表 7 回归系数显著性检验

Table 7 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	8.053E+006	14	5.752E+005	65.67	<0.0001	**
x1—转速	7.027E+005	1	7.027E+005	80.22	<0.0001	**
x2—温度	1.312E+005	1	1.312E+005	15.08	0.0017	**
x3—碳源	6.733E+005	1	6.733E+005	76.87	<0.0001	**
x4—氮源	1.949E+005	1	1.949E+005	22.25	0.0003	**
x1x2	45892.03	1	45892.03	5.24	0.0381	*
x1x3	36553.46	1	36553.46	4.17	0.0604	
x1x4	27222.25	1	27222.25	3.11	0.0997	
x2x3	2.059E+005	1	2.059E+005	23.51	0.0003	**
x2x4	3.066E+005	1	3.066E+005	35.01	<0.0001	**
x3x4	6.663E+005	1	6.663E+005	76.07	<0.0001	**
x1 <sup>2</sup>	2.971E+006	1	2.971E+006	339.21	<0.0001	**
x2 <sup>2</sup>	1.882E+006	1	1.882E+006	214.88	<0.0001	**
x3 <sup>2</sup>	5.886E+005	1	5.886E+005	67.20	<0.0001	**
x4 <sup>2</sup>	2.041E+006	1	2.041E+006	233.03	<0.0001	**
残差	1.226E+005	14	8758.9	—	—	
失拟项	70543.21	10	7054.32	0.54	0.8032	
误差项	52081.40	4	13020.35	—	—	
总和	8.175E+006	28	—	—	—	

注:  $P \leq 0.0001$ , 为高度显著, 用 \*\* 表示,  $P \leq 0.05$ , 为显著, 用 \* 表示,  $P > 0.05$ , 为不显著。

Note:  $P \leq 0.0001$ , highly significant, as \*\*,  $P \leq 0.05$ , significant, as \*,  $P > 0.05$ , insignificant.

### 3.4.3 回归模型的优化

交互项  $x_1$ 、 $x_4$ 、 $x_1$ 、 $x_3$  对结果的影响不显著 ( $P > 0.05$ ), 采用手动方式进行优化, 优化结果见表 8, 模型优化后得到方程为:  $Y = 3484.11 + 241.98x_1 + 104.91x_2 + 236.87x_3 - 127.45x_4 - 226.89x_2x_3 - 276.87x_2x_4 - 408.14x_3x_4 - 676.79x_1^2 - 538.66x_2^2 - 301.23x_3^2 - 560.96x_4^2$

由表 8 可知, 失拟项不显著, 而模型  $P$  值小于 0.0001, 表明该模型高度显著, 同时经软件分析后可知, 复相关系数  $R^2$  为 97.16%, 而  $R_{Adj}^2$  为

95.32%, 该结果表明, 经过手动调整后, 虽然方程的失拟度有所增加, 但该模型的模型的拟合程度依旧很高, 同时更能减小实验误差影响结果预测的准确性, 因此该模型是最合适的, 可以利用该模型对枯草芽孢杆菌 Y-6-A 产酶进行预测与分析。

### 3.4.4 响应面分析

利用软件对 29 组实验的响应值进行二次多元回归拟合并经优化后, 得到的响应面曲线图及等高线见图 11, 在进行结果分析时以 1 个图形为例进行。



表 8 去掉交互项  $x_1 x_4, x_1 x_3, x_1 x_2$  后的优化结果

Table 8 The optimization results of excluding  $x_1 x_4, x_1 x_3$  and  $x_1 x_2$

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	7.943E+006	14	7.221E+005	52.84	<0.0001	**
x1—转速	7.027E+005	1	7.027E+005	51.42	<0.0001	**
x2—温度	1.312E+005	1	1.312E+005	9.67	0.0064	**
x3—碳源	6.733E+005	1	6.733E+005	49.27	<0.0001	**
x4—氮源	1.949E+005	1	1.949E+005	14.26	0.0015	**
x2x3	2.059E+005	1	2.059E+005	15.07	0.0012	**
x2x4	3.066E+005	1	3.066E+005	22.44	0.0002	**
x3x4	6.663E+005	1	6.663E+005	48.76	<0.0001	**
x12	2.971E+006	1	2.971E+006	217.43	<0.0001	**
x22	1.882E+006	1	1.882E+006	137.74	<0.0001	**
x32	5.886E+005	1	5.886E+005	43.07	<0.0001	**
x42	2.041E+006	1	2.041E+006	149.38	<0.0001	**
残差	2.323E+005	17	13862.26	—	—	
失拟项	1.802E+005	13	13862.38	1.06	0.5281	
误差项	52081.40	4	13020.35	—	—	
总和	8.175E+006	28	—	—	—	

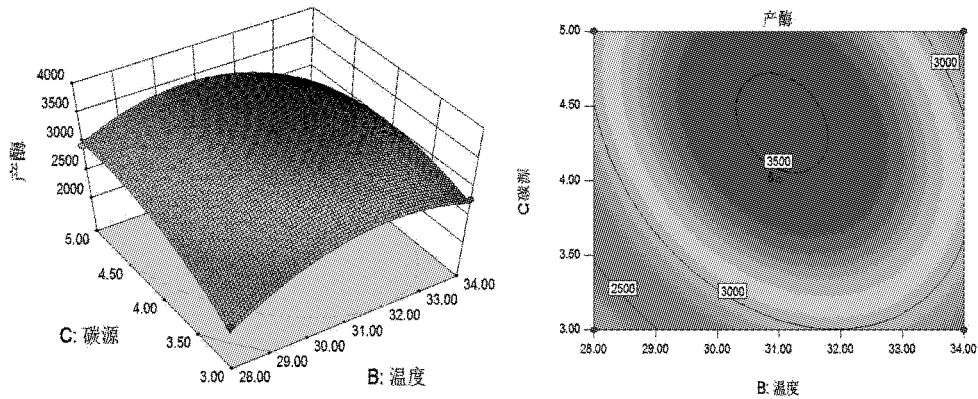


图 11 碳源与温度对产酶的影响

Fig. 11 effects of carbon sources and temperature on enzyme production

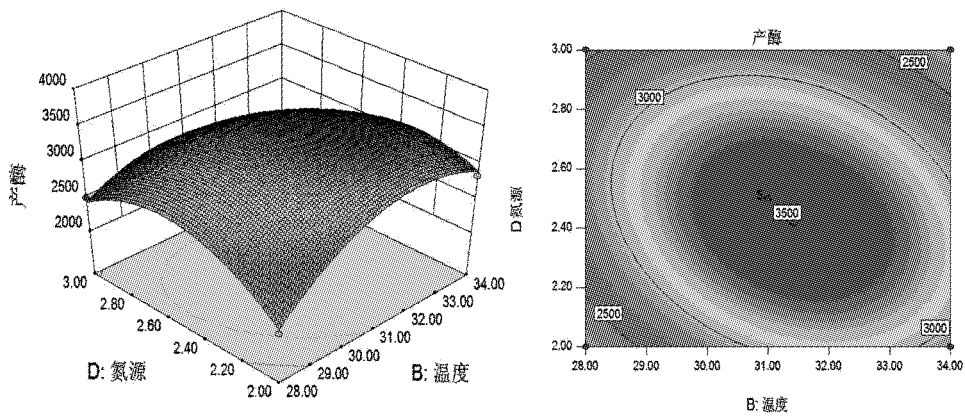


图 12 氮源与温度对产酶的影响

Fig. 12 Effects of nitrogen sources and temperature on enzyme production

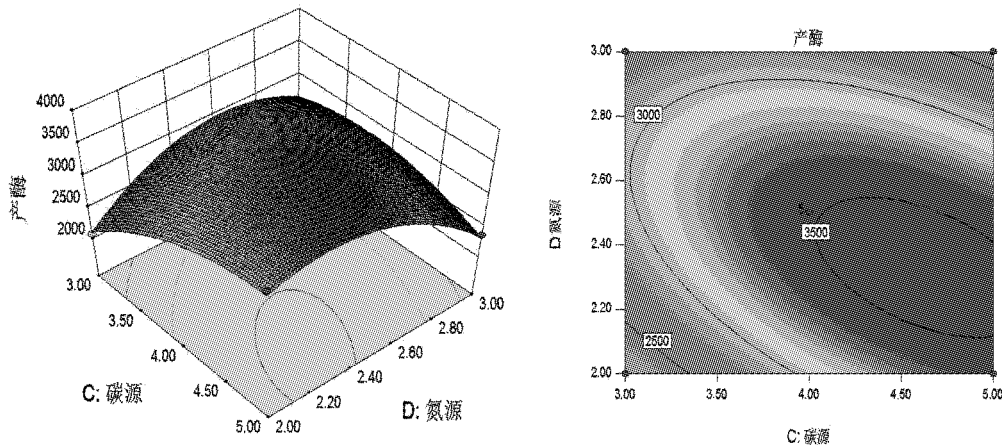


图 13 氮源与碳源对产酶的影响

Fig. 13 Effects of nitrogen sources and carbon sources on enzyme production

由图 11 可知,当转速与氮源一定时,菌株 Y-6-A 的产酶活力均随着碳源增大及温度升高而先增大后减小,并在响应面上具有最高点,此外由曲面图可以看出,该图形呈钟罩型,同时在响应面的等高线图中,圆形等高线表示参数之间交互作用不显著,椭圆形或马鞍形等高线则表示参数之间交互作用较强<sup>[21-22]</sup>,根据响应面的立体图与等高线图可知碳源与温度的交互作用比较显著,其他交互项( $x_2x_3$ 、 $x_3x_4$ )的曲面图类似,这与表 8 的结果一致(各交互项的  $P$  值均小于 0.01,交互作用高度显著)。

#### 3.4.5 最优条件的预测与验证

通过软件 Design-Expert 8.0.6 对回归方程进行求解,在试验因素水平范围内预测菌株产酶的最佳条件为:转速 183.57 r/min,温度 31.18 °C 碳源 46.1 g/L,氮源 23.3 g/L,在此条件下预测的最大产酶酶活为 3606.23 IU/mL,基于试验条件的可行性,将预测条件调整为转速 184 r/min,温度 31.2 °C,碳源 46.1 g/L,氮源 23.3 g/L,在此条件下进行 3 次验证试验,最终测得菌株 Y-6-A 的平均产酶酶活为 3580.32 ± 14.82 IU/mL,与理论预测值的相对误差为 0.63%,该结果表明该回归方程对菌株 Y-6-A 液体发酵产酶进行的分析与预测非常可靠。

### 3 结论

通过单因素实验与 plackett-Burman 设计相结合的方式筛选出影响海洋枯草杆菌 Y-6-A 液体发酵产酶的 4 个主要因素,并经爬坡实验确定了

逼近酶活最高区域的 3 个水平,最后利用 Design-Expert 8.0.6 软件对其进行中心组合设计,经实验及软件分析最终得到最优液体发酵条件为转速 184 r/min,温度 31.2 °C,碳源 46.1 g/L,氮源 23.3 g/L,在此条件下进行 3 次验证试验,最终测得菌株 Y-6-A 的平均产酶酶活为 3580.32 ± 14.82 IU/mL,较优化前提高了 22.4%,同时与理论预测值的相对误差仅为 0.63%,表明该优化结果较理想。由于目前采用响应面法对产纤溶酶的海洋微生物进行液体发酵条件优化的研究相对较少,通过该实验的研究说明通过响应面的优化方式能使海洋微生物的纤溶酶产酶量得到一定的提高,这对相关类似的研究提供了一定的参考价值。

#### 参考文献

- [1] 翁郁华,杨晓彤,杨明峻,等. 微生物纤溶酶的多样性与运用前景[J]. 现代生物医学进展,2010,10(8):1562-1564.
- [2] 陈丽娟,沙长青,奚新伟,等. 国外纳豆激酶的开发现状[J]. 生物科技,2003,6(3):44-45.
- [3] 华颖,沈国华,刘大群. 两种纤溶酶的酶学性质比较与溶栓机理分析[J]. 中国食品学报,2012,10(12):48-55.
- [4] Hua Y, Jiang B, Mine Y, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste [J]. *J Agric Food Chem*,2008,56(4):1451-1457.
- [5] Kim J S, Sapkota K, Park S E, et al. A fibrinolytic enzyme from the medical mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *J Microbiol*,2006,44(6):622-631.
- [6] 武临专,陈昉,王以光,等. 一种产生纤溶酶的链霉菌 C-3662 的鉴定及发酵研究[J]. 微生物学报,2002,42(5):600-605.
- [7] 马磊,雷兰,王光,等. 新一代溶栓药物—注射用纤溶酶[J].

- 生物科技,2004(21):3-8.
- [8] 王佃亮.一种新型海洋纤溶酶的研究[D].青岛:中国海洋大学,2006.
- [9] 刘晨光,魏香,刘万顺,等.海洋假单胞菌的纤溶酶的酶学性质的研究[J].青岛海洋大学学报(自然科学版),2001,31(5):730-734.
- [10] 黎艳,张兆峰,田苗,等.海洋纤溶酶高产菌株的选育及产酶条件优化[J].中国酿造,2012,31(2):33-37.
- [11] 黄珊,李家群,张云开,等.一株高活力产纤溶酶海洋微生物的筛选及鉴定[J].食品科技,2009,34(12):19-22.
- [12] Huang S, Pan S, Chen G, et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3 [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, 62: 124-130.
- [13] 雷德柱,胡位荣.生物工程中游技术实验手册[M].北京:科学出版社,2010:43-45.
- [14] Elibol M, Ozer D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus* [J]. *Process Biochem*, 2002,38:367-372.
- [15] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. *Biochem Eng J*, 2001,9:17-23.
- [16] 牛广财,严宝东,朱丹,等.响应面法优化黑加仑果醋的发酵条件[J].食品科学,2012,33(1):157-160.
- [17] 武英才,李娜,山威,等.响应面法优化阿卡波糖发酵培养基[J].沈阳医科大学学报,2011,28(11):18-19.
- [18] 陈桂光,李文杰,黄梅华,等.产纤溶酶海洋枯草芽孢杆菌的发酵工艺研究[J].食品工业科技,2012,24(33):249-252.
- [19] 赵岩岩,李帅,陈晓平.响应面法优化浸提大蒜抑制大肠杆菌成分工艺[J].吉林农业大学学报,2012,5:575-579.
- [20] 苏伟同,包斌,严婷,等.响应面法优化海洋微生物发酵产生纤溶化合物的培养条件[J].生物工程学报,2013,29(6):1-4.
- [21] 胡青平,张红,周冰,等.响应面优化光合细菌 PSB-B 的生长条件[J].食品工业科技,2013,15:1-7.
- [22] 申乃坤,王青艳,陆艳,等.响应法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇[J].生物工程学报,2010,26(1):42-47.