

# 解淀粉杆菌 DC-12 产纤溶酶发酵条件的优化

柴海云, 崔堂兵

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:**用响应面法对产纤溶酶的解淀粉芽孢杆菌 D-12 的发酵条件进行了优化。首先通过单因素实验考察了各因素对产酶的影响, 后在此基础上采用 Plackett-Burman 设计得出发酵时间、糊精浓度、细菌学蛋白胨浓度三个最重要的影响因素, 接着通过最陡爬坡实验逼近酶活的最高区域, 然后通过中心组合设计实验对显著因素进行优化, 最后响应面法进行分析, 得到的最佳发酵条件为: 细菌学蛋白胨浓度 2.25%, 糊精浓度 2.65%, 发酵时间 45 h。在此条件下, 酶活为 96.340 IU/mL。验证实验所得酶活为 98.947 IU/mL, 因此本优化工艺结果比较可靠。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌; 纤溶酶; Plackett-Burman(PB)设计; 中心组合设计; 响应面

文章编号: 1673-9078(2012)10-1350-1355

## Optimization of the Fermentation Conditions for Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* by Response Surface

### Methodology

CAI Hai-yun, CUI Tang-bing

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The fermentation conditions for fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* was optimized by response surface methodology. Firstly, the impact of single factor on fibrinolytic enzyme production was studied and three factors with the most significant effect on fibrinolytic enzyme production were obtained by Plackett-Burman design. The way to reach the highest fibrinolytic activity area was investigated through the steepest climbing experiments. Different levels of the most three significant factors were optimized using central composite designs and response surface analysis. As a result, the optimal fermentation conditions for fibrinolytic enzyme were the concentration of bacteria peptone 2.25%, concentration dextrin 2.65% and fermentation time 45 h. Under these conditions, the enzyme activity was 96.340 IU/mL. Validation experiment showed the activity of fibrinolytic enzyme was 98.947 IU/mL.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*; fibrinolytic enzyme; Plackett-Burman (PB) design; central composite design; response surface analysis

血栓栓塞性疾病是当前危机人类健康的死亡率较高的疾病之一, 而溶栓治疗是其常用的治疗手段。豆豉中存在的豆豉纤溶酶可以直接降解纤维蛋白, 具有良好的抗凝和溶栓作用, 并且其分子量也比较小, 不仅可以通过消化道直接吸收而且可以开发成方便的口服溶栓药<sup>[1-2]</sup>。因此, 近年来我国学者相继对豆豉中存在的溶栓酶并做了一定的研究<sup>[3-11]</sup>。而 Plackett-Burman 实验设计法和响应面分析法是 20 世纪中后期发展起来的优化实验条件统计学方法<sup>[12]</sup>, 在微生物培养条件优化中得到了广泛的应用<sup>[13-16]</sup>。在前期研究中

发现解淀粉芽孢杆菌 DC-12 产生两种纤溶酶, 分子量分别为 28 kDa 和 48 kDa。我们敲除了 28 kDa 纤溶酶的基因, 获得其缺失突变菌。本文对 48 kDa 纤溶酶的发酵条件进行了优化, 为进一步研究其酶学性质及发酵放大实验奠定了基础。

### 1 材料

#### 1.1 实验菌株

解淀粉芽孢杆菌 DC-12 *Δdfe*。

#### 1.2 实验试剂

纤维蛋白原 (国家药检所), 凝血酶 (国家药检所), 标准尿激酶 (国家药检所), 其余试剂均为国产或进口分析纯

#### 1.3 培养基

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171732); 中央高校基本业务费项目 (2011ZM0136)

通讯作者: 崔堂兵

平板活化培养基: 胰蛋白胨 (1%), 酵母粉 (0.5%), NaCl (1%), 琼脂粉 (2%), pH 7.0;

种子培养基 (g/L): 胰蛋白胨 (1%), 酵母粉 (0.5%), NaCl (1%), pH 7.0;

基础发酵培养基: 碳源 (2%), 氮源 (2%),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.6%),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.2%), NaCl (1%), pH 7.0。

## 2 方法

### 2.1 纤溶酶酶活的测定

#### 2.1.1 纤维平板的制作

取 8.0 mL 保温于 55 °C 的 1.2% 的琼脂糖于小三角瓶中, 后加入 8.0 mL 0.3% 的纤维蛋白原摇匀, 再加入 0.65 mL 凝血酶溶液 (1 BP/mL), 迅速摇匀后倒入 9.0 cm 平板中 静止冷却 0.5 h 备用。然后用 3.0 cm 孔径的胶头滴管在平板上打孔。

#### 2.1.2 尿激酶活力标准曲线的测定

取尿激酶用巴比妥钠-HCl 缓冲液稀释成 6.25、12.5、25、50、100 IU/mL, 然后各取 10  $\mu\text{L}$  点样于纤维蛋白平板中, 放置 10 min 后于 37 °C 温育 18 h, 测定纤维蛋白平板上溶解圈的直径, 计算溶解圈面积, 以尿激酶酶活 (IU/mL) 为纵坐标, 水解圈面积为横坐标, 得到尿激酶标准曲线 (注: 水解圈面积可用水解圈的垂直直径减孔径的乘积表示)。

#### 2.1.3 发酵液纤溶酶活力的测定

先取发酵液 1.8 mL 于 2 mL 的离心管中, 在 4 °C, 10000 r/min 条件下离心 10 min, 制得纤溶酶的粗酶液。用微量加样器取 10  $\mu\text{L}$  粗酶液点样于纤维蛋白平板上并作好标记, 37 °C 条件下温育 18 h, 测量水解圈直径, 计算面积, 通过尿激酶标准曲线计算出酶活大小。

### 2.2 解淀粉芽孢杆菌种子液生长曲线的测定

将甘油管中的解淀粉芽孢杆菌划线在固体培养基上进行活化, 接着挑取两环活化后的菌落于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 37 °C, 180 r/min 的恒温摇床上培养, 间隔一定时间取样测定  $\text{OD}_{600}$ 。

### 2.3 单因素实验

通过单因素实验探究了培养基成分, 发酵条件对纤溶酶活性的影响。将经过活化的种子液按 2% 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 发酵瓶中, 于恒温摇床 37 °C, 180 r/min 条件下培养 24 h 后测定纤溶酶活力。每次只改变一个条件, 且每个条件做三个平行, 最后取其平均值。

#### 2.3.1 碳源、氮源对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

将细菌学蛋白胨作为基础发酵培养基中的氮源,

分别加入 2% 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉和糊精作为碳源, 调节 pH 为 7.0 左右, 其他条件不变, 筛选出促进纤溶酶产生的最佳碳源。

将葡萄糖作为基础发酵培养基中的碳源, 然后分别加入 2% 的细菌学蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、硫酸铵和酵母粉作为氮源, 调节 pH 为 7.0 左右, 其他条件不变, 找出促进纤溶酶产生的最佳氮源。

#### 2.3.2 糊精和细菌学蛋白胨浓度对产纤溶酶的影响

将 2% 的细菌学蛋白胨最做为基础培养基中的氮源, 然后添加糊精, 使其浓度依次控制在 1%、2%、3%、4% 和 5%, 调节 pH 为 7.0 左右, 其他条件不变, 从而找出糊精的最佳浓度。

将 2% 的糊精做为基础培养基中的碳源, 然后添加细菌学蛋白胨, 使其浓度依次控制为 1%、2%、3%、4% 和 5%, 调节 pH 为 7.0 左右, 其他条件不变, 从而筛选出细菌学蛋白胨的最佳浓度。

#### 2.3.3 无机盐对产解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础发酵培养基中的碳源和氮源, 然后在基础培养基中分别添加  $\text{KCl}$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgSO}_4$ , 使其浓度分别控制在 0 g/L、0.1 g/L、0.3 g/L、0.5 g/L、0.7 g/L 和 0.9 g/L, 调节 pH 至 7.0, 其他条件不变。

#### 2.3.4 发酵培养基初始 pH、接种量和装液量对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础培养基中的碳源和氮源, 然后调节培养基 pH 至 6、7、8、9 和 10, 其他条件不变。

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础培养基中的碳源和氮源, 接种量分别为 1%、2%、3%、4% 和 5%, 其他条件不变。

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础发酵培养基中的碳源和氮源, 然后向 250 mL 的发酵瓶中依次加入 30 mL、50 mL、70 mL、90 mL 和 110 mL 的培养基, 其余条件不变。

#### 2.3.5 培养温度、摇瓶转速和发酵时间对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础培养基中的碳源和氮源, 控制发酵瓶培养温度为 30 °C、33 °C、35 °C、37 °C 和 40 °C, 其他条件不变, 从而可筛选出酶活最高的培养温度。

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础发酵培养基中的碳源和氮源, 摇瓶转速控制为 150 r/min、180 r/min、200 r/min、225 r/min 和 250 r/min, 其他条件不变。

以 2% 的糊精和细菌学蛋白胨作为基础培养基中

的碳源和氮源,控制发酵时间分别为 20 h、24 h、27 h、44 h、48 h 和 68 h,其他发酵条件不变。

### 2.4 Plackett-Burman (PB) 设计实验

选用 N=12 的 PB 设计,每个因素取两个水平,低水平设定为最佳水平,高水平取约低水平 1.5 倍,各因素水平见表 1,使用 minitab 软件对实验数据进行回归分析。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素及编码值

标号	因素	低 (-1)	高 (1)
x <sub>1</sub>	糊精浓度	1%	2%
x <sub>2</sub>	细菌学蛋白胨浓度	1%	2%
x <sub>3</sub>	pH	7	8
x <sub>4</sub>	接种量	1%	3%
x <sub>5</sub>	摇瓶转速	225 r/min	250 r/min
x <sub>6</sub>	发酵温度	35 °C	40 °C
x <sub>7</sub>	发酵时间	24 h	48 h

### 2.5 最陡爬坡实验

因为响应面的拟合方程只有在考察的最佳领域才可以更充分近似真实情形,拟合最有意义。因此,我们需要通过实验找到这个接近最大产酶的区域。最陡爬坡实验以实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,以及 PB 试验中的步长来确定爬坡试验中的步长。从而可以确定酶活最高时显著影响因素的最佳浓度组合。

### 2.6 中心组合实验

在 PB 实验和最陡爬坡实验的基础上,采用中心组合实验对影响解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶过程中的显著因素做进一步的探讨。最后用统计软件 minitab 对实验数据进行分析得出各因素的最佳水平。

## 3 实验结果

### 3.1 解淀粉芽孢杆菌种子液的生长曲线

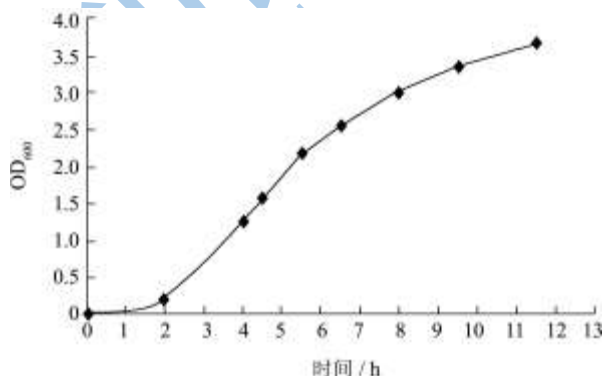


图 1 解淀粉芽孢杆菌种子液生长曲线

Fig.1 The growth curve of Seed solution of *Bacillus amyloliquefaciens*

由图 1 可以看出,活化后的菌落接入到种子瓶后,在最开始的 3 h 内生长速度很慢,但从 3 h 到 7 h 之间生长速率增加最快,而从第 8 h 开始生长速率增加程度逐渐减小,因此最佳种龄应为 8 h。

### 3.2 单因素实验结果

#### 3.2.1 碳源、氮源种类的优化

以细菌学蛋白胨为氮源进行碳源的优化,糊精为碳源时发酵液的纤溶酶活力最高,其次是蔗糖,并且两者对应的纤溶酶活力相差较大,因此选择糊精为碳源。

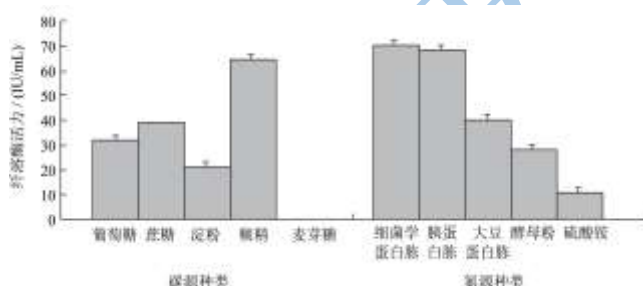


图 2 不同碳源、氮源对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

Fig.2 Effect of different carbon sources and nitrogen sources on fibrinolytic enzyme production of *Bacillus amyloliquefaciens*

如图 2 所示,以糊精作为碳源进行氮源的优化,细菌学蛋白胨作为氮源时对应的发酵液酶活最高,其次为胰蛋白胨,硫酸铵对应的酶活最低,从而说明细菌学蛋白胨是最佳氮源。

#### 3.2.2 碳源及氮源浓度的优化

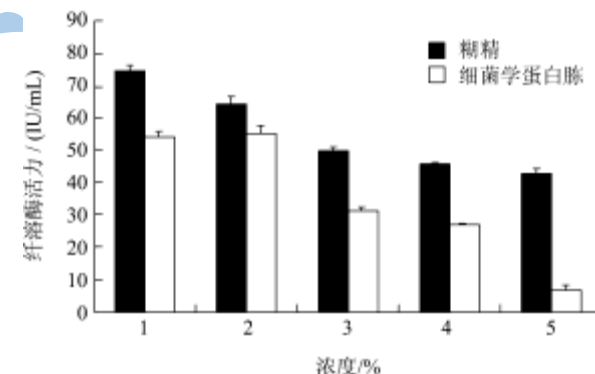


图 3 碳源氮源浓度对产酶的影响

Fig.3 Effect of dextrin concentrations and bacterial peptone concentrations on fibrinolytic enzyme production of *Bacillus amyloliquefaciens*

由图 3 可以看出,随着糊精浓度的升高,对应的发酵液的酶活逐步降低,其中 1% 和 2% 浓度时对应的酶活差距不大;氮源浓度逐步增加后,对应的酶活力也逐步下降,其中当浓度为 1% 和 2% 时对应的酶活力几乎相等。因此,初步判定糊精和细菌学蛋白胨的最佳浓度均为 1%。

#### 3.2.3 无机盐的优化

由图4可以看出这几种无机盐对产纤溶酶均有不同程度的抑制作用,随着浓度的增加,抑制作用也有不同程度的增加。当MgSO<sub>4</sub>的浓度为0.1 g/L时其抑制作用不太明显,当CaCl<sub>2</sub>的浓度增至0.5 g/L时可完全抑制纤溶酶的产生,不同浓度条件下的KCl、MnSO<sub>4</sub>对纤溶酶的抑制作用趋势一致。

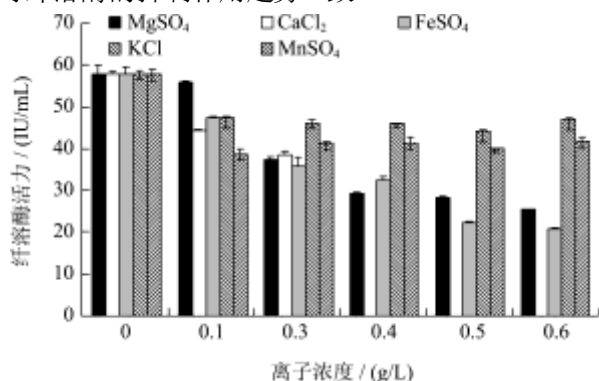


图4 无机盐对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

Fig.4 Effect of ion on fibrinolytic enzyme production of *Bacillus amyloliquefaciens*

### 3.2.4 pH、接种量和装液量的优化

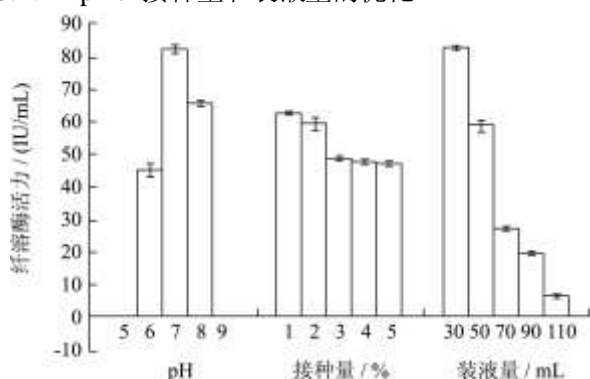


图5 培养基初始 pH、接种量、发酵瓶装液量对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶影响

Fig.5 Effects of medium initial pH, inoculum volume and media volume on fibrinolytic enzyme production of *Bacillus amyloliquefaciens*

由图5可以明显看出发酵液初始 pH 为 7 时对应的纤溶酶活力最高,当 pH 低至 6 或高于 9 时对应的纤溶酶活力均为 0,所以发酵液初始 pH 为 7 时对产纤溶酶最有利。由图5可以看出接种量为 1% 和 2% 时对应的纤溶酶活力相当且最大,所以最佳接种量为 2%。由图5可以看出发酵瓶的装液量对纤溶酶的活力影响很大,随着装液量的增加对应的酶活力下降幅度很大,装液量为 30 mL 时对应的纤溶酶活力最高,但考虑到实际情况,选择 50 mL 为最佳装液量。

3.2.5 培养温度,摇瓶转速及发酵时间对酶活的影响  
如图6所示,发酵温度由 30 °C 逐步升到 40 °C 的

过程中,发酵液纤溶酶活力也逐渐升高,35 °C 到 40 °C 之间对应的纤溶酶活力达到最高,且相差不大,因此该温度区间为产纤溶酶的最佳温度范围。摇瓶转速达到 250 r/min 时对应的纤溶酶活力最大,因此确定最佳转速为 250 r/min。发酵时间在 44 h 之前对应的纤溶酶活力增加很快,44 h 之后纤溶酶活力增加速度很慢,到达 68 h 时已有下降趋势,因此利于纤溶酶的最佳发酵时间为 48 h。

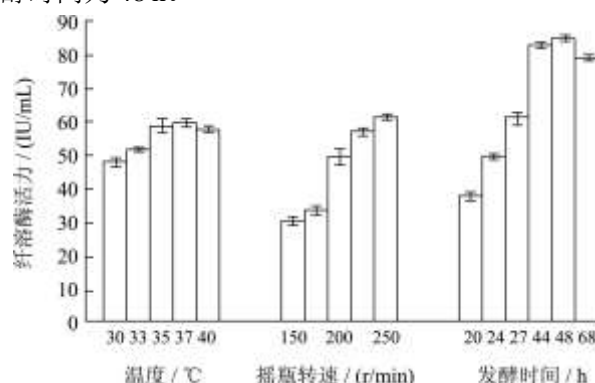


图6 发酵温度、摇瓶转速和发酵时间对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的影响

Fig.6 Effect of temperature, rotate speed and fermentation time on fibrinolytic enzyme production of *Bacillus amyloliquefaciens*

### 3.3 PB 实验-显著影响因素的筛选

表2 Plackett-Burman 实验设计及结果

Table 2 TPB design and corresponding results

X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	纤溶酶活/(IU/mL)
1	-1	1	1	-1	1	-1	40.88±1.2
-1	1	-1	-1	-1	1	1	100.94±2.2
-1	-1	1	1	1	-1	1	64.12±1.5
1	-1	1	-1	-1	-1	1	68.44±0.5
1	1	-1	1	1	-1	1	96.51±2.6
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	12.76±2.2
-1	1	1	-1	1	-1	-1	51.38±1.4
1	1	1	-1	1	1	-1	53.15±2.2
-1	1	1	1	-1	1	1	87.22±1.3
1	-1	-1	-1	1	1	1	109.25±0.9
1	1	-1	1	-1	-1	-1	67.46±0.5
-1	-1	-1	1	1	1	-1	37.24±0.8

PB 实验设计结果如表 2 所示。运用 minitab 软件对各因素进行检验分析,由表 3 知对酶活影响较大的前三个因素为发酵时间、糊精浓度、细菌学蛋白胨浓度,这三者均是正效应,其他影响因素不显著,维持在较低水平。最终选择发酵时间、细菌学蛋白胨浓度和糊精浓度做进一步考察。

表 3 PB 实验参数评估表

Table 3 Coefficient estimates of variables in PB design

标号	系数	t 值	p 值	显著性
x <sub>1</sub>	6.836	1.73	0.159	
x <sub>2</sub>	10.331	2.61	0.059	**
x <sub>3</sub>	-4.914	-1.24	0.282	
x <sub>4</sub>	-0.207	-0.05	0.961	
x <sub>5</sub>	2.829	0.72	0.514	
x <sub>6</sub>	5.668	1.43	0.225	
x <sub>7</sub>	21.968	5.55	0.005	**

3.4 最陡爬坡实验

表 4 最陡爬坡实验设计及结果

Table 4 Steepest ascent design and corresponding results

实验 编号	因素			纤溶酶活 /(IU/mL)
	X <sub>1</sub> (发酵 时间/h)	X <sub>2</sub> (细菌学蛋 白胨浓度/%)	X <sub>3</sub> (糊精 浓度/%)	
1	36	1.5	1.5	67.26±2.5
2	40	2	2	88.45±3.2
3	44	2.5	2.5	91.94±3.2
4	48	3	3	74.75±2.3
5	52	3.5	3.5	67.67±1.6
6	56	4	4	62.03±4.7
7	60	4.5	4.5	47.61±1.2
8	64	5	5	46.81±1.7

由表 3 确定最陡爬坡实验方向，发酵时间，细菌学蛋白胨和糊精浓度均为正效应，因此发酵时间，细菌学蛋白胨和糊精浓度的增加均有助于酶活的提高。三个因素同时提高水平，通过设计合理的步长，逐步逼近酶活最高的区域。由表 4 知，第 3 次试验酶活最高。

3.5 中心组合实验和响应面的分析

响应面实验只有在逼近酶活最高区域内才可以建立有效的响应面拟合方程。因此以爬坡实验中的第 3 组实验条件作为响应面实验因素水平的中心点进行响应面实验设计。

由实验数据拟合得到的二次多项式方程为：  
 $Y=95.0441+1.5161X_7-3.3093X_2+0.5857X_1-5.8041 X_7^2-3.2002X_2^2-5.1323X_1^2-0.1X_2*X_7+4.8775X_1*X_7-2.065X_1*X_7$ ，由此方程绘出的影响面图可以直观地看出最大酶产量约为 96.346 IU/mL。

通过 minitab16 软件分析可知，R<sup>2</sup> 为 94.32%，说明影响面 94.32% 的变化可以由此模型解释。因此可以用此方程代替真实试验点进行分析和预测。由 minitab 软件计算得，最大响应值对应的三个因素发酵时间、细菌学蛋白胨浓度和糊精浓度分别为：45.02 h，

2.203% 和 2.644%。此时得到的最高酶活为 96.346 IU/mL。为了验证模型预测的准确性，我们在最佳发酵条件下进行实验，得出的酶活为 98.947 IU/mL，因此该模型可以较好的预测实际酶活情况。

表 5 中心组合实验设计及结果

Table 5 Central composite design and corresponding results

试验 号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	纤溶酶活 /(IU/mL)
1	0(44)	0(2.5)	1.68(3.3409)	80.98±1.2
2	1(48)	1(3)	-1(2)	74.6±3.2
3	1.68(50.7272)	0	0(2.5)	77.72±1.3
4	0	0	0	94.26±1.1
5	-1(40)	1	1(3)	66.17±0.9
6	-1.68(37.2728)	0	0	79.62±1.2
7	-1	-1(2)	1	81.51±2.1
8	-1	1	-1	81.43±1.5
9	1	-1	1	94.23±1.8
10	1	1	1	84.91±2.1
11	0	0	0	96.01±0.8
12	-1	-1	-1	82.45±0.5
13	0	1.68(3.3409)	0	82.35±0.5
14	1	-1	-1	81.72±1.9
15	0	-1.68(1.6591)	0	89.72±2.1
16	0	0	0	94.58±1.4
17	0	0	0	94.5±2.1
18	0	0	-1.68(1.6591)	80.16±1.6
19	0	0	0	94.85±1.4
20	0	0	0	96.05±2.5

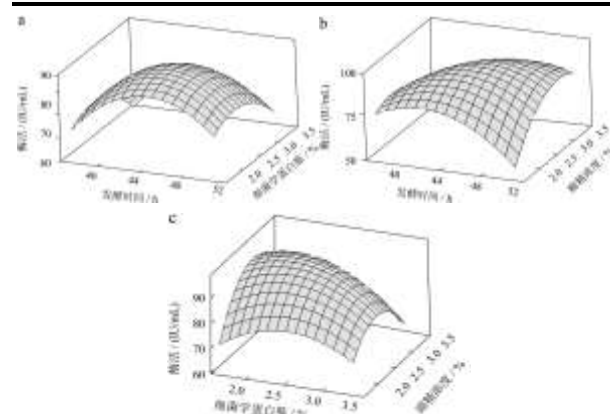


图 7 细菌学蛋白胨和发酵时间 (a)，发酵时间和糊精浓度 (b)，糊精浓度和细菌学蛋白胨 (c) 对纤溶酶活力影响的中心组合响应面

Fig.7 Response surface plots of Bacterial peptone and Dextrin concentrations(a), fermentation time and Dextrin concentrations(b), fermentation time and Bacterial peptone concentrations (c) on the activity of fibrinolytic enzyme

#### 4 结论

通过最初单因素实验与之后使用的 Plackett-Burman 实验和响应面法相结合的试验方法对解淀粉芽孢杆菌产纤溶酶的培养基及发酵条件进行了优化, 获得了产酶的优化培养基组分: NaCl 1%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2%, 细菌学蛋白胨浓度 2.25%, 糊精浓度 2.65%, pH 7。优化的发酵条件: 发酵时间 45 h, 发酵温度 37 °C, 摇瓶转速 225 r/min。在此条件下, 纤溶酶活力提高到 96.346 IU/mL。

#### 参考文献

- [1] Sumi H, Hamada H, Mihara H, et al. Fibrinolytic effect of the Japanese traditional food natto(nattokinase) [J]. Thromb Haemost, 1989, 62(2): 549-551
- [2] Long SP, Zhang SG. Evaluation of clinical application of anticoagulant enzyme (fibrinolysis promoter) in prevention and treatment of thrombosis [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2003, 3(6): 327-330
- [3] 路福平, 杜连祥. 微生物发酵产生纤溶酶的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 1999, 1:5-9
- [4] 齐海萍, 江洁, 胡文忠. 豆豉纤溶酶基因的克隆及其在枯草杆菌中的表达[J]. 大豆科学, 2012, 31(1):159-161
- [5] 齐海萍, 胡文忠, 姜爱丽. 豆豉纤溶酶基因在枯草杆菌中表达的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(7):3881-3883
- [6] 郭晓军, 袁洪水, 刘慧娟. 假蕈状芽孢杆菌纤溶酶基因的克隆与表达[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(1):14-17
- [7] 文浩平, 和七一. 微生物源纤溶酶的研究进展[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2011, 28(3):60-63
- [8] 朱春节, 汤祝华, 谢秀祯. 一株新的豆豉纤溶酶产生菌的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1):7-15
- [9] 关晨晨, 赵敏. 豆豉纤溶酶的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(1):64-66
- [10] 王中枢. 纤维蛋白溶解的生物化学[M]. 北京: 解放出版社(第一版), 1991
- [11] 罗文华, 郭勇. 食品纤溶酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8):111-114
- [12] 胡良平. Windows 下的 SAS 6.12 & 8.0 实用统计分析教程[M]. 北京: 军事医学出版社, 2000
- [13] Elibol M, Ozer D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus* [J]. Process Biochemistry, 2002, 38:367-372
- [14] Muralidharan, Chirumamilla RR, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9:17-23
- [15] 傅莉, 李荣萍, 李品, 等. 一株具有纤溶活性的枯草杆菌的研究-液体发酵条件的选择[J]. 生物工程进展, 1997, 17(3): 31-33
- [16] 吴思芳, 向梅, 陶琳, 等. 豆豉纤溶酶产生菌发酵条件研究[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(6):332-335