

蜡状芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件的优化

Response surface methodology optimization of fermentation conditions for neutral protease production by *Bacillus cereus*

解万翠^{1,2} 杨亚东² 杨锡洪^{2,3} 吴帅² 吉宏武²

XIE Wan-cui^{1,2} YANG Ya-dong² YANG Xi-hong^{2,3} WU Shuai² JI Hong-wu²

(1. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266061; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;
3. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东 青岛 266061)

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266061, China; 2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266061, China)

摘要:为提高蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)发酵产蛋白酶的能力,对发酵培养基组成及培养条件进行优化。通过单因素试验研究最适 C 源及其添加量、最适 N 源及其添加量、温度、种龄、摇床转速、装液量、pH、时间、接种量等条件对菌株产蛋白酶的影响。在此基础上,利用正交试验设计从 9 个影响因素中筛选 3 个主要影响因素,即蛋白胨添加量、温度和装液量;再利用 Box-Behnken 试验设计进行响应面分析,最终确定蜡状芽孢杆菌发酵产酶条件的最优条件为:蛋白胨添加量 7.9 g/L,温度 26.7 °C,装液量 56.4 mL。优化后,蛋白酶活力达到 753.67 U/mL,比初始蛋白酶活力(249.50 U/mL)提高了 2.02 倍。

关键词:蜡状芽孢杆菌;中性蛋白酶;发酵条件

Abstract: In order to improve the production of protease from *Bacillus cereus*, the fermentation medium composition and culture conditions were optimized. By single factor experiment, the effects were studied, including the optimum additions of carbon and nitrogen sources, the adding amounts, fermentation temperature, inoculation age, shaking speed, medium volume, medium initial pH, fermentation time, and inoculation amount on protease production. On this basis, Plackett-Burman was to evaluate the effects of nine variables, and selected significant factors, namely peptone addition amount, fermentation temperature and medium volume. The optimal fermenta-

tation condition was obtained by Box-Behnken and response surface analysis. The optimal conditions of peptone addition amount, fermentation temperature and medium volume were 7.9 g/L, 26.7 °C and 56.4 mL, respectively. Under the optimal conditions, the protease activity was up to 753.67 U/mL, 2.02 times higher than the initial protease activity (249.50 U/mL).

Keywords: *Bacillus cereus*; neutral protease; fermentation conditions

蛋白酶作为一类重要的工业用酶,约占酶制剂市场总额的 65%^[1],主要来源于动、植物和微生物,微生物产蛋白酶,具有成本低、生产周期短、产量及工艺条件易于控制等优点^[2]。目前,市售微生物蛋白酶大都产自于芽孢杆菌属,如 *Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Bacillus amyloliquefaciens*^[3] 等,其次是一些真菌,比如 *Aspergillus oryzae*、*Mucor*^[4] 等。中性蛋白酶作为最早发现并投入生产的工业酶制剂,已广泛应用于洗涤、皮革脱毛、酿酒、饲料、医药、食品等行业^[5-6]。但中性蛋白酶产量较低,发酵不稳定,生产成本高等因素阻碍了其大规模生产,科研工作者长期致力于中性蛋白酶生产菌筛选及发酵条件的优化^[7]。

培养基可提供微生物生长繁殖及生物合成所需的营养物质,适宜的培养条件利于微生物生长繁殖及代谢产物的合成,因此,在微生物发酵产酶过程中,有效调整发酵培养基组成和发酵条件对提高蛋白酶的产量非常重要。不同菌株的最适培养基组成及发酵培养条件不同,优化培养基组成主要考虑最适 C 源、N 源及其添加量,优化发酵培养条件时考虑培养基起始 pH、温度、发酵时间、摇床转速、装液量、接种量、种龄等^[8-10],在诸多因素中如何快速准确找出主要影响因素

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(编号: GARS-47)

作者简介:解万翠(1969—),青岛科技大学教授,博士。

E-mail: xiewancui@163.com

通讯作者:杨锡洪

收稿日期:2015-09-03

并进行优化是关键。正交试验是基于不完全平衡块原理,从众多变量中快速、有效地筛选一些重要的影响因素^[11]。响应面分析法可通过较少的试验组数研究各因素及其交互作用对指标(响应值)的影响,明确因素和响应值之间的关系,进而得到明确、有目的的结论^[12]。

本试验采用的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是从凡纳滨对虾肠道中筛选得到的一株产中温、中性蛋白酶的菌株。为提高其产酶能力,在单因素试验基础上,利用正交筛选试验及响应面法相结合的方法,对蜡状芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件进行多因素复合优化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株

由海水养殖凡纳滨对虾肠道中分离菌株,经前期分子鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),由课题组保藏。

1.1.2 培养基

斜面培养基:蛋白胨 5.0 g/L,琼脂 15.0 g/L,磷酸铁 0.1 g/L,酵母膏 1.0 g/L, pH 7.5;

种子及基础培养基:酵母膏 1.0 g/L,蛋白胨 5.0 g/L, pH 7.5。

1.1.3 试剂

蛋白胨、琼脂、酵母膏:北京奥博星生物技术有限公司;
干酪素、福林酚试剂、三氯乙酸等:国药集团化学试剂有限公司。

1.1.4 仪器

恒温摇床:HZQ-F160型,金坛市万华实验仪器厂;

恒温培养箱:SPX-250B-Z型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;

紫外可见分光光度计:UV-3200PC型,上海精密科学仪器有限公司;

高速冷冻离心机:LG20-W型,博动行仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 预试验培养方法 试验菌株经试管斜面活化,加5 mL无菌海水制备菌悬液,于50 mL种子培养基中按2.0%接种,28℃、150 r/min恒温摇床培养12 h,得种子液。将种子液以同样条件接种并培养48 h,得发酵液在4℃、10 000 r/min条件下离心15 min,制备粗酶液,并测定该蛋白酶活力。

1.2.2 蛋白酶活力测定方法 采用福林酚法,选择40℃、pH 7.5,1 min水解产生1 μg酪氨酸,定义成1个活力单位。

1.2.3 正交试验设计 在单因素试验基础上^[13],采用正交试验设计,选择9个影响产酶的因素进行试验,包括蛋白胨添加量、乙酸钠添加量、发酵温度、菌种种龄、摇床转速、装液体积、发酵pH、发酵时间、接种量。正交试验设计见表1,其中每个因素取2水平,即低水平(-1)和高水平(+1), X_4 、 X_9 为虚拟变量。以蛋白酶活力为响应值,通过分析各因素对其响应效应,并进行显著性分析($P < 0.05$),从而获得响应较为显著的因素。

表1 正交试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

水平	X_1 乙酸钠/ (g · L ⁻¹)	X_2 温度/ ℃	X_3 蛋白胨/ (g · L ⁻¹)	X_5 摇床转速/ (r · min ⁻¹)	X_6 装液量/ mL	X_7 pH	X_8 时间/ h	X_{10} 种龄/ h	X_{11} 接种量/ %
-1	5.0	25	5.0	150	50	7.5	48	10	2.0
+1	7.5	30	7.5	180	70	8.5	60	12	2.5

1.2.4 Box-Behnken 试验设计 通过正交试验筛选得到对产酶影响最为显著的3个关键因素分别是发酵培养温度、蛋白胨添加量和装液量,采用Box-Behnken中心组合进行响应面试验设计^[14-15],试验设计因素水平见表2。其中,对于其他影响不显著因素,通过正交试验结果分析得到各因素同一水平对产酶的效应均值 k_{-1} 、 k_1 ,选取相应的因素水平进行进一步的优化试验。根据相应的试验设计表进行试验,对数

表2 响应面试验设计的因素与水平

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	A 蛋白胨/(g · L ⁻¹)	B 温度/℃	C 装液量/mL
1	5.0	25	30
0	7.5	30	50
-1	10.0	35	70

据进行二次回归拟合分析,得到二次方程。通过分析各因素的主效应及交互项,在一定水平范围内求最佳值,及最优产蛋白酶对应的发酵条件。

1.2.5 数据处理 所有试验重复3次,采用Excel 2003进行数据统计和处理,采用正交设计助手II 3.1、DPS 9.5及Design Expert 8.0进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 正交试验结果

经分析单因素试验结果,采用正交设计助手II创建了一个 $N=12$ 筛选方案,对11因素(9实际因素、2虚拟因素)进行试验。以*Bacillus cereus*为试验菌株,蛋白酶活力为响应值,进行摇瓶发酵产酶,试验设计及结果见表3。

运用DPS 9.5统计分析软件对表3正交试验结果进行方差分析,结果见表4。

表 3 正交试验设计及结果

Table 3 Design table and experimental results of Plackett-Burman design

试验编号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₁₀	X ₁₁	蛋白酶活力/ (U·mL ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	415.71
2	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	228.48
3	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	523.60
4	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	525.98
5	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	609.28
6	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	537.09
7	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	483.14
8	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	430.78
9	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	374.45
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	654.50
11	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	545.81
12	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	623.56
k ₋₁	473.36	409.36	452.33	477.46	537.75	520.56	512.76	489.75	507.21	
k ₁	518.71	582.70	539.73	514.61	454.32	471.51	479.31	502.31	484.86	
极差	45.35	173.34	87.40	37.15	83.43	49.05	33.45	12.56	22.35	

表 4 正交试验结果方差分析

Table 4 Variance analysis of Plackett-Burman design experiment results

因素	偏差平方和	自由度	F 值	P 值	重要性
乙酸钠添加量	7 546.595 9	1	20.936 3	0.052 1	4
温度	94 182.331 6	1	226.520 7	0.004 6	1
蛋白胨添加量	25 554.065 5	1	67.343 4	0.015 5	2
摇床转速	4 673.848 4	1	12.116 2	0.085 9	6
装液量	20 986.249 8	1	56.040 5	0.020 4	3
起始	5 898.800 9	1	15.560 8	0.063 6	5
时间	3 795.975 0	1	9.664 8	0.104 7	7
种龄	399.504 8	1	1.010 5	0.438 3	9
接种量	1 311.585 3	1	3.546 0	0.210 9	8
误差	846.045 9	2			
总和	155 758.586 1				

由表 4 可知,在 95% 的置信区间内,温度、蛋白胨添加量及装液量的 P 值小于 0.05,是对产酶影响最为显著的 3 个因素^[16-17],可作为进一步优化的主要因素考虑进行响应面分析。而培养基起始 pH、乙酸钠添加量、摇床转速、发酵时间、接种量和种龄在 95% 的置信区间内差异不显著,说明其接近最优水平或远离试验考虑范围^[18-19]。由表 3 可知,对产酶影响不显著的因素诸如乙酸钠添加量、摇床转速和种龄为正效应,培养基起始 pH、培养时间和接种量为负效应^[20]。因此,在后续的试验中,选取乙酸钠添加量 7.5 g/mL、摇床转速 180 r/min、培养基起始 pH 7.5、培养时间 48 h、种龄 10 h 和接种量 2.0%。

2.2 响应面设计与结果分析

2.2.1 Box-Behnken 试验结果 采用 Box-Behnken 中心组合方法进行 3 因素 3 水平共计 17 个试验点的响应面设计

计,结果见表 5。

2.2.2 Box-Behnken 试验设计回归模型建立 利用 Design Expert 8.0 数据处理软件,对表 5 中试验结果进行回归拟合,得到蛋白酶活力对自变量蛋白胨添加量、摇床温度和装液量的二次多元回归方程:

$$Y = 706.700 + 24.296A - 85.780B + 45.219C + 9.520AB + 23.208AC - 27.170BC - 73.899A^2 - 71.121B^2 - 104.244C^2 \quad (1)$$

对回归方程求导,令一阶偏导等于 0,整理得到 3 个方程^[21]:

$$\begin{cases} 24.296 - 147.798A + 9.520B + 23.208C = 0 \\ -85.780 + 9.520A - 142.242B - 27.170C = 0 \\ 45.219 + 23.208A - 27.170B - 208.488C = 0 \end{cases} \quad (2)$$

联立方程组求解得:A=0.173,B=-0.653,C=0.321,

表5 响应面试验结果

Table 5 Design table and experimental results of Box-Behnken design

试验编号	A	B	C	发酵液蛋白酶活力/ (U · mL ⁻¹)
1	0	0	0	706.07
2	0	0	0	688.61
3	1	0	1	633.08
4	-1	0	-1	470.45
5	0	1	-1	442.68
6	-1	-1	0	630.70
7	0	0	0	721.93
8	0	-1	-1	558.51
9	0	1	1	449.82
10	0	-1	1	674.33
11	0	0	0	714.00
12	0	0	0	702.89
13	-1	1	0	438.71
14	1	1	0	511.70
15	1	0	-1	467.27
16	1	-1	0	665.61
17	-1	0	1	543.43

换算可知最优发酵条件参数为:蛋白胨添加量 7.933 g/L,温度 26.735 °C,装液量 56.420 mL,由回归方程求出蛋白酶的理論酶活是 744.06 U/mL。综合考虑实际操作的可行性,确定最优理论发酵条件为:蛋白胨添加量 7.9 g/L,温度 26.7 °C,装液量 56.4 mL。

2.2.3 Box-Behnken 试验设计回归模型的显著性及方差分析 经 *F* 检验判断,概率 *P* 值越小,则变量的显著程度越高^[22]。由表 6 可知,本试验所选用的二次多项模型为极显著($P < 0.0001$),模型失拟项为不显著($P = 0.1196 > 0.05$),说明酶活力实际值与预测值有较好的拟合度。相关系数 $R^2 =$

表6 回归模型的显著性及方差分析[†]

Table 6 Significance and variance analysis of regression model

项	自由度	系数	系数标准误差	<i>T</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
常量	9	706.70	8.221	85.96	0.0000	**
A	1	24.30	6.500	3.74	0.0073	**
B	1	-85.78	6.500	-13.20	0.0000	**
C	1	45.22	6.500	6.96	0.0002	**
AB	1	9.52	9.192	1.04	0.3348	
AC	1	23.21	9.192	2.25	0.0395	*
BC	1	-27.17	9.192	-2.96	0.0212	*
A ²	1	-73.90	8.960	-8.25	0.0000	**
B ²	1	-71.12	8.960	-7.94	0.0000	**
C ²	1	-104.24	8.960	-11.64	0.0000	**
残差	7	2365.75	338.000			
失拟合	3	1738.34	579.448	3.69	0.1196	
纯误差	4	627.40	156.851			
总计	16	187944.93				

[†] “*”表示差异显著(0.01 < *P* < 0.05); “**”表示差异极显著(*P* < 0.01); $R^2 = 0.9874, R_{adj}^2 = 0.9712$ 。

0.9874,校正系数 $R_{adj}^2 = 0.9712$,表明可用该回归方程对试验结果进行理论预测。一次项和二次项对产酶的影响为极显著水平,交互作用 AC、BC 对产酶的影响为显著水平,交互作用 AB 对产酶的影响不显著。

2.2.4 响应曲面及等高线分析 为考察因素间交互作用对 *Bacillus cereus* 发酵产酶的影响,采用 Design Expert 8.0 软件建立响应面及等高线图,见图 1~3。等高线形状可反应出两因素交互作用强弱,圆状表示交互作用不显著,椭圆状表示交互作用显著。

2.3 结果验证

为了验证模型的有效性和实用性,在修正后的最优理论

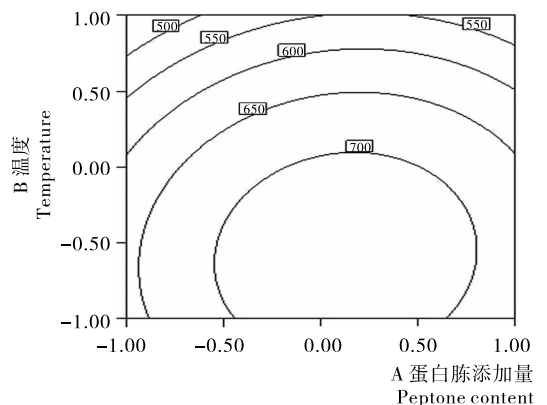
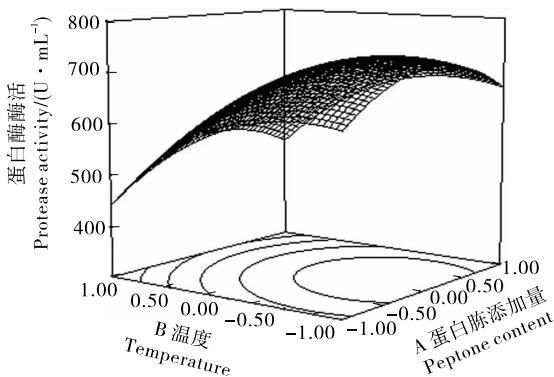


图1 蛋白胨添加量和摇床温度交互作用对产酶影响的响应面图及其等高线图

Figure 1 Response surface and contour plots of interaction between peptone content and fermentation temperature on protease production

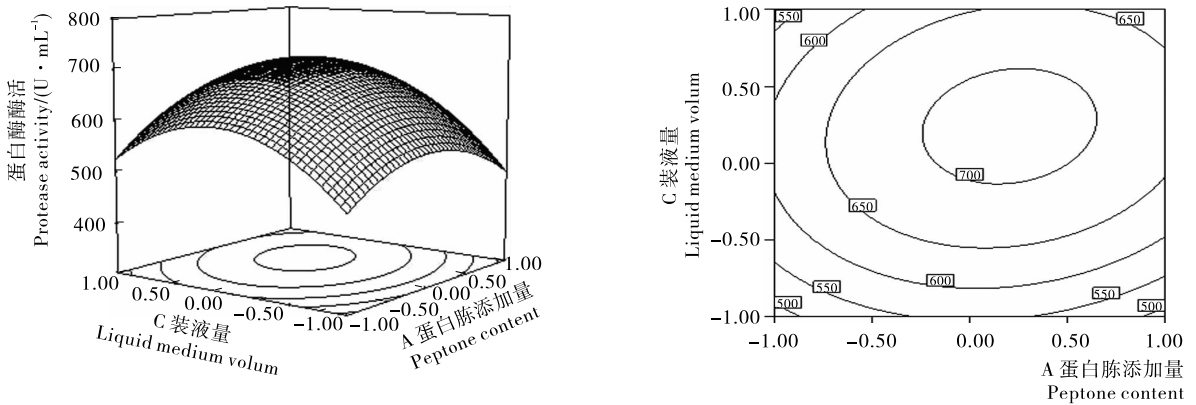


图 2 蛋白胨添加量和装液量交互作用影响产酶的响应面及等高线

Figure 2 Response surface and contour plots of interaction between peptone content and liquid medium volume on protease production

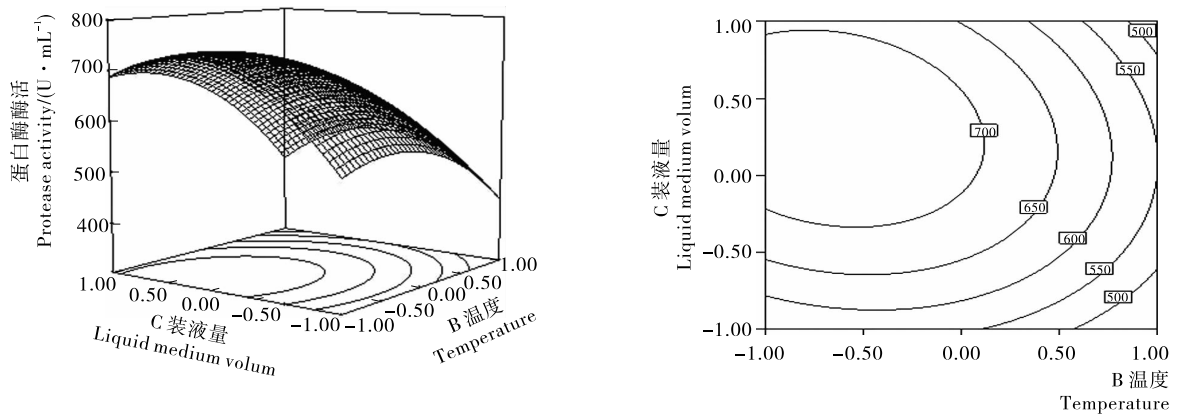


图 3 温度和装液量交互作用影响产酶的响应面及其等高线

Figure 3 Response surface and contour plots of interaction between fermentation temperature and liquid medium volume on protease production

发酵条件下对模型做 3 次平行实验,测定蛋白酶活力结果分别为 766.36,742.56,752.08 U/mL,平均值为 753.67 U/mL,与预测值(744.06 U/mL)基本一致,说明该模型可较好地预测实际发酵情况。通过发酵条件的优化,凡纳滨对虾肠道 *Bacillus cereus* 产中性蛋白酶活力从 249.50 U/mL 提高到 753.67 U/mL,其酶活提高了 2.02 倍。

3 结论

本研究以海水养殖凡纳滨对虾肠道产中性蛋白酶菌株 *Bacillus cereus* 为研究对象,筛选了发酵培养基以及优化了培养条件。在单因素试验结果的基础上,采用正交试验,得知对产酶影响最显著的 3 个关键因素分别是摇床温度、蛋白胨添加量和装液量;对产酶影响不显著的因素中,乙酸钠添加量、摇床转速和种龄为正效应,培养基起始 pH、培养时间和接种量为负效应。利用 Box-Behnken 试验考察 3 个关键因素及交互作用对产酶的影响,建立了二次多项模型方程,经对试验结果分析确定产酶的最优发酵条件为蛋白胨添加量 7.9 g/L,温度 26.7 °C,装液量 56.4 mL。经过优化后,发酵液蛋白酶活力达到 753.67 U/mL,与预测值(744.06 U/mL)的误差小于 5.0%,较初始蛋白酶活力(249.50 U/mL)提高了 2.02 倍,为进一步的酶制剂安全性研究及工业化生产提

供了试验依据。

参考文献

- [1] Rao M B, Tanksale A M, Ghatge M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [J]. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62(3): 597-635.
- [2] 邓菊云. 微生物碱性蛋白酶研究进展[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(3): 293-296.
- [3] Essam Kotb. Purification and partial characterization of a chymotrypsin-like serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* FCF-11 using corn husk as a novel substrate[J]. *World J. Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(7): 2 071-2 080.
- [4] 刘莹莹, 刘颖, 张光. 毛霉高产中性蛋白酶发酵培养基的优化[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(6): 166-170.
- [5] Marcus, Schallmeyer, Ajay Singh, et al. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production[J]. *Can. J. Microbiol.*, 2004, 50(1): 1-7.
- [6] Demain A L, Adrio J L. Contributions of microorganisms to industrial biology[J]. *Mol Biotechnol*, 2008, 38(1): 41-55.
- [7] 孙晓鸣, 王萍, 邬向东. 产中性蛋白酶芽孢杆菌菌胞发酵响应面法研究[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(2): 117-124.

(下转第 129 页)

3 结论

在单因素试验的基础上,通过正交试验确定了木耳 CZSWXY0012 的最优组合工艺,即葡萄糖 25 g/L,酵母膏 2 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, CuSO₄ 6 mg/L, K₂ HPO₄ 3.2 g/L, pH 6.0, 温度 27 ℃, 装液量 100 mL/250 mL, 发酵培养 8 d. 试验结果有望为工业化生产提供重要的技术参考. 下一步将对木耳菌丝体发酵粗提液中的具体抗氧化成分和含量开展研究.

参考文献

- [1] Halliwell B, Murcia M A, Chirico S, et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995, 35(1): 7-20.
- [2] Volpi N, Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu²⁺ mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma derived chondroitin sulfate[J]. Journal of Biochemistry, 1999, 125(2): 297-304.
- [3] 贾春风, 刘松雁, 陈梅香, 等. 紫薯发酵醋工艺优化及其抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 211-215.
- [4] 刘力, 李理. 酸浆水中 3 种菌株的产酸能力及抗氧化活性[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 11-15.
- [5] 曾伟, 丁利君, 黄聪华, 等. 黑曲霉发酵法辅助提取芒果黄酮及其抗氧化研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 115-118.
- [6] 马玲. 3 种食用菌中多糖的提取与测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(2): 174.
- [7] Lindequist U, Niedermeyer T, Julich W D. The pharmacological

potential of mushrooms[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2005, 2(3): 285-299.

- [8] 陈康林, 卯晓岚, 黄明达. 中国抗肿瘤大型药用真菌图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 1-10.
- [9] Lee I K, Kim S E, Yeom J H, et al. Daldinan A, a novel isoindolinone antioxidant from the ascomycete *Daldinia concentrica* [J]. The Journal of Antibiotics, 2012, 65(2): 95-97.
- [10] Bai Ming-sheng, Wang Chen, Zong Shi-chun, et al. Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3 424-3 427.
- [11] Liu Kun, Wang Jun-li, Zhao Le, et al. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 58(8): 375-380.
- [12] Lee I K, Jung J Y, Kim Y H, et al. Phellinins B and C, new styrylpyrones from the culture broth of *Phellinus* sp. [J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(5): 263-266.
- [13] 李峻志, 吴小杰, 党永, 等. 大型真菌抗氧化活性物质的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(5): 455-465.
- [14] 张北红, 宋瑞清, 刘淑双, 等. 高效抗氧化大型真菌的筛选[J]. 菌物研究, 2010, 8(4): 213-218.
- [15] 杨建, 袁海生, 曹云. 5 种野生多孔菌提取物的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 40-44.
- [16] Tina S, Chi T H. Antioxidant activities of buckwheat extracts [J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 743-749.
- [17] 葛飞, 石贝杰, 高樱萍, 等. 一株高抗氧化活性银杏内生真菌 SG0016 的鉴定及其培养条件优化[J]. 西北植物学报, 2015, 35(2): 403-409.

(上接第 30 页)

- [8] 任佩, 金玉兰, 朴美子. 章鱼肠道产蛋白酶菌的筛选、产酶条件及酶学性质[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 189-193.
- [9] Ramamoorthy Sathish Kumar, Gnanakkan Ananthan, Antonyraj Selva Prabhu. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GACAS9 using response surface methodology-A statistical approach[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013, 2(1): 1-6.
- [10] Arastoo Badoei-Dalfard, Zahra Karami. Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: Activity optimization by response surface methodology [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 89(1): 15-23.
- [11] Douglas C Montgomery. 实验设计与分析[M]. 汪仁官, 陈荣昭, 译. 北京: 中国统计出版社, 1998: 589-640.
- [12] 张智, 朱宏亮, 钮宏禹, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产蛋白酶的发酵条件[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 400-404.
- [13] 杨亚东, 解万翠, 杨锡洪, 等. 一株中性蛋白酶产生菌的发酵产酶及其生长特性[C]//“食品工业新技术与新进展”学术研讨会暨 2014 年广东省食品学会年会论文集. 广州: [出版者不详], 2014: 38-43.
- [14] He Shan, Wang Hong-qiang, Wu Bin, et al. Response surface methodology optimization of fermentation conditions for rapid

and efficient accumulation of macrolactin a by marine *Bacillus amyloliquefaciens* ESB-2 [J]. Molecules, 2013, 18(1): 408-417.

- [15] 张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 248-253.
- [16] 牛帅科, 杨自洁, 李艳. 蛹虫草菌的液态培养基优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 202-206.
- [17] Feng Yan-li, Shao Yan-chun, Zhou You-xiang, et al. Production and optimization of monacolin K by citrinin-free *Monascus pilosus* MS-1 in solid-state fermentation using nonglutinous rice and soybean flours as substrate[J]. Eur. Food Res. Technol., 2014(239): 629-636.
- [18] 李金良, 张莉李, 春燕海, 等. 洋链霉菌 GB-2 产西索米星发酵条件优化[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 208-212.
- [19] 宋一恒, 谢定, 钟海雁. 响应面法优化酵母富硒发酵条件[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 125-130.
- [20] 张建国, 陈晓明, 熊双丽. 响应面分析优化 ϵ -聚赖氨酸发酵培养基[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 19-23.
- [21] 张祁, 宁喜斌, 张继伦. 响应面法优化产蛋白酶海洋细菌的培养条件[J]. 中国生物工程, 2013, 33(8): 100-105.
- [22] 王璐, 李小溪, 古丽娜孜, 等. 响应面法优化马奶酒发酵条件的研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(2): 66-70.