

## 高产纤溶酶菌株 CNY16 发酵条件优化及其酶学特性初步研究

袁慎亮<sup>1</sup> 邢德明<sup>1,2</sup> 窦少华<sup>1</sup> 王晓辉<sup>1\*</sup> 张庆芳<sup>1</sup> 迟乃玉<sup>1\*</sup>

(1. 大连大学 生命科学与技术学院 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

(2. 沈阳农业大学 食品学院 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**【目的】通过响应面试验对产纤溶酶菌株 CNY16 发酵条件进行优化, 并对其酶学特性进行初步研究。【方法】采用 Plackett-Burman 设计得出酵母膏、氯化钠、转速 3 个最重要影响因素, 通过最陡爬坡实验逼近酶活的最高区域, 然后根据 Box-Behnken 中心组合设计实验对显著因素进行优化分析, 最后对该酶学性质进行初步分析。【结果】最终得到 3 个因素的最优组合: 酵母膏 3.28%, 氯化钠 1.14%, 转速 166 r/min, 在此培养条件下, 纤溶酶活达到 875.932 U/mL, 比优化前提高了 46%; 该菌株产纤溶酶最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 6.5。【结论】确定了高产纤溶酶菌株 CNY16 的最优发酵条件及其部分酶学性质, 为该酶的进一步深入研究及中试实验奠定基础。

**关键词:** 纤溶酶, 标准曲线, 响应面, 发酵条件优化, 纤维蛋白酶谱

## Optimization of fermentation conditions of a fibrinolytic enzyme strain CNY16 with high activity and preliminary study of its enzymatic properties

YUAN Shen-Liang<sup>1</sup> XING De-Ming<sup>1,2</sup> DOU Shao-Hua<sup>1</sup> WANG Xiao-Hui<sup>1\*</sup>  
ZHANG Qing-Fang<sup>1</sup> CHI Nai-Yu<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Center, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

**Abstract:** [Objective] Response surface analysis was applied to optimize the fermentation conditions for producing fibrinolytic enzyme strain CNY16, and preliminarily studied its enzymology characteristics. [Methods] Through the Plackett-Burman design, the most significant effect on fibrinolytic enzyme production was obtained which include yeast extract, sodium chloride and revolving speed. The highest fibrinolytic activity area was investigated by the steepest climbing experiments, then, the optimal fermentation conditions of producing fibrinolytic enzyme strain CNY16 was analysed by Box-Behnken central composite design experiments. [Results] The

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306)

\*通讯作者: Tel: 86-411-87402624

✉: 王晓辉: wangxiaohui@dlu.edu.cn; 迟乃玉: cny7566@126.com

收稿日期: 2013-11-12; 接受日期: 2013-12-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

optimal fermentation conditions of strain CNY16 was determined for 3.28% yeast extract, 1.14% sodium chloride, rotate speed at 166 r/min, the enzyme activity was 875.932 U/mL, the optimized enzyme activity was 46% higher than before. The optimum temperature for the fibrinolytic enzyme was 30 °C and the optimum pH was 6.5. **[Conclusion]** This experiment determined the most optimal fermentation conditions for producing fibrinolytic enzyme strain CNY16 and researched part of enzymatic properties, laied a foundation for further research and experiment of the the pilot study.

**Keywords:** Fibrinolytic enzyme, Standard curve, Response surface, Optimization of fermentation conditions, Fiber protease spectrum

血栓性疾病是血栓形成和血栓栓塞两种病理过程所引起的疾病,严重威胁人类的生命健康,其发病率高居各种疾病之首,且近年来还有增长之势,是当前研究的重点和热点之一<sup>[1-2]</sup>。目前,国内外已正式批准临床使用的溶栓药物有链激酶(SK)、尿激酶(UK)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)<sup>[3-6]</sup>等。这些药物主要从动植物组织中提取获得,疗效肯定,但还存在许多缺陷:酶特异性及稳定性差,半衰期短,毒副作用大,价格昂贵,还需大量给药,并且均不能口服。从微生物中分离提取的纤维蛋白溶解酶(纤溶酶),对血栓中的纤维蛋白具有一定降解特异性,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。

本文从环境微生物中分离筛选出一株高产纤溶酶菌株 CNY16,经鉴定为沙福芽孢杆菌(GenBank 登录号 KF802857)<sup>[7]</sup>,为了进一步研究其最优发酵条件,本试验在 Plackett-Burman (P-B)实验设计基础上,从多个过程变量中有效地选出几个重要的因素,然后通过 Design-Expert.V8.0.6.1 软件的响应面 Box-Behnken 实验设计系统对几个响应过程变量进行数学建模分析,进一步优化响应因子,最终确定最优发酵条件,并初步研究了该菌的酶学性质<sup>[8-10]</sup>,为该纤溶酶更深入研究及中试实验等奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** CNY16 筛选自大黑山土壤,鉴定为沙福芽孢杆菌<sup>[7]</sup>。现由大连大学辽宁省海洋微生物

工程技术研究中心保藏。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 纤维蛋白原、凝血酶、尿激酶, Sigma 公司;核酸 Marker, MBI 公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 培养基:** 固体活化培养基(%):胰蛋白胨 1.0,酵母提取物 0.5, NaCl 1.0, 琼脂 1.5, pH 7.0,  $1.0 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

液体发酵培养基(%):麦芽糖 2.0,酵母膏 3.5, NaCl 0.5,  $K_2HPO_4$  0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.04, pH 7.0,  $1.0 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

琼脂-纤维蛋白双层平板配制方法:称取 0.2 g 琼脂加热溶于 10 mL 巴比妥钠缓冲液中,倒入培养皿中,待冷却凝固形成第一层。称取 0.1 g 琼脂糖加热溶于 10 mL 巴比妥钠缓冲液中,放入 55 °C 水浴锅中。称取 0.02 g 纤维蛋白原溶于 5 mL 巴比妥钠缓冲液中,待溶解后与琼脂糖溶液混匀,并加入 200  $\mu$ L 凝血酶(100 IU)。充分混匀后倒入已凝固的琼脂平板上。待冷却形成双层纤维蛋白平板后,放入 4 °C 备用。由于纤维蛋白原易失活,故纤维蛋白平板最好现用现配,确保每一平板厚度相同,以减少实验误差。然后用 3 mm 胶头滴管打孔,放在 4 °C 备用。

### 1.2 酶活测定方法

纤溶酶活性测定参照 Astrup 等<sup>[11]</sup>的方法并稍作修改。在琼脂-纤维蛋白平板上,以尿激酶为标准进行测定,测得的结果相当于尿激酶的单位数。具体方法如下:(1) 按照 1.1.3 方法配制纤维蛋白双层平板。(2) 酶活力测定:吸取 10  $\mu$ L 酶液点入打好孔的琼脂-纤维蛋白双层平板的孔中,30 °C 恒温培养 16 h 后观察透明圈,测量透明圈直径,根

据标准曲线方程计算酶活。

### 1.3 响应面法优化实验

**1.3.1 最陡爬坡试验设计:** 根据 P-B 试验得到 3 个最显著因素进行设计,按照两个因素步长逐渐增大、一个因素逐渐减小以寻找最大相应区,酶活最高的一组作为中心组合试验中心点。

**1.3.2 中心组合试验设计:** 根据 P-B 和最陡爬坡试验确定三因素三水平,运用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件 Box-Behnken 设计 15 个试验点,其中 12 个试验点为析因点,3 个为零点,然后运用软件分析得到最优结果,最后对预测值进行验证,每组试验重复 3 次取平均值。

### 1.4 CNY16 纤溶酶酶学性质的初步研究

将 CNY16 在 30 °C、166 r/min 条件下培养 52 h,然后在 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min,取上清液作为粗酶液用于酶学特性研究。

**1.4.1 溶解纤维蛋白作用方式测定:** 购买的血纤维蛋白原中一般存在纤溶酶原,因此配制的血纤维蛋白平板中含有纤溶酶原(阳性平板)。阳性平板置 85 °C 保温 30 min,冷却至室温制成阴性平板。结合 1.1.3 所述方法,制得两个纤维蛋白平板。用直径为 3 mm 的打孔器在平板上打孔,将 10  $\mu$ L 粗酶液分别加入两个平板中,30 °C 培养 16 h 后测量溶圈直径。阳性平板反映了直接溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原间接溶解纤维蛋白的双重作用,而阴性平板中纤溶酶原受热失活,仅反映酶的直接纤溶活性。以此判断纤溶酶溶解纤维蛋白的作用方式<sup>[12-13]</sup>。

**1.4.2 CNY16 粗酶液最适反应温度的测定:** 将 CNY16 纤溶酶粗酶样品添加到琼脂糖-纤维蛋白平板,分别置于 20、30、40、50、60、70 °C 检测纤溶活性,每次做 3 组平行。

**1.4.3 CNY16 粗酶液最适 pH 研究:** 在配制纤维蛋白平板时,各成分分别用 pH 2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5 的同类型缓冲液配制,其他条件均相同。加样后置于 30 °C 恒温箱,保温 16 h 后取出测各平板中溶圈的垂直直径,以

确定酶作用的最适 pH。

**1.4.4 酶的 pH 稳定性研究:** 将样品分别用 pH 2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5 的缓冲液溶解,放 30 °C 恒温箱保温 2 h,取出后再调整 pH 为 6.5,按 1.2 方法测酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 尿激酶酶活标准曲线

用尿激酶标准品配制 10、20、40、60、80、100 U 的标准梯度浓度,按照酶活测定方法(1.2)测量不同浓度尿激酶透明圈直径,以不同浓度尿激酶透明圈的垂直直径乘积的对数对不同浓度标准品的对数作一元线性回归,得到标准曲线如图 1 所示,标准曲线的回归方程:  $y=0.296x+1.852$ ,  $R^2=0.996$ 。

### 2.2 最陡爬坡试验研究最大响应区域

通过 P-B 实验设计得到 3 个最显著因素:氯化钠、酵母膏、转速。在此基础上将氯化钠和转速的值按照步长逐步增大,酵母膏浓度按照步长依次减小。实验设计和结果如表 1 所示,在第 2 组实验中,当氯化钠 1.00%,酵母膏 3.20%,转速 160 r/min 时酶活最大。故以第 2 组实验作为中心组合实验的中心点,进行响应面试验设计。

### 2.3 响应曲面试验设计

**2.3.1 Box-Behnken 中心组合设计:** 在 P-B 试验和最陡爬坡试验基础上确定三因素三水平(表 2),运用 Design-Expert.V8.6.0.1 软件进行 B-B 中心组合设计,设计结果与响应值见表 3。

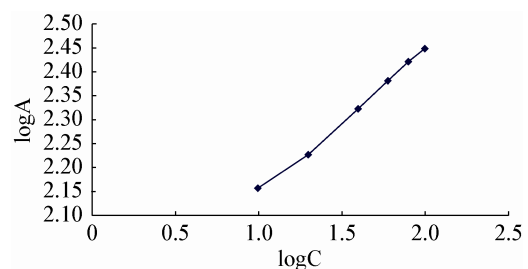


图 1 尿激酶标准曲线

Figure 1 Urokinase standard curve

注: A: 两直径乘积; C: 尿激酶浓度。

Note: A: Arithmetic product of two diameter; C: Concentration of urokinase.

表 1 最陡爬坡试验设计及实验结果				
Table 1 Experimental design and the results of steepest ascent				
序号 No.	A 氯化钠 Sodium chloride (%)	B 酵母膏 Yeast extract (%)	C 转速 Rotate speed (r/min)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	0.75	3.50	150.00	724.70
2	1.00	3.20	160.00	760.60
3	1.25	2.90	170.00	708.80
4	1.50	2.60	180.00	690.40

表 2 因素水平编码			
Table 2 Coding of factors and levels			
因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 氯化钠 Sodium chloride (%)	0.75	1.00	1.25
B 酵母膏 Yeast extract (%)	2.90	3.20	3.50
C 转速 Rotate speed (r/min)	150.00	160.00	170.00

表 3 N=15 的 Box-Benhknen 试验设计							
Table 3 Result and design table of Box-Benhknen (N=15)							
序号 No.	氯化钠		酵母膏		转速		酶活 Enzyme activity (U/mL)
	Sodium chloride (%)		Yeast extract (%)		Rotate speed (r/min)		
	A	Code A	B	Code B	C	Code C	
1	0.75	-1	2.90	-1	160.00	0	730.40
2	1.25	1	3.50	1	160.00	0	833.80
3	1.25	1	3.20	0	150.00	-1	765.50
4	1.00	0	2.90	-1	150.00	-1	702.90
5	1.25	1	2.90	-1	160.00	0	795.50
6	1.00	0	3.20	0	160.00	0	835.50
7	1.00	0	3.20	0	160.00	0	828.80
8	1.00	0	3.20	0	160.00	0	840.80
9	1.25	1	3.20	0	170.00	1	838.70
10	1.00	0	3.50	1	150.00	-1	778.50
11	0.75	-1	3.20	0	150.00	-1	735.60
12	1.00	0	3.50	1	170.00	1	835.80
13	1.00	0	2.90	-1	170.00	1	826.50
14	0.75	-1	3.50	1	160.00	0	786.90
15	0.75	-1	3.20	0	170.00	1	757.80

**2.3.2 回归模型建立与方差分析：**运用 Design-Expert.V8.6.0.1 软件对表 3 数据进行回归分析、得到回归方程：酶活(U/mL)=835.033+7.850A+22.463B+34.538C-4.550AB+12.750AC-16.575BC-29.954A<sup>2</sup>-18.429B<sup>2</sup>-30.679C<sup>2</sup>

进行显著性检验和方差分析(表 4、5)。在统计学中，模型显著性检验  $P<0.05$ ，表明模型建立有意义。由表 4 知其自变量一次项  $A, B, C$ ，二次

项  $A^2, C^2$  显著( $P<0.05$ )。失拟项用来表示所用模型与实验拟合的程度，即二者差异的程度。该设计失拟项  $P$  值为  $0.1067>0.05$ ，对模型是有利的，无失拟因素存在。回归方程的相关系数  $R^2=0.9940$ ，校正决定系数  $R^2(Adj)(0.9057>0.80)$ ，说明该模型只有 9.43%的变异。进一步说明模型拟合度较好，因此可用该回归方程代替试验真实点对实验结果进行初步分析和预测<sup>[14-15]</sup>。

表 4 回归系数显著性检验  
Table 4 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

变量 Variable	系数估计 Coefficient estimated	标准误 Standard error	F 值 F value	P 值 Prob>F
A-Sodium chloride (%)	27.850	4.996	31.070	0.002 6
B-Yeast extract (%)	22.463	4.996	20.212	0.006 4
C-Rotate speed (r/min)	34.538	4.996	47.783	0.001 0
AB	-4.550	7.066	0.415	0.548 0
AC	12.750	7.066	3.256	0.131 0
BC	-16.575	7.066	5.503	0.065 9
A <sup>2</sup>	-29.954	7.354	16.589	0.009 6
B <sup>2</sup>	-18.429	7.354	6.279	0.054 1
C <sup>2</sup>	-30.679	7.354	17.402	0.008 7

Note:  $R^2=0.994\ 0$ ; Adj  $R^2=0.905\ 7$ .

表 5 回归方程的方差分析  
Table 5 Variance analysis for regression equation

方差来源 Variance sources	自由度 Degrees of freedom	调整平方和 Sum of squares	调整均方 Mean square	F 值 F value	P 值 Prob>F
回归 Model	9	2.866E-004	3.185E-003	15.946	0.003 6
残差误差 Residual	5	998.539	199.708		
失拟 Lack of fit	3	926.213	308.738	8.537	0.106 7
纯误差 Pure error	2	72.327	36.163		
合计 Cor total	14	2.966E-004			

**2.3.3 响应面分析:** 根据响应面法分析数据绘出响应面及其等高线图,可以直观反映出氯化钠、酵母膏、转速及其交互作用对酶活的影响(图 2、3、4)。在响应面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表示参数之间交互作用较强<sup>[16-17]</sup>。由响应面立体优化图可以看出,氯化钠、酵母膏、转速与酶活存在显著的相关性。由图 2、3 和 4 表明:当酵母膏和转速固定在一般水平时,氯化钠浓度在 0.75%–1.05%时,酶活呈增大趋势,之后变化不大;当氯化钠和转速在一般水平时,酵母膏在 2.9%–3.3%时,酶活呈增大趋势,在酵母膏大于 3.3%时,酶活小范围变化;当氯化钠和酵母膏固定在一般水平时,转速在 150–160 r/min

左右时酶活呈增大趋势,高于 160 r/min 时,酶活开始渐渐降低。上述结果可使我们在发酵生产时科学合理的选择氯化钠浓度、酵母膏浓度和转速,提高发酵效率。

**2.3.4 最优条件的确定与验证:** 利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件分析可以得到最优发酵条件为(图 5):氯化钠 1.14%、酵母膏 3.28%和转速 166.12 r/min,预测最大酶活为 856.553 U/mL。根据实际情况将最优条件调整为氯化钠 1.14%、酵母膏 3.28%和转速 166 r/min。通过多次验证实验得到纤溶酶酶活均值为 875.932 U/mL,相对偏差为 2.3%,与理论预测相近度较高,表明采用响应面法对培养条件进行优化准确可靠。

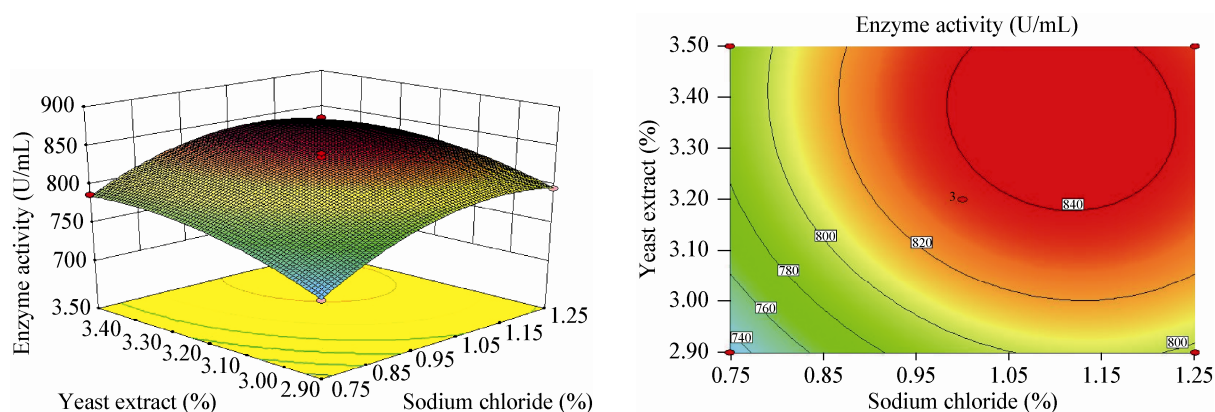


图 2 氯化钠与酵母膏交互影响酶活的曲面图和等高线图

Figure 2 Response surface plot and contour plot for the effects of sodium chloride and yeast extract on the enzyme activity

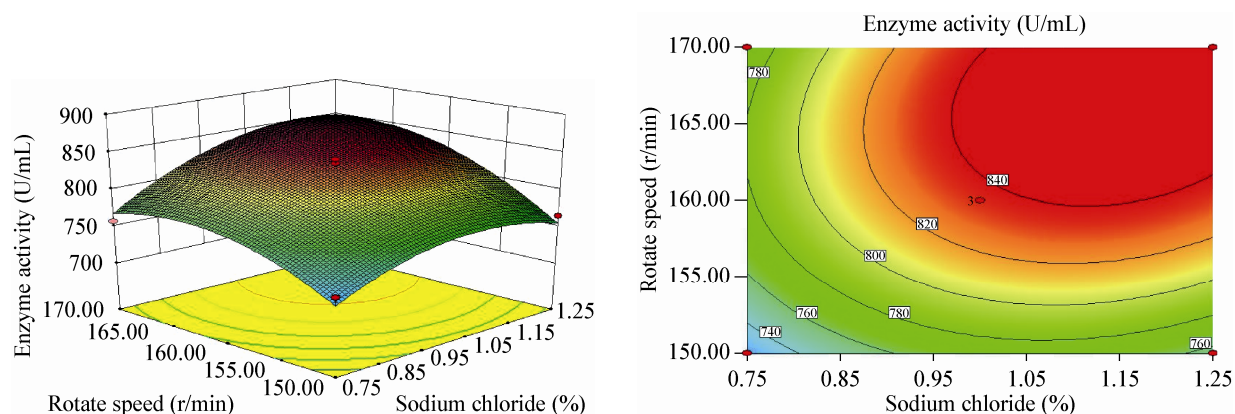


图 3 氯化钠与转速交互影响酶活的曲面图和等高线图

Figure 3 Response surface plot and contour plot for the effects of sodium chloride and rotate speed extract on the enzyme activity

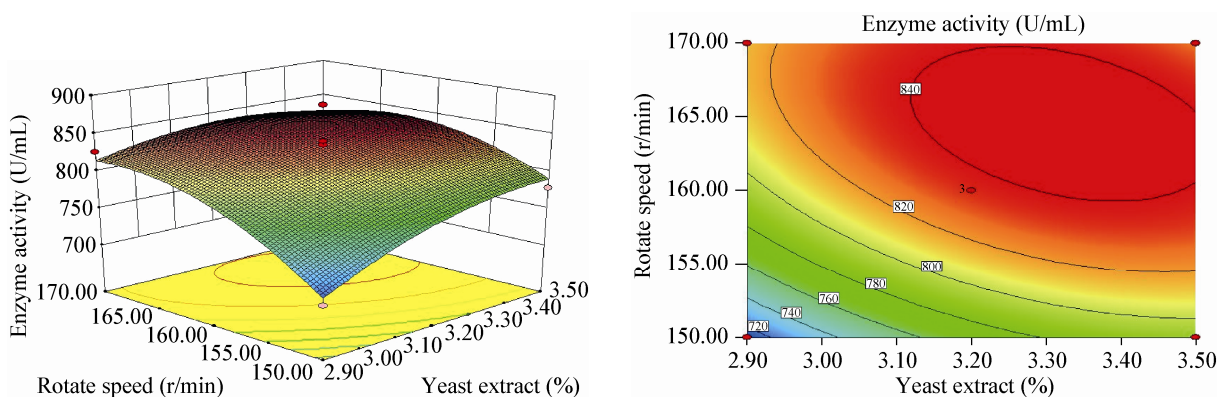


图 4 酵母膏与转速交互影响酶活的曲面图和等高线图

Figure 4 Response surface plot and contour plot for the effects of yeast extract and rotate speed extract on the enzyme activity



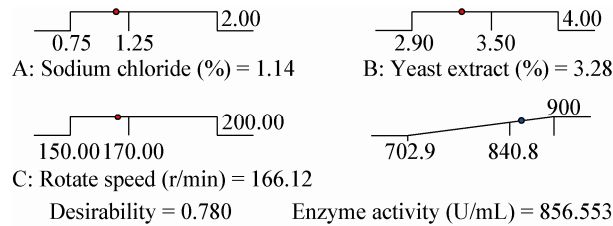


图5 预测最佳条件及最大酶活

Figure 5 Predict the best conditions and enzyme activity

## 2.4 酶学性质初步研究

**2.4.1 溶解纤维蛋白的作用方式:** 阳性平板和阴性平板上都产生透明圈, 阳性平板上纤维蛋白溶解圈比阴性平板上显得略大。阳性平板反映了直接溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原间接溶解纤维蛋白的双重作用, 而阴性平板中纤溶酶原受热失活, 仅反映酶的直接纤溶活性。初步推断该纤溶酶除直接降解纤维蛋白作用外, 还可激活血纤维蛋白溶酶原成纤溶酶, 从而间接降解纤维蛋白。

**2.4.2 酶作用的最适温度:** 如图6所示, 纤溶酶最适作用温度为 30 °C。该酶的作用温度比较宽泛, 对高温比较敏感, 在中低温环境下酶活保持较高水平, 这对于医药和保健食品的开发有重要意义。

**2.4.3 酶作用的最适 pH 及稳定性:** pH 对该纤溶酶活力的影响如图7所示。该酶的最适作用 pH 为 6.5。在 pH 为 3.5 时, 酶活为最适 pH 时的 35%, 表明该酶在微酸性环境下具有较好作用效果。该纤溶酶的 pH 稳定性曲线表明 pH 范围在 5.5–9.5、30 °C 保温 2 h, 酶活力保存 80% 以上, pH 稳定性较好, 这与 NK、CK 等略有不同。

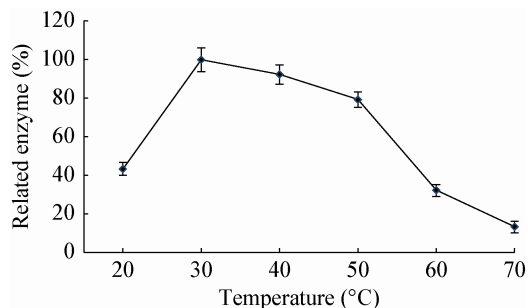


图6 酶作用最适温度曲线

Figure 6 The optimal temperature curve of enzyme action

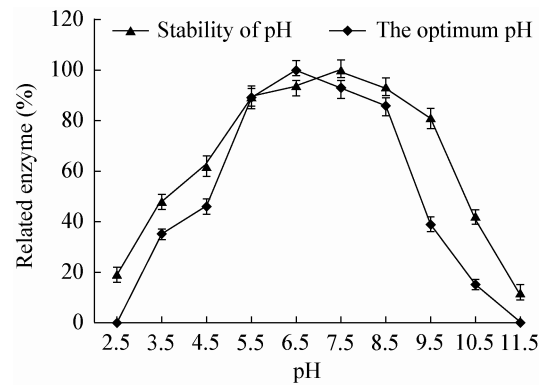


图7 酶作用最适 pH 及其稳定性曲线

Figure 7 The optimal pH and its stability curve of enzyme action

## 3 结论

本试验通过采用 Plackett-Burman 设计得出酵母膏、氯化钠、转速 3 个最重要影响因素, 最陡爬坡试验逼近酶活的最高区域确定 3 个水平, 然后根据确定的三因素三水平利用 Box-Behnken 模型对 CNY16 发酵产生纤溶酶的培养条件进行优化, 方差分析后表明模型拟合度良好。最优的发酵条件为氯化钠 1.14%、酵母膏 3.28% 和转速 166 r/min, 通过培养条件优化, 纤溶酶酶活由优化前的约 600 U/mL 提高到 875.932 U/mL, 比优化前提高了约 46%, 结果表明, 通过对发酵条件的优化是成功有效的。该酶活在相关研究中处于较高水平, 高于董明盛等<sup>[18]</sup>的 NK-5 纤溶酶酶活为 683.3 U/mL, 徐德钦等<sup>[19]</sup>的 U-11 纤溶酶酶活 410.0 U/mL, 刘晓艳等<sup>[20]</sup>的 YY-15 纤溶酶的酶活 98.31 U/mL; 与牟光庆等<sup>[21]</sup>的 SY-3 纤溶酶酶活 893.0 U/mL 和闵伟红等<sup>[22]</sup>的霉菌纤溶酶酶活 873.76 U/mL 基本持平。

该菌株为沙福芽孢杆菌, 分泌的纤溶酶在阴性和阳性平板中都能产生透明圈, 说明该酶既能直接降解纤维蛋白酶, 同时也能激活纤溶酶原间接降解纤维蛋白; 该酶的最适作用温度为 30 °C, 最适 pH 为 6.5, 在微酸性环境 pH 3.5 中有部分酶活, 这对于开发口服溶栓药或溶栓保健食品具有重要意义。有关该菌纤溶酶的分离纯化, 分子水平诱变以及工业深层发酵、基因序列、氨基酸序列、纤溶成分与

纤溶机制的关系将进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 翁郁华, 杨晓彤, 杨明俊, 等. 微生物纤溶酶的多样性与应用前景[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1562-1564.
- [2] 熊强, 梁剑光, 熊晓辉. 微生物——几种溶栓药物的重要来源[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 116-118.
- [3] 龚勇, 王以光. 一种来源于链霉菌的纤溶酶的纯化及其基因的克隆[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 186-190.
- [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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1451-1457.
- [5] Kim JS, Sapkota K, Park SE, et al. A fibrinolytic enzyme from the medical mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Microbiology, 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] 袁慎亮, 邢德明, 窦少华, 等. 一株产纤溶酶菌株的分离鉴定及其纤溶组分分析[J]. 微生物学通报, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.130821.
- [8] 彭勇, 张义正. 豆豉溶栓酶产生菌的筛选及酶学性质的初步研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(2): 30-40.
- [9] 王骏, 王敏, 王以光, 等. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 147-152.
- [10] 刘晨光, 魏香, 刘万顺, 等. 海洋假单胞菌纤溶酶的酶学性质的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 730-734.
- [11] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry Biophysics, 1952, 40: 346-354.
- [12] 刘晨光, 王鹏, 刘成圣, 等. 海洋假单胞菌纤溶酶的体外溶栓实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(1): 34-35.
- [13] 杜连祥, 刘晓兰, 路福平, 等. 根霉 12<sup>#</sup> 发酵产生纤溶酶的酶学性质[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 323-327.
- [14] 牛广财, 严宝冬, 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.
- [15] 苏同伟, 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.
- [16] 胡青平, 张红, 周冰, 等. 响应面法优化光合细菌 PSB-B 的生长条件[J]. 食品工业科技, 2013, 15: 1-7.
- [17] 申乃坤, 王青艳, 陆雁, 等. 响应面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.
- [18] 董明盛, 江晓, 刘诚, 等. 胞外纤溶酶产生菌的筛选及其产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(1): 23-27.
- [19] 徐德钦, 陈海燕, 章海锋, 等. 黄绿蜜环菌产纤溶酶的发酵条件优化研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(6): 96-103.
- [20] 刘晓艳, 刘毅. 根霉液态发酵产生纤溶酶的培养条件优化[J]. 生物技术, 2006, 16(2): 71-73.
- [21] 牟光庆, 孙园, 霍贵成. 豆豉纤溶酶产生菌的产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2007, 167(2): 30-33.
- [22] 闵伟红, 李佳, 王影, 等. 高产纤溶酶霉菌固体发酵工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 207-211.