

## 海洋来源链霉菌 MY0504 产纤溶酶的发酵条件优化

侯正欣<sup>1,2</sup> 董超<sup>2\*</sup> 马萱<sup>2</sup> 史延茂<sup>2</sup>

(1. 河北工业大学化工学院 天津 300130)

(2. 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050081)

**摘要:**【目的】以发酵液纤溶酶活力为指标, 优化海洋来源的链霉菌菌株 MY0504 的发酵条件。【方法】在菌株生长曲线及单因素试验基础上, 采用 Plackett-Burman 设计筛选影响纤溶酶活性的主要因素, 进一步用最陡爬坡试验及 Box-Behnken 中心组合设计法优化发酵条件。【结果】纤溶酶活性最高的发酵条件为: 葡萄糖 21.68 g/L, 酵母粉 25.31 g/L, NaCl 5.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 3.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, 装液量 50 mL (250 mL 摇瓶), 接种量 10% (体积比), 初始 pH 7.5, 温度 24 °C, 转速 200 r/min, 培养时间 4.5 d。发酵液纤溶酶活性可达 2 190.6 U/mL。【结论】确定了 MY0504 菌株产纤溶酶的最优发酵条件, 为该酶的进一步分离纯化及性质研究奠定基础。

**关键词:** 海洋, 链霉菌, 纤溶酶, 发酵优化, 单因素试验, 响应面

## Optimization of fermentation for fibrinolytic enzyme production by *Streptomyces* MY0504 from ocean

HOU Zheng-Xin<sup>1,2</sup> DONG Chao<sup>2\*</sup> MA Xuan<sup>2</sup> SHI Yan-Mao<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

(2. Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050081, China)

**Abstract:** [Objective] To optimize the fermentation conditions of *Streptomyces* strain MY0504 from marine environment and improve the fibrinolytic activity in fermentation broth. [Methods] Based on the growth curve of MY0504 and single factor test, the main factors affecting enzyme activity were found through the Plackett-Burman design, and the fermentation conditions were further optimized using steepest ascent experiment and Box-Behnken central composite design. [Results] The optimal fermentation conditions were as follows: glucose 21.68 g/L, yeast powder 25.31 g/L, NaCl 5.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 3.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, medium volume 50 mL (250 mL flask), inoculum size 10% (V/V), initial pH 7.5, fermentation temperature 24 °C, shaking speed 200 r/min, fermentation time 4.5 d. The enzyme activity reached 2 190.6 U/mL in fermentation

**Foundation item:** Science and Technology Support Project of Hebei Science and Technology Department (No. 14273201D)

\*Corresponding author: Tel: 86-311-83014602; E-mail: dongchao8605@sina.com

Received: June 22, 2016; Accepted: September 08, 2016; Published online (www.cnki.net): September 28, 2016  
基金项目: 河北省科技厅科技支撑项目 (No. 14273201D)

\*通讯作者: Tel: 86-311-83014602; E-mail: dongchao8605@sina.com

收稿日期: 2016-06-22; 接受日期: 2016-09-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-28

broth. **[Conclusion]** The optimal fermentation conditions of strain MY0504 producing fibrinolytic enzyme were obtained, which lay a foundation for further purification and characterization of the fibrinolytic enzyme.

**Keywords:** Ocean, *Streptomyces*, Fibrinolytic enzyme, Fermentation optimization, Single factor test, Response surface

正常情况下血液中凝血机制和抗凝血机制处于动态平衡状态,这种平衡可以维持血液通畅和伤口愈合,当抗凝和纤溶机制出现问题时,不溶性的纤维蛋白在血管中积累导致血栓形成,进一步导致心肌梗死等心血管疾病,严重危害人类的生命健康<sup>[1]</sup>。在现代饮食结构及生活习惯等因素的影响下,心血管疾病发病率和死亡率有逐年升高的趋势,据世界卫生组织报道,在2008年全世界有1 730万人死于心血管疾病,并推测到2030年将有超过2 300万人死于此类疾病<sup>[2]</sup>。因此,关于血栓疾病药物的研究一直被持续关注。

目前,被广泛用于治疗血栓病的疗法是溶栓疗法<sup>[3-4]</sup>,溶栓剂主要分为两种类型,一种是纤溶酶原激活物,如组织型纤溶酶原激活物(t-PA)<sup>[5]</sup>和尿激酶(u-PA)<sup>[6]</sup>;另一种是纤溶酶类物质,它们可以直接作用于血纤维蛋白,从而迅速溶解血栓,如纳豆激酶<sup>[7]</sup>、蚓激酶<sup>[8]</sup>等。u-PA和t-PA仍广泛应用于溶栓治疗,但这些药物副作用较大,仅能注射不可口服,且价格昂贵。因此,国内外研究人员一直在努力寻找更安全有效的溶栓剂。

海洋微生物日益成为研究的焦点,它们具有独特的生理功能,可以在极端环境中生存,产生很多新型的代谢产物<sup>[9-11]</sup>。而放线菌早已被证实能产生种类繁多的活性物质<sup>[12]</sup>,因此,海洋来源放线菌逐渐成为生产新的天然产物的最具潜力的类群,其产生的代谢物质很可能更加符合人类对有效药物的需求。

本实验室从渤海海域筛选到了一株产纤溶酶的链霉菌 MY0504,本文对其产纤溶酶的发酵条件进行了优化,提高了发酵液酶活,为进一步分离纯化并确定此纤溶酶的性质奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 菌株 MY0504,由本实验室自渤海海域海水中分离,通过生理生化试验及 16S rRNA 基因序列分析确定其为链霉菌属,菌株已保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏编号 No. 10664。

**1.1.2 培养基:** 牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[13]</sup>(g/L): 蛋白胨 10.0,牛肉膏 3.0,NaCl 5.0。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 牛纤维蛋白原购自 Sigma 公司,凝血酶购自石家庄华瑞创新生物技术开发中心;尿激酶购自辽宁卫星制药厂。

### 1.2 分析方法

**1.2.1 菌株的生长曲线:** 保藏菌种经斜面活化后,挑取部分到 600 mL (3 L 摇瓶)牛肉膏蛋白胨培养基中,28 °C、200 r/min 培养 6 d,每隔 12 h 取样测菌体干重及发酵液酶活,做 3 次重复。

**1.2.2 纤溶酶酶活测定:** 发酵液中纤溶酶酶活采用改进的纤维蛋白平板法进行测定<sup>[14]</sup>。每个样品在已制备好的纤维平板上点样 10  $\mu$ L,37 °C 培养箱中恒温孵育 15 h,得到的透明圈面积与酶活对数成正比关系,用尿激酶作为标准品,再根据透明圈面积可得到样品酶活。

### 1.3 发酵条件优化设计

**1.3.1 单因素试验:** 不同碳源对 MY0504 菌株产纤溶酶的影响:以蛋白胨(10 g/L)为氮源,分别以浓度为 5 g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉作为碳源,装液量 50 mL (250 mL 摇瓶),接种量 10% (体积比),28 °C、200 r/min 培养 4.5 d。每个处理做 3 个平行。发酵结束后用纤维蛋白平板法测定发酵上清液酶活,确定不同碳源对菌株产酶的影响。

不同氮源对 MY0504 菌株产纤溶酶的影响：以葡萄糖(5 g/L)为碳源 ,分别以浓度为 10 g/L 的蛋白胨、豆饼粉、酵母粉、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为氮源 ,装液量 50 mL (250 mL 摇瓶) ,接种量 10% (体积比) ,28 °C、200 r/min 培养 4.5 d。每个处理做 3 个平行。发酵结束后用纤维蛋白平板法测定发酵上清液酶活 ,确定不同氮源对菌株产酶的影响。

无机盐对 MY0504 菌株产纤溶酶的影响：以牛肉膏蛋白胨培养基为基础 ,分别加入不同数量级浓度的 NaCl、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ,装液量 50 mL (250 mL 摇瓶) ,接种量 10% (体积比) ,28 °C、200 r/min 培养 4.5 d。每个处理做 3 个平行。发酵结束后用纤维蛋白平板法测定发酵上清液酶活 ,确定不同浓度的无机盐对菌株产酶的影响。进一步确定各无机盐浓度应处的水平。

1.3.2 Plackett-Burman 设计：根据单因素试验结果 ,选取 8 个因素进行 P-B 试验设计 ,将每个因素设置高低两个水平 ,并设置 3 个虚拟因素用于估算误差 ,如表 1 所示。

1.3.3 最陡爬坡试验：对 P-B 试验设计选出的 3 个显著因素 ,进行步长和变化方向的设计 ,按一定梯度增加或减少 3 个显著变量的值 ,根据响应值大小确定各因素的最佳浓度范围 ,使因素趋近中心点<sup>[15]</sup> ,在最佳范围内建立更准确的响应面拟合方程。

1.3.4 Box-Behnken 设计：根据最陡爬坡试验结果 ,选取 3 个因素的高中低水平 ,如表 2 所示 ,在

表 1 Plackett-Burman 设计因子水平及编码			
Table 1 The levels and codes of variables used in the Plackett-Burman design			
编码	变量	低水平	高水平
Code	Variables	Low level-1	High level+1
A	Glucose (g/L)	5	10
B	Temperature (°C)	23	28
C	Dummy 1	—	—
D	pH	7.0	9.0
E	Yeast powder (g/L)	10	20
F	Dummy 2	—	—
G	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	0.5	1.0
H	NaCl (g/L)	5	10
J	Dummy 3	—	—
K	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (g/L)	2	4
L	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	0.02	0.04

表 2 Box-Behnken 试验因素水平及编码			
Table 2 The levels and codes of variables used in the Box-Behnken design			
因素	Level		
	-1	0	1
(A) Glucose (g/L)	15	20	25
(B) Yeast powder (g/L)	20	25	30
(C) Temperature (°C)	21	24	27

此基础上用 Design-Expert 8.0 软件进行设计并做统计学分析。

2 结果与分析

2.1 MY0504 菌株的生长曲线及产酶曲线

如图 1 所示 ,菌株在 0-24 h 的生长处于迟缓期 ,24 h 后进入对数生长期 ,发酵 60 h 后进入平稳生长期 ,培养 6 d 未见明显衰亡。在对数生长期期间菌株最健壮 ,最适合作为种子液接种到发酵培养基中 ,因此 ,选取生长 48 h 的菌株作为种子。从产酶曲线可见 ,在 4.5 d 时发酵液酶活最高 ,因此 ,选择发酵时间为 4.5 d。菌株在进入平稳期时开始产生纤溶酶并积累 ,说明该酶的产生和菌体生长是非偶联的关系 ,酶的合成类型属于滞后合成型。在 4.5 d 时酶活力最高 ,之后酶活下降 ,分析可能在发酵进行 4.5 d 后纤溶酶积累过多造成反馈抑制 ,或者产生了抑制纤溶酶活力或抑制其合成的新的产物。

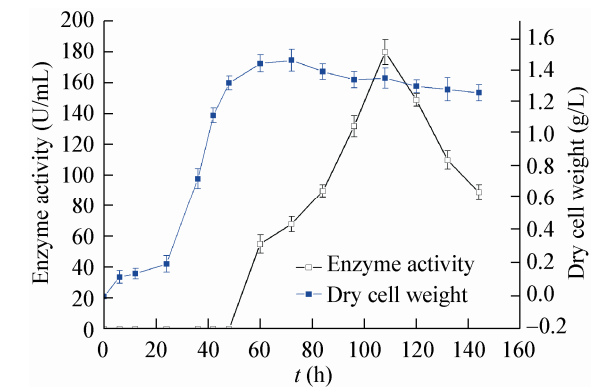


图 1 MY0504 菌株生长曲线及产酶曲线  
Figure 1 The growth and enzyme production curves of strain MY0504

在优化后培养条件下,菌株生长环境发生较大改变,因此在优化后的发酵过程中曾定时取样测发酵液酶活,发现在 4.5 d 时发酵液酶活力仍最高,因此其他培养条件的改变对此菌株产纤溶酶的最佳发酵时间影响不大。

## 2.2 发酵条件的优化

2.2.1 单因素试验:单因素试验结果见图 2、图 3、图 4 及图 5,可以看出,对菌株 MY0504 产纤溶酶

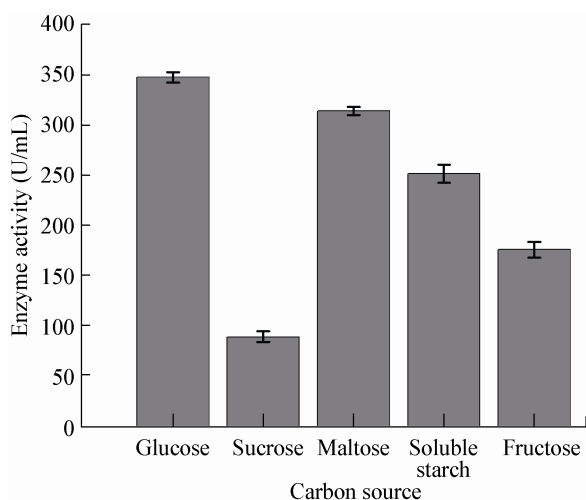


图 2 不同碳源对酶活的影响

Figure 2 Effects of different carbon sources on enzyme activity

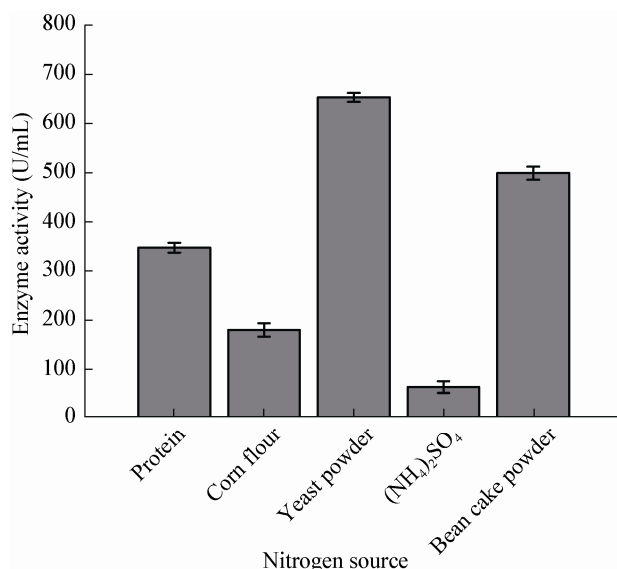


图 3 不同氮源对酶活的影响

Figure 3 Effects of different nitrogen sources on enzyme activity

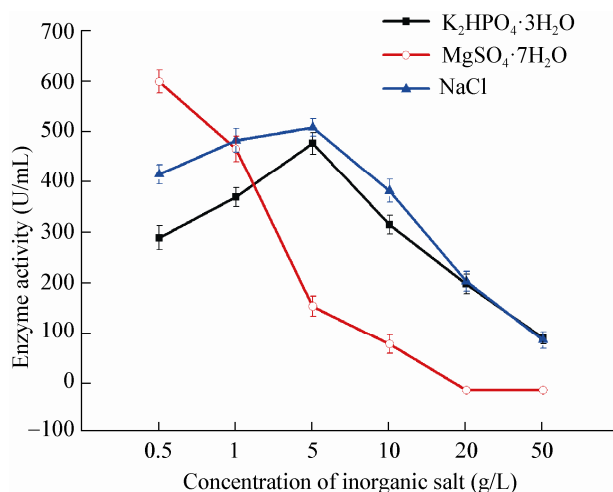


图 4 不同浓度无机盐对酶活的影响

Figure 4 Effects of inorganic salt with different concentration on enzyme activity

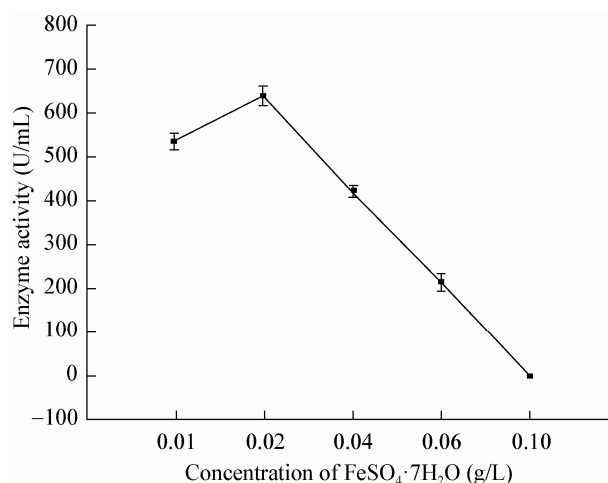


图 5 不同浓度 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 对酶活的影响

Figure 5 Effects of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O with different concentration on enzyme activity

最有利的碳氮源为葡萄糖和酵母粉。一定量的 NaCl、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 对纤溶酶产生有利,且它们较为适合的水平分别为(质量体积比): 0.5%、0.05%、0.5%、0.002%。在此基础上,确定初始发酵培养基为(g/L): 葡萄糖 5.0, 酵母粉 10.0, NaCl 5.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 5.0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02。培养条件为: 温度 28 °C, 初始 pH 7.5, 接种量 10% (体积比),

装液量 50 mL (250 mL 摇瓶), 摇床 200 r/min 培养 4.5 d。在此条件下, 发酵液酶活达到 927 U/mL。

**2.2.2 Plackett-Burman 设计筛选主要因素:** Plackett-Burman 试验设计及结果见表 3, 进行 12 组试验, 运用 Design-Expert 8.0 软件对表 3 中的结果进行统计学回归性分析, 得到各因素的回归系数及重要性评价(表 4), 结果表明, 温度、葡萄糖、酵母粉是影响发酵液纤溶酶酶活的 3 个最显著的因素。其中, 葡萄糖、酵母粉的浓度对纤溶酶活的影响是正效应, 温度对纤溶酶活的影响是负效应。其

他因素对酶活的影响不大, 根据各因素效应的正负及节约成本原则, 调整它们的取值。

**2.2.3 最陡爬坡试验结果:** 如表 5 所示, 随着发酵温度的降低, 葡萄糖和酵母粉浓度的上升, 发酵液酶活先上升后下降, 在发酵温度为 24 °C, 葡萄糖浓度为 20 g/L, 酵母粉浓度为 25 g/L 时, 酶活力最高, 因此选此组数值作为响应面优化的中心点。

**2.2.4 响应面试验确定最佳发酵条件:** 三因素三水平的响应面试验设计及结果如表 6 所示, 共进行 17 组试验。运用 Design-Expert 8.0 软件分析试验结果, 得

表 3 Plackett-Burman 实验设计及结果												
Table 3 Plackett-Burman experiment design and response values												
Test No.	A	B	(C)	D	E	(F)	G	H	(J)	K	L	Enzyme activity (U/mL)
1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	197.2
2	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1 019.3
3	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	589.0
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	712.2
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1 484.1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	710.3
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1 084.9
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	579.2
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	992.7
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	722.8
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	529.1
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	497.2

表 4 回归系数及重要性分析			
Table 4 Regression coefficient and analyses of their significance			
因素 Factors	回归系数 Regression coefficient	贡献值 Contribution (%)	重要性 Significance
Glucose	160.08	21.92	2
Temperature	-210.20	28.78	1
pH	-42.65	5.84	6
Yeast powder	147.18	20.15	3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	90.95	12.45	4
NaCl	35.28	4.83	7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	43.38	5.94	5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.62	0.09	8

表 5 最陡爬坡试验设计及结果				
Table 5 The path of steepest ascent experiment design and response values				
Test No.	Glucose (g/L)	Yeast powder (g/L)	Temperature (°C)	Enzyme activity (U/mL)
1	5	10	30	581.2
2	10	15	28	848.5
3	15	20	26	1 035.9
4	20	25	24	1 850.1
5	25	30	22	961.1
6	30	35	20	493.6

到二次回归拟合方程  $Y(\text{发酵液纤溶酶活力})=2\,026.2+124.69A+29.75B+153.44C-43.63AB-51.00AC+65.38BC-114.97A^2-261.35B^2-612.98C^2$ , 决定系数  $R^2=93.1\%$ 。方程及各因素的方差分析见表 7, 可以看出, 二次方程显著性检测  $P<0.05$  显著, 失拟项显著性检测  $P>0.1$  不显著, 说明模型拟合性良好, 能准确反映实际情况。利用 Design-Expert 8.0 软件根据回归方程进行响应面分析, 绘制响应面分析图及其对应的等高线图, 如图 6 所示, 可直观的看出各因素之间交

互作用的强弱及最优响应值对应的变量取值。

解方程后得到最大响应值即发酵液最大酶活为 2 078.3 U/mL, 对应的变量浓度为: 葡萄糖 21.68 g/L, 酵母粉 25.31 g/L, 温度 24 °C。

### 2.3 模型的验证

为了验证模型预测的准确性, 在预测的最佳发酵条件下进行 4 次发酵试验。测得了发酵液平均纤溶酶酶活为 2 190.6 U/mL, 与模型预测值相差不大, 因此该模型可以较好的预测实际酶活值。

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6 Box-Behnken experiment design and response values

Test No.	Glucose (A)	Yeast powder (B)	Temperature (C)	Enzyme activity (U/mL)
1	-1	0	1	1 185.5
2	0	0	0	2 218.0
3	0	1	-1	1 540.4
4	0	0	0	2 175.0
5	0	1	1	1 285.0
6	0	0	0	2 068.0
7	-1	-1	0	1 441.5
8	1	0	1	1 586.0
9	-1	0	-1	1 208.5
10	0	-1	-1	1 205.0
11	0	0	0	1 965.5
12	-1	1	0	1 562.0
13	0	0	0	1 804.0
14	1	-1	0	1 825.0
15	1	1	0	1 771.0
16	0	-1	1	1 413.0
17	1	0	-1	1 313.0

表 7 回归方程分析结果

Table 7 Results of regression equation analysis

项目 Item	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F values	P>F
Model	1.955E+006	9	10.50	0.002 6
A	2.441E+005	1	11.80	0.010 9
B	41 112.78	1	1.99	0.201 5
C	5 151.13	1	0.25	0.633 1
AB	56 287.56	1	2.72	0.143 1
AC	21 904.00	1	1.06	0.337 8
BC	53 592.25	1	2.59	0.151 6
A <sup>2</sup>	2.725E+005	1	13.17	0.008 4
B <sup>2</sup>	1.981E+005	1	9.57	0.017 5
C <sup>2</sup>	9.243E+005	1	44.67	0.000 3
Residual	1.449E+005	7		
Lack of fit	32 975.69	3	0.39	0.765 6
Pure error	1.119E+005	4		
Cor total	2.100E+006	16		

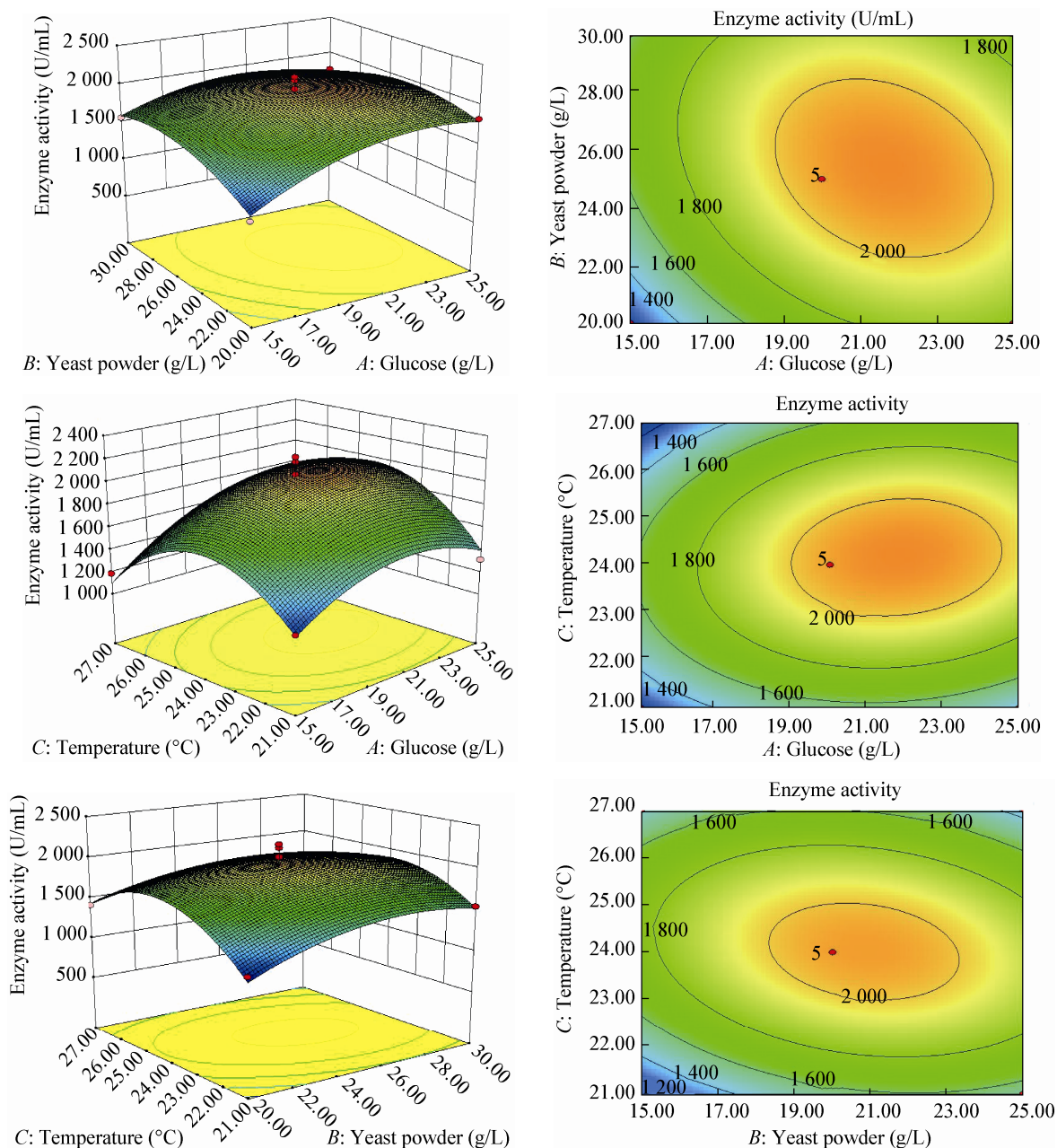


图6 二因素交互作用响应面图及等高线图

Figure 6 Surface and contour plots of two factor interactions

### 3 讨论

血栓病逐渐成为危害人类生命健康的最大杀手,急需寻找更加安全有效且价格低廉的溶栓药物,本实验室从渤海海域分离出一株具有纤溶活性的链霉菌 MY0504,通过优化发酵条件提高了纤溶酶产量,为进一步研究此纤溶酶的结构及开发为新型溶栓药物奠定基础。本文通过单因素试验及响

应面设计确定了最优发酵条件,最终发酵液纤溶酶活力可达 2 190.6 U/mL,是优化前酶活的 4 倍,且在同类研究中处于较高水平<sup>[16-18]</sup>。

用 Plackett-Burman 设计筛选主要因素时,发现温度对酶活的影响很大,且是负效应,说明在温度较低情况下有利于产生纤溶酶,同时发现菌株喜低温,在低温条件下生长良好,菌体较多,这可能



与该菌株分离自海洋环境有关,但是温度太低可能会造成代谢缓慢,产物减少,因此经响应面优化后确定的最优发酵温度为 24 °C。以优化的发酵条件,本实验室尝试在 100 L 发酵罐中进行扩大培养,结果发酵液纤溶酶活力未达到预期值,推测是由于发酵罐搅拌叶产生的机械损伤较大,或者为消泡加入了较多的食用油而影响了菌体产酶。因此,该菌株的发酵工艺扩大还需要进一步探索。但本试验的发酵条件优化方法和结果对于后续研究有良好的指导作用。

## 参 考 文 献

- [1] Ahn MJ, Ku HJ, Lee SH, et al. Characterization of a novel fibrinolytic enzyme, bsFA, from *Bacillus subtilis* ZA400 in kimchi reveals its pertinence to thrombosis treatment[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(12): 2090-2099
- [2] Vijayaraghavan P, Vincent SGP. Statistical optimization of fibrinolytic enzyme production using agroresidues by *Bacillus cereus* IND1 and its thrombolytic activity *in vitro*[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 725064
- [3] Chitte RR, Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 31(6): 405-410
- [4] Narasimhan MK, Chandrasekaran M, Rajesh M. Fibrinolytic enzyme production by newly isolated *Bacillus cereus* SRM-001 with enhanced *in vitro* blood clot lysis potential[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2015, 61(5): 157-164
- [5] Banerjee A, Chisti Y, Banerjee UC. Streptokinase-a clinically useful thrombolytic agent[J]. Biotechnology Advances, 2004, 22(4): 287-307
- [6] Yan F, Yan JP, Sun WT, et al. Thrombolytic effect of Subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice[J]. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2009, 28(4): 444-448
- [7] Zhu JH, Du LX, Lu FP, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme-nattokinase[J]. Microbiology China, 2006, 33(1): 68-71 (in Chinese)  
朱建辉, 杜连祥, 路福平, 等. 高效溶栓酶——纳豆激酶的纯化及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 68-71
- [8] Ge T, Liang GD. The progress in the studies on the thrombolysis enzymes of earthworm[J]. China Biotechnology, 2003, 23(4): 48-52 (in Chinese)  
葛涛, 梁国栋. 蚓激酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 48-52
- [9] Valli S, Suvathi SS, Aysha OS, et al. Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(6): 469-473
- [10] Gandhimathi R, Arunkumar M, Selvin J, et al. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes[J]. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology, 2008, 18(1): 16-22
- [11] Naveena B, Sakthiselvan P, Elaiyaraju P, et al. Ultrasound induced production of thrombinase by marine actinomycetes: kinetic and optimization studies[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 61: 34-42
- [12] Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 158(4): 168-175
- [13] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. 4th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2010: 17 (in Chinese)  
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2010: 17
- [14] Yang M, Dong C, Shi YM, et al. Improvement on the method of measuring the activity of nattokinase with agarose-fibrin plate[J]. China Brewing, 2008(7): 77-80 (in Chinese)  
杨明, 董超, 史延茂, 等. 纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进[J]. 中国酿造, 2008(7): 77-80
- [15] Qi XZ, Wang LQ, Meng P, et al. Medium optimization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors production by response surface analysis[J]. Microbiology China, 2012, 39(2): 203-210 (in Chinese)  
齐西珍, 王利强, 孟鹏, 等. 利用响应面法优化  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂发酵培养基[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 203-210
- [16] Yuan SL, Xing DM, Dou SH, et al. Optimization of fermentation conditions of a fibrinolytic enzyme strain CNY16 with high activity and preliminary study of its enzymatic properties[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1621-1628 (in Chinese)  
袁慎亮, 邢德明, 窦少华, 等. 高产纤溶酶菌株 CNY16 发酵条件优化及其酶学特性初步研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1621-1628
- [17] Jiao L, Yu HW, Guo RF, et al. Study on the fermentation for fibrinolytic enzyme from *Pichia pastoris* PK53[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(3): 94-98 (in Chinese)  
焦龙, 于宏伟, 郭润芳, 等. 毕赤酵母工程菌 PK53 产纤溶酶发酵条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 94-98
- [18] Hong Y, Liu XL, Deng YP, et al. Optimization of fibrinolytic enzyme production by using *Neurospora sitophila*[J]. The Food Industry, 2015, 36(4): 96-99 (in Chinese)  
洪瑜, 刘晓兰, 邓永平, 等. 好食脉孢霉产纤溶酶的液体发酵条件优化[J]. 食品工业, 2015, 36(4): 96-99