

# 过氧化氢酶高产菌株 CE-2-A 的发酵条件优化

张增祥<sup>1,2</sup> 王 伟<sup>1</sup> 王 芳<sup>1</sup> 孙 谥<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>海洋产物资源与酶工程实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>上海海洋大学食品学院, 201306)

**摘 要** 为了提高气单胞菌属菌株 CE-2-A 的过氧化氢酶产量, 对其发酵条件进行优化。首先运用了单因子试验筛选出了发酵培养基的麦芽糖含量、牛肉膏含量、CaCl<sub>2</sub> 和 MgCl<sub>2</sub> 含量, 在此基础上采用 Plackett-Burman 设计法, 对 8 种影响产酶的因素进行评价。试验结果表明, 牛肉膏含量、起始 pH、摇瓶装液量对菌株产过氧化氢酶的活力具有显著的影响。通过 Box-Behnken 试验考察了牛肉膏含量、起始 pH、摇瓶装液量这 3 个主要因素对菌株所产过氧化氢酶活力的影响。发酵条件优化结果为装液量 42.6 ml、牛肉膏含量 3.69 g/L、起始 pH 9.1, 采用优化后发酵培养条件进行摇瓶发酵培养, 过氧化氢酶的酶活力达到 2 532.5 U/ml, 与优化前酶活力(1 849.7 U/ml)相比提高了 36.9%。

**关键词** 气单胞菌 过氧化氢酶 发酵条件 响应面分析

**中图分类号** Q939.9; TQ925 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0095-09

## Optimization of fermentation conditions for the catalase production by *Aeromonas* sp. CE-2-A

ZHANG Zeng-xiang<sup>1, 2</sup> WANG Wei<sup>1</sup> WANG Fang<sup>1</sup> SUN Mi<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Marine Products and Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

**ABSTRACT** The effective three-phase statistical method was used to optimize the fermentation conditions for the catalase production by *Aeromonas* sp. CE-2-A. Firstly, the content of maltose, beef extract, calcium chloride and magnesium chloride in the fermentation medium was screened through single factor experiments. Based on the results of the first step, eight factors that affected the enzyme production were evaluated by using the method of Plackett-Burman design. It showed that the medium volume, beef extract content and original pH had great influence on the catalase activity of strain CE-2-A. The effects of three factors on the enzyme activity produced by the strain were determined by the Box-Behnken experiment. The results of fermentation optimization were as follows: medium volume 42.6 ml, beef extract content 3.69 g/L, original pH 9.1, and the enzymatic activity of catalase after optimization in shaking flasks was

国家高技术研究发展(863)计划(2007AA091602)和国家自然科学基金(41006119)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85819525

收稿日期: 2009-12-28; 接受日期: 2010-03-03

作者简介: 张增祥(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物过氧化氢酶研究。E-mail: zhangzengxiang@yeah.net, Tel: (0532)85833961

improved from 1,849.7 U/ml to 2,532.5 U/ml, a 36.9% increase compared with the initial fermentation conditions before the optimization.

**KEY WORDS** *Aeromonas* Catalase Fermentation conditions  
Response surface analysis

过氧化氢酶(Hydroperoxidase, catalase, 过氧化氢氧化还原酶, EC1.11.1.6)是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶,能够高效催化过氧化氢分解,具有清除生物体内自由基、保护细胞免受损害等作用(Schriner *et al.* 2005)。近年来它又以高效催化的能力广泛用于食品、医学诊断以及纺织、造纸等工业领域(曹翔宇等 2006)。

传统的过氧化氢酶是从牛肝中提取,随着微生物学的不断发展,越来越多的过氧化氢酶通过微生物发酵获得(洪海军等 2004)。微生物的生长离不开碳源、氮源、无机盐等各种营养物质。同时,酶的合成受发酵条件的影响,条件不同,所产生的酶量有很大变化,因此提高其产酶水平需要进行发酵条件的优化(肖开芳等 2008)。

Plackett-Burman 设计法(刘建忠等 2002)是一种通过  $N$  次实验可以研究  $K = N - 1$  个变量的一种近饱和的两水平分式析因试验设计方法,它基于平衡的非完全区组(Balanced incomplete block)原理,试图用最少的实验次数达到使因子的主效果得到尽可能精确的估计,以从众多的考察因素中快速有效地筛选出最为重要的因素供进一步研究(Skowronek *et al.* 2003)。

Box-Behnken 响应面分析法(RSM)是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法,是国际上较为常用的响应面法。其采用了合理的试验设计,能以最经济的方式、以很少的实验数量和时间对试验进行全面研究,从而取得更为明确的、有目的性的结论(Montgomery 2002)。

本研究利用响应面分析方法对气单胞菌属菌株 CE-2-A 的摇瓶发酵培养基以及培养条件进行了优化,以提高产过氧化氢酶的活力,为后续工业化生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

#### 1.1.1 菌种

气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)高产突变菌株 CE-2-A,由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室分离保存。

#### 1.1.2 培养基

液体(基础)培养基:蛋白胨 1.0%,牛肉膏 0.3%,NaCl 0.5%,pH 7.0;固体培养基:上述液体培养基中加 2%琼脂。

### 1.2 主要试剂及设备

实验所用试剂均为国产分析纯。

全温空气摇床-QYC2112,上海福玛实验设备有限公司;奥利龙 pH 计,美国 Thermo Scientific Orion 公司;Sonics VCF1500 超声破碎仪,美国 Sonics 公司;日立高速冷冻离心机,日本 HITACHI 公司;752N 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。

### 1.3 发酵培养

从斜面挑取菌体转入含 50.0 ml 液体培养基的 250 ml 摇瓶,200 r/min,25 °C 培养 24 h,按 1.5%的接种量取菌悬液转入 50.0 ml 新鲜液体培养基中培养。离心发酵液收集菌体,以 pH 7.0,50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 20.0 ml 重悬菌体并在冰浴中超声破碎。离心后取上清即为粗酶液,对其进行过氧化氢酶活力测定。

## 1.4 过氧化氢酶活力的测定

过氧化氢酶活力采用紫外分光光度法(Wang *et al.*, 2008)。

## 1.5 产酶培养基的优化

在基础培养基中,添加不同的碳源、氮源、无机盐和诱导剂,其他成分不改变,在 25 °C、200 r/min 条件下摇瓶发酵。顺次考查这些因素对产酶活性的影响,以不添加项为对照,每项试验均有 3 次平行,依次确定相应组分。

### 1.5.1 Plackett-Burman 设计法筛选重要影响因素(Plackett *et al.*, 1946)

Plackett-Burman 试验设计中每个因子取两个水平,即用“+1”、“-1”分别代表其高、低水平进行编码,通过对数据进行分析筛选出对目的响应最为显著的几个效应因子。

### 1.5.2 Box-Behnken 试验设计

完成 Plackett-Burman 试验的结果分析后,按照 Box-Behnken 设计法每个因素取 3 个水平,以(-1, 0, 1)编码进行试验,借助 Design Expert 软件对实验数据进行回归拟合,并且对拟合方程进行显著性检验及方差分析,分析各因素的主效应和交互效应,并作出响应曲面,最后在在一定水平范围内求取最佳值,以获得该菌株的最佳培养条件(平芮巾等 2008)。

## 1.6 优化发酵条件后产酶验证试验

为了检验模型预测的准确性,在优化后的发酵条件下对菌株 CE-2-A 进行发酵试验。同时在原始发酵条件下进行试验,将优化后测得过氧化氢酶活力和原始发酵条件下测得过氧化氢酶活力进行对比,比较优化效果。

## 2 结果和分析

### 2.1 产酶培养基单因子试验

#### 2.1.1 碳源对过氧化氢酶活性的影响

在基础培养基中其他组分不变的前提下,分别选用麦芽糖、淀粉、葡萄糖、米糠、 $\beta$ -环糊精、花生粕、甘油和蔗糖作为碳源物质,加入量为 5.0 g/L,以无外加氮源物质的基础培养基为对照,发酵培养后分别测其过氧化氢酶活力(图 1)。结果显示,以麦芽糖为碳源,过氧化氢酶活力提高最为明显。

#### 2.1.2 氮源对过氧化氢酶活性的影响

在基础培养基中其他组分不变的前提下,分别选用硫酸铵、蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、尿素以及蛋白胨与牛肉膏混合物作为氮源,加入量为 5.0 g/L,设无外加氮源的基础培养基为对照,发酵培养后分别测其过氧化氢酶活力(图 2)。结果显示,细菌 CE-2-A 利用有机氮源的能力远强于无机氮源,以牛肉膏为氮源物质时产酶水平最佳,这可能是因为牛肉膏中除含有丰富的蛋白质、多肽和游离的氨基酸外,往往还含有少量的糖类、脂肪、无机盐、维生素及某些生长因子,因而有利于菌体生长和产酶。

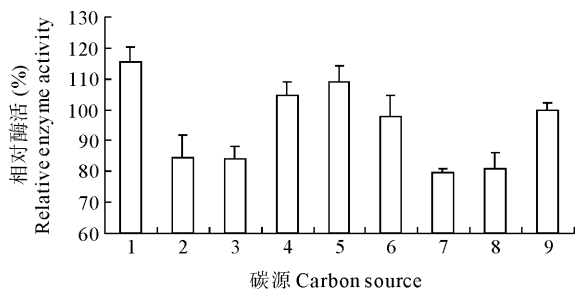
#### 2.1.3 金属离子对过氧化氢酶活性的影响

在优化碳源、氮源后的液体培养基中,分别加入浓度为 0.001mol/L 的 KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、FeSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>,设不添加离子为对照组,发酵培养后分别测其过氧化氢酶活力(图 3)。结果显示,向培养基中添加 CaCl<sub>2</sub>或 MgCl<sub>2</sub>对产酶具有明显的促进作用,这可能由于较高浓度的钙离子增强了膜流动性,从而使膜透性加强,便于胞内外物质运输(董先平等 2002);镁可以通过影响菌体内一些酶的活性影响发酵产酶能力(万 伟等 2008),也对增强膜的稳定性,防止细胞早衰有重要作用。

#### 2.1.4 诱导剂对过氧化氢酶活性的影响

在经过以上优化的培养基中,以 0.5 ml/L 的量添加不同的诱导剂,接种进行发酵培养,测定酶活,结果见

图4。如图4所示,  $H_2O_2$ 、Tween 80 和 Triton X-100 对产酶影响都不大,这可能是由于诱导物的存在能显著增加微生物胞外酶的产量(李 艳 1999),而菌株所产过氧化氢酶为胞内酶,因此诱导剂可能对产酶作用不明显。

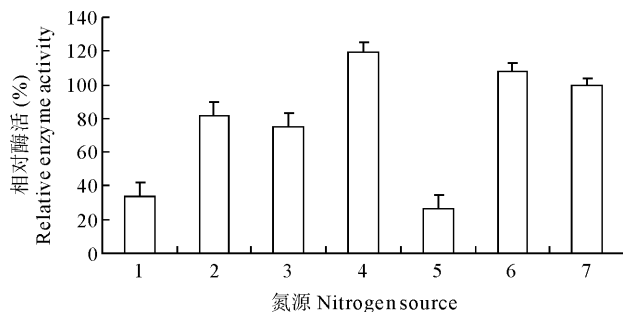


1. 麦芽糖; 2. 淀粉; 3. 葡萄糖; 4. 米糠; 5.  $\beta$ -环糊精;  
6. 花生粕; 7. 甘油; 8. 蔗糖; 9. 对照

1. Maltose; 2. Starch; 3. Glucose; 4. Rice bran; 5. Beta-cyclodextrin;  
6. Peanut meal; 7. Glycerol; 8. Sucrose; 9. Control

图1 碳源对 CE-2-A 菌株产过氧化氢酶的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on the catalase production of strain CE-2-A



1. 硫酸铵; 2. 蛋白胨; 3. 酵母粉; 4. 牛肉膏; 5. 尿素;  
6. 蛋白胨与牛肉膏混合物; 7. 对照

1. Ammonium sulfate; 2. Peptone; 3. Yeast extract;  
4. Beef extract; 5. Urea; 6. Mixed nitrogen; 7. Control

图2 氮源对 CE-2-A 菌株产过氧化氢酶的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on the catalase production of strain CE-2-A

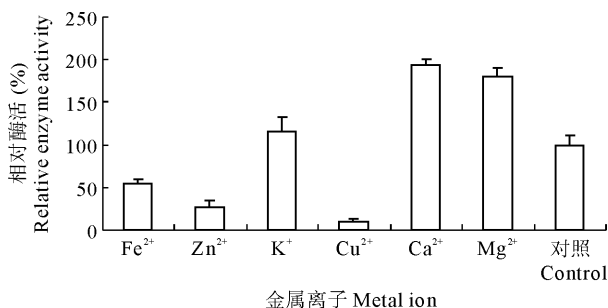


图3 金属离子对 CE-2-A 菌株产过氧化氢酶的影响

Fig. 3 Effect of metal ions on the catalase production of strain CE-2-A

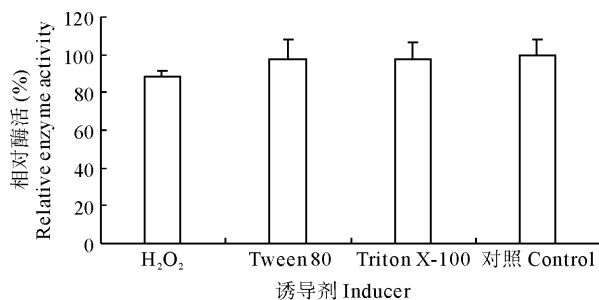


图4 诱导剂对 CE-2-A 菌株产过氧化氢酶的影响

Fig. 4 Effect of various inducers on the catalase production of strain CE-2-A

## 2.2 Plackett-Burman 设计试验

根据以上试验结果,试验中选用  $N=12$  的 Plackett-Burman 试验设计,为了增加准确性,设置 3 个空白作为误差分析项,将可能影响过氧化氢酶活力的氮源、碳源、氯化钙含量、氯化镁含量、发酵温度、接种量、装液量、起始 pH 作为 Plackett-Burman 试验的 8 个因素进行全面考察,每个因素取两个水平,高水平约取低水平的 1.5 倍,以发酵过氧化氢酶活力  $Y$  (U/ml)为响应值。运用 Design Expert 7.1 软件设计试验(表 1),进行两组平行试验,效应值取两次测量值的平均值。实验各因素、水平及结果分析见表 2。

由表 2 分析结果可知,此模型  $P$  值为 0.013 4,证明此模型显著,其决定系数( $R^2$ )为 0.983 6,校正系数( $R_{adj}^2$ )为 0.939 9,说明与过氧化氢酶活力相关的因素中,由此模型解释的已经超过 93.99%(平芮巾等 2008)。各因素中对过氧化氢酶活力有显著影响(置信度  $>95\%$ )作用的包括装液量、牛肉膏含量和起始 pH。由各因素效应还可看出,后续试验要提高过氧化氢酶活力,应该减少装液量,提高牛肉膏含量和起始 pH,其他可信度较小的因素对过氧化氢酶活力无明显影响,在下一步的条件优化中可不予考虑。

表 1 Plackett-Burman 试验设计与结果(N=12)  
Table 1 Results of Plackett-Burman experimental design (N=12)

序号 Run	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	酶活力 Y(U/ml) Enzyme activity	标准偏差 Std. Dev.
1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1 621.14	8.45
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1 354.26	3.14
3	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1 512.31	6.52
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1 582.19	7.21
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1 243.09	3.51
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1 555.24	1.40
7	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1 438.12	4.05
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1 794.65	2.42
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2 066.15	3.25
10	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1 373.38	6.19
11	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1 850.27	7.89
12	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1 987.34	2.72

表 2 Plackett-Burman 试验设计各因素、水平及方差分析(N=12)  
Table 2 Factors, levels and ANOVA of variables for Plackett-Burman experimental design(N=12)

代码 Code	变量因素 Variable	水平 Level		自由度 DF	平方和 SS	均方差 MS	显著性检验 Significance Test		效应 Effect
		低(-) Low	高(+) High				F 值 F value	Prob>F	
A	麦芽糖含量(g/L) Maltose content	4.00	6.00	1	7 332.94	7 332.94	1.77	0.275 2	24.72
B	温度(℃) Temperature	20.00	30.00	1	16 699.96	16 699.96	4.04	0.138 1	-37.30
D	起始 pH Original pH	7	9	1	47 469.37	47 469.37	11.48	0.042 8	62.9
F	牛肉膏含量(g/L) Beef extract content	2.40	3.60	1	86 190.75	86 190.75	20.84	0.019 7	84.75
G	接种量(%) Inoculum size	1.50	2.50	1	3 7381.54	37 381.54	9.04	0.057 4	-55.81
H	氯化钙含量(mol/L) Calcium chloride content	0.001	0.001 5	1	17 570.52	17 570.52	4.25	0.131 4	-38.27
J	氯化镁含量(mol/L) Magnesium chloride content	0.001	0.001 5	1	16 806.07	16 806.07	4.06	0.137 2	-37.42
L	装液量(ml) Medium volume	40.0	60.0	1	51 470	51 470	124.44	0.001 5	-207.11
	回归模型 Model			8	74 420	93 024.26	22.49	0.013 4	
	残差 Residual			3	12 409.19	4 136.4			
	总离差 Cor Total			11	75 660				
	$R^2=0.983 6$								
	$R^2_{adj}=0.939 9$								

### 2.3 Box-Behnken 试验结果

由 Plackett-Burman 试验结果可知,在本阶段中实际考察的变量为装液量、牛肉膏含量和起始 pH,将这 3 个因素作为 Box-Behnken 设计所要考察的变量并对其进行三水平(-1、0、+1)编码,因素水平及编码见表 3,试验方案见表 4,表 4 中的实验结果为 3 次试验的平均值。

表3 Box-Behnken 试验因素水平及编码

Table 3 Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

因素 Factor	编码 Code	水平 Level		
		+1	0	-1
装液量 Medium volume (ml)	A	30.0	40.0	50.0
牛肉膏含量 Beef extract content (g/L)	B	3.00	3.50	4.00
起始 pH Original pH	C	8.0	9.0	10.0

表4 响应面设计及试验结果

Table 4 Experimental design and results of RSM design

序号 Run	因素 Factor			酶活力(U/ml) Enzyme activity	标准偏差 Std. Dev.
	A	B	C		
1	-1	-1	0	1 372.63	4.55
2	1	-1	0	1 941.05	5.55
3	-1	1	0	1 858.16	2.71
4	1	1	0	2 203.68	1.65
5	-1	0	-1	1 562.63	2.15
6	1	0	-1	1 980.53	3.54
7	-1	0	1	1 701.05	1.52
8	1	0	1	2 130.00	3.21
9	0	-1	-1	1 719.47	3.54
10	0	1	-1	2 145.26	3.64
11	0	-1	1	1 877.63	2.58
12	0	1	1	2 252.89	1.95
13	0	0	0	2 456.32	3.33
14	0	0	0	2 485.79	3.74
15	0	0	0	2 471.32	3.65
16	0	0	0	2 470.00	2.25
17	0	0	0	2 474.21	2.69

表5 回归模型的方差分析及显著性检验

Table 5 ANOVA and significance test of quadratic polynomial model

方差来源 Variation source	自由度 DF	平方和 MS	均方差 MS	F 值 F value	P 值(显著水平) Prob>F
模型 Model	9	1.975×10 <sup>6</sup>	1.975×10 <sup>6</sup>	1 083.34	<0.000 1
A	1	3.875×10 <sup>5</sup>	3.875×10 <sup>5</sup>	1 913.66	<0.000 1
B	1	3.000×10 <sup>5</sup>	3.000×10 <sup>5</sup>	1 481.40	<0.000 1
C	1	38 320.19	38 320.19	189.22	<0.000 1
AB	1	12 421.10	12 421.10	61.33	<0.000 1
AC	1	30.53	30.53	0.15	0.709 4
BC	1	638.32	638.32	3.15	0.119 1
A <sup>2</sup>	1	6.425×10 <sup>5</sup>	6.425×10 <sup>5</sup>	3 185.94	<0.000 1
B <sup>2</sup>	1	2.349×10 <sup>5</sup>	2.349×10 <sup>5</sup>	1 159.88	<0.000 1
C <sup>2</sup>	1	2.355×10 <sup>5</sup>	2.355×10 <sup>5</sup>	1 163.10	<0.000 1
残差 Residual	7	1 417.61	202.52		
失拟项 Lack of fit	3	973.35	324.45	2.92	0.163 6
纯误差 Pure Error	4	444.26	111.06		
总离差 Cor Total	16	1.976×10 <sup>6</sup>			
决定系数(R <sup>2</sup> )				0.999 3	
校正系数(R <sub>adj</sub> <sup>2</sup> )				0.998 4	
信噪比(Adeq Precision)				100.519	
变异系数(C.V.)%				0.69	

通过对表 5 中试验数据进行多项式回归分析建立二次响应回归模型,拟合得到二次回归方程:

$$R=2\ 471.53+220.10\times A+193.65\times B+69.21\times C-55.72\times AB+2.76\times AC-12.63\times BC-391.45\times A^2-236.19\times B^2-236.52\times C^2$$

从该方程的方差分析可知(表 5),实验所用模型高度显著( $P<0.000\ 1$ ),失拟项不显著( $P=0.163\ 6$ ),预测值与真实值之间具有高度的相关性  $R^2=0.999\ 3$ ,模型的校正系数  $R^2_{adj}=0.998\ 4$ ,表明该模型可以解释过氧化氢酶活力响应值的变化,试验的变异系数  $C.V.=0.69\%$ ,较低,说明试验的可靠性较高。回归方程的一次项和平方项系数都较大,说明各因子对相应值的影响不是简单的直线关系,而交互项系数较小,说明试验中所选的 3 个因素间交互效应较小(Liu *et al.* 2003)。

根据回归方程,运用 Design Expert 7.1 软件作图,图 5、图 6 和图 7 为软件分析得到的响应曲面图和等高线图。等高线的形状可显示出交互效应的强弱,圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形则表示两因素交互作用显著(马 龙等 2006;Muralidhar *et al.* 2001)。

图 5 显示了当起始 pH 在中心水平时,装液量与牛肉膏含量对过氧化氢酶活性交互作用的等高线图及响应曲面图。在一定范围内,CE-2-A 发酵的酶活随着装液量的增加呈现升高的趋势,但是当装液量高于 45.0 ml 后,发酵产过氧化氢酶的酶活反而呈现降低的趋势。这可能是由于随装液量增加,发酵液内溶氧浓度迅速下降,溶氧浓度降低会影响菌体体内的一些代谢活动(骆健美等 2005)。

起始 pH 和装液量对过氧化氢酶活力的交互影响效应见图 6。当装液量小于 45.0 ml 时,起始 pH 增加使过氧化氢酶活力不断提高,但继续增大发酵液的起始 pH 值将对菌体的生长不利。装液量对酶活力的影响与图 5 结果一致。

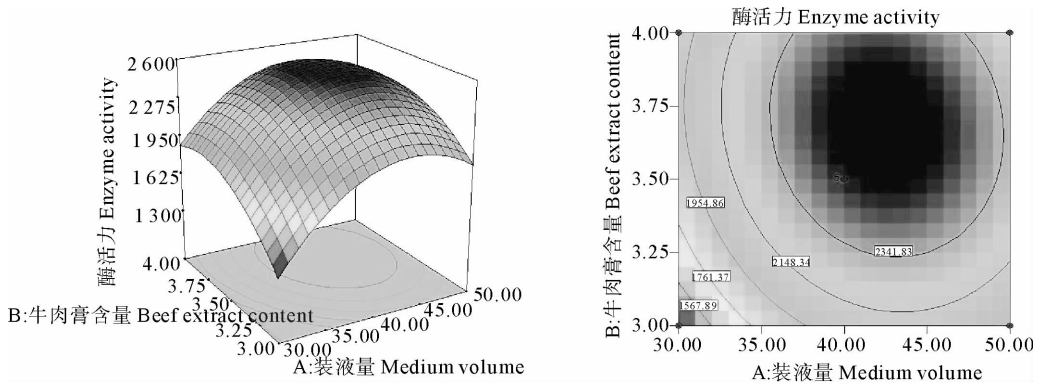


图 5 装液量与牛肉膏含量对菌株 CE-2-A 产过氧化氢酶活力的响应面及其等高线

Fig. 5 Response surface and contour plots for the effects of medium volume and beef extract content on catalase activity of CE-2-A

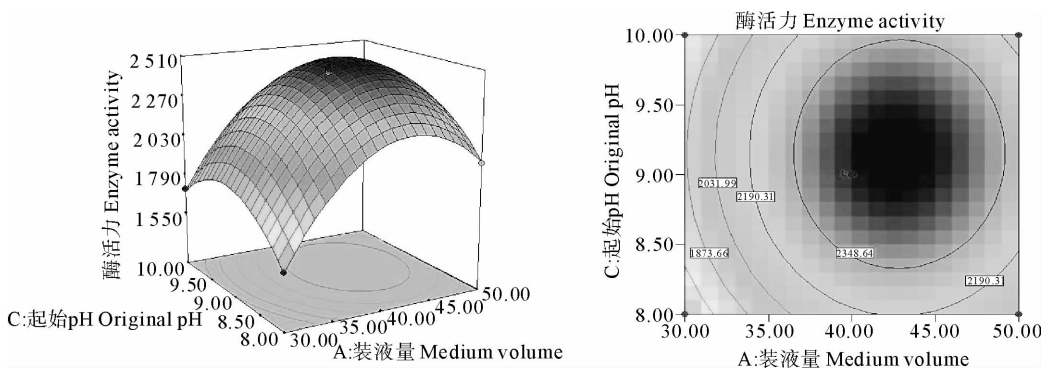


图 6 装液量与起始 pH 对菌株 CE-2-A 产过氧化氢酶活力的响应面及其等高线

Fig. 6 Response surface and contour plots for the effects of medium volume and original pH on catalase activity of CE-2-A

从图7可知,在选定的条件范围内,起始pH与牛肉膏含量对发酵产过氧化氢酶的影响与上述结论基本一致,即随装液量和牛肉膏含量的升高,产过氧化氢的活力先呈现出逐渐增大的趋势而后又逐渐降低。

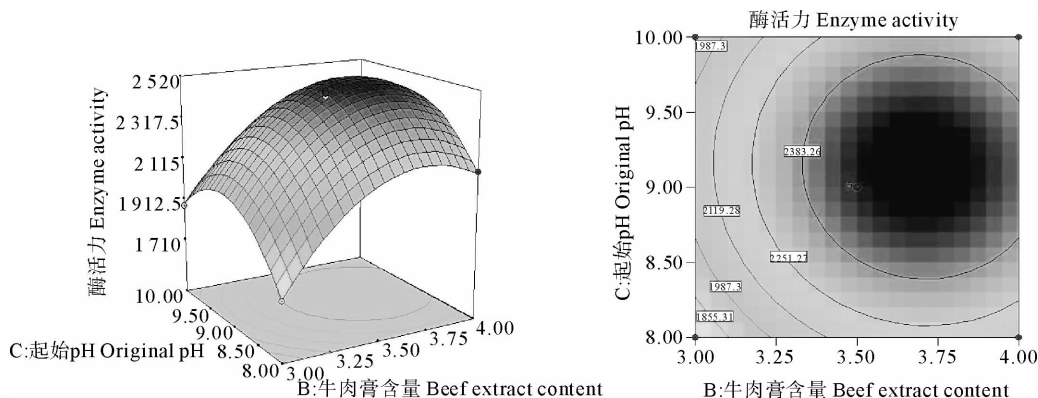


图7 牛肉膏含量与起始pH对菌株CE-2-A产过氧化氢酶活力的响应面及其等高线

Fig. 7 Response surface and contour plots for the effects of beef extract content and original pH on catalase activity of CE-2-A

从响应曲面图和回归方程可以知道,发酵产酶模型存在最大值。对响应面模型求导,计算出响应值( $R$ )取最大值时各因子水平为: $A=0.255$ , $B=0.376$ , $C=0.134$ ,即:装液量、牛肉膏含量和起始pH分别为:42.6 ml、3.69 g/L、9.1。

## 2.4 优化发酵条件后产酶验证试验

为了检验模型预测的准确性,在优化后的发酵条件下,即麦芽糖含量、温度、装液量、牛肉膏含量、接种量、氯化钙含量、氯化镁含量和起始pH分别为:4.0 g/L、20 °C、42.6 ml、3.69 g/L、1.5%、0.001 mol/L、0.001 mol/L和9.1,进行5组发酵试验,所得过氧化氢酶平均活力为2532.5 U/ml,与模型预测值2540.9 U/ml一致,说明模型能够很好地预测实际发酵情况。原始发酵条件下进行试验所测得的过氧化氢酶活力1849.7 U/ml,优化后的产酶活力与优化前相比提高了36.9%,优化效果较好。

## 3 结论

本实验在对培养基成分和培养条件进行单因素试验的基础上,借助Design Expert 7.1统计软件,采用Plackett-Burman设计进行多因素快速筛选,得到了3个显著因素为装液量、牛肉膏含量和起始pH,利用响应面设计(RSM)对显著性因素的最佳水平及其交互作用进行了进一步探讨,通过试验数据分析实现条件优化,得最佳响应值,进而确定最优操作条件,与实际发酵情况较吻合。

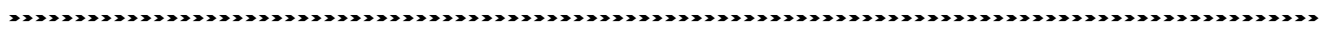
经上述试验统计方法进行优化的产过氧化氢酶发酵的最佳条件:麦芽糖含量、温度、装液量、牛肉膏含量、接种量、氯化钙含量、氯化镁含量和起始pH分别为:4.0 g/L、20 °C、42.6 ml、3.69 g/L、1.5%、0.001 mol/L、0.001 mol/L和9.1。在此条件下,优化后酶活力由1849.7 U/ml提高到2532.5 U/ml,与模型预测值基本一致。

## 参 考 文 献

- 马 龙,王永斌. 2006. 利用响应面法对柳小皮伞液体发酵培养基的优化. 中国农学通报, 22(7): 112~117
- 万 伟,王建龙. 2008.  $Mg^{2+}$ 浓度对混合细菌发酵产氢的影响. 清华大学学报(自然科学版), 48(12): 2099~2101
- 平芮巾,孙 溢,刘均忠,王跃军,郝建华,张胜军. 2008. 响应面法优化海洋细菌MP-2酯酶发酵条件. 应用与环境生物学报, 14(4): 548~552
- 刘建忠,熊亚红,翁丽萍,计亮年. 2002. 生物过程的优化. 中山大学学报(自然科学版), S1: 132~137
- 肖开芳,李 薇,郑 珩,吴梧桐. 2008. 谷胱甘肽生物合成途径及发酵条件研究. 中国生化药物杂志, 29(2): 144~146



- 李 艳. 1999. 发酵工业概论. 北京:中国轻工业出版社,351~361
- 洪海军,许赣荣. 2004. 产过氧化氢酶菌株培养条件的优化. 无锡轻工大学学报,23(6): 85~89
- 骆健美,金志华,岑沛霖. 2005. 培养条件对褐黄孢链霉菌发酵合成纳他霉素的影响. 浙江大学学报(工学版), 39(2):296~300
- 曹翔宇,华兆哲,燕国梁,堵国成,陈 坚. 2006. 过氧化氢酶发酵生产条件优化及在染整清洁生产中的应用研究. 工业微生物,36(4): 7~12
- 董先平,智 刚,徐天乐. 2002. 钙调素参与离子通道和受体功能的调控. 自然科学进展,12(3): 232~239
- Liu, C. B., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z. Y., and Chen, S. L. 2003. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey. *Biotechnology Letters*, 25(11): 877~882
- Montgomery, D. C. 2002. *Design and analysis of experiments* (5th Ed.). New York: JOHN WILEY & SONS, INC, 590~630
- Muralidhar, R. V., Chirumamilla, R. R., Ramachandran, V. N., Marchant, R., and Nigam, P. 2001. Racemic resolution of RS-baclofen using lipase from *Candida cylindracea*. *Mededelingen*, 66(3a): 227~232
- Plackett, R. L., and Burman, J. P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4): 305~325
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C., and Rabinovitch, P. S. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308(5 730): 1 909~1 911
- Skowronek, M., and Fiedurek, J. 2003. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *J. Appl. Microbiol.* 95(4): 686~692
- Wang, W., Sun, M., and Liu, W. S. 2008. Isolation and characterization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-decomposing bacteria from Antarctic seawater. *Annals of Microbiology*, 58 (1):29~33



## 《海洋水产研究》期刊于 2009 年 1 月起更名为《渔业科学进展》

### 各有关单位、各位读者:

经国家新闻出版署 2008 年 11 月 13 日(新出报刊[2008]1324 号文)和山东省新闻出版局 2008 年 12 月 11 日(鲁新出批字[2008]325 号文)批准,从 2009 年 1 月起,《海洋水产研究》期刊更名为《渔业科学进展》(英文名:Progress in Fishery Sciences),ISSN 1000-7075,国内统一刊号:CN 37-1466/S,国内邮发代号:24-153,国外发行代号:4578Q。刊期仍为双月刊。

更名后,本刊栏目包括研究论文、研究综述和研究简报等,内容涵盖各类水域渔业科学研究最新成果,涉及与渔业科技有关的各学科门类的研究进展。本刊主要报道渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术、水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。希望各位领导、各位专家,一如既往地关心和支持我们的工作,踊跃为《渔业科学进展》刊物投稿。

祝愿各位领导、各位专家工作顺利、万事如意!

《渔业科学进展》编辑部

2010 年 12 月 10 日