

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171009002

http://www.yykxjz.cn/

朱祥杰, 王震, 苑志欣, 郝建华, 郑兰红. 海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的发酵条件优化. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 155-163

Zhu XJ, Wang Z, Yuan ZX, Hao JH, Zheng LH. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus* sp. N11-8 on the production of protease PBN11-8. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 155-163

## 海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的发酵条件优化\*

朱祥杰<sup>1,2</sup> 王震<sup>1,2</sup> 苑志欣<sup>1</sup> 郝建华<sup>1</sup> 郑兰红<sup>1①</sup>

(1. 农业农村部极地渔业开发重点实验室 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 本研究采用响应面法(RSM)对南极海洋芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)N11-8 液体发酵产蛋白酶 PBN11-8 的发酵条件进行快速优化。通过单因素实验初步确定南极海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的最佳碳源和氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨;并通过 Plackett-Burman(PB)设计对影响其产酶相关因素进行评估,筛选出具有显著效应的 3 个因素:温度、氮源和碳源;以最陡爬坡实验逼近至上述因子最大响应区域,进而采用 RSM 法对其最佳水平范围进行研究,确定最优发酵条件为:可溶性淀粉 3 g/L,蛋白胨 13.1 g/L,酵母浸粉 2.9 g/L, NaCl 5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2 mmol/L, 初始 pH 值为 7.0, 温度为 34.0℃, 转速为 200 r/min, 装液量为 50 ml/250 ml, 接种量为 4%, 培养时间为 60 h。最终优化后的酶活达到 90.5 U/ml, 比初始酶活提高了 23.6%。

**关键词** 芽孢杆菌;蛋白酶;Plackett-Burman 设计;响应面法

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0155-09

蛋白酶是水解蛋白质肽链的一类酶的总称,在动植物、微生物中均有分布。产蛋白酶的微生物种类主要包括细菌、霉菌和放线菌等(史翠娟等, 2015)。蛋白酶在医学领域主要用于治疗心血管病等疾病,同时也在治疗脓毒症、消化系统疾病、炎症、囊性纤维化、视网膜疾病和牛皮癣等疾病方面也有所应用(Gomis-Ruth *et al*, 2003)。目前,在食品、洗涤剂、化妆品及抗肿瘤药物等和疾病的机理研究等方面也有诸多应用(荆谷等, 2002)。迄今为止,有关抗肿瘤活性蛋白酶只有少量报道(Weildle *et al*, 2014; 纪明开等, 2017)。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)N11-8 由南极表层海水中

分离获得(Zheng *et al*, 2016),其所产蛋白酶 PBN11-8 具有较好的应用潜力(郑兰红等, 2015)。为获得更高的产酶量,对芽孢杆菌 N11-8 的培养基与培养条件进行优化。优化实验采用正交实验或响应面实验,其中,正交实验是一种高效处理多因素优化问题的方法,采取部分实验代替全面实验(何磊等, 2011; 李洪康等, 2016)。响应面法是采用拟合因素响应值之间的函数关系,精确分析因子与响应值关系以优化工艺参数的方法,适用性强(刘志祥等, 2009)。响应面法明显优于正交实验,具有实验次数少、周期短、精度高等特点,可快速有效确定多因子系统最佳条件(刘志祥等, 2009; 王茜等, 2015)。本研究通过单因素法进行前期

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014B01YQ01)和山东省科技发展计划项目(2014GSF121016)共同资助[This work was supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2014B01YQ01), and the Science and Technology Development Plans of Shandong Province (2014GSF121016)]. 朱祥杰, E-mail: zhuxiangjie1204@163.com

① 通讯作者: 郑兰红, 副研究员, E-mail: zhenglh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-09, 收修改稿日期: 2017-11-14

优化,再运用响应面法建立模型,分析处理验证,确定培养基与培养条件,从而提高蛋白酶活力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与培养** 芽孢杆菌 N11-8 由南极表层海水分离获得(Zheng *et al.*, 2016)。ND 培养基(牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, pH 7); 固体 ND 培养基(牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 2%, pH 7)。

**1.1.2 实验试剂** 葡萄糖、Folin-酚、干酪素等(国药集团化学试剂有限公司), 蛋白胨(北京双旋), 可溶性淀粉(汕头市西陇化工), 酵母浸粉(英国 Oxoid 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 蛋白酶活力测定** 采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力,具体方法参考国家标准 GB/T 23527-2009。每毫升酶液在 30℃、pH 8 条件下水解酪蛋白,每分钟释放 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为 1 个酶活单位(杨娟等, 2017)。

**1.2.2 单因素实验** 在发酵培养基的基础上,其他条件不变,依次测定不同碳源、不同氮源、碳源浓度、氮源浓度、磷酸盐浓度、NaCl 浓度、不同金属离子、金属离子浓度、接种量、装液量、转速、温度和初始 pH 对菌株产酶的酶活影响(马子宾等, 2015; 张丹等, 2011; 张增祥等, 2010)。

**1.2.3 响应面优化实验** Plackett-Burman(PB)实验参照王东等(2016)和梁昌聪等(2014),在单因素实验结果基础上,选出 7 个对产酶量有较大影响的因子(可溶性淀粉、蛋白胨、酵母浸粉、NaCl、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>),设计 PB 实验(表 1、表 2),进一步筛选出 3 个显著影响因子。最陡爬坡实验根据 PB 实验的结果,以蛋白胨、酵母浸粉、温度为主要影响因素设计本实验,培养基中其他因素分别为可溶性淀粉(3 g/L)、NaCl(5 g/L)、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(2 mmol/L)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1 g/L)、装液量(50 ml),转速(200 r/min),培养时间(60 h)(表 4)。中心组合实验分别以蛋白胨添加量、酵母浸粉添加量和温度为自变量,以蛋白酶的酶活为指标进行液体发酵条件优化(表 5、表 6)。

### 1.3 数据统计与分析

采用 Design-Expert 软件(Version 7.0 Stat-Ease Inc., USA)对响应面实验得到的数据进行线性回归和方差分析。模型及因素的显著性均通过 *F* 值考察

(*P*<0.05),所有实验重复 3 次,结果以蛋白酶活力表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

**2.1.1 不同碳、氮源对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响** 从图 1a 可以发现,当可溶性淀粉为碳源时,产酶量最高。因此,培养基最适碳源为可溶性淀粉。酶的合成往往受到分解代谢阻遏的控制。葡萄糖等易代谢的碳水化合物对细菌的蛋白酶产量都有阻遏作用,在实践中往往采用代谢缓慢的碳源,或者降低糖浓度并采用连续流加法(郭军等, 2003)。图 1b 显示,在实验选取的 7 种氮源中,蛋白胨具有最强的竞争力(产酶量最高)。

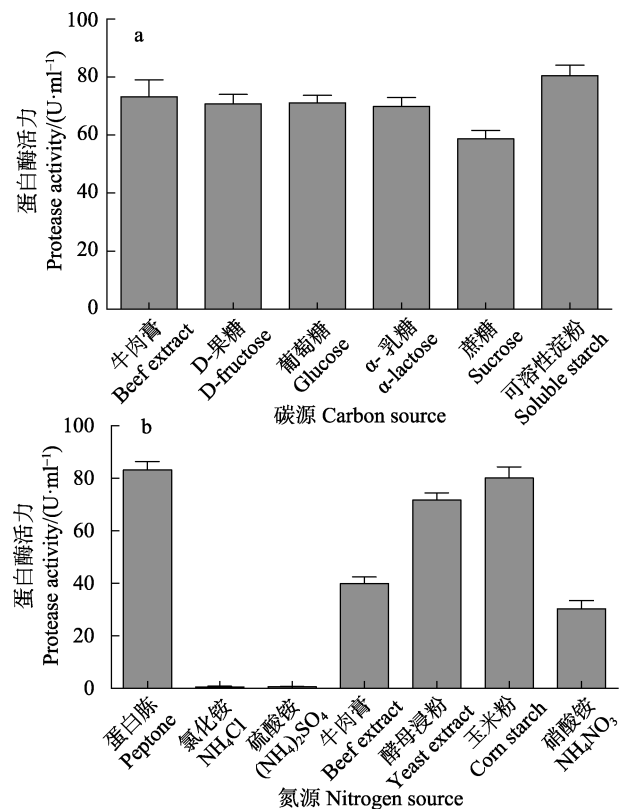


图 1 不同碳、氮源对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响  
Fig.1 Effects of different carbon and nitrogen source on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

**2.1.2 不同碳、氮源浓度对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响** 图 2a 显示,随着可溶性淀粉浓度的不断增加,产酶量逐渐上升;可溶性淀粉浓度达到 3 g/L 时,产酶量达到最高。因此,可溶性淀粉浓度宜取 3 g/L。从图 2b 可以发现,随着蛋白胨浓度的增加,产酶量不断增加,在蛋白胨浓度达到 15 g/L 时,产酶量达到最高。因此,蛋白胨浓度宜取 15 g/L。从

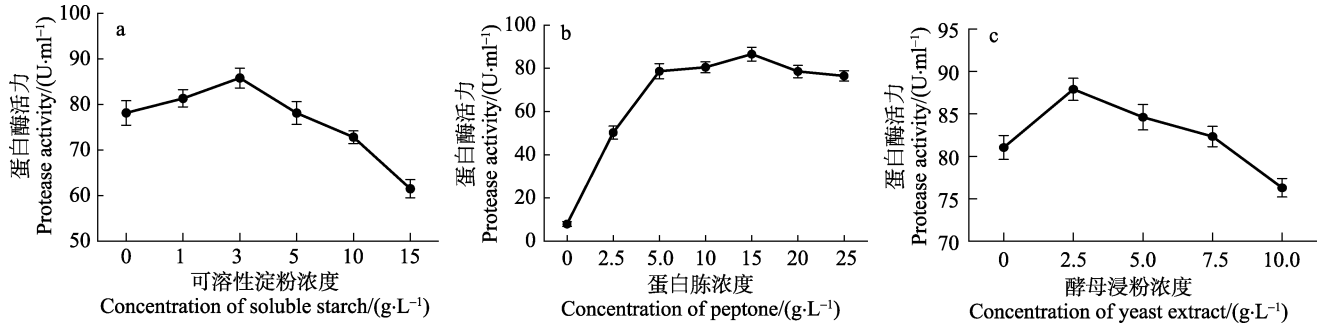


图 2 不同浓度可溶性淀粉、蛋白胨或酵母浸粉对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响  
Fig.2 Effects of different concentrations of soluble starch, peptone and yeast extract on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

图 2c 可知, 在酵母浸粉浓度达到 2.5 g/L 时, 产酶量达到最高。因此, 酵母浸粉浓度宜取 2.5 g/L。

**2.1.3 不同盐浓度对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响**

图 3a 显示, 磷酸盐浓度在 1 g/L 时, 产酶量达到最高。因此, 磷酸盐浓度宜取 1 g/L。由图 3b 可以看出, NaCl 浓度在 5 g/L 时, 产酶量达到最高。因此, NaCl 浓度宜取 5 g/L。

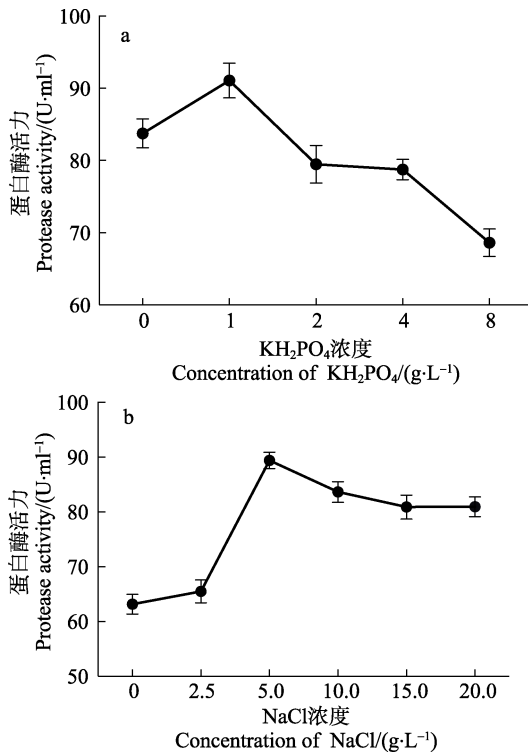


图 3 不同盐浓度对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响  
Fig.3 Effects of different concentration of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> or NaCl on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

**2.1.4 金属离子对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响**

图 4a 显示, 当加入 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 时, 产酶量最高, 即 Fe<sup>3+</sup>对酶活促进作用最强。Fe<sup>2+</sup>对酶活促进作用略低于 Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>对酶活也有一定的促

进作用, 而 Mg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对酶活都有不同程度的抑制作用, 尤其 Zn<sup>2+</sup>几乎可使蛋白酶完全失活。随着样品中 Fe<sup>3+</sup>浓度的增加, 产酶量不断增加, 当达到 2 mmol/L 时, 产酶量最高(图 4b), 故培养基中宜添加终浓度为 2 mmol/L 的 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O。

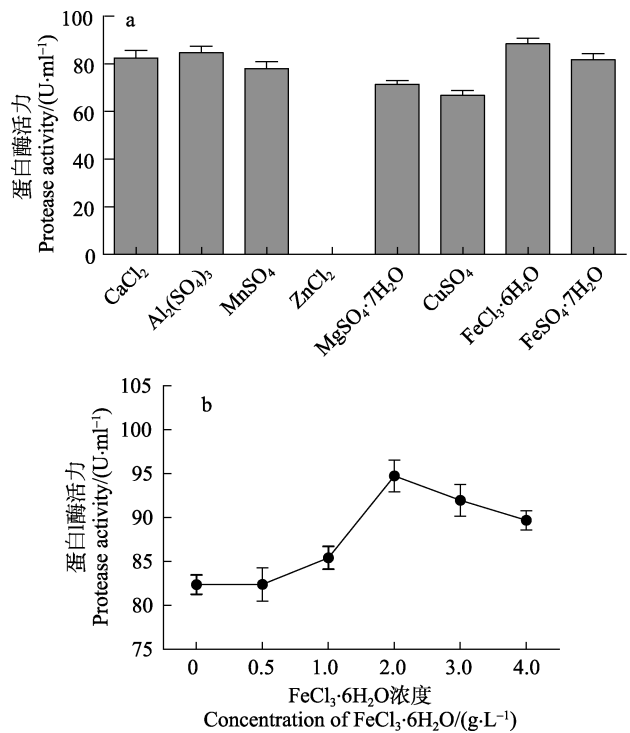


图 4 金属离子对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响  
Fig.4 Effects of metal ion on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

**2.1.5 接种量与装液量对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响**

图 5a 显示, 接种量在 4% 时, 产酶量达到最高。因此, 接种量宜为 4%。从图 5b 可以看出, 装液量在 50 ml 时, 产酶量达最高。因此, 装液量宜为 50 ml。在较高的装液量水平时, 产酶量减少, 可能主要是由于溶氧较低、供氧不足造成的(陈世建等, 2014)。

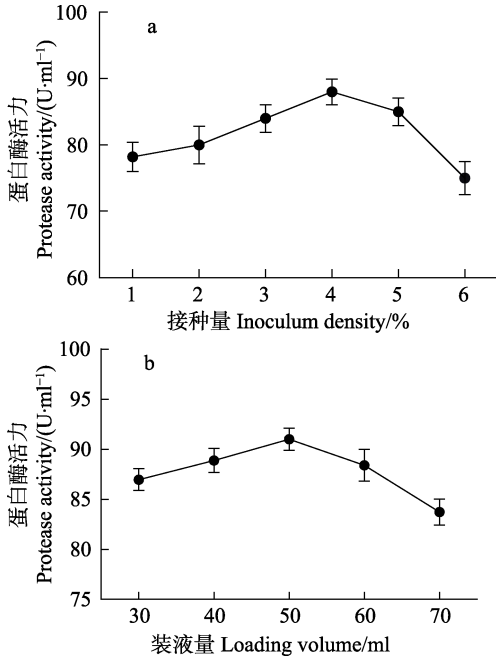


图5 接种量与装液量对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.5 Effects of initial inoculum and culture volume on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

2.1.6 转速与温度对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响

图 6a 显示, 转速在 200 r/min 时, 产酶量达到最高。因此, 转速宜为 200 r/min。图 6b 显示, 温度在 35℃ 时, 产酶量达到最高。因此, 温度宜为 35℃。

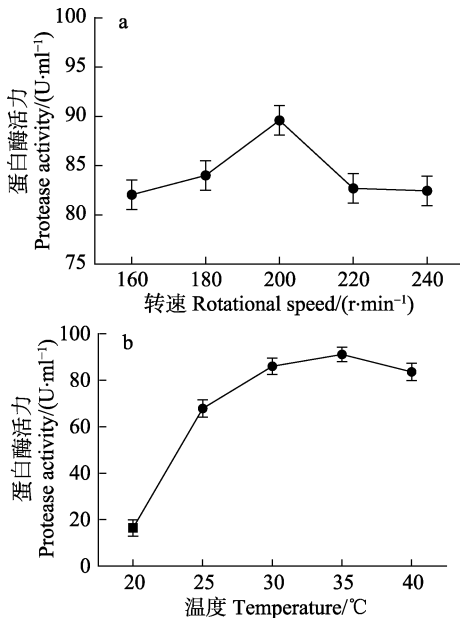


图6 不同转速与温度对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.6 Effects of rotational speed and temperature on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

2.1.7 初始 pH 与时间对芽孢杆菌 N11-8 液体发酵的影响 图 7a 显示, 初始 pH=7 时, 产酶量达到最高。因此, 初始 pH 宜为 7。然而, 随着时间增加, 产酶量不断增加, 并在 60 h 后趋于稳定, 产酶量达到最高。因此, 时间宜为 60 h (图 7b)。

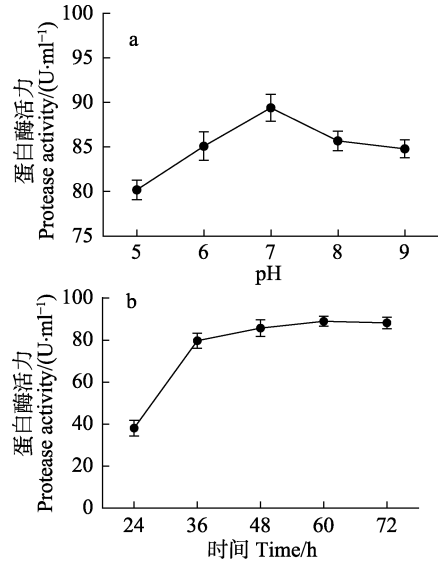


图7 初始 pH 与时间对芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶的影响

Fig.7 Effects of initial pH and time on the production of protease by *Bacillus* sp. N11-8

2.2 响应面法优化发酵培养基及发酵条件

2.2.1 PB 实验主要因子筛选 如表 1 所示, 从单因素实验中选择 7 个因素: 可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度、酵母浸粉浓度、NaCl 浓度、FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 浓度、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度、温度, 选择高低 2 个水平, 设计实验, 通过 PB 实验为响应面优化条件筛选出主要影响因素。12 组实验的实验结果如表 2 所示。由表 3 可知, 发酵条件的显著影响因素依次为蛋白胨浓度、温度和酵母浸粉浓度。

表 1 Plackett-Burman 实验因子水平

Tab.1 The level of factors in Plackett-Burman assay

代码 Code	因子 Factor	低水平(-1) Low level	高水平(1) High level
A	可溶性淀粉 Soluble starch (g/L)	1.0	5.0
B	蛋白胨 Peptone (g/L)	10.0	20.0
C	酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	1.0	5.0
D	氯化钠 NaCl (g/L)	2.0	10.0
E	六水合三氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (mmol/L)	1.0	3.0
F	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0.5	2.0
G	温度 Temperature (°C)	30.0	40.0

表 2 Plackett-Burman 实验筛选主要影响因素  
Tab.2 Screening of main influence factors in Plackett-Burman

编号 Number	可溶性淀粉 Soluble starch	蛋白胨 Peptone	酵母浸粉 Yeast extract	氯化钠 NaCl	六水合三氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	温度 Temperature	酶活 Enzyme activity(U/ml)
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	78.1
2	1	-1	1	-1	1	1	-1	86.8
3	-1	1	-1	-1	1	1	1	79.8
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	80.2
5	-1	-1	-1	1	1	-1	1	78.7
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	85.4
7	-1	1	1	1	-1	1	1	82.3
8	1	-1	1	1	1	-1	1	86.8
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	78.6
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	81.8
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	88.8
12	1	1	-1	1	1	1	-1	80.9

表 3 Plackett-Burman 实验统计分析

Tab.3 Statistical analysis of the Plackett-Burman assay

代码 Code	因子 Factor	贡献值 Contribution value	F	P	显著性 Significance
A	可溶性淀粉 Soluble starch	1.26	1.23	0.330	
B	蛋白胨 Peptone	20.01	19.57	0.012	*
C	酵母浸粉 Yeast extract	17.44	17.06	0.015	*
D	氯化钠 NaCl	8.46	8.27	0.045	*
E	六水合三氯化铁 FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.82	2.75	0.172	
F	磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.47	0.46	0.537	
G	温度 Temperature	18.50	18.09	0.013	*

\*: 差异显著(P<0.05)

\*: Significant differences (P<0.05)

**2.2.2 最陡爬坡实验** 根据 PB 实验统计分析结果, 以蛋白胨、酵母浸粉、温度为主要影响因素设计本实验, 具体设计方法及实验结果如表 4 所示。显然, 第 4 组实验的单位酶活最高, 这说明产酶最优点在第 4 组附近。

**2.2.3 中心组实验确定显著因素最优水平** 以最陡爬坡实验的最优组第 4 组为中心, 采用二次回归旋转中心组设计, 进一步确定蛋白胨、酵母浸粉、温度对菌株产酶的影响。具体设计和实验结果见表 5 和表 6。

表 4 最陡爬坡路径设计方法及实验结果

Tab.4 Experimental design and results of steepest ascent and corresponding results

编号 Number	蛋白胨 Peptone (g/L)	酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	温度 Temperature (°C)	酶活 Enzyme activity (U/ml)
1	7.5	1.0	20.0	2.0
2	10.0	1.5	25.0	3.6
3	12.5	2.0	30.0	73.6
4	15.0	2.5	35.0	86.2
5	17.5	3.0	40.0	74.5
6	20.0	3.5	45.0	72.4

表 5 中心组因素与水平

Tab.5 Factors and coded values of central composite test design

因素 Factor	水平 Level ( $\alpha=1.7$ )				
	-1.7	-1	0	1	1.7
A 蛋白胨 Peptone (g/L)	6.5	10.0	15.0	20.0	23.5
B 酵母浸粉 Yeast extract (g/L)	0.9	1.5	2.5	3.5	4.2
C 温度 Temperature (°C)	26.5	30.0	35.0	40.0	43.5

用 Design-Expert V 8.0.6 对实验数据进行多项式回归分析,  $P<0.0001$  表明该模型是显著的, 同时, 失拟项  $P=0.0970>0.05$  表示该模型失拟不显著, 因此, 该模型是合适的。另外, 此模型  $R^2=0.9714$ , 表明该

表 6 中心组合实验设计及结果  
Tab.6 Experimental design and the results of central composite test

编号 Number	蛋白胨 Peptone	酵母浸粉 Yeast extract	温度 Temperature	酶活 Enzyme activity (U/ml)	编号 Number	蛋白胨 Peptone	酵母浸粉 Yeast extract	温度 Temperature	酶活 Enzyme activity (U/ml)
1	0	1.68	0	78.2	11	1.68	0	0	62.6
2	0	0	0	91.7	12	-1	-1	1	60.6
3	1	-1	1	70.2	13	0	0	1.68	59.8
4	-1	1	1	76.1	14	-1.68	0	0	76.5
5	1	1	1	62.1	15	-1	1	-1	80.6
6	1	-1	-1	72.5	16	0	0	-1.68	72.1
7	0	0	0	91.9	17	0	0	0	89.1
8	0	0	0	88.3	18	0	0	0	88.2
9	1	1	-1	65.4	19	-1	-1	-1	70.2
10	0	0	0	88.5	20	0	-1.68	0	65.6

表 7 响应面模型方差分析  
Tab.7 Variance analysis of the response surface model

变异来源 Sources of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean squares	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significance
模型 Model	2269.5	9	252.17	37.71	< 0.0001	***
A-蛋白胨 Peptone	21.16	1	121.16	18.12	0.0017	**
B-酵母浸粉 Yeast extract	74.47	1	74.47	11.14	0.0075	*
C-温度 Temperature	119.43	1	119.43	17.86	0.0018	**
AB	211.15	1	211.15	31.58	0.0002	**
AC	9.03	1	9.03	1.35	0.2722	
BC	2.10	1	2.10	0.31	0.5874	
A <sup>2</sup>	648.90	1	648.90	97.04	< 0.0001	***
B <sup>2</sup>	498.15	1	498.15	74.50	< 0.0001	***
C <sup>2</sup>	918.41	1	918.41	137.35	< 0.0001	***
残差值 Residual	66.87	10	6.69			
失拟项 Loss of quasi item	52.06	5	10.41	3.52	0.0970	Not significant
纯误差 Pure error	14.81	5	2.96			
总变异 Total variation	2336.38	19				

注:  $R^2=97.14\%$ ,  $Adj.R^2=94.56\%$ 。  $P<0.05$  表明模型中各项都是显著的。\*: 差异显著( $P<0.05$ ), \*\*: 差异高度显著( $P<0.01$ ), \*\*\*: 差异极显著( $P<0.001$ )

Note:  $R^2=97.14\%$ ,  $Adj.R^2=94.56\%$ .  $P<0.05$  showed all factors in the model are significant. \*: Significant differences ( $P<0.05$ ), \*\*: Highly significant differences ( $P<0.01$ ), \*\*\*: Extremely significant differences ( $P<0.001$ )

模型能较好地解释菌株产酶量的变化。以单位酶活(Y)为因变量, 蛋白胨(A)、酵母浸粉(B)和温度(C)为自变量, 建立回归方程式如下:

$$\text{酶活 } Y = 89.56 - 2.98A + 2.34B - 2.96C - 5.14AB + 1.06AC + 0.51BC - 6.71A^2 - 5.88B^2 - 7.98C^2$$

根据上面的方程绘制响应面分析图、等高线图(图 8), 直接反映了各因素对酶活的影响。

用 Design-Expert V8.0.6 计算, 对回归方程求一阶偏导数, 得出模型极值点。即当蛋白胨浓度为 13.1 g/L、酵母浸粉浓度为 2.9 g/L、温度为 34℃时,

酶活力最大, 理论最大值为 90.8 U/ml。

**2.2.4 验证实验** 以上述响应面分析得到的最佳培养基成分与培养条件下, 进行 3 次实验, 实际测定平均酶活为 90.5 U/ml, 和理论值 90.8 U/ml 基本一致, 表明方程拟合度很好, 验证了模型的正确性。

### 3 结论

本研究通过单因素法和响应面法对来自南极表层海水的一株海洋芽孢杆菌 N11-8 产蛋白酶 PBN11-8



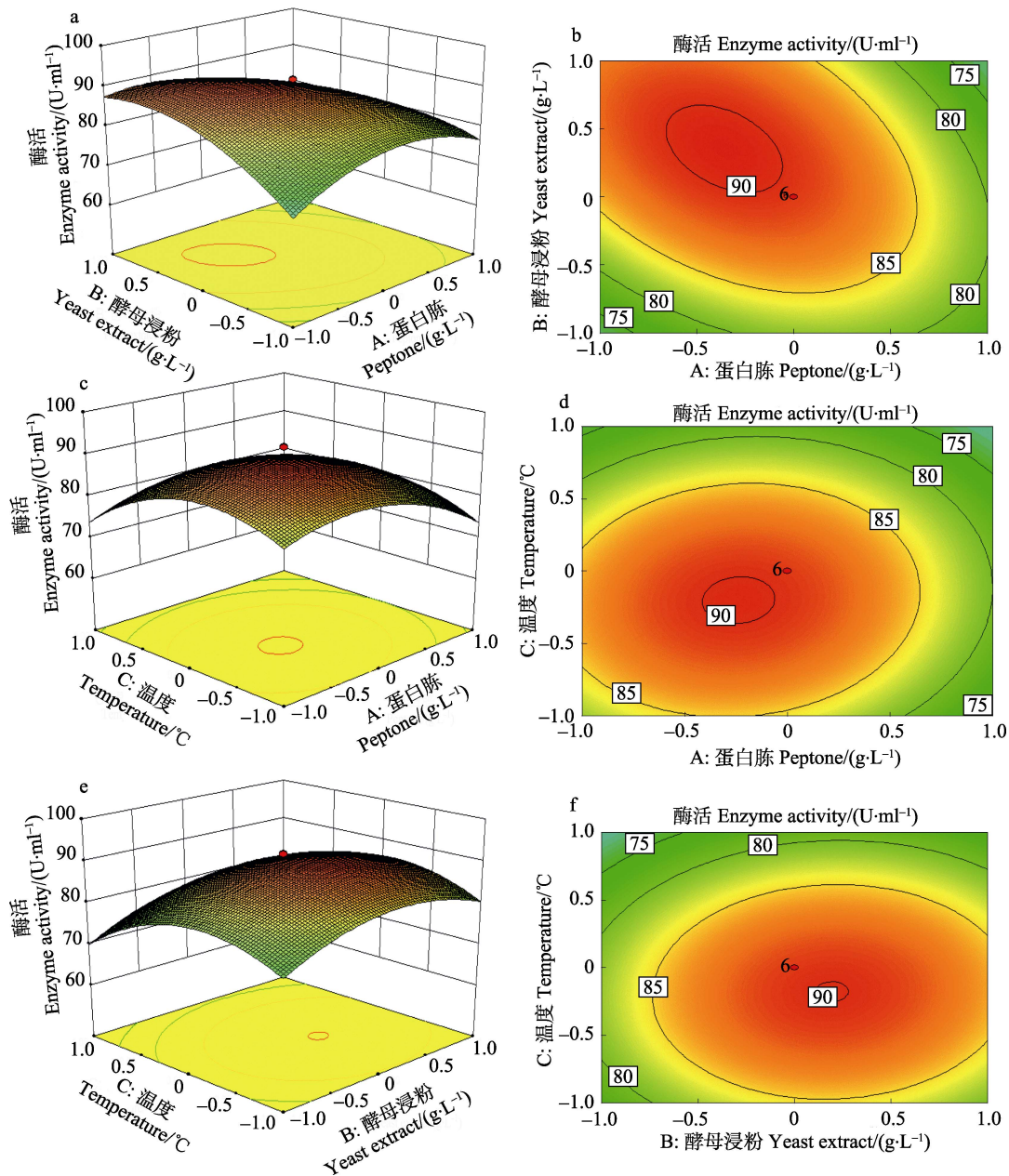


图 8 不同因素对酶活响应值的影响

Fig.8 The influence of three factors on the response value of enzyme activity

的培养基成分和培养条件进行了优化, 利用实验设计软件 Design-Expert 建立相应数学模型, 经检验证明该模型合理可靠, 能够较好地预测并用于优化该菌产蛋白酶发酵条件。对影响产酶量的关键因素及其相互作用进行探讨后, 最终确定了以可溶性淀粉(3 g/L)为碳源, 蛋白胨(13.1 g/L)和酵母浸粉(2.9 g/L)为复合氮源,  $\text{Fe}^{3+}$ (2 mmol/L)为金属离子, 初始 pH 值为 7.0, 用 NaCl(5 g/L)调节盐度, 250 ml 三角瓶装液 50 ml, 接种量为 4%, 34°C、200 r/min 发酵培养 60 h, 最终优化后的酶活达到 90.5 U/ml, 比初始酶活 73.2 U/ml 提高了 23.6%。

## 参 考 文 献

- Brown GT, Murray GI. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *Journal of Pathology*, 2015, 237(3): 273–281
- Chen SJ, Wang W, Sun M. Identification of a marine bacterium producing high-level catalase and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 103–109 [陈世建, 王伟, 孙溢. 一株海洋过氧化氢酶高产菌的鉴定及产酶条件优化. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 103–109]
- Gomis-Rüth FX. Structural aspects of the metzincin clan of

- metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, 2003, 24(2): 157–202
- Guo J, Yang YP, Renqinkaorile. Ascertaining the medium ingredients for a fibrinolytic enzyme secreting *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2003, 24(1): 51–55 [郭军, 杨雨平, 仁庆考日乐. 枯草杆菌溶血纤维蛋白酶发酵培养基配方的确定. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(1): 51–55]
- He L, Liu JZ, Qin SL, *et al.* Identification of an astaxanthin-producing marine yeast strain YS-185 and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 93–101 [何磊, 刘均忠, 秦胜利, 等. 产虾青素海洋酵母菌 YS-185 的鉴定及发酵条件优化. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 93–101]
- Ji KM, Chen LH, Cheng B, *et al.* The inhibition effects and mechanism of recombinant snake venom metalloproteinase inhibitor on tumor angiogenesis. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(3): 394–400 [纪明开, 陈丽红, 程波, 等. 蛇毒金属蛋白酶抑制剂重组蛋白抗肿瘤血管生成作用及其机制. 中国药理学通报, 2017, 33(3): 394–400]
- Jing G, Feng J, Kong J, *et al.* Research progress on metalloproteinases from microorganism. *Progress in Biotechnology*, 2002, 22(1): 61–63, 56 [荆谷, 冯静, 孔健, 等. 微生物金属蛋白酶的研究进展. 生物工程进展, 2002, 22(1): 61–63, 56]
- Li HK, Li YR, Li Y, *et al.* Optimization of fermentation conditions for the production of neutral protease by *Bacillus subtilis*. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(5): 102–107 [李洪康, 李由然, 李赢, 等. 枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件优化. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 102–107]
- Liang CC, Liu L, Zhang JH, *et al.* Optimization of medium components for sporulation quantity by *trichoderma viride* strain H06 using response surface methodology. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(2): 333–338 [梁昌聪, 刘磊, 张建华, 等. 响应面法优化绿色木霉 H06 产孢发酵培养基. 热带作物学报, 2014, 35(2): 333–338]
- Liu ZX, Zeng CZ. The application of response surface method in optimization of fermentation medium. *Northern Horticulture*, 2009(2): 127–129 [刘志祥, 曾超珍. 响应面法在发酵培养基优化中的应用. 北方园艺, 2009(2): 127–129]
- Ma ZB, Zheng HF, Liu JZ, *et al.* Identification of a marine bacterium S-3685 with high neutral protease and optimization of its fermentation conditions. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 131–137 [马子宾, 郑鸿飞, 刘均忠, 等. 一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的鉴定及产酶条件. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 131–137]
- Shi CJ, Yan PS, Zhao RX, *et al.* Advances on enzymes from marine microorganisms. *Current Biotechnology*, 2015, 5(3): 185–190 [史翠娟, 闫培生, 赵瑞希, 等. 海洋微生物酶研究进展. 生物技术进展, 2015, 5(3): 185–190]
- Wang D, Rong JP, Tang ZZ, *et al.* Response surface method optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* producing neutral protease. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 143–151 [王东, 荣家萍, 唐自钟, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(1): 143–151]
- Wu EX, Wang FF, NormanMcKIE. Matrix metalloproteinase. *Life Science Research*, 1999(3): 175–194 [吴二喜, 王凤飞, NormanMcKIE. 基质金属蛋白酶(英文). 生命科学研究, 1999(3): 175–194]
- Yang J, Li SY, Ma ZB, *et al.* Optimization of the purification protocol of biomimetic affinity material for marine metalloprotease MP. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(15): 146–152 [杨娟, 李尚勇, 马子宾, 等. 海洋金属蛋白酶 MP 仿生亲和材料纯化条件的优化. 食品工业科技, 2017, 38(15): 146–152]
- Zhang D, Min WH, Liu JS, *et al.* Response surface optimization of fermentation conditions for protease production by *Pichia kudriavzevii* yeast. *Food Science*, 2011, 32(13): 248–253 [张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件. 食品科学, 2011, 32(13): 248–253]
- Zhang ZX, Wang W, Wang F, *et al.* Optimization of fermentation conditions for the catalase production by *Aeromonas* sp. CE-2-A. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 95–103 [张增祥, 王伟, 王芳, 等. 过氧化氢酶高产菌株 CE-2-A 的发酵条件优化. 渔业科学进展, 2010, 31(6): 95–103]
- Zheng LH, Yang KL, Liu J, *et al.* Screening of microorganisms from Antarctic surface water and cytotoxicity metabolites from Antarctic microorganisms. *Food Science and Nutrition*, 2016, 4(2): 198–206
- Zheng LH, Yang KL, Sun M, *et al.* The preparation and application of a marine bacillus polypeptide. *China*, 151008745.8[P]. 2015-02-13 [郑兰红, 杨康利, 孙谧, 等. 一种海洋芽孢杆菌多肽及其制备和应用. 中国, 151008745.8[P]. 2015-02-13]

(编辑 马瑾艳)



## Optimization of Fermentation Conditions of *Bacillus* sp. N11-8 on the Production of Protease PBN11-8

ZHU Xiangjie<sup>1,2</sup>, WANG Zhen<sup>1,2</sup>, YUAN Zhixin<sup>1</sup>, HAO Jianhua<sup>1</sup>, ZHENG Lanhong<sup>1</sup>①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In this study, we optimized fermentation conditions to increase the production of PBN11-8 by *Bacillus* sp. N11-8. Response surface methodology (RSM) is a generally available method used to optimize the fermentation conditions of proteases, by fitting factors function relation between response value. The optimal carbon and nitrogen sources for protease production by *Bacillus* sp. N11-8 were starch and peptone respectively, which were verified in single-factor experiments. Other optimal fermentation conditions were determined as follows: temperature 35 °C, incubation time 60 h, rotational speed 200 r/min, pH 7, initial inoculums 4%, culture volume 50 ml in a 250 ml shake flask, and starch, peptone, yeast extract, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and metal ions (Fe<sup>3+</sup>) concentrations of 3 g/L, 15 g/L, 2.5 g/L, 5.0 g/L, 1.0 g/L, and 2.0 mmol/L, respectively. The Plackett-Burman design (PB) method was used to evaluate factors affecting protease production by *Bacillus* sp. N11-8, and three significant factors were identified: temperature, peptone, and yeast extract. Next, we used the steepest ascent design to approach the maximum response area of the three factors. Furthermore, the best scope of fermentation conditions was studied using a central composite test design, which is a type of RSM. Finally, through analysis of variance for the RSM, we obtained a regression equation and calculated the theoretical optimal fermentation conditions as follows: 3 g/L of soluble starch, 13.1 g/L of peptone, 2.9 g/L of yeast extract, 5 g/L of NaCl, 1 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mmol/L of Fe<sup>3+</sup>, pH 7.0, temperature 34 °C, rotational speed 200 r/min, culture volume 50 ml/250 ml, initial inoculums of 4%, incubation time 60 h. Under the optimized fermentation conditions, the theoretical enzyme activity reached 90.8 U/ml, and in the verification test, enzyme activity reached 90.5 U/ml, which increased 23.6% of the initial enzyme activity.

**Key words** *Bacillus* sp.; Protease; Plackett-Burman design; RSM

① Corresponding author: ZHENG Lanhong, E-mail: zhenglh@ysfri.ac.cn