

[文章编号] 1007-7405(2017)04-0028-08

卡拉胶酶发酵的工艺优化及中试放大

赫慧敏¹, 李永幸¹, 洪清林², 倪辉^{1,3}, 郭东旭², 肖安风^{1,3,4}

- (1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 绿新福建食品有限公司, 福建 漳州 363100;
3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;
4. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 在5 L发酵罐上, 以考察搅拌转速、补料及pH值对菌株 *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5产卡拉胶酶的影响进行优化, 建立卡拉胶酶的高产发酵工艺。结果表明: 提高搅拌转速能促进产酶并缩短发酵时间, 其中搅拌转速为280 r/min时较佳; 发酵过程中补料或控制恒定pH值对酶活力没有促进作用。在5 L罐发酵试验基础上进行中试放大实验, 在20, 75, 200 L罐中的卡拉胶酶活力最大值分别为33.9, 34.7, 36.1 U/mL。

[关键词] 卡拉胶酶; *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5; 发酵; 工艺优化; 中试放大
[中图分类号] TQ 920.6

Process Optimization and Scale-up of Carrageenase Fermentation with *Pseudoalteromonas carrageenovora*

HE Huimin¹, LI Yongxing¹, HONG Qinglin², NI Hui^{1,3}, GUO Dongxu², XIAO Anfeng^{1,3,4}

- (1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Green Fresh (Fujian) Food Stuff Co., Ltd., Zhangzhou 363100, China;
3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China;
4. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: In the 5 L fermentor, the effects of rotation speed supplementation of medium and pH on the production of carrageenase by strain *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5 were investigated to optimize the fermentation process. The results showed that high rotation speed could promote the rate of enzyme producing and shorten the fermenting time, and a speed of 280 r/min was found to be the most appropriate. Additional supplementation of medium and control constant pH exerted no obvious effects on the yield of enzyme production. Then, the scale-up experiments of 20, 75 and 200 L were conducted based on the results of 5 L bioreactor. The maximum carrageenase activities reached 33.9, 34.7 and 36.1 U/mL in 20, 75 and 200 L bioreactor, respectively.

Keywords: carrageenase; *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5; fermentation; process optimization; scale-up

[收稿日期] 2017-02-24 [修回日期] 2017-04-06

[基金项目] 福建省高校产学研合作项目(2016N5008); 福建省科技重大专项项目(2015N20001-1); 国家海洋公益行业科研专项(201505033); 福建省海洋高新产业发展专项(闽海洋高新[2016]08号); 十三五厦门市海洋经济创新发展示范项目(16CZP016SF13)

[作者简介] 赫慧敏(1992—), 女, 硕士生, 从事食品生物技术研究。通信作者: 肖安风(1973—), 男, 教授, 博士, 从事食品生物技术研究, E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn。

0 引言

卡拉胶寡糖是卡拉胶通过物理法、化学法和酶解法降解得到的小分子低聚糖^[1]。孙涛等^[2]发现, 氧化与酸降解的卡拉胶寡糖具有抗氧化、抗病毒和抗菌等多种生物活性^[3-5], 在食品^[3]、医药^[4]、饲料^[5]等领域具有广泛的应用价值。相对于化学法和物理法降解, 酶法降解反应条件温和, 易于控制, 产物单一, 对环境污染小, 表现出了较好的应用前景。卡拉胶酶是从海洋细菌类^[6]或一些海洋动物肝脏^[7]中获得的能特异性水解卡拉胶生成卡拉胶寡糖的酶。马悦欣等^[8]、Knutsen 等^[9]利用 κ -卡拉胶酶对卡拉胶进行水解, 经分析知, 降解后的卡拉胶为卡拉胶寡糖组分。目前, 卡拉胶酶的研究主要集中在产酶菌种筛选、酶分离纯化、酶学性质等方面: Liu 等^[10]分离鉴定海藻中的细菌, 发酵液的上清液经过纯化后得到 κ -卡拉胶酶; Hatada 等^[11]发现 *Microbulbifer thermotolerans* 具有 ι -卡拉胶酶基因, 对重组表达的 ι -卡拉胶酶进行了酶学性质研究。相比之下, 在卡拉胶酶发酵工艺方面的研究较少。苏平安等^[12]对不同载体的卡拉胶酶进行发酵优化, 得到高产量菌株 pET-22b-CgkX, 并采用单因素试验对菌株 pET-22b-CgkX 进行发酵优化, 优化后酶活力达到 32.1 U/mL。文献 [13] 从厦门红树林土壤腐叶样品中筛选得到一株产 κ -卡拉胶酶的菌株 *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5, 发现该细菌产生的 κ -卡拉胶酶在较高的温度和碱性条件下均具有较高的酶活性, 同时, 对该菌株产 κ -卡拉胶酶的摇瓶发酵培养条件进行了优化, 卡拉胶酶活力最大可达到 40.8 U/mL。在此基础上, 本文对 *P. carrageenovora* ASY5 产卡拉胶酶的 5 L 罐发酵工艺进行优化, 建立卡拉胶酶的高产发酵工艺, 并将优化的发酵工艺进行中试放大, 为规模化生产卡拉胶酶进而利用卡拉胶水解酶产生卡拉寡糖提供研究和应用基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

产卡拉胶酶菌株 *P. carrageenovora* ASY5: 在 NCBI 数据库的登录号是 KJ747189, 在中国工业微生物菌种保藏管理中心保藏, 编号为 238190。

1.2 培养基

人工海水 (g/L): NaCl 37.51, KCl 1.03, CaCl₂ 1.61, MgCl₂ · 6H₂O 6.4, NaHCO₃ 0.15, MgSO₄ · 7H₂O 4.67。

种子培养基: 牛肉浸膏 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 蒸馏水 250 mL, 人工海水 750 mL。牛肉浸膏和胰蛋白胨溶解后调 pH 值至 7.8, 加热煮沸 10 min, 冷却后调 pH 值至 7.3, 然后和人工海水混合, 121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基 (g/L): 卡拉胶 5, NaCl 20, CaCl₂ 0.2, 蛋白胨 5.0, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.3, Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.82, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 5 L 罐发酵工艺的优化

将保存在 -20 °C 的菌种解冻后, 接入制备好的种子培养基中, 20 °C、180 r/min 条件下培养 24 h 即得到种子液。按 2% 接种量接入装液量为 3 L 的 5 L 发酵罐中, 在 180 r/min、通气量 3 m³/h 和发酵温度 18 °C 条件下培养, 以搅拌转速、补料及 pH 值为考察对象, 对 5 L 罐发酵条件进行优化。

1.4 中试放大发酵

在 5 L 罐发酵的基础上, 分别进行 20, 75, 200 L 罐的放大实验。

20 L 罐培养: 按 2% 接种量将活化的菌种接入制备好的发酵培养基中, 在摇床温度 20 °C、转速 180 r/min 下培养, 培养好的种子液按 2% 接种量接入装液量为 12 L 的 20 L 发酵罐中, 在 18 °C、180 r/min、通气量 0.3 m³/h、培养基初始 pH = 6.5 条件下培养。

75 L 罐培养: 按 2% 接种量将活化的菌种接入制备好的发酵培养基中, 在摇床温度 20 °C、转速 180 r/min 下培养, 培养好的种子液按 2% 接种量接入装液量为 45 L 的 75 L 发酵罐中, 在 18 °C、

200 r/min、通气量 1.4 m³/h、培养基初始 pH = 6.5 条件下培养。

200 L 罐培养: 按 2% 接种量将活化的菌种接入制备好的培养基中, 在摇床温度 20 ℃、转速 180 r/min 下培养, 培养好的种子液按 2% 接种量接入 12 L 的 20 L 发酵罐中, 在 18 ℃、180 r/min、通气量 0.3 m³/h 条件下培养后接入装液量为 120 L 的 200 L 发酵罐中, 在 18 ℃、200 r/min、通气量 3 m³/h、培养基初始 pH = 6.5 条件下培养。

1.5 参数检测

1.5.1 生物量

取 1.0 mL 发酵液在 10 000 r/min 转速下离心 5 min, 用一定量的蒸馏水稀释菌体后, 测其在 600 nm 波长下的吸光度值, 空白为蒸馏水。

1.5.2 卡拉胶酶活力测定

参照文献 [14], 取 50 μL 适当稀释的酶液, 添加 550 μL 质量分数为 0.5% 的卡拉胶 (用 50 mmol/L NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄、pH = 7.0 的缓冲液溶解) 溶液, 60 ℃ 水浴 20 min, 沸水浴 5 min, 然后加入 0.9 mL DNS 并沸水浴 5 min, 冷却后加蒸馏水至 5 mL, 520 nm 处测定吸光度值, 根据反应液中还原糖的生成量, 计算卡拉胶酶的活力。对照组的酶液以沸水浴 5 min 后的酶液代替。以每分钟催化产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

1.6 数据统计

文中的酶活力和生物量的试验数据是每隔 8 h 定时取发酵罐中的发酵液进行测定的, 用 Excel 软件计算 3 次平行试验得到平均值和标准差; pH 值利用 pH 电极实时检测, 每隔 8 h 记录一次。

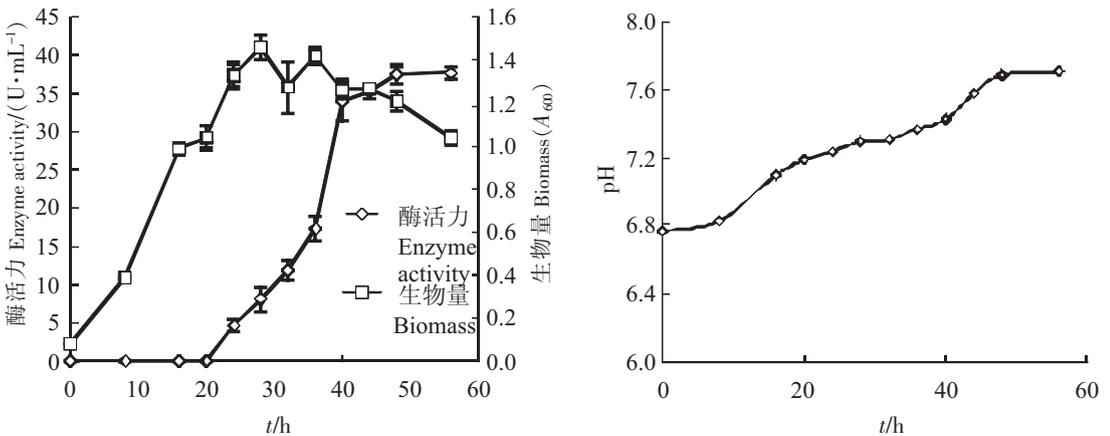
2 结果与讨论

2.1 卡拉胶酶 5 L 罐发酵工艺优化

2.1.1 5 L 罐发酵曲线

在 5 L 发酵罐中培养产卡拉胶酶菌株 *P. carrageenovora* ASY5, 考察发酵过程生物量、酶活力及发酵液 pH 值的变化情况, 结果如图 1 所示。

由图 1a 可知, 菌体在 8 ~ 28 h 之间呈现快速生长, 且在 28 h 处生物量达到最大值, 随后生物量趋于稳定, 发酵后期略有下降。36 ~ 40 h 处酶活力迅速增大, 随后酶活力缓慢增加, 酶活力最大为 37.7 U/mL。卡拉胶酶的产生呈现滞后现象, 在菌生长前期, 酶基本不产生, 生长中后期及稳定期才大量产生。这是因为菌体并不能直接利用卡拉胶为碳源, 必须合成卡拉胶酶水解卡拉胶生产寡糖后才



a) 酶活力及生物量变化曲线 Changes in enzyme activity and biomass

b) pH 值变化曲线 Changes in pH

图 1 菌株 ASY5 的 5 L 罐发酵曲线

Fig.1 Fermentation process curves of strain ASY5 in 5 L bioreactor

能进入细胞供菌体生长。因此, 前期菌体快速利用培养基中的速效碳源等营养物质供菌体快速生长; 生长中后期, 菌体合成的卡拉胶酶可以水解卡拉胶, 从而供菌体生长代谢, 所产生的卡拉胶寡糖进入细胞后, 诱导卡拉胶酶的大量产生。

图 1b 表明, 在整个发酵过程中, pH 值呈现逐渐增加的趋势, 这说明整个发酵过程处于氮源过量而发酵碳源 (如寡糖等) 限量的情况。

2.1.2 搅拌转速对产酶的影响

溶氧会影响代谢的合成速度^[15], 为了提高发酵过程的溶氧供应, 在发酵罐一般采用提高搅拌转速达到增加溶氧量的目的^[16]。利用地衣芽胞杆菌工程菌产纳豆激酶时, 提高发酵罐的搅拌转速可使发酵活性提高 94%^[17]。考察不同搅拌转速对菌株 *P. carrageenovora* ASY5 的生长及产酶的影响, 结果如图 2 所示。

图 2a 表明, 从发酵开始至发酵 20 h 处, 3 种转速条件下的菌株的生长情况一致, 随后, 转速为 180 r/min 的菌株的生物量呈现先增加后减小的趋势, 转速为 280 r/min 的菌株的生物量基本维持稳定, 而转速为 380 r/min 的菌株的生物量呈现了下降的趋势。这说明, 搅拌转速对菌株 *P. carrageenovora* ASY5 的生长具有显著的影响, 过低会造成供氧不足, 从而影响菌体生长; 转速过高产生的剪切力对菌体造成一定损伤, 使其过早衰亡自溶。

对 3 种搅拌转速条件下的酶活力结果进行比较 (见图 2b), 在发酵转速为 180 r/min 时, 发酵 0~20 h 处上清液中检测不到酶活力, 20~36 h 产酶速度较快, 36~40 h 酶活力迅速增加, 随后酶活力增加缓慢, 发酵结束时酶活力达到最大, 为 37.7 U/mL。在转速为 280 r/min 时, 在 16 h 处可以检测到酶活力, 16~28 h 酶活力增加较为迅速, 28~44 h 酶活力缓慢增加, 在 44 h 处达到最大, 为 38.2 U/mL, 随后酶活力呈现略微降低的趋势。在转速为 380 r/min 时, 同样在 16 h 处检测到酶活力, 16~24 h 酶活力增加迅速, 24~32 h 酶活力增加缓慢, 随后酶活力基本维持稳定, 在 48 h 和 56 h 处有峰值, 为 38.9 U/mL。

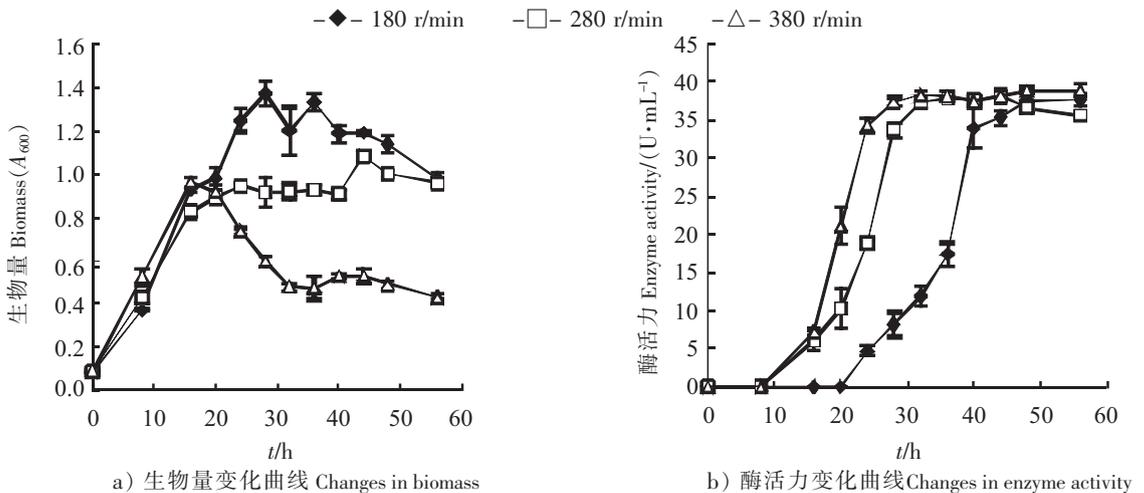


图 2 转速对 ASY5 生长及卡拉胶酶产量的影响

Fig.2 Effects of the rotation speed on cell growth and carrageenase production of ASY5

搅拌转速越低, 酶活力增长越滞后, 这说明搅拌转速过低, 导致溶氧供应不足, 不利于细胞进行有氧呼吸而导致酶活力增长滞后。搅拌转速为 380 r/min 时, 产酶速度最快且酶活力最高, 搅拌转速 280 r/min 的发酵产酶情况与其相似, 最高酶活力差异不明显。考虑到搅拌转速 280 r/min 更节能, 并且搅拌转速 380 r/min 时菌体易发生自溶。所以, 确定转速 280 r/min 为菌株 *P. carrageenovora* ASY5 的发酵搅拌转速。

2.1.3 补料对产酶的影响

补料工艺是提高产量、控制中间代谢的一个有效而方便的手段^[18]。为了考察补料对菌株 *P. carrageenovora* ASY5 产酶和生长的影响,采取发酵过程间歇补料的方式增加其碳源浓度。在初始发酵条件下进行 3 组试验:第 1 组为发酵过程不补加卡拉胶的对照试验;第 2 组在发酵至 24 h 和 48 h 时补料 2 次;第 3 组在发酵至 36 h 时补料 1 次,每次补加卡拉胶的量为 5 g/L。发酵过程控制搅拌转速为 280 r/min,其他条件和初始发酵条件相同,绘制发酵曲线,发酵结果见图 3。图 3a 表明,分两次补加卡拉胶的发酵试验在 24 h 和 48 h 处补加卡拉胶后,生物量明显提高,只在 36 h 处补加卡拉胶时,菌株的生物量同样出现增加的现象。这说明卡拉胶被菌株分解利用,导致菌体量增加。

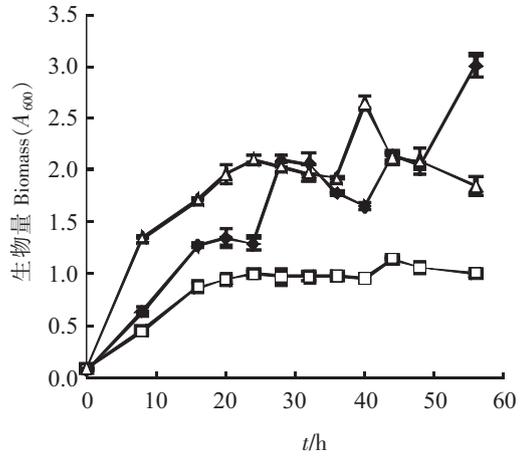
由图 3b 可知,不补料的对照试验,酶活力在 30 h 之后达到稳定,48 h 之后酶活力开始呈现下降的趋势。在 24 h 处补加卡拉胶后,与不补加卡拉胶的对照试验相比,24~32 h 的产酶速度变缓;32~48 h 的酶产量呈现缓慢增加的趋势,在 48 h 后补料,56 h 和 48 h 处的酶活力没有显著变化,且在 56 h 处有个峰值,为 38.1 U/mL。在 36 h 处补加卡拉胶后,与补加前相比,酶活力提升不明显,但酶活力至发酵结束均比较稳定。

由图 3c 可以看出,在每次补料后, pH 值会迅速降低,然后缓慢回升。这可能是由于卡拉胶属于硫酸多糖,当卡拉胶被分解利用后,某些中间代谢产物的积累会导致发酵液的 pH 值迅速降低,然后又随着代谢产物的积累消耗,发酵液的 pH 值又开始缓慢上升。

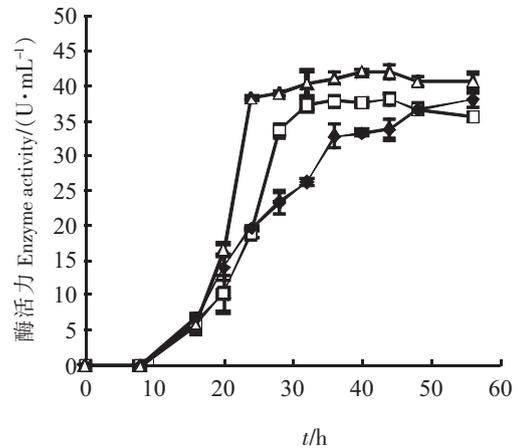
2.1.4 补料后控制 pH 值对产酶的影响

补料试验表明,补料后发酵液的 pH 值会出现明显的降低,且在 24 h 处补料后,产酶速度出现降低的现象,故推测发酵 pH 值的迅速降低可能会抑制卡拉胶酶的产生。因此,在补料后采取控制 pH 值措施,并根据生长过程中 pH 值的变化情况,控制补料后 pH 值在 7~7.5,其他条件和初始发酵条件相同,研究菌株 *P. carrageenovora* ASY5 的发酵过程,结果见图 4。图 4a 表明,补料后菌株的生物量与不补料相比有增加;图 4b 表明,补料后控制 pH 值、补料后不控制 pH 值以及不补料的发酵液的酶活力没有出现明显的增加或降低,且最大酶活力都能达到 40~42.1 U/mL。结果表明,该菌株的代谢生长及产酶对于补料与否及补料后是否控制 pH 值没有严格的要求。

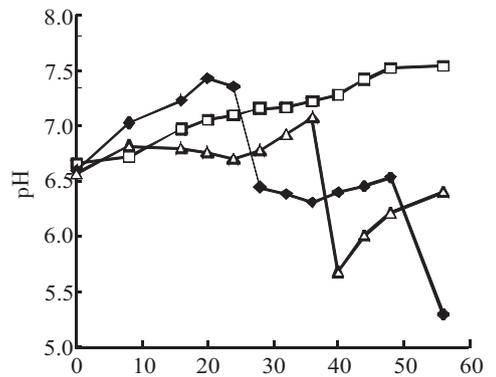
□- 不补料 No feeding batch
 ◆- 24 h 和 48 h 补料 24 h and 48 h feeding batch
 ▲- 36 h 补料 36 h feeding batch



a) 生物量变化曲线 Changes in biomass



b) 酶活力变化曲线 Changes in enzyme activity



c) pH 变化曲线 Changes in pH

图 3 补料对 ASY5 产卡拉胶酶的影响
Fig.3 Effects of the feeding batch on carrageenase production of ASY5

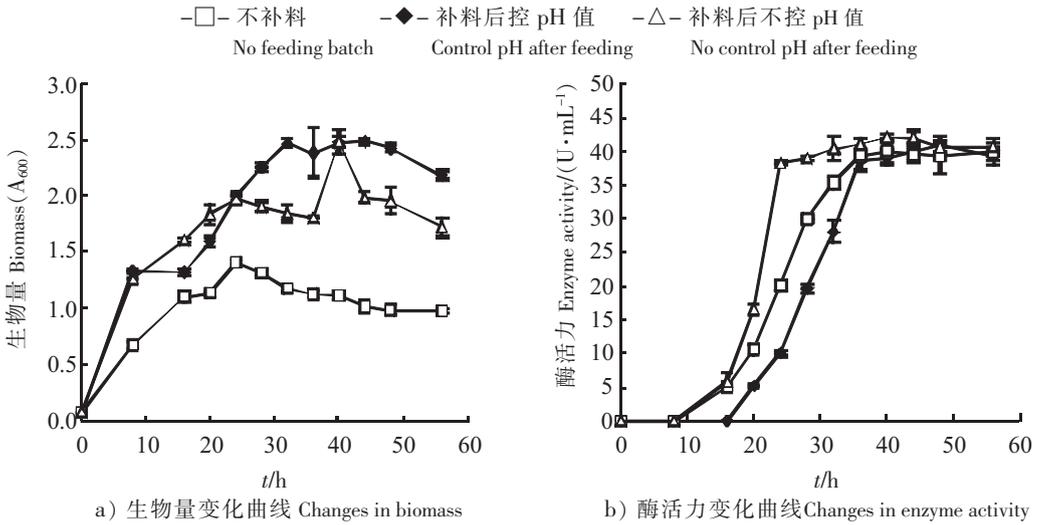


图 4 补料后控 pH 值对 ASY5 生长与产酶的影响

Fig.4 Effects of the control pH after feeding on cell growth and carrageenase production of ASY5

2.1.5 pH 值对产酶的影响

pH 值能直接反映菌株所处的生长环境的变化情况, 发酵液 pH 值是改变微生物生长环境的重要手段之一, 也是影响微生物新陈代谢的重要原因之一。因此, 本试验对其发酵过程中的 pH 值进行控制以研究其生长与产酶的规律, 分别控制发酵过程中的 pH 值为 6,7,8, 其他条件与发酵初始条件相同, 结果如图 5 所示。

从图 5a 可以看出, 控制 pH 值对菌体的生物量增加没有影响。pH 值为 6,7,8 时, 对酶活力影响显著, 对菌株的生长几乎没有影响, 且 pH = 7 时, 菌株 *P. carrageenovora* ASY5 能较好地产酶。

从图 5b 可以看出, 当把发酵过程中的 pH 值控制在 6 时, 直至发酵至 20 h 时才能检测到酶活力, 20 ~ 40 h 酶活力增加较为缓慢, 40 h 处酶活力达到最大, 也仅仅只有 11.5 U/mL 。控制 pH = 8 时, 虽然在 16 h 处可以检测到酶活力, 但是随后的酶活力增加也较为缓慢, 最高酶活力在 36 h 处出现, 为 16.8 U/mL 。pH = 7 时的酶活力也是在 16 h 处出现, 但随后的酶活力增加相对较为迅速, 在 32 h 时有峰值出现, 为 32.2 U/mL 。

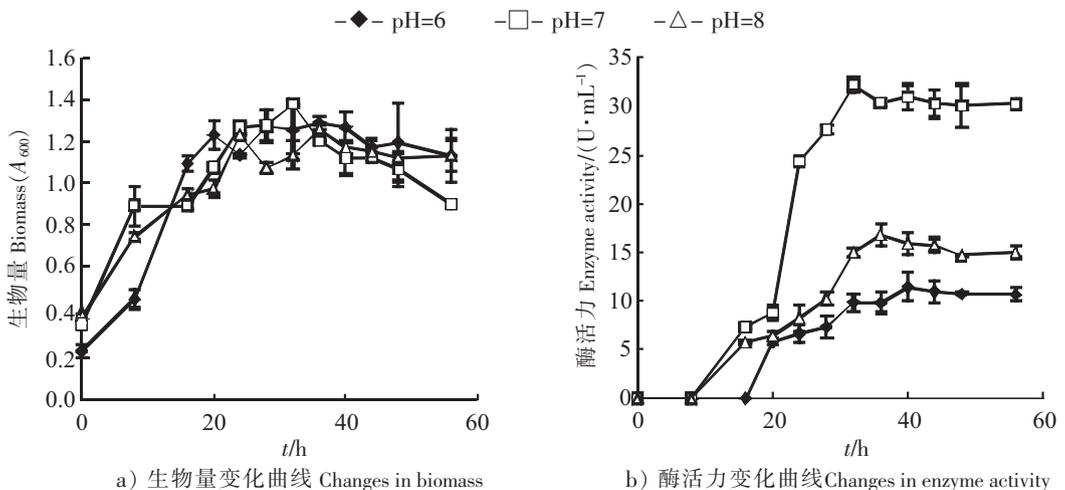


图 5 pH 值对 ASY5 生长与产酶的影响

Fig.5 Effects of pH on cell growth and carrageenase production of ASY5

2.2 中试放大实验

研究 5 L 罐发酵是为中试放大发酵提供技术参考, 从而能更好地把握其生长及产酶规律, 也能节约成本。而中试放大试验也更贴近于工业化生产。因此, 本文设计了一个连续化的有梯度的放大实验, 分别为菌株 *P. carrageenovora* ASY5 在 20 L, 75 L, 200 L 罐上发酵试验, 结果如图 6 所示。图 6a 表明, 在不同规模的发酵试验中, 生物量均呈现先增加后降低的走势, 其中在 200 L 罐的发酵时, 生物量略微偏大。图 6b 表明, 随着发酵规模的扩大, 菌株产酶有加快速度的趋势, 达到最大酶活力的时间也有缩短的趋势。在 200 L 罐的发酵中, 在 32 h 处酶活力达到 36.1 U/mL, 随后酶活力基本维持不变; 在 75 L 罐的发酵中, 峰值出现在 44 h 处, 为 34.7 U/mL; 而在 20 L 罐的发酵中, 酶活力在 44~56 h 基本维持稳定, 在 44 h 处酶活力为 33.3 U/mL, 在 56 h 处酶活力为 33.9 U/mL。试验结果表明, 在不同的发酵规模中, 菌株 *P. carrageenovora* ASY5 都能较好地生长及产酶。

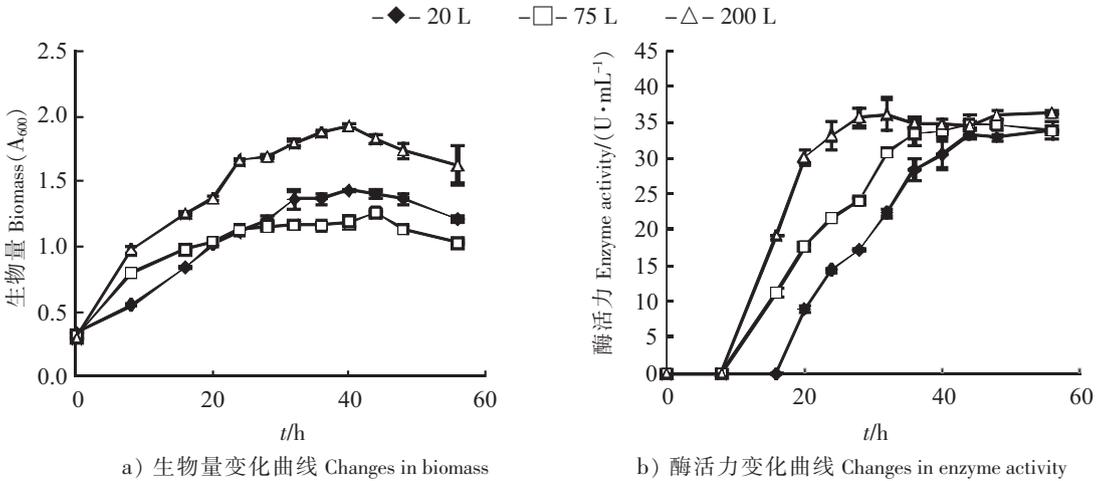


图 6 20 L, 75 L, 200 L 发酵罐的菌株 ASY5 的发酵曲线

Fig.6 Fermentation process curves of strain ASY5 in 20 L, 75 L and 200 L bioreactor

3 结论

提高搅拌转速能促进产卡拉胶酶菌株 *P. carrageenovora* ASY5 产酶速度并缩短发酵时间, 补料及控制 pH 值对酶活力没有明显促进作用, 其最佳发酵工艺条件为: 搅拌转速 280 r/min, 不进行补料及 pH 值为自然 pH 值时进行发酵。将 5 L 罐发酵优化工艺放大至 20 L, 75 L, 200 L 罐上进行试验, 其最大酶活力分别为 33.9, 34.7, 36.1 U/mL。

[参考文献]

[1] 李尚勇. 海洋交替假单胞菌 QY203 产 κ 卡拉胶酶研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.

[2] 孙涛, 陶慧娜, 周冬香, 等. 氧化与酸降解卡拉胶寡糖抗氧化活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 111-112.

[3] 袁华茂. 卡拉胶寡糖与衍生物的制备及生物活性研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所, 2005.

[4] WANG W, ZHANG P, HAO C, et al. In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus [J]. Antiviral Research, 2011, 92(2): 237-246. DOI:10.1016/j.antiviral.2011.08.010.

[5] 王秀武, 杜昱光, 白雪芳, 等. 卡拉胶寡糖对肉仔鸡肠道菌群、小肠微绒毛及免疫功能和生产性能的影响 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 498-500.

[6] MICHEL G, FLAMENT D, BARBEYRON T, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ι -carrageenase from *Alteromonas fortis* [J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2000, 56(6): 766-768.

- [7] SKEA G L, MOUNTFORT D O, CLEMENTS K D. Contrasting digestive strategies in four New Zealand herbivorous fishes as reflected by carbohydrase activity profiles [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 146(1): 63-70. DOI:10.1016/j.cbpa.2006.09.006.
- [8] 马悦欣, 董双林, 牟海津, 等. κ -卡拉胶寡糖的酶解制备及其体外抗病毒活性 [J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 2009, 48(6): 105-108.
- [9] KNUTSEN S H, SLETMOEN M, KRISTENSEN T, et al. A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by ν - and κ -carrageenase [J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 331(1): 101-106. DOI:10.1016/S0008-6215(00)00324-4.
- [10] LIU G L, LI Y, CHI Z, et al. Purification and characterization of κ -carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas porphyrae* for hydrolysis of κ -carrageenan [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(1): 265-271. DOI:10.1016/j.procbio.2010.08.021.
- [11] HATADA Y, MIZUNO M, LI Z, et al. Hyper-production and characterization of the ν -carrageenase useful for ν -carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94 T, and insight into the unusual catalytic mechanism [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(3): 411-422. DOI:10.1007/s10126-010-9312-0.
- [12] 苏平安, 王莹, 李尚勇, 等. κ -卡拉胶酶 CgkX 高效重组表达菌株的构建和发酵优化 [J]. *中国海洋药物*, 2015, 34(4): 1-6.
- [13] 许彩云, 朱艳冰, 倪辉, 等. 一株产卡拉胶酶细菌的分离鉴定及其酶学性质 [J]. *微生物学报*, 2015, 55(2): 140-148.
- [14] ZHU H, SHI Y, ZHANG Q, et al. Applying 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) method to analyzing the content of potato reducing sugar [J]. *Chinese Potato*, 2005, 19(5): 266-269.
- [15] CHRISOTPH P, UWE T, HANNE G. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 80(2): 135-142. DOI:10.1016/S0168-1656(00)00249-2.
- [16] 储炬. 现代工业发酵调控学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 251.
- [17] 祝亚娇, 宋嘉宾, 陈杨阳, 等. 地衣芽胞杆菌工程菌高产纳豆激酶的发酵罐工艺优化及中试放大 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 37-41.
- [18] 蔡谨, 孙章辉, 王隽, 等. 补料发酵工艺的应用及其研究进展 [J]. *工业微生物*, 2005, 35(1): 42-48.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)