

# 产 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* CGX5-1 发酵培养基的优化

刘晓玲<sup>1,2</sup>, 王金晶<sup>1,2</sup>, 李永仙<sup>1,2</sup>, 李 崎<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 采用响应面优化法对一株野生特基拉芽孢杆菌的发酵培养基进行优化, 最终培养基各组分分为: 大麦粉 68.4 g/L, 玉米粉 40 g/L, 豆饼粉 61.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L。用优化培养基在 37 °C 摇瓶发酵 52 h,  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活达到 191.96 U/mL, 是优化前产酶水平的 1.91 倍。

**关键词:**  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶; 响应面法; 培养基优化; 特基拉芽孢杆菌

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)06—0645—06

## Medium Optimization for the Production of $\beta$ -1,3-1,4-Glucanase by *Bacillus tequilensis* CGX5-1

LIU Xiao-ling<sup>1,2</sup>, WANG Jin-jing<sup>1,2</sup>, LI Yong-xian<sup>1,2</sup>, LI Qi<sup>\*1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** *Bacillus tequilensis* CGX5-1 is a newly screened strain which can effectively secrete  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase. Fractional factorial design was used to clarify the medium components and the concentration of barley flour and soy bean flour were found to be the key factors. The steepest ascent experiments was applied to determine the optimal domain and the central composite design was used to estimate the quadratic response surface, thus we acquire the factor values for maximum production of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase. The final composition of fermentation medium was determined via response surface methodology, which was (g/L): barley flour 68.4, corn flour 40, soybean flour 61.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{CaCl}_2$  0.1. The highest activity of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase was 191.96 U/mL at 52 h culture using optimized medium, which was 1.91 times higher than that from original medium.

收稿日期: 2012-08-30

基金项目: 国家 863 计划项目 (2012AA021303); 教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-10-0453); 国家创新基金项目 (09C26213203751); 江苏省创新基金项目 (BC2009291); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江南大学自主科研计划项目 (JUSRP11218)。

\* 通信作者: 李 崎 (1971—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事啤酒酿造科学与微生物方面的研究。

E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

**Keywords:**  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase, response surface methodology, medium optimization, *Bacillus tequilensis*

$\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶(EC 3.2.1.73)主要来源于植物与微生物,能够有效切割禾本科植物胚乳细胞壁中的 $\beta$ -葡聚糖,因此在啤酒酿造及饲料工业中得到广泛应用<sup>[1]</sup>。在麦汁糖化过程中适量添加外源的 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶可以有效提高糖化得率,加快糖化醪的过滤速率、降低能耗,而且能够使成品啤酒的非生物浑浊现象得以缓解<sup>[2]</sup>。在饲料中适量添加 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶可以帮助动物消化饲料中的 $\beta$ -葡聚糖,提高饲料的利用率并减少动物肠道疾病的发生<sup>[3]</sup>。

随着国内社会经济的发展,我国的啤酒酿造与饲料工业的发展速度也逐渐加快,而 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的需求量也势必会越来越大。目前国内市场上常见的 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶主要由真菌发酵产生,且多为国外的酶制剂公司生产,价格较为昂贵,这将严重制约行业的发展,因此分离筛选具高效产 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶能力的菌株并应用于生产实践具有重大意义。芽孢杆菌由于其非致病性、胞外蛋白分泌能力强、生长速率快等优点,逐渐成为酶制剂工业研究的热点。作者以实验室分离筛选的一株芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* CGX5-1 为目的菌,通过研究其生长规律并对其发酵培养基进行优化,为后续中试发酵以及工业化应用提供有力的技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

特基拉芽孢杆菌 CGX5-1 (*Bacillus tequilensis* CGX5-1):由江南大学生物工程学院啤酒与酿造食品实验室分离,并已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CGMCCNo.5935。

### 1.2 培养基

**1.2.1 斜面培养基(g/L)** 蛋白胨 10,酵母提取物 5,NaCl 10,琼脂粉 15;pH 6.5~7.0。

**1.2.2 种子培养基(g/L)** 蛋白胨 10,酵母提取物 5,NaCl 10,琼脂粉 15;pH 6.5。

**1.2.3 基础发酵培养基(g/L)** 玉米粉 30,豆饼粉 40,大麦粉 50,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,CaCl<sub>2</sub> 0.2,MgSO<sub>4</sub> 0.98,pH

7.0。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 培养方法

1)斜面活化:将保存的菌种在斜面上划线并于 37 °C 条件培养 14 h,待斜面上长出菌苔即为活化的种子。

2)种子培养:250 mL 三角瓶种子培养基装液量 30 mL(121 °C 灭菌 20 min,冷却),从活化斜面上挑取一环菌接种摇瓶,37 °C 200 r/min,培养 12 h。

**1.3.2 生长曲线的测定** 向装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中接入体积分数 3%的种子液,摇瓶培养。从 0~22 h 间隔 2 h 取样测定菌液在 600 nm 处的 OD 值。

**1.3.3 摇瓶发酵** 250 mL 三角瓶发酵培养基装液量 30 mL(121 °C 灭菌 20 min,冷却),以 3%的接种体积分数转移新鲜的种子液至发酵培养基中,37 °C 200 r/min,培养。

**1.3.4 产酶曲线的测定** 向基础发酵培养基中接入体积分数 3%新鲜的种子液,摇瓶培养。前 48 小时每隔 12 h 取样,至 48 h 时每隔 4 h 取样,测定发酵液上清液中 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的酶活。

**1.3.5  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活测定方法** 发酵液 8 000 r/min 离心 3 min 后取出上清液,用蒸馏水稀释合理倍数后,于 40 °C 预热。用等体积预热至 40 °C 的 20 mmol/L、pH 6.5 的磷酸缓冲液稀释 Megazyme 公司的蓝色 $\beta$ -葡聚糖溶液。取 0.1 mL 稀释酶液加入 0.4 mL 蓝色 $\beta$ -葡聚糖底物中,于 40 °C 反应 10 min 后向每个样品中加入 3 mL 沉淀液(由硫酸锌、乙二醇甲醚、盐酸、乙酸钠配制而成)后立即混匀,静置 5 min 后离心,测定上清液 A<sub>590</sub> 值,对照组为先加入沉淀液后加入蓝色 $\beta$ -葡聚糖底物的稀释酶液。 $\beta$ -葡聚糖酶酶活力的定义为:1 mL 发酵液于 40 °C、pH 6.5,每分钟分解大麦 $\beta$ -葡聚糖产生 1  $\mu$ mol 还原糖定义为 1 个酶活单位(U)。

### 1.4 响应面优化实验设计

**1.4.1 部分因子实验设计(Fractional Factorial Design,FFD)** 部分因子实验设计是一种部分析因筛选方法,可在少量的实验中对多个变量进行考

察,通过统计分析筛选出对实验结果有显著影响的实验变量。

作者选取大麦粉、玉米粉、豆饼粉、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  作为待筛选因素,部分因子实验选

择  $2^{6-2}$  部分重复因子设计,每一独立变量在高(+1)和低(-1)两个水平上进行,高水平为低水平 1.5 倍。实验设计见表 1。

表 1 部分因子设计编码值及水平

Table 1 Code and level of fractional factorial design

水平	大麦粉( $x_1$ ,g/L)	玉米粉( $x_2$ ,g/L)	豆饼粉( $x_3$ ,g/L)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $x_4$ , g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ( $x_5$ ,g/L)	$\text{CaCl}_2$ ( $x_6$ , g/L)
-1	40	20	30	1	0.1	0.1
0	50	30	40	2	0.2	0.2
1	60	40	50	3	0.3	0.3

**1.4.2 最速上升实验** 利用部分因子设计实验找到对产物合成影响最大的因素后,需要进一步对这些因素进行分析。其中最常用的分析方法是响应面分析,但响应面分析是一种局部的分析方法,只实用于一定范围内根据实验求得最优解。所以在进行响应面分析实验前应先进行最速上升实验得到最优值附近的区域,在区域内进行响应面实验。

**1.4.3 中心组合实验设计** 中心组合设计是一种国际上比较常见的水平数为 5 的实验设计方法。实验完成后,通过响应面分析可以对影响目标产物的因素及其交互作用进行评价,而且还能对各因子的浓度进行优化,以获得影响过程的最佳条件。在部分因子实验结果的基础上,选出对 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶产量影响显著的因子,进行中心组合优化实验。实验设计与数据分析均采用统计分析软件 Minitab 16.0 处理。

**1.4.4 培养基优化结果验证** 使用优化后发酵培养基进行发酵实验,发酵结束后测定 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活力,并与响应面分析得到的理论值进行比较,以得到最佳培养基组成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长曲线

菌株培养过程中菌液的  $\text{OD}_{600}$  随时间的变化曲线见图 1。由图 1 可知,*B. tequilensis* CGX5-1 的对数生长期在培养过程中的第 4~12 小时之间,0~4 h 为延滞期,4~12 h 为对数生长期,14 h 以后达到平衡期。选取对数后期即培养 10~12 h 的种子接入发酵培养基,此时的菌体生长旺盛,繁殖速度较快,为理想的生长状态。

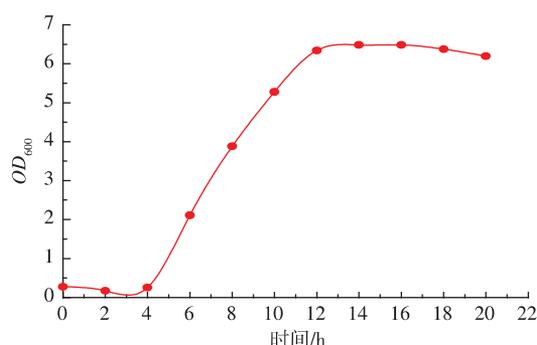


图 1 *B. tequilensis* CGX5-1 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *B. tequilensis* CGX5-1

### 2.2 产酶曲线

为了更好地监控菌体在发酵过程中的产酶情况,使用基础发酵培养基发酵并测定 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶酶活的变化情况。结果见图 2。由图 2 可知,菌体在发酵培养基中生长 52 h 后其产酶量达到顶点,因此选取发酵 52 h 点测定发酵液中 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活力。

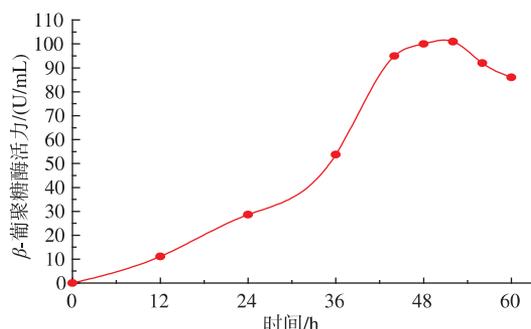


图 2 *B. tequilensis* CGX5-1 在发酵培养基中的产酶曲线

Fig. 2 Curve of  $\beta$ -glucanase production of *B. tequilensis* CGX5-1 in fermentation medium

### 2.3 部分因子设计实验

选取  $N=6$  进行实验设计, 每组 3 个平行, 响应值为  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶活力, 结果见表 2。

表 2 部分因子实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of fractional factorial design

序号	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$\beta$ -葡聚糖酶活力/(U/mL)
1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	76.85
2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	108.05
3	-1	+1	-1	+1	-1	+1	55.60
4	-1	-1	+1	+1	-1	-1	73.98
5	-1	-1	-1	+1	+1	+1	56.15
6	+1	-1	-1	-1	-1	+1	68.65
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	89.09
8	-1	+1	-1	-1	+1	-1	79.76
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	79.67
10	+1	+1	-1	-1	+1	+1	80.10
11	+1	-1	+1	-1	+1	-1	97.72
12	+1	-1	+1	+1	-1	+1	103.42
13	-1	-1	+1	-1	-1	+1	88.44
14	+1	-1	-1	+1	+1	-1	79.22
15	+1	+1	-1	+1	-1	-1	90.37
16	+1	+1	+1	-1	-1	-1	111.29
17	0	0	0	0	0	0	85.92

对部分因子实验结果进行回归分析表明, 大麦粉、玉米粉和豆饼粉对  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶合成具有正效应, 故对这 3 个因素取高水平值。而  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  和  $\text{CaCl}_2$  具有负效应, 故对其取低水平值。

实验结果的方差分析见表 3。其中  $p$  值小于 0.05 的因素可认为其对发酵结果的影响较显著。由此可知大麦粉和豆饼粉对于  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶的合成是显著影响因子。由回归分析结果可得一次拟合线性回归方程:

$$Y=84.376+8.704x_1+2.741x_2+9.957x_3-3.194x_4-0.362x_5-2.460x_6 \quad (1)$$

实验模型的回归方程决定系数  $R^2=90.18\%$ , 调整决定系数  $\text{Adj } R^2=83.67\%$ , 说明模型可以较好地解释实验结果。

表 3 部分因子实验回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis in fractional factorial design

变量	自由度	估计参数	标准误差	$t$ 值	$p$ 值
截距	1	84.376	1.841	45.840	0.000
$x_1$	1	8.704	2.058	4.23	0.001
$x_2$	1	2.741	2.058	1.33	0.206
$x_3$	1	9.957	2.058	4.84	0.000
$x_4$	1	-3.194	2.058	-1.55	0.145
$x_5$	1	-0.362	2.058	-0.18	0.863
$x_6$	1	-2.460	2.058	-1.20	0.253

### 2.4 最速上升实验

从方程 (1) 中大麦粉和豆饼粉的系数 ( $x_1$ : 8.704,  $x_3$ : 9.957) 得出这两个因素步移的步长之比为 (0.874:1), 即当豆饼粉步移 1 个单位 (5 g/L) 时, 大麦粉步移 (4.37 g/L)。以部分因子实验设计的中心点作为步移的起点, 实验设计与实验结果见表 4。

表 4 最速上升实验设计与结果

Table 4 Experimental design and results of steepest ascent experiments

序号	大麦粉质量浓度/(g/L)	豆饼粉质量浓度/(g/L)	$\beta$ -葡聚糖酶活/(U/mL)
1	50.00	40.00	120.15
2	54.37	45.00	149.51
3	58.74	50.00	169.38
4	63.11	55.00	179.59
5	67.48	60.00	191.99
6	71.85	65.00	186.22
7	76.22	70.00	176.61

以上实验利用部分因子设计确定了大麦粉和豆饼粉两个显著影响因素, 又利用最速上升实验确定了最优的取值范围。此部分研究利用基于中心组合设计的响应面分析法对这两个因素进行进一步的优化。

### 2.5 中心组合实验

中心组合实验设计及结果见表 5, 共有 13 个实验点。13 个实验点可分为两类: 一类为析因点, 即自变量取值在  $X_1, X_2$  所构成的三维顶点, 共 8 个析因

点;另一类为零点,即区域的中心点,零点实验重复5次,用以估计实验误差。

表5 中心组合实验设计及实验结果

Table 5 Experimental design and results of central composite design

序号	编码值水平		实际值水平		$\beta$ -葡聚糖酶活力/(U/mL)
	$X_1$	$X_2$	大麦粉质量浓度/(g/L)	豆饼粉质量浓度/(g/L)	
1	-1.414	0	61.29	60.00	180.70
2	0	0	67.48	60.00	191.97
3	0	0	67.48	60.00	191.37
4	0	+1.414	67.48	67.07	185.90
5	+1.414	0	73.66	60.00	185.44
6	0	0	67.48	60.00	191.97
7	0	0	67.48	60.00	191.98
8	-1	+1	63.11	65.00	180.21
9	-1	-1	63.11	55.00	179.47
10	+1	+1	71.85	65.00	186.11
11	+1	-1	71.85	55.00	181.35
12	0	-1.414	67.48	52.93	178.45
13	0	0	67.48	60.00	191.99

以大麦粉和豆饼粉为自变量,以 $\beta$ -葡聚糖酶活力为响应值,利用 Minitab 16.0 分析实验数据,结果见表6。所得数学模型见方程(2)。

$$Y=191.857+1.809X_1+2.004X_2-4.603X_1^2-5.049X_2^2+1.005X_1X_2 \quad (2)$$

其中: $Y$ 为响应值( $\beta$ -葡聚糖酶酶活); $X_1$ 为大麦粉质量浓度; $X_2$ 为豆饼粉质量浓度。回归方程各项的方差分析表明,方程一次项与二次项的 $p$ 值均小于0.05,说明大麦粉与豆饼粉的单独影响与交互影响都较为显著。实验模型的回归方程决定系数 $R^2=98.59%$ ,调整决定系数 $Adj R^2=97.58%$ ,说明模型可以很好的解释实验结果。

### 2.6 响应面分析

本研究在中心组合实验设计确定的参数取值范围基础上,对实验结果进行响应面分析,结果见图3。由图3可以看出,在实验取值范围内两图都有最大值(响应面的顶点和等高线的最高点),即两因子间的相互作用是有利于 $\beta$ -葡聚糖酶产生的最优组合。利用 Minitab 16.0 软件自带的分析预测功能对两个因素的最佳值进行寻优,得到当 $X_1=68.4$  g/L与 $X_2=61.1$  g/L时,响应值 $\beta$ -葡聚糖酶酶活有最大值,预测值为192.27 U/mL。

至此经过优化实验,最终确定 *B. tequilensis* CGX5-1 发酵产 $\beta$ -葡聚糖酶的培养基组成为:大麦粉 68.4 g/L,玉米粉 40 g/L,豆饼粉 61.1 g/L, $KH_2PO_4$  1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g/L, $CaCl_2$  0.1 g/L。

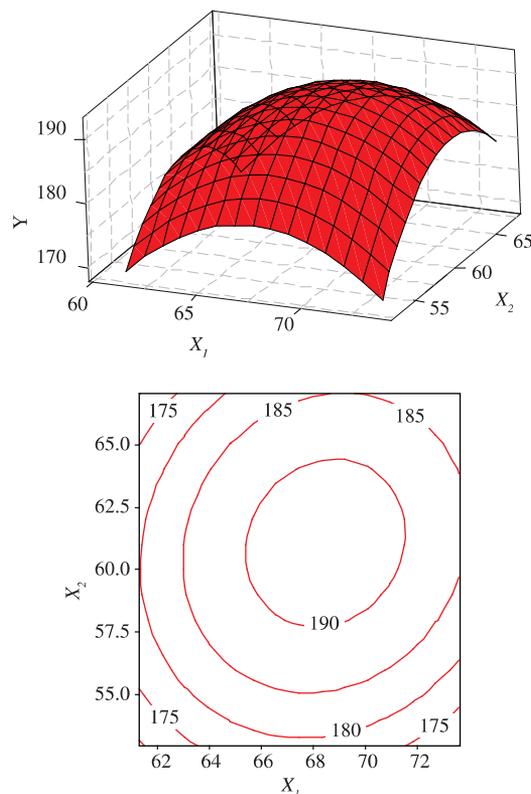


图3 响应曲面与等值线

Fig. 3 Response surface and isoline

### 2.7 培养基优化结果验证

为了验证优化结果的可靠性,将初始发酵培养基及响应面优化培养基在相同的发酵条件下进行对比实验,每组3个平行实验,结果见表6。

表6 培养基优化前后的 $\beta$ -葡聚糖酶产量的比较( $n=3$ )

Table 6 Comparison of  $\beta$ -glucanase production before and after optimization of fermentation medium

培养基组分	初始培养基/(g/L)	RSM 优化培养基/(g/L)
大麦粉	50.0	68.4
玉米粉	30.0	40.0
豆饼粉	40.0	61.1
$KH_2PO_4$	2.0	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	0.1
$CaCl_2$	0.2	0.1
平均酶活/(U/mL)	100.54	191.96

表 6 的结果表明,培养基经过优化后, $\beta$ -葡聚糖酶活力(191.96 U/mL)与初始培养基(100.54 U/mL)相比,提高至原酶活的 1.91 倍。与预测值 192.27 U/mL 较为接近,相对误差为 0.16 %,同时证明了回归方程的可靠性和统计学方法的有效性。

### 3 结 语

通过研究,确定了野生特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* CGX5-1 的生长曲线及发酵产酶曲线,在此基础上利用部分因子实验、最速上升、中

心组合以及响应面分析等实验方法,结合 Minitab 16.0 软件,最终得到优化后的发酵培养基。由实验结果可知,相较于初始发酵培养基,优化后的发酵培养基更适用于该菌产  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶。培养基组分中的大麦粉含有较高的葡聚糖含量,对  $\beta$ -葡聚糖酶的产生具有一定的诱导作用,同时作为碳源。而豆饼粉作为氮源,不仅廉价易得而且绝对氮的含量较高,为菌体的生长繁殖以及胞外酶类的产生提供不可或缺的营养。本研究优化所得的培养基材料廉价易得,为日后菌种工业化生产奠定了基础。

### 参 考 文 献:

- [1] Antoni P. Bacterial 1,3-1,4- $\beta$ -glucanases: structure, function and protein engineering [J]. **Biochemical et Biophysica Acta**, 2000, 1543: 361-382.
- [2] 李永仙, 顾国贤, 俞中. 耐高温  $\beta$ -葡聚糖酶在啤酒糖化中的应用研究[J]. 酿酒, 2002, 29(2): 81-83.  
LI Yong-xian, GU Guo-xian, YU Zhong, et al. The application of thermal- $\beta$ -Glucanase in Mashing[J]. **Liquor Making**, 2002, 29(2): 81-83. (in Chinese)
- [3] Frost. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to salm nella typhim urium[J]. **Vet Pathol**, 1997, 31: 369-386.
- [4] 杨辉, 廖威, 梁海秋, 等. 葡聚糖酶高产菌株的分离鉴定及其培养基优化的研究[J]. 广西大学学报, 2003, 28(6): 89-92.  
YANG Hui, LIAO Wei, YANG Hai-qiu, et al. The isolation and identification of a high-productive strain of dextranase and its optimum medium of flask fermentation[J]. **Journal of Guangxi University**, 2003, 28(6): 89-92. (in Chinese)
- [5] 郑元平, 袁康培, 冯明光. 啤酒用  $\beta$ -葡聚糖酶高产菌株的选育及发酵条件优化[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(3): 316-321.  
ZHENG Yuan-ping, YUAN Kang-pei, FENG Ming-guang. Breeding of a bacterial strain for efficient production of beer-purpose  $\beta$ -glucanase and the optimized conditions for its fermentation [J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**, 2004, 12(3): 316-321. (in Chinese)
- [6] 李文婧, 赵祥瑞, 田延军, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸产生菌的发酵培养基优化[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 108-112.  
LI Wen-jing, ZHAO Xiang-yin, TIAN Yan-jun, et al. Optimization of  $\gamma$ -PGA fermentation medium of *Bacillus amyloliquefaciens* by response surface methodology[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010, 36(3): 108-112. (in Chinese)
- [7] Xingjun Tang, Guoqing He, Qihe Chen, et al. Medium optimization for the production of thermal stable  $\beta$ -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology[J]. **Bioresource Technology**, 2004, 93: 175-181.
- [8] 李勇昊, 周长海, 丁雷, 等. 发酵培养基优化策略[J]. 北京联合大学学报: 自然科学版, 2011, 25(2): 53-59.  
LI Yong-hao, ZHOU Chang-hai, DING Lei, et al. Strategies for optimization of fermentation medium composition performance[J]. **Journal of Beijing Union University: Natural Sciences**, 2011, 25(2): 53-59. (in Chinese)
- [9] 畅晓洁, 郑必胜, 赵欣. 裂褶菌产  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶培养基组成的优化研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5): 167-173.  
CHANG Xiao-jie, ZHENG Bi-sheng, ZHAO Xin, et al. Study on the optimization of medium composition of endo- $\beta$ -1,3-glucanase producing by *Schizophyllum commune* Fr[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(5): 167-173. (in Chinese)
- [10] 沈海萍, 吴晓刚, 王晓丹, 等.  $\beta$ -葡聚糖酶产生菌的选育及培养基的初步优化[J]. 中国酿造, 2011(226): 55-57.  
SHEN Hai-ping, WU Xiao-gang, WANG Xiao-dan, et al. Screening of  $\beta$ -glucanase-producing microorganisms and medium optimization for  $\beta$ -glucanase production[J]. **Journal of China Brewing**, 2011(226): 55-57. (in Chinese)
- [11] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 92-93.
- [12] Bhunia B, Behera K, Baquee A, et al. Optimization of alkaline protease activity from *Bacillus subtilis* 2724 by response surface methodology (RSM)[J]. **International Journal of Biological Sciences and Engineering**, 2010, 1(3): 158-169.