

文章编号:1000-0615(2009)03-0511-08

## 海洋细菌 DT-7 产琼胶酶的培养基组分优化

桑卫国, 章宗铭

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:**培养基是微生物生长的重要条件之一。为研究微生物发酵法获取高活性琼胶酶并为今后酶法生产琼胶寡聚糖奠定一定基础,利用筛选实验设计法,首次以海洋细菌 *Brevundimonas* sp. DT-7 为实验菌株,以琼胶酶活性为评价指标,对该菌株培养基进行筛选,所筛选的8个相关因子为  $X_1$ (琼胶粉)、 $X_2$ (NaCl)、 $X_3$ ( $\text{FePO}_4$ )、 $X_4$ ( $\text{CaCl}_2$ )、 $X_5$ ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、 $X_6$ ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、 $X_7$ (酵母膏)、 $X_8$ (蛋白胨),其中  $X_1$ (琼胶粉)、 $X_4$ ( $\text{CaCl}_2$ )、 $X_8$ (蛋白胨)对产琼胶酶活性有显著影响( $P < 0.05$ ),然后采用 Box-Behnken 设计法进行实验设计,再应用 SAS 8.2 软件的二次响应面回归程序,对实验点的响应值进行回归分析,最后建立了二次响应面回归模型  $Y_1 = 499.6 + 19.45X_1 + 13.99X_4 - 1.213X_8 - 33.16X_1^2 - 5.3X_1X_4 - 3.45X_1X_8 - 39.64X_4^2 - 10.23X_4X_8 - 15.79X_8^2$ 。优化后培养基组分(w/v):琼胶粉 0.536%, NaCl 2.5%,  $\text{FePO}_4$  0.1%,  $\text{CaCl}_2$  0.052%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%, 酵母膏 1%, 蛋白胨 0.484%;经培养基组分优化后,在 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL、初始 pH 7.5、摇床转速为 120 r/min、培养温度为  $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、培养 28 h 的条件下,菌株产酶活力从优化前的 372.0 U/mL 提高到 503.3 U/mL,酶活力为前者的 1.35 倍。上述研究结果表明:SAS 软件可快速、有效地优化培养基组分配方;优化后的 DT-7 培养基配方的组分简单,这为今后低成本生产高活性琼胶酶提供有利条件;对菌株 *Brevundimonas* sp. DT-7 的选育及其发酵特性的深入研究有望解决琼胶酶的商品化。

**关键词:**琼胶酶;短波单胞菌属;响应面

**中图分类号:**Q 55; S 917

**文献标识码:**A

琼胶主要从石花菜、江篱、紫菜等红藻中提取分离,由琼胶糖(agarose)和硫酸琼胶(agaropectin)组成,琼胶糖是由 1,3 连接的  $\beta$ -D-半乳糖和 1,4 连接的 3,6-内醚- $\alpha$ -L-半乳糖残基反复交替连接的链状中性糖<sup>[1]</sup>。硫酸琼胶结构较复杂,含有 D-半乳糖、3,6-半乳糖酐、半乳糖醛酸和硫酸基,丙酮酸<sup>[2]</sup>。海藻多糖,如褐藻胶、琼胶、卡拉胶等,其一定分子量的降解产物寡糖具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫等作用。琼胶寡糖还可以用于饮料、面包等低热量健康食品的生产。由于琼胶是某些红藻细胞壁的重要组成成分,因此,琼胶酶在这些海藻的单细胞分离、酶解破壁制备原生质体等过程中具有重要的使用价值,是一种海藻

遗传工程的工具酶。琼胶酶主要来源于海洋软体动物和海洋微生物。前者的来源有限不能可持续获取,后者则有望满足人类的需要。迄今已从海洋环境中分离到多种琼胶分解菌。据报道<sup>[3-5]</sup>,弧菌属(*Vibrio* sp.)、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等中的某些菌种均能分解琼胶。国内在琼胶降解微生物和琼胶酶解方面的研究报道目前很少,且尚无国产的琼胶酶产品。进口的琼胶酶产品价格达每支几百元人民币。

目前琼胶寡糖主要通过化学水解法进行生产,利用酶法降解琼胶生产琼胶寡糖将是生产该低聚糖的一条更有效途径。本研究以一株浙江省

收稿日期:2008-10-22 修回日期:2009-02-22

资助项目:国家自然科学基金(40776077)

通讯作者:桑卫国, E-mail: sangweigu@nbu.edu.cn

温州海域腐烂紫菜中分离到的产琼胶酶海洋细菌 *Brevundimonas* sp. DT-7 为实验菌株,通过单因子试验,确定了培养基主要成分的优化范围,再利用筛选试验设计法筛选出显著因子,然后采用响应面分析法进行实验,得出优化后培养基组分。这为 *Brevundimonas* sp. DT-7 产琼胶酶的工业化可行性提供了基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

从浙江省温州洞头紫菜养殖场中的腐烂紫菜筛选出海洋细菌 *Brevundimonas* sp. DT-7,该菌株由本实验室保存。

### 1.2 培养基及试剂

试剂 DNS 试剂<sup>[6]</sup>。

固体培养基(g/L) 琼胶 15, NaCl 25, 蛋白胨 5, 酵母膏 10,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1; 自来水 1 000 mL, pH 7.5。

液体种子培养基(g/L) 琼胶 2, NaCl 25, 蛋白胨 5, 酵母膏 10,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1; 自来水 1 000 mL, pH 7.5。

发酵培养基成分 琼胶粉、NaCl、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酵母膏、蛋白胨。初始的培养基按 2216 海洋细菌培养基配制<sup>[7]</sup>,按单因子进行优化;再用筛选试验设计软件设计培养基,最后用响应面设计软件设计多因子多水平发酵实验。

### 1.3 发酵条件

除非特定说明,培养温度定为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;初始 pH 7.5;250 mL 三角瓶装液量为 50 mL;摇床转速为 120 r/min;发酵时间 28 h。

### 1.4 琼胶酶活力测定

按 DNS 法进行<sup>[6]</sup>。

### 1.5 单因子实验设计

在 1.3 所述的发酵条件下分别采用单因子实验,初始的培养基按 2216 海洋细菌培养基配制,再分别考察各成分含量对发酵产酶的影响,确定某成分在培养基中的最佳含量<sup>[8]</sup>。

### 1.6 培养基优化方法

应用筛选试验设计进行多因子二水平实验设计,分析培养基各组分的效应并筛选出显著因子,然后采用 Box-Behnken 设计法进行实验设计,最后运用 SAS 8.2 软件的二次响应面回归

(RSREG)程序对实验点的响应值进行回归分析,建立回归模型,确定培养基组成的最佳配方。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基的单因子实验

通过分别对发酵液中的琼胶粉、NaCl、 $\text{FePO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、酵母膏、蛋白胨进行单因子实验,确定了因子的水平范围(图 1-a~h)。结果表明培养基成分为(w/v):琼胶粉 0.5%、NaCl 2.5%、 $\text{FePO}_4$  0.1%、 $\text{CaCl}_2$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%、酵母膏 1%、蛋白胨 0.%时效果较佳。将此定为多因子两水平的部分因子设计的中心点<sup>[9-10]</sup>。

### 2.2 培养基组分的筛选

根据筛选试验设计的方法,对培养基进行多因子两水平的试验设计,该设计方法的优越性是用较少试验次数达到各因子的效应得到尽可能精确的估计,适用于从众多的考察因子中快速有效地筛选出最为重要的几个因子,待进一步研究<sup>[11]</sup>。对于  $N$  次实验至多可研究 $(N-1)$  个因子,其中 $(N-4)$  个实际因子,3 个虚构变量用以估计误差。每个因子取两个水平:低水平为原始培养条件,高水平值约取较低水平的 1.25 倍。但对某个因子高低水平的差值不能过大,以防掩盖了其他因子的重要性。用 1 表示高水平, -1 表示低水平。本设计定义: $X_1$  (琼胶粉),  $X_2$  (NaCl),  $X_3$  ( $\text{FePO}_4$ ),  $X_4$  ( $\text{CaCl}_2$ ),  $X_5$  ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),  $X_6$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $X_7$  (酵母膏),  $X_8$  (蛋白胨)。  $Y_1$  为琼胶酶酶活的响应值(U/mL)。表 1 为 8 个因子用 Plackett-Burman 设计出的实验以及相对应的酶活响应值,表 2 是各因子的效应。根据  $P < 0.05$  的因子存在显著差异,表 2 的结果表明  $X_1$  (琼胶粉)、 $X_4$  ( $\text{CaCl}_2$ )、 $X_8$  (蛋白胨) 3 个因子对 *Brevundimonas* sp. DT-7 发酵产琼胶酶有显著影响。这 3 个因子可进一步作响应面分析<sup>[12]</sup>。

### 2.3 培养基的响应面分析试验

具有显著性差异的 3 个因子  $X_1$  (琼胶粉)、 $X_4$  ( $\text{CaCl}_2$ )、 $X_8$  (蛋白胨)用三因子三水平响应面分析进行试验设计。表 3 为三因子三水平的编码及取值,表 4 是三因子三水平试验设计及其响应值。

根据表 4 的数据,应用 SAS 8.2 软件的 RSREG 程序,结合响应面分析可得到表 5 至表 7 和图 2 至图 4。表 5 是关于可信度的分析,其中

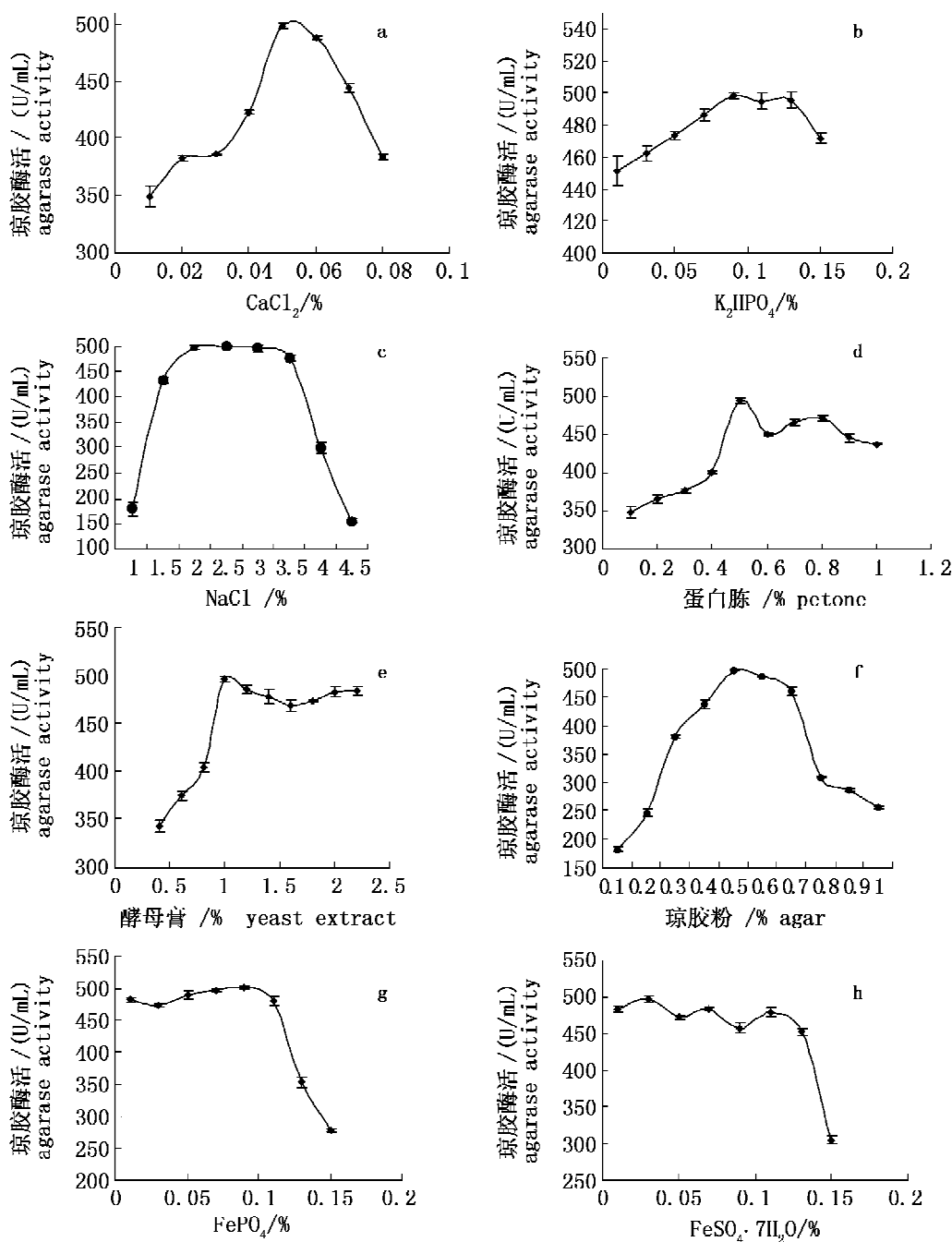


图1 培养基组分对琼胶酶活力的影响

a.  $\text{CaCl}_2$  对琼胶酶活力的影响, b.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  对琼胶酶活力的影响, c.  $\text{NaCl}$  对琼胶酶活力的影响, d. 蛋白胨对琼胶酶活力的影响, e. 酵母膏对琼胶酶活力的影响, f. 琼胶粉对琼胶酶活力的影响, g.  $\text{FePO}_4$  对琼胶酶活力的影响, h.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  对琼胶酶活力的影响

Fig.1 Specific activity of agarase affected by culture medium components

a. specific activity of agarase affected by  $\text{CaCl}_2$ , b. specific activity of agarase affected by  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , c. specific activity of agarase affected by  $\text{NaCl}$ , d. specific activity of agarase affected by peptone, e. specific activity of agarase affected by yeast extract, f. specific activity of agarase affected by agar powder, g. specific activity of agarase affected by  $\text{FePO}_4$ , h. specific activity of agarase affected by  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

表 1 筛选试验设计培养基的因子和响应值  
Tab. 1 Plackett-Burman design ( factors  $X_1 - X_8$  and responses  $Y_1$  )

试验号 test No.	因子 factor								$Y_1$ (U/mL)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	454.3
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	420.3
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	496.2
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	454.9
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	437.5
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	445.7
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	463.6
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	472.4
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	468.5
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	471.6
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	482.6
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	497.5

表 2 培养基各因子的效应  
Tab. 2 Effects of factors and their significance

因子 factor	估计值 estimate	标准差 std err	检验 test	结果 $P >  t $
$X_1$	-32.75	4.012 054	-8.162 9	0.003 846
$X_2$	-12.216 67	4.012 054	-3.044 99	0.055 648
$X_3$	1.516 666 7	4.012 054	0.378 028	0.730 573
$X_4$	-21.783 33	4.012 054	-5.429 47	0.012 262
$X_5$	3.116 666 7	4.012 054	0.776 826	0.493 888
$X_6$	1.45	4.012 054	0.361 411	0.741 746
$X_7$	-0.183 333	4.012 054	-0.045 7	0.966 424
$X_8$	-12.916 67	4.012 054	-3.219 47	0.048 604

表 3 培养基显著因子水平表  
Tab. 3 Selected main factors and their levels

因子 factor		编码值 coded data		
		-1	0	1
$X_1$	琼胶粉 (%)	0.375	0.5	0.625
$X_4$	CaCl <sub>2</sub> (%)	0.037 5	0.05	0.0625
$X_8$	蛋白胨 (%)	0.375	0.5	0.625

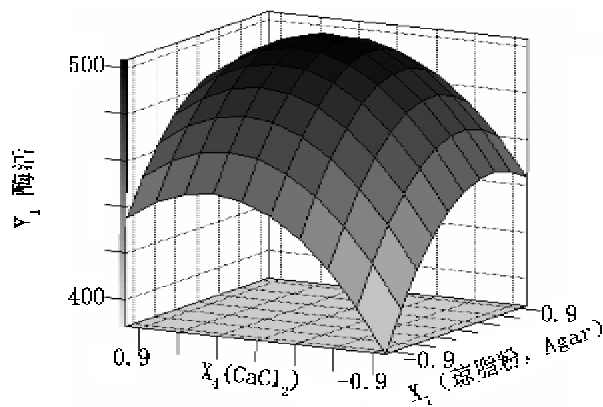
表 4 培养基 3 个显著因子 Box-Behnken 设计及其结果  
Tab. 4 Box-Behnken design ( three main factors and their responses )

试验号 test no.	因子 factor			$Y_1$ (U/mL)
	$X_1$	$X_4$	$X_8$	
1	-1	-1	0	382.7
2	-1	1	0	436.5
3	1	-1	0	427.7
4	1	1	0	460.3
5	0	-1	-1	435.4
6	0	-1	1	440.2
7	0	1	-1	468.6
8	0	1	1	432.5
9	-1	0	-1	420.1
10	1	0	-1	470.4
11	-1	0	1	437.8
12	1	0	1	474.3
13	0	0	0	498.8
14	0	0	0	500.3
15	0	0	0	499.7

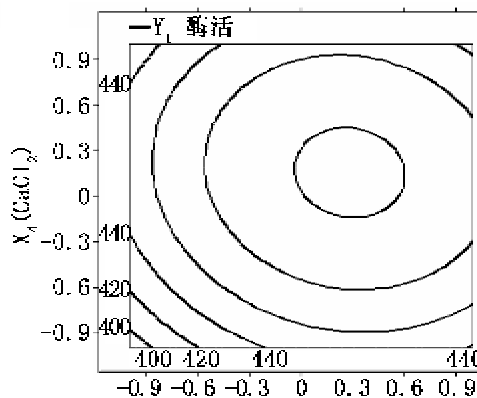
$R^2$  为 0.945 3,表明回归方程拟合度很高。表 6 是关于拟合方程各个参数以及系数值, $P$  的大小说明各个参数对方程的贡献的大小, $P$  越小显著性越大,从方程上看, $(X_1, X_4, X_1^2, X_4^2)$  对方程有显著贡献。经回归拟合后,试验因子对响应值的影响可用回归方程表示为

响可用回归方程表示为

$$Y_1 = 499.6 + 19.45X_1 + 13.99X_4 - 1.213X_8 - 33.16^2X_1 - 5.3X_1X_4 - 3.45X_1X_8 - 39.64X_4^2 - 10.23X_4X_8 - 15.79X_8^2$$



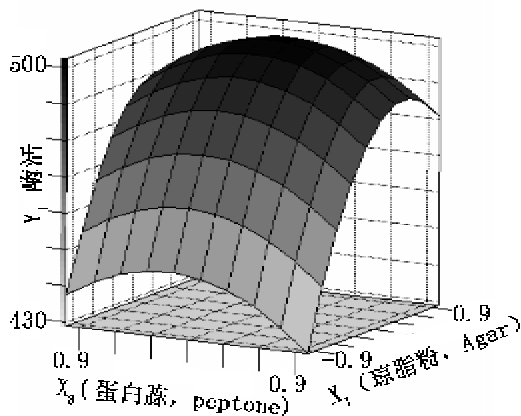
Fixed levels:  $X_8$ (蛋白胨, peptone)=0



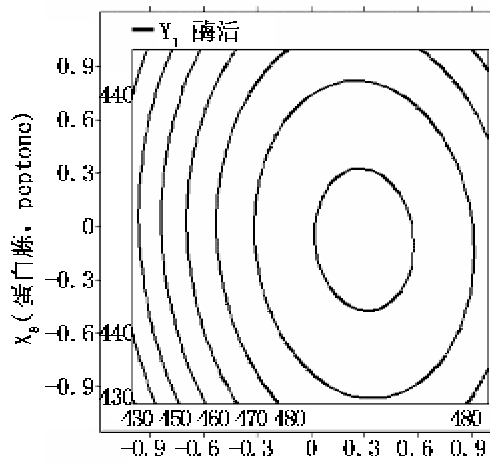
Fixed levels:  $X_8$ (蛋白胨, peptone)=0

图 2 培养基主要因子的响应面立体图和等高线(蛋白胨编码值=0)

Fig.2 Response surface and contour line at fixed concentration of peptone (code=0)



Fixed levels:  $X_4$ (CaCl<sub>2</sub>)=0



Fixed levels:  $X_4$ (CaCl<sub>2</sub>)=0

图 3 培养基主要因子的响应面立体图和等高线(CaCl<sub>2</sub> 编码值=0)

Fig.3 Response surface and contour line at fixed concentration of CaCl<sub>2</sub> (code=0)

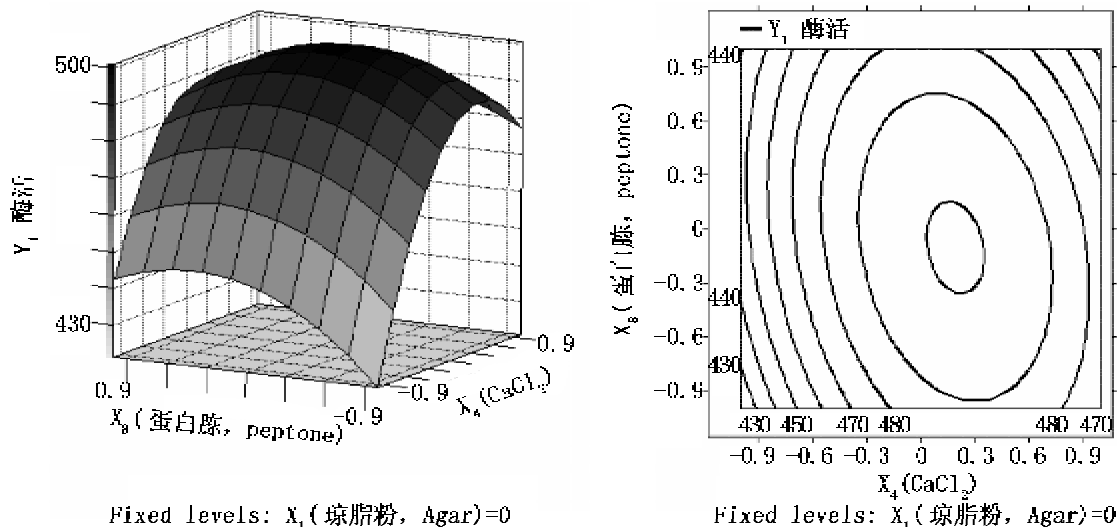


图4 培养基主要因子的响应面立体图和等高线(琼胶粉编码值=0)

Fig. 4 Response surface and contour line at fixed concentration of agar (code = 0)

表5 培养基3个因子响应面的可信度分析  
Tab. 5 Reliability analysis of RSREG procedure for three main factors

	$Y_1$ (U/mL)
响应平均值 response mean	452.353 333
残差平方根 root MSE	13.077 022
相关系数 $R^2$	0.945 3
变异系数 coefficient of variation	2.890 9

表7对拟合方程作出了其极值评估的分析,从表中可知在  $X_1 = 0.285\ 93$ ,  $X_4 = 0.173\ 558$ ,  $X_8 = -0.125\ 846$  时可以取到最大值(最大值是稳定点)503.670 778。换算至未编码值( $X_0$ ):琼

胶粉( $X_{01}$ ) = 0.536,  $\text{CaCl}_2$  ( $X_{04}$ ) = 0.052, 蛋白胨( $X_{08}$ ) = 0.484, 再加上其它5个通过单因子优化得到的最优水平: NaCl 2.5%、 $\text{FePO}_4$  0.1%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%、酵母膏1%。

由图2至图4的响应面立体图可知:3种培养基组分( $X_1, X_4, X_8$ )对琼胶酶酶活的响应值( $Y_1$ )存在极值点。在等高线图平面图中,曲线越陡峭表示因子的效应越大,能揭示出各因子对琼胶酶酶活的影响的显著性。

将上述配方进行多次重复试验,得到的平均酶活为503.3 U/mL。这与计算的数据较吻合。

表6 培养基主要3个因子拟合方程各参数及其系数  
Tab. 6 Parameters and coefficients of three main factors

参数 parameter	自由度 df	估值 estimate	标准差 standard error	t 值 t value	$P >  t $	编码值 coded data
截距 intercept	1	499.600 000	7.550 022	66.17	<0.000 1	499.600 000
$X_1$	1	19.450 000	4.623 425	4.21	0.008 4	19.450 000
$X_4$	1	13.987 500	4.623 425	3.03	0.029 2	13.987 500
$X_8$	1	-1.212 500	4.623 425	-0.26	0.803 6	-1.212 500
$X_1^2$	1	-33.162 500	6.805 498	-4.87	0.004 6	-33.162 500
$X_4 X_1$	1	-5.300 000	6.538 511	-0.81	0.454 4	-5.300 000
$X_4^2$	1	-39.637 500	6.805 498	-5.82	0.002 1	-39.637 500
$X_8 X_1$	1	-3.450 000	6.538 511	-0.53	0.620 3	-3.450 000
$X_8 X_4$	1	-10.225 000	6.538 511	-1.56	0.178 6	-10.225 000
$X_8^2$	1	-15.787 500	6.805 498	-2.32	0.068 1	-15.787 500

表 7 培养基主要 3 个因子拟合方程的极值评估

Tab.7 Critical values of three main factors

因子序号 factor no.	编码临界值 $X$ critical value coded	未编码临界值 $X_0$ (%) critical value uncoded
1	0.285 930	0.535 741
4	0.173 558	0.052 169
8	-0.125 846	0.484 269

### 3 结语

实验证明在单因子实验基础上应用 SAS8.2 软件进行实验设计,对琼胶酶产生菌 *Brevundimonas* sp. DT-7 培养基组分进行优化是非常有效的,可快速确定培养基组成的最佳配方。在 *Brevundimonas* sp. DT-7 正常发酵条件下,优化后的培养基配方(w/v):琼胶粉(碳源)0.536%,蛋白胨(氮源)0.484%, $\text{CaCl}_2$  0.052%, $\text{NaCl}$  2.5%, $\text{FePO}_4$  0.1%, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%,酵母膏 1%。这种配方培养基的组成简单,菌种产酶活力高,有利于对发酵液中的琼胶酶进行分离和纯化,对于将来利用该菌株进行琼胶酶的工业化生产,在生产成本和酶产品精制方面创造了有利的条件。*Brevundimonas* sp. DT-7 在发酵液初始酶活和产酶稳定性方面具有一定的优势,通过进一步的菌种改良,有望成为商业化生产琼胶酶的来源菌株。

#### 参考文献:

- [1] 王静雪,江晓路,牟海津,等.海洋弧菌 QJH-12 发酵产琼胶酶条件的优化[J].海洋科学,2007,31(7):8-14.
- [2] 李能章,邱荣蓉,彭远义.琼胶酶的研究进展[J].

生命科学研究,2006,10(2):62-66.

- [3] Sugano Y, Terada I, Arita M, et al. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107 [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1549-1554.
- [4] Romanenko L A, Zhukova N V, Rohde M, et al. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 53:125-131.
- [5] Ha J C, Kim G T, Kim S K, et al. beta-Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1997, 26: 1-6.
- [6] 徐丽,刘江涛,蔡俊鹏.一株琼胶酶高产菌株的筛选鉴定及产酶条件的优化[J].现代食品科技,2006,22(4):19-22.
- [7] 杜宗军,赵苑,李美菊,等.青岛近海琼胶降解细菌的筛选和多样性分析[J].中国海洋大学学报,2007,33(2):277-282.
- [8] 刘兴旺,赵洪坤,杜连祥,等.利用 SAS 软件优化丙酮丁醇梭状芽孢杆菌产丁醇的发酵条件[J].食品与发酵工业,2007,33(11):44-47.
- [9] 胡运权.试验设计方法[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,1997:153-154.
- [10] 汪远征,徐雅静.SAS 软件与统计应用教程[M].北京:机械工业出版社,2007:129-134.
- [11] 褚以文.微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J].国外医药抗生素分册,1999,20(2):58-61.
- [12] Konya A. Optimization of compact in fermentation [J]. J Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998, 20:150-152.

## Optimization of culture medium components for agarase-producing marine bacterial strain *Brevundimonas* sp. DT-7

SANG Wei-guo, ZHANG Zong-ming

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** The activity of agarase depended on the bacterial growth conditions such as growth medium formula. In this study, we used marine bacterial strain *Brevundimonas* sp. DT-7 as an extracellular agarase producer and optimized the growth medium formula to produce maximum agarase that can be used for producing oligosaccharides from agar on a commercial scale in the future. Eight components in the bacterial culture medium ( $X_1$  agar powder,  $X_2$  NaCl,  $X_3$  FePO<sub>4</sub>,  $X_4$  CaCl<sub>2</sub>,  $X_5$  K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $X_6$  FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,  $X_7$  yeast extract,  $X_8$  peptone) were selected for the optimization. Plackett-Burman design was used in the experiments and the significance of each component ( $X_1 - X_8$ ) contributing to activity of agarase ( $Y_1$ ) was determined. The significant levels were defined at  $P < 0.05$ . The data show that among the eight components, three medium components ( $X_1$  agar powder,  $X_4$  CaCl<sub>2</sub> and  $X_8$  peptone) are significant factors for production of agarase from DT-7. The three significant factors ( $X_1$  agar powder,  $X_4$  CaCl<sub>2</sub> and  $X_8$  peptone) were selected for further analysis using Box-Behnken design. A regression model was obtained by response surface regression method (SAS 8.2) as follows:

$$Y_1 = 499.6 + 19.45X_1 + 13.99X_4 - 1.213X_8 - 33.16X_1^2 - 5.3X_1X_4 - 3.45X_1X_8 - 39.64X_4^2 - 10.23X_4X_8 - 15.79X_8^2$$

The results demonstrate the optimum culture medium components (w/v): 0.536% agar powder, 2.5% NaCl, 0.1% FePO<sub>4</sub>, 0.052% CaCl<sub>2</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1% yeast extract, and 0.484% peptone, respectively. Using those optimized culture components and combined with other culture conditions [50 mL culture medium in 250 mL flask, initial pH 7.5, shaken at 120 r/min, incubated at (23 ± 1) °C for 28 h], the agarase activity of 503.3 U/mL was obtained, which was significantly higher than that of 372.0 U/mL when the culture medium was not optimized. We conclude that (1) using SAS software is a very effective and quick way to optimize a bacterial growth culture medium; (2) the culture medium optimized in this study is simply formulated and can be used for production of high activity of agarase at low cost; (3) with further modification and improvement, *Brevundimonas* sp. DT-7 can be a source bacterium for production of agarase on a commercial scale. This is a preliminary study. Further research will be required to evaluate *Brevundimonas* sp. DT-7 in commercial application.

**Key words:** agarase; *Brevundimonas* sp.; response surface