

## 研究报告

## 淀粉酶产生菌的筛选、鉴定及其发酵条件优化

王屈祎<sup>1,2</sup>, 钟倩<sup>1</sup>, 闫如玉<sup>1</sup>, 马醒佳<sup>1</sup>, 王会<sup>1</sup>, 刘思瑜<sup>1</sup>, 吴凌天<sup>\*1,3,4,5</sup>

1 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500

2 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816

4 江苏久吾高科技股份有限公司, 江苏 南京 211808

5 张家港市滨江有机农庄有限责任公司, 江苏 苏州 215618

王屈祎, 钟倩, 闫如玉, 马醒佳, 王会, 刘思瑜, 吴凌天. 淀粉酶产生菌的筛选、鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 173-188

Wang Quyi, Zhong Qian, Yan Ruyu, Ma Xingjia, Wang Hui, Liu Siyu, Wu Lingtian. Screening and identification of amylase-producing strain and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 173-188

**摘 要:**【背景】淀粉酶可以水解淀粉, 在淀粉制糖、白酒、黄酒、啤酒和食醋等食品发酵行业有着广泛的应用。【目的】从高温酒曲中筛选获得产淀粉酶的芽孢杆菌属菌株, 并对其进行分类鉴定和产淀粉酶发酵条件优化, 为发酵过程提供优良的淀粉酶资源。【方法】取高温酒曲, 经过富集培养和可溶性淀粉平板筛选培养基初筛, 摇瓶复筛得到高产淀粉酶的菌株; 通过菌落形态、革兰氏染色观察和 16S rRNA 基因序列比对进行菌株鉴定; 通过单因素试验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken design 试验考察培养基成分(碳源、氮源和金属离子)和发酵条件(温度、pH 和接种量)对淀粉酶产量的影响, 确定最佳产淀粉酶培养基和发酵条件, 并将淀粉酶应用于淀粉水解。【结果】筛选获得一株高产淀粉酶的菌株 LT-2, 经鉴定为 *Bacillus velezensis* LT-2; *B. velezensis* LT-2 产淀粉酶的最佳发酵参数为: 麦芽糖 8.00 g/L, 大豆分离蛋白 8.69 g/L, 氯化铵 3.00 g/L, 氯化钙 13.94 mmol/L, 发酵初始 pH 7.5, 温度 34.08 °C, 接种量 6%。在最佳发酵参数下, *B. velezensis* LT-2 经 33 h 发酵淀粉酶产量为 972.88 U/mL, 是优化前的 5.01 倍; 5 L 发酵罐中发酵, *B. velezensis* LT-2 发酵 51 h 淀粉酶产量可达(1 198.40±4.56) U/mL, 是摇瓶发酵的 1.23 倍, 是发酵参数优化前摇瓶发酵的 6.17 倍; *B. velezensis* LT-2 所产淀粉酶具有较好的淀粉水解能力, 水解速率为  $6.17 \times 10^{-5}$  g/(U·h)。【结论】*B. velezensis* LT-2 在淀粉酶分泌和淀粉水解方面具有良好的

基金项目: 国家自然科学基金(21908011); 中国博士后基金(2020M681571); 江苏省自然科学基金(BK20191028); 张家港市科技支撑计划(ZKN2008)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21908011); China Postdoctoral Science Foundation (2020M681571); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191028); Zhangjiagang Science and Technology Development Project (ZKN2008)

\*Corresponding author: E-mail: wlt913@csjg.edu.cn

Received: 2021-03-26; Accepted: 2021-07-08; Published online: 2021-09-13

应用前景, 研究结果为酒曲糖化能力和液化力的改善提供了理论支持。

**关键词:** 淀粉酶; 筛选鉴定; 发酵条件优化; 贝莱斯芽孢杆菌; 酶活

## Screening and identification of amylase-producing strain and optimization of the fermentation conditions

WANG Quyi<sup>1,2</sup>, ZHONG Qian<sup>1</sup>, YAN Ruyu<sup>1</sup>, MA Xingjia<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, LIU Siyu<sup>1</sup>, WU Lingtian<sup>\*1,3,4,5</sup>

1 College of Biological and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, Jiangsu, China

2 College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China

3 College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

4 Jiangsu Jiuwu High-Tech Company Limited, Nanjing 211808, Jiangsu, China

5 Zhangjiagang Binjiang Organic Farm Company Limited, Suzhou 215618, Jiangsu, China

**Abstract: [Background]** Amylase hydrolyses starch and has a wide range of applications in the food fermentation industry, including starch-based sugar, white wine, yellow wine, beer, and vinegar. **[Objective]** In order to provide excellent amylase resources, an amylase-producing *Bacillus* strain was screened from high-temperature Jiuqu, and its classification and identification were carried out, and the fermentation conditions of amylase production were optimized. **[Methods]** The *Bacillus* strain was identified by colony morphology, Gram staining, and 16S rRNA gene sequence analysis. The effects of medium composition (carbon source, nitrogen source, and metal ions) and fermentation conditions (temperature, pH, and inoculum size) on amylase production was evaluated by single factor experiment, Plackett-Burman experiment, steepest climb experiment, and Box-Behnken design experiment. The optimum medium and fermentation conditions were applied to amylase production using starch hydrolysis. **[Results]** A high amylase producing strain LT-2 was obtained and identified as *Bacillus velezensis* LT-2. The optimum fermentation parameters for amylase production by *B. velezensis* LT-2 are maltose 8.00 g/L, soy protein isolate 8.69 g/L, ammonium chloride 3.00 g/L, calcium chloride 13.94 mmol/L, initial fermentation pH 7.5, temperature 34.08 °C, and inoculum size 6%. *B. velezensis* LT-2 had an extracellular amylase activity of 972.88 U/mL in 33 h incubation under optimal fermentation parameters, which was 5.01 times higher than that before optimization; it had an amylase production of (1 198.40±4.56) U/mL in 51 h incubation in a 5 L fermenter, which was 1.23 times higher than in shake flask level and 6.17 times higher than in shake flask level (before optimization). The amylase produced by *B. velezensis* LT-2 had a good starch hydrolysis ability, and the hydrolysis rate was  $6.17 \times 10^{-5}$  g/(U·h). **[Conclusion]** *B. velezensis* LT-2 has promising applications in amylase secretion and starch hydrolysis, which provides theoretical support for the improvement of saccharification capacity and liquefaction power of Jiuqu.

**Keywords:** amylase; screening and identification; fermentation parameters optimization; *Bacillus velezensis*; enzyme activity

淀粉酶来源广泛, 如植物、动物、细菌和真菌<sup>[1-2]</sup>, 能将淀粉水解为糊精和一系列以葡萄糖为组成单位的低聚糖。由于其具有温和、高效和专一的特点, 淀粉酶的应用已遍布各个领域, 包括食品、制药、纺织和造纸等行业, 是目前生产量最大、应用范围最广的一种水解酶<sup>[3-6]</sup>。

众所周知, 酒是由优质粮谷类(淀粉)为原材料制成的, 而酒曲在酿酒过程中具有糖化、发酵和生香等作用, 其中淀粉糖化程度可以直接影响到酒的产量及质量<sup>[7]</sup>。覃雪珍等<sup>[8]</sup>研究表明添加淀粉酶可以提高浓香型白酒的出酒率和酒体品质; 安琦琦<sup>[9]</sup>研究表明淀粉酶的添加不仅可以提高出酒率, 还能缩短清香型白酒发酵周期; 钟浩等<sup>[10]</sup>在黄酒生产过程中添加淀粉酶, 结果显示黄酒出酒率明显提升, 高达 92.06%, 其感官评价结果也得到了提升。目前, 产淀粉酶的菌株主要是芽孢杆菌属微生物<sup>[6]</sup>, 如凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等。虽然放线菌、霉菌等也能产淀粉酶<sup>[6]</sup>, 但就芽孢杆菌产酶量高、发酵周期短、成本低和易于规模化生产等优势来看, 其更有发展前景。因此, 本文拟从高温酒曲中筛选获得产淀粉酶的芽孢杆菌属菌株, 对其进行分类鉴定并优化产酶培养基和发酵条件, 为改善酒曲糖化能力和液化力提供支持, 以便有效控制酒曲制备工艺与酒曲质量, 这对提高白酒的品质有着重要的理论意义和实践价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器及培养基

高温酒曲为市购; 胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司; 基因组小提试剂

盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 其余试剂和药品均为国产分析纯。

超净工作台、高速冷冻离心机, 上海善志仪器设备有限公司; 高压蒸汽灭菌锅、5 L 发酵罐, 上海百仑生物科技有限公司; 恒温培养箱、全温摇床, 苏州培英试验设备有限公司; pH 计, 上海雷磁仪器仪器有限公司; 酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 核酸电泳仪: Bio-Rad 公司。

富集培养基(g/L): 酵母浸膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 可溶性淀粉 5.0, 供产淀粉酶菌株富集。

筛选培养基(g/L): 牛肉膏 0.5, 酵母粉 10.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 可溶性淀粉 10.0, 琼脂 20.0, 供产淀粉酶菌株筛选。

LB 培养基成分与李习<sup>[11]</sup>报道一致, 供细菌活化。

### 1.2 种子液培养方法

将 *Bacillus velezensis* LT-2 (贝莱斯芽孢杆菌 LT-2, 以下简称菌株 LT-2) 在 LB 平板上 37 °C 条件下活化 24 h, 形成单菌落后用接种环接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 条件下培养 12–16 h, 得种子液。

### 1.3 淀粉酶产生菌株的筛选与鉴定

称取 1 g 高温酒曲加入富集培养基中, 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h 后进行梯度稀释( $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ ), 采用  $10^{-5}$  稀释液涂布于筛选培养基上, 30 °C 培养 2 d。向筛选培养基滴加卢戈氏碘液后测定透明圈直径( $D$ )和菌落直径( $d$ ), 并计算  $D/d$  值。

以基因组小提试剂盒提取  $D/d$  值最高的菌株基因组 DNA, 以电泳验证后的基因组 DNA 为模板, 采用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCT

GGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因片段。PCR 产物经胶回收试剂盒回收纯化后,送至苏州金唯智生物科技有限公司测序,测序结果提交 GenBank 数据库,并将所测序列进行相似性比对,构建系统发育树。

#### 1.4 菌株 LT-2 产淀粉酶的发酵培养基优化

以 LB 液体培养基为基础培养基,在接种量为 3%、初始 pH 值为 6.5、培养温度为 37 °C、摇床转速为 200 r/min 条件下,以淀粉酶产量为响应值,对碳源(菊粉、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、果糖和乳糖浓度分别为 10.0 g/L)、麦芽糖(浓度为 2.0–18.0 g/L)、有机氮源(胰蛋白胨、玉米浆干粉、黄豆饼粉、酵母膏、麦芽浸粉、大豆分离蛋白和蛋白胨浓度分别为 10.0 g/L)、大豆分离蛋白(浓度为 2.0–16.0 g/L)、无机氮源(尿素、氯化铵、硝酸铵、硝酸钠、磷酸二氢铵、磷酸氢二铵、亚硝酸铵和硝酸钙浓度分别为 5.0 g/L)、氯化铵(浓度为 1.5–12.0 g/L)、金属离子(氯化钙、氯化锌、氯化镁、氯化钡和硫酸锰浓度分别为 1.0 mmol/L)、氯化钙(浓度为 1.0–30.0 mmol/L)进行优化。

#### 1.5 菌株 LT-2 产淀粉酶的发酵条件优化

在 1.4 的基础上,以淀粉酶产量为响应值,对发酵温度(24–38 °C)、发酵液初始 pH 值(3.5–10.5)和接种量(1%–8%)进行优化。

#### 1.6 Plackett-Burman 试验

在单因素优化结果的基础上,利用 Plackett-Burman 试验<sup>[12]</sup>从 7 个因子(麦芽糖、大豆分离蛋白、氯化铵、氯化钙、温度、pH 和接种量)中筛选出对菌株 LT-2 淀粉酶产量具有显著影响的因子。

#### 1.7 最陡爬坡试验

为确定最佳响应值区域,建立响应面的拟合方程,采用最陡爬坡试验进一步确定影响

*B. velezensis* LT-2 产淀粉酶活力因素的最佳参数。

#### 1.8 Box-Behnken design 响应面试验

根据最陡爬坡试验结果,采用 Box-Behnken Design (BBD)试验对淀粉酶活力影响最大的 4 个因素(大豆分离蛋白、pH、温度和氯化钙)进行优化试验,以确定菌株 LT-2 最佳产酶条件。

#### 1.9 菌株 LT-2 分批发酵产淀粉酶

在最佳发酵参数条件下,分别在 5 L 发酵罐和 500 mL 摇瓶中进行淀粉酶发酵,每 3 h 取样测定淀粉酶活力和菌体量,绘制淀粉酶活力曲线和菌体生长曲线。摇瓶发酵产淀粉酶:以 4%的接种量将种子液接种于 100 mL 发酵培养基中,在 30 °C、200 r/min 条件下发酵培养 24 h。发酵罐发酵产淀粉酶条件:以 6%的接种量将种子液接种于 3 L 发酵培养基中,在 34 °C、300 r/min 条件下发酵培养, pH (7.50±0.05),通气量为 1.1 vvm。

#### 1.10 菌株 LT-2 淀粉酶水解淀粉

将 1.9 中所获发酵液在 4 °C、5 000 r/min 条件下离心 20 min,上清液即粗淀粉酶液。将 9 500 U 淀粉酶加入淀粉溶液中,混匀后在 37 °C、pH 6.5 条件下进行水解反应,每隔 0.5 h 取样,用 DNS 法测定样品中还原糖含量。

#### 1.11 分析方法

淀粉酶酶活参照杨心意<sup>[13]</sup>和苟亚峰<sup>[14]</sup>报道的方法测定,菌体干重参照 Wang 等<sup>[15]</sup>报道的方法测定。

## 2 结果与分析

#### 2.1 菌株的筛选和鉴定

通过筛选获得 12 株产淀粉酶菌株,其中菌株 LT-2 产酶能力较强。由图 1A 可知,菌株 LT-2 菌落边缘粗糙且不规则,菌落起皱呈白色;菌体为杆状,有芽孢,革兰氏染色呈阳性(图 1B);

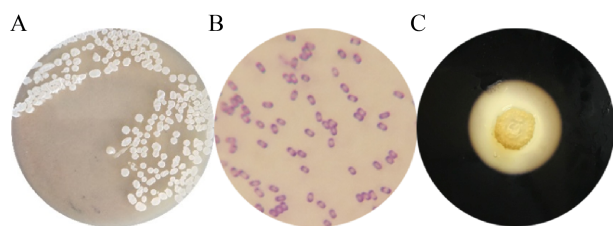


图1 菌株 LT-2 的菌落形态(A)、细胞显微镜检图(B)和卢戈氏碘液染色图(C)

Figure 1 Colony morphology (A), photomicrograph (B) and the graph of Lugol's iodine staining (C) of strain LT-2.

从卢戈氏碘液染色显色透明圈可知菌株 LT-2 可分泌淀粉酶, 而且  $D/d$  值达到 2.56 (图 1C)。

以菌株 LT-2 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得 16S rRNA 基因片段, 测序后提交 GenBank 数据库并进行同源比对, 发现菌株 LT-2 与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) zjt9 的一致性达到 100%。根据菌株形态和测序分析结果将菌株 LT-2 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) LT-2 (GenBank 登录号 MN822654) (图 2)。

## 2.2 发酵培养基优化

### 2.2.1 碳源对菌体量和淀粉酶产量的影响

碳源是培养基的主要成分, 其主要功能是为合成菌体提供碳骨架并为微生物生长提供能源。由图 3A 可知, 以菊粉、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖为唯一碳源时, 菌株 LT-2 菌体量基本一致, 但以麦芽糖为碳源时, 淀粉酶产量远高于其他碳源。虽然麦芽糖和葡萄糖均为淀粉水解产物, 但以葡萄糖为碳源时的淀粉酶产量仅为麦芽糖的 74.65%。由图 3B 可知, 随着麦芽糖浓度的增加淀粉酶活力逐步增加; 当麦芽糖浓度为 8–10 g/L 时淀粉酶活力达到最大值, 继续增加麦芽糖浓度, 淀粉酶产量反而下降。因此, 最佳麦芽糖浓度为 8 g/L。

### 2.2.2 有机氮对菌体量和淀粉酶产量的影响

氮源是菌体合成氨基酸、蛋白质、核酸及含氮代谢物的物质。由图 4A 可知, 黄豆饼粉、酵母浸膏和麦芽浸粉可以促进菌体快速繁殖, 但淀粉酶产量并未随着菌体量的增加而增

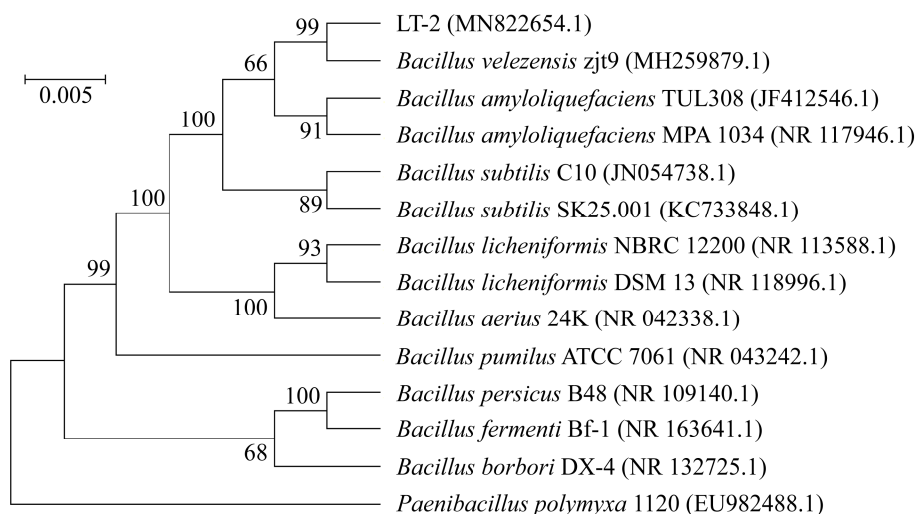
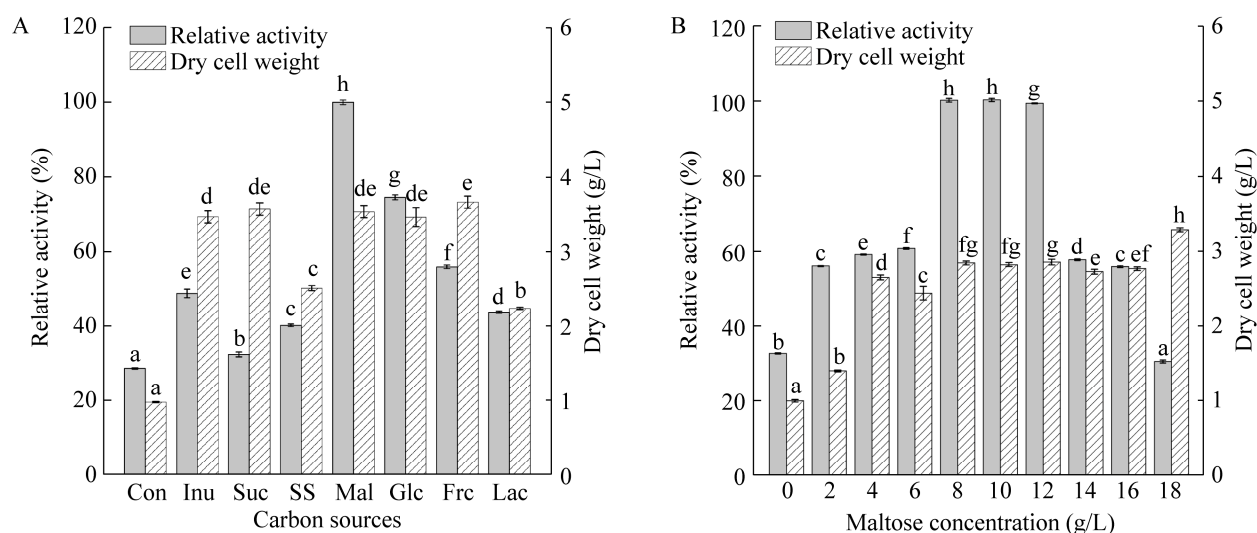


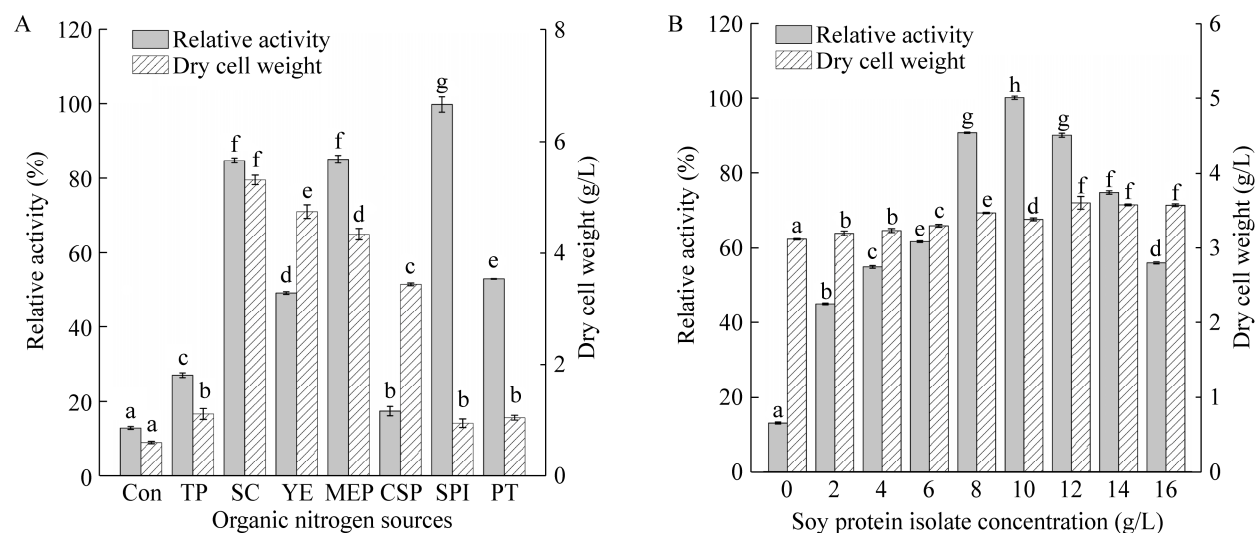
图2 菌株 LT-2 与其他相近菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号是相关菌株的登录号, 分支点上的数字是 bootstrap 支持率, 标尺刻度 0.005 是序列差异的分支长度

Figure 2 Phylogenetic tree based on a comparison of the 16S rRNA gene sequences of strain LT-2 and related strains. Numbers in parentheses are the accession numbers of related strains, the numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap, bar=0.005 is nucleotide divergence.



**图 3 碳源种类(A)和麦芽糖浓度(B)对菌体量及淀粉酶产量的影响** Con: 对照; Inu: 菊粉; Suc: 蔗糖; SS: 可溶性淀粉; Mal: 麦芽糖; Glc: 葡萄糖; Frc: 果糖; Lac: 乳糖。不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同

Figure 3 Effects of carbon sources (A) and maltose concentrations (B) on cell biomass and amylase production. Con: Control; Inu: Inulin; Suc: Sucrose; SS: Soluble starch; Mal: Maltose; Glc: Glucose; Frc: Fructose; Lac: Lactose. Different lowercase letters mean significant ( $P<0.05$ ). The same below.



**图 4 有机氮种类(A)和大豆分离蛋白浓度(B)对菌体量及淀粉酶产量的影响** Con: 对照; TP: 胰蛋白胨; SC: 黄豆饼粉; YE: 酵母浸膏; MEP: 麦芽浸粉; CSP: 玉米浆干粉; SPI: 大豆分离蛋白; PT: 蛋白胨

Figure 4 Effects of organic nitrogen sources (A) and soy protein isolate concentrations (B) on cell biomass and amylase production. Con: Control; TP: Tryptone; SC: Soybean cake powder; YE: Yeast extract; MEP: Malt extract powder; CSP: Corn steep powder; SPI: Soy protein isolate; PT: Peptone.



加。当以大豆分离蛋白为有机氮源时, 虽然菌体量仅为 $(0.95 \pm 0.08)$  g/L, 但淀粉酶产量最高, 是对照组的 7.71 倍。由图 4B 可知, 随着大豆分离蛋白浓度的升高, 菌体量缓慢上升, 淀粉酶产量也不断上升, 当浓度为 10 g/L 时淀粉酶产量最大, 随后淀粉酶产量急剧下降, 因此选择 10 g/L 为最佳大豆分离蛋白浓度。

### 2.2.3 无机氮源对菌体量和淀粉酶产量的影响

如图 5A 所示, 尿素、硝酸钙和硝酸钠不仅抑制菌体生长, 也降低了淀粉酶的产量。添加硝酸铵、硫酸铵和氯化铵菌体量有所增加, 而且淀粉酶产量较对照组显著增加, 可以推测铵根离子可诱导菌体产淀粉酶; 氯化铵可以显著增加淀粉酶产量, 产量约为对照组的 2.0 倍。由图 5B 可知, 菌体生物量和淀粉酶产量均随氯化铵浓度的增加而增加, 当氯化铵浓度为 3.0 g/L 时淀粉酶产量达到最高, 因此选择 3.0 g/L 为最

佳氯化铵浓度。

### 2.2.4 金属离子对菌体量和淀粉酶产量的影响

如图 6A 所示, 氯化镁、氯化钙、氯化钡可增加淀粉酶产量, 其中氯化钙的促进作用最为显著, 约为对照组的 3.3 倍, 其原因可能是  $\text{Ca}^{2+}$  的存在增加了酶的刚性, 可使淀粉酶保持稳定的构象<sup>[16]</sup>。随着氯化钙浓度的增加, 淀粉酶产量显著增加, 15 mmol/L 氯化钙对酶产量的促进效果最佳, 当氯化钙浓度大于 15 mmol/L 时, 淀粉酶产量逐渐下降(图 6B)。

## 2.3 发酵条件优化

### 2.3.1 发酵温度对菌体量和淀粉酶产量的影响

如图 7A 所示: 当温度为 24–30 °C 时淀粉酶产量较低, 这可能与低温条件下菌株生长缓慢相关; 当温度为 34 °C 时淀粉酶产量达到最高, 此时菌体代谢旺盛, 致使淀粉酶大量表达。

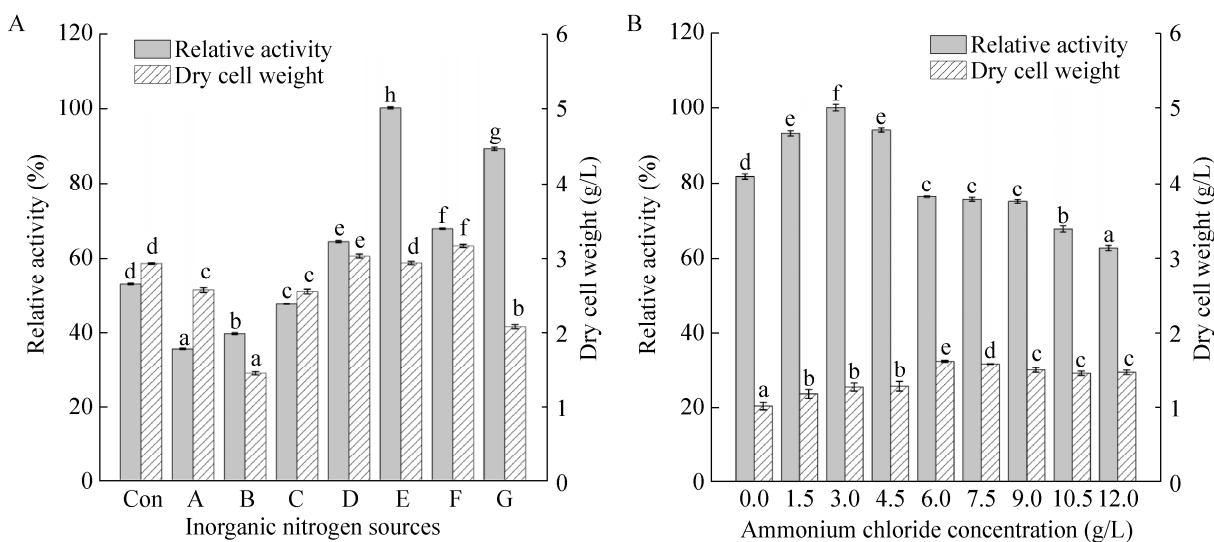


图 5 无机氮种类(A)和氯化铵浓度(B)对菌体量及淀粉酶产量的影响 Con: 对照; A: 尿素; B: 硝酸钙; C: 硝酸钠; D: 硝酸铵; E: 氯化铵; F: 硫酸铵; G: 磷酸氢二铵

Figure 5 Effects of inorganic nitrogen sources (A) and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  concentrations (B) on cell biomass and amylase production. Con: Control; A: Urea; B: Calcium nitrate anhydrous; C: Sodium nitrate; D: Ammonium nitrate; E: Ammonium chloride; F: Ammonium sulfate; G: Ammonium phosphate.

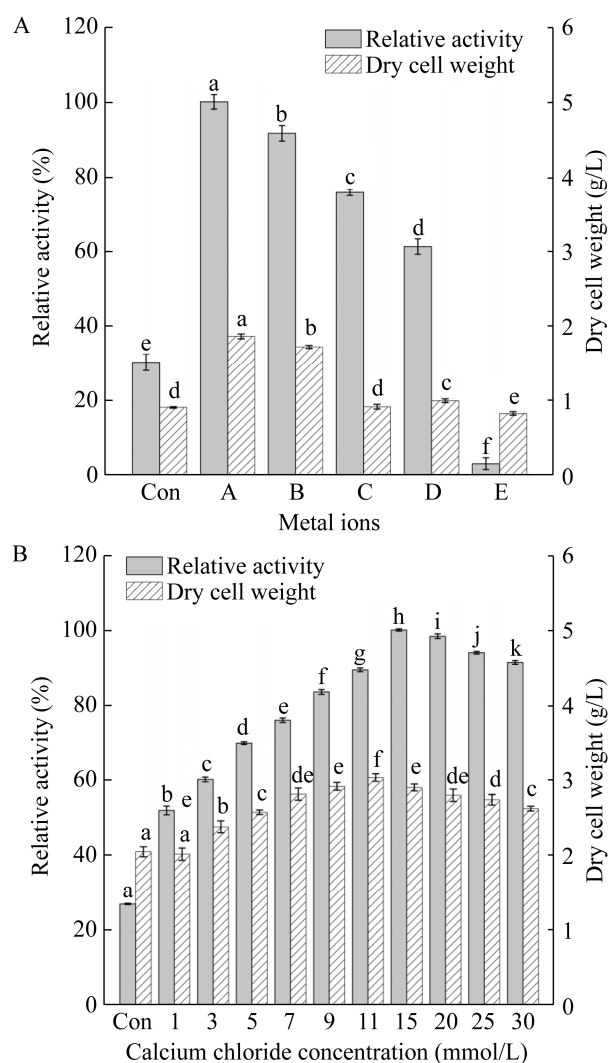


图 6 金属离子种类(A)和氯化钙浓度(B)对菌体量及淀粉酶产量的影响 Con: 对照; A: 氯化钙; B: 硫酸锰; C: 氯化镁; D: 氯化钡; E: 氯化锌

Figure 6 Effects of metal ions (A) and CaCl<sub>2</sub> concentrations (B) on cell biomass and amylase production. Con: Control; A: Calcium chloride; B: Manganese sulphate; C: Magnesium chloride; D: Barium chloride; E: Zinc chloride.

### 2.3.2 发酵液初始 pH 对菌体量和淀粉酶产量的影响

由图 7B 可知, pH 值增大可促进淀粉酶分泌, 当 pH 值为 7.5 时产酶量最大; 在偏碱性和偏酸性条件下, 菌株生长受到抑制, 导致淀粉酶表达量低, 这与郦金龙等<sup>[17]</sup>报道一致。

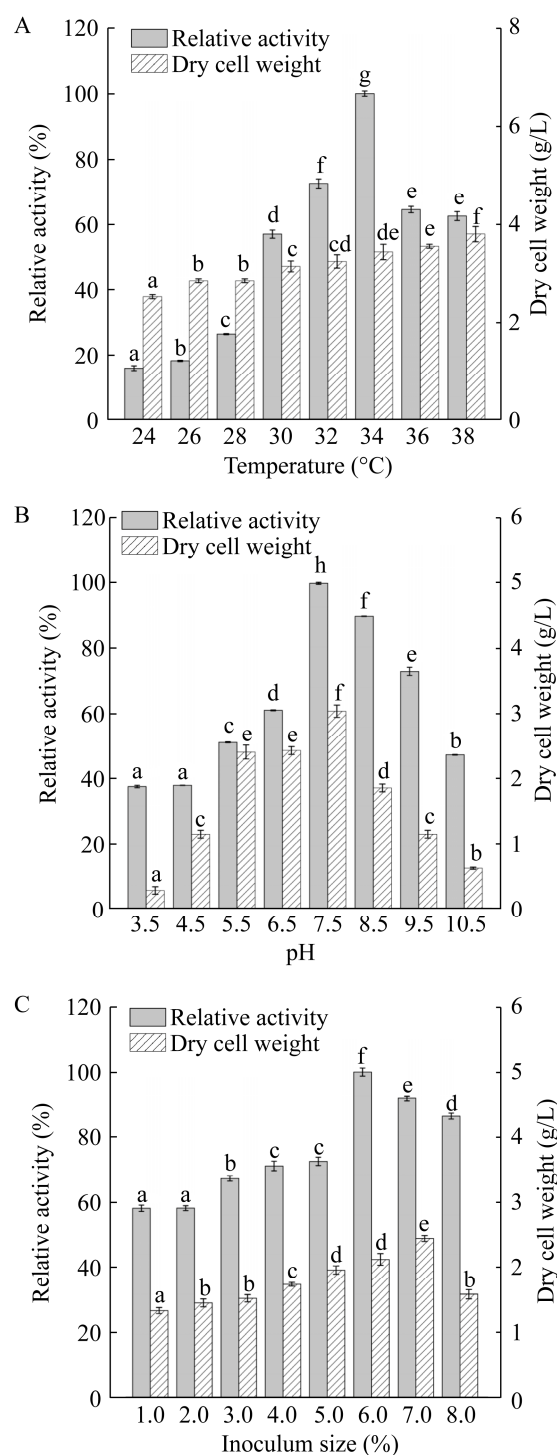


图 7 发酵温度(A)、发酵液初始 pH (B)和接种量 (C)对菌体量及淀粉酶产量的影响

Figure 7 Effects of temperature (A), pH (B) and inoculum size (C) on cell biomass and amylase production.



### 2.3.3 接种量对菌体量和淀粉酶产量的影响

如图 7C 所示,接种量在 1.0%–6.0%时,淀粉酶产量随接种量的增加而增加,接种量为 6.0%时,酶产量达到最大;当接种量大于 6.0%,淀粉酶产量随接种量的增加而减少。因此,选择接种量为 6.0%为最佳接种量。

### 2.4 Plackett-Burman 试验

Plackett-Burman 试验设计及结果如表 1 所示。由表 2 可知,  $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_6$  和  $X_7$  是构建模型的主要影响因素( $P < 0.05$ ),因此选取变量  $X_2$ 、

$X_4$ 、 $X_6$  和  $X_7$  进一步优化试验。

### 2.5 最陡爬坡试验

为了逼近  $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_6$  和  $X_7$  的最大响应区域,根据表 2 设计爬坡方案,如表 3 所示。试验组 3 条件下,淀粉酶产量最高(836.04 U/mL),因此选择试验组 3 作为中心点。

### 2.6 Box-Behnken design 试验结果

为确定  $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_6$  和  $X_7$  的交互作用,进行四因素三水平的响应面实验,试验设计与结果如表 4 所示。

表 1 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 1 Design matrix and experimental results of Plackett-Burman design

Assay	Variable levels							Amylase activity (U/mL)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	
1	-1	1	-1	1	1	-1	1	356.89±2.12
2	-1	-1	1	-1	1	1	-1	831.21±3.68
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	716.79±3.18
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	840.79±2.02
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	588.47±3.08
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	428.07±1.56
7	1	1	-1	1	1	1	-1	528.00±4.24
8	-1	1	1	-1	1	1	1	768.32±3.16
9	1	-1	1	1	-1	1	1	832.08±2.02
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	796.99±2.52
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	772.93±2.62
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	356.89±2.12

注:  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$  和  $X_7$  分别为麦芽糖、大豆分离蛋白、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、pH、接种量、温度和  $\text{CaCl}_2$

Note:  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$  and  $X_7$  are maltose, soy protein isolate,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH, inoculum, temperature and  $\text{CaCl}_2$  respectively.

表 2 Plackett-Burman 试验显著性分析表

Table 2 Significance analysis of Plackett-Burman experiments

Factors	Variable	Low level	High level	Coefficient	SE <sup>a</sup>	F-value	P-value
麦芽糖 Maltose	$X_1$	6.0	12.0	22.98	12.62	3.32	0.142 7
大豆分离蛋白 Soy protein isolate	$X_2$	6.0	12.0	-117.40	12.62	86.56	0.000 7 <sup>b</sup>
$\text{NH}_4\text{Cl}$	$X_3$	2.0	6.0	30.82	12.62	5.97	0.071 0
pH	$X_4$	6.5	8.5	-59.37	12.62	22.13	0.009 3 <sup>b</sup>
接种量 Inoculum size	$X_5$	5.0	7.0	-19.01	12.62	2.27	0.206 5
温度 Temperature	$X_6$	32.0	36.0	43.51	12.62	11.89	0.026 1 <sup>b</sup>
$\text{CaCl}_2$	$X_7$	11.0	17.0	45.43	12.62	12.96	0.022 8 <sup>b</sup>

注: <sup>a</sup>: 标准误差; <sup>b</sup>: 显著影响因子;  $R^2=0.973\ 2$ ;  $R^2_{\text{Adj}}=0.926\ 2$ ;  $R^2_{\text{Pre}}=0.758\ 5$

Note: <sup>a</sup>: Standard error; <sup>b</sup>: Significant effect factor;  $R^2=0.973\ 2$ ;  $R^2_{\text{Adj}}=0.926\ 2$ ;  $R^2_{\text{Pre}}=0.758\ 5$ .

表 3 最陡爬坡试验设计结果

Table 3 Results of the steepest climb experimental design

Assay	$X_2$ (g/L)	$X_4$	$X_6$ (°C)	$X_7$ (mmol)	Amylase activity (U/mL)
1	12.0	8.5	32	11.0	494.03±1.25
2	10.5	8.0	33	12.5	630.83±2.55
3	9.0	7.5	34	14.0	836.04±3.45
4	7.5	7.0	35	15.5	752.44±2.98
5	6.0	6.5	36	17.0	718.24±1.26

注:  $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_6$  和  $X_7$  分别是大豆分离蛋白、pH、温度和  $\text{CaCl}_2$

Note:  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_6$  and  $X_7$  are soy protein isolate, pH, temperature and  $\text{CaCl}_2$  respectively.

表 4 Box-Behnken design 试验设计及结果

Table 4 Design matrix and experimental results of Box-Behnken design

Assay	Factors				Amylase activity (U/mL)	
	$X_2$	$X_4$	$X_6$	$X_7$	Observed	Predicted
1	7.5 (-1)	7.0 (-1)	34 (0)	14 (0)	648.03±5.66	635.95
2	10.5 (1)	7.0 (-1)	34 (0)	14 (0)	720.04±3.77	722.62
3	7.5 (-1)	8.0 (1)	34 (0)	14 (0)	808.04±1.87	807.96
4	10.5 (1)	8.0 (1)	34 (0)	14 (0)	512.03±5.89	526.61
5	9.0 (0)	7.5 (0)	33 (-1)	11 (-1)	632.03±5.66	633.28
6	9.0 (0)	7.5 (0)	35 (1)	11 (-1)	760.04±5.21	756.29
7	9.0 (0)	7.5 (0)	33 (-1)	17 (1)	761.04±3.74	767.29
8	9.0 (0)	7.5 (0)	35 (1)	17 (1)	640.03±5.66	641.28
9	7.5 (-1)	7.5 (0)	34 (0)	11 (-1)	768.04±3.77	765.33
10	10.5 (1)	7.5 (0)	34 (0)	11 (-1)	648.03±5.61	631.99
11	7.5 (-1)	7.5 (0)	34 (0)	17 (1)	728.04±1.87	738.83
12	10.5 (1)	7.5 (0)	34 (0)	17 (1)	680.03±1.47	677.49
13	9.0 (0)	7.0 (-1)	33 (-1)	14 (0)	552.03±5.56	536.16
14	9.0 (0)	8.0 (1)	33 (-1)	14 (0)	808.04±1.41	804.17
15	9.0 (0)	7.0 (-1)	35 (1)	14 (0)	816.04±1.27	814.67
16	9.0 (0)	8.0 (1)	35 (1)	14 (0)	512.03±5.26	522.66
17	7.5 (-1)	7.5 (0)	33 (-1)	14 (0)	584.03±3.35	590.82
18	10.5 (1)	7.5 (0)	33 (-1)	14 (0)	720.04±2.13	725.50
19	7.5 (-1)	7.5 (0)	35 (1)	14 (0)	824.04±3.14	821.33
20	10.5 (1)	7.5 (0)	35 (1)	14 (0)	496.03±5.26	491.99
21	9.0 (0)	7.0 (-1)	34 (0)	11 (-1)	696.04±2.02	718.66
22	9.0 (0)	8.0 (1)	34 (0)	11 (-1)	704.04±1.07	702.66
23	9.0 (0)	7.0 (-1)	34 (0)	17 (1)	720.04±1.17	724.16
24	9.0 (0)	8.0 (1)	34 (0)	17 (1)	736.04±5.16	716.16
25	9.0 (0)	7.5 (0)	34 (0)	14 (0)	960.05±1.57	949.07
26	9.0 (0)	7.5 (0)	34 (0)	14 (0)	936.05±2.22	949.07
27	9.0 (0)	7.5 (0)	34 (0)	14 (0)	944.05±3.14	949.07
28	9.0 (0)	7.5 (0)	34 (0)	14(0)	960.48±4.58	949.07
29	9.0 (0)	7.5 (0)	34 (0)	14 (0)	944.72±1.81	949.07

注:  $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_6$  和  $X_7$  分别是大豆分离蛋白、pH、温度和  $\text{CaCl}_2$

Note:  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_6$  and  $X_7$  are soy protein isolate, pH, temperature and  $\text{CaCl}_2$  respectively.

由表 5 可知, 模型极显著( $P<0.001$ ), 失拟项不显著( $P=0.279 \ 2>0.05$ ),  $R^2=0.994 \ 8$ ,  $R^2_{\text{Adj}}(0.989 \ 5)$ 和 $R^2_{\text{Pre}}(0.973 \ 6)$ 的差值 $<0.02$ , 说明模型预测值与实际值的拟合度较高<sup>[18]</sup>, 适用于菌株 LT-2 发酵产淀粉酶的预测分析<sup>[19]</sup>。该模型  $X_2$ 、 $X_2X_4$ 、 $X_2X_6$ 、 $X_4X_6$ 、 $X_6X_7$ 、 $X_2^2$ 、 $X_4^2$ 、 $X_6^2$  和  $X_7^2$  影响极显著( $P<0.001$ ); 考虑显著项, 运用 Design Expert 10.04 进行二次线性回归拟合, 得到回归方程:  $Y=949.07-48.67X_2-6.00X_4-0.75X_6+$

表 5 Box-Behnken design 试验回归方程和方差分析

Table 5 Experimental regression equations and analysis of variance of Box-Behnken design

Source	SS <sup>a</sup>	DF <sup>b</sup>	MS <sup>c</sup>	F-value	Probe>F
Model	5.08×10 <sup>5</sup>	14	3.63×10 <sup>3</sup>	189.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>2</sub>	2.84×10 <sup>4</sup>	1	2.84×10 <sup>4</sup>	148.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>4</sub>	4.32×10 <sup>2</sup>	1	4.32×10 <sup>2</sup>	23.00	0.155 3
X <sub>6</sub>	0.68×10 <sup>1</sup>	1	0.68×10 <sup>1</sup>	350.00	0.853 8
X <sub>7</sub>	2.71×10 <sup>2</sup>	1	2.71×10 <sup>2</sup>	14.00	0.254 2
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	3.39×10 <sup>4</sup>	1	3.39×10 <sup>4</sup>	177.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>6</sub>	5.38×10 <sup>4</sup>	1	5.38×10 <sup>4</sup>	281.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>7</sub>	1.30×10 <sup>3</sup>	1	1.30×10 <sup>3</sup>	68.00	0.020 9
X <sub>4</sub> X <sub>6</sub>	7.84×10 <sup>4</sup>	1	7.84×10 <sup>4</sup>	410.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>4</sub> X <sub>7</sub>	1.60×10 <sup>1</sup>	1	1.60×10 <sup>1</sup>	840.00	0.776 8
X <sub>6</sub> X <sub>7</sub>	1.55×10 <sup>4</sup>	1	1.55×10 <sup>4</sup>	81.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1.34×10 <sup>5</sup>	1	1.34×10 <sup>5</sup>	701.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1.13×10 <sup>5</sup>	1	1.13×10 <sup>5</sup>	589.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>6</sub> <sup>2</sup>	1.42×10 <sup>5</sup>	1	1.42×10 <sup>5</sup>	740.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
X <sub>7</sub> <sup>2</sup>	6.72×10 <sup>4</sup>	1	6.72×10 <sup>4</sup>	351.00	<0.000 1 <sup>d</sup>
Residual	2.68×10 <sup>3</sup>	14	1.91×10 <sup>2</sup>		
Lack of fit	2.22×10 <sup>3</sup>	10	2.22×10 <sup>2</sup>	1.91	0.279 2
Pure error	4.64×10 <sup>2</sup>	4	1.16×10 <sup>2</sup>		
Cor total	5.11×10 <sup>5</sup>	28			

注: X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>6</sub> 和 X<sub>7</sub> 分别是大豆分离蛋白、pH、温度和 CaCl<sub>2</sub>。a: 平方和; b: 自由度; c: 均方差; d: 极显著。

$R^2=0.994\ 8$ ,  $R^2_{Adj}=0.989\ 5$ ,  $R^2_{Pre}=0.973\ 6$

Note: X<sub>2</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>6</sub> and X<sub>7</sub> are soy protein isolate, pH, temperature and CaCl<sub>2</sub>, respectively. a: Sum of squares; b: Degrees of freedom; c: Mean squared difference; d: Highly significant.  $R^2=0.994\ 8$ ,  $R^2_{Adj}=0.989\ 5$ ,  $R^2_{Pre}=0.973\ 6$ .

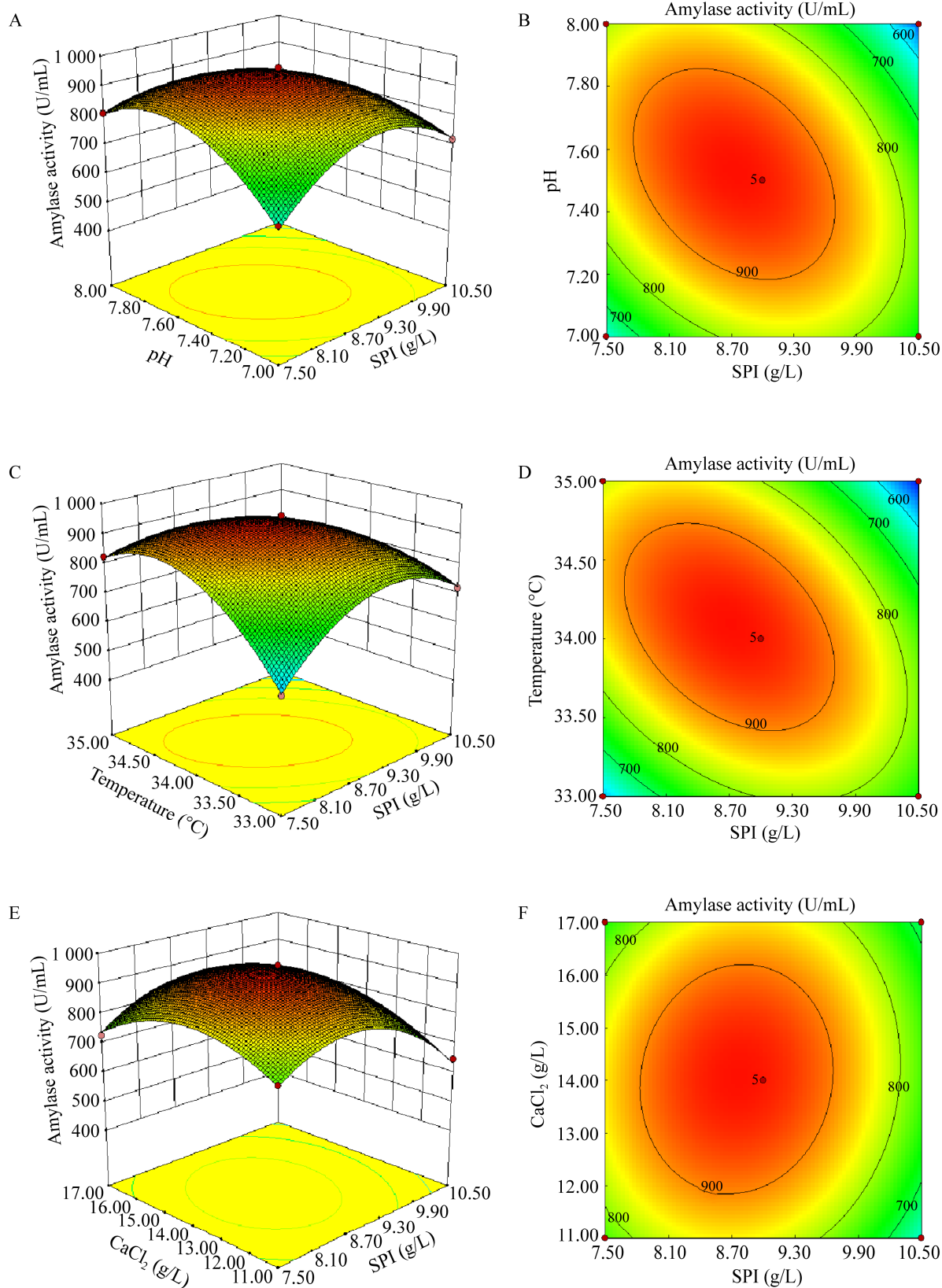
$4.75X_7-92.00X_2X_4-116.01X_2X_6+18X_2X_7-140.01X_4X_6+2X_4X_7-62.26X_6X_7-143.89X_2^2-131.89X_4^2-147.77X_6^2-101.77X_7^2$ 。各因素交互作用对淀粉酶产量的响应面和对应等高线图如图 8 所示。

## 2.7 产酶最佳条件的确定与验证试验

使用 Design Expert 10.04 得到模型极值点: 大豆分离蛋白 8.69 g/L、pH 7.5、温度 34.08 °C、氯化钙 13.94 mmol/L, 此条件下模型预测最高淀粉酶产量为 953.94 U/mL。以此最佳条件进行验证试验, 淀粉酶产量为 (945.01±2.51) U/mL, 是预测值的 99.06%, 说明该模型可信度较高<sup>[20]</sup>, 所得条件可用于菌株 LT-2 发酵产淀粉酶。

## 2.8 5 L 发酵罐分批发酵产淀粉酶

在最佳发酵参数下, 将菌株 LT-2 分别在 5 L 发酵罐和 500 mL 摇瓶中发酵产淀粉酶。试验结果如图 9 所示, 在摇瓶水平条件下, 发酵 33 h 淀粉酶产量最高为 972.88 U/mL, 约为发酵条件优化前产量的 5.01 倍; 在发酵罐水平条件下, 发酵 51 h 淀粉酶产量最高为 (1 198.40±4.56) U/mL, 是优化前淀粉酶产量的 6.17 倍。虽然发酵罐水平的发酵时间较长, 但淀粉酶产量是摇瓶水平的 1.23 倍。发酵罐水平发酵周期较长的原因可能是种子液接入量不能满足发酵罐扩大培养的需要, 也可能是摇瓶与发酵罐的发酵条件不同, 导致发酵罐中菌体生长延滞期较长。



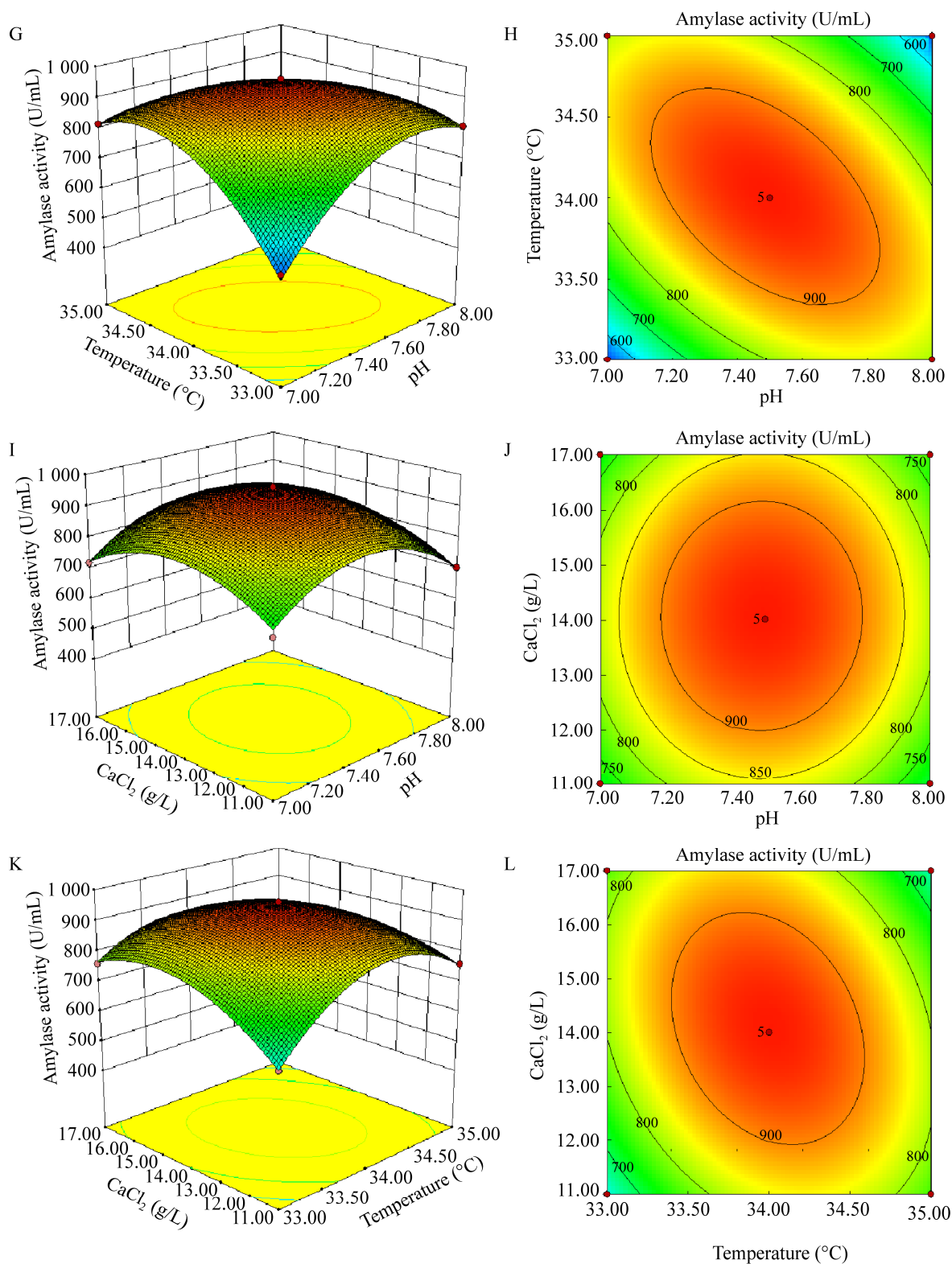


图 8 各因素交互作用对淀粉酶产量的响应面 and 对应等高线图

Figure 8 Response surface plot and the corresponding contour showing the interactive effects of various factors on amylase production.

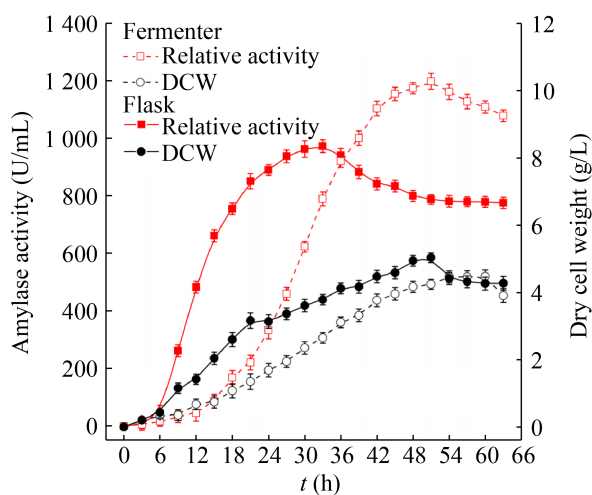


图9 菌株 LT-2 产淀粉酶发酵进程曲线

Figure 9 Time profile of amylase fermentation by strain LT-2.

## 2.9 菌株 LT-2 淀粉酶水解淀粉

如图 10 所示, 菌株 LT-2 所产淀粉酶具有较强的淀粉降解能力。在淀粉酶的催化下, 随着时间的推移, 淀粉始终保持快速水解状态, 当水解时间为 12 h 时, 还原糖浓度达到峰值约为 27.5 g/L, 淀粉降解速率为  $6.17 \times 10^{-5} \text{ g}/(\text{U} \cdot \text{h})$ 。

## 3 讨论与结论

本文分离得到一株高产淀粉酶的细菌, 经形态与 16S rRNA 基因序列鉴定, 确定为贝莱斯芽孢杆菌。通过单因素试验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken Design 试验对其产酶条件进行优化, 并探索其淀粉水解能力。

发酵优化结果显示, 菌株 LT-2 在以麦芽糖为碳源、大豆分离蛋白和氯化铵为无机氮源、氯化钙为无机盐、pH 7.5、温度 34.08 °C 条件下培养产酶效果最佳。摇瓶水平淀粉酶产量达到 972.88 U/mL, 发酵罐水平淀粉酶产量达到 1 198.40 U/mL, 是优化前淀粉酶产量的 6.17 倍。由表 6 可知, 菌株 LT-2 淀粉酶产量是

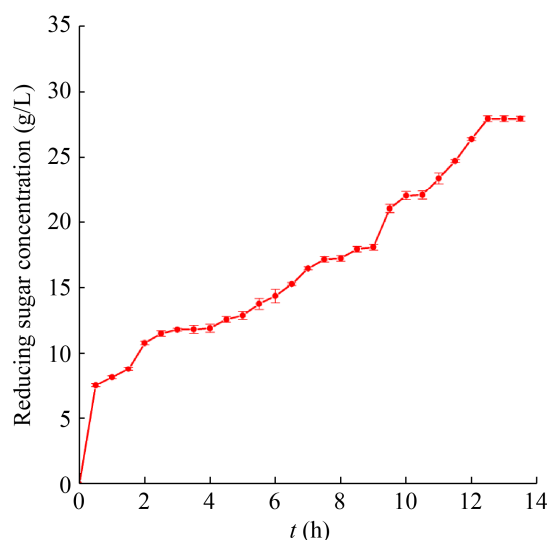


图10 菌株 LT-2 水解淀粉时间曲线

Figure 10 Time profile of hydrolyzing starch by amylase.

*B. velezensis* 6-10 的 7.32 倍<sup>[21]</sup>, 是 *B. aryabhattai* KIIT BE-1 淀粉酶产量的 288.46 倍<sup>[22]</sup>。菌株 6-10 和菌株 KIIT BE-1 产酶时均以淀粉为碳源, 虽然淀粉是淀粉酶的作用底物, 但淀粉作为碳源时并未诱导菌株高产淀粉酶<sup>[21-22]</sup>。菌株 LT-2 发酵产酶最佳碳源是麦芽糖, 当以麦芽糖为唯一碳源发酵淀粉酶的产量约为淀粉作为唯一碳源发酵淀粉酶产量的 2.5 倍。众所周知, 麦芽糖是由 2 分子葡萄糖经  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成的二糖, 由此可以推测菌株 LT-2 所产淀粉酶能专一水解  $\alpha$ -1,4 糖苷键, 进一步可以推断麦芽糖可以高效诱导菌株 LT-2 表达淀粉酶, 这一现象与聂晶晶等<sup>[26]</sup>报道一致。由此可见, 菌株 LT-2 在淀粉酶产量和淀粉酶生产效率上具有明显的优越性。此外, *B. velezensis* LT-2 产淀粉酶速率大于 23.50 U/(mL·h), 是菌株 6-10 的生产速率的 13.74 倍, 是菌株 MF04 的 27.97 倍。

本文所用贝莱斯芽孢杆菌来源于高温酒曲, 对酿造环境具有较好的适应性, 若将该菌应用于白酒和黄酒等食品发酵行业有望提高



表 6 不同芽孢杆菌属发酵淀粉酶情况

Table 6 Fermentation of amylases in different *Bacillus* species

菌株 Strains	淀粉酶活力 Amylase activity (U/mL)	发酵时间 Fermentation time (h)	淀粉酶生产速率 Amylase production rate (U/(mL·h))	参考文献 References
<i>Bacillus velezensis</i> 6-10	$1.64 \times 10^2$	96	1.71	[21]
<i>Bacillus aryabhattai</i> KIIT BE-1	4.16	48	$8.70 \times 10^{-2}$	[22]
<i>Bacillus</i> sp. Q-164	$1.26 \times 10^2$	120	1.05	[23]
<i>Bacillus cereus</i> MF04	$6.02 \times 10^1$	72	0.84	[24]
<i>Bacillus subtilis</i> D19	$1.30 \times 10^3$	NG	NG	[25]
<i>Bacillus velezensis</i> LT-2	$9.72 \times 10^2$	33	28.64	This study <sup>a</sup>
<i>Bacillus velezensis</i> LT-2	$1.20 \times 10^3$	51	23.50	This study <sup>b</sup>

注: NG: Not given; <sup>a</sup>: 摇瓶水平; <sup>b</sup>: 发酵罐水平

Note: NG: Not given; <sup>a</sup>: Shake flask level; <sup>b</sup>: Fermenter level.

粮食利用率并丰富酒体风味, 对芽孢杆菌在酿酒工业领域的应用有着重要的实践意义。

## REFERENCES

- [1] 林必博. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的研究进展[J]. 河北农业科学, 2011, 15(2): 77-80  
Lin BB. Research progress of thermostable  $\alpha$ -amylase[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2011, 15(2): 77-80 (in Chinese)
- [2] Stergiou PY, Foukis A, Theodorou L, Papagianni M, Papamichael E. Optimization of the production of extracellular  $\alpha$ -amylase by *Kluyveromyces marxianus* IF<sub>0</sub> 0288 by response surface methodology[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2014, 57(3): 421-426
- [3] Rezaei PS, Darzi GN, Shafaghat H. Optimization of the fermentation conditions and partial characterization for acido-thermophilic  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* NCIM 548[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2010, 27(3): 919-924
- [4] 李刚, 孙俊良, 葛晓虹, 梁新红. 碳源对枯草芽孢杆菌产  $\alpha$ -淀粉酶的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 13-14, 18  
Li G, Sun JL, Ge XH, Liang XH. Effect of carbon sources on activity of  $\alpha$ -amylase by *B. subtilis*[J]. Food & Machinery, 2010, 26(5): 13-14, 18 (in Chinese)
- [5] Gebreselema G. Isolation and optimization of amylase producing bacteria and actinomycetes from soil samples of Maraki and Tewedros campus, University of Gondar, North West Ethiopia[J]. African Journal of Microbiology Research, 2015, 9(31): 1877-1882
- [6] Raul D, Biswas T, Mukhopadhyay S, Kumar Das S, Gupta S. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) using solid state fermentation[J]. Biochemistry Research International, 2014, 2014: 568141
- [7] Wang XD, Ban SD, Hu BD, Qiu SY, Zhou HX. Bacterial diversity of Moutai-flavour Daqu based on high-throughput sequencing method[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017, 123(1): 138-143
- [8] 覃雪珍, 向宗府, 张学英. TH-AADY 和糖化酶在湘泉浓香型白酒工艺中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2006(6): 79-81  
Qin XZ, Xiang ZF, Zhang XY. Application of TH-AADY and saccharifying enzyme in the production of Xiangquan Luzhou-flavor liquor[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2006(6): 79-81 (in Chinese)
- [9] 安琦琦. 清香酒曲放线菌产酶及对酿酒酵母生长和酒曲质量的影响[D]. 临汾: 山西师范大学硕士学位论文, 2019  
An QQ. Enzyme production by actinomycetes from daqu for light-flavor Chinese liquor brwing and its effects on *Saccharomyces cerevisiae* growth and daqu quality[D]. Linfen: Master's Thesis of Shanxi Normal University, 2019 (in Chinese)
- [10] 钟浩, 谭兴和, 熊兴耀, 苏小军, 胡亚平. 糖化酶研究进展及其在食品工业中的应用[J]. 保鲜与加工, 2008, 8(3): 1-4  
Zhong H, Tan XH, Xiong XY, Su XJ, Hu YP. Research development and application in food industry of glucoamylase[J]. Storage & Process, 2008, 8(3): 1-4 (in Chinese)
- [11] 李习. 高产  $\alpha$ -淀粉酶地衣芽孢杆菌的筛选及重组质粒的构建[D]. 武汉: 湖北工业大学硕士学位论文, 2014  
LI X. Screening of high yield of  $\alpha$ -amylase *Bacillus*

- licheniformis* and construction of recombinant plasmid[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University of Technology, 2014 (in Chinese)
- [12] 陈晨. 耐高温  $\alpha$ -淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化及酶基因的克隆[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2009  
Chen C. Strain screening, fermentation of thermostable  $\alpha$ -amylase and molecular cloning of the enzyme[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University, 2009 (in Chinese)
- [13] 杨心意. 产耐高温  $\alpha$ -淀粉酶菌株的筛选、发酵条件优化及酶学性质研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2013  
Yang XY. Screening, optimization of fermentation conditions and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase producing strains[D]. Ala'er: Master's Thesis of Tarim University, 2013 (in Chinese)
- [14] 苟亚峰. 产菊粉酶菌株的筛选及其产酶与菊粉乙醇发酵条件的优化[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2014  
Gou YF. Inulinase producing strains screening and the optimization of its enzyme production and inulin ethanol fermentation condition[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2014 (in Chinese)
- [15] Wang LY, Wu LT, Chen QY, Li S, Zhu YB, Wu JN, Chu JL, Wu SS. Development of sugarcane resource for efficient fermentation of exopolysaccharide by using a novel strain of *Kosakonia cowanii* LT-1[J]. Bioresource Technology, 2019, 280: 247-254
- [16] 李鑫玲, 孙晓菲, 李欣.  $\alpha$ -淀粉酶产生菌的筛选鉴定及其发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(12): 163-165  
Li XL, Sun XF, Li X. Identification of the  $\alpha$ -amylase producing strain and optimization of the fermentation conditions[J]. Food Research and Development, 2016, 37(12): 163-165 (in Chinese)
- [17] 酆金龙, 朱运平, 滕超, 李秀婷. 解淀粉芽孢杆菌 11568 产柚苷酶发酵条件的优化[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 80-89  
Li JL, Zhu YP, Teng C, Li XT. Optimization of fermentation conditions for naringinase by *Bacillus amyloliquefaciens* 11568[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(7): 80-89 (in Chinese)
- [18] 何伟, 李菁菁, 包可翔, 颜奕华, 姜振锟, 林俭, 陈善义, 李易非. 高效表达淀粉酶 *Bacillus koreensis* 的培养基响应面优化[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(8): 1425-1433  
He W, Li JJ, Bao KX, Yan YH, Jiang ZK, Lin J, Chen SY, Li YF. Optimization of culture medium for a high performance amylase-producing *Bacillus koreensis* by response surface methodology[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(8): 1425-1433 (in Chinese)
- [19] Mian SZ, Sik A, Ikram UH. Optimization of the alpha amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens* IIB-14 via parameter significance analysis and response surface methodology[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(17): 3845-3855
- [20] 张程慧, 冯叙桥. 响应面法优化  $\alpha$ -淀粉酶的酶反应体系[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 206-210, 220  
Zhang CH, Feng XQ. Optimization of enzyme reaction system of  $\alpha$ -amylase by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 206-210, 220 (in Chinese)
- [21] 刘延波, 张世凯, 赵志军, 王贤, 潘春梅, 孙西玉. 高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 65-71  
Liu YB, Zhang SK, Zhao ZJ, Wang X, Pan CM, Sun XY. Isolation and identification of amylase bacterial and optimization of enzyme production conditions by response surface[J]. Food & Machinery, 2020, 36(1): 65-71 (in Chinese)
- [22] Ojha SK, Singh PK, Mishra S, Pattnaik R, Dixit S, Verma SK. Response surface methodology based optimization and scale-up production of amylase from a novel bacterial strain, *Bacillus aryabhattai* KIIT BE-1[J]. Biotechnology Reports, 2020, 27: e00506
- [23] Lakshmi SS, Mahesh CH, Gayatri K, Manisha P, Aishwarya K. Statistical optimization of amylase production and its purification from a palm wine isolate *Bacillus* sp. Q-164[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 29: 101820
- [24] 郭宏文, 江成英, 王路, 郭建华, 景艳, 孙美佳. 酸性  $\alpha$ -淀粉酶菌种产酶条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21): 308-310  
Guo HW, Jiang CY, Wang L, Guo JH, Jing Y, Sun MJ. Optimization of enzyme production conditions 400 for acidic  $\alpha$ -amylase strains[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(21): 308-310 (in Chinese)
- [25] Almana TN, Vijayaraghavan P, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Alyahya SA. Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues[J]. Journal of King Saud University - Science, 2020, 32(2): 1555-1561
- [26] 聂晶晶, 叶建斌, 马科, 周留柱, 杨雪鹏. 解淀粉芽孢杆菌 Y11 产淀粉酶的条件优化[J]. 农产品加工, 2019(10): 34-39  
Nie JJ, Ye JB, Ma K, Zhou LZ, Yang XP. Optimization of amylase production by *Bacillus amylus* Y11[J]. Farm Products Processing, 2019(10): 34-39 (in Chinese)