

响应面法优化 *Anoxybacillus* sp. YIM 342 产耐高温 α -淀粉酶发酵条件^{*1}

杨心意^{1,2}, 张峰², 任万增², 聂国兴³, 李帅³, 明红⁴, 唐蜀昆², 张利莉¹, 李文均^{1,2}

(1. 塔里木大学 新疆建设兵团塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;

2. 云南大学 云南省微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室, 云南 昆明 650091;

3. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 4. 新乡医学院 生命科学技术系, 河南 新乡 453003)

摘要: 利用响应面法对 *Anoxybacillus* sp. YIM 342 产耐高温 α -淀粉酶的液体发酵培养条件进行优化. 在单因素试验的基础上, 首先应用 Plackett-Burman 实验设计筛选在发酵过程中对产酶量影响较大的因素, 然后利用中心组合设计确定对产酶量影响较大因素的最佳水平. 筛选结果表明, 淀粉和 CaCl_2 的浓度以及发酵时间对产酶量有显著的影响; 最佳发酵条件为: 淀粉 11.73 g/L, CaCl_2 0.65 g/L, 发酵时间为 37.27 h, 胰蛋白胨 5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, 起始 pH 值 6.5, 转速 200 r/min, 温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 在此条件下产酶量达到了 62.71 U/mL, 较初始产酶量提高了 3.25 倍.

关键词: 耐高温 α -淀粉酶; Plackett-Burman 设计; 响应面法; 液体发酵

中图分类号: Q 93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2012)04-0490-07

α -淀粉酶(Alpha amylase; EC 3.2.1.1)属于水解酶类, 可从淀粉分子内部切开 α -1,4 糖苷键, 使溶液的黏度迅速下降, 生成还原糖和糊精^[1]. 耐高温 α -淀粉酶由于具有较高的耐热性能, 能广泛应用于高温操作中的制糖、酿造、纺织等工业, 并且具有环保、经济、高效等优点^[2]. 因此, 耐高温 α -淀粉酶更加受到研究者的关注.

工业生产中利用微生物发酵生产 α -淀粉酶, 培养基的成分以及各成分的比例很大程度上影响着微生物的生长以及产酶量, 因此优化培养基的成分以及相关的参数, 建立最佳的生产工艺, 是工业化生产酶制剂的首要任务^[3]. 传统的优化方法如单因素实验, 虽然设计简单, 但耗时费力, 而且还忽略了各因素之间的互作关系, 容易得出不准确的结论; 统计学优化方法, 如用 Plackett-Burman (PB) 设计可从众多发酵因素中筛选出主效应因素, 再结 0.1%, 胰蛋白胨 0.05%. 基础发酵培养基成分为:

合响应面法(RSM)中的中心组合设计(CCD)对主效应进一步的优化, 最终可获得最佳的发酵条件^[4], 响应面法已经广泛应用到许多实验条件优化试验中^[5-7]. 云南大学微生物研究所西南微生物多样性教育部重点实验室前期从高温热泉中分离到 1 株耐高温 α -淀粉酶的产生菌 YIM 342, 经检测具有较强的淀粉降解能力. 本文对该菌株产酶发酵培养基进行了优化, 为进一步挖掘该菌株的应用价值奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 由云南大学微生物研究所西南微生物多样性教育部重点实验室分离保存.

1.1.2 培养基 种子培养基成分为: 淀粉 0.1% (质量分数, 下同), 酵母提取物 0.2%, 葡萄糖 此实验用来确定最佳的碳源和氮源, 为 Plackett -

* 收稿日期: 2011-12-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070007); 云南省国际合作项目资助(2009AC017).

作者简介: 杨心意(1986-), 男, 湖南人, 硕士生, 主要从事酶学方面的研究.

通讯作者: 李文均(1973-), 男, 河南人, 研究员, 博士, 主要从事特境微生物资源及其开发利用方面的研究. E-mail: wjli@ynu.edu.cn.

淀粉 0.2%, 胰蛋白胨 0.2%, $MgSO_4$ 0.03%, $CaCl_2$ 0.01%.

1.2 方法

1.2.1 菌株的初步鉴定 用细菌基因组提取试剂盒(Qiagen, 美国)提取菌株 YIM 342 的 DNA, 以总 DNA 为模板, 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增. PCR 扩增产物送上海生物工程有限公司进行测序. 将测序所得到的基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对, 发现此序列与 *Anoxybacillus rupiensis* 的 16S rRNA 基因的相似度达到了 99.846%, 因此我们将其定为无氧芽孢杆菌属 (*Anoxybacillus*), 并将其初步将其命名为 *Anoxybacillus* sp. YIM 342^[8].

1.2.2 粗酶液制备 采用三角瓶(500 mL)装培养基 100 mL, 以 5% 的接种量接种后于 55 °C, 200 r/min 恒温振荡培养 48 h, 取发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液.

1.2.3 酶活测定 在 150 μ L 的淀粉底物溶液中加入 100 μ L 的酶液, 70 °C 条件下反应 30 min, 利用 DNS 法测定还原糖的量^[9]. 酶活单位 U 定义: 在 pH 为 6.0、温度为 70 °C、每小时水解生成 1 mg 还原糖所需的酶量.

1.2.4 实验设计

1.2.4.1 单因素实验设计 采用单次单因素法,

Burman 实验做准备.

1.2.4.2 Plackett – Burman 实验设计 利用 Design Expert 软件, 创建 Plackett – Burman 实验设计方案^[10]. 在前期单因素的试验的基础上, 本研究选取对产酶量影响较大的 7 个因素: 淀粉质量浓度、胰蛋白胨质量浓度、 $MgSO_4$ 质量浓度、 $CaCl_2$ 质量浓度、培养时间、接种量、起始 pH 值. 其他因素保持恒定, 选用变量个数 $N = 12$ 的 Plackett – Burman 设计表, 另加 4 个虚拟变量, 用于考察实验误差. 各因素所代表参数、水平见表 1, 实验设计及结果见表 2.

表 1 Plackett – Burman 实验设计参数与水平

Tab. 1 Factors and levels of Plackett – Burman design

因素 代码	因素	因素水平	
		-1	+1
A	时间/h	12	36
B	pH	5.5	7.5
C	接种量 $w/\%$	1	10
D	$\rho(\text{胰蛋白胨})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1	10
E	$\rho(\text{淀粉})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1	10
F	$\rho(\text{氯化钙})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.10	0.50
G	$\rho(\text{硫酸镁})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0.25	0.75

表 2 Plackett – Burman 设计表及实验结果

Tab. 2 Design and results of Plackett – Burman experimental

序号	因素											产酶量/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	实测值	预测值
1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	36.69	34.42
2	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	24.15	23.40
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	32.65	35.13
4	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	56.62	55.69
5	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	49.76	51.62
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	34.29	31.82
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	23.31	25.38
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	38.81	39.75
9	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	44.09	44.62
10	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	47.76	45.89
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	45.90	47.05
12	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	53.08	52.33

1.2.4.3 中心组合设计 在 Plackett - Burman 实验结果上,利用中心组合试验设计来评价因素间和指标的非线性关系,估计一阶、二阶以及一阶交互作用项的多项式模式.具体做法是:选取试验中对菌株 YIM 342 产 α - 淀粉酶能力影响较大的 3 的因素:即淀粉质量浓度(X_1)、培养时间(X_2)、 CaCl_2 质量浓度(X_3),每个因素取 5 个水平($-a, -1, 0, +1, +a$)一共 20 个实验点,其中 14 个实验点和 6 个零点.各因素所代表参数、水平见表 3,实验设计

表 3 响应面设计因素水平

Tab. 3 Levels and factors of response surface methodology

因素 代码	因素	水 平				
		$-a$	-1	0	$+1$	$+a$
X_1	$\rho(\text{淀粉})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	1.59	5.00	10.00	15.00	18.41
X_2	时间/h	15.82	24.00	36.00	48.00	56.18
X_3	$\rho(\text{CaCl}_2)/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	0	0.20	0.60	1.00	1.27

表 4 中心组合实验设计及实验结果

Tab. 4 Design matrix and experimental results of central composite design

序号	因 素			产酶量/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	X_1	X_2	X_3	实测值	预测值
1	+1	+1	-1	54.28	52.78
2	0	0	0	58.13	60.22
3	0	0	0	61.29	60.22
4	0	0	0	60.48	60.22
5	0	$-a$	0	47.25	48.59
6	-1	-1	+1	41.81	41.20
7	+1	-1	+1	55.50	54.60
8	0	0	0	59.58	60.22
9	0	0	0	58.78	60.22
10	0	0	$+a$	51.29	52.21
11	$+a$	0	0	55.34	56.11
12	0	0	$-a$	49.61	51.66
13	$-a$	0	0	36.15	38.35
14	+1	-1	-1	54.54	54.06
15	-1	-1	-1	45.36	43.38
16	-1	+1	-1	46.27	45.07
17	0	0	0	63.58	60.22
18	+1	+1	+1	55.75	55.62
19	0	$+a$	0	49.22	50.86
20	-1	+1	+1	46.80	45.18

及结果见表 4. 所有的实验设置 3 个平行重复,以所测得的 α - 淀粉酶产酶量的平均值作为响应面的分析值. 根据多项式回归分析对实验数据进行拟合,可得到二次多项式,即:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j, \quad (1)$$

其中: Y 为预测响应值; $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ 和 β_{ij} 分别为常量、一次项系数、二次项系数和交互作用系数; $X_i X_j$ 为输入的自变量因素^[11-12].

2 结果与分析

2.1 Plackett - Burman 实验结果与分析 在单因素实验确定最佳的碳源和氮源分别为淀粉和胰蛋白胨的基础上,利用 Design Expert 软件对 Plackett - Burman 实验数据进行分析,结果如表 5 所示. 表 5 中, p 值表征各因素对产酶量的显著性,如果 p 值小于 0.05,说明该因素对该 α - 淀粉酶的产酶量是显著的;如果 p 值小于 0.01 说明该因素对该 α - 淀粉酶的产酶量是极显著的. 由表 5 可以看出,该模型和因素 E (淀粉质量浓度)是极显著的,而因素 A (时间)、 F (CaCl_2 质量浓度)2 个因素对产酶量是显著的. 另外, p 值的大小表示了因素对产酶量影响的程度, p 值越小说明因素对产酶量的影响就越大. 由此可知淀粉的浓度对产酶量影响最大,其次为培养时间和 CaCl_2 的质量浓度,可作为进一步优化的因素^[13]. 而初始 pH、接种量、胰蛋白胨及 MgSO_4 的质量浓度对产酶量影响不显著,在进一步研究中,可取中间水平,其对产酶量影响效果不再进行分析.

2.2 中心组合实验设计实验结果分析 方差分析结果如表 6 所示. 由表 6 可知 α - 淀粉酶的产酶量与培养时间、淀粉的质量浓度、 CaCl_2 质量浓度的关系可以用下列回归方程来表示:

$$Y = 60.61 + 4.20X_1 + 1.02X_2 + 0.52X_3 -$$

$$0.59X_1X_2 + 0.53X_1X_3 + 0.5X_2X_3 - 6.07X_1^2 - 4.15X_2^2 - 3.1X_3^2, \quad (2)$$

式中 Y 表示预测 α -淀粉产酶量, 回归方程的系数 $R^2 = 0.9574$, R^2 经调整后为 0.9191, 说明回归方程拟合程度很好, 因此可以使用该模型来分析响应值。

由表 6 可以看出该模型的 F 值为 24.97 ($p = 0.0001$), 显示了这个模型是极显著的, 同时它也显示了在该模型下仅有 0.01% 的产酶量变异不能由该模型解释。变化系数 (CV) 表示实验值与预测值之间的拟合的精确度, CV 值越低表明该是实验值与预测值拟合的精确度越高, 本研究中 CV 为 4.19%, 由此

可以说明在该模型下所得到的实验数据是比较精确的。此外, 模型中的因素 X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 p 值分别为 <0.0001 、 <0.0001 、 <0.0001 和等于 0.0003, 均小于 0.010, 表明这些因素也是极显著的。

失拟项 (Lack of Fit) 表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 反应拟合出来的模型与实验数据的接近程度。若失拟项对应的 $p > 0.05$, 可说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小, 从表 6 可知: 模型的失拟项检验的 p 值为 0.2879, 大于 0.050, 由此可知该回归模型在此实验条件下是合适的, 不需要对回归方程进行调整^[14]。

表 5 Plackett - Burman 实验设计分析结果

Tab.5 Analytic result of Plackett - Burman experimental design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	差异显著性
模型	1 245.99	7	178.00	21.49	0.005 1	* *
A	112.70	1	112.70	13.60	0.021 0	*
B	23.37	1	23.37	2.82	0.168 3	
C	23.87	1	23.87	2.88	0.164 8	
D	11.4	1	11.4	1.38	0.305 8	
E	959.63	1	959.63	115.84	0.000 4	* *
F	89.10	1	89.10	10.76	0.030 5	*
G	25.91	1	25.91	3.13	0.151 7	

* : 显著; * * : 极显著; 变化系数 (CV) = 7.09%; $R^2 = 0.9741$; 调整 $R^2 = 0.9288$

表 6 中心组合实验设计方差分析表

Tab.6 Analysis of variance (ANOVA) for central composite design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	差异显著性
模型	1 049.55	9	116.62	24.97	< 0.0001	* *
X_1	240.64	1	240.64	51.53	< 0.0001	* *
X_2	14.24	1	14.24	3.05	0.111 3	
X_3	3.69	1	3.69	0.79	0.394 7	
X_1X_2	2.81	1	2.81	0.60	0.455 9	
X_1X_3	2.28	1	2.28	0.49	0.500 9	
X_2X_3	2.00	1	2.00	0.43	0.527 4	
X_1^2	531.27	1	531.27	113.75	< 0.0001	* *
X_2^2	247.90	1	247.90	53.08	< 0.0001	* *
X_3^2	138.77	1	138.77	29.71	0.000 3	* *
残差	46.70	10	4.67			
失拟项	29.66	5	5.93	1.74	0.278 9	

* : 显著; * * : 极显著; 变化系数 (CV) = 4.19%; $R^2 = 0.9574$; 调整 $R^2 = 0.9191$

各因素间交互作用对响应值的影响见图 1 ~ 3, 其中各图表示 X_1 、 X_2 、 X_3 中任意一个变量取零水平时, 其余 2 个变量对产酶量的交互作用. 图 1 为淀粉为零水平时, 发酵时间与 CaCl_2 质量浓度对 α -淀粉产酶量交互作用的响应面图. 由图 1 可以看出在淀粉为 10 g/L 时, 随着发酵时间的延长, α -淀粉酶的产量逐渐增大, 发酵时间在 36 ~ 39 h 范围内, α -淀粉酶的产量不低于 58.73 U/mL. 培养基中 CaCl_2 质量浓度对 α -淀粉酶的产量也有较大的影响. 而且, 初始培养基中 CaCl_2 质量浓度低时不利于该菌产 α -淀粉酶, 只有在 CaCl_2 的质量浓度为 0.65 ~ 0.75 g/L 时, 产酶量较高, 在最佳范围左右的发酵时间、 CaCl_2 质量浓度对产酶量的影响

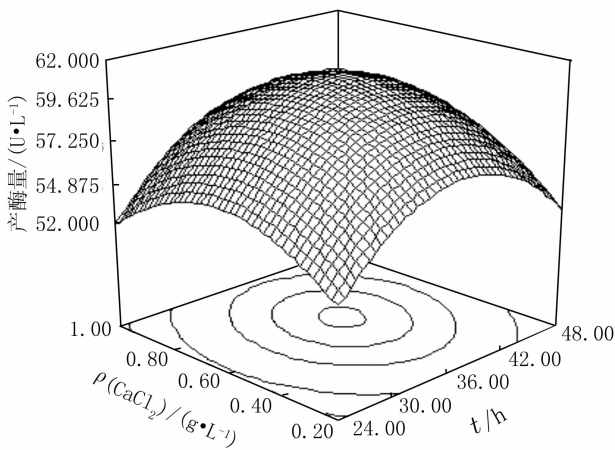


图 1 发酵时间、 CaCl_2 质量浓度与产酶量的交互作用

Fig. 1 Interaction between ferment time and CaCl_2 concentration on amylase yield

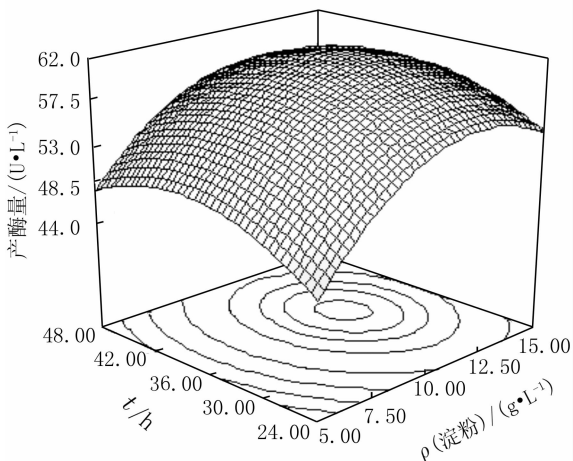


图 3 淀粉质量浓度、发酵时间与产酶量的交互作用

Fig. 3 Interaction between starch concentration and fermentation time on amylase yield

较为显著^[15].

图 2 为淀粉和 CaCl_2 质量浓度对 α -淀粉产酶量交互作用的响应面图, 图 3 为淀粉和发酵时间对 α -淀粉产酶量交互作用的响应面图. 从图 2 和图 3 可以看出, 在发酵时间和 CaCl_2 质量浓度分别取零水平时, 淀粉质量浓度对产酶量影响较大. 在一定范围内, 产酶量与淀粉质量浓度成正比, 这可能与淀粉在此培养基中既做碳源又做诱导物有关, 同时从交互作用可以看出, 淀粉质量浓度在 11 ~ 12.5 g/L 时, 产酶量较高. 依据软件预测, 当发酵时间为 37.27 h, 淀粉、 CaCl_2 质量浓度分别为 11.73, 0.65 g/L 时, 产酶量最高, 为 61.43 U/mL.

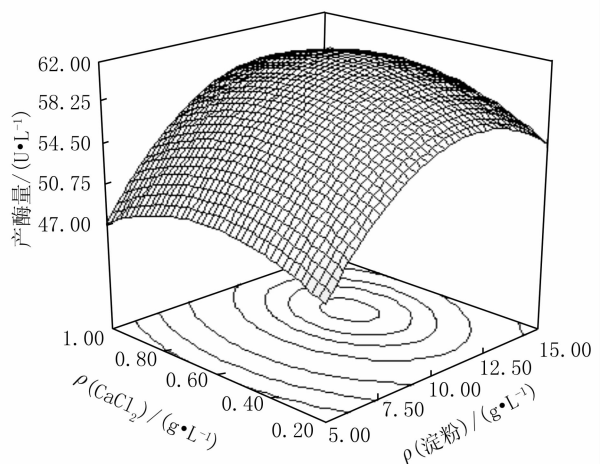


图 2 淀粉、 CaCl_2 质量浓度与产酶量的交互作用

Fig. 2 Interaction between starch and CaCl_2 concentration on amylase yield

2.3 回归模型的验证 按照优化后的产酶条件重复 3 次发酵产酶实验实测 α -淀粉酶产酶量分别为 61.76, 63.52, 62.86 U/mL, 其平均值为 62.71 U/mL 与预测值 61.43 U/mL 接近, 预测的精确度达到了 97.92%, 说明本实验设计与响应面分析方法能较好的模拟该菌株 α -淀粉酶实际的生产过程, 结果较为准确可靠^[16].

3 讨论

目前, 利用微生物发酵来研究 α -淀粉酶报道大多集中在土壤环境以及工程菌等方面, 涉及高温热泉环境的报道相对较少. 本文在单因素的基础上利用 Plackett - Burman 设计以及响应面法对 1 株分离自高温热泉的能产生耐高温 α -淀粉酶的产

酶条件进行了优化,并获得了最佳的发酵条件:淀粉 11.73 g/L, CaCl_2 0.65 g/L, 发酵时间为 37.27 h, 胰蛋白酶 5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, 起始 pH 值 6.5, 温度 55 $^\circ\text{C}$, 在最优条件下, α -淀粉酶产量得到了很大的提高, 达到 62.71 U/mL, 较初始产酶量(19.30 U/mL)提高了 3.25 倍。

一般来说, 影响微生物产酶的因素有很多, 包括装样量, 培养温度、培养基的组分、培养时间以及溶氧量等。基于前期的研究基础, 本研究在 Plackett-Burman 设计中选取了其中的 3 个因素(培养基成分、培养时间以及装样量)为研究对象, 最终筛选出 2 个对产酶量有显著影响的因素, 分别为培养基的组分(淀粉质量浓度、 CaCl_2 质量浓度)和培养时间。我们推测产生这一结果的可能原因是: 淀粉为淀粉酶的天然底物, 它的存在及浓度变化很可能改变菌株对碳源的利用类型。研究表明, 适宜浓度的 CaCl_2 有助于维持 α -淀粉酶的酶构象, 保证其热稳定性, 因此 CaCl_2 的浓度与产酶量息息相关也在情理之中; 细菌在不同的生长时期酶的产量一般是不同的, 此外, 胞外酶的积累与降解也随着时间的推移在变化, 故培养时间对酶的产量也会造成影响。不过我们的这些推测还需实验的进一步证明, 因为有人^[17]利用同样的方法对芽孢杆菌 La7 产低温淀粉酶发酵条件进行了研究, 结果发现装添量、蛋白胨和蔗糖才是影响产酶量的主要因素, 而 CaCl_2 的浓度对该菌的产酶量没有太大的影响。我们推测这可能是因为菌株不同, 影响产酶量的显著因素也各异。不过也有人用芽孢杆菌为实验材料得到了与我们比较一致的结果^[14], 此外一份来自真菌产淀粉酶优化条件的报道^[18]也与我们的报道基本吻合。

总而言之, 影响微生物产酶的因素很多, 具体什么因素能成为影响特定研究对象产酶量的显著因素, 还需对具体研究对象的发酵条件进行具体的摸索。因此, 本研究对 *Anoxybacillus* sp. YIM 342 产淀粉酶发酵条件的摸索是十分有意义的。当然, 虽然经过响应面法的优化后, 我们获得了目的菌的最佳发酵条件(产酶量比初始培养条件得到很大的提高)但是, 毋庸置疑实验室条件下的优化结果与工业大量发酵的具体条件一定存在一些差异(比如实验室一般采用摇瓶发酵, 有很多因素如 pH、溶氧量等都难以得到有效的控制, 不能充分挖掘该菌发酵生产 α -淀粉酶潜力)。不过, 这项工作对于

该菌 α -淀粉酶发酵规模的扩大积累了第一手资料。

参考文献:

- [1] 张树政. 酶工业制剂(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 蒲宗耀, 陈松, 卢涛, 等. 耐碱耐高温淀粉酶性能及退浆工艺试验研究[J]. 纺织科技进展, 2006(1): 24-26.
- [3] DJEKIRIF - DAKHMOUCHE S, GHERIBI - AOULMI Z, MERAIHI Z, et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder[J]. Food Eng, 2006, 73(2): 190-197.
- [4] PLACKETT RL, BURMAN J P. The design of optimum multifactor experiments[J]. Biometrika, 1946, 33(4): 305-325.
- [5] DEY G, MITRA A, BANERJEE R, et al. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology[J]. Biochem Eng, 2001, 7(3): 227-231.
- [6] 王维乐, 牟志美, 张淑君, 等. 响应面法优化 *Paraconiothyrium variabile* GHJ-4 产漆酶发酵条件[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(3): 321-325.
- [7] 王华, 于寒松, 朴春红, 等. 响应面法优化重组大肠杆菌 PUCRF 发酵培养基[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 225-230.
- [8] ANNA D, CARSTEN S, ROSSICA M, et al. *Anoxybacillus rupiensis* sp Nov, a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria) [J]. Extremophiles, 2007, 11(4): 577-583.
- [9] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-428.
- [10] 欧宏宇, 贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用[J]. 天津轻工业学院学报, 2001, 36(1): 14-17.
- [11] BOX G E P, BEHNKEN D W. Some new three level designs for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, 2(4): 455-475.
- [12] ADINARAYANA K, ELLAIAH P, SRINIVASULU B, et al. Response surface method of logical approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation [J]. Process Biochemistry, 2003, 38(11): 1565-1572.

- [13] 柳志强, 李晓宇. 响应面法优化海洋细菌 *Bacillus* sp YP07 淀粉酶发酵条件研究[J]. 中国酿造, 2011(2): 64-66.
- [14] DHANYA G, SWETHA S, MADHAVAN N K, et al. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4 597-4 602.
- [15] 赵伟, 陈晨, 刘倩, 等. 利用 Minitab 优化耐高温淀粉酶发酵培养条件[J]. 中南大学学报, 2010, 41(5): 1 652-1 657.
- [16] 张丹, 闵伟红, 刘景圣, 等. 响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 248-253.
- [17] 茆军, 张志东, 王玮, 等. 响应面法优化低温淀粉酶发酵条件研究[J]. 生物技术, 2008, 18(4): 83-86.
- [18] 柳志强, 田富, 李晓宇, 等. 响应面法优化解脂耶罗维亚酵母 ypy01 淀粉酶发酵条件研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(17): 98-102.

A study on the best condition for thermostable alpha amylase fermented by response surface methodology by strain *Anoxybacillus* sp. YIM 342

YANG Xin-yi^{1,2}, ZHANG Feng², REN Wan-zeng², NIE Guo-xing³, LI Shuai³,
MING Hong⁴, TANG Shu-kun², ZHANG Li-li¹, LI Wen-jun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar 843300, China;

2. Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China;

3. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China);

4. Department of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The fermentation condition of thermostable alpha amylase by strain *Anoxybacillus* sp. YIM 342 was optimized by response surface methodology. Based on the single factor experiment, main factors affecting the enzyme activity were screened during the fermentation by Plackett – Burman design, and the optimum values of the main factors were obtained by central composite design. The results showed that the productivity of the enzyme was affected by incubation time and concentrations of soluble starch and CaCl₂. The optimized conditions were as follows: starch, 11.73 g/L, CaCl₂, 0.65 g/L, incubation time, 37.27 h, tryptone, 5 g/L, MgSO₄, 0.5 g/L, pH 6.5, rotation speed, 200 r/min and temperature, 55 °C. Under these conditions, the amylase activity was 62.71 U/mL, which was 3.25 times better than before.

Key words: thermostable alpha amylase; Plackett – Burman design; response surface methodology; liquid fermentation

* * * * *

(上接第 489 页)

Abstract: Twenty – two physical indices of the heads and faces of 643 Han adults people (334 males and 309 females) were investigated in Qionghai city and Wanning city of Hainan, thirteen physical indices were calculated and the morphological characteristics' changing in the heads and faces was analyzed preliminarily. The results are as follows: ① There are 4 indices having a negative correlation with age, they are interocular breadth, external biocular breadth, lips heights, and thickness of lips. There are also 4 indices having a positive correlation with age, they are upper lips skin height, physiognomic ear length, physiognomic ear breadth and facial skinfold. And the index value in different age groups in the presence of height significant difference. ② The lip index decreases by age, the difference of the indices among groups of different ages is significant. The morphological characters of the heads and faces show certain correlation to the changing of the age in Han people of Hainan.

Key words: physical indices; heads; faces; age; Han people; Hainan province