

# 高效表达淀粉酶 *Bacillus koreensis* 的培养基响应面优化

何伟<sup>#</sup>,李菁菁<sup>#</sup>,包可翔,颜奕华,姜振锬,林俭,陈善义\*,李易非\*

福建中烟工业有限责任公司技术中心,厦门 361021

**摘要:**为降低烟叶中的淀粉含量,提高烟叶的可用性,从云南马龙 C3F-2014 烟叶表面筛选出一株高产淀粉酶的细菌,经 16sRNA 测序鉴定为 *Bacillus koreensis*。本研究利用响应面法优化 *Bacillus koreensis* 的培养基提高了其表达淀粉酶的产量。首先,单因素优化试验表明培养基的最优碳源、氮源和金属离子分别为淀粉、蛋白胨和  $\text{Ca}^{2+}$ , 培养条件单因素试验表明 *Bacillus koreensis* 最适初始 pH、最适温度和最适接种量分别为 pH8.0、37 °C 和 3%。利用 Box-Behnken 中心组合设计对可溶性淀粉、蛋白胨、 $\text{Ca}^{2+}$  设计三因素三水平实验,通过响应面回归分析,得到模型预测的最优培养基条件。在 18.74 g/L 可溶性淀粉,21.56 g/L 蛋白胨,0.52 g/L  $\text{CaCl}_2$  的培养基条件下 *Bacillus koreensis* 产淀粉酶最高。验证试验得到的淀粉酶活力达到  $959.39 \pm 22.34$  U/mL,与模型的预测值相近,比未优化前提高了 69.76%。本研究结果为烟草天然源淀粉酶处理烟叶,提高烟叶品质的工业化应用提供了基础。

**关键词:** *Bacillus koreensis*; 淀粉酶; 培养基优化; 响应面; 烟叶

中图分类号: R284.2; Q556

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)8-1425-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.8.018

## Optimization of culture medium for a high performance amylase-producing *Bacillus koreensis* by response surface methodology

HE Wei<sup>#</sup>, LI Jing-jing<sup>#</sup>, BAO Ke-xiang, YAN Yi-hua, JIANG Zhen-kun, LIN Jian, CHEN Shan-yi\*, LI Yi-fei\*

Technology Center, Fujian Tobacco Industry Co., Ltd., Xiamen 361021, China

**Abstract:** In order to reduce the content of starch in tobacco leaves and improve the usability of tobacco leaves, a high performance amylase-producing strain was isolated from tobacco leaf samples C3F from Malong which is in Yunnan province, China. It was identified as *Bacillus koreensis* by 16s RNA analysis. The culture medium of *Bacillus koreensis* was optimized by response surface methodology, remarkable elevated the expression of amylase. First, single parameter experiments show that the optimal carbon, nitrogen, metal ion, initial pH, temperature and inoculums size were starch, peptone,  $\text{Ca}^{2+}$ , 8.0, 37 °C, 3% respectively. Then, a three factors-three levels experiment was carried out based on the Box-Behnken central composite design. The highest amylase activity was  $959.39 \pm 22.34$  U/mL in the validation experiment under the optimized conditions of 18.74 g/L soluble starch, 21.56 g/L peptone, 0.52 g/L  $\text{CaCl}_2$ . The amylase activity of *Bacillus koreensis* was elevated 69.76% than before, which was similar to the predicted value of the model. This study was based on *Bacillus koreensis* from natural tobacco leaves, providing a basis for industrial application of improving tobacco quality.

**Key words:** *Bacillus koreensis*; amylase; medium culture optimization; response surface methodology; tobacco

淀粉是烟草中一类重要的碳水化合物,新鲜烟叶通过调制,大部分淀粉经酶解反应降解为还原糖。但调制后的烟叶仍残留少量淀粉,这对烟叶内在质量有不利的影响<sup>[1]</sup>。以淀粉形式存在的糖类在卷

烟燃吸时会影响燃烧速率和完全性,并产生糊焦气味,影响烟叶的香味和内在品质,因此淀粉含量的高低对烤烟烟叶的品质有重要影响<sup>[2,3]</sup>。现有调制方法中淀粉降解转化不够充分,导致中国成品烟叶的淀粉含量普遍偏高,约为 4%~6%,远高于国外优质成品烟中的淀粉含量(约为 1%~2%)<sup>[4,5]</sup>。烤后烟叶淀粉残留量过高已成为制约中国烟叶质量提高的重要因素之一。

近年来,利用外加微生物或酶制剂降低烟叶中

收稿日期:2019-04-22 接受日期:2019-05-30

基金项目:福建中烟工业有限责任公司技术中心科技项目(JSZ XKJH2016001)

\*通信作者 Tel:86-592-3170883; E-mail:csy23174@fjtic.cn, ly23116@fjtic.cn

#共同第一作者

的淀粉含量、提高烟叶的可用性已成为烟叶原料研究的热点之一。冯颖杰等<sup>[6]</sup>研究发现,向烟叶中施加高效产淀粉酶的苏云金芽孢杆菌,烟叶中淀粉大幅度降低,烟叶的总糖、还原糖含量上升,有效提升了烟叶的整体质量。沙云菲等<sup>[7]</sup>研究了淀粉酶复合酶制剂对上部烟叶的降解效果,处理后效果显著。李晓等<sup>[8]</sup>采用 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶分别处理烤烟和白肋烟,处理后烟叶品质明显改善。此外,这些生物技术烟草中的应用还必须考虑到微生物和酶制剂自身所带来的污染、安全性和失活不稳定等多种因素。

本实验室前期从云南马龙 C3F-2014 烟叶表面筛选出一株能够高效表达淀粉酶的 *Bacillus koreensis*。本研究以该菌株为研究对象,利用响应面法优化了其发酵培养基的碳源、氮源和金属离子,提高了 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的产量,为烟草天然源淀粉酶处理烟叶,提高烟叶品质的工业化应用提供了基础。

## 1 材料与方

### 1.1 菌种与培养基

1.1.1 *Bacillus koreensis*, 由云南马龙 C3F-2014 片烟分离纯化得到。

1.1.2 种子培养基 (LB 培养基): 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 氯化钠, pH=7.0。

1.1.3 初始发酵培养基 (牛肉膏蛋白胨培养基): 3 g/L 牛肉膏, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 氯化钠, pH=7.0。

### 1.2 试剂与仪器

试剂: 胰蛋白胨等生物试剂, 葡萄糖、淀粉、氯化钠等分析纯试剂, DNS 等化学纯试剂均购自于国药

集团化学试剂有限公司; 牛肉浸膏购自广东环凯微生物科技有限公司; 酵母粉购自英国 Oxoid 公司。

主要仪器设备: SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; CLC-B2V-M/CLC 222-TV 型恒温培养箱, MMM Group(德国); 1-14 型离心机, SIGMA(德国); DMG-9423A 型烘箱, 上海精宏; QS-2A 型切丝机, 郑州嘉德机电科技有限公司; Lambda 35 型分光光度计, PerkinElmer(美国); VX-95 型灭菌锅, Systec(德国); Milli-Q Integral 5 型纯水机, Millipore(美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌种培养

##### 1.3.1.1 平板活化

从甘油管中将菌种接种到牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 37 °C 恒温培养 12 h。

##### 1.3.1.2 种子培养基培养

从平板上挑取单菌落接种种子培养基, 发酵培养 6 h 至培养基浑浊, 温度为 37 °C, 摇床转速为 180 rpm。

##### 1.3.1.3 发酵培养基培养

按 3% 的接种量将种子液接种于发酵培养基, 发酵培养 36 h, 测定淀粉酶活。

#### 1.3.2 淀粉酶活的测定

##### 1.3.2.1 葡萄糖标准曲线的绘制

按表 1 配制不同浓度的葡萄糖溶液反应体系, 沸水浴反应 5 min, 冷却后加蒸馏水定容到 25 ml。0 号为空白, 作为调零管。用可见分光光度计在 540 nm 波长处测定吸光光度值。

表 1 葡萄糖标准曲线配置表

Table 1 Glucose standard curve configuration table

试管编号 Test tube No.	0	1	2	3	4	5	6
葡萄糖溶液 Glucose solution (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水 Distilled water (mL)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
DNS (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

##### 1.3.2.2 粗酶液淀粉酶活的测定

将 1 mL 发酵液和 1 mL 1% 淀粉溶液混合并在 37 °C 水浴条件下保温 5 min (混合之前各自在 37 °C 预热 5 min)。加入 1.5 mL DNS 试剂后在沸水浴 5 min 使酶失活, 冷却后用蒸馏水定容到 25 mL。空白为发酵液和淀粉溶液混合直接沸水浴, 再加 1.5 mL DNS, 沸水浴 5 min, 冷却后用蒸馏水定容到 25 mL。用可见分光光度计在 540 nm 波长处测定样品吸

光光度值。

##### 1.3.2.3 淀粉酶活性定义及计算方法

淀粉酶活力单位定义 (U/mL): 在 37 °C 条件下, 1 mL 酶液每分钟水解淀粉产生 1  $\mu$ g 葡萄糖所用的酶量为 1 个酶活力单位。

淀粉酶活力根据以下公式进行计算:

淀粉酶活力 (U/mL) = 生成的葡萄糖毫克数  $\times N \times 1\ 000/5$

式中: N-稀释倍数; 1 000-转化成  $\mu\text{g}$ ; 5-反应时间 5 min。

### 1.3.3 单因素试验

分别对碳源、氮源、金属离子、氯化钠浓度、接种量、培养温度、初始 pH 进行优化, 测定每种因素对淀粉酶活的影响, 选择最佳培养基成分。

表 2 PB 设计培养基组分和水平

Table 2 Medium factors and levels of PB Design

因素 Factor	代码 Code	水平 Level	
		Low(-1)	High(+1)
淀粉 Starch (g/L)	X <sub>1</sub>	10	20
蛋白胨 Peptone (g/L)	X <sub>2</sub>	10	20
酵母粉 Yeast extract (g/L)	X <sub>3</sub>	10	20
CaCl <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>4</sub>	0.2	0.8
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g/L)	X <sub>5</sub>	0.2	0.8
NaCl (g/L)	X <sub>6</sub>	0	5
接种量 Inoculum size (v/v)	X <sub>7</sub>	2	4
初始 pH Initial pH	X <sub>8</sub>	7	9

### 1.3.5 BBD 响应面设计

Box-Behnken 设计适用于 2~5 个因素的优化试验。基于 PB 试验设计和最陡爬坡试验的试验结果, 采用 3 因素的 Box-Behnken design (BBD) 设计来分析各因素之间的关系并得到最优培养基配方。以

### 1.3.4 PB 设计

PB 设计用于考察 8 个独立变量对响应值也就是淀粉酶活的影响, 从而挑选出影响显著的因素。每个独立变量有个两个水平, 分别表示为 +1 和 -1, 各因素的设计浓度见表 2。

PB 设计筛选得到的对淀粉酶活影响显著的因素作为设计因素, 以最陡爬坡试验得出的浓度作为中心点, 每个因素设有 -1.68、-1、0、+1、+1.68 五个水平 (见表 3)。

表 3 BBD 设计的因素水平

Table 3 Coded and uncoded values of the experimental variable

因素 Factor	Code value				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
淀粉 Starch (g/L)	5.91	10	16	22	26.10
蛋白胨 Peptone (g/L)	8.55	14	22	30	35.45
CaCl <sub>2</sub> (g/L)	0.26	0.4	0.6	0.8	0.94

## 2 结果与分析

以牛肉膏蛋白胨培养基作为初始发酵培养基对 *Bacillus koreensis* 的发酵培养基进行优化, 初始发酵培养基发酵所得到的淀粉酶活为 565.13 U/mL。

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 碳源对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

碳源是构成菌体的基本骨架, 是菌体生长的能量来源, 通过影响菌体的呼吸、能量供给、生长及相关代谢最终影响抗生素等次级代谢产物的产量<sup>[9]</sup>。选择 15 g/L 的不同碳源进行碳源优化试验, 结果如图 1 所示, 以淀粉作为碳源时酶活最高, 其次是蔗糖

和葡萄糖。因此, 在下个阶段的 PB 设计中, 将淀粉作为考察因素。

#### 2.1.2 氮源对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

氮源在合成菌体各种初级、次级代谢产物等含氮物质的过程中发挥着重要作用, 同时在发酵生产中氮源起着调节菌体的生长及生物量的作用<sup>[10]</sup>。选择 20 g/L 的不同氮源进行氮源优化试验, 结果如图 2 所示, 菌株以蛋白胨作为氮源时酶活较高, 其次是酵母粉培养基。因此, 在下个阶段的 PB 设计中, 将蛋白胨和酵母粉含量作为考察因素。

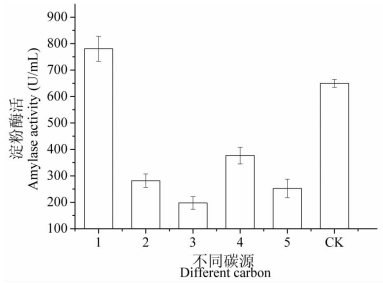


图1 不同碳源对淀粉酶活的影响

Fig. 1 The effect of different carbon sources on amylase activity

注:1. 淀粉,2. 葡萄糖,3. 乳糖,4. 蔗糖,5. 麦芽糖,6. 对照(CK)。

Note:1. Starch,2. Glucose,3. Lactose,4. Sucrose,5. Maltose,6. Contrast (CK).

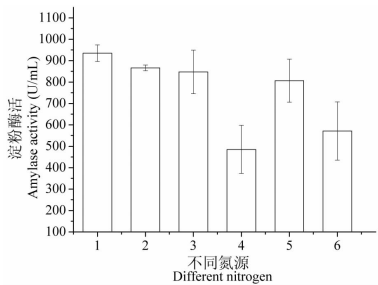


图2 不同氮源对淀粉酶活的影响

Fig. 2 The effect of different nitrogen sources on amylase activity

注:1. 蛋白胨,2. 酵母粉,3. 胰蛋白胨,4. 牛肉膏,5. 牛肉膏 + 蛋白胨,6. 牛肉膏 + 胰蛋白胨。Note:1. Peptone,2. Yeast extract,

3. Tryptone,4. Beef extract,5. Beef extract + Peptone,6. Beef extract + Tryptone.

### 2.1.3 金属离子对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

金属离子是微生物生命活动中必不可少的一类营养物质,它们在机体中的生理功能主要是作为酶的活性中心的组成部分、维持细胞结构的稳定性等。不同金属离子产酶发酵结果见图3,培养基中添加  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  对菌株产酶有促进作用,而添加  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对菌株产酶有一定的抑制作用,尤其是  $\text{Zn}^{2+}$  对 *Bacillus koreensis* 产酶有显著的抑制作用。 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  的浓度试验表明,添加浓度为 0.5 g/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  时,菌株酶活最高。因此,在下一个阶段的 PB 设计中,将  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  作为考察因素。

### 2.1.4 不同盐浓度对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

不同盐浓度产酶发酵结果见图4,随着培养基盐浓度的增加,菌株产酶活力逐渐下降。当不添加盐

时,酶活最高,盐浓度高于 0.8% 时,淀粉酶活显著下降。因此,*Bacillus koreensis* 培养基选择不添加 NaCl。

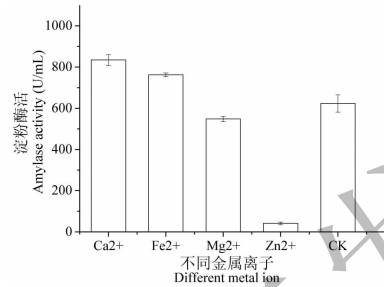


图3 不同金属离子对淀粉酶活的影响

Fig. 3 The effect of different metal ion on amylase activity

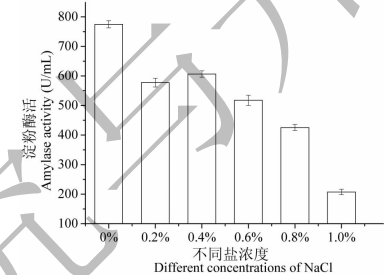


图4 不同 NaCl 浓度对淀粉酶活的影响

Fig. 4 The effect of different concentrations of NaCl on amylase activity

### 2.1.5 不同接种量对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

由图5可知,接种量对 *Bacillus koreensis* 产酶影响较大。3%的接种量较之2%的接种量,酶活明显提升,而5%和3%的接种量酶活基本持平,因此,选取3%的接种量为最佳接种量。

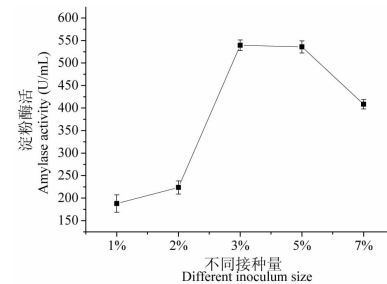


图5 不同接种量对淀粉酶活的影响

Fig. 5 The effect of different inoculum size on amylase activity

### 2.1.6 不同初始 pH 对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

pH 值是衡量培养基酸碱度的一个重要指标,发酵过程中主要影响微生物对营养物质的吸收利用以及代谢产物的分泌,从而影响酶活力,每一种微生物

都有其生长发酵的适宜 pH 范围。由图 6 可知, pH 值从 5.0 到 8.0 酶活随 pH 的增加而增加。pH 为 8.0 时, 酶活达到最大值, 继续增加 pH 值, 酶活迅速降低。从总的变化趋势来看, 中性偏碱性环境有利于菌株产酶。因此, 确定 8.0 为菌株产酶最佳初始 pH 值。

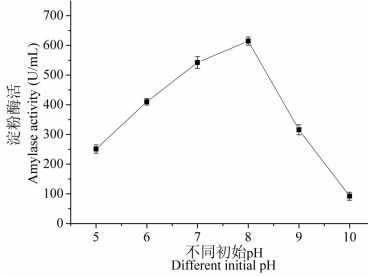


图 6 不同初始 pH 对淀粉酶活的影响

Fig. 6 The effect of different initial pH on amylase activity

2.1.7 不同培养温度对 *Bacillus koreensis* 表达淀粉酶的影响

不同温度产酶发酵结果表明, 温度对产酶影响很大, 温度过低, 微生物代谢缓慢, 随着温度升高, 代谢加快, 由图 7 可以看出 37 °C 时酶活最高, 之后随着温度的升高, 酶活反而降低。因此, 确定 37 °C 为产酶最适培养温度。

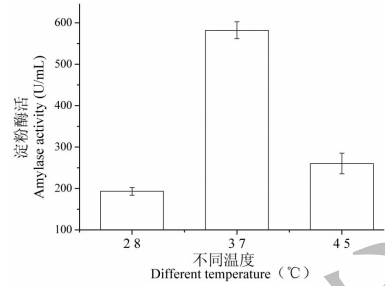


图 7 不同温度对淀粉酶活的影响

Fig. 7 The effect of different temperature on amylase activity

2.2 Plackett-Burman 设计

通过单因素试验表明, 在 *Bacillus koreensis* 产酶过程中, 对其影响较大的 8 个变量为淀粉含量、蛋白胨含量、酵母粉含量、CaCl<sub>2</sub> 含量、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 含量、NaCl 含量、接种量和初始 pH, 再加上 3 个虚拟变量, 每个变量有 高 (+)、低 (-) 2 个水平<sup>[11]</sup>, 采用 Design-Expert 软件设计试验, 共 12 组试验 (表 4)。使用 Design-Expert 软件对表 4 进行分析, 得到 PB 设计方差分析结果。由表 5 可知, 该模型的 P 值 = 0.009 4, 表明该模型显著 (P < 0.05)。上述 8 个因素对淀粉酶活的影响排序为其中淀粉含量 > 蛋白胨含量 > CaCl<sub>2</sub> 含量 > NaCl 含量 > 接种量 > 初始 pH > 酵母粉含量 > FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 含量, 且淀粉含量、蛋白胨含量和 CaCl<sub>2</sub> 含量为显著因素。

表 4 PB 设计实验结果

Table 4 The result of PB design

Run	变量水平 Variable level											酶活 Enzyme activity (U/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	557.23
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	817.68
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	798.34
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	766.11
5	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	845.25
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	718.35
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	645.76
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	687.56
9	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	733.66
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	912.39
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	765.79
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	532.5

注: X<sub>1</sub>: 淀粉含量; X<sub>2</sub>: 蛋白胨含量; X<sub>3</sub>: 虚拟因素 1; X<sub>4</sub>: 虚拟因素 2; X<sub>5</sub>: 酵母粉含量; X<sub>6</sub>: 虚拟因素 3; X<sub>7</sub>: CaCl<sub>2</sub> 含量; X<sub>8</sub>: FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 含量; X<sub>9</sub>: NaCl 含量; X<sub>10</sub>: 接种量; X<sub>11</sub>: 初始 pH。

Note: X<sub>1</sub>: starch; X<sub>2</sub>: peptone; X<sub>3</sub>: the virtual factors 1; X<sub>4</sub>: the virtual factors 2; X<sub>5</sub>: yeast extract; X<sub>6</sub>: the virtual factors 3; X<sub>7</sub>: CaCl<sub>2</sub>; X<sub>8</sub>: FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; X<sub>9</sub>: NaCl content; X<sub>10</sub>: inoculum size; X<sub>11</sub>: initial pH.

表5 PB设计各因数效应分析

Table 5 Effect analysis of each factor of PB design

因素 Factor	系数 Coefficient	自由度 <i>df</i>	<i>F</i> -Value	<i>P</i> -value Prob > <i>F</i>	显著性 Significance	重要性排列 Order of importance
模型 Model	-	8	28.64	0.0094	Significant	-
A-淀粉 Starch	77.92	1	121.33	0.0016	**	1
B-蛋白胨 Peptone	62.06	1	76.96	0.0031	**	2
E-酵母粉 Yeast extract	-0.65	1	8.531E-003	0.9322		7
G-CaCl <sub>2</sub>	38.62	1	29.81	0.0121	*	3
H-FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.40	1	3.198E-003	0.9585		8
J-NaCl	4.53	1	0.41	0.5671		4
K-接种量 Inoculum size	3.95	1	0.31	0.6160		5
L-初始 pH Initial pH	-3.59	1	0.26	0.6472		6

注: \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同。

Note: \* means significant difference at  $P < 0.05$ , \*\* means extremely significant difference at  $P < 0.01$ , the same as below.

由上述 Plackett-Burman 试验得到的回归方程为:

$$\text{淀粉酶活} = 261.03 + 15.58A + 12.41B - 0.13E + 128.74G + 1.33H + 1.81J + 3.95K - 3.59L$$

其中 A 为淀粉含量, B 为蛋白胨含量, E 为酵母粉含量, G 为 CaCl<sub>2</sub> 含量, H 为 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 含量, J 为 NaCl 含量, K 为接种量, L 为初始 pH。方程拟合的相关性为  $R^2 = 98.71\%$ , 表明此多项式方程很好地模拟和解释了 Plackett-Burman 的试验结果。

### 2.3 最陡爬坡试验

最陡爬坡法可以确定主要影响因素的水平, 以

其试验值变化的梯度方向为爬坡方向, 根据各因素效应值的大小确定变化步长, 能快速、经济地逼近最佳值区域<sup>[12]</sup>。最陡爬坡试验结果见表6。由表6可知, 淀粉含量为 16 g/L, 蛋白胨含量为 22 g/L, CaCl<sub>2</sub> 含量为 0.6 g/L 时, 实验组合 4 的响应值 (淀粉酶活) 达到最高, 此后淀粉酶活开始降低, 这说明适当增加培养基中碳源、氮源以及金属离子的含量有助于菌体的产酶, 但过多的添加反而造成不利影响, 因此选择适宜的添加量尤为重要。选取实验号 4 试验组合中各种因素水平作为后续 Box-Behnken 试验设计的中间点。

表6 最陡爬坡试验设计及结果

Table 6 Design and results of path of steepest ascent experiment

实验号 No.	淀粉 Starch (g/L)	蛋白胨 Peptone (g/L)	CaCl <sub>2</sub> (g/L)	淀粉酶活 Amylase activity (U/mL)
1	10	16	0.3	735.67
2	12	18	0.4	798.29
3	14	20	0.5	844.36
4	16	22	0.6	922.35
5	18	24	0.7	882.12
6	20	26	0.8	818.32

### 2.4 Box-Behnken 中心组合设计

响应面法可通过较少的试验, 较短的周期在整个区域内给出因素与响应值之间的明确函数关系, 且精度更高, 同时能够研究几种因素间的交互作用。根据最陡爬坡试验筛选出的试验中心点, 采用 Box-Behnken 试验设计, 利用 Design Expert 10 软件进行

3 因素 3 水平的响应面分析试验, 试验设计及结果见表7。建立以淀粉酶活为目标函数的二次回归方程, 并对所得到的回归方程进行方差分析与显著性检验, 结果见表6。使用 Design-Expert 软件进行分析, 得到一个 3 元 2 次方程:

$$Y = -1\,509.26 + 96.41A + 83.43B + 2\,577.94C -$$

0.38AB-28.58AC-3.68BC-1.96A<sup>2</sup>-1.73B<sup>2</sup>-1.885.86C<sup>2</sup>

方程中,A 为淀粉含量,B 为蛋白胨含量,C 为 CaCl<sub>2</sub> 含量。方程中正号表示协同效应,而负号表示拮抗效应<sup>[13,14]</sup>。该方程的 R<sup>2</sup> =0.916 3,表明模型能解释 91.63% 淀粉酶产量的变化,回归拟合程

度较好。模型的 ANOVA 结果见表 8。其中模型的 P > F 值 =0.000 3,说明该模型是一个显著并十分有效的模型。从 ANOVA 还可以看出淀粉和 CaCl<sub>2</sub> 在模型中是影响最为显著的因素。

表 7 BBD 响应面设计及结果

Table 7 Experiment and results of BBD design

实验号 No.	淀粉 Starch (g/L)	蛋白胨 Peptone (g/L)	CaCl <sub>2</sub> (g/L)	淀粉酶活 Amylase activity (U/mL)
1	16	22	0.6	958.85
2	10	30	0.4	614.24
3	16	22	0.263 641	856.33
4	16	22	0.6	925.66
5	16	22	0.936 359	684.79
6	16	22	0.6	964.18
7	16	35.454 3	0.6	625.57
8	16	22	0.6	958.15
9	22	14	0.4	787.28
10	5.909 24	22	0.6	742.06
11	10	30	0.8	624.44
12	16	22	0.6	946.72
13	26.090 8	22	0.6	827.03
14	22	14	0.8	683.85
15	22	30	0.8	619.65
16	10	14	0.8	548.45
17	16	22	0.6	896.28
18	22	30	0.4	814.13
19	16	8.545 66	0.6	717.51
20	10	14	0.4	582.2

表 8 响应面二次方程模型的 ANOVA 值

Table 8 ANOVA of response surface quadratic model

来源 Source	平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	3.524E +005	9	39 154.22	12.16	0.000 3	Significant
A-淀粉含量 Starch content	33 707.45	1	33 707.45	10.47	0.008 9	**
B-蛋白胨含量 Peptone content	515.98	1	515.98	0.16	0.697 4	
C-CaCl <sub>2</sub> 含量 CaCl <sub>2</sub> content	27 242.35	1	27 242.35	8.46	0.015 6	*
AB	2 641.92	1	2 641.92	0.82	0.386 4	
AC	9 409.18	1	9 409.18	2.92	0.118 2	
BC	277.30	1	277.30	0.086	0.775 2	
A <sup>2</sup>	71 607.32	1	71 607.32	22.24	0.000 8	**
B <sup>2</sup>	1.758E +005	1	1.758E +005	54.59	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	82 005.28	1	82 005.28	25.47	0.000 5	**
Lack of Fit	28 785.18	5	5 757.04	8.43	0.017 7	Significant
Pure Error	3 415.51	5	683.10			

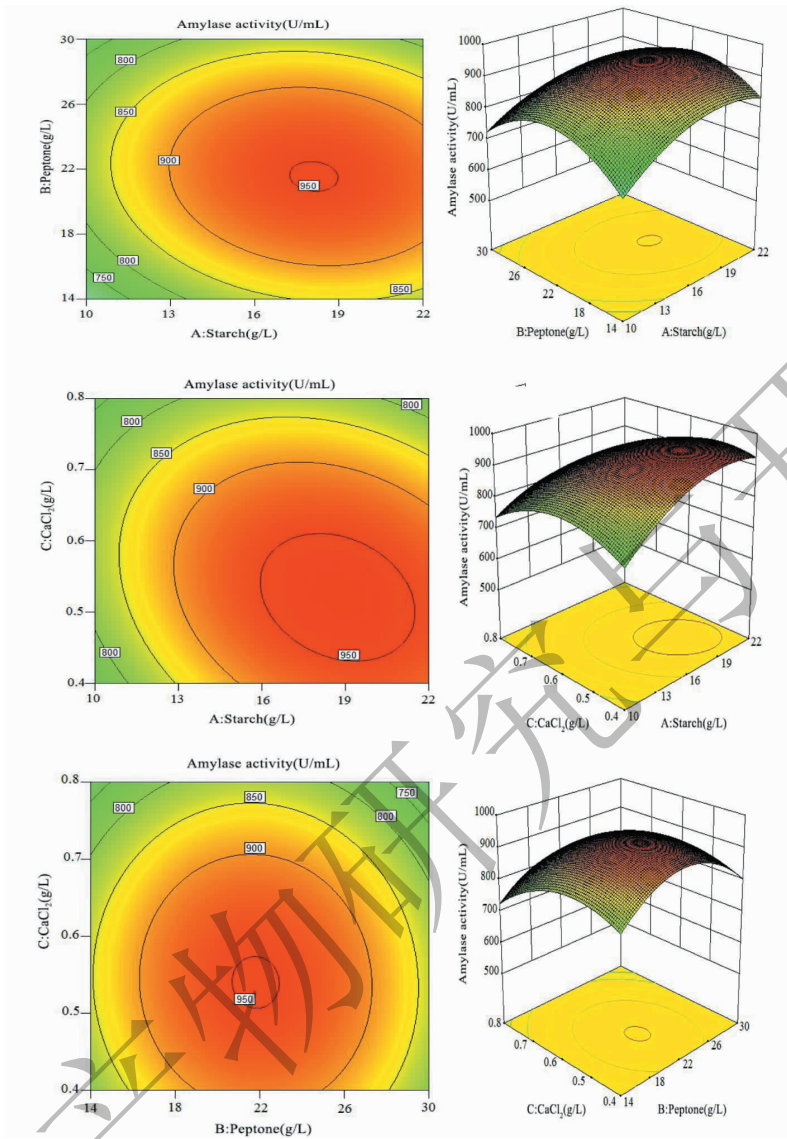


图8 淀粉、蛋白胨和  $\text{CaCl}_2$  含量交互作用对淀粉酶活影响的响应面和等高线

Fig. 8 Response surface plot and contour line of effects of interaction between starch, peptone and calcium chloride content on amylase activity

图8分别表示了淀粉含量和蛋白胨含量、淀粉含量和  $\text{CaCl}_2$  含量、蛋白胨含量和  $\text{CaCl}_2$  含量的等高线图和3D图,各培养基成分的含量对应的响应值都是随着培养基成分的含量的提高先升高后降低。根据上述分析和软件的预测,*Bacillus koreensis* 的最优培养基组合为淀粉含量 18.74 g/L,蛋白胨含量 21.56 g/L,  $\text{CaCl}_2$  含量 0.52 g/L,预测的最高酶活为 964.31 U/mL。为验证模型预测的可靠性,用预测的最优培养基条件下进行3次平行试验,得出酶活的实际平均值为  $959.39 \pm 22.34$ ,与响应面拟合所得的方程预测值符合良好,说明该模型可以很好

的模拟 *Bacillus koreensis* 的产酶效率。

### 3 结论

生物酶法降解淀粉因为条件温和、易于操作、改善效果明显,在实际应用中具有一定优势,可将淀粉分解成低聚糖、半乳糖醛酸、还原糖等,减少烟草原料的刺激性和杂气,改善吸食品质,提高其在烟草行业中的使用价值<sup>[15]</sup>。生物酶法所使用的酶主要有商品酶和菌株发酵提取的酶,产淀粉菌株主要有解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、米根霉等<sup>[16]</sup>,这些高效的菌株大多不是从烟叶表面分离得到。本研究从全国多个产地片烟筛选得到的 *Bacillus koreensis* 来



源于烟叶表面,与烟草的烟香能较好的契合,对可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉都有较强的降解能力,能有效协调烟草的化学成分、减少刺激、增加烟香,有很广泛的应用前景。

本研究通过单因素试验、PB 设计、最陡爬坡试验和 BBD 响应面设计对 *Bacillus koreensis* 的培养基进行了系统的优化。BBD 响应面设计较之传统的线性回归和正交试验有周期短、试验次数少、精度高等优势,因此在微生物发酵中得到广泛的应用<sup>[17]</sup>。该方法先通过 PB 设计选出影响酶活的最显著因素为淀粉、蛋白胨和 CaCl<sub>2</sub>,再通过最陡爬坡设计试验逼近响应面的中心点,最后通过 BBD 响应面设计得出最优的培养基配方。验证试验得出酶活的实际平均值为 959.39 ± 22.34 U/mL,较之初始酶活提高了 69.67%,大幅度提高了淀粉酶活和片烟处理效率,为进一步微生物酶制剂的工业化应用提供了材料基础。故下一步研究将在本研究的基础上,研究 *Bacillus koreensis* 的发酵罐条件(溶氧、转速、pH 调节等)和该淀粉酶的酶学性质、分子量等,并通过硅藻土过滤、膜过滤等方法进一步精制酶液。本研究开发的酶制剂天然高效、感官评吸配伍性强,为卷烟生产企业提高上部叶的可用性和提高烟草品质提供一条新的方向并奠定了良好的基础。

#### 参考文献

- Weeks WW. Chemistry of tobacco constituents influence flavor and aroma[J]. Re Adv of Tobacco Sci, 1985, 11: 175-200.
- Tao XQ, Huang M, Yang X, et al. Analysis and evaluation of starch content in Sichuan tobacco leaves [J]. Tobacco Sci Tech(烟草科技), 2012, 1: 78-80.
- Wang DS. Tobacco cultivation(烟草栽培学)[M]. Hefei: Press of University of Science and Technology of China, 2002.
- He F, Wang T, Wang M, et al. Structural characteristics and properties of starch granules in flue-cured tobacco leaves [J]. Acta Tabacaria Sinica(中国烟草学报), 2013, 19(3): 49-53.
- Wang XB, Sun FS, Wang SF, et al. Advances in influence factors and controlling measures of starch in flue-cured tobacco leaves[J]. Chin Tob Sci(中国烟草科学), 2008, 29(2): 53-57.
- Feng YJ, Wang PF, Chen ZF, et al. Screening and application of an efficient starch-degrading strain from Tobacco Leaf [J]. J Henan Agri Sci(河南农业科学), 2018, 47: 150-154.
- Sha YF, Dong HZ, Zhang Y, et al. Preparation of multienzyme complex and condition optimization for degradation of macromolecules in upper tobacco leaves[J]. Chin Tob Sci(中国烟草科学), 2018, 39(3): 80-88.
- Li X, Liu FZ, Yao GM, et al. Experiments on improvement of smoking quality of tobacco with enzymatic degradation[J]. Tobacco Sci Tech(烟草科技), 2002, 3: 14-17.
- Wang Q. Effects of different conditions on mycelial growth of trichoderma[J]. Chin Agric Bull(中国农学通报), 2002, 18(5): 57-59.
- Voelker F, Altaba S. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*' [J]. Microbiology, 2001, 147: 2447-2459.
- Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments[J]. Biometrika, 1946, 33: 305-325.
- Robert HC. Fundamental concepts in the design of experiments[M]. Holt: Rinehart and Winst, 1982: 35-42.
- Lu SY, Qian JQ, Zhang GW, et al. Application of statistical method to evaluate immobilization variables of trypsin entrapped with sol-gel method[J]. Biochem Tech, 2009, 1: 79-84.
- Tan KT, Lee KT, Mohamed AR. A glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: An optimization study via response surface methodology[J]. Biore Tech, 2010, 101: 665-669.
- Li W, Li SP, Bulletin, et al. Application of enzyme on tobacco industry[J]. Chin Agric Bull(中国农学通报), 2006, 22(9): 66-70.
- Yang YH, Li SC, Lan SY, et al. Identification of an acid-stable  $\alpha$ -amylase-producing strain and its enzymatic characteristics[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27: 1544-1549.
- Wang YH, Zhang Q, Zhang X. Enhanced antibiotic activity *Xenorhabdus nematophila* by fermentation medium optimization with response surface methodology[J]. J Northwest A&F Univ(西北农林科技大学学报), 2009, 37: 140-146.