

# 响应面法优化解脂耶罗维亚酵母 ypy01 淀粉酶发酵条件研究

柳志强, 田 富, 李晓宇, 张横江, 刘美珍  
(海南大学环境与植物保护学院, 海南儋州 571737)

**摘要:**利用 Plackett-Burman(PB)设计和响应面法,对解脂耶罗维亚酵母 ypy01 淀粉酶生产条件进行了优化。PB设计筛选到3个显著因子,分别为可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度和初始pH。采用响应面法对3个显著因子进一步优化,获得了最佳培养基组成:0.84%可溶性淀粉,2.25%蛋白胨,1%酵母粉,3%NaCl,0.05% MgSO<sub>4</sub>,0.05% CaCl<sub>2</sub>,初始pH为6.8,在最优条件下,淀粉酶产量达到2012.50 U/mL。

**关键词:**解脂耶罗维亚酵母;淀粉酶;优化;Plackett-Burman设计;响应面法

中图分类号:Q93

文献标志码:A

论文编号:2010-3258

## Optimization of Amylase Production from *Yarrowia lipolytica* ypy01 by Using Response Surface Methodology

Liu Zhiqiang, Tian Fu, Li Xiaoyu, Zhang Hengjiang, Liu Meizhen  
(College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Danzhou Hainan 571737)

**Abstract:** The aim of this work was to optimize the operational parameters of marine yeast *Yarrowia lipolytica* ypy01 to increase amylase production using Plackett-Burman (PB) design and response surface methodology (RSM). The results of PB design showed that the concentrations of starch and peptone and initial pH were the most significant factors to influence amylase production. A Central Composite Design (CCD), which is the standard design of RSM, was then employed to further optimize these three factors. The experimental results indicated that the optimized composition of medium was 0.84% starch, 2.25% peptone, 1% yeast extract, 3% NaCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.05% CaCl<sub>2</sub> and pH 6.8. Under the optimized conditions, the amylase production was up to 2012.50 U/mL in shake flask experiments.

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*; amylase; optimization; Plackett-Burman design; response surface methodology

### 0 引言

淀粉酶是催化淀粉水解的一类酶的总称,广泛存在于动物、植物和微生物中。目前工业上淀粉酶的生产主要来源于微生物,微生物淀粉酶具有产量高、功能多样的特点,广泛应用于发酵、食品、饲料、医药、造纸及纺织工业,具有良好的发展和应用前景<sup>[1-2]</sup>。

微生物在发酵生产酶制剂的过程中,发酵培养基的组分在很大程度上影响微生物的生长和酶的产量,

因此发酵条件的优化是微生物发酵生产的前提<sup>[3]</sup>。传统优化方法如单因素方法,虽然比较简单,但耗时费力,又忽略了各优化因子之间的关系<sup>[4]</sup>。Plackett-Burman设计是一种经济有效的两水平实验设计方法,它可以利用最少的实验次数,从众多的考察因素中快速而有效地筛选出主要的影响因子,广泛地用于因子主效应的估计中<sup>[5]</sup>。响应面法是一种优化生物过程的综合技术,通过建立连续变量曲面模型,对影响生物过

**基金项目:**海南省自然科学基金项目“海南热带海洋酵母多样性分析及活性菌株筛选”(310034);海南大学科研启动基金项目“海南热带海洋酵母资源多样性分析”(kyqd1027)。

**第一作者简介:**柳志强,男,1980年出生,河北邯郸人,讲师,博士,研究方向:海洋生物学。通信地址:571737 海南大学环境与植物保护学院, E-mail: liuzhiqiang1980@yahoo.com.cn。

**通讯作者:**李晓宇,女,1979年出生,河南新郑人,讲师,博士,研究方向:分子微生物学。通信地址:571737 海南大学环境与植物保护学院, E-mail: lixiaoyu911@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2010-11-11,修回日期:2011-03-22。

程中的因子水平及其交互作用进行优化与评价<sup>[6]</sup>,这些方法已经广泛应用到许多发酵条件优化实验中<sup>[7]</sup>。王淑军等<sup>[8]</sup>利用响应面法对假交替单胞菌 G23 产 $\alpha$ -淀粉酶的发酵条件进行了优化,结果表明,可溶性淀粉浓度为 1.16%、蛋白胨浓度为 2.11%,发酵温度 12.38℃,酶活为 41.4 U/mL,较优化前提高了 7 倍;孙海彦等<sup>[9]</sup>利用响应面法研究了培养基成分对 *Penicillium* sp. X21 液态发酵生产淀粉酶的影响,得到的培养基组成为:玉米粉 42 g/L,豆饼粉 30 g/L, MgCl<sub>2</sub> 16 mmol/L,在最优条件下酶活达到 239 U/mL,与采用基本培养基的相比,酶活提高了 7.5 倍。苏小军等<sup>[10]</sup>利用相应面法对黑曲霉 AF-1 固态发酵生产淀粉酶的条件进行了优化,得出豆粕粉含量、麸皮添加量和温度的最佳值分别为 11.46%、17.41 g 和 26.26℃,优化后的酶活力(204 U/mL)比初始酶活力(42 U/mL)提高了 3.85 倍。

有关响应面法优化淀粉酶生产的研究多集中在细菌与霉菌方面,对于酵母生产淀粉酶的研究较少,涉及海洋酵母的更少<sup>[11]</sup>。在前面的研究中,笔者从海南洋浦近海分离出 1 株产淀粉酶的海洋酵母菌,鉴定为解脂耶罗维亚酵母,本研究利用响应面法对其发酵生产淀粉酶的条件进行了优化,确定了最佳发酵条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 解脂耶罗维亚酵母 ypy01,本实验室保存。

1.1.2 培养基 种子培养基:蛋白胨 2%,酵母粉 1%,葡萄糖 2%,pH 7.0。发酵培养基:可溶性淀粉 1%,蛋白胨 2%,酵母粉 1%,NaCl 3%,MgSO<sub>4</sub> 0.05%,CaCl<sub>2</sub> 0.05%,pH 7.0。

## 1.2 方法

1.2.1 淀粉酶活力测定 1.5 mL 1%的可溶性淀粉为底物,加入 0.5 mL 适当稀释的酶液,在 pH 7.0,50℃下反应 20 min,利用 DNS 法测定还原糖的量<sup>[12-13]</sup>,1 个活力单位定义为在实验条件下,每分钟水解生成 1  $\mu$ g 还原糖的酶量。

1.2.2 显著因子筛选 使用 Design expert7.0 软件,选用 11 因素、实验次数为 12 的 Plackett-Burman 设计,考查各因素对产酶影响的显著性。

1.2.3 响应面分析 根据中心组合设计(Central Composite Design, CCD)原理,对选取的显著因子从 5 个水平进行考查,利用 Design expert7.0 软件进行分析,确定最优条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 优化

选用实验次数 N=12 的实验设计,对 11 个因素进行考查,其中 7 个实际因素,分别为可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度、酵母粉浓度、初始 pH、NaCl 浓度、MgSO<sub>4</sub> 浓度和 CaCl<sub>2</sub> 浓度,4 个为虚拟因素(H, J, K 和 L),响应值为淀粉酶活力。7 个实际因素分别从 2 个水平(-1,+1)来考查,实验设计见表 1,各因素效应结果见表 2。

表 2 中, *F* 值表征各因子对发酵过程的显著性,如果 *F* 值小于 0.05,说明该因子对该淀粉酶的生产是显著的,从表 2 可以看出可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度和初始 pH 3 个因子是显著的。

### 2.2 响应面优化

对于 Plackett-Burman 设计选择的 3 个显著因子

表 1 Plackett - Burman 实验设计及实验结果

	因子											淀粉酶活力/(U/mL)	
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	实测值	预测值
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	294.32	346.81
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	683.56	631.07
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	168.04	181.40
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	274.66	240.86
5	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	314.06	327.42
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	594.16	580.80
7	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	677.76	709.82
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	153.44	121.38
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	548.54	516.48
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	159.79	212.28
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	186.70	152.90
12	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	431.94	465.74

表2 Plackett-Burman设计因素水平及效应结果

因子	名称	-1	+1	F-value	P-value
A	可溶性淀粉/%	0.5	1	34.13	0.0100*
B	蛋白胨/%	0.5	2	12.92	0.0369*
C	酵母粉/%	1	3	0.065	0.8158
D	初始pH	6	8	23.32	0.0169*
E	NaCl/%	1	3	4.84	0.1152
F	MgSO <sub>4</sub> /%	0.02	0.05	4.46	0.1252
G	CaCl <sub>2</sub> /%	0.02	0.05	7.52	0.0712

注:\*表示该项数据是显著的。

表3 响应面设计因素水平

因子	名称	水平				
		-α	-1	0	1	α
X <sub>1</sub>	可溶性淀粉/%	0.37	0.50	0.75	1.00	1.12
X <sub>2</sub>	蛋白胨/%	0.50	1.00	2.00	3.00	3.50
X <sub>3</sub>	初始pH	5.50	6.00	7.00	8.00	8.50

表4 响应面实验设计与结果

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	淀粉酶活力/(U/mL)	
				实测值	预测值
1	-1	-1	-1	100.10	-22.54
2	1	-1	-1	865.97	774.20
3	-1	1	-1	1241.17	1132.44
4	1	1	-1	1688.48	1619.95
5	-1	-1	1	1030.41	941.88
6	1	-1	1	1341.47	1293.14
7	-1	1	1	227.26	161.97
8	1	1	1	238.42	204.00
9	-α	0	0	776.37	963.36
10	α	0	0	1500.21	1592.44
11	0	-α	0	1430.17	1594.55
12	0	α	0	1529.08	1643.92
13	0	0	-α	265.41	456.71
14	0	0	α	30.13	118.05
15	0	0	0	2001.50	1956.63
16	0	0	0	1999.64	1956.63
17	0	0	0	1983.78	1956.63
18	0	0	0	1990.72	1956.63
19	0	0	0	1972.28	1956.63
20	0	0	0	2001.27	1956.63

(可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度和初始pH),从5个水平(-α, -1, 0, 1, α)进行考察(见表3),共进行20组实

验,每组实验均测定酶产量,实验设计及每组实验对应的酶产量见表4。

根据实验结果,由软件获得拟合方程为:

$$Y = -47157.18 + 11815.38X_1 + 4234.25X_2 + 11575.11X_3 - 309.23X_1X_2 - 445.48X_1X_3 - 483.72X_2X_3 - 4826.52X_1^2 - 149.95X_2^2 - 741.89X_3^2$$

其中:Y表示淀粉酶产量,X<sub>1</sub>表示可溶性淀粉浓度(%),X<sub>2</sub>表示蛋白胨浓度(%),X<sub>3</sub>表示初始pH。相关系数R<sup>2</sup>=0.98,说明该公式能够较好地模拟淀粉酶的发酵过程。

对表4的结果做响应面,见图1和图2。图1表示初始pH为7.0时,可溶性淀粉浓度和蛋白胨浓度对酶产量的交互影响,可以看出可溶性淀粉浓度为0.8%~

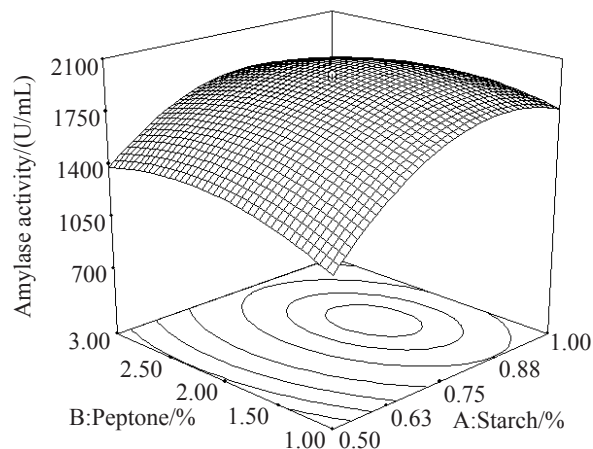


图1 可溶性淀粉与蛋白胨浓度对淀粉酶产量的响应面(初始pH为7.0)

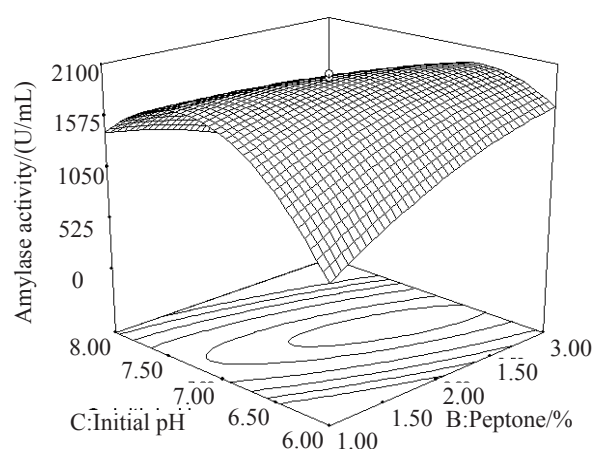


图2 蛋白胨浓度与初始pH对淀粉酶产量的响应面(可溶性淀粉浓度为0.75%)

0.9%, 蛋白胨浓度为2.0%~2.5%时, 酶产量较高。图2表示可溶性淀粉浓度为0.75%时, 蛋白胨浓度和初始pH对酶产量的交互影响, 可以看出初始pH对酶产量的影响较大, 酶产量随pH的增加呈现先增后减的趋势, 当蛋白胨浓度1.5%~2.5%之间时, 淀粉酶的产量变化不大。依据软件预测, 当可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度和初始pH分别为0.84%、2.25%、6.8时, 酶产量最高, 为2005.99 U/mL。

### 2.3 模型验证

按照优化后的产酶条件: 可溶性淀粉0.84%, 蛋白胨2.25%, 酵母粉1%, NaCl 3%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.05, pH 6.8, 180 r/min, 28℃培养72 h, 实验测得酶活力为2012.50 U/mL, 与预测值2005.99 U/mL比较接近, 说明本实验设计与响应面分析方法能够较好地模拟该淀粉酶实际的生产过程, 结果可靠。

### 3 结论与讨论

目前, 微生物淀粉酶的研究多集中在陆地微生物, 涉及海洋微生物的相对较少。笔者利用Plackett-Burman设计结合响应面法对1株分离自海洋的解脂耶罗维亚酵母产淀粉酶的发酵条件进行了优化, 获得了最佳的发酵条件: 可溶性淀粉0.84%, 蛋白胨2.25%, 酵母粉1%, NaCl 3%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.05%和pH 6.8, 在最优条件下, 淀粉酶产量得到显著提高, 达到2012.50 U/mL, 较初始酶产量(309.60 U/mL)提高了6.5倍。

影响微生物产酶的因素很多, 包括培养基组分、培养温度、转速等。本研究在Plackett-Burman设计中选取的因素, 主要集中在培养基组分方面, 这主要是基于前期研究的基础, 培养温度、转速等因素对该菌产酶的影响不大。另外, 对于Plackett-Burman实验来说, 过

多的因素也会带来更大的实验误差, 故本研究选取7个主要因素作为考察对象。经过Plackett-Burman设计, 成功筛选到3个对产酶有显著影响的因子, 分别为可溶性淀粉浓度、蛋白胨浓度和初始pH。一般来说, 菌株不同, 对其产酶影响显著的因子也是不同, 茆军等<sup>[14]</sup>利用Plackett-Burman设计法对芽孢杆菌La7产低温淀粉酶发酵条件进行了筛选, 获得3个显著因素, 分别为蔗糖、蛋白胨、装添量; 在霉菌方面, 对产酶影响显著的因素也不尽相同, 如苏小军等<sup>[10]</sup>报道影响黑曲霉AF-1生产淀粉酶的显著因素为豆粕粉、麸皮含量和温度; 而郑毅等<sup>[15]</sup>报道影响米曲霉FS016淀粉酶生产的显著因素是豆粕粉、NaNO<sub>3</sub>和FeSO<sub>4</sub>。近年来, Plackett-Burman设计在许多研究中被采用, 可见其在筛选显著因子方面具有较大的优势。获得显著因子之后, 一般需要利用响应面法对其进行优化, 以获得最佳水平。响应面法能够精确地研究各因子与响应值之间的关系, 解决多变量的问题, 还可以对各显著因子水平及其交互作用进行优化和评价, 可快速有效地确定多因子的最佳条件, 该方法比正交试验更为有效<sup>[16]</sup>。经过相应面法的优化, 获得了该菌最佳的发酵条件, 相比初始培养基, 淀粉酶产量得到了显著的提高, 说明了响应面法的有效性。另外, 本研究主要采用摇瓶发酵的方法, 很多因素(如溶氧、pH等)难以有效控制, 不能充分发掘该菌发酵生产淀粉酶的潜力, 对于该菌淀粉酶发酵规模的放大以及相关酶学性质, 也有待于进一步的研究。

### 参考文献

- [1] Kandra L, Gyemant G, Remenyik J.  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance[J]. J Mol Struct, 2003: 666-667, 487-498.
- [2] 胡欣洁, 李凇, 王忠彦, 等. 耐酸性 $\alpha$ -淀粉酶产生菌的选育[J]. 酿酒科技, 2005, 5: 27-29.
- [3] Djekrif-Dakhmouche S, Gheribi-Aoulmi Z, Meraihi Z, et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder[J]. J Food Eng, 2006, 7: 190-197.
- [4] Weuster-Botz D. Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search[J]. J Biosci Bioeng, 2000, 90: 473-483.
- [5] Kalil S J, Mauger F, Rodrigues M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. Proc Biochem, 2000, 35: 39-550.
- [6] Annadurai G. Design of optimum response surface experiments for adsorption of direct dye on chitosan[J]. Bioproc Eng, 2000, 23: 451-455.
- [7] 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: 227-231.
- [8] 王淑军, 刘红飞, 李华钟, 等. 海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. G23 产低温淀粉酶发酵条件的研究[J]. *中国酿造*, 2008, 23: 9-12.
- [9] 孙海彦, 张伟国. *Penicillium* sp. X21 液态发酵生产淀粉酶的优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(3): 106-109.
- [10] 苏小军, 熊兴耀, 谭兴和, 等. 黑曲霉 AF-1 固态发酵生产淀粉酶的条件优化[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2009, 35(2): 208-212.
- [11] Li H F, Chi Z M, Wang X H, et al. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1006-1012.
- [12] Li H F, Chi Z M, Duan X H, et al. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 462-465.
- [13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Anal Chem*. 1959, 31: 426-428.
- [14] 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.
- [15] 郑毅, 刘源慧, 邓琳芬. 响应面法优化米曲霉 $\alpha$ -淀粉酶液体发酵培养基[J]. *海峡科学*, 2010, 10: 3-4.
- [16] 田东, 袁其朋, 孙新晓, 等. 响应面法优化多粘菌素B的发酵条件[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(15): 53-57.