

枯草芽孢杆菌工程菌产耐酸性高温 α -淀粉酶 发酵条件的优化

胡博, 刘逸寒, 徐艳静, 薄嘉鑫, 路福平

(工业发酵微生物教育部重点实验室; 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 利用基因工程手段获得的产耐酸性高温 α -淀粉酶基因枯草芽孢杆菌工程菌株 pWB-*amyd*/WB600, 通过单因素筛选及正交实验进行发酵培养基优化, 得到的最佳配方为(g/L): 玉米粉 20, 蛋白胨 30, CaCl₂ 0.5, Na₂HPO₄ 8. 同时对实验室摇瓶条件下液体发酵的主要影响因素初始 pH、接种量、装液量、转速、温度等进行探讨, 确定了最佳培养条件: 37 °C、pH 6.5、200 r/min 摇床培养 36 h, 接种量为 2%, 装液量为 30 mL/250 mL. 在此优化条件下, 耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到 3 980 U/mL, 是未优化条件下的 2.1 倍.

关键词: 枯草芽孢杆菌工程菌; 耐酸性高温 α -淀粉酶; 培养基优化; 正交实验; 发酵条件优化

中图分类号: Q814.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2012)06-0001-06

Optimization of Fermentation Conditions for Acid-resistant and Heat-stable α -Amylase Production with Engineered Strain *Bacillus subtilis*

HU Bo, LIU Yihan, XU Yanjing, BO Jiabin, LU Fuping

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Single factor experiments and orthogonal experiments were adopted to optimize the liquid fermentation medium and conditions of the engineered strain *Bacillus subtilis* pWB-*amyd*/WB600, which expresses acid-resistant and heat-stable α -amylase. The results indicated that the constituents of the medium, the filling volume of shaking flask, the rotation speed and the temperature were the major factors that affected the yield of α -amylase. The composition of the best medium was 20 g/L maizena, 30 g/L peptone, 0.5 g/L CaCl₂, and 8 g/L Na₂HPO₄. The optimal fermentation conditions were the combination of 37 °C temperature, 6.5 initial pH, shaking at 200 r/min for 36 h, 2% of inoculum volume and 30 mL/250 mL medium volume. The enzyme activity of α -amylase is 3980 U/mL in the optimized conditions, which is 2.1 times of the enzyme activity level in unoptimized conditions.

Key words: engineered strain *Bacillus subtilis*; acid-resistant and heat-stable α -amylase; medium optimization; orthogonal experiment; fermentation conditions optimization

α -淀粉酶作为淀粉酶的一种, 是目前最重要、最古老、应用范围最广的工业酶制剂之一, 其中耐高温 α -淀粉酶凭借其热稳定上的优势已经占据了很大的市场^[1]. 耐高温 α -淀粉酶目前被广泛地应用于味精、啤酒、有机酸、酒精等食品发酵以及淀粉工业^[2-3]. 目

前, 国内外市场中常用的耐高温 α -淀粉酶的最适 pH 范围为 6~7^[4], 在酸性条件下酶活明显降低, 甚至失去活性, 已经不能满足酸性条件下淀粉原料深加工工艺的要求, 因此对耐酸性 α -淀粉酶的需求日益上升. 近几年来国内开展了大量的针对产耐酸性 α -淀

收稿日期: 2012-04-22; 修回日期: 2012-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101219)

作者简介: 胡博(1985—), 男, 吉林人, 硕士研究生; 通信作者: 路福平, 教授, lfp@tust.edu.cn.

粉酶菌株发酵条件优化的研究,王淑军等^[5]对 1 株产耐热酸性 α -淀粉酶的嗜嗜热古菌进行了发酵条件的优化,经优化后 α -淀粉酶活力达到了 500 U/mg;刘雅琴等^[6]在筛选出的耐酸性 α -淀粉酶产生菌的基础上对其进行发酵培养基与发酵条件的优化,最终 α -淀粉酶活力达到 31.4 U/mL,比初始时提高了 0.65 倍;莫新迎等^[7]通过单因素实验和响应面分析法对 1 株产耐酸性 α -淀粉酶的小孢根霉菌培养基组分进行优化, α -淀粉酶活力较优化前提高了 0.15 倍,达到 259.902 U/g 干物质,但其酶活力均不高。

本实验通过对本课题组前期研究获得的可高效表达耐酸性高温 α -淀粉酶枯草芽孢杆菌工程菌株 pWB-*amyd*/WB600^[8-10]发酵条件进行优化,旨在提高耐酸性高温 α -淀粉酶活力,为以淀粉为原料的深加工工业的发展提供有力支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株

产耐酸性高温 α -淀粉酶工程菌株 pWB-*amyd*/WB600,由本实验室构建^[9]并保藏。以初始发酵培养基及未优化的发酵条件进行发酵培养,初始酶活力为 1 890 U/mL。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5, NaCl 10,琼脂粉 20,卡那霉素 0.03, pH 自然。

种子培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5, NaCl 10,卡那霉素 0.03, pH 自然。

初始发酵培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5, NaCl 10, pH 自然。

1.3 培养方法

种子的培养:取冻存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的工程菌株 pWB-*amyd*/WB600,将其接种到新鲜斜面培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后,挑取单菌落接入种子培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 16 h,得到种子液。

初始发酵培养:以 1%接种量接种至装液量 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 36 h。

1.4 生长曲线的绘制

配制 400 mL 发酵培养基分装至 250 mL 三角瓶,编号为 1—8,每瓶装液量 50 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min,待用。从新鲜斜面培养基挑取单菌落接入含有发酵培养基的三角瓶中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床

振荡培养。每隔一定时间取样。将菌液适当稀释至吸光度在 0.1~1.0 范围内,用分光光度计于光程 1 cm、波长 600 nm 条件下测定其吸光度。以时间为横坐标,吸光度为纵坐标绘制重组菌生长曲线。

1.5 发酵培养基优化

1.5.1 碳源的选择

选择 10 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、糊精、玉米粉、薯干粉作为碳源,氮源为 10 g/L 的蛋白胨,比较不同碳源对产酶的影响,确定最适碳源。再以 10 g/L 的蛋白胨为氮源,加入 10、20、30、40、50 g/L 的最适碳源,确定最适碳源的最优质量浓度。

1.5.2 氮源的选择

以最适质量浓度的最适碳源为培养基基本组分,分别加入 10 g/L 的胰蛋白胨、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、尿素、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl ,比较不同氮源对产酶的影响,确定最适氮源。再以最适质量浓度的最适碳源为培养基基本组分,加入 10、20、30、40、50 g/L 的最适氮源,确定最适氮源的最优质量浓度。

1.5.3 金属离子 Ca^{2+} 对产酶的影响

以最适质量浓度的最适碳源、氮源为培养基基本组分,加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的 Ca^{2+} 进行发酵,确定 Ca^{2+} 的最优质量浓度。

1.5.4 Na_2HPO_4 对产酶的影响

以最优浓度的最适碳源、氮源、 Ca^{2+} 为培养基基本组分,加入 0、4、8、12、16 g/L 的 Na_2HPO_4 进行发酵,确定 Na_2HPO_4 的最优质量浓度。

1.5.5 正交实验

利用 $L_9(3^4)$ 正交实验筛选出玉米粉、蛋白胨、 CaCl_2 和 Na_2HPO_4 的最佳配比。

1.6 发酵条件优化

1.6.1 培养基初始 pH 对产酶的影响

以上述优化后的培养基配方为基础,用一定浓度的 NaOH 或 HCl 溶液调节培养基初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 进行发酵,确定培养基最适初始 pH。

1.6.2 接种量对产酶的影响

以原始发酵培养条件为基础,分别按 1%、2%、3%、4% 和 5% 的接种量接种到优化后的最优培养基中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 36 h,取样测定酶活力,确定最适接种量。

1.6.3 装液量对产酶的影响

按优化后所得的最适接种量将种子液分别接种于装有 20、30、40、50、60、70 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 36 h,取

样测定酶活力,确定最适装液量。

1.6.4 摇床转速对产酶的影响

将种子液接种到发酵培养基中,接种量和装液量均按照优化后的结果,在 37 °C 条件下,摇床转速分别为 120、160、200、240 r/min 培养 36 h,取样测定酶活力,确定最适摇床转速。

1.6.5 发酵温度对产酶的影响

将种子液接种到发酵培养基中,接种量、装液量及摇床转速均按照优化后的结果,在 27、32、37、42 °C 分别培养 36 h,取样测定酶活力,确定最适发酵温度。

1.7 酶活检测

参照 QB/T 2306—1997^[11]。酶活力单位定义:在 70 °C、pH 6.0 条件下,1 min 液化 1 mg 可溶性淀粉成为糊精所需要的酶量,即为 1 个酶活力单位,以 U/mL 表示。

$$X = c \times n \times 16.67 \quad (1)$$

式中: X , 样品的酶活力 (U/mL); c , 测试的酶液浓度 (U/mL); n , 样品的稀释倍数; 16.67, 换算常数。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的测定

工程菌株 pWB-*amyd*/WB600 生长曲线如图 1 所示。由图 1 可知,0~12 h 为生长的延滞期;12~18 h 为对数生长期;从 18 h 开始进入稳定期。由于在对数生长中后期,菌体量较大,此时菌体还未发生自溶,因此确定在接种后 18 h 时收集菌体。

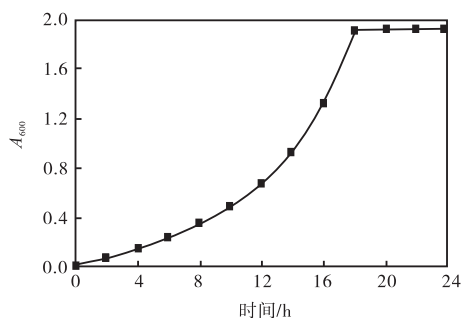


图 1 工程菌株 pWB-*amyd*/WB600 生长曲线
Fig. 1 Growth curve of pWB-*amyd*/WB600

2.2 发酵培养基的优化

2.2.1 碳源对产酶的影响

初始发酵培养基中无特定的碳源,胰蛋白胨和酵母提取物仅能维持菌体生长至 A_{600} 为 3.0 左右^[12],为了考察重组菌株对碳源的利用情况,本实验选择了几种常用的碳源进行碳源的优化。由表 1 结果可知,玉

米粉是产酶的最佳碳源,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高值,为 2 090 U/mL,其余依次为可溶性淀粉、糊精、薯干粉、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖。玉米粉的最优质量浓度实验结果表明,随着玉米粉质量浓度的增加,耐酸性高温 α -淀粉酶活力也随之增加,当玉米粉质量浓度为 20 g/L 时,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高,为 2 310 U/mL。当继续加大玉米粉质量浓度时,其耐酸性高温 α -淀粉酶活力不再随玉米粉质量浓度的增加而增加,反而随之下降,所以本实验选取 20 g/L 为玉米粉的最适质量浓度。

表 1 碳源对产酶的影响

Tab. 1 Effects of carbon resource on the yield of enzyme

碳源	酶活力/(U·mL ⁻¹)	碳源	酶活力/(U·mL ⁻¹)
葡萄糖	1 162 ± 20	糊精	1 300 ± 18
麦芽糖	950 ± 13	玉米粉	2 090 ± 24
蔗糖	1 250 ± 16	薯干粉	1 300 ± 21
可溶性淀粉	1 620 ± 22		

2.2.2 氮源对产酶的影响

为了考察重组菌株对碳源的利用情况,实验中同时对有机氮源和无机氮源进行研究,选择 10 g/L 的胰蛋白胨、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、玉米浆、尿素、NH₄NO₃、NH₄Cl 作为氮源,碳源为 20 g/L 的玉米粉,其他条件相同,结果见表 2。

表 2 氮源对产酶的影响

Tab. 2 Effects of nitrogen resource on the yield of enzyme

氮源	酶活力/(U·mL ⁻¹)	氮源	酶活力/(U·mL ⁻¹)
胰蛋白胨	1 450 ± 21	玉米浆	1 400 ± 20
蛋白胨	2 310 ± 26	尿素	940 ± 16
酵母膏	1 270 ± 20	NH ₄ NO ₃	550 ± 13
牛肉膏	1 000 ± 18	NH ₄ Cl	480 ± 14

由表 2 可知,重组菌株利用以上氮源培养时,有机氮源对产酶的促进作用明显优于无机氮源。单一的无机氮源作为培养基中的氮源,菌体生长缓慢,产酶量较低。而有机氮源中,蛋白胨是最佳的氮源,其主要成分各种氨基酸、肽类等可溶性氮化合物,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高值,为 2 310 U/mL。蛋白胨最优浓度实验结果表明,随着蛋白胨浓度的增加,耐酸性高温 α -淀粉酶活力也随之增加,当蛋白胨质量浓度为 30 g/L 时,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高,为 2 620 U/mL。所以本实验选取 30 g/L 为蛋白胨最适质量浓度。

2.2.3 金属离子 Ca²⁺质量浓度对产酶的影响

根据 Machius 等^[13]的研究可知,Ca²⁺的添加对产地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶有明显的促进作用,这是

因为产地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶是一种金属酶,金属离子 Ca^{2+} 与之结合,有利于保持 α -淀粉酶的结构稳定性及其活力.故选用不同质量浓度的 Ca^{2+} 进行发酵,由图2中可以看出,随着 Ca^{2+} 质量浓度的增加,耐酸性高温 α -淀粉酶活力也随之增加,当 Ca^{2+} 质量浓度为0.6 g/L时,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高,为2740 U/mL.当继续加大 Ca^{2+} 质量浓度时,其耐酸性高温 α -淀粉酶活力不再随 Ca^{2+} 质量浓度的增加而增加,反而随之下降,所以本实验选取0.6 g/L为 Ca^{2+} 最适质量浓度.

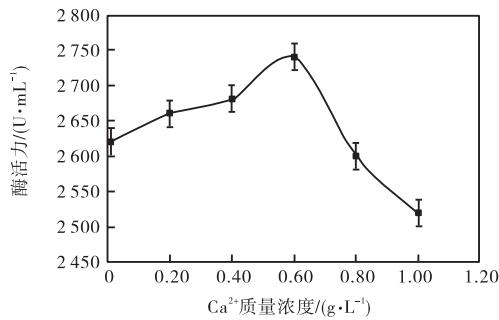


图2 CaCl_2 质量浓度对产酶的影响

Fig. 2 Effects of CaCl_2 concentration on the yield of enzyme

2.2.4 磷酸盐质量浓度对产酶的影响

磷酸盐对微生物产酶的作用是非常重要的,磷是

细胞合成核酸必需的一种元素,也是加快吸收葡萄糖,促进细胞生长不可或缺的一种物质.所以耐酸性高温 α -淀粉酶活力随着磷酸盐质量浓度的增加而增加,当磷酸盐浓度为8 g/L时,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高,为2870 U/mL.但是随着磷酸盐质量浓度的继续升高,耐酸性高温 α -淀粉酶活力却随之下降,所以本实验选取8 g/L为磷酸盐最适质量浓度(图3).

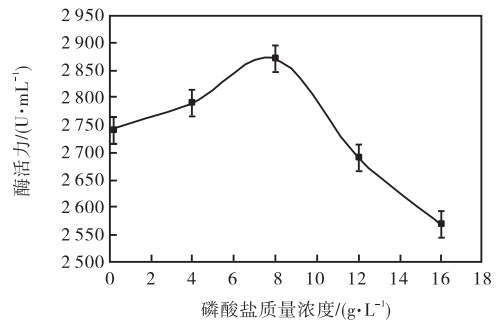


图3 磷酸盐质量浓度对产酶的影响

Fig. 3 Effects of Na_2HPO_4 concentration on the yield of enzyme

2.2.5 正交实验

利用 $L_9(3^4)$ 正交实验筛选出玉米粉、蛋白胨、 CaCl_2 和 Na_2HPO_4 的最佳配比,结果见表3.

表3 培养基配方正交实验结果及其极差分析

Tab. 3 Results and variance analysis of orthogonal experiment of medium components

编号	玉米粉/(g·L ⁻¹)	蛋白胨/(g·L ⁻¹)	CaCl_2 /(g·L ⁻¹)	Na_2HPO_4 /(g·L ⁻¹)	酶活力/(U·mL ⁻¹)
1	15	25	0.5	6	2470
2	15	30	0.6	8	2730
3	15	35	0.7	10	2510
4	20	25	0.6	10	2660
5	20	30	0.7	6	2950
6	20	35	0.5	8	3140
7	25	25	0.7	8	2750
8	25	30	0.5	10	3010
9	25	35	0.6	6	2820
k_1	2570.000	2626.667	2873.333	2746.667	
k_2	2916.667	2896.667	2736.667	2873.333	
k_3	2860.000	2823.333	2736.667	2726.667	
R	346.667	270.000	136.666	146.666	

由表3可知,在玉米粉、蛋白胨、 CaCl_2 和 Na_2HPO_4 这4种培养基组分不同配比中,耐酸性高温 α -淀粉酶活力最高的组合为(g/L):玉米粉20,蛋白胨30, CaCl_2 0.5, Na_2HPO_4 8.极差分析结果表明4个因素的影响程度依次为:玉米粉>蛋白胨> Na_2HPO_4 > CaCl_2 .

由于从理论上优化得到的培养基不在正交实验中,经实验验证结果表明,耐酸性高温 α -淀粉酶活

力达到3280 U/mL,此活力大于正交实验中出现的的所有结果,验证了选取该结果的正确性.因此,确定最适发酵培养基配方为(g/L):玉米粉20,蛋白胨30, CaCl_2 0.5, Na_2HPO_4 8.

2.3 发酵条件

2.3.1 培养基初始pH对产酶的影响

pH是影响微生物正常生理活动的一个重要因素.由图4结果显示,发酵培养基初始pH在5.0~8.0

之间,都可产生耐酸性高温 α -淀粉酶,初始 pH 为 6.5 时,即发酵培养基自然 pH,耐酸性高温 α -淀粉酶活力最高,达到 3 280 U/mL. 所以本实验选取 pH 6.5 为最适初始 pH.

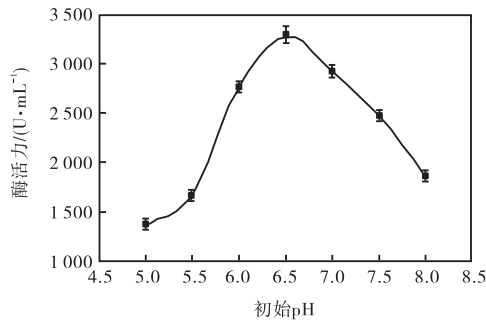


图 4 初始 pH 对产酶的影响

Fig. 4 Effects of pH on the yeild of enzyme

2.3.2 接种量对产酶的影响

由图 5 结果显示,在接种量为 1%时,由于菌体数量过低,减少了蛋白质分泌总量,因此酶活力较低. 当以 2%的接种量进行发酵培养时,菌体蛋白分泌较高,酶活力显著提高,耐酸性高温 α -淀粉酶活力最高,达到 3 450 U/mL. 随着接种量继续增加,耐酸性高温 α -淀粉酶活力却随之下降. 根据余晓红等^[14]的研究可知,这是由于培养基中菌体相对密度增大,导致菌体生长时所需培养基成分不足同时溶氧不足,菌体生长状态不良,反而使酶活力降低造成的,所以本实验选取 2%为最适接种量.

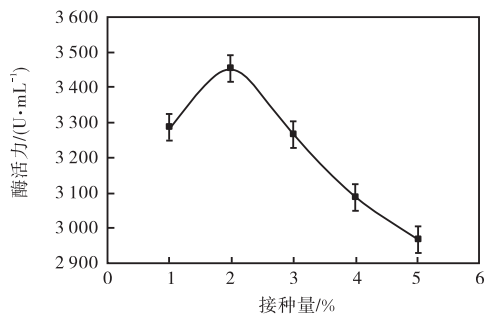


图 5 接种量对产酶的影响

Fig. 5 Effects of inoculation volume on the yield of enzyme

2.3.3 装液量对产酶的影响

在微生物发酵过程中,能够提供充足的氧分对于提高产酶量具有重要的作用,在一定范围内,装液量越低,产酶量越高. 由图 6 结果显示,装液量在 30 mL 以上时,随着装液量的增加,发酵过程中溶氧量不足,菌体生长受到抑制,导致耐酸性高温 α -淀粉酶活力下降. 当装液量为 30 mL 时,耐酸性高温 α -淀

粉酶活力达到最高,为 3 670 U/mL. 装液量为 20 mL 时,虽然溶解氧量充足,但是由于养分不足,菌体生长缓慢,导致耐酸性高温 α -淀粉酶活力下降. 所以本实验选取 30 mL/250 mL 为最适装液量.

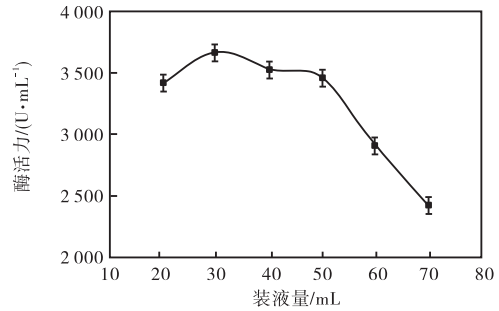


图 6 装液量对产酶的影响

Fig. 6 Effects of medium volume on the yield of enzyme

2.3.4 摇床转速对产酶的影响

摇床转速同样影响发酵液中氧气的溶解量. 由表 4 结果显示,当摇床转速较低时,发酵液中氧气的溶解量不足,不利于菌体生长,导致耐酸性高温 α -淀粉酶活力下降,因而耐酸性高温 α -淀粉酶活力随着转速的升高而变高,当达到 200 r/min 时,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高,为 3 980 U/mL. 随着摇床转速的继续升高,耐酸性高温 α -淀粉酶活力却随之降低,所以本实验选取 200 r/min 为最适摇床转速.

表 4 转速对产酶的影响

Tab. 4 Effects of rotation speed on the yield of enzyme

摇床转速/(rmin ⁻¹)	酶活力/(U·mL ⁻¹)
120	1 500 ± 51
160	3 670 ± 83
200	3 980 ± 89
240	2 800 ± 60

2.3.5 温度对产酶的影响

培养温度对菌株产酶的影响结果见表 5.

表 5 培养温度对产酶的影响

Tab. 5 Effects of cultivated temperature on enzyme production

培养温度/°C	酶活力/(U·mL ⁻¹)
27	700 ± 16
32	1 800 ± 20
37	3 980 ± 89
42	2 480 ± 32

由表 5 结果显示,低温不利于菌株生长产酶,随着温度升高,反应速度加大,生长代谢加快,生产期提前,菌株的产酶量大幅度提高,当温度到达 37 °C 时,菌体的生长最旺盛,菌株的产酶活力大幅度增

加,耐酸性高温 α -淀粉酶活力达到最高,为 3 980 U/mL. 但是随着温度的继续升高使得菌体易于衰老,发酵周期缩短,导致产物的最终产量降低. 所以本实验选取 37 °C 作为最适发酵温度.

3 结 论

枯草芽孢杆菌工程菌株 pWB-*amyd*/WB600, 具有高拷贝的重组表达质粒, 且具有良好的遗传稳定性, 可高效表达耐酸性高温 α -淀粉酶. 本研究在此基础上, 对该工程菌株进行发酵培养基及发酵条件的优化. 分别研究碳源、氮源、金属离子以及磷酸盐对耐酸性高温 α -淀粉酶活力的影响, 通过正交实验进一步分析, 确定最适发酵培养基为(g/L): 玉米粉 20, 蛋白胨 30, CaCl₂ 0.5, Na₂HPO₄ 8. 同时, 确定了摇瓶最佳发酵工艺: 将重组菌的单菌落接种于种子培养基(50 mL/250 mL 三角瓶)中, 于 37 °C、200 r/min 条件下培养 18 h 后, 以 2%接种量接种于优化后的发酵培养基(30 mL/250 mL 三角瓶)中, 初始 pH 6.5, 37 °C、200 r/min 培养 36 h 后, 最终得到的耐酸性高温 α -淀粉酶活力为 3 980 U/mL, 是优化前活力的 2.1 倍.

参考文献:

- [1] 胡建恩, 曹茜, 杨帆, 等. 耐高温 α -淀粉酶高密度高表达发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 219-225.
- [2] 张强, 黄丹, 王川. 耐高温 α -淀粉酶产生菌的选育研究[J]. 中国酿造, 2008(7): 21-23.
- [3] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review[J]. Bioresour Technol, 2003, 89(1): 17-34.
- [4] 刘逸寒, 李玉, 路福平, 等. 耐酸性高温 α -淀粉酶突变基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 36-41.
- [5] 王淑军, 陆兆新, 秦松, 等. 超嗜热古菌耐热酸性 α -淀粉酶的发酵条件和酶学性质研究[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 19-26.
- [6] 刘雅琴, 乌日娜, 段金华. 耐酸性 α -淀粉酶产生菌的发酵条件优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(35): 19888-19890.
- [7] 莫新迎, 高梅莹, 韩丹, 等. 耐酸性 α -淀粉酶产生菌筛选及培养基优化[J]. 中国酿造, 2010(4): 85-88.
- [8] 刘逸寒, 李玉, 田琳, 等. 耐酸性高温 α -淀粉酶突变基因的异源表达及纯化[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(3): 58-62.
- [9] Liu Yihan, Lu Fuping, Li Yu, et al. Characterisation of mutagenised acid-resistant alpha-amylase expressed in *Bacillus subtilis* WB600[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2008, 78: 85-94.
- [10] Liu Yihan, Lu Fuping, Li Yu, et al. Acid stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha amylase through introduction of mutations[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2008, 80: 795-803.
- [11] 中国轻工总会. QB/T 2036-1997 耐高温 α -淀粉酶制剂[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [12] 黄鹤, 杨晟, 李仁宝, 等. 重组青霉素 G 酰化酶在枯草芽孢杆菌中的表达条件优化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(2): 173-177.
- [13] Machius M, Declerck N, Huber R, et al. Kinetic stabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase through introduction of hydrophobic residues at the surface[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11546-11553.
- [14] 余晓红, 汪志君, 方维明. 麦汁中啤酒酵母的最适接种量研究[J]. 酿酒科技, 2003(4): 73-74.

责任编辑: 郎婧