

响应面法优化蛋白酶菌株发酵条件

张 丹, 闵伟红*, 刘景圣, 解蕙铭, 张 春, 李锁霞, 方 丽
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 发酵工程实验室, 吉林 长春 130118)

摘 要:目的: 在单因素试验的基础上, 应用响应面法优化可用于玉米高效浸泡的产蛋白酶菌株的发酵条件。方法: 通过单因素试验及响应面方法研究 C/N、MgSO₄ 和 CaCl₂、接种量等因素对菌株产蛋白酶活力的影响, 确定发酵最佳工艺参数。结果: C/N 为 2、MgSO₄ 0.5g/L、CaCl₂ 0.2g/L、接种量 6%, 该蛋白酶活力最大值为 2504.8U/mL, 酶活力较优化前提高了 4 倍。同时建立蛋白酶活力与 C/N、MgSO₄ 添加量、CaCl₂ 添加量、接种量之间的二次多项式模型, 该模型可以很好地预测蛋白酶产量。结论: 用响应面分析方法对该产蛋白酶菌株发酵培养基进行优化, 可获得最佳的工艺条件。

关键词: 蛋白酶; 玉米浸泡; 优化; 响应面

Response Surface Optimization of Fermentation Conditions for Protease Production by *Pichia kudriavzevii* Yeast

ZHANG Dan, MIN Wei-hong*, LIU Jing-sheng, XIE Hui-ming, ZHANG Chun, LI Suo-xia, FANG Li
(Fermentation Engineering Laboratory, College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In our previous work, we have isolated a protease-producing *Pichia kudriavzevii* yeast strain. This study was undertaken to use response surface methodology to optimize fermentation conditions for protease production by the strain. Protease activity in fermentation broth was investigated with respect to C/N ratio, MgSO₄ and CaCl₂ concentrations, and inoculum size. A quadratic polynomial model describing the effects of the fermentation conditions on protease production was established. The highest protease production of 2504.8 U/mL was achieved under the following conditions: C/N ratio of 2, 0.5 g/L MgSO₄, 0.2 g/L CaCl₂, and inoculum size of 6%, which was four times higher than before optimization. In addition, the established regression model was found to have good effectiveness in predicting protease production.

Key words: protease; corn steeping; optimization; response surface

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0248-06

我国是玉米生产大国, 玉米年产量居世界第二位。2008 年产量达到 1.5 亿 t, 其中玉米深加工的初级产品淀粉占中国淀粉总产量的 80% 以上^[1]。在玉米淀粉生产中浸泡是首要也是最重要的工序, 浸泡的效果直接影响淀粉和副产品成本、收率和质量。目前, 我国玉米淀粉生产普遍采用传统亚硫酸浸泡, 存在浸泡时间长、生产成本低、生产效率低、能耗大、废水排放量大, 同时所释放的 SO₂ 气体污染环境, 并且亚硫酸对设备和管道都有强烈的腐蚀作用等缺点^[2]。因此国内外学者一直在探索新的浸泡方法。

目前关于玉米浸泡方法的研究主要集中在酶法浸泡工艺研究方面。如 2004 年段玉权等^[3]、2007 年赵寿经

等^[4]和董海洲等^[5]以及 2009 年闵伟红等^[6]分别采用现有的商业化酶制品对玉米进行浸泡, 不同程度地缩短了玉米浸泡时间, 但目前市场上商业化蛋白酶的作用效果还不能满足进一步缩短玉米浸泡时间的要求, 与国外学者自主筛选获得的酶在浸泡时间和效果上还有较大差距。本课题组前期研究通过筛选和诱变育种获得了一株可提高玉米浸泡效果的蛋白酶产生菌, 结合 26S rDNA 序列的系统发育学分析, 鉴定为库德里阿兹威毕赤酵母菌。本实验通过响应面法对其发酵培养条件进行优化, 为其在玉米淀粉生产中浸泡工艺的应用提供参考。

收稿日期: 2011-02-16

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA100802); 吉林省科技厅重点资助项目(20080250)

作者简介: 张丹(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: dadan2008518@163.com

*通信作者: 闵伟红(1971—), 女, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程、粮油科学与深加工技术。E-mail: minwh2000@163.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

菌株：由吉林农业大学食品科学与工程学院发酵工程实验室自行分离和保存。经 26S rDNA 序列的系统发育学分析为库德里阿兹威毕赤酵母菌。

酪氨酸标准样品 美国 Sigma 公司；Folin-酚 北京鼎国公司；蛋白胨、牛肉膏、干酪素 北京奥博星生物技术有限责任公司； MgSO_4 、 CaCl_2 、 NaCl 、葡萄糖均为国产分析纯。

AUY220 型分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司；Z-36HK 型高速低温离心机 德国 Hermle 公司；UV-1700 型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司；SHP-250 型生化培养箱 上海精宏实验设备有限公司；CL-32L 型高压蒸汽灭菌器 日本 ALP 公司；HZQ-C 型空气恒温振荡器、SW-CJ-4 型超级洁净工作台 上海博迅实业有限公司。

1.2 培养条件

1.2.1 培养基

种子培养基：葡萄糖 20g、蛋白胨 20g、酵母膏 10g、蒸馏水 1L、pH6.5。

发酵培养基：葡萄糖 20g、酵母膏 10g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g、 KH_2PO_4 2.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 CaCl_2 0.2g、蒸馏水 1L、pH6.5。

1.2.2 培养方法

将斜面保存的菌株接入装有 50mL 种子培养基的锥形瓶中，180r/min、30℃ 培养 14h 进行活化。将活化的菌液接入装有 50mL 发酵培养基的锥形瓶中，180r/min、30℃ 培养，培养至 44h 时取发酵液，测定蛋白酶活力。

1.3 蛋白酶活力测定方法

采用 Folin-酚法测定蛋白酶活力^[7]。

1.4 方法

1.4.1 碳源和氮源的确定

选择 20g/L 的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖以及乳糖作为碳源，其他同 1.2.1 节发酵培养基，单因素试验选择合适的碳源；选择 10g/L 的麸皮、蛋白胨、酵母膏、黄豆粉、硫酸铵以及硝酸钠作为氮源，以 20g/L 葡萄糖为碳源，其他同上，单因素试验选择合适的氮源。

1.4.2 C/N 的确定

将葡萄糖和酵母膏按 1:2、1:1、2:1 的比例，添加到发酵培养基中，其他同 1.4.1 节，确定最适 C/N。

1.4.3 MgSO_4 和 CaCl_2 添加量的确定

添加 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5g/L MgSO_4 ，C/N 为 2:1，其他同 1.4.2 节，确定最适 MgSO_4 添加量；添加 0.1、0.2、0.3、0.4g/L CaCl_2 ，C/N 为 2:1、 MgSO_4 添加量为 0.5g/L，其他同 1.4.2 节，确定最适 CaCl_2 添加量。

1.4.4 接种量的确定

分别选择 1%、5%、7%、10%、13%、15% 接种量，0.2g/L CaCl_2 ，其他同 1.4.3 节，确定最适接种量。

1.5 响应面优化试验

在单因素试验结果基础上，采用四因素三水平的 Box-Behnken 响应面试验设计法^[8-12]，以 C/N、 MgSO_4 添加量、 CaCl_2 添加量和接种量为自变量，分别以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 表示，以蛋白酶的酶活为指标进行优化，按方程 $x_i = (X_i - X_0)/X$ 对自变量进行编码^[13]，其中 x_i 为自变量的编码值； X_i 为自变量的真实值； X_0 为试验中心点处自变量的真实值； X 为自变量的变化步长^[14]。

1.6 数据统计与分析

采用 Design-Expert 软件(Version 7.0 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)对响应面试验得到的数据进行线性回归和方差分析，模型及因素的显著性均通过 F 值考察 ($P < 0.05$)，所有试验均做 3 个重复，结果以蛋白酶活力表示。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同碳源和氮源对蛋白酶活力的影响

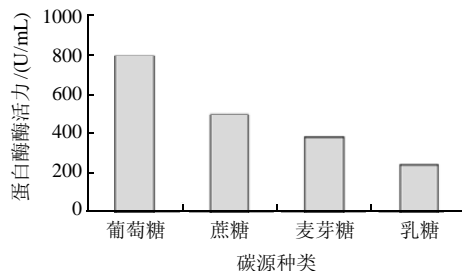


图1 不同碳源对蛋白酶活力的影响

Fig.1 Effect of carbon source type on protease production

由图1可看出，不同碳源发酵液中蛋白酶活力不同，其中以葡萄糖为碳源，蛋白酶活力最高为 801U/mL，其次蔗糖和麦芽糖，最低为乳糖，蛋白酶活力为 226.6U/mL。

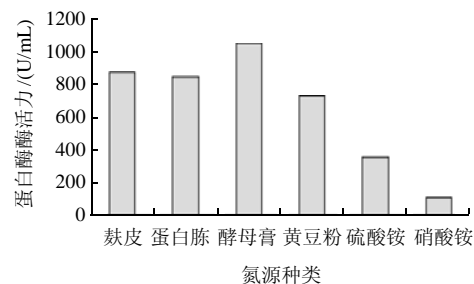


图2 不同氮源对蛋白酶活力的影响

Fig.2 Effect of nitrogen source type on protease production

由图2可看出,不同氮源发酵液中蛋白酶活力不同,其中以酵母膏为氮源,蛋白酶活力最高为1048U/mL,其次麸皮和蛋白胨,最低为硝酸铵,蛋白酶活力为103.4U/mL。

2.1.2 不同C/N对蛋白酶活力的影响

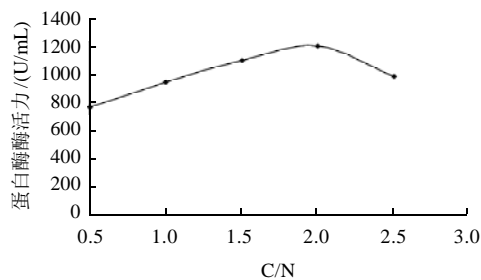


图3 不同C/N对蛋白酶活力的影响
Fig.3 Effect of C/N ratio on protease production

由图3可看出,在C/N为0.5~2范围内,蛋白酶活力逐渐升高并在2:1时达到最大值1205U/mL;继续升高C/N,蛋白酶活力逐渐降低。因此,确定最佳C/N为2:1。

2.1.3 $MgSO_4$ 和 $CaCl_2$ 对蛋白酶活力的影响

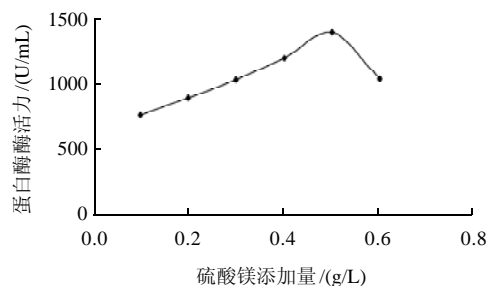


图4 $MgSO_4$ 对蛋白酶活力的影响
Fig.4 Effect of $MgSO_4$ concentration on protease production

由图4可看出,当 $MgSO_4$ 添加量为0.1~0.5g/L时,蛋白酶活力不断地增加;并达到最大值1394.8U/mL;继续增加 $MgSO_4$ 添加量,蛋白酶活力逐渐降低。因此,确定 $MgSO_4$ 最佳添加量为0.5g/L。

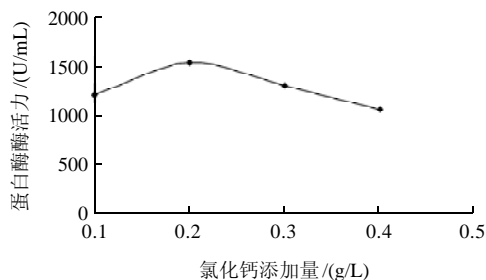


图5 $CaCl_2$ 对蛋白酶活力的影响
Fig.5 Effect of $CaCl_2$ concentration on protease production

由图5可看出,在 $CaCl_2$ 添加量为0.1~0.2g/L时,蛋白酶活力不断地增加;并达到最大值1538.1U/mL;继续增加 $CaCl_2$ 添加量,蛋白酶活力逐渐降低。因此,确定 $CaCl_2$ 最佳添加量为0.2g/L。

2.1.4 接种量的影响

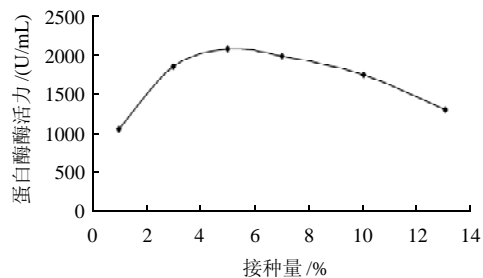


图6 不同接种量对蛋白酶活力的影响
Fig.6 Effect of inoculum size on protease production

由图6可看出,当接种量范围为1%~5%时,蛋白酶活力在不断地增加;当接种量为5%时有最大值2079.8U/mL;继续升高接种量,蛋白酶活力逐渐降低。因此,可确定最佳接种量为5%。

2.2 响应面设计结果与分析

表1 Box-Behnken 响应面设计试验因素水平和编码

Table 1 Factors and their coded levels in response surface design

编码	X_1 C/N	X_2 $MgSO_4$ 质量 浓度/(g/L)	X_3 $CaCl_2$ 质量 浓度/(g/L)	X_4 接种量/%
-1	1.25	0.3	0.1	2
0	2.00	0.5	0.2	5
1	2.75	0.7	0.3	8

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface design and corresponding results

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	蛋白酶活力/(U/mL)
1	-1	-1	0	0	2303.5
2	-1	1	0	0	2358.6
3	1	-1	0	0	2298.7
4	1	1	0	0	2398.7
5	0	0	-1	-1	1925.6
6	0	0	-1	1	2268.9
7	0	0	1	-1	1925.6
8	0	0	1	1	1368.95
9	-1	0	0	-1	987.92
10	-1	0	0	1	2369.7
11	1	0	0	-1	1668.6
12	1	0	0	1	2329.7
13	0	-1	-1	0	2265.2
14	0	-1	1	0	2326.9
15	0	1	-1	0	2142.8
16	0	1	1	0	2352.0
17	-1	0	-1	0	2300.3
18	-1	0	1	0	2258.9
19	1	0	-1	0	2098.4
20	1	0	1	0	2309.8
21	0	-1	0	-1	2172.6
22	0	-1	0	1	2338.7
23	0	1	0	-1	1889.6
24	0	1	0	1	2300.9
25	0	0	0	0	2504.8
26	0	0	0	0	2497.4
27	0	0	0	0	2489.7

根据单因素试验结果, 设定 $C/N(X_1)$ 在 1.25~2.75 之间, $MgSO_4(X_2)$ 在 0.3~0.7 g/L 之间, $CaCl_2(X_3)$ 在 0.1~0.3 g/L 之间, 接种量(X_4)在 2%~8% 之间, 采用 Box-Behnken 响应面设计法进行优化。试验因素编码和水平如表 1 所示, 试验安排及结果如表 2 所示。

2.3 回归模型的建立及其显著性检验

用 Design Expert 软件, 对表 2 中的数据进行多元回归拟合, 选择对响应值影响显著的各项, 可得 C/N 、 $MgSO_4$ 添加量、 $CaCl_2$ 添加量、接种量与蛋白酶酶活力的多项回归方程, 回归方程为:

$$Y=2497.30-31.27x_1-21.95x_2+36.74x_3+200.54x_4-124.14x_1^2+11.28x_1x_2+63.15x_1x_3+44.83x_1x_4-53.49x_2^2+36.90x_2x_3+61.33x_2x_4-141.60x_3^2-0.025x_3x_4-278.68x_4^2$$

对回归方程求一阶偏导数, 解得 $x_1=-0.03$, $x_2=0.05$, $x_3=0.13$, $x_4=0.36$, 即可换算得到 C/N 、 $MgSO_4$ 添加量、 $CaCl_2$ 添加量、接种量。考虑到实际操作便利, 确定蛋白酶发酵培养条件为 C/N 为 2、 $MgSO_4$ 添加量 0.5 g/L、 $CaCl_2$ 添加量 0.2 g/L、接种量 6%。由回归方程预测蛋白酶的酶活理论得率可达 2535.96 U/mL。

对回归方程进行显著性检查、方差分析及各因素最佳值分析, 结果见表 3。

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model equation

方差来源	自由度	平方和	均方差	F	Pr > F	显著性
x_1	1	11731.25	11731.25	1.33	0.2705	
x_2	1	5781.63	5781.63	0.66	0.4331	
x_3	1	16199.40	16199.40	1.84	0.1996	
x_4	1	4.826×10^5	4.826×10^5	54.91	< 0.0001	**
x_1^2	1	82192.82	82192.82	9.35	0.0099	**
x_1x_2	1	508.50	508.50	0.058	0.8140	
x_1x_3	1	15951.69	15951.69	1.81	0.2028	
x_1x_4	1	8037.12	8037.12	0.91	0.3578	
x_2^2	1	15260.58	15260.58	1.74	0.2122	
x_2x_3	1	5446.44	5446.44	0.62	0.4464	
x_2x_4	1	15043.02	15043.02	1.71	0.2153	
x_3^2	1	1.069×10^5	1.069×10^5	12.17	0.0045	**
x_3x_4	1	2.500×10^5	2.500×10^5	2.844×10^5	0.9996	
x_4^2	1	4.142×10^5	4.142×10^5	47.12	< 0.0001	**
模型	14	1.013×10^5	72322.91	8.23	0.0004	**
误差	12	1.055×10^5	8789.43			
失拟	10	1.054×10^5	10535.91	184.81	0.0054	**
纯误差	2	114.02	57.01			
总和	26	1.118×10^5				
R^2		0.9057				
R^2_{Adj}		0.7956				

注: *.差异显著($P < 0.05$); **.差异极显著($P < 0.01$)。

由表 3 可知, 回归模型系数显著性检验结果可知, 模型的一次项 x_4 极显著, x_1 、 x_2 、 x_3 不显著, 二次项 x_1^2 、 x_3^2 、 x_4^2 极显著, x_2^2 不显著, 交叉项 x_1x_2 、 x_1x_3 、 x_1x_4 、 x_2x_3 、 x_2x_4 、 x_3x_4 都不显著。表明各个影响因素

与响应值不是简单的线性关系。

方程的 F 值为 8.23, $Pr > F$ 值为 $0.0004 < 0.001$, 说明用上述回归方程描述各因素与响应值之间的关系时, 其因变量和全体自变量之间的线性关系极显著, 即这种实验方法是可靠的。复相关系数 $R^2=0.9057$ 说明拟合程度良好, 实验误差小, 因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析和预测。

验证实验: 在上述响应面分析结果确定的最佳工艺条件下进行 3 次实验, 得到蛋白酶的平均酶活力为 2504.8 U/mL, 与预测值 2535.96 U/mL 基本一致, 说明该方程与实际情况拟合很好, 充分验证了所建模型的正确性, 说明响应面法适用于对蛋白酶菌种发酵工艺条件进行回归分析和参数优化。

2.4 蛋白酶培养基条件响应面分析及优化

根据模型作出相应的响应曲面和等高线见图 7~12。

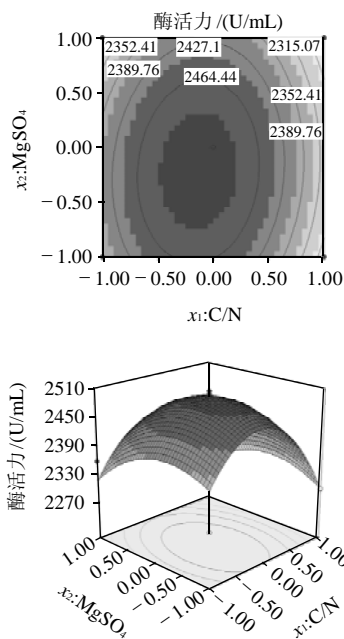
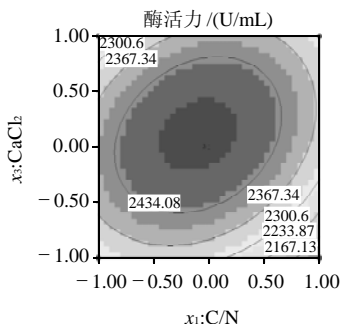


图 7 C/N 与 $MgSO_4$ 对蛋白酶酶活力的影响

Fig.7 Response surface and contour plots showing the effect of C/N ratio and $MgSO_4$ concentration on protease production



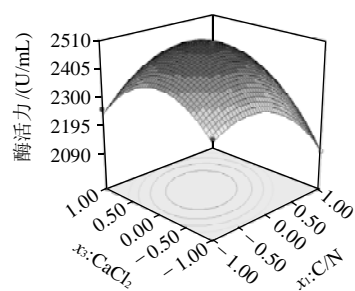
图8 C/N与CaCl₂对蛋白酶活力的影响

Fig.8 Response surface and contour plots showing the effect of C/N ratio and CaCl₂ concentration on protease production

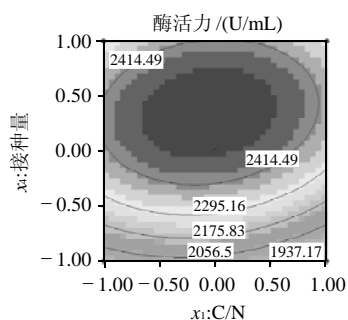


图9 C/N与接种量对蛋白酶活力的影响

Fig.9 Response surface and contour plots showing the effect of C/N ratio and inoculum size on protease production

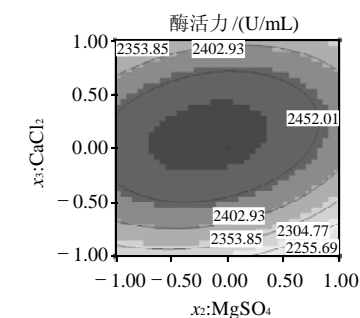
图10 MgSO₄与CaCl₂对蛋白酶活力的影响

Fig.10 Response surface and contour plots showing the effect of MgSO₄ concentration and CaCl₂ concentration on protease production

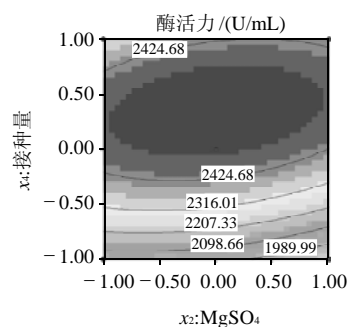
图11 MgSO₄与接种量对蛋白酶活力的影响

Fig.11 Response surface and contour plots showing the effect of MgSO₄ concentration and inoculum size on protease production

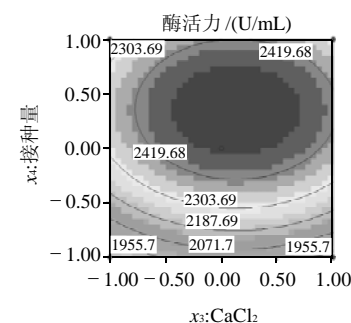
图12 CaCl₂与接种量对蛋白酶活力的影响

Fig.12 Response surface and contour plots showing the effect of CaCl₂ concentration and inoculum size on protease production

图7为C/N与MgSO₄对蛋白酶活力(Y)的响应曲面图和等高线图,等高线图形状近乎呈圆形,表明C/N与MgSO₄两个自变量之间的交互效应较弱。图8为C/N与CaCl₂对蛋白酶活力的响应曲面图和等高线图,等高线近似圆形,说明C/N与CaCl₂两个自变量之间的交互作用较弱。图9为C/N与接种量对蛋白酶活力的响应

曲面图和等高线图,等高线呈扁圆形,等高线近似圆形,说明C/N与接种量两个自变量之间的交互作用较弱。图10为 MgSO_4 与 CaCl_2 对蛋白酶活力的响应曲面图和等高线图,等高线近似圆形,说明 MgSO_4 与 CaCl_2 两个自变量之间的交互作用较弱。图11为 MgSO_4 与接种量对蛋白酶活力的响应曲面图和等高线图,等高线近似圆形,说明 MgSO_4 与接种量两个自变量之间的交互作用较弱;图12为 CaCl_2 与接种量对蛋白酶活力的响应曲面图和等高线图。等高线呈扁圆形,近似圆形,说明 CaCl_2 与接种量两个自变量之间的交互作用较弱。

3 结 论

利用实验设计软件Design-Expert,通过二次回归设计得到了提高玉米浸泡效果蛋白酶菌株与C/N、 MgSO_4 添加量、 CaCl_2 添加量、接种量的回归模型,经检验证明该模型是合理可靠的,能够较好地预测蛋白酶活力。在对影响蛋白酶活力的关键因素及其相互作用进行探讨后,得到的优化工艺参数为:当C/N为2、 MgSO_4 为0.5g/L、 CaCl_2 为0.2g/L、接种量为6%时,蛋白酶活力理论值为2535.96U/mL,验证实验结果为2504.8U/mL。因此,利用响应面分析方法对蛋白酶菌种发酵工艺进行优化,可获得最优的工艺参数,从而为进一步的实验研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 张博雅,王云峰.中国玉米深加工生产发展现状[J].河北北方学院学报,2008,24(4):28.
- [2] 任海松.玉米淀粉的酶法湿磨工艺及其理化性质研究[D].山东:山东农业大学,2007.
- [3] 段玉权,李新华.纤维素酶对玉米淀粉生产中浸泡效果的影响[J].粮油食品科技,2004,12(1):14-15.
- [4] 赵寿经,黄丽.嗜热乳酸菌的筛选及其在玉米淀粉湿法生产浸泡工艺中的应用[J].食品与发酵工业,2008,3(1):46-49.
- [5] 董海洲,任海松.玉米湿磨生产中减少浸泡时间的研究[J].中国食物与营养,2007(5):37-39.
- [6] 闵伟红,冯琦.加压和复合酶法联合浸泡对玉米浸泡效果影响的研究[D].吉林:吉林农业大学,2009.
- [7] 诸葛健,王正祥.蛋白酶活力测定方法,工业微生物试验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994:205-209.
- [8] 左爱连,张伟国.利用Design-Expert软件优化丝氨酸发酵培养基的研究[J].食品科技,2008(3):45-48.
- [9] 杜双奎,于修焯.红枣酶法提汁工艺条件响应面分析[J].农业机械学报,2007,38(8):191-193.
- [10] 许辉,孙兰萍.超临界 CO_2 萃取杏仁油的响应面优化[J].中国粮油学报,2008,23(1):94-98.
- [11] 代文亮,程龙.响应面法在紫杉醇产生菌发酵前体优化中的应用[J].中国生物工程杂志,2007,27(11):66-72.
- [12] 杨文雄,高彦祥.响应面法及其在食品工业中的应用[J].中国食品添加剂,2005(2):68-71.
- [13] MONTGOMERY D C.实验设计与分析[M].北京:中国统计出版社,1998:589-592.
- [14] 周纪芃.实用回归分析方法[M].上海:上海科学技术出版社,1990:77-79.