

响应面法优化微小毛霉 固态发酵生产凝乳酶工艺研究

李倬林¹,邵淑娟^{1,2},李铁柱¹,孙悦³,李玉秋¹,王景会¹,郑丽^{1,4},杨贞耐^{1,2,4,*}

(1.吉林省农业科学院,农产品加工研究中心,吉林长春 130033;

2.吉林大学军需科技学院,吉林长春 130062;3.吉林农业大学,吉林长春 130118;

4.吉林大学生物与农业工程学院,吉林长春 130024)

摘要:采用麦麸培养基进行固态发酵,以研究发酵条件对产酶活力的影响,在此基础上应用 Plackett-Burman、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 实验设计,对微小毛霉的固态发酵培养基进化以达到最佳产酶量。实验结果表明,最佳发酵条件为:发酵时间 5d,发酵温度 30℃,固液比值 0.75,接种量为 3 份,测得凝乳酶酶活为 828U/mL。并且当麸皮质量为 15.50g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量为 0.15g、 KH_2PO_4 质量为 0.08g 时,微小毛霉产凝乳酶活力达到 1200U/mL。较未优化前活力提高了 66.67%。

关键词:微小毛霉,固态发酵,凝乳酶,响应面法

Optimization of solid state fermentation using response surface methodology for milk-clotting enzyme production by *Mucor pusillus*

LI Zhuo-lin¹, SHAO Shu-juan^{1,2}, LI Tie-zhu¹, SUN Yue³, LI Yu-qiu¹,

WANG Jing-Hui¹, ZHENG Li^{1,4}, YANG Zhen-nai^{1,2,4,*}

(1.Jilin Academy of Agricultural Sciences, Center of Agro-food Technology, Changchun 130033, China;

2.College of Quartermaster and Technology, Jilin University, Changchun 130062, China;

3.Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

4.College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130024, China)

Abstract: Using Plackett-Burman design combined with the path of steepest ascent method and Box-Behnken design, the optimum fermentation properties of *Mucor pusillus* including fermentation time 5d, fermentation temperature 30℃, solid-to-liquid ratio 0.75 and application with 4 samples were determined. Under such conditions, with increasing the amount of bran, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 in the culture to 15.50g, 0.15g and 0.08g respectively, the highest enzyme milk-clotting activity 1200U/mL was achieved, 66.67% higher than the milk-clotting activity before optimization.

Key words: *Mucor pusillus*; solid-state fermentation; milk-clotting enzyme; response surface methodology

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)04-0248-07

凝乳酶是干酪及凝乳酶干酪素生产的关键性酶,其主要生物学功能为专一性裂解 Phe105-Met106 之间的肽键,从而导致牛奶的凝结,因此它被广泛应用于干酪和干酪素生产^[1]。传统的牛凝乳酶生产方法是通过屠宰未断奶的小牛并在其第四胃中提取,生产量较低难以满足现代工业化生产干酪的需

要^[2-3]。相比于动物源凝乳酶,微生物源凝乳酶具有凝乳活力高,制备简单,产量大,成本低等不可比拟的优势。但是微生物源凝乳酶存在蛋白水解能力较高,特异性不强等缺点^[4]。如果可以进一步降低其蛋白水解活力或者提高其的凝乳活力就可以降低生产成本,为干酪的工业化大生产提供技术支持。常用凝乳酶生产菌种有三种:米黑毛霉、微小毛霉和寄生内座壳菌(栗疫霉)。其中应用最多的是微小毛霉(*Mucor pusillus*)产生的凝乳酶。自 1964 年,Arima^[5]发现毛霉属微小毛霉可以产生高活力凝乳酶后,许多科学家都对其展开了大量研究。本文采用响应面法(RSM),结合 Plackett-Burman、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 中心组合实验设计,模拟出微小毛霉产凝乳酶固态发酵的最佳模型,为凝乳酶工业化发酵

收稿日期:2010-11-24 * 通讯联系人

作者简介:李倬林(1985-),女,双学士,研究方向:食品生物技术。

基金项目:吉林省青年科研基金(201101126);农业部现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycyt-0502);国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903043);中国博士后科学基金资助项目(20100471246);吉林省博士后科研项目启动经费(04006)。

生产提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 吉林省农业科学院农产品加工研究中心保藏; 脱脂乳粉 新西兰进口; NaCl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、蔗糖、 CaCl_2 、 FeSO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 分析纯, 北京化工厂; 实验用水 均为超纯水; 麸皮、米糠、豆饼粉 农贸市场购买; 固体活化培养基 PDA 培养基^[7]; 固态发酵培养基 15g 麸皮, 0.3g 硫酸铵, 0.05g 磷酸二氢钾, 去离子水 25mL。

DHP-9272 电热恒温培养箱、HWS24 电热恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司; HZQ-X100 振荡培养箱 中国哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 研究微小毛霉发酵条件

1.2.1.1 粗酶液的制备 固态发酵培养物在恒温振荡器上, 以 150r/min 的转速 30℃ 浸提 4h, 然后过滤浸提液, 即可得到凝乳酶的粗酶液。

1.2.1.2 凝乳酶活力测定 活力测定方法根据改进的 Magda 方法^[8], 将脱脂乳粉用 0.01mol/L MgCl_2 配制 10% 脱脂乳溶液。35℃ 下, 取待测酶液 0.2mL 加入 2mL 10% 复原脱脂乳中, 充分混匀, 开始计时, 至絮状凝集颗粒出现为止。

凝乳酶活力 = (供试乳数量/凝乳酶量) $\times$ 2400/ $t \times n$

式中: n —稀释倍数; t —凝乳时间。

1.2.2 凝乳酶高产菌株固态发酵未进行优化实验时凝乳酶活性测定 在固态发酵基础培养基上接种微小毛霉, 在固液比为 0.6、用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量, 接种量 4 份, 30℃ 培养条件下进行发酵 5d, 测定样品的凝乳活力。

1.2.3 凝乳酶高产菌株固态发酵条件单因素实验

1.2.3.1 发酵时间对微小毛霉产凝乳酶的影响 在固态发酵基础培养基上接种微小毛霉, 在固液比为 0.6 时, 用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量, 接种量 4 份, 30℃ 培养条件下进行发酵, 测定不同发酵时间样品的凝乳活力。

1.2.3.2 发酵温度对微小毛霉产凝乳酶的影响 在固态发酵基础培养基上接种微小毛霉, 在固液比为 0.6 时, 用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量, 接种量 4 份, 测定不同发酵温度下样品的凝乳活力。

1.2.3.3 加水量对微小毛霉产凝乳酶的影响 在固态发酵基础培养基上接种微小毛霉, 本实验用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量, 接种量 4 份, 在 30℃ 下培养 5d, 测定不同加水量下培养物的凝乳活力。

1.2.3.4 接种量对微小毛霉产凝乳酶的影响 在固态发酵基础培养基上接种微小毛霉, 本实验用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量。在固液比为 0.6, 30℃ 培养条件下发酵 5d,

测定不同接种量的凝乳活力。

1.2.4 响应面法优化发酵培养基

1.2.4.1 Plackett-Burman 法筛选影响发酵的主要因素 Plackett-Burman 设计^[17]对影响凝乳酶生产的 10 个营养因素进行考察, 每个因素取 2 个水平, 各因素及其水平见表 3, 实验设计见表 4, 表 4 中每行代表 1 个实验, 每列代表 1 个独立的变量, 符号“+1”和“-1”分别代表高和低 2 个不同的水平, “0”代表其中心水平。

1.2.4.2 主要影响因素单因素实验 确定主要影响因素后, 在优化出的培养条件下对微小毛霉进行培养, 测定主要影响营养因素不同添加量下所产凝乳酶酶活。

a. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响: 本实验用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量。在发酵时间为 5d, 发酵温度为 30℃, 固液比为 0.75, 接种量为 4 份, 麸皮添加量为 15.0g, 豆饼粉添加量为 0.6g, KH_2PO_4 添加量为 0.08g 的条件下对微小毛霉进行发酵, 考察 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量依次为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 时对微小毛霉固态发酵产酶的影响。

b. KH_2PO_4 添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响: 本实验用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量。在发酵时间为 5d, 发酵温度为 30℃, 固液比为 0.75, 接种量为 4 份, 麸皮添加量为 15.0g, 豆饼粉添加量为 0.6g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为 0.6g 的条件下对微小毛霉进行发酵, 考察 KH_2PO_4 质量依次为 0.04、0.06、0.08、0.12、0.14g 时对微小毛霉固态发酵产酶的影响。

c. 麸皮添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响: 本实验用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量。在发酵时间为 5d, 发酵温度为 30℃, 固液比为 0.75, 接种量为 4 份, KH_2PO_4 添加量为 0.08g, 豆饼粉添加量为 0.6g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为 0.6g 的条件下对微小毛霉进行发酵, 考察麸皮质量依次为 12、13.5、15、16.5、18g 时对微小毛霉固态发酵产酶的影响。

d. 豆饼粉添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响: 本实验用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样, 其所取菌体份数即为接种量。在发酵时间为 5d, 发酵温度为 30℃, 固液比为 0.75, 接种量为 4 份, KH_2PO_4 添加量为 0.08g, 麸皮添加量为 15.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为 0.6g 的条件下对微小毛霉进行发酵, 考察豆饼粉质量依次为 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8g 时对微小毛霉固态发酵产酶的影响。

1.2.4.3 最陡爬坡实验 根据 Plackett-Burman 实验及实验条件的正交实验确定影响微小毛霉固态发酵生产凝乳酶的主要影响因素, 进行最陡爬坡实验。本实验以凝乳酶凝乳活力为显著因素效应值, 根据显著因素效应值的大小来确定最陡上升路径, 而主要影响因素的取值则根据各因素效应的正负和大小, 正效应的因素均取较高值, 负效应的因素均取较低值^[18]。

1.2.4.4 响应面实验优化培养基成分 在对 Plackett-Burman 实验结果充分分析的基础上, 在最陡爬坡

实验确定的区域内,以凝乳酶酶活为响应值设计了3因素3水平共16个实验点的响应面分析实验,其中12个为析因点,4个为零点,零点实验进行了3次用来估计误差。其因素水平选取见表7,实验方案与结果见表8。

1.2.5 模型拟合和验证 对优化实验所得的实验数据与响应面模型进行拟合,便可以得到模型中的各个系数。再对该多元函数进行分析便可确定出其极值点以及取得极值的相应的自变量的取值。最后按照计算所得到的参数进行实验验证模型的可靠性,确定最后的优化结果。实验数据均用 Design-Expert 7.1.3 软件处理分析。

2 结果与讨论

2.1 发酵时间对微小毛霉产凝乳酶的影响

从图1可知,发酵开始阶段,由于菌体的增殖,生长旺盛,产酶能力随着时间的延长而增强,酶活力也增强;3~5d酶活上升较快。当发酵到6d时酶活基本达到最大值758U/mL,而后凝乳活性略有下降,可能是由于随着培养基中营养成分不断的消耗,菌体生长开始进入衰亡,产酶能力下降,酶活力也随之减小^[15-16]。

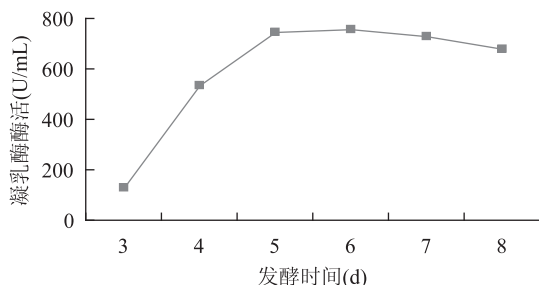


图1 发酵时间对产酶的影响

Fig.1 Effect of culture time on enzyme production

2.2 发酵温度对微小毛霉凝乳酶的影响

温度是影响微生物生长和代谢的重要的因子之一,为了考察微小毛霉的生长和产酶的最适温度,在其它条件不变的情况下温度分别为25℃(室温)、30℃(毛霉最适生长温度)、35℃(细菌生长温度)、40℃(高温菌最适生长温度)下采用基础培养基进行固态发酵,以凝乳酶活力为指标,实验结果见图2。

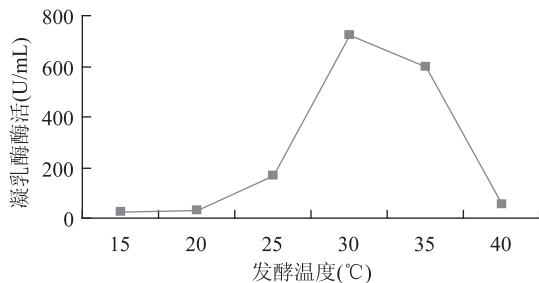


图2 发酵温度对产酶的影响

Fig.2 Effect of culture temperature on enzyme production

由图2可知,随着温度的升高凝乳活性逐渐升高,当温度高于25℃时,凝乳活性急剧增加,30℃出现最大值720U/mL。大量研究表明,此温度是微小毛霉产酶最适温度^[10-12]。升高或降低发酵温度不但会影响菌丝的生长而且会影响酶的合成与分泌。本

实验得出的最适产酶温度为30℃与Yu和Chou^[15]及Hung,Chou^[16]的研究结果一致,并且Tubasha和Al-Delaimy^[9]在研究微小毛霉J2时也得出相似结论;对微小毛霉及蜂毛霉的研究表明其产凝乳酶的最适温度为28~30℃。但Thakur^[10]在研究米黑毛霉时发现其产酶的最适温度为42℃。

2.3 加水量对微小毛霉产凝乳酶的影响

在研究微生物固体发酵产酶的影响因素中,水分含量或水分活度是一个重要指标。因为固体发酵有别于液体发酵,固体培养基中微生物生长,酶的合成及分泌都是在低水分含量中进行的^[6,13]。含水量低时,物料松散,固体培养基中的营养成分溶解的少,菌丝体不能连接到一起,凝乳酶产量低^[6,13];含水量高时,溶氧量降低,菌丝被浸泡,致使菌丝不能生长,进而影响到凝乳酶的产量^[12]。因此研究加水量是至关重要的。

图3可知,在固液比1.5:1~0.75:1之间凝乳酶酶活逐渐升高,在固液比为0.6:1时出现最大值742U/mL。随着加水量的增加,酶活有所下降。

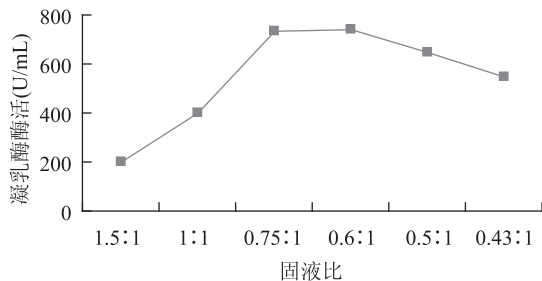


图3 不同的培养基含水量对产酶的影响

Fig.3 Effect of different water content of culture medium on enzyme production

2.4 接种量对微小毛霉产凝乳酶的影响

本实验用直径1.5cm的圆环取样器进行取样,其所取菌体份数即为接种量。按1.2.3.4方法,在30℃培养条件下发酵5d,测定不同接种量的凝乳活力。结果见图4。

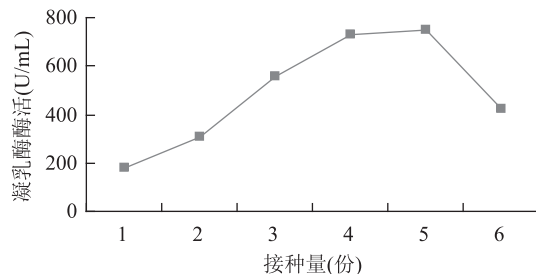


图4 不同的接种量对产酶的影响

Fig.4 Effect of inoculum size on enzyme production

由图4可知,随着接种量的增加凝乳酶酶活逐渐增加,在接种量为5份时出现最大值750U/mL,而后开始下降。接种量对微小毛霉产酶有很大的影响,接种量过少,生长缓慢,发酵周期长;接种量过大时,会导致菌种生长过旺,进而造成固体培养基局部迅速升温,影响产酶量^[19]。接种量为4份或5份时,凝乳酶活力相差不大,从经济成本和产酶量考虑选择4份作为最佳接种量。

表5 回归方程系数显著性检验表

Table 5 Test of significance for egression quation coefficients

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	86461.33	10	86461.33	14.74	0.0098	显著
A	16875.00	1	16875.00	28.76	0.0058	显著
B	2821.33	1	2821.33	4.81	0.0934	
C	8533.33	1	8533.33	14.54	0.0189	显著
D	26696.33	1	26696.33	45.50	0.0025	显著
E	17328.00	1	17328.00	29.53	0.0056	显著
F	3745.33	1	3745.33	6.38	0.0649	
G	1083.00	1	1083.00	1.85	0.2459	
H	2133.33	1	2133.33	3.64	0.1292	
I	2760.33	1	2760.33	4.70	0.0959	
J	4485.33	1	4485.33	7.64	0.0506	
曲率	2.367E + 005	1	2.367E + 005	403.47	<0.0001	显著
残差项	2347.08	4	586.77			
失拟项	1776.33	1	1776.33	9.34	0.0552	不显著
误差	570.75	3	190.25			
总和	3.256E + 005	15				

2.5 正交实验设计优化微小毛霉发酵条件研究

根据单因素实验,对发酵时间,发酵温度,固液比和接种量进行 L₁₆(4⁴) 正交实验,因素水平表见表 1,实验结果见表 2。

表1 L₁₆(4⁴) 因素水平表

Table 1 Factors level table of L₁₆(4⁴)

水平	因素			
	A 发酵时间 (d)	B 发酵温度 (℃)	C 固液比	D 接种量 (份)
1	4	20	1.0:1	1
2	5	25	0.75:1	2
3	6	30	0.6:1	3
4	7	35	0.5:1	4

表2 正交实验结果表

Table 2 Extreme value analysis of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	凝乳酶活力 (U/mL)
1	1	1	1	1	444
2	1	2	2	2	818
3	1	3	3	3	811
4	1	4	4	4	692
5	2	1	2	3	783
6	2	2	1	4	779
7	2	3	4	1	783
8	2	4	3	2	628
9	3	1	3	4	421
10	3	2	4	3	679
11	3	3	1	2	820
12	3	4	2	1	629
13	4	1	4	2	441
14	4	2	3	1	750
15	4	3	2	4	632
16	4	4	1	3	499
k ₁	691.250	522.250	635.500	651.500	
k ₂	743.250	756.500	715.500	676.750	
k ₃	637.250	761.500	652.500	693.000	
k ₄	580.500	612.000	648.750	631.000	
R	162.750	239.250	80.00	62.000	

由表 2 所示,经过极差计算得出 A₂B₃C₂D₃ 为实验的最佳组合,即:发酵时间为 5d,发酵温度为 30℃,固液比为 0.75,接种量为 3 份,这四个因素对固态发酵凝乳活力影响的主次顺序为发酵温度 > 发酵时间 > 固液比 > 接种量。这说明发酵温度对微小毛霉固态发酵的产酶能力影响最大。以最优条件进行固态发酵验证实验,凝乳酶活力为 828U/mL。

2.6 重要因素的筛选

根据微小毛霉生长所需营养要素和结合相关的文献报道以及笔者的前期实验,实验选取的影响因素(变量)共 10 个(包括原始的和非原始的培养基成分),表 3 列出 10 个营养因素的编号及水平,A~J 编码了 10 个因素。表 4 列出了 Plackett-Burman 设计的不同培养基,标号为 1~16,每行代表 1 个实验,按照设计的培养基进行发酵实验,每组重复 3 次,结果见表 3~表 5。

表3 Plackett-Burman 实验因素与水平

Table 3 Factors level table of Plackett-Burman

实验因素	(-1)低水平(g)	(+1)高水平(g)
A 麸皮	10.00	12.50
B 米糠	5.44	6.80
C 豆饼粉	0.60	0.75
D KH ₂ PO ₄	0.096	0.12
E (NH ₄) ₂ SO ₄	0.32	0.40
F 蔗糖	0.40	0.50
G CaCl ₂	0.08	0.10
H FeSO ₄	0.0008	0.001
I MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04	0.05
J MnSO ₄ · H ₂ O	0.04	0.05

用 Design-Expert 7.1.3 软件进行方差分析发现,麸皮、豆饼粉、KH₂PO₄ 和 (NH₄)₂SO₄ 对凝乳酶的活力具有显著性的影响,而其它的因素没有显著影响。

2.7 重要因素单因素实验

2.7.1 (NH₄)₂SO₄ 添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响 由图 5 可知,随着 (NH₄)₂SO₄ 添加量的增加凝乳酶酶活逐渐增加,在添加量为 0.4g 时出现最大值

750U/mL,而后开始下降。

表4 Plackett-Burman 实验设计和结果

Table 4 Plackett-Burman design and results of experiment

实验号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	凝乳酶活力 (U/mL)
1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	476
2	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	383
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	409
4	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	444
5	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	480
6	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	470
7	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	707
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	754
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	783
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	538
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	754
12	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	380
13	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	455
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	760
15	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	563
16	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	477

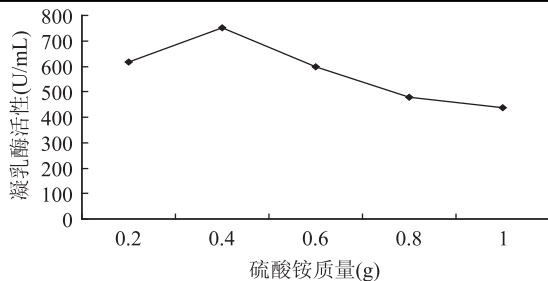


图5 不同质量硫酸铵对凝乳活性的影响

Fig.5 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on clotting activity

2.7.2 KH_2PO_4 添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响

磷是构成核酸、细胞膜磷脂的主要成分之一,也是参与能量代谢与转化的重要元素。微小毛霉生长与产物分泌过程中需要适量的磷。

由图6可知,随着 KH_2PO_4 添加量的增加凝乳酶酶活逐渐增加,在添加量为 0.12g 时出现最大值 750U/mL,而后开始下降。原因是由于磷含量过高时,导致微小毛霉生长速度过快,菌体老化速度增加从而使得其产酶能力降低。

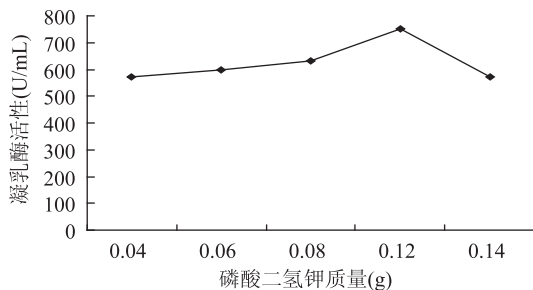


图6 不同质量磷酸二氢钾对凝乳活性的影响

Fig.6 Effect of KH_2PO_4 on clotting activity

2.7.3 麸皮添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响 由图7可知,随着麸皮添加量的增加凝乳酶活性逐渐增强,在添加量为 15g 时出现最大值 722U/mL,而后开始下降。

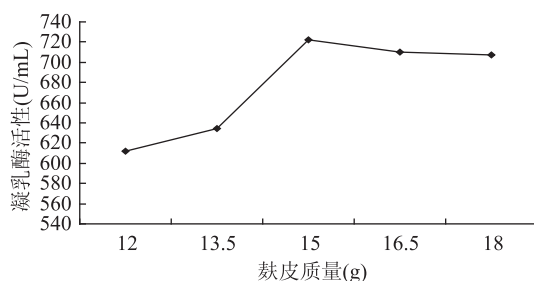


图7 不同麸皮质量对凝乳活性的影响

Fig.7 Effect of bran on clotting activity

2.7.4 豆饼粉添加量对微小毛霉产凝乳酶的影响

由图8可知,随着豆饼粉添加量的增加凝乳酶酶活逐渐下降。

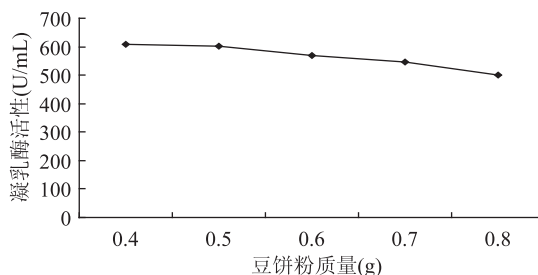


图8 不同质量豆饼粉对凝乳活性的影响

Fig.8 Effect of soybean cake on clotting activity

2.8 最陡爬坡实验

实验 2.7.4 结果显示,豆粉饼对微小毛霉固态发酵生产凝乳酶的影响是负效应,故在培养基的主要营养成分的选择中,我们仅选择麸皮、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KH_2PO_4 作为最陡爬坡实验的筛选因素。

表6 最陡爬坡实验设计及结果

Table 6 The path of steepest ascent method Design and results of experiment

实验号	麸皮 (g)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	KH_2PO_4 (g)	凝乳酶活性 (U/mL)
1	13.5	0.35	0.12	138
2	14.0	0.30	0.11	191
3	14.5	0.25	0.10	193
4	15.0	0.20	0.09	399
5	15.5	0.15	0.08	935
6	16.0	0.10	0.07	686
7	16.5	0.05	0.06	533

表6列出了各显著因素的变化方向、步长和实验结果。由表6可知,凝乳酶活性在条件1到5之间有一个明显的上升,之后开始下降,最优发酵条件在5和6之间,故条件5为后续实验的中心点。

2.9 Box-Behnken 设计进一步优化培养基成分

以主要影响凝乳酶产量的麸皮、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KH_2PO_4 这三个因素的含量为自变量,各因素编码水平如表7所示,Box-Behnken 实验设计和实验结果见表8,回归方程系数显著性如表9所示。

用 Design-Expert 7.1.3 软件回归拟合表实验数据,可以得到二阶经验模型为 $Y = +800.00 + 85.25A + 70.00B + 55.75C - 70.00AB - 72.50AC + 17.50BC - 121.50A^2 - 51.50B^2 - 28.00C^2$

表9 回归方程系数显著性检验表

Table 9 Test of significance for egression quation coefficients

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
模型	2.368E + 005	9	26316.56	6.95	0.0142	显著
A	58140.50	1	58140.50	15.34	0.0078	显著
B	39200.00	1	39200.00	10.35	0.0182	显著
C	24864.50	1	24864.50	6.56	0.0428	显著
AB	19600.00	1	19600.00	5.17	0.0633	
AC	21025.00	1	21025.00	5.55	0.0566	
BC	1225.00	1	1225.00	0.32	0.5903	
A ²	59049.00	1	59049.00	15.58	0.0076	显著
B ²	10609.00	1	10609.00	2.80	0.1453	
C ²	3136.00	1	3136.00	0.83	0.3980	
残差项	22735.00	6	3786.17			
失拟项	22735.00	3	7578.33			
误差	0.000	3	0.000			
总和	2.596E + 0.005	15				

R² = 0.9124

R²_{Adj} = 0.9124

式中,Y 代表凝乳活力,A、B、C 分别代表培养基中麸皮、(NH₄)₂SO₄ 和 KH₂PO₄ 的质量(g)。

表7 因素水平表

Table 7 Factors level form

因素	编码水平		
	-1	0	+1
A 麸皮(g)	15.0	15.5	16.0
B (NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	0.1	0.15	0.2
C KH ₂ PO ₄ (g)	0.07	0.08	0.09

表8 N = 16 的 Box-Behnken 实验设计

Table 8 N = 16 Box-Behnken design of experiment

实验号	A	B	C	凝乳酶活力(U/mL)
1	0	+1	+1	789
2	0	0	0	800
3	0	0	0	800
4	+1	-1	0	667
5	0	-1	+1	697
6	-1	0	+1	723
7	0	+1	-1	709
8	0	0	0	800
9	0	0	0	800
10	0	-1	-1	687
11	+1	0	-1	723
12	+1	0	+1	756
13	-1	0	-1	400
14	-1	-1	0	364
15	-1	+1	0	727
16	+1	+1	0	750

由方差分析(表9)可知该方程的决定系数 R² 为 0.9124,修正决定系数 R²_{Adj} 为 91.24%,能对实验数据进行较好的拟和,因此该模型可用于预测微小毛霉实际发酵所产凝乳酶活力情况。从表9 中还可以看出在各模型参数中,交互项的 F 值都很小,表明这 3 个因素之间的相互影响很小,即 AB、AC、BC 对凝乳酶活力影响不显著,两两之间的二价交互作用没有统计学意义;而 A、B、C、A² 对凝乳酶的影响均为显著性(可信度 >99%)。

2.10 各因素对凝乳酶活力的影响

在保持 1 个因素为最优条件下,其它 2 个因素与响应值关系用三维坐标图表示,图 9~图 11 直观地反映了各因素对响应值的影响关系。

如图 9 所示,当 (NH₄)₂SO₄ 为 0.20g 时随着麸皮的不断增大,凝乳酶活力较快地提高。当麸皮达到 15.50g 时凝乳酶活力达到最大值,然后开始下降。方差分析表明 (NH₄)₂SO₄ 和麸皮的交互作用不显著。

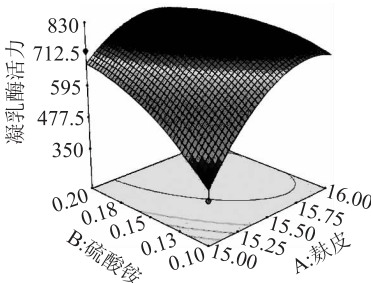


图9 麸皮含量和 (NH₄)₂SO₄ 含量对凝乳酶活力的影响

Fig.9 Effect of bran and (NH₄)₂SO₄ on clotting activity

如图 10 所示,当 KH₂PO₄ 为 0.09g 时随着麸皮的不断增大凝乳酶活力较快地提高。当麸皮达到 15.50g 时凝乳酶活力达到最大值,然后开始下降。方差分析表明 KH₂PO₄ 和麸皮的交互作用不显著。

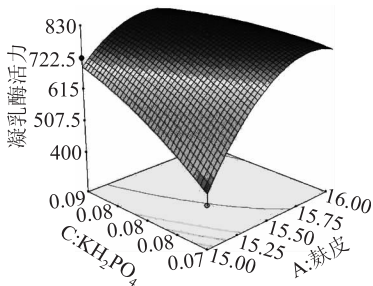


图 10 麸皮含量和 KH₂PO₄ 含量对凝乳酶活力的影响

Fig.10 Effect of bran and KH₂PO₄ on clotting activity

如图 11 所示,当 KH₂PO₄ 为 0.09g 时随着

(NH_4) $_2$ SO $_4$ 含量的不断增大,凝乳酶活力较快地提高,而后趋于平稳。当(NH_4) $_2$ SO $_4$ 为 0.20g 时,随着 KH_2PO_4 的不断增大凝乳酶活力也随之提高而后趋于平稳。方差分析表明 KH_2PO_4 和 (NH_4) $_2$ SO $_4$ 的交互作用不显著。

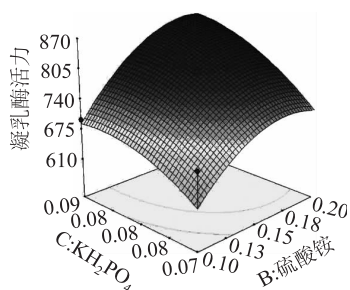


图 11 (NH_4) $_2$ SO $_4$ 含量和 KH_2PO_4 含量对凝乳酶活力的影响

Fig.11 Effect of (NH_4) $_2$ SO $_4$ and KH_2PO_4 on clotting activity

2.11 模型的验证

在最优条件下:麸皮、(NH_4) $_2$ SO $_4$ 和 KH_2PO_4 分别为 15.50、0.15、0.08g 时,预测凝乳最大活力为 1143U/mL。为验证模型准确性和有效性,在预测最优发酵条件下进行发酵实验,得到实际凝乳酶活力为 1200U/mL,可见该模型能较好预测发酵所产凝乳酶活力。因此,最优发酵培养基的组成为:麸皮 15.50g、(NH_4) $_2$ SO $_4$ 0.15g、 KH_2PO_4 0.08g。

3 结论

3.1 本实验在未进行优化实验前,对微小毛霉在固液比为 0.6:1、用直径 1.5cm 的圆环取样器进行取样,其所取菌体份数即为接种量,接种量 4 份、30℃ 培养条件下进行发酵 5d,并测定样品的凝乳活力,其乳酶活力为 720U/mL。

3.2 本实验采用了单因素和正交实验设计对目的菌株的发酵条件进行优化研究。结果表明,其最佳发酵条件为:发酵时间 5d,发酵温度 30℃,固液比值 0.75,接种量为 3 份,这四个因素对固态发酵凝乳活力影响的主次顺序为发酵温度 > 发酵时间 > 加水量 > 接种量。以最优条件进行固态发酵实验,凝乳酶活力为 828U/mL。

3.3 本实验用了响应面方法对微小毛霉发酵生产凝乳酶的培养基配方进行优化。用 Plackett-Burman 实验方法研究麸皮、米糠和豆饼粉等 10 个营养因子对产凝乳酶活力的影响,结果表明,主要影响因子为麸皮、(NH_4) $_2$ SO $_4$ 和 KH_2PO_4 。根据实验结果对主要影响因子的含量范围进行估计,然后用 Box-Behnken 设计及响应面分析确定主要影响因子的最佳质量。结果表明当麸皮质量为 15.50g, (NH_4) $_2$ SO $_4$ 质量为 0.15g, KH_2PO_4 质量为 0.08g 时,微小毛霉产凝乳酶活力达到 1200U/mL。较原始培养基活力提高了 66.67%。

参考文献

[1] Arima K, et al. Milk-clotting enzyme from *Mucor Pussilus*

- [J]. In methods in enzymoio Academic, 1970, 19(3): 446-460.
- [2] 张建忠,徐笔峰,胡斌斌. 基因工程凝乳酶的研究开发[J]. 食品研究与开发, 1998, 19(3): 43-45.
- [3] 姜峰,张兰威. 我国凝乳酶特性及其替代品的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(6): 3-6.
- [4] 郭本恒. 功能性乳制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [5] 郭光远,姜成林,马俊. 微生物凝乳酶的研究 I: 菌株的筛选、发酵、制备及毒性[J]. 微生物学通报, 1988, 15(5): 207-210.
- [6] Nigam J M, K R Pillai, J N Baruah. Effect of carbon and nitrogen sources on neutral proteinase production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Folia Microbiol, 1981, 26: 358-363.
- [7] 王锦,吕红线,于同立. 食品微生物学实验技术[M]. 山东轻工业学院, 2003.
- [8] Stefan R, Kappeler, Hans (J) M. van den Brink, et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 342: 647-654.
- [9] Holker U, J Lenz. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages[J]. Cur Opin Microbiol, 2005(8): 301-306.
- [10] Thakur M S, N G Karanth, N Krishna. Production of fungal rennet by *Mucor meiehei* using solid state fermentation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 32: 409-413.
- [11] Su Y C, W P Chen. Studies on milk clotting enzymes from microorganisms: Part 1. Screening tests and production of the enzymes[J]. J Chin Agric Chem Soc, 1970(8): 73-83.
- [12] Pandey A, C R Soccol, P Nigam, et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses[J]. Biochem Eng J, 2000(6): 153-162.
- [13] Chu I M, C Lee, T S Li. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis*[J]. Enz Microbiol Technol, 1992, 14: 755-761.
- [14] Gupta R, Q K Beg, S Khan, et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial proteases[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 60: 381-395.
- [15] Yu P J, C C Chou. Factors affecting the growth and production of milk clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium[J]. Food Techno, 2005.
- [16] Hung Y C, C C Chou. Growth and milk clotting enzyme production in submerged culture of *Amylomyces rouxii*[J]. Chin Agric Chem Soc, 1997, 35: 422-432.
- [17] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. Biometrika, 1946, 33: 305-325.
- [18] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- [19] 王明强. 微小毛霉产凝乳酶条件及酶性质的研究[D]. 西南大学, 2008.