

洗毛用枯草芽孢杆菌产蛋白酶发酵条件优化

王丽丽¹, 高忠涛², 杜冰¹, 郑来久¹

1. 大连工业大学纺织工程重点实验室, 辽宁大连 116034

2. 辽宁超懿工贸集团, 辽宁阜新 123000

摘要 用响应面法(Response Surface Methodology, RSM)对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)液体发酵产蛋白酶的发酵条件进行快速优化。首先运用逐因子试验确定 *Bacillus subtilis* 产蛋白酶的最佳碳源和氮源分别为糊精和玉米粉。在此基础上,通过 Plackett-Burman 设计对其产酶相关因素进行评估,并筛选出具有显著效应的 3 个因素:糊精、玉米粉和酵母膏。在用最陡爬坡试验逼近以上 3 个因子的最大响应区域后,采用 RSM 法对以上 3 个显著因子的最佳水平范围进行研究,通过对二次多项回归方程求解,确定其最优发酵条件为:糊精 11.568g/L,玉米粉 22.462g/L,酵母膏 10.202g/L,NaCl 5g/L。初始 pH 值为 7.0,37℃培养 48h。最终优化后的酶活达到 3281.79U/mL,比初始酶活 2463.95U/mL 提高了 33.19%,证明 RSM 法优化洗毛用 *Bacillus subtilis* 产蛋白酶发酵工艺是可行的。

关键词 枯草芽孢杆菌;蛋白酶;Plackett-Burman 设计;响应面法

中图分类号 TS133+.2

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)06

Optimization of Protease Production Fermentation Conditions by *Bacillus subtilis*

WANG Lili¹, GAO Zhongtao², DU Bing¹, ZHENG Laijiu¹

1. Key Laboratory of Textile Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning Province, China

2. Liaoning Chaoyi Co. Ltd., Fuxin 123000, Liaoning Province, China

Abstract The response surface methodology (RSM) was used to optimize the immersion fermentation conditions for protease production by *Bacillus subtilis*. Firstly, dextrin and cornmeal were screened out as the most suitable carbon and nitrogen sources by using single factor experiment. Based on these, the assay Plackett-Burman was designed to evaluate relative factors related to protease production and three statistically significant factors (dextrin, cornmeal and yeast extract) were selected. And then the steepest ascent method was applied to define the optimal response region for these three factors, the RSM was used to optimize the above critical factors, and to find out the optimal concentration levels and the relationships between these factors. By solving the quadratic regression model equation by using appropriate statistic methods, the optimal fermentation concentrations were determined, with dextrin of 11.568g/L, cornmeal of 22.462g/L, yeast extract of 10.202g/L, NaCl of 5g/L, initial pH of 7.0, and 37℃ incubation for 48h. Protease activity after optimization was increased from 2463.95U/mL to 3281.79U/mL, an increase by 33.19%. The experiment data under various conditions have validated the theoretical values.

Keywords *Bacillus subtilis*; protease; Plackett-Burman design; response surface methodology(RSM)

随着全球环境问题日益严重,发展低碳经济和低碳技术已成为世界各国的研究热点。纺织行业是高能耗、高污染行

业,特别是洗毛工业对环境的污染比较严重,且传统洗毛工艺很难去除蛋白质污染物(PCL)^[1],影响后加工的质量和成品

收稿日期: 2009-12-25

基金项目: 辽宁省技术创新重点项目(09C579);辽宁省纺织材料绿色加工技术创新团队项目(2006T028)

作者简介: 王丽丽,硕士研究生,研究方向为纺织生物技术,电子信箱:369035181@qq.com,郑来久(通信作者),教授,研究方向为纺织清洁化加工技术,电子信箱:fztrw@dlpu.edu.cn

的色光^[2]。为解决这一难题,本研究应用枯草芽孢杆菌蛋白酶进行洗毛,可有效去除蛋白质污染物^[3-5],提高洗净毛的质量。首先优化菌种发酵条件,采用逐因子试验筛选出菌株 *Bacillus subtilis* 的最佳碳源和氮源,然后结合 Plackett–Burman 设计和 RSM 法优化确定产酶发酵的最佳条件。通过各种方法的联合应用,在短时间内对菌株的产酶条件进行系统的研究,快速地优化了产酶的发酵条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),为实验室保藏菌株。

1.2 培养基

1) 斜面培养基(g/L):牛肉膏 5,蛋白胨 10, NaCl 5,琼脂 20,pH 7.0。

2) 种子培养基(g/L):牛肉膏 5,蛋白胨 10, NaCl 5,pH 7.0。

3) 发酵培养基(g/L):牛肉膏 5,蛋白胨 10,酵母膏 5, NaCl 5,pH 7.0。

1.3 接种和发酵

将活化后的菌种由培养斜面接种到种子培养基中,于 28~30℃、180r/min 下培养 24h,制成液体菌种。然后按 2%的接种量接入到产酶培养基中,在 37℃、200r/min 下进行产酶试验。发酵液 4℃、10000r/min 下离心 8min,取上清液测定蛋白酶的活力。

1.4 酶活力的测定

按照 QB/T1803 —1993 Follin–Phenol 法测定蛋白酶酶活。

2 结果与讨论

2.1 最适碳源的选择

在发酵培养基的基础上,把牛肉膏替换成不同种类的碳源(5g/L),如可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、糊精、甘油进行发酵,48h 后测定酶活。结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出糊精的产酶效果最佳,因此选用糊精作为发酵产酶的最佳碳源。

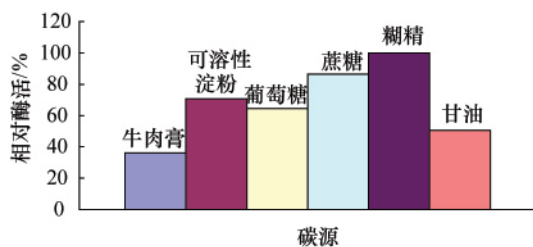


图 1 不同碳源对产酶的影响

Fig. 1 Effect of various carbon sources on protease production

2.2 最适氮源的选择

在确定糊精为碳源的基础上,分别添加玉米粉、KNO₃、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、牛肉膏代替培养基中的蛋白胨为氮源,其他培养基成分不变,进行发酵比较,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,用玉米粉作氮源发酵 48h 后酶活最高,明显优于其他氮源。因此选用玉米粉作为发酵的最佳氮源。

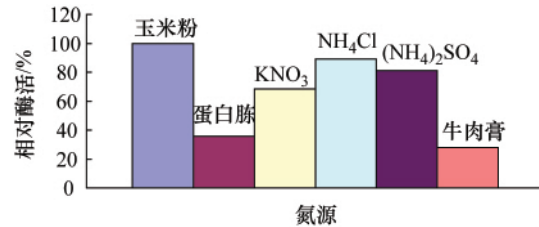


图 2 不同氮源对产酶的影响

Fig.2 Effect of various nitrogen sources on protease production

2.3 Plackett–Burman 设计筛选主效因子

采用 Plackett–Burman 设计从糊精(X_1)、玉米粉(X_2)、酵母膏(X_4)、NaCl(X_5)、初始 pH(X_7)、发酵温度(X_8)和培养时间(X_{10})7 个影响发酵产酶的因素中筛选具有显著影响的因素。实验中,每个因素取两个水平:即高水平“1”和低水平“–1”。实验设计 3 个冗余变量: X_3 、 X_6 、 X_9 。实验设计及结果如表 1 所示。针对实验结果,用 SPSS 软件进行统计分析(表 2)。

表 1 Plackett–Burman 实验设计及响应值

Table 1 Plackett–Burman design and its results

序号	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	酶活 Y /(U·mL ⁻¹)
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	2893.57
2	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	2793.68
3	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	3056.45
4	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	2909.58
5	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	2806.72
6	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	2845.83
7	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	2957.42
8	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3121.67
9	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	2764.93
10	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	2721.74
11	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	2786.89
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2706.31

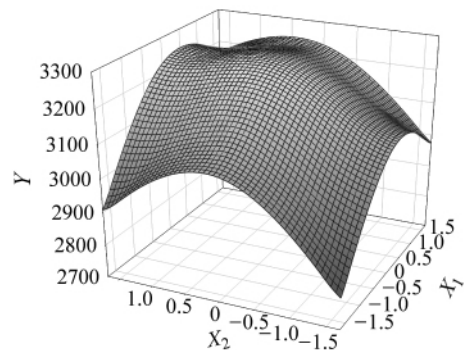
由表 2 所示实验结果可知, X_1 (糊精)、 X_2 (玉米粉)和 X_4 (酵母膏)3 个因素的重要性分别为 99.87%、99.85%和 99.14%,在 7 个实际考察因素中最高,因此这 3 个因素被选为重要因素,即在进一步研究工作中,选择糊精、玉米粉和酵母膏作为主要研究对象进行优化工作。而其他 4 个因素根据其效应性选择实验水平,即: X_5 (NaCl)和 X_7 (初始 pH)选择高

中一次项中最显著的因素为 X_1 ,即糊精。方程复相关系数的平方 $R^2=0.9642$,说明建立的模型能解释酶活变化的 96.42%,即能较好地描述实验的变化规律。在所选的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序: $X_1>X_2>X_3$,即:糊精>玉米粉>酵母膏。

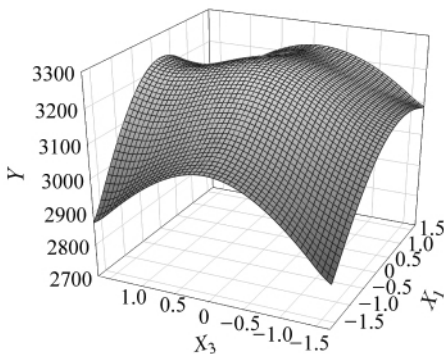
表 6 回归系数显著性检验

Table 6 Regression coefficients and their significance of the regression equation

参数	数值	标准误差	t 值	Prob> t
截距	3281.486	10.288	318.972160	2.254E-21
X_1	55.960	6.825	8.199033	9.480E-6
X_2	44.224	6.825	6.479467	7.072E-5
X_3	21.665	6.825	3.174238	0.009916
X_1^2	-52.044	6.643	-7.834075	1.413E-5
X_2^2	-51.334	6.643	-7.727130	1.592E-5
X_3^2	-49.876	6.643	-7.507653	2.043E-5
X_1X_2	9.194	8.918	1.030913	0.326870
X_1X_3	-6.991	8.918	-0.783942	0.451243
X_2X_3	4.949	8.918	0.554913	0.591149
R^2	调整 R^2		标准估计误差	
0.9642	0.9320		25.22410	



(a) X_1-X_2



(b) X_1-X_3

图 3 响应面三维图和对应的等高线图

Fig. 3 The 3D and contour plot of response surface

表 7 回归方程方差分析

Table 7 ANOVA for the regression equation

模型	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F
回归	171344.866	9	19038.3185	29.9225	4.5187E-6 ^a
残差	6362.551	10	636.2551		
总计	177707.417	19			

2.5 最佳优化条件的确定

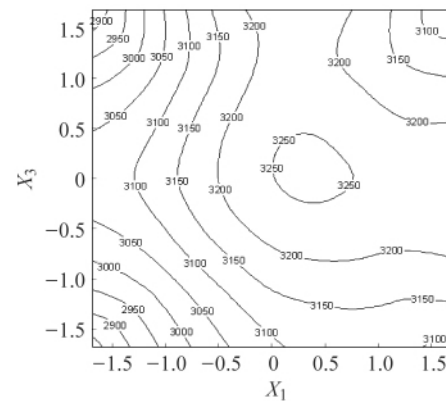
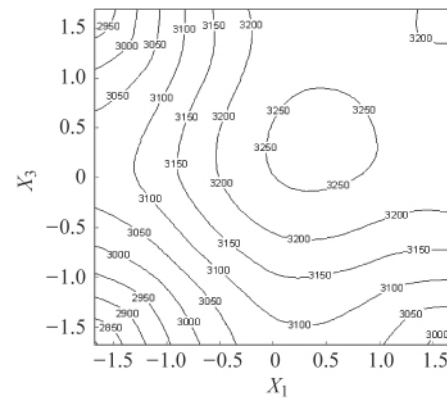
为了确证各因素的最佳点,对已回归的非线性模型方程求一阶偏导,并令其等于零,可以得到曲面的最高点,求导方程整理得

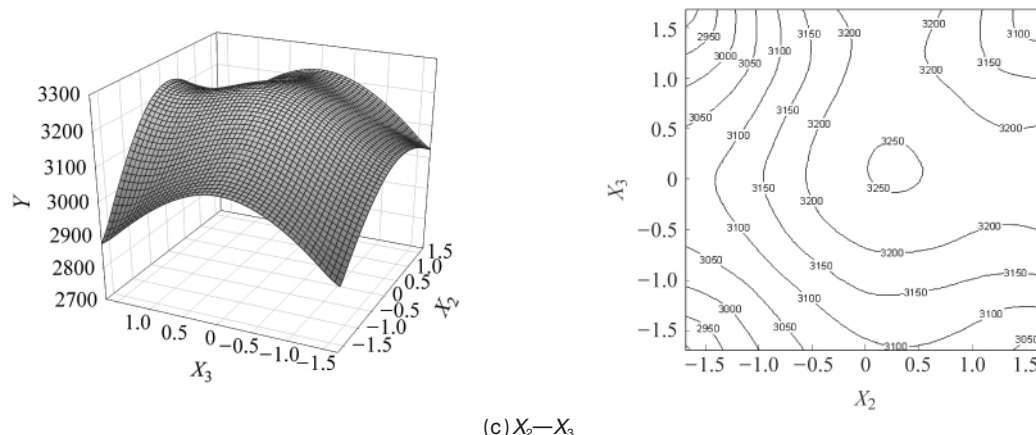
$$\begin{cases} 1234.069-104.088X_1+1.839X_2-6.991X_3=0 \\ 60.855+1.839X_1-4.106X_2+0.990X_3=0 \\ 1076.286-6.991X_1+0.990X_2-99.752X_3=0 \end{cases}$$

在回归方程中,求解得 $X_1=11.56766422$ 、 $X_2=22.46170291$ 和 $X_3=10.20183601$,即酶法洗毛优化后的条件为:糊精 11.56766422g/L、玉米粉 22.46170291g/L 和酵母膏 10.20183601g/L。

2.6 验证实验

由于以上最佳条件未包括在 RSM 的 20 个实验中,应进一步确认计算结果,但因优化后实验条件过于精确,本研究以糊精 11.568g/L、玉米粉 22.462g/L、酵母膏 10.202g/L,并结





(c) X_2 — X_3

图 3 响应面三维图和对应的等高线图 (续)

Fig. 3 The 3D and contour plot of response surface (continued)

合单因素最适条件: NaCl 5g/L, 初始 pH 7.0, 37℃培养 48h, 对结果进行验证实验, 测得的酶活为 3281.79U/mL (3 次重复)。相对于优化前的初始酶活 2463.95U/mL 提高了 33.19%, 证明用 RSM 法优化枯草芽孢杆菌发酵产酶条件是可行的。

3 结论

本研究通过逐因子实验、Plackett-Burman 设计以及响应面法 3 种实验设计相结合, 快速且有效地筛选主效因子, 并对其水平进行了优化, 从而得到 *Bacillus subtilis* 最优发酵条件。优化后的发酵条件为: 糊精 11.568g/L, 玉米粉 22.462g/L, 酵母膏 10.202g/L, NaCl 5g/L, 初始 pH 7.0, 37℃培养 48 h。按照此发酵条件培养, 酶活可以达到 3281.79U/mL, 比初始酶活 2463.95U/mL 提高 33.19%。实验证明, 联合逐因子实验、Plackett-Burman 设计以及响应面分析, 能够快速、有效地优化产酶的发酵条件。

参考文献 (References)

- [1] 邢声远. 羊毛沾污物与洗毛工艺(一)[J]. 洗净技术, 2004, 2(2): 13-16.
Xing Shengyuan. *Cleaning Technology*, 2004, 2(2): 13-16.
- [2] 陈坚, 华兆哲, 堵国成. 新型纺织酶制剂的发酵与应用[M]. 北京: 化学

工业出版社, 2007: 88.

Chen Jian, Hua Zhaozhe, Du Guocheng. *Novel enzymes in tixtile industry fermentation and application*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 88.

- [3] Lou Hui, Qi Liming, Zong Yanjun. Application in the textile industry of compound-enzyme[C]//Proceedings of the Third China International Wool Textile Conference, 2002, (3): 644-645.
- [4] 樊增禄, 戴瑾瑾, 朱泉. 蛋白酶对羊毛的作用机理研究 [J]. 纺织学报, 2002, 23(1): 19-21.
Fan Zenglu, Dai Jinjin, Zhu Quan. *Journal of Textile Research*, 2002, 23 (1): 19-21.
- [5] 马永才, 刘生红, 谭磊. 酶在毛纺织加工过程中的作用 [J]. 染整技术, 2002, 24(2): 20-23.
Ma Yongcai, Liu Shenghong, Tan Lei. *Textile Dyeing and Finishing Journal*, 2002, 24(2): 20-23.
- [6] He Yaoqiang, Tan Tianwei. Use of response surfacemethodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43: 9-14.
- [7] 陈晖, 杨江科, 刘曼西, 等. 响应面法快速优化曲霉 *Aspergillus* sp. F044 产脂肪酶培养条件[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 47-52.
Chen Hui, Yang Jiangke, Liu Manxi, *et al.* *Industrial Microbiolog*, 2007, 37(1): 47-52.

(责任编辑 李慧政)

·学术动态·

“2010年亚太青年通信 学术会议(APYCC2010)”征文



由中国通信学会主办的“2010年亚太青年通信学术会议(APYCC2010)”将于2010年8月6-8日在昆明市举行。

会议征文范围: 通信理论与信号处理、智能通信与智能计算、无线移动通信、宽带交换技术、数字城市与数字地球、信息技术与数据挖掘、地理信息系统、网络与信息安全、下一代网络、光互联网结构及交换技术、传感器网络、网络理论与技术、军事通信、信息隐藏与数字水印、光纤通信、数字媒体艺术、生物信息学、计算机技术及应用、计算机软件与理论、微电子与芯片、人机环境与安全工程、通信课程教学改革、多媒体处理与应用、财务信息系统。全文截稿日期: 2010年6月30日。会议网站: <http://www.leaderstudio.net>。

联系方式: 北京市海淀区西土城路10号北京邮电大学287信箱(100876)段老师; 电话: 13910538828; 电子信箱: du-an@leaderstudio.net。