文章编号: 1673-1689(2011)03-0422-05

响应面法优化酱油生产用大曲培养基

魏鹏飞[1,2], 冯 杰[1,2], 王 栋[1,2], 郑志永[1,2], 詹晓北*[1,2], 张丽敏[1,2]
(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 在工厂大曲培养基的基础上, 采用响应面法对影响大曲蛋白酶活的关键影响因子进行了研究和探讨。用统计学方法建立了大曲蛋白酶活和培养基组成的二次多项式数学模型, 并求解得到了大曲培养基组成的最佳配比, 即豆粕: 炒麦: 拌料水的比例为 11.3: 10.5: 19.6(g: g: mL)。在此最佳配比下大曲蛋白酶活达到 2 402U/g, 比对照配方的酶活提高了 20%。

关键词: 酱油生产; 大曲; 蛋白酶; 响应面法; 优化
中图分类号: Q 819 文献标识码: A

Optimization of Koji Medium in Soy Sauce Production Using Response Surface Methodology

WEI Peng-fei[1,2], FENG Jie[1,2], WANG Dong[1,2], ZHENG Zhi-yong[1,2], ZHAN Xiao-bei*[1,2], ZHANG Li-min[1,2]
(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Based on the factory production medium formula of koji, response surface methodology was used to optimize the protease production in this manuscript. A multivariate model was proposed to manifest the interactions of the medium components. It was showed that the optimum, weight proportion of soy bean, fried wheat and water in koji medium is 11.3: 10.5: 19.6 with this optimum conditions, a high level of koji protease activity (2402 U/g) was achieved, it was higher 20% than that of the control.

Key words: soy sauce production, koji, protease, response surface methodology, optimization

制曲是中国传统技术, 谚语有一曲、二酵、三熬油的说法, 说明了制曲的重要性。目前酱油酿造主要选用纯种米曲霉, 以适宜的条件保证米曲霉等有益微生物生长繁殖, 使米曲霉分泌产生所需要的各种酶系, 达到大曲优质高产的目的[1]。

蛋白酶作为米曲霉分泌的酶系中能够提高原料蛋白利用率, 提高发酵酱油氨基态氮含量的关键酶, 其在大曲制作过程中的产量对酱油品质的好坏和生产成本的高低有着直接的影响, 而且提高蛋白酶活还可以减少酿造工业的污染[2-3]。在实际的酱

收稿日期: 2010-05-21
基金项目: 国家"十二五"科技支撑计划项目(2011BAD23B00); 国家"十一五"科技支撑计划项目(2008BAI63B06, 2007BAK36B03)。
* 通信作者: 詹晓北(1962-), 男, 北京人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化工程与反应器等研究。Email: xbzhan@yahoo.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

油生产过程中, 多方面因素影响着制曲过程中成曲蛋白酶活的高低。国外有文献提到培养基的成分和水活度是两个比较重要的影响固态发酵中真菌产酶的因素[4]。工厂中主要采用蒸熟后豆粕与炒麦混料模式制作大曲培养基[5], 可以看出大曲培养基对产酶有着比较重要的影响。因此, 有必要对大曲培养基的组成进行优化。

目前, 统计优化方法有很多, 响应面分析法是一种非常适用的实验设计方法, 具有实验设计、建模、因子效应评估、寻求因子水平最佳操作条件以及数据统计处理等功能, 显示出了其他实验方法如正交实验、因子实验等所不具备的优点[6~9]。响应面分析法中的中心组合设计有着实验次数少, 精度高, 预测性好等优点, 近年来经常被用于发酵培养基优化、最佳反应条件寻优等方面[10~13]。

针对酱油生产的高盐稀态工艺, 选择豆粕、炒麦和拌料水为考察变量, 在工厂生产大曲经验配方的基础上, 应用中心组合设计, 以大曲的蛋白酶活作为响应值, 并采用多元二次回归和方差分析等手段, 对大曲培养基的组成进行优化。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　菌种　米曲霉(*Aspergillus oryzae* CICIM F0899), 由作者所在的江南大学生化工程与反应器研究室保藏。

1.1.2　培养基

1) 菌种活化培养基: 马铃薯蔗糖琼脂培养基[2]。

2) 小曲培养基[2]: 按照麸皮∶豆粕质量比为 4∶1 的比例在 250mL 三角瓶中加入 20 g 过 10 目筛的干料, 12 g 蒸馏水, 拌匀。121 ℃, 0.1MPa 灭菌 30 min。

1.1.3　原料　食用大豆粕: 河北秦皇岛益海豆粕有限公司生产, 符合中华人民共和国食用大豆粕卫生标准(GB 14932.1-2003)[14]; 冬小麦: 无锡三里桥粮油市场购买。

1.2　方法

1.2.1　制曲方法　将豆粕、炒麦和拌料水按照设计配比混匀后, 经过 121 ℃, 30 min 灭菌处理。按照质量分数 1%接种量接入培养好的种曲, 控制曲料品温在 30 ℃培养 48 h, 取样测定大曲蛋白酶酶活。

1.2.2　小麦焙炒粉碎　小麦在 320 ℃条件下焙炒 1~3 min, 其中焦糊粒不超过 5~20%, 小麦裂嘴为 90%以上, 熟麦投水实验时, 沉降率为 3~5%[15]。

1.2.3　取样时间确定　以中心点初始配方, 即工厂大曲培养基制曲, 分段取样测定大曲的蛋白酶活, 从而得到大曲蛋白酶活随时间的变化曲线, 以确定测定大曲酶活的最佳时间。

1.2.4　蛋白酶提取方法　向取出的大曲曲样中加入 1∶20(g∶mL)的 0.1mol/L, pH 值为 7.2 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲溶液, 于 40 ℃水浴中, 间歇搅拌, 浸提 1h, 滤纸过滤得蛋白酶酶液。

1.2.5　蛋白酶活测定方法　采用福林酚法。参照中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法(SB/T 10317-1999)[16]。大曲蛋白酶活定义为 1g 干重大曲中所含的蛋白酶在 40 ℃, pH 值为 7.2 条件下每 1 min 水解干酪素产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.6　分析优化方法　大曲培养基组成按照响应面分析法中的中心组合设计进行优化。中心组合设计由 Box 和 Wilson 提出, 是响应曲面中最常用的二阶设计, 它由 3 部分组成: 立方体点、中心点和星点[17]。对于本实验, 选择大曲配方中的豆粕、炒麦和拌料水 3 个因素, 并以工厂的经验配方为初始水平, 考察制曲过程中蛋白酶活的变化, 对大曲培养基的组成进行优化, 中心点实验选择 6 次。此设计由全 2^3 因子设计构成的 8 个点, 6 个中心点的重复以及 6 个星臂点, 即每个因素轴上距中心点 ±α 处各一个点组成。轴距离 α 选择为 1.682 使得该设计为正交设计[10]。为了预测最佳点, 用二次多项式拟合中心组合设计的实验数据。该多项式方程为:

$$Y = 2\,416.6 + 156.4X_1 + 103.4X_2 - 152.1X_3 - 12.6X_1X_2 + 187.9X_{13} + 184.3X_2X_3 - 255.6X_1^2 - 239.9X_2^2 - 271.7X_3^2$$

式中, Y 为预测响应值, 即大曲的蛋白酶活; X_1、X_2 和 X_3 分别为豆粕、炒麦和拌料水。

实验进行设计和数据利用 Design-Expert7.1.3 (Stat-Ease, Inc.)软件对处理, 用 F(Fischer)检验评价数学模型方程的显著性, 方程的拟合性由确定系数 R^2 确定, 以确立大曲培养基中豆粕、炒麦和拌料水的最佳配比。

2　结果与讨论

2.1　大曲的生长产酶曲线

以中心点初始配方, 即工厂大曲培养基制曲, 分别在 0、12、24、36、48 和 72 h 取样测定大曲的蛋白酶活, 从而得到了大曲蛋白酶活随时间的变化曲线。实验结果见图 1。

由图 1 可知, 大曲的蛋白酶的产生主要集中在 12~36 h, 蛋白酶活在 48 h 时达到最大, 并随着制

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

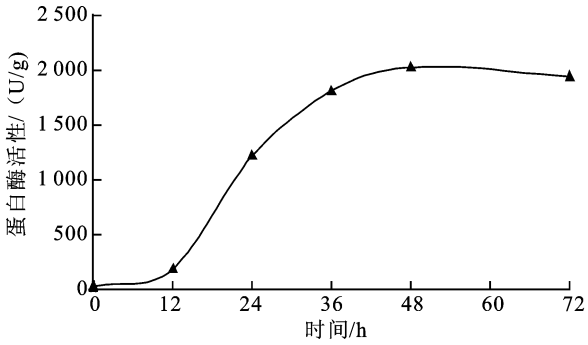


图 1 酱油大曲的产蛋白酶过程曲线

Fig. 1 Protease production of *Aspergillus oryzae* in koji

曲时间的增长蛋白酶活会逐渐下降。因此选择48 h作为取样测定大曲蛋白酶活的最佳时间点。

2.2 中心组合实验优化大曲培养基组成

对影响大曲生产中蛋白酶酶活的培养基组成中的豆粕、炒麦和拌料水进行了三因素五水平响应面分析试验。试验设计与结果见表 1 和表 2。

表 1 响应面分析试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels for response surface analysis

水平	X_1 豆粕/ g	X_2 炒麦/ g	X_3 拌料水/ g
α	15.0	15.0	25.0
1	13.0	13.0	23.0
0	10.0	10.0	20.0
- 1	7.0	7.0	17.0
- α	5.0	5.0	15.0

α= 1.682

表 2 响应面中心组合设计及试验结果

Tab. 2 Response surface central composite design and corresponding experiment results

序号	因 素			蛋白酶活力/(U/g)	
	X_1 豆粕	X_2 炒麦	X_3 拌料水	实际值	预测值
1	- α	- 1	- 1	1 965	2 066
2	α	- 1	- 1	2 103	2 029
3	- α	1	- 1	2 055	1 905
4	α	1	- 1	1 645	1 867
5	- α	- 1	1	1 378	1 170
6	α	- 1	1	1 445	1 580
7	- α	1	1	1 687	1 745
8	α	1	1	2 242	2 155
9	- 1	0	0	1 887	2 005
10	1	0	0	2 434	2 317
11	0	- α	0	1 537	1 564
12	0	α	0	1 938	1 912
13	0	0	- α	1 963	1 904
14	0	0	α	1 332	1 392
15	0	0	0	2 409	2 417
16	0	0	0	2 350	2 417
17	0	0	0	2 476	2 417
18	0	0	0	2 394	2 417
19	0	0	0	2 384	2 417
20	0	0	0	2 487	2 417

α= 1.682

由此实验的实际值用二次多项式进行回归, 其结果见表 3。

表 3 试验结果的回归分析

Tab. 3 Regression analysis of the experiment results

因 素	回归系数估计	标准偏差	95% 置信区间	
			最低	最高
X_1	156.4	66.0	9.4	303.4
X_2	103.4	39.2	16.0	190.8
X_3	- 152.1	39.2	- 239.5	- 64.7
X_1X_2	- 12.6	86.2	- 204.7	179.4
X_1X_3	187.9	86.2	- 4.1	380.0
X_2X_3	184.3	51.2	70.1	298.4
X_1^2	- 255.6	108.0	- 496.2	- 14.9
X_2^2	- 239.9	38.2	- 325.0	- 154.8
X_3^2	- 271.7	38.2	- 356.8	- 186.7

由表 3 中的回归系数可以写出二次多项式回归方程为:

$$Y = 2\,416.6 + 156.4X_1 + 103.4X_2 - 152.1X_3 - 12.6X_1X_2 + 187.9X_{13} + 184.3X_2X_3 - 255.6X_1^2 - 239.9X_2^2 - 271.7X_3^2$$

对该回归方程进行方差分析, 方差分析结果见表 4。

表 4 二次多项式回归模型的方差分析

Tab. 4 Analysis of variance for quadratic polynomial model

方差源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 704 738.0	9	300 526.4	14.3	0.000 1
X_1	118 090.1	1	118 090.1	5.6	0.039 2
X_2	146 071.0	1	146 071.0	7.0	0.024 9
X_3	315 943.5	1	315 943.5	15.0	0.003 1
X_1X_2	450.0	1	450.0	0.0	0.886 6
X_1X_3	99 904.3	1	99 904.3	4.8	0.054 2
X_2X_3	271 584.5	1	271 584.5	12.9	0.004 9
X_1^2	117 679.4	1	117 679.4	5.6	0.039 5
X_2^2	829 523.3	1	829 523.3	39.5	< 0.000 1
X_3^2	1 064 150.4	1	1 064 150.4	50.6	< 0.000 1
残差	210 121.0	10	21 012.1	13.4	0.006 4
失拟项	195 569.6	5	39 113.9		
净误差	14 551.3	5	2 910.3		
总和	2 914 859.0	19			

R^2= 0.927 9, R= 0.963 3

由表 4 的方差分析看出, 该模型的举动决定系数 R^2 = 0.927 9, 显著性水平 α= 0.000 1。R^2 值 0.972 9 说明了 97.29% 的响应值变化是由该模型决定的。R 值为 0.963 3 说明实验中蛋白酶活的实

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

际值与模型预测值有 96.33% 的一致性。由此表明,该模型可对实验结果进行较准确的预测。

此外,由表 4 中的方差分析可以看出,因素 X_1、X_2即豆粕和炒麦的交互影响显著性水平 $\alpha = 0.8866$,远远大于 0.05(置信水平 95%),说明豆粕和炒麦的交互影响对大曲蛋白酶活的影响不够显著。由方差分析还可以看出拌料水在大曲培养基中所占的比例对大曲最终蛋白酶活的影响非常显著。大曲培养基组成中的豆粕、炒麦和拌料水与大曲蛋白酶活的关系分别见图 2、图 3 和图 4。响应面可以直接反映出各因子对响应值的影响大小。分析图 2、图 3 和图 4 可以看出分析结果和方差分析的结果相一致。

2.3　模型验证

对拟合出的二次多项式回归方程分别求 X_1、X_2 和 X_3的偏导数,求得各个因素的极值点:

$X_1 = 11.3$, $X_2 = 10.5$, $X_3 = 19.6$

即大曲培养基组成的配比为豆粕:炒麦:拌料水= 11.3:10.5:19.6 时产蛋白酶活最高。以上述分析得到的最佳培养基组组成制曲,做三次平行实验取蛋白酶活的平均值验证试验结果,结果见表 5。

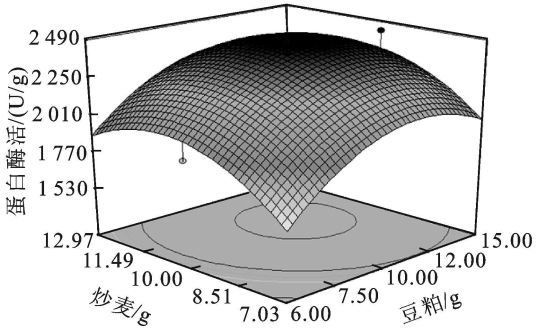


图 2　豆粕和炒麦配料比对蛋白酶活影响的响应面图

Fig. 2　Contour plot of protease activity at various weights of soy bean and fried wheat

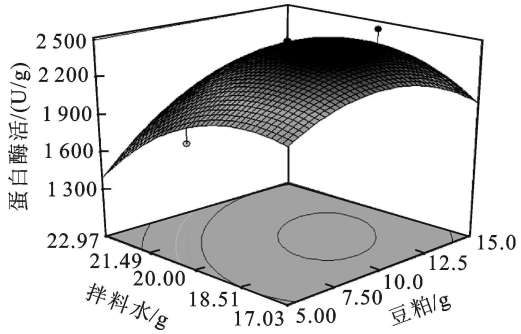


图 3　豆粕和拌料水配料比对蛋白酶活影响的响应面图

Fig. 3　Contour plot of protease activity at various weights of soy bean and water

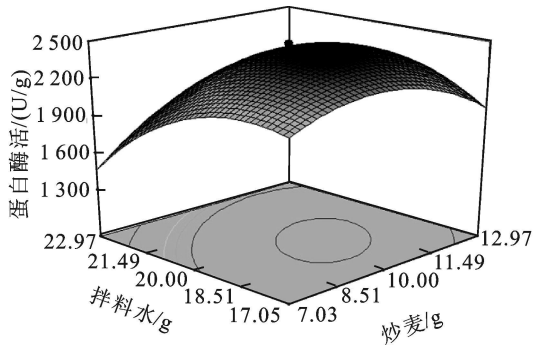


图 4　炒麦和拌料水配料比对蛋白酶活影响的响应面图

Fig. 4　Contour plot of protease activity at various weights of fried and water

表 5　最优条件下蛋白酶活的预测值与试验值比较

Tab. 5　Performance comparison of protease activity between the model simulation and experiment results at optimum conditions

蛋白酶活/(U/g)		相对误差
预测值	实际值	
2 455	2 414	2%
	2 491	
	2 302	

可知,蛋白酶活的预测值为 2 455 U/g,实验实际值为 2 402 U/g,实际值与预测值的相对误差为 2%,在模型允许的误差范围之内。说明模型能很好地预测实际制曲情况,响应面分析方法可靠。

3　结　语

本实验选择大曲配方中的豆粕、炒麦和拌料水 3 个因素,在工厂经验配方的初始水平上,应用响应面法对大曲培养基组成进行优化。借助 Design Expert 软件,用统计学方法建立了大曲蛋白酶活和大曲培养基组成的二次多项式数学模型,并通过分析模型方程和响应面 3D 图得到了大曲培养基组成的最佳配比,即豆粕:炒麦:拌料水的比例为 11.3:10.5:19.6。通过对大曲培养基的优化,酶活比未经优化的经验配方提高了 20%。通过对模型的方差分析和响应面 3D 图分析,可以看出在大曲生产过程中,豆粕和炒麦的比例对大曲产蛋白酶活的影响较小,而拌料水在大曲中所占的比例对蛋白酶活有着很重要的影响,这对酱油酿造工厂大曲生产有着一定的指导意义。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献(References):

[1] 林祖申. 米曲霉制曲过程中酶活性变化及其工艺优化[J]. 中国酿造, 2007, 5: 56-59.
LIN Zu-shen. Change of enzyme activity in *Aspergillus oryzae* cultivation and technical optimization[J]. **China Brewing,** 2007, 5: 56-59. (in Chinese)

[2] 邓静, 吴华昌, 吴明霞等. 米曲霉产蛋白酶条件的优化[J]. 中国酿造, 2008, 12: 51-53.
DENG Jing, WU Hua-chang, WU Ming-xia, et al. Condition optimization for the production of protease by *Aspergillus oryzae*[J]. **China Brewing,** 2008, 12: 51-53. (in Chinese)

[3] 贾爱娟. 提高高盐稀态法酿造酱油原料蛋白质利用率及氨基酸出品率的研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2006.

[4] Krishna C. Solid-state fermentation systems- an overview [J]. **Critical Reviews in Biotechnology,** 2005, 25: 1-30. (in Chinese)

[5] 鲁肇元, 魏克强."酿造酱油"高盐稀态发酵工艺综述[J]. 中国调味品, 2006, 1: 28-31.
LU Zhao-yuan, WEI Ke-qiang. Discuss on the high salt liquid state fermentation of the soy sauce[J]. **China Condiment,** 2006, 1: 28-31. (in Chinese)

[6] Phiarais B P N, Schehl B D, Oliveira J C, et al. Use of response surface methodology to investigate the effectiveness of commercial enzymes on buckwheat malt for brewing purposes[J]. **Journal of the Institute of Brewing,** 2006, 112: 324-332.

[7] Elibol M. Optimization of medium composition for actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2) with response surface methodology[J]. **Process Biochemistry,** 2004, 39: 1057-1062.

[8] 李蕾, 岳喜华, 于欢等. 响应面法优化酸浆果多糖的提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 53-56.
LI Lei, YUE Xi-hua, YU Huan, et al. Optimization of the extraction of polysaccharide(PAP) by response surface analysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(1): 53-56. (in Chinese)

[9] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 306-310.
LIU Dai-xin, NING Xi-bin, ZHANG Ji-lun. Optimization of growth condition of vibrio parahaemolyticus via response surface methodology[J]. **Microbiology,** 2008, 35(2): 306-310. (in Chinese)

[10] 曾文炉, 赵飞飞, 曹照根等. 利用响应面方法优化转小鼠金属硫蛋白-Ⅰ基因聚球藻7002的培养基成分[J]. 生物工程学报, 2008, 24(1): 130-136.
ZENG Wen-lu, ZHAO Fei-fei, CAO Zhao-gen, et al. Medium optimization by response surface method for transgenic synechococcus sp. PCC 7002 with mouse metauothioneinⅠgene[J]. **Chinese Journal of Biotechnology,** 2008, 24(1): 130-136. (in Chinese)

[11] Vohra A, Satyanarayana T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by Pichia anomala[J]. **Process Biochemistry,** 2002, 37(9): 999-1004.

[12] 王普, 孙立明, 何军邀. 响应面法优化热带假丝酵母104菌株产羰基还原酶发酵培养基[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6): 863-868.
WANG Pu, SUN Li-ming, HE Jun-yao. Medium optimization for enhanced production of carbonyl reductase by Candida tropicalis 104 by response surface methodology[J]. **Chinese Journal of Biotechnology,** 2009, 25(6): 863-868. (in Chinese)

[13] 韩景华, 李吕木, 张邦辉等. 响应面分析法优化大豆11S球蛋白提取工艺条件[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 70-74.
HAN Jing-hua, LI Lu-mu, ZHANG Bang-hui, et al. Optimization of extraction conditions for 11S globulin from soybean by response surface methodology[J]. **Food and Fermentation Industries,** 2009, 35(4): 70-74. (in Chinese)

[14] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 食用大豆粕卫生标准[S]. GB 14932.1-2003 中国国家标准出版社, 2004.

[15] 张妍, 范志军. 高盐稀态发酵酱油生产工艺及危害分析[J]. 中国调味品, 2008, 4: 67-70.
ZHANG Yan, FAN Zhi-jun. High salt liquid-state fermentive technology and hazard analysis in soy sauce production[J]. **China Condiment,** 2008, 4: 67-70. (in Chinese)

[16] 上海市酿造科学研究所, 中华人民共和国商业部. 蛋白酶活力测定法[S]. SB/T 10317-1999 中国国家标准出版社, 1999.

[17] 张冬冬, 陶文沂, 崔凤杰等. 响应面法优化白首乌中抗氧化成分的提取[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5): 81-87.
ZHANG Dong-dong TAO Wen-yi Cui Feng-jie, et al. Optimization of the processing parameters for the extraction of antioxidants from cynanchum auriculatum royle ex wight using response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2006, 25(5): 81-87. (in Chinese)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net