

# 米曲霉固态发酵啤酒糟产 $\alpha$ -淀粉酶的优化<sup>\*</sup>

许 晖 孙兰萍 张 斌 石亚中

**【摘要】** 以啤酒糟为主要原料,采用 Box-Benhnken 响应曲面法对影响米曲霉(*Aspergillus oryzae*)NRRL 6270 固态发酵啤酒糟产 $\alpha$ -淀粉酶的关键培养条件:发酵温度、培养基初始含水率和接种量进行了探讨。结果表明:在发酵温度为 29.15~35℃、培养基初始含水率为 68%~71.26%和每克培养基接种孢子数为  $2.6 \times 10^6 \sim 1.38 \times 10^7$  条件下, $\alpha$ -淀粉酶活性可达 6 342.60 U/g;通过对二次多项回归方程解逆矩阵得知,在上述自变量分别为 32.96℃、71.04%和  $1.0 \times 10^7$  时, $\alpha$ -淀粉酶活性最大预测值为 6 581.63 U/g,在上述自变量分别为 32℃、71%和  $1.0 \times 10^7$  左右时,通过试验验证 $\alpha$ -淀粉酶活性可达到 6 445 U/g,证实该方程的预测值与实际值之间具有较好的拟合度。

**关键词:** 米曲霉 啤酒糟  $\alpha$ -淀粉酶 固态发酵 响应面法

中图分类号: TQ920.9

文献标识码: A

## Optimization of Producing $\alpha$ -amylase from Spent Brewing Grains under Solid-state Fermentation by *Aspergillus Oryzae*

Xu Hui Sun Lanping Zhang Bin Shi Yazhong  
(Bengbu College)

### Abstract

For the optimal activity of  $\alpha$ -amylase from spent brewing grains (SBG) by *Aspergillus oryzae* NRRL 6270 in solid-state fermentation (SSF), the optimization of three parameters (fermentation temperature, initial substrate moisture and inoculum size) was carried out using the Box-Benhnken response surface methodology (RSM). By analyzing the response surface plots, the optimum range of fermentation temperature, initial substrate moisture and inoculum size for obtaining over 6 342.60 U/g  $\alpha$ -amylase activity were in 29.15~35℃, 68%~71.26% and  $2.6 \times 10^6 \sim 1.38 \times 10^7$  spores per gram dry substrate, respectively. By solving the regression equation and also by analyzing the response surface contour plots, the optimal process conditions were determined: under conditions of temperature, 32.96℃; initial substrate moisture, 71.04% and inoculum size,  $1.0 \times 10^7$  spores per gram dry substrate, the prediction of  $\alpha$ -amylase activity was 6 581.63 U/g, the above conditions would be 32℃, 71% and  $1.0 \times 10^7$  spores per gram dry substrate, respectively. In this situation, the maximum predicted  $\alpha$ -amylase activity was 6 445 U/g. The experimental data under various conditions have validated the theoretical values.

**Key words** *Aspergillus oryzae*, Spent brewing grains,  $\alpha$ -amylase, Solid-state fermentation, Response surface methodology

### 引言

$\alpha$ -淀粉酶是我国目前用途最广泛、产量最大的

工业酶制剂之一<sup>[1]</sup>。目前国内主要采用解淀粉芽孢杆菌 BF7658 及其变异菌株,以液体深层发酵法(submerged fermentation, 简称 SmF)生产 $\alpha$ -淀粉

收稿日期: 2006-11-23

<sup>\*</sup> 蚌埠学院优秀人才计划专项资助项目(项目编号:院人字[2006]18号)

许 晖 蚌埠学院食品与生物工程系 副教授, 233030 安徽省蚌埠市

孙兰萍 蚌埠学院食品与生物工程系 副教授

张 斌 蚌埠学院食品与生物工程系 讲师

石亚中 蚌埠学院食品与生物工程系 讲师

酶<sup>[2-3]</sup>,而利用真菌发酵生产 $\alpha$ -淀粉酶的研究报道较少<sup>[4-5]</sup>。固态发酵法(solid-state fermentation,简称SSF)生产 $\alpha$ -淀粉酶具有生产效率高、工艺简单、操作方便、能耗少、废液少、产物分离较容易等优点,利用固态发酵技术生产 $\alpha$ -淀粉酶具有较好的经济和环境效益<sup>[6-9]</sup>。

啤酒糟(spent brewing grains,简称SBG)是啤酒酿造过程中的主要废弃物。据测定,鲜啤酒糟含水为69%,粗蛋白为6.2%,粗脂肪为11%,粗纤维为3.4%,无氮浸出物为10.4%<sup>[10]</sup>。啤酒糟中固形物含量一般为15%~20%,水分含量高,极易腐败变质,处理和综合利用存在很大问题。以米曲霉(*Aspergillus oryzae*)NRRL 6270为试验菌种,啤酒糟为固体培养基,通过Box-Behnken试验设计法及响应面分析法(Response surface methodology,简称RSM),对固态发酵法(SSF)生产 $\alpha$ -淀粉酶的工艺条件进行优化,为 $\alpha$ -淀粉酶生产和啤酒糟的综合利用开辟新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及供试菌种

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)NRRL 6270;蚌埠学院实验室保藏。

啤酒糟:蚌埠学院啤酒工艺实验室提供。

### 1.2 试验仪器及设备

GHP-9050型隔水式恒温培养箱(上海之信仪器有限公司)、3K30型高速冷冻离心机(德国Sigma公司)、SZK-103型超净工作台(上海硕光电子科技有限公司)、LS-B50L型立式压力蒸汽灭菌器(上海华线医用核子仪器有限公司)等。

### 1.3 培养基及种子液的制备

斜面培养基:综合马铃薯培养基。

种子液的制备:将上述培养基培养7d的新鲜菌株接入到10 mL含0.1% Tween-80的灭菌蒸馏水,通过稀释得到不同浓度的孢子悬液,孢子悬液的浓度采用平板菌落计数法进行计算。

### 1.4 固体发酵和粗酶液提取

固体发酵培养:5 g啤酒糟置于250 mL三角瓶中,用基本营养盐溶液(1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.2 g NaCl,0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )调节培养基到不同的初始含水率,pH值自然,在121℃灭菌20 min。冷却后接入1 mL种子液,30℃静置培养96 h。

粗酶液的提取:在发酵结束后的新鲜培养基中加入10倍含0.1% Tween-80的蒸馏水,于室温下以150 r/min转速振摇1 h,然后在3 506g条件下离心10 min,取上清液作为粗酶液。

### 1.5 $\alpha$ -淀粉酶活性的测定

采用DNS法测定 $\alpha$ -淀粉酶的活性:取0.25 mL粗酶液,分别加入1%的可溶性淀粉溶液1.25 mL,0.1 mol/L、pH值5.0的醋酸钠缓冲液0.25 mL和蒸馏水0.25 mL,在50℃下反应10 min,用DNS法测定释放的还原糖量。酶活力单位定义:在以上条件下,1 min内产生1  $\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需的酶量为1个酶活单位(U)。

### 1.6 试验设计

在单因素试验的基础上,筛选出影响米曲霉NRRL 6270固态发酵产生 $\alpha$ -淀粉酶的关键培养条件,采用Box-Behnken设计法,对其进行进一步研究,以获得该菌种产 $\alpha$ -淀粉酶的最佳培养条件。

从单因素试验结果可知,发酵温度、培养基初始含水率和接种量是影响米曲霉NRRL 6270固态发酵产生 $\alpha$ -淀粉酶的关键培养条件,因此选择上述3个因子为研究对象,自变量按 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i$ 进行编码变换,式中 $x_i$ 为自变量 $X_i$ 的编码值, $X_0$ 为自变量 $X_i$ 在中心点的值, $\Delta X_i$ 为自变量变化步长。以 $\alpha$ -淀粉酶活性为响应值,设计Box-Behnken试验,用标准多项式回归方法,对试验数据进行拟合,得到二次多项式

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

式中  $Y$ ——预测响应值  $\beta_0$ ——截距  
 $\beta_i$ ——线性系数  $\beta_{ii}$ ——平方系数  
 $\beta_{ij}$ ——交互作用系数

试验辅助软件为Design Expert(Version 7.0.2, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA)。实际考察的变量及其试验水平编码见表1。

表1 Box-Behnken设计试验因素水平及编码

Tab.1 Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

因素	代码		编码水平		
	未编码	已编码	-1	0	1
温度/℃	$X_1$	$x_1$	25	30	35
初始含水率/%	$X_2$	$x_2$	68	70	72
接种量	$X_3$	$x_3$	5.5	6.5	7.5

注: $x_1 = (X_1 - 30) / 5$ ;  $x_2 = (X_2 - 70) / 2$ ;  $x_3 = (X_3 - 6.5) / 1$ ;  $X_3 = \lg n$ ,  $n$ 为每克培养基所接种的孢子数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 米曲霉产 $\alpha$ -淀粉酶多元二次模型方程

按照Box-Behnken试验设计的统计学要求,需要进行17组试验,其中 $\alpha$ -淀粉酶活性(U/g)为响应变量 $Y$ 。试验设计和结果如表2所示。

表2 Box-Behnken 设计表及试验结果

Tab.2 Box-Behnken design matrix along with the experimental and predicted values of  $\alpha$ -amylase activity

试验序号	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$\alpha$ -淀粉酶活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	
				试验值	预测值
1	-1	-1	0	5 116	5 177
2	1	-1	0	3 816	3 745
3	-1	1	0	4 429	4 499
4	1	1	0	6 507	6 445
5	-1	0	-1	4 634	4 240
6	1	0	-1	4 625	4 364
7	-1	0	1	5 067	5 328
8	1	0	1	5 324	5 717
9	0	-1	-1	2 745	3 055
10	0	1	-1	4 168	4 515
11	0	-1	1	5 024	4 683
12	0	1	1	5 641	5 336
13	0	0	0	6 356	6 342
14	0	0	0	6 273	6 342
15	0	0	0	6 415	6 342
16	0	0	0	6 345	6 342
17	0	0	0	6 324	6 342

利用 Design Expert 软件对表 2 试验数据进行二次多项回归拟合,获得  $\alpha$ -淀粉酶活性对发酵温度、培养基初始含水率和接种量的二次多项式回归方程

$$Y = 6\,342.60 + 128.25x_1 + 505.50x_2 + 610.50x_3 + 844.50x_1x_2 + 66.50x_1x_3 - 201.50x_2x_3 - 428.80x_1^2 - 946.80x_2^2 - 1\,001.30x_3^2$$

由以上方程得出  $\alpha$ -淀粉酶活性预测值见表 2。该二次回归方程方差分析结果见表 3,回归系数显著性检验见表 4。

表3 回归方程方差分析表

Tab.3 ANOVA for the fitted quadratic polynomial model for optimization of  $\alpha$ -amylase activity

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	17 850 000	9	1 983 000	15.36	0.000 8
失拟项	893 300	3	297 800	112.19	0.000 3
误差项	10 617.20	4	2 654.30		
总和	18 760 000	16			

$R^2 = 0.951\,8$   $R_{\text{Adj}}^2 = 0.889\,8$

由表 3 可知,该模型较显著( $P = 0.000\,8$ ),模型的校正确定系数  $R_{\text{Adj}}^2 = 0.889\,8$ ,表明模型能解释  $\alpha$ -淀粉酶活性响应值的变化。因而该模型与实际情况拟合较好,可用于预测米曲霉 NRRL 6270 固态发酵产生  $\alpha$ -淀粉酶的实际情况。

由表 4 回归系数显著性检验表明, $x_2$  和  $x_3$  对  $\alpha$ -淀粉酶活性的线性效应以及对  $\alpha$ -淀粉酶活性的曲面效应皆显著; $x_1x_2$  的交互作用显著; $x_1x_3$ 、 $x_2x_3$  的交互影响不显著。

表4 回归系数显著性检验

Tab.4 Results of regression analysis of a full second-order polynomial model for optimization of  $\alpha$ -amylase activity

变异来源	系数估计	标准误差	F 值	P 值
常数项	6 342.60	160.71		
$x_1$	128.25	127.05	1.02	0.346 4
$x_2$	505.50	127.05	15.83	0.005 3
$x_3$	610.50	127.05	23.09	0.002 0
$x_1x_2$	844.50	179.68	22.09	0.002 2
$x_1x_3$	66.50	179.68	0.14	0.722 2
$x_2x_3$	-201.50	179.68	1.26	0.299 1
$x_1^2$	-428.80	175.13	6.00	0.044 2
$x_2^2$	-946.80	175.13	29.23	0.001 0
$x_3^2$	-1 001.30	175.13	32.69	0.000 7

## 2.2 $\alpha$ -淀粉酶活性响应面分析及最优水平确定

通过回归方程所作的响应曲面图及其等高线图如图 1~3 所示。

图 1 为接种量位于中心水平时,发酵温度与培养基初始含水率对  $\alpha$ -淀粉酶活性交互作用的响应面图及等高线图。由图 1 可知,在本试验水平范围内,随着发酵温度的增加, $\alpha$ -淀粉酶活性随之增大,发酵温度基本在  $29.15 \sim 35^\circ\text{C}$  范围内, $\alpha$ -淀粉酶活性不低于  $6\,342.60\text{ U/g}$ ,当温度达到  $32.96^\circ\text{C}$  时,达到本次试验中的最大值,即  $6\,581.63\text{ U/g}$ 。培养基初始含水率也是影响米曲霉 NRRL 6270 固态发酵产生  $\alpha$ -淀粉酶的关键因子,但从图可见,初始含水率低时却不利于  $\alpha$ -淀粉酶的产生,只有在含水率位于  $70\% \sim 72\%$  范围时,产生的  $\alpha$ -淀粉酶活性不低于  $6\,342.60\text{ U/g}$ 。从等高线的形状也可以看出,发酵温度和培养基初始含水率对  $\alpha$ -淀粉酶活性交互作用较显著,因为在固态发酵过程中,温度是一个重要的因素,它可以影响固体培养基的湿度和水分活度。由以上分析可知,在中温范围以外, $\alpha$ -淀粉酶活性降低,表明了米曲霉 NRRL 6270 属于嗜温性细菌。通常在固体发酵过程中,由于呼吸作用导致固体培养基的温度升高,从而影响了微生物的生长和繁殖,特别是在大规模工业生产中,但是在小规模发酵过程中,这种情况并不是很严重<sup>[6,11]</sup>。

图 2 为发酵温度与接种量对  $\alpha$ -淀粉酶活性交互作用的响应面图及等高线图。由图 2 可知,当接种量小于  $7.14$  时,随着发酵温度的增加, $\alpha$ -淀粉酶活性增加,但当温度增大至  $33.38^\circ\text{C}$  时,继续增加温

度,可能会使产生的  $\alpha$ -淀粉酶活性下降,即不利于米曲霉 NRRL 6270 的生长;同样,当发酵温度低于 33.38℃ 时,增加接种量也会使  $\alpha$ -淀粉酶活性增加,但继续增大至 7.14,也会导致  $\alpha$ -淀粉酶活性下降。

图 3 为接种量与培养基初始含水率对  $\alpha$ -淀粉酶活性交互作用的响应面图及等高线图。由图 3 可

以看出,当发酵温度为 30℃,培养基初始含水率为 68%~71.26% 时,随着接种量的增加, $\alpha$ -淀粉酶活性增大,说明增大接种量有利于米曲霉的生长繁殖,并有利于  $\alpha$ -淀粉酶的产生,当接种量在 6.42~7.14 范围内时,产生的  $\alpha$ -淀粉酶活性不低于 6 342.60 U/g。

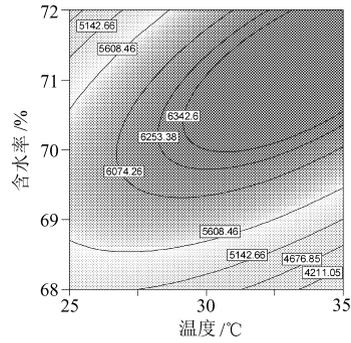
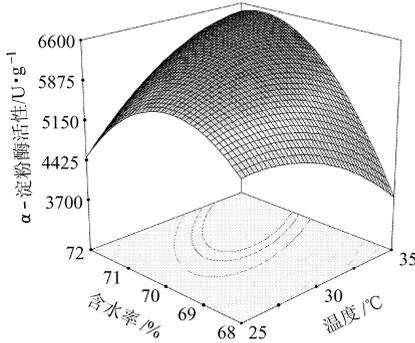


图 1 温度和含水率交互影响  $\alpha$ -淀粉酶活性的曲面图及其等高线图

Fig.1 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of  $\alpha$ -amylase activity vs. fermentation temperature and initial substrate moisture

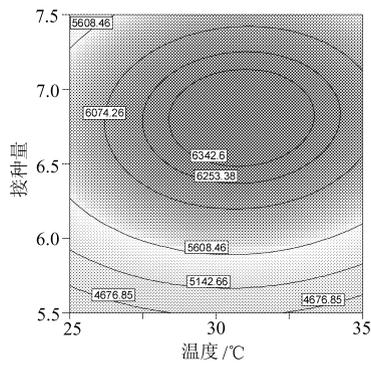
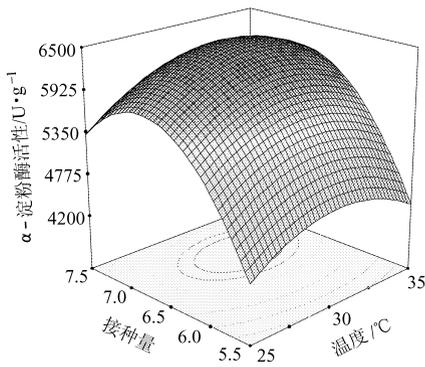


图 2 温度和接种量交互影响  $\alpha$ -淀粉酶活性的曲面图及其等高线图

Fig.2 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of  $\alpha$ -amylase activity vs. fermentation temperature and inoculum size

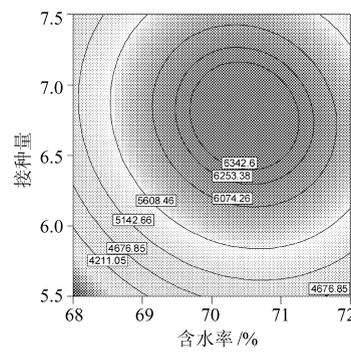
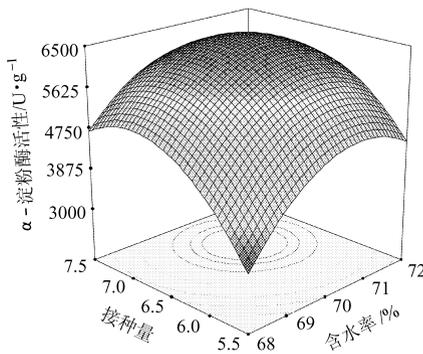


图 3 含水率和接种量交互影响  $\alpha$ -淀粉酶活性的曲面图及其等高线图

Fig.3 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of  $\alpha$ -amylase activity vs. initial substrate moisture and inoculum size

通过对  $\alpha$ -淀粉酶活性模型进行求导和解逆矩阵,可以得到模型的极值点:发酵温度 32.96℃,培养基初始含水率 71.04%,接种量 7.0,此时模型预测的最大响应值为 6581.63 U/g。为了证实预测结

果,在上述优化条件下进行重复试验,得出  $\alpha$ -淀粉酶活性为 6 445 U/g,与模型的预测值较为接近,可见该模型能较好地预测米曲霉 NRRL 6270 以啤酒糟为唯一碳源固态发酵产生  $\alpha$ -淀粉酶的情况。

### 3 结束语

对影响米曲霉 NRRL 6270 以啤酒糟为唯一碳源通过固态发酵产生  $\alpha$ -淀粉酶的 3 个关键培养条件:发酵温度、培养基初始含水率和接种量的最佳水平及其交互作用进行了研究。利用统计学方法建立了发酵产  $\alpha$ -淀粉酶的二次多项数学模型,通过对模型方程的响应曲面图及其等高线图进行研究发现,

当培养基为 5 g 啤酒糟,用基本营养盐溶液调节固体培养基初始含水率为 71.04%,每克培养基接种孢子数为  $1.0 \times 10^7$ ,在 32.96℃ 发酵 96 h 后产生的  $\alpha$ -淀粉酶活性约为 6 581.63 U/g。利用最优条件进行试验验证,结果显示回归模型的预测值与试验的实测值较为接近,进一步证明回归模型具有很好的拟合度。

### 参 考 文 献

- 1 刘春莉,张文学,杨瑞. 特殊  $\alpha$ -淀粉酶的应用研究现状和前景展望[J]. 四川食品与发酵, 2002(4): 5~9.
- 2 谷军.  $\alpha$ -淀粉酶的生产与应用[J]. 生物技术, 1994, 4(3): 1~5.
- 3 沈同,王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 1998: 232~233.
- 4 Moller K, Sharif M Z, Olsson L. Production of fungal  $\alpha$ -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 111(3): 311~318.
- 5 Francis F, Sabu A, Nampoothiri K M, et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 15(2): 107~115.
- 6 Pandey A. Recent developments in solid-state fermentation[J]. Process Biochemistry, 1992, 27(2): 109~116.
- 7 Mulimani V H, Patil G N, Ramalingam.  $\alpha$ -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses[J]. Biochemical Education, 2000, 28(3): 161~163.
- 8 Couto S R, Sanromán M A. Application of solid-state fermentation to food industry[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 76(3): 291~302.
- 9 Rahardjo Y S P, Weber F J, Haemers S, et al. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate  $\alpha$ -amylase production in a model solid-state fermentation system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(7): 900~902.
- 10 Mussatto S I, Dragone G, Roberto I C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 43(1): 1~14.
- 11 Pandey A, Radhakrishnan S. Packed bed column bioreactor for production of enzymes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1992, 14(6): 486~488.

(上接第 52 页)

机在实际的作业过程中可把此关系趋势作为指导依据,综合结穗高度、生产率要求等来设定各影响因素的水平值。

### 3 结论

(1) 本机分禾器对不同行距的玉米收获有较好

的适应性。

(2) 影响指标的因素主次顺序为:分禾器尖离地高度  $H$ 、分禾器平面与地面的夹角  $\beta$ 、整机行驶速度,最优方案为  $A_1B_2C_3$ 。实际作业中应参照因素与指标关系设定水平值。

### 参 考 文 献

- 1 中国农业机械化科学研究院. 不分行玉米联合收割机. 中国, 200520023278. 7[P]. 2006-11-26.
- 2 杜翠红. 穗茎兼收型玉米联合收获机立式割台的理论分析与试验研究[D]. 淄博:山东理工大学, 2006.
- 3 北京农业工程大学. 农业机械学[M]. 北京:农业出版社, 1991.
- 4 庄楚强,吴亚森. 应用数理统计基础[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2005.
- 5 叶慈南,曹伟丽. 应用数理统计[M]. 北京:机械工业出版社, 2004.