

泸型大曲中根霉固态发酵产糖化酶条件研究

黄丹, 尚志超, 袁先铃, 李玉龙

(四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要:对泸型大曲中根霉菌株固态发酵产糖化酶的条件进行了研究。以糖化酶活力为评价指标, 设计单因素实验, 研究培养基水分含量、培养时间、培养温度对根霉产糖化酶的影响, 在此基础上, 利用 Box - Benhnken Design 的方法, 对根霉菌株固态发酵产糖化酶的条件进行优化, 结果显示泸型大曲中根霉菌株固态发酵产糖化酶的优化条件为培养温度 29 ℃, 培养基水分含量 53%, 培养时间 164 h, 糖化酶的酶活力为 2 194.44 U/g。

关键词:根霉; 糖化酶; 固态发酵; 产酶条件多相流

中图分类号:Q814

文献标识码:A

葡萄糖淀粉酶(Glucoamylase, EC. 3. 2. 1. 3) 又可称为 γ -淀粉酶(γ -amylase) 或淀粉葡萄糖苷酶(Amylo-glucosidase), 因在发酵工业中大量用作淀粉糖化剂, 通常又被简称为糖化酶。糖化酶底物专一性较低, 不但可以从淀粉的非还原末端依次水解 α -1,4 糖苷键, 切下一个个葡萄糖分子, 而且可以水解支链淀粉中的 α -1,6 糖苷键, 甚至对 α -1,3 糖苷键连接的碳链也有微弱的水解作用。糖化酶能将淀粉百分之百的水解为葡萄糖, 并像 β -淀粉酶一样, 使水解下来的葡萄糖发生构型变化, 形成 β -D-葡萄糖, 因此被广泛地应用于酒精、白酒、抗生素、氨基酸、有机酸、甘油、淀粉糖等工业中, 是我国产量最大的酶制剂产品^[1]。

在白酒酿造过程中, 淀粉质原料正是通过糖化酶的作用水解为葡萄糖后被酵母菌利用产生酒精, 而根霉是浓香型大曲中糖化酶的主要产生菌^[2], 因此大曲中根霉糖化酶活力的高低直接决定了大曲糖化力的高低, 对白酒生产中出酒率有重要的影响。所以, 研究固态发酵条件下根霉糖化酶的产酶条件, 能够对大曲的生产提供理论指导和数据支持, 为解决大曲生产中所遇到的用曲量大、糖化力不高等实际问题提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验采用的根霉菌株为 Rh-4, 分离自泸型大曲。

1.1.2 培养基

斜面培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 ~ 20 g, 水 1 000 mL, pH 自然, 121 ℃ 灭菌 20 min。

固体发酵培养基: 破碎小麦处理后的小麦 30 g, 蒸馏水 36.6 mL, 115 ℃ 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 孢子悬液制备

将孢子接种于斜面培养基中培养 3 d, 用接种环将孢子移到无菌生理盐水中, 摇匀用脱脂棉滤去菌丝, 计数, 然后将孢子悬液稀释至孢子数为 10^8 个/mL。

1.2.2 糖化酶粗酶液制备

将长满菌丝的培养基从锥形瓶中取出, 捣碎后搅拌均匀, 测定鲜曲的含水量。取相当于 5 g 绝干曲的鲜曲置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL pH4.6 乙酸-乙酸钠缓冲液, 补加蒸馏水至 100 g, 摇匀, 然后在 40 ℃ 下水浴抽提 2 h, 每 15 min 震荡一次。滤纸过滤, 将最初 5

收稿日期: 2012-04-30

基金项目: 川菜发展研究中心项目(CC10Z01); 泸州老窖科研基金项目(09ljzk02); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2009-02); 四川理工学院研究生创新基金项目(024)

作者简介: 黄丹(1968-), 女, 四川自贡人, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究, (E-mail) huangdan3212006@126.com

mL 酶液弃去,所得液体即为粗酶液。

1.2.3 糖化酶活力的测定

糖化酶活力的测定采用 DNS 法,参照陈毓荃^[3]的方法作适当改进。

取 A、B 两支试管加入 2 mL pH4.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液和 1 mL 酶液,将试管和 2% 的标准淀粉溶液在 40 °C 下保温 5 min,然后向 B 试管中加入 5 mL 淀粉溶液,摇匀,在 40 °C 下保温反应 30 min,向 A 管加 5 mL 2% 的可溶性淀粉溶液后即将 A、B 两支试管放在沸水中,水浴加热 10 min 终止反应。取反应液 0.5 mL 加到 25 mL 比色管中,加入 1.5 mL 的蒸馏水和 1.5 mL DNS 试剂,摇匀后在沸水浴中水浴加热 6 min,立即用水冷却,用蒸馏水定容至 25 mL,摇匀后在 540 nm 波长测定其吸光度。

酶活力单位定义为:1 g 绝干曲,在 40 °C、pH4.6 条件下,每小时分解可溶性淀粉生成 1 mg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.4 根霉糖化酶菌株产酶条件的单因素实验研究

1.2.4.1 培养基水分含量的研究

分别向含水量为 30%、40%、50%、55%、60%、70% 及 80% 的小麦培养基中接种 0.2 mL 10^8 个/mL 的孢子悬液,在 30 ± 0.2 °C 的条件下,培养 4 d。测定糖化酶的酶活力,研究酶活力与初始水分的关系。

1.2.4.2 培养时间的研究

向灭菌后的固体发酵培养基中接种 0.2 mL 10^8 个/mL 的孢子悬液,在 30 ± 0.2 °C 条件下分别培养 2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、10 d、11 d,然后测定糖化酶酶活力,观察酶活力随培养时间的变化。

1.2.4.3 培养温度的确定

向固体发酵培养基中接种 0.2 mL 10^8 个/mL 的孢子悬液,分别在 24 °C、28 °C、30 °C、32 °C、36 °C 及 44 °C 条件下培养 120 h。测定糖化酶酶活力,比较酶活力与培养温度的关系。

1.2.5 根霉糖化酶菌株产酶条件的优化

Box - Benhnken 设计(BBD)具有实验次数少、时间短,求得的方程精确度高,可以确定各个因素间是否有交互作用等优点,是降低生产成本、优化发酵条件^[4-6]、增加产品产量的一种科学实验方法,广泛应用于生物、化学、食品、检测、制造等领域^[7]。根据对水分、温度及时间进行的单因素实验结果,设计 Box - Benhnken Design 实验水平,设计结果见表 1。

表 1 Box - Benhnken Design 实验的因素及水平

水平	A - 温度(°C)	B - 水分(%)	C - 时间(h)
1	26	50	72
2	30	55	144
3	34	60	216

2 结果与讨论

2.1 根霉糖化酶菌株产酶条件的单因素实验研究

2.1.1 培养基水分含量的影响

水分对微生物的生长十分重要,是决定固态发酵是否成功的关键因素。含水量过低会影响微生物吸收基质中的营养物质,从而影响发酵的正常进行;含水量过高会影响氧气的流通及发酵热的释放。由图 1 可以看出,培养基水分含量对根霉产糖化酶的影响十分明显。含水量在 30% 到 55% 之间时,糖化酶酶活力随着水分的增加而缓慢提高,在含水量达到 55% 时酶活力上升到最大值 1 322.60 U/g,当培养基水分超过 55% 时,酶活力迅速下降。

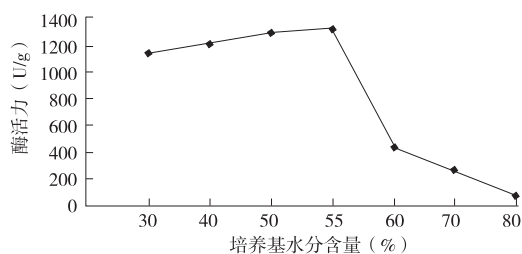


图 1 培养基水分含量对糖化酶酶活力的影响

2.1.2 培养时间的影响

从图 2 可以看出根霉产糖化酶的情况,与其生长曲线极其类似,我们可以大胆猜测,根霉产糖化酶的数量与根霉生物量的增加呈正相关。当发酵进行到 144 h 时进入稳定阶段,这一时期糖化酶的酶活力稳定在 1 998.17 U/g 左右。

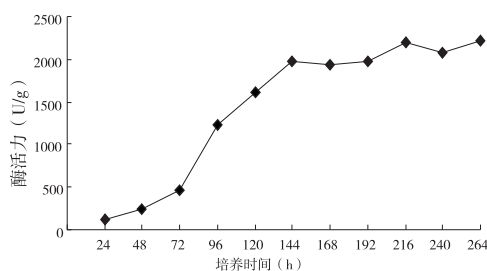


图 2 培养时间对糖化酶酶活力的影响

2.1.3 培养温度的影响

从图 3 可以看出,根霉在 24 °C ~ 40 °C 之间生长时,其最适产糖化酶的温度为 30 °C,此时糖化酶的酶活力

为 1 212. 2 U/g, 当温度升到 32 °C 以上时产酶量迅速下降, 在 37 °C 时趋于稳定。

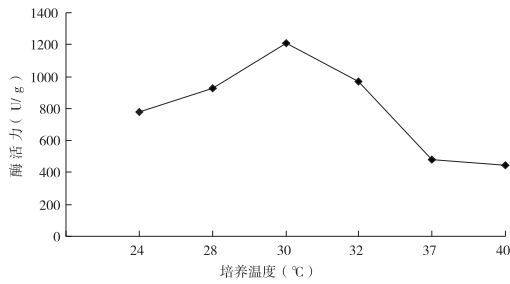


图 3 温度对糖化酶酶活力的影响

2. 2 根霉糖化酶菌株产酶条件的优化

表 2 Box – Benhnken Design 实验结果

序号	A – 温度 (°C)	B – 水分 (%)	C – 时间 (h)	糖化酶酶活力 (U/g)
1	34	55	72	211. 25
2	30	50	72	460. 12
3	30	55	144	2083. 79
4	34	55	216	196. 78
5	34	50	144	434. 79
6	30	55	144	1914. 11
7	30	55	144	1609. 68
8	30	55	144	1728. 12
9	26	60	144	1430. 39
10	26	55	72	247. 66
11	30	60	72	219. 82
12	34	60	144	148. 68
13	30	55	144	1830. 12
14	30	60	216	376. 42
15	30	50	216	2040. 13
16	26	50	144	1661. 18
17	26	55	216	1979. 93

以糖化酶酶活力为响应值, 根据表 2 的实验结果, 用 design experts 软件进行数据处理。经回归拟合后, 得到实验因子编码值对响应值的回归方程: 糖化酶酶力 $Y = 1833. 16 - 540. 96A - 302. 61B + 431. 80C - 13. 83AB - 436. 69AC - 355. 85BC - 514. 81A^2 - 399. 59B^2 - 659. 45C^2$ 将上述方程转化为以 X_1 表示温度、 X_2 表示初始水分、 X_3 表示培养时间的实验值与酶活力 Y 的回归方程: $Y = - 87111. 2959 + 2051. 6836X_1 + 1860. 7734X_2 + 142. 4875X_3 - 0. 6916X_1X_2 - 1. 5163X_1X_3 - 0. 9885X_2X_3 - 32. 1757X_1^2 - 15. 9837X_2^2 - 0. 1272X_3^2$ 。

由表 3 可知, 所选模型的不同处理间差异显著, 由此可见用回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其应变量与全体自变量之间线性关系显著, 即该试验方法可靠。A、B、C、AC、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均小于 0. 05,

表 3 Box – Benhnken Design 实验回归模型方差分析表

来源	均方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型		9	1095164. 89	17. 8213	0. 0005	显著
A	2341072. 56	1	2341072. 56	38. 0956	0. 0005	显著
B	732604. 89	1	732604. 89	11. 9215	0. 0107	显著
C	1491615. 10	1	1491615. 10	24. 2726	0. 0017	显著
AB	765. 21	1	765. 21	0. 0125	0. 9143	不显著
AC	762775. 16	1	762775. 16	12. 4124	0. 0097	显著
BC	506524. 00	1	506524. 00	8. 2425	0. 0240	显著
A^2	1115920. 91	1	1115920. 91	18. 1590	0. 0037	显著
B^2	672313. 37	1	672313. 37	10. 9403	0. 0130	显著
C^2	1831030. 67	1	1831030. 67	29. 7958	0. 0009	显著
残差	430168. 48	7	61452. 64			
失拟项	299813. 56	3	99937. 85	3. 0666	0. 1537	不显著
纯误差	130354. 91	4	32588. 73			
总和	10286652. 45	16				
R^2_{Adj}	0. 9044					
R^2_{Pred}	0. 5139					
R^2	0. 9582					
CV %	22. 6902					

说明这些因素对模型显著。失拟项的 P 值为 0. 153 7 > 0. 05, 失拟项差异不显著, 说明该方程拟合度情况非常好, 试验误差小。预测 R^2 值为 0. 958 2 也能合理地说明校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0. 904 4$ 值得变化。根据上述回归方程及回归模型方差分析表绘出双因子效应方差分析如图 4、图 5、图 6 所示。由图 4、图 5、图 6 这三幅立体分析图可知两因素之间的影响基本呈抛物线型关系, 且均有一个极大值点, 变化趋势都是先增大后减小。等高线呈圆形说明两因素交互作用不显著, 呈椭圆或马鞍形则表明交互作用显著。

回归方程得到的 Box – Benhnken Design 实验的最优结果为培养温度 29. 2 °C, 培养基水分含量 53. 1%, 培养时间 164 h, 此时酶活力为 2 106. 66 U/g。由于微生物代谢过程中会产生水分和热量, 因此在生产中对培养温度和培养基水分含量进行精确控制没有意义。实际操作中采用的培养温度为 29 °C, 培养基水分含量 53%, 培养时间为 164 h, 实验测得此条件下该根霉所产糖化酶的酶活力为 2 194. 44 U/g 与模型预测值相比误差为 4%, 说明方程具有很好的预测效果。

3 结束语

通过单因素试验知根霉产糖化酶固态培养基的最佳含水量为 55%, 最适培养时间为 144 h, 最优培养温度为 30 °C。利用 Box – Benhnken Design 方法研究上述三

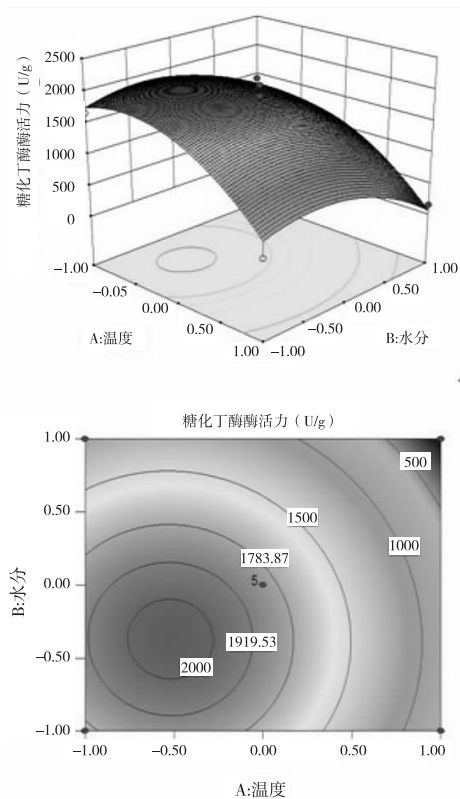


图4 温度与水分响应面立体分析图及等高线图

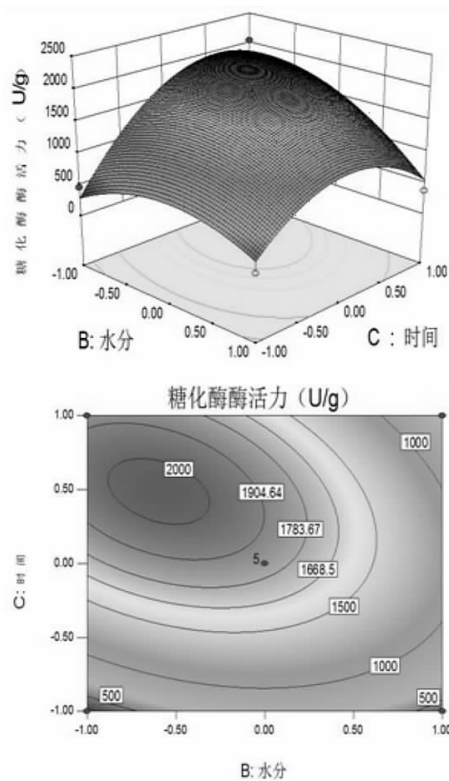


图6 水分与时间响应面立体分析图及等高线图

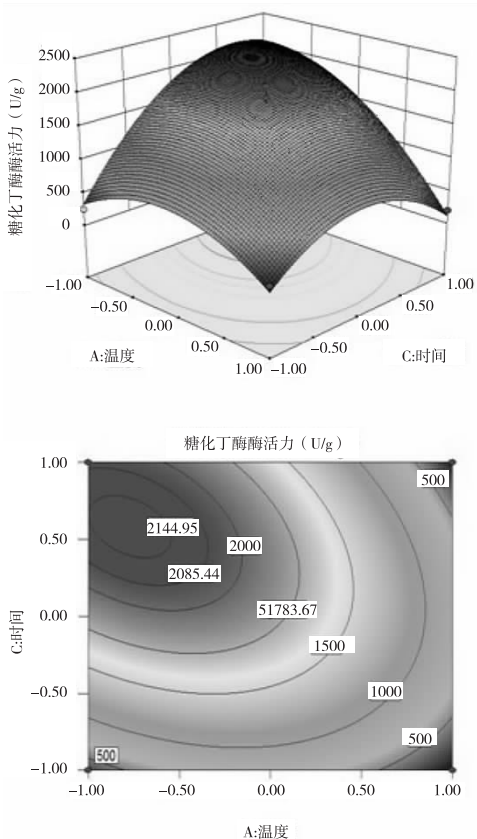


图5 温度与时间响应面立体分析图及等高线图

个因素对根霉产糖化酶的影响,得到根霉糖化酶酶活力(Y)与温度(X_1)、水分(X_2)和时间(X_3)的回归方程:

$$Y = -87111.2959 + 2051.6836X_1 + 1860.7734X_2 + 142.4875X_3 - 0.6916X_1X_2 - 1.5163X_1X_3 - 0.9885X_2X_3 - 32.1757X_1^2 - 15.9837X_2^2 - 0.1272X_3^2$$

回归方程得到的 Box - Benhnken Design 实验的最优结果为温度 29.2 °C,初始水分 53.1%,培养时间 164 h,此时酶活力为 2 106.66 U/g。实际操作中采用的培养温度为 29 °C,培养基水分含量 53%,培养时间为 164 h,实验测得此条件下该根霉所产糖化酶的酶活力为 2 194.44 U/g与模型预测值相比误差为 4%,说明方程具有很好的预测效果。

参考文献:

[1] 武金霞,王沛,李晓明.糖化酶的研究进展及趋势[J].自然杂志,2003,25(3):161-163.
 [2] 田国政.酒曲根霉糖化性质的研究[J].湖北民族学院学报:自然科学版,2003,21(2):19-21.
 [3] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002.
 [4] 潘明,周永进,张强.产生淀粉糖化酶菌株的分离以及酶性质的初步研究[J].四川理工学院学报:自然

- 科学版,2006,19(6):66-68.
- [5] 汪彬彬,车振明.Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 实验设计法优化华根霉产糖化酶发酵培养基的研究[J].食品科技,2011(5):41-45.
- [6] 韩玲玲,潘道东.根霉产凝乳酶的固态发酵条件优化[J].食品科学,2010(9):156-160.
- [7] Tompson D R. Response surface experimentation[J]. Food Process,1982:155.

Study on the Conditions of Glucoamylase Production of the *Rhizopus Oryzae* in Luzhou-flavor Daqu by Solid State Fermentation

HUANG Dan, SHANG Zhi-chao, YUAN Xian-ling, LI Yu-long

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: The conditions of glucoamylase production of the *Rhizopus oryzae* in Luzhou – flavor Daqu by solid state fermentation are studied. By single factor experiment and saccharifying enzymic activity as an assessing index, the influence on saccharifying enzymic activity of the water content in culture medium, the culture time, the culture temperature are studied. According to the Box-Behnken design, the conditions of glucoamylase production of the *Rhizopus oryzae* are optimized by solid state fermentation. The results show that the optimum conditions of glucoamylase production of the *Rhizopus oryzae* in Luzhou-flavor Daqu by solid state fermentation are the culture temperature 29°C, the water content in culture medium 53%, culture time 164h, glucoamylase activity was 2 194.44U/g.

Key words: *Rhizopus oryzae*; glucoamylase; solid state fermentation; conditions of glucoamylase production