

黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的研究*

胡 伟 谭显东[#] 王君君 羊依金 罗明江 张 伟

(成都信息工程学院资源环境学院,四川 成都 610225)

摘要 以三七渣为基质,采用黑曲霉固态发酵产淀粉酶,考察了硫酸铵(氮源)添加量、三七渣粒径、固体培养基含水率、发酵温度、发酵时间、菌悬液接种量等因素对产淀粉酶效果的影响,并采用正交实验对发酵条件进行了优化。单因子实验结果表明,黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶适宜的硫酸铵添加量为40~60 mg/g(以干药渣计),最佳三七渣粒径为100目,最适固体培养基含水率为55%,最佳发酵温度为34℃,最适发酵时间为7d,最佳菌悬液接种量为10%(质量分数)。正交实验多重比较的结果表明,优化的发酵条件为:硫酸铵添加量50 mg/g,发酵温度34℃,发酵时间5d,在此发酵条件下,黑曲霉固态发酵三七渣产生的淀粉酶的酶活可达84.15 U/g(以湿物料计)。

关键词 黑曲霉 固态发酵 三七渣 淀粉酶

Study on amylase production from solid-state fermentation of notoginseng residues by *Aspergillus niger* HU Wei, TAN Xiandong, WANG Junjun, YANG Yijin, LUO Mingjiang, ZHANG Wei. (College of Resources and Environment, Chengdu University of Information Technology, Chengdu Sichuan 610225)

Abstract: The solid-state fermentation of notoginseng residues by *Aspergillus niger* was performed to investigate the effect of fermentation condition such as ammonia sulfate dosage, particle size of notoginseng residues, water content of solid medium, incubation time and temperature and inoculation size of bacteria suspension on amylase production. The single factor experiments showed that feasible fermentation conditions for amylase production were ammonia sulfate dosage of 40-60 mg/g (counted dry drug residue), raw material sieved to 100 mesh, initial water content of solid medium 55%, fermentation temperature 34℃, fermentation time 7 d and inoculation size 10%. The fermentation conditions were optimized by orthogonal test. They were ammonia sulfate 50 mg/g and fermentation at 34℃ for 5 d, under these conditions, the enzyme activity of amylase produced by drug residue fermentation could reached to 84.15 U/g (counted by wet material).

Keywords: *Aspergillus niger*; solid-state fermentation; notoginseng residues; amylase

淀粉酶广泛存在于微生物和动植物中,它能够将淀粉和糖原分子水解为糊精和更小的分子。淀粉酶应用广泛,在液化、糖化、淀粉洗涤剂、医药、纺织品脱胶、造纸等行业中有着极重要的用途^[1-2]。从植物中提取淀粉酶的工艺非常复杂、成本也高。而微生物来源的淀粉酶具有提取工艺简单、成本低、产量高、性质稳定、使用条件温和等特点,因此在工业应用上具有很大优势,在淀粉水解工业中,利用微生物发酵产淀粉酶几乎取代了传统的化学水解法^[3]。用黑曲霉、米曲霉等微生物固态发酵产淀粉酶的报道较多^[4-7],但所用培养基多以粮食为主。

三七是名贵的中药材,目前医药工业中主要利用其成分中的皂苷,而提取皂苷后的三七渣中还含有大量营养物质^[8],其中包括粗蛋白、氨基酸、脂肪

酸、微量元素、维生素在内的多种营养元素及三七多糖、残余皂苷等生物活性组分。很多中成药厂一般将提取皂苷后的三七渣作为废物丢弃,而大量堆积的三七渣极易腐烂,产生恶臭,造成环境污染。

本研究以三七渣为基质,采用黑曲霉固态发酵产淀粉酶,考察了硫酸铵(氮源)添加量、三七渣粒径、固体培养基含水率、发酵温度、发酵时间、菌悬液接种量等因素对黑曲霉固态发酵产淀粉酶的影响,并采用正交实验对发酵条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

黑曲霉(*Aspergillus niger*),由山东农业大学生命科学院保藏与提供。

第一作者:胡 伟,男,1988年生,硕士研究生,研究方向为污染控制与资源化。[#] 通讯作者。

* 四川省科技支撑计划项目(No. 2008sz0129)。

1.1.2 三七渣

实验所用的三七渣取自四川成都某中成药厂,其组成为:粗蛋白 12.28%(质量分数,下同)、真蛋白 9.97%、还原糖 1.37%、粗淀粉 33.13%。三七渣经烘干、粉碎、过筛 60 目筛后,存放在干燥器中备用。

1.1.3 培养基

马铃薯培养基:土豆 200 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 15.0 g、蒸馏水 1 L,于 121 °C 下灭菌 30 min,制成平板培养基用于黑曲霉的活化。

除特别说明外,本实验所用固体培养基为 10.0 g 过 60 目筛的三七渣中加入硫酸铵(分析纯)0.2 g,调整培养基含水率为 60%。固体培养基于 121 °C 灭菌 30 min,用于黑曲霉的固态发酵实验。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

将黑曲霉接种到马铃薯培养基中,于 30 °C 下培养活化 3 d,用无菌水冲洗,制成为 2×10^7 个/mL 的菌悬液。

1.2.2 发酵培养

将一定量(除特别说明,为 10%,质量分数,下同)菌悬液接入到固体培养基中,置于 PYX-280M-C 霉菌培养箱中恒温(除特别说明,为 30 °C)发酵培养一定时间(除特别说明,为 5 d)。发酵培养结束后准确称取 1.00 g 发酵培养物(湿物料)测定淀粉酶活。以 40 °C 下,5 min 内降解 1 mg/mL 的淀粉溶液生成 1 μ mol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位^[9],记为 U/g,以湿物料计。

1.2.3 单因子实验

分别考察了硫酸铵添加量、三七渣粒径、固体培养基含水率、发酵温度、发酵时间、菌悬液接种量等因素对黑曲霉固态发酵产淀粉酶的影响。

1.2.4 正交实验

以淀粉酶活为指标,取硫酸铵添加量、发酵温度、发酵时间 3 个因素,进行 $L_9(3^3)$ 正交实验,以优化发酵条件。

2 结果与讨论

2.1 单因子实验

2.1.1 硫酸铵添加量对产酶的影响

氮是构成蛋白质、核酸等物质的主要元素,只有合适的 C/N 比,微生物才能很好地生长。三七渣中氮源不足,需添加适量氮源才能满足微生物的生长需求^[10]。以硫酸铵为氮源,在三七渣基质中按照 0 ~ 70 mg/g(以干药渣计,下同)的比例添加硫酸铵,

考察硫酸铵添加量对黑曲霉固态发酵产淀粉酶的影响,结果见图 1。

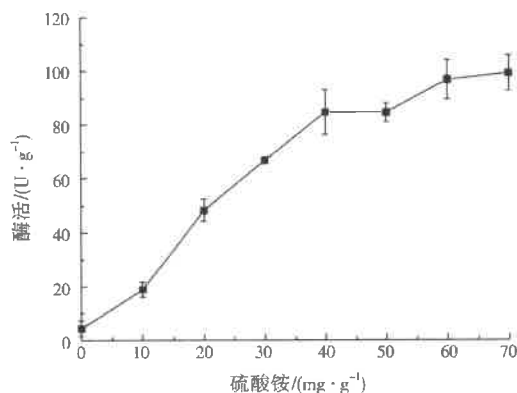


图 1 硫酸铵添加量对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响

Fig. 1 Effect of ammonia sulfate dosage on amylase production

由图 1 可看出,随着硫酸铵添加量的增多,产生的淀粉酶酶活迅速升高,当硫酸铵添加量超过 40 mg/g 后,酶活增长趋势变缓。考虑到成本因素,本研究适宜的硫酸铵添加量为 40~60 mg/g。

2.1.2 三七渣粒径对产酶的影响

分别用过 20~140 目筛的三七渣制成固体培养基,考察三七渣粒径对黑曲霉固态发酵产淀粉酶的影响,结果见图 2。

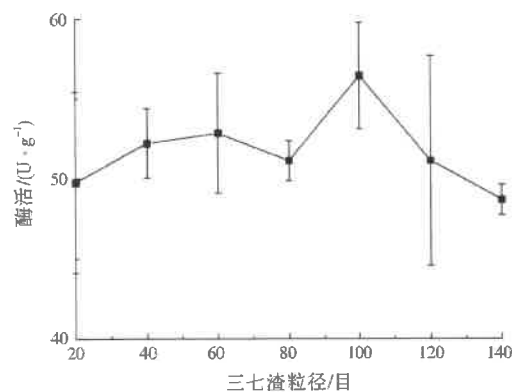


图 2 三七渣粒径对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响

Fig. 2 Effect of particle size of raw materials on production of amylase

由图 2 可看出,用过 100 目筛的三七渣制成固体培养基时,黑曲霉固态发酵产淀粉酶的效果最好。物料粒径太大时,不利于物料中的淀粉在高压灭菌时的糊化及营养物质的溶出,而物料粒径太小时,发酵时易结块,对传质与传热不利^[11]。

2.1.3 固体培养基含水率对产酶的影响

微生物对发酵体系的含水率有一定要求,含水率过低,则会影响物料颗粒的吸水膨胀,进而影响基

质中营养的溶解与传递,不能维持菌体的生长;而含水率过高,物料颗粒易结成块状物,降低通透性,从而阻碍气体的扩散以及热量的逸散^[12-13],也不利于菌体的生长。本次实验考察了固体培养基含水率对黑曲霉固态发酵产淀粉酶的影响,结果如图 3 所示。

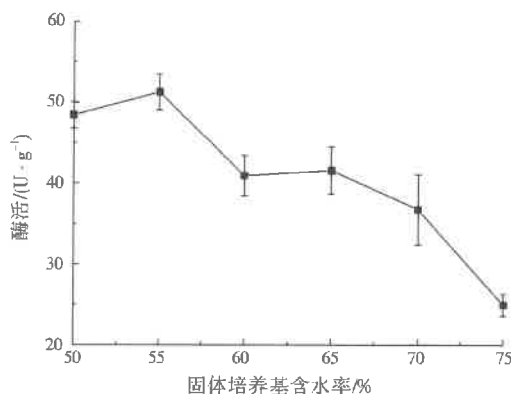


图 3 固体培养基含水率对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响

Fig. 3 Effect of water content of notoginseng residues on production of amylase

由图 3 可看出,在固体培养基含水率为 55% 时,产生的淀粉酶酶活就能达到最高,随着含水率的继续增加,酶活逐渐降低。许晖等^[14]的研究发现,固体培养基初始含水率在 70%~72% 时,有利于米曲霉固态发酵产淀粉酶。可见,就固态发酵产淀粉酶而言,黑曲霉对固体培养基初始含水率的要求不如米曲霉高,这也与刘永乐等^[15]的研究结论相符。

2.1.4 发酵温度对产酶的影响

温度对微生物的生长代谢意义重大,温度过高或过低都不利于微生物的生长,不同的产淀粉酶菌株的最佳发酵温度也不同。发酵温度对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响如图 4 所示。

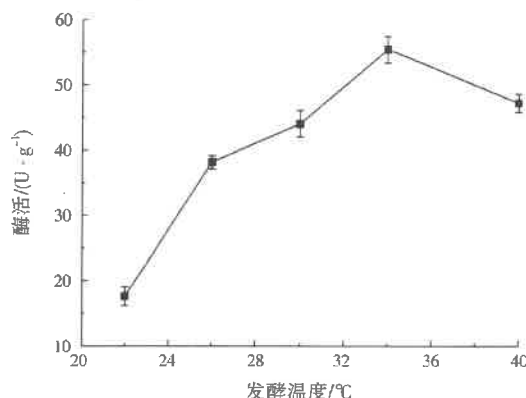


图 4 发酵温度对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响

Fig. 4 Effect of incubation temperature on production of amylase

由图 4 可知,随着发酵温度的升高,产生的淀粉

酶酶活逐渐升高,34℃ 时酶活达到最高值。当发酵温度大于 34℃ 时,产生的淀粉酶酶活逐渐下降,这可能是因为发酵温度升高,黑曲霉机体内的蛋白质、核酸等物质的结构遭到破坏,致使其生长代谢与机体功能下降,因此产酶受到影响。可见,本研究最佳的发酵温度为 34℃;

2.1.5 发酵时间对产酶的影响

从发酵第二天开始,每天称取发酵物料测其酶活,以考察发酵时间对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响,结果如图 5 所示。

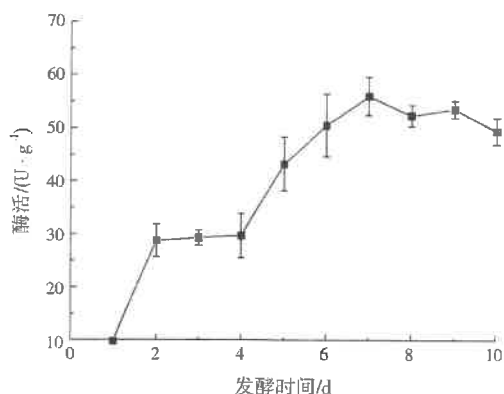


图 5 发酵时间对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响

Fig. 5 Effect of incubation time on production of amylase

从图 5 可以看出,发酵培养 1 d 时,产生的淀粉酶酶活很低,之后的 3 d,酶活有所升高,但变化不明显,这阶段可能黑曲霉菌体处于调整期,它对三七渣基质需要一个适应过程。发酵培养 4 d 以后,酶活逐渐升高,在培养 7 d 时酶活达到最高,之后又有所下降,可能是菌体生长进入了衰亡期,积累的代谢产物抑制了产酶。

2.1.6 菌悬液接种量对产酶的影响

在固体培养基中接入不同量(5%~25%)的菌悬液,考察不同菌悬液接种量对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,在菌悬液接种量为 10% 时,产生的淀粉酶酶活最高,接种量低于 10% 或高于 10% 都不利于产酶。接种量过低,菌丝体生长缓慢,会使发酵周期延长;接种量过高,菌体生长迅速,但易造成培养基温度上升过快,菌体会老化而产生自溶^[16]。

2.2 正交实验

通过上述单因素实验,发现硫酸铵添加量、发酵温度、发酵时间 3 个因素对产淀粉酶的影响较大。采用 $L_9(3^3)$ 正交实验进行优化。正交实验因素水平见表 1,正交实验结果见表 2,方差分析见表 3。

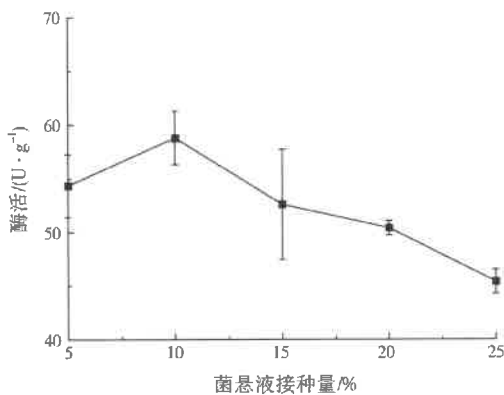


图 6 菌悬液接种量对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响

Fig. 6 Effect of inoculation size of bacteria suspension on production of amylase

表 1 发酵条件优化的正交实验因素水平

Table 1 Levels and factors of orthogonal test for fermentation condition optimization

水平	因素		
	硫酸铵添加量 (A)/(mg·g ⁻¹)	发酵温度 (B)/℃	培养时间 (C)/d
1	30	30	5
2	40	34	7
3	50	40	8

由表 3 可以看出,硫酸铵添加量及硫酸铵添加量、发酵温度、发酵时间三者之间的交互作用对黑曲霉固态发酵三七渣产淀粉酶的影响显著($P<0.05$),而发酵时间与发酵温度对产淀粉酶的影响极显著($P<0.01$)。由于所考察的 3 个因素之间的交互

作用显著,因而需要进行多重比较才能获得最优的发酵条件。采用 SPSS 软件,以酶活为因变量,以不同的实验组合为固定因子进行多重比较分析,得到实验结果没有显著性差异($P>0.05$)的 4 个实验组子集,结果见表 4。

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal test

实验编号	A	B	C	酶活/(U·g ⁻¹)
1	1	1	1	59.19
2	1	2	2	79.41
3	1	3	3	71.99
4	2	1	2	88.57
5	2	2	3	86.09
6	2	3	1	59.65
7	3	1	3	90.61
8	3	2	1	84.15
9	3	3	2	67.05

由表 4 可看出,子集 4,即实验 2、实验 4、实验 5、实验 7、实验 8 所得的结果最没有显著性差异($P>0.05$),考虑到实际生产中缩短发酵时间与发酵温度可以降低成本,所以对于本研究正交实验所考察的 3 个因素来说,较优的发酵条件搭配为 A3B2C1 (实验 8),即硫酸铵添加量为 50 mg/g,发酵温度为 34℃,发酵时间为 5 d,在此发酵条件下,黑曲霉固态发酵三七渣产生的淀粉酶的酶活可达 84.15 U/g。

3 结 论

单因子实验结果表明,黑曲霉固态发酵三七渣

表 3 正交实验方差分析结果

Table 3 The variance analysis of orthogonal test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
硫酸铵添加量	591.911	2	295.955	4.420	0.027
发酵温度	1 529.356	2	764.678	11.419	0.001
发酵时间	1 167.354	2	583.677	8.716	0.002
交互作用	676.660	2	338.330	5.053	0.018
误差	1 205.329	18	66.963		
总变异	5 170.609	26			

表 4 正交实验多重比较结果

Table 4 Multiple comparison of orthogonal test

项目	样本数	子集			
		1	2	3	4
实验 1	3	59.19 U/g			
实验 6	3	59.65 U/g			
实验 9	3	67.05 U/g	67.05 U/g		
实验 3	3	71.99 U/g	71.99 U/g	71.99 U/g	
实验 2	3		79.41 U/g	79.41 U/g	79.41 U/g
实验 8	3			84.15 U/g	84.15 U/g
实验 5	3			86.09 U/g	86.09 U/g
实验 4	3				88.57 U/g
实验 7	3				90.61 U/g
P 值		0.103	0.105	0.074	0.158

(下转第 69 页)