

采用 BP 神经网络优化酱油固态酿造条件

冷云伟^{1,2}, 徐岩^{1*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 中国矿业大学 生物工程学院, 江苏 徐州 221008)

摘要: 酱油是一种中国传统发酵调味品。酱油的生产机理主要利用米曲霉所产的蛋白酶分解原料蛋白质为氨基酸, 通过后期发酵增香, 经淋油、灭菌、勾调而成。作者研究了米曲霉产蛋白酶在不同温度、pH、盐分条件下的特性, 并且利用 BP 神经网络对蛋白酶最佳作用条件进行了优化。结果表明: 最佳作用条件为 42 °C, pH 7.0, 盐度为 0 °Bé。以该结果为基础, 进行规模化实验。结果表明: 车间试验发酵条件确定为温度 42 °C, 全程盐度 18 °Bé, 加盐水比为 1:2, 淋浇次数为 3 次/d。

关键词: 米曲霉; 蛋白酶活力; 酱油; 神经网络; 固态酿造

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)05—0471—06

Study on the Optimization of Solid State Fermentation Conditions of Soy Sauce by Using BP Neural Network

LENG Yunwei^{1,2}, XU Yan^{1*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Department of Biological Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: Soy sauce is a kind of Chinese traditional fermented condiment. The main mechanism of soy sauce production is the decomposition of raw protein into amino acids using protease formed by *Aspergillus oryzae*, and the late fermentation flavor, shower oil, sterilization and blending into. This paper studies the characteristics of the protease formed by *Aspergillus oryzae* in different temperature, pH and salinity conditions analysis, and by using BP neural network to optimize the protease hydrolyse conditions. The results show: the best effect condition of 42 °C, pH 7.0, salinity is 0 °Bé. With the above research results as the foundation, carries on the scale of the experiment, the results showed that: the shop tests the optimal fermentation conditions for a temperature of 42 °C, the whole salinity 18 °Bé, and salt water ratio is 1:2, pouring 3 times/day.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, protease, soy sauce, neural network, solid state fermentation

收稿日期: 2014-10-17

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA021301; 2008BAI63B07)。

* 通信作者: 徐岩(1962—), 男, 浙江慈溪人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酿酒科学与酶技术方面的研究。

E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

我国目前主流的酱油生产工艺主要有两种:一种是低盐固态发酵,另一种是高盐稀态发酵,其中前者占到 80%左右。而两种发酵方式都存在各自的缺点:低盐固态虽然发酵周期短,但是原料蛋白质利用率不高,产品风味不好;高盐稀态发酵发酵周期过长,劳动强度大,不适合大规模生产^[1-4]。因此,寻求一种合适的发酵方式来提高酱油原料利用率、提高酱油风味同时缩短发酵周期,已成为急需解决的问题^[5-8]。由于酱油发酵的主要菌种是米曲霉,利用该菌种生产的成曲主要分泌碱性、中性和酸性蛋白酶,研究蛋白酶作用的最佳条件是提高蛋白质利用率的主要方式^[9-15]。

作者主要针对生产用酱油曲精所生产的成曲进行蛋白酶的粗提取,根据所产蛋白酶在不同温度、盐分和 pH 条件下的酶活数据,确定蛋白酶的最佳作用条件。利用神经网络模型对实验条件进行深入优化,得出最优条件,并在此优化的基础上对大规模最优酱油发酵条件进行研究。

1 材料与方法

1.1 成曲蛋白酶的分离提取

成品曲由江苏恒顺万通食品酿造有限公司提供。称取充分研细的成曲 5 g,加水至 100 mL,在 40 ℃水浴内间断搅拌 1 h,过滤,滤液用 0.1 mol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液稀释到一定倍数。

提取酸性和碱性蛋白酶时,各自加入相应倍数的 pH 3.0 的乳酸缓冲液和 pH 10.0 的硼酸缓冲溶液。

1.2 蛋白酶活力的测定

采用改进的福林酚法^[17],取试管 3 支,每管加入酶液稀释液 1 mL,置于 40 ℃水浴中预热 2 min,再加入经同样预热的酪蛋白 1 mL,精确保温 10 min,时间到后,立即再各加入 0.4 mol/L 三氯乙酸 2 mL,以终止反应,继续置于水浴锅中保温 20 min,使残余蛋白质沉淀后过滤。另取试管 3 支,每管加入滤液 1 mL,再加入 0.4 mol/L 碳酸钠 5 mL,已稀释的福林试剂 1 mL 摇匀。40 ℃保温发色 20 min 后测定吸光值。

空白试验也取试管 3 支,测定方法同上,在加酪蛋白之前先加 0.4 mol/L 三氯乙酸 2 mL,使酶失活,再加入酪蛋白。酶活力计算:在 40 ℃下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸定义为 1 个蛋白酶活

力单位(U)。

$$\text{样品蛋白酶活力(干基)} = \frac{A}{10} \times 4 \times n \times \frac{1}{1-w}$$

式中:A 为样品的净吸光值,由标准曲线得相当的酪氨酸微克数;4 为 4 mL 反应液取出 1 mL 测定;N 为酶液稀释倍数;10 为反应 10 min;w 为样品水分质量分数。

1.3 温度对成曲溶液酶活力的影响

鉴于温度敏感性是米曲霉产蛋白酶的一个重要特性,设定盐度为 0 °Bé、pH 7.5 恒定,在 25、30、35、40、45、50、55 ℃下精确保温 30 min,再调温至 40 ℃测定酶活力,以温度为横坐标,以相应的酶活力为纵坐标,即可求得酶反应的最适温度。

1.4 盐度对成曲溶液酶活力的影响

盐分在发酵生产过程当中主要起调味和抑制杂菌生长的作用,但是也会抑制蛋白酶的酶活。通过保持温度 40 ℃、pH 7.5 不变的情况下,在 0、5、10、15、20、25 °Bé 的盐度下保持 30 min,测定酶活力,可以了解到不同盐分对蛋白酶的抑制程度。

1.5 pH 对成曲溶液酶活力的影响

pH 不仅对酶活性有很大的影响,而且对酶的稳定性的影响。将提取的酶液分成 5 份,分别置于 pH 为 3、5、7、9、11 缓冲溶液中保温处理 30 min,然后再调至 pH 7.5 测定酶活力。

1.6 BP (Back Propagation) 神经网络对各因素的学习训练

人工神经网络是近年来发展的一门前沿科学,已成为数学建模领域的一个热点并在工程领域得到了较为广泛的应用^[17-18]。作为一个非线性动态系统,人工神经网络具有很强的自学习和自适应能力,使得它适于处理在已知条件和结果之间无明确数学关系的数据,并能够在条件与结果之间建立一定的关系。

对于蛋白酶反应条件和酶活大小的对应关系,现在来说还是一个盲区,或者说很多时候都是以经验为主,利用 BP 神经网络刚好可以模拟此过程,进行深入优化。

以温度、盐度和 pH 为输入层的三个因素,以对应条件下的蛋白酶酶活为输出层因素,通过对单因素数据的不断正向训练和反向传播,不断更改隐含层各节点的权值,得出模拟结果。网络结构见图 1。

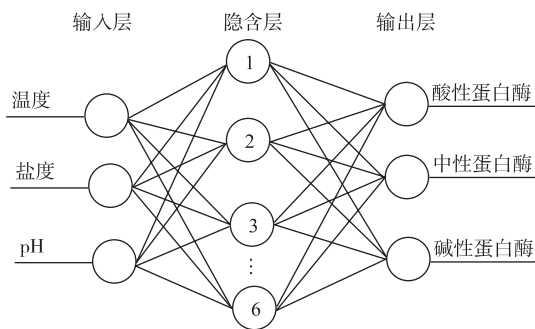


图1 BP神经网络训练结构图

Fig. 1 Trained BP neural network structure diagram

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与讨论

2.1.1 温度对成曲蛋白酶酶活力的影响 根据实验所得数据,做出成曲溶液酶活力随温度的变化趋势图,见图2。在其他的条件不变时,温度对蛋白酶的影响极大,最低到 620 U/g。而在最适温度 38 °C 时,酶活可以达到 1 550 U/g。中性蛋白酶在 36 °C 左右酶活最大,而碱性蛋白酶和酸性蛋白酶略低,在 37 °C 左右。所以,在酱油发酵时,前期要保持在 35~40 °C 之间,利于蛋白质的分解利用。

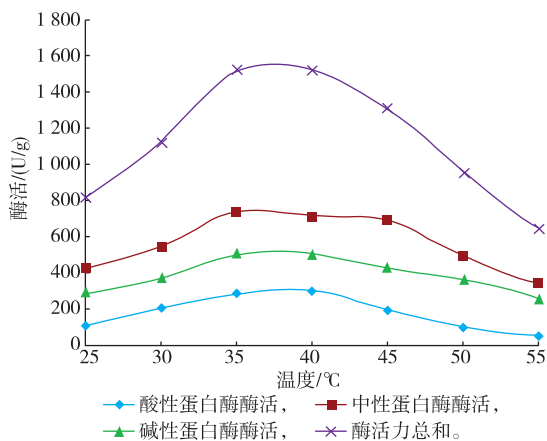


图2 温度对成曲蛋白酶酶活力的影响

Fig. 2 Effects of temperatures on the enzyme activity

2.1.2 盐度对成曲蛋白酶酶活力的影响 根据实验所得数据做出随盐度的变化,蛋白酶酶活力的变化趋势见图3。盐分主要在酱油发酵过程中对蛋白酶的影响主要是负面的。

在盐度从 0 °Bé 到 10 °Bé 时,中性蛋白酶酶活下降较为快速,之后趋于缓慢。食盐浓度的增加对 3 种酶都产生抑制作用,该抑制作用随盐度的增加而

更加显著。

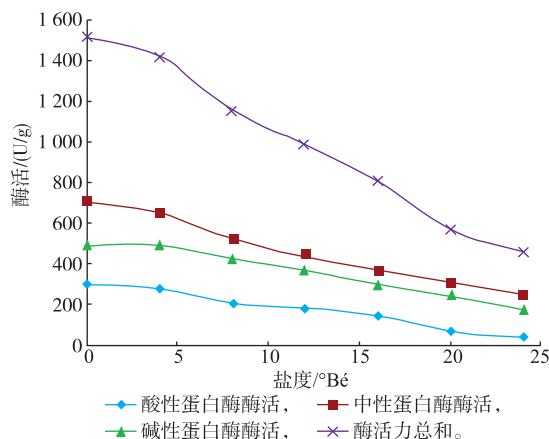


图3 盐度对蛋白酶酶活力的影响

Fig. 3 Effects of salinity on enzyme activity of protease

2.1.3 pH 对成曲蛋白酶酶活力的影响 根据实验所得数据,做出酶活随 pH 的变化趋势,见图4。可以看出,蛋白酶的最适作用 pH 在 7 左右,偏酸或偏碱都会影响蛋白酶的总酶活,呈“倒钟”形。pH 较低时,酸性蛋白酶酶活力较高,但是因为在整体酶系中,酸性蛋白酶含量较少,而此时中性和碱性蛋白酶酶活减少,应控制总酸,抑制变酸。

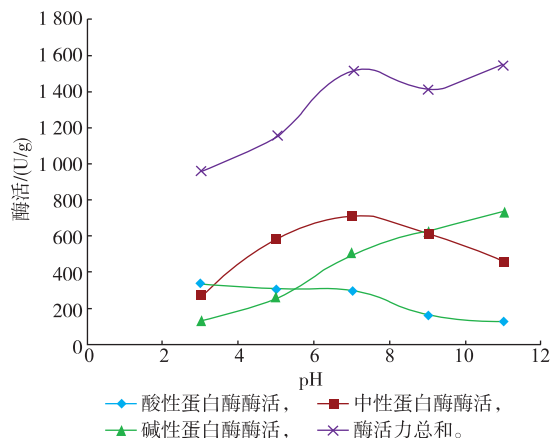


图4 pH对蛋白酶酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pH on the enzyme activity

2.2 BP神经网络对不同作用参数的研究探讨

利用训练好的 BP 神经网络对已做实验数据进行验证,见表1。

可以看出,网络对已测值的模拟误差在 0.5%~6% 波动,基本上很稳定,可以利用训练好的网络对影响因素进行进一步的优化。

表 1 蛋白酶活力网络模拟值和实测值的比对

Table 1 Protease activity network simulation value and test value

酸性酶活 实测值	网络模拟值	误差绝对值	中性酶活 实测值	网络模拟值	误差绝对值	碱性酶活 实测值	网络模拟值	误差绝对值
103.2	101.2	0.019	423.6	432.6	0.021	287.5	273.3	0.049
206.5	212.6	0.030	545.3	567.3	0.040	368.2	354.6	0.037
283.5	289.3	0.020	734.8	724	0.015	501.4	534.2	0.065
298.1	287.5	0.036	714.5	714.9	0.001	504.4	524.7	0.040
193.4	192.5	0.005	687.6	642.9	0.065	424.9	435.7	0.025
98.4	106.4	0.081	486.3	453.7	0.067	365.7	375.9	0.028
48.5	50.2	0.035	334.2	339.2	0.015	256.3	263.5	0.028
335.2	342.7	0.022	268.2	269.3	0.004	132.5	142.1	0.072
303.4	298.4	0.016	589.4	596.9	0.013	258.9	262.9	0.015
298.1	289.6	0.029	714.5	726.9	0.017	504.4	531.5	0.054
158.4	168.4	0.063	616.5	641.6	0.041	634.5	643.8	0.015
58.2	59.4	0.021	462	479.4	0.038	734.8	742.9	0.011
298.1	304.2	0.020	714.5	735.7	0.030	504.4	513.9	0.019
278.3	287.4	0.033	652.1	645.2	0.011	492.3	493.1	0.002
204.5	201.3	0.016	525.8	576.8	0.097	424.6	431.3	0.016
183.2	182.1	0.006	437.5	475.9	0.088	368.3	347.8	0.056
146.5	142.9	0.025	365.3	354.9	0.028	297.5	284.3	0.044
80.4	83.2	0.035	304.7	321.7	0.056	246.1	254.4	0.034
38.3	40.4	0.055	245.8	253.8	0.033	173.2	184.6	0.066

本实验采取温度区间为 36、38、40、42、44、46℃;pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,利用训练好的网络进行优化,结果见图 5—7。

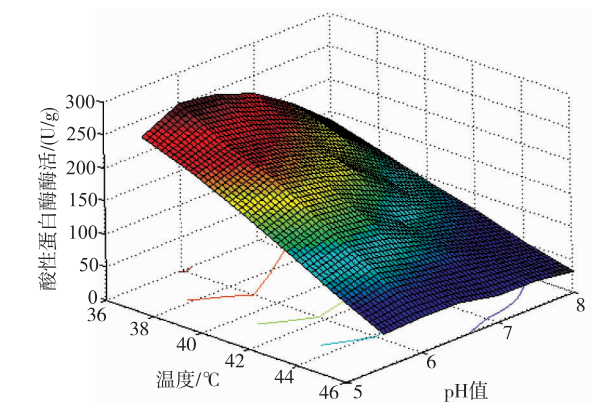


图 5 酸性蛋白酶网络条件优化结果
Fig. 5 Optimization results of acid protease network condition
由图 5 可知,网络所模拟的酸性蛋白酶在限制区间下,在 36℃、pH 5.5 具有最高酶活,随着温度和 pH 的升高,酶活快速下降。

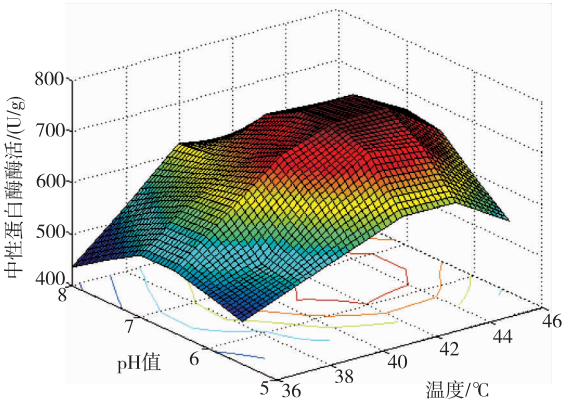


图 6 中性蛋白酶神经网络条件优化结果
Fig. 6 Optimization results of neutral protease network condition
由图 6 可知,中性蛋白酶的最佳作用条件是 42℃、pH 7.0,在偏酸和温度偏高的条件下,酶活力下降较快。
由图 7 可以看出,碱性蛋白酶在温度 42℃、pH 为 7.0 时,有最佳的蛋白酶活性,在偏酸和温度较低的条件下降酶活下降较快。
图 5—7 均为网络模拟结果,采用最优条件再次

实验,结果超出文献参考值,见表 2。

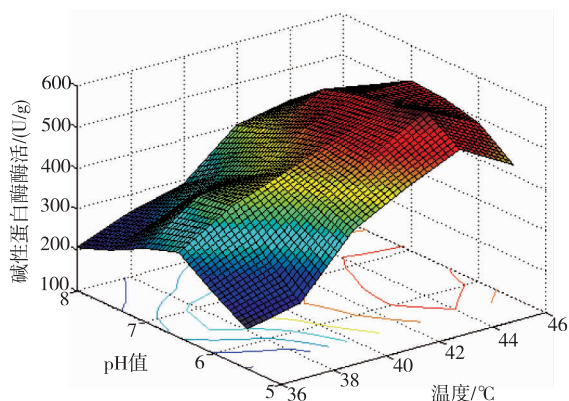


图 7 碱性蛋白酶神经网络条件优化结果

Fig. 7 Optimization results of alkaline protease neural network condition

表 2 神经网络训练后的最优条件情况

Table 2 Optimal conditions of the trained neural network situation

项目	温度	pH	酸性酶活	中性酶活	碱性酶活
对照	40	7.0	80.5	756.6	436.3
文献值	40	7.5	102	934	394
网络优化值	42	7.0	157.1	1026.4	547.2
实验验证值	42	7.0	162.2	1143.5	583.2
提高百分比/%			101.4	52.8	33.6

由表 2 可以看出,通过神经网络训练,酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶活均有了显著提高,分别比优化前提高了 101.4%,52.8%,和 33.6%,而且均高于文献值。

2.3 车间发酵试验

车间共进行了三批共 6 大罐发酵试验。确定的试验工艺参数为:原料配比为豆粕:麸皮=6:4,盐水浓度 18 °Bé,发酵作用温度为 40、45、50 °C,加盐比为 1:2,淋浇次数为 3 次/d。

参考文献:

[1] 鲁肇元,唐娟娟. 传统工艺与酱油行业的发展[J]. 中国酿造,2009,11:5-10.

LU Zhaoyuan,TANG Juanjuan. Development of traditional brewing technology and soy sauce industry [J]. **China Brewing**, 2009,11:5-10.(in Chinese)

[2] 李大锦,王汝真. 酶制剂在酱油酿造中的应用的现状和发展[J]. 中国调味品,2002(1):1-3.

发酵过程中不同温度条件下的氨基酸态氮和总酸的变化情况见图 8。从氨基酸态氮的变化曲线可以看出,40~50 °C 条件下,温度对氨基酸态氮的影响不明显;发酵前期氨基酸态氮增长都较慢,但逐渐增长,蛋白质分解时间较长,同时利于其他微生物的生长,利于后期生香;总酸的变化曲线显示,45 °C 最适于生酸,进一步提高温度,生酸变缓,而且催化产物产生高峰较早出现,并且峰值较低。

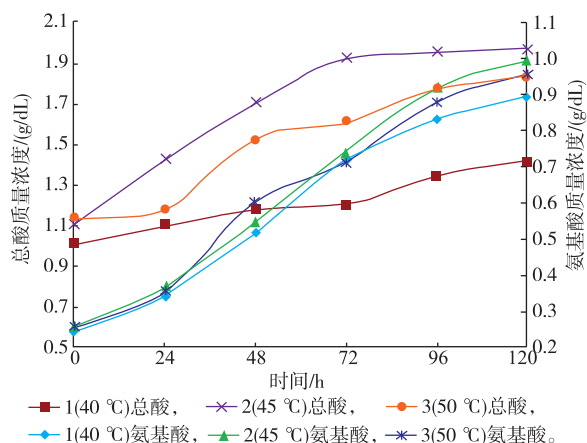


图 8 车间发酵不同温度条件下氨基酸和总酸变化

Fig. 8 AN and total acid change in workshop fermentation condition under different temperature

3 结 语

通过单因素试验,得出了米曲霉产蛋白酶的最佳作用条件是:38 °C、pH 7.0、盐度为 3 °Bé。通过 BP 神经网络的优化,得出了米曲霉产蛋白酶的作用条件应为:42 °C、pH 7.0、盐度为 0 °Bé。因为盐度对蛋白酶酶活具有抑制作用,所以在单因素试验过程中,未添加盐分。通过对网络模拟条件的实际操作,得出实验结果也较单因素阶段有较大提高。结合生产实际,修正部分工艺参数后,进行了三批共 6 大罐发酵试验。确定的试验工艺参数为:原料配比为豆粕:麸皮=6:4,盐水浓度 18 °Bé,发酵作用温度为 45 °C,加盐比为 1:2,淋浇次数为 3 次/d。

- LI Dajin, WANG Ruzhen. The present situation and development of enzyme application in the production of soy sauce[J]. **China Condiment**, 2002(1):1-3. (in Chinese)
- [3] 侯丽华, 卢嵩, 王檬, 等. 低盐固态工艺条件下米曲霉 3.042 和米曲霉 RIB40 酿造酱油发酵性能的比较 [J]. 中国调味品, 2014, 8:1-8.
- HOU Lihua, LU Song, WANG Meng, et al. Comparison of fermentation performance between *A. oryzae* 3.042 and *A. oryzae* RIB40 in low-salt solid-state fermentation of soy sauce[J]. **China Condiment**, 2014, 8:1-8. (in Chinese)
- [4] 尹文颖, 崔春, 陈玲, 等. 发酵温度对高盐稀态酱油原油品质的影响[J]. 食品工业科技, 2014(2):154-161.
- YIN Wenying, CUI Chun, CHEN Lin, et al. Effects of fermentation temperature on the quality of soy sauce [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014(2):154-161. (in Chinese)
- [5] 潘一, 郭泽, 王春龙, 等. 酱油成分检测方法的研究进展[J]. 中国调味品, 2013(3):14-17.
- PAN Yi, GUO Ze, WANG Chunlong, et al. The research progress of detection methods of components in soy sauce [J]. **China Condiment**, 2013(3):14-17. (in Chinese)
- [6] 王夫杰, 鲁绯, 赵俊平, 等. 酱油风味及其检测方法的研究进展[J]. 中国酿造, 2010(8):1-4.
- WANG Fujie, LU Fei, ZHAO Junping, et al. Research progress of flavor compounds in soy sauce and detection methods[J]. **China Brewing**, 2010(8):1-4. (in Chinese)
- [7] 王栋, 冯杰, 郑志永, 等. 酱油发酵用 2 种米曲霉中性蛋白酶的酶学性质比较[J]. 食品与生物技术学报, 2012(5):479-485.
- WANG Dong, FENG Jie, ZHENG Zhiyong, et al. Characteristic comparison of two neutral proteases used for soy sauce fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012(5):479-485. (in Chinese)
- [8] 黄毅, 锁然, 李娜. 酱油中氨基酸的组成与分析[J]. 中国调味品, 2012(3):101-107.
- HUANG Yi, SUO Ran, LI Na. Composition and analysis of amino acid in soy sauce [J]. **China Condiment**, 2012(3):101-107. (in Chinese)
- [9] 刘晓蓉, 谭才邓, 陈小冰, 等. 米曲霉 1228 制曲条件的优化及酱油酿造的研究[J]. 现代食品科技, 2013(2):291-293.
- LIU Xiaofeng, TAN Caideng, CHEN Xiaobing. Optimization conditions of Koji making by *Aspergillus oryzae* 1228 and study on soy sauce brewing[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2013(2):291-293. (in Chinese)
- [10] Catrinus van der Sluis et al. Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy sauce processes [J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2001, 12:322-327.
- [11] Blesa J. Absence ochratoxin a in soy sauce[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2004, 97:221-225.
- [12] Tanaka F, Morita K, Mallikarjunan P, et al. Analysis of dielectric properties of soy sauce [J]. **Journal of Food Engineering**, 2005, 71:92-97.
- [13] Cheng-Chun, Chou Ling, Meei Yueh. Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials[J]. **Food Research International**, 1998, 31(6):487-492.
- [14] Thawatchai Mongkolwai et al. Technology transfer for small and medium soy sauce fermentation factories in Thailand: a consortium approach[J]. **Food Research International**, 1997, 80(8):555-563.
- [15] Ruud Vallyaseyi, Rosa S. Rolle. An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with reference to Thailand: scope for their improvement[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2002, 75:231-239.
- [16] Anson M L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin [J]. **The Journal of General Physiology**, 1983, 22(1):79.
- [17] 杨光, 刘俏, 代蕊, 等. BP 神经网络预测 *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 发酵产物活性[J]. 计算机与应用化学, 2013, 9:1055-1058.
- YANG Guang, LIU Qiao, DAI Rui. et al. Predicting antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 in shake flask culture based on BP neural network[J]. **Computers and Applied Chemistry**, 2013, 9:1055-1058. (in Chinese)
- [18] 赵亮, 刘俏, 宋莉. 用 BP 神经网络与遗传算法优化 γ -氨基丁酸的发酵培养基[J]. 计算机与应用化学, 2008, 10:1273-1276.
- ZHAO Liang, LIU Qiao, SONG Li. Culture medium optimization for γ -aminobutyric acid production by BP neural network and genetic algorithms[J]. **Computers and Applied Chemistry**, 2008, 10:1273-1276. (in Chinese)