

文章编号:2095-7386(2016)04-0022-04

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.04.004

黑曲霉固态发酵产糖化酶动力学研究

江贤君¹, 魏正平²

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 湖北天沁生态农业发展有限公司, 湖北 孝感 432000)

摘 要:以玉米粉和麸皮等混合物为发酵培养基,进行黑曲霉产糖化酶固态发酵动力学研究。用氨基葡萄糖含量表征生物量,通过试验数据用R语言进行数据建模建立黑曲霉固态发酵细胞生长和酶合成 Logistic 动力学方程。以酶合成 Logistic 动力学方程为基础考察了温度和水分对酶合成的影响,结果表明用R语言拟合的 Logistic 动力学方程可用于固态发酵条件优化研究。

关键词:黑曲霉;糖化酶;动力学;R语言;固态发酵

中图分类号: Q55

文献标识码: A

Study on the kinetics of glucoamylase production by solid-state fermentation of aspergillus niger

JIANG Xian-jun¹, WEI Zheng-ping²

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Hubei Tian qin Ecological Agriculture Development Co., Ltd, Xiaogan 432000, China)

Abstract: In this paper, kinetics of glucoamylase production by solid-state fermentation was studied by using the mixture of corn flour and wheat bran as substrates. With measured glucosamine for biomass estimation, Logistic models for *Aspergillus niger* growth and glucoamylase production were proposed and the model parameters were fitted by using R language. Based on the Logistic model of enzyme synthesis, the effect of temperature and moisture on the enzymatic synthesis was investigated. Results show that the Logistic dynamics using R language fitting equation can be used in solid-state fermentation condition optimization research.

Key words: *Aspergillus niger*; glucoamylase; kinetics; R language; solid-state fermentation

1 引言

黑曲霉在生长过程中分泌的糖化酶是一类酸性糖苷水解酶,它能水解淀粉 $\alpha-1,4$ 、 $\alpha-1,6$ 等糖苷键生成葡萄糖。糖化酶广泛地应用于酒精、白酒、抗生素、氨基酸、有机酸、甘油、淀粉糖等工业中。目前,酶制剂的生产有固态发酵和液态发酵两种方法,

固态发酵虽然历史悠久,但由于其参数不易检测、过程不易控制、劳动强度大等缺点发展一直非常缓慢,但固态发酵相对于液态发酵有许多优点,如能耗小、工艺操作简单、废水少、微生物在接近自然条件下生长、克服了液体深层培养中酶合成的分解代谢阻遏、酶活力高等^[1,2]。随着科技的发展和机械化水平的提高,固态发酵因其固有的优点近些年逐渐成为研

收稿日期:2016-06-10.

作者简介:江贤君(1962-),男,副教授, E-mail:1098377885@qq.com.

究热点。

用黑曲霉固态发酵生产糖化酶在规模上远不及液态发酵,除了上述固态发酵缺点外,理论上固态发酵缺乏动力学支持也是生产停留在经验化生产水平的重要原因。研究人员对黑曲霉固态发酵产糖化酶研究主要集中在菌种选育和培养基配方等方面^[3],对黑曲霉固态发酵产酶动力学研究鲜有报道。本研究以生态学领域的 logistic 方程为基础,通过试验获得黑曲霉生长和产酶数据,再用 R 语言进行数据建模确立黑曲霉生长和产酶 Logistic 动力学方程^[4],并从动力学角度考察固态发酵重要影响因素温度和水分对黑曲霉产酶影响,以期为固态发酵条件的优化提供实用有效方法。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种

黑曲霉 TQ1201 (*Aspergillus niger*):湖北天沁生态科技有限公司提供。

2.1.2 培养基^[5]

斜面菌种培养基:马铃薯葡萄糖琼脂斜面培养基(PDA)。

发酵培养基:玉米粉:麸皮:豆饼粉:米糠=2:2:1:0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0%,加水比 1:1.2。

2.2 方法

2.2.1 培养方法

种子制备:将长满成熟孢子的活化 2 次的斜面培养基用无菌生理盐水洗涤,倒入装有玻璃珠的无菌三角瓶中,再在 120 rpm 的摇床中震荡 30 min,用灭菌后的脱脂棉滤去菌丝片段,制得单孢子悬浮液作为种子。

浅盘发酵:取若干个 250 mL 三角瓶,每瓶加入 10 g 配好的发酵培养基,121 ℃、 1.01×10^5 Pa 灭菌 30 min。冷却到 35 ℃接入孢子悬浮液,摇匀摊平,然后在霉菌培养箱中 30 ℃恒温培养,每隔 12 小时进行测定。每瓶操作保持一致。

2.2.2 分析方法

酶活力的测定:按 GB8276-2006 食品添加剂糖化酶制剂进行,酶比活力为 IU/g。

菌体量测定^[6,7,8]:固态发酵因为菌丝和基质缠绕在一起,直接计量生物量非常困难,一般通过间接法计量。由于氨基葡萄糖是参与构成真菌细胞壁中几丁质的主要成分,因此用氨基葡萄糖含量可表示菌体量。

将固态发酵样品(3 个平行样)在 105 ℃下烘干至恒重,称取 0.5 g 干燥样品,加入 10 mL 浓盐酸,在室温下浸泡 24 h,在 2 000 rpm 下离心,取上清液 5 mL,加 2 mL 蒸馏水稀释,放入封口试管中,沸水浴水解 2 h,用 30% NaOH 溶液中中和至中性,在 15 000 rpm 下离心,上清液即为氨基葡萄糖溶液。

采用 Elson-Morgan 法测定氨基葡萄糖浓度,将 2 mL 氨基葡萄糖溶液与 1 mL 乙酰丙酮试剂混合,置入沸水中 30 min,冷却后加入 2 mL 无水乙醇,1 mL 对二氨基苯甲醛试剂,振荡,再加入 4 mL 无水乙醇,在 60 ℃下保温 1 h,在 530 nm 下测定吸光值(以蒸馏水为空白对照),以测定的吸光值(OD)表征菌体量。

3 结果与讨论

3.1 黑曲霉浅盘发酵菌体生长和糖化酶合成

按 2.2.1 的方法浅盘固态培养黑曲霉,培养过程测定氨基葡萄糖和糖化酶酶活,结果如图 1 所示。

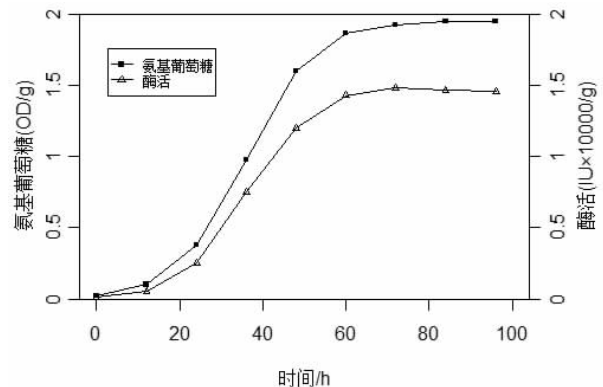


图1 黑曲霉生长和酶合成曲线图

由图 1 可以看出,在接种后黑曲霉生长和酶合成有一段约 10 小时左右延迟期,之后进入指数期,在第 3 天到第 4 天进入平衡期,此时菌体量和糖化酶比活力都达到最大值,试验中黑曲霉已布满整个培养基。由图 1 还可以看出黑曲霉生长和糖化酶合成均呈 S 型曲线,同时,糖化酶的合成与黑曲霉的生长呈偶联型关系,因为黑曲霉必须藉由糖化酶水解淀粉得以生长。

3.2 数据建模拟合动力学方程

在微生物学中描述菌体生长常用 Monod 方程,Monod 方程在液态培养环境下描述细菌、酵母等单细胞微生物生长比较理想,但不适合高等生物尤其在固态环境下培养过程。在生态学领域描述在资源有限条件下种群增长规律的最佳数学模型是 Logistic 方程。Logistic 方程指出当一个物种迁入到一个

新生态系统中后,其数量会发生变化,当物种的起始数量小于环境的最大容纳量时,数量会增长,且增长呈自抑制,生长曲线呈 S 形。因此,Logistic 方程适合真菌的固态培养过程,其数学表达式为:

$$\frac{dx}{dt} = u_m x \left(1 - \frac{x}{x_m} \right)$$

当初始条件为 $t=0, x=x_0$ 时,积分上式可得:

$$X = \frac{x_m}{1 + \left(\frac{x_m}{x_0} - 1 \right) \exp(-u_m t)}$$

式中: x —菌体量(菌体量以氨基葡萄糖含量表示,即 OD 值)

u_m —最大比生长速率(h^{-1})

x_m —最大菌体量

x_0 —初始菌体量

t —时间(h)

以 3.1 的试验数据为基础,用开源 R 语言(版本 R_{x64} 3.3.1)对黑曲霉生长进行数据拟合,在 R 控制台输入如下代码:

$x = c(0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96)$ #() 中为时间序列;

$y = c(0.02, 0.10, 0.38, 0.98, 1.55, 1.8, 1.93, 1.95, 1.95)$ #() 中与时间序列对应的氨基葡萄糖含量序列(OD 值);

$S <- \text{getInitial}(y \sim \text{SSlogis}(x, \text{alpha}, \text{xmid}, \text{scale}))$,

$\text{data} = \text{data.frame}(y = y, x = x)$

$x_m <- S["\text{alpha}"]$

$u_m <- 1/S["\text{scale}"]$

$x_0 <- S["\text{alpha}"] / (\exp(S["\text{xmid}"] / S["\text{scale}"]) + 1)$

$f <- \text{formula}(y \sim x_m * x_0 * \exp(u_m * x) / (x_m + x_0 * (\exp(u_m * x) - 1)))$

$m <- \text{nls}(f, \text{start} = \text{list}(x_m = x_m, u_m = u_m, x_0 = x_0))$

$\text{summary}(m)$

$\text{cor}(y, \text{predict}(m))$

R 在控制台即输出拟合结果,截图如图 2 所示。

从图 2 可以看到 $x_m = 1.9486, u_m = 0.115, x_0 = 0.029986$ (拟合优度 > 0.99 , 各参数 P 值 $\ll 0.05$), 因此,黑曲霉生长动力学方程为:

$$X = \frac{1.9486}{1 + 63.99 \exp(-0.115t)}$$

依同样方法可以得出糖化酶合成动力学方程为

```
> summary(m)
```

```
Formula: y ~ Xm * X0 * exp(mu * x) / (Xm + X0 * (exp(mu * x) - 1))
```

```
Parameters:
```

```
Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
Xm.alpha 1.948600    0.010088   193.17 1.30e-12 ***
mu.scale 0.115020    0.002904    39.61 1.73e-08 ***
X0.alpha 0.029986    0.003060     9.80 6.50e-05 ***
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.01702 on 6 degrees of freedom
```

```
Number of iterations to convergence: 0
```

```
Achieved convergence tolerance: 3.466e-06
```

```
> cor(y, predict(m))
```

```
[1] 0.9998581
```

图 2 R 输出拟合结果

(在酶合成动力学中, μ_m, x_m, x_0 三个参数分别对应比合成速率、最大比活力、初始比活):

$$p = \frac{14773.83}{1 + 109.43 \exp(-0.13t)} \quad p - \text{酶活(IU/g)}$$

再用 R 语言绘图函数 $\text{plot}()$ 对 3.1 试验数据和拟合得到的 Logistic 方程曲线作图以检验 R 语言拟合效果,结果如图 3 和图 4 所示。

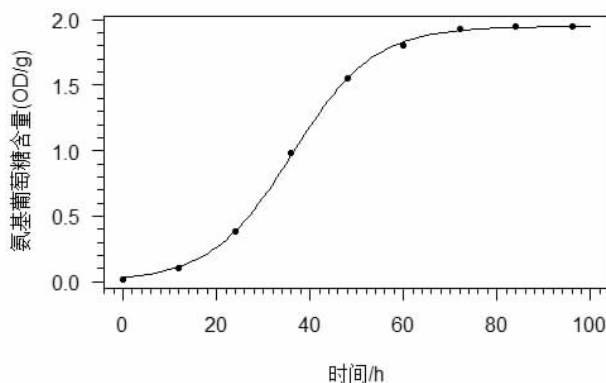


图 3 黑曲霉试验数据与生长 Logistic 曲线图

从图 3 和图 4 可以看出,试验数据与用 R 语言拟合出的 Logistic 方程曲线重合度很好,说明用 R 语言拟合得到的黑曲霉生长动力学方程和酶合成动力学方程可靠,也说明生态学领域的 Logistic 方程适合固态发酵过程。

3.3 温度对糖化酶合成的影响

温度是影响固态发酵重要因素,按 2.2.1 方法分别在 25℃、30℃ 和 35℃ 下进行固态发酵,其他条件保持不变。对比在 25℃、30℃ 和 35℃ 三个不同温度下产酶情况,结果如图 5 所示。

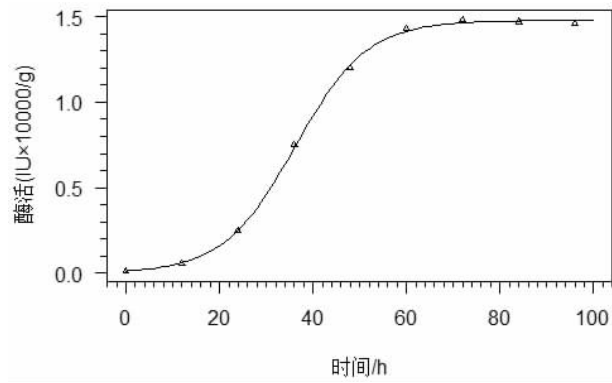


图4 糖化酶试验数据与酶合成 Logistic 曲线图

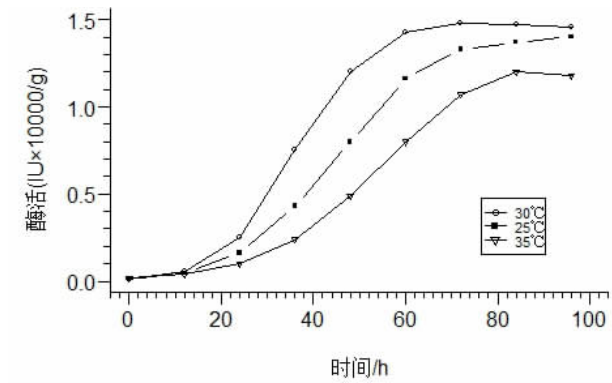


图5 温度对酶合成的影响

从图5可以看出,在25℃、30℃和35℃三个不同温度下黑曲霉固态发酵,以30℃酶活最高,在25℃下培养酶活峰值接近30℃酶活,但发酵时间延长。在35℃条件下培养情况最差,无论酶活峰值还是速率都较低,说明黑曲霉不宜在较高温度下发酵。

不同温度条件下酶合成曲线都成S形,按照3.2的数据建模方法用R语言进行不同温度条件下产酶动力学 Logistic 拟合,得到相应的 Logistic 动力学参数见表1(拟合优度均大于0.99, $P < 0.05$)。

表1 不同温度下拟合酶合成 Logistic 动力学参数表

项目	30℃	25℃	35℃
u_m	0.13	0.11	0.08
x_m	14773	14687	11893
x_0	135	122	153

3.4 水分对糖化酶合成的影响

在固态发酵中温度、水分和空气是影响发酵的三个重要因素,对于浅盘培养空气不是限制因素,所以除温度外,水分是另一个重要参数了。浅盘培养水分均由配料时加水比控制,培养过程不添加水分。这里比较了加水比为1:0.8、1:1.2和1:1.6三种情

况下黑曲霉产糖化酶动力学,培养温度为30℃,其它条件不变,结果如图6所示。

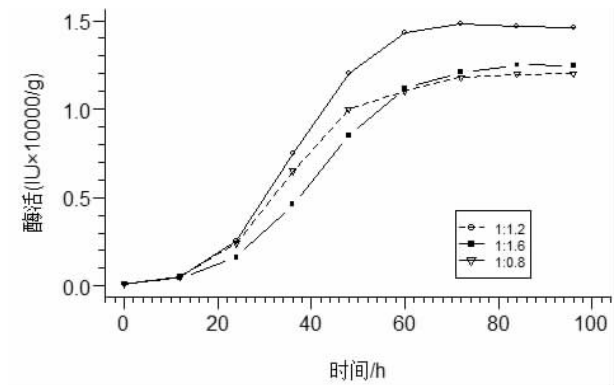


图6 水分对酶合成的影响

由图6可以看出,当水分为1:0.8时,刚开始黑曲霉生长旺盛,产酶速率也高,随着时间进行,由于水分蒸发产酶速度下降,而且酶活峰值最低。水分为1:1.6时,刚开始因为水分阻碍了氧的传递,表现生长很慢,产酶也低,随着时间进行,水分蒸发一部分,导致后期产酶速率略有加快,而且产酶峰值较水分1:0.8情况下要高。当水分为1:1.2时,无论产酶速率还是酶活峰值都最高,所以水分以1:1.2为宜。

不同水分条件下酶合成曲线都成S形,按照3.2的数据建模方法用R语言进行不同水分条件下产酶动力学 Logistic 拟合,得到相应的 Logistic 动力学参数见表2(拟合优度均大于0.99, $P < 0.05$)。

表2 不同水分下拟合酶合成 Logistic 动力学参数表

项目	1:1.2	1:1.6	1:0.8
u_m	0.13	0.10	0.125
x_m	14773	12889	11764
x_0	135	121	160

4 结论

本试验进行了黑曲霉产糖化酶动力学研究,通过R语言对试验数据进行数据建模,得到黑曲霉生长 Logistic 动力学方程和酶合成 Logistic 动力学方程,通过拟合验证表明数据建模得到的动力学方程拟合优度高,动力学方程可靠。

浅盘固态发酵中温度和水分是影响微生物生长和产物合成最重要因素。本试验以数据建模得到的酶合成 Logistic 动力学方程为基础,研究了温度和水分对黑曲霉产糖化酶的影响,试验结果表明操作变

(下转第30页)

- state of the art[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994, 189: 1-8.
- [7] Wang Xinjing, Cao Zhihong, Jiang Jing, et al. Elevated expression of Tim-3 on CD8 T cells correlates with disease severity of pulmonary tuberculosis[J]. *Journal of Infection*, 2011, 62(4): 292-300.
- [8] 南文龙, 金宁一, 鲁会军, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素 Th 和 B 细胞表位预测及抗原性分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2009(7): 630-633, 637.
- [9] 刘海灿. 结核分枝杆菌八种蛋白抗原中人 T/B 细胞抗原表位多态性研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2014.
- [10] Nobuhiro Nakamoto, David E Kaplan, Jennifer Coleclough, et al. Functional Restoration of HCV -Specific CD8 T Cells by PD-1 Blockade Is Defined by PD-1 Expression and Compartmentalization[J]. *Gastroenterology*, 2008(7): 927-1937.
- [11] Li Fan, Yang Di, Wang Yi-qin, et al. Identification and modification of an HLA-A * 0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from Ran antigen[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2009(12): 2039-2049.
- [12] Grotzke J E, Lewinsohn D M. Role of CD8⁺ T lymphocytes in control of Mycobacterium tuberculosis infection[J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(4): 776-788.
- [13] Mommaas B, Kamp J, Drijfhout JW, et al. Identification of a novel HLA- B60- restricted T cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus[J]. *J Immunol*, 2002, 169(6): 3131-3136.

(上接第 25 页)

量改变 Logistic 动力学参数随之改变, 这种动力学研究方法可以为固态发酵条件优化提供理论技术支持。

参考文献:

- [1] 邱立友. 固态发酵工程原理及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.
- [2] Santos M M, Rosa A S, Dal' Bait S, et al. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzyme[J]. *Bioresour Toehnlol*, 2004(93): 261-268.
- [3] 郑建丰. WMC-15 黑曲霉固态发酵生产糖化酶的研究[J]. *江苏食品与发酵*, 1998(4): 2-5.
- [4] 张良均, 谢佳标, 杨坦, 等著. R 语言与数据挖掘[M]. 北京: 机械工业出版社, 2016.
- [5] 陈陶声. 酶制剂生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994.
- [6] 苏畅, 夏文水, 姚惠源. 氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖的测定方法[J]. *食品工业科技*, 2003(6): 75-77.
- [7] 陈书峰, 赵亮, 刘德华. 绿色木霉在稻壳和麸皮混合基质上固态发酵生产纤维素酶的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(1): 8-12.
- [8] 路秀玲, 赵树欣. 固态发酵中生物量的测定方法[J]. *天津轻工业学院学报*, 2000(4): 57-62.
- [9] Weiss R M, Ollis D F. Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass, and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1980, 22(4): 859-873.