

黑曲霉液态发酵生产植酸酶的动力学研究

石 坚¹ 孙君社¹ 苏东海¹ 经 玲²

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083; 2. 中国农业大学 理学院,北京 100083)

摘 要 对黑曲霉(*Aspergillus niger* ND313)液态发酵生产植酸酶的发酵过程和发酵动力学进行了研究。在摇瓶试验得到基本发酵工艺参数的基础上,应用 10 L 生物反应器进行放大试验取得了较好的结果,其最大菌体量(干重)达到 $1.19 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$,酶活力达到 $3.6 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。试验通过分批补料手段控制比生长速率的变化,得到了描述发酵过程的动力学模型并回归了模型参数。利用数学计算软件对试验数据与模型进行拟合,结果证明所建立的动力学模型能较好地反映并预测植酸酶的发酵过程。

关键词 黑曲霉; 植酸酶; 液态发酵; 动力学模型

中图分类号 TQ 920.1

文章编号 1007-4333(2003)02-0045-04

文献标识码 A

Kinetics study on the production of phytase in submerged fermentation by *Asp. niger*

Shi Jian¹, Sun Junshe¹, Su Donghai¹, Jing Ling²

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Based on the primary fermentation parameters obtained from flake cultures, the law of growth and metabolism of *Asp. niger* ND313 and the fermentation kinetic models were studied in an auto control bioreactor. The fermentation in bioreactor was successfully performed with a maximal biomass concentration (dry mass) of $1.19 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ and a maximal enzyme activity of $3.6 \mu \text{ mL}^{-1}$. Then the kinetic formula of cell growth rate, phytase production rate and glucose consumption rate were inferred by controlling the specific biomass growth rate. The results of mathematic fitting between model calculated values and experimental values proved the validity and rationality of the kinetic models.

Key words *Asp. niger*; phytase; submerged fermentation; kinetics model

来源于微生物的植酸酶(Phytase, EC. 3. 1. 3. 8)能催化植酸,使其水解为各级磷酸肌醇、肌醇和正磷酸盐的混合物。人们在研究中发现,植酸带负电荷,具有强大的螯合能力,能降低蛋白质的吸收利用,影响微量元素的吸收以及消化酶的活性。

对于植酸酶的应用效果,国内外进行了大量的饲养和消化试验,结果表明,植酸酶完全可替代畜禽日粮中的全部或部分磷酸氢钙,并不影响其生产性能。植酸酶的应用可提高饲料利用率,减少畜禽粪便中磷的排泄量,缓解磷对环境特别是对水体的污

染,对我国农业的可持续发展和环境保护具有重大意义^[1,2]。

目前国内植酸酶的研究已经取得一系列进展,但多集中于产酶菌种选育、生理功能和发酵工艺条件等方面,有关发酵动力学的报道很少^[2]。笔者以试验室筛选诱变得到的植酸酶高产菌株黑曲霉(*Aspergillus niger* ND313)作为供试菌株,应用 10 L 自动控制生物反应器进行放大试验,并对黑曲霉液态发酵过程及其动力学进行了研究探讨。

收稿日期:2002-09-16

作者简介:石 坚,硕士研究生;孙君社,博士,教授,研究方向为生物技术在水产品加工中的应用。

1 试验材料与方法

1) 供试菌株。

黑曲霉 (*Asp. niger* ND313), 由本试验室筛选诱变得到的。

2) 培养基。

a. 斜面培养基为麦芽汁-琼脂固体培养基。

b. 植酸酶液态发酵的基本培养基。液化淀粉 5% (取玉米淀粉, 加入适量水, 加热煮沸, 加入为干淀粉质量 1% 的 α -淀粉酶, 70 反应数小时, 冷却加水至所需量), 硫酸铵 5% (质量分数, 下同), 氯化钾 0.05%, 硫酸镁 0.05%, 硫酸亚铁 0.01%, 调节 pH 至 5.5。

3) 种子制备。

从斜面培养基上挑取几环霉菌孢子, 置于 200 mL 生理盐水中, 加玻璃珠于 30 水浴振荡, 制成孢子悬液, 镜检使孢子浓度达到 10^7 个 \cdot mL $^{-1}$, 取悬液按 2% 接种量接种发酵培养基。

4) 发酵条件。

a. 批次发酵条件。使用镇江东方生工公司生产的 10 L 型自动控制生物反应器进行批次发酵。反应器容积 10 L, 2 层 4 平直叶搅拌, 四挡板, 发酵培养基装料系数 0.7, 接种量 2%, 调整初始 pH 为 5.5, 控制培养温度 30, 搅拌转速 150 r \cdot min $^{-1}$, 通气比 1 2 (每 min, 下同)。

在发酵过程中, 由发酵控制系统自动记录 pH、DO 值的变化趋势, 同时每隔 6 h 取样测定发酵液总糖量 S , g \cdot 100 mL $^{-1}$; 菌体生物量 X , g \cdot 100 mL $^{-1}$; 植酸酶相对活力 P (以最高酶活力为 100, 换算为相对酶活力), %。

b. 分批补料发酵。发酵条件同批次发酵试验, 在发酵过程中用浓度为 20% 的液化淀粉液 (添加无机盐同基本培养基, 并调整 pH 为 5.5) 进行流加补料, 控制基质浓度, 补料过程中实时监测发酵液总糖量 S , 菌体生物量 X , 酶活力 P 的变化, 作为控制发酵过程的依据。

5) 发酵过程参数检测。

a. 发酵液总糖量。取发酵液 20 mL, 使用滤纸过滤, 并用蒸馏水冲洗滤出物, 回收 2 次过滤的滤液定容, 取一定量滤液, 采用蒽酮法在 640 nm 处比色测定总糖量^[3]。

b. 菌体生物量。取发酵液 20 mL, 用已烘干称重的滤纸过滤, 并用蒸馏水冲洗滤出物 2 次, 将滤纸

连同滤出物于 80 烘干至恒重, 前后滤纸质量的差值即为发酵液中的菌体生物量 (g \cdot 100 mL $^{-1}$)^[4]。

c. 植酸酶活力。采用钒-钼酸铵法测定^[5]。

2 试验结果与分析

2.1 生物反应器放大试验

在前期工作中, 已经通过摇瓶试验初步摸索出黑曲霉产植酸酶的液态发酵参数, 在此基础上使用 10 L 生物反应器进行了摸索性的放大试验。其中发酵培养基配比、培养温度、起始 pH 均采用摇瓶试验得到的参数, 搅拌速率、通气量等控制参数则通过反应器批次发酵试验确定。试验测定了反应器批次发酵的最大菌体量和最大植酸酶活力, 数据证明 10 L 生物反应器上的放大试验取得了较好的结果。发酵液中最大菌体量 (干重) 高于摇瓶试验结果 0.79 g \cdot 100 mL $^{-1}$, 达到 1.19 g \cdot 100 mL $^{-1}$; 最高酶活力达到 3.6 u \cdot mL $^{-1}$, 略低于摇瓶试验的 3.8 u \cdot mL $^{-1}$ 。

2.2 黑曲霉生长及代谢规律

为了弄清黑曲霉在液态发酵培养基上的生长规律和代谢规律, 采用批次发酵试验进行研究, 结果见图 1。可以看出, 黑曲霉的细胞生长曲线存在迟滞期、平缓期、对数期、衰减期等几个期段, 在发酵中后期细胞出现二次生长, 生长速率再次加快, 然后细胞生长又趋于平缓直至衰减。糖减曲线与细胞生长曲线呈反向变化, 又根据前期摇瓶试验的结果 (另文发表), 可假设发酵液中的碳源是黑曲霉生长的限制性基质。从图 1 中还可以看出, 酶活力的增长趋势明显滞后于细胞生长的增长趋势, 酶活力的快速增长出现于细胞生长的对数生长末期, 并随着细胞的衰亡期继续保持快速增长, 因此预测黑曲霉产植酸酶的发酵过程属于部分相关模型, 即 Gaden 提出的型发酵。

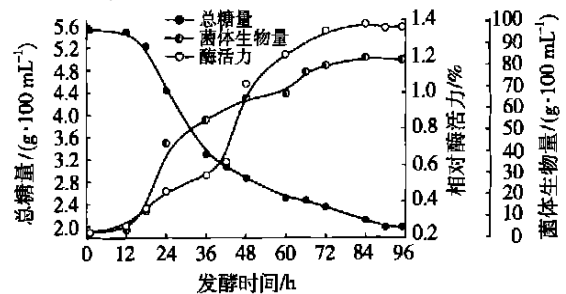


图 1 基质消耗、菌体生长和产酶与发酵时间的关系

Fig. 1 The relationship between glucose cons., biomass conc. and enzyme act.

2.3 发酵过程溶解氧和 pH 的变化规律

用智能发酵系统记录的发酵过程 DO 值和 pH 的数据作图。图 2 示出发酵过程中 pH, DO 值和比生长速率的变化曲线。可以看出, 随着霉菌细胞进入对数生长期 (比生长速率最大), 发酵液 DO 值急剧降低; 随着细胞生长趋势的变缓, DO 值降低趋势随之变缓; 当细胞生长进入衰亡期, 在产酶活力增加的同时, DO 值趋于平稳, 甚至有所回升。由上述现象可以推断, 黑曲霉的生长是典型的耗氧过程, 而在产植酸酶高峰的发酵后期, 伴随着代谢产物植酸酶的大量生成, 霉菌细胞呼吸作用趋缓, 需氧减少。如果在发酵前期采用较高的通气比 (2.3) 和搅拌速率 (200 r · min⁻¹), 则有可能提高黑曲霉的生长速率和生长量; 在发酵后期采用较低通气比 (1.2) 和搅拌速率 (150 r · min⁻¹), 则有可能减少对菌丝体的剪切破坏, 同时提高酶活力。

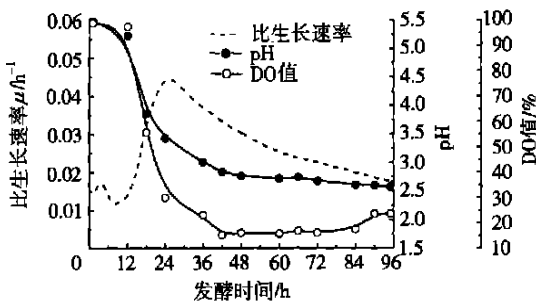


图 2 发酵过程中 pH, DO 值和比生长速率的变化曲线

Fig. 2 The relationship between pH, DO value and specific growth rate

从图 2 中看出 pH 呈下降的趋势, 且在细胞生长的旺盛期, 即比生长速率最大的时期, pH 下降最快, 这说明在菌体细胞生长的同时, 黑曲霉大量产酸; 而在产酶高峰期 pH 下降趋缓, 说明其代谢产酸量减少。由于黑曲霉产植酸酶的代谢机理十分复杂, 如何预测和控制发酵过程 pH 的变化, 有待于更深入的研究和探讨。

2.4 细胞生长动力学

Verhulst-Pearl 提出的 Logistic 方程是目前应用较为普遍的方程之一, 多用于单细胞菌的生长动力学^[4]。由于黑曲霉是多细胞生长, 且存在 12 h 的生长迟滞期, 根据 2.2 中得到的细胞生长曲线及碳源是黑曲霉生长限制性基质的假设, 采用修正后的 Logistic 方程来描述黑曲霉细胞生长动力学, 其基本形式为

$$dX/dt = K \cdot (1 - X/X_m) \cdot X \quad (1)$$

将式 (1) 积分可得

$$\ln [(X / (X_m - X))] = K \cdot t - \ln (X_m / X_0 - 1) \quad (2)$$

式中: X_0 —— 初始菌体生物量, $X_0 = 0.223 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$;
 X_m —— 最大菌体生物量, $X_m = 1.19 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 。

采用最小二乘法应用数学计算软件对模型参数进行非线性回归, 得到 $K = 0.0671$ 。于是得到迟滞期 (即 $t = 0 \sim 12 \text{ h}$ 的阶段) 和迟滞期后 ($t > 12 \text{ h}$) 细胞生长的动力学方程

$$\left. \begin{aligned} X(t) &= 0.223 \{ \exp[0.0671(t - 12)] \} / \\ &\left\{ 1 - \frac{0.223 \{ 1 - \exp[0.0671(t - 12)] \}}{1.19} \right\} \quad (t > 12) \\ X(t) &= 0.223 \quad (t < 12) \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

2.5 产植酸酶动力学

根据黑曲霉产植酸酶的发酵过程属于部分相关模型, 即 Gaden 提出的 型发酵的假设, 采用 Luedeking-Piret 方程描述产酶速率和细胞生长速率的关系:

$$dP/dt = (dX/dt) + \cdot X \quad (4)$$

将式 (4) 从 0 ~ t 积分后得到

$$P(t) = P_0 + \cdot [X(t) - X_0] + \cdot \left\{ (X_m / K) \ln \{ 1 - (X_0 / X_m) \cdot [1 - \exp(-K \cdot t)] \} \right\} \quad (5)$$

式中: P_0 —— 起始酶活力, %;
 —— 生长相关产物生成因数;
 —— 生长无关产物生成因数。

采用最小二乘法应用数学计算软件对模型参数进行非线性回归, 得到

$$= 14.74, \quad = 5.92$$

考虑细胞生长迟滞期的影响, 最终得到产酶动力学方程

$$\left. \begin{aligned} P(t) &= 14.74 [X(t - 12) - 0.223] + \\ &105.20 \ln \{ 1 - 0.187 \{ 1 - \\ &\exp[0.0671 \cdot (t - 12)] \} \} \quad (t > 12) \\ P(t) &= 0 \quad (t < 12) \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

2.6 基质消耗动力学

分别以酶活力 P 对基质 (总糖) S, P 对菌体生物量 X, X 对 S 进行线性回归处理, 得率系数见表 1。

表 1 得率系数表
Table 1 Yield coefficient

参 数	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{X/S}$
得率系数	27.29	101.6	0.262
线性度 R^2	0.938	0.925	0.975

考虑到基质的消耗分为菌体生长消耗、产物合成消耗和菌体维持消耗 3 部分,其消耗速率可描述为

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{Y_{P/S}} + m_s X \quad (7)$$

式中 m_s 为维持常数。

根据式(1)和(4),将式(7)经过适当变形得到

$$-\frac{dS}{dt} = \left[\frac{1}{Y_{P/S}} + m_s \right] X + \left[\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{1}{Y_{P/S}} \right] \frac{dX}{dt} \quad (8)$$

令

$$b_1 = \left[\frac{1}{Y_{P/S}} + m_s \right] \quad b_2 = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{1}{Y_{P/S}} \right]$$

当菌体细胞生长速率 μ 恒定,即菌体生长处于稳态时,式(8)中第 1 个括号内的参数项

$$b_1 = - \left[(dS/dt) / X \right]_{\mu=c} \quad (9)$$

离散化处理

$$b_1 = - \left[(S/t) / X \right]$$

对式(9)以 $0 \sim t$ 做定积分得到

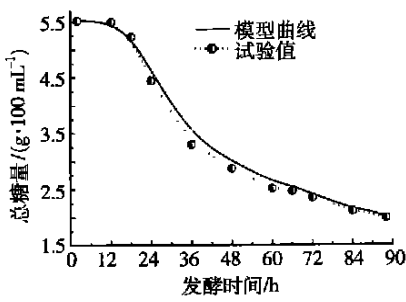
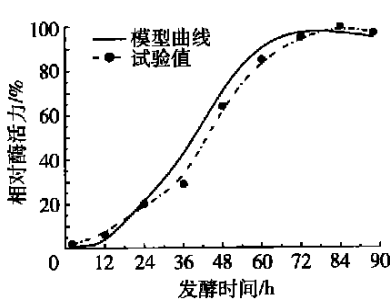
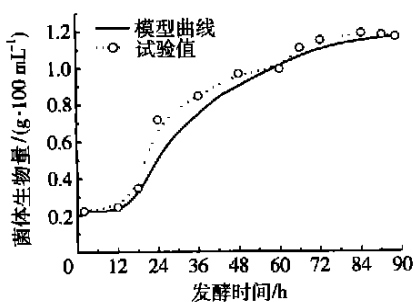


图 3 试验数据与动力学模型的拟合曲线

Fig. 3 Fitting curves between experiment values and kinetics models

3 结 论

通过对黑曲霉(*Asp. niger* ND313)液态发酵生产植酸酶的发酵过程和动力学研究,得到了以下结果:

1) 黑曲霉液态发酵摇瓶试验的结果在 10 L 生物反应器上的放大试验取得了较好的结果,最大菌体生物量(干重)达到 $1.19 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$,最高酶活力达到 $3.6 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2) 发酵液中的碳源是黑曲霉生长的限制性基

$$S(t) - S(0) = - [X(t) - X(0)] b_2 - \left\{ \frac{X_m}{K} \ln \left[1 - \frac{X_0 - X_0 \exp(K \cdot t)}{X_m} \right] \right\} b_1 \quad (10)$$

将试验测得的一系列 S, X 以及前面得到的 $K = 0.0671$ 代入式(10),并进行线性回归处理,得到

$$b_1 = 0.0154, b_2 = 2.43$$

考虑到细胞生长迟滞期的存在,最后得到基质消耗的动力学方程为

$$\left. \begin{aligned} S(t) &= 5.52 - 2.43[X(t-12) - 0.223] - 0.257 \cdot \\ &\quad \ln \left\{ 1 - \frac{0.233[1 - \exp(0.0671 \cdot (t-12))]}{1.19} \right\} \quad (t \geq 12) \\ S(t) &= 5.52 \quad (t < 12) \end{aligned} \right\} \quad (11)$$

2.7 试验值与动力学模型拟合曲线

利用 MatLab 数学软件将本文中得到的动力学方程与试验数据进行拟合,得到拟合曲线(图 3)。可以看出,试验值与动力学模型曲线拟合较好,证明本文中得到的数学模型能较好地解释黑曲霉液态发酵生产植酸酶的发酵过程。其中产酶动力学和基质消耗动力学模型曲线与试验值最大拟合误差分别为 9.7% 和 7.3%。对于细胞生长动力学,虽然总体上模型曲线与试验值拟合较好,但在个别区域误差较大(最大误差为 18.7%),讨论其原因认为是黑曲霉在 72 h 后出现二次生长现象所致。

质;植酸酶活力的增长趋势明显滞后于细胞生长的增长趋势,其发酵过程属于部分相关模型,即 Gaden 提出的 型发酵。

3) 通气量和搅拌速率的控制对于黑曲霉生长和产酶有很大影响。

4) 鉴于发酵过程细胞生长迟滞期的存在,对动力学模型进行分段处理可以取得较好效果。

5) 本文中建立的发酵动力学模型与试验数据拟合结果较好,能在一定程度上预测发酵过程。

(下转第 60 页)

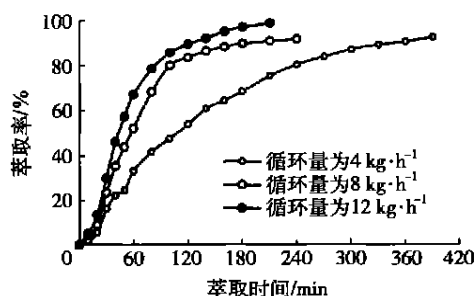


图3 不同 CO₂ 循环量下萃取率与萃取时间的关系

Fig. 3 The relationship between extraction rate and time under different quantity of cycling CO₂

3 结论

1) 在设计的试验条件下萃取压力对萃取率的影响大于萃取温度的影响。

2) 在 43 和 48 萃取温度下小麦胚芽油的萃取率高于 38 和 53 的萃取率, 所以超临界 CO₂ 萃取小麦胚芽油的理想萃取温度应在 43 ~ 48 范围内。

3) 在 20 ~ 30 MPa 萃取压力范围内, 萃取压力对萃取率影响非常明显, 随萃取压力的升高萃取率逐渐增大, 在操作费用与安全等其他条件许可的情

况下应尽可能增大萃取压力。

4) CO₂ 循环量也是影响小麦胚芽油萃取率的一个重要的外部因素, 尤其在较低循环量下影响非常明显。为此, 在萃取小麦胚芽油时, 要合理的选择 CO₂ 循环量。

参 考 文 献

- [1] 张元培. 展望新世纪的优质小麦品种研究与开发[J]. 粮食与饲料工业, 1998(7): 37 ~ 38
- [2] 蔡秋声. 小麦胚芽油[J]. 粮食与油脂, 1993(1): 78 ~ 82, (2): 58 ~ 62
- [3] 陆 龙. 小麦胚的提取及利用[J]. 粮食与饲料工业, 1995(12): 8 ~ 11
- [4] 孙 伟. 小麦胚芽和小麦胚芽油的开发与利用[J]. 粮食与饲料工业, 1998(8): 37 ~ 38
- [5] 马海乐, 姚 忠, 吴守一. 生育酚在超临界 CO₂ 中溶解度神经网络模型的建立[J]. 农业工程学报, 2001, 17(1): 127 ~ 132
- [6] Palmer M V, Ting S S T. Applications for supercritical fluid technology in food processing[J]. Food Chemistry, 1995, 52: 345 ~ 352
- [7] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998

(上接第 48 页)

参 考 文 献

- [1] Greiner R. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(5): 2234 ~ 2240
- [2] 马 玺, 单安山. 植酸酶研究进展及在饲料工业中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2001(4): 27 ~ 23
- [3] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989. 30 ~ 35
- [4] 刘淑芳, 蔡昭铃. 衣康酸发酵及动力学模型[J]. 化工冶金, 2000, 21(1): 58 ~ 63
- [5] Harland B F. Fermentative reduction of phytate in rye, white and whole wheat breads[J]. J Cereal Chemistry, 1980, 57(3): 226 ~ 229
- [6] Narang Atul, Konopka Allan, Ramkrishna Doraiswami. The dynamics of microbial growth on mixtures of substrates in batch reactors[J]. J Theor Biol, 1997, 184: 301 ~ 317
- [7] Greiner R, Konietzny U. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate[J]. J Biotechnol, 1996, 48: 1 ~ 2, 153 ~ 159
- [8] Ullah A H J. Aspergillus niger phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization[J]. Prep Biochem, 1988, 18(4): 459 ~ 471