

耐酸性 α -淀粉酶发酵动力学的研究刘永乐^{1,2},李忠海¹,俞健²,杨培华¹

(1.中南林业科技大学绿色食品研究所,湖南长沙410004;2.长沙理工大学,湖南长沙410076)

摘要:以AS-EUⅢ为发酵的出发菌株,进行10L发酵罐扩大培养发酵,确定了建立三个动力学模型,它们的线性拟合度达到95%以上,能较好地描述所建立的模型,为以后进一步研究和预测耐酸性 α -淀粉酶发酵过程奠定了理论基础。

关键词:耐酸性 α -淀粉酶,发酵,动力学

Study on kinetics of acid-resistant α -amylaseLIU Yong-le^{1,2}, LI Zhong-hai¹, YU Jian², YANG Pei-hua¹

(1.Green Food Institute of Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China;

2.Changsha University of Science and Technology, Changsha 410076, China)

Abstract: The kinetics of acid-resistant α -amylase fermentation process was studied. The mathematical kinetic models describing the course of fermentation were established. The perimental data showed that the model could describe acid-resistant α -amylase fermentation quite well. This will provide the theoretical foundation for the further study and forecast of the fermentation process in future.

Keywords: acid-resistant α -amylase; fermentation; kinetics

中图分类号:TS201.2⁺5

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2008)01-0060-03

近年来,随着淀粉质原料深加工工业的发展,工艺条件的改变,一些深加工工艺须在较低的pH条件下进行,使耐酸性 α -淀粉酶成为研究的热点,具有很大的应用潜力和开发前景,在酒精、食品、饲料、医药等领域得到充分的发挥和利用。我国是一个农业大国,淀粉资源十分丰富,淀粉酶应用范围广泛,淀粉酶工业的发展也必将促进我国的其它工业基础的迅速增长。但是,我国的产耐酸性 α -淀粉酶菌株所分泌的酶活跟国外相比,尚有一定的差距^[1,2]。而迄今为止,虽然国内外关于耐酸性 α -淀粉酶发酵条件优化方面的报道较多^[1-3],而对其发酵特性、发酵动力学未见报道。本文利用常见的发酵动力学模型,来描述耐酸性 α -淀粉酶的发酵动力学过程。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1AS-EUⅢ菌株 由本实验室从AS-Y诱变所

得;种子培养基(W%) 酵母膏0.5、蛋白胨1、可溶性淀粉1、NaCl 0.2、MgSO₄·7H₂O 0.05、KH₂PO₄ 0.05, pH 4.2;发酵培养基(%) 可溶性淀粉1.5、蛋白胨2、酵母膏0.5、MgSO₄·7H₂O 0.05、KH₂PO₄ 0.1、NaCl 0.2、CaCl₂ 0.1, pH 4.2。

SY3000E发酵罐 上海世友生物设备有限公司。

1.2 培养条件

1.2.1 斜面菌株活化 试管菌株在28℃中培养2~3d。

1.2.2 种子液培养 在250mL的三角瓶中装量40mL,四层纱布封口,30℃,180r/min振荡培养27h。

1.2.3 10L发酵罐分批发酵 10L的发酵罐中装量5L,接种量为10%,温度控制在30℃,通风比为1:1,搅拌速度为300r/min,流加6mol/L HCl和6mol/L NaOH,控制pH为4.2。

1.3 分析方法

1.3.1 菌体干重测定 取10mL发酵液于预先干燥好的离心管中,3000r/min离心15min,弃上清液,用蒸馏水将沉淀物洗涤转移到干燥皿中,于105℃烘干

收稿日期:2007-08-15

作者简介:刘永乐(1962-),男,教授,研究方向:食品生物技术。

基金项目:湖南省长沙市科技局计划项目(K051053-12)。

[5] 赵允麟,赵莉.黑曲霉复合酶的调节与控制[J].工业微生物,2001,31(3):19~22.

[6] 刘伟雄.游离果胶酶和固定化果胶酶酶学性质[J].食品研究与开发,2001,22(4):5~7.

[7] 尤华,陆兆新,冯红霞.曲霉液体发酵产原果胶酶的条件优化研究[J].微生物学通报,2003,30(1):26~30.

[8] 郭鲁宏,扬顺楷.黑曲霉单宁酶高活性菌株的诱变选育

[J].微生物学通报,2007,27(2):105~107.

[9] 杨辉,陈合,石振海.果胶酶在苹果酒生产中的应用[J].食品与发酵工业,2003,29(12):110~112.

[10] 尤华,陆兆新,冯红霞.微生物原果胶酶的研究进展[J].工业微生物,2002,32(1):50~53.

[11] 陈峰,赵学慧.液体发酵生产霉菌果胶酶的工艺条件[J].中国酿造,1998(5):4~5.

至恒重,称重,即为菌体干重,换算为 g/L。

1.3.2 淀粉基质消耗的测定^[4] 采用宁正祥的淀粉测定方法。

1.3.3 酶活力的测定 在 10mL 试管中,依次加入 1mL 0.5% 的可溶性淀粉溶液和 2.5mL pH4.2 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,40℃ 预热 10min。加入 0.5mL n 倍稀释的酶液,40℃ 保温 5min 后,加入 1mL 0.1mol/L H₂SO₄ 终止反应。2mL 反应液和 0.5mL 0.5% KI-I₂ 溶液显色,测定 OD₆₂₀,与淀粉梯度标准曲线对照得反应液淀粉浓度后,计算酶活力^[4]。酶活力单位:在 pH4.2、温度 40℃ 下,5min 水解可溶性淀粉 1mg 所需的酶量为一个活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 10L 罐分批发酵实验的特征

AS-Y 诱变菌株在 10L 发酵罐上分批发酵的过程曲线如图 1 所示。

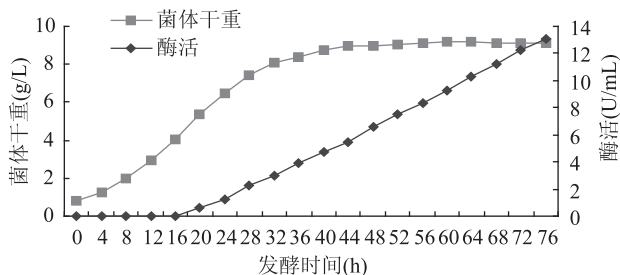


图 1 10L 罐分批发酵过程曲线

一般来说,发酵产物的形成与菌体生长的关系可分为:与生长相关型;与生长部分相关型;与生长不相关型。由图 1 可知,该发酵类型为与生长部分相关型。

2.2 发酵动力学模型的建立

2.2.1 菌体生长动力学模型的建立 由图 1 可知,该菌株的生长曲线是典型的 S 型曲线,采用 Logistic 方程能较好地描述菌体的生长规律,反映出分批发酵过程中,因菌体浓度的增加对自身生长存在的抵制作用,并能较好地拟合分批发酵过程的菌体的生长规律。

Logistic 方程:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X$$

积分得:

$$X = \frac{X_0 X_{\max} e^{\mu_{\max} t}}{X_{\max} - X_0 + X_0 e^{\mu_{\max} t}} \quad \text{式(1)}$$

式中: μ_{\max} 为最大比生长率(h); X_{\max} 为菌体生长上限(g/L)。

分批发酵开始时,菌体浓度很低, X/X_{\max} 项可忽略不计,式(1)表示菌体呈指数生长;对数生长结束后,在稳定期时 $X = X_{\max}$,式(1)表示菌体停止生长。

2.2.2 产物生成动力学模型的建立 微生物代谢产

物的生物合成是一个极其复杂的过程,产物主要是指细胞培养过程中代谢生成的细胞量以外的产物。目前大多数研究只限于以宏观过程变量描述的非结构模型,一般按照产物生成与菌体生长的特点,Gaden 将产物形成分为 3 类:生长偶联型,即只是在菌体生长时才有产物的生成;部分生长偶联型或称混合型,即菌体生长阶段有部分产物生成,而大部分产物是在菌体生长稳定期生成的;非生长偶联型,即只要有细胞存在,产物就会生成。Luedeking 和 Piret^[5] 提出如下模型来描述产物形成与细胞生长的关系。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{式(2)}$$

当 $\alpha > 0, \beta = 0$ 时,为生长偶联型;当 $\alpha > 0, \beta > 0$ 时,为部分生长偶联型;当 $\alpha = 0, \beta > 0$ 时,为非生长偶联型。

由前面所知,本实验产物形成与菌株生长的关系属于部分生长偶联型,故可用 Luedeking 和 Piret 方程来描述其产物生成动力学模型。

2.2.3 基质消耗动力学模型的建立 发酵过程中,淀粉主要用于细胞的生长以及用于维持细胞基本生命活动和代谢产物的生成。为方便建模的简化,可将酸性 α -淀粉酶的分批发酵过程限制性基质的消耗分为两个阶段:长菌消耗和产酸消耗,可将维持生命活动的基质消耗包括在长菌阶段,因此限制性基质的消耗模型方程可用下式来描述:

$$-\frac{ds}{dt} = k_1 \frac{dx}{dt} + k_2 \frac{dP}{dt} \quad \text{式(3)}$$

式中: k_1 表示用于菌体生长的底物消耗常数; k_2 表示用于产物形成的底物消耗常数。

2.3 模型参数求解

应用 MATLAB 软件编程,进行非线性规划,采用的算法为全局性收敛的 Levenberg-Marquardt 修正的高斯-牛顿法,以误差平方和最小为目标,获得待估参数。根据发酵实验数据和经验模型参数的初估值,经高斯-牛顿法逐步迭代进行拟合处理,不断修正模型参数的初估值,直到获得全局性收敛的最优参数估计值。应用 nlparci 函数还可以得到参数的置信区间,结果见表 1。

因此,非线性规划得到的 3 个发酵动力学数学模型为:

$$\frac{dX}{dt} = 0.1358 \left(1 - \frac{x}{9.1684}\right) X$$

$$\frac{dP}{dt} = 0.1027 \frac{dX}{dt} + 0.0255 X$$

$$-\frac{ds}{dt} = 0.3815 \frac{dx}{dt} + 0.4239 \frac{dP}{dt}$$

2.3.1 菌株 AS-EU III 发酵动力学曲线拟合分析 为了进一步衡量所建数学模型的可靠性,利用

表 1 分批发酵动力学模型参数估计值

参数	μ_{\max}	X_0	X_{\max}	α	β	k_1	k_2
估计值	0.1358	0.7772	9.1684	0.1027	0.0255	0.3815	0.4239
95% 置信区间	(0.1330, 0.1385)	(0.7421, 0.8122)	(9.1347, 9.2021)	(0.0569, 0.1484)	(0.0246, 0.0265)	(0.3606, 0.4024)	(0.4079, 0.4400)

表2 分批发酵动力学模型计算值与实验值的比较

发酵时间(h)	菌体量(g/L)		基质消耗量(g/L)		产物生成量(U/mL)	
	实验值	拟合值	实验值	拟合值	实验值	拟合值
0	0.812	0.777	15.00	15.00		
4	1.216	1.261	14.81	14.81		
8	2.013	1.974	14.42	14.54		
12	2.971	2.941	13.90	14.13		
16	4.047	4.111	13.30	13.66	0.044	0.241
20	5.368	5.347	12.52	12.99	0.579	0.582
24	6.451	6.478	11.85	12.19	1.256	1.061
28	7.400	7.387	11.02	11.39	2.245	1.664
32	8.118	8.041	10.45	10.66	2.983	2.378
36	8.406	8.478	9.87	10.09	3.900	3.189
40	8.756	8.754	9.45	9.60	4.690	4.042
44	8.961	8.923	9.00	9.15	5.494	4.934
48	8.993	9.024	8.50	8.72	6.576	5.858
52	9.078	9.084	8.11	8.29	7.508	6.789
56	9.131	9.119	7.78	7.89	8.357	7.729
60	9.220	9.140	7.40	7.51	9.257	8.674
64	9.178	9.152	7.00	7.11	10.290	9.631
68	9.134	9.158	6.56	6.73	11.223	10.589
72	9.127	9.163	6.20	6.36	12.213	11.540
76	9.118	9.165	5.82	5.99	13.044	12.490

MATLAB 软件中的 nlinfit 函数对菌株的发酵动力学模型进行非线性拟合,所得图形如图 2~图 4 所示,在置信区间为 95% 时,所得的拟合曲线较理想。

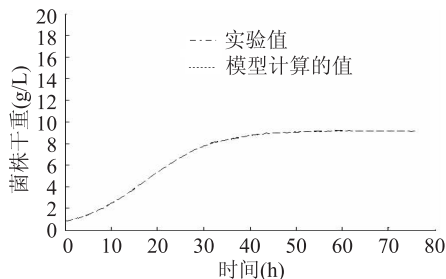


图2 菌体生长拟合曲线

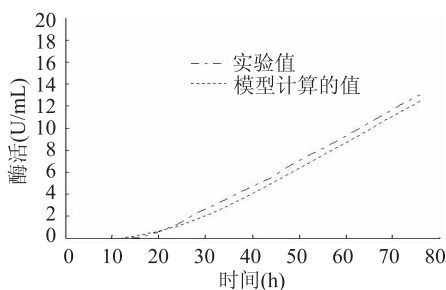


图3 产物形成拟合曲线

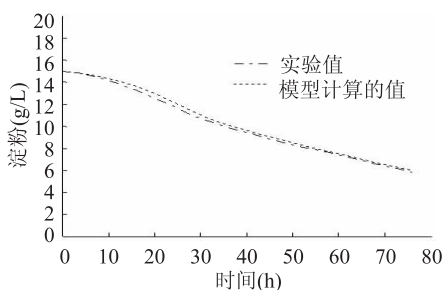


图4 底物消耗拟合曲线

2.3.2 实验值与拟合值的比较 根据所建立的发酵动力学模型表达式,应用 nlpredci 函数,可得到分批发酵过程中的菌体量、基质消耗量和产物生成量随着发酵时间变化的拟合值,进而可计算出实验值与拟合值之间的相对误差,结果如表 2。

由表 2 可以看出,拟合值与实验值非常接近,在置信区间为 95% 时,拟合情况较好,说明所建模型能较好地反映菌株 AS-EU III 分批发酵的过程。

3 结论

对菌株 AS-EU III 进程数据进行了初步的动力学研究,得到了三个发酵动力学模型方程。菌体生长模型、底物消耗模型及代谢产物生成模型的拟合度分别达到 95% 以上,表明该方程能较好地描述菌株 AS-EU III 的生长动力学、底物消耗及代谢产物生成的情况。

参考文献:

- [1] Sudo S. Growth of submerged mycelia of aspergillus kawachii in solid - state culture [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 79(3): 252~256.
- [2] 向文良,张文学,罗红平. 利用白曲霉菌基因工程菌 TR12 制备优质麸曲的工艺条件研究[J]. 中国酿造,2003(6): 10~14.
- [3] 刘春莉,张文学,杨瑞. 耐酸性液化糖化淀粉酶的液态发酵工艺的研究[J]. 四川大学学报,2003, 35(2):87~91.
- [4] 陈波,李大力,杨树林. 酸性 α -淀粉酶生长菌株的筛选和酶的纯化及酶学的性质研究[J]. 食品科学,2005,26(5): 119~112.
- [5] Luedeking R, Piret E. A kinetic study of the lactic acid fermentation; Batch process at controlled pH [J]. Microbiol. Biotechnol,1959(1): 363~394.