文章编号：1009－038X(2003)04－0041－04

米曲霉固体发酵过程中的动力学

张玉涛， 许学书， 王 宏

（华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室，上海 200237）

摘 要：对米曲霉固体发酵生产酱油过程中各阶段的微生物动力学行为进行了研究，应用动力学的概念对所建立的菌种筛选模型进行了解释. 种子生长和发酵阶段的研究结果表明：碳源是米曲霉产孢子的速率限制性底物，种子阶段孢子对残总糖的产率系数为 $Y_{X/S}=2.428\times10^{10}$个／g，最大比生长速率 $\mu_{max}=5.28\ d^{-1}$，产孢子的最大比生长速率与温度之间的关系呈钟罩形. 同时建立了产孢子速率与水分含量的关系以及产酶速率与水分之间的关系. 在发酵过程中发现了米曲霉的二次生长现象，该现象出现的时间随不同的底物比例发生迁移.

关键词：米曲霉；固体发酵；动力学

中图分类号：TS 261.12　　**文献标识码**：A

On the Kinetics of *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation

ZHANG Yu-tao， XU Xue-shu， WANG Hong

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: To reveal the dynamic behavior of *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation, the solid fermentation kinetics of *Aspergillus oryzae* for different soy sauce production stages were studied, and the model for screening strains was established and then interpreted based on the kinetics obtained. The results showed that carbon source is a rate-limiting substrate for spore producing, the yield coefficient of spores to the total sugar are 2.428×10^{10} spores／g and the maximal specific growth rate at the seed growth state, 5.28 d^{-1} respectively. The relationships between the different speed parameters and operating conditions were also established. The second growth phenomenon of *Aspergillus oryzae* during the fermentation stage was discovered. The occurrence time of the second growth changed with the different substrate ratio.

Key words: *Aspergillus oryzae*; solid state fermentation; kinetics

利用米曲霉(*Aspergillus oryzae*)发酵生产蛋白酶是一个典型的固体发酵过程，在酱油酿造中广泛应用. 由于固体发酵的底物和产物不是纯净的化学物质，比较难于描述，因此有关这方面的动力学研究非常少[1,2]. 为了对传统加工过程有更加深入地了解，为用现代化的技术和手段改造传统工艺和设备提供理论基础，作者对米曲霉固体发酵中的各个阶段进行动力学研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)沪酿 3042，由上海

收稿日期：2003－04－10； 修回日期：2003－05－06.

作者简介：张玉涛(1977－)，男，河南三门峡人，食品科学硕士研究生.

万方数据

钱万隆酱油厂提供.

1.2 主要仪器

UV754 型紫外可见分光光度计:上海第三分析仪器厂生产;LABOPHOT-2 型光学显微镜:日本尼康公司生产;元素分析仪:德国 elementar vario EL III;恒温水浴摇床:德国 HAAKE 公司生产.

1.3 培养基

种子培养基:麸皮 80 g,面粉 20 g,水 80 mL(原配比).

发酵培养基:麸皮 40 g,豆粕 220 g,水 157 mL(原配比).

一般平板:5°Bx 黄豆汁培养基,酪蛋白平板培养基.

1.4 实验方法

1.4.1 孢子数的测定 比浊度法与显微镜血球计数板计数法[3].

1.4.2 残总糖的测定 费林试剂法[4].

1.4.3 蛋白酶活的测定 福林试剂法[4].

1.4.4 综合酶活的测定 甲醛滴定法[4].

2 结果与讨论

2.1 生物系统中各组分的成分分析

用元素分析仪对原料、培养基以及菌丝体和孢子的碳氮质量分数进行了分析,结果见表 1.

表 1 各物质碳、氮质量分数

Tab.1 The content of carbon and nitrogen

底物	氮质量分数/%	碳质量分数/%	C/N
麸皮	2.70	40.05	14.83
豆粕	7.58	41.66	5.49
种子培养基	2.56	38.84	15.17
发酵培养基	6.83	41.41	6.06
菌丝体	7.52	41.68	5.54
孢子	6.14	42.46	6.91

从元素分析的结果来看,孢子的 C/N 要比菌丝体高,由此判断高碳氮比有利于产孢子.

2.2 酪蛋白平板培养基动力学

米曲霉产蛋白酶能够分解酪蛋白产生透明圈,因此可根据酪蛋白透明圈的大小测定其产酶能力的高低.定义单菌落所产透明圈的直径(D_T,mm)与菌落直径(D,mm)之比为 K,U 为用该菌落固体发酵后产氨基氮的量,即综合酶活.用不同的菌落进行实验,结果见表 2.

表 2 菌落产酶能力与菌落直径和 K 值之间的关系

Tab.2 The relationship between the enzyme activity and the colony diameter and K

菌落直径/mm	K 值	酶活/(g 氨基氮/100g 干基)
13.8	1.29	0.874
17.5	1.33	0.987
11.7	1.36	0.905
17.5	1.37	1.080
14.5	1.38	0.962
20.9	1.39	1.200
15.0	1.39	0.970
20.5	1.41	1.230
20.7	1.45	1.300

根据表 2 回归得到不同菌落的酶活(U,g/100 g)与 K 值和菌落直径(D,mm)之间的关系为

$$U = 1.30K + 0.032D - 1.26 \quad (1)$$

式中菌落直径 D 相当于比生长速率,K 值相当于个体孢子产酶的产率系数,对于不同的菌落,比生长速率和产率系数不同,因此它们的 K 值和 D 值也不同.根据式(1)可以通过酪蛋白平板培养判断菌株的固体发酵酶活.

2.3 种子生长阶段的动力学

2.3.1 速率限制性底物和底物抑制性的判断 表 3 中的添加比例是按各碳源和氮源中碳元素和氮元素的绝对量计算的,是在原培养基的配比上再加入相应比例的碳源或氮源的量.从表 2 可以看出,氮源和碳源都会对米曲霉的产孢产生抑制作用.在低添加量下,碳源对产孢具有明显的促进作用,说明碳源是米曲霉产孢子的速率限制性底物.葡萄糖比可溶性淀粉对米曲霉产孢子的促进作用要明显.在氮源中,豆粕的效果要比其它两种氮源的效果好,说明米曲霉分解利用植物蛋白质的能力要比动物蛋白质和无机氮源的能力强.

表 3 碳源和氮源对米曲霉产孢子的影响

Tab.3 The effect of carbon and nitrogen source on the spores production

添加物		孢子密度/($\times 10^9$个/g)			
		0% 添加量	0.25% 添加量	0.5% 添加量	1% 添加量
碳源	可溶性淀粉	2.64	2.95	2.56	2.38
	葡萄糖	2.64	3.53	2.86	2.31
氮源	蛋白胨	2.64	2.05	1.56	1.04
	豆粕	2.64	2.55	2.29	2.12
	硫酸铵	2.64	2.35	2.20	2.05

2.3.2　米曲霉种子生长的时间进程　米曲霉种子生长过程中的时间曲线见图 1.

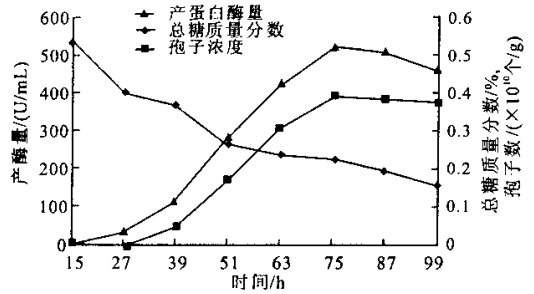


图 1　米曲霉种子生长的时间曲线

Fig.1　Time course of the seeds growth

从图 1 可以看出,米曲霉从 39 h 左右进入产孢子的对数期,一直到 75 h 左右达到最大. 产酶量也在 75 h 达到最大,然后又逐渐降低. 因此要得到生长旺盛活力高的孢子,应当控制种子培养时间在 75 h 左右.

假设在产孢子的对数期产率系数为一常数,根据图 1 的曲线,可以得到孢子相对于总糖的产率系数:

$$Y_{X/S}=-\Delta c_x/\Delta c_s=-\frac{3.351\times10^9\text{个}/\text{g}}{-0.138\ \text{g}/\text{g}}=2.428\times10^{10}\text{个}/\text{g} \quad (2)$$

设产孢子的对数期为非限制性生长期,孢子的比产生速率达最大值,为一常数,根据比生长速率的定义有

$$\mu_{max}=\frac{1}{X}\cdot\frac{dX}{dt} \quad (3)$$

以 39～63 h 为区间,积分得

$$\mu_{max}=(\ln X-\ln X_0)/(t-t_0)=5.28\ d^{-1}$$

2.3.3　温度对米曲霉种子生长的影响　米曲霉在不同温度下进行种子培养,产孢子情况见图 2.

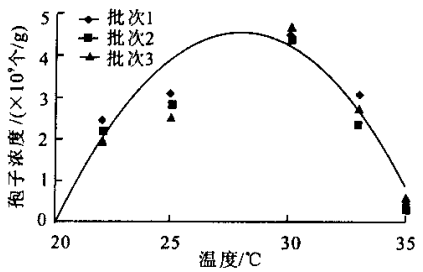


图 2　温度对米曲霉种子生长的影响

Fig.2　The effect of temperature on the seeds growth

当温度从 30 ℃升高至 35 ℃,米曲霉产孢子能力下降程度超过 85%. 而从 30 ℃降低至 25 ℃,产孢子能力只下降 30%左右. 高于最佳温度处的曲线比低于最佳温度处的曲线陡,说明超温对产孢更为不利. 产孢速度对温度非常敏感,固体发酵过程中品温的波动应当控制在 25～32 ℃之间.

2.3.4　水分含量对米曲霉种子生长的影响　水分对微生物的生长具有十分重要的作用,不仅能够起到运输介质的作用,而且还参与了许多代谢过程中水化反应[5]. 在液体发酵中通常不需要考虑水分的影响,由于在固体发酵中水分是不充足的,它成了固体发酵中的一个特有参数. 水分对米曲霉种子生长的影响见图 3.

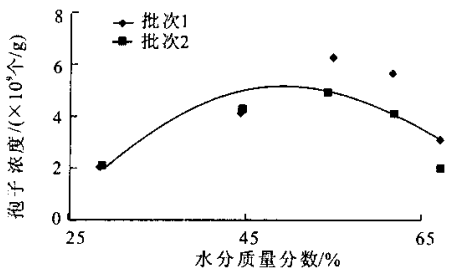


图 3　水分对米曲霉产孢子的影响

Fig.3　The effect of moisture on the seeds growth

从该曲线可以看出,在低水分时,产孢子量随着水分质量分数的升高而上升,当水分含量进一步加大时,孢子产量反而下降. 通常丝状真菌处于液体环境中是不产孢子的[6].

根据不同水分质量分数下米曲霉孢子的增长情况,可以得到孢子增长速率 R_S(×10⁹ 个/(g·d))与水分质量分数(g/g)之间的关系:

$$R_S=\frac{0.6444}{1-\frac{0.6960}{[H_2O]}+\frac{0.1685}{[H_2O]^2}}$$

从图 3 中的曲线以及所得到的公式来看,水分对米曲霉产孢子具有底物抑制现象,表明水分在产孢子过程中具有抑制性的限制性底物性质.

2.4　发酵产酶阶段的动力学

2.4.1　米曲霉发酵过程中的二次生长现象及其迁移　米曲霉发酵过程中分解底物产生氨基氮的综合酶活和蛋白酶的产生情况见图 4. 从图 4 可以看出,发酵 12 h 后,米曲霉开始分泌蛋白酶,当到 27 h 时,分泌产生蛋白酶的量达到最大. 氨基氮的质量分数在固体培养基中累积,由于胞外酶的存在,氨基氮的质量分数应当一直上升,至 21 h 左右氨基氮的质量分数就开始趋于平缓. 24 h 以后培养基中 pH 值明显迅速上升,并在后期产生氨味. 这是由于在发酵后期碳源不足,米曲霉开始利用氨基酸作为碳源,进入了脱氨基的代谢途径,释放出氨造成的[5]. 这是生产中应当避免的途径,因此发酵时间

万方数据

应当控制在 21 h 左右.

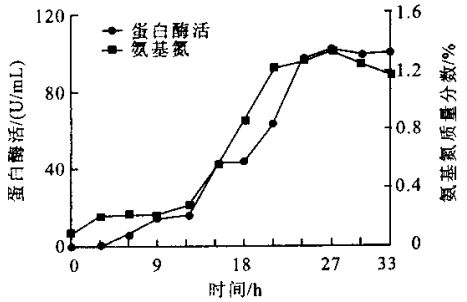


图 4 米曲霉发酵过程的时间进程

Fig.4 The fermentation time course

发酵培养基中 C/N 较低,米曲霉不易产孢子. 米曲霉菌丝体生长过程中伴随着蛋白酶的分泌,根据蛋白酶的产生可以判断菌丝体的生长状况. 由图 4 可见,15～18 h 出现了分泌蛋白酶的停滞现象. 一般微生物在生长过程中出现暂时停滞而后又开始生长的现象称为二次生长现象,它一般是由于生长过程中对底物的利用发生转变而引起的. 可见米曲霉在发酵过程中产生了二次生长的现象. 发酵培养基含麸皮和豆粕两种底物,调整底物的比例可使二次生长的时间发生迁移(见图 5). 当培养基中麸皮与豆粕质量比增加到 1∶2 时,停滞期延后到 18 h 出现,全豆粕的培养基不出现停滞阶段. 这说明米曲霉在发酵过程中利用底物麸皮和豆粕的情况发生了转变,导致了二次生长现象的发生. 二次生长现象出现的时间影响终态的酶产量,产酶量随底物中 C/N 的增加而增加.

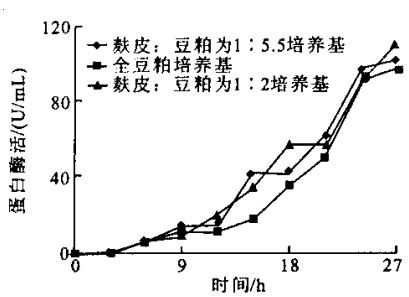


图 5 不同底物配比下米曲霉发酵产酶曲线的迁移

Fig.5 The shifting of the second growth at different substrate ratio

2.4.2 温度对发酵过程的影响 温度对发酵的影响结果见图 6,可见温度对产酶的影响与温度对产孢的影响趋势相同. 当温度从 30 ℃升高到 36 ℃左右时,酶活下降了 40% 左右. 而当温度从 30 ℃下降到 25 ℃左右时,酶活则下降不大. 可见温度的升高对米曲霉产酶的影响要大于温度降低的影响.

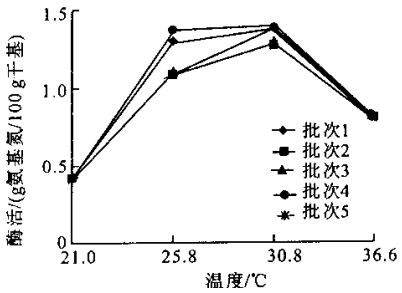


图 6 温度对米曲霉发酵产酶的影响

Fig.6 The effect of temperature on the fermentation

2.4.3 水分质量分数对米曲霉发酵过程的影响 米曲霉在不同水分条件下发酵,其综合酶活的情况见图 7.

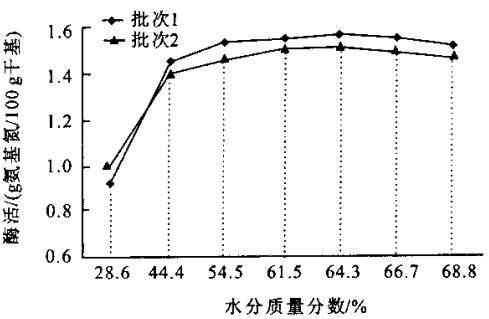


图 7 水分含量对米曲霉发酵产酶的影响

Fig.7 The effect of moisture on the fermentation

随着水分质量分数的上升,米曲霉产酶能力也随之上升,而后基本保持不变. 说明水分对产孢子和产酶过程的影响不同,水分对菌丝体的生长没有抑制.

根据实验测得的不同水分条件下的产酶情况,可以得到水分质量分数与米曲霉产酶速率 R_P(g/100(g·h))的关系:

$$R_P=\frac{0.103\cdot[H_2O]}{0.387+[H_2O]}$$

3 结 论

1) 建立了米曲霉产酶能力的筛选模型,得到了产酶能力与 K 值和菌落直径 D 的关系

$$U=1.30K+0.032D-1.26$$

2) 对米曲霉培养过程中的动力学行为研究结果表明,碳源是米曲霉产孢子的速率限制性底物,在发酵过程中由于所利用底物的转变发生了二次生长现象. 同时得到了种子生长阶段产孢数对残总糖的产率系数 $Y_{X/S}=2.428\times10^{10}$个/g,最大比生长速率 $\mu_{max}=5.28\ d^{-1}$. 温度升高对种子生长和发酵过程的抑制作用都十分明显. (下转第 48 页)

万方数据

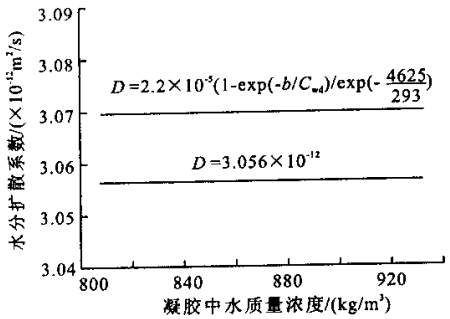


图 5 两种扩散系数估计值比较

Fig. 5 The comparison of the two estimated diffusivities

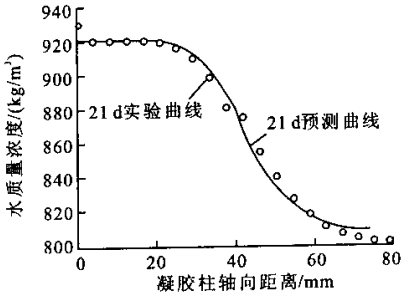


图 6 明胶水分扩散系数估计值的验证

Fig. 6 The verification of the estimated water diffusivity in gelatin gel

4 结 论

明胶凝胶类的无孔隙收缩性固体，可以根据 Fick 第二扩散模型、样品密度与水分含量之间的关系式和渗透扩散实验得到的水分分布曲线，采用变步长手段对其水分扩散系数进行数值法估算.

在一定的水分含量差范围和一定温度条件下，明胶凝胶的扩散系数可作常数处理.

参考文献：

[1] Crank J. The Mathematics of Diffusion[M]. Oxford : Clarendon Press, 1976. 160-202.

[2] C Bronazzi, A Rippoche, C Michon. Moisture diffusion in gelatin slabs by modeling drying kinetics[J]. **Drying Technology**, 1997, 15(6-8): 2045 - 2059.

[3] N P Zogzas, Z B Maroulis, D Marinos-Kouris. Moisture diffusivity data compilation in foodstuffs[J]. **Drying technology**, 1996, 14(10): 2225 - 2253.

（责任编辑 朱 明）

（上接第 44 页）

孢子增长速率 R_S 与水分含量之间的关系：

$R_S = 0.644\ 4 / (1 - 0.696\ 0 / [H_2O] + 0.168\ 5 / [H_2O]^2)$

在发酵阶段水分与产酶速率 R_P 之间的关系：

$R_P = 0.103 \times [H_2O] / (0.387 + [H_2O])$

参考文献：

[1] Mitchell D A, Von Meien O F. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2000, 68: 127 - 135.

[2] Brand D, Pandey A, Rodriguez-Leon J A, *et al*. Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation[J]. **Biotechnol Progress**, 2001, 17(6): 1065 - 1070.

[3] 沈萍，范秀容，李广武. 微生物学实验[M]. 北京：高等教育出版社，1999.

[4] 张龙翔，张庭芳，李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京：高等教育出版社，1987.

[5] 沈同，王镜岩. 生物化学(下册)[M]. 北京：高等教育出版社，1981.

[6] 邢来君，李春明. 普通真菌学[M]. 北京：高等教育出版社，1999.

（责任编辑 李春丽）

万方数据