

脉冲电场促进黑曲霉生长提高产酶活性

刘振宇¹, 宋艳波^{2*}, 高瑞梅², 李林葳¹, 杨政³, 贾丽艳⁴

(1. 山西农业大学信息科学与工程学院, 晋中 030801; 2. 山西农业大学生命科学学院, 晋中 030801;
3. 山西农业大学工学院, 晋中 030801; 4. 山西农业大学食品科学与工程学院, 晋中 030801)

摘要:为了探讨脉冲电场对黑曲霉生长和糖化酶活性的影响, 研究采用响应面法设计脉冲电场工作参数(脉冲强度 5~15 kV/cm、脉冲持续时间 10~100 μ s 和脉冲数 50~99)并对黑曲霉孢子悬液进行处理和培养。结果表明: 脉冲强度显著($P<0.05$)影响菌丝干质量和产糖化酶能力, 当脉冲强度为 12.975 kV/cm、脉冲宽度为 54 μ s 和脉冲数为 66, 黑曲霉的菌丝干质量和糖化酶活性分别为 28.05 mg 和 18.01 U/mL, 比对照(未采用脉冲处理)提高了 68.27% 和 14.71%; 酯酶同工酶分析未显示出 PEF 对黑曲霉有诱变作用, 但 PEF 处理明显刺激了黑曲霉孢子萌发, 使孢子萌发率增加了 77.8%~231%。该研究为黑曲霉菌等霉菌生物学性能的提高及其在实际生产中的应用提供理论依据。

关键词: 电场; 酶; 优化; 脉冲电场; 黑曲霉; 糖化酶; 酯酶同工酶

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.19.037

中图分类号: TP391.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2019)-19-0299-08

刘振宇, 宋艳波, 高瑞梅, 李林葳, 杨政, 贾丽艳. 脉冲电场促进黑曲霉生长提高产酶活性[J]. 农业工程学报, 2019, 35(19): 299—306. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.19.037 <http://www.tcsae.org>

Liu Zhenyu, Song Yanbo, Gao Ruimei, Li Linwei, Yang Zheng, Jia Liyan. Pulsed electric field promoting *Aspergillus niger* growth and enzyme activity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, (35): 299—306. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.19.037 <http://www.tcsae.org>

0 引言

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是国际公认的生物技术中最重要的微生物之一。从1919年黑曲霉生产柠檬酸被工业化开发, 首次获得实际应用开始, 至今黑曲霉一直是工业应用中重要的研究对象^[1]。目前, 黑曲霉发酵产生的多种代谢产物在发酵饲料、食品添加配料、工业酶制剂以及医药方面都有重大作用^[2-4]。黑曲霉是多种酶的来源, 成为众所周知的外源蛋白和酶的细胞生产工厂, 其生产的糖化酶已经实现了规模化工业应用^[5]。而且, 柠檬酸和许多黑曲霉的酶被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)认为是GRAS(Generally regarded as safe)产品, 此外, 黑曲霉还可用于生物转化和废物处理^[1]。因此研究黑曲霉菌种特性、培养环境、发酵体系, 采用物理、化学和生物技术等手段改造黑曲霉菌种, 提高菌株对目标代谢物的生产能

力成为目前国内外研究的热点。研究黑曲霉菌丝生长形态和特异性蛋白酶活性与高水平葡萄糖淀粉酶活性关系^[6], 优化生产工艺提高黑曲霉中壳聚糖产量和功能活性^[7], 采用⁶⁰Co射线和紫外辐照结合处理黑曲霉孢子获得环氧化物水解酶(epoxide hydrolase, EH)高产菌株^[8]。这些技术本身具有一定限制, 如产生不需要的化学残留物和需要很长时间培养等。而脉冲电场作为非热处理技术, 以其绿色环保, 节约能源和可提高某些微生物细胞活性和发酵能力, 有望发展为解决这些问题的可替代技术。

脉冲电场(pulsed electric field, PEF)处理是一种新型的细胞电穿孔技术^[9]。在外加 PEF 作用下, 细胞膜上形成小孔的过程即为电穿孔。在一定条件下形成的电穿孔是不可逆的, 使细胞死亡, 可以有效杀灭食品中的多种食源性、腐败性和致病性微生物, 广泛用于果汁等流动和果酱等半流动及鲜果和肉类保鲜贮藏及品质改善^[9-12]; 在医学中作为联合治疗技术和直接治疗方法进行肿瘤细胞杀灭^[13-14]。在某些条件下, 形成了可逆的膜电穿孔, 细胞是活的, 但细胞透性增大, 这利于组织中活性化合物和基因提取^[15]; 利于果蔬干燥时水分散失, 提高干燥速率^[16]。近年来 PEF 对活细胞的刺激越来越受到广泛关注, 用于促进植物种子萌发^[17-19]和改良菌种等, 如用 PEF 处理酵母, 既可改变酿酒酵母的培养周期, 促进细胞分裂同步化^[20], 也可增加酵母细胞生长和酒精生产率^[21], 改善酵母

收稿日期: 2019-04-05 修订日期: 2019-09-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31772651)

作者简介: 刘振宇, 副教授, 主要从事农业物料电磁特性的研究。

Email: lzysyb@126.com

*通信作者: 宋艳波, 副教授, 主要从事电磁对生物生理生化影响的研究。

Email: 1153625039@qq.com

发酵特性,提高酵母菌的代谢,成为刺激微生物反应(即发酵)的积极工具^[22]。目前,关于PEF对黑曲霉作用报道较少,本研究以黑曲霉糖化酶高产菌株为作用对象,探讨脉冲工作参数对黑曲霉生长和产糖化酶性能影响,力求获得两者间的互作规律,为黑曲霉生产效能的提高提供一种新的技术和方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌株:黑曲霉 AS3.4309,购买于中国科学院微生物研究所。

试验试剂:马铃薯葡萄糖(PDA,potato dextrose agar)液体培养基:马铃薯200 g切成小块,加适量水煮沸30 min过滤,滤液中加20 g蔗糖,用蒸馏水补至1 000 mL;培养基加入20 g琼脂即为固体培养基。察氏培养基:蒸馏水1 000 mL,硝酸钠3 g,蔗糖30 g,磷酸氢二钾1 g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.5 g,氯化钾0.5 g,硫酸亚铁0.01 g,琼脂20 g,加热溶解。蛋白胨:1 g蛋白胨,蒸馏水溶解,定容至1 000 mL,灭菌备用。

试验仪器:SW-CJ-2G型超净台,苏州江东精密仪器有限公司;ECM830型脉冲发生器,美国BTX公司;JS-2000W-A型交流电源电压转换器,上海景赛电子科技有限公司;SPX-300-F生化培养箱,上海龙跃仪器设备有限公司;血球计数板(QIUJING,25格 \times 16格),上海求精生化试剂仪器有限公司;E100型显微镜,上海维翰光电科技有限公司;Megafuge 8R台式高速冷冻离心机,Thermo Fisher美国公司;DH5000-AB干燥箱,德州市昊诚实验仪器有限公司;THZ-98A恒温振荡培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;UV752N紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;HH-42水浴锅,福州精科仪器仪表有限公司;DYCZ-24A电泳仪,北京市六一仪器厂;Chemixrsf化学发光凝胶成像仪,美国Bio-Rad伯乐公司等。

1.2 试验方法

1.2.1 黑曲霉的活化和孢子悬液制备

黑曲霉接种于斜面培养基上,28℃培养7 d,4℃保存。向上述培养物加适量无菌蛋白胨,用接种针刮下培养物,无菌纱布滤去菌丝体,使孢子分布均匀,用血球计数板计量3次孢子数,求其平均值,得到孢子浓度为 4.2×10^6 个/mL的菌悬液。

1.2.2 菌悬液的PEF处理及培养

吸取150 μL 孢子悬液于电击杯(聚碳酸酯材质,两电极间距2 mm)中进行脉冲处理:取100 μL 放入装有25 mL PDA液体培养基离心管中,28℃、150 r/min培养60 h,测定菌丝干质量;另取10 μL 接于装有30 mL PDA液体培养基的锥形瓶中培养108 h,测定糖化酶活性;取2 μL 进行微室培养(察氏培养基)10~12 h,显微镜下观察孢子萌发;取1 μL 接于PDA固定平板中央,观察菌丝生长,以未进行PEF处理的黑曲霉为对照。所有试验重复3次。

1.2.3 指标测定方法

1)菌丝干质量测定^[23]:用定量滤纸过滤培养物,70℃烘干至恒质量。

2)糖化酶活性的测定:培养后的菌液,4℃5 700 r/min离心20 min,上清液即为粗酶液^[24],酶活性测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[25]。

酶活性单位为pH值5、40℃和15 min反应时间分解淀粉产生1 μmol 葡萄糖(0.18 mg)所需酶量^[24]。

3)黑曲霉孢子萌发测定^[26-27]:菌丝长度比孢子直径一半长时,认为孢子已萌发。

孢子萌发率=已萌发孢子数目/(已萌发孢子数+未萌发孢子数) $\times 100\%$ 。

4)同工酶测定

孢子悬液接于装有25 mL PDA液体培养基的锥形瓶中培养72 h,过滤并收集菌团,蒸馏水冲洗,吸干。称菌丝团放入预冷的研钵,加适量石英砂和0.1 mol/L pH值8.0 Tris-HCl提取液(1 g菌丝/2 mL提取液)冰浴研磨,低温浸提0.5 h或过夜。12 000 r/min 4℃离心15 min,上清液用于酯酶(EST)同工酶分析^[28]。

聚丙烯酰胺凝胶电泳:分离胶质量分数12%,pH值8.9;浓缩胶5%,pH值6.8,电泳缓冲液为Tris-Gly pH值8.3系统;初始电压160 V,分离胶电压为240 V。染液配制参考文献[29]稍作修改:50 mg固蓝B盐(氯化四氮邻二甲氧基苯胺),溶于150 mL 0.1 mol/L pH值6.2磷酸缓冲液,过滤;50 mg α -乙酸萘酯和50 mg β -乙酸萘酯溶于1 mL丙酮,倒入固蓝溶液中,边倒边搅拌。电泳结束后将胶转移至染色液中,37℃黑暗染色至褐色条带清晰,水漂洗,7%的醋酸固定,用凝胶成像仪拍照。

1.2.4 试验设计

依据脉冲仪器性能、菌液承受能力和前期试验研究结果选择脉冲参数和参数范围。采用三因素五水平中心组合设计(central composite experimental design,CCD)确立脉冲强度(5~15 kV/cm)、脉冲持续时间(10~100 μs)和脉冲数(50~99)3个脉冲参数组合,以黑曲霉菌丝干质量和产糖化酶活性为主要响应指标,研究这些指标在不同脉冲参数下的变化规律,优化脉冲工艺。各变量的编码值和实际值如表1。

1.2.5 统计分析

所有结果用平均值表示。数据统计分析和建模均由Design Expert 10.0.7统计分析软件(Stat-Ease公司,明尼阿波里斯市,美国)完成。试验数据进行多元回归和显著性分析($P < 0.05$)。从回归模型中生成响应面图,直观反映响应值与自变量之间的关系,确定最优条件。

2 结果与分析

PEF处理技术可以产生多种生物学效应,如杀灭食源性和腐源性致病菌,从而被广泛用于液态食品加工中;增加植物和肉类等固态食品传质,改善加工中的传质品质;促进植物种子的代谢活动,提升种子活力;提高物料

干燥速率;增加细胞内活性物质提取率;生物大分子改性和刺激酵母细胞生长等。而要达到以上某种特定效应的前提是执行相应的 PEF 加工参数^[30]。研究获得了 PEF 工作参数对黑曲霉生长和产糖化酶活性关系。

表 1 试验设计与实测结果
Table1 Experimental design and measured results

序号 Serial number	因素 Factors						响应结果 Response result	
	脉冲强度 Pulse intensity X_1	脉冲宽度 Pulse width X_2	脉冲数 Pulse number X_3	脉冲强度 Pulse intensity $Z_1/$ ($\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$)	脉冲宽度 Pulse width $Z_2/\mu\text{s}$	脉冲数 Pulse number Z_3	黑曲霉菌丝干质量 Dry weight of <i>Aspergillus niger</i> mycelium Y_1/mg	糖化酶活力 Activity of glucoamylase $Y_2/(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$
0	-	-	-	-	-	-	16.67±1.25	15.70±0.31
1	-1	-1	-1	7.025	28	60	9.66±0.47	15.95±0.12
2	-1	-1	1	7.025	28	89	20.66±1.70	16.55±0.91
3	-1	1	-1	7.025	82	60	15.42±1.70	15.07±0.18
4	-1	1	1	7.025	82	89	19.07±1.63	16.54±0.92
5	1	-1	-1	12.975	28	60	29.40±1.62	15.92±0.54
6	1	-1	1	12.975	28	89	16.06±0.81	12.75±0.66
7	1	1	-1	12.975	82	60	23.51±2.49	16.55±0.77
8	1	1	1	12.975	82	89	17.60±1.70	11.30±0.02
9	-1.682	0	0	5.00	55	75	12.47±1.63	16.18±0.56
10	1.682	0	0	15.00	55	75	20.66±1.63	15.59±0.71
11	0	-1.682	0	10.00	10	75	21.80±1.24	13.56±0.80
12	0	1.682	0	10.00	100	75	21.80±2.49	14.74±1.72
13	0	0	-1.682	10.00	55	50	10.15±2.16	16.47±0.45
14	0	0	1.682	10.00	55	99	17.84±2.05	13.98±0.85
15	0	0	0	10.00	55	75	27.62±2.49	18.61±0.44
16	0	0	0	10.00	55	75	30.41±0.47	18.58±0.86
17	0	0	0	10.00	55	75	34.49±1.25	17.76±0.53
18	0	0	0	10.00	55	75	26.49±2.49	17.81±0.82
19	0	0	0	10.00	55	75	34.58±0.94	17.87±0.59
20	0	0	0	10.00	55	75	26.49±0.94	19.70±1.61

2.1 PEF 参数对黑曲霉菌丝干质量和产糖化酶活性影响规律

2.1.1 PEF 作用对黑曲霉菌丝干质量和产糖化酶活性影响
PEF 处理对黑曲霉菌丝干质量和产糖化酶性能有明显影响,不同参数效果不同。未经 PEF 处理的黑曲霉菌丝干质量和糖化酶活性分别为(16.67±1.25)mg 和(15.70±0.31)U/mL;PEF 处理后,菌丝干质量和糖化酶活性最大达(34.58±0.94)mg 和(19.70±1.61)U/mL,比对照分别增加了 107%和 25.47%(见表 1)。在个别参数下菌丝干质量和糖化酶活性比未处理低,从表 1 不难看出,在低电场强度处理下菌丝干质量未增反而下降;而脉冲数较高的处理下,产酶活性下降。Zhao 等采用 20 kV/cm、100 和 200 ms 的短时间 PEF 处理酿酒酵母细胞,发现 α -葡萄糖苷酶、N-乙酰- β -糖苷酶和 α -甘露糖苷酶活性增加;当 PEF 处理时间超过 200 ms 时,观察到了蛋白团聚体的形成,同时发现这些酶活性降低甚至完全丧失^[31]。在本研究中,脉冲处理个数高,脉冲作用时间积累效应导致黑曲霉产糖化酶活性的下降,与上述研究结果一致。

因此,寻求脉冲参数及参数间相互作用对响应指标影响规律,确立脉冲参数与响应指标间的量化关系尤为重要。

2.1.2 PEF 作用参数与两响应指标回归方程建立与分析
用统计分析软件对表 1 结果进行回归分析和显著性检验,建立了脉冲强度、脉冲时间和脉冲数 3 个自变量和黑曲霉菌丝干质量、产糖化酶活力 2 个响应指标关系的

二阶多项式方程:
$$Y_1=29.94+2.60X_1-0.013X_2+0.61X_3-1.06X_1X_2-4.24X_1X_3+0.010X_2X_3-4.28X_1^2-2.43X_2^2-5.19X_3^2$$
 (1)
$$Y_2=18.38-0.63X_1+0.020X_2-0.77X_3+8.750\times10^{-3}X_1X_2-1.31X_1X_3-0.15X_2X_3-0.84X_1^2-1.46X_2^2-1.08X_3^2$$
 (2)
式中 X_1, X_2, X_3 分别为脉冲强度、脉冲持续时间和脉冲数的编码水平; Y_1 为黑曲霉菌丝干质量,mg; Y_2 为糖化酶活力, U/mL。

采用方差分析评价两模型的充分性和适合度,以相应的 P 值评价模型的显著性(表 2)。黑曲霉菌丝干质量(Y_1) F 值为 6.89,糖化酶活性(Y_2) F 值为 12.02, F 值较大,说明了模型的正确性; $P<0.01$,模型均显著;两模型失拟项均不显著,且决定系数 R^2 分别为 0.861 2 和 0.915 4,值较高,表明该模型可用。方程能反映和预测试验选定参数范围内 3 个脉冲参数与 2 个响应指标间的关系。

回归系数检验显示:对黑曲霉菌丝干质量影响最大的因素是脉冲强度($P<0.01$),其次是脉冲数和脉冲持续时间。根据回归模型方差结果绘制 3D 效果图:从图 1a 可以看出,曲面比较陡,表示脉冲强度与脉冲数互作时,对黑曲霉菌丝干质量影响显著($P<0.01$)。而脉冲强度与脉冲宽度互作、脉冲宽度与脉冲数互作对黑曲霉菌丝干质量的影响不显著(表 2)。

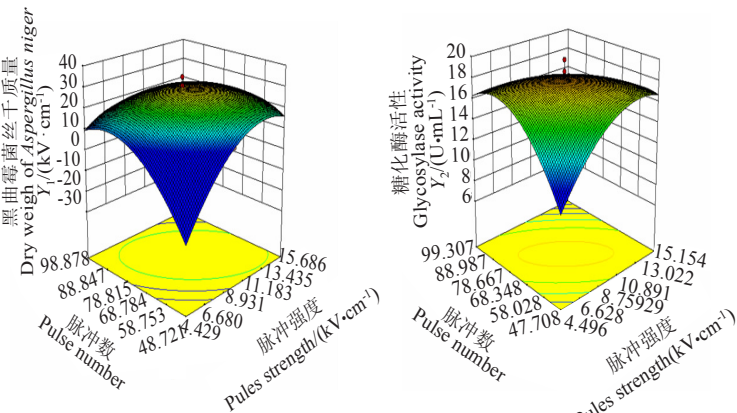
与菌丝干质量略有不同,影响糖化酶最大的因素是脉冲数($P<0.01$),其次是脉冲强度($P<0.05$)和脉冲宽度。

综合响应曲面图和测定结果表,只有脉冲强度和脉冲数的互作效应3D响应曲面图的凸起幅度较强,互作效应显著 $P<0.05$,与对黑曲霉干质量作用结果一致(图1b)。综合脉冲参数对2个响应指标影响可知,脉冲强度对两指标影响显著,这与当前研究认为PEF的作用主要取决于电场强度^[32]结果一致。另外,脉冲数与脉冲强度的互作也显著影响两指标变化,应用时也需重点考虑。

表2 PEF 参数对黑曲霉菌丝干质量和产糖化酶活性影响的方差分析

Table 2 Variance analysis from influence of PEF parameters on <i>Aspergillus niger</i> mycelium dry weight and activity of glucoamylase				
项目 Item	F值 F value		P值 P value	
	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
模型 Model	6.89	12.02	0.002 9	0.000 3
X ₁	6.50	7.64	0.028 9	0.020 0
X ₂	1.668E-004	7.818E-003	0.989 9	0.931 3
X ₃	0.36	11.52	0.563 2	0.006 8
X ₁ X ₂	0.64	8.678E-004	0.443 0	0.977 1
X ₁ X ₃	10.10	19.49	0.009 8	0.001 3
X ₂ X ₃	5.625E-005	0.26	0.994 2	0.621 6
X ₁ ²	18.60	14.56	0.001 5	0.003 4
X ₂ ²	6.00	43.40	0.034 3	<0.000 1
X ₃ ²	27.32	23.72	0.000 4	0.000 7
失拟项 Lack of fit	0.99	1.52	0.506 0	0.329 4
标准差 Standard deviation	3.77	0.84		
平均值 Mean value	21.81	16.07		
变异系数 Variable coefficient	17.29	5.23		

注: $P<0.01$ (极显著); $P<0.05$ (显著)。
Note: $P<0.01$ (extremely significant); $P<0.05$ (significant).



a. 脉冲数和脉冲强度互作对黑曲霉菌丝干质量的影响
a. Influence from the interaction of the pulse intensity and pulse number of PEF on *Aspergillus niger* mycelium dry weight
b. 脉冲数和脉冲强度互作对产糖化酶活性的影响
b. Influence from the interaction of the pulse intensity and pulse number of PEF on *Aspergillus niger* mycelium activity of glucoamylase

注: 脉冲宽度固定在0水平。
Note: Pulse width fixed at 0 level

图1 PEF脉冲数和脉冲强度两参数互作对黑曲霉菌丝干质量和产糖化酶活性的影响
Fig.1 Influence from the interaction of the pulse intensity and pulse number of PEF on *Aspergillus niger* mycelium dry eight and activity of glucoamylase

2.2 PEF对黑曲霉菌落形态特征的影响

PEF处理对黑曲霉菌落生长形态产生了明显影响(图2)。在表1脉冲参数处理下,所有菌落虽然都呈圆形生长,但未处理的菌落(图2中0)可见清晰的菌落圈;而PEF处理后,有些菌落圈隆起高,出现星状褶皱,菌落圈较难分辨,孢子数量显著增加,孢子颜色没变但孢子周围出现明显不同的深黄色(图2中PEF-7和PEF-11分别为表1中序号7和11处理)。说明,PEF不但刺激了黑曲霉生长,也影响其代谢。

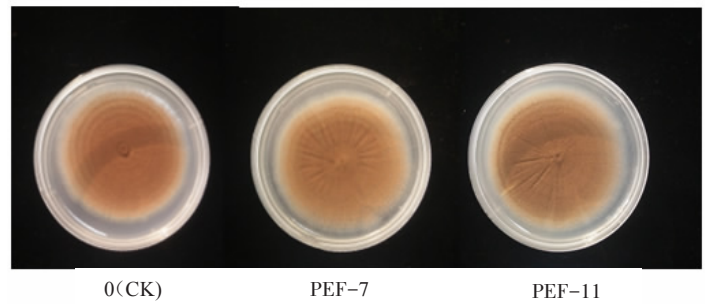


图2 PEF对黑曲霉菌落形态特征的影响
Fig.2 Influence of PEF on *Aspergillus niger* colony shape feature

2.3 PEF对黑曲霉孢子萌发的影响

显微镜下观察和统计黑曲霉孢子萌发情况(图3)。未经PEF处理的黑曲霉孢子萌发率为14.06%±0.59%,采用表1中PEF工作参数处理后,孢子萌发率为25.00%±0.33%~46.54%±0.55%,比对照增加了77.8%~231%。据此认为PEF促进菌丝生长原因之一是刺激了孢子萌发。

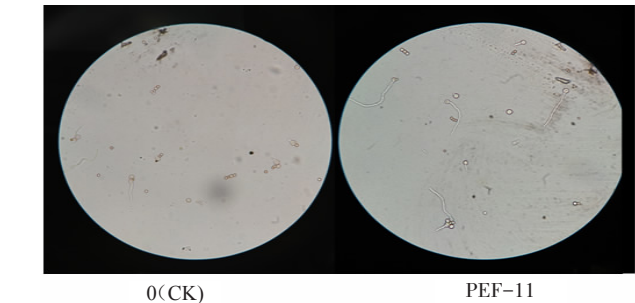


图3 PEF对黑曲霉孢子萌发的影响(×400)
Fig.3 Influence of PEF on *Aspergillus niger* spore germination (×400)

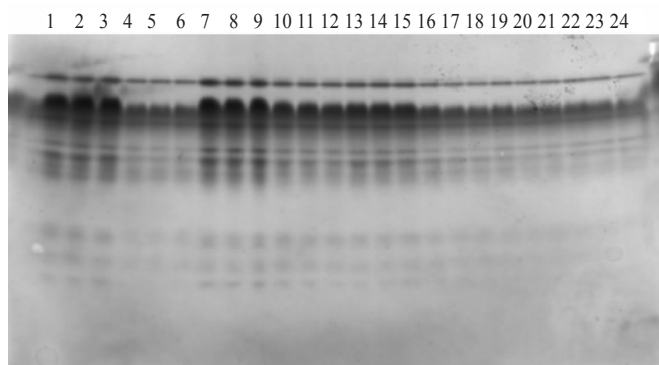
2.4 PEF对EST同工酶的影响

PEF处理在某些条件下可能对菌株产生诱变作用^[33],为了检测PEF处理后的黑曲霉是否发生质变,基于菌落形态特征观察,对生长褶皱、颜色和疏密度等表现出差异的处理和对照同时收获孢子,进行酯酶同工酶酶谱分析。

由图4a和4b可知,黑曲霉的EST同工酶出现了10条谱带,标记为EST-01~EST-10,其迁移率为0.267~0.750。EST-01~EST-05条带强度明显强于其他条带,说明这5条条带对EST活性贡献较大。而EST-08~EST-10条带最弱,对EST活性贡献最小。同工酶是基因表达产物,是遗传与变异的重要指标;而酯酶同工酶由于易于检测,且具有高度多态性,被作为遗传研究中常见的标记物,广泛用于微生物、昆虫和植物物种鉴定及分类与进化研究中^[34-36]。本文,PEF处理组与对照组的EST-01~EST-08的

迁移率都相同。说明PEF处理并未对黑曲霉的EST同工酶形成明显遗传变异。另外,酯酶活性可作为微生物细胞代谢性能的指标,图中编号7~9样本EST-01和EST-02

条带颜色比对照深,11~16号样本与对照无明显差异,而其他样本比对照浅。这一结果表明PEF影响了黑曲霉的代谢性能。



a. 电泳酶带图

a. Enzyme electrophoretic band diagram

注:编号1~3为对照(表1中序号0),4~24为PEF处理组(4~6为表1中PEF-1;7~9为PEF-7;10~12为PEF-8;13~15为PEF-9;16~18为PEF-11;19~21为PEF-12;22~24为PEF-13),每组处理三次。共有10条谱带,命名为EST-01~EST-10,酶带迁移率为0.267~0.750。

Note: Number 1—3 are blank control groups(The serial number is 0 in Table 1), and number 4—24 are the PEF treatment groups(in Table 1, number 4—6 is PEF-1, number 7—9 is PEF-7, number 10—12 is PEF-8, number 13—15 is PEF-9, number 16—18 is PEF-11, number 19—21 is PEF-12, number 22—24 is PEF-13), every treatment group are process by three times. There are 10 bands named from EST-01 to EST-10, and the band mobility changed from 0.267~0.750.

图4 PEF对黑曲霉酯酶同工酶影响

Fig.4 Influence of PEF on esterase isozyme of *Aspergillus niger*

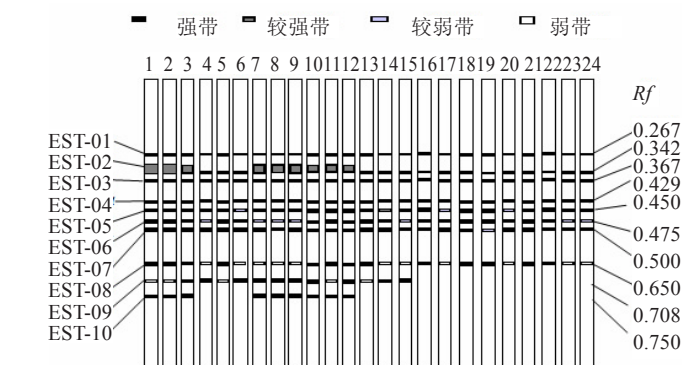
2.5 工艺参数的优化验证

黑曲霉菌丝干质量和黑曲霉糖化酶活性在相应约束条件下都应达到最大值,即 Y_{1max} 和 Y_{2max} 确立为目标函数,经Design Expert 10.0.7 统计分析软件对两个回归模型分别优化求解。在此基础上,利用多目标决策理论及非线性优化方法,综合目标函数采用线性加权法进行规划求解,由于糖化酶活性是主要目标,其加权系数 K_2 取0.6,则黑曲霉菌丝干质量的加权系数 K_1 为0.4^[16]。获得综合优化条件为脉冲强度12.974 95 kV/cm、脉宽为53.517 μ s、脉冲数66.052,相应的黑曲霉菌丝干质量为28.662 mg,糖化酶活性为17.746 U/mL。经修正,选择脉冲强度为12.975 kV/cm、脉宽为54 μ s、脉冲数66,获得黑曲霉的菌丝干质量和糖化酶活性分别为28.05 mg和18.01 U/mL,与预测值基本一致,表明优化结果合理可靠,比对照提高了68.27%和14.71%,可以作为进一步试验研究的指导。

3 讨论

3.1 PEF对黑曲霉作用机理分析

PEF处理影响黑曲霉分生孢子活力,增加柠檬酸产量^[37]。在本研究中,PEF处理后产糖化酶能力增强,菌丝干质量增加,这与PEF刺激孢子萌发有关,与对萌发中和萌发后代谢刺激也有关。PEF处理酵母细胞研究中发现,PEF处理促进细胞中锌离子、镁离子和钙离子积累^[38-39],促进果糖等物质吸收,刺激酵母细胞代谢^[22]。以及造成细胞代谢过程中酶的变化,如PEF处理新鲜蓝莓提高了花青素浓度,改变了其在蓝莓中的分布,可能通过影响反应动力学中涉及的分子,如酶,改变花青素降解的机制^[11]。作为一种丝状真菌,黑曲霉孢子萌发常需要较长的延滞期,因此缩短孢子萌发时间,可以提高发酵效率,而PEF处理可以通过改变细胞膜组分排列,产生电穿孔,增加细胞膜渗透性或激活转运蛋白质^[40],增加对水分、离子和有益营养物质的吸收运转,活化代谢过程中的



b. 酶谱模式图

b. Enzymatic pattern diagram

酶,促进细胞代谢,从而促进生长,提高其产酶性能。

3.2 PEF参数优化

PEF可以刺激细胞代谢,也可以杀死细胞。这主要取决于脉冲工作参数。研究认为PEF的作用主要取决于电场的强度,Sotelo等研究了中、轻度PEF(电场强度0.3和2.5 kV/cm,脉冲频率100 Hz,脉冲宽度20 μ s)处理樱桃提高了其可食品质且不影响益生菌的生长^[41]。电场强度5.0 kV/cm,脉冲宽度20 μ s,电场频率1 Hz下处理酵母细胞15 min后培养20 h,镁和锌的积累比对照分别增加了1.5倍和2倍^[38],过高电场强度会使细胞损伤严重,甚至死亡。因此,高的电场强度(10~80 kV/cm)常被用于巴氏杀菌,使微生物膜破坏到无法修复的程度,最终死亡^[42]。影响果汁质量最重要的电学参数不只电场强度,还有处理时间^[10],用于有机物提取研究中,使细胞膜发生可逆穿孔,增加细胞渗透性的脉冲强度范围在1~10 kV之间,脉冲数在5~50之间^[42-43]。可见,PEF作用中脉冲工艺参数确立的重要性。本文研究同样得出脉冲强度对黑曲霉生长和产糖化酶活性能力影响最突出,并且与脉冲个数互作效应明显。因此,在对不同类型,不同发育时期等不同特点细胞进行PEF处理时,对参数进行选择和优化是首要任务,研究为该技术在今后工厂化应用中提供理论基础。

4 结论

1)PEF处理黑曲霉孢子,不同的电场强度、脉冲宽度以及脉冲数会导致黑曲霉菌丝干质量和生产糖化酶的能力有所改变,电场强度和脉冲数及其相互作用是影响两指标的主要参数。电场处理后的黑曲霉,其细胞膜通透性和酶活性会增大,代谢速度变快,可以更好的促进孢子萌发。脉冲强度为12.975 kV/cm、脉宽为54 μ s、脉冲数66,获得黑曲霉的菌丝干质量和糖化酶活性分别为28.05 mg和18.01 U/mL。

2)酯酶同工酶分析未发现PEF对黑曲霉有诱变的作用,只是通过刺激黑曲霉生长,影响细胞代谢而影响其生长和产糖化酶能力,可见PEF技术是不破坏黑曲霉本质,且处理过程简单,生产效率高,是一种有前景的用于提高生物工程菌发酵效率的有力工具。

[参 考 文 献]

- [1] Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, et al. On the safety of *Aspergillus niger*: A review [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59: (415)426—435.
- [2] Kim T, Mullaney E J, Porres J M, et al. Shifting the pH Profile of *Aspergillus niger* PhyA Phytase To Match the Stomach pH Enhances Its Effectiveness as an Animal Feed Additive [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4397—4403.
- [3] Mustafa G, Arif R, Bukhari S A, et al. Structural and functional annotation of citrate synthase from *Aspergillus niger* ANJ-120[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 31(2(Suppl)): 709—717.
- [4] Khokhar I, Haider M S, Mukhtar I, et al. Biological control of *Aspergillus niger*, the cause of black-rot disease of *Allium cepa* L. (onion), by *Penicillium* species[J]. Journal of Agrobiology, 2012, 29(1): 23—28.
- [5] Chao L, Wei S, Shuai W, et al. Dynamic metabolic response of *Aspergillus niger* to glucose perturbation: evidence of regulatory mechanism for reduced glucoamylase production [J]. Journal of Biotechnology, 2018, 287: 28—40.
- [6] Papagianni M, Moo-Young M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects [J]. Process Biochemistry, 2002, 37(11): 1271—1278.
- [7] Abdel-Gawad K M, Hifney A F, Fawzy M A, et al. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 593—601.
- [8] Jin H X, Ouyang X K, Hu Z C. Enhancement of epoxide hydrolase production by ^{60}Co gamma and UV irradiation mutagenesis of *Aspergillus niger*, ZJB-09103 [J]. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2016, 64(3): 392—399.
- [9] Wang M S, Wang L H, Bekhit E D A, et al. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing [J]. Journal of Food Engineering, 2017, 223: 32—41.
- [10] Bi X, Liu F, Rao L, et al. Effects of electric field strength and pulse rise time on physicochemical and sensory properties of apple juice by pulsed electric field [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 17: 85—92.
- [11] Jin T Z, Yu Y, Gurtler J B. Effects of pulsed electric field processing on microbial survival, quality change and nutritional characteristics of blueberries [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 77: 517—524.
- [12] Suwandy V, Carne A, Ven R V D, et al. Effect of repeated pulsed electric field treatment on the quality of cold-boned beef loins and topsides [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(6): 1218—1288.
- [13] Chen X, Sun J, Yin S, et al. Interaction of pulsed electric field and biomedicine technology and the influence on solid tumor therapy [J]. High Voltage Engineering, 2014, 40(12): 3746—3754.
- [14] Chih-Hsiung H, Chueh-Hsuan L, Yu-Yi K, et al. Studies on the non-invasive anticancer remedy of the triple combination of epigallocatechin gallate, pulsed electric field, and ultrasound [J]. PLOS ONE, 2018, 13(8): 1—21.
- [15] Liu Z W, Zeng X A, Ngadi M. Enhanced extraction of phenolic compounds from onion by pulsed electric field (PEF) [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2018, 42(9): 1—8.
- [16] Liu Z, Song Y, Guo Y, et al. Optimization of pulsed electric field pretreatment parameters for preserving the quality of *Raphanus sativus* [J]. Drying Technology, 2016, 34(6): 11.
- [17] Gang X I, Yu G, Kai L, et al. Effect of extremely-low-frequency high-voltage pulsed electric field on water absorption of germinating mung beans and its mechanism [J]. High Voltage Engineering, 2014, 40(12): 3762—3767.
- [18] 闫银发, 韩守强, 周盛祥, 等. 极低频高压脉冲电场提高陈年棉种活力的参数优化[J]. 农业工程学报, 2017, 33(22): 301—307.
- [19] 闫银发, 周盛祥, 宋占华, 等. 频率及电压对高压脉冲电场提高陈年棉种活力的影响[J]. 农业工程学报, 2017, 33(13): 310—314.
- [20] Araujo O Q F, Oliveira, A A C, Torres, C C O, et al. Glucose uptake in electrically stimulated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* [C]. In: Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6), 16—20 September Copenhagen, 2007: 1—9.
- [21] Nakanishi K, Tokuda H, Soga T, et al. Effect of electric current on growth and alcohol production by yeast cells [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(2): 250—253.
- [22] Mattar J R, Turk M F, Nonus M, et al. *S cerevisiae* fermentation activity after moderate pulsed electric field pre-treatments [J]. Bioelectrochemistry, 2015, 103: 92—97.
- [23] Mai H T N, Lee K M, Choi S S. Enhanced oxalic acid production from corncob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-state fermentation [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(1): 9—15.
- [24] Izmirlioglu G, Demirci A. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization [J]. Fuel, 2016, 185: 684—691.
- [25] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426—428.
- [26] 郑肖兰, 胡飞, 梁艳琼, 等. 苯乙酸对橡胶树胶胞炭疽菌生长速率、孢子萌发率和附着胞形成率的影响[J]. 热带农业科学, 2016, 36(8): 45—48.

- Zheng Xiaolan, Hu Fei, Liang Yanqiong, et al. Effect of NAA on mycelial growth, spore germination and attached spore formation of *C. gloeosporioides* [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture 2016, 36 (8): 45—48. (in Chinese with English abstract)
- [27] 武金霞, 程会欣, 张贺迎. 激活剂对米曲霉孢子萌发率的影响[J]. 中国调味品, 2010, 35(3): 58-61.
- Wu Jinxia, Cheng Huixin, Zhang Heying. The influence of activating agent on spore germination rate of *Aspergillus oryzae* [J]. China Condiment, 2010, 35 (3): 58-61. (in Chinese with English abstract)
- [28] 隋玉龙, 宋慧, 杜金, 等. 灵芝栽培菌株酯酶同工酶的酶谱多样性[J]. 菌物研究, 2013(2): 136—140.
- Sui Yulong, Song Hui, Du Jin, et al. Esterase isozyme analysis of *Ganoderma* strains[J]. Journal of Fungal Research, 2013(2): 136—140. (in Chinese with English abstract)
- [29] 杨海旭, 邓百万, 陈文强, 等. 秦巴山区蜜环菌酯酶同工酶的研究[J]. 陕西理工学院学报: 自然科学版, 2016, 32(2): 51—56.
- Yang Haixu, Deng Baiwan, Chen Wenqiang, et al. Study on esterase isozyme of *Armillaria mellea* in Qinba mountainous area[J]. Journal of Shaanxi University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 32(2): 51—56. (in Chinese with English abstract)
- [30] Vijayalakshmi S, Nadasabhapathi S, Kumar R, et al. Effect of pH and pulsed electric field process parameters on the aflatoxin reduction in model system using response surface methodology [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(3): 868—878.
- [31] Zhao W, Yang R, Gu Y J, et al. Assessment of pulsed electric fields induced cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*: Change in performance of mitochondria and cellular enzymes[J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 58(1): 55—62.
- [32] Wang M S, Wang L H, Bekhit E D A, et al. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing [J]. Journal of Food Engineering, 2017, 223: 32—41.
- [33] Reyns K M F A, Diels A M J, Michiels C W. Generation of bactericidal and mutagenic components by pulsed electric field treatment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93 (2): 165—173.
- [34] M Láday, Bagi F, á. Mesterházy, et al. Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*[J]. Mycological Research, 2000, 104(7): 788—793.
- [35] Machado P S, Fatima M D, Castroprado D E, et al. Differential esterase expression in developmental mutants of *Aspergillus nidulans*[J]. Biochemical Genetics, 2001, 39(11—12): 357—377.
- [36] Carvalho V M D, Marochio C A, Mangolin C A, et al. The use of esterase polymorphism for analysis of the genetic diversity and structure of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. Bertoni) populations[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(4/5/6): 594—599.
- [37] Fiedurek J. Influence of a pulsed electric field on the spores and oxygen consumption of *Aspergillus niger* and its citric acid production [J]. Acta Biotechnologica, 2010, 19(2): 179—186.
- [38] Pankiewicz U, Sujka M, Włodarczyk-Stasiak M, et al. Effect of pulse electric fields (PEF) on accumulation of magnesium and zinc ions in *Saccharomyces cerevisiae* cells[J]. Food Chemistry, 2014, 157(1): 125—131.
- [39] Pankiewicz U, Sujka M, Jamroz J. Bioaccumulation of the selected metal ions in *saccharomyces cerevisiae* cells under treatment of the culture with pulsed electric field (PEF) [J]. Journal of Membrane Biology, 2015, 248(6): 943—949.
- [40] Castro I, Oliveira C, Domingues L, et al. The Effect of the electric field on lag phase, β -Galactosidase production and plasmid stability of a recombinant *saccharomyces cerevisiae* strain growing on lactose [J]. Food & Bioprocess Technology, 2012, 5(8): 3014—3020.
- [41] Sotelo K A G, Hamid N, Oey I, et al. Red cherries (*Prunus avium* var. Stella) processed by pulsed electric field - physical, chemical and microbiological analyses [J]. Food Chemistry, 2008, 240: 926—934.
- [42] Loginova K V, Shynkaryk M V, Lebovka N I, et al. Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields [J]. Journal of Food Engineering, 2010, 96(3): 374—379.
- [43] Fincan M, Devito F, Dejmek P. Pulsed electric field treatment for solid - liquid extraction of red beetroot pigment [J]. Journal of Food Engineering, 2004, 64(3): 381—388.

Pulsed electric field promoting *Aspergillus niger* growth and enzyme activity

Liu Zhenyu¹, Song Yanbo^{2*}, Gao Ruimei², Li Linwei¹, Yang Zheng³, Jia Liyan⁴

(1. College of Information Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

2. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

3. College of Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

4. College of Food Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Abstract: *Aspergillus niger* is an important microorganism in biotechnology and its metabolites play an important role in fermenting feed, food ingredients, enzymatic production and medicine; it is known as a cell-production plant for heterologous proteins and enzymes. Glucoamylase produced by *Aspergillus niger* is widely used to hydrolyze starch into glucose in brewery industry, calcium lactate industry and a variety of fermentation industry; it is regarded as a generally safe product by food and drug administrations. Although glucoamylase produced by *Aspergillus niger* has been studied for many years, there is still room for improvement such as enhancing glucoamylase activity, reducing energy and production costs. As such, *Aspergillus niger* still attracts research interest. Compared with chemical mutation and recombination technology, the pulsed electric field is able to improve microbial activity and its fermentation ability with limited chemical residues and short cultivation period. In this work, we cultured and processed *Aspergillus niger* spore suspension under different pulsed electric field in attempts to understand the responsive changes in its biological activities and glucoamylase production. The pulsed electric fields we examined had pulse intensity: 5-15 kV/cm, pulse duration: 10-100 s and pulse numbers: 50-99, and they were compared to the surface method. The results showed that both pulse intensity and pulse number affected the dry weight of *Aspergillus niger* mycelium and the production of glucoamylase. When the pulse intensity and pulse width were 12.975 kV/cm and 54 μ s, respectively, and the pulse number was 66, the dry weight of *Aspergillus niger* mycelium was 28.05 mg and the productivity of the glucoamylase was 18.01 U/mL, increasing by 68.27% and 14.71% respectively up the control. Compared with clear colony circles of untreated colonies, the colonies processed by the PEF was round while the colony circles were hardly distinguishable from the star-shaped folds and higher colony circles. The PEF treatment significantly increased the spore number, with a distinct dark yellow appearing around the spores while the color of the spores remained unchanged. The observed colony morphology showed that the PEF treatment boosted the growth of *Aspergillus niger* due to the change in its metabolism. Statistical analysis showed that PEF treatment improved the spore germination rate by 77.8%-231%, thereby promoting mycelial growth. Esterase isozyme analysis showed that PEF treatment altered the brightness and width of the bands but not the band number. It was also found that the PEF treatment affected the enzymatic activity in all experiments although it did not have significant effects on genetic mutagen. This work provides a theoretical basis to improving enzyme synthesis of *Aspergillus niger* and its industrial production.

Keywords: electric field; enzyme; optimization; pulse electric field; *Aspergillus niger*; glucoamylase; esterase isozyme