

人工神经网络在米曲霉菌体固定化研究中的应用

王 燕¹ 张凤宝^{1*} 高志明² 宋正孝¹ 张国亮¹ 赵 林¹

(¹ 天津大学化工学院, ² 材料学院, 天津 300072)

摘 要 在液体培养基中,将米曲霉 3042 菌体培养成直径为 1~2mm、菌壁上含较高氨基酰化酶浓度的菌丝球,以甲醛为交联剂,明胶为酶活性保护剂对米曲霉菌丝球进行固定化研究。在正交实验 $L_6(4^5)$ 的基础上,选用结构为 4-10-15-1 的 BP(Back propagation)人工神经网络,对固定化工艺条件进行优化和预测,得到了优化的固定化条件。实验测定在此条件下制备的固定化米曲霉菌体比酶活为 1500u,比酶活保留率达到 83%,说明人工神经网络可以用于米曲霉菌体固定化工艺条件的优化。

关键词 人工神经网络,米曲霉菌体,固定化,交联法

中图分类号 Q814.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)02-0221-04

近 30 年来,由于酶反应具有专一性强、经济、污染少、无毒性等方面的优点,酶技术研究进展很快^[1,2],其中酶和细胞的固定化技术更是由于具有生物活性保留率高和操作稳定性好,易于与产物分离等优点,而受到越来越广泛的重视^[3-6]。酶和细胞的固定化方法通常分为 4 类:吸附法、交联法、共价法和包埋法。所谓交联法是通过酶与功能试剂进行交联反应而实现固定化的,目前这方面的研究报道也比较多。但有关用交联法来固定化米曲霉菌丝球的报道还很少。在用甲醛和明胶固定化米曲霉菌丝球的过程中影响因素很多,主要有甲醛浓度、明胶浓度、固定化时间、以及菌体与固定液的用量比等。本文试图同时考虑影响因素及其相互间的交互作用,应用人工神经网络方法对固定化工艺进行优化,探求一种酶活保留率较高的固定化条件。

1 人工神经网络^[7,8]

人工神经网络优化是将简单的处理单元广泛连接而成网络,用以模拟大脑神经系统的结构和功能。本文选用 BP 网络(Back-propagation network)选择神经元时,一方面考虑到实际情况,选择太多学习速率慢,且没有必要,选择太少则网络非线性能力差;另一方面考虑到菌体固定化过程中主要有甲醛浓度、明胶的浓度、固定化时间,以及菌体与固定液的用量

比等 4 种影响因素,所以选定网络结构为 4-10-15-1。输入层 4 个结点分别对应甲醛浓度、明胶浓度、固定化时间,以及菌体与固定液的用量比。人工神经网络算法分为学习和工作两部分。在学习过程中首先将随机权值赋予网络,从正交实验数组中顺序选取一数据对 (x^k, T^k) ,将实验条件加到输入层 ($m=0$),式中上标 k 指正交实验样本标号。信息通过网络的前向传播,利用下述关系式求得各层内每个结点 j 的输出,即

$$y_j^m = F(s_j^m) = F\left(\sum_{i=0}^{n(N)} w_{ij}^m y_i^{m-1}\right)$$

计算从第一层开始,直到输出层每个结点 j 的输出计算完为止,其中 $n(N)$ 为第 m 层结点数(下同), w_{ij}^m 为第 m 层第 i 个结点同 $m-1$ 层第 j 个结点间的连接权重, $F(\cdot)$ 为传递函数,本文指 sigmoid 函数。

输出层 (m) 每个结点的误差值为

$$\delta_j^m = F'(s_j^m) (T_j^k - y_j^m)$$

逐层误差反传,直至求得各层内每个结点的误差值为止,即

$$\delta_j^{m-1} = F'(s_j^{m-1}) \sum_{i=1}^{n(N)} \delta_i^m w_{ij}^m$$

其中 $m = m, m-1, \dots, 1$ 。计算时,应用加权修正量公式 $\Delta w_{ij}^m = \eta \delta_j^m y_i^{m-1}$ 和 $w_{ij}^{new} = w_{ij}^{old} + \Delta w_{ij}$ 修正所有连接,并输入下一图形重复以上步骤,至网络能量

$$E(w) = \frac{1}{2} \sum_k \sum_j (T_j^k - y_j^k)^2$$

达到要求为止。

在上述学习过程中,本文除依据学习效果调整网络学习速率外,采用改进了的神经网络方法,用动量法降低网络对局部细节的敏感性,从而有效地避免了网络陷入局部极小的可能性。

网络工作时,输入实验条件,通过网络的前向传播,利用下述关系式求得各层内每个结点 j 的输出,即

$$y_j^m = F(s_j^m) = F\left(\sum_{i=0}^{m(N)} w_{ij}^m y_i^{m-1}\right)$$

计算从第一层开始,直至输出层每个结点 j 的输出计算完为止,最后一层的网络输出即为输入实验条件下的酶活保留率。

2 实验

2.1 米曲霉固定化材料及仪器

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) B042 菌株由本实验室保存,还原茛三酮为本实验室自制,明胶、甲醛、茛三酮、乙二醇甲醚等试剂均为市售产品,分析纯。

721 分光光度计,上海第三仪器厂;HZS-D 水浴振荡器,哈尔滨东联电子技术公司。

2.2 固定化方法

将在液相中培养的直径为 1~2 mm 的米曲霉菌丝球放入溶有明胶、浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH7.0 磷酸缓冲溶液中,然后加入甲醛作为交联剂进行交联固定。菌体固定一段时间后,过滤洗净,得到固定化菌体。

2.3 酶活的测定

取干菌体 0.1 g 放在 100 mL 的三角瓶中,加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N-乙酰-DL-丙氨酸溶液(含 $\text{CoCl}_2 \cdot 5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 5 mL, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液(pH7.0) 40 mL 及 5 mL 去离子水在 37°C 下恒温振荡 30 min,过滤后溶液迅速煮沸灭酶活,冷却后用茛三酮显色,用分光光度计测定拆分出的 L-丙氨酸的 μmol 数。菌体细胞比酶活定义为在 37°C 下 1 h 内由菌体细胞催化拆分产生 L-丙氨酸的 μmol 数,单位为 u ,其中 $1u = 1\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

测定固定化细胞比酶活的方法与游离的菌体细胞相同,实验以固定化后比酶活保留率为考核指标。

2.4 人工神经网络优化操作方法

将影响米曲霉固定化的 4 个主要因素:甲醛浓度、明胶浓度、固定化时间,以及菌体与固定液的用

量比作为网络输入,以固定化菌体酶活保留率作为目标输出。在网络学习结束后,网络能量达到最小,得到网络权值。在网络工作时依次逐步改变输入变量,比较网络输出,当网络输出最大时,所对应的网络输入即为实验最优条件。

3 结果与讨论

在甲醛浓度 0.5%、固定化时间 1 h、菌体与固定液用量比为 1:8 的实验条件下,改变明胶浓度 0、0.25%、0.5%、1.0%、1.5%,分别进行实验,结果发现在明胶浓度达到 0.5% 时,酶活保留率接近最大,继续增加浓度,酶活增加速率趋缓,再随着明胶浓度的增加,由于增加了扩散阻力,反而使酶的表现活性有所下降。而甲醛作为交联剂,通常说来含量越低,对酶活性的损失越少,但考虑到菌体上酶的脱落问题,所以甲醛的浓度不能过低。基于上述原因,选择明胶浓度 0.5%~2%、甲醛浓度 0.5%~2%、固定液用量 4~10 mL/g 菌体,以及固定化时间 0.5~2 h 进行 4 因素 4 水平的实验,以此作为网络学习样本,人工神经网络学习样本和优化的结果见表 1。

表 1 人工神经网络学习样本和优化结果

Table 1 Samples and result of artificial neural network(ANN)

Factor No.	Gelatin conc./%	Formaldehyde conc./%	Immobilizing time/h	Immob. solution vol. (mL·g ⁻¹)	Activity yield/%
1	0.5	0.5	0.5	4	26.5
2	0.5	1.0	1.0	6	11.7
3	0.5	1.5	1.5	8	69.0
4	0.5	2.0	2.0	10	40.3
5	1.0	0.5	1.0	8	39.4
6	1.0	1.0	0.5	10	25.1
7	1.0	1.5	2.0	4	16.5
8	1.0	2.0	1.5	6	11.6
9	1.5	0.5	1.5	10	32.8
10	1.5	1.0	2.0	8	42.7
11	1.5	1.5	0.5	6	15.4
12	1.5	2.0	1.0	4	30.0
13	2.0	0.5	2.0	6	59.1
14	2.0	1.0	1.5	4	55.3
15	2.0	1.5	1.0	10	36.5
16	2.0	2.0	0.5	8	66.6
Result of ANN	0.5	0.5	1.5	8	80.9

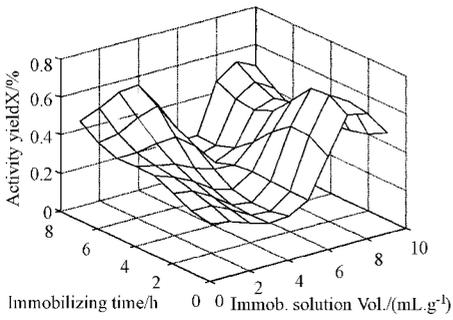


图 1 神经网络优化结果示意图

Fig.1 Schematic diagram for result of artificial neural network

图 1 为明胶浓度 0.5% ,甲醛 0.5% ,固定化时间坐标的优化结果示意图。通过神经网络得到的较优固定化条件为明胶浓度 0.5%(W/V) ,甲醛浓度 0.5%(W/V) ,固定化时间 1.5 h ,菌体与固定液的用量比 1:8。

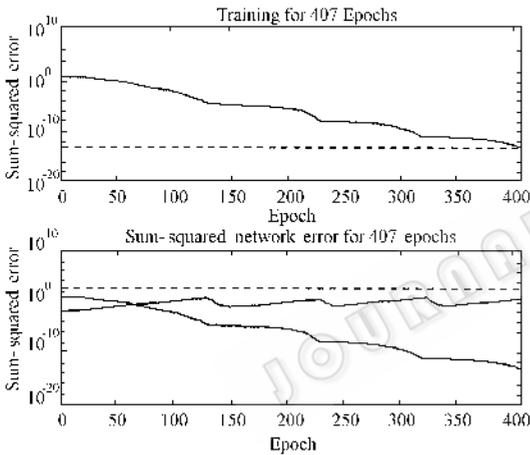


图 2 网络训练误差下降曲线

Fig.2 Sum-squared error decrease curve of network training

图 2 示出了网络学习过程中的误差下降曲线 ,误差选择为 10^{-12} ,网络学习 407 次即达到要求。

从人工神经网络的计算结果可以看出 ,固定液用量比和固定化时间的最佳点均在所选定的范围内 ,而明胶浓度和甲醛浓度 ,则处于边界点。通过实验进一步测定了甲醛浓度对菌体酶脱落率的影响 ,结果如表 2 所示。

表 2 甲醛浓度对固定化菌体酶的脱落率的影响*

Table 2 The effect of formaldehyde on enzyme loss of immobilized pellets

Formaldehyde concentration/%	0	0.25	0.3	0.5
Enzyme loss/%	50	31.3	23	5

* 固定液中明胶浓度 0.5% ,固定液用量比 1:8 ,时间 1.5 h ,低温放置 20 d 后的测定结果

实验结果表明 ,尽管甲醛浓度为 0.3% 时的酶活保留率较 0.5% 时稍高 ,但放置 20 d 后 ,菌体上酶的脱落率却达到 23% ,远高于甲醛浓度 0.5% 时的菌体脱落率 5%。因此 ,作为交联剂 ,0.5% 的甲醛浓度不宜再低。而明胶 ,如前面文中所述 ,在固定化过程中 ,是作为酶活性保护剂 ,在浓度达到 0.5% 时 ,酶活保留率接近最大 ,继续加大浓度 ,酶活增加速率趋缓 ,若进一步增加明胶浓度 ,反而由于增加了扩散阻力 ,使酶的表观活性有所下降。上述分析表明甲醛和明胶的浓度不宜再进一步降低 ,这也充分说明了神经网络所找到的条件是合理的。

依上述固定化条件而制备的固定化米曲霉 ,其比酶活为 1500 u ,固定化前的游离菌体的比酶活为 1800 u ,酶活保留率为 83% ,这与人工神经网络的优化值 80.9% 相当吻合。在间歇反应器中 ,利用上述固定化菌体和游离菌体拆分 N-乙酰-DL-丙氨酸外消旋体反应一次 (30 h) ,其酶的脱落率分别为 4.3% 和 40% ,因而不论是从酶活的保留率 ,还是从酶的稳定性方面 ,都表明人工神经网络找到了较优的固定化工艺条件。

4 结 论

通过液体培养米曲霉 3042 菌体 ,制备出了直径为 1~2 mm ,菌壁上含较高氨基酰化酶浓度的菌球 ;以甲醛为交联剂 ,惰性蛋白明胶为稳定剂对上述菌球进行固定化研究 ,应用神经网络对制备工艺进行优化 ,得到了较好的固定化条件 :每克湿菌体所用的 8 mL 固定液中含 0.5% 的明胶 ,0.5% 的甲醛 ,固定化时间为 1.5 h ,在此条件下固定化后的菌体比酶活为 1500 u ,比酶活保留率为 83%。间歇反应器中 ,反应一次 (30 h) 后 ,固定化菌体上酶的脱落率为 4.3% ,具有较高的操作稳定性。

符号说明

$E(w)$ —网络能量

$F(s_j^m)$ —传递函数 ,Sigmoid 函数

i —结点

j —结点

k —样本标号

m —网络层

$n(N)$ —第 m 层网络结点总数

T^k —样本 k 的期望值

w_{ij}^m —第 m 层结点 i 与 $m-1$ 层结点 j 的连接权重

Δw —加权修正误差

y_j^m —第 m 层结点 j 的计算结果

x_k —样本 k 的输入结点的计算结果

η —动量因子

α —学习速率

δ_j^m —第 m 层结点 j 的误差值

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ephraim Katchalski-Katzir E , Dieter M. Kraemer. Eupergit C , a carrier for immobilization of enzymes of industrial practical. *J Mol Cat B :Enzymatic* , 2000 , **10** (2) :157 ~ 176
- [2] ZHOU X Y (周晓云). Enzyme Technology (酶技术). Beijing :Petrol Industry Press ,1995.
- [3] Kong H Lee , Pat M Lee , Yew S Siaw. Immobilization of aminoacylase by encapsulation in poly-L-lysine stabilized calcium alginate beads. *J Chem Tech Biotechnol* , 1993 , **57** (1) :27 ~ 32
- [4] SONG Z X (宋正孝) , LI X M (李晓敏) , WANG Z (王铮) *et al.* Optical resolution of DL-alanine by using immobilized *Aspergillus oryzae* cells. *Chinese J Biotechnology* (生物工程学报) , 1997 , **13**

(1) :168 ~ 173

- [5] LI Q B (李清彪) , CHEN H F (陈洪妨). A modified method of measuring the effective diffusivities in cell-free and cell-occupied gel. *Ion Exchange and Adsorption* (离子交换与吸附) , 1992 , **8** (4) :355 ~ 361
- [6] GUO L H (郭鲁宏) , YANG S K (杨顺楷). Study on Gallic acid preparation by using immobilized Tannase from *Aspergillus niger*. *Chinese J Biotechnology* (生物工程学报) , 2000 , **16** (5) :614 ~ 617
- [7] HAN J Y (韩金玉) , XIAO J (肖剑) , WANG H (王华) *et al.* Measurement and correlation of taxol solubility in methanol , ethanol and methanol-water systems. *Journal of Chemical Industry and Engineering* (China) (化工学报) , 2001 , **52** (1) :64 ~ 67
- [8] HU S R (胡守仁) , YU S B (余少波) , DAI K (戴葵). Artificial Neural Network Introduction (神经网络导论). Changsha (长沙) : National Dependence University of Science and Technology Press , 1993

Study of Immobilization of *Aspergillus oryzae* Mycelium Aided by Artificial Neural Network

WANG Yan¹ ZHANG Feng-Bao^{1*} GAO Zhi-Ming² SONG Zheng-Xiao¹ ZHANG Guo-Liang¹ ZHAO Lin¹

(¹ School of Chemical Engineering and Technology , ² School of Material Engineering , Tianjin University , Tianjin 300072 , China)

Abstract *Aspergillus oryzae* mycelium pellets with abundant aminoacylase were cultured by liquid fermentation. Mycelium pellets were immobilized by crosslinking method with reagent of gelatin and formaldehyde. Basing on the orthogonal design table L_{16} (4^5) , artificial neural network (ANN) model with back-propagation (BP) of error structured 4-10-15-1 was used to optimize the immobilization conditions. And the optimal conditions were obtained. Then the activity of the immobilized cells prepared under the optimal conditions was assayed. Compared with the free mycelium activity of 1800u , the residual activity rate was 83% , which was in good accordance with that predicted by ANN. It illustrated that artificial neural network can be used to find optimal conditions for cell immobilization.

Key words artificial neural network , *Aspergillus oryzae* mycelium pellets , immobilization , crosslinking method