

## 固态发酵的参数周期变化及对微生物发酵的影响

# The Periodic Change of Environment Factors in Solid State Fermentation and Effect on Microorganism Fermentation

李宏强, 陈洪章\*

LI Hong-Qiang and CHEN Hong-Zhang\*

中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

**摘要** 研究了压力脉动固态发酵反应器内环境参数的周期性变化以及这些周期性的环境刺激对于固态培养的斜卧青霉发酵的影响。研究结果显示:在这种反应器中,在空气压力脉动的带动下,反应器内的温度和空气湿度也会发生较大幅度的周期性变化,变化的周期和空气压力脉动的周期相同,变化的幅度随着压力脉动的幅度增大而增加;在外界周期刺激条件下,较未加外界周期刺激斜卧青霉的生物量增加了 104%,二氧化碳的产生总量增加了 229%和纤维素酶的产量增加了 320%,数据显示外界周期刺激不仅增加了菌体的生物量同时增加了其代谢活性。

**关键词** 固态发酵, 外界周期刺激, 生物反应器, 纤维素酶

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0440-06

**Abstract** The periodic change of environment factors in air pressure oscillation solid state fermentation bioreactor was studied. Based this research the effect of the periodic environment stimulations on *Penicillium decumbens* JUA10 cultured in solid state substrate was researched too. The research results showed that in this bioreactor air temperature and relative humidity had large amplitude periodic change driven by air pressure oscillation. The changes had same frequency with the air pressure Oscillation and had amplitude that increased with the air pressure increased. When the press lower limit and upper limit were 0.0MPa and 0.2MPa respectively, pulsating period was 20min, contrast to the period gather breath solid state fermentation, the air press pulsating SSF had a 2.29 times total CO<sub>2</sub> production increase, 3.2 times enzyme activity increase and 1.04 times biomass increase. The data suggested air press pulsating stimulation not only increased biomass but also the metabolic activity.

**Key words** solid state fermentation, environment period stimulation, bioreactor, cellulase

固态发酵是一种古老的发酵方式<sup>[1]</sup>。上个世纪 40 年代以来液体发酵逐渐取代固态发酵成为发酵的常规技术,仅在某些传统的行业如酿造等还采用

固态发酵技术<sup>[2]</sup>。但是液体发酵也有其自身难以克服的缺点,如高能耗,生产大量的有机废水等,这些缺点限制了其进一步的发展<sup>[3]</sup>。为了解决这个问

Received: November 3, 2004; Accepted: December 15, 2004.

This work was supported by Grants from The National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2004CB719700); CAS Knowledge Innovation Program Important Direction Project (No. KJXC2-SW-206); Hi-Tech Research and Development Program of China (863program) (No. 2003AA514023).

\* Corresponding author. Tel:86-10-82627067; E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No.2004CB719700)、中国科学院知识创新工程重要方向性项目(No. KJXC2-SW-206)和国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2003AA514023)项目资助。

题,固态发酵在最近 20 年内重新获得重视<sup>[4,5]</sup>,科学家和工程技术人员纷纷尝试开发固态发酵生产工艺以解决液态发酵过程中产生的问题。到目前为止固态发酵的研究表现出了实验室研究多,工程化研究少,产业化推广更少的局面。造成这种局面的一个重要原因就是缺乏适合大规模纯种培养的固态发酵反应器<sup>[6,7]</sup>。压力脉动固态发酵生物反应器是一种新型的固态发酵反应器。它成功地实现了固态发酵反应器的放大和纯种培养,并被用于 B.t 的产业化生产<sup>[8]</sup>。压力脉动固态发酵反应器之所以有优秀的表现,可以从两个方面加以解释:首先反应器内空气的压力脉动大大改善了发酵过程中的传热、传质条件,这已经在先前的工作中得到了很好的证明<sup>[9]</sup>;再者,在反应器中由于空气的压力脉动使微生物的外界环境形成了一个复杂的周期刺激源并对微生物的代谢产生了积极的影响。本文研究了这种新型的反应器内两种重要的环境参数,并在此基础上通过对比周期换气和周期压力脉动固态发酵研究了这些周期性的外界刺激对于斜卧青霉的代谢情况的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 固态发酵生物反应器

试验所用的压力脉动固态发酵反应器为本课题组所研制,结构如图 1 所示。体积  $V = \pi \cdot R^2 \cdot L = 3.14 \times 1.62 \times 3.46 = 27.83\text{L}$ 。

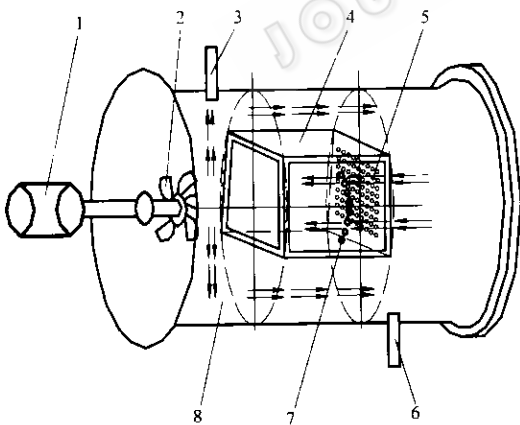


图 1 压力脉动固态发酵反应器

Fig.1 Solid-state fermentation bioreactor

1: motor; 2: fan; 3: air outlet; 4: luggage carrier; 5: air distribution board; 6: air inlet; 7: spare holes; 8: bioreactor body.

### 1.2 压力脉动过程控制及数据采集系统

发酵过程的控制和数据采集是通过在 MCGS 全中文工控组态软件(北京昆仑通态自动化软件科技有限公司)上自主开发的控制程序进行控制的。整个系统的控制关系图如图 2 所示。

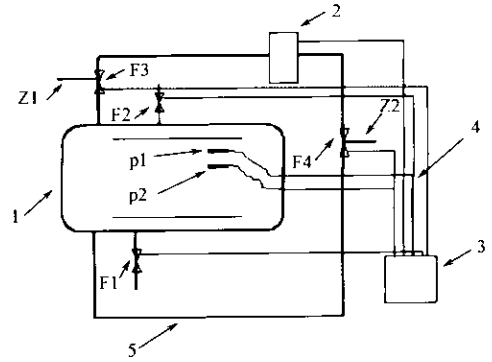


图 2 压力脉动固态发酵系统过程控制及数据采集原理图

Fig.2 Profile of the process controlling and data collection of the air pulsating SSF system

1: bioreactor body; 2: exhaust analysis system; 3: industry control computer; 4: lines for process controlling and data collection; 5: air tubes; F1: electromagnetic valve for compressed air in; F2: electromagnetic valve for exhaust; F3, F4: tee joint electromagnetic valve for air circulation; Z1, Z2: bypass of the tee joint electromagnetic valve; p1, p2: temperature and relative humidity probes.

### 1.3 温度和湿度传感器的校准

温度的测量采用精度为  $0.1^\circ\text{C}$  的 Pt100 温度传感器。首先将传感器和水银温度计 ( $0 \sim 100^\circ\text{C}$ ,  $0.1^\circ\text{C}$ ) 置于盛水的烧杯中加入冰块,使水温降至  $0.0^\circ\text{C}$ ,校准传感器的零点。然后加热烧杯中的水使之达到  $50.0^\circ\text{C}$ ,校准传感器的斜率。

空气相对湿度的测量采用 HM1500 型相对湿度测量仪来进行。选用一些饱和水活度已知的盐<sup>[10,11]</sup>,将其置于大试管内,加入少许的蒸馏水使之成为饱和溶液。将湿度传感器置于试管液面上,密封试管口后将试管置于恒温的水浴中,待湿度计稳定后校准湿度计。

### 1.4 不同压力脉动条件下温度和相对湿度的测量

分别在室温 ( $22^\circ\text{C}$ ) 和发酵温度 ( $30^\circ\text{C}$ ) 下,在压力脉动高压为  $0.1\text{MPa}$  和  $0.2\text{MPa}$  下,在压力脉动周期分别为  $5\text{min}$ 、 $10\text{min}$ 、 $15\text{min}$  和  $20\text{min}$  的条件下,用计算机记录了压力脉动过程中温度和湿度的周期变化情况。

### 1.5 菌种和培养基

斜卧青霉 (*Penicillium decumbens* JUA10) 菌种移接在  $10\%$  麸皮浸汁斜面上<sup>[12]</sup>。发酵培养基为:汽爆秸秆<sup>[13]</sup>/麸皮 (8:2),固液比 1:2.5,液体为营养盐溶液,每  $100\text{mL}$  含有  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1.5\text{g}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $0.6\text{g}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.3\text{g}$  发酵所用的培养基干重为  $125\text{g}$ 。

### 1.6 两种方式的固态发酵

灭菌后的培养基冷却后接种  $60\text{mL}$  浓度调整为  $5 \times 10^8$  孢子悬浮液搅拌均匀后,分别在反应器中进

行两种方式的固态发酵:1. 周期换气静态固态发酵,利用本发酵罐的控制系统在发酵过程中每隔20min,打开F1和F2阀30s用压缩空气置换出罐内的空气。在两次置换过程中间打开F3和F4通过尾气分析仪中的蠕动泵使罐内空气通过尾气分析仪,测量罐内空气CO<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>的浓度变化。测量值被工控机中的软件采集并保存。2. 周期压力脉动固态发酵,在前一种方式的基础上在周期换气结束后加入一个10s的高压过程,即在换气结束后打开F1关闭F2使罐内压力达到0.2MPa后维持10s后打开F2放气至常压后开始常压过程。尾气浓度变化的测量同上。

### 1.7 FPA 分析

发酵结束后将全部发酵基质称重,然后取5/125为一份,取3份测量酶活。在称取的酶曲加入100mL的0.2mol/L pH4.8的乙酸缓冲溶液,室温下浸泡4h,于4000r/min离心15min,将上清液适当稀释后取2.5mL的酶液加入1条1cm×6cm的Whatman 1号滤纸50℃保温60min后加入2.5mL DNS试剂沸水浴5min冷却后于520nm比色法测定酶解得到的葡萄糖量<sup>[14]</sup>,数据换算为滤纸酶活。FPA的单位定义为每分钟酶解产生1 $\mu$ mol的葡萄糖的酶量为1IU。

### 1.8 生物量分析

发酵基质总重的5/125为一份,三份70℃48h烘干后测生物量用比色法测定菌体中氨基葡萄糖的含量来代表固态发酵的生物量。方法见参考文献[15],采用氨基葡萄糖标准品绘制标准曲线,通过在琼脂平板上培养获得的纯菌体换算出每克干菌体细胞中的氨基葡萄糖含量作为固态发酵生物量测定的标准。

### 1.9 二氧化碳代谢产量的测量和记录

发酵过程的尾气分析采用西克麦哈克(北京)仪器有限公司的尾气在线测控系统检测,通过工控软件自动记录发酵过程中反应器中尾气的二氧化碳和氧气的浓度。

## 2 结果

### 2.1 空罐内空气温度和相对湿度在压力脉动条件下的周期变化

用计算机记录的罐内空气温度和相对湿度的变化曲线如图3~7所示。从这些数据中可以看出,罐内空气的温度和相对湿度也有周期性的变化。变化的基本规律是,随着罐内空气压力的增加,罐内温度和相对湿度均增加,但是在不同的条件下其变化的

幅度差别很大。

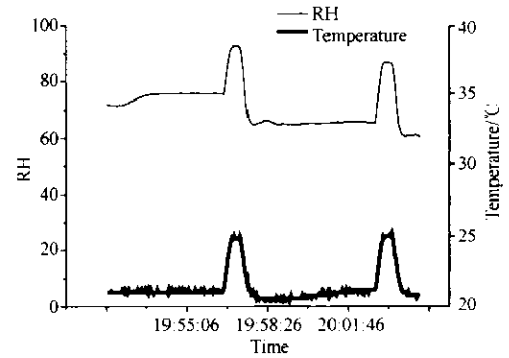


图3 压力脉动振幅0~0.2MPa,脉动周期5min,管内空气22℃,无水盘时,压力脉动对于反应器内空气温度和湿度的影响

Fig.3 When the press lower limit, upper limit, period and air temperature were 0.0MPa, 0.2MPa, 5min, 22℃ respectively, without water tray the effect of air pressure pulsation on air temperature and relative humidity

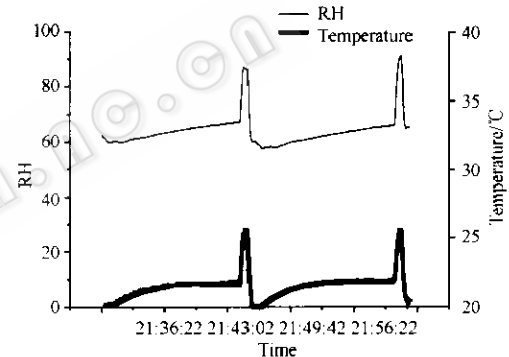


图4 压力脉动振幅0~0.2MPa,脉动周期20min,管内空气22℃,无水盘时,压力脉动对于反应器内空气温度和湿度的影响

Fig.4 When the press lower limit, upper limit, period and air temperature were 0.0MPa, 0.2MPa, 20min, 22℃ respectively, without water tray the effect of air pressure pulsation on air temperature and relative humidity

首先,温度和空气相对湿度的变化幅度和脉动周期没有明显的关联,随着脉动周期的延长,温度和相对湿度的变化幅度没有明显的变化,基本保持相同的振幅,这可以在图3、4中明显看到。在没有加水盘,空气温度在室温,压力脉动幅度为0.2MPa的条件下,温度在脉动周期内变化的幅度在4~5℃之间,空气的相对湿度变化在RH65~88之间。这可能是由于在最小的脉动周期内反应器内的空气在温度和湿度上也达到了平衡。

其次,当反应器内的温度控制在不同的温度时(本文中选择的室温 and 常用的丝状真菌培养温度30℃)。压力脉动过程中温度和空气相对湿度的周

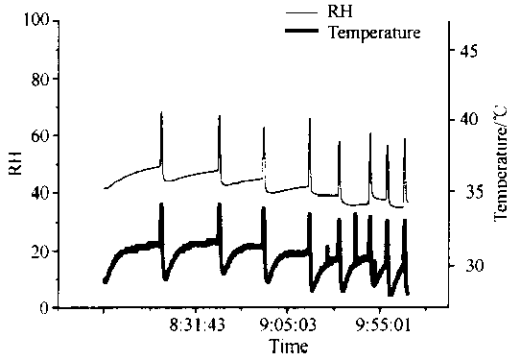


图5 压力脉动振幅0~0.2MPa,管内空气30℃,无水盘时,压力脉动对于反应器内空气温度和湿度的影响

Fig.5 When the press lower limit, upper limit, period and air temperature were 0.0MPa, 0.2MPa, 30℃ respectively, without water tray the effect of air pressure pulsation on air temperature and relative humidity

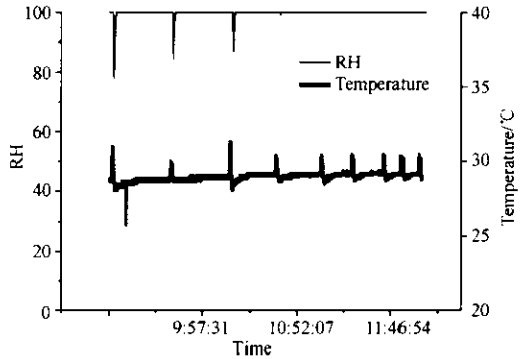


图7 压力脉动振幅0~0.1MPa,管内空气30℃,有水盘时,压力脉动对于反应器内空气温度和湿度的影响

Fig.7 When the press lower limit, upper limit, period and air temperature were 0.0MPa, 0.1MPa, 30℃ respectively, with water tray the effect of air pressure pulsation on air temperature and relative humidity

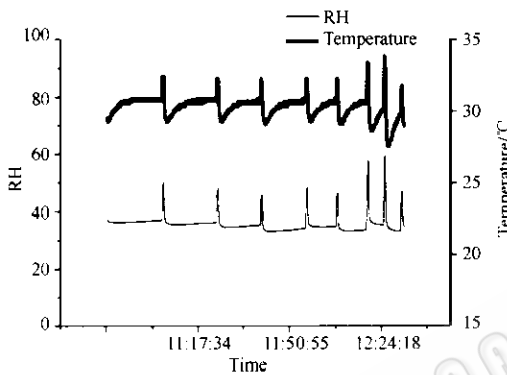


图6 压力脉动振幅0~0.1MPa,管内空气30℃,无水盘时,压力脉动对于反应器内空气温度和湿度的影响

Fig.6 When the press lower limit, upper limit, period and air temperature were 0.0MPa, 0.1MPa, 30℃ respectively, without water tray the effect of air pressure pulsation on air temperature and relative humidity

期变化规律基本相同,所不同的就是变化范围的不同,温度的变化是在一个较高的起点上变化的,而相对湿度的变化则是在一个较低的起点上变化的。这一现象很好理解。相对湿度的定义是在一定的总压下,湿空气中水气分压 $P$ 与同温度下水的饱和蒸汽压 $P_s$ 之比的百分数。在进入罐内之前空气的含水量是一定的,也就是说其湿度是一定的。所以其相对湿度就取决于温度,温度升高水的饱和蒸汽压也升高<sup>[16]</sup>,当温度升高时,罐内的相对湿度将有明显的下降。

再次,当空气脉动时的振幅减小时,温度和空气相对湿度的变化幅度都相应的减小,温度的变化幅度从4~5℃,减小到3~4℃,空气相对湿度的变化幅度则由20%减小到15%左右,温度变化幅度的减小可以从充气 and 排气过程中的能量转化得到解释,

当充气时空气经过空气压缩机的作用温度升高,同时空气在迅速冲入罐中时空气具有的动能部分转化为热能导致温度升高,在高压过程结束时,打开放气阀时,空气迅速排出,空气获得了大量的动能,这些能量的来源就是由于空气温度降低的能量转化而来,这样一个空气脉动的过程就导致了罐内空气温度的一个脉冲过程,整个过程基本上是和空气的脉动过程重合的。同时,由于空气的相对湿度在绝对湿度不变的情况下和温度和总压有关,其关系见文献[16],当压缩比越大时,空气的相对湿度也越大,因此可以解释当空气的脉动幅度为0.2MPa时空气相对湿度的脉动比0.1MPa是要大。

最后,通过图6、7可以看出,当反应器内加上水盘时,将对反应器内的温度和湿度的周期变化产生根本性的改变。对于温度,可以看出温度的变化幅度由4~5℃减小到了1℃。相对湿度的变化幅度则减小到了10%以下。对于温度的变化幅度大大减小,可能是反应器内加水以后反应器内的空气的相对湿度一直保持在相对较高的水平,这样空气的含水量大大增加,由于水蒸汽的热容(1.9kJ/kg·K)较空气(1.05kJ/kg·K)大,使温度的变化幅度大大减小了。对于空气湿度的变化,其变化方式和没有加水平时有了相反的变化,当没有加水盘时,当空气压缩时空气的相对湿度增大,但是在加了水盘之后,在低压阶段密闭的反应器内的水蒸气达到在此温度下的饱和,当开始加压时水蒸汽会达到过饱和而发生冷凝,在高压结束时罐内压力下降,则空气的相对湿度会随压力的下降而下降,但是下降的幅度有限,而且在高压结束不久,由于罐内空气的水分蒸发而在次达到饱和状态。所以会形成和不加水盘不太一样的

倒峰。这也说明,通过在反应器内加水盘,可以很好的保持发酵过程中反应器内时相对湿度,由于空气的相对湿度和反应器体系中的水活度有一定的联系,因此这也是保持发酵基质的水活度的有效手段。

当反应器内没有空气的压力脉动只有周期的空气交换时,空气温度和相对湿度的变化如图 8 所示。

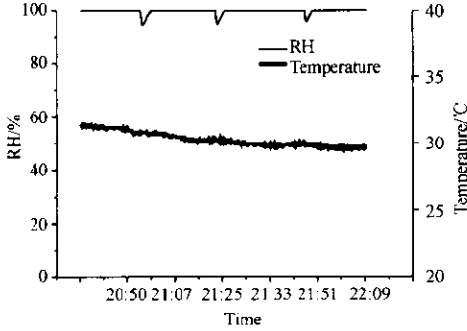


图 8 管内空气 30℃,有水盘时,周期换气对于反应器内空气温度和相对湿度的影响

Fig.8 When period and air temperature were 20min,30℃ respectively, with water tray the effect of period gather breath on air temperature and relative humidity

2.2 CO<sub>2</sub> 浓度变化曲线

用计算机记录的典型的 CO<sub>2</sub> 浓度实时变化曲线如图 9(周期换气固态发酵的第一天)所示。

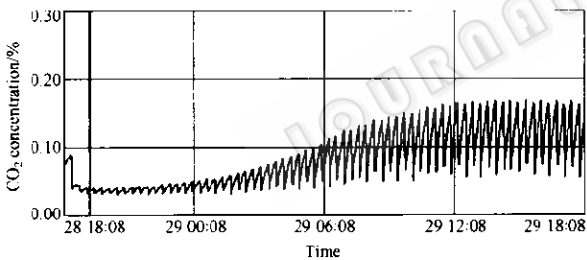


图 9 计算机记录的 CO<sub>2</sub> 浓度实时变化图

Fig.9 The CO<sub>2</sub> concentration curve recorded by computer

2.3 两种发酵方式 CO<sub>2</sub>呼吸强度的对比

计算机实时地记录下了发酵罐内 CO<sub>2</sub> 浓度的变化情况。我们用常压结束时的 CO<sub>2</sub> 浓度减去常压开始时的浓度就可以得到在 20min 内 CO<sub>2</sub> 的产生量。由于在反应器内 CO<sub>2</sub> 的产生量和 O<sub>2</sub> 的消耗量在大多数时候几乎相同,所以 CO<sub>2</sub> 这个产生量同时也就反应了微生物在 20 min 内的代谢活力的大小。图 10 按上述思想将两种发酵方式的呼吸强度的变化做了对比。周期换气固态发酵在 50 个换气周期就达到了呼吸强度的峰值并长时间维持。而周期压力脉动固态发酵在 100 个换气周期才达到呼吸强度的峰

值,但是在达到峰值后就迅速下降,表现出来和前一种发酵方式完全不同的峰型曲线。

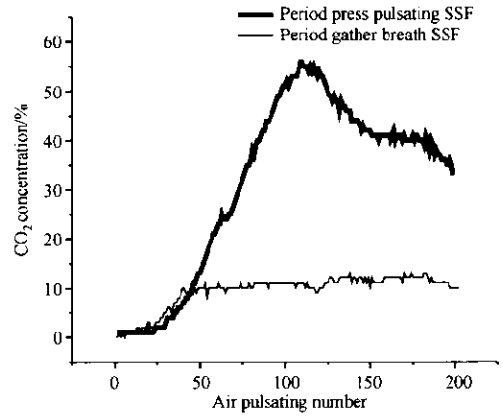


图 10 两种发酵方式呼吸强度的变化曲线

Fig.10 The respiration intensity curve of the two kinds of fermentations

2.4 两种发酵方式 CO<sub>2</sub>呼吸总量的对比

对上面两条曲线进行积分,就得到了两种方式的 CO<sub>2</sub>呼吸总量变化曲线。曲线如图 11 所示。比较两条曲线发现在发酵的初期,两条曲线几乎重合,但是在 60 个脉动周期之后,有压力脉动的固态发酵其代谢活力明显高于另外的发酵方式。在 200 个脉动周期后,压力脉动固态发酵的总的 CO<sub>2</sub> 产生量 (62.27)为没有压力脉动的(18.95)3.29 倍。

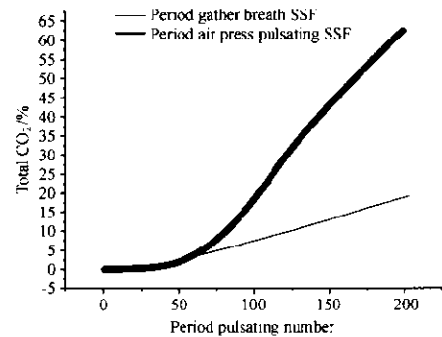


图 11 两种发酵方式呼吸总量的变化曲线

Fig.11 The total CO<sub>2</sub> curve of the two kinds of fermentations

2.5 两种发酵方式生物量和酶产量的对比

在 3 d 的发酵周期内,比较了两种发酵方式的相对酶活和生物量。则酶活和生物量的相对值如图 12 所示。从中可以看出采用压力脉动固态发酵方式后,酶活较周期换气固态发酵提高了 3.2 倍。发酵过程中从 CO<sub>2</sub> 的显示的代谢活性的高低,其原因首先可能是由生物量的不同而产生的。从图中可以看出在增加压力脉动后,发酵基质中的生物量增加

了 1.04 倍。

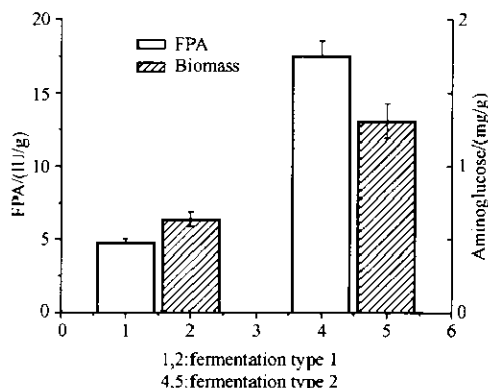


图 12 两种发酵方式产酶和生物量的比较

Fig.12 The FPA and biomass contrast of the two kinds of fermentations

### 3 小结

将周期操作用于化学反应可以提高反应的收率和选择性,这在生产和试验中已有应用并用反应动力学模型做出了解释<sup>[17]</sup>。将周期操作用于生物反应也有不少的尝试和成功实例。但是由于生物反应的复杂性难以套用化学反应的方法用动力学加以解释,需要研究微生物在周期刺激下的代谢变化情况,这其中必然要涉及到生物反应过程中的信息传递问题<sup>[18]</sup>。

通过本试验,对于压力脉动固态发酵反应器中存在的周期性因子进行了研究,总结了基本的规律。用尾气分析的方法辅助其他手段研究了压力脉动对固态发酵中微生物代谢的影响。从试验结果可以看出,压力脉动可以促进微生物在固态基质上的生长,因为压力脉动的发酵方式中微生物的生物量成倍地增加了。这可能是压力脉动过程中的充气和快速放气过程增加了固态基质中的空隙度,同时增加了氧气的供应。而在只有换气的固态发酵过程中,从 CO<sub>2</sub> 的强度曲线也看出,微生物向底层物料生长的过程是一个缓慢而不同步的过程,这就大大延长了发酵的周期。但是仅从这一点还不能完全解释压力脉动对于固态发酵的巨大促进作用。因为在整个过程中 CO<sub>2</sub> 的总的排出量,有压力脉动的是没有压力脉动的 3.29 倍,大大高出生物量增加的 2.04 倍。这就说明,同样的生物量产生的 CO<sub>2</sub> 量在压力脉动条件下也大大提高了,也就是说压力脉动不仅促进了微生物生物量的增加而且还增加了微生物的代谢活性,这也为我们今后的研究指明了方向。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Chen HZ (陈洪章), Xu J (徐建). Modern Times Solid State Fermentation Principle and Application (现代固态发酵原理及应用). Beijing: Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2004
- [2] Yu JT (俞俊棠), Tang XX (唐孝宣). Biotechnology (生物工艺学). Shanghai, East China University of Science and Technology Press (华东理工大学出版社), 1991
- [3] Ye W (叶伟), Qi PY (齐平言), Zhu WP (祝万鹏). Experimental Study on anaerobic treatment of amino acid fermentation wastewater. *Shanghai Environment Science* (上海环境科学), 1998, 17: 11 - 13
- [4] Pandey A Carlos R Soccol, David Mitchell. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem*, 2000, 35: 1153 - 1169
- [5] David A Mitchell, Nadia Krieger, Deidre M Stuart, Ashok Pandey. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem*, 2000, 35: 1211 - 1225
- [6] Durand A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J*, 2003, 13: 113 - 125
- [7] Chen HZ (陈洪章). Bioprocess and Equipments (生物过程工程与设备). Beijing, Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2004
- [8] Chen HZ, Xu FJ, Tian ZH. A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93: 211 - 214
- [9] Xu FJ, Chen HZ, Li ZH. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation *Enzyme. Microb Tech*, 2002, 30: 45 - 48
- [10] Silvia L Resnik, Guillermo Favetto, Jorge Chirfe *et al*. A world survey of water activity of selected saturated salt solutions used as standards at 25 °C. *J of Food Sci*, 1984, 49: 510 - 513
- [11] Liu DJ (刘代俊), Ma KC (马克承), Shi YF (石炎福). Relative humidities about saturated solutions of different kinds of Salt. *Journal of Chengdu University of Science and Technology* (成都科技大学学报). 1991, 58: 99 - 102
- [12] Chen HZ (陈洪章), Li ZH (李佐虎). Cellulas periodic stimulation solid state fermentation research. 8th Chinese National Biochemical Engineering Academic Conference Symposium (第八届全国生物化学学术会议论文集), 1998, pp. 353 - 358
- [13] Qu YB, Chen HZ. SCP from steam-exploded hemicellulose by *Trichospora*. *J Ferment Bioeng*, 1992, 73: 386 - 396
- [14] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl Chem*, 1987, 59: 257 - 268
- [15] Lu XL (路秀玲), Zhao SX (赵树欣). Biomass determination in solid-state fermentation. *Journal of Tianjing Institute of Light Industry* (天津轻工业学院学报), 2000, 4: 57 - 62
- [16] Yao YY (姚玉英). Chemical Engineering Principle (化工原理) Tianjing, Tianjing Science and Technology Press (天津科学技术出版社), 1992
- [17] Leah E Stermann, Ydstie B Erik. The steady-state process with periodic perturbations. *Chem Eng Sci*, 1990, 45: 721 - 736
- [18] Li ZH (李佐虎). A new principle of bioreactor design. 5th Chinese National Biochemical Engineering Academic Conference Symposium (第五届全国生物化学学术会议论文集), 1993, pp. 12 - 17