

# 纤维素酶气相双动态固态发酵

徐福建, 陈洪章, 李佐虎(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, E-mail: fujianxu@yahoo.com)

摘要: 为了充分利用纤维素酶固态发酵的优势, 提出了纤维素酶气相双动态固态发酵的方式. 研究表明: 在优化条件下(最佳压力脉冲范围、脉冲频率及气体内循环速率), 发酵温度得到较好地控制, 9.0cm 高的填料层中最大温度梯度为 0.12 °C/cm; 以汽爆秸秆为底物, 发酵水活度得到较好的保持; 动态培养发酵周期(60h)比静态发酵周期(84h)缩短了 1/3, 酶活(20.36IU/g)比静态酶活(10.82IU/g)提高了 1 倍, 压力脉动固态培养的料层上中下微生物生长状况均匀一致, 且疏松, 而静态固态发酵的料层中部几乎没有菌体生长. 利用气相双动态固态发酵可为纤维素酶大规模生产奠定基础.

关键词: 纤维素酶; 温度; 水活度; 固态发酵; 汽爆麦草

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2002)03-06-0053

## The Solid-state Fermentation with Double Dynamic of Gas Phase for Celluloses

Xu Fujian, Chen Hongzhang, Li Zuohu(State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process. Eng., CAS, Beijing 100080, China)

**Abstract:** To utilize the advantages of solid-state fermentation for cellulose production, the solid-state fermentation with double dynamic of gas phase was proposed. The studies showed as follows: under the optimum operating conditions, the air pulsation range, the air pulsation periods and the air internal circulation, the fermentation temperatures were controlled quite well and the maximum temperature difference was 0.12 °C/cm at a bed height of 9.0cm; the water activity in the fermentation with steam-exploded straw as substrates was very suitable for the fungal growth; and with the observation of microbial growth by ESEM. It was discovered that air-pulsating fermentation was more advantageous to cellulose production and microorganism growth than static fermentation. The period of air-pulsating fermentation (60h) was almost shorter 1/3 and its filter paper activity of enzymes (20.36IU/mg) was larger 1 time than in the static fermentation with the fermentation period 84h and the enzyme activity (10.82 IU/mg). Thus, this double dynamic of gas laid strong basis for cellulose production on a large scale.

**Keywords:** celluloses; temperature; water activity; solid-state fermentation; steam-exploded wheat straw

纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 占陆地生态系统生物量的 80%。纤维素这一巨大资源的充分利用对解决环境污染、能源危机及食品短缺具有重大现实意义, 世界各国都将天然纤维素资源的微生物转化作为 21 世纪的重要战略性课题<sup>[1]</sup>。纤维素酶的研究、开发及利用是纤维素资源综合利用的关键。采用液体发酵法可大规模的生产纤维素酶, 但是存在着产酶水平低、生产成本低、价格昂贵等问题, 限制了纤维素酶在工业上的应用。采用固态发酵来生产纤维素酶则具有更多的优点, 如固态发酵中可选用任何天然的或纤维废弃物, 纤维素酶固

态发酵的产量是一般液态发酵的产量的 2~3 倍, 所以固态发酵可以很大程度上降低生产成本。但固态发酵的规模化生产并未迅速普及, 主要因为固态发酵一些培养参数(传热、传质及水活度等)难以控制<sup>[2-3]</sup>。在传统的固态发酵中, 加强传质、传热的手段就是机械翻动, 即气相不动, 固相连续翻动。其翻动的目的就是使颗粒混合, 加速反应颗粒间或气体分子间的接触频率, 使料层间的气体由分子扩散变为对流扩散。但

基金项目: 中国科学院应用研究与发展“九五”重点项目  
作者简介: 徐福建(1976-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物质转化利用工程。

收稿日期: 2001-05-09; 修订日期: 2001-06-12

对发酵过程中的微生物反应而言,过多的翻动对生长不利,使菌丝体断裂,翻动引起的剪切力对菌体往往有伤害.翻动固体物料除设备机械密封困难,能耗高,结构复杂,引起染菌等问题外,还有 2 个致命的缺陷:其一是粘湿物料与机械耙及四壁接触,且接触压力大,死角不可避免,无法清洗彻底,几乎不可能达到严格意义上的纯种培养;其二,翻动唯一的正面作用是使发酵料层内的气相传质由分子扩散变为对流扩散.但培养基不可能像干物料那样,不易结团,所以机械搅拌达到单颗粒混合尺度,即团块内部的大量颗粒不受机械翻动的影响,因此变分子扩散为对流扩散的有效性十分有限<sup>[4-6]</sup>.为此,本文提出纤维素酶气相双动态(气体内循环及气体压力脉冲)固态发酵(动态培养)的研究.本文主要研究气相双动态对纤维素酶固态发酵温度、发酵基质水活度  $a_w$ 、丝状真菌生长及其产酶的影响.

1 材料与方法

1.1 实验装置

50L 周期性气相双动态固态发酵罐,其主要由不锈钢体、磁力耦合系统及压力控制系统组成<sup>[7]</sup>,如图 1 所示.气体脉冲压力变化如图 2 所示,罐体气相压力脉动通过无菌空气的冲压与泻压实现:一个周期时间由冲压时间(随罐体大小而变,一般由气源能力而定),峰压稳定时间( $t_1$ ,一般为 0.5 min,人为设定),泻压时间(要求尽可能短,压降速度要快,使固体培养基潮湿颗粒间的气体发生突然膨胀而使料层发生松动)及谷压稳定时间( $t_2$ ,随微生物代谢阶段而变,人为设定) 4 段组成,罐体始终处于正压状态.气体内循环速度根据微生物不同的代谢阶段通过变速马达人为设定.

环境扫描电镜由中国科学院过程工程研究所多相反应开放实验室提供<sup>[8]</sup>.

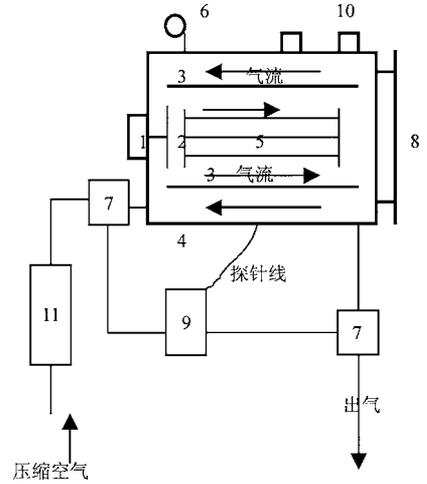
1.2 菌种

斜卧青霉(*Penicillium decumbens* JUA10)菌种移接在 10%麸皮浸汁斜面上<sup>[9]</sup>.

1.3 固态产酶培养基

汽爆秸秆<sup>[10]</sup>/麸皮(8:2),固液比 1:2.5,营

养盐含 1.5%  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.6%  $MgSO_4$ , 0.3%  $KH_2PO_4$ .



1. 变速马达 2. 循环风扇 3. 空气挡板 4. 发酵罐体 (50L) 5. 浅盘(内含温度探针) 6. 压力表 7. 电池阀 8. 手柄 9. 继电器与温度记录仪 10. 观察孔 11. 过滤器  
图 1 气相双动态固态发酵装置示意图

Fig.1 The profile of the solid-state fermentor with double dynamic of gas phase

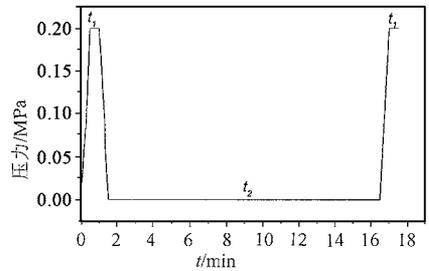


图 2 周期性气体压力脉冲示意图

Fig.2 The profile of pressure pulsation of periodical air

1.4 培养方法

在由不锈钢网做成的浅盘(30.0cm × 30.0cm × 9.0cm)中装大约 1.5kg 固态培养基(以干料计),灭菌后,接孢子悬浮液,气相双动态固态培养 3 或 4 天,及在静态培养 4 天.

1.5 酶活测定方法<sup>[11]</sup>

在固态发酵曲加入 10 倍的 pH4.8 的乙酸缓冲溶液,在室温下浸泡 4h,于 4000r/min 离心 15min,取上清液用 721 型分光光度计在 520nm 处测 OD 值,以测定酶活.

### 1.6 温度测定方法

不同料层的温度通过探针在线测定,在基质中每间隔 3cm 的床层高度放置一个温度探针.

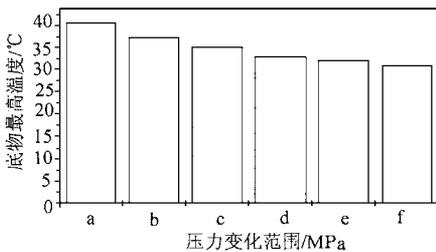
### 1.7 水活度 $a_w$ 测定方法<sup>[12]</sup>

首先取 4~6 个康威皿,分别在每个康威皿的外室放一种不同的盐(如 LiCl),并加入少量水,使之成为饱和溶液;然后在康威皿的内室中放入被测样品,用玻璃板将康威皿盖好,放入 25℃ 的恒温箱内.利用样品水分变化与对应盐的水活度制图,内插得到所测样品的水活度.

## 2 结果与讨论

### 2.1 气体脉冲压力变化范围的优化

(1) 气体脉冲压力上限的影响 本文所指压力为表压:常压被定义为 0.00 MPa.压力的下限设定为 0 点(0.00 MPa),上限变化范围为 0.00~0.30 MPa.从传热、传质观点出发,压力范围越大越利于传热、传质,如图 3 所示.但是当上限大于 0.20 MPa 时,在气相泻压过程中基质内部的气体膨胀,开始破坏菌丝体,导致酶活下降,如图 4.所以气体脉冲压力变化范围存在一个临界点即 0.20 MPa.



a. 0.00 ~ 0.05 b. 0.00 ~ 0.10 c. 0.00 ~ 0.15  
d. 0.00 ~ 0.20 e. 0.00 ~ 0.25 f. 0.00 ~ 0.30

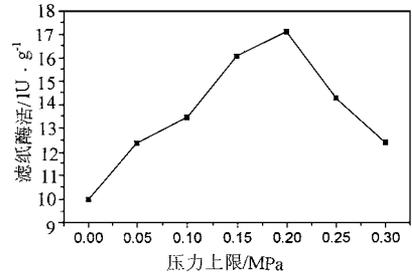
气体脉冲周期为 10 min 气体内循环速率为 1.5 m/s

图 3 压力变化范围对传热的影响

Fig.3 Effect of pressure range on temperature  
(the period of air pulsation = 10 min, the internal circulation rate of air = 1.5 m/s)

(2) 气体脉冲压力下限的影响 压力变化范围维持 0.20 MPa, 下限变化从 0.00 MPa 到 0.20 MPa,如图 5 所示.从图 5 可看出,随着压力下限的升高,酶活不断降低.可能是微生物适

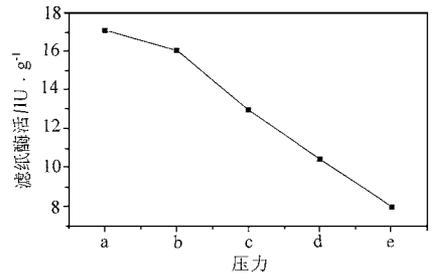
于自然状态下生长(0.00 MPa),所以低压维持在 0.00 MPa 且其维持时间  $t_2$  相对较长.从上述研究可得出结论:气体脉冲压力变化最佳范围 0.00 MPa ~ 0.20 MPa.



周期为 10 min,内循环速率为 1.5 m/s

图 4 气体压力变化范围对微生物产酶的影响

Fig.4 Effect of different lower limits of pressure on enzyme production(the pressure range = 0.20 MPa)



a. 0.00 ~ 0.20 b. 0.05 ~ 0.25 c. 0.10 ~ 0.30  
d. 0.15 ~ 0.35 e. 0.20 ~ 0.40

压力变化范围为 0.20 MPa,周期为 10 min,  
内循环速率为 1.5 m/s

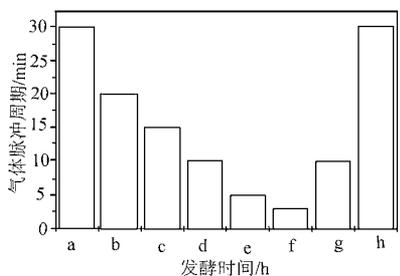
图 5 不同的压力下限对微生物产酶的影响

Fig.5 Effect of pressure range on enzyme production  
(the period of air pulsation = 10 min, the internal circulation rate of air = 1.5 m/s)

### 2.2 气体脉冲压力周期的优化

气体压力脉冲的目的除避免机械搅拌的缺陷外,主要是为了提高传质、传热速率,降低温度、O<sub>2</sub> 及 CO<sub>2</sub> 浓度梯度.在微生物代谢活跃阶段,较高频率的压力脉冲才能满足微生物所需大量 O<sub>2</sub> 及热传的要求.但如果频率较高,对罐体性能及能耗要求较高.所以在最小温度、浓度梯度与最大的脉冲频率之间存在一个折中值.

由于很难预测微生物代谢活跃阶段的开始,所以根据温度探针指示基质温度(反应微生物的代谢状况,见图8)来优化气体压力脉动周期(图6)。



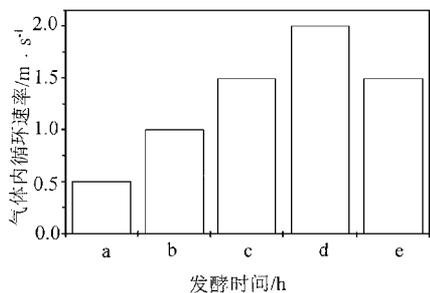
a. 0 ~ 24 b. 24 ~ 36 c. 36 ~ 42 d. 42 ~ 45  
e. 45 ~ 48 f. 48 ~ 54 g. 54 ~ 60 h. 60 ~ 72

图6 气体压力脉冲示意图

Fig.6 The profile of pulsation periods of air pressure

### 2.3 气体内循环速率的优化

气体内循环的目的是使气相始终处在对流扩散状态,它对传热的影响相对气体脉冲来讲较小(见图8)。内循环速率变化也应与微生物的代谢状况相对应,随着微生物代谢活动的加剧,气体内循环速率也应增加。但风速太大,填料层表面基质将被吹起。风速可以通过马达转速及风扇功率估计。优化后的气体内循环速率如图7所示。



a. 0 ~ 24 b. 24 ~ 36 c. 36 ~ 48 d. 48 ~ 60 e. 60 ~ 72

图7 气体内循环速率示意图

Fig.7 The profile of internal circulation rates of air

### 2.4 气相双动态对温度的影响

(1) 动态培养与传统静态培养温度变化比较 从图8可看出:基质(底物)温度变化与微生物生长曲线一致,包括滞后期、对数期及稳定

期(伴随温度下降);气体脉冲与内循环不可分割,共同影响传热的效果。传统的静态培养中,底物最高温度达到 $53^{\circ}\text{C}$ ,散热较慢,发酵所积累的大量热大大限制中温微生物的生长。而气相双动态大大提高传热效果,散热快,有利于产酶微生物的生长。

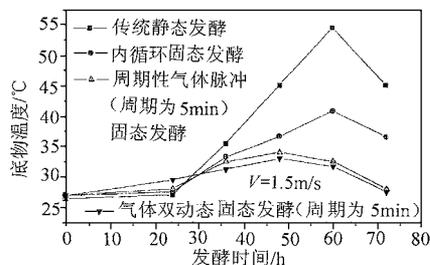


图8 动态培养与传统的静态培养底物温度变化的比较(床层高度为6cm)

Fig.8 The comparison of substrate temperatures between the dynamic and static fermentation

(2) 优化条件下气体双动态固态发酵基质温度变化 从图9可看出,不同床层高度的料温梯度很小(最大的梯度为 $0.12^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ )。有文献报道,在一个床层高度 $6.5\text{cm}$ 传统静态发酵中,最大温度梯度可达 $3^{\circ}\text{C}/\text{cm}^{[13]}$ ;及在一个强制通风的填料床式发酵中,温度梯度为 $0.13^{\circ}\text{C}/\text{cm}^{[14]}$ 。与其比较,可得出结论:气相双动态固态发酵是一个降低温度梯度、控温较好的选择。

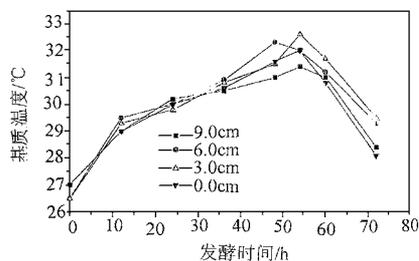


图9 在优化条件下,不同床层高度基质温度变化

Fig.9 The temperature profile of different bed heights under optimum conditions

### 2.5 气相双动态中水活度 $a_w$ 的变化

由于固态发酵最大的特点是无游离水,因而底物含水量的变化,必然会对微生物的生长

及代谢能力产生重要影响<sup>[15]</sup>.  $a_w$  表示微生物对水的可利用性,所以微生物能否在底物上生长取决于该基质的水活度  $a_w$ ,它与底物的含水量有关<sup>[16]</sup>.在固态发酵移热过程中,水分蒸发冷却约占移热的 80%<sup>[17]</sup>,随着移热速率的增加,必然会导致基质湿度的减小,改变  $a_w$  的大小.由于水分的含量与基质的物理特性有关,所以人们通常选择吸水性能较强的固体物做底物(如纸浆等).采用汽爆技术可使秸秆中的半纤维素和木质素部分降解,以此汽爆秸秆做为底物,不仅是微生物的营养物和膨松剂,纤维素酶的诱导物<sup>[9~10]</sup>,而且此底物结合水的能力较强(图 10).从图 10 可看出,在湿度相当大的范围内,水活度保持相当高.从以前的研究得知,斜卧青霉产酶最佳水活度在 0.920 ~ 0.999<sup>[9]</sup>,所以在水活度降到临界值之前,水分可被大量蒸发.从图 11 看出,在气相双动态发酵系统中,水活度保持相当好,在酶活达到最佳时(图 12),水活度为 0.953.其原因除了汽爆秸秆有较强的结合水能力外,还在于本发酵系统为密闭系统.

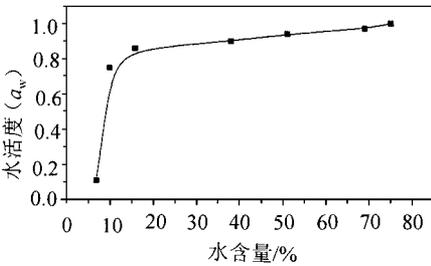


图 10 汽爆秸秆含水量与水活度的关系

Fig. 10 The relation of water content of steam-exploded straw with water activity

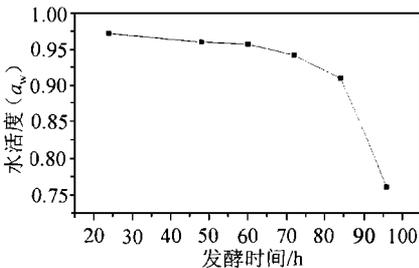


图 11 在优化条件下,气相双动态固态发酵过程中水活度的变化

Fig. 11 The change of water activity during the fermentation process under optimum conditions

## 2.6 气相双动态对微生物生长及产酶的影响

### 2.6.1 优化条件下动态培养与静态培养的微生物生长比较

从浅盘中间料层(4.5cm)及顶部(9.0cm)料层取出代表性样品,在环境扫描电镜下观察微生物及基质的微观形态变化(照片略).

从照片比较动态与静态培养相对应微生物及底物微观形态可看出:①动态培养的微生物在较短的时间内就进入迅速生长期,发酵料层内外菌丝体十分丰满,菌丝体密集程度远大于静态培养对应料层的微生物菌丝体的密集程度,且动态培养料层之间的微生物菌丝体状况变化不大,在第 3 天就出现大量的孢子,与其生长状态相对应在发酵第 4 天孢子量大而又密集;而静态培养料层之间微生物菌丝体生长状况变化较大,在第 3 天继续生长与繁殖,在第 4 天零落出现一些孢子.②观察底物的微观形态可以发现,动态培养中底物内外均被充分利用,且纤维较疏松,被微生物分解吸收较快.说明压力脉动迅速加压与泻压有利于改善底物致密程度,不但供  $O_2$  充足,还为菌丝体的大量的繁殖提供空间,所以加速了微生物对底物的分解吸收;而静态培养中底物被分解的量较小.

### 2.6.2 优化条件下动态培养与静态培养酶活比较

图 12 表示动态与静态培养发酵过程中滤纸酶活(FPA)的变化.动态培养酶活在发酵 60 h(微生物已开始产生大量孢子)就达到高峰,其平均酶活为 20.36IU/g;而静态培养发酵周期约为 84 h(孢子零落出现),其平均酶活为 10.82IU/g.

## 3 结论

(1)气相双动态固态发酵方式除了可以避免机械搅拌破坏微生物的生长外,温度得到较好的控制,在优化条件下,9.0cm 高的填料层中最大温度梯度为 0.12  $^{\circ}C/cm$ .

(2)本系统利用汽爆秸秆为底物(基质),在优化条件下水活度得到较好控制,促进了微生物的生长.

(3)扫描电镜观察表明,动态发酵的料层中

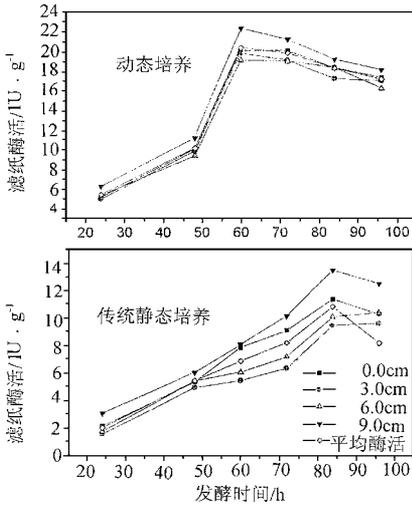


图 12 不同料层酶活的变化

Fig. 12 The enzyme change of different bed heights

微生物生长状况均匀一致,且疏松,微生物在较短的时间内就进入迅速生长期,其菌落致密,微生物菌丝体极其丰满;而静态培养微生物菌丝体量相对较少。

(4) 气相双动态培养在第 3 天开始产生孢子,其产酶达到最高峰(20.36IU/g);而静态发酵在第 4 天才出现少量的孢子,产酶达 10.82IU/g。

#### 参考文献:

- 1 Michell D A. Solid state substrate cultivation. London, K: Elsevier Science Publisers LTD, 1992. 53 ~ 63.
- 2 Lonsane B K et al. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. Process Biochem., 1992, 27: 259 ~ 273.
- 3 Ryoo D, Murphy V G, Karim M N. Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid-state fermentation. Biotechnol. Techniques, 1999, 5: 19 ~ 24.
- 4 Durand A. A new pilot reactor for solid-state fermentation:

- application to the protein enrichment of sugar beet pulp. Biotechnol. Bioeng., 1988, 31: 476 ~ 486.
- 5 Bandelier S, Renaud R, Durand A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid-state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. Process Biochem., 1997, 32: 141 ~ 145.
  - 6 Fernandez M, Perez-Correa J R, Solar I, Agosin E. Automation of a solid-state substrate cultivation pilot reactor. Bioprocess Engineering, 1996, 16: 1 ~ 4.
  - 7 徐福建,陈洪章,李佐虎. 实用新型固态发酵实验装置. 实用新型,中国专利号:012076.93.7,2001.
  - 8 邵曼君,赵万敏,肖骅昭等. 环境扫描电镜(KYKY1500) II 调试与应用. 电子显微学报,1997,16:2~6.
  - 9 陈洪章,李佐虎. 纤维素酶周期刺激固态发酵研究. 第八届全国生物化学学术会议论文集,1998,353~358.
  - 10 Qu Yinbo, Chen Hongzhang. SCP from steam-exploded hemicellulose by *Trichospora*. J. Ferment. Bioeng., 1992, 73(5): 386 ~ 396.
  - 11 诸葛建,王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京:中国轻工业出版社,1997. 209 ~ 213.
  - 12 兰景波. 内插法测定水活度的动力学分析. 食品分析, 1990,(5):55 ~ 57.
  - 13 Rathbun B L, Shuler M L. Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: Design of fermentation chambers. Biotechnol. Bioeng., 1983, 25:929 ~ 938.
  - 14 Hildyal NP, Gowthaman M K, Raghava rao KSM S. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentor: effect of temperature gradients. Enzyme Microb. Technol., 1994, 16: 253 ~ 257.
  - 15 Patrick Gervais. Development of solid-substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. Biotechnology Letter, 1986, 8(3): 191 ~ 196.
  - 16 M Actunær-Arguelles, M Gutierrez-Rojaas, G Viniegra-Gonzalez. Effect of water activity on exo-pectinase productivity by *Aspergillus niger* CH<sub>4</sub> on solid state fermentation. Biotechnology Letter, 1994, 16(1):23 ~ 28.
  - 17 K Sato, M Nagatani, S Sato. A method of supplying moisture to the medium a solid-state culture with forced aeration. J. Ferment. Technol., 1982, 60(6):607 ~ 610.