

# 固态发酵工程研究进展

徐福建 陈洪章 李佐虎

(中国科学院过程工程所生化国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要** 最近十年中,由于能源危机与环境问题的日益严重,曾被人们冷落的固态发酵再次引起人们的兴趣,固态发酵工程在基质特性、染菌控制、水活度的控制、pH的调控、传质与传热等领域的研究取得了较大的进展。论文着重综述最近固态发酵工程在上述领域取得的一些重大的发展,探讨了固态发酵过程控制参数特征及其控制策略。

**关键词** 固态发酵 底物 水活度 传质 传热 pH

固态发酵(Solid State Fermentation, SSF)是指在培养基呈固态,虽然含水丰富,但没有或几乎没有自由流动水的状态下进行的一种或多种微生物发酵过程,底物(基质)是不溶于水的聚合物,它不仅可以提供微生物所需碳源、氮源、无机盐、水及其它营养物,还是微生物生长的场所<sup>[1]</sup>。固态发酵是人类利用微生物生产产品历史最悠久的技术之一。但现代发酵技术的首要条件是纯种培养,不允许自然界的其它微生物进入,造成杂菌污染,加上现代工业对大规模集约化生产的要求,使固态发酵的生产应用处于停滞状态,几乎被排斥到现代工业之外。当液态发酵与固态发酵具有相同的经济性能时,液态发酵的许多特征使其成为较优选的方法。重要的是,液态发酵的传热、传质均匀性使其有较大程度的可行性。固态发酵含有不溶于水的固体、少量的水分及空气,微生物生成的热导致水分蒸发,使发酵体系具有汽液固不均匀三相,存在严重的浓度梯度及传热、传质困难,这样很难控制pH、水活度、最佳反应温度等,使产量大大下降。然而近几年,由于能源危机与环境问题的日益严重,固态发酵技术再次引起人们的兴趣,固态发酵领域的研究出现了翻天覆地的变化。90年代以来,大约有上千篇论文在国外不同的期刊上发表<sup>[2,3]</sup>,也不时出现一些关于固态发酵某些特征的综述<sup>[4~7]</sup>。现代固态发酵工程在基质特性、染菌控制、水活度的控制、pH的调控、传质与传热等领域的研究取得了较大的进展。但到目前为止,很难找到关于现代固态发酵工程领域系统论述的文献,追溯这段历史,有助于人们了解当代固态发酵发展动态,及时推动我国现代固态发酵工业的发展。

本篇论文着重综述最近几年固态发酵工程领域

的一些重大发展,范围主要限制在底物(底物特性研究、底物预处理及底物灭菌)、无菌操作相对性及过程控制参数(水活度、通风与传质、温度和pH)等研究方面。

## 1 基质(底物)研究

在固态发酵中,固体底物不仅提供微生物所需营养,还作为细胞的固定物,能提供微生物所需一切营养的底物被认为是理想底物。基质在固态发酵中具有独特的作用,它影响微生物发酵过程的传质、传热及微生物的代谢功能等。所以人们对底物研究比较透彻,主要集中在基质的特性、预处理及灭菌等方面。

### 1.1 基质特性

微生物要在底物上进行生长并产生代谢产物,必将受到底物本身的物理因素(底物颗粒大小、形状、空隙率、纤维含量、黏度、颗粒之间扩散率等)和化学因素(聚合度、疏水性、结晶度及电化学性质等)的影响。但底物颗粒的尺寸及湿度或水活度(见过程控制参数)在固态发酵中对微生物的生长与活性最重要<sup>[8~10]</sup>。底物颗粒的大小直接影响到单位体积反应表面积,也会影响颗粒间菌体的生长、氧的供给率及二氧化碳的移出率等。Gamil A.<sup>[11]</sup>利用甜菜为底物,进行单胞菌固态发酵生产乙醇,在其它因素不变的情况下,研究甜菜颗粒大小对产物乙醇的影响,结果发现小颗粒明显有利于乙醇产量提高。Rao PV et al.<sup>[12]</sup>利用米糠进行固态生产脂肪酶时,发现颗粒由500 $\mu\text{m}$ 减少到177 $\mu\text{m}$ ,脂肪酶活性由8.6提高到18u/g。Pandey<sup>[13]</sup>利用黑曲霉固态发酵,考察底物麸皮颗粒尺寸对产物葡萄糖苷酶的影响,最佳尺寸为

425—600 $\mu\text{m}$ ,但若利用小于180 $\mu\text{m}$ 、大于1.4mm的混合颗粒做底物,可达到与425—600 $\mu\text{m}$ 颗粒同样的效果。

一般来讲,小的底物颗粒可以提供较大微生物攻击表面积,可以明显提高固态发酵反应速率,被认为是理想的选择。但是,在许多情况下太小的颗粒容易造成底物积团,颗粒间空隙率也减小,导致阻力增大,对传热、传质产生不利的影响,以致于妨碍微生物的呼吸或通气,结果导致微生物不良生长;同时,大颗粒由于存在较大间隙有利于提高传质和传热效率,还可提供更好的呼吸及通气条件,但提供较小的微生物攻击表面积。随着菌丝的增长,空隙大小在反应过程中会减小,氧、二氧化碳有效扩散系数降低<sup>[14]</sup>。Richard A<sup>[15]</sup>通过固态反应器不同床层阻力变化,预测菌丝体的生长量变化,随着菌丝体增长,颗粒间空隙减小。所以对于某些生物过程,选择合适的颗粒是十分必要的。

### 1.2 底物预处理及吸收

大多底物都是聚合物,不仅具有不溶于水,在微生物开始发酵初期不易被攻击等特点而且底物经常缺少某些微生物所需的营养,这时需要从外部添加这些营养。为了使底物更容易地被微生物利用,经常对底物进行化学或机械预处理。底物预处理方法很多,包括:汽爆、浸提、粉碎、裂解、研磨等机械处理及碱化学处理。

微生物的生长应归因于其分泌酶对底物有效分解的程度。但底物的物理和化学因素都会促进或限制微生物的生长。下列因素决定了微生物对底物的水解及利用:(1)微生物分泌酶的种类;(2)微生物对酶解物利用状况及其生长状态;(3)酶、底物及水解物的消耗度;(4)酶的扩散率;(5)底物被攻击面积;(6)底物不均匀性;(7)最终产物的反馈抑制;(8)微生物对易降解碳源的要求;(9)酶动力学等<sup>[10-19]</sup>。

### 1.3 培养基灭菌

我们知道随着反应器的放大,培养基大规模灭菌会带来许多问题,如:培养基物理化学性质改变、有毒化合物的形成及营养物的损失等<sup>[20]</sup>。灭菌加热及冷却时间随培养基规模而变,灭菌过程受不同因素影响如杀死微生物的速率(与微生物活细胞成正比)、不同微生物对温度的敏感性差别等。对大规模灭菌一般采用高温、短时方法,这样由于热而引起营养成分破坏的概率减小。在工业化生产时,培养基灭菌遇到的另一个棘手问题是:培养基有的有机成分易受热分解,甚至在较高温度下互相作用,形成

对微生物有毒害作用的物质<sup>[20]</sup>。有时培养基灭菌除了考虑杀死微生物外,还应考虑温度对基质的物理化学性质的影响。例如:麸皮(培养基中经常用的物质)在较高温度下物理化学性质发生改变,这一般有利于微生物的吸收,所以灭菌时间要长一些<sup>[11]</sup>。

## 2 无菌操作相对概念

在任何液体发酵中,大多都要求无菌操作,这是因为杂菌可以在含水量高的液体培养基中比发酵使用的微生物生长更好。而对于固态发酵来说,其菌种一般可在含水量低的情况下快速生长;如果固态发酵所用微生物接种到已灭菌的底物上,此过程有利于微生物优于杂菌生长,甚至可以排除杂菌的干扰。这意味着严格的无菌操作在固态发酵不是十分重要。当然,操作尽可能地无菌。与液体发酵相比,这种生化反应器设计要求低,相对费用也低,这些可能是固态发酵倍受青睐的重要原因。然而,也有一些产品在固态发酵中呈现较高的潜能,但是其微生物生长缓慢,杂菌生长却很旺盛。例如:利用赤霉来生产赤霉酸。对于此种情况,用一个可以在无菌条件下操作的生物反应器是十分必要的。这种固态发酵反应器费用有可能与液体发酵反应器的费用相当。只有固态发酵具有像高产品浓度、低下游处理费用等具体优点时,这种发酵方式才可能被选用<sup>[11-13]</sup>。对于易染菌微生物的固态发酵可采取加大接种量和利用密闭反应器(如:转鼓式、密闭盘式及圆柱式反应器)等措施来控制染菌<sup>[20]</sup>。

## 3 过程控制参数

发酵过程中不同的控制参数(水活度、通风与传质、温度、pH)是固态发酵中的关键因素,如何成功控制不同的发酵参数是工程放大的难点。

### 3.1 水活度

由于固态发酵最大的特点就是无游离水,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>[21]</sup>。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。水活度 $a_w$ 因子定义为: $a_w = P(\text{湿料饱和蒸汽压})/P(\text{同样温度下纯水饱和蒸汽压})$ <sup>[11]</sup>。水活度除受基质本身的影响外,还与溶质的种类和数量有关: $a_w = 1 - \frac{VM}{55.5}$ ,V:离子数;M:溶质的摩尔浓度; $\phi$ :分子渗透压系数;55.5:纯水的摩尔浓度。底物的性质、最终产物的类型及微生物的需求共同决定底物含水量的水平,不同微生物,水活度也就不同。

一般而言,细菌要求  $a_w$  在 0.90 ~ 0.99 之间;大多数酵母菌要求  $a_w$  在 0.80 ~ 0.90;真菌及少数酵母菌要求  $a_w$  在 0.60 ~ 0.70。因此,固态发酵常用真菌原因就是其对水活度要求低,可以排除其它杂菌的污染。高的  $a_w$  降低空隙率,阻碍  $O_2$  及  $CO_2$  的扩散,增加染菌概率,最终影响真菌的生长。在发酵过程中,由于蒸发及温度上升,导致  $a_w$  下降<sup>[16]</sup>。可以通过往底物加无菌水、加湿空气、安装喷湿器等办法,来提高  $a_w$ ,以保证菌体正常生长<sup>[17]</sup>。在固态发酵中将通气、散热和含水量的控制耦合可以比较有效地调节  $a_w$ <sup>[22]</sup>。

### 3.2 通气与传质

固态发酵利用的微生物几乎都是好氧性的,空气的通气率特别重要。空气速率增加既可以提供微生物所需氧,又可以移走反应热和二氧化碳,提高传质、传热效率。在实验室及工业化大生产中,一般利用强制通无菌空气来达到通风的目的。但是通风的速率由以下因素决定:微生物的特性;合成产物对氧的需求程度;发酵反应产生的热量多少;底物的料层厚度;微生物产生二氧化碳和其它易挥发代谢产物的量;底物间的空隙大小等<sup>[16,17]</sup>。通风率增加,底物的  $a_w$  降低,导致底物干燥,相应的空气加湿的时间变长。可以用气相色谱或氧分析仪来分析氧的浓度,根据情况及时调节强制通风的速率<sup>[20]</sup>。

固态发酵没有自由水,微生物直接从空气中汲取氧,但很多操作因素与培养基特性影响氧的传递速率如空气压力、通气率、基质的孔隙率、料层厚度、基质湿度、反应器几何特征及机械搅拌装置的转速等<sup>[23]</sup>。基质表面湿度足以形成一层液膜,是传质的控制因素。其传质阻力比液体发酵小,传质速率常数仍用  $K_L a$  表示<sup>[24]</sup>。M. K. Gowthaman et al.<sup>[25]</sup> 采用深层液体发酵测定方法估计固态发酵填料床反应器的  $K_L a$ , 研究结果表明:湿度影响传质效率;气体速率在 0 - 15L/min 时,  $K_L a$  随气体速率升高而增加;但速率在 15 - 25L/min 之间,  $K_L a$  则随气体速率升高而减小。 $O_2$  和  $CO_2$  气体梯度也是影响固态发酵的重要因素。N. P. Ghildyal et al.<sup>[19]</sup> 研究浅盘固态发酵反应器气体浓度梯度对产物及产率的影响,结果表明浅盘中  $O_2$ 、 $CO_2$  浓度梯度随料层变化很大,严重影响产物与产量。梯度增大,产率大大下降。M. K. Gowthaman et al.<sup>[27]</sup> 研究填料床固态反应器气体浓度梯度对产物的影响,发现强制通风填料床固态反应器可以消除气体浓度梯度,大大增强传质能力,酶活

升高。Lu et al.<sup>[16]</sup> 比较了不同填料塔生物反应器柠檬酸的生产,指出在相同的情况下,多层填料塔反应器传质大大提高,填料床反应器在生产柠檬酸方面优于摇瓶培养,主要原因是传热、传质、通气得到了改善。

一般情况下,可利用下列措施改善传质状况:以颗粒状多孔或纤维状物质做底物;减小底物厚度;增大底物间空隙;使用多孔浅盘发酵;搅拌底物或使用转鼓反应器。目前利用较多的方法是把强制通风与搅拌相耦合,但要定时换气或改变气体流向来防止沟流的产生。物料浓度梯度的克服比温度梯度相对容易得多,通气常与散热热联系在一起,并且依附于温度控制<sup>[25]</sup>。

### 3.3 温度

传热与传质不可分割,温度是一个重要的影响因素。一方面微生物需要适宜的生长温度(真菌生长的最适温度为 20 ~ 30 °C);另一方面伴随微生物生长,会产生大量的热,又因为固态发酵传热效率差,易导致床温急剧上升(真菌致死温度在 50 ~ 60 °C)。如果产生的热不能及时散去,温度会影响孢子发芽、生长和产物的产率<sup>[8,9]</sup>。传热困难使发酵体系很难维持在最佳温度。在微生物生长对数期,固体料层温度可超过 3 °C/cm。这些就是固态发酵反应器放大的关键、难点<sup>[27~30]</sup>。在固态发酵传热方面国外研究相当多:Gutierrez - Rozas et al.<sup>[31]</sup> 比较了固态发酵生产柠檬酸填料床反应器对流、传导、蒸发三种传热机制,结果表明:蒸发传热占 64.7 %,对流占 26.65 %,传导占 8.65 %。G. Saucedo - Castaneda et al.<sup>[29]</sup> 研究出一个模拟固态发酵产热及传热数学模型,此模型被实验证实,显示传导是固态发酵传热阻力,使人们更好地理解发酵中的传热现象,是自动控制固态发酵静态反应器理论基础。N. P. Ghildyal et al.<sup>[28]</sup> 研究填料床固态发酵反应器中温度梯度对产物的影响,温度梯度严重影响酶活,利用强制通风、冷凝蛇管或夹套冷却来消除上述问题,促进传热,酶活相应增加。Sangsurasak et al.<sup>[30,32,33]</sup> 提出一个把填料床固态发酵反应器液体蒸发包括在内的二维传热数学模型,精确描述了静态发酵水分蒸发的重要性。但是这个模型为包括了水平衡,过于强调对流传热,忽略温度对空气速度的影响。在 1999 年,Fans J. Weber et al.<sup>[34]</sup> 提出一个包括上述因素的简化物质与能量守恒数学模型,实验证实了其可行性,为反应器的放大奠定了理论基础。D. M. Stuart et al.<sup>[35]</sup> 研究转鼓固态发酵反应器操作变量通过传递现象对反

反应器性能的影响,发现反应过程中的变量互相制约,互相影响,共同决定反应器发酵效果。发酵过程中传递现象是把反应器的设计、操作和温度、传质联系起来的纽带,我们对固态发酵传热、传质及动量传递的有限理解限制了反应器的放大。目前,较普遍的控温方法是把通气、温度、湿度控制相耦合<sup>[23]</sup>,但对物料颗粒内部的散热和换气仍无法有效。

### 3.4 pH 控制

与温度对微生物的影响类似,微生物存在最适 pH。多数真菌对环境 pH 不太敏感,一般在 3~9 能很好地生长,与细菌、放线菌相比,更易生活在酸性环境里,其最适 pH 在 5~8,然而有些菌必须维持在一定值如:采用里氏木霉生产纤维素酶时,pH 必须在 4.5。尽管 pH 值是一个很重要的参数,但是在发酵过程中因缺乏在线测量湿润物料 pH 的办法,所以 pH 很难有效控制<sup>[20]</sup>。到目前研究固态发酵过程中 pH 变化,尤其是 pH 调控方面的研究比较少。Ryoo<sup>[36]</sup>认为在固态发酵过程中把蒸发散热、水活度和 pH 控制相耦合是最有效的办法。方法是将酸碱溶液喷洒在曲上,但酸碱与固体混合的均一性比较差,在一般敞开式固态发酵才是行之有效的。通常采用具有缓冲能力的物质作底物以消除 pH 变化所带来的不利影响。另一个比较新颖的方法是以含氮无机盐(如脲)做氮源,以抵消发酵过程中酸的生成带来的负面影响。Frank - Jan Nagel et al.<sup>[37]</sup>系统研究了 pH、营养盐及缓冲溶液对丝状真菌 *Rhizopus oligosporus* 生长的影响,结论表明控制一定的 pH、培养基中添加蛋白胨,将使微生物产物大大增加,缩短滞后期。Lonsane et al.<sup>[20]</sup>认为只要调好初始的 pH,在发酵过程不必加测控。然而,许多固态发酵过程的 pH 具有特征性的变化,只是常规性的检测方法难以凑效,限制了 pH 作为重要控制参数的可行性<sup>[38]</sup>。

## 4 结论

通过对文献系统分析,可看出固态发酵近几年在下列工程领域的研究得到迅速发展及应用:底物特性研究、避免染菌的对策、水活度、通风与传质、传热及 pH 的控制。固态发酵具有大规模操作的潜能,但没有像液体发酵那样得到同样程度的研究。所以我们不能十分确信,即使设计规则合理,固态发酵能否大规模操作。但目前可信的是,已有一些像酶生产及生物农药等过程成功小规模地应用固态发酵技术,如中国科学院化冶所设计的“周期性压力脉

动反应器”成功应用于 B.t 工业生产。有足够的理由可以证明还需继续开发固态发酵技术以充分发挥其潜能。现代固态发酵技术既与传统的发酵技术相区别,又与现代液态深层发酵相对应。随着人们对固态发酵机理认识不断加深,现代固态发酵的成功也将成为现代发酵技术的一次革命,而且必将打破液体深层发酵技术一统天下的局面。

## 参考文献

- [1] Pandey A. Process Biochem, 1992, 27: 109 ~ 117.
- [2] Doelle HW, Mitchell. Process Biochem, 1993, 28 (3): 305 ~ 309.
- [3] Pandey A. Biores Technol, 1995, 51(3): 217 ~ 220.
- [4] Nigam P, Singh D. J Basic Microbiol, 1994, 34: 404 ~ 423.
- [5] Durand A. Solid state fermentation, Biofutur, 1998, 181: 41 ~ 43.
- [6] Pandey A, Soccol CR. J Ind Sci Res, 2000, 59: 12 ~ 22.
- [7] Vollbrecht D. Chem Eng Tech, 1997, 10: 1403 ~ 408.
- [8] Sarrette M, Nout M R, Gervais et al. Appl Microbial Biotechnol, 1992, 37 (4): 420 ~ 425.
- [9] Auria R, Palacios M, Revah S. Biotechnol Bioeng, 1992, 39: 898 ~ 902.
- [10] Ohno A, Ano T, Shoda. J Ferment Bioeng, 1993, 75: 23 ~ 27.
- [11] Gnala A. Biotech Letter. 1992, 14: 499 ~ 504.
- [12] Rao PV. Process Biotech., 1993, 28: 285 ~ 389.
- [13] Pandey A. Bioresour Technology, 1991, 37: 169 ~ 172.
- [14] Richrd A. Biotech Bioeng, 1992, 39: 898 ~ 902.
- [15] Richrd A. Biotech Bioeng, 1993, 41: 1007 ~ 1013.
- [16] Liu BL, Tzeng YM. J. Biotechnol Lett, 1999, 21: 657 ~ 661.
- [17] Pandey A. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10: 485 ~ 486.
- [18] Lonsane BK, Saucedo - Castaneda, G. Raimbault. Process Biochem, 1992, 27: 259 ~ 273.
- [19] N. P. Gildyal, Palacios. Bioprocess Engineering, 1992, 8: 67 ~ 72.
- [20] B. K. Lonsane. Bioprocess Engineering, 1992, 27: 259 ~ 273.
- [21] Ramesh MV, B. K. Lonsane. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990, 33: 501 ~ 505.
- [22] Saucedo - Castaneda G, Gutierrez - Rojas M, Bacqute G et al. Process Biochemistry. 1992, 27: : 97 ~ 107.
- [23] Roussos S, Raimbaut M, Prebois JP et al. Biotechnol. Technique, 1991, 5: 415 ~ 420.
- [24] Selvakumar P. Biores Technol, 1999, 69 (2): 123 ~ 127.
- [25] M. K. Gwthaman. Process Biochem, 1995, 30 (1): 9 ~ 15.
- [26] Lu MY. Enzyme Microb Technol, 1997, 21: 392 ~ 397.
- [27] M. K. Gwthaman. J. Chem. Biotechnol, 1993, 56: 233 ~ 239.
- [28] N. P. Gildyal. Microb. Technol, 1994, 16: 253 ~ 257.
- [29] G. Saucedo ~ Castaneda, Gutierrez - Rojas M. Biotechnol Bioeng, 1991, 35: 802 ~ 808.
- [30] Sangsurasak P, Mitchell DA. J. Chem Technol Biotechnol, 1995, 64: 253 ~ 260.
- [31] Gutierrez ~ Rojas M, Hosn S. A., Auria R. et al. Process Biochem, 1996, 31: 363 ~ 369.
- [32] Sangsurasak. Chem Eng J, 1995, 60: 199 ~ 204.

- [33] Sangsurasak P, Mitchell DA. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 60:793 ~ 749.
- [34] Frans J. Wester, Johannes Tramper and Arjen R. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 65 (4) :447 ~ 458.
- [35] D.M. Stuart, D.A Mitchell, M.R. John et al. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 63 (4) : 383 ~ 391
- [36] Ryoo D., Murphy V. G., Karim M. V et al. *Biotechnol. Technique*. 1991, 5: 19 - 24
- [37] Frank - Jan Nagel and Jaap Oostra, Johannes Tramper et al. *Process Biochem*, 1999, 35 :69 ~ 75
- [38] Parminder S. C, Devinder S. C and Gerard A. J. of *Fermentation and Bioengineering*, 1992, 74 :126 ~ 128

## New developments in engineering aspects of solid - state fermentation

Xu Fu-jian Chen Hong-zhang Li Zuo-hu

(State Key Lab of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** In last about ten years, solid-state fermentation (SSF), which was previously termed as a low-technology system, has raised an unprecedented increase in interest, and has been changing drastically. This paper reviews previous and current developments in engineering aspects of SSF mainly including substrates (pretreatments and uptake of substrates), specialties of substrates, sterilization of substrates, relevant conception of sterility and control of process parameters (water activity, aeration and mass transfer, temperature and pH).

**Key words** Solid-state fermentation, substrates, water activity, mass transfer, heat transfer, pH

(接第 52 页)

## The Progress on Studies of Selenoprotein P(SeP)

Gu Peng Li Zhiwei Yang Jianguo

(Beijing Institute for Nutritional Resources 100054)

Nie shijian, Li dong

(Beijing fungus Engineering Hi-tech Laboratory 100054)

**Abstract** Selenoprotein P(SeP) is a glycoprotein that has been purified from rat and human plasma. SeP contains 10 selenocysteine residues per polypeptide. It accounts for more than 50 % the selenium content in rat and human plasma. The sequence of the cloned cDNA contains 10 UGA codon in the open reading frame of mRNA. Selenocysteine is incorporated into the primary structure of the protein at a UGA codon. Although its function is still not completely understood, a function as an extracellular antioxidant seems most probable. A protective function of SeP in rat plasma against diquat-induced lipid peroxidation, liver necrosis *in vivo* and in human plasma against the potent endotoxin peroxynitrite and phospholipid hydroperoxide reducing activity was demonstrated *in vitro*. SeP of bovine serum acts as a survival-promoting factor in neuronal cell culture.

**Key words** Selenoprotein, Selenoprotein P, Selenium, Selenocystein