

木聚糖酶固态罐发酵及尾气在线测定\*

张洁<sup>1</sup> 吴克<sup>1</sup> 刘斌<sup>1</sup> 张敏<sup>1</sup> Oliver Menke<sup>2</sup> 蔡敬民<sup>1</sup>

Marinus Meiners<sup>2</sup>

1(合肥学院生物科学与技术系,合肥 230022)

2(University of Applied Sciences Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, Emden, Germany)

摘要 建立了可对4个各自独立的2 L玻璃发酵罐同时通气培养和尾气检测的固态发酵系统(SSF),以100 g麸皮和100 g木屑及150 mL Mandels营养盐溶液为培养基进行木霉T6培养,在实验条件范围内找出了最佳产木聚糖酶的环境条件,即温度为30℃,pH6.0,接种量25 mL/罐( $2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$  个孢子/mL),通过对木聚糖酶活力和尾气中CO<sub>2</sub>变化的连续测定显示,菌体CO<sub>2</sub>的释放与木聚糖酶合成具有一定的相关性,木聚糖酶的合成与尾气中CO<sub>2</sub>含量之间存在着滞后关系,尾气CO<sub>2</sub>浓度在发酵26 h达到最高值,木聚糖酶活力在39 h才达峰值。通过对SSF尾气中CO<sub>2</sub>的在线测定,能够初步了解SSF中菌丝体生长和产物合成之间的动力学关系。

关键词 木霉,固态发酵,尾气分析,木聚糖酶

木聚糖酶(Xylanase EC3.2.1.8)是一类水解植物材料中半纤维素的内切酶,其水解产物以寡聚木糖为主。该酶可用于食品、保健品、饲料及纸浆的漂白等。除了利用液态发酵法生产外,也可以用固态法生产<sup>[1]</sup>。然而,固态发酵参数的检测和控制远未达到液态培养的水平,致使这一发酵方式的大规模应用受到了限制。其中生物量的测定就是一个关键问题。到目前为止,已报道的固态发酵生物量测定方法有细胞壁葡萄糖胺测定法<sup>[2]</sup>、细胞壁麦角固醇测定法<sup>[3]</sup>、酶联免疫吸附法<sup>[4]</sup>、基质色泽变化的不同粒子光散射法<sup>[5]</sup>、胞内ATP测定法<sup>[6]</sup>和尾气CO<sub>2</sub>释放期呼吸率测定法<sup>[7]</sup>等。但以上测定方法复杂烦琐,且大多需要离线测定,难以及时反映发酵曲中的微生物生长和产物的积累情况。Desgranges等人曾经报道过CO<sub>2</sub>在线检测分析生物量的方法<sup>[8]</sup>。本实验中是以木霉菌作为生产菌株,以麸皮和木屑为培养基,在2 L柱式反应器中进行固态培养,以尾气CO<sub>2</sub>直接检测法结合固态发酵曲中木聚糖酶活力的变化、呼吸商和木聚糖酶比活的过程曲线分析,以及对

菌体生长外观的观察结果,认为T6菌产木聚糖酶与菌体CO<sub>2</sub>释放之间、CO<sub>2</sub>与菌体生长之间具有内在的关系,即曲中微生物的CO<sub>2</sub>释放量可以作为产酶活力的分析依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

木霉(*Trichoderma* sp.)T6,本实验室自备。在PDA琼脂斜面上28℃培养7 d。用无菌蒸馏水将斜面孢子洗脱制成孢子悬液( $2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$  个孢子/mL),接入SSF培养基。

1.2 培养方法

将100 g麸皮和100 g木屑(云杉和冷杉的混合物),放入2 L烧杯中,加入150 mL Mandels营养盐<sup>[9]</sup>和4 g NaNO<sub>3</sub><sup>[10]</sup>拌匀,以NaOH调pH,121℃灭菌30 min,冷却后,用孢子悬液接种并拌匀,倒入灭过菌的玻璃发酵罐中(料高21 cm,培养基初始湿含量100.3%)通气培养,通气量为10 L/h。

1.3 发酵装置

发酵罐是玻璃制圆柱体,总高34 cm,上部

第一作者:硕士,副教授(蔡敬民教授为本文通讯作者)。  
\* 德国下萨克森州科文部资助·安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2000j1267)·安徽省教育厅重点建设课程项目(No. 200167)资助·安徽省优秀青年科技基金(No. 04043051)资助  
收稿时间 2004-02-09

高 29 cm ,内径 10 cm ,壁厚约 4.0 mm ,下部侧面有一入口管 ,通入增湿的无菌空气 ,上部侧面有一尾气出口管 ,尾气经干燥瓶干燥后进入 CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub> 分析仪 ,图 1。

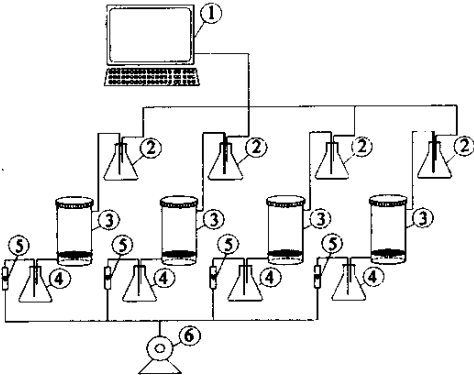


图 1 固态发酵系统

1 - CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub> 分析仪 ; 2 - 干燥瓶 ; 3 - 发酵罐 ;  
4 - 增湿瓶 ; 5 - 流量计 ; 6 - 空压机

1.4 分析测定

木聚糖酶活力的测定<sup>[11]</sup> :取适当稀释的浸提酶液 0.1 mL 加入 1 mL 2% 木聚糖( Birch Wood Xylan Sigma 公司产 )悬浮液( pH4.8 , 0.2 mol/L 醋酸缓冲液配制 ) ,于 50℃ 水浴反应 10 min ,用 DNS 法<sup>[12]</sup>测定产生的还原糖。以木糖为标准 ,每分钟生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

还原糖 采取 DNS 法测定。

蛋白质 采取 Bradford 比色法测定<sup>[13]</sup>。

CO<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 尾气中 CO<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 含量由 CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub> 分析仪( ULTRAMAT22/O<sub>2</sub>——SIEMENS

产 )每隔 5 min 对 4 个发酵罐的出口气体轮流切换连续采样 ,并由电脑记录 and 作图。呼吸商 RQ 可根据下式计算 :

$$Q_{CO_2}^m = \frac{V^a}{W \cdot V^m} \left( \frac{C_N^a C_{CO_2}^w}{1 - C_{CO_2}^w - C_{O_2}^w} - C_{CO_2}^a \right)$$
$$Q_{O_2}^m = \frac{V^a}{W \cdot V^m} \left( C_{O_2}^a - \frac{C_N^a C_{CO_2}^w}{1 - C_{CO_2}^w - C_{O_2}^w} \right)$$
$$RQ = \frac{Q_{CO_2}^m}{Q_{O_2}^m} \tag{1}$$

式中 :Q<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>m</sup> :CO<sub>2</sub> 释放率[ mol CO<sub>2</sub>/ ( g 曲 · h ) ] ;  
Q<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>m</sup> :氧消耗率[ mol O<sub>2</sub>/ ( g 曲 · h ) ] ;C<sub>N</sub><sup>a</sup> ,C<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>a</sup> ,  
C<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>a</sup> :分别为进气中惰性气体、O<sub>2</sub> ,CO<sub>2</sub> 的体积分  
数( % ) ;C<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>w</sup> ,C<sub>CO<sub>2</sub></sub><sup>w</sup> :分别为排气中 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>  
的体积分  
数( % ) ;W :发酵曲样质量( g ) ;V<sup>m</sup> :  
气体的体积摩尔数( 22.415 mol/cm<sup>3</sup> )。

碳源、氮源及 C/N 的分析 :采用 Heraeus CHO-O-RAPID 分析仪分析经冷冻干燥的曲料中 C、N 含量。浸提酶液的制备 :以 1g 经冷冻干燥的曲料加 20 mL pH4.8 醋酸缓冲液浸提 1 h 后过滤得酶液。pH 值的测定 :取 1g 湿曲加 10 mL 蒸馏水浸提 ,用 pH 计测上清液的 pH 值。培养基湿含量 :参照 Tunga 的方法测定并计算<sup>[14]</sup>。

2 结 果

2.1 T6 菌产酶优化条件

选择温度 22~33℃、固体曲浸提液起始 pH5.5 ~7.0、接种量为 15~35 mL/罐的环境条件 ,对木霉 T6 菌木聚糖酶的产酶条件进行优化 ,见图 2。

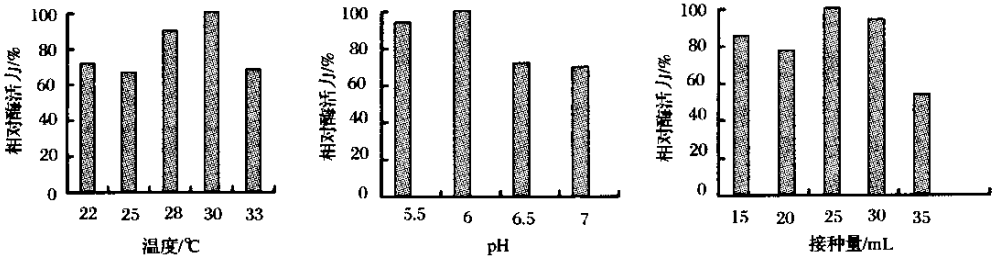


图 2 温度、pH 和接种量对产酶的影响

从结果看,温度、起始 pH 值和接种量对木霉 T6 菌木聚糖酶活力具有明显的影响。这与黑曲霉和细菌的木聚糖酶生产情况类似<sup>[10]</sup>。在 30℃、pH6.0、接种量 25 mL 环境条件下,酶活力最高,产酶期也比其他条件下提前。

## 2.2 T6 菌的产酶特性

在上述优化条件下,T6 菌的产酶过程曲线见图 3。对曲芯(距料面约 10 cm 处的中心部位)的温度进行了测定,结果见图 4。

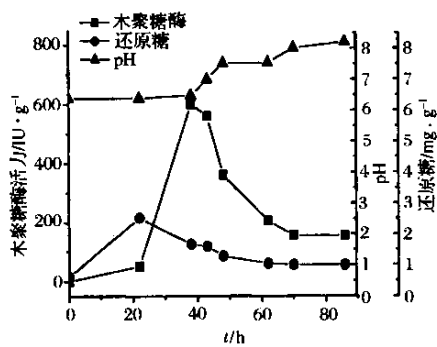


图 3 T6 产木聚糖酶过程曲线

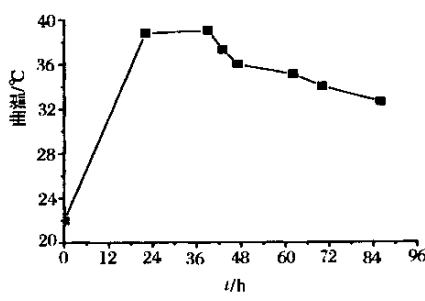


图 4 固体曲曲芯温度变化曲线

发酵初始阶段,随着孢子萌发和菌丝体的生长,还原糖含量不断增加。曲芯温度也开始上升,在 22 h 趋于最高值,并保持至 39 h,说明此阶段产热量最高,菌体生长旺盛。同时曲中出现绿色孢子。这一阶段正是木聚糖酶活力大幅上升的时期,在 39 h 达到最大值 599 U/g(干曲)。酶的比活力此时也最高,为 1.4 IU/g(蛋白质),见图 5。这说明木聚糖酶固态发酵与液态发酵一样,也属于生长同步发酵型。在木聚糖酶活力迅速上升时,还原糖含量快速降低。酶活力达到峰值后,随着固体曲 pH 值的上升,木聚糖酶的合成过程结束,显示该酶为弱酸性

酶。

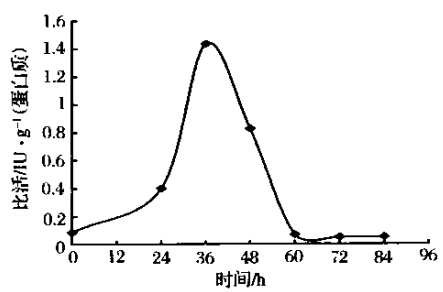


图 5 木聚糖酶比活曲线

## 2.3 发酵过程的尾气

T6 菌发酵过程中尾气中的 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 体积百分含量变化曲线见图 6。CO<sub>2</sub> 含量与曲芯温度和还原糖(图 3、图 4)几乎同时上升,在 26 h 达峰顶,为 4.25%。之后 CO<sub>2</sub> 体积分数缓慢下降。根据式(1)计算,获得呼吸商 RQ 的时间曲线(图 7),RQ 也在 26 h 达最大值为 0.96。表明此阶段菌体呼吸强度最高。从结果看,CO<sub>2</sub> 体积百分含量最大时,RQ 最大,曲芯温度也最高,这符合菌体的代谢特点。

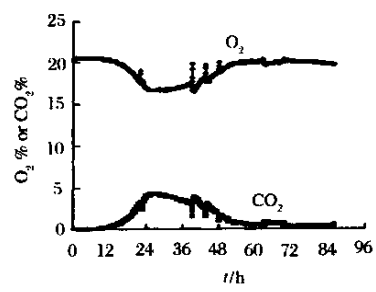


图 6 尾气中 O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 变化曲线

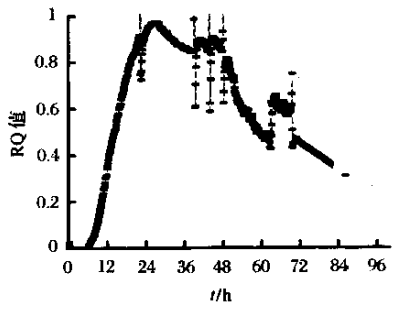


图 7 呼吸商的时间曲线

## 2.4 曲中 C、N 含量变化及 C/N

对定时取样并经干燥的发酵曲分析其 C、

N 成分,并计算得到 C/N 变化值,见图 8。曲中总 C 含量随 CO<sub>2</sub> 的释放有所损失,总 N 含量基本不变,结果使 C/N 比下降。符合菌体代谢规律。

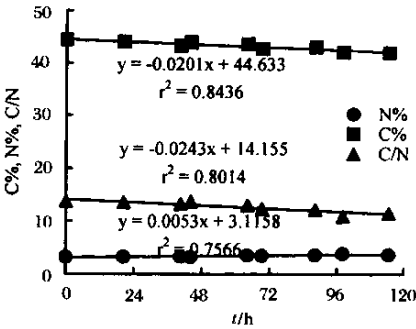


图 8 发酵曲中 C、N 含量及 C/N 的变化

3 讨 论

3.1 尾气中 CO<sub>2</sub> 的含量与菌体生长的关系

固态发酵曲中生物量难以直接测定。CO<sub>2</sub> 是菌体呼吸生长的代谢产物。通过尾气中 CO<sub>2</sub> 含量的变化和对固态曲中菌体生长、产孢情况的外观观察了解到,在 26 h 之前,即 CO<sub>2</sub> 含量达到最大值之前,菌丝体的生长是随着 CO<sub>2</sub> 含量的增加而增加的,菌体呼吸商曲线也反映出此阶段呼吸代谢非常旺盛,处于快速生长阶段。从结果看,CO<sub>2</sub> 含量的变化,能够反映菌体呼吸代谢的状况,产热结果也说明了这一点(图 4)。从第 26 h 曲中明显出现孢子开始,CO<sub>2</sub> 释放量逐渐下降。根据 CO<sub>2</sub> 的变化,对菌丝与产孢的外观观察以及曲芯温度的变化推测,CO<sub>2</sub> 的快速上升阶段,也是菌丝体生成的阶段。通过对曲中菌体细胞壁中麦角固醇含量的测定结果(前期)也可说明这一点。

3.2 尾气中 CO<sub>2</sub> 含量与产酶的关系

T6 菌大量合成木聚糖酶是在 22~39 h,CO<sub>2</sub> 释放是从第 10 h 开始,因此木聚糖酶的合成与 CO<sub>2</sub> 的释放存在着一个滞后期,正好是菌体处于产孢初期,这表明,菌丝体是在积累到一定数量后才大量分泌木聚糖酶的,这与 Smits 的木霉产木聚糖酶的实验结果一致<sup>[15]</sup>。当曲中孢子占绝对数量,CO<sub>2</sub> 含量快速下降时,酶活

也下降。我们在研究黑曲霉 A3 液态发酵时发现,木聚糖酶的合成是滞后型的,与 T6 菌在固态发酵时所表现出的生长和木聚糖酶生产之间的动力学关系是一致的<sup>[1]</sup>。其实这里也有一个类似的现象,就是木聚糖酶合成时,残糖处于下降阶段。在合成多聚糖分解酶的发酵过程中,易利用的 C 源往往会对酶的合成起到抑制作用。从我们的实验结果似乎可以预见,采用尾气 CO<sub>2</sub> 的在线检测,可以获得固态发酵过程中生长和生产的动态信息,从而可以进一步建立过程控制模型。这将是我们的研究目标。

3.3 发酵过程的产热问题

对于多数真菌而言,固态发酵方式可能更接近于其在自然环境下的生长条件,所以与液态条件相比,单位体积的产物生成结果往往要高<sup>[1]</sup>。但固态发酵存在一个显著特点,就是菌体、基质、产物均处于一个非均一的发酵系统中,尤其是在一个大规模的固态发酵系统中,随着发酵的进行,菌体呼吸产热,料芯散热慢,菌体生长、基质利用和产物合成都不均匀,可能导致曲中酶的稳定性降低,甚至产生局部酶的热失活。在传统的曲盘发酵中,温度就是一个较难控制的参数。我们曾经采用前期高温、后期降温以利于菌体生长和产物形成的变温发酵方法,以降低产热的影响<sup>[16]</sup>。在固态罐发酵系统中,由于通入湿空气,在加强供氧的同时,也加快了曲中气流和热量的交换速度,并可保持固体曲一定的湿度,弥补了传统曲盘发酵水分蒸发造成发酵中后期固体曲干燥的不足,有利于菌体的生长和生产。由于通气,罐发酵比曲盘发酵的最适温度 28℃<sup>[17]</sup>高出 2℃。但是,固态罐发酵在菌体的生长旺盛期,曲芯温度上升过快,同时,木聚糖酶的快速合成时期正是固体曲料的高温维持时期(图 3,图 4),可以考虑在此阶段采取适当加大通风量和中心插管透气等方式,以加速通风和散热,维持料芯部位酶的稳定性。

参 考 文 献

1 Cai J M. Yu K, Zhang J et al. Production, properties,

- and application of xylanase from *Aspergillus niger* A3. Reprinted from Enzyme Engineering XIV Volume 864 of the New York Academy of Sciences December 13. 1998. 214~218
- 2 Sakurai K, Misawa S, Shiota H. Growth and respiratory activity of *Aspergillus oryzae* grown on solid state medium[J]. Agric Biol Chem, 1985, 49: 745~750
  - 3 Desgranges C, Vergoignan C, Georges M et al. Biomass estimation in solid state fermentation. I. Manual biochemical method[J]. Appl Micro Biotechnol, 1991a, 35: 200~205
  - 4 Dubey A K, Suresh C. An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation[J]. Appl Microb Biot, 1998, 50: 299~302
  - 5 Ramanamurthy M V, Thakur M S, Karanth N G. Monitoring of biomass in solid state fermentation using light reflectance[J]. Biosensors Bioelectronics, 1993, 8: 59~63
  - 6 West A W, Ross D J, Cowling J C. Changes in microbial C, N, P and ATP contents, number and respiration on storage soil[J]. Soil Biol Biochem, 1986, 18: 141~148
  - 7 Sakurai Y, Lee T H, Shiota H. On the convenient method for glucosamine estimation in *Koji*. Agric [J]. Biol Chem, 1977, 41: 619~624
  - 8 Desgranges C, Georges M, Vergoignan C, Durand A. Biomass estimation in solid state fermentation II. On line measurements[J]. Appl Micro Biotechnol, 1991b, 35: 206~209
  - 9 Mandels M, Weber J. The production of cellulose[J], Adv. Chem Series, 1969, 95: 391~414
  - 10 蔡敬民, 吴克, 张洁等. 黑曲霉 A3 木聚糖固态发酵研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(2): 1~4
  - 11 Bailey M J, Biely P, Poutanen K J. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase[J]. Biotechnol, 1992, 23: 257~270
  - 12 Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar[J]. Ana Chem, 1959, 31(3): 416~428
  - 13 Bradford M M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein dry binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254
  - 14 Tunga R., Banerjee R, Bhattacharyya B C. Optimizing some factors affecting protease production under solid state[J]. Bioprocess engineering, 1998, 19: 187~190
  - 15 Smits J P, Rinzema A, Tramper H M et al. Solid~state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. Fermentation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 46: 489~496
  - 16 张洁, 蔡敬民, 吴克等. 黑曲霉 A3 木聚糖酶变温发酵试验和曲盘中试研究[J]. 合肥联合大学学报, 1999, 19(2): 92~96
  - 17 吴克, 蔡敬民. 木霉 T6 木聚糖酶固态发酵条件和酶学性质研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 191~195

## On Line Carbondioxide Measurements in Solid Fermentation of Xylanase

Zhang Jie<sup>1</sup> Wu Ke<sup>1</sup> Liu Bin<sup>1</sup> Zhang Min<sup>1</sup>  
Oliver Menke<sup>2</sup> Cai Jingmin<sup>1</sup> Marinus Meiners<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Department of Biological Science and Technology Hefei University, Hefei 230022)  
<sup>2</sup>University of Applied Sciences Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, Emden, Germany)

**ABSTRACT** A solid state fermentation (SSF) system was established. Fungi can be cultured with air and exhaust gas can be detected simultaneously in this four-two liters -fermentor system. Culture medium for *Trichoderma* sp. T6 was as follows: wheat bran 100g, sawdust 100g, mandles nutrition salt 150 mL. The optimal conditions for producing xylanase were temperature 30℃, pH6.0 and inoculum level 25 mL [(2~4) × 10<sup>8</sup> spores/mL]. Through detecting the activity of xylanase and the continuous content change of CO<sub>2</sub>. It is found that the release level of CO<sub>2</sub> is correlated the synthesis of xylanase. There was a time lag between them, the former arrived at its acme at 26 hour and the latter at 39 hour during fermentation. The dynamics between growth of mycelium and the xylanase synthesis were analyzed on the condition of SSF through the on-line CO<sub>2</sub> detecting content in the exhaust gas.

**Key words** *Trichoderma* sp., solid fermentation, exhaust gas analysis, xylanase