

固态发酵技术在酶生产中的应用研究进展

徐桂转¹, 马俊军², 张百良^{1*}

(1. 河南农业大学 农业部可再生能源重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南省产品质量监督检验院, 河南 郑州 450004)

摘要: 能源危机和环境问题的日益突出促进了固态发酵技术的发展。相对于液体深层发酵, 固态发酵在酶的生产中具有独特的优势。文中综述了固态发酵近年来在酶生产中的应用研究进展、固态发酵产酶存在的问题和发展前景。

关键词: 固态发酵; 液态发酵; 酶

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004—3268(2007)12—0013—04

固态发酵(solid state fermentation, SSF)是指利用不溶性原料作为固体支持物和营养物质, 体系无自由流动液体, 在其上进行的任何发酵过程^[1]。SSF 历史悠久, 应用广泛, 是人类利用微生物生产产品历史最悠久的技术之一。但由于现代发酵工业对大规模、集约化生产的要求, 在过去的很长一段时间内, 有关它的应用研究基本停滞不前。自 20 世纪 90 年代以来, 随着能源危机和环境问题的日益严重, 人们开始重新审视 SSF 的优点, 并不断在原料、

工艺和设备等方面进行大量深入的研究, 使 SSF 在酶制剂、食品、医药、饲料、燃料、农药、生物转化、生物冶金和生物修复等诸多领域取得了长足的进展^[2]。

酶作为具有催化活性的生物制品, 具有十分广泛的应用领域, 对它的需求也不断地增加。目前, 大多数酶的生产通常采用液体深层发酵(submerged fermentation, SmF)技术, 这使得酶的生产成本偏高, 在一些领域中使用, 经济性较差。所以, 人们不

收稿日期: 2007—07—12

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划资助项目(200510459056)

作者简介: 徐桂转(1972—), 女, 山西侯马人, 副教授, 博士, 主要从事可再生能源转换及利用技术的研究。

通讯作者: 张百良(1941—), 男, 河南汤阴人, 教授, 博士生导师, 主要从事可再生能源方面的研究。

- [31] Kong L, Attree S M, Fowke L C. Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanyldiazotane) on endogenous polyamine levels and osmotic embryo maturation in white spruce [J]. *Plant Sci*, 1998, 133: 211—220.
- [32] Puga-Hermida M I, Gallardo M, Matilla A J. The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines [J]. *Physiol Plant*, 2003, 117: 279—288.
- [33] 牛明功, 胡炳义, 刘怀攀, 等. 小麦种子脱水过程中多胺水平的变化[J]. *种子*, 2006, 25(11): 61—63.
- [34] Liu H P, Zhu Z X, Liu T X, *et al.* Effects of osmotic stress on the kinds forms and levels of polyamines in wheat coleoptiles [J]. *J Plant Physiol Mol Bio*, 2006, 32 (3): 293—299.
- [35] Hohelfeld H, Schurmm W. Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl coenzyme A [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 545—560.
- [36] Ohno-Iwashitay O T, Irahori K. Effect of uncommon polyamines on protein catabolism [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1975, 171: 490—499.
- [37] Suman B, James R. Putrescine-aminopropyltransferase is responsible for biosynthesis of spermidine, spermine and multiple uncommon polyamines in osmotic stress-tolerant alfalfa [J]. *Plant Physiol*, 1997, 114: 445—454.
- [38] Liu K, Fu H H, Bei Q X, *et al.* Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124 (3): 1315—1325.
- [39] Waie B, Rajam M V. Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene [J]. *Plant Sci*, 2003, 164: 727—734.
- [40] Tang W, Newton R J, Li C, *et al.* Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper CaPF1 gene is associated with the polyamine biosynthesis [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(1): 115—124.

断尝试新的生产方法来降低酶的生产成本。研究显示,相比 SmF 技术,SSF 技术在酶的生产方面具有许多独特的优势^[3]。主要表现在:①培养基价格低廉,可以利用可再生的天然生物质或工业下脚料为主要原料;②工艺简单,节约能耗;③产物浓度高,无废液,后处理简单;④所需通气压力低;⑤有利于微生物在接近于自然状态下生长等。这些特点决定了 SSF 生产酶具有明显的优势。以下主要介绍近年来研究最多的几类酶的最新进展。

1 SSF 在酶生产中的应用

1.1 α -淀粉酶

α -淀粉酶是用途最广泛,产量最大的一类酶,主要应用于淀粉加工业、纺织工业、纸浆制造、酿造和饲料加工等领域。利用 SSF 技术可生产出高活力的 α -淀粉酶。国内学者曾以 BF7658 变异菌对麸皮进行固体发酵,在培养温度 37~39℃,接种量 0.5%,发酵 48~60 h 条件下,产酶达 1248 U/g,浅盘培养平均产酶达 1754 U/g,大大高于该菌液体发酵的酶活 350 U/mL,显示出良好的经济性^[4]。国外学者的研究结果也表明,SSF 技术生产 α -淀粉酶具有良好的经济和环境效益。Ramachandran 等^[5]报道了利用椰子油饼作为基质,以 *A. oryzae* 为菌种进行固态发酵,经过 24 h,淀粉酶活性达 1372 U/g。补加 0.5% 的淀粉和 1% 的蛋白胨能显著提高酶的活性,达到 3388 U/g。固态发酵可以产生高活力淀粉酶的原因是固态发酵中培养基麸皮的碳源浓度比液态深层发酵中的碳源浓度高得多,并且固态发酵中营养基质从固体颗粒到细胞的传递阻力较大,不如在液体深层发酵中液体基质细胞内部那样相对容易,从而消除了液体深层发酵中酶合成的分解代谢阻遏,造成了淀粉酶的大量合成^[6]。

1.2 蛋白酶

蛋白酶有酸性、中性、碱性之分,其中以 SSF 生产酸性蛋白酶的研究报道最多。酸性蛋白酶是水解酶类的一种,能够在微酸条件下,通过内切和外切作用将动植物蛋白质水解为短肽和氨基酸,广泛用于食品、医药、饲料、制革工业、毛皮软化和脱毛处理^[7]。我国在 20 世纪 80 年代初做过一些研究,此后有关这方面的研究报道极少。近年来,随着酸性蛋白酶作为一种新型的生物饲料添加剂,在饲料工业中表现出潜在的功能,酸性蛋白酶正在引起人们更多的研究兴趣。王晓林等^[8]报道了以啤酒糟为主要原料,SSF 生产酸性蛋白酶的方法。在最适的发

酵基质质量配比为啤酒糟:豆粕:玉米淀粉:KH₂PO₄=100:9:2:0.2,原料含水量为 58%,发酵温度 31℃,初始 pH 为 5.5 的条件下,经发酵周期 84 h,酸性蛋白酶活力达 7800 U/g。刘建峰等^[9]以土曲霉为菌种,利用响应面分析法,考察了影响 SSF 产酸性蛋白酶培养基的 4 个主要因素,得到了以麸皮和豆粕为主要原料的培养基,酸性蛋白酶的活力可达 9327 U/g。

1.3 脂肪酶

脂肪酶是类脂化合物分解、合成和酯交换的催化剂,广泛应用于食物、清洁剂、化妆品和制药行业等。以往对于利用细菌、真菌和酵母菌生产脂肪酶的研究主要集中于 SmF 上。近年来,利用不同固态基质发酵生产脂肪酶,正在引起研究人员的关注。不同的学者通过对 SmF 和 SSF 生产脂肪酶进行比较后发现,SSF 产脂肪酶的产率更高且酶活更稳定^[10]。SSF 生产脂肪酶有诸多影响因素,如:pH、温度、通气和培养基组成。此外,甘油脂肪酸的存在能使某些微生物分泌的脂肪酶增加^[11]。孙舒扬等^[12]在以 *Rhizopus Chinese* 全细胞发酵产脂肪酶的研究表明,加入橄榄油不仅有利于菌体生长、提高脂肪酶水解活力,更可使脂肪酶的合成活力显著增加。整个发酵过程中橄榄油既作为碳源又是脂肪酶的诱导物。

1.4 果胶酶

果胶酶是指分解果胶质的多种酶的总称,包括聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶裂解酶(PL)、果胶酯酶(PE)等主要组分。果胶酶广泛应用于食品工业中,能澄清果汁和酒,改善油浸出,除去柑橘皮,增加一些水果的硬度,使纤维脱胶。近年来,果胶酶及其水解物也正逐渐应用于植物诱导抗病的研究中。研究发现,利用 SSF 技术生产的果胶酶比 SmF 生产的果胶酶性能更好。SSF 生产的果胶酶性质更稳定,具有较高的 pH 值和温度耐受性,且降解物阻遏影响更小^[13]。目前,生产商业化果胶酶主要是用真菌微生物,如 *Aspergillus niger* 菌株。利用 SSF 生产果胶酶能使用不同的固态农业残渣作为底物,如麦麸、豆糠、草莓渣、咖啡浆和咖啡壳、果壳、可可、柠檬和橙皮、桔渣、甘蔗渣、麸皮和苹果渣等。此外,张保国等^[14]利用嗜碱性细菌克劳氏芽孢杆菌 S-4 为菌种,进行了产果胶酶的研究,通过对比发现,SSF 产果胶酶具有明显的优势,并可以用甜菜粕为碳源和酶的诱导物,酵母膏和麸皮作氮源。

1.5 木聚糖酶

木聚糖酶(xylanase)是最主要的一种木聚糖降解酶类,它主要通过内切方式降解木聚糖中的 β -1,4-木糖苷键。水解产物以低聚木糖为主,并伴有少量的木糖和阿拉伯糖。木聚糖酶作为一类饲料添加剂,可有效降解木聚糖抗营养因子,提高饲料营养。它已经成为酶制剂生产行业中的一个重要产品,具有广阔的应用前景。作为一种诱导酶,木聚糖对木聚糖酶有很大的诱导作用。自然界中的许多半纤维素中都含有木聚糖,如麸皮、玉米芯、稻草等。所以,采用这些价格低廉的原料进行固态发酵具有很好的应用价值。

黑曲霉是生产木聚糖酶使用最多的菌种。高洁等^[15]通过三角瓶和托盘固态发酵对黑曲霉 ASP-12 产木聚糖酶的各种环境因素进行了研究。结果表明,培养基最优配方为:玉米芯 5%、 K_2HPO_4 0.2%、豆粕 2%、麸皮 95%,培养基的初始 pH 值为 4.5~5.0,发酵温度为 28~32℃,接种量为 1%,发酵 32 h,酶活接近 2000 U/g。邬敏辰等^[16]探索了宇佐美曲霉生产木聚糖酶的固体发酵条件,结果表明,三角瓶优化培养基及发酵条件为:250 mL 三角瓶装 8.0 g 基料(麸皮:玉米芯=3.5:4.5), NH_4NO_3 10 g/kg, Tween-80 3 g/kg, KH_2PO_4 3.0 g/kg, $CaCl_2$ 1.0 g/kg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/kg(均相对于基料),基料与自来水的质量比为 1:1.3~1:1.4, pH 自然;于 29℃培养 72 h,期间翻动 2 次,此工艺条件下最高酶活力为 8752 U/g。此外,有学者研究了里氏木霉和嗜热拟青霉产木聚糖酶固态发酵条件,研究显示,固态发酵具有良好的适用性^[17,18]。Battan 等^[19]报道了利用细菌(*Bacillus pumilus* ASH)固态发酵木聚糖酶的研究,结果显示,麦麸是最好的固体基质,在料水比为 1:2.5(W/V),接种量 15%,37℃条件下,酶活为 7087 U/g,显示了良好的工业前景。

1.6 纤维素酶

纤维素酶是使纤维素降解生成葡萄糖的酶的总称,主要有 C1 酶、CX 酶和葡萄糖苷酶。这 3 种酶协同作用可将天然纤维素降解为葡萄糖。自 1906 年在蜗牛的消化液中发现了分解纤维素的纤维素酶后,纤维素酶就受到世界各国的重视。19 世纪 80 年代,首先被添加于动物饲料中,后来逐步应用于纺织、造纸、日用化工、工业洗涤、酿造等领域,据预测,纤维素酶的开发利用将是未来可再生性资源利用开发的关键之一。

自然界中广泛地存在着能降解纤维素的微生物,它们种类繁多,包括细菌、真菌和放线菌等,其中真菌中的木霉属是研究最多的产酶菌种。目前,纤维素酶的生产有固体发酵和液体深层发酵两种方法,其中固体发酵比液体深层发酵具有较多的优势。固态发酵时,影响纤维素酶产量和酶活的因素很多,除菌种本身的个体差异外,培养基及其培养条件是影响发酵产酶的主要因素。戴四发等^[20]在研究绿色木霉产纤维素酶特性时发现,培养基中碳源及其一些物质对纤维素酶复合系中各组分的分泌呈现不同的规律:分别以纤维素粉或麦麸为唯一碳源时,CX 酶最早呈现最高酶活,而按比例混合作为碳源时则各酶组分较一致的呈现最高酶活形式。

张建新等^[21]研究了以麸皮和玉米芯为主要原料,采用康氏木霉(*Trichoderma koningii*)固态发酵生产纤维素酶,并对影响纤维素酶活性的碳源和氮源配比、外加氮源、培养基初始 pH 值、培养时间和表面活性剂等因素进行了研究。结果表明,培养基碳源和氮源配比以麸皮:玉米芯为 3:2 时最适合;外加氮源以 0.8%硝酸铵产纤维素酶活性最高;培养基初始 pH 值为 3.0 时,纤维素酶活力最高,是对照的 1.37 倍;表面活性剂以 0.5%“奇强”洗洁精对提高纤维素酶活性的作用最显著,较对照提高 12.4%;培养时间为 72 h 时,纤维素酶活性最高。

目前,纤维素酶还不能实现大规模地生产和使用,这不仅需要寻找新的产纤维素酶菌株或进一步选育高产菌株,同时,应大力开发新的生产技术。利用农作物废弃物固态发酵产纤维素酶具有所产酶系全面、能耗小、成本低等优点^[22],SSF 技术在纤维素酶的生产中具有重要的工业应用前景。

2 SSF 生产酶存在的主要问题及发展前景

随着环境和能源问题的日益突出,利用 SSF 产酶引起了国内外研究者的广泛关注,它已经成为生产酶的主要技术手段之一。但目前还存在着一些亟待解决的问题。①能够进行固态发酵的酶种类偏少。目前,大多数的报道多为实验室的研究结果,但相对实际生产和应用的酶种类而言,还是很小的一部分,很少能体现出规模化生产的应用价值。②有关 SSF 产酶的研究中,由于各个试验所用的菌种、固体基质和反应条件的设计存在差异,得到的数据缺乏可比性,且各类试验以测酶活为多,以产酶量为指标的研究不多。③由于 SSF 自身的特征,使得发酵参数的控制非常困难,而且目前缺少固态发酵过程中

参数检测、发酵调控和自动化控制的仪表,造成了SSF过程产品质量的稳定性较差,同时,由于发酵数据的缺乏,很难建立能够对数据做有效预测和最佳化的数学模型。④新型SSF反应器的开发仍然是值得研究的领域。由于缺少比较成熟的大规模生产用SSF反应器,这无疑会大大阻碍固态发酵产酶的实际应用。

目前,虽然工业上需求的酶大部分是用液态深层发酵技术生产来满足的,但随着人们对固态发酵认识的不断深入,固态发酵中存在的一些问题也有望逐步得到解决和完善,使利用固态发酵技术进行酶的大规模生产完全成为可能。尤其在能源危机和环境问题日益突出的今天,固态发酵作为一种绿色的生产工艺,将会有更加广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Pandey A. Recent process developments in solid-state fermentation [J]. *Process Biochemistry*, 1992, 27: 109—127.
- [2] 陈洪章, 徐建. 现代固态发酵原理及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 10—12.
- [3] Dos Santos M M, Souza da Rosa A, Dal'Boit S. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzyme [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 93: 261—268.
- [4] 吴大治, 张礼星, 徐柔, 等. 固态发酵生产细菌 α -淀粉酶 [J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(1): 54—57.
- [5] Ramachandran S, Patel A K, Nampoothire K M. Coconut oil cake— a potential raw material for the production of α -amylase [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 93: 169—174.
- [6] 姚跃飞, 曾柏全. 现代固态发酵技术在食品加工业中的应用 [J]. *食品与机械*, 2005, 21(6): 89—92.
- [7] 王利敏, 陈林海, 王雁萍, 等. 弹性蛋白酶产生菌的诱变选育及发酵条件初步研究 [J]. *河南农业科学*, 2006(6): 42—46.
- [8] 王晓林, 陶玉贵, 李鹤飞, 等. 酸性蛋白酶饲料固态发酵条件的研究 [J]. *安徽工程科技学院学报*, 2006, 21(2): 22—24.
- [9] 刘建峰, 葛向阳, 梁运祥. 响应面分析法优化酸性蛋白酶固态发酵培养基的研究 [J]. *饲料工业*, 2006, 27(24): 7—11.
- [10] Benjamin S, Pandey A. Lipase production by *Candida rugosa* on copra waste extract [J]. *India Journal of Microbiology*, 1996, 36: 201—204.
- [11] Marek A, Bednarski W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi [J]. *Biotechnology Letters*, 1996, 18: 1155—1160.
- [12] 孙舒扬, 王栋, 徐岩. 固液态发酵中橄榄油对 *Rhizopus Chinese* 全细胞脂肪酶的影响 [J]. *微生物学通报*, 2006, 33(4): 10—15.
- [13] Acuna Arguelles M E, Gutierrez-Rojas M, Viniegra-Gonzalez G. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation [J]. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 1995, 43: 808—814.
- [14] 张保国, 白志辉, 李祖明, 等. 克劳氏芽孢杆菌 S-4 菌株固态发酵产碱性果胶酶 [J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(3): 8—12.
- [15] 高洁, 李军训, 肖军, 等. 黑曲霉 ASP-12 固态发酵木聚糖酶培养条件研究 [J]. *饲料工业*, 2006, 27(6): 16—18.
- [16] 邬敏辰, 王瑾, 杨书艳, 等. 木聚糖酶固态发酵培养基的优化 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2006, 34(11): 111—116.
- [17] 江正强, 杨绍青, 闫巧娟. 嗜热拟青霉固体发酵产木聚糖酶的纯化和性质 [J]. *工业微生物*, 2006, 36(3): 1—4.
- [18] 刘亮伟, 王明道, 高玉千, 等. 木聚糖酶研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2006(6): 14—18.
- [19] Battan B, Sharma J, Kuhad R C. High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid fermentation [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2006, 22: 1281—1287.
- [20] 戴四发, 贺淹才, 谢德镛, 等. 绿色木霉分泌纤维素酶特性研究 [J]. *中国饲料*, 2003(6): 17—19.
- [21] 张建新, 刘起丽, 李学酶, 等. 康氏木霉固态发酵生产纤维素酶条件的条件 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2005, 33(11): 99—102.
- [22] Jatinde K, Chadha B S, Saini H S. Optimization of culture for production of cellulose and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using response surface methodology [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(2): 169—176.