

以麦秸为基质豌豆根瘤菌的压力脉动固态发酵

赵 华* 张小勇 李佐虎

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室,北京 100080)

关键词 豌豆根瘤菌, 压力脉动固态发酵, 麦秸

中图分类号 TQ920.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0598-03

生物肥料的常规生产方法是经液态发酵后,再以固态基质吸附^[1]。其工艺繁琐,吸附时易引入大量杂菌,从而降低生物肥料的施用效果。而由于静止浅盘固态发酵存在着较大的氧气浓度和温度梯度^[2,3],及易染菌等因素,所以利用固态发酵成功生产生物肥料的研究较少。近年来,固态发酵以其优于液态发酵的特点而成为人们研究的热点^[4],但至今仍未能普遍应用于工业生产。其主要原因是固态发酵反应器在放大过程中传质、传热困难^[5]。Bajracharya & Mudgett^[5]指出,解决上述弊端的唯一可行的方法是对反应器中的气相进行控制。基于此思路所研制出的周期变压新型固态发酵反应器^[6],它是采用无菌空气压力的周期性变化来对气相进行控制,以达到强化固态发酵基质中气体和热的传递效果。其中,压力脉动的振幅、频率是其重要的操作参数。

本文的主要目的是利用此新型固态发酵反应器对豌豆根瘤菌进行固态发酵,探索生物肥料生产的新方法;并对此反应器中氧的传递现象进行测定,以期深入研究周期性压力脉动对微生物生长的影响机制。

1 材料与方 法

1.1 基质的预处理

麦秸(平均粒径 2mm)经 2 次 121℃ 间歇式高压灭菌,每次 1h,灭菌后备用。

1.2 菌种

豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*) L003,中科院微生物研究所提供。

1.3 实验装置

实验装置为自行研制的 2L 压力脉动固态发酵反应器^[6]。固态培养基以浅盘方式摆在盘架上,空气压力的周期性变化是靠控制系统对电磁阀的开-关控制实现。主要操作是用无菌空气对罐压施以周期性脉动,罐体气相压力通过无菌空气的充压与泻压,在高压与低压之间周期波动。罐压变化曲线如图 1 所示, t_1 、 t_2 分别为高、低压维持时间,可根据需要设定为不同的值。

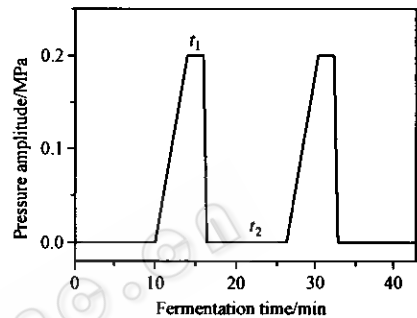


图 1 压力脉动的波形

Fig. 1 Representative air pressure oscillation profile
 $t_1 = 0$ and varied t_2

1.4 培养基及配制方法

斜面、种子和发酵培养基的配制参照文献[7],在 121℃ 下灭菌 30min。将经 30℃ 培养 48h 的斜面菌种洗入 100mL 培养基中,在 30℃ 130r/min 培养 16h 作为接种物,接种量为 10% (占液体培养基比例),再按固液比 1:3,加入到灭菌后的麦秸中,料层厚 3cm,混匀后,30℃ 于压力脉动固态发酵反应器中培养,培养过程采用脉冲式周期性压力刺激。

1.5 活菌数的测定

发酵产品中活菌数的测定采用梯度稀释后,平板菌落计数法。单位为 cfu/g。

1.6 氧传递速率(OTR)的测定

20g 麦秸加入预先用氮气冲洗的压力脉动固态发酵反应器中,并在氮气保护下,加入 75mL 0.5mol/L Na_2SO_3 (含 0.075g/L CoCl_2),轻轻拌匀。20min 后,关闭氮气阀,同时打开空气阀,并开始计时,当反应进行到一定时间,迅速加入 120mL 0.1mol/L I_2 以终止反应。20min 后,取样滴定。OTR 的测定和计算方法见文献[8],单位为 $\text{mmol}/(\text{kg} \cdot \text{h})$,即每千克起始干物料每小时所传递的氧量。

2 实验结果

2.1 振幅对豌豆根瘤菌的影响

收稿日期:2001-02-27,修回日期:2001-06-14。

* 通讯作者。Tel: 86-10-62568173; Fax: 86-10-62561822; E-mail: zhaohua696@hotmail.com

压力脉动的频率设定为:每 30min 变压 1 次,其中高低压维持时间分别为 0、30min,低压为常压(0MPa),高压在 0~0.4MPa 范围内波动。当高压也设定为 0MPa 时,即为静止浅盘发酵。实验结果见图 2。

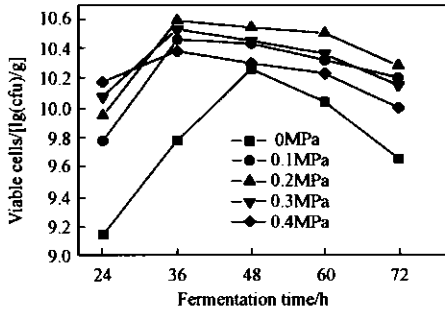


图 2 压力脉动振幅的影响

Fig.2 Effects of pressure amplitude on the viable cells

同静止浅盘固态发酵相比,压力脉动固态发酵能显著提高发酵产品中活菌数。当压力脉动振幅为 0.2MPa、发酵 36h 时,活菌数达 3.9×10^{10} cfu/g,而静止浅盘发酵在发酵 48h 时,活菌数才达 1.8×10^{10} cfu/g。但当振幅继续增加时活菌数略显下降趋势。

2.2 低压维持时间对豌豆根瘤菌的影响

在高、低压分别设定为 0.2、0MPa,高压维持时间为 0min 条件下,研究了不同低压维持时间对活菌数的影响,实验结果见图 3。从图 3 可以看出,活菌数随低压维持时间的缩短而增加。这表明采用高的变压频率可以促进微生物的生长。当 $t_2 = 10\text{min}$ 、发酵 36h 时,活菌数高达 5.3×10^{10} cfu/g。

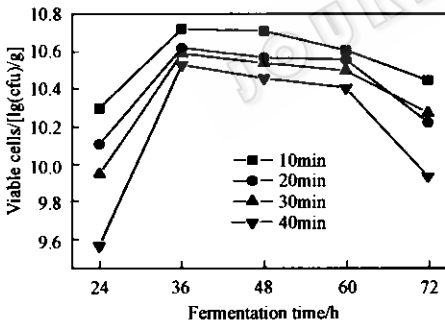


图 3 低压维持时间的影响

Fig.3 Effects of oscillation frequency on the viable cells

2.3 振幅对 OTR 的影响

为了阐明压力脉动对上述微生物生长的促进机制,对压力脉动固态发酵反应器中氧传递速率进行了研究。

在高低压维持时间分别为 0、0.5min,低压为 0MPa 的条件下,研究了不同振幅对 OTR 的影响,实验结果见图 4。同静止浅盘固态发酵相比,OTR 随着压力脉动振幅的增加而增加,当压力脉动振幅为 0.35MPa,OTR 高达 $487.01\text{mmol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$,而此时静止浅盘固态发酵的 OTR 仅为 $37.46\text{mmol}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。

2.4 低压维持时间对 OTR 的影响

图 5 是高低压分别设定为 0.35、0MPa,高压维持时间为 0min,不同低压维持时间对 OTR 的影响结果。

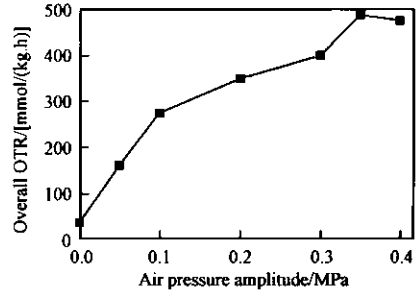


图 4 压力脉动振幅对 OTR 的影响

Fig.4 Effects of pressure amplitude on OTR

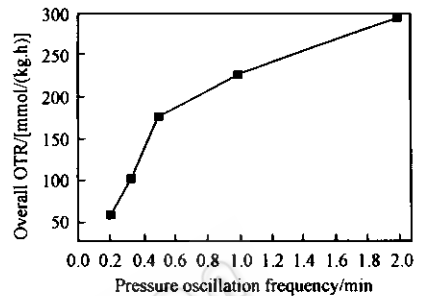


图 5 低压维持时间对 OTR 的影响

Fig.5 Effects of pressure oscillation frequency on OTR

从图 5 可看出,OTR 随着低压维持时间的缩短而增加。这表明随着低压维持时间的缩短,导致脉动频率的增加,加快了固态基质中气相更新的速度,从而减小 O_2 的浓度梯度,强化了 O_2 的传递。

3 讨论与结论

在静止浅盘固态发酵中,随着发酵过程的进行,微生物代谢活动的加剧,导致在固态基质中存在着较大的氧气浓度梯度^[2],传质阻力成为限制生物反应的主要因素。而在压力脉动固态发酵中,当升压时,气体会进入固态基质内部;突然泻压时,会导致固态基质内部的气体迅速排出,这一方面造成固态基质更加疏松、孔隙度增加;另一方面,气体的传递由分子扩散变成对流扩散,强化了氧的传递,从而强化了生物反应,最终表现为促进了微生物的生长(如图 2、图 3 所示)。但当压力脉动的振幅达到一定程度后(0.35MPa),再增加脉动幅度,对基质的孔隙率影响不大,从而导致 OTR 不再增加。

同静止浅盘固态发酵相比,压力脉动固态发酵能显著提高发酵产品中的活菌数,且能缩短发酵周期,可作为生物肥料生产的一个新途径。初步的研究结果表明,在压力脉动固态发酵中,生物反应的强化主要是压力脉动强化固态发酵中氧传递的结果。

REFERENCES(参考文献)

[1] Bhandari S C, Somani L L. In: Somani, L L *et al.* Biofertilizers. 2nd ed, India: Pawan Kumar Scientific Publishers, 1986, pp. 345 - 353
 [2] Childyal N P, Ramakrishna M, Lonsane B K *et al.* Gas concentration

- gradients in tray type solid state fermenters-effect on yield and productivities. *Bioprocess Engineering*, 1992, 8:67 ~ 72
- [3] Gowthaman M K, Childyal N P, Raghava R *et al.* Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid state fermenters: the effect of gaseous concentration gradients. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 1993, 56:233 ~ 239
- [4] Pandy A, Soccol C R, Nigam P *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 2000, 74:69 ~ 80
- [5] Bajracharya R, Mudgett R E. Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. *Biotechnology Bioengineering*, 1980, 22:2219 ~ 2235
- [6] Sun T, Li Z H, Liu D M. A novel design of solid state fermenter and its evaluation for cellulase production by *Trichoderma viride* SL-1. *Biotechnology Techniques*, 1996, 10:889 ~ 894
- [7] China General Microbiological Culture Collection Center, ed. (中国普通微生物菌种保藏管理中心编). *Microbiology Index (菌种目录)*. 3rd ed, Beijing: Chinese Agricultural Technology Press, 1997
- [8] Durand A, Pichon P, Desgranges C. Approaches to $K_L a$ measurements in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques*, 1988, 2:11 ~ 16

A Study on Growth of *Rhizobium leguminosarum* in Air Pressure Oscillating, Solid-State Fermenter

ZHAO Hua ZHANG Xiao-Yong LI Zuo-Hu

(State Key Lab. of Biochemical Engineering, Inst Chem Metall, Chines Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract *Rhizobium leguminosarum* L003, a kind of biofertilizers, was cultured in a periodic air pressure oscillating, solid-state fermenter by using straw of wheat as an inert solid support. Effects of air pressure oscillation amplitude, frequency on the viable cells of *R. leguminosarum* L003 and oxygen transfer rate were investigated. It was found that enhanced oxygen transfer and biochemical reaction occurred in this system. Under the optimized conditions, about a 3-fold increase of the viable cells was obtained in this system compared with that in a static tray fermenter. The overall oxygen transfer rate reached 487.01 mmol/(kg·h) in this system in case of 0.35 MPa, $t_2 = 0.5$ min against 37.46 mmol/(kg·h) in static tray fermenter.

Key words *Rhizobium leguminosarum*, air pressure oscillation fermenter, straw of wheat

Received: February 27, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-10-62568173; Fax: 86-10-62561822; E-mail: zhaohua696@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>