

固态发酵中的传感器检测技术

杨佐毅¹, 李理²

(1. 广东工业大学环境科学与工程学院, 广东广州 510006;
2. 华南理工大学食物蛋白工程研究中心, 广东广州 510640)

摘要: 固态发酵(SSF)中各种变量的检测对发酵过程的控制具有重要意义,但由于其培养基来源的多样和复杂性,使得这些参数不易测定。本文综述了固态发酵中采用不同传感器对环境参数(温度、pH、水分含量和水活度)和碳素平衡(生物量、底物浓度、CO₂)的检测方法,并对目前固态发酵在线检测中的新技术应用,以及具有应用潜力的检测方法(X射线、磁共振成像技术等)进行了介绍。

关键词: 固态发酵, 传感器, 在线检测

Sensors in the detecting of solid-state fermentation

YANG Zuo-yi¹, LI Li²

(1. Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;
2. Research Center of Food Protein Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Detection of variational parameters is significant for the solid state fermentation(SSF), but the detecting is difficult because of the variable and complicity substrate in SSF. Different sensors were discussed in the measurement of environmental parameters (temperature, pH, water content and activity) and the carbon cycle (biomass, substrate concentration, CO₂) in SSF. Application of new techniques and potential techniques (X-rays, Magnetic Resonance Imaging, et al.) of more recent methods in the on-line detection were introduced.

Key words: solid state fermentation; sensor; on-line detection

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0402-04

固态发酵(SSF)是在低湿含量(a_w)的固态培养基上(一般为0.40~0.90),在不腐烂和自然状态下进行的发酵过程。自从1940年青霉素引起液体深层发酵(SmF)技术的迅速发展以来,SSF长期受到未引起人们的重视,而近年来SSF在食品、燃料、酶、动物饲料的生产和染料降解等领域的应用越来越多。在生物反应器设计和操作中,环境参数的监测对于固态发酵中生物量和/或代谢物的生产具有重要意义,但由于SSF的培养基物质通常来源于农作物,未经精制使得生产的重现性差,SSF的复杂性和固体培养基的异质性使得各种变量的探测和衡量比SmF更加困难。传感器是基于物理、化学或生物的原理,感应生产环境条件的变化并将有用信号传送到显示单元,最常见的形式是对电信号进行传送或显示。传感器主要有三种测定方式:样品不用从反应器中取出,信号由传感器直接在线测定;传感器安装在生产环境附近,需要通过取样系统或从反应器中取出样品进行分析,通常这种方式使用较多;离线分析,也称测量/检测系统或分析仪。传感器在生产中作为监测和控制关

键部件,常会出现误差而需要矫正。

1 环境变量的检测

1.1 温度测定

在固态发酵中温度与湿度范围的监控至关重要,例如在堆肥生产中,温度达到80℃时会成为限制因素而造成曝晒,导致培养基干燥和水活度下降并使养分流失。温度测定中常用的传感器包括热电偶、热敏电阻或金属探针Pt100(表1),温度传感器一般置于反应器径向的不同距离并连接到相应的控制系统,通常在气流入口和出口测定固态发酵生物反应器内的温度情况。在实验室条件下可通过控制恒温水浴或室内温度来调节固态发酵反应器的温度,而在工业规模生产中,通过强制通风、搅拌或蒸汽加热来进行温度控制,最有效的方法是调节进入反应器的空气湿度,误差为 $\pm 4^\circ\text{C}$ 。

1.2 水分含量与水活度的测定

水分含量通常采用离线测定干重进行分析,但这种方法不能准确测定微生物生长代谢活动所消耗的水分。SSF中的水活度(a_w)测定可采用细胞接触平衡法(The Proximity Equilibration Cell method)^[2],采用干燥的滤纸或微晶纤维素与培养基接触,通过测定其重量的变化可测得水活度变化,虽然不能在线检测但可实现水分测定的自动化。在线测定中

收稿日期: 2009-01-19

作者简介: 杨佐毅(1976-),男,博士,讲师,研究方向:环境生物技术。

基金项目: 广东工业大学博士基金资助(073018)。

表1 不同温度传感技术的比较^[1]

传感器	热电偶	金属探针(Pt 100)	热敏电阻
原理	塞贝克效应:当两种不同导体相连接时,如两个连接点保持不同温度则在导体中产生温差电动势	金属导体的电阻变化与温度变化相对应	半导体的电阻率随温度变化而改变
温度	-270~400℃	-270~1100℃	-100~450℃
优点	精度较好	温度测量仅依赖于敏感元件,比热电偶更简单、更精确	高灵敏度,响应时间短,探头形式多样
缺点	温度测定依赖于温度低的导体	价格高,响应时间较长	比金属探针稳定性差,可替换性差

表2 离线生物量测定^[1]

方法	测量原理	应用
从基质中分离	生物量分离: 熔融去除支持物(明胶) + 离心 + 称干重	适用于真菌
细胞计数	酶解除去支持物 + 过滤 + 称干重纯化 + 过滤 + 细胞计数	适用于酵母菌或孢子
蛋白质	生物物质成分: 酸水解 + Lowry 法(测蛋白质含量) 或 kjeld-hal 法(测总氮)	适用于各种微生物, 基质富含蛋白质时会受到干扰
核酸	DNA(或 RNA)的提取 + 酶处理 + 二苯胺比色法	适用于各种微生物, 基质中核酸含量不高时可靠性高
甲壳素	甲壳素酸水解 + 比色法测定氨基葡萄糖	仅用于真菌, 甲壳素的含量随菌龄而变, 基质中氨基葡萄糖的存在会干扰测定
麦角固醇	提取 + GLC 分离 + UV 色谱	仅用于真菌, 依赖于干物质或几丁质的浓度
微热量测定	生物活性: 代谢热测定	高峰生长期的特点
酶活力(α -淀粉酶, 漆酶分解酶)	固态基质吸收的液体成分中的酶活力分析	仅适用于胞外酶, 并不总是与生长相关

使用最多的是用电容式传感器来测定水活度(a_w)和空气湿度。在实验室研究中可将生物反应器置于室内,用饱和盐溶液调节空气湿度从而来控制 SSF 的水活度,而大规模生产中常用饱和湿空气通风来进行控制。

1.3 pH

pH 是衡量微生物代谢活性变化的指标,其变化会影响基质消耗(如蛋白质水解)与代谢物(例如有机酸)的产生,在 SSF 中可通过在冷却水中加酸碱进行 pH 控制。由于 SSF 中缺乏游离水,因此无法用电极直接测定固体培养基的 pH。有些研究人员将样品浸泡于蒸馏水中,然后采用电位电极或 pH 电极来测定,但这样难于精确控制固态培养基的 pH^[3],而标准的 pH 测定方法是采用氮源物质(尿素,氨盐)、钙盐或碱性溶液等对培养基进行缓冲后进行测定。

2 碳平衡中变量的测定

在固态发酵中碳源在需氧条件下可转化成生物量、代谢产物、CO₂ 和水。微生物生长的在线监测可通过 O₂ 消耗和 CO₂ 的产生(呼吸作用),以及丝状真菌菌丝体生长引起的压力降(PD)等间接方法来测定,呼吸作用和 PD 测量需要对空气流量进行准确测量和控制。为了获得有价值的信息必须进行离线检测,通常需要从基质中取出生物量、蛋白质、核酸、麦角固醇和测定酶活力等特征成分(表2),这些操作会影响物质平衡,从而对发酵具有破坏性。

2.1 气流监测与控制

通常空气流量是在反应器出口处采用测定装置

进行在线检测,可采用的设备包括转子流量计、热式质量流量计、风力计或空速计等压力传感器,若采用可校准的电磁阀系统来监测出口的气体流量,则可设定间隔为 100mL/min 的进气量进行数字化控制。

2.2 呼吸作用

由于 O₂ 在水中的溶解度低,因此也可在反应器顶部空间采用顺磁分析仪测定浓度。顺磁分析仪的缺点是对热敏感和精度不高,但也足以检测到气体成分的变化和 O₂ 在反应器中的变化,由于顺磁性的测量是非破坏性的,因此在其后可以连接红外探测器来同时测定 CO₂ 的含量。顺磁分析很适合 SSF,因为在发酵过程中 O₂ 是唯一的顺磁性气体。而液相中 O₂ 浓度一般采用安培计探头进行检测。通常用红外光谱来测定 CO₂,在分析中 CO₂ 的测量可用于评价固态基质的生物可降解性或研究挥发性有机物(VOC)的特点。CO₂ 的释放量也可先用 NaOH、KOH 等碱液吸收,然后采用手动或自动的方法检测其含量。通过对呼吸作用的监控可评估微生物的生长、验证气体扩散模型,以及监测固态发酵生产。

采用气相色谱(GC)可同时进行 O₂ 和 CO₂ 的测定。利用两个同心的色谱柱,其中一根柱充满多孔聚合物或硅胶,从空气中分离出 CO₂;另一根柱充满了一种分子筛对 O₂ 和 N₂ 进行分离,然后再用热定量探测仪或导热析气计确定^[4]。这一系统可同时在线监控几个生物反应器,甚至在较大范围内也能测定耗氧率的变化。测得数据可用于二氧化碳产率(CDPR)、呼吸商(RQ)、CO₂ 产生和 O₂ 消耗率的计算,以及建立 O₂ 摄取速率(OUR)基础上的动态生长模型等。

表3 气味传感器在固态发酵的应用

应用	反应物	传感器技术	结果
监测微生物生长	干猪粪	5个采用青蛙嗅觉细胞感应的石英传感器	从霉味到发酵初期气味的变化
	面包酵母	14个 SnO ₂ 传感器和1个 IR 分析仪	细胞物质和乙醇浓度的测定 生长期和稳定期的评价
检测生产过程的异常	抗生素生产, 谷物	12个导电聚合物传感器	检测污染和细菌和真菌产生的挥发性成分(如麦角固醇)
菌株分类	培养皿培养	14个导电聚合物单元	10种常见的微生物分类

2.3 压差测量

由于 SSF 中微生物吸附在固体基质颗粒上和培养基的异质性, 因此难以用生物传感器进行检测。生物量的增长可以直接测定菌丝的生长, 采用这种方法需要在反应器中将气体流速降到最低, 而气体流速可用压差计、液柱或不同类型的压力传感器进行测定。PD/L 值是压力降和反应器长度的比值, 可显示发芽、生长、产孢等过程的定量变化, 并反映了固定床的生产能力。由于在固态发酵中, 植物性原料往往同时用来作为支持物和反应基质成分, 渗透率变化不仅可能导致生物量增长, 而且改变了固态反应器内部支持物的结构。因此压力传感器最好用作报警用, 用于探测床层压实性或排水性是否良好。

3 生物量和代谢产物的测定

气体成分测定、近红外(NIR)分光法和成像分析技术可用于测定生物量和代谢物的生长, 有望在固态发酵代谢物生产的在线监控系统中得到应用。

3.1 挥发性有机化合物(VOCs)的分析

在固态发酵过程中往往会产生挥发性有机物, 例如初级代谢产生的乙醇和堆肥中产生的次级代谢产物, 这些代谢物质的量是微生物活性的重要指标。自上世纪九十年代中期开始, 气味传感器(电子鼻)在食品工业中得到商业化应用, 用于监测产品的缺陷和异常情况^[5]。气味传感器系统内设有敏感物质感应单元和数据处理单元, 相应敏感材料可吸附和处理 VOCs, 通过传感器测得的数据可对样品进行分析。在固态发酵中气味传感器用来监测微生物增长, 预测芳香族代谢物的质量, 或在某些情况下可区别不同的微生物种类。在固态发酵监测中使用的感应元件包括半导体探测器(如 SnO₂)、导电聚合物和石英微感应器(表3)。

虽然看起来颇具吸引力, 但这些传感器一般都存在重复性差、灵敏性差、选择性差和反应时间滞后等弱点, 生产中可将几个传感器结合使用来弥补各自的缺点。新的检测技术如微型和低成本的气相色谱法(GCs)可进行快速和可靠的气味分析, 已进入商业化应用, 利用热导率探测器可3min内得出结果。质谱仪也可作为电子鼻使用, 其优点在于选择性、敏感性和适应性很好, GC-MS方法常被用于挥发性成分的定性和定量测定。田怀香等采用自制简易的气体吸取装置, 用GC-MS对顶空固相微萃取法提取的金华火腿的风味物质进行测定, 同时进行感官评价, 对其中22种化合物进行了明确的定性^[6]。Hau采用GC-MS分析方法测定了自制和商品腐乳中的挥发

性物质, 其中的主要成分为醇和酯^[7]。

3.2 红外光谱

红外光谱包括特征分子键的近红外(NIR)和中红外(MIR)吸收光谱。NIR和MIR技术在固态发酵、堆肥和土壤有机物的分析中得到大量应用, 例如在SSF中采用NIR(1100~2500nm和800~1100nm)进行干酪风味成分的分析^[8-9]。研究人员采用近红外光谱和声化学计量法来检测玉米青贮法生产的沼气, 在靠近反应器的附近取样, 采用在线近红外技术, 标准差分析结果表明在线测定效果较好^[10]。

3.3 人工视觉

人工视觉技术包括产品影像收集和相关特征的提取, 需要进行摄像(CCD)、数码化和计算机处理(图像分析), 其中最困难的步骤在于建立从背景中自动分离目标对象的算法。在液体介质中由于微生物对均匀背景的对比如度高, 因此很容易进行图像分离, 可对酵母和菌丝的生长过程进行研究。而在固态发酵中, 反应物的多样性使得很难找到从背景中分离目标微生物图像的方法。在土壤研究中, 图像分析可以用来鉴别培养基的宏观结构(体积、粒子大小和孔隙度)或菌丝生长。近年来 CCD 在固态发酵中的应用正在逐渐增加, 可使研究人员测量环境条件在真菌生理活动中的作用。

采用新的多光谱摄像技术在可见光范围之外能够拍摄菌丝, 并且能对代谢产物或菌丝活动进行定量研究。红外线和紫外线辐射范围内, 可以提高生物量和基质的反差, 或者使得某些代谢物变得可见。例如某些真菌代谢物荧光染色后在紫外线照射下会成像, 采用UV多光谱分析法还可区分不同菌株。

4 基于断层摄影的检测技术

由于固态发酵中培养基成分多样, 代谢中空间变量的数据也在不断变化, 因此可设计和利用传感器来进行X射线断层摄影从而对SSF的过程进行深入研究。例如固体培养基中的水分、生物量或代谢化合物的三维图像, 尤其是水分含量在固态发酵控制是一个关键的参数, 在固态发酵以及食品、土壤领域的研究中, 可利用微波、X射线和磁共振成像(MRI)等技术来研究水分的动态变化。

4.1 微波

微波感应传感器的原理是建立在水分子吸收微波辐射的基础上, 其优点是对SSF没有破坏性, 并可以测定出总的湿度值。例如在食品工业中, 基于朗伯-比耳定律信号减弱的原理, 微波传感器正在应用于工业规模的生产, 能检测谷物、鱼、面粉中的水分

含量而对产品无破坏作用^[11]。微波传感器也用于分析土壤结构、温度和盐浓度等方面的内容。Pablo Resa 等采用超声技术来在线监控样品中啤酒酵母细胞胞外水解酶的动态变化,具有检测快捷方便、无污染、低消耗、非破坏性、分析速度快等优点^[12]。采用微波传感器是适应固体发酵的发展方向,但目前还较少用于对 SSF 水分概况的分析。

4.2 X 射线和伽马射线

计算机辅助 X 射线断层摄影 (CT) 是一种无破坏性的技术,目前使用在医疗领域,可对目标的内部特征进行观察,实际上首先观察到的是“片状”的目标,然后将这些“片段”重新整合得到三维图像,在土壤研究中,可采用 X 射线技术可用于测量其多孔性与水分特征曲线^[13]。在固态发酵的实验室研究中,也可采用该技术来观察菌丝的空间结构。

4.3 时间域-核磁共振 (TD-NMR)

TD-NMR 通常用于检测食品中含¹H 的化合物或监测其在生产过程中的变化,这种技术可对固态培养基中的化学键和游离水进行测定,因此在 SSF 培养基中,可应用该技术来进行湿度和水活度的分析。磁共振成像 (MRI) 已被用于研究水的流动性、多孔介质中自由水和结合水等领域。

在固态发酵中,¹H MRI 技术用来测定含水量、葡萄糖的浓度梯度、固态基质中的水活度等,结果表明基质表面之下的水活度主要受到水含量的影响,而同一位置的葡萄糖浓度却很低,可能是由于真菌菌丝层对葡萄糖的摄取率较高^[14];MRI 可用于固态发酵的研究,例如考查奶酪成熟过程中水分的变化^[15],但由于磁共振成像仪还十分昂贵,目前其工业规模的应用还受到制约。

5 结语

固态发酵技术主要是采用低成本的基质生产低附加值的产品,因此生产中用于在线测定的传感器必须成本低、可靠性高和易于维护,可在线安装使用而又不能过于昂贵。在本文所述的检测方法中,可用电流传感器在线检测除 pH 之外的环境变量(温度、湿度、氧气),工业上最有前途的传感器包括气体传感器尤其是小型气相色谱 (GCs)、照像技术和微波传感器,而近红外 (NIR) 传感器难以用作固态发酵生产的在线检测。

参考文献

[1] Véronique Bellon-Maurel, Olivier Orliac, Pierre Christen.

(上接第 363 页)

[6] Se-Kwon Kim, Yang-Tae Kim, Hee-Guk Byun, et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack Skin [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 1984-1989.

[7] Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease [J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2000, 30 (2): 87-99.

[8] 卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003: 43-58.

Sensors and measurements in solid state fermentation [J]. Process Biochemistry, 2003, 38: 881-896.

[2] Xavier S, Karanth NG. A convenient method to measure water activity in solid state fermentation systems [J]. Lett Appl Microbiol, 1992, 15: 53-55.

[3] Villegas E, Aubague S, Alcantara L, et al. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments [J]. Biotechnol Adv, 1993, 11: 387-397.

[4] Saucedo-Castaneda G, Trejo-Hernandez MR, Lonsane BK, et al. On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations [J]. Proc Biochem, 1994, 29: 13-24.

[5] Gardner IW, Bartlett PN. A brief history of electronic noses [J]. Sens Actuators B, 1994, 18: 211.

[6] 田怀香, 王璋, 许时婴. GC-O 法鉴别金华火腿中的风味活性物质 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12): 117-221.

[7] Han YC. Volatile Components in Fermented Soybean (Glycine max) Curds [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2690-2696.

[8] Sorensen LK, Jepsen R. Assessment of sensory properties of cheese by near infrared spectroscopy [J]. Int Dairy J, 1999, 8: 863-887.

[9] 李桂峰. 近红外光谱技术及其在农业和食品检测中的应用 [J]. 农业与技术, 2007, 27(5): 91-94.

[10] Carina J Lomborg, Jens Bo Holm-Nielsen, Piotr Oleskowicz-Popiel, et al. Near infrared and acoustic chemometrics monitoring of volatile fatty acids and dry matter during co-digestion of manure and maize silage [J]. Bioresource Technology, 2009, 100 (5): 1711-1719.

[11] 张吉, 刘稚, 毕建秀, 等. 微波消解原子荧光光度法测定粮谷中的砷 [J]. 检验检疫科学, 2008, 18(4): 44-45.

[12] Pablo Resa, Luis Elvira, Carlos Sierra, et al. Ultrasonic velocity assay of extracellular invertase in living yeasts [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 384(1): 68-73.

[13] 何娟, 刘建立, 吕菲. 基于 CT 数字图像的土壤孔隙分形特征研究 [J]. 土壤, 2008, 40(4): 662-666.

[14] Van As H, Nagel F-I, Wieland A. ¹H MRI applied to low water and/or low mobility systems: solid-state-fermenter and biomats. Book of abstracts fifth international meeting on recent advances in MR applications to porous media, Bologna, Italy, 2000, 11: 64.

[15] 张锦胜, 林向阳, 阮榕生, 等. NMR 和 MRI 技术对面包和奶酪二元体系在贮藏过程中水分迁移的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(11): 132-138.

[9] Adibi SA. Intestinal transport of depeptides in man; Relative importance of hydrolysis and intact absorption [J]. J Clin Invest, 1971, 50: 2226.

[10] Fei yj, Y Kanaai, S Nussberger, et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligo-peptide transporter [J]. Nature, 1994, 368: 563-566.

[11] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 102.