



GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

• 高等学校专业教材 •

[高校教材]

# 固态发酵工程 原理及应用

邱立友 主编

PRINCIPLES AND APPLICATION  
OF SOLID-STATE FERMENTATION



20.6  
4

 中国轻工业出版社

高等学校专业教材

# 固态发酵工程原理及应用

主 编 邱立友

2009年1月 3日

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

固态发酵工程原理及应用/邱立友主编. —北京:中国轻  
工业出版社,2008.8  
高等学校专业教材  
ISBN 978-7-5019-6236-5

I. 固… II. 邱… III. 固态发酵-高等学校-教材  
IV. TQ920.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 177674 号

This edition is published by arrangement with Asiatech Publishers, Inc, New Delhi.  
Translated by China Light Industry Press from the original English language version.

责任编辑:江娟  
策划编辑:姚怀芝 责任终审:唐是雯 封面设计:锋尚设计  
版式设计:王超男 责任校对:杨琳 责任监印:胡兵 张可

出版发行:中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编:100740)

印刷:三河市世纪兴源印刷有限公司

经销:各地新华书店

版次:2008年8月第1版第1次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:15.25

字数:352千字

书号:ISBN 978-7-5019-6236-5/Q·050

定价:30.00元

著作权合同登记 图字:01-2008-3711

读者服务部邮购热线电话:010-65241695 85111729 传真:85111730

发行电话:010-85119845 65128898 传真:85113293

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

61193J4X101ZYW

## 前 言

生物工程中最重要的一项技术和方法是固态发酵(应用低水分含量的固态基质培养微生物和形成产物)或固体基质发酵(采用固体和非水溶性的基质)。这种技术在东方常用于食用菌、中国白酒、日本清酒和东方传统食品生产等,在西方常用于生产西式日常食品,如奶酪、发酵香肠等。固态发酵是人们熟悉的微生物过程,如堆肥、青贮饲料、沤麻、床栽和表面培养等,都是经济可行的、能够进行大规模生产的生物转化和生物降解过程,在现代生物工程中发挥显著的作用。

目前,关于固态发酵方面的著作比较少。本书在编写过程中,得到印度 Asiatech Publishers 出版公司的大力支持,授权中国轻工业出版社在中国独家翻译出版该公司出版的专著《Solid - State Fermentation in Biotechnology》的中文译本。因此,本书是在其中文译本的基础上根据我国固态发酵科研、生产和教学实际增加适当内容编译而成的。本书的内容可分为三个部分。第一部分包括第一章和第二章,介绍固态发酵的历史和发展,以及该技术所涉及的一般问题。第二部分包括第三章至第六章,阐述固态发酵的基础知识,如固态发酵的影响因素、固态发酵过程的动力学、能量平衡、发酵模型和用于不同固态发酵代谢和产物生产的设备的设计。第三部分包括第七章至第十四章,讨论了固态发酵在食品、医药、化工、农业和环境等领域的重要的工业应用。

参加本书编译的有:邱立友(第一章和第九章),戚元成(第二章),高玉千(第三章),刘亮伟(第四章和第五章),李富欣(第五章),张世敏(第六章),王明道(第七章),陈红歌(第八章),张继英(第九章),王凤芹(第十章),麻兵继和王振河(第十一章),宋安东(第十二章),刘新育和谢慧(第十三章),徐淑霞(第十四章)。刘新育、宋安东、张世敏和刘亮伟对初稿进行了审定,全书由邱立友统稿。

在编写过程中参考了许多同仁的著作和论文,在此深表谢意。由于固态发酵工程发展迅速,还有很多新观点、新技术和新成果未能消化吸收编入本书,加上编者水平所限,错误和不足之处在所难免,诚恳希望读者批评指正。

编者

2007年6月于郑州

## 本书编译人员

**主 编 译** 邱立友(河南农业大学)

**副主编译** 刘新育(河南农业大学)

宋安东(河南农业大学)

张世敏(河南农业大学)

刘亮伟(河南农业大学)

**编 译 者** (以姓氏笔画为序)

王风芹(河南农业大学)

王明道(河南农业大学)

王振河(河南科技学院)

麻兵继(河南农业大学)

刘亮伟(河南农业大学)

刘新育(河南农业大学)

李富欣(河南农业大学)

陈红歌(河南农业大学)

邱立友(河南农业大学)

宋安东(河南农业大学)

张世敏(河南农业大学)

张继英(信阳农业高等专科学校)

高玉千(河南农业大学)

戚元成(河南农业大学)

徐淑霞(河南农业大学)

谢 慧(河南农业大学)

# 目 录

第一章 固态发酵的历史和发展	1
第一节 固态发酵过程进展	1
第二节 固态发酵在食品工业中的研究与应用进展	2
第三节 固态发酵在抗生素中的研究进展	5
第四节 固态发酵在饲料工业中的研究与应用进展	5
第五节 固态发酵在资源环境中的研究与应用进展	7
第六节 固态发酵设备的设计与应用进展	10
第二章 固态发酵概论	11
第一节 固态发酵的分类	11
第二节 固态发酵微生物及基质	12
第三节 固态发酵的特性	16
第三章 影响固态发酵的因素	19
第一节 碳源和氮源的关系(C/N比)	19
第二节 温度	20
第三节 湿度及水活度( $a_w$ )	23
第四节 酸碱度(pH)	26
第五节 通气搅拌和传质过程	26
第六节 适用于固态发酵的基质特征	29
第四章 固态发酵动力学及固态发酵模型的构建	34
第一节 固态发酵动力学	34
第二节 固态发酵模型的构建	47
第五章 固态发酵过程的质量和能量衡算	53
第一节 总的能量衡算	53
第二节 木薯固态发酵模型的建立	54
第六章 固态发酵反应器	57
第一节 静态固态发酵反应器	57
第二节 动态固态发酵反应器	59
第三节 新型固态发酵反应器	65
第七章 固态发酵产酶	67
第一节 固态发酵产酶微生物和发酵原料	67
第二节 固态发酵生产的主要酶类	72
第三节 固态发酵酶的提取	76
第八章 有机酸的固态发酵生产	77
第一节 柠檬酸	78

第二节	乳酸 .....	87
<b>第九章</b>	<b>固态酿造食品 .....</b>	<b>90</b>
第一节	概述 .....	90
第二节	白酒的固态酿造 .....	94
第三节	固态酿造酱油 .....	109
第四节	固态食醋酿造 .....	123
<b>第十章</b>	<b>生物农药、生物肥料和单细胞蛋白的固态发酵生产 .....</b>	<b>131</b>
第一节	生物农药的固态发酵 .....	131
第二节	生物肥料的固态发酵 .....	141
第三节	单细胞蛋白的固态发酵 .....	147
<b>第十一章</b>	<b>食用菌的固态发酵生产 .....</b>	<b>151</b>
第一节	农作物及其下脚料的生物转化和生物改良 .....	151
第二节	食用菌栽培的一般过程 .....	153
第三节	食用菌固体发酵常用培养料及其配制原则 .....	156
第四节	食用菌培养料处理方式 .....	161
第五节	食用菌常用的出菇方式 .....	163
第六节	食用菌固体发酵生产实例 .....	164
<b>第十二章</b>	<b>次级代谢产物的固态发酵生产 .....</b>	<b>186</b>
第一节	有重要商业和工业价值的次级代谢产物 .....	186
第二节	对次级代谢产物固态发酵生产的评价 .....	194
<b>第十三章</b>	<b>色素和香料及其他产品的固态发酵生产 .....</b>	<b>200</b>
第一节	色素的发酵生产 .....	200
第二节	香料的发酵生产 .....	202
第三节	其他产物的生产 .....	211
<b>第十四章</b>	<b>土壤固态修复技术 .....</b>	<b>213</b>
第一节	污染土壤的原位微生物处理 .....	213
第二节	污染土壤的异位微生物处理 .....	215
<b>参考文献</b>	.....	<b>220</b>

# 第一章 固态发酵的历史和发展

固态发酵(solid - state fermentation, SSF)是指在不含或几乎不含自由水的湿的固体物料中培养微生物的过程。固态发酵在某些生物过程和生产中表现出许多优势。固态发酵和固体发酵常被混用,然而,二者在逻辑上有所区别。固体发酵应特指那些基质本身作为碳源/能源,基质中不含或几乎不含自由水的生物过程。而固态发酵则是指采用不含或几乎不含自由水的自然基质作为碳源/能源或(和)惰性基质作为固体支持材料的发酵过程。

## 第一节 固态发酵过程进展

最早的固态发酵是食品发酵和酶的生产。关于固态发酵的最早记载是公元前亚洲地区应用娄地青霉(*Penicillium roqueforti*)制作奶酪。固态发酵的历史沿革见表 1-1。

表 1-1 固态发酵的历史沿革

时 期	进 展
公元前 2000 年	埃及人制作面包
公元前 1000 年	亚洲地区应用娄地青霉制作奶酪
2 500 年前	开始使用糖、淀粉、盐等发酵/保藏食品
2 500 年前	米酒生产
7 世纪	米酒由中国传至日本
18 世纪	利用果渣生产食醋
18 世纪	使用没食子酸鞣革、印染等
1860 ~ 1900	污水处理
1900 ~ 1920	生产真菌酶、曲酸
1920 ~ 1940	生产真菌酶、葡萄糖酸、柠檬酸、发明转鼓制曲机
1940 ~ 1950	发酵工业大发展,青霉素生产
1950 ~ 1960	甾体转化
1960 ~ 1980	生产毒枝菌素、蛋白加富饲料
1980 ~ 1990	生产各种初级和次级代谢产物,发明圆柱形发酵罐,研究固态发酵的动力学及其模型
1990 ~ 至今	固态发酵的基础研究进展,生物过程/生产进展: A. 生物过程 生物除污和有害物的生物降解,工农业废弃物生物脱毒、生物转化、生物制浆等 B. 产物生产 生物活性物质: 黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、细菌内毒素、赤霉酸、玉米烯酮、麦角碱、青霉素、头孢菌素、头霉素 C、四环素、金霉素、土霉素、伊枯草素、放线紫红素、次甲霉素、表面活性素、根赤壳菌素、环孢素 A、ustiloxins、抗真菌挥发物、destruxins、克拉维酸、霉酚酸



续表

时 期	进 展
1990 ~ 至今	<p><b>酶:</b> 纤维素酶、<math>\beta</math>-葡萄糖苷酶、羧甲基纤维素酶、漆酶、木聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶、木质酶、<math>\beta</math>-木糖苷酶、<math>\beta</math>-阿拉伯呋喃糖苷酶、锂-过氧化物酶、锰-过氧化物酶、芳醇氧化酶、过氧化氢酶、酚氧化酶、(酸、中、碱性)蛋白酶、脂肪酶、<math>\beta</math>-半乳糖苷酶、<math>\alpha</math>-淀粉酶、<math>\beta</math>-淀粉酶、糖化酶、谷氨酰胺酶、菊粉酶、植酸酶、丹宁酸酶、阿魏酸异-香豆酰酯酶</p> <p><b>有机酸:</b> 柠檬酸、延胡索酸、乳酸、草酸、没食子酸</p> <p><b>其他产品:</b> L-谷氨酸、色素、类胡萝卜素、黄原胶、琥珀酰聚糖、乙醇、芳香化合物、维生素 B<sub>12</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、核黄素、硫胺素、烟酸、烟碱、<math>\gamma</math>-亚麻酸、生物表面活性剂、生物杀虫剂、生物除草剂</p>

在 18 世纪,人们就开始利用苹果渣进行固态发酵生产食醋,在这一时期还发明了采用没食子酸鞣革技术。19 世纪末期出现了固态发酵堆肥和固体废物处理工艺。20 世纪初,第一次利用微生物固态发酵生产初级代谢产物如酶和有机酸,生产菌绝大多数是真菌。在这一时期首次出现了适用于固态发酵的先进的发酵设备(生物反应器),并促进了转鼓式制曲机的发明。20 世纪 40 年代开创了发酵工业的黄金时代。在这一时期首先发现和生产了高效药物青霉素。青霉素的生产既有液体发酵,也有固态发酵。然而,这一时期人们将主要的精力都关注到液体发酵,而完全忽视了固态发酵,典型的例子即是青霉素生产,并延续到其他发酵生产。仅有少数人开展固态发酵系统这方面的研究,在 19 世纪 50 ~ 60 年代,发表了应用真菌固态发酵进行菌体转化的论文,这是固态发酵历史上的又一个里程碑式的成就。到了 19 世纪 70 年代,应用固态发酵成功开展了培养真菌生产用来治疗癌症的毒枝菌素。在这一时期,另一个重要的应用是生产蛋白加富饲料(单细胞蛋白),自此以后,大量的研究工作投入到与单细胞蛋白发酵有关的多种基质和微生物的研究,各种发酵过程的技术经济的可行性研究也取得了有益的进展。

最近 10 多年来,固态发酵过程在很多领域有了空前的大发展,主要包括生物除污和有害化合物的生物降解、工农业废弃物的生物脱毒、作物和秸秆营养加富的生物转化、生物制浆、高附加值产物如生物活性次级代谢产物生产(包括抗生素、生物碱和植物生长因子等)以及酶、有机酸、生物杀虫剂(包括杀菌剂和生物除草剂)、生物表面活性剂、生物燃料、芳香化合物等。这些在过去总被认为是水平低下的技术系统如今则用来生产高附加值的产品。固态发酵在特定方面比液体发酵具有优势,如高产值、相对较高的产物浓度、发酵设备简单等。

固态发酵过程在生物除污、有害有毒物的生物脱毒方面有着明显的优势。随着生物工程主要是酶和发酵工程领域的不断创新,固态发酵的应用也将会扩展许多新的领域。

## 第二节 固态发酵在食品工业中的研究与应用进展

### 一、香 料

香料用量超过了世界食品添加剂的 1/4。大多数香料化合物是由化学合成或天然植物提取得到的。然而,最近市场调查表明,消费者更倾向于天然食品。植物是精油和香料的主要来源,但是它们受到气候条件和植物疾病的影响。另一种合成路线是以微生物合成或生物转化为基础。当前已知一些微生物(包括细菌和真菌)具有合成不同香料化合物的能力。

微生物利用液态发酵生产香料化合物产率很低,这阻碍了其工业化应用,而固态发酵在这方面具有很大优势。Ferron 等(1996)对微生物生产香料以及固态发酵过程的应用做了全面论述。已经研究了脉孢菌、鲁氏接合酵母、曲霉菌分别利用预胶化大米、胶体次枸橼酸铋、纤维素通过固态发酵过程生产香料化合物。Bramorski 等(1998)使用甘蔗渣、苹果渣和大豆固体培养基利用甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata*)生产水果香料。Soares 等(2000)也报道了采用固态发酵利用同样菌株以咖啡豆壳作底物生产菠萝香料。Christen 等(2000)报道了利用可食性真菌米根霉以热带农副产品为底物生产挥发性化合物(如乙醛、3-甲基丁醇)。Medeiros 等(2001)报道利用 *Kluyvomyces marxianus* 以甘蔗渣或麦麸作底物可生产香料化合物如单萜醇和乙酸异戊酯。他们发现,固态发酵过程非常适合于生产此类化合物。

## 二、酶 制 剂

近来,dos Santos 等(2004)对固态发酵是否是生产酶的最优系统进行了评估,指出固态发酵适合于生产酶以及其他不耐热产品,并且其收率高于液态发酵。

### 1. 淀粉酶

淀粉酶(内切-1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖水解酶,EC3.2.1.1)是一种胞外内切酶,能随机裂解直链淀粉中相连葡萄糖的1,4-糖苷键,最终得到葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖。自19世纪50年代起,真菌淀粉酶就已用于制造含有特殊糖混合物的糖浆剂,它们不能利用简单的酸水解而得到。淀粉酶广泛应用于食品加工工业,如烘烤、酿造、果汁和淀粉糖浆的生产等。生产 $\alpha$ -淀粉酶一般是利用液态发酵工艺,然而固态发酵工艺更好。最近,Francis(2003)在固态发酵过程中使用谷物生产 $\alpha$ -淀粉酶,并且确定用Tween-80或 $\text{Ca}^{2+}$ 作为发酵培养基的添加物以增强 $\alpha$ -淀粉酶的活性。

现在,糊化和液化结合技术已经应用于利用液态发酵和固态发酵生产耐热淀粉酶。Sodhi(2005)认为利用芽孢杆菌生产耐热淀粉酶受到固态底物(麸皮、米糠、玉米糠)、湿润剂性质、水分浓度、培养温度、表面活性剂的有无以及碳、氮、无机物、氨基酸和维生素添加物的影响。

近来,Ramachandran(2004)报道了用椰子油(COC)作为底物利用米曲霉在固态发酵条件下生产 $\alpha$ -淀粉酶。粗椰子油支持培养基的生长,在24h内生产 $\alpha$ -淀粉酶1372U/g干曲。底物中补充0.5%的淀粉和1%蛋白胍能得到淀粉酶3388U/g干曲。实验表明,椰子油是淀粉酶生产中很有前途的底物。

### 2. 果糖基转移酶

果糖基转移酶(EC2.4.1.10)催化蔗糖生成果糖寡聚体。果糖寡聚体应用于各种食品加工,如水果、蔬菜、谷物和蜜。近年来,在液态发酵中使用曲霉、青霉和短梗霉,在固态发酵中使用臭曲霉和米曲霉生产果糖基转移酶引起了科研人员的兴趣。

最近,Sangeetha 等(2004)研究了以各种农副产品为底物,如谷糠(麸皮、米糠、燕麦糠)、玉米产物(玉米芯、玉米糠、玉米胚芽、玉米面)、咖啡和茶加工副产物(咖啡壳、咖啡浆)、甘蔗渣和木薯粉,利用米曲霉生产果糖基转移酶。研究发现,在酵母膏和完全合成培养基中添加米糠、麸皮、玉米胚芽效果最好。

### 3. 脂肪酶

脂肪酶(三酰基甘油酯酰水解酶,EC3.1.1.3)以长链三酰基甘油脂肪酸为天然底物,是水解水不溶性脂肪酸酯的高效生物催化剂。如今,工业级脂肪酶广泛应用于食物、清洁剂、

化妆品和制药行业。利用细菌、真菌和酵母菌生产脂肪酶的研究主要集中于深层发酵,然而也有利用固态培养基发酵生产脂肪酶的报道。

近年来,利用固态培养基转化工业废物的过程引起研究人员的关注。在深层条件下利用真菌如根霉、曲霉和青霉用不同固态底物生产胞外脂肪酶的研究已有报道。然而,少数研究人员研究了用固态发酵工艺利用酵母菌合成脂肪酶。Benjamin 等(1997)对用液态发酵和固态发酵两种体系生产脂肪酶作了比较,所有研究表明后者产率更高且稳定。

生产胞外脂肪酶有诸多影响因素,如 pH、温度、通气和培养基组成。此外,三酰基甘油脂肪酸的存在能使某些微生物分泌的脂肪酶增加。因此,在固态发酵中底物类型能够用于增加酶的生成,因为很多食品和农业废物中富含脂肪酸、甘油三酯和(或)糖。Dominguez 等(2003)报道了以食品-农业废物作为底物,用解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)在固态培养基上生产脂肪酶具有较大优势。

#### 4. 果胶酶

果胶酶能够催化降解果胶,果胶是植物细胞中的结构多糖并且维持植物组织完整。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。

生产商业化果胶酶主要是利用黑曲霉菌株。利用固态发酵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、橘渣、甘蔗渣、麸皮和苹果渣。张保国等(2005)研究了以甜菜粕为碳源和酶的诱导物,酵母膏和麸皮作氮源利用克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*) S-4 菌株生产碱性果胶酶。这不仅减少了废物的产生,而且减少了污染。

固态发酵生产的果胶酶性质更稳定,具有高 pH 和温度耐受性、降解物阻遏影响更小。

### 三、有机酸

长期以来,有机酸就作为食品工业中的食品添加剂和防腐剂,用于防止食品变质和延长易腐食品的贮存期限。下面主要讨论食品工业中常用的两种有机酸。

#### 1. 乳酸

乳酸有两种对映异构体 L(+) 和 D(-),由于 L-乳酸脱氢酶的存在,L(+) 已用于人类代谢过程。现在,乳酸需求巨大,因为它是生产医药、工业和消费品生物可降解聚合物的起始原料。

Soccol 等(1994)研究了固态条件下以甘蔗渣为载体用米根霉生产 L(+) - 乳酸。其产率稍高于深层培养。Richter(1994)也研究了固态条件下以高粱为载体用副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) 生产 L(+) - 乳酸。近来,Naveena 等(2005)报道了固态发酵条件下以麦麸为底物和载体用嗜淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylophilus*) GV6 生产 L(+) - 乳酸。

#### 2. 柠檬酸

柠檬酸是食品和医药工业中最常用的有机酸。其中食品工业中消费量最大,占总产量的 78%,而医药工业占 12%。口感好、高溶解性以及增味特性保证了其在市场中占优势地位。虽然化学合成也能得到柠檬酸,但其成本要比发酵法高。柠檬酸主要是由丝状真菌黑曲霉利用液态发酵工艺生产得到。

近来,为了提高利用黑曲霉生产柠檬酸的效率,科研人员研究了用固态发酵代替液态发

酵的潜在优势。柠檬酸的生产主要依赖于选择合适的菌株和操作条件。氧是柠檬酸发酵的重要参数。Prado 等(2004)研究了强制通风对柠檬酸生产的影响。研究表明,低通气率形成少量菌体有利于柠檬酸的生产。另外,由于固态发酵对特定金属离子如  $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  等的存在没有抑制,因此利用该过程生产柠檬酸产率较高。

#### 四、黄原胶

黄原胶是由野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)以葡萄糖和蔗糖为原料工业化生产得到的杂多糖。它是一种重要的商业化微生物多糖,全球年产量约 30 000t,市场价值 4.08 亿美元。这种水溶性微生物多糖的水溶液广泛应用于食品、化妆品、纺织品、医药工业。由于其流变学特性,它可作为食品工业中的乳化剂、稳定剂和组织增强剂。

近来,Stredansky 等(1999)报道了固态发酵过程生产多糖的可行性。为了评价甘蓝黑腐病黄单胞菌菌株生产黄原胶的能力,在固态底物或副产物(如苹果渣、葡萄渣、柑橘渣等)和易得廉价底物上培养该菌株,黄原胶产率能与常用的深层发酵培养相当。另外,产品经 NMR 分析显示其组成与商业化的黄原胶一致。

### 第三节 固态发酵在抗生素中的研究进展

抗生素作为微生物的一种次级代谢产物,它在微生物生长的稳定期开始形成,早期的一些研究已经表明通过常规的液态发酵方法产量较低的抗生素,通过固态发酵往往可以获得较好的效果。近年来,随着固态发酵技术在各研究领域的进步,抗生素的固态发酵也有了很大的变化,见表 1-2。这些研究主要集中在国外,国内对抗生素的固态发酵研究较少,几乎没有有什么进展。

表 1-2

利用固态发酵技术生产的抗生素种类

产 物	生 产 菌	底 物
青霉素	产黄青霉( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	甘蔗渣
头孢霉素	顶头孢霉( <i>Cephalosporium acremonium</i> )	大 麦
头霉素 C	棒状链霉菌( <i>Streptomyces clavuligerus</i> )	麦麸 + 棉籽饼 + 葵花籽饼
四环素	生绿链霉菌( <i>Streptomyces viridifaciens</i> )	番薯渣
土霉素	龟裂链霉菌( <i>Streptomyces rimosus</i> )	玉米芯
伊枯草菌素	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	麸 皮
放线紫红素	天蓝色链霉菌( <i>Strptomycetes coelicolor</i> )	凝胶培养基
表面素	枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	大豆渣
根赤壳菌素	<i>Humicola fuscoatra</i>	凝胶培养基

### 第四节 固态发酵在饲料工业中的研究与应用进展

#### 一、生物饲料添加剂

生物饲料添加剂是指利用某些特殊的有益微生物与原、辅料混合发酵,经干燥或制粒等

特殊工艺加工而成的含有活性菌的安全、无污染、无药物残留的饲料添加剂。按培养基质不同可分为以下几种。

### 1. 生物浓缩料

利用微生物以浓缩饲料发酵而成。由中国农业大学研制的此类产品“益生康”，在猪的日粮中添加结果表明，28d 断奶后仔猪日增重 550 ~ 600g，腹泻控制率达 98% 左右，小猪日增重 850 ~ 900g，大猪日增重 900 ~ 950g，比常规饲料提前 15d 左右出栏。饲养者的直接经济效益净增收 28 ~ 34 元/头猪，同时使猪肉绿色化，提高了产品的市场竞争力。

### 2. 发酵饲料

利用食品工业废渣如酒糟、豆渣、糖渣等与其他原料配合，经微生物发酵而成。工业废渣含水量大，含有机质高，处理不及时，极易腐败发臭，污染环境。如果直接干燥，耗能高，得不偿失。原料经发酵后，其生物效价和营养成分大大提高。例如可以进行秸秆饲料的发酵，原理就是给细化后的农作物秸秆提供适宜的营养、温度、湿度条件，使用有益的微生物（天然的或人工接种的）在饲料中生长繁殖，利用微生物的发酵作用，进行一系列复杂的生化反应，以改变原料的物理、化学性质，提高其适口性、消化吸收率和营养价值。

固态发酵常用的菌种有乳酸菌、酵母菌、芽孢杆菌和光合细菌等。乳酸菌是一种可以分解糖类产生乳酸的革兰氏阳性菌，厌氧或兼性厌氧生长，对胃中的酸性环境有一定的耐受性。在动物体内通过生物拮抗、降低 pH、阻止和抑制致病菌的侵入和定植，降解亚硝氨、氨、吲哚和粪臭素等有害物质，从而维持肠道的正常菌群平衡。目前主要应用的有乳酸杆菌、粪链球菌和双歧杆菌等。

酵母菌富含蛋白质、核酸、维生素和多种酶类，具有增强动物免疫力、增加饲料适口性和增强消化吸收等功能。用于饲料中的酵母菌主要有假丝酵母、啤酒酵母等。

芽孢杆菌是好氧菌，在一定条件下产生芽孢，耐酸碱、耐高温和挤压，在肠道环境中具有高度的稳定性。目前主要使用的菌株有枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌等。

光合细菌能在厌氧光照条件下同化  $\text{CO}_2$ ，有些菌还有固氮作用。经分析，光合细菌的细胞成分优于酵母菌和其他种类微生物，菌体中必需氨基酸的含量高于酵母菌，而且可产生辅酶 Q 等生物活性物质，提高宿主的免疫力。

## 二、单细胞蛋白

单细胞蛋白又称生物菌体蛋白或微生物蛋白，是指酵母菌、真菌、霉菌、非致病性细菌等单细胞微生物体内所产生的菌体蛋白质，含量为 40% ~ 80%。随着畜牧业的发展，保证家畜必需的蛋白饲料越来越缺乏，已引起人们的高度重视。据联合国粮农组织 (FAO) 统计，在 20 世纪末，全球的蛋白质短缺量约为 2 500 万吨。据有关资料报道，我国蛋白质饲料的缺口每年至少达 1 200 万吨。

微生物发酵生产蛋白饲料，关键是菌种。从目前报道的资料来看，发酵方式由单一菌种趋向于复合菌株的协同发酵，并且注重不同微生物之间的协同性、互补性，总体上发挥出正组合效应。从组合情况看，菌种应包括纤维分解菌、氮素转化菌、增加适口性的菌。霉菌、酵母菌和乳酸菌的组合发酵为多数，这是由于木霉、黑曲霉、根霉等霉菌同化淀粉、纤维素的能力强，可降解秸秆饲料中的结构性碳水化合物，将工业废渣中的淀粉和纤维素降解为酵母能利用的单糖、双糖等简单糖类物质，使酵母得以良好地生长繁殖，而利用乳酸菌产生乳酸等

则可改善发酵饲料的适口性。并且组合菌株发酵能充分利用不同菌株基因产物的功能,完成单个菌种难以完成的复杂代谢作用,可以代替某些基因重组工程菌来进行复杂的多种代谢反应,或促进生长代谢,提高生产效率。此外,在双菌或多菌混合发酵中,酶促作用生成的糖立即被发酵糖的微生物所利用,这样就维持了降解物的浓度,消除了酶合成作用受到的降解物的阻遏作用,也解除了反应终产物对酶的反馈抑制,缩短发酵过程。这些体现了微生物之间的互惠、偏利生等关系。协同发酵形式对各种原料的有效转化对蛋白饲料的品质提高起到了重要的作用。

通过微生物发酵,将生产、废弃物综合利用和环境保护三者有机地结合起来,不仅弥补了我国动物性蛋白饲料的不足,而且有效地降低了环境的污染。

## 第五节 固态发酵在资源环境中的研究与应用进展

人们对资源环境质量的要求越来越高的同时,资源环境受到的威胁及破坏也越来越严重。微生物在资源环境中扮演着十分重要的角色,在环境保护中做出了巨大的贡献。微生物在资源环境保护中的应用已从自然生态系统发展到活性污泥方法处理废水,并进一步扩大到工农业残渣转化、固体废弃物处理及生物修复等领域,因此固态发酵技术越来越引起人们的重视,主要表现在生物燃料、生物农药、生物转化、生物解毒及生物修复等方面的应用。

### 一、生物燃料(biofuel)

当前地球上“温室效应”增强的罪魁祸首是  $\text{CO}_2$ 。所以,如果能找到一种不增加大气中  $\text{CO}_2$  含量的燃料来代替化石燃料,就可以有效地控制“温室效应”。目前能满足这种需要的就是燃料乙醇,主要原料为各种可再生性糖类物质(如天然纤维素)。乙醇是可再生性能源。利用固态发酵技术生产乙醇有许多优点,如可消除糖的萃取过程,节省成本;由于发酵过程减少用水量,而减小发酵罐体积,无废水;降低能耗等。这是一个有潜力的生产乙醇路线,国外对其研究相当多,大多利用酵母菌发酵,但也有研究用代谢葡萄糖的细菌菌株(如运动发酵单胞菌)。

很多学者从不同的角度研究利用苹果渣固态发酵生产乙醇,取得较好收效,发现酵母菌发酵生产乙醇优于苹果渣自然发酵,而酿酒酵母是最理想的菌种。Henk 等(1996)研究用高粱固态发酵生产乙醇,发现纤维素酶的增加有利于乙醇产量的提高。Roukas(1994)利用稻壳做底物,发现底料有无灭菌不影响乙醇的产量,此种方法值得借鉴。也有一些学者利用淀粉做底物进行乙醇固态发酵,证明用 *Schwanniomyces castellii* 固态发酵可有效利用淀粉,提高生物积累量,促进淀粉水解,乙醇产量相应增加。淀粉底物可以是高粱、土豆、麦粉、玉米粉、可溶性淀粉等。但若用酿酒酵母做菌种,玉米粉、高粱固态发酵生产乙醇效果最好。

### 二、生物农药(biopesticide)

最近,大量的文献表明,人们越来越重视利用昆虫病原体真菌及寄生真菌来控制害虫的方法。Deshpande(1999)综述了利用固态发酵生产真菌杀虫剂的方法,与液态发酵相比,不仅生产成本大大降低,而且药物对害虫的毒力也提高了。筛选具有杀虫能力的真菌是开发可感染繁殖体(像分生孢子、粉孢子、衣原体孢子、卵孢子、受精卵孢子等)的第一步,对真菌

与害虫作用机理理解是生产有效生物农药的主要研究领域。

Soccol 等(1997)与 Desgranges 等(1993)都研究出一种利用微生物固态生产可感染繁殖体球孢白僵菌的方法,这种繁殖体可以控制香蕉、甘蔗、大豆、玉米及咖啡上的虫子。Silman 等(1993)利用固态蛭石与似珍珠粒状琼脂混合固态发酵生产洋扁豆炭疽刺盘孢菌(*Colletotrichum truncatum*)(一种威力极强的真菌病原体杀虫剂),其田间杀虫效率比球孢白僵菌高 25%。

当前国内外研究的另一个热点就是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 B. t),该菌适合在廉价的培养基上大规模生产,对哺乳动物和其他脊椎动物无害,无致癌和无致畸作用。B. t 在国际上被列入现代农业三大组成之一,被我国先后列入国家“863”计划,“七五”、“八五”、“九五”重点科技攻关项目,最近还被列入国家“火炬”计划。我国现在在这一领域实现了突破,中国科学院化工冶金研究所李佐虎研究员发明的“压力脉动固态发酵反应器”已成功地实现工业化生产 B. t,其毒力达到 10 000IU/mg,在国际上处于领先地位。现已在安徽建立了示范工厂,通过了国家鉴定,并已成功地推广到山西、河南、吉林和山东等地区,年产值达 1 亿多元。

### 三、生物转化(biotransformation)

固态发酵其中一个重要的应用领域就是利用微生物转化农作物及其废渣,以提高它们的营养价值,减小对环境的污染。生物转化利用的菌株一般为白腐菌。木薯是非洲、亚洲及南美洲地区人民最重要的食物之一,但其蛋白质、维生素、矿物质含量低,也缺乏含硫氨基酸。已有几种固态发酵方法可以改善其营养价值。Soccol 等(1994)对木薯及其残渣做了大量的研究,筛选了几种特别适于生长在木薯上的根霉菌株。Sterzsc 等(1999)也发现了一株十分适于粗木薯粉发酵的菌株福尔摩沙根霉(*Rhizopus formosa*)(可食用丝状真菌)。

蘑菇是可食用丝状真菌十分典型的代表,拥有可把许多不能食用的植物或其剩余物降解转化为有食用价值的食物的能力。大约有 2 000 多种可食用蘑菇,其中大约 80 种已实现实验室成功培育,大约 20 种已利用于固态发酵技术进行商业化生产。

木质纤维素作物的剩余物是具有潜力的动物饲料的源泉,主要由纤维素、半纤维素及部分木质素组成,其蛋白含量低、难消化、味道差等特点限制它们作为理想饲料的应用。提高它们的利用价值就必须改变其营养含量,可用物理、化学或生物方法等。但物理、化学方法能耗高,比较昂贵,所以人们更倾向于生物方法,在这一方面固态发酵特别有潜力。现在已成功地利用白腐菌把木质纤维素转化为蛋白含量较高的饲料。

还有一些植物残渣也可用来生产高蛋白物质或单细胞蛋白,如柑橘皮、黑麦、芒果与海枣工业废渣、甜菜根、麦草或苹果渣。上述发酵成品提高了蛋白质含量,更利于动物消化。

### 四、生物解毒(biological detoxification)

某些工农业残渣含有对人体有副作用或可造成营养不良的化合物,如咖啡因、氰化氢、聚苯化合物、鞣酸等,对这些残渣有效利用十分困难。由于它们可导致严重的环境问题,所以对它们的处理对加工业来说是十分头疼的事。最近,固态发酵已成为对木薯皮、油菜籽粉、咖啡皮、咖啡浆等残渣有效的解毒方法,已有一些成功的例子。Ofuya 等(1994)研究了固态发酵对木薯皮有毒成分的影响,结果表明,HCN 降低了 95%,可溶性鞣酸减少了 42%。微生物的培养与活性对于降低木薯皮有毒成分的含量起着十分重要的作用,不同的微生物

相差很大。Bau 等(1994)研究了利用少孢根霉(*Rhizopus oligosporus*)对脱脂油菜籽这种有毒物质进行的固态发酵。结果发现,发酵 24h 就可以降解脂族芥子油苷大约 58%,吡啶族芥子油苷降低 97%。

一般认为,大麻味道美、有营养、好种植,但其种子含有一种可造成神经中毒的氨基酸,当这种物质食用过量时,可导致无法医治的脑性麻痹瘫痪。Kuo 等(1995)尝试先用黑曲霉进行固态发酵 48h,再用污水生物少孢根霉发酵 48h,以消除种子中的这种有毒物质。结果发现,除了改善种子其他成分质量外,有害氨基酸也降低了 90%。

咖啡肉浆与咖啡壳中含有咖啡因、聚苯化合物和鞣酸等。咖啡因是自然界最有力、最令人上瘾的兴奋剂物质之一,若浆、壳中咖啡因含量大于 1.3% (以干重计),会引起轻微的刺激作用。鞣酸通常被认为是造成营养不良的因素,动物饲料一般含鞣酸小于 10%。人们经常用丝状真菌固态发酵技术对咖啡壳进行去毒。Boccas 等(1994)利用咖啡壳琼脂培养基筛选出 3 株根霉菌株,并与 2 株担子菌黄孢原毛平革菌(*Phanerochate chrysosporium*)在降解咖啡因与鞣酸方面进行比较,结果发现这 5 株菌都生长相当好,但根霉发酵周期短,在最优发酵条件(pH、湿度、接种量、温度及通风性等)下,根霉降解咖啡因 87%、鞣酸 65%,而黄孢原毛平革菌降解率分别为 70% 和 60%。一些像凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、萎地干酪青霉(*Penicillium roqueforti*)、壳青霉(*P. crustosum*)和侧耳(*Pleurotus* sp.)等细菌或丝状真菌都有降解咖啡壳中有毒物质的能力。Roussos 等(1994)分别研究了疣孢青霉菌(*P. verrucosum*)在有或无外界氮源情况下对咖啡浆的固态发酵。结果表明,尽管无外界氮源供应,微生物生长缓慢,但咖啡因降解十分完全,含氮化物的添加反而抑制咖啡因的降解。Porres 等(1993)研究了青贮饲料咖啡浆的生物降解。数据表明,在不同条件下,咖啡因可降低 13% ~ 60%,聚苯化合物降低 28% ~ 70%,鞣酸降低 51% ~ 81%。证明把青贮饲料进行固态发酵是处理咖啡浆中有毒物质的理想方法。

## 五、生物修复(bioremediation)

生物修复是利用微生物及其代谢过程(其产物消除或在体内富集有毒物质)来修复被人类长期生活和生产所污染和破坏的局部环境,使之重现生机的过程。由于目前环境污染日益严重,国外学者对生物修复研究相当投入。

固态发酵生物技术是有毒化合物生物降解与环境生物修复的有益工具。Masaphy 等(1996)研究发现,把白腐菌凤尾菇(*Pleurotus pulmonarius*)接种到棉花或麦草混合物上可以降解莠除净,提出可通过微生物降解来达到生物修复的目的。很久以前, Berry 等(1993)就指出利用固态发酵技术可处理杀虫剂残留物。他们比较几种除去莠除净的方法,发现固态发酵可大大降低杀虫剂的生物利用率。Kastanek 等(1995)研究受污染的土壤和地下水中的聚氯联苯及氯乙烯生物降解,并且评价自然界自然降解过程,设计了 15m<sup>3</sup> 固态发酵反应器,大大提高了微生物的脱卤作用。Wiesche 等(1996)把白腐菌污叉丝孔菌(*Dichomitus squalens*)及土壤菌侧耳(*Pleurotus* sp.)接种到染有 C-14 莠的麦草上,研究莠的生物降解固态发酵两步法。结果表明,可以把丝状真菌与土壤自然微生物结合起来对莠进行生物降解。



## 第六节 固态发酵设备的设计与应用进展

固态发酵设备的设计是固态发酵过程的一个重要方面,过去 10 多年在一定程度上取得了突破性的进展,然而,生物反应器仍然没有受到研究者的足够重视。

用于固态发酵的各种不同类型的生物反应器归纳于表 1-3。很显然,绝大多数设计都基于两个模型:盘形或鼓形,带有或没有混合装置。早在 1964 年,一种 5 加仑(22.73L)的转鼓式生物反应器曾用于真菌酶制剂生产。一些研究者设想将鼓用挡板分成 3~4 个小室以改善混合效果以有利于产物形成。最初的鼓形生物反应器的设计是用于蛋白加富饲料的生产,一些试验将其用于其他产物如酶和毒枝菌素的生产。为了便于操作和降低成本,在反应器中尝试使用各种尺寸的混合装置,如面包生产用的搅拌机经改造后用于农业废弃物生产饲料相当有效。

表 1-3 固态发酵设备的设计进展

发酵设备型式	过程/产品	微生物
木盘[1923]	酒曲发酵	米曲霉
转鼓[1962]	堆肥	混合培养
转鼓[1964]	酒曲发酵	米曲霉
转鼓[1969]	酶	米曲霉
Fernbach 瓶[1966,1968,1983]	黄曲霉毒素,孢子	米曲霉
铝罐[1943]	酶	米曲霉
平底皿[1975]	赭曲霉素	赭曲霉
平底鼓[1976]	连续饲养场	—
组合混合装置[1977]	玉米发酵	—
组合混合装置[1975]	秸秆发酵	木霉,假丝酵母
面包生产用搅拌机[1979]	加富蛋白	黑曲霉
玉米贮藏柜[1979]	黄曲霉毒素	黄曲菌
平底皿[1979]	酒曲	米曲霉
铝盘[1980]	木质纤维素发酵	—
Valmic 袋(多孔渗水膜)[1985]	毒枝菌素	黄曲菌
不同的固定床反应器[1989]	孢子生产	娄地青霉
玻璃柱[1980,1991,1992]	酶生产	黑曲霉
玻璃柱[1999,2000]	柠檬酸,赤霉酸	真菌菌株

近 20 多年里又出现一些新的生物反应器,如柱形和深槽形反应器,据报道可有效地进行过程控制,特别是散热方面。然而,不同生产需要体积合适的柱形反应器,还存在很多问题需要研究,尤其是柱形生物反应器的放大仍比较困难。