

实用生物技术丛书

固态发酵技术 与应用

吴振强 主编



化学工业出版社

实用生物技术丛书

固态发酵技术与应用

吴振强 主编



化学工业出版社

·北京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

固态发酵技术与应用/吴振强主编. —北京: 化学工业出版社, 2006. 2

(实用生物技术丛书)

ISBN 7-5025-8264-9

I. 固… II. 吴… III. 固态发酵 IV. TQ920. 6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 007740 号

实用生物技术丛书
固态发酵技术与应用

吴振强 主编

责任编辑: 梁虹

文字编辑: 彭爱铭

责任校对: 凌亚男

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市前程装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 17¼ 字数 419 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8264-9

定 价: 39.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

生物技术 (biotechnology) 又称为生物工程, 是生物科学与工程技术相结合而形成的新学科, 是 20 世纪后半叶迅速发展起来的新技术。

回顾 20 世纪, 生物工程迅速崛起, 已在理论与应用领域取得举世瞩目的成果, 为新物种的形成和新物质的生产开辟了崭新的途径。

展望 21 世纪, 伴随着人类基因组计划取得划时代的成果、基因组学和蛋白质组学的诞生以及生物信息学的迅速发展, 生物工程可望以更快的速度腾飞, 将在世界科技与经济的发展中起支柱与骨干的作用。

生物工程主要包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。

一、基因工程

基因工程又称为重组 DNA 技术, 是通过人工操作, 在分子水平上进行基因重组、改造和转移, 以获得具有新的遗传特性的细胞, 合成人们所需物质的技术过程。1973 年, 科亨 (Cohen) 和波伊尔 (Boyer) 发明了克隆技术, 成功地将外源基因转入大肠杆菌细胞并得以表达, 宣告了基因工程的诞生。其后各种基因工程药物层出不穷, 转基因动物和转基因植物不断涌现, 取得了激荡人心的丰硕成果。

21 世纪基因工程的发展前沿是基因组和功能基因组的研究和开发。1990 年启动的“人类基因组计划”已经于 2003 年 4 月完成, 已经全部阐明了人类染色体 DNA 的约 30 亿对碱基的排列顺序, 接着将继续进行功能基因组的研究, 以阐明其中的 3 万多个基因的序列、位置及其功能。到时人们对疾病的诊断和治疗将在基因水平上进行, 这对提高人体素质、保障人体健康有着划时代的意义。同时还将逐步开展对其他物种的基因组研究, 这将使人们对物种的改良和对所需物质的生产提高到一个前所未有的高度。

二、细胞工程

细胞工程是在细胞水平上改变细胞的遗传特性或通过大规模细胞培养以获得人们所需物质的技术过程。1975 年, 科勒 (Kohler) 和米尔斯坦 (Milstein) 首创杂交瘤技术, 开创了细胞工程的新纪元。细胞融合技术、植物组织培养技术、植物细胞培养技术、动物体细胞克隆技术、杂交瘤细胞培养技术、干细胞培养技术等都在世界范围内发出夺目的光彩。

21 世纪细胞工程发展的重点是动、植物细胞培养技术。动物细胞和植物细胞都可以如同微生物细胞那样, 在人工控制条件的生物反应器中培养, 以获得各种所需的产物。

动物细胞培养主要用于生产激素、疫苗、单克隆抗体、酶、多肽等功能性蛋白质以及皮肤、血管、心脏、大脑、肝、肾、胃、肠等组织器官。在医药工业和医学工程的发展中占有重要的地位。

植物细胞培养主要用于色素、香精、药物、酶等次级代谢物的生产。具有缩短周期、提高产率等显著特点, 不占用耕地, 并且可以不受地理环境和气候条件等的影响, 对于农业产品的工业化生产具有深远的意义。

三、酶工程

酶工程是酶的生产与应用的技术过程。即是通过人工操作, 获得人们所需的酶, 并通过各

种方法使酶发挥其催化功能的技术过程。1969年，固定化氨基酰化酶首次在工业上成功地用于氨基酸的拆分，有力地推动了酶工程的发展。其后，酶分子修饰技术，酶、细胞、原生质体固定化技术，有机介质中酶的催化技术等的发展，为酶的生产和应用开辟了崭新的途径。

21世纪酶工程的发展焦点是新酶的研究与开发应用。随着生物工程的发展，被研究和开发的新酶将越来越多，其中最令人瞩目的有核酸类酶（ribozyme）、抗体酶（abzyme）和端粒酶（telomerase）等。此外，酶的优化生产和高效应用也将进一步发展到前所未有的水平。

四、发酵工程

发酵工程又称为微生物工程，是在人工控制的条件下，通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。1944年，青霉素液体深层发酵的成功，标志着现代发酵工程时代的到来。随后各种抗生素、氨基酸、核苷酸、维生素等的发酵生产蓬勃发展，使发酵工程进入了全盛时期。

21世纪发酵工程的发展策略是利用DNA重组技术获得更加符合人们需要的优良的微生物细胞，并进行全面的代谢调节控制。由于传统的从自然界直接获得的微生物或者经过筛选、诱变得到的微生物已难以满足人们的需要，21世纪用于发酵工程的微生物大多数都是经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌。利用这些工程菌进行发酵，需要进行一系列的代谢调节控制，才能获得理想的发酵效果。故此，21世纪的发酵工程将根据代谢工程的理论对优良的工程菌进行全面的代谢调控，以获得人们需要的各种代谢产物。

由此可见，生物工程不仅对于物种的改良和进化具有极其重大的意义，而且在医药、食品、工业、农业、环保、能源等方面有重要的应用价值，将对人类的健康、长寿和世界科技、经济、社会的发展产生深远的影响。

为了加速我国生物工程的发展，使生物技术的研究成果尽快产业化，加速生物技术在各个领域的应用，特组织有关专家学者编写《实用生物技术丛书》。

本丛书的编写宗旨是以实用生物技术为特色，以生物技术在医药、食品、轻工、化工、环保、能源等领域的应用为主线，理论与实际紧密结合，推动生物技术和产业化的进程。为此，本丛书不是面面俱到地介绍各种生物技术的基本理论和基本知识，而是有重点地选择介绍一些实用性强、前景看好，与产业化关系密切的生物技术的原理、方法及其应用的最新研究进展与发展趋势。本丛书由下列各分册组成：

- 《基因克隆技术在制药中的应用》
- 《细胞融合技术与应用》
- 《植物细胞培养技术与应用》
- 《动物细胞培养技术与应用》
- 《酶的生产与应用》
- 《固态发酵技术与应用》
- 《非热杀菌技术与应用》

各分册均由有实践经验的在职专家撰写，在简明介绍基本理论和基本知识的基础上，重点阐述技术的原理和方法及其应用的最新研究进展和发展趋势。期望本丛书的出版对我国生物技术研究、开发和产业化能够起到积极的推动作用。

2005年9月于广州

前 言

固态发酵历史悠久，其起源可追溯到数千年以前。由于固态发酵水分活度低，发酵过程中菌体生长、营养物质的传输及代谢物的分泌等均匀性差，给发酵参数检测及控制带来困难，较难达到纯种培养与大规模产业化要求，从而使固态发酵被隔离在现代发酵工业的大门之外，作为传统与落后的代表而被忽视。但实际上许多现代生物制品采用固态发酵的产率比液体深层发酵高得多。因此，固态发酵将随着生物工程的深入开发而重新焕发活力。

固态发酵应用范围极为广泛，传统上人们利用固态发酵生产面包、麦芽、酒曲、酒精饮料、酱油、豆豉、蘑菇等食品或生产中间原料。近代研究发现利用固态发酵生产的一些食品中含有生理活性物质，表明了固态发酵在生产这些食品及食品添加剂上有优势。随着能源危机与环境问题的日益严重，固态发酵技术以其特有的优点引起人们极大的兴趣。人们在固态发酵领域的研究及其在资源环境、蛋白质饲料中的应用取得了较大进展，主要表现在生物饲料、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成功开发应用，为固态发酵的不断发展提供了强有力支持，为传统技术发扬光大提供了广阔的应用前景。

此书面向高等院校高年级学生、研究生、工程技术人员，着重介绍固态发酵技术概况、固态发酵菌种培养技术、固态发酵设备及主要生产应用工艺。既有基本理论知识，又有实际应用例子，对工艺和设备都有较好的阐述，可作为专业参考书和实际应用指导书。

全书共分九章，由吴振强主编，其中第一章、第四章、第五章、第八章由吴振强编写，第二章由杨汝德编写，第三章、第六章由朱明军编写，第七章由胡飞编写，第九章由秦华明编写。

本书由梁世中教授审阅并提出宝贵意见，编写过程中得到了裘晖、李珊、黄国勇、唐江伟、席仁荣的帮助，他们在录入、排版、插图等方面做出了许多贡献，在此向他们表示衷心感谢！

作者

2005年9月1日

目 录

第一章 绪论	1
第一节 固态发酵的发展历史.....	1
第二节 固态发酵的应用范围.....	3
一、危险化合物的生物修复与降解.....	3
二、工农业废渣的生物脱毒.....	3
三、蛋白质富集生产动物饲料.....	4
四、生物制浆.....	5
五、农作物的综合管理.....	6
六、食用真菌固态发酵.....	6
七、生物杀虫剂.....	7
八、代谢产品型的固态发酵.....	7
第三节 发展固态发酵的意义及措施.....	13
一、固态发酵的优点与缺点.....	14
二、固态发酵研究的关键问题.....	15
三、大规模固态发酵需要考虑的工程问题.....	17
参考文献.....	20
第二章 固态发酵的菌种培养	21
第一节 固态发酵微生物的种类.....	21
一、细菌.....	21
二、放线菌.....	27
三、酵母菌.....	30
四、霉菌.....	35
五、担子菌.....	44
第二节 菌种培养技术.....	45
一、培养基及其制备方法.....	45
二、消毒与灭菌方法.....	49
三、微生物菌种培养技术.....	52
第三节 菌种的选育与保藏.....	55
一、微生物菌种的分离.....	55
二、微生物菌种的筛选.....	58
三、微生物的育种方法.....	60
四、微生物菌种的保藏.....	65
参考文献.....	68
第三章 固态发酵原理及调控	69
第一节 固态发酵培养基及其优化.....	69

一、固态发酵培养基常用原料	69
二、固态发酵原料优化	72
三、培养基灭菌	74
第二节 发酵过程的无菌控制	74
第三节 温度对固态发酵的影响及其控制	75
一、影响固态发酵温度的因素	75
二、温度对固态发酵的影响	75
三、固态发酵过程温度控制	76
第四节 发酵过程的湿度控制	77
第五节 发酵过程的供氧控制	77
第六节 固态发酵动力学	79
参考文献	82
第四章 固态发酵生产设备	83
第一节 固态发酵反应器	83
一、反应器设计的主要影响因素	83
二、固态生物反应器的类型	84
第二节 配料与消毒设备	94
一、固体物料混合设备	94
二、灭菌设备	98
三、空气除菌技术简介	99
第三节 干燥设备	101
一、热风循环干燥烘箱	101
二、气流干燥器	101
三、流化床干燥器	105
四、真空干燥器	108
第四节 辅助设备	112
一、筛选设备	112
二、粉碎设备	115
三、固态物料输送	121
四、气力输送	125
参考文献	130
第五章 酿造工业的固态发酵	131
第一节 酱油及酱类的固态发酵	131
一、酱油的固态发酵法生产工艺	131
二、酱类的固态发酵	139
第二节 醋类的固态发酵	140
一、原料的分类、选择和处理	140
二、糖化剂、酒母及醋酸种子的制备	141
三、固态发酵法酿醋工艺	147
第三节 酒类的固态发酵	152

一、固态发酵法白酒生产的类型·····	152
二、固态发酵法白酒酿造用的原料和辅料·····	153
三、固态发酵法白酒的制曲工艺·····	153
四、固态发酵法白酒的制酒工艺·····	158
第四节 麦芽的固态发酵·····	167
一、大麦的清选·····	167
二、大麦的分级·····	168
三、大麦的浸渍·····	168
四、大麦的发芽·····	169
五、绿麦芽的干燥·····	171
六、麦芽的除根和贮藏·····	171
参考文献·····	171
第六章 酶制剂的固态发酵·····	173
第一节 纤维素酶的固态发酵·····	173
一、概述·····	173
二、纤维素酶固态发酵微生物·····	174
三、纤维素酶的检测·····	175
四、纤维素酶固态发酵培养基·····	175
五、纤维素酶固态发酵工艺控制·····	176
第二节 糖化酶的固态发酵·····	178
一、概述·····	178
二、糖化酶固态发酵微生物·····	179
三、糖化酶固态发酵培养基·····	179
四、糖化酶固态发酵工艺控制·····	180
五、糖化酶处理技术·····	181
第三节 植酸酶的固态发酵·····	182
一、概述·····	182
二、植酸酶固态发酵微生物·····	182
三、植酸酶固态发酵培养基·····	183
四、植酸酶固态发酵工艺控制·····	184
第四节 葡聚糖酶的固态发酵·····	185
一、概述·····	185
二、葡聚糖酶固态发酵微生物·····	187
三、葡聚糖酶固态发酵培养基·····	187
四、葡聚糖酶固态发酵工艺控制·····	188
第五节 木聚糖酶的固态发酵·····	189
一、概述·····	189
二、木聚糖酶固态发酵微生物·····	191
三、木聚糖酶固态发酵工艺控制·····	192
第六节 其它酶的固态发酵·····	193

一、复合酶的固态发酵·····	193
二、腺苷酸脱氨酶的固态发酵·····	195
参考文献·····	197
第七章 有机酸的固态发酵·····	198
第一节 概述·····	198
一、简介·····	198
二、有机酸固态发酵工艺条件的控制·····	198
第二节 柠檬酸的固态发酵·····	200
一、简介·····	200
二、柠檬酸的固态发酵工艺·····	201
第三节 苹果酸的固态发酵·····	208
一、简介·····	208
二、苹果酸的固态发酵工艺·····	209
三、影响苹果酸固态发酵的因素·····	211
四、苹果酸检测方法·····	213
第四节 曲酸的固态发酵·····	213
一、简介·····	213
二、曲酸的固态发酵工艺·····	214
参考文献·····	215
第八章 生物农药的固态发酵·····	216
第一节 概述·····	216
一、生物农药的定义·····	216
二、生物农药的分类·····	216
三、生物农药的研究现状·····	216
四、生物农药微生物杀虫剂的生产·····	218
五、生物农药的应用前景·····	220
第二节 苏云金杆菌的固态发酵·····	221
一、概述·····	221
二、作用机理·····	221
三、固态发酵培养方法·····	222
四、应用前景·····	224
第三节 白僵菌的固态发酵·····	224
一、传统固态发酵生产·····	225
二、压力脉动固态发酵反应器生产·····	227
第四节 绿僵菌的固态发酵·····	229
一、概述·····	229
二、分类形态·····	229
三、作用机理·····	230
四、固态发酵培养·····	230
五、应用·····	231

六、展望·····	232
第五节 其它生物农药的固态发酵·····	233
一、粉拟青霉的固态发酵培养·····	233
二、木霉菌的固态发酵培养·····	235
三、蜡蚧轮枝菌的固态发酵培养·····	236
四、柑橘粉虱座壳孢菌固态发酵培养·····	237
参考文献·····	238
第九章 饲料蛋白的固态发酵·····	240
第一节 概述·····	240
第二节 饼粕类发酵饲料蛋白·····	243
一、棉子饼(粕)·····	243
二、豆粕·····	244
三、菜子饼(粕)·····	245
四、油茶枯饼·····	246
五、桐粕·····	247
六、花生饼(粕)·····	247
第三节 单细胞蛋白固态发酵·····	247
一、概述·····	247
二、微生物蛋白的营养价值·····	248
三、生产单细胞蛋白的微生物·····	249
四、生产单细胞蛋白的原料·····	251
五、单细胞蛋白的生产·····	253
六、单细胞蛋白固态发酵生产工艺·····	254
第四节 工业废弃物固态发酵饲料蛋白·····	254
一、用柠檬酸渣生产菌体蛋白饲料·····	255
二、用甜菜渣原料生产菌体蛋白饲料·····	255
三、用豆渣生产菌体蛋白饲料·····	255
四、用油茶子饼渣生产菌体蛋白饲料·····	256
五、用酒糟、啤酒糟、丙酮丁醇渣生产菌体蛋白饲料·····	257
六、用玉米淀粉渣生产菌体蛋白饲料·····	258
七、用甘蔗糖厂废料发酵强化基质蛋白·····	259
八、用果渣生产菌体蛋白饲料和强化蛋白饲料·····	260
参考文献·····	262

第一章 绪 论

微生物发酵方法可分为两大类：液态发酵与固态发酵。固态发酵是接近于自然状态的一种发酵，它与液态深层发酵有许多不同。由于固态发酵水分活度低，发酵过程中菌体生长、营养物质的传输及代谢物的分泌等均匀性差，这给固态发酵参数检测及控制带来困难，难于达到纯种培养与大规模产业化要求。1945年青霉素的大规模工业化生产开创了液体深层发酵技术及现代发酵工业，发酵工程与生化工程也由此应运而生，主要研究对象是纯种培养与大规模产业化。从而使固态发酵被隔离在现代发酵工业的大门之外，作为传统与落后的代表而被忽视。但实际上许多现代生物制品采用固态发酵的产率比液体深层发酵高得多。另外，液体深层发酵产生的大量发酵废水、通气与机械搅拌的高动力能耗，已成为液体深层发酵进一步发展的障碍，迫使其向高浓度、高黏度方向发展，然而高浓度、高黏度的极限就是固态发酵。因此，固态发酵将随着生物工程的深入开发而重新焕发活力。

第一节 固态发酵的发展历史

固态发酵历史悠久，其起源可追溯到数千年以前。最早的固态发酵是应用于面包和酒曲的生产。考古学者在史前 2500 年的埃及 Theban 法老王坟墓内找到经发酵的面包实体，以及可以证明酒和啤酒酿造的壁画和实物；《史记》中也记载了在公元前 2698 年中国自黄帝开始已有烹煮面食的例子，都证明人类在史前就懂得种植稻米、小麦以及贮存、磨粉和利用微生物发酵，调制不同的食物。据推测：人类在史前 3000 年已懂得使用酵母发酵技术，虽然不知原理，但已具有熟悉经验。

最初的发酵方法可能是偶然发现的：和好的面团在温暖处放久了，受到空气中酵母菌的侵入，导致发酵、膨胀、变酸，再经烤制便得到了远比没有经过发酵、直接烤制而成的“烤饼”松软的一种新面食，这便是世界上最早的面包。古埃及的面包师起初是用酸面团发酵，后来改进为使用经过培养的酵母。在公元前 13 世纪，摩西带领希伯来人大迁徙，将面包制作技术带出了埃及。至今，在犹太人的“逾越节”时，仍制作一种叫作“马佐”（matzo）的膨发饼状面包，以纪念犹太人从埃及出走。此后，面包制作技术又从中东传入了欧洲。1859 年，法国科学家巴斯德（Louis Pasteur）终于解开了面包发酵的谜团，发现面包的发酵原来是由于微生物所引起的。其中以酵母的发酵最为重要，但酵母种类繁多，遂经分离纯化出适合之品种，并控制酵母用量、温度、湿度、材料用量等，以预计生产量，做出更理想的产品。

另一个古老的固态发酵是酒曲发酵。最早的酒是自然酒，是由含糖的水果、蜂蜜、兽乳等受到自然界中的微生物作用发酵而成。众所周知的猿酒就是自然酒。人类最早发明的人工饮料酒则是游牧时代用兽乳酿造的乳酒，这种乳酒，古称醴酪，是第一代人工饮料酒，它不添加任何糖化发酵剂，全靠自然形成。这种技术大约是距今 7000~10000 年以前的事。第二代人工饮料酒是加了糖化发酵剂而酿成的，又称人工发酵酒，所加的糖化发酵剂，就是大家熟悉的曲蘖。天然的曲蘖是谷物在贮藏过程中受潮发芽、长霉或吃剩的熟谷物发霉而形成，遇到水以后，自然会发酵生成酒，这一阶段的曲、蘖是混合不分家的。到了农耕时代的中、

晚期，曲蘖分为曲、蘖（谷芽）、黄衣曲（糖化用曲、酱曲、豉曲）。于是，人类把用蘖酿制的“酒”称为醴，把用曲制作的酒方称为酒。从发酵原理来看，蘖（谷芽）是单边发酵，在发酵过程中，仅起糖化作用。因此，醴中含乙醇量很低。而用曲制酒，则是边糖化边酒化的复式发酵，亦称双边发酵。所以，酒中的乙醇含量较高。

新石器时代仰韶文化遗址出土饮酒容器，晚期龙山文化出现酒器，酿酒历史可追溯5000年前龙山文化早期。殷墟中发现酿酒作坊的遗址，证明在3000多年前中国的酿酒业已经相当发达，当时已发明了曲蘖，而且可以熟练地用它酿酒。曲是一种利用固体培养物保存微生物的好方法。在干燥条件下，微生物处于休眠状态，活性容易保持不变。这种方法的原理，一直延用到今天。曲的发明，是我国古代劳动人民的伟大贡献，后传入西方，不仅改变了西方自古沿用麦芽糖化谷物，然后再加酵母菌发酵成酒的方法，还奠定了酒精工业的基础。更重要的是，曲给现代发酵工业和酶制剂工业带来了深远影响。

豆腐乳的生产也是较古老的固态发酵产品，起源于中国，可追溯到公元220~265年三国时期的魏国。它具有明显特征的风味，是非常普遍的附加菜，主要与饭团或馒头等配食。豆腐乳是将豆腐用真菌固态发酵后，经含盐和酒精的盐水老化而成。根据加工方法、颜色和风味等，腐乳可以分为几类。如以加工方法来分有霉菌发酵腐乳、自然发酵腐乳、细菌发酵腐乳和酶法催熟腐乳。以外调料混合物的选择可分为：红腐乳、白腐乳和灰腐乳。加工过程包括豆腐制备、发酵、盐渍、催熟等。真菌菌种有 *Actinomucor* spp.、*Mucor* spp. 和 *Rhizopus* spp. 等。

至今固态发酵技术仍是食品发酵工业的主要生产形式，如多种酶制剂、酿造下脚料生物处理、特种食品生产等。固态发酵因微生物在不溶于水的底物界面上生长繁殖，其营养物质的输送、热量传递及微生物生长等的不均匀性，使得对这方面的研究带来了困难。随着现代微生物发酵技术及数学模型研究的不断发展，使固态发酵这一古老的酿造技术发挥更大的优越性。近几年来国外竞相对固态发酵的关键设备通风反应器及反应动力学进行了研究，使固态发酵生产最优化。

虽然固体发酵从传统食品和饮料工业发展而来，它的应用已扩展到制药和生化工业。尽管未知固态发酵对酶及代谢物的大量生产将起到什么样的作用，但其进一步应用可以预见。由于具有独特的生产特性，固态发酵已发展为一门新的生物技术。例如，在19世纪60年代，许多火鸡死于摄入黄曲霉毒素，该毒素由黄霉菌产生，此菌生长在花生粉上，进而发现固态发酵中产生大量的毒素，而不是在液态发酵中。这引起了广泛的关注。在1896年，一种消化酶——高峰淀粉酶用麦麸固态发酵米曲霉生产得到，这导致了固态发酵应用于其它的食品和饮料生产工业。第二次世界大战后，强制通风固态发酵填料床被开发，使工业化规模的发酵罐得到发展，并应用于酶和柠檬酸的生产。如今，固态发酵工业上的应用延伸到堆肥处理、蘑菇培养和其它食品的生产。

20世纪90年代初期，有两篇综述描述了固态发酵的一般特性以及固态发酵罐设计方面的问题。这些综述追溯了固态发酵的历史，讨论了不同历史时期的开发状况。自此之后，世界各地对固态发酵研究有了很大的变化。追踪这些综述发表后的历史，可以显示出在固态发酵方面的重大发展。

随着能源危机与环境问题的日益严重，固态发酵技术以其特有的优点（如无“三废”排放）引起人们极大的兴趣。人们在固态发酵领域的研究及其在资源环境、蛋白质饲料中的应用取得了进展，主要表现在生物饲料、生物燃料、生物农药、生物转化、生物解毒及生物修

复等方面的成功开发应用，为固态发酵的不断发展提供了强有力支持，为传统技术发扬光大提供广阔的应用前景。

第二节 固态发酵的应用范围

固态发酵在东方国家的传统食品生产过程中发挥重要作用。很多世纪以前，人们利用固态发酵生产面包、麦芽、酒曲、酒精饮料、酱油、豆豉、蘑菇等食品或生产中间原料，一直至今。第二次世界大战期间美国生产青霉素也是采用固态发酵。最近，固态发酵被应用于农业生物杀虫剂的生产。西方食品工业对固态发酵也产生了兴趣，原因是发现亚洲国家利用固态发酵生产的一些食品中含有一些健康促进物质，表明固态发酵在生产某些食品及食品添加剂上有优势。特别是人们在利用工农业废渣等木质纤维原料的固态发酵应用研究方面取得了较大的进步。木质纤维可以作为生产高附加值的产品，如生物燃料、生化制品、生物杀虫剂、生物促进剂等；或者通过生物转化后它本身就是一种产品，如堆肥、生物浆等。在所有的应用中，最基本的要求是通过某种纤维素酶将木质纤维水解为可发酵的糖，或者将木质纤维素结构进行适当改变。经济有效的木质纤维素酶复合物，包含纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶和木质素酶等，可以用固态发酵制备。

在介绍固态发酵的具体应用前，需要对两个术语进行说明，就是固态发酵（solid state fermentation）和固体基质发酵（solid substrate fermentation）。固体基质发酵只用于定义那些在缺乏或近似缺乏自由水情况下，基质作为碳源和能源的过程；而固态发酵则用于定义所有在缺乏或近似缺乏自由水情况下的发酵过程，可以是上述的天然基质，也可以是作为固态支承物的惰性基质。在应用时应适当加以区分。以下就对固态发酵的具体应用领域作一总结。

一、危险化合物的生物修复与降解

固态发酵是危险化合物生物修复（bioremediation）和生物降解（biodegradation）的有用手段，如阿特拉津（Atrazine，一种除草剂）生物降解的修复系统，就是将 atrazine 加入棉花和麦秆的混合物中，接种白腐菌 *Pleurotus pulmonarius* 进行降解。也有报道用 *Pleurotus* sp. 对咖啡因残渣进行生物矫正，用固态发酵技术处理杀虫剂废料。通过比较几种对阿特拉津的处理方法，发现固态发酵处理可使杀虫剂的可浸出率和生物利用率显著减少。通过研究在野外条件下土壤和水源污染的多氯化联二苯 [polychlorinated biphenyls (PCBs)] 和挥发性氯乙烯 [chlorinated ethenes (CIUs)] 的生物降解评估自然界的减毒作用过程，发现固态发酵反应器（15m³）可增强脱卤效果。另一项研究是评估固态发酵法降解碳呋喃（carbofuran）的技术可行性，结果表明它可以作为残留杀虫剂的有效、经济的生物降解方法的基础。采用白腐菌和土壤微生物，*Dichomitus squalens* 和 *Pleurotus* sp. 两菌株，以固态发酵对嵌二萘（pyrene）进行两步生物降解，真菌在加入了¹⁴C 嵌二萘的麦草上培养，结果证明采用固态发酵法以真菌菌株单独或联合土壤微生物菌株降解嵌二萘在技术上都是可行的。

二、工农业废渣的生物脱毒

某些工农业废渣含有抗生或抗营养等有毒化合物，如氰化氢（hydrogen cyanide）、咖啡因、鞣酸、多酚等，对它们的有效利用造成障碍。它们的处置也成了生产过程中的一个难题，造成严重的环境问题。近来，人们采用固态发酵对这些废渣进行脱毒处理，如木薯皮、油菜子粉、咖啡壳、咖啡肉等，有些已取得成功。有研究显示，采用固态发酵处理木薯皮有毒化合物，发酵 96h 后，木薯皮的氰化氢水平剧减 95%，溶解性鞣酸减少约 42%。通过研

究固态基质木薯发酵的六种优势菌, 包括 *Geotrichum candidum*, *Mucor racemosus*, *Neurospora sitophila*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer* 和 *Bacillus* sp., 对氰水平的影响, 结果显示固态发酵可降低木薯的潜在毒性, 不同的微生物种类的脱毒效果有显著变化。对脱脂油菜子粉抗营养物质的去除, 采用 *Rhizopus oligosporus* 菌固态发酵 24h 后, 大约 58% 的脂肪葡萄糖异硫氰酸盐 (aliphatic glucosinolates) 和 97% 的吲哚葡萄糖异硫氰酸盐 (indo glucosinolates) 被降解。

β -N-oxalyl-L-2,3-diaminopropanoic acid (ODAP, β -草酰氨基丙氨酸), 一种神经毒性氨基酸, 存在于豌豆类植物 (*Lathyrus sativus*) 的种子中, 过量服用将导致不可恢复的痉挛性下肢瘫痪 (neurolathyrism)。虽然该作物味道鲜美、营养好, 而且易于种植, 但由于其毒性使其食用价值大大降低。采用固态发酵法对该种子进行脱毒处理, 前 48h 用 *Aspergillus niger* 菌, 后 48h 用 *R. oligosporus* 菌。结果使 ODAP 减少 90%, 并提高其营养价值。

在咖啡豆加工过程中产生的咖啡肉和咖啡壳含有抗生化化合物, 如咖啡因、鞣酸、多酚等, 一般认为是不适于作为生物转化过程的基质。结果, 大部分的肉和壳被弃置或仅小部分利用。如果这些毒素成分被去除, 或至少被降解到一个合理的低水平, 将为它们用作生物过程基质开辟一条新途径。很多专家正利用各种方法研究咖啡肉和壳的脱毒问题。利用霉菌固态发酵是常用的生物脱毒方法。试验结果显示, 可降解咖啡因 90%、鞣酸类物质 57%; 固态发酵后, 咖啡壳基质的蛋白质含量增加到 10.6%, 是发酵前 5.2% 的 2 倍以上。改善其在饲料中的应用。也可以应用于多种产品的生产中, 如酶、有机酸、风味和香味化合物、蘑菇等。

咖啡因是一种活性化合物, 是自然界最强的、易上瘾的兴奋剂之一。它是咖啡中能够引起温和兴奋作用的主要物质。它在咖啡肉和咖啡壳中的干含量约为 1.3%。鞣酸则被认为是抗营养因子, 在动物饲料中的添加量不能超过 10%。固态发酵常用于咖啡壳的生物脱毒, 所用的菌为真菌, 如 *Rhizopus* sp., *Phanerochaete chrysosporium* 等。它们在咖啡壳培养基上均能生长良好, 但 *Rhizopus* sp. 优于 *Phanerochaete chrysosporium*, 原因是它在较短的时间内有较高的咖啡因和鞣酸降解率。在优化条件下, 包括 pH 值、初始含水量、接种量、温度、通气率等, 前者对咖啡因及鞣酸的降解率分别为 87% 和 65%, 而后者为 70% 和 60%。

某些细菌和真菌, 如 *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Penicillium rouqui fortii*, *P. curtosum* 和 *Pleurotus* sp. 等具有降解咖啡因的能力。用 *P. verrucosum* 固态发酵降解咖啡肉中的咖啡因, 不需要外加氮源。结果显示, 尽管在没有任何氮源条件下生长受到限制, 但咖啡因几乎被完全降解。添加氮源反而会抑制咖啡因的降解。此外, 用几株丝状菌也取得很好的咖啡因降解效果。

通过青贮法降解咖啡肉中的咖啡因和多酚, 不同条件下的结果显示, 对咖啡因、总多酚、鞣酸等的降解率分别可达到 13%~63%、28%~70%、51%~81%。因此, 可以得出结论: 青贮是降低咖啡肉抗生化化合物含量的理想方法。

三、蛋白质富集生产动物饲料

木质纤维农作物废渣是反刍动物膳食能量的潜在资源。这些废渣含有大量的纤维素、半纤维素和一些木质素, 但缺乏蛋白质。这就限制了它们作为动物饲料的利用率。另外, 它们在消化性和适口性方面有时也较差。为了提高其利用率, 有必要改善其营养质量, 可采用物理、化学和微生物等方法实现。由于物理法和化学法的能耗大而且成本高, 因此重点是开发

微生物方法，其中固态发酵显示了很好的潜力。有报道用白腐菌将木质纤维素生物转化为富含蛋白质的反刍动物饲料，所用的菌包括 *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Stropharia*, *Polyporus*, *Lentinus*, *Dichomitus*, *Sporotrichum* 和 *Trametes* 等。也有通过用 *Penicillium camemberti* 和 *P. roquefortii* 菌处理柑橘类果皮废渣，用于蛋白质富集和单细胞蛋白的生产，用 *Fusarium* sp. 菌处理黑麦废渣，用 *A. niger* 菌处理豆荚废渣，用 *Pleurotus ostreatus* 菌处理芒果及海枣工业废渣，用 filamentous fungi 菌处理甜菜糖废渣，用 *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata* 和 *Ceriporiopsis subvermispora* 菌处理麦草废渣。可以用纯菌培养，也可以用混合菌培养，如用 *A. niger* 和 *Candida utilis* 菌处理苹果渣。发酵后的产品显示蛋白含量有良好的改善，对牛有较好的消化性。

苹果汁加工大约产生 15%~20% 的固态废渣——苹果渣，它富含有机物质。很多研究利用它生产乙醇、天然气、柠檬酸和果胶动物饲料。有研究将苹果渣用作生物资源材料，通过 *Rhizopus* 固态发酵进行蛋白质富集。经过 36h 发酵，蛋白质含量可达到 11g/100g 干苹果渣，没有孢子形成现象。

以甜菜粕为原料固体发酵生产蛋白饲料，通过一株能分解利用纤维质原料甜菜粕直接生产微生物蛋白的高活性新菌株溜曲霉 No. 827，采用深层、可控的固态发酵器，发酵周期 3~4d，产品收率 70%。产品含蛋白 25% 以上，氨基酸组成齐全，并含有丰富的维生素和矿物质，毒性试验表明它属于安全性产品。经猪、鸡和牛的饲喂，适口性好，可全部或部分代替豆饼，动物增重和饲料报酬等各项指标均属正常。

以秸秆为原料固态发酵生产单细胞蛋白，以黑曲霉和饲料酵母为菌种，在秸秆上共同发酵，其最佳条件为：酵母种类为产朊假丝酵母，接种间隔时间为 20h，接种量为 10%。培养后蛋白含量可达到 49%，且含有多种酶和氨基酸。不同预处理对发酵结果有一定影响，结果表明环磨效果最好。

虽然通过固态发酵富集了微生物蛋白、酶和生物因子等的木质纤维农业残余物可以被用作动物饲料。但是，通过固态发酵对木质纤维进行大规模微生物蛋白富集被证明是不经济的。一种更有前途的方法是在动物饲料中补充用固态发酵生产的饲料酶。例如，甜高粱的综合生物处理，被部分消化的提取物和富含酶的果浆在动物饲料定量中是一种有价值的饲料配料。固态发酵酶也可以应用于其它酶处理过程，如紫花苜蓿。这里 1%~5% 的固态发酵粗纤维素水解酶复合物是以紫花苜蓿和玉米青贮饲料 1:1 混合物通过固态发酵生产的，改进青贮效率以及贵得多的商业酶制剂。

四、生物制浆

生物制浆被定义为在制浆前用木质素降解菌对木屑进行处理。生物制浆是木屑的固态发酵。通常通过生物制浆改善机械制浆工艺，增加浆液处理量，改善纸张的强度，减少树脂含量，减少精制时的电能消耗，减少制浆对环境的冲击。在此白腐菌具有特别的优势，其中 *Phanerochaete chrysosporium* 和 *Ceriporiopsis subvermispora* 两种是最重要的。前者已成功用于木屑的生物制浆，无需高压灭菌或添加营养物质。该工艺显示了良好的技术和经济可行性。

一种新型的生物漂白工艺（预漂白工艺）已经被开发，基质专一的真菌和放线菌以固态发酵的形式在桉树和蔗渣纸浆中生长，发酵后的基质用于生物漂白。发酵后桉树和蔗渣纸浆主要含有木聚糖酶，伴随少量的纤维素酶。固态发酵技术也被成功应用于生物制浆过程中，发酵过程可以选择担子菌部分去除木屑中的木质素。采用固态发酵技术的生物制浆过程已经

扩大到工业化规模。

五、农作物的综合管理

农作物废渣回用作堆肥、生物肥料、生物促进剂、生物杀虫剂等是现代综合农作物处理的重要部分。其中固态发酵技术扮演重要角色。固态发酵技术特别应用于制备微生物土壤接种物、生物防治 (biocontrol) 剂和直接有机堆肥, 在此开发出特别的微生物群落, 适合于特定的农作物或特定的土壤。全世界范围内对贫瘠或负担过重的土壤恢复生产能力和腐殖质形成能力的需求, 使之成为固态发酵最有用和最普遍的应用之一。对于直接堆肥, 首先要对采用纯培养所需要的微生物进行增殖, 包括土壤细菌和真菌、固氮菌、腐殖质生产菌、木质纤维素降解菌等。在摇瓶中增殖至 $10^{11} \sim 10^{12}$ 个/mL, 然后用小型固态生物反应器培养。这些纯培养物将以一定的比例混合, 比例值取决于最终的用途。对于蒸汽处理后的有机材料的肥料堆, 包括酒加工残渣、食品加工废物、农林废弃物、城市污泥等, 其混合后种量约为 10^9 个/g。碳氮比调节为 30~50, 对 pH 值、溶氧值、温度等进行优化, 以实现最大的堆砌效率。对于在土壤中的应用, 直接堆肥产品更加优越。

作为种子涂层, 孢子则采用两步法工艺进行大规模生产, 然后添加适当的黏合剂将孢子涂布于种子上, 涂布后的种子为粒状, 易于在种植中应用。另一种可选择的应用是将微繁殖胚芽和孢子包裹于海藻酸盐小珠中, 尤其适合于球果植物。与肥料混合的孢子也可以撒播于收成后的弃置物中, 加速其降解, 并对下一代农作物提供保护。

土壤接种物、堆肥接种物以及被加入到含有本土微生物群落的基质中的类似微生物启动物培养评价的实际标准, 是被加入微生物的存活率及优势度。正在开发一种复杂的标记技术跟踪在混合种群中添加微生物的命运。通过减少原始微生物的量 (蒸汽或辐射), 以及加大希望培养的微生物的量 ($10^5 \sim 10^6$ 个/g), 所加入的微生物将较为受惠。最起码受控堆肥能确保总的微生物活性的大幅度提高。有机土壤接种物和直接堆肥制剂产品是采用固态发酵方法进行微生物富集。根据微生物的浓度, 直接堆肥可以用作田野或庭院水平堆肥的启动培养物, 或者直接将堆肥与土壤混合。这一处理工艺的副效益是可以将沉重的工业、农业和城市废物转化为有价值商品。直接堆制肥料含有增湿剂、固氮剂、生长促进剂和生物杀虫剂等。

固态发酵微生物的孢子可以用作种子的表层涂料, 可以与包裹组织培养胚芽合围一体, 或直接在田野中喷洒或施粉剂, 以便于收获后废弃物的分解。经犁地后提供土壤营养, 改善土壤结构, 促进生物防治及较好的植物生长。

六、食用真菌固态发酵

农作物及农作物废渣通过生物转化改善营养质素 (生产食用真菌) 一直是一个重要研究领域, 固态发酵具有潜在的开发前景, 在技术和经济方面具有可行性。木薯在非洲、亚洲、南美洲等地区作为人类的食物, 起着极其重要的作用。由于其蛋白质、维生素及矿物质含量低, 同时也缺乏含硫氨基酸, 因此并不是一种均衡食品。人们试图用固态发酵方法改善其营养质素。人们对木薯及木薯废渣的生物转化进行了广泛的研究。筛选出适合于在粗木薯粉及处理过的木薯原料上生长的菌株, 用于改善粗木薯粉的营养质素。其它还有很多关于食用蘑菇培养的研究报道。

食用真菌 (蘑菇) 具有生物降解和生物转化非食用植物废渣的能力, 使之变为可食用产品。大约有 2000 种蘑菇是可食用的, 其中大约有 80 种在实验室培植, 20 种左右实现商业化固态培养生产。

有报道利用咖啡生产废渣固态发酵生产蘑菇 (*P. ostreatus* 和 *L. edodes*)。另外, 木薯渣