

## 滚筒式生物反应器固态发酵的应用研究

韩北忠

(中国农业大学食品学院)

**摘要** 传统方法生产丹贝(大豆发酵食品)都以静态方式进行固态发酵,发酵过程中热质传递受到一定的限制,会产生温度梯度,且气体组分不均匀,从而导致发酵产品质量不稳定。滚筒式生物反应器的应用可以促进热质传递,使物料均匀发酵,且易于实现机械化生产和扩大生产规模。笔者参与设计制造了450L的滚筒式生物反应器,并利用其进行了固态发酵生产丹贝的应用研究。以2株根霉为发酵剂,进行了静态和动态固态发酵的对照试验,并对发酵过程中物料的化学组分和微生物组成进行了检测,结果表明,滚筒式固态发酵产品质量可靠;不同的菌株对搅动有不同的反应,其中微孢子根霉对搅动有适应能力,适用于滚筒固态发酵。

**关键词** 固态发酵; 滚筒式生物反应器; 根霉

**中图分类号** TS 264; TS 214

## Agitated Solid-Substrate Fermentation of Soybeans in a Rotary-Drum Bioreactor

Han Beizhong

(College of Food Science and Engineering, CAU)

**Abstract** Agitated solid-substrate fermentation of soybeans to tempe was studied in a Rotary-Drum Bioreactor (RDB). Traditionally, tempe is fermented in static layer trays or wrapped packages. Due to heat and mass transfer limitations, gradients of temperature and gas atmosphere will be result in. Agitated fermentation can help to level heat and mass gradients, yielding better homogeneity. For agitated solid-substrate fermentation a 450-liter size rotary-drum bioreactor was designed and constructed. The comparative effect of static versus agitated solid-substrate fermentation using two *Rhizopus* spp is studied. According to the chemical analyses of substrate modification, it was shown that two *Rhizopus* spp have different behavior on agitation. *Rhizopus microsporus* could be used as a starter in agitated solid-substrate fermentation.

**Key words** solid-substrate fermentation; Rotary-Drum Bioreactor; *Rhizopus* spp

固态发酵是指微生物在没有或基本没有游离水的固态基质上的生长过程<sup>[1]</sup>。它涉及到微生物的生长和水不溶性物料的利用。与液态发酵相比,固态发酵有很多优点<sup>[2]</sup>,如:发酵过程粗放,无须严格无菌条件;设备投资少,能耗低;产品得率较高;后处理简单,基本无废水排放。因此,固态发酵受到国内外人士的广泛关注<sup>[3]</sup>,成为发酵行业中广泛应用的工艺类型之一。

丹贝是印度尼西亚的传统大豆发酵食品,通常采用小规模固态发酵进行生产。由于固态发

收稿日期: 2000-08-28

韩北忠,北京清华东路17号中国农业大学(东校区)113信箱,100083

酵过程中发酵物传质、传热困难, 温度、湿度和氧气需求量等参数不易控制, 若扩大发酵规模, 将会因热量传递困难, 而导致发酵物料中心温度过高, 影响产品质量, 且生产过程难以实现机械化。据报道<sup>[4]</sup>, 传统丹贝发酵过程中, 若环境温度设置为 35℃, 发酵 24 h 后, 物料外部向内 2 cm 处的温度为 36℃, O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 的体积分数分别为 6% 和 16%; 而物料外部向内 5.8 cm 处温度为 46℃, O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 的体积分数分别为 2% 和 22%。

滚筒式生物反应器(滚筒发酵罐)可以促进固态发酵物料的热质传递, 而使发酵状态保持均一。目前, 已有采用滚筒式生物反应器进行乙醇<sup>[5]</sup>、酶制剂、大曲和发酵大豆食品<sup>[6]</sup>生产的研究, 但是规模较小(仅为 15~20 L)。为了进一步研究滚筒式生物反应器在固态发酵中的应用, 特设计制造了 450 L 的可通气、控温的滚筒式生物反应器, 研究动态和静态条件下的固态发酵过程。

## 1 试验装置与材料

1) 试验装置。滚筒式生物反应器由荷兰瓦赫宁根农业大学食品科学系与其机械加工厂共同设计制造<sup>[7]</sup>。该系统主要包括滚筒、滚轴、通气管、温控装置和系统控制箱。滚筒由不锈钢制成, 分为 3 节, 总长 1.1 m, 直径 0.7 m, 容积 450 L (装料体积系数 30%~40%)。滚轴与调速电机连接, 并带动滚筒转动, 转速可控制在 1.5~4.0 r·min<sup>-1</sup>。过滤空气经通气管输入滚筒, 流速为 2.0 L·m<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。温度由传感器控制, 发酵过程中温度变化为 1℃。

2) 材料。发酵菌种由荷兰瓦赫宁根农业大学食品微生物室提供。菌种 I 为微孢子根霉 (*Rhizopus microsporus*), II 为少孢子根霉 (*Rhizopus oligosporus*)。

## 2 试验方法

### 2.1 发酵过程

将浸泡过夜的脱壳大豆用自来水轻轻漂洗后蒸煮 20 min, 然后在常温下冷却并晾至含水率为 56%~60%。滚筒先用体积分数为 70% 的酒精清洁, 装入物料后, 接入纯培养的根霉孢子菌悬液(约 0.01 mL·g<sup>-1</sup>)。接种后, 滚筒以 1.5 r·min<sup>-1</sup> 的转速转动 30 min, 使物料与悬菌液混合均匀。称取数份 450 g 混合均匀的物料置于塑料盒(205 mm × 90 mm × 45 mm)中, 做静态发酵对照试验。

由于热量的积累, 静态发酵塑料盒中心温度高于培养箱的温度 12℃, 所以培养箱温度分别设定为 25 和 30℃。利用剩余物料进行滚筒发酵试验, 设定发酵程序: 每隔 30 min 滚筒转动 30 s, 通气量为 2.0 L·m<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, 发酵物料的温度分别控制在 30 和 37℃。取发酵后物料做为样品进行各项指标的测定。

### 2.2 化学组分测定

*w*(NH<sub>3</sub>)的测定。取 10 g 样品, 置于装有 100 mL 水的凯氏蒸馏瓶中, 用凯氏蒸馏装置 (Gerhardt, 12, Bonn, 德国) 蒸出约 100 mL 液体, 并用浓度为 0.100 mol·L<sup>-1</sup> 的 HCl 滴定终点。 $w(\text{NH}_3) = 0.1V \cdot 17/m$  (*V* 为 HCl 体积, L; *m* 为样品干质量)。

粗脂肪和蛋白质含量的测定。称取经干燥、粉碎的样品 25 g, 以索氏抽提法测定粗脂肪含量; 称取同样质量的同一样品, 以凯氏定氮法测定蛋白质含量。

水溶性物质含量的测定。将测定粗脂肪抽提后的脱脂样品, 置于装有 50 mL 水的三角瓶

中,在 37 °C 下搅拌 30 min。将悬浮液转入离心管中离心分离 15 min (4 °C, 1 600 g), 分离上清液。沉淀物再用水洗涤并离心分离 2 次, 集中上清液, 用重量法测其水溶性物质含量。

### 2.3 微生物学检验

总细菌 (Total aerobic bacteria): 培养基为 Plate count agar (PCA, CM 325, Oxoid), 温度 37 °C, 培养时间为 72 h。

肠道菌 (Enterobacteriaceae): 培养基为 Violet red bile glucose (VRBG, CM 485, Oxoid), 温度 30 °C, 培养时间为 24~36 h。

腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*): 培养基为 Cereus selective agar base acc To Mossel (MYP, 1.052 67, Merck), 每升培养基加入 10 g 蛋黄和 1 g 那他霉素 (natamycin), 温度为 30 °C, 培养时间为 24~36 h。

### 3 结果与讨论

图 1 示出发酵过程中不同温度条件下样品的 pH 值、 $w(\text{NH}_3)$  和粗脂肪含量随时间的变化情况。可以看出, 发酵过程中有  $\text{NH}_3$  产生, 微孢子根霉生成的  $w(\text{NH}_3)$  高于少孢子根霉; 滚筒发酵的  $w(\text{NH}_3)$  较静态发酵低, 可能是由于搅拌将产生的  $\text{NH}_3$  散出发酵物料所致。  $\text{NH}_3$  的生成可间接说明微生物对蛋白质的水解作用。

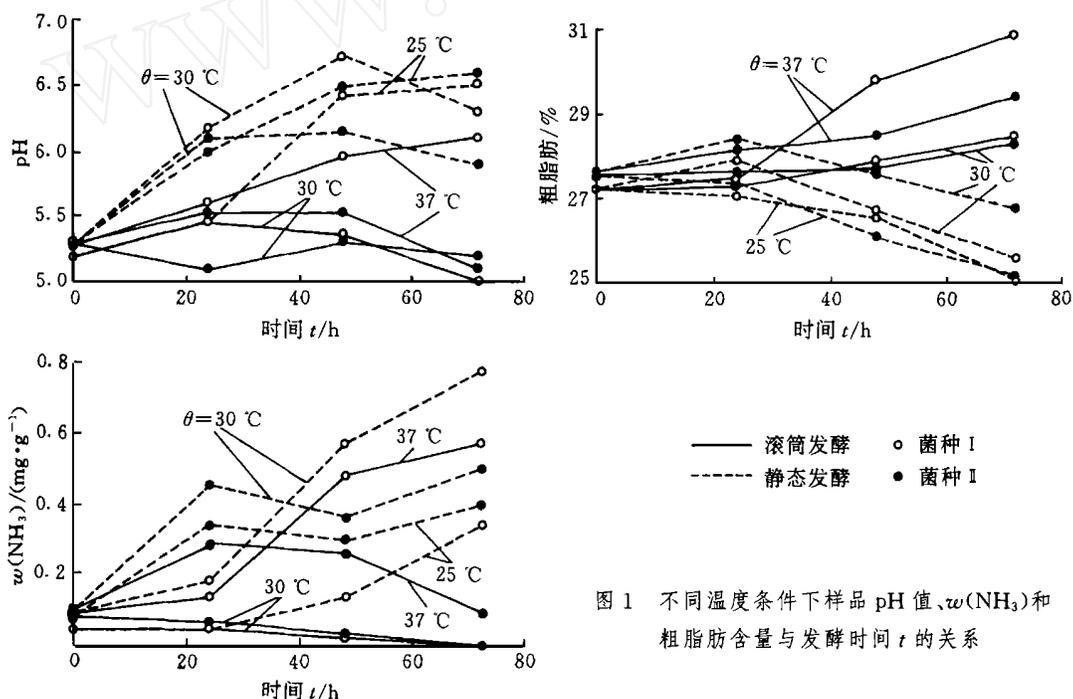


图 1 不同温度条件下样品 pH 值、 $w(\text{NH}_3)$  和粗脂肪含量与发酵时间  $t$  的关系

由微孢子根霉发酵的样品 pH 值略高于少孢子根霉发酵的; 同时, 静态发酵样品的 pH 值高于动态发酵的。

静态发酵过程中样品的粗脂肪含量减少 (结果与有关报道<sup>[8]</sup>相符), 而滚筒发酵样品中的粗脂肪含量却有所增加。原因是: 1) 动态发酵影响了菌株的代谢活动, 导致脂肪的合成; 2) 滚筒

发酵促进了蛋白质等物质的分解和利用,使脂肪含量相对增加。

表 1 示出不同发酵时间条件下样品水溶性物质的质量分数和水溶性含氮物质质量分数的变化情况。可以看出,滚筒发酵 24 h 后,样品水溶性物质的质量分数有所减少,随后逐渐增加;而静态发酵中,水溶性物质的质量分数基本为始终增加,并高于前者。

发酵过程中,样品水溶性含氮物质的质量分数均逐渐增加。其中,微孢子根霉滚筒发酵样品中的质量分数略高于静态发酵,而少孢子根霉发酵恰恰相反;且滚筒发酵样品中水溶性含氮物质的质量分数大大低于静态发酵。

表 1 样品中水溶性物质和水溶性含氮物质质量分数的变化

菌种	时间/h	静态发酵		滚筒发酵			
		温度/°C	水溶性物质的质量分数/%	水溶性含氮物质的质量分数/%	温度/°C	水溶性物质的质量分数/%	水溶性含氮物质的质量分数/%
I	0		19.2	2.3		19.2	2.3
	24	25	18.1	4.5	30	15.3	4.6
	48		25.8	7.7		18.1	7.5
	72		32.0	7.8		23.4	8.3
	0			18.7		1.8	
	24	30	25.1	7.6	37	16.9	5.4
	48		28.6	9.2		22.4	10.3
	72		33.2	9.8		26.4	11.1
0			18.9	3.0			18.9
II	24	25	26.1	6.5	30	10.7	3.1
	48		32.4	9.1		13.5	3.5
	72		34.0	9.6		15.3	3.9
	0			17.9		2.3	
	24	30	22.1	6.3	37	15.3	4.4
	48		26.6	9.0		18.1	5.6
	72		29.7	10.7		20.6	6.9

由于滚筒式生物反应器为敞口条件下发酵,故对样品做了微生物学检验。通过对照试验发现,滚筒发酵和静态发酵样品中所检微生物组成基本一致,发酵 24 h 后,总细菌数达到  $10^8 \sim 10^9$  cfu·g<sup>-1</sup>; 48 h 后,肠道菌数达到  $10^7 \sim 10^8$  cfu·g<sup>-1</sup>; 腊状芽孢杆菌未检出。

## 4 结 论

1) 搅动可影响菌种的代谢活动,不同菌种对搅动有不同的反应。试验结果表明,少孢子根霉对搅动较敏感,不适用于滚筒固态发酵;微孢子根霉适用于滚筒固态发酵进行丹贝生产。

2) 滚筒生物反应器可以用于固态发酵生产大豆发酵食品,并可逐步实现固态发酵机械化。该方法生产的产品与传统发酵生产的丹贝,除外观形态不同外,其他理化指标和微生物学指标基本一致。

## 参 考 文 献

- 1 Mitchell D A, Lonsane B K. Definition, characteristics and potential. In: Doelle H W. Solid-Substrate Cultivation. Barking: Elsevier, 1992. 1~ 16
- 2 Nout M J R, Rinzema A, Smits J P. Biomass and productivity estimates in solid substrate fermentations. In: Wicklow, Soderstrom. The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 323~ 345
- 3 Smits J P, Rinzema A, Tramper J, et al. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22: 50~ 57
- 4 Rathbun B L, Shuler M L. Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentation: design of fermentation chambers. Biotechnology, 1983, 25: 929~ 938
- 5 Kargi F, Cume J A. Solid-substrate fermentation of sweet sorghum to ethanol in a rotary-drum fermentor. Biotechnology, 1985, 27: 1122~ 1125
- 6 de Reu J C, Zwietering M H, Rombouts F M, et al. Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. Applied Microbial Biotechnology, 1993, 40: 261~ 265
- 7 Han B-Z, Kiers J, Nout M J R. Solid-substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus* spp: Comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(2): 205~ 209
- 8 de Reu J C, Ramadas D, Rombouts F M, et al. Changes in soya bean lipids during tempe fermentation. Food Chemistry, 1994, 50: 171~ 175