



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104845876 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510186140. 7

(22) 申请日 2015. 04. 17

(71) 申请人 南京工业大学

地址 210009 江苏省南京市新模范马路 5 号

(72) 发明人 冯小海 王程 梁金丰 汤宝

徐虹 许宗奇

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12M 1/34(2006. 01)

C12M 1/16(2006. 01)

C12M 1/12(2006. 01)

C12M 1/04(2006. 01)

C12M 1/02(2006. 01)

C12M 1/00(2006. 01)

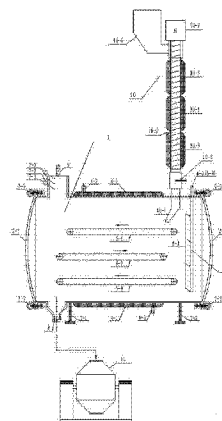
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

一种一体化固态发酵反应器及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种一体化固态发酵反应器，它包括依次相连的加料系统、发酵罐和回转真空双锥干燥机；其中，加料系统包括依次相连的电动机、加料斗、输送螺杆、出料管，发酵罐罐体外壁焊接有不锈钢夹套，并设有出气口、探头、蒸汽进出口、出料口、活动顶盖和二流体喷嘴装置。本发明还公开了上述反应器在好氧、厌氧和兼性厌氧微生物的固态发酵中的应用。与现有技术相比，本发明具有自动化强度高，发酵过程稳定，操作简便，能进行单批次和多批次发酵生产的优点，有利于固态发酵的工业化应用。



1. 一种一体化固态发酵反应器,其特征在于,包括依次相连的加料系统(10)、发酵罐(1)和回转真空双锥干燥机(11);

所述的发酵罐(1)为卧式发酵罐,发酵罐外周设有夹套(4-1),发酵罐(1)水平方向两侧设有第一活动顶盖(2-1)和第二活动顶盖(2-2),发酵罐(1)底端设有出料口(8),发酵罐(1)内部自上而下设有2~10层传输带,相邻两层传输带传输方向相反,且保证物料沿上一层传输带传输至尽头时可以自由下落至下一层传输带沿传输方向的起始处,最下一层传输带沿传输方向的尽头正对出料口(8)的正上方;

发酵罐(1)顶部设有出气孔(9),出气孔(9)附近设有温度探头(7-1)、湿度探头(7-2)和压力探头(7-3);

发酵罐(1)内靠近活动顶盖(2-2)的位置垂直设置二流体喷嘴系统(6),所述的二流体喷嘴系统(6)包括1~10个喷嘴和二流体喷嘴管路,喷嘴通过二流体喷嘴管路与发酵罐(1)外部气液管路串联,所述发酵罐(1)外部气液管路为相互并联的无菌水管路、种子液管路、蒸汽管路和气体管路;

所述的加料系统(10)包括依次相连的电动机(10-7)、加料斗(10-6)、输送螺杆(10-2)、出料管(10-1);

其中,

输送螺杆(10-2)外部设有加热夹套(10-5)、保温夹套(10-4)和冷却夹套(10-3);

出料管(10-1)与发酵罐(1)相连,且出料管(10-1)与发酵罐(1)相连且正对最上层传输带沿传输方向的起始处。

2. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,所述的发酵罐(1)为不锈钢材质,发酵罐(1)底端设有出料口(8),发酵罐(1)通过底部的第一支架(3-1)和第二支架(3-2)固定在底座(3)上。

3. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,所述的夹套(4-1)上设有热交换介质进口(4-2)和热交换介质出口(4-3),热交换介质进口(4-2)设于夹套(4-1)最顶端,热交换介质出口(4-3)设于夹套(4-1)最底端,且热交换介质进口(4-2)和热交换介质出口(4-3)在水平方向上的位置远离。

4. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,第一活动顶盖(2-1)与发酵罐(1)侧壁连接处设有固定螺栓(2-3),第二活动顶盖(2-2)与发酵罐(1)侧壁连接处设有固定螺栓(2-3)。

5. 根据权利要求1所述的固态发酵反应器,其特征在于,其特征在于,发酵罐(1)内部自上而下设有三层传输带,分别为第一传输带(5-1)、第二传输带(5-2)和第三传输带(5-3),相邻两层传输带传输方向相反,且保证物料沿第一传输带(5-1)传输至尽头时可以自由下落至第二传输带(5-2)沿传输方向的起始处,物料再沿第二传输带(5-2)传输至尽头时可以自由下落至第三传输带(5-3)沿传输方向的起始处,第三传输带(5-3)沿传输方向的传输尽头正对出料口(8)的正上方。

6. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,所述的二流体喷嘴系统(6)包括4个喷嘴(6-1)、第一二流体喷嘴管路(6-2)和第二二流体喷嘴管路(6-3),4个喷嘴(6-1)采用并联的方式同时与第一二流体喷嘴管路(6-2)和第二二流体喷嘴管路(6-3)连通;无菌水管路和蒸汽管路相互并联,再与第一二流体喷嘴管路(6-2)串联;种子

液管路和气体管路相互并联,再与第二流体喷嘴管路(6-3)串联;无菌水管路上设有第一液体过滤器(6-5)和第二液体过滤器(6-6),蒸汽管路上设有蒸汽发生器(6-4),种子液管路外接接种瓶(6-9),气体管路上设有第一气体过滤器(6-7)和第二气体过滤器(6-8);无菌水管路和种子液管路上分别设有气体流量计,蒸汽管路和气体管路上分别设有气体流量计。

7. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,出料管(10-1)上设有蝶阀(10-8),蝶阀(10-8)位于发酵罐(1)外。

8. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,冷却夹套(10-3)由循环水进行冷却,加热夹套(10-5)由电加热系统进行加热,保温区(10-4)由酚醛保温材料进行保温;其中,进入输送螺杆(11-4)的物料总是先经过加热夹套(10-5),再经过保温夹套(10-4),最后经过冷却夹套(10-3)。

9. 根据权利要求1所述的一体化固态发酵反应器,其特征在于,回转真空双锥干燥机(11)顶部进料口通过活套法兰与出料口(8)连通。

10. 权利要求1所述的一体化固态发酵反应器在培养好氧微生物、厌氧微生物以及兼性厌氧微生物进行固态发酵中的应用。

## 一种一体化固态发酵反应器及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于发酵工程和过程工程技术领域,具体涉及一种一体化固态发酵反应器及其应用。

### 背景技术

[0002] 生物技术是本世纪最具影响力的高新技术新兴产业带,是最有生命力的经济增长链,生物工程将成为 21 世纪我国重点发展的支柱产业,生物技术的发展对人类生活的各个领域将产生越来越大的影响。

[0003] 固态发酵是微生物利用固体基质作为能源和载体,进行的一种生物反应过程。由于所用培养基气固表面积大,微生物易于生长,而且因为微生物是在最接近自然状态的情况下生长,因此可产生一些在液体发酵时不会产生的酶或其他代谢产物,特别是许多丝状真菌,只有在固态发酵是才能达到最佳的生长和代谢水平。另外,固态发酵后处理简便、污染少、基本无废水排放,由于这些特点,固态发酵已被广泛地用于生产生物饲料、生物肥料、生物农药、酶制剂、有机酸、功能食品等众多产品。

[0004] 但是,现有的固态发酵反应器在原位灭菌、自动化控制、传质散热、连续操作等方面缺乏较为全面的研究,致使其功能单一、应用范围狭小,从而也制约了现代固态发酵技术的快速发展。因此,开发一种多功能、高效率的固态发酵生产装置,是所属技术领域面临的难题。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服现有固态发酵反应器中的缺陷,提供一种多功能,高效率的一体化固态发酵反应器。

[0006] 本发明还要解决的问题是提供上述一体化固态发酵反应器在培养好氧微生物、厌氧微生物以及兼性厌氧微生物进行固态发酵中的应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 一种一体化固态发酵反应器,它包括依次相连的加料系统、发酵罐和回转真空双锥干燥机;

[0009] 所述的发酵罐为卧式发酵罐,发酵罐外周设有夹套,发酵罐水平方向两侧设有第一活动顶盖和第二活动顶盖,发酵罐底端设有出料口,发酵罐内部自上而下设有 2~10 层传输带,相邻两层传输带传输方向相反,且保证物料沿上一层传输带传输至尽头时可以自由下落到下一层传输带沿传输方向的起始处,最下一层传输带沿传输方向的尽头正对出料口的正上方;

[0010] 发酵罐顶部设有出气孔,出气孔附近设有温度探头、湿度探头和压力探头;

[0011] 发酵罐内靠近活动顶盖的位置垂直设置二流体喷嘴系统,所述的二流体喷嘴系统包括 1~10 个喷嘴和二流体喷嘴管路,喷嘴通过二流体喷嘴管路与发酵罐外部气液管路串联,所述发酵罐外部气液管路为相互并联的无菌水管路、种子液管路、蒸汽管路和气体管

路；

[0012] 所述的加料系统包括依次相连的电动机、加料斗、输送螺杆、出料管；

[0013] 其中，

[0014] 输送螺杆外部设有加热夹套、保温夹套和冷却夹套；

[0015] 出料管与发酵罐相连，且出料管与发酵罐相连且正对最上层传输带沿传输方向的起始处。

[0016] 其中，所述的发酵罐为不锈钢材质，发酵罐底端设有出料口，发酵罐通过底部的第一支架和第二支架固定在底座上。

[0017] 其中，所述的夹套上设有热交换介质进口和热交换介质出口，热交换介质进口设于夹套最顶端，热交换介质出口设于夹套最底端，且热交换介质进口和热交换介质出口在水平方向上的位置远离。

[0018] 其中，第一活动顶盖与发酵罐侧壁连接处设有固定螺栓，第二活动顶盖与酵罐侧壁连接处设有固定螺栓。

[0019] 其中，发酵罐内部自上而下设有三层传输带，分别为第一传输带、第二传输带和第三传输带，相邻两层传输带传输方向相反，且保证物料沿第一传输带传输至尽头时可以自由下落至第二传输带沿传输方向的起始处，物料再沿第二传输带传输至尽头时可以自由下落至第三传输带沿传输方向的起始处，第三传输带沿传输方向的传输尽头正对出料口的正上方。

[0020] 其中，所述的二流体喷嘴系统包括 4 个喷嘴、第一二流体喷嘴管路和第二二流体喷嘴管路，4 个喷嘴采用并联的方式同时与第一二流体喷嘴管路和第二二流体喷嘴管路连通；无菌水管路和蒸汽管路相互并联，再与第一二流体喷嘴管路串联；种子液管路和气体管路相互并联，再与第二二流体喷嘴管路串联；无菌水管路上设有第一液体过滤器和第二液体过滤器，蒸汽管路上设有蒸汽发生器，种子液管路外接接种瓶，气体管路上设有第一气体过滤器和第二气体过滤器；无菌水管路和种子液管路上分别设有气体流量计，蒸汽管路和气体管路上分别设有气体流量计。

[0021] 其中，出料管底端正对最上层传输带沿传输方向的起始处，出料管上设有蝶阀，蝶阀位于发酵罐外。

[0022] 其中，冷却夹套由循环水进行冷却，加热夹套由电加热系统进行加热，保温夹套由酚醛保温材料进行保温；其中，进入输送螺杆的物料总是先经过加热夹套，再经过保温夹套，最后经过冷却夹套。

[0023] 其中，回转真空双锥干燥机顶部进料口通过活套法兰与出料口连通。

[0024] 上述的一体化固态发酵反应器在培养好氧微生物、厌氧微生物以及兼性厌氧微生物进行固态发酵中的应用。

[0025] 其中，上述一体化固态发酵反应器的使用方法包括装料灭菌—传输—发酵—卸料—干燥过程，如此往复进行，可实现灭菌、发酵、干燥的重复进行，大大缩短了了发酵时间，具体步骤为：

[0026] 装料灭菌：由培养基制备罐中的加料斗加入物料，并由绞龙搅拌均匀，通入蒸汽、控制条件对物料进行灭菌；

[0027] 传输：开启培养基制备罐内部的绞龙，并打开蝶阀开关，同时启动发酵罐传输带动

力,调节速度,使物料均匀地分布在3层传输带上;

[0028] 发酵:调节罐体内部温度、湿度、通气量适宜后,由负压接入种子液,开启接种管道阀门,将种子液喷洒于物料表面,完成接种。发酵过程中,轻轻地开启传输带动力同时打开出料口,完成取样;

[0029] 卸料:开启传输带,打开出料口,输送出物料;

[0030] 干燥:对需要干燥的发酵产品,连接好真空干燥机,开启加热装置并设置真空度,干燥物料至所要求。

[0031] 有益效果

[0032] 本发明中的一体化固态发酵器,具有自动化强度高,发酵过程稳定,操作简便,能进行单批次和多批次发酵生产的优点,可应用于好氧、厌氧及兼性厌氧微生物的固态发酵,不论是哪种应用,该生产装置都具有以下优点或效果:

[0033] 1、自动化控制:本发明中的生产装置应用了螺杆、传输带输送系统,使物料加入后,自动控制各个过程,满足了现代发酵工艺的要求,大大降低了人工劳动强度,提高了生产效率。

[0034] 2、原位灭菌、连续发酵:本发明中的生产装置物料灭菌、发酵是在同一个系统不同罐体中进行,有效地避免离位灭菌带来的杂菌污染问题,同时能够实现发酵的连续进行。

[0035] 3、本发明中的真空干燥机干燥效果显著,较常压干燥,具有减少干燥时间,容易控制,受热均匀,还可以使产品的质量得到提高。

[0036] 4、本发明中的二流体喷嘴集加湿、接种、通气、蒸汽管道功能于一身,免去了多重管道带来罐体结构的繁琐。而且通过该装置使液体形成雾化状态,能更加均匀地喷洒于物料之上。

[0037] 5、本发明中加湿所用的无菌水是经过液体过滤器制备的,较传统的灭菌方法简单,同时节约灭菌所耗费的能源。

## 附图说明

[0038] 图1为一体化固态发酵反应器的主视图。

[0039] 图2为二流体喷嘴系统示意图。

[0040] 图3为实施例2中单批次固体发酵 $\gamma$ -聚谷氨酸示意图。

[0041] 图4为实施例2中重复批次固体发酵 $\gamma$ -聚谷氨酸。

[0042] 图5为实施例5中单批次固体发酵生产丁酸梭菌活菌制剂示意图。

[0043] 图6为实施例5中重复批次固体发酵生产丁酸梭菌活菌制剂示意图。

[0044] 图7为实施例6中单批次固体发酵豆粕示意图。

[0045] 图8为实施例6中重复次固体发酵豆粕示意图。

## 具体实施方式

[0046] 实施例1

[0047] 如图1所示的固态发酵带式反应器,它包括发酵罐1、培养基制备罐10和传送带系统11;其中,发酵罐1为不锈钢卧式发酵罐,通过底部的第一支架3-1和第二支架3-2固定在底座3上。发酵罐外周设有夹套4-1,所述的夹套4-1上设有热交换介质进口4-2和

热交换介质出口 4-3,热交换介质进口 4-2 设于夹套 4-1 最顶端,热交换介质出口 4-3 设于夹套 4-1 最底端,且热交换介质进口 4-2 和热交换介质出口 4-3 在水平方向上的位置远离。热交换介质为水蒸气和循环冷却水。

[0048] 发酵罐 1 水平方向两侧设有第一活动顶盖 2-1 和第二活动顶盖 2-2,第一活动顶盖 2-1 与发酵罐 1 侧壁连接处设有固定螺栓 2-3,第二活动顶盖 2-2 与发酵罐 1 侧壁连接处设有固定螺栓 2-3。

[0049] 发酵罐 1 底端设有出料口 8,发酵罐 1 内部自上而下设有三层传输带,分别为第一传输带 5-1、第二传输带 5-2 和第三传输带 5-3,相邻两层传输带传输方向相反,且保证物料沿第一传输带 5-1 传输至尽头时可以自由下落至第二传输带 5-2 沿传输方向的起始处,物料再沿第二传输带 5-2 传输至尽头时可以自由下落至第三传输带 5-3 沿传输方向的起始处,第三传输带 5-3 沿传输方向的传输尽头正对出料口 8 的正上方。

[0050] 发酵罐 1 顶部还设有第一出气孔 9,第一出气孔 9 附近设有温度探头 7-1、湿度探头 7-2 和压力探头 7-3。

[0051] 发酵罐 1 内靠近活动顶盖 2-2 的位置垂直设置二流体喷嘴系统 6,如图 2 所示,二流体喷嘴系统 6 包括 4 个喷嘴 6-1、第一二流体喷嘴管路 6-2 和第二二流体喷嘴管路 6-3,4 个喷嘴 6-1 采用并联的方式同时与第一二流体喷嘴管路 6-2 和第二二流体喷嘴管路 6-3 连通;无菌水管路和蒸汽管路相互并联,再与第一二流体喷嘴管路 6-2 串联;种子液管路和气体管路相互并联,再与第二二流体喷嘴管路 6-3 串联;无菌水管路上设有第一液体过滤器 6-5 和第二液体过滤器 6-6,蒸汽管路上设有蒸汽发生器 6-4,种子液管路外接接种瓶 6-9,气体管路上设有第一气体过滤器 6-7 和第二气体过滤器 6-8;无菌水管路和种子液管路上分别设有气体流量计,蒸汽管路和气体管路上分别设有气体流量计。

[0052] 其中,加料系统 10 包括依次相连的电动机 10-7、加料斗 10-6、输送螺杆 10-2、出料管 10-1;输送螺杆 10-2 外部设有加热夹套 10-5、保温夹套 10-4 和冷却夹套 10-3,冷却夹套 10-3 由循环水进行冷却,加热夹套 10-5 由电加热系统进行加热,保温区 10-4 外壁裹有酚醛保温材料;其中,进入输送螺杆 11-4 的物料总是先经过加热夹套 10-5,再经过保温夹套 10-4,最后经过冷却夹套 10-3;出料管 10-1 与发酵罐 1 相连,且出料管 10-4 与发酵罐 1 相连且正对最上层传输带沿传输方向的起始处。

[0053] 其中,回转真空双锥干燥机 11 顶部进料口通过活套法兰与出料口 8 连通。

[0054] 实施例 2:好氧微生物固态发酵(以枯草芽孢杆菌固态发酵生产  $\gamma$ -聚谷氨酸农业肥料为例)

[0055]  $\gamma$ -聚谷氨酸( $\gamma$ -polyglutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是由微生物合成的一类均聚氨基酸,基本骨架是由 L-谷氨酸和 D-谷氨酸通过  $\gamma$ -酰胺键连接而成的直链分子,相对分子质量可达  $200 \times 10^4$ Da。由于其结构中存在大量的氢键和亲水性游离羧基,具有优良的保湿性能,已被广泛应用在农业肥料中。

[0056] 本实施例中发酵的微生物为本实验室已获得授权的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* NX-2((菌种保藏号:CGMCC 0833),直接用微生物菌剂( $5 \times 10^{10}$ cfu/g)接种,接种量为 25g/kg。

[0057] 固态发酵培养基:香菇培养后的菌渣 600g/kg,味精粕 400g/kg,工业甘油 40g/kg。

[0058] 在本实施例 1 的一体化固态发酵反应器上进行进行连续化固体发酵生产  $\gamma$ -聚谷

氨酸农业肥料。发酵罐主体 1 是采用不锈钢材料制成,罐体内径 50cm,长度 80cm,厚度 6mm,左右两端为活动顶盖 2-1、2-2,可由螺栓 2-3 固定在罐体上。罐体外壁中部铸有夹套 4-1,夹套左上端连接有蒸汽进口、循环水出口 4-2、右下端有蒸汽出口、循环水进口 4-3,夹套可对罐体进行加热和冷却。出气口 9、温度探头 7-1、湿度探头 7-2、压力表 7-3 位于罐体左上端,出料口、取样口、排污口 8 位于罐体左下端。传输带 5-1、5-2、5-3 长度为 60cm,宽度为 40cm,位于罐体内部上、中、下三层,每层错开排列,由外接电动机提供动力,传输方向如图 1 所示,该传输带在发酵过程中兼作浅盘。发酵罐主体 1 的右上端与加料系统 10 通过蝶阀 10-1 连接,该加料系统包括加料斗 10-6、加热夹套 10-5、保温夹套 10-4、冷却夹套 10-3 组成,并由电机 10-7 控制螺杆搅拌装置 10-2。该加料系统可实现物料灭菌与输送同时进行。二流体喷嘴系统 6 与主体 1 右侧连接,该系统在罐体外部由气体管道和液体管道组成,所述的气体管道设有气体预过滤器 6-8、精过滤器 6-9,并由流量计控制流速;液体管道设有液体预过滤器 6-5、精过滤器 6-6,并由流量计控制流速,该管道即为加湿器管道,为罐体内部物料补充水分;蒸汽输送管道位于两侧,并设有蒸汽过滤器 6-4,另在气体管道一侧设有接种管道 6-9,外接接种瓶。回转真空双锥干燥剂 11 与出料口 8 通过活套法兰连通。

[0059] 具体生产工艺如下:称取 3kg 香菇菌渣、2kg 味精粕、200g 工业甘油,由加料斗加入到加料系统,并由螺杆搅拌均匀后通入蒸汽对物料进行灭菌,灭菌条件 121℃、0.1Mpa、20min。同时,从二流体喷嘴通入蒸汽进入发酵罐主体,对罐体内及管道进行灭菌,维持 121℃、0.1Mpa、15min。灭菌结束后,通入无菌空气对罐体进行保压,启动传输带动力,控制速度为 5cm/s,开发蝶阀、绞龙,输送物料至传输带上。待物料输送完毕,控制罐体温度 35℃,物料湿度 60-65%,通气量 100ml/min。称取 125g *B. subtilis* NX-2 菌剂溶于 100ml 无菌水中,通过接种瓶负压接入种子液管道,并由二流体喷嘴喷洒于物料表面,发酵过程中通过 PLC 系统维持温度 35℃、湿度 60-65%,通气量 100ml/min,取样过程中,打开取样口,开启传输带速度 3cm/s,完成取样后关闭传输带、取样口。48h 为发酵终点。打开卸料口,开启传输带,将物料输入至真空干燥机中,干燥物料水分至 10%即可。对于连续发酵,发酵的过程中由加料系统准备好灭菌的物料,在卸料的同时或之后,进行物料传送,连续发酵过程中无需再次接入种子液,直接利用残留的菌体进行后续发酵。

[0060] 结果表明:在本发明的一体化固态发酵反应器中,单批次过程中物料的营养物质能够迅速被菌体消耗,最终产生的  $\gamma$ -聚谷氨酸浓度达到 162g kg<sup>-1</sup>,活菌落数为 56×10<sup>8</sup>cfu g<sup>-1</sup>,说明 *B. subtilis* NX-2 能够很好地在本发明的生产装置中生长并产生代谢产物。由图 5 可知,经过重复 8 批次后,菌体浓度仍然能够达到 43.3×10<sup>8</sup>cfu g<sup>-1</sup>, $\gamma$ -聚谷氨酸浓度达到 145g kg<sup>-1</sup>,说明本生产装置能够进行多批次发酵,这大大减少了发酵时间和动力消耗。

[0061] 实施例 3:好氧微生物以固态发酵枯草芽孢杆菌解磷菌菌剂为例

[0062] 磷素是植物生长发育必需的营养元素之一,土壤缺磷直接影响农作物的生长和粮食产量,在我国缺磷耕地面积达到 74%,且土壤中 95%以上的磷为无效态,很难被植物直接吸收利用。土壤中存在许多解磷微生物,能够将这些难溶性的磷酸盐降解成游离形式,以便植物吸收利用,因此,开展解磷微生物开发、降低磷肥生产成本、解决磷肥污染及提高磷素利用率方面的研究十分必要。

[0063] 本实施例中的解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 由本实验室从湖北省宜昌杉树垭磷矿地区的磷矿中筛选得到,保藏于中国典型培养物保藏中心(简称 CCTCC),保藏号为

CCTCCM 2014367。

[0064] 种子培养基：葡萄糖 10g/L、NaCl 5g/L、蛋白胨 10g/L；

[0065] 固体发酵培养基：玉米芯粉与畜禽粪便质量比为 3:1，甘蔗糖蜜 10%， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3%， $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.015%，pH 6.8 ~ 7.0。

[0066] 在本实施例 1 的固态发酵带式反应器上进行连续化固体发酵生产解磷菌，其步骤同实施例 2 的步骤，只是具体发酵条件有所区别，以下给出具体发酵条件。

[0067] 从保藏的斜面上接入一满环 *Bacillus subtilis* JT-1 于 500mL 种子培养液中，35℃ 150rpm 下培养 15h。接种量为 4.8%，固体发酵基质质量为 5kg，灭菌条件为 121℃、20min。发酵温度控制在 35 ~ 37℃，湿度为 65 ~ 70%，通气量 80ml/min，发酵总时间 30h。以 5L 抽滤瓶进行静息不通气培养作为对比，考察本发明装置的性能。

[0068] 表 1 单批次与重复批次固体发酵 *B. subtilis* JT-1

[0069]

	对照	批次 发酵	重复批次发酵					
			第一 批次	第二 批次	第三 批次	第四 批次	第五 批次	第六 批次
活菌数 (cfu g <sup>-1</sup> , 10 <sup>10</sup> )	35	48.5	48.6	48.7	48.4	48.2	47.5	47.0

[0070] 由表 1 可知，与对照相比，在本发明的固态发酵带式反应器中，*Bacillus subtilis* JT-1 能够很好地生长，单批次发酵 30h 后菌落数达到  $48.5 \times 10^{10}$  cfu g<sup>-1</sup>，比对照提高了 27.8%；重复批次发酵，菌体生长稳定，6 批次后菌落数只下降了 3.3%。

[0071] 实施例 4：好氧微生物以固态发酵枯草芽孢杆菌解钾菌菌剂为例

[0072] 钾是农作物生长必需的营养元素，占干物质含量 0.2 ~ 4.1%，在植物生长发育过程中，钾能增强作物的抗病虫害、抗倒伏、抗旱和抗寒等抗逆能力，从而提高作物的产量和品质。据土壤普查资料显示，我国约 70% 的耕地缺钾，约 45% 的耕地严重缺钾。而中国的钾肥生产量只占世界 0.34%，而消耗量占 14.7%，每年虽然进口 200 万吨钾肥，仍然不能满足农业生产对钾肥的需求。这些已成为限制作物产量和品质提高的重要因素。硅酸盐细菌，又称钾细菌，是指能分解土壤中的硅铝酸盐等矿物，将难溶性的钾转变成可溶性状态供植物吸收利用的一类微生物，此外它还能分泌多种植物激素促进植物生长。因此，寻求解甲效果好、解甲能力强的解甲菌资源来挖掘土壤中的不可利用的钾素，对发展经济、生态农业具有十分重要的意义。

[0073] 本实施例中的解钾菌 *Bacillus subtilis* JT-2 由本实验室从富含钾矿物的山西临县紫金山地区矿土中选育的，保藏于中国典型培养物保藏中心（简称 CCTCC），保藏号为 CCTCCM 2014368。

[0074] 种子培养基：葡萄糖 10g/L、NaCl 5g/L、蛋白胨 10g/L；

[0075] 固体发酵培养基：香菇菌渣与稻草质量比为 2.5:1.5，工业甘油 5%，酵母粉 2%，NaCl 2%，pH 6.8 ~ 7.0。

[0076] 在本实施例 1 的固态发酵带式反应器上进行连续化固体发酵生产解钾菌制剂，其

步骤同实施例 2 的步骤,只是具体发酵条件有所区别,以下给出具体发酵条件。

[0077] 从保藏的斜面上接入一满环 *Bacillus subtilis* JT-2 于 500mL 种子培养液中, 30℃ 200rpm 下培养 8h。接种量为 8%, 固体发酵总物料质量为 5kg, 灭菌条件为 121℃、20min。发酵温度控制在 28 ~ 30℃, 湿度为 60 ~ 70%, 通气量 150ml/min, 发酵总时间 24h。以 5L 抽滤瓶进行静息不通气培养作为对比。

[0078] 表 2 单批次与重复批次固体发酵 *B. subtilis* JT-2

[0079]

	对照	批次 发酵	重复批次发酵							
			第一 批次	第二 批次	第三 批次	第四 批次	第五 批次	第六 批次	第七 批次	第八 批次
活菌数 (cfu g <sup>-1</sup> , 10 <sup>10</sup> )	63.5	78.5	77.9	78.3	78.5	78.1	77.8	77	75.1	68.7

[0080] 结果由表 2 所示,与对照组相比, *Bacillus subtilis* JT-2 在本发明的固态发酵带式反应器中生长更好,单批次发酵 24h 后菌落数达到  $78.5 \times 10^{10}$  cfu g<sup>-1</sup>, 比对照提高了 19.1%; 重复批次发酵结果表明, 菌体在前 6 个批次条件下生长稳定, 随后性能有所下降。本发明固态发酵反应器在大量利用农业废弃物发酵的同时, 也实现了解钾菌的连续生产。

[0081] 实施例 5: 厌氧微生物固态发酵 (以固态发酵生产丁酸梭菌活菌制剂为例)

[0082] 丁酸梭菌, 又名酪酸菌, 它是梭状芽孢菌属中的一个种, 是 1993 年由日本千叶医科大学宫入近治博士首先发现并报告的, 因此又叫宫入菌。1935 年 Kingi miyairi 博士从人的粪便和土壤中分离出丁酸梭菌, 随后发现其厌氧培养的过滤物中含有较少的脂肪酸, 具有极强的整肠作用, 它可抑制肠道中的致病菌, 促进肠道中有益菌如双歧杆菌和乳杆菌的生长。丁酸梭菌为典型的严格厌氧菌。最适生长温度 25-37℃, 最适 pH 值为 4.0-9.8。丁酸梭菌微生物制剂的主要特点是: (1)、维持肠道菌群平衡; (2)、增强免疫功能, 预防肿瘤发生; (3)、产生宜生产物; (4)、稳定抗性较好。

[0083] 本实施例中的丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum* CGMCC 1.336) 购自于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

[0084] 种子培养基: 葡萄糖 20g/L、牛肉膏 1.5g/L、蛋白胨 20g/L、碳酸钙 10g/L、七水硫酸镁 0.2g/L、一水硫酸锰 0.2g/L, pH 7.0。

[0085] 固态发酵培养基: 豆粕与麸皮质量比为 1:1, 氯化钙 0.2%, 硫酸铵 1.5%。

[0086] 在本实施例 1 的一体化固态发酵反应器上生产丁酸梭菌活菌制剂, 其步骤同实施例 2 的步骤, 只是具体发酵条件有所区别, 以下给出具体发酵条件。*Clostridium butyricum* CGMCC 1.336 为厌氧微生物, 接种前先将菌种活化, 接入种子培养基, 37℃ 静止培养 24h 制成种子液, 接种量为 5%。物料总质量为 5kg, 灭菌条件为 115℃、15min。灭菌结束后需要通入 N<sub>2</sub> 排尽罐体内部及管道中的空气并对罐体进行保压, 并维持通入 N<sub>2</sub> 速率为 10ml/min。发酵过程中控制罐体温度 37℃, 湿度 55-60%, 发酵时间为 72h。同时, 以 5-L 抽滤瓶为静息不通入 N<sub>2</sub> 为对照。

[0087] 结果表明：在本发明的一体化固态发酵反应器中，菌体生长明显比对照（5-L 抽滤瓶）旺盛，最终的或菌落数比对照高 23.6%，重复 5 批次之后，菌体生长虽然有所降低，但是总的菌落数仍然能达到  $18.3 \times 10^8 \text{cfu g}^{-1}$ ，说明利用本发明生产装置重复批次丁酸梭菌是可行的。

[0088] 实施例 6 兼性厌氧微生物固态发酵（以植物乳酸菌固态发酵豆粕为例）

[0089] 豆粕是一种优质的蛋白质饲料资源，与棉粕、菜粕、花生粕相比，其赖氨酸含量高（接近理想氨基酸模式）、消化率高、适口性好。与动物源蛋白相比，豆粕来源充足，不易被病原菌污染、不易氧化腐败，含毒害物质少、安全系数高。因此豆粕成为目前畜牧业中使用量较大的一种优质的植物性蛋白源。

[0090] 但豆粕中含有一些抗营养因子，主要有胰蛋白酶抑制剂、植酸、大豆凝血素、胰酶、低聚糖、脂肪氧化酶、大豆抗原蛋白（致敏因子）及致甲状腺肿素等。由于它们的存在，一方面对动物体内某些消化酶起抑制作用或与营养物质络合成不易消化的成分等，使得豆粕的利用率下降；另一方面对动物体内的某些器官起到毒害作用，对动物的生理、生长、健康造成不良的影响，特别对于幼龄动物的影响更为明显。

[0091] 目前对豆粕中抗营养因子的处理方法多以化学、物理方法为主，有一定的去除作用，但存在安全性、成本高以及对豆粕中营养价值损失大等缺陷。本实施例中以植物乳酸菌固态发酵手段对普通生豆粕进行发酵处理，研究植物乳酸菌对豆粕中抗营养因子及其营养价值的影响。

[0092] 本实施例中的植物乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* CICC 21790 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

[0093] 种子培养基：葡萄糖 5g/L，蛋白胨 10g/L，牛肉膏 10g/L，酵母膏 5g/L，柠檬酸铵 2g/L，醋酸钠 5g/L，Tween80 1ml/L， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g， $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.2g/L，pH 6.0 ~ 6.8。

[0094] 固态发酵培养基：豆粕

[0095] 在本实施例 1 的一体化固态发酵反应器上进行固态发酵豆粕，其步骤同实施例 2 的步骤，只是具体发酵条件有所区别，以下给出具体发酵条件。*Lactobacillus plantarum* CICC 21790 为兼性厌氧微生物，但是鉴于研究经验和实验方便，我们按照厌氧菌培养。先接植物乳酸菌于 500ml 种子培养基中，37℃ 静止培养 12h 制成种子液，接种量为 9%。豆粕总质量为 5kg，灭菌条件为 121℃、15min。灭菌结束后需要通入  $\text{N}_2$  排尽罐体内部及管道中的空气并对罐体进行保压，并维持通入  $\text{N}_2$  速率为 20ml/min。发酵过程中控制罐体温度 37℃，湿度 55-65%，发酵时间为 48h。

[0096] 结果表明：在本发明的一体化固态发酵反应器中，*Lactobacillus plantarum* CICC 21790 能够有效地降解豆粕中的胰蛋白酶抑制因子和凝集素，发酵 48h 后，去除率分别达到 60.4%，99%，而且重复 6 批次后，去除效率仍然很显著。

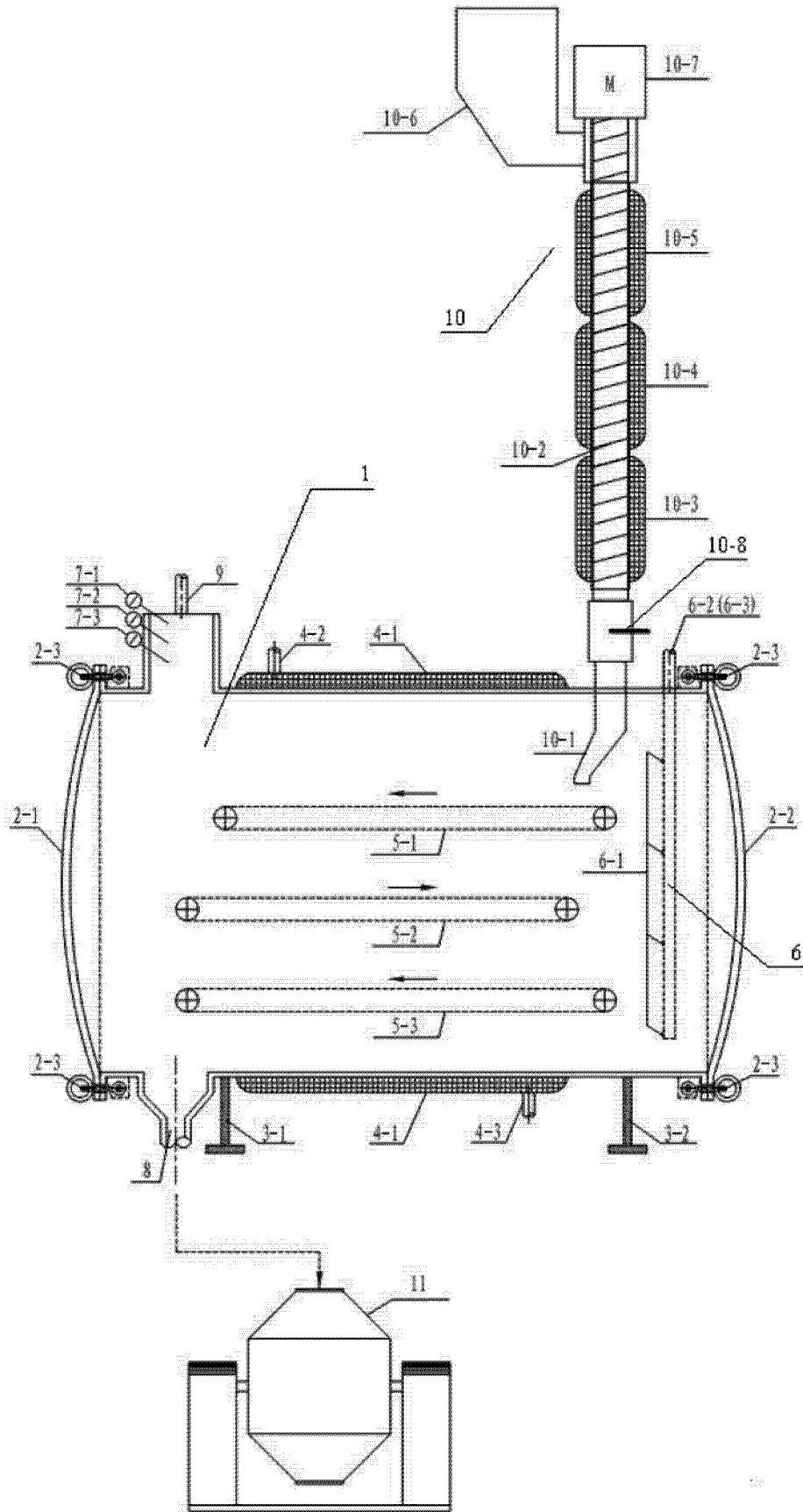


图 1

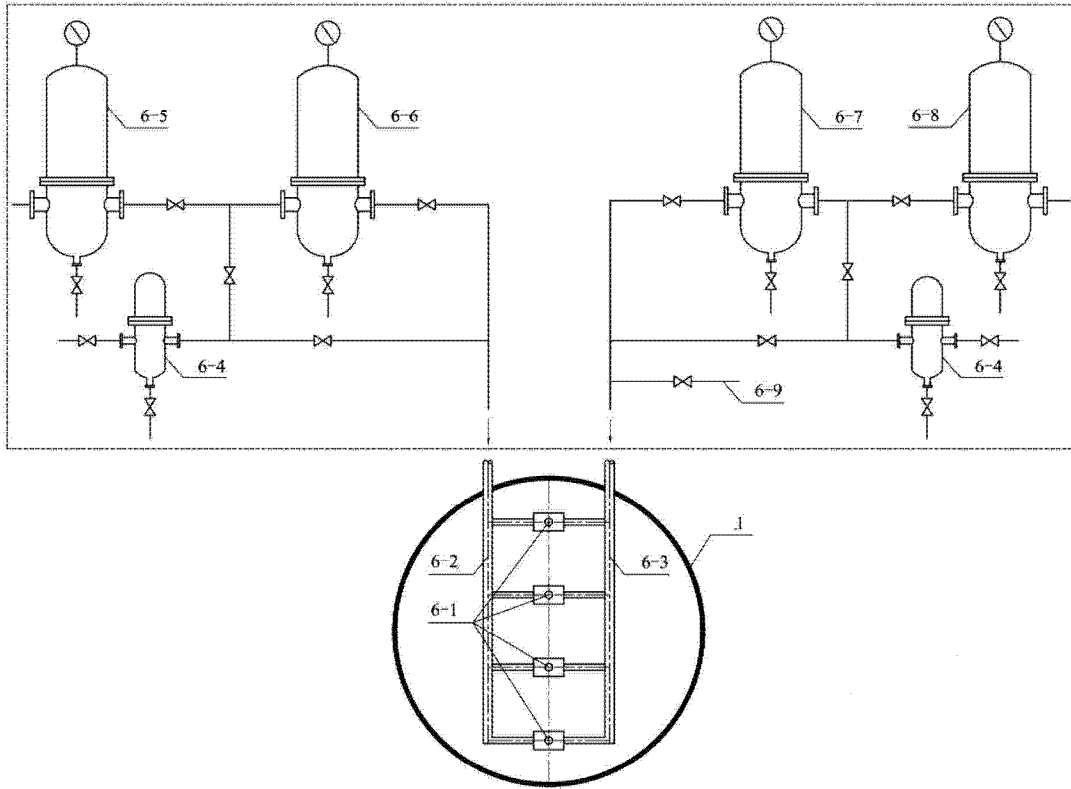


图 2

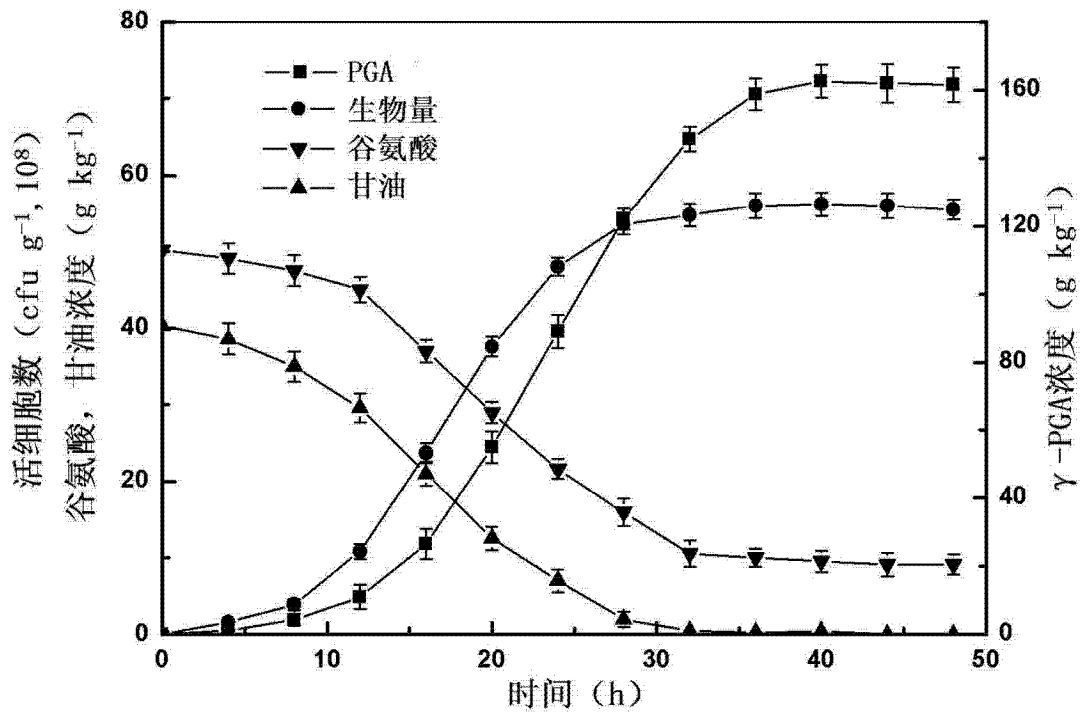


图 3

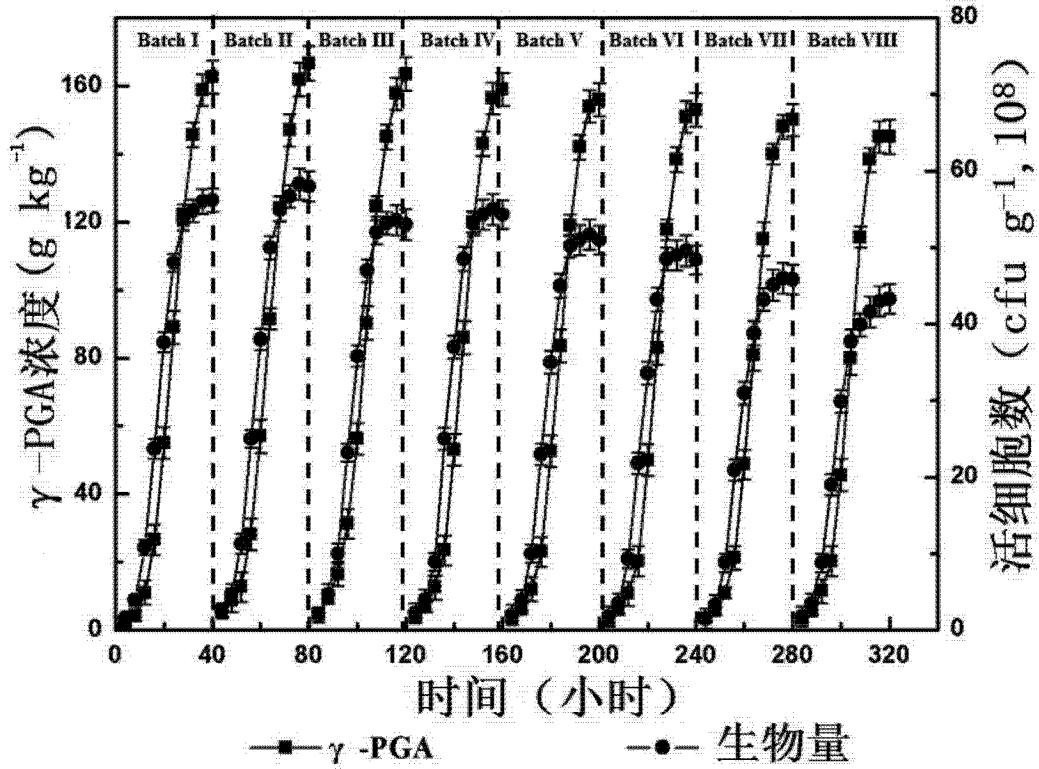


图 4

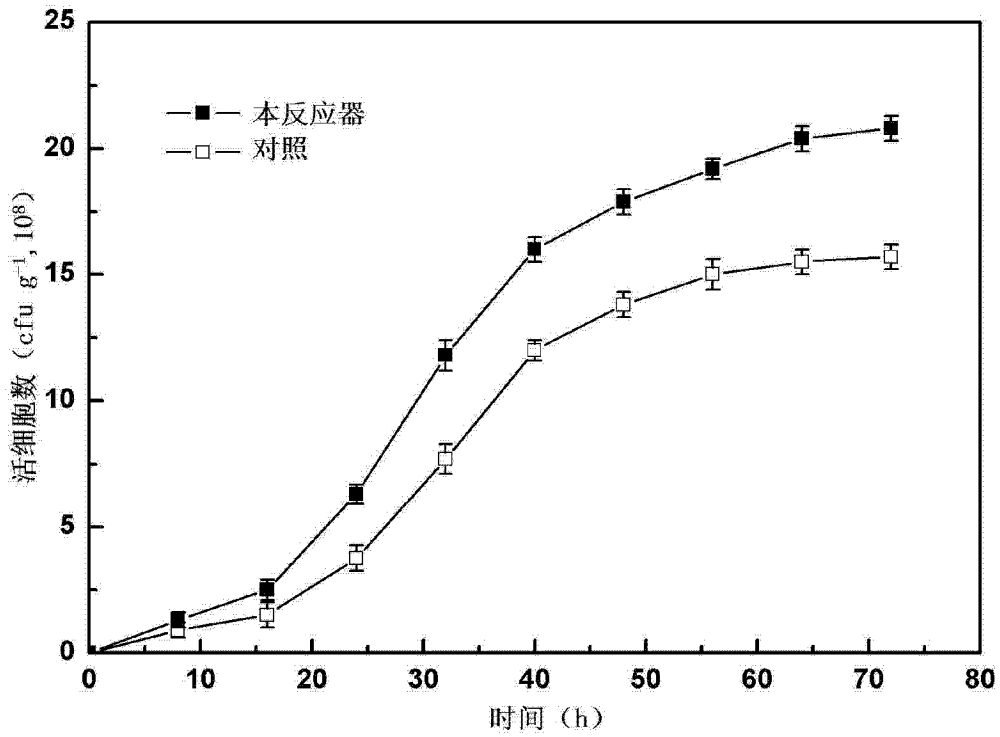


图 5

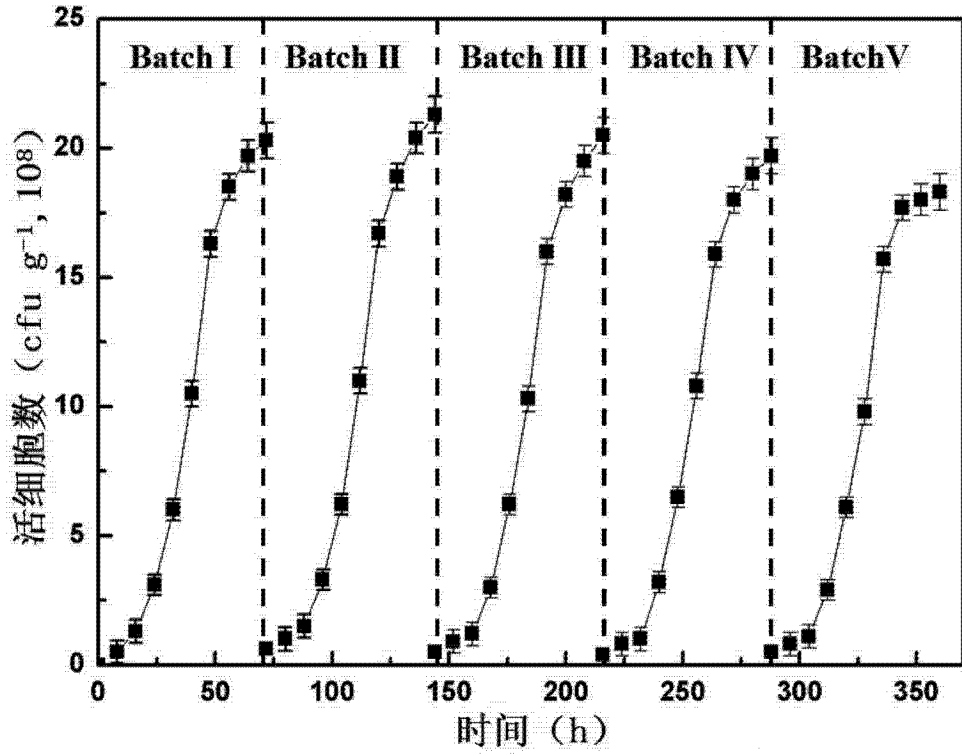


图 6

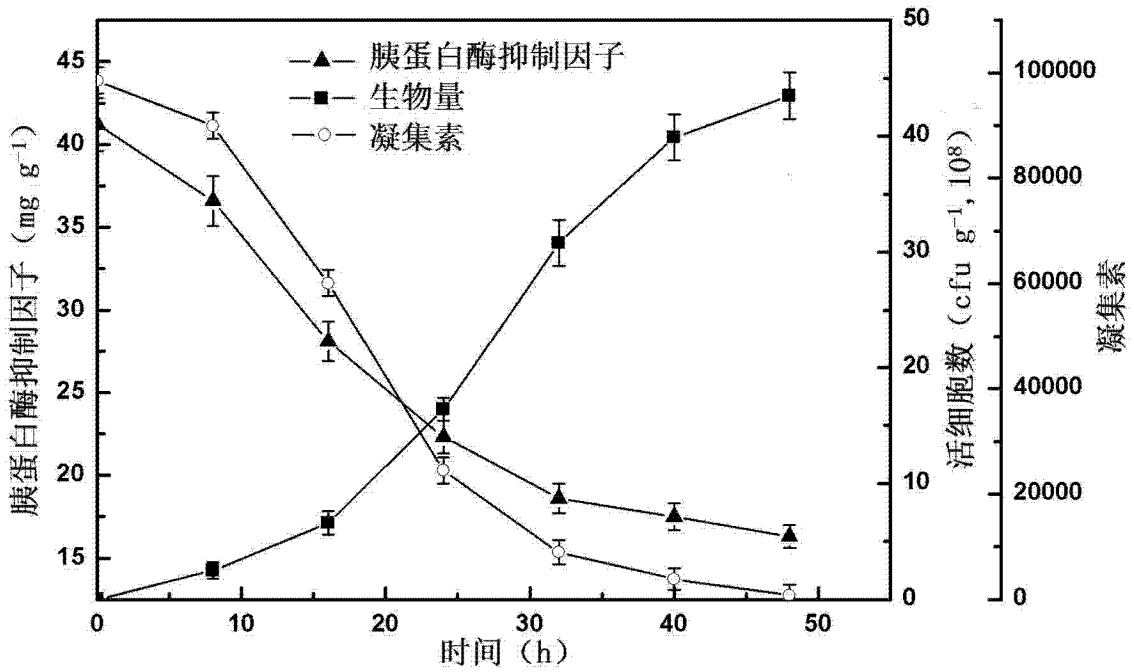


图 7

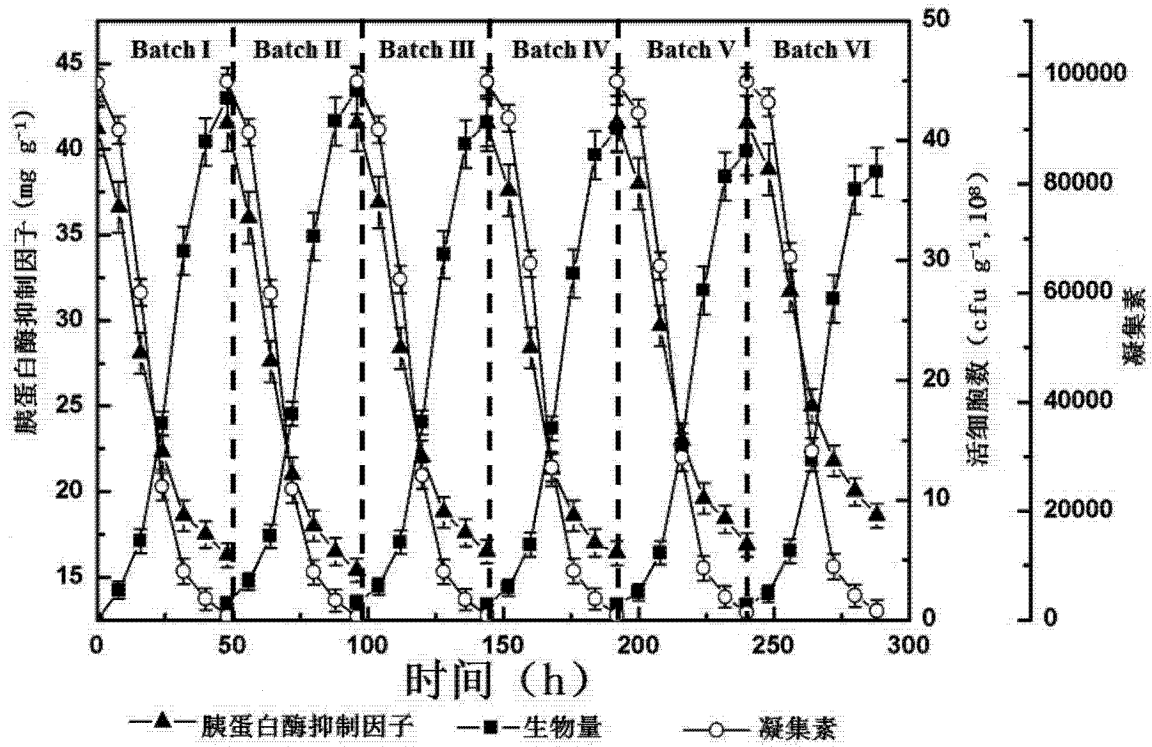


图 8