

自絮凝颗粒酵母酒精高浓度连续发酵的研究*

刘传斌 白凤武 邵 梅 谢 健 李 宁

(大连理工大学生化工程研究所 大连 116012)

摘要: 在四釜串联气升环流悬浮床生物反应器系统中,进行了絮凝颗粒酵母酒精连续发酵的研究。以 CO_2 为驱动动力,发酵液液蒸馏废液全循环,稀释率为 0.2/h。发酵成熟醪酒精平均浓度为 96.6g/L,残余还原糖和总糖分别为 1.2g/L 和 4.1g/L。

关键词: 絮凝酵母颗粒, 酒精发酵, 悬浮床生物反应器

中图分类号: TQ222.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0367-05

酒精发酵的历史十分悠久,然而传统酒精发酵工艺严重污染环境。废液循环使用是减少生产过程污染物排放量的简捷途径,但是,传统的发酵工艺的本质决定了即使采用比较低的循环比,装置也很难实现稳定运行。因此,工业生产上不得不采用能耗很高的全蒸发浓缩(DDGS)技术处理酒精糟。我国千吨级规模小型酒精厂众多,DDGS 技术的设备投资大,运行费用高,使得众多小型酒精厂的废糟液几乎无一例外地直接排放到江河湖泊。

利用现代生物技术手段使发酵性能优良的菌株具有自絮凝形成颗粒的特性^[1-3],以此作为固定化细胞方法的无载体固定化细胞技术是近年来提出的新概念^[4],并首先在酵母细胞酒精发酵领域取得了比较大的进展,展示出良好的工业前景^[5-8]。絮凝颗粒酵母酒精连续发酵工艺要求原料中的纤维质残渣在糖化后过滤去除,发酵过程为清液发酵,而且酵母细胞在生物反应器中实现了固定化,故酒精精馏废液能够以较大的比例甚至“全循环”直接拌料使用^[9]。这样既解决了废液污染问题,又节省了工艺过程用水,同时废液中残留的少量可发酵性糖富集后还可以继续利用。人们长期以来期望的从发酵工艺本身解决酒精发酵面临的重大环境污染问题,有可能成为现实。

发酵终点产物浓度是体现发酵工艺技术水平的重要标志。采用传统的酒精发酵工艺,目前国内外工业生产发酵液中的酒精浓度已经达到 80~95g/L 的水平^[10]。为保证无载体固定化细胞技术在工业上切实可行,其各项技术指标均不得低于现有技术。因此,本文对自絮凝酵母细胞颗粒多釜串联酒精连续发酵工艺过程进行了研究。通过四个悬浮床生物反应器串联运行,发酵液精馏废液“全循环”使用,控制平均发酵时间为 20h,使发酵液中的酒精浓度达到 96.6g/L。

1 材料和方法

1.1 菌种

采用原生质体融合技术选育的融合株 SPSC,其基础发酵特性如文献[11]所述。

* 国家自然科学基金资助项目(29706001)

作者简介:刘传斌(1973-),男,山东阳谷人,大连理工大学生物工程系讲师,博士,主要从事生化工程研究。

收稿日期:2000-06-05,修回日期:2000-09-26

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基:酵母粉 3 g/L,蛋白胨 3 g/L,葡萄糖 10 g/L,琼脂 20 g/L,在 0.1MPa (121℃)压力一灭菌 30 min。

1.2.2 生长培养基:酵母粉 3 g/L,蛋白胨 3 g/L,葡萄糖 30 g/L,在 0.1MPa 压力下灭菌 30 min。

1.2.3 发酵培养基:由双酶法制得的玉米糖化液,添加适量无机盐,其糖度为 22°Bx 左右。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶培养:将菌种接入装有 100 mL 生长培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 30℃,转速为 150 r/min 条件下进行摇床培养。培养 24 h 后静置,使酵母颗粒沉降,倾去上清液,换入新鲜培养基,分瓶扩大培养。

1.3.2 发酵罐培养:将摇瓶种子和生长培养基分别接入 4 个发酵罐,在 30℃条件下流加培养,直至获得所需酵母浓度。

1.3.3 连续发酵:当酵母浓度达到 30 g/L 以上时,各操作条件切换为发酵状态,4 个发酵罐串联运行,用 CO₂ 驱动,通风量 0.026vvm。玉米糖化液自 1 号罐进入反应系统,顺序流经 2 号和 3 号罐,自 4 号罐流出,控制稀释率为 0.2/h。实验工艺流程如图 1 所示。

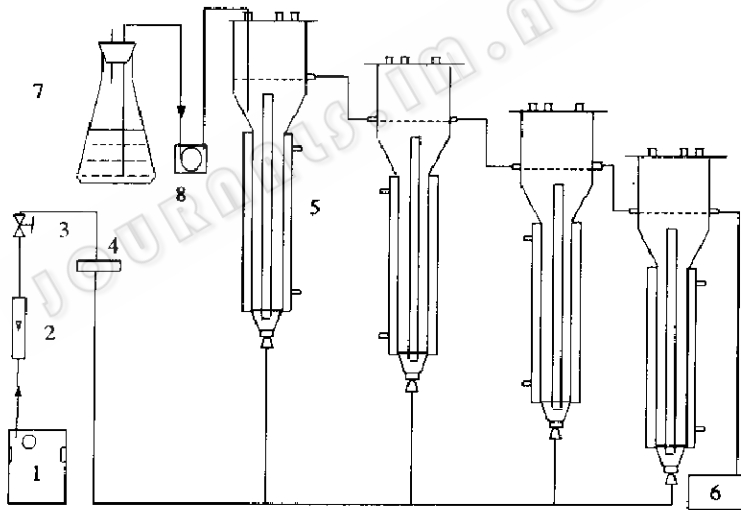


图 1 自絮凝颗粒酵母多釜串联酒精高浓度发酵装置图

Fig.1 Equipment for ethanol continuous fermentation

1. CO₂ gas source; 2. Rotometer; 3. Valve; 4. Filter; 5. Bioreactor;

6. Fermentation broth; 7. Medium; 8. Pump.

1.4 分析方法

1.4.1 乙醇:由气相色谱仪测定。

1.4.2 菌体浓度:以单位体积絮凝颗粒酵母悬浮液中菌体干重表示。

1.4.3 其它各项技术指标的分析检测均按酒精发酵行业规定的统一方法进行。

2 结果和讨论

2.1 悬浮床反应器驱动力的选择

自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵过程中,酵母细胞颗粒被固定化在反应器中,不随发酵液的流动而流出。由于每个酵母细胞都要经历分裂、生长、衰老和死亡的过程,因此,从微观角度讲,反应器中的酵母又是不断更新的。衰老和死亡的细胞不断脱离絮凝体,随发酵液流出反应器,同时有更多的新细胞长大聚集,形成新的絮凝颗粒。

酒精发酵是一个厌氧过程,但在先前进行自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵研究时,一直用空气驱动悬浮床生物反应器,目的是提供微量氧,促进反应器内酵母的更新^[12],由于微量空气的存在,从而影响了反应器出口 CO₂ 的纯度,不利于 CO₂ 的收集。考虑到酵母在厌氧状态下同样可以生长,尝试采用 CO₂ 驱动悬浮床生物反应器。实验发现,只要在糖液中适当补充营养盐,就能保证反应器中酵母菌体浓度和发酵活性不降低,酒精连续发酵长期稳定运行。因此,选择 CO₂ 为悬浮床生物反应器的驱动动力。

2.2 各罐发酵温度的确定

与单个反应器操作相比,多釜串联运行时底物和产物的浓度都有很大程度的提高,相应地,对细胞生长的抑制作用明显增强。由于悬浮床生物反应器中的酵母是不断更新的,故自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵长期稳定运行的关键在于,保持反应器内适宜的酵母浓度和发酵活性。因此,为了维持反应器中酵母浓度不下降,多釜串联操作时,考虑到酵母生长的需要,发酵应在更适合酵母生长的温度下进行。试验结果表明,在 30℃ 下发酵,每个反应器中酵母浓度都不下降,且维持很好的发酵活性。

2.3 发酵培养基中无机盐的添加

自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵工艺要求以澄清糖液为底物,糖化后的醪液过滤除渣,所得清液灭菌后进入发酵系统。因此,发酵培养基中除碳源外,其它营养成分相对不足。为了使酵母在悬浮床生物反应器中有一定程度的生长,必须向培养基中补加无机盐。向糖液中添加不同浓度的 NH₄HCO₃ 或 (NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄,以补充培养基中氮和磷的缺乏,研究了发酵液中总氮、无机氮、无机磷和总磷随时间的变化情况。表 1 为按照同一无机盐添加量发酵 15d 后,发酵液中的无机盐残留量。从表 1 可以看出,发酵培养基中适宜的无机盐添加量为 1.5 g/L NH₄HCO₃,0.2 g/L KH₂PO₄。

表 1 发酵培养基中无机盐添加量的确定
Table 1 Determination of inorganic salt addition in medium

Concentration of inorganic salt in medium/(g/L)	Total nitrogen in effluent/(g/L)	Inorganic nitrogen in effluent/(g/L)	Total phosphorus in effluent/(g/L)	Inorganic phosphorus in effluent/(g/L)
1.0 g/L NH ₄ HCO ₃ 4.0 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0 g/L KH ₂ PO ₄	1.776	0.967	0.332	0.314
1.0 g/L NH ₄ HCO ₃	1.303	0.535	0.210	0.186

续表 1

2.0 g/l. (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 g/L KH ₂ PO ₄				
1.0 g/L NH ₄ HCO ₃	1.097	0.321	0.087	0.062
1.0 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 g/L KH ₂ PO ₄				
1.0 g/L NH ₄ HCO ₃	0.972	0.231	0.090	0.061
0.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 g/L KH ₂ PO ₄				
1.5 g/L NH ₄ HCO ₃	0.913	0.225	0.088	0.062
0.2 g/L KH ₂ PO ₄				

2.4 四釜串联酒精连续发酵

当反应器中的絮凝酵母浓度上升到 30 g(d.w.)/L 时,停止进行流加培养,进入发酵阶段。采用 CO₂ 驱动悬浮床生物反应器,通风量 0.026 vvm。糖度为 22°Bx 的玉米糖化液自 1 号罐进入反应系统,顺序流经 2 号和 3 号罐,自 4 号罐流出,控制稀释率为 0.2/h。图 2、3 为有效容积为 1.5L 的四个悬浮床生物反应器串联运行时,末级罐出口发酵液中酒精和残糖浓度。

表 2 为四个悬浮床生物反应器在发酵运行过程中各项工艺技术指标的平均值。四釜串联酒精连续发酵装置连续运行 60 d,各项工艺参数保持稳定,说明 CO₂ 驱动、发酵液蒸馏废液全循环的四釜串联工艺是切实可行的。

表 2 四釜串联操作各罐发酵工艺技术指标的平均值

Table 2 The average fermentation results of the four bioreactors operated in series

Bioreactor	No.1	No.2	No.3	No.4
Ethanol concentration/(g/L)	64.2	82.2	92.4	96.6
Residual reducing sugar/(g/L)	77.3	34.5	11.0	1.2
Residual total sugar/(g/L)	81.4	38.4	14.8	4.1

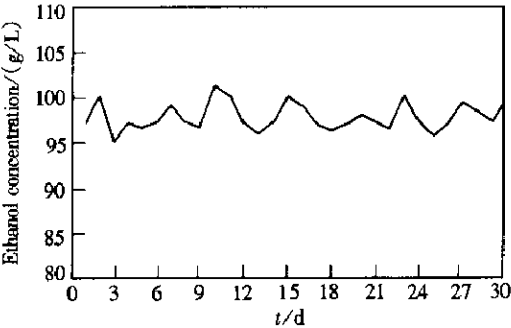


图 2 四釜串联操作末级罐发酵液中酒精浓度
Fig.2 Ethanol concentration of the effluent from the last bioreactor

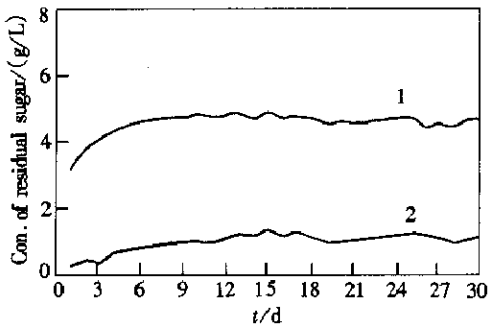


图 3 四釜串联操作末级罐发酵液中残糖浓度
Fig.3 Concentration of residual sugar of the effluent from the last bioreactor
1. Residual total sugar 2. Residual reducing sugar.

参 考 文 献

- [1] Shinohara T, Mamiya S, Yanagida F. *J Ferment Bioeng*, 1997, **83**(1):96 ~ 101.
- [2] Watari J, Kudo M, Nishikawa N, et al. *Agric Biol. Chem*, 1990, **54**:1667 ~ 1681.
- [3] Watari J, Takada Y, Ogawa M, et al. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**:1547 ~ 1552.
- [4] 白凤武. 生物工程进展, 2000, **20**(2):32 ~ 36.
- [5] Kida K, Yamadaki M, Aasno S I, et al. *J Ferment Biogeng*, 1989, **68**(2):107 ~ 111.
- [6] Kida K, Aasno S I, Yamadaki M, et al. *J Ferment Biogeng*, 1990, **69**(1):39 ~ 45.
- [7] Kuriyama H, Ishibashi H, Miyagawa H, et al. *Biotechnol Let*, 1993, **15**(4):415 ~ 420.
- [8] 谢 健, 白凤武, 云战友, 等. 微生物学报, 1999, **39**(4):367 ~ 372.
- [9] 李东侠, 白凤武, 宋 琪, 等. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(5):533 ~ 536.
- [10] Luong J H T. *Biotechnol Bioeng*, 1985, **27**:280 ~ 285.
- [11] 靳 艳, 白凤武, 冯朴荪, 等. 微生物学报, 1996, **36**(2):115 ~ 120.
- [12] 白凤武, 冯朴荪, 谢 健, 等. 化工学报, 1995, **46**(1):106 ~ 111.

HIGH CONCENTRATION ETHANOL CONTINUOUS FERMENTATION USING YEAST FLOCS*

Liu Chuanbin Bai Fengwu Shao Mei Xie Jian Li Ning

(Institute of biochemical engineering, Dalian university of technology, Dalian 116012, China)

Abstract: Continuous ethanol fermentation using yeast flocs was carried out in 4 air-lift suspended-bed bioreactors operated in series. Drafted by CO₂, with complete recycle of ethanol distilled effluent broth and at the dilution rate of 0.2/h, the average ethanol concentration of the fermentation broth was 96.6g/L, while the average concentration of residual total sugar was 4.1g/L and residual reducing sugar was 1.2g/L.

Key words: Yeast flocs, Ethanol fermentation, Suspended-bed bioreactor

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(29706001)

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《微生物学报》编辑部