

自絮凝酵母颗粒连续发酵生产酒精的新工艺

谢 健 白凤武 云战友 李 宁 何秀良*

(大连理工大学生化工程研究所 大连 116012)

摘 要 用既有优良酒精发酵性能,又具有强自絮凝能力的融合酵母株 SPSC,在单釜有效容积为 10m^3 的四釜并联气升环流悬浮床生物反应器系统中,进行了连续发酵生产酒精的研究。以玉米为原料,双酶法制糖,过滤得到清糖液作为底物,在稀释速率为 $0.1/\text{h}$ 的条件下,终点发酵液中酒精浓度为 $70\sim 80\text{g/L}$,残余还原糖和残余总糖分别为 $2\sim 3\text{g/L}$ 和 $3\sim 5\text{g/L}$,悬浮床反应器的设备生产强度达到 $7\sim 8\text{g}(\text{EtOH})/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。

关键词 絮凝酵母颗粒,酒精发酵,悬浮床生物反应器

分类号 TQ222.12 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)04-0367-72

利用某些发酵性能优良且具有强自絮凝能力的菌株形成自絮凝细胞颗粒,并以此作为固定化细胞的方法,与通常的各种载体固定化细胞技术相比,具有方法简单、不消耗辅助材料、无附加成本、反应器中菌体浓度高、连续使用寿命长的优点^[2],展示了良好的工业化应用前景。目前,人们在获得自絮凝酵母菌株的基础上,对这一新的酒精发酵工艺进行了广泛的研究^[1~6]。

本文使用具有自絮凝能力的粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株和酒精发酵性能优良的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)变异株的原生质体融合株^[1],建立了工业化放大规模的自絮凝酵母颗粒悬浮床生物反应器系统,进行运转试验,考核该新技术的经济技术指标,并与传统的酒精发酵工艺进行了比较,为该技术的进一步工业化放大提供了依据。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及培养方法

1.1.1 菌种:使用具有自絮凝能力的粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株和酒精发酵性能优良的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)变异株,通过原生质体融合技术获得的融合株 SPSC^[1],该融合株既具有强自絮凝能力,又具有优良的酒精发酵性能。该融合株由中国科学院沈阳应用生态研究所选育,大连理工大学生化工程研究所保存,其基础发酵性能如文献[1]所述。

1.1.2 培养基:摇瓶种子培养用 YMPG 培养基,其组成为:酵母浸膏 5g,麦芽汁 3g,蛋白胨 3g,葡萄糖 10g 和 30g,定容至 1L。葡萄糖浓度 30g/L 的培养基用于絮凝酵母颗粒形成后的摇瓶扩大培养。有效容积 5L 的一级种子罐培养基的葡萄糖浓度为 $100\sim 120\text{g/L}$,其它组份同上。有效容积 500L 的二级种子罐培养基为双酶法制备的玉米糖化液,外观

* 中国科学院沈阳应用生态研究所

收稿日期:1998-01-04,修回日期:1998-04-13

糖浓度配制成 5~6Bx 和 10~12Bx, 前者用于接种, 后者用于流加培养, 为了补充氮源, 糖化液中补加 1g/L 的碳酸氢铵。

1.1.3 培养方法:斜面试管保存的菌种接入三角瓶, 在温度 30~32℃, 摇瓶转速 150~220r/min 条件下培养, 2~4h 开始自絮凝形成形状不规则的酵母颗粒, 摇瓶中的培养液逐渐变得澄清透明, 每天更换一次培养基, 同时可根据需要进行分瓶扩大培养, 至一级种子罐需求的种子量, 整个摇瓶培养需要 2~3d 时间。

将摇瓶培养的种子以约 5% 的接种量接种到一级种子罐, 通风培养, 至残糖浓度降到 5g/L 以下时, 进行流加培养, 底物的流加速度由流出液中的残糖浓度调节, 控制残糖浓度为 3g/L 左右, 至絮凝酵母颗粒浓度达到 20g(d. w.)/L 以上时, 即可向二级种子罐接种, 一级种子罐培养需要 3d 时间。

二级种子罐培养过程同上, 有效容积 10m³ 的悬浮床生物反应器接种后进行酵母种子的分割扩大培养, 至四台悬浮床生物反应器中的菌体浓度达到 20g(d. w.)/L 以上时, 开始流加高糖浓度底物, 进行酒精连续发酵。

1.2 生物反应器

有效容积 10m³ 的絮凝颗粒酵母酒精连续发酵悬浮床生物反应器结构如图 1 所示。

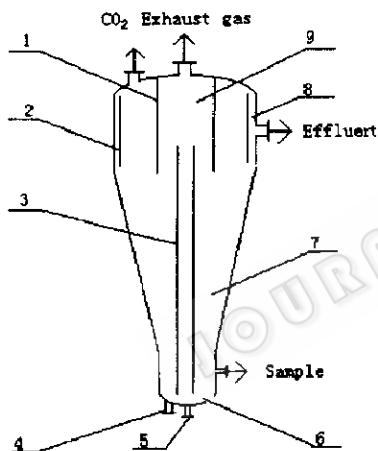


图 1 悬浮床生物反应器

Fig. 1 Diagram of suspended-bed bioreactor

1. Separating baffle for CO₂ and exhaust gas

2. Separating baffle for yeast flocs

3. Draft-tube

4. Input for medium

5. Input for air

6. Bottom zone

7. Main fermentation zone

8. Separating zone for yeast flocs

9. Separating zone for CO₂ and exhaust gas

反应器主体为气升环流悬浮系统, 絮凝颗粒酵母悬浮液周期性流过气升管时, 实现了微量供氧, 保持了絮凝颗粒酵母长期连续使用状态下的高发酵活性。反应器壳体设计成截面逐渐扩大的倒锥形, 可以降低酒精发酵过程产生 CO₂ 的表观上升速度, 有利于在反应器的顶部形成弱扰动区, 使絮凝颗粒酵母得以从悬浮液中沉降分离, 实现固定化。在反应器的顶部还设计了尾气分离装置使酒精发酵产生的 CO₂ 与通风产生的尾气分离, 保证回收 CO₂ 的纯度达到要求。

1.3 分析方法

絮凝颗粒酵母浓度以单位体积悬浮液中菌体干重来表示, 其余各项技术指标的分析检验均按酒精发酵行业的统一方法进行^[7]。

1.4 工艺流程

如图 2 所示为发酵装置的工艺流程。

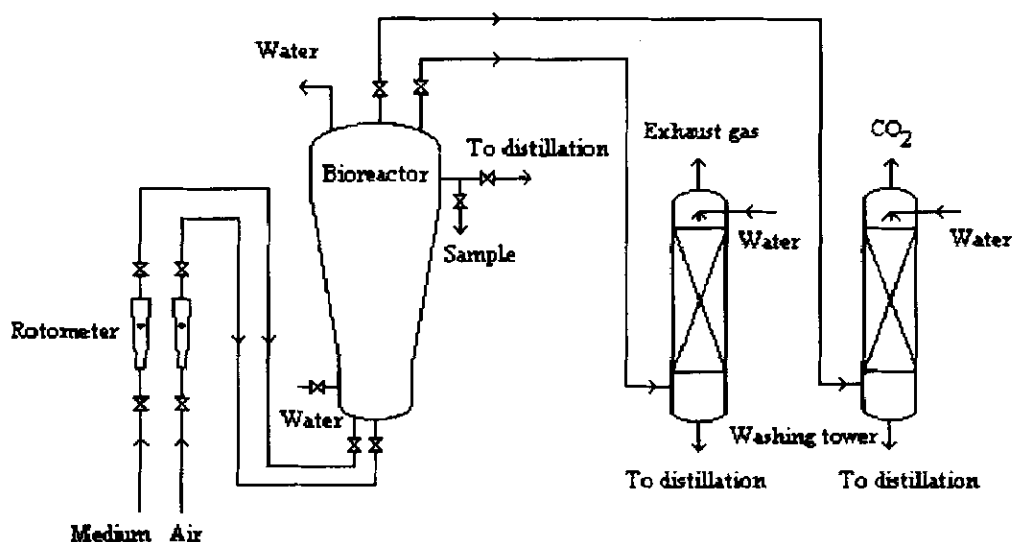


图2 絮凝酵母颗粒酒精连续发酵装置的工艺流程

Fig.2 The diagram of the continuous ethanol fermentation plant

2 结果和讨论

2.1 絮凝酵母颗粒的扩大培养

在制订有效容积 10m^3 悬浮床生物反应器中絮凝酵母颗粒扩大培养的工艺方案时,根据以玉米为原料传统酒精发酵工艺酵母培养的经验,提出了将糖化液稀释到 $10 \sim 12\text{Bx}$,不添加其它营养辅料,直接用来培养絮凝酵母颗粒的工艺方案,并与反应器有效容积 5L 的小试和反应器有效容积 500L 的中试结果进行了比较,其结果如图3所示。

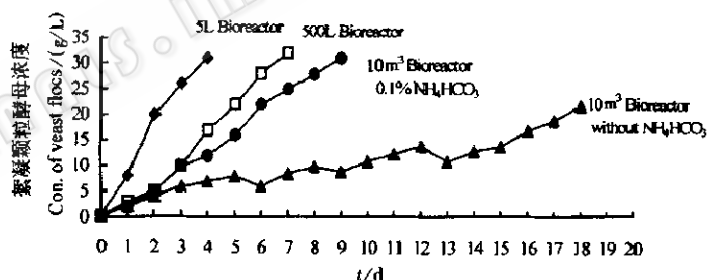


图3 絮凝酵母颗粒在悬浮床生物反应器中的增殖培养过程

Fig.3 Cultivation of yeast flocs in the suspended-bed bioreactors

可见,流加培养进入第三天的时候,有效容积 10m^3 悬浮床生物反应器中絮凝酵母颗粒浓度增加非常缓慢,而且从视镜观察可以看到絮凝酵母颗粒明显变细,显微镜下观察,发现游离酵母细胞大量增加,并随培养液的流出而流失。考虑到小试和中试时所用培养基中营养物质比较丰富^[2],一般超过菌体生长的基本要求,而在工业化放大以后,糖化液培养基中除碳源以外的其它营养物质相对不足。为此我们测定了用于絮凝酵母颗粒扩大培养的糖化液中蛋白质和总氮的含量,发现蛋白质含量为 2g/L ,相当于总氮含量 0.3g/L ,比小试和中试时培养基中蛋白质和总氮的含量低约一倍。玉米原料中蛋白质含量比较丰富,一般可以满足各种微生物生长的营养需求,但絮凝酵母颗粒的连续培养和发酵工艺要求以清糖化液为底物,糖化后的醪液要过滤除渣,为了便于过滤操作,糖化后醪液的 pH

值调节到 5.0~5.5, 部分蛋白质等电凝聚, 随滤渣除去, 致使滤液中氮源缺乏。为此在糖化液中补加 1g/L 的碳酸氨铵, 从图 3 可以看出效果明显。

通风供氧也是促进絮凝酵母颗粒快速生长的一个重要工艺条件, 但是由于絮凝酵母颗粒的机械强度较弱, 沉降过程抗扰动能力差, 要控制悬浮床生物反应器中的流动剪切, 并减轻沉降区的扰动, 悬浮床生物反应器操作时的通气量要控制在较低的水平, 一般以实现均匀悬浮为准则, 在有效容积 10m³ 悬浮床生物反应器中, 絮凝酵母颗粒培养时的通风量控制为 0.01vvm。

2.2 絮凝酵母颗粒的酒精连续发酵

当反应器中的絮凝酵母浓度达到 30g(d. w.)/L 时, 将通风量降低到 0.005vvm, 同时将流加的糖化液糖浓度提高到 16~18Bx, 进入酒精连续发酵操作。图 4、5、6 所示为絮凝酵母颗粒在有效容积 10m³ 悬浮床生物反应器中酒精连续发酵的运行结果。

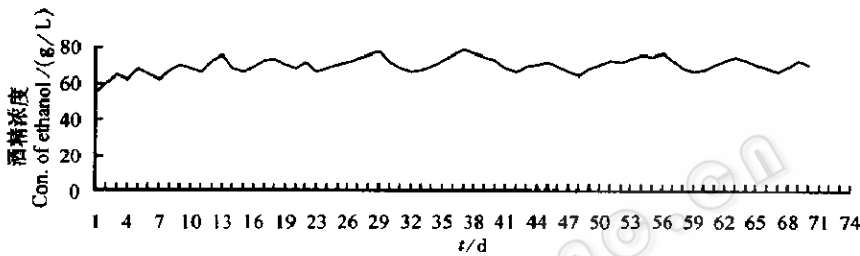


图 4 装置运行过程中跟踪检测发酵液中酒精浓度的结果
Fig. 4 Concentration of ethanol during continuous fermentation

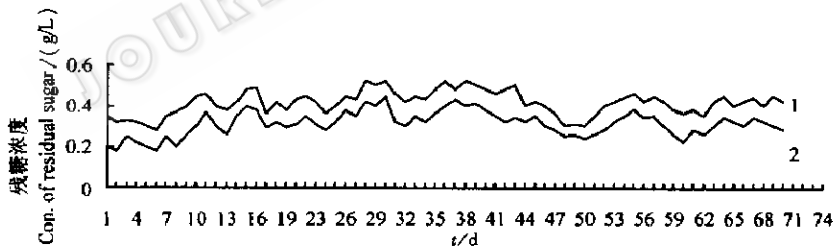


图 5 装置运行中跟踪检测发酵液中残糖浓度的结果
Fig. 5 Concentration of residual sugar during continuous ethanol fermentation

1 残总糖 Residual total sugar 2 残还原糖 Residual reducing sugar

表 1 所示为有效容积 10m³ 悬浮床生物反应器中酒精连续发酵运行过程各项工艺技术指标的平均值。

2.3 讨论

2.3.1 连续发酵工艺方案: 酒精连续发酵过程中酵母细胞生长和产物酒精生成的动力学特征均为典型的产物酒精抑制型^[8], 连续发酵工艺宜采用反应器多釜串联的工艺方案。但是对于絮凝酵母颗粒酒精连续发酵系统来说, 最突出的特点是酵母细胞在悬浮床生物

反应器中形成絮凝颗粒,菌体连续使用周期长,采用多釜串联的工艺,会给工业化生产带来如下二方面的问题:

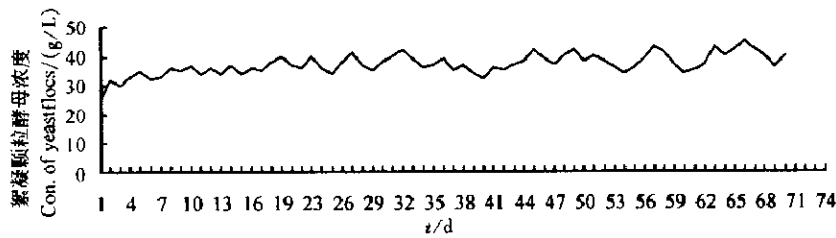


图6 装置运行中跟踪检测悬浮床生物反应器中絮凝颗粒酵母浓度
Fig.6 Concentration of yeast flocs in the bioreactor during continuous fermentation

表1 酒精连续发酵运行过程各项工艺技术指标的平均值
Table 1 Results of continuous ethanol fermentation using yeast flocs

稀释率 Dilution rate /h	糖化液总糖 Total sugar /(g/L)	糖化液还原糖 Reducing sugar /(g/L)	发酵液残总糖 Residual total sugar /(g/L)	发酵液残还原糖 Residual reducing sugar /(g/L)
0.1	155	141	4.8	3.7
酒精浓度 Ethanol /(g/L)	设备生产强度 Productivity /(g/L)	反应器中酵母浓度 Yeast flocs /(g/L)	得率系数 Y _{P/S}	收率* Yield coefficient
70	7.0	34.7	0.483	94.6

* 收率定义为实际得率系数 Y_{P/S}与理论得率系数 0.511 之比

1 前面反应器中产物酒精浓度低,底物糖浓度高,其它营养物质充足,在强化了产物酒精生成速率的同时,也强化了絮凝酵母颗粒的增殖,导致反应器中菌体过剩,影响反应器的稳定运行,同时降低了产物酒精对底物糖的得率系数。

2 连续发酵的最大威胁来自杂菌污染,酒精发酵系统因为 pH 值比较低,发酵液中又含有一定的酒精浓度,自身具有抗杂菌污染的能力,但在反应器多釜串联的情况下,前面反应器中产物酒精浓度很低,降低了对杂菌污染的抗性,而且一旦前面的反应器中出现染菌,随着发酵液在反应器之间的流动,杂菌污染将很快扩散到整个系统。

采用悬浮床生物反应器多釜并联的工艺,对于絮凝酵母颗粒酒精连续发酵过程来说,可以使工艺操作稳定。表 1 的结果表明,产物酒精的实际得率系数为 0.483,为理论值的 94.6%,高于传统酒精发酵工艺的指标,而且反应器中较高的酒精浓度有效地抑制了杂菌繁殖,保证了系统安全运行。

2.3.2 絮凝酵母颗粒酒精连续发酵系统对糖化工艺的要求:工业化生产均使用粗原料,如玉米、瓜干、薯干等,酒精发酵前需要经过糖化工艺将原料中的淀粉降解为可发酵性糖。在传统酒精发酵工艺中,发酵时间长,通常 30~40h,而糖化工艺进行初糖化,DE 值一般为 30~40,在发酵过程中进行后糖化。对于絮凝酵母颗粒酒精连续发酵过程来说,平均发酵时间只有 8~10h,发酵过程的后糖化作用减弱,要求糖化工艺实现深度糖化,DE 值

达到 90 左右,同时发酵底物不能带渣,糖化醪需要经过过滤处理。

2.3.3 絮凝酵母颗粒酒精连续发酵工艺的应用前景:絮凝酵母颗粒酒精连续发酵工艺已经实现了工业化放大,从装置半年多运行获得的技术和经济指标来看,展示了如下几方面的优点:

1 反应器的设备生产强度指标高,与传统的酒精发酵工艺相比,可提高 5~8 倍,实现了小设备、大生产。

2 生产过程实现了酵母细胞的固定化,省去了传统工艺的酒母制备过程,既简化了工艺操作,又在一定程度上降低了原料消耗,但是糖化醪过滤过程部分糖份进入滤渣,在工艺上应合理考虑。

3 清糖液发酵,不仅酒精精馏过程排出的污水污染物含量大大降低,仅为传统工艺的一半,COD 为 15000~20000mg/L,部分废水可以直接循环使用,而且发酵和精馏设备运行稳定,传热和传质状况明显改善。

这些技术和经济上的优点,展示了这一新工艺良好的工业化应用前景。目前,一套采用该工艺的万吨级规模的装置已经开始筹建。

参 考 文 献

- [1] 靳 艳,白凤武,冯朴荪等,微生物学报,1996,36(2):115~119.
- [2] 白凤武,秦金来,史今兰等,食品与发酵工业,1993,1:11~16.
- [3] 秦金来,白凤武,谢 健等,生物工程学报,1995,11(2):139~144.
- [4] 白凤武,冯朴荪,谢 健等,化工学报,1995,46(2):106~111.
- [5] Kida K, Yamadaki M, Asano S *et al.* *J Ferment Bioeng*, 1989, 68(2):107~111.
- [6] Kida K, Asano, Yamadaki M *et al.* *J Ferment Bioeng*, 1990, 69(1): 39~45.
- [7] 胡嗣明,张天杭,《酒精生产分析检验》.北京:轻工业出版社,1987,132~150.
- [8] Luong J H T. *Biotechnol Bioeng*, 1985, 27(3):280~285.

INDUSTRIAL SCALE-UP OF CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION USING YEAST FLOCS

Xie Jian Bai Fengwu Yun Zhanyou Li Ning He Xiuliang

(Institute of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract Inducing yeast cells to self-flocculate as a cell immobilization method, an industrial scale-up plant composed of 4 air-lift suspended-bed bioreactors in parallel and with a total volume of 400m³ was established and operated. During a more than 6 months continuous operation, the effluent contained ethanol of 70~80g/L and residual sugar less than 5g/L and the ethanol productivity of 7~8g/L·h⁻¹ was achieved.

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