

自絮凝酵母 SPSC01 在组合反应器系统中酒精连续发酵的研究 Continuous Ethanol Fermentation Using Self-flocculating Yeast Strain and Bioreactor System Composed of Multi-stage Tanks in Series

徐铁军¹, 赵心清¹, 周友超², 白凤武^{1*}

XU Tie-Jun¹, ZHAO Xin-Qing¹, ZHOU You-Chao² and BAI Feng-Wu^{1*}

1. 大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

2. 安徽丰原生物化学股份有限公司, 蚌埠 233010

1. Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China

2. BBCA Biochemical Co., Ltd., Bengbu 233010, China

摘 要 建立了一套由四级磁力搅拌发酵罐串联组成、总有效容积 4000 mL 的小型组合生物反应器系统, 其中一级罐作为种子培养罐。以脱胚脱皮玉米粉双酶法制备的糖化液为种子培养基和发酵底物, 进行了自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵的研究。种子罐培养基还原糖浓度为 100 g/L, 添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 KH_2PO_4 各 2.0 g/L, 以 0.017 h^{-1} 的恒定稀释速率流加, 并溢流至后续酒精发酵系统。发酵底物初始还原糖浓度 220 g/L, 添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5 g/L 和 KH_2PO_4 2.5 g/L, 流加至第一级发酵罐, 稀释速率分别为 $0.017, 0.025, 0.033, 0.040$ 和 0.050 h^{-1} 。实验数据表明, 自絮凝颗粒酵母在各发酵罐中呈部分固定化状态, 在稀释速率 0.040 h^{-1} 条件下, 发酵系统呈一定的振荡行为, 其他四个稀释速率实验组均能够达拟稳态。当稀释速率不超过 0.033 h^{-1} , 流出末级发酵罐的发酵液中酒精浓度可以达到 12% (V/V) 以上, 残还原糖和残总糖分别在 0.11% 和 0.35% (W/V) 以下。在稀释速率为 0.033 h^{-1} 时, 计算发酵系统酒精的设备生产强度指标为 $3.32(\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$, 与游离酵母细胞传统酒精发酵工艺相比, 增加约 1 倍。

关键词 自絮凝颗粒酵母, 酒精连续发酵, 振荡行为, 多罐串联生物反应器系统

中图分类号 TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0113-05

Abstract A continuous ethanol fermentation system composed of four-stage tank fermentors in series and with a total working volume of 4000 mL was established. The first fermentor was designated as the seed fermentor and the others for ethanol fermentation. A self-flocculating yeast strain developed by protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* was applied. Two-stage corn powder enzymatic hydrolyzate containing reducing sugar 100 g/L, together with 2.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and KH_2PO_4 , was used as yeast seed culture medium and fed into the seed fermentor at the dilution rate of 0.017 h^{-1} . Meanwhile, the hydrolyzate containing reducing sugar 220 g/L, added with 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and 2.5 g/L KH_2PO_4 , was used as ethanol fermentation substrate and fed into the second fermentor at the dilution rates of 0.017, 0.025, 0.033, 0.040 and 0.050 h^{-1} (based on the total working volume of the three fermentors), respectively. The chemostat states on which all of the monitoring parameters, including residual sugar, ethanol and yeast cell biomass concentrations, were maintained

Received: May 24, 2004; Accepted: June 18, 2004.

This work was supported by Grant from Chinese High-Tech Research Program (No. 2002AA647060).

* Corresponding author. Tel: 86-411-4706308; E-mail: fwbai@dlut.edu.cn

国家高新技术研究与发展计划(863)项目基金资助(No. 2002AA647060)。

relatively constant were observed for seed cultivation and ethanol fermentations when the fermentation system was operated at the dilution rates of 0.017, 0.025, 0.033 and 0.050 h^{-1} . Yeast cells were observed being partly immobilized because significant yeast cell biomass concentration differences between the broth out of and inside the fermentors were detected. Moreover, the oscillations of residual sugar, ethanol and yeast cell biomass concentrations were observed when the fermentation system was operated at the dilution rate of 0.040 h^{-1} . The broth containing more than 12% (V/V) ethanol and less than 0.11% (W/V) residual reducing sugar and 0.35% (W/V) residual total sugar was produced when the dilution rate was controlled at no more than 0.033 h^{-1} . The ethanol productivity was calculated to be $3.32(\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$ for the dilution rate of 0.033 h^{-1} , which increased nearly 100% compared with that for conventional ethanol fermentation technologies using freely suspended yeast cells.

Key words self-flocculating yeast cells, continuous ethanol fermentation, oscillation, tanks in series fermentation system

近年来,以石油为代表的矿物质资源贮量的不断减少及其过量开发利用导致生态环境的不断恶化,促使人们开始重新注重开发利用生物质资源,生产能源产品和化学品,以逐步减轻对石油资源的依赖。其中微生物发酵法生产的酒精,作为可再生清洁能源,再一次引起了世界各国的高度重视。我国政府也决定“十五”期间以先试点后推广的方式发展燃料酒精,并批准在吉林、安徽、河南等地建设几个大型燃料酒精工程。然而,现阶段以玉米、小麦、早籼稻等粮食作物为原料生产燃料酒精,成本高的问题十分突出。因此,研究开发酒精发酵新工艺新技术,最大限度地降低生产成本,具有十分重要的意义。

与现有各种酒精发酵工艺技术相比,自絮凝颗粒酵母酒精发酵新工艺具有如下几方面的突出优点^[1-3]:①在对原料进行前处理分离脂肪、蛋白、纤维等组分的基础上,液化糖化后得到不含残渣的糖液,进行清液发酵,提高了原料综合利用程度;②在特殊设计的悬浮床生物反应器中,自絮凝颗粒酵母可以实现完全固定化,细胞密度显著提高,平均发酵时间缩短,发酵罐设备生产强度相应提高;③原料的前处理及酵母细胞的完全固定化,使进入后续精馏系统的发酵液十分清洁,精馏过程产生的废糟液COD可以由现有酒精发酵工艺的 $30000\text{ mg/L} \sim 50000\text{ mg/L}$ 降低到 $5000\text{ mg/L} \sim 8000\text{ mg/L}$,废糟液能够以比较大的比例在发酵系统中直接循环使用,实现清洁生产。目前,自絮凝颗粒酵母酒精发酵悬浮床生物反应器已经放大到了 100 m^3 的容积规模,并配套建设了万吨级规模的产业化示范工程装置。

然而,我国现有的酒精发酵行业在原料前处理路线和发酵罐结构设计与目前开发的自絮凝颗粒酵母酒精发酵体系有非常大的差异,能否将这一技术经济指标先进的发酵工艺应用到现有酒精发酵装置的技术改造中,提升其工艺技术水平,也是一个亟

待解决的问题。

本文模拟现有酒精发酵行业普遍采用的发酵罐结构,建立了一套与悬浮床生物反应器^[4]完全不同的生物反应器系统,该系统由三级串联操作的磁力搅拌发酵罐和一个种子罐组成,实验研究了自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵过程。

1 材料和方法

1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母菌株 SPSC01,系由酒精发酵性能优良的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和具有自絮凝能力的粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)为双亲株,采用原生质体融合技术选育,大连理工大学生物科学与工程系保存。

1.2 主要原材料与试剂

原料:干法脱胚脱皮玉米粉为铁岭市玉米综合加工厂产品。

试剂: α -淀粉酶糖化酶为诺维信公司的商品酶制剂。磷酸氢二铵、磷酸二氢钾由沈阳化学试剂一厂生产。

1.3 糖化液及培养基

1.3.1 糖化液的制备:糖化液制备在...工作容积 25L 的搅拌罐中进行,将脱胚脱皮玉米粉与 60°C 左右的温水按 1:2.5 的比例配制成粉浆,并按每千克玉米粉 0.6mL 的比例加入 α -淀粉酶,升温至 $85^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$,保温液化 1h,然后降温至 $60^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$,按每千克玉米粉 1.2mL 的比例加入糖化酶,保温糖化 10h \sim 12h 后,过滤得糖化液,供整个发酵系统使用。

1.3.2 摇瓶种子培养基:葡萄糖为 30 g/L,酵母粉 3.85g/L,蛋白胨 3.0g/L。灭菌后供摇瓶种子培养使用。

1.3.3 种子罐培养基(与扩大培养基相同):1.3.1 制备的糖化液,还原糖浓度调节为 100g/L,添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 KH_2PO_4 各 2.0g/L,灭菌后供种子罐接

种、连续培养和各发酵罐接种时使用。

1.3.4 发酵培养基:1.3.1 制备的糖化液,还原糖浓度控制为 220g/L,添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5g/L, KH_2PO_4 2.5g/L^[5]。

1.4 分析方法

1.4.1 乙醇:由 Agilent 6890 气相色谱仪内标法测定,色谱条件:毛细管柱,氮气为载气,柱温 90℃,采用氢火焰检测器,以正丁醇为内标物。

1.4.2 葡萄糖、还原糖及总糖的测定:葡萄糖用 SBA-50B 生物传感分析仪进行分析,还原糖直接由斐林反滴定法测定,总糖经酸水解后,也由斐林反滴定法测定^[6]。

1.4.3 酵母干重:取样后置于预先烘干称重的滤纸上过滤,并用蒸馏水洗涤菌体 2~3 次,然后置 85℃ 的恒温箱中烘干至恒重后称重。

1.5 实验装置及工艺流程

本实验自行加工了 4 个有效容积 1000 mL、带有保温夹套的玻璃发酵罐,内置不锈钢挡板,并配置磁力搅拌装置(上海司乐仪器厂生产的 S21 型小型磁力搅拌器,搅拌子为 $\phi 8 \times 10\text{mm}$,调节搅拌速度使自絮凝颗粒酵母悬浮而不发生沉积现象),整个实验装置的工艺流程如图 1 所示。

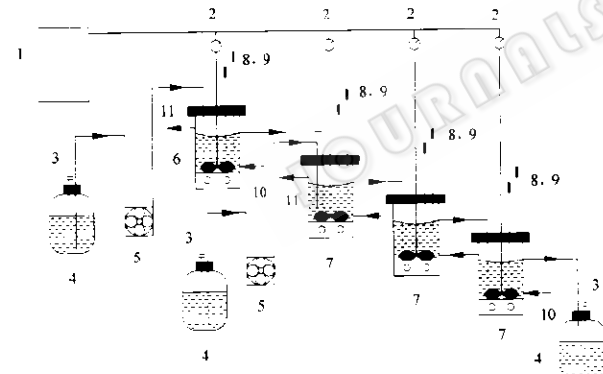


图 1 自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵实验装置工艺流程图

Fig. 1 Process diagram of continuous ethanol fermentation using self-flocculating yeast cells

1: air compressor; 2: air flow meters; 3: filters; 4: storage tanks for media and broth; 5: peristaltic pumps; 6: seed fermenter; 7: fermenters; 8: pH probes and controllers; 9: temperature probe and controllers; 10: thermostat water inlet; 11: thermostat water outlet.

种子培养用培养基用蠕动泵按照设定的稀释速率输送到种子罐中,种子罐的温度控制为 $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,从种子罐中流出的自絮凝颗粒酵母种子悬浮液直接溢流进入第一级发酵罐。发酵培养基用蠕动泵按照设定的稀释速率全部输送到第一级发酵罐

中,并依次溢流进入第二级和第三级发酵罐。由于发酵状态下各发酵罐产生的热量按第一级、第二级、第三级的顺序依次递减,系统保温水逆向按第三级、第二级、第一级的顺序进入各发酵罐,控制第一级发酵罐的温度为 $(33 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,第二级发酵罐和第三级发酵罐的温度可以保持在 $30 \sim 32^\circ\text{C}$,满足自絮凝颗粒酵母酒精发酵的温度要求。各罐的 pH 值控制在 4.2 ± 0.2 ,使用氨水调节。

2 结果与讨论

2.1 装置运行状态考察

实验中种子罐保持恒定的稀释速率 ($D = 0.017\text{h}^{-1}$) 运行,通气量为 0.01。在两个多月的实验运行期间,流出种子罐的培养液中残还原糖和残总糖分别稳定在 0.1% 和 0.3% (W/V),酒精浓度稳定在 4.6% (V/V),罐内和流出种子罐培养液中的生物量分别稳定在 9.2g/L 和 4.1g/L,达到了恒化状态(实验运行中为了判定种子罐内的混合状态,从不同位置采样测定各项指标,没有发现明显差别),为后续发酵系统补充了新鲜的种子,保证了后续发酵系统的稳定运行。

发酵装置连续运行 63d,实验数据表明:除在稀释速率 $D = 0.040\text{h}^{-1}$ 条件下,流出各级发酵罐的发酵液中酒精浓度、残糖浓度和生物量浓度有比较大的波动,呈振荡行为外(在其平均值上下几乎对称分布,这种现象在酿酒酵母酒精发酵中也曾报道过,但诱发这一现象的机理还没有阐明^[7,8])。其余几组稀释速率条件下,各发酵罐均能够保持拟稳态,即稀释速率改变后,系统经过一段时间的自衡调整,各发酵罐内酒精浓度、残糖浓度和自絮凝颗粒酵母浓度趋于稳定(实验运行中为了判定发酵罐内的混合状态,从不同位置采样测定各项指标,虽然酵母浓度有一定差异,但残糖和酒精浓度基本相同),如图 2 所示。

2.2 系统稀释速率对发酵过程技术指标的影响

表 1 所示为各稀释速率条件下,末级发酵罐流出发酵液的各项技术指标的平均值。可见,当系统稀释速率比较低时 ($D = 0.017\text{h}^{-1}$),种子罐输送过来的种子培养液对后续发酵系统的稀释作用明显,导致发酵液中酒精浓度降低,仅为 9.50% (V/V),残还原糖和残总糖分别为 0.05% 和 0.15% (W/V)。当系统的稀释速率提高到 0.025h^{-1} 时,发酵液中酒精浓度迅速提高到 12.43% (V/V),而残糖指标仅略有提高,残还原糖和残总糖分别为 0.10% 和 0.29% (W/V)。进一步将系统稀释速率提高到 0.033h^{-1} ,

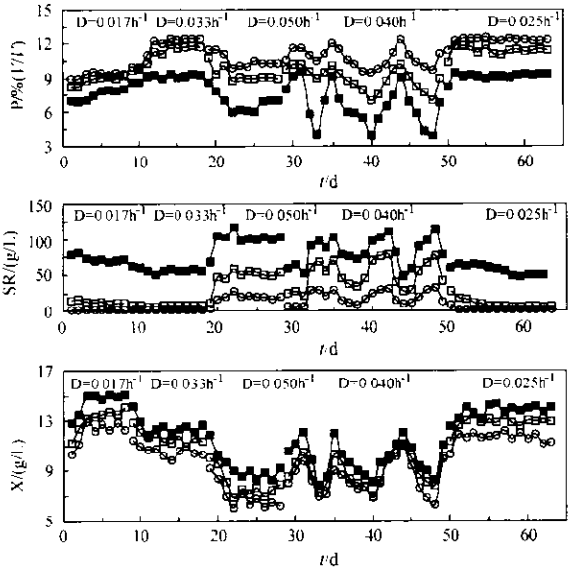


图2 不同稀释速率条件下各发酵罐内酒精浓度、残糖浓度和酵母浓度随时间的变化情况

Fig. 2 Ethanol, residual sugar and biomass versus time at dilution rates of 0.017 (1~8d), 0.033 (9~18d),

0.05 (19~28d), 0.040 (29~49d) and 0.025 h⁻¹ (50~63d)

P: ethanol, S_R: residual reducing sugar, X: biomass.

—■— Tank 1; —○— Tank 2; —△— Tank 3.

发酵液中酒精浓度和残糖浓度均没有明显改变,但系统的设备生产强度指标从稀释速率为 0.025h⁻¹ 条件下的 2.45(g·L⁻¹·h⁻¹) 提高到 3.15(g·L⁻¹·h⁻¹), 提高幅度达到 28.6%。在此基础上继续提高系统的稀释速率,虽然生产强度指标随之提高,但酒精浓度明显下降,残糖浓度明显升高。

2.3 自絮凝颗粒酵母在各发酵罐中的特征

自絮凝颗粒酵母细胞发酵的最佳状态是在反应器内均匀悬浮,这可以在专门设计的悬浮床生物反应器中实现,并通过设计内部分离结构,实现自絮凝

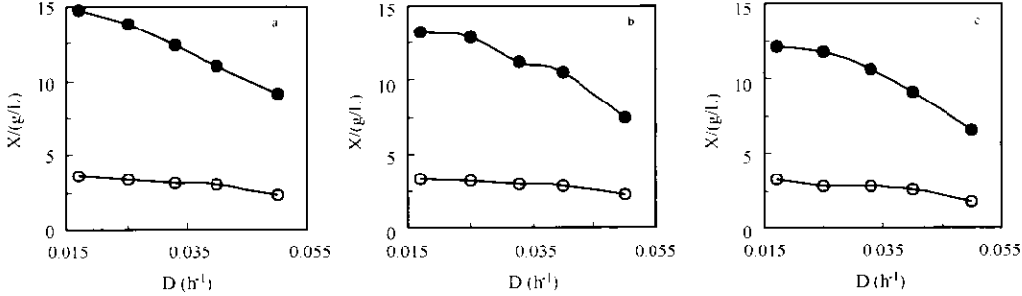


图3 不同稀释速率条件下各发酵罐内部和流出发酵液中生物量浓度的比较

(a, b 和 c 分别代表第一、第二和第三级发酵罐)

Fig. 3 Comparisons of biomass concentrations in the broth inside and out of fermentors at different dilution rates

(a, b and c indicated for the first, second and third fermentors, respectively)

—●— Xin; —○— Xout

表1 不同稀释率下末级发酵罐出口发酵液各指标的平均值

Table 1 Average values of fermentation parameters under different dilution rates

Dilution rate/h ⁻¹	Fermentation parameters					
	P/% (V/V)	S _R /% (W/V)	S _T /% (W/V)	X/ (g/L)	q/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	
0.017	9.50	7.50	0.05	0.15	3.2	1.29
0.025	12.43	9.81	0.10	0.29	2.9	2.45
0.033	12.11	9.56	0.11	0.35	2.8	3.15
0.040	11.56	9.12	0.91	1.10	2.6	3.65
0.050	9.63	7.61	2.70	3.00	1.8	3.81

S_T: residual total sugar concentration; and q, ethanol productivity.

颗粒酵母细胞的完全固定化⁴。在本实验研究采用的生物反应器系统中,由于磁力搅拌的搅拌强度比较弱,虽然基本上满足了反应器内部混合的要求,残糖浓度和酒精浓度基本均匀,但不足以使毫米级大小的自絮凝颗粒酵母完全达到均匀悬浮,特别是种子罐和各发酵罐溢流出口附近,导致反应器内部的生物量浓度与流出发酵液中的生物量浓度有比较大的差异,如图3所示,自絮凝颗粒酵母在这样的反应器系统中呈不完全固定化,或部分固定化状态,有利于提高发酵罐中酵母细胞密度。

2.4 实验结果的比较

将取得的实验结果与现有酒精发酵工艺和我们完全按照自絮凝颗粒酵母酒精发酵工艺特点设计的悬浮床反应器系统的运行指标进行比较,结果如表2所示。

从表2的结果可以看出,虽然本实验取得的技术指标低于悬浮床生物反应器系统自絮凝颗粒酵母发酵的运行指标,但与现有酒精发酵工艺技术相比,其发酵时间显著缩短,发酵罐的设备生产强度增加

表 2 几种工艺方案指标的比较

Table 2 Comparisons between conventional ethanol fermentations with those using the self-flocculating yeast cells (flocs)

Process strategies	Fermentation results	Freely suspended yeast cell system ^a	Tanks in series system for flocs	Suspended-bed system for flocs ^b
P	(V/V)/%	11.0 ~ 12.0	12.0 ~ 13.0	12.0 ~ 13.0
	(W/V)/%	9.08 ^c	9.98 ^c	9.98 ^c
S	Reducing	0.25	< 0.20	< 0.20
	Total	0.50	< 0.35	< 0.35
	X/(g·L ⁻¹)	3.0 ~ 5.0	7.0 ~ 14.0	40 ~ 60
	t/h	50 ~ 60	25 ~ 35	20 ~ 25
	q/(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.65 ^c	3.32 ^c	4.44 ^c

t: average ethanol fermentation time.

a: data were kindly provided by Haarun Jinyu Group, Heilongjiang, China;

b: data were achieved on a pilot ethanol fermentation plant using self-flocculating yeast cells;

c: calculated based on average ethanol concentration and fermentation time required.

达到 1 倍。尽管这些实验数据来自小型装置,在进一步放大过程中可能会产生一定的放大效应,但在国家将要发展燃料酒精,现有酒精发酵装置需要提高产量的条件下,这一自絮凝颗粒酵母体系在现有酒精发酵装置改造中还是具有比较大的技术优势。

3 结论与展望

(1)实验数据和装置运行状况表明,自絮凝颗粒酵母酒精发酵可以在由通用发酵罐串联和种子罐组成的组合反应器系统上进行,为现有酒精发酵装置改造,提升其工艺技术水平提供了一条可选择的技术路线。

(2)现有发酵系统搅拌强度不足,有利于自絮凝

颗粒酵母在发酵罐中实现一定程度的固定化,提高了发酵罐中酵母细胞密度,缩短了平均发酵时间。

(3)在特定的稀释速率条件下($D = 0.040\text{h}^{-1}$),发酵系统呈振荡行为,诱发这种振荡现象的机理有待于进一步研究。

(4)取得的实验结果需要进一步进行中试或生产规模装置的试验验证。

REFERENCES(参考文献)

[1] Bai FW (白凤武). Application of self-immobilization cell technology for biochemical engineering. *Prog in Biotechnol* (生物工程进展), 2000, 20(2): 32 ~ 36

[2] Hoshino K, Tanikuchi M, Marumoto H *et al*. Continuous ethanol production from raw starch using a reversibly soluble-auto precipitating amylase and flocculating yeast cells. *J Ferment Bioeng*, 1990, 69: 228 ~ 233

[3] Liu CB (刘传斌), Bai FW (白凤武), Shao M (邵梅) *et al*. High concentration ethanol continuous fermentation using yeast flocs. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2001, 41(3): 367 ~ 371

[4] Bai FW (白凤武), Feng PS (冯朴荪), Xie J (谢健) *et al*. Hydrodynamic behavior of 500 L suspended-bed bioreactor suitable for continuous ethanol fermentation using flocs. *Journal of Chemical Industry and Engineering* (化工学报), 1995, 46(1): 106 ~ 111

[5] Wang JL (王江龙), Zi LH (孜力汗), Bai FW (白凤武). Optimization of growth parameters during the continuous culture of flocculating yeast strain SPSC01. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2004, 44(1): 93 ~ 95

[6] Wuxi Light Industry College (无锡轻工业学院). The analysis for Industry fermentation, Beijing (北京): Light Industry Publishing Company (轻工业出版社), 1980

[7] Bai FW, Chen LJ, Anderson WA and Moo-Young M. Parameter oscillations in very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system. *Biotechnol & Bioeng*, 2004, 88(5): 558 ~ 566

[8] Borzani W. Variation of the ethanol yield during oscillatory concentrations changes in undisturbed continuous ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molssses. *W J Microbial & Biotechnol*, 2001, 17: 253 ~ 258