

多级串联悬浮床反应器系统中自絮凝颗粒酵母乙醇连续发酵耦合废糟液直接全循环使用的研究

Continuous Ethanol Fermentation Using Self-flocculating Yeast in Multi-stage Suspended Bioreactors Coupled with Directly Recycling of Waste Distillage

严 正¹, 孜力汗¹, 李 宁¹, 汪 芳², 白凤武^{1*}

YAN Zheng¹, ZI Li-Han¹, LI Ning¹, WANG Fang² and BAI Feng-Wu^{1*}

1. 大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

2. 安徽丰原集团工程设计部, 蚌埠 233010

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

2. Department of Engineering Design, BBCC, Bengbu 233010, China

摘 要 在一套四级串联悬浮床生物反应器系统中,以双酶法制备的玉米粉糖化液为底物,进行了废糟液全循环条件下自絮凝颗粒酵母乙醇连续发酵的实验研究。在实验中,每隔 5 d 将从末级反应器收集到的发酵液集中精馏处理,得到的废糟液直接用于玉米粉调浆制糖。系统连续运行了 120d,共进行了 24 批次实验,数据分析表明系统达到了平衡状态。在平均发酵时间为 20h 条件下,发酵终点乙醇浓度平均为 11.7%(V/V),残还原糖浓度平均为 7.9g/L,装置运行平稳。这些工作为自絮凝颗粒酵母乙醇发酵耦合废糟液直接全循环使用,实现污染物源头减废、清洁生产奠定了理论和实验基础。

关键词 自絮凝颗粒酵母,乙醇连续发酵,悬浮床生物反应器,废糟液全循环

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0628-05

Abstract A fermentation system composed of four airlift suspended-bed bioreactors in series and with a total working volume of 4800 mL was established. Continuous ethanol fermentation using self-flocculating yeast *SPSC01*, a fusant from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, and two-stage enzymatic hydrolyte of dry milling corn powder, was continuously run for 120 days. All of the backset distillage collected after distilling the final beer was used to mix the corn powder and no any other wastes except the solid residue of corn powder was discharged from the fermentation system, which guaranteed the distillage to be recycled at its maximum. The experimental results revealed that both ethanol and residual sugar in the final beer could be maintained relatively stable with their average levels of 93.6 and 7.9 g/L, respectively when the fermentation system was operated at the dilution rate of 0.05 h⁻¹. Parameter oscillations reported previously were also observed for the first and second bioreactors, but were effectively attenuated thereafter, which indicated that high yeast cell concentrations resulted from the self-immobilization of this special self-flocculating strain contributed to damp these oscillations. The monitoring of residual nitrogen and phosphor indicated that the accumulations of these nutritional elements occurred and the amount of these inorganic salts supplemented in the substrate should be decreased properly.

Key words self-flocculating yeast, continuous ethanol fermentation, airlift suspended-bed bioreactor, distillage recycling

Received: January 12, 2005; Accepted: March 28, 2005.

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

* Corresponding author. Tel 86-411-84706308; E-mail fwbai@dlut.edu.cn

国家高技术发展计划(863)项目(No.2002AA647060)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

目前,国内外淀粉质原料乙醇发酵技术所能达到的终点乙醇浓度一般在11%(V/V)左右,精馏过程产生的大量废糟液,一般需要采用多效蒸发装置处理,设备投资大、运行能耗高的问题非常突出,严重影响了这一新能源产业的发展。因此,研究开发新的废糟液处理技术,降低废糟液处理的设备投资和运行能耗,具有十分重要的意义。

废糟液直接全循环使用是最简洁经济的技术手段,它不增加设备投资,不产生运行费用。尽管很早就有这方面的探索性研究工作报道^[1-4],然而均没有在工业化生产装置上得以实施。其主要原因在于:一方面目前普遍采用的带渣发酵的技术使得原料中的蛋白、脂肪、纤维等副产品在精馏操作中易与发酵残糖及酵母细胞代谢副产物等发生反应,产生对酵母细胞生长和乙醇发酵具有强烈抑制作用的有害副产物;另一方面,大量游离酵母细胞无法与糟渣分离,进入后续精馏工段后,酵母细胞自溶释放大蛋白、脂肪、核酸等生物大分子,严重干扰废糟液的直接循环使用。因此,实现乙醇发酵耦合废糟液直接全循环使用的理论和技术基础在于从工艺技术和工程上分别消除来自酵母细胞和原料的这些不利影响。

自絮凝颗粒酵母乙醇连续发酵是一种与传统乙醇发酵工艺完全不同的新技术^[5-8],已经建立了万吨级规模的产业化示范工程装置,成为国家“十五”燃料乙醇产业发展的关键支撑技术。这一新工艺不仅其发酵本身的技术指标优于现有乙醇发酵工艺,而且其对原料进行前处理分离残渣实现清液发酵及酵母细胞以自絮凝颗粒的形态在发酵罐中实现完全固定化的特点,保证了原料残渣和酵母细胞均不进入后续精馏工段。数据分析表明,从粗馏塔排出塔釜液的COD指标,可以由现有乙醇发酵工艺的50 000mg/L左右,降低到20 000mg/L左右,总量削减60%,为乙醇发酵耦合废糟液直接全循环使用创造了十分有利的条件。

本文在一套四级悬浮床反应器串联组成的小型发酵装置上,对自絮凝颗粒酵母乙醇发酵耦合废糟液直接全循环使用的工艺过程进行了实验研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母(*SPSC01*)是粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)变异株通过原生质体融合

而得到的融合株。该菌株具有两亲株的优点,乙醇发酵性能优良且具有良好的自絮凝特性,大连理工大学生物工程系保藏。

1.2 主要原辅材料与试剂

脱皮脱胚玉米粉由黑龙江金玉公司赠送,液化酶和糖化酶由诺维信公司赠送; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 KH_2PO_4 均为沈阳化学试剂厂产品。

1.3 种子培养基

酵母粉4g/L,蛋白胨3g/L,葡萄糖分别为30和100g/L,于121℃温度条件下灭菌20min,分别用于30℃下摇瓶种子培养和发酵罐接种。

1.4 发酵培养基

发酵液乙醇蒸馏后得到的废糟液全部用来配制粉浆,该废糟液与工业上燃料乙醇双塔精馏条件下粗馏塔排出的塔釜液组成基本相同。使用自来水补充系统水分损耗,保证工艺要求的粉浆配制料水比,粉浆温度调节到55~60℃时按照每克原料15u加入 α -淀粉酶,升温到95℃左右,液化90min,然后冷却至65℃,用 H_2SO_4 调节pH为4.5左右,按每克原料150u加入糖化酶液化,糖化12h,DE值可以达到90以上,过滤后得到糖化液,还原糖浓度调节到220g/L,添加1.5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和0.5g/L KH_2PO_4 ,于105℃温度条件下灭菌15min,供后续发酵使用。

1.5 培养方法

1.5.1 摇瓶培养 250mL锥形瓶装入100mL种子培养基并接种,于30℃、150r/min条件下置于摇床恒温培养。24h后弃去上清液,更换培养基,并根据反应器接种要求的种子量分瓶扩大培养。

1.5.2 反应器扩大培养 装入葡萄糖浓度为100g/L的种子培养基,控制温度于30℃,按约10%的接种量接种,接种后以0.05vvm的速率通入无菌空气,间歇培养至葡萄糖浓度降低至1g/L以下后,开始流加培养,酵母细胞浓度达到30g/L以上,即可开始流加发酵培养基,进入发酵阶段。

1.5.3 乙醇连续发酵 酵母培养结束后,将各发酵罐串联起来,开始向第一级发酵罐连续流加发酵培养基。工艺条件为:基于反应器总有效容积的稀释率为 0.05h^{-1} ,各反应器通气量为0.037vvm,pH值4.2~4.5,温度控制在30~32℃,酵母密度控制在30~60g/L,超过60g/L时,则适量采出酵母悬浮液。

1.6 分析方法

葡萄糖含量用SBA生物传感分析仪(山东省生物科学研究所)分析;二硝基水杨酸法测定还原糖;

乙醇使用国家标准乙醇计,比重法测定;生物量由干重法测定。

1.7 实验工艺方案流程及发酵装置

从图1可以看出,尽管整个系统没有向外排放废糟液,但在向外输送糖化醪过滤得到滤渣的同时会有少量废糟液随滤渣离开系统,形成一个高沸点

副产物出口。随废糟液循环使用时间的延长,系统积累的高沸点副产物浓度逐渐提高,随滤渣离开系统的高沸点副产物量随之增大,最终系统副产物积累和离开会达到平衡。若在系统达到平衡条件下,这些高沸点副产物对自絮凝颗粒酵母生长和乙醇发酵没有明显抑制效应,则该工艺方案就是可行的。

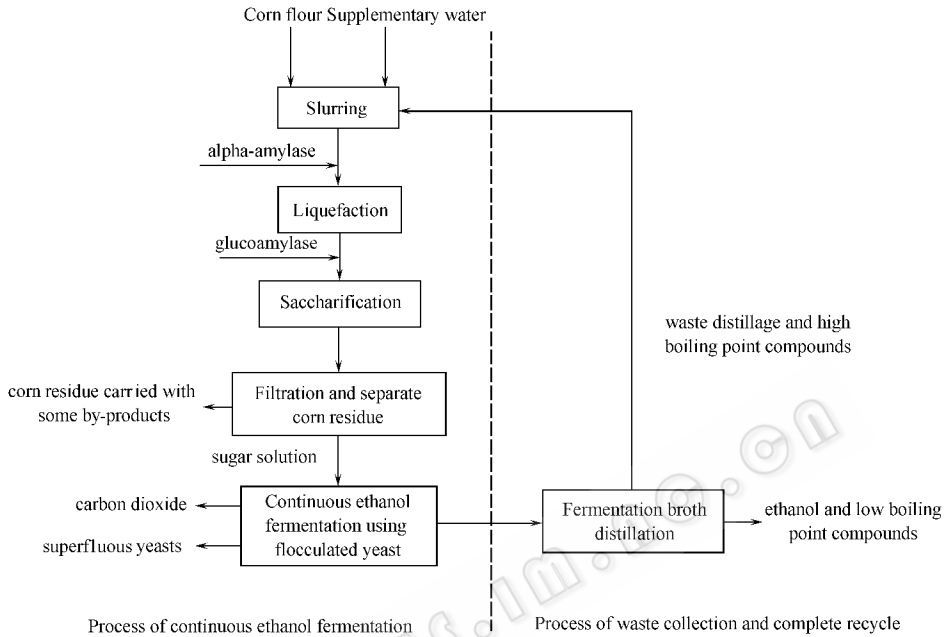


图1 乙醇连续发酵耦合废液直接全循环使用工艺流程

Fig.1 Continuous ethanol fermentation coupling with waste distillate complete recycle

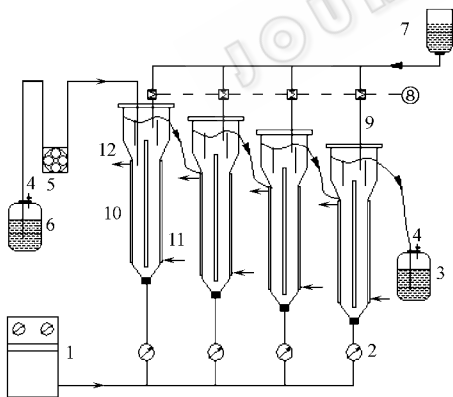


图2 自絮凝酵母酒精连续发酵四级串联悬浮床生物反应器装置流程图

Fig.2 Continuous ethanol fermentation using self-flocculating yeast and a bioreactor system composed of four-stage suspended-bed bioreactors in series

1: air compressor; 2: air filters and flowmeters; 3: broth storage tank; 4: vent hole; 5: peristaltic pump; 6: medium storage tank; 7: ammonia water storage tank; 8: pH and temperature controllers; 9: pH and temperature probes; 10: suspended-bed bioreactors; 11: thermowater inlet; 12: thermowater outlet.

级串联的悬浮床反应器系统中进行。原糖浓度为220g/L的糖化液从第一级发酵罐进入反应系统,依靠位差自行溢流至最后一级发酵罐。将每隔5天收集到的发酵液蒸馏,得到的废糟液用于玉米粉调浆制备糖化液,实验装置及流程如图2所示。

2 结果与讨论

2.1 废糟液全循环条件下各级反应器发酵指标的考察

图2所示为生物反应器系统完全进入发酵状态后,连续运行120d反应器中残糖和乙醇浓度变化情况,结果如图3所示。

实验结果表明,糟液直接全循环使用并没有导致各发酵罐中乙醇浓度的明显降低。残还原糖浓度如图3所示,由于部分非优先利用的还原性糖积累而逐渐升高,在4个循环周期后开始达到平衡点,并围绕平衡点上下一定范围内波动。这部分还原糖将会随废糟液的循环而重新进入发酵系统被利用。各反应器从前至后乙醇浓度平均值为8.7%、11.2%、11.5%和11.7%(w/w),残还原糖浓度的平均值为

乙醇连续发酵实验在单级有效容积1200mL、四

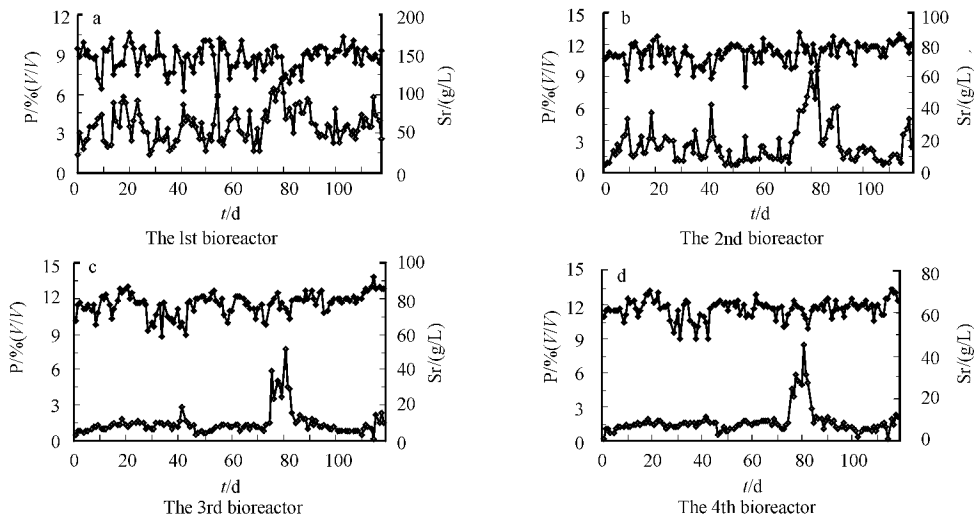


图 3 酒精(♦)和残还原糖(○)随时间的变化(P和S_r分别代表酒精和残还原糖)

Fig.3 Ethanol(♦) and residual reducing sugar(○) versus running time (P and S_r for ethanol and residual reducing sugar , respectively)

a the 1st bioreactor ; b the 2nd bioreactor ; c the 3rd bioreactor ; d the 4th bioreactor.

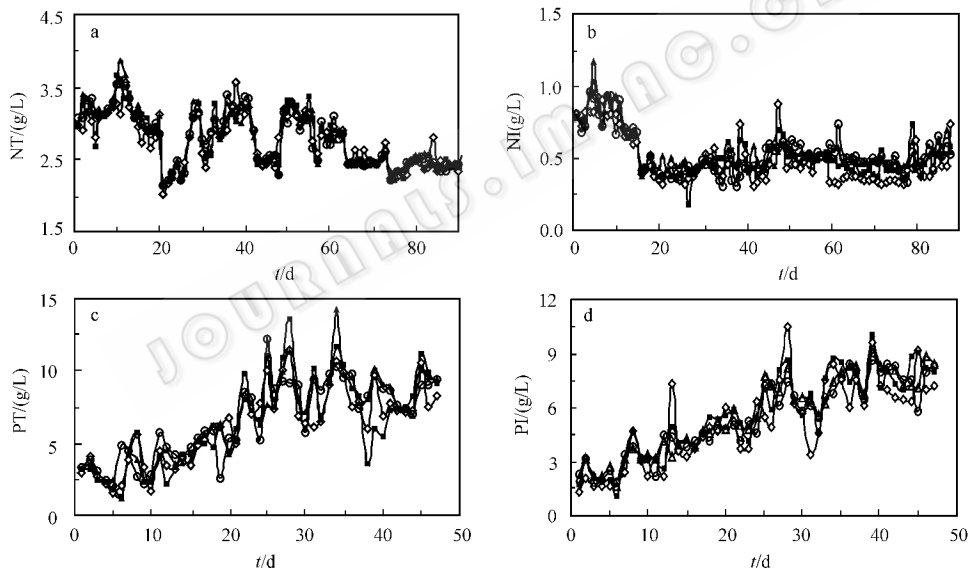


图 4 氮 磷随时间的变化 (NT,NI,PT,PI 分别代表总氮,无机氮,总磷和无机磷含量)

Fig.4 Residual N(total , NT and inorganic , NI) and P(total , PT and inorganic PI) versus running time

(symbol ■,◇,▲ and ○ for the 1st , 2nd , 3rd and 4th bioreactor respectively)

56.6、14.3、7.9 和 7.2 g · L⁻¹ ,没有呈现高沸点副产物抑制现象。从图 3 的实验数据还可以看出 ,第一级发酵罐中乙醇浓度和残还原糖浓度波动幅度比较大 ,呈现一定程度的振荡行为 ,但随后各级发酵罐中这种波动现象逐渐减弱 ,第四级发酵罐基本上能够完全弱化前面发酵罐中的振荡 ,达到准稳态。

酵母细胞乙醇连续发酵过程中的不稳定现象及振荡行为 ,在游离酵母细胞体系已经见诸报道^[9] ,在四级串联的小型搅拌式生物反应器系统中也观察到

了类似的现象^[10] ,但诱发这种不稳定现象的机理还没有阐明。我们的四级串联悬浮床反应器系统在 0.05h⁻¹ 稀释速率下 ,第一级反应器中也观察到了类似的振荡行为 ,但在后续反应器中很快被弱化 ,表明酵母细胞自絮凝产生的固定化效果对弱化振荡行为有明显作用。

装置运行第 75 ~ 85 天时 ,出现的残还原糖浓度异常升高和乙醇浓度降低 ,是装置供电故障导致系统不稳定所致。

2.2 废糟液全循环条件下系统 N 和 P 积累情况的考察

N 和 P 这两种重要营养元素浓度的变化,一方面能够在一定程度上反映酵母细胞代谢状态,另一方面还可以反映废糟液中物质的积累情况,有助于合理调整发酵培养基中无机盐添加量。装置运行过程中,我们每天监测各发酵罐中无机氮、总氮、无机磷和总磷浓度的变化情况。图 4 为进入发酵状态后以上参数的变化。

图 4(a)和(b)所示的各发酵罐中总氮和无机氮浓度的检测结果显示,装置完全进入发酵状态的前 20 天,总氮和无机氮浓度均呈逐渐降低趋势。分析其原因在于,酵母细胞生长和发酵过程副产的有机酸会使用以调节 pH 值的氨水大量消耗,同时也引入了大量氮源。有机酸及其阴离子和 NH_4^+ 随着废糟液循环过程在发酵系统中积累,经过 4 个循环周期后,发酵液的 pH 缓冲性体现出来,发酵过程 pH 值自身达到稳定不再引入氨水进行调节,氮浓度趋于稳定。无机氮浓度在 20d 以后趋于平衡,各发酵罐中平衡浓度差别不大,均为 0.5g/L 左右。然而,图 4(b)所示总氮的波动幅度较大,表明系统中自絮凝颗粒酵母细胞的生长、衰老、死亡、自溶及从各发酵罐中采出多余酵母这些影响生物量浓度和状态的因素之间达到平衡所需时间是比较长的,约 2 个月以后,系统总氮浓度也趋于平衡稳定,各发酵罐中平衡浓度差别也不大,均为 2.5g/L 左右。

图 4(c)和(d)所示装置运行期间各发酵罐中磷的监测情况表明,虽然装置运行 40d 以后总磷和无机磷的浓度也逐渐趋于平衡稳定,平衡浓度分别为 9.5g/L 和 8.0g/L 左右,各发酵罐之间差异不大。无机磷与总磷差别不大说明磷源作为酵母细胞合成物质在发酵过程当中被利用量非常小,图中体现的主要是无机磷随废糟液循环的积累效应。图中平衡浓度较高,表明装置运行达到平衡点时,培养基中添加的磷酸盐已经过量。因此,在废糟液直接全循环使用时,培养基中添加的磷酸盐量应相应降低,以降低辅助原料消耗,减少浪费。

3 结论

实验装置的 120d 连续稳定运行表明,装置运行达到平衡状态后积累的副产物没有对乙醇发酵过程产生明显的不利影响,自絮凝颗粒酵母乙醇连续发

酵耦合废糟液直接全循环使用的工艺方案在技术上是可行的,为这一新的乙醇发酵技术实现污染物源头减废、清洁生产奠定了良好基础。对系统 N 和 P 积累情况的监测表明,废糟液直接全循环使用导致发酵液中残留无机盐积累,从提高生产过程经济性角度考虑,发酵培养基中无机盐添加量应适当降低。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kim Jae-Sok, Kim Byoung-Gee, Lee Chung-Hak *et al.*. Development of clean technology in alcohol fermentation industry. *J Cleaner Prod*, 1997, **5**(4):263-267
- [2] Lu X, Li YF, Duan ZY *et al.*. A novel, repeated fed-batch, ethanol production system with extremely long term stability achieved by fully recycling fermented supernatants. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(21):1819-1826
- [3] Brain Maiorella, Harvey W Blanch, Charles R Wilke. By-product inhibition effect on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983, **25**(1):103-121
- [4] Maiorella BL, Blanch HW, Wilke CR. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, **26**(10):1155-1166
- [5] Bai FW(白凤武), Jin Y(靳艳), Feng PS(冯朴荪) *et al.*. Studies of ethanol fermentation using a fusant SPSC flocs—description of flocs, growth and ethanol fermentation kinetics. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15**(4):455-461
- [6] Qin JI(秦金来), Bai FW(白凤武), Xie J(谢健) *et al.*. A study of growth kinetics of the flocs from *Schizosaccharomyces pombe*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1995, **11**(2):139-144
- [7] Wang JI(王江龙), Zi LH(孜力汗), Bai FW(白凤武). Co-production of ethanol and yeast during continuous fermentation using self-flocculation fusant SPSC01. *Journal of Chemical Industry and Engineering* (化工学报), 2004, **55**(66):1024-1027
- [8] Xie J(谢健), Bai FW(白凤武), Yun ZY(云战友) *et al.*. Industrial Scale-up of continuous ethanol fermentation using yeast flocs. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1999, **39**(4):367-372
- [9] Bai FW, Chen LJ, Anderson WA *et al.*. Parameter oscillation in high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system. *Biotechnol and Bioeng*, 2004, **88**(5):558-566
- [10] Xu TX(徐铁军), Zhao XQ(赵心清), Zhou YC(周友超) *et al.*. Continuous ethanol fermentation using self-flocculating yeast strain and bioreactor system composed of multi-stage tanks in series. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**(1):113-117