

自絮凝颗粒酵母乙醇连续发酵耦合酵母回用工艺的研究 Continuous Ethanol Fermentation Coupled with Recycling of Yeast Flocs

王 博, 葛旭萌, 李 宁, 白凤武*

WANG Bo, GE Xu-Meng, LI Ning and BAI Feng-Wu*

大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

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

摘 要 模拟现有酒精发酵行业普遍采用的多级发酵罐串联系统, 建立了一套由三级串联操作的搅拌式发酵罐和两个沉降罐组成的反应器系统, 以脱胚脱皮玉米粉双酶法制备的糖化液为发酵底物, 培养基初始还原糖浓度为 220g/L, 添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5g/L 和 KH_2PO_4 2.5g/L, 以 0.057h^{-1} 的恒定稀释速率流加, 将自沉降浓缩后的酵母乳先后经活化和不活化两种方式处理并循环至第一级发酵罐, 系统在两种操作条件下分别达到了拟稳态。实验结果表明, 活化处理对改善发酵工艺技术指标方面发挥了显著的作用, 发酵终点乙醇浓度达到 101g/L, 还原糖和残总糖分别在 3.2 和 7.7g/L 左右, 发酵系统的设备生产强度指标为 $5.77\text{g}(\text{L}\cdot\text{h})$, 与无酵母回用的搅拌式反应器系统中自絮凝颗粒酵母乙醇发酵工艺相比, 提高了 70%。

关键词 燃料乙醇, 自絮凝颗粒酵母, 酵母回用, 活化, 设备生产强度

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0816-05

Abstract A continuous ethanol fermentation system composed of three-stage tanks in series coupled with two sedimentation tanks was established. A self-flocculating yeast strain developed by protoplast fusion from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* was applied. Two-stage enzymatic hydrolysate of corn powder containing 220g/L of reducing sugar, supplemented with 1.5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and 2.5g/L KH_2PO_4 , was used as the ethanol fermentation substrate and fed into the first fermentor at the dilution rate of 0.057h^{-1} . The yeast flocs separated by sedimentation were recycled into the first fermentor as two different models: activation-recycle and direct recycle. The quasi-steady states were obtained for both operation models after the fermentation systems experienced short periods of transitions. Activation process helped enhance the performance of ethanol fermentation at the high dilution rates. The broth containing more than 101g/L ethanol, 3.2g/L residual reducing sugar and 7.7g/L residual total sugar was produced. The ethanol productivity was calculated to be $5.77\text{g}(\text{L}\cdot\text{h})$, which increased by more than 70% compared with that achieved in the same tank in series system without recycling of yeast cells.

Key words fuel ethanol, self-flocculating yeast cells, recycling of yeast, activation, productivity

以生物质资源为原料, 发酵法生产的燃料乙醇作为可再生清洁能源, 对于缓解当前石油资源严重短缺及生态环境恶化的双重危机具有十分重要的意

义。然而, 我国传统的乙醇发酵行业整体上处于工艺技术水平落后、行业经济效益差的状态, 严重制约了燃料乙醇工业的发展。目前, 除了开发新技术并

Received: April 21, 2006; Accepted: May 23, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 20576017).

* Corresponding author. Tel: 86-411-84706308; Fax: 86-411-84706329; E-mail: fwbai@dlut.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20576017)

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

建立产业化示范工程之外,亟需在现有乙醇生产装置基础上对传统乙醇发酵工艺路线进行技术改造,以适应国家燃料乙醇产业发展的需要。

与国内外现有乙醇生产普遍采用的带渣发酵工艺技术路线相比,清液发酵工艺的优势之一体现为:原料残渣在制糖工段进行分离,不进入发酵系统,这样就可以实现酵母的回用并联产采出,进而通过增大发酵罐内部的菌体浓度提高设备生产强度指标,同时生产酵母副产品提高过程综合经济效益。目前,国内外的清液发酵工艺所采用的菌株多为游离酵母,需要使用高速离心机分离发酵液中的酵母以实现酵母回用及采出,但存在离心机设备投资大、运行能耗高、设备维护费用昂贵的缺点。与之相比,采用自絮凝酵母的乙醇发酵过程可以通过酵母絮凝颗粒的自身沉降很方便地从发酵液中分离酵母,这一过程不需要能耗和较大的设备投资,从而具有明显的经济优势^[1]。

然而,以往开发的自絮凝酵母乙醇发酵工艺技术多在悬浮床生物反应器装置中进行,在发酵罐结构上与中国现有的酒精发酵行业普遍采用的发酵罐有非常大的差异,无法直接应用于现有工业化装置的技术改造^[2-5]。徐铁军等首次研究了自絮凝颗粒酵母在一套由三级串联操作的磁力搅拌发酵罐和一个种子罐组成的发酵系统中的乙醇连续发酵过程^[6]。但在此基础上,能否根据自絮凝颗粒酵母易于沉降的特点实现酵母回用并可控采出,以达到进一步提高设备生产强度的目的,尚有待进一步的实验研究和验证。

本文模拟现有乙醇发酵行业普遍采用的发酵罐结构,建立了一套由三级串联操作的搅拌式反应器和两个沉降罐组成的发酵系统,首次研究了该系统中自絮凝酵母 SPSC01 乙醇连续发酵耦合酵母回用的工艺过程,并与其它工艺过程的各项技术指标进行了比较,以期为此工艺技术进一步工程放大及在现有乙醇发酵行业技术改造中的实际应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母菌株 SPSC01,由本实验室构建和保存。

1.2 主要原材料与试剂

原料:干法脱胚脱皮玉米粉由黑龙江金玉酒精厂提供。

试剂:α-淀粉酶糖化酶为诺维信公司的商品酶制剂,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

摇瓶种子培养基:葡萄糖 30g/L,酵母粉 3.85g/L,蛋白胨 3.0g/L,121℃下灭菌 20min。

糖化液的制备:糖化液制备在一工作容积 25L 的搅拌罐中进行,将脱胚脱皮玉米粉与 60℃左右的温水按 1:2.5 的比例配制成粉浆,并按每公斤玉米粉 0.6mL 的比例加入 α-淀粉酶,升温至 85℃~95℃,保温液化 1h,然后降温至 60℃~65℃,按每公斤玉米粉 1.2mL 的比例加入糖化酶,保温糖化 10h~12h 后,过滤得到糖化液。

扩大培养基:将制备的糖化液稀释至还原糖浓度为 100g/L,添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 KH_2PO_4 各 2.0g/L,115℃下灭菌 15min。

发酵培养基:将制备的糖化液稀释至还原糖浓度为 220g/L,添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5g/L, KH_2PO_4 2.5g/L,115℃下灭菌 15min。

活化培养基:葡萄糖 20g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.5g/L, KH_2PO_4 2.5g/L, pH 2.0,在 121℃下灭菌 20min (由于工业中对回用酵母常采用酸化处理方法以抑制杂菌生长,因此本文实验模拟工业化生产将活化培养基的 pH 调到 2.0)。

1.4 分析方法

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。

葡萄糖浓度用 SBA-50B 生物传感分析仪进行分析,还原糖及总糖浓度由斐林反滴定法测定^[7]。

生物量的测定采用干重法: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 培养及连续发酵

发酵罐接种初期各罐采用各自间歇通气培养,温度控制在 $(28.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, pH 值控制在 4.2 ± 0.2 ,使用氨水调节。待残糖低于 1g/L 时,开始流加扩大培养基,当罐内菌体浓度达到 10~15g/L 干重时,将发酵罐串联,同时用蠕动泵按照设定的稀释速率把发酵培养基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。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 $(30.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,第二级发酵罐和第三级发酵罐的温度保持在 $31 \sim 32^\circ\text{C}$,各发酵罐

的 pH 值控制在 4.2 ± 0.2 。第三级发酵罐中的发酵液溢流入沉降罐,自絮凝酵母颗粒在沉降罐底部沉积。

活化-回用:每隔 24h 用恒流泵将第一级沉降罐底部的 200mL 酵母泥输入到含有 500mL 活化培养基的 1000mL 三角瓶中,在 150r/min, 28°C 条件下活化 8h 后倒入第二级沉降罐,静置 1h 后,关闭发酵培养基流加泵,用恒流泵将第二级沉降罐中的酵母泥(约 200mL)回流入首级发酵罐,回流完毕后打开发酵培养基流加泵并通气 10min。

直接回用:每隔 24h,关闭发酵培养基流加泵,用恒流泵将第一级沉降罐底部的 200mL 酵母泥直接回流入首级发酵罐,回流完毕后打开发酵培养基流加泵并通气 10min。

1.6 实验装置及工艺流程

本实验自行加工了三个单罐有效容积 1.1L、带有保温夹套的玻璃发酵罐,及两个有效容积为 1L 的锥形底沉降罐。发酵罐内置不锈钢挡板,并配置机械搅拌装置。整个实验装置的工艺流程如图 1 所示。

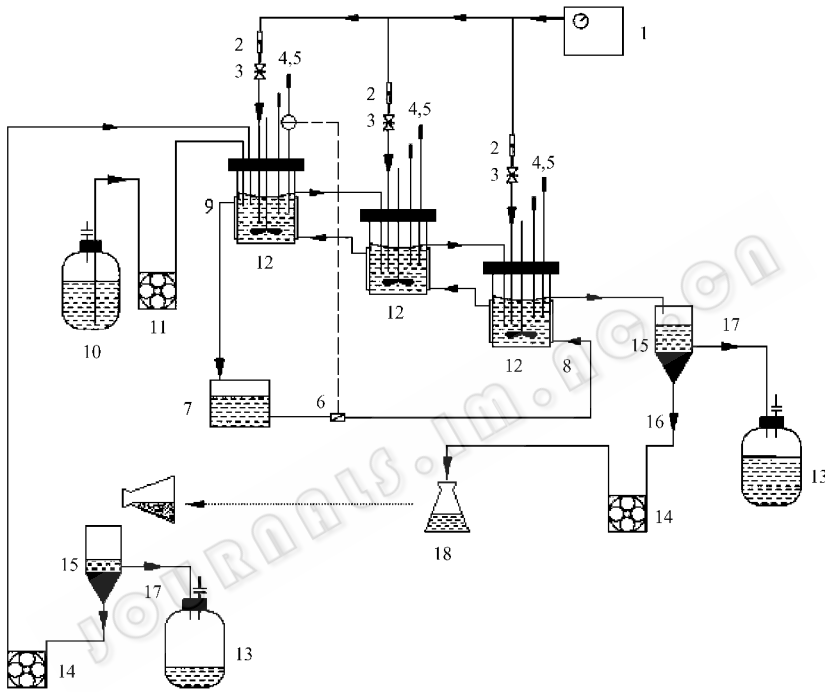


图 1 自絮凝酵母乙醇连续发酵耦合酵母回用工艺装置图

Fig.1 Process diagram of continuous ethanol fermentation coupled with recycling of self-flocculating yeast cells

1: air compressor; 2: air flow meters; 3: needle valves; 4: pH probes and controllers; 5: temperature probes and controllers; 6: electromagnetic valve; 7: thermostat water tank; 8: thermostat water inlet; 9: thermostat water outlet; 10: storage tank for medium; 11: peristaltic pumps for medium input; 12: stirred tank fermentors; 13: storage tanks for broth; 14: peristaltic pumps for yeast slurry recycle; 15: sedimentation tanks; 16: yeast sludge; 17: supernate; 18: activation tank.

2 结果与讨论

2.1 装置运行状态考察

图 2 所示为生物反应器系统完全进入发酵状态后,沉降的酵母在活化-回用和直接回用两种工艺操作条件下,各级反应器中生物量、残还原糖和乙醇浓度变化情况。

由图 2 可见,在开始酵母回用操作后的 3d 内,各级反应器中的生物量浓度出现了一定幅度的波动,但 3d 后,随着酵母回用次数的增加,各级反应器

中的生物量浓度逐渐升高(见图 2a),残还原糖浓度逐渐下降(见图 2b),乙醇浓度逐渐升高(见图 2c);并且变化的趋势逐渐趋于平缓,在第 10 天后基本达到拟稳态。初步分析以上现象的原因为:酵母随发酵液溢流入沉降罐后未完全沉降,仍有少量酵母细胞随沉降罐上清液溢流入发酵液储罐;开始阶段酵母的回用使系统中的生物量浓度由于不断的积累而逐渐升高,残糖浓度随之下降,乙醇浓度随之升高,进而导致酵母比生长速率的降低,直到系统中酵母的生长速率与酵母细胞流出系统的速率平衡,系统

达到拟稳态。

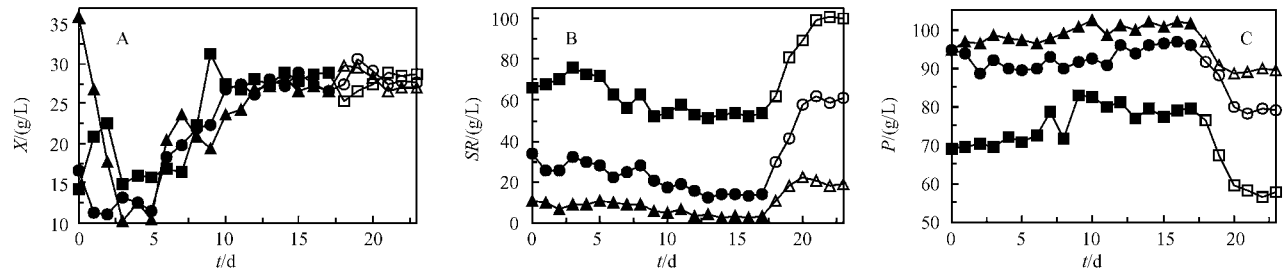


图2 生物量、残糖和乙醇浓度的时程变化

Fig.2 Time-courses of biomass , residual and ethanol during fermentation

(A , B and C for biomass , residual sugar and ethanol , respectively)

Activation-recycle model : tank1 (—■—), tank2 (—●—), tank3 (—▲—). Direct-recycle model : tank1 (—□—), tank2 (—○—), tank3 (—△—).

从第 18 天开始 ,酵母活化操作被取消 ,直接回用沉降浓缩的酵母乳 ,残余还原糖浓度显著上升 ,发酵终点乙醇浓度相应降低 ,但系统经过一段时间的自衡调整 ,各发酵罐内残糖浓度、酒精浓度和自絮凝颗粒酵母浓度趋于稳定 ,乙醇浓度等发酵指标均低于活化回流工艺 ,这表明活化处理在提高酵母回用

工艺的发酵指标方面发挥了显著的作用。

2.2 发酵工艺指标的考察及比较

将本文实验得到的实验结果与目前工业生产和文献报道的相关乙醇发酵工艺运行指标进行比较 ,结果如表 1 所示。

表 1 几种乙醇发酵工艺方案发酵指标的比较

Table 1 Comparisons of several different ethanol fermentation technologies

Fermentation results	Process strategies			
	Freely suspended yeast cell system ^a	Tanks in series system for flocs ^a	Suspended-bed system for flocs ^a	Tanks in series system for flocs coupled with yeast cell recycling
<i>P</i> /g/L	88 ~ 96	96 ~ 104	96 ~ 104	99 ~ 103
<i>SR</i> /g/L	2.5	2.0	2.0	3.2
<i>ST</i> /g/L	5.0	3.5	3.5	7.7
<i>X</i> /g/L	3 ~ 5	7 ~ 14	40 ~ 60	25 ~ 30
<i>t</i> /h	50 ~ 60	25 ~ 35	20 ~ 25	17 ~ 18
<i>q</i> /g(L·h ⁻¹)	1.65	3.32	4.44	5.77

a : data were cited from the paper written by Xu *et al.*^[6] ; *P* : ethanol concentration ; *SR* : residual reductive sugar concentration ; *ST* : residual total sugar concentration ; *X* : biomass concentration ; *t* : average ethanol fermentation time ; *q* : ethanol productivity .

由表 1 可知 ,本文实验所采用工艺的发酵终点乙醇浓度达到 101g/L ,还原糖和残总糖分别在 3.2 和 7.7g/L 左右 ,与其他三种发酵工艺相比 ,在终点乙醇浓度及残糖指标基本一致的同时 ,发酵时间大幅度缩短 ,设备生产强度显著提高 :与传统的游离酵母发酵工艺相比 ,发酵时间缩短了三分之二 ,设备生产强度提高了 2.5 倍 ;与徐铁军等设计的不采用酵母回用的工艺相比 ,发酵时间缩短了 42% ,设备生产强度提高了 70% ;与采用悬浮床生物反应器系统的自絮凝颗粒酵母发酵工艺相比 ,发酵时间缩短了 22% ,设备生产强度提高了 30% 。

进一步分析表 1 的数据可见 ,虽然可以通过提高生物量浓度来达到较高的设备生产强度 ,但是设备生产强度的提高并不与生物量浓度的提高成正比。例如 :与游离酵母细胞乙醇发酵过程相比 ,自絮

凝颗粒酵母乙醇发酵过程生物反应器内酵母细胞密度提高接近 10 倍 ,但设备生产强度只提高 2 倍。这说明自絮凝颗粒酵母细胞由游离状态微米尺度自絮凝形成毫米尺度颗粒后 ,颗粒体系内扩散的影响也变得非常严重。与悬浮床反应器相比 ,搅拌式反应器内部的剪切速率较高 ,自絮凝酵母颗粒的粒径较小 ,颗粒体系的内扩散影响也相应减小。因此 ,表 1 中搅拌式反应器虽然在生物量浓度上远低于悬浮床反应器 ,但设备生产强度却与之接近 ,甚至高出悬浮床反应器系统。

与徐铁军等采用的组合反应器系统相比 ,本文实验在乙醇连续发酵过程中省去了种子罐流加培养的过程 ,增加了沉降、活化及回流的步骤。表 2 给出了这两种工艺过程中培养基中糖的消耗、乙醇生成及糖醇得率的比较结果。

表2 糖的消耗、乙醇生成及糖醇得率指标与文献[6]的比较

Table 2 Comparisons of the sugar consumption, ethanol formation and yield with the reference[6]

Fermentation results	Tanks in series system for flocs coupled with seed culture ^a			Tanks in series system for flocs coupled with activation and recycle of yeast cells		
	Seed culture	Fermentors	Total	Activation	Fermentors	Total
S_0 /g/L	100	220	—	—	220	—
F_{in} /L/d	0.41	2.38	2.79	0.20	4.51	4.71
G_S /g/d	41	524	565	10	994	1004
V_P /L/d	—	—	2.79	—	—	4.66
P_f /g/L	36.8	95.6	95.6	0	101.16	101.16
G_P /g/d	15	252	267	0	477	477
$Y_{P/S}$	0.37	0.48	0.47	0	0.48	0.48

a : data were obtained from the paper written by Xu *et al.*^[6]; S_0 : feeding sugar concentration; F_{in} : volume of medium input per day; G_S : mass of feeding sugar consumed per day; V_P : volume of broth obtained per day; P_f : ethanol concentration in the final broth; G_P : mass of ethanol produced per day; $Y_{P/S}$: yield of ethanol from sugar.

由表2可知,对于采用种子罐的乙醇发酵工艺,种子培养单元的耗糖量约占总耗糖量的7%,但糖醇得率仅为0.37,因此使得工艺过程总的糖醇得率有所下降,而对于本文实验采用的酵母活化-回用乙醇发酵工艺,活化单元耗糖量仅占总耗糖量的1%,因而对工艺过程中总的糖醇得率未产生显著的影响。

本文实验中沉降罐中分离出的酵母在实验装置运行期间全部回用,没有酵母产出。在实际的应用过程中,可根据发酵罐中酵母密度的控制指标,将沉降罐中的酵母以一定比例采出用于生产酵母副产品,以增加经济效益,另一部分回用以提高设备生产强度,并根据市场需求等实际情况,适当调整采出及回用的比率。另外,本文依靠小型实验装置所开发的工艺还有待在工业化生产装置上做进一步的验证,以为此工艺技术在燃料乙醇产业化过程中的实际应用奠定基础。

3 结论

(1)模拟现有乙醇发酵行业普遍采用的发酵罐结构,建立了一套由三级串联操作的搅拌式反应器和两个沉降罐组成的发酵系统,研究了该系统中自絮凝酵母SPSCO1乙醇连续发酵耦合酵母回用的工艺过程。

(2)系统在副产酵母活化-回用和直接回用两种条件下均达到了拟稳态,活化处理在提高酵母回用工艺发酵指标方面发挥了显著的作用。

(3)本文实验建立的多级串联搅拌式反应器系

统中自絮凝颗粒酵母乙醇连续发酵耦合酵母回用工艺在保证其他发酵指标的前提下,显著提高了设备生产强度。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**: 197-205
- [2] Bu lock JD, Comberbach DM, Ghommidh C. A study of continuous ethanol production using a highly flocculent yeast in the gas lift tower fermentor. *Chem Eng J*, 1984, **29**: 9-24
- [3] Kida K, Yamadaki M, Asano S *et al.* The effect of aeration on stability of continuous ethanol fermentation by a flocculating yeast. *J Ferment Bioeng*, 1989, **68**: 107-111
- [4] 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
- [5] Yan Z(严正), Zi LH(孜力汗), Bai FW(白凤武) *et al.* Continuous ethanol fermentation using self-flocculating yeast in multi-stage suspended bioreactors coupled with directly recycling of waste distillate. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2005, **21**(4): 628-632
- [6] Xu TJ(徐铁军), Zhao XQ(赵心清), Bai FW(白凤武) *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
- [7] 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