

# 絮凝酵母颗粒悬浮床反应器中试 及酒精连续发酵工艺的研究

白凤武 秦金来 谢 健 李 宁 冯朴荪

(大连理工大学化学工程研究所 大连 116012)

**摘 要** 在小型悬浮床反应器研究絮凝颗粒酵母酒精连续发酵工艺的基础上,建立了单釜反应器有效容积  $0.5\text{m}^3$ 、二级串联的中试装置。以淀粉糖化液为底物,考察了悬浮床反应器由小试到中试的放大效应,提出了该反应器工业放大时对危险截面表观气速应加以限制的原则,以保证絮凝酵母颗粒不被剪切破坏。进而在平均稀释率为  $0.10\text{h}^{-1}$  的条件下,中试装置稳定运转一个月,获得终点发酵液中酒精浓度  $80\sim 85\text{g/L}$ ,残糖低于  $5.0\text{g/L}$ ,设备平均生产酒精  $8.4\text{g/L}\cdot\text{h}$  的结果。

**关键词** 絮凝酵母颗粒, 悬浮床反应器, 酒精连续发酵

利用某些酵母细胞在一定条件下能够自身絮凝形成颗粒的特性,可以作为一种固定化细胞的方法。然而,这种絮凝酵母颗粒在形态、结构及发酵动力学等方面都有很大的特殊性。目前文献上报道这一领域的研究工作一般都限于菌株的筛选和发酵工艺的初步探讨,发酵罐的规模也大都在几升至几十升的范围内<sup>[1~5]</sup>。从工业应用的意义上来说,研制开发适宜的反应器,解决其放大过程中出现的工程问题,例如:酒精发酵的同时产生大量  $\text{CO}_2$ ,随着反应器规模的扩大、高度的增加,絮凝酵母颗粒受到的湍流扰动和剪切破坏作用增强,严重影响这种连续操作反应器的稳定运转。

本文的工作是在大量实验室研究工作的基础上<sup>[6~9]</sup>,将适宜于絮凝酵母颗粒酒精连续发酵的悬浮床反应器放大到  $0.5\text{m}^3$  的中试规模,以其为进一步的工业放大提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

使用从粟酒裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces pombe*) 筛选出的变异株,该菌株具有良好的酒精发酵性能和强自身絮凝能力,其发酵动力学基本参数与絮凝颗粒的培养方法如文献 [6, 7] 所述。

### 1.2 材料

培养基 I 用于絮凝酵母颗粒的摇瓶一级种子培养,其组成为 ( $\text{g/L}$ ):葡萄糖 10 和 30 (前者用于前期游离细胞培养),酵母膏 5,麦芽膏 3,蛋白胨 3。

培养基 II 用于絮凝酵母颗粒的种子罐二级种子和  $0.5\text{m}^3$  反应器三级种子培养,其组成为外观糖 10Bx 的淀粉糖化液添加 5% 可溶性玉米浆。

培养基 III 用于絮凝酵母颗粒连续发酵生产酒精,其组成为测定总糖为  $160\sim 180\text{g/L}$

的淀粉糖化液添加 0.5% 可溶性玉米浆。

玉米淀粉及玉米浆均由大连酿酒厂淀粉车间生产, 玉米浆干物质浓度 45~50%, 总氮  $\geq 4\%$ 。淀粉糖化液采用双酶法制备<sup>[10]</sup>, 糖化后的醪液静置沉降澄清, 少量残渣去除, 上清液供絮凝酵母颗粒培养及酒精发酵使用。所用  $\alpha$ -淀粉酶及糖化酶为唐山酶制剂厂生产的固体酶, 活力分别为 2 000u/g 和 50 000u/g。

### 1.3 反应器

自行设计了有效容积 0.5m<sup>3</sup> 中试规模的悬浮床生物反应器, 该反应器利用气升环流的原理, 在气升管中输入少量空气的驱动下, 反应器中的物料形成和缓的环流, 使絮凝酵母颗粒均匀悬浮在基质中, 该反应器的流体力学冷模研究如文献 [8、9] 所述。中试装置的工艺流程见图 1。

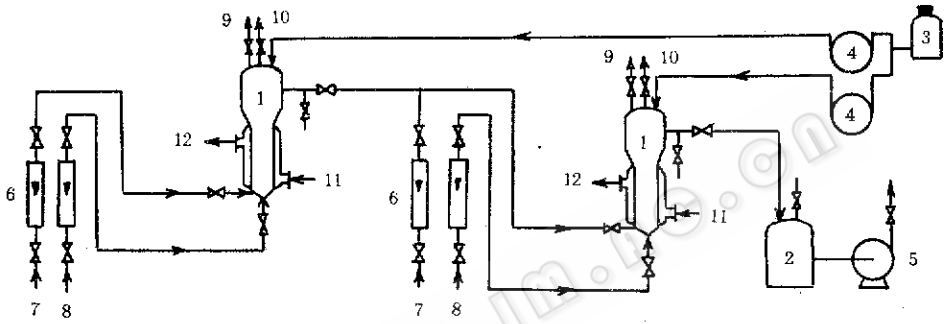


图 1 中试装置的工艺流程

Fig. 1 Process flow-sheet of the pilot plant

1. Suspended-bed bioreactor, 2. Storage tank for effluent, 3. Storage tank for alkali, 4. Peristaltic pump, 5. Pump for effluent, 6. Rotameters, 7. Feed, 8. Air, 9. CO<sub>2</sub>, 10. Exhaust gas, 11. Cool water inlet, 12. Cool water outlet

### 1.4 分析方法

发酵液中酒精和残糖浓度采用酒精发酵行业规定的方法测定<sup>[11]</sup>。悬浮相中絮凝酵母颗粒的浓度以单位体积悬浮液中酵母干重来表示, 测定步骤见文献 [7]。絮凝酵母颗粒中活细胞的检测在絮凝颗粒经 EDTA 溶液处理解离后采用次甲基蓝染色技术估测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 絮凝颗粒酵母的逐级扩大培养

摇瓶培养的一级种先接种至有效容积 5L 有机玻璃制造的小型种子罐中培养。种子罐以 1.5% 的过氧乙酸灭菌, 然后用无菌水冲洗。接种量为 50% (250ml 浓集絮凝颗粒酵母悬浮液), 使用基质 I 接种。接种后在通风条件下间歇培养 12h, 罐中残糖降至 5g/L 左右时, 开始进行流加培养, 流加速度根据流出废液的残糖浓度来调节。培养温度和 pH 值分别控制在 30℃ 和 4.5, 通风比为 0.01vvm。约 3 d, 种子罐中菌体 (dwt, 下同) 可达到 40g/L, 将其作为二级种向有效容积 0.5m<sup>3</sup> 的悬浮床反应器接种, 按照上述过程, 约 5d, 反应器中菌体可达到 30g/L, 然后通过管道将菌体悬浮液的一半输送到另一台反应器中继续培养, 亦可切换基质 II 进入发酵状态。

### 2.2 悬浮床反应器的中试放大效应

图 2 所示为  $\text{CO}_2$  生产强度对反应器操作稳定性的影响。曲线 A 是基于小型反应器<sup>[8,9]</sup>基础上几何相似放大时的结果。可见当  $\text{CO}_2$  生产强度达到  $6\text{g/L}\cdot\text{h}$  时,流出发酵液中即开始带菌体,当  $\text{CO}_2$  生产强度达到  $8\text{g/L}\cdot\text{h}$  时,流出发酵液中菌体浓度已超过  $2\text{g/L}$ ,此时反应器在稀释率  $0.1\text{h}^{-1}$  条件下操作,菌体的流失速率达到  $100\text{g/h}$  以上,超过了发酵条件下反应器中菌体的增殖速率,反应器中菌体浓度开始降低,致使发酵液中残糖浓度升高,如图 3 所示。发酵液中残糖浓度升高,絮凝颗粒酵母的比酒精生成速率增大,当比酒精生成速率达到  $0.5\text{h}^{-1}$  时,颗粒细碎,沉降性能变差,反应器无法稳定操作。造成菌体随发酵液流失的主要原因是反应器放大后高度增加,发酵产生  $\text{CO}_2$  对上部沉降区的扰动加剧,只有设法消除这种扰动,这种反应器才能进行工业放大。图 2 所示曲线 B 是对沉降区结构改进后的结果,此时  $\text{CO}_2$  生产提高到  $10.5\text{g/L}\cdot\text{h}$ ,发酵液中夹带菌体浓度仅有  $0.5\text{g/L}$ ,反应器可以稳定操作。

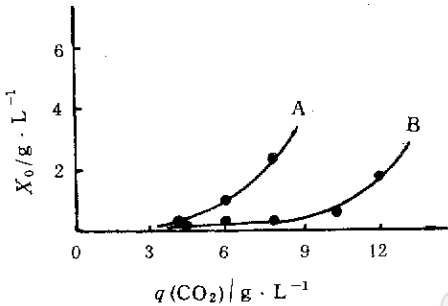


图 2  $\text{CO}_2$  扰动控制的反应器操作稳定性

Fig. 2 Operation stability controlled by  $\text{CO}_2$  turbulence

$q(\text{CO}_2)$ ,  $X_0$ ,  $\text{CO}_2$  productivity and floc concentration in effluent respectively

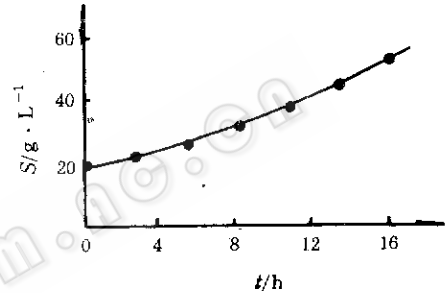


图 3 菌体流失对发酵过程的影响

Fig. 3 Effect of the flocs washing out on fermentation

$t$ ,  $s$  Lasting time with floc washing out and residual sugar concentration in effluent

当  $\text{CO}_2$  生产提高到  $12.0\text{g/L}\cdot\text{h}$  时,发酵液中再次出现菌体大量流失现象,但此时观察到流失的菌体都是十分细碎的小颗粒和大量游离细胞,这表明菌体流失的机理发生了转变。此时从发酵动力学来判定尚未达到  $\text{CO}_2$  气泡对絮凝颗粒胀裂破坏的状态,颗粒破碎的主要原因是剪切破坏。由于这种反应器中悬浮液环流十分缓慢,剪切主要来自气泡上升运动,显然反应器中表观气速最高的截面是危险截面。图 4 所示为有效容积  $0.5\text{m}^3$  反应器结构示意图。对气升管来说,顶端截面表观气速最高,且这一表观气速由两部分叠加而成,一部分是通气所致,另一部分是发酵产生  $\text{CO}_2$  所致,即  $U_{gi}=U_{air}+U(\text{CO}_2)$ 。而气升管外部为主发酵区,为了减轻  $\text{CO}_2$  对沉降区的扰动,沉降区与主体间采用底角  $60^\circ$  的锥台形,截面渐扩,根据实际尺寸参数,可以看出 S 截面  $\text{CO}_2$  的表观气速最高。图 5 所示为这二个危险截面表观气速与  $\text{CO}_2$  生产强度的关系,当  $\text{CO}_2$  生产强度为  $12.0\text{g/L}\cdot\text{h}$  时,气升管内外危险截面的表观气速分别为  $1.5\text{cm/s}$  和  $0.5\text{cm/s}$ 。尽管  $U_{gi}>U_{gc}$ ,由于气泡上升产生的剪切力还与气泡的聚并与分散等诸多因素有关,气升管外截面积远远大于气升管内截面积,其流体力学状态更加复杂,二者哪个是制约参数尚有待于深入研究。限制危险截面表观气速是这种反应器进一步工业放大时需仔细考虑的方面。

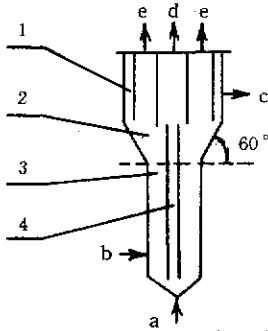


图4 有效容积 0.5m<sup>3</sup> 悬浮床反应器  
Fig. 4 Diagram of the SBB with volumn of 0.5m<sup>3</sup>

1. Separation zone for flocs, 2. Buffer zone, 3. Main fermentation zone, 4. Draft-tube, a. Air inlet, b. Feed inlet, c. Effluent outlet, d. Exhaust gas, e. CO<sub>2</sub>

2.3 发酵工艺

中试装置采用二级有效容积 0.5m<sup>3</sup> 悬浮床反应器串联操作的工艺。为了保证第一级反应器中的絮凝颗粒酵母不被剪切破坏,控制其基质的稀释速率为 0.15h<sup>-1</sup>,相应酒精生产强度为 10~12g/L·h。在保证第二级反应器出口发酵液中残糖浓度满足酒精发酵工业通常规定的 ≤5g/L 的条件下,为了充分发挥反应器中菌体的发酵潜力,以 0.05h<sup>-1</sup> 的稀释速率补充基质 III。中试装置的平均稀释速率为 0.10h<sup>-1</sup>,测得的数据如图 6 所示,终点发酵液的酒精浓度为 80~85g/L,计算产物酒精对底物糖的得率系数为 0.47,是理论值 0.51 的 92%,平均酒精生产强度为 8.4g/L·h。

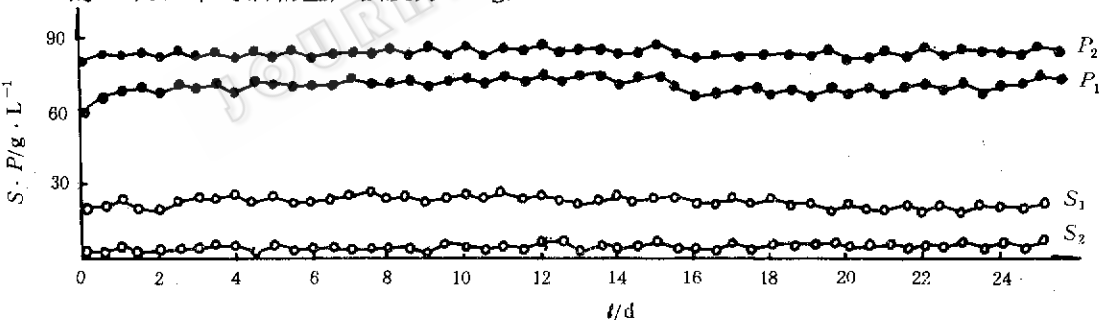


图6 中试装置运转的测试结果

Fig. 6 Results of continuous, ethanol fermentation by flocs in the pilot plant

S, P<sub>1</sub>, Residual sugar and ethanol concentration in effluent

1, 2: For the first and the second SBB respectively

杂菌污染是连续发酵必须解决的问题,实际操作发现,这种絮凝颗粒连续酒精发酵系统,细菌污染比较容易控制,一方面反应器中较高的酒精和菌体浓度、较低的 pH 值环境不适宜常见污染菌繁殖,且它们能被发酵液不断冲出;另一方面可以使用抗菌素(如青霉素)加以控制。在操作中,对基质进行巴氏灭菌,有效地防止了野生酵母的污染。

保持絮凝酵母颗粒长期连续使用时具有较稳定的发酵活性是这一工艺工业放大时另一个必须解决的问题。在不影响酒精发酵的前提下,少量氧的供给可以刺激发酵条件下

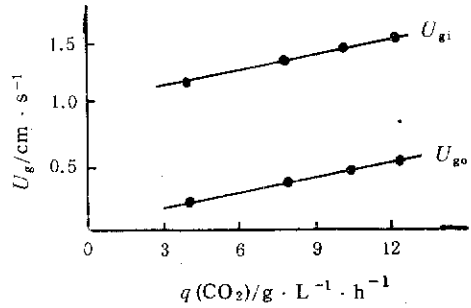


图5 气泡剪切控制的反应器操作稳定性

Fig. 5 Operation stability controlled by gas bubble shearing

q(CO<sub>2</sub>), U<sub>g</sub> CO<sub>2</sub> productivity and superficial gas velocities on the dangerous cross-section respectively

i, o inside and outside of draft-tube

菌体增殖。悬浮床反应器气升管内输入少量空气既为絮凝颗粒酵母均匀悬浮提供了动力, 同时又供给了有限量氧。在反应器结构设计上可以实现发酵产生  $\text{CO}_2$  与含空气尾气的分离, 不影响  $\text{CO}_2$  回收。二级反应器串联, 采用末级补料的操作方案对保持末级反应器中菌体活性亦十分有利。随基质而补充的营养物质有利于菌体增殖, 补偿了菌体的死亡和自溶, 基本上维持了菌体浓度的动态平衡, 这些都是工业放大时可行的工艺方案。

### 参 考 文 献

- [1] Jones S T, Korus R A, Admassu W *et al.* *Biotech Bioeng*, 1984, **16**: 742~747.
- [2] Bu'Lock J D, Comberbach D M, Ghommidh C. *J Chem Eng*, 1984, **29**: B9~24.
- [3] Limtong S, Nakata M, Funahashi H *et al.* *J Ferment Technol*, 1984, **62**: 55~62.
- [4] Kuriyama H, Seiko Y, Murakami T *et al.* *J Ferment Technol.*, 1985, **63**: 159~165.
- [5] Kida K, Asana S, Yamadaki M *et al.* *J Ferment Bioeng*, 1990, **69**: 39~45.
- [6] 冯朴荪, 许贵林, 赵 岩等. *生物工程学报*, 1989, **5** (1): 70~76.
- [7] 白凤武, 秦金来, 史今兰等. *食品与发酵工业*, 1993, (1): 11~16.
- [8] 白凤武, 冯朴荪. *化工学报*, 1992, **43**: 304~309.
- [9] 白凤武, 冯朴荪. *化学工程*, 1993, **21** (5): 30~34.
- [10] 张力田. 《淀粉糖》, 北京: 轻工业出版社, 1987.
- [11] 胡嗣明, 张天杭. 《酒精生产分析检验》, 北京: 轻工业出版社, 1981.
- [12] Ryu D D Y, Kim Y J, Kim H J. *Biotechnol. Bioeng*, 1984, **26**: 12~16.

## A study of Continuous Ethanol Fermentation in Pilot plant Using Yeast Flocs

Bai Fengwu Qin Jinlai Xie Jian Li Ning Feng Pusun

(Laboratory of Biochemical Engineering,

Dalian University of Technology, Dalian 116012)

**Abstract** Based on the bench scale experiment results using yeast flocs from *Schizosaccharomyces pombe* to produce ethanol from hydrolysate, a pilot plant composed of two suspended-bed bioreactors (SBB) in series with a total working volume of  $1.0\text{m}^3$  was set up and had been operated over one months continuously. The SBBs were driven by air and limit oxygen was supplied, the floc concentration of  $30\sim 40\text{g/L}$  was maintained in suspended phase. It was discovered that the shearing effect of  $\text{CO}_2$  evolved on flocs was not neglected during the scale-up of the SBB, and the superficial gas velocities on the dangerous cross-sections of the SBB should be controlled properly. At a dilution rate of  $0.10\text{h}^{-1}$ , the effluent contained ethanol  $80\sim 85\text{g/L}$  and residual sugar less than  $5.0\text{g/L}$ , the average ethanol productivity was  $8.4\text{g/L}\cdot\text{h}$ , and the conversion yield of sugar to ethanol was about 92% of the value theoretically obtainable.

**Key words** Flocs, suspended-bed bioreactor, continuous ethanol fermentation