

文章编号:1009-038X(2004)01-0001-04

滤液全回流在细菌酒精连续发酵中的试验

石贵阳, 陶飞, 蔡宇杰, 张梁, 方亚叶, 徐柔, 章克昌

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了用酒精滤液代替原来的工艺用水进行细菌酒精连续发酵试验的可行性;建立了单级无回流连续发酵系统,在稀释率为 0.35 h^{-1} 时,酒精产量为 64.0 g/L ,发酵强度达到 $22.4 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$;考察了回流比分别为 $0.5, 1.0$, 稀释率为 $0.3, 0.35, 0.4 \text{ h}^{-1}$ 时,滤液回流对连续发酵系统的影响. 结果表明:进行一定时间的酒糟滤液全回流的连续回流发酵是可行的,但最大稀释率不宜大于 0.35 h^{-1} , 此时连续发酵的生产强度为 $22.1 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$,酒精产量为 63.1 g/L .

关键词: 运动发酵单胞菌; 酒精连续发酵; 酒糟废液回流; 自絮凝

中图分类号: TQ 920.62

文献标识码: A

Broth Recycle in the Continuous Ethanol Fermentation by Self-Flocculating *Zymomonas mobilis*

SHI Gui-yang, TAO Fei, CAI Yu-jie, ZHANG Liang,
FANG Ya-ye, XU Rou, ZHANG Ke-chang

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Distillage recycle, as a kind of economic and effective method to eliminate pollutant in the ethanol production, was studied in the continuous fermentation system in this paper. Different operating parameters such as recycle ratio ($0.5, 1.0$) and dilution rate ($0.3, 0.35, 0.4 \text{ h}^{-1}$) were tested in the continuous system. The continuous ethanol production with complete distillage recycle was available for a certain period provided that the dilution rate was controlled below 0.35 h^{-1} , while an ethanol concentration and productivity of 63 g/L and $22.1 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ could be achieved by this continuous fermentation system. The results showed the feasibility of the continuous fermentation system with full distillage recycle.

Key words: *Zymomonas mobilis*; continuous ethanol fermentation; self-flocculation; distillage recycle

用固定化细胞来实现酒精连续发酵是当今酒精发酵工艺的重要研究方向之一^[1~3]. 某些微生物自身有很强的絮凝能力,可形成颗粒,与传统的各种载体固定化细胞方法相比,这种新的固定化细胞

方法,具有简单、无附加费用的突出优点,可以降低酒精生产成本,提高生产效率.

酒糟滤液全回流是解决酒精发酵工业环境污染问题的途径之一. 然而,传统的淀粉质原料酒精

收稿日期:2003-06-03; 修回日期:2003-07-11.

基金项目:江苏省科委青年基金项目(BQ98039)资助课题.

作者简介:石贵阳(1963-),男,浙江新昌人,副教授,工学博士.
万方数据

发酵工艺均为游离细胞带渣发酵,使得精馏废液含有大量糟渣和细胞,其化学吸氧量(COD)一般为40 000 mg/L左右^[4],难以在固定化细胞连续发酵中实现直接循环.以细菌自絮凝形成的颗粒作为细胞固定化方法,发酵过程实现了清液发酵,减少了菌体的洗出,其化学吸氧量可以降低到10 000 mg/L左右^[4],有可能以较大的比例甚至“全回流”直接使用,这样既解决了废液污染问题,又节省了成本.

作者以酒糟滤液代替原工艺用水,对运动发酵单胞菌酒精连续全回流发酵系统进行了试验.通过不同回流比和稀释率的连续发酵试验,研究了滤液全回流对连续发酵过程中的各项工艺技术指标产生的影响,进而探讨了全回流絮凝细菌连续发酵的可行性.

1 材料与方法

1.1 菌种

Zymomonas mobilis ATCC 31821,由江南大学生物工程学院生物资源研究室保藏.

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 100,蛋白胨 10,酵母膏 15. pH 6.0.

1.2.2 清液培养基 组分(g/L):葡萄糖 150,蛋白胨 5,酵母膏 5. pH 4.5,自来水配料.

1.2.3 酒糟培养基 组分(g/L):葡萄糖 150,蛋白胨 5,酵母膏 5. pH 4.5,酒糟滤液配料.

1.3 絮凝细胞颗粒培养方法

1.3.1 间歇培养 将试管斜面保存的菌种在无菌条件下接入装有100 mL生长培养基的250 mL锥形瓶中,在温度为30℃的培养箱中静置厌氧培养.24 h后倾去上清液,换入新鲜培养基.然后每天换1次新鲜培养基,直至形成细菌絮凝颗粒.

1.3.2 连续培养 在连续反应器中,接入颗粒细菌,当发酵液有大量的气泡时,启动连续发酵.根据试验改变操作条件,直至连续稳态的建立.

1.4 分析方法

酒精质量浓度、菌体浓度、还原糖质量浓度和絮凝颗粒透射电镜的测定按文献[3]. pH用pH S-3TC精密数显酸度计(上海天达仪器厂制造)测定.

2 结果与讨论

2.1 自絮凝细胞颗粒的描述

图1为电镜下的自絮凝细胞颗粒.可以看出,细胞虽然密集凝聚在一起形成颗粒,但细胞之间的空隙较大,这对于营养底物向颗粒内部细胞的扩散

和颗粒内部细胞产生的代谢产物向外部扩散是非常有利的,与通常的各种载体固定化细胞过程相比,细胞自絮凝形成颗粒的内扩散阻力是很小的,这为连续稳态发酵系统的建立奠定了基础.



图1 絮凝细胞透射电镜图

Fig.1 The photo of SEM of self-flocculation *Z. mobilis*

2.2 无回流单级连续发酵系统的建立

从图2可知,当稀释率在0.1~0.35 h⁻¹时,反应器的各项指标差别不大,酒精质量浓度为65 g/L左右,残还原糖质量浓度为9 g/L左右.其中当稀释率在0.35 h⁻¹时,发酵强度达到22.4 g/(L·h),但是当稀释率再增大时,虽然反应器的发酵强度继续上升,但流出液中残还原糖质量浓度上升到26.7 g/L,酒精质量浓度降为58.2 g/L.因此在单级连续发酵时,稀释率不宜大于0.35 h⁻¹.

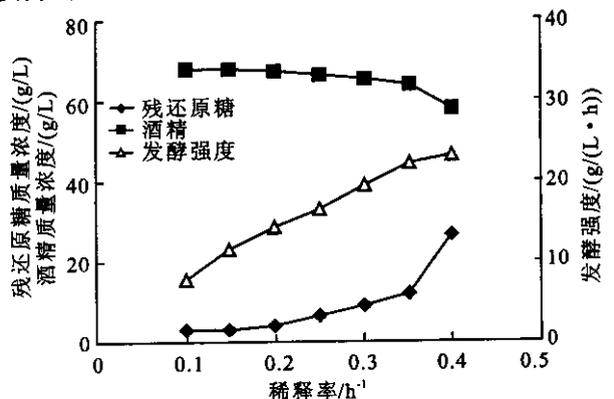


图2 单级连续稳态发酵

Fig.2 Continuous ethanol fermentation at different dilution rate

2.3 单级回流连续发酵

2.3.1 回流比对酒糟回流连续发酵系统的影响

图3~5为回流比(α)分别是0,0.5,1.0(回流酒糟液0.50%,100%),稀释率为0.15 h⁻¹时,絮凝细胞连续发酵过程中残还原糖质量浓度、酒精质量浓度的变化情况.

由图3~5的结果可以看出,运行一段时间后,各组试验均能达到拟稳态,即酒精质量浓度、残余还原糖质量浓度随时间变化很小,仅在一定范围内

波动;只是随着循环比的变化,达到稳态的时间也有些变化,无废液循环的对照试验在 4 d 后就能稳定,循环比为 0.5 的需要 7 d,而循环比为 1.0 的“全回流”则需更长时间,10 d 后才能平衡。

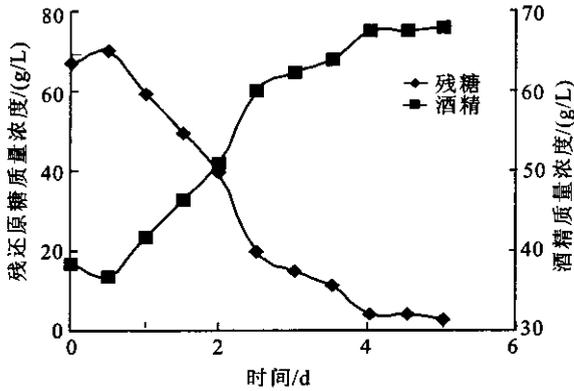


图 3 无废液循环时单级连续稳态发酵结果
Fig. 3 Continuous ethanol fermentation without broth recycle

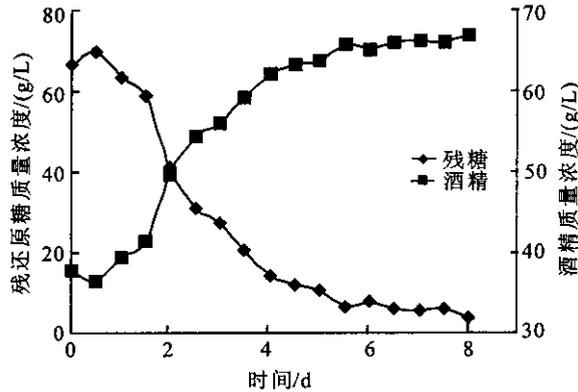


图 4 回流比为 0.5 时单级连续稳态发酵结果
Fig. 4 Continuous ethanol fermentation with recycle ratio of 0.5

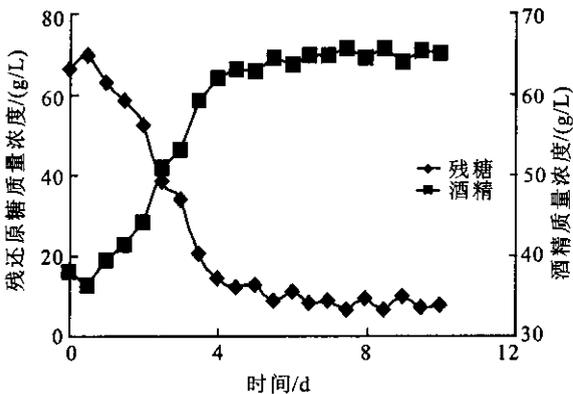


图 5 回流比为 1 时单级连续稳态发酵结果
Fig. 5 Continuous ethanol fermentation with recycle ratio of 1.0

2.3.2 稀释率对全回流连续发酵的影响 由稀释率为 0.15 h^{-1} 的回流试验可知,回流连续发酵在经过一定时间的平衡后,能达到拟稳态.为了更进一步了解连续反应系统在回流发酵中的生产潜力,考

察了不同稀释率对回流连续发酵系统的影响(见图 6)。

当回流连续发酵在稀释率为 0.3 h^{-1} 时稳定后 ($0 \sim 7 \text{ d}$),增加回流培养基的流量,使稀释率升到 $0.35 (7 \sim 20 \text{ d})$ 和 $0.4 (20 \sim 36 \text{ d})$,在这 3 个稀释率下,酒精发酵的指标测定结果见图 6.由图 6 可知,稀释率的增加导致残还原糖质量浓度升高,酒精质量浓度降低.当稀释率增加到 0.4 h^{-1} 时,残还原糖质量浓度为 27.1 g/L .可以认为,过高的稀释率导致反应器内产生大量 CO_2 ,造成培养液滑溜,反应器内的絮凝颗粒也有部分冲出现象,降低了反应器的综合生产能力。

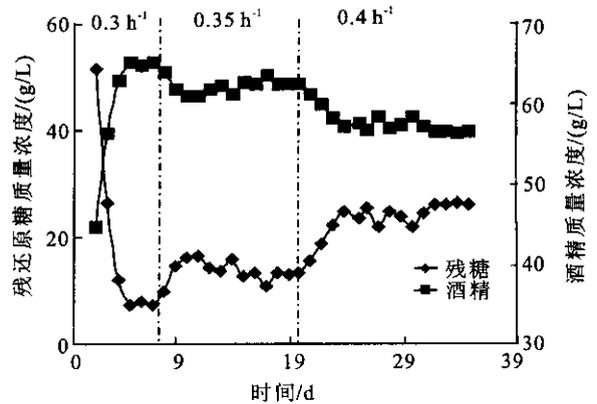


图 6 稀释率对回流连续发酵系统的影响
Fig. 6 Effect of dilution rate on continuous fermentation with broth recycle

2.4 拟稳态时工艺技术指标的比较

2.4.1 不同回流比时工艺指标的比较 从表 1 可以看出,在 0.15 h^{-1} 的稀释率下,随着循环比的增大,发酵液中酒精质量浓度和反应器的发酵强度等指标都有所降低,说明废液循环利用对发酵工艺有抑制作用;而且这种抑制作用随着循环比增大而加强,但酒精对底物还原糖的得率系数变化不大,稍高于无回流试验的结果。

表 1 不同回流比时工艺指标的比较
Tab. 1 Performance index at different recycle ratio

酒精发酵指标	回流比		
	$\alpha=0$	$\alpha=0.5$	$\alpha=1$
流出液中酒精质量浓度/(g/L)	68.4	67.6	65.8
流出液中还原糖质量浓度/(g/L)	2.8	4.7	8.5
初始还原糖质量浓度/(g/L)	145.8	143.1	139.6
酒精对还原糖的得率系数/(g/g)	0.469	0.472	0.471
发酵强度/(g/(L·h))	10.26	10.14	9.87

2.4.2 不同稀释率时工艺指标的比较 不同稀释率时工艺指标的比较见表 2。

表2 不同稀释率时工艺指标的比较

Tab. 2 Performance index at different dilution rate

回流方式	酒精发酵指标	稀释率/(h ⁻¹)		
		D=0.3	D=0.35	D=0.4
无回流 连续发酵	流出液中酒精 质量浓度/(g/L)	65.5	64.1	58.2
	流出液中还原糖 质量浓度/(g/L)	9.2	12.3	26.7
	发酵强度/ (g/(L·h))	19.6	22.4	23.3
回流 连续发酵	流出液中酒精 质量浓度/(g/L)	65.9	63.1	57.3
	流出液中还原糖 质量浓度/(g/L)	8.2	14.0	27.1
	发酵强度/ (g/(L·h))	19.8	22.1	22.9

从表2可知,在稀释率为0.3 h⁻¹时,残还原糖质量浓度为8.2 g/L,酒精质量浓度为65.9 g/L;当稀释率提高为0.35 h⁻¹时,残还原糖质量浓度为14 g/L,酒精质量浓度为63.1 g/L;当稀释率提高为0.4 h⁻¹时,残还原糖质量浓度升高为27.1 g/L.酒

精质量浓度为57.0 g/L,与稀释率为0.3 h⁻¹的相比减少了13.5%.因此在回流连续发酵中,稀释率不宜超过0.35 h⁻¹,此时连续反应器的生产强度为22.1 g/(L·h).

3 结 论

1) 建立了单级无回流连续发酵系统,在稀释率为0.35 h⁻¹时,发酵强度达到22.4 g/(L·h),酒精产量为64.0 g/L,残还原糖质量浓度为12.4 g/L.稀释率继续增大时,反应器的酒精生产性能下降.

2) 在回流比为0.5和1.0时,虽然酒糟滤液对酒精发酵有一定的抑制作用,但经过一定时间的平衡后,连续发酵系统可以达到拟稳态.

3) 不同稀释率的单级回流连续发酵试验表明:高稀释率时,反应器内的絮凝颗粒被洗出,影响回流发酵的性能.最大稀释率不宜大于0.35 h⁻¹,此时连续发酵的生产强度为22.1 g/(L·h),酒精质量浓度为63.1 g/L.

参考文献:

- [1] Siva Kesava S, Panda T, Rakshit S K. Production of ethanol by immobilized whole ceshl of *Zymomonas mobilis* in an expanded bed bioreactor[J]. **Biotechnol Progress**, 1996,31:449-456.
- [2] Tomiaki Y, Michael A F, Min Zhang. Performance of immobilized *Zymomonas mobilis* 31821 (*pZB5*) on actual hydrolysates produced by arkenol technology[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2002,98:899-908.
- [3] Nigam P, Banat I M, Singh D, *et al.* Continuous ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized on mineral Kissiris at 45 °C[J]. **J of Microbiol Biotechnol**, 1997,13:5283-5288.
- [4] 程树培. 环境生物技术[M]. 南京:南京大学出版社,1994. 295-298.
- [5] 蔡宇杰. 絮凝性运动发酵单胞菌酒精发酵研究[D]. 无锡:无锡轻工大学,1995.

(责任编辑:李春丽)