

文章编号:1671-6833(2011)02-0015-04

纤维乙醇发酵工艺的比较及放大试验研究

常春, 赖智乐, 马晓建

(郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 为了得到高效的纤维乙醇发酵方式, 在酶解和发酵适宜的条件下, 以汽爆玉米秸秆为原料对分步糖化发酵、同步糖化发酵、预酶解补料批式糖化发酵和变温同步糖化发酵生产乙醇的4种工艺进行了对比研究. 试验表明: 变温同步糖化发酵效率较高, 其乙醇体积分数为4.98%, 比同步糖化发酵提高了7.56%, 比预酶解分批补料糖化发酵提高了12.60%, 比分步糖化发酵提高了23.07%. 在50 L发酵罐内进行了变温同步糖化发酵的放大实验, 乙醇体积分数为4.26%; 同时对放大实验中酵母浓度随时间的变化关系、残糖浓度随时间的变化关系和乙醇的体积分数随时间的变化关系进行了考察.

关键词: 同步糖化发酵; 变温; 放大实验; 乙醇

中图分类号: TQ352.78A

文献标志码: A

0 引言

随着世界经济的发展, 石油供不应求, 各国政府开始考虑燃料的替代问题. 以农业废弃物为原料生产燃料乙醇工业的出现, 有效地缓解了石油资源短缺的问题. 燃料乙醇的生产工艺很多, 而同步糖化发酵法 (SSF) 是目前研究比较多的一种工艺, 它最早由 W. F. Gauss 等^[1]提出, 是在同一发酵罐中直接将酶解的糖发酵为乙醇的过程. 因而纤维二糖和葡萄糖的浓度很低, 解除了纤维二糖和葡萄糖对纤维素酶的抑制作用, 提高了酶解效率, 减少了酶的用量, 简化了反应设备, 可以节约20%左右的设备投资^[2], 同时减少了外部微生物污染的危险性, 节约了总生产时间, 提高了生产效率^[3].

对SSF发酵方式的改进是提高乙醇产量的重要手段之一. 分步糖化发酵是一种比较传统的生产工艺, 纤维素的酶解和还原糖的发酵是分步进行的. 补料批式发酵是一种介于批式发酵和连续发酵之间的发酵方式^[4]. 补料批式发酵可以解除底物的抑制、产物的反馈抑制和葡萄糖分解阻遏效应等. 与连续发酵相比, 补料批式发酵不需要严格的无菌条件, 也不会产生菌种老化和变异问题. 补料批式发酵现在已经被广泛的应用于发酵工业

生产中, 但是将其应用于乙醇的生产还罕有报道. 将补料批式发酵应用于木质纤维素水解液生产燃料乙醇, 有如下优势: ①水解液中的抑制因子被少量分批的加入到反应系统中, 可避免一次大量加入而引起的菌体代谢受到环境突然改变的影响; ②补料批式发酵有利于控制底物的浓度、控制泡沫、避免污染和控制发酵时间^[5]; ③防止副产物的产生. 文献[6]报道了有学者利用分批补料发酵技术, 以稻草为原料进行乙醇发酵试验, 发酵液中乙醇的体积分数为11.1%~11.5%, 纤维素乙醇转化率为92%~95%. SSF是采用酶解温度与发酵温度的折中温度, 会出现纤维素酶的钝化, 通过适当提高反应温度, 可以激活纤维素酶, 提高酶解效率, 进而提高乙醇得率, 为此可采用变温同步糖化发酵. 孙亚东等^[7]利用变温同步糖化发酵提高了糠醛的得率, 但是此工艺在生产乙醇方面的研究却未见报道. 为此, 笔者针对SSF中糖化和发酵所需最佳温度不一致的问题采用改变加料方式和调节反应温度的方法进行了探索, 得出SSF的优化工艺.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

经蒸汽爆破的玉米秸秆 (南阳天冠集团提

收稿日期: 2010-09-20; 修订日期: 2010-12-20

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2007BAD66B04); 河南省教育厅自然科学研究项目 (2008B480004).

作者简介: 常春 (1973-), 男, 河南郑州人, 郑州大学高级工程师, 博士, 主要从事生化设备与发酵工程方面的研究.

通讯作者: 马晓建, 男, 河南郑州人, 郑州大学教授, 博士生导师.

供);安琪耐高温型酿酒高活性干酵母(湖北安琪酵母股份有限公司);酵母的活化方式:将该酵母在 35~40 ℃ 条件下,用 2% 糖水或 4~5 Bx 的稀糖化醪复水 15~20 min,然后温度降至 34 ℃ 下活化 1~2 h,即可做酒母使用.纤维素酶(湖南尤特),酶活为 82.5 U/mL(1 U 为 1 min 分解杭州新华一号滤纸产生 1 mg 葡萄糖的酶量).其它试剂均为分析纯.

1.2 分析方法

(1) 纤维素含量测定:采用质量减重法^[8-9].

测得爆破后的玉米秸秆成分为:纤维素含量为 31.78%;半纤维素含量为 17.19%;木质素含量为 22.91%;灰分含量为 10.06%;其它为 18.06%(均为质量分数).

(2) 乙醇体积分数的测定:重铬酸钾比色法^[10].

(3) 酵母生长情况测定:血球板计数法^[11].

(4) 还原糖的测定:3,5-二硝基水杨酸(DNS 法)^[12].

1.3 试验方法

实验条件:温度 37 ℃;pH=4.8;底物质量分数为 30%;表面活性剂 Tween-20 的质量分数为 0.15%;纤维素酶的用量为 30 U/g;酵母的接种量为底物干重的 5%;培养基为 KH_2PO_4 2.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, MgSO_4 0.15 g/L, CaCl_2 0.35 g/L;摇床转速为 160 r/min.

实验方法:本试验是在前期试验的基础上,分别在各自最优的工艺条件下,进行了分步糖化发酵、同步糖化发酵、预酶解分批补料糖化发酵和变温同步糖化发酵 4 种工艺的试验.

分步糖化发酵(I):①将一定量的汽爆秸秆装入 500 mL 的三角瓶中,按要求分别移取培养基,纤维素酶, Tween-20 和 pH=4.8 的稀盐酸溶液,混匀后加入装有汽爆秸秆的三角瓶中,并用保鲜膜封口,在 50 ℃ 的条件下酶解 48 h;②对酶解液进行接种,在 37 ℃ 发酵 60 h 后,取样检测.

同步糖化发酵(II):将一定量的汽爆秸秆装入 500 mL 的三角瓶中,按要求分别移取培养基,纤维素酶,活化后的酵母液, Tween-20 和 pH=4.8 的稀盐酸溶液,混匀后加入装有气爆秸秆的三角瓶中,并用保鲜膜封口,在 37 ℃ 条件下发酵 60 h,取样检测.

预酶解的分批补料糖化发酵(III):将一定量的汽爆秸秆装入 500 mL 的三角瓶中,按要求分别移取培养基、纤维素酶、Tween-20 和 pH=4.8 的

稀盐酸溶液,混匀后加入装有汽爆秸秆的三角瓶中,此时秸秆浓度的质量分数为 15%,用保鲜膜封口,在 50 ℃ 的条件下预酶解 24 h,每隔 12 h 补一次秸秆,加入量为总溶液质量的 5%,并且加入相应的纤维素酶,在 37 ℃ 条件下进行同步糖化发酵 60 h,取样检测.

变温的同步糖化发酵(IV):将一定量的汽爆秸秆装入 500 mL 的三角瓶中,按要求分别移取培养基,纤维素酶,活化后的酵母液, Tween-20 和 pH=4.8 的稀盐酸溶液,混匀后加入装有汽爆秸秆的三角瓶中,并用保鲜膜封口,糖化发酵 12 h 后,取出在 42 ℃ 的恒温摇床中震荡 15 min,取出放回 37 ℃ 的恒温摇床中震荡,糖化发酵 12 h,再放回 42 ℃ 的恒温摇床中震荡 15 min,如此反复,糖化发酵时间 60 h 后,取出检测.

2 实验结果与分析

2.1 不同糖化发酵工艺对酒度的影响

分别对 4 种实验工艺的的发酵液取样进行常压蒸馏,测试结果如表 1 所示.

表 1 4 种发酵方式的乙醇体积分数
Tab. 1 The volume fraction of ethanol in four kinds of fermentation

试验 工艺	吸光度 (1)	吸光度 (2)	吸光度 平均值	乙醇体 积分数/%
I	0.244	0.245	0.245	4.044
II	0.280	0.274	0.277	4.627
III	0.265	0.266	0.266	4.420
IV	0.286	0.307	0.297	4.977

从表 1 可以得出变温同步糖化发酵的发酵液的乙醇体积分数最高,它比分步糖化发酵的效率提高了 23.07%,比预酶解的分批补料糖化发酵效率提高了 12.60%,比同步糖化发酵提高了 7.56%,分步糖化发酵虽然使纤维素的水解和糖的发酵都在最适宜的温度条件下,但是还原糖对纤维素酶的抑制作用、乙醇对酵母的抑制作用以及杂菌的污染都是乙醇浓度相对较低的重要原因.同步糖化发酵虽然在一定程度上克服了分步糖化发酵的抑制作用,但是纤维素的酶解与还原糖发酵温度不一致,采用折中温度是制约乙醇浓度提高的重要因素.预酶解补料批式糖化发酵乙醇浓度相对低的原因因为经过预酶解后,醪液中还原糖的浓度较高,对酵母产生较强的抑制作用^[6].由表 1 可知变温对糖化发酵的影响还是很显著的.其原因为通过温度的提高激发了纤维素

酶的活力,从而提高了纤维素转化为还原糖的比率,利于发酵的进行。

2.2 变温同步糖化发酵的放大实验

按照在三角瓶中变温同步糖化发酵的试验条件,在50 L的发酵罐中进行了放大实验,结果如图1~3所示。

(1)变温同步糖化工艺对酵母生长的影响如图1所示。从图1可知:24 h之前酵母细胞数量增长较快,是因为酵母细胞出芽繁殖旺盛,底物浓度较高,细胞生长不受它的限制;之后由于底物的不断消耗和有害物质的大量积累,导致细胞生存环境恶化,使细胞内能量储存性物质产生缺失,造成酵母细胞的不断死亡。

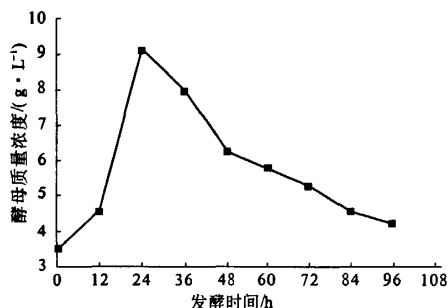


图1 在放大实验中酵母的生长情况随时间的变化

Fig.1 Variations of the concentration of yeast with time in scale-up experiment

(2)变温同步糖化工艺对残留糖的影响如图2所示。从图2可知:24 h前残糖浓度较快增加,之后残糖浓度逐渐减小。结合图1进行分析:因为开始阶段酶解旺盛,酵母数量还处于增殖期,酶解的还原糖不能被酵母立刻降解,还原糖不断积累;24 h后随着酵母数量的不断增加,还原糖逐渐被降解,因而还原糖的浓度不断减小。

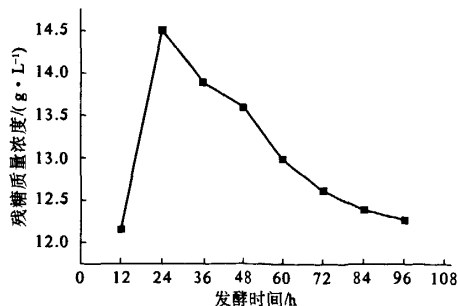


图2 在放大实验中残糖浓度随时间的变化

Fig.2 Variations of the concentration of residual sugar with time in scale-up experiment

(3)变温同步糖化工艺对乙醇体积分数的影响如图3所示。从图3可知:乙醇体积分数随着时间的增加而增大,72 h之前乙醇体积分数增长较快,原因是72 h之前酶解的还原糖比较充分,而且还有相当数量的酵母,可以将还原糖发酵为乙醇,但是72 h之后乙醇的体积分数增长缓慢,原因为还原糖几乎消耗殆尽,酵母数量减少和抑制物的不断积累。此时如果一味的延长发酵时间,对提高乙醇体积分数意义不大,而且延长发酵时间,必将增加能耗,降低生产效率。

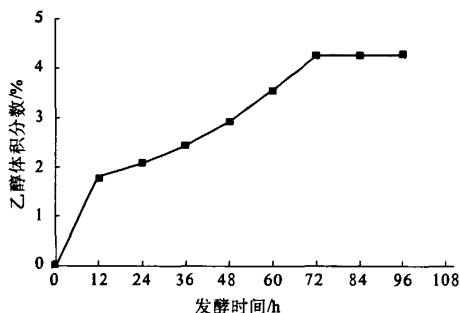


图3 在放大实验中乙醇体积分数随时间的变化

Fig.3 Variations of alcohol content with time in scale-up experiment

将放大实验结果与实验室小试进行比较可知:放大实验72 h时的乙醇体积分数(4.26%)为实验室小试72 h时乙醇体积分数(4.98%)的85.60%,取得了不错的放大效果。两者之间差别的原因有:①变温过程缓慢,不能立刻激发纤维素酶,而且并不能按照小试严格执行变温;②采用调压器来保持罐体的恒温,此温度存在一定的波动;③发酵罐没有挡板搅拌不够充分,传质效果不好。

3 结论

(1)通过对同步糖化发酵玉米秸秆产乙醇的几种工艺的比较,得出较优的同步糖化发酵工艺为变温同步糖化发酵,其比同步糖化发酵提高了7.56%,比预酶解的分批补料糖化发酵效率提高了12.60%,比分步糖化发酵的效率提高了23.07%,由此可见变温对糖化发酵的影响是很显著的。

(2)进行了变温同步糖化发酵的50 L放大实验,乙醇体积分数为4.26%,为实验室小试时乙醇体积分数4.98%的85.60%,取得了不错的放大效果,可以为进一步的放大实验提供参考。

参考文献:

- [1] GAUSS W F, SUZUKI S, TAKAG M. Manufacture of

- alcohol from cellulosic materials using plural ferments [J]. *Biotech*, 2006, 26(15): 247-260.
- [2] HUNG Y C, BAKALINSKY A, PENNER M H. Analysis of biomass cellulose in simultaneous saccharification and fermentation process [J]. *Appl Biochem Biotech*, 1997, 66(12): 249-261.
- [3] WINGREN A, GALBE M, ZACCHI G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(4): 1109-1117.
- [4] LONGOBARDI G P. Fed-batch versus batch fermentation [J]. *Bioprocess Engineering*, 1994, 10(27): 185-194.
- [5] GARVALHO JOAO M. Ethanol production by *saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane black-strap molasses through a fedbatch process [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 110(56): 151-164.
- [6] 杨涛, 马美湖. 纤维素类物质生产酒精的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2006, 161(6): 11-15.
- [7] 孙亚东, 孙冉, 蒋建新, 等. 糠醛渣纤维乙醇同步糖化发酵过程研究 [J]. *现代化工*, 2008, 28(11): 48-52.
- [8] 常春. 生物质制备新型平台化合物乙酰丙酸的研究 [D]. 杭州: 浙江大学化工学院, 2006: 33-35.
- [9] 赵文恩, 张晓阁, 胡水涛, 等. 双氧水氧化橡胶淀粉的实验研究 [J]. *郑州大学学报: 工学版*, 2010, 31(2): 23-27.
- [10] 王福荣. 酿酒分析与检测 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 267-270.
- [11] 姚占芳, 吴云汉. 微生物学实验技术 [M]. 北京: 气象出版社, 1998: 50-52.
- [12] 中国食品发酵工业研究院, 北京宁馨儿生物科技发展有限公司, 诺维信(中国)生物技术有限公司, 等. QB 2583-2003 附录 A (规范性附录) 滤纸酶活力(FPA)的测定方法 [S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.

Study on Scale-up Experiment and Comparison of the Processes of the Cellulosic Ethanol Production

CHANG Chun, LAI Zhi-le, MA Xiao-jian

(School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Several processes of the SSF based on steam-exploded corn stalk were compared in this paper. The best process of the simultaneous saccharification and fermentation is in the condition of variable-temperature. In this condition the efficiency of the ethanol production improved by 7.56% compared with the simultaneous saccharification and fermentation, improved by 12.60% compared with the pre-hydrolysis of the fed-batch saccharification and fermentation, and improved by 23.07% compared with the score-step saccharification and fermentation. Besides the amplification of the variable-temperature simultaneous saccharification and fermentation test was studied in 50 L fermenter and the volume of ethanol is 4.26%. At the same time, the variations of the concentration of yeast, the concentration of residual sugar and the alcohol content with time in scale-up experiment were also studied.

Key words: simultaneous saccharification and fermentation; variable-temperature; amplification test; ethanol