

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 1/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610114377.5

[43] 公开日 2008 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 101177693A

[22] 申请日 2006.11.8

[21] 申请号 200610114377.5

[71] 申请人 中国科学院过程工程研究所

地址 100080 北京市海淀区中关村北二条 1 号

[72] 发明人 陈洪章 张志国

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种连续耦合的固态发酵方法及生物反应装置

[57] 摘要

本发明是一种连续耦合固态发酵方法及其固态生物反应器装置，其操作方法为，物料先在卧式罐中发酵，之后在立式罐中提取；或者物料先在卧式罐中完成酶解过程，之后在立式罐中发酵和提取。其反应器特征在于，进料口使用关风器，实现发酵过程中物料连续进入发酵罐和发酵罐内部与外界的隔离；物料的酶解，发酵以及提取过程整合到一个反应器中连续进行。适用于生物质酒精，生物质制氢，甜高粱发酵酒精以及惰性载体发酵黄原胶等固态发酵过程。实现了发酵连续进行和各个操作环节的耦合，与批次发酵相比减少了反应器接种，清洗以及灭菌等步骤，避免了中间操作，节省人力物力，同时整个过程无固体物料的翻动和搅拌装置，避免对菌丝体的破坏。

- 1.一种连续耦合固态发酵方法及其固态生物反应装置，其反应装置包括关风器（1），螺杆（2），卧式罐（3），立式罐（4），卧式罐气体进口（5）和出口（6），立式罐放料关风器（7），立式罐进气口和出气口（8）（9）。
- 2.根据权利要求1所述的连续耦合固态发酵反应器，其特征为：卧式罐（3）的进料口使用关风器，保证进料的同时反应器内外的隔绝。
- 3.根据权利要求1所述的连续耦合固态发酵反应器，其特征为：卧式罐内部安装用于推动发酵物料前进的螺杆（2）作为物料的推进装置。
- 4.根据权利要求1所述的连续耦合固态发酵反应器，其特征为：为了在出料的同时保证内外隔绝，立式罐下部出料口使用关风器（7）。
- 5.一种连续耦合固态发酵方法，其步骤为：固体物料通过关风器（1）连续进入卧式罐（3），卧式罐中的螺杆（2）缓缓将物料推向立式罐（4），再从立式罐下部的关风器（7）连续出料，物料在连续的进出过程中完成酶解、发酵和分离的生化过程。
- 6.根据权利要求书1，5所述的发酵方法，其特征为：对于需要预先酶解的固态发酵品种，物料在卧式罐（3）中维持所需的温度进行酶解。酶解的同时使用螺杆推进器（2）缓缓将物料推向立式罐（4），调整推进速度，使得物料在卧式罐中的停留时间和酶解所需时间一致，之后物料在立式罐中进行水提或者气提，完成提取过程后，从出料口关风器（7）连续出料。
- 7.根据权利要求书1，5所述的发酵方法，其特征为：对于不需要对物料进行预先酶解的发酵品种，物料在卧式罐（3）中完成发酵过程，在发酵的同时物料被螺杆推进器（2）推向立式罐（4），调整推进速度，使得物料在卧式罐中的停留时间和发酵所需时间一致，之后物料在立式罐中进行水提或者气提，完成提取过程后，从出料口关风器连续出料。

一种连续耦合的固态发酵方法及生物反应装置

技术领域

本发明属于发酵工业技术领域

背景技术

固态发酵是一种在没有或者几乎没有游离水的条件的发酵过程。人类很早就把固态发酵的技术应用于食品的生产,而且几乎所有的古代发酵产品都是使用固态发酵技术生产的。与液态发酵相比,固态发酵的优势在于能耗低,污染少,并且环境友好,因此近年来固态发酵越来越多得应用于研究和生产。

固态发酵得研究和应用有赖于不断开发和改进发酵工艺和发酵所使用的生物反应器。传统的固态发酵不是纯种培养,其发酵过程是在开放的发酵池中进行。随着科学技术的进步,现在固态发酵反应器已经从传统的发酵池等开放容器中的发酵走向了密闭容器和纯种(或者限定菌种的混菌)发酵。同时,基于强化“热量传递”“质量传质”和“动量传递”的目的,人们也已经开发出了许多形式的反应器应用于科研和生产实践,包括静态的浅盘式,填充床式等以及动态的搅拌式,滚筒式等等。

不过,在取得技术进步的同时,操作复杂,劳动量大却依然是制约固态发酵放大和应用的重要因素,这一点在固态发酵工艺的开发和反应器的设计上还没有大的改观。造成这个问题的主要原因是:

1. 发酵分批进行,操作繁多,生产不连续。固态发酵使用的是固态基质而非流体,因此装料卸料劳动强度很大。如果能够实现发酵和进出料连续进行将大大提高发酵的生产效率。Morteza Khanahmadi等建立了简单的数学模型讨论了平推流全混流两种模式连续固态发酵,但是真正能够同时实现纯种发酵和连续固态发酵的反应器还没有见到报道。

2. 缺乏有效的过程集成和耦合。发酵工程不仅仅是单纯的生物反应过程，放大的实现同时依靠过程的强化和产物的分离等操作。固态发酵相比液态发酵本来就存在劳动强度相对较大的不足，分散的工序和操作因此成为固态发酵放大的障碍。特别是有一些固态发酵过程中，比如汽爆秸秆发酵生产乙醇，汽爆秸秆发酵生产氢气等等，固态基质往往需要进行酶解等处理。如果能将酶解过程与发酵过程有机结合起来，开发出酶解、发酵和提取耦合的发酵反应器就可以通过系统集成减少中间环节，避免不必要的卸料，装料，运输等等繁琐的操作。

总之，通过实现连续操作和过程集成耦合来开发新的固态发酵工艺和反应器，将会解决固态发酵操作复杂，劳动量大的问题，有利于固态发酵技术的进步，这在固态发酵的放大和生产应用上将有重要意义。

发明内容

本发明的目的是开发一种能够连续进料出料能同时实现密闭培养，并能将固体物料的酶解处理和发酵分离耦合起来的固态发酵工艺和生物反应器，减少操作的中间步骤，从而使得固态发酵操作多，劳动量大的缺点能够得到改观。适用于连续固态发酵过程。

本发明的基本思想是通过物料的连续进出和相关环节的耦合减少中间操作，提高效率。现有的固态发酵一般都是批次操作，由于固体物料本身的原因，不论是批次之间还是每批发酵的不同工序之间，装料卸料劳动量往往比较大，特别是当反应器放大到工业规模的时候，这个问题尤为严重。这与液态发酵相对简单的物料传输相比，是固态发酵的一个严重缺陷，也是制约固态发酵应用的一个重要原因。本发明涉及的反应器能够将固态发酵的不同工序整合在一个反应器中；使用螺杆作为推进装置，将静态的酶解，发酵，提取过程变为连续的动态过程；使用关风器调整进出料的速度并保证发酵反应器内外的隔绝。这些手段的使用，避免了原来不同工序之间卸料装料过程，也减少了灭菌，清洗等的麻烦。

本发明具有以下特点：

1. 实现了发酵连续进行，与批次发酵相比减少了反应器接种，清洗以及灭菌的环节的操作。
2. 酶解发酵以及分离的耦合，没有中间操作，节省人力物力。

3. 无固体物料的翻动和搅拌装置，避免对菌丝体的破坏。

本发明的生物反应器如图1所示，主要包括一个卧式带螺杆推进装置的卧式罐和一个立式罐，包括关风器（1），螺杆（2），卧式罐（3），立式罐（4）卧式罐气体进口（5）和出口（6），立式罐放料关风器（7），立式罐进气口和出气口（8）（9）。图中（1）（7）分别为进料口和出料口的关风器，（2）为推进物料运动的螺杆推进器。关风器的作用在于连续进料出料的同时保证罐内外的隔绝，保证纯中发酵。螺杆的作用在于将酶解的物料连续不断地推向立式罐。关风器与螺杆得配合使用保证连续进料和连续出料。（5）（8）分别为卧式罐和立式罐的进气口，（6）（9）分别为卧式罐和立式罐的出气口，起作用为灭菌通蒸汽和厌氧培养时置换空气；（8）（9）还用于挥发性成分气提。另外（8）兼起接种口的作用。本发明的发酵工艺是这样的：固体物料通过关风器（1）连续进入卧式罐（3），卧式罐中的螺杆（2）缓缓将物料推向立式罐（4），再从立式罐下部的关风器（7）连续出料，物料在连续的进出了过程中完成酶解，发酵和分离等生化过程。其具体过程如下：

1.需要预先酶解的固态发酵品种：物料通过关风器连续进入卧式罐，在卧式罐中维持适当的温度进行酶解。酶解的同时使用螺杆推进器缓缓将物料推向立式罐。物料在螺杆推进的同时完成酶解处理，并连续进入立式罐。立式罐维持适当温度进行发酵。立式罐下部安装一关风器，立式罐装满后可以打开关风器连续卸料以保证发酵的连续进行。发酵罐下部和上部设进气和出气阀门，方便气体和易挥发组分的提取。

2.不需要对物料进行预先酶解的固态发酵：物料在卧式罐中完成发酵过程，在发酵的同时，物料被螺杆推进器缓缓推向前进。发酵完毕后物料进入立式罐，在立式罐完成提取过程之后连续出料或者不提去连续出料。

附图说明：图1，本发明装置示意图

图面说明：1.进料口关风器 2.螺杆 3.卧式罐
4.立式罐 5.卧式罐气体进口 6.卧式罐气体出口
7.立式罐放料关风器 8.立式罐进气口
9. 立式罐出气口

具体实施方式

实例 1：汽爆秸秆发酵生产纤维素乙醇的酶解、发酵气提耦合连续发酵

物料准备：将玉米秸秆切至长度为 2—3cm，在汽爆罐中 1.4MPa 维持 5 分钟，瞬间释放压力，得到汽爆秸秆。

灭菌：汽爆秸秆在另外的容器中 121—125℃，15-20min 灭菌。立式罐和卧式罐灭菌，从 (5) (8) 进蒸汽，从 (6) (9) 排蒸汽，压力维持 121—125℃，时间 15-20min。

混合，进料和酶解：进料之前通过通入 CO₂ 置换罐中的空气，(5) (8) 进气，(6) (9) 排气。灭完菌并冷却的汽爆秸秆按照 20 μ/g-汽爆秸秆的比例与纤维素酶混合，调含水量至 65—75%。在按照每 10kg 秸秆加 1g 酵母的比例，与安琪酵母（市场购得）混合。混合在卧式罐进料口进行，边混合边连续进料。

酶解：卧式罐维持温度 45℃，进行物料的酶解，酶解的同时开启驱动螺杆的步进电机，推动物料缓缓向立式罐运动。调节转速使得物料在卧式罐中停留的时间为 36—48h。

发酵：物料酶解完毕后进入立式罐。立式罐罐温维持 35℃，开始发酵过程。从 (8) 通入 CO₂ 进行气提。待立式罐中物料高度达到卧式罐下缘后，开启出料口 (7) 的关风器，以与进料相同的速度卸出物料，使得发酵能够连续进行。

经检测，酒精的得率为秸秆质量得 13-15%

实施例 2：汽爆麦草固态发酵制取氢气的酶解、发酵及气固分离耦合连续发酵

物料准备：将麦草切至长度为 15—20cm，在汽爆罐中 1.4MPa 维持 5 分钟，瞬间释放压力，得到汽爆麦草。

灭菌：将汽爆麦草放入灭菌锅中进行灭菌，灭菌温度在 121—125℃，灭菌时间为 15-20min；固态发酵反应器使用蒸汽灭菌，蒸汽从 (5) (8) 进入，从 (6) (9) 流出，维持 121—125℃，30 分钟以上。

酶解：将纤维素酶配置成 100 μ/ml 的溶液，再将溶液与灭菌并冷却的汽爆麦草按照 20 μ/g 的比例混合均匀。调节卧式罐的温度维持 35±1℃。打开进料口的关风器，缓缓进料，同时开动驱动螺杆的步进电机，将物料推向立式罐。调节转速使得物料在罐中的停留时间为 36—40 小时。

种子培养：丁酸梭菌（*C. butylicum* AS1.209，购自中科院微生物研究所）种子培养，每升种子培养基包括以下组分为葡萄糖 20g，酵母抽提物 3g， KH_2PO_4 0.2g， K_2HPO_4 1.6g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g，NaCl 0.1g， CaCl_2 0.01g， $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.25g， $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g， NaHCO_3 0.2g and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g。35±1℃厌氧培养至对数生长期，作为种子液。

发酵：在酶解的物料连续进入立式罐的同时，用蠕动泵将培养好的 *C. butylicum* AS1.209 种子液从(8)输入立式罐，比例为每 10g 基质加 1ml 种子液。发酵的同时打开出气口(9)，用排水法收集产生的气体。当立式罐中物料达到卧式罐下缘时，开启出料口的关风器（7），以进料相同的速度卸出物料，使得发酵能继续进行。

利用 SQ-206 型气相色谱仪（北分），使用热导检测器（TCD）检测氢气含量，载气为氮气，进样量为 50μl，用面积归一法计算氢气含量。连续发酵 48 小时，发酵产物中只有氢气和二氧化碳，其中，氢气含量为 40—43%，比产氢率为 65—70ml/g-底物。

实施例 3：用于甜高粱固态发酵生产乙醇的发酵、气提耦合连续发酵

物料的准备：将成熟收获后的甜高粱秸秆去掉高粱穗、高粱叶子和根后粉碎；

灭菌：粉碎后的甜高粱秸秆放入灭菌锅中进行灭菌，灭菌温度在 121—125℃，灭菌时间为 15-20min；固态发酵反应器使用蒸汽灭菌，蒸汽从（5）进入，从（6）流出，维持 121—125℃，30 分钟以上。

发酵：将安琪酵母（市场购得）与无菌水混合，混合比例按酵母 1g 加无菌水 40mL，在 35℃活化 25—30min，活化后再置于室温下 45—60min；在另一灭菌的容器内，按照 100g 秸秆加 20ml 活化液的比例将甜高粱与活化液混合；

开动关风器上的电机，从进料口将混合好的甜高粱基质从关风器缓缓送入发酵罐。同时用步进电机带动螺杆向前推动物料。在发酵开始进料时，从（8）通入 CO_2 置换罐内的空气。发酵罐温度保持 35±1℃。调整螺杆转速，保证物料在罐中的停留时间大约为 45—50 小时。

提取：物料在发酵罐中被螺杆徐徐推向提取罐，进入提取罐后开始提取过

程。提取罐温度 80℃，进气口（5）和出气口（6）持续通入 CO₂，流量 5—10L/min。进气口（8）和出气口（9）通入 CO₂ 气提。在口上连接冷凝器，使用自来说冷凝可以得到酒精溶液。提取罐积累的物料高度达到发酵罐下缘时，开动卸料口的关风器（7），以与进料相同速度卸出提取罐中的物料，然后继续前述步骤，使得发酵能够继续进行。

经检测，甜高粱酒精转化率达 10—12%。

实施例 4：惰性载体固态发酵连续发酵生产黄原胶

载体准备：将聚氨酯泡沫塑料裁成 0.5m³ 的小块，洗净，烘干，121℃30 分钟蒸汽灭菌。

种子培养：将培养在 PDA 斜面上的野油菜黄单胞菌（*Xanthomonas campestris* 1.1781，购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心）接种到盛有 50ml 营养肉汤培养液的 250ml 锥形瓶中，30℃摇床培养 24h 后，作为固态发酵的接种液。

反应器灭菌：将反应器 121℃30 分钟蒸汽灭菌。

接种和发酵：配制黄原胶发酵培养基，培养基成分为每升培养基包含蔗糖 40—50g，硝酸铵 1.0—1.25g，酵母膏 2.0—3.0g，MgSO₄·7H₂O，Na₂HPO₄·12H₂O，调 PH7.5。将配好培养基 121℃30 分钟蒸汽灭菌，冷却后按照 10% 的接种量将种子液接入其中，再按照固液比 1：10—1：15 的比例与灭过菌的载体混合并挤压使吸附均匀。开启进料口关风器，并缓缓进料，同时打开驱动螺杆的步进电机，缓缓将物料推向前进。通过进口（5）和出口（6）通入无菌空气，调节通气两在 0.5—1VVM。

出料：物料缓缓进入立式罐，从 8 注入无菌水浸泡物料溶出黄原胶。立式罐中的物料量达到卧式罐下沿后，开启出料口的关风器，连续卸出物料，通过挤压得到黄原胶发酵液。

经检测，发酵结束后，发酵液中黄原胶的浓度达到 2—3.5%。

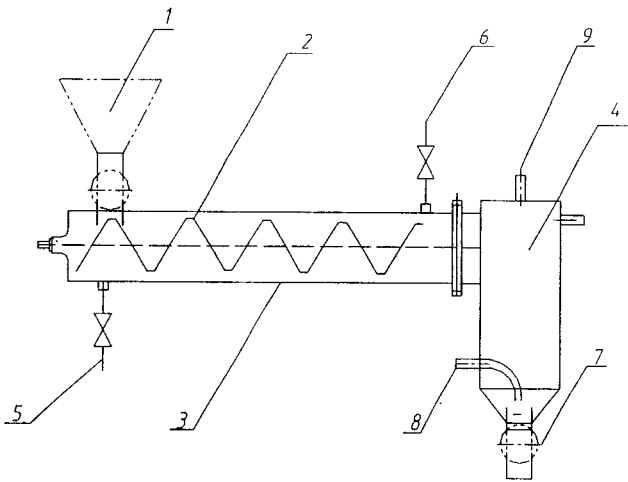


图 1