

絮凝法固定粟酒裂殖酵母实现乙醇连续发酵过程的研究

冯朴荪 许贵林 赵 岩 黄玉华

(大连理工大学生化工程研究室, 大连)

本文利用了粟酒裂殖酵母的絮凝颗粒, 依此作为固定化手段, 在悬浮床生物反应器中, 对淀粉糖化液进行了连续发酵的实验研究。对发酵过程中的酵母絮凝颗粒特性作了初步考察。三个月以上的不间断运转, 证明该反应器操作可行可靠, 酵母浓度可达 40—60g(干重)/L, 设备的生产强度可达 20—24g(乙醇)/L·h, 超过一般用载体包埋法固定化酵母的指标。悬浮床反应器由空气为驱动力, 由此而供入的有限量氧提高了酵母的发酵活性和对乙醇的耐受性, 可使乙醇的比生成速率提高 6—8%。本文还根据连续发酵所获得实验数据分别整理出了该发酵体系的动力学方程式, 它们是,

$$\text{对通空气情况: } v_g^1 = 1.02 \frac{S}{18.2 + S} \left(1 - \frac{P}{112}\right)$$

$$\text{对完全厌氧情况: } v_g^2 = 0.943 \frac{S}{24.9 + S} \left(1 - \frac{P}{108}\right)$$

关键词 发酵; 固定化细胞; 粟酒裂殖酵母

用固定化增殖酵母实现连续发酵是当前乙醇生产工艺的重要发展方向之一。近二三十年来已有许多利用载体包埋或吸附等固定化酵母的研究工作发表, 但因其消耗的化学品价格较贵, 使用寿命不长, 因此还迟迟没有在工业上应用。利用菌体自身絮凝能力而形成酵母颗粒, 依此作为一种固定化手段, 是晚近提出来的新概念^[1,2], 尽管目前生产中所用的优异菌株多数并不具备自身絮凝的性能, 但由于絮凝固定方法简单; 不需要任何载体材料与药剂; 能获得比其他固定化方法高得多的菌体浓度 (40—60g(干重)/L(反应器容积)), 从而可以达到较高的设备生产强度 (22—24g(乙醇)/L·h), 展示着更现实的工业应用前景, 因此它正愈来愈引起人们的兴趣与关注。近年来相继已选育出具有自身絮凝能力的酿酒酵母(*Saccharo-*

myces cerevisiae) 变异菌株^[3-5]、葡萄汁酵母 (*Saccharomyces uvarum*) 变异菌株^[6]、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)^[1,7] 和运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)^[8,9] 等, 陆续开展以它们的絮凝体实现乙醇的连续发酵的研究。本工作利用具有强自身絮凝能力的粟酒裂殖酵母菌株, 研究开发出一种适用的新型悬浮床生物反应器, 以淀粉的糖化液为原料进行连续发酵试验, 探讨其过程特征和稳定操作条件。

材 料 与 方 法

(一) 菌种和培养

采用从粟酒裂殖酵母 (*S.pombe*) 选

本文于1987年12月5日收到。

参加本研究的还有谢健、贾凌云、钱利平、李宁。

育出来的有强自身絮凝能力的菌株。形成絮凝颗粒的基本方法如文献〔7〕所述。菌种自斜面接种至YMPG培养液, 置于250 ml烧瓶在30℃, 150rpm条件下培养。每天更换一次培养液。一般在4—5天后就可以得到稳定的直径为0.5—1.5mm的絮凝颗粒。然后逐步扩展增殖至一定数量后, 便可以引入反应器。

(二) 培养基

1. YMPG培养液(g/L): 葡萄糖10, 酵母浸出膏3, 麦芽浸出膏5, 蛋白胨5。

2. 发酵实验用的原料液: 用市售纯淀粉, 以通常的双酶法〔10〕获得含总糖100—160g/L的糖化液。长期运转试验表明: 采用无锡酶制剂厂生产的 α 淀粉酶和糖化酶所制备的糖化液不再需要添加其他营养成分就可以保持良好的絮凝颗粒特征和稳定的发酵速率。

3. 其他: 在某些性能试验中还采用了含葡萄糖100—160g/L的YMPG培养液和YG培养液(葡萄糖溶液加酵母浸出膏5g/L)。

(三) 分析

1. 发酵液总糖含量: 用碘量法分析。

2. 乙醇浓度: 由气相色谱仪确定。

3. 酵母菌体浓度以单位体积料液中干重表示, 即试样取出后经离心沉降、洗涤, 反复3次。然后在70℃下干燥12h以上, 称重而得。

4. 细胞的存活率: 由通常的亚甲基蓝染色技术来确定。

(四) 絮凝颗粒酵母的发酵实验

在自行设计的悬浮床生物反应器中进行。其反应器的结构如图1所示。设备容积为0.5L, 反应器的主体是中央气提式环流系统, 颗粒酵母悬浮液靠通入空气或氮气提升至顶部, 然后在环形空间缓慢下流。由于颗粒自由沉降速度不大, 在

这和缓的环流运动中, 酵母颗粒可保持均匀的悬浮状态, 发酵产生的CO₂气泡亦能顺利上升至顶部逸出。气体用量只要大于25ml/min即0.05vvm, 就能维持上述正常的操作状态。反应器顶部设有颗粒沉降分离装置, 本实验设备仅是3cm高度的静止沉降区, 这就可以在连续发酵实验中保证颗粒酵母不被液流夹带出去。

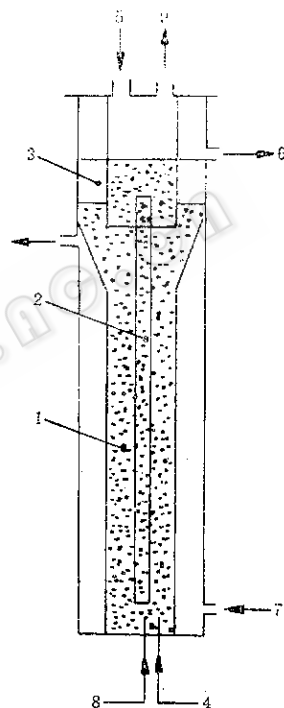


图1 实验悬浮床生物反应器
Fig. 1 Experimental suspended-bed bioreactor

- 1. 发酵区 Fermentation zone
- 2. 提升管 Draft tube
- 3. 沉降区 Sedimentation zone
- 4. 进料口 Medium in
- 5. 检测口 Monitoring hole
- 6. 产物 Product
- 7. 水 Water
- 8. 气体入口 Gas in
- 9. 气体出口 Gas out

结果与讨论

(一) 粟酒裂殖酵母絮凝体的特征

一些微生物的絮凝现象早已为人们所知晓, 并利用它使微生物更容易地从培养

液中分离出来。但因其机制涉及到基因、生理学、环境等诸多复杂因素,因此形成絮凝体的规律性迄今还很不清楚^[10]。*S. pombe* 酵母的具有强絮凝能力的菌株是在为木酮糖发酵筛选中得到。这菌株一旦形成絮凝体后,有一定的牢固度,在往后的增殖过程中几乎不再有自由酵母游离出去。实验证明这个属性可以利用来作为固定化手段。

实验观察表明,一些通常发酵操作中遇到的化学因素,对絮凝体形成和保持没有什么妨碍。酵母的絮凝颗粒在pH从2.8到7.0很宽的范围内都是稳定的。实际操作中 Ca^{2+} 浓度不需要控制或添加任何钙盐; K^+ , Na^+ 离子总浓度增加到1.0mol/L也显不出它的影响来,但是在与 Ca^{2+} 有螯合作用的EDTA或柠檬酸钠溶液(0.1mol/L)中絮凝体能迅速瓦解,这与Gong^[8]对*S. uvarum*絮凝体观察到的现象相类似。

酵母絮凝体的形状很不规则,且强度很弱。若许多小絮凝酵母颗粒静置堆积接触,就有进一步凝聚的趋向,形成如楂饼状大块。流体的湍流和剪切力都可以把絮凝体破碎。我们曾在7L的实验标准发酵罐中进行絮凝体培养试验,当51mm直径的涡轮桨叶在350rpm时,相应于桨叶顶端切线速度为0.47m/s时,絮凝体很快被粉碎,而转速低于250rpm时,其搅动还不足使沉积在釜底的絮凝颗粒悬浮起来。在工程应用的设备选用上排除了固定床和剪切速率大的机械搅拌罐的可能性。实践表明,搅动和缓的悬浮床生物反应器则很合适,不论是YMPG培养液还是淀粉糖化液在这类型设备的整个发酵实验过程中始终能保持0.3—1.5mm大小的絮凝颗粒,含糖浓度高,颗粒结实,尺寸偏大;发酵速率大时,颗粒疏松,尺寸偏小;湍动剧烈时,尺寸偏小。

絮凝颗粒的沉降速度 v_s 是悬浮床生物反应器结构和操作控制的重要依据,经初步测定,大致是:

大絮凝颗粒 ($d \geq 1 \text{ mm}$) $v_s = 0.67 - 0.72 \text{ cm/s}$

中等絮凝颗粒 $v_s = 0.45 - 0.54 \text{ cm/s}$

小絮凝颗粒 ($d \leq 0.3 \text{ mm}$) $v_s = 0.1 - 0.15 \text{ cm/s}$

絮凝颗粒的沉降速度是较慢的,在悬浮床操作中当发酵液在下降侧下流速度超过1 cm/s,絮凝颗粒就不会在该区内沉降,保持了酵母颗粒-发酵液的均一悬浮。

(二) 连续发酵实验

在单级悬浮床生物反应器中,连续发酵实验曾不间断地进行了3个月以上,操作中供入空气量为37ml/min,相当于0.074vvm。结果证明此设备系统操作稳定,自始至终能保持高的乙醇生产速率。长期运转中,絮凝颗粒中活细胞比率一直在98%以上;酵母浓度在缓慢增长,但当酵母浓度达到30g(干重)/L以上时,其增殖速度变得缓慢,其间有5天多时间,酵母浓度基本保持不变。

在悬浮床生物反应器操作中,空气和进料速率、pH和温度均可保持恒定,但是酵母总是在增长,增长速率不会恰好等于洗出速率(悬浮床反应器几乎把所有絮凝颗粒截留在内),因此酵母浓度在不断增高,为了保持反应器长时期的稳定操作,需要定期地(例如间隔3—5天)从反应器中取出一批酵母颗粒,以避免浓度过高而堵塞设备。这样酵母将在一定浓度范围变动,从而出口糖浓度和乙醇浓度严格地讲也将不会恒定,但变化是极为缓慢,可以认为这是一种“准稳态”,它不妨碍按稳态测算其设备生产强度 PD [g(乙醇)/L·h]和乙醇的比生成速率 v_E' [g(乙醇)/g(酵母干重)·h]。

连续发酵实验的典型结果如图2所示。实验在30℃,自然pH下进行。酵母颗粒含量平均为30g/L,原料液含糖160g/L,初始pH为5.6;反应器内pH为3.5—4;空气用量为37ml/min,相当于0.074VVM。结果表明:当稀释速率小于 0.1h^{-1} 时,残糖浓度可低于15g/L,糖转化率达90%以上。随着稀释速率的增加,乙醇浓度下降,出口残糖浓度上升,但乙醇的生成速率显著增加,当稀释速率到 0.42h^{-1} 时,乙醇生成速率已达到 $20\text{g/L}\cdot\text{h}$,明显高于用载体包埋固定酵母可能达到的16—18 $\text{g/L}\cdot\text{h}$ 的数值^[13],与其他酵母絮凝体的连续发酵实验结果接近^[4,5]。需要指出的是在实际生产应用中,可以通过多级串联来既保持高的设备生产强度,又使出口残糖尽可能低。

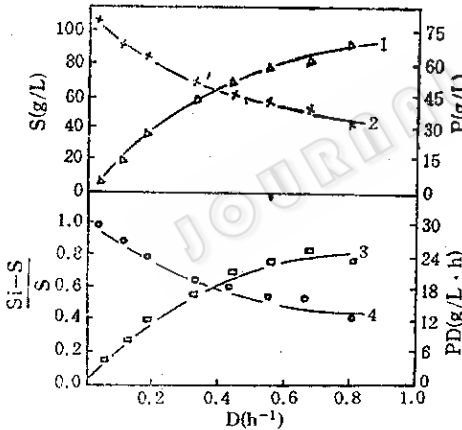


图2 连续发酵实验结果
Fig.2 Experimental results for continuous fermentation $S_i = 160\text{g/L}$

1. S 2. P 3. PD 4. $\frac{S_i - S}{S_i}$

颗粒酵母的浓度是影响设备发酵强度的重要因素,一定进料速度和糖浓度下乙醇的生成速度对于不同颗粒酵母浓度的典型关系如图3所示。由图看出,乙醇生产速率随酵母浓度的增加而增高,但达到一定值后增高趋于平缓,趋向于一定值;这转

折点随着稀释速率的增加而更早地出现,这现象对于维持悬浮床生物反应器的稳定操作将是有利的。

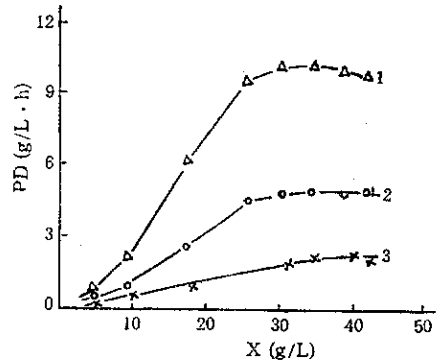


图3 不同细胞干重X下乙醇生产能力
Fig.3 Ethanol Productivity PD at different cell dry weight X

1 $D = 0.35\text{h}^{-1}$ 2 $D = 0.11\text{h}^{-1}$
3 $D = 0.04\text{h}^{-1}$

(三) 有限供氧的影响

发酵过程中,不断与空气鼓泡接触因而有少量氧溶入是本研究反应器操作的重要特征。尽管用酵母将糖发酵生成乙醇是一厌氧过程,一些作者已指出^[12,14],痕量的氧能改善酵母活性和对乙醇的耐受性,特别对高酵母浓度有效。我们在发酵过程中分别通入空气和纯氮气测得的乙醇生成速率也显示出这一效果,如图4所示,在其他条件相同下通空气情况的乙醇生成速率要比氮气情况高出6%以上。作者在先前的工作^[11]中还测得了絮凝颗粒酵母的氧比摄取速率 q_{O_2} ($\text{mmol/g(干重)}\cdot\text{h}$)对乙醇生成速率的影响,示于图5,可见稍微提高 q_{O_2} 可使生成速率增大。

在长期运转中我们注意到在供氧条件下乙醇的得率系数 $Y_{E/s}$ 值均在0.46—0.48范围内,与通常厌氧发酵过程没有差异。

我们还检验了供氧后对酵母细胞增殖的影响,从通空气和厌氧两种情况下测定的比生长速率 μ ,标绘于图6,可以看到,操作中这样有限量氧的供给对酵母细

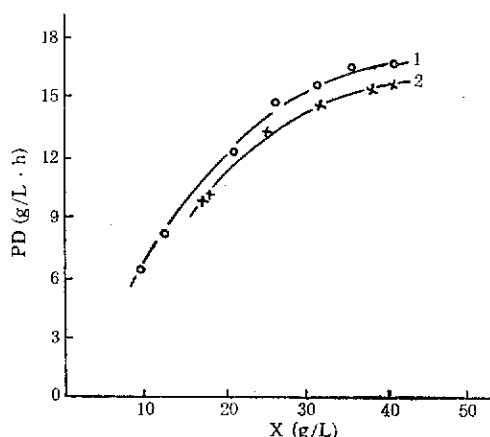


图4 通空气和通氮气实验结果比较
Fig. 4 Comparison of experiments between
at air driven and anaerobic condition

$D = 0.35 \text{ h}^{-1}$ $S_i = 118 \text{ g/L}$
1. 空气 Air 2. 氮气 Nitrogen

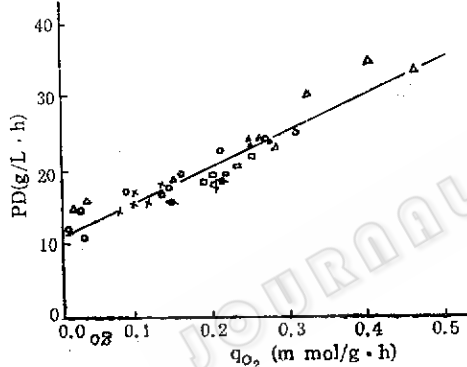


图5 乙醇生产速率PD与比氧摄取速率 q_{O_2} 的关系
Fig. 5 Correlation of ethanol productivity PD
on specific oxygen uptake rate q_{O_2}

稀释率 Dilution rate (h^{-1}): $\square 0.522$, $\circ 0.530$, $\triangle 0.632$, $\nabla 0.741$

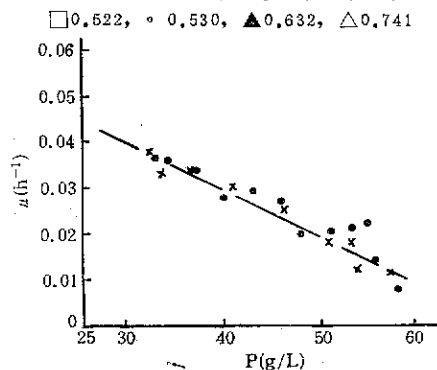


图6 比生长速率与乙醇浓度的关系
Fig. 6 Correlation of specific growth rate on
ethanol concentration

• 通空气 Aerobic × 厌氧 Anaerobic

胞增殖速度的影响显不出来, 两种情况下 μ 对乙醇浓度的关系是一致的。

(四) 发酵液中的最大乙醇浓度

为了确定本发酵体系可能达到的最大乙醇浓度 P_m , 在反应器中进行了特别的分批发酵实验, 即在发酵进行过程中定期地加入高浓度葡萄糖溶液以补偿糖的消耗, 保持底物大致恒定的较高浓度, 保证代谢速度不会因底物浓度减低而过分地变慢, 糖和乙醇浓度定期地采样测定。乙醇浓度随时间的变化曲线示于图7, 在这里我们感兴趣的仅是渐近线的逼近值, 对于通空气情况下, 它是112g/L; 絮凝体抑或游离酵母没有差别。对于通氮气厌氧条件下, 是108g/L。由此可见, 在供氧的条件下减轻了乙醇对酵母的抑制作用。两者的数值均略高于其他常用的酵母^[15], 表明采用*S. pombe*酵母的发酵生产可使发酵液终了乙醇含量到达应有的浓度。上述测得的最大乙醇浓度正是发酵过程受乙醇抑制使代谢生产停止的浓度, 也就是考虑产物抑制的动力学模型中抑制常数 P_m 。

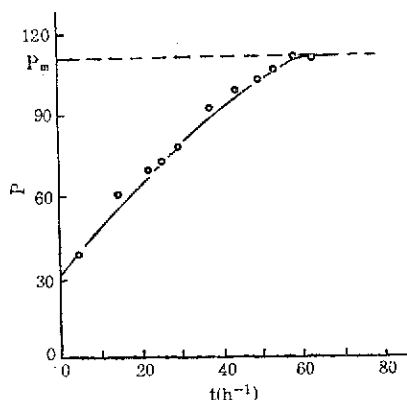


图7 最大乙醇浓度的确定
Fig. 7 Determination of maximum ethanol
concentration

(五) 发酵动力学方程式

悬浮床生物反应器应用于絮凝颗粒酵母的连续发酵时, 物料在反应器内停留时

间是1.25至20h,在此期间物料在反应器内至少循环60—300次以上,反应器内混和良好,糖与乙醇浓度、pH值都均一。因此宏观上此反应器可以当作全混釜处理。根据准稳态条件下获得的数据,可以归纳出该发酵系统的动力学方程式。

关于游离酵母发酵动力学模型公认为 Ghose 和 Tyagi^[18]提出的形式比较恰当

$$v_E = v_{E_{\max}} \frac{S}{S + K_M + \frac{S^2}{K_I}} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \quad (1)$$

这里 $\left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n$ 是考虑产物抑制的因素, K_M 是米氏常数; K_I 是底物非竞争性抑制常数。

在我们的絮凝颗粒酵母情况下,颗粒核心部位的酵母受内扩散的影响,不会同处于颗粒表面的酵母起到同样的作用,按传统的做法引入一个有效因子 η 来计及,于是絮凝颗粒酵母的发酵速率 v_E' 可表示为:

$$v_E' = \eta v_E \quad (2)$$

为了检验絮凝颗粒内扩散的影响程度,我们在悬浮床反应器中测定了在 YMPG 培养液中絮凝酵母与游离酵母的比生成速率 v_E' 细胞浓度均约为 20g(干)/L; 测得 v_E 分别为 0.357 和 0.420, η 等于 0.85, 表明内扩散影响还不能忽略,不过它比载体包埋固定酵母的情况要小得多。由于絮凝酵母颗粒在具体发酵过程中是动态地维持某种形态和尺寸,制约因素复杂,很难得到有效因子的规律,因此,目前还只能笼统地处理,在我们的连续发酵系统中,底物的抑制作用显不出来,产物乙醇呈线

性抑制,于是得到:反应器在通空气驱动下

$$v_E' = 1.02 \left(\frac{S}{18.2 + S} \right) \left(1 - \frac{P}{112} \right) \quad (3)$$

通氮气情况下

$$v_E' = 0.943 \left(\frac{S}{24.9 + S} \right) \left(1 - \frac{P}{108} \right) \quad (4)$$

符号说明

- D 稀释速率 (h^{-1})
- K_I 底物非竞争性抑制常数
- K_M 米氏常数
- n 指数
- P 产物浓度 (g/L)
- PD 乙醇生成速率或设备生产强度 [g (乙醇) / L·h]
- P_m 最大乙醇浓度 (g/L)
- q_{O_2} 氧的比摄取速率 (mmol/g(干重)·h)
- S_i 底物入口浓度 (g/L)
- S 底物浓度 (g/L)
- t 时间
- X 酵母浓度 [g (干重) / L]
- $Y_{E/S}$ 得率系数
- μ 比生长速率 (h^{-1})
- v_E' 絮凝颗粒酵母比生成速率 [g (乙醇) / g (酵母干重)·h]
- v_E 游离酵母比生成速率 [g (乙醇) / g (酵母干重)·h]
- $v_{E_{\max}}$ 最大比生成速率 [g (乙醇) / g (酵母干重)·h]
- η 有效因子

参 考 文 献

- [1] 冯朴荪 and Tsao, G.T. et al.: Research Report in LORRE, Purdue University, 1985.
- [2] Karal, S.F. et al.: Chem. Eng. Sci., 40:1321, 1985.
- [3] Jones, S.T. et al.: Biotech. and Bioeng., 26:742, 1984.
- [4] Limtong, S. et al.: J. of Ferment. Technol., 62:55, 1984.

- [5] Bu'Lock, J.D. et al.: *The Chem. Eng. Journal* (Lausanne), 29:B9, 1984.
- [6] Gong, C.S. et al.: *Biotech. and Bioeng. Symp.*, No.14, 257, 1984.
- [7] Hsiao, H.-Y. et al.: *Biotech. and Bioeng.*, 25: 363, 1983.
- [8] Scott, C.D.: *Biotech and Bioeng. Symp.*, No.13, 278, 1983.
- [9] Rodriguez, E. and Calieri, D.A.S.: *Eur. J. Appl. Microbial. Biotech.*, 18:186, 1983.
- [10] Esser, K. and Kues, U.: *Process Biochemistry*, No.12, 21, 1983.
- [11] Mill, P.J.: *Gen. Microbial.*, 35:61, 1964.
- [12] Ryu, D.D.Y. et al.: *Biotech. and Bioeng.*, 26:12, 1984.
- [13] Linko, Y. and Linko, P.: *Biotech. Letters*, 3:21, 1981.
- [14] Furukawa, K. et al.: *Biotech. and Bioeng.*, 25:2293, 1983.
- [15] Gianetto, A. et al.: *Chem. Eng. Commun.*, 23:215, 1983.
- [16] Ghose, T.K. and Tyagi, R.D.: *Biotech. and Bioeng.*, 21:1401, 1979.

A STUDY OF CONTINUOUS FERMENTATION TO PRODUCE ETHANOL USING *SCHIZOSACCHAROMYCES* *POMBE* YEAST FLOCS

Feng Pusun Xu Quilin Zhao Yan Huang Yuhua

(Laboratory of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian)

A experimental study of continuous fermentation for saccharified starch solution to produce ethanol using yeast particles of highly flocculent strain of *Schizosaccharomyces pombe* regarded as immobilized microbial cells was presented. The characteristics of yeast floc particles during fermentation was observed primarily. A suspended-bed bioreactor driven by air was built up, in which total yeast particles virtually to be retented and operated over 3 months without interruption. It was shown that the operating of such bioreactor was favored in our fermentation system, yeast concentration could be held up exceeding 40g/L (dry weight), a limited oxygen supplement enhanced the productivity, and a high values of 20—24g/L·h was obtained. The kinetic equations were also to be found. They were

$$v_E' = 1.02 \left(\frac{S}{18.2 + S} \right) \left(1 - \frac{P}{112} \right)$$

in air drining condition; and

$$v_E' = 0.943 \left(\frac{S}{24.8 + S} \right) \left(1 - \frac{P}{108} \right)$$

in anaerobic condition.

Key words

Fermentation; immobilized cells; *Schizosaccharomyces pombe*