

絮凝颗粒酵母均匀悬浮体系生长动力学的研究

秦金来* 白凤武 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 利用粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株自身絮凝形成的颗粒,作为细胞固定化方法。以双酶法制备的淀粉糖化液为底物,在有效容积 2.35L 的小型悬浮床生物反应器中连续生产酒精。研究了微量供氧条件下该絮凝颗粒酵母均匀悬浮体系的生长动力学,获得了描述其生长规律的模型方程。

关键词 絮凝颗粒酵母, 悬浮床生物反应器, 酒精连续发酵, 生长动力学

用固定化酵母细胞技术实现酒精连续发酵是当今酒精发酵工艺的重要研究和发展方向之一^[1,2]。某些发酵性能优良的菌株具有强自身絮凝能力,可以形成颗粒,以此作为一种固定化细胞的方法^[3-5]。与通常的各种载体固定化细胞技术相比,它具有方法简单、不消耗辅助材料、反应器中菌体浓度高的突出优点^[6]。目前,这种絮凝颗粒酵母实现酒精连续发酵的研究工作正在发展^[7-12]。

本文选用具有强自身絮凝能力的粟酒裂殖酵母变异株,使用在气升环流反应器基础上发展起来适宜于该絮凝颗粒酵母连续发酵生产酒精的悬浮床生物反应器^[13,14],以双酶法^[15]制备的淀粉糖化液为底物,在微量供氧的条件下研究了该絮凝颗粒酵母均匀悬浮体系的生长动力学规律,以期为这一技术工业应用时选择合理的工艺操作方案提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及培养方法

1.1.1 菌种: 粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株,由大连理工大学生化工程研究室提供。该菌株具有强自身絮凝能力,且酒精发酵性能良好。

1.1.2 培养基: 摇瓶一级种子培养基(YMPG)组成(g/L): 酵母膏 5, 麦芽汁 3, 蛋白胨 3, 葡萄糖 10。将葡萄糖浓度提高到 30g/L 的 YMPG 作为摇瓶二级种子培养基。发酵培养基为双酶法制备的淀粉糖化液,将其稀释至外观糖 10Bx,添加 5g/L 玉米浆,以补充糖化液中缺乏的氮源和各种生长素。培养基均在 0.1MPa 压力下灭菌 20 分钟。

1.1.3 培养方法: 斜面菌种接入一级种子培养基中,在 30℃、150r/min 下进行摇瓶培养,每天更换一次培养基,4—5 天后酵母细胞可絮凝形成颗粒,该絮凝颗粒酵母具有良好的沉降性能,静置后收集沉降的菌体,以 5% 的种量接入二级种子培养液内培养。

收集二级摇瓶培养的絮凝颗粒作为种子,以约 5% 的种量接种到悬浮床生物反应器,

* 在中国石化科技开发公司工作。

参加本文研究工作的还有赵绍林、耿国其、王 军。

本文于 1994 年 3 月 2 日收到。

通风间歇培养至反应器中残糖浓度降至约 5g/L 时,开始流加发酵。

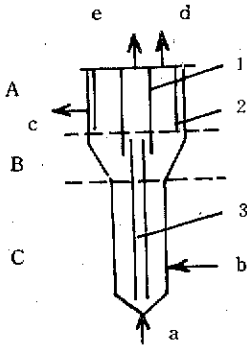


图 1 悬浮床生物反应器示意图

Fig. 1 Diagram of the suspended-bed bioreactor

- A. Separation zone, B. Buffer zone
- C. Main fermentation zone
- a. Air input, b. Medium input
- c. Effluent output, d. CO₂ output
- e. Exhaust gas output
- 1. Separating wall,
- 2. Sedimentation buffer,
- 3. Draft-tube

1.2 反应器

悬浮床生物反应器如图 1 所示。其主体为气升环流系统^[13,14],操作时气升管内输入的少量空气在气升管内外形成气含率差,构成反应器中物料缓慢环流的推动力,使得絮凝颗粒酵母克服重力沉降,实现均匀悬浮。同时菌体悬浮液周期性流过气升管与空气接触,摄取微量的氧,使其在培养期迅速增殖,在发酵过程中保持高活性。反应器上部为分离区,一方面实现固液分离,使絮凝颗粒酵母不随发酵液流失,另一方面实现尾气与 CO₂ 的分离,保证回收高纯度的 CO₂。反应器主体与分离区之间为缓冲区,可以减轻发酵产生 CO₂ 对沉降分离区的扰动。反应器有效容积为 2.35L。

1.3 分析方法

1.3.1 糖浓度测定:糖浓度测定采用常规的 Feiling 反滴定法^[16]。

1.3.2 酒精浓度测定:酒精浓度用国产 2305 气相色谱接美国 SP4029 微处理机内标法测定。

1.3.3 絮凝颗粒酵母浓度及活性测定:絮凝颗粒酵母浓度以单位体积悬浮液中菌体干重表示,测定时取样离心,并用蒸馏水洗涤三次,置 70℃ 恒温烘箱干燥至恒重,称重;将絮凝颗粒酵母用 EDTA 溶液解离后,离心收集菌体,用美蓝染色,显微镜下观测活细胞比率来判定菌体活性。

1.3.4 溶解氧与气相氧浓度的测定:用自制 Ag-Pb 电极和中国科学院大连化学物理研究所提供的 CD-Ⅱ 型气相氧浓度分析仪,分别测定发酵液中溶解氧和尾气中残留氧浓度。比菌体的比氧摄取速率为:

$$r(\text{O}_2) = \frac{1}{x} \cdot \frac{20.8 - C(\text{O}_2)}{100 - C(\text{O}_2)} \cdot \frac{60Q}{2.35} \cdot \frac{1}{2.24 \times 10^4} \cdot \frac{273.2}{273.2 + t} \times 10^3 \quad (1)$$

1.4 实验操作工艺流程

图 2 所示为实验操作的工艺流程:

2 结果与讨论

2.1 氧的供给对菌体生长的影响

在 pH 值 4.0, 温度 30℃ 条件下,根据菌体耗糖速率/反馈调节反应器的底物稀释率,控制残余还原糖浓度为 10g/L,酒精浓度 28g/L,改变通气量来研究氧的供给对菌体生长的影响,结果如图 3 所示。

当反应器以 N₂ 驱动时,随着底物流加供氧量为 $3.98 \times 10^{-3} \text{ mmol/g} \cdot \text{h}$,菌体比生长

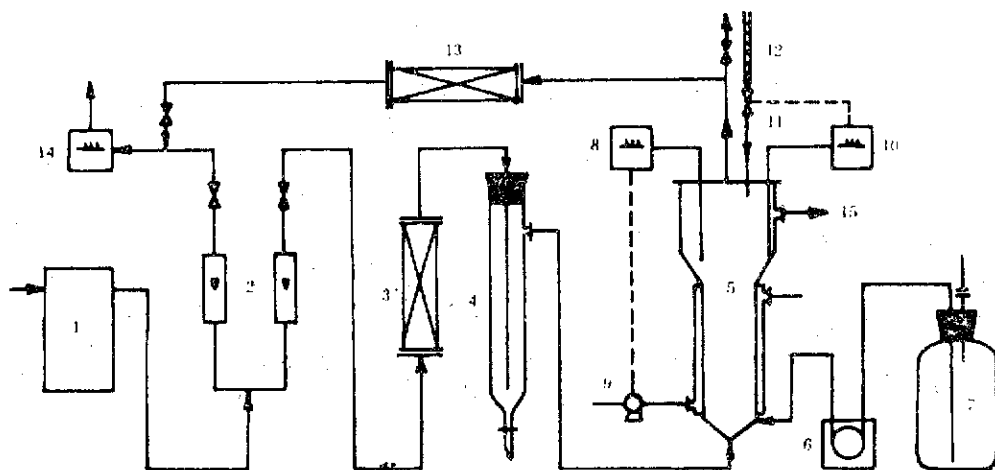


图2 实验装置及工艺流程

Fig. 2 Process flow sheet of continuous ethanol fermentation using flocs

1. Air compressor, 2. Air rotameter, 3. Air filter, 4. Air humidifier, 5. Suspended-bed bioreactor, 6. Peristaltic pump for feeding, 7. Storage tank for medium, 8. Temperature controller, 9. Pump, 10. pH controller, 11. Electromagnetic valve, 12. Burette for alkali, 13. CO₂ absorber, 14. Oxygen concentration detector

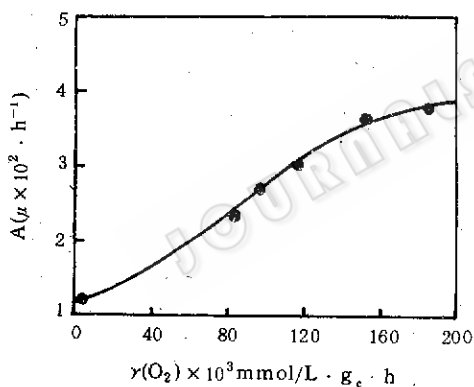


图3 氧的供给对菌体生长的影响

Fig. 3 Effects of oxygen supplement on growth
Specific oxygen up-take rate

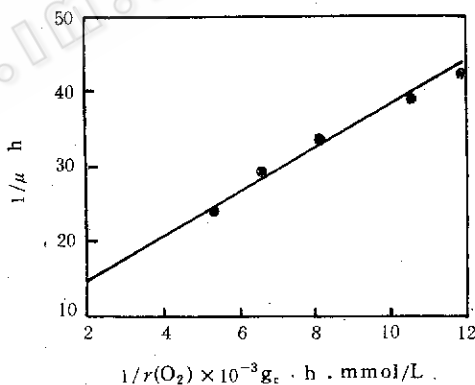


图4 实验数据的 Lineweaver-Burk 标绘

Fig. 4 Results of drawing $1/\mu$ to $1/r(\text{O}_2)$

速率为 $1.26 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$, 生长十分缓慢。切换空气后, 通气量增加, 供氧量相应提高。当通风比为 0.04—0.12vvm 时, 比氧摄取速率为 84.3×10^{-3} — $122 \times 10^{-3} \text{mmol/g} \cdot \text{h}$, 比生长速率由 $2.36 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$ 提高到 $3.47 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$, 提高幅度接近 50%。与通 N₂ 相比, 即使通风量仅为 0.04vvm (反应器操作时保证絮凝颗粒酵母均匀悬浮的最低通风量), 比生长速率却由 $1.26 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$ 提高到 $2.36 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$, 增大近一倍。当通风量由 0.12vvm 继续增大时, 尽管菌体比生长速率继续增加, 但此时絮凝颗粒酵母的颗粒形态受到影响, 其主要原因在于反应器中悬浮液环流速度过高, 流动剪切力超过了颗粒的耐剪限度。在通 N₂ 情况下, 也观察到絮凝颗粒酵母解离的现象, 这可能是由于此时酵母细胞活性较低, 细胞表

面促絮凝物质分泌减少所致。

图 4 所示为比生长速度与比氧摄取速率的 Lineweaver-Burk 标绘,线性关系良好,表明氧对该絮凝颗粒酵母生长过程的影响符合 Monod 方程:

$$\mu' = \frac{\mu'_{\max} r(\text{O}_2)}{K(\text{O}_2)' + r(\text{O}_2)} \quad (2)$$

并获得模型参数 $\mu'_{\max} = 10.3 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$, $K(\text{O}_2)' = 279 \times 10^{-3} \text{mmol/g} \cdot \text{h}$ 。

2.2 絮凝颗粒酵母生长动力学研究

除了氧的影响外,底物糖浓度、产物酒精浓度对菌体生长均有较大影响,其生长动力学基础数据如表 1 表示。

表 1 粟酒裂殖酵母絮凝颗粒的生长动力学实验数据

Table 1 Experimental data of growth kinetics for the flocs from *S. pombe*

No.	S (g/L)	P (g/L)	$r(\text{O}_2) \times 10^3$ (mmol/g · h)	$\mu \times 10^2$ (1/h)	No.	S (g/L)	P (g/L)	$r(\text{O}_2) \times 10^3$ (mmol/g · h)	$\mu \times 10^2$ (1/h)
1	7.30	72.0	136.6	1.11	10	37.0	75.0	153.6	2.50
2	12.5	43.2	122.9	2.72	11	38.5	21.5	102.4	4.02
3	13.5	35.0	119.4	2.93	12	38.7	43.0	107.8	3.85
4	14.3	49.5	102.9	2.22	13	38.7	90.0	126.7	0.88
5	15.5	71.5	129.2	2.08	14	40.0	62.5	88.7	2.60
6	17.3	67.2	125.4	1.95	15	40.5	20.5	99.8	4.30
7	30.0	26.0	93.6	3.30	16	45.0	44.7	94.4	3.70
8	31.5	76.5	122.9	2.19	17	52.9	75.5	117.0	2.68
9	34.0	42.0	98.0	3.60	18	54.5	62.0	144.6	3.65

限制性底物糖的影响通常由 Monod 方程描述。人们在研究游离细胞生长时提出了各种形式的数学模型来描述产物酒精对菌体生长的抑制效应,我们采用 Luong⁽¹⁷⁾提出的非线性模型来描述酒精对该絮凝颗粒酵母生长的抑制效应,提出如下的动力学模型:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K(S) + S} \cdot \frac{r(\text{O}_2)}{K(\text{O}_2) + r(\text{O}_2)} \left[1 - \left(\frac{P}{P_{\max}} \right)^{\alpha} \right] \quad (3)$$

用表 1 的数据进行非线性回归,得到模型参数为:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= 0.234 \text{ h}^{-1}, & K(S) &= 15.0 \text{ g/L}, \\ K(\text{O}_2) &= 266 \times 10^{-3} \text{ mmol/g} \cdot \text{h} & P_{\max} &= 106 \text{ g/L}, \\ \alpha &= 1.64 \end{aligned}$$

这样,综合反应底物糖、产物酒精及氧摄取量影响的絮凝颗粒酵母生长动力学模型方程为:

$$\mu = \frac{0.234S}{15.0 + S} \cdot \frac{r(\text{O}_2)}{266 + r(\text{O}_2)} \cdot \left[1 - \left(\frac{P}{106} \right)^{1.64} \right] \quad (4)$$

回归得到的 $K(\text{O}_2)$ 与图 4 标绘得到 $K(\text{O}_2)'$ 十分相近。

图 5 所示为模型方程(4)预测菌体比生长速度与实测值的比较,其最大误差为 35%,平均误差为 14.8%,表明方程(4)较好地描述了粟酒裂殖酵母絮凝颗粒在悬浮床生物反应器中培养与酒精发酵时的生长规律。

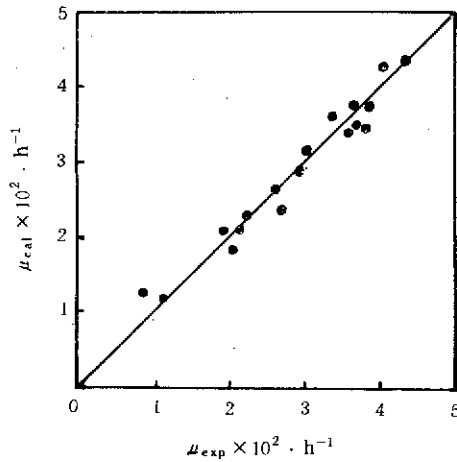


图 5 模型预测值与实测值的比较

Fig. 5 Comparative results of calculated value to experiment value

符 号 说 明

$C(O_2)$	脱除 CO_2 后尾气中氧浓度 (%)
$K'(O_2)$	方程(2)定义的模型参数 (mmol/g · h)
$K(O_2)$	方程(3)定义的模型参数 (mmol/g · h)
$K(S)$	方程(3)定义的模型参数 (g/L)
P	发酵液中酒精浓度 (g/L)
P_{max}	菌体生长所耐受的最大酒精浓度 (g/L)
Q	反应器通风量 (ml/min)
$r(O_2)$	菌体比氧摄取速率 (mmol/g · h)
S	发酵液中底物糖浓度 (g/L)
t	操作温度 (°C)
x	悬浮液中菌体 (dwt) 浓度 (g/L)
μ'	氧摄取速率影响下菌体比生长速率 (1/h)
μ'_{max}	氧摄取速率影响下菌体最大比生长速率 (1/h)
μ	各因素综合影响时菌体比生长速率 (1/h)
μ_{max}	各因素综合影响时菌体最大比生长速率 (1/h)
α	方程(3)定义的模型参数

参 考 文 献

- (1) Nagashima M *et al.* Biotechnol Bioeng, 1984, 26: 992.
- (2) Nunez M J and Lema J M. Enzyme Microb Technol, 1987, 9: 642.
- (3) Hsiao H Y *et al.* Biotechnol Bioeng, 1983, 25: 263.
- (4) Jones S T *et al.* Biotechnol Bioeng, 1984, 26: 742.
- (5) Limtong S *et al.* J Ferment Technol, 1984, 62: 55.
- (6) Bu'Lock J D *et al.* J Chem Eng, 1984, 29: B9.
- (7) Kida K *et al.* J Ferment Bioeng, 1989, 68: 107.
- (8) Kida K *et al.* J Ferment Bioeng, 1990, 69: 39.
- (9) 冯朴荪等. 生物工程学报, 1989, 5(1): 70.

- [10] 裴疆森等. 食品与发酵工业, 1991, (1): 11.
[11] 白凤武等. 食品与发酵工业, 1991, (1): 11.
[12] 白凤武等. 食品与发酵工业, 1993, (6): 8.
[13] 白凤武. 冯朴荪. 化工学报, 1992, 43(3): 304.
[14] 白凤武. 冯朴荪. 化学工程, 1993, 21(5): 30.
[15] 张力田. 《淀粉糖》, 北京: 轻工业出版社, 1981.
[16] 胡嗣明, 张天杭. 《酒精生产分析检验》, 北京: 轻工业出版社, 1987.
[17] Luong J H T. Biotechnol Bioeng, 1985, 27: 280

A Study of Growth Kinetics of the Flocs from *Schizosaccharomyces pombe*

Qin Jinlai Bai Fengwu Xie Jian Li Ning Feng Pusun

(Laboratory of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract Inducing yeast cells to self-flocculate as a cell immobilization method, the growth kinetics of the flocs from *Schizosaccharomyces pombe* was studied in a experiment scale suspended-bed bioreactor using saccharified solution of starch. It was discovered that oxygen was a kind of limited substrates, and its effects on floc growth corresponded with Monod model. Further, a kinetic model described this floc growth was proposed.

Key words Continuous ethanol fermentation, flocs, kinetics, suspended-bed bioreactor