

# 无载体固定化酵母细胞木薯淀粉质原料酒精连续发酵研究\*

马 悦

(华东理工大学生物反应工程国家重点实验室 上海 200237)

周祥山 吴佩琮

(无锡轻工大学生物工程学院生化工程研究室 无锡 214036)

**摘 要:**以木薯粉糖化液为发酵底物,在总发酵体积(有效)为 1.5L 的悬浮床生物反应器中,对一株粟酒裂殖酵母变异株进行一级和二级连续发酵研究。结果表明,二级连续发酵系统可明显改善一级系统的不足,并取得了平均流加糖液浓度 150g/L,发酵强度为 9.7g/L·h,流出液酒精浓度 72.7g/L,残糖浓度 3.74g/L,总糖利用率达 90% 的较好结果;整个系统在连续一个月的运行中从未发现染菌现象,发酵操作稳定。

**关键词:**粟酒裂殖酵母,悬浮床生物反应器,絮凝颗粒,木薯淀粉,酒精连续发酵

**中图分类号:**TQ920.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0198-03

酒精发酵的研究近年来多是围绕提高生产强度而展开的,在这些研究中,改善传统间歇发酵生产强度比较行之有效的途径有:采用菌体细胞循环等方式大幅度提高菌体浓度,实现高密度细胞发酵;采用各种形式的连续化发酵工艺以及在线除去乙醇抑制的发酵分离耦合方案<sup>[1~4]</sup>。

在诸多方法中,细胞固定化技术最为突出<sup>[5]</sup>,已成为酒精发酵研究领域里的热点之一。80 年代初,K. Esser 等人率先提出利用某些具有强自身絮凝能力的菌株形成颗粒,以此作为一种固定化细胞的方法<sup>[6]</sup>。这种技术被称为无载体细胞固定化技术,与通常的载体固定化方法相比,它具有如下优点:①固定化操作方法简单,无载体附加费,不消耗任何辅助材料,颗粒制备成本低;②与载体固定颗粒相比,细胞颗粒内部传质阻力小,有利于维持细胞的活性和发酵的进行;③反应器中菌体浓度高,可获得很高的生产强度。

为此,本文在颗粒化技术的基础上<sup>[7]</sup>,对一株粟酒裂殖酵母变异株(*Schizosaccharomyces pombe*)在悬浮生物反应器内进行了以木薯淀粉糖化液为发酵底物的酒精清液连续发酵研究,以期为这一极具工业开发价值的酒精高效发酵技术的进一步的放大研究提供有益的优化参数。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株,由无锡轻工大学生物工程学院再

作者简介:马悦(1970-),男,北京人,助工,硕士,1997 年 12 月获无锡轻工大学发酵工程专业工学硕士学位,1998 年起于华东理工大学生物反应器国家重点实验室攻读博士学位,主要从事海洋生物技术研究

收稿日期:1998-07-27,修回日期:1999-01-04

生资源研究室保藏和提供。该菌株具有强自身絮凝能力,且酒精发酵性能良好。

## 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基:葡萄糖 50g,酵母膏 5g,蛋白胨 5g,麦芽汁 30g(10°Bx),pH 自然,定容至 1L。

1.2.2 絮凝培养基:葡萄糖 80g,蛋白胨 8g,酵母膏 2g,pH4.5,定容至 1L。

1.2.3 发酵培养基:双酶法制备的木薯粉糖化液,稀释到一定浓度,添加 5g/L 玉米浆。

以上培养基均在 0.08 Mpa 压力下灭菌 20 min。

## 1.3 细胞颗粒制备工艺

斜面菌种接入种子培养基  $\xrightarrow[\text{直至细胞浓度达 } 10^8/\text{mL}]{30^\circ\text{C}, 150\text{r}/\text{min} \text{ 摇瓶培养}}$  以 10% 的种量接入絮凝培养基

$\xrightarrow[12\text{h 更换 1 次}]{30^\circ\text{C}, 100\text{r}/\text{min}}$  2 ~ 3d 后收集沉降性能良好,形态结实的颗粒菌体

以 10% 的种量接入悬浮床生物反应器  $\rightarrow$  通风间歇培养至菌体浓度达 40g(dwt)/L 左右,停止供氧, 5% 还原糖的糖化液 + 0.5% 玉米浆

转入厌氧发酵状态。

## 1.4 主要原材料

玉米浆、液体高温  $\alpha$ -淀粉酶(2000 u/mL)、液体糖体酶(100000 u/mL)为中美合资无锡星达生物工程有限公司提供;木薯粉原料(淀粉含量 72.5%)为中外合资苏州百科化工有限公司提供。

## 1.5 分析方法

1.5.1 还原糖测定:3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法<sup>[8]</sup>。

1.5.2 总糖测定:准确称取一定量待测样品,放入 250 mL 三角瓶中,加 10 mL 6mol/L HCl 和 15 mL 水,于沸水浴中回流水解 1 h,用 I<sub>2</sub>-KI 测试水解终点,加一滴酚酞试液,用 20% NaOH 液中和至微红色,过滤稀释,定容后测还原糖。

1.5.3 原料淀粉含量测定:样品经双酶法糖化后加 HCl 水解,测还原糖、计算得淀粉含量<sup>[9]</sup>。

1.5.4 乙醇浓度测定<sup>[9]</sup>:按酒精工业常规方法测定。

1.5.5 菌体浓度测定:取一定体积培养液于 4000 r/min 离心 15 min,倾去上清液,洗涤后于 80℃ 干燥箱中烘干至恒重,测得净重,计算浓度。

## 1.6 数据的计算分析

1.6.1 总糖利用率(%) = [酒精含量(g/L) / (0.511 × 总糖含量(g/L))] × 100

1.6.2 生产强度 = 稀释速率 × 发酵液中酒精浓度

## 1.7 连续发酵装置流程

一级反应器为有效容积 1L 的锥形悬浮床生物反应器,二级反应器为 0.5L 有效容积的柱式反应罐;pH 和温度等环境控制手段采用瑞士 INFORS 全自动在线发酵监测系统,实施过程稳态操作(图 1)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 单级连续发酵

从分批发酵的研究中<sup>[7]</sup>,可以得到葡萄糖浓度在 150 g/L 时,*S. pombe* 发酵处于最具

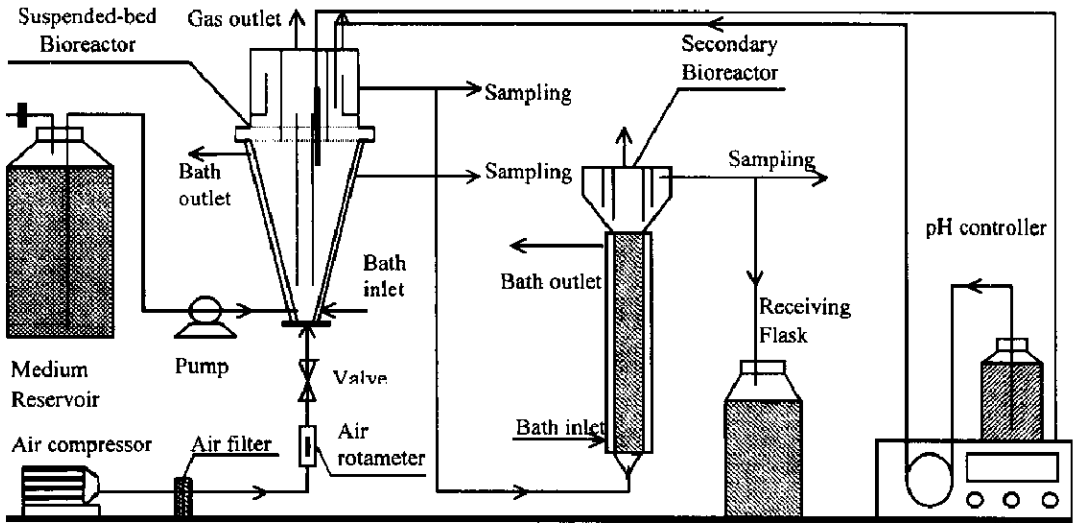


图 1 气升悬浮床反应器连续发酵装置及工艺流程图

Fig.1 System of continuous fermentation in suspended-bed bioreactor and technological flow chart

经济开发价值的范围内(既产生较高浓度的酒精,又不过多地抑制发酵的顺利进行),因此,本研究主要对 140~160 g/L 糖浓度进行了比较实验研究,以确定连续发酵初始的最佳流加糖液浓度,并考察提高发酵强度的途径和潜力。

实验结果如图 2、图 3 及表 1。从中可以看到,随着糖浓度的提高,酒精浓度和发酵强度不断增加,同时发酵液残糖也随之提高。在发酵指标允许(<5 g/L 残糖)的范围内,一级反应的最佳稀释率应在 0.1~0.12 之间,此时,发酵液残糖控制在 3.0~5.0 g/L 左右,酒精浓度为 68.5~72.0 g/L 范围内,最大发酵强度为 7.2 g/(L·h)。

从表 1 中可以得出:以单级发酵为优化对象,稀释率应控制在 0.1 h<sup>-1</sup> 左右,且还原糖浓度不应大于 160 g/L,应综合考虑发酵强度和产物浓度两方面因素,实现系统优化。

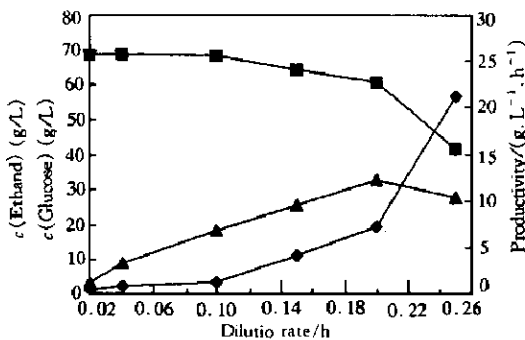


图 2 单级稳态连续发酵(140 g/L 葡萄糖)  
Fig.2 Single-stage continuous fermentation( $c(\text{Glucose}) = 140 \text{ g/L}$ )  
◆—Residual glucose; ■—Ethanol; ▲—Productivity.

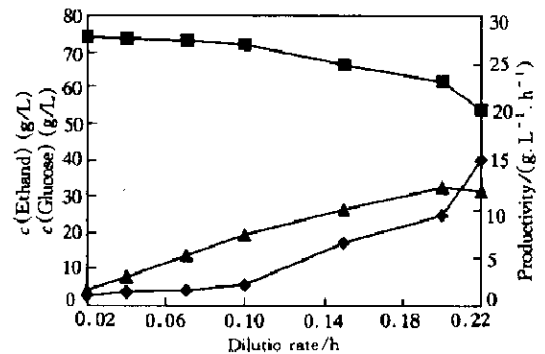


图 3 单级稳态连续发酵(150 g/L 葡萄糖)  
Fig.3 Single-stage continuous fermentation( $c(\text{Glucose}) = 150 \text{ g/L}$ )  
◆—Residual glucose; ■—Ethanol; ▲—Productivity.

## 2.2 双级连续发酵

根据单级发酵的研究来看,其继续提高发酵强度的潜力有限,为此本研究着手进行了两级连续发酵。木薯粉糖化液中葡萄糖

表 1 两种糖浓度单级连续酒精发酵的比较

Table 1 Results from single-stage continuous fermentation at two level glucose concentration

Dilute rate/h	140 g/L: S/(g/L)	P/(g/L)	$r_p$ /h	160 g/L: S/(g/L)	P/(g/L)	$r_p$ /h
0.07	2.38	68.9	4.82	3.78	78.5	5.50
0.10	3.45	68.3	6.83	9.98	74.3	7.51
0.15	11.4	64.0	9.60	25.75	66.9	10.04

S: Residual glucose concentration; P: Ethanol concentration;  $r_p$ : Ethanol fermentation productivity

浓度选择为 150 g/L, 稀释率(一级)由  $0.07\text{h}^{-1}$  至  $0.22\text{h}^{-1}$  递增, 糖液 pH 控制在 4.2~4.4 的范围内; 又根据 Lee<sup>[10]</sup> 等人的研究表明, 在使用两级串联形式的连续发酵系统时, 两能反应器体积的比例对系统的稳定操作和总体发酵强度有较大影响; 同时, 第一级反应器已消耗了 80%~90% 的基质, 二级反应器内基本为比较平稳的柱塞流型。基于以上理论, 我们在实验中采取了如图 1 所示的连续发酵系统, 实验结果如图 4:

图中的结果表明: 两级发酵明显优于单级, 总体发酵强度提高到  $9.5\text{g/L}\cdot\text{h}$  左右, 发酵残液中糖浓度降至  $4.35\text{g/L}$  以下。

从图 4 的试验可以得到淀粉质原料 *S. pombe* 酒精连续发酵的最佳操作条件: 葡萄糖浓度  $150\text{g/L}$ , pH4.2 左右, 稀释率为  $0.2\text{h}^{-1}$  (第一级); 为了考察该条件对系统的稳定性, 按这一条件对系统进行了为期 5d 的连续运行, 结果见表 2。

表 2 *S. pombe* 酒精连续发酵的运行结果Table 2 Results of continuous ethanol fermentation by *S. pombe*

$t$ /h	Substrate feed		Effluent		Utilization ratio of total substrate/%	Fermentation productivity/ $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$
	Total substrate/(g/L)	Glucose/(g/L)	Residual reduced glu./(g/L)	Ethanol/(g/L)		
12	158.5	151.0	4.93	71.7	88.5	9.56
24	157.6	150.0	4.71	72.6	90.1	9.68
36	158.7	150.9	3.79	73.1	90.1	9.75
48	159.4	151.2	3.58	72.9	89.5	9.72
60	157.9	150.3	3.22	72.8	90.2	9.71
72	159.1	151.5	4.15	72.8	89.5	9.71
84	155.5	149.1	2.54	71.9	90.5	9.59
96	158.3	150.5	2.68	73.6	91.0	9.81
108	159.0	151.4	4.11	73.2	90.0	9.76
120	159.2	151.3	3.96	72.9	89.6	9.72
132	157.7	150.0	3.43	72.4	89.8	9.65

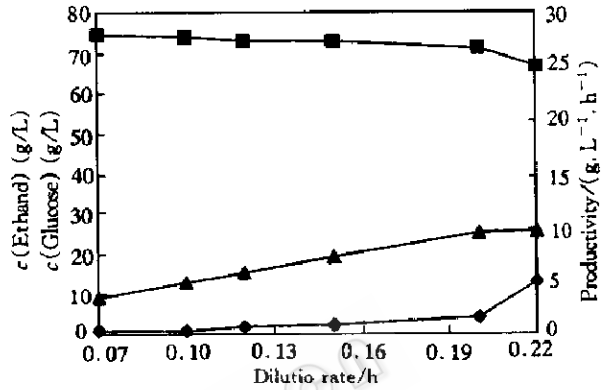


图 4 稀释率对酒精稳态连续发酵的影响

Fig. 4 Influence of dilution on continuous ethanol fermentation

◆ Residual glucose; ■ Ethanol; ▲ Productivity.

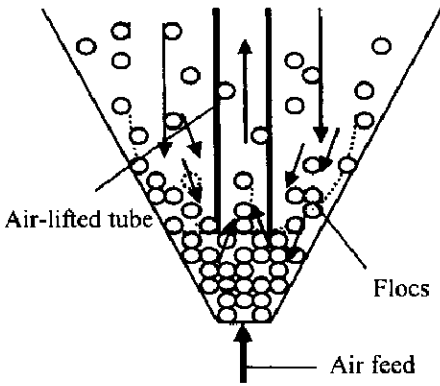


图5 反应器底部的流动状况

Fig. 5 State at bottom of bioreactor

## 2.3 关于悬浮床生物反应器的流体力学稳定性的总结分析

**2.3.1 实现絮凝颗粒的均匀悬浮:** *S. pombe* 颗粒的悬浮的机理,是依靠反应器中发酵液的环流速度大于絮凝颗粒酵母群体的干扰沉降速度而实现颗粒在反应器内均匀悬浮的<sup>[11]</sup>。在反应器设计中,气升管的内外通道截面比较低,气升管内通道流动阻力和管内壁摩擦阻力较大,高密度的颗粒细胞可能会沉积堵塞气升管入口,使颗粒形成无序流动。在研究中,我们发现,在反应器底部,颗粒被液流曳带由气升管外经流线收缩和折流进入气升管入口,如图5所示:为避免颗粒在反应器底部沉积,悬浮液必须有一个较大的

流动速度,以冲刷沉积在反应器底部的颗粒粒子层。因此,在反应器设计中,必须考虑到防止这种死角的形成。

**2.3.2 保证颗粒不被液流大量冲出:**当稀释率增大时,发酵反应剧烈,产生大量  $\text{CO}_2$ ,它对反应器的沉降区的扰动加剧,如不能有效地消除这种扰动,絮凝颗粒就不能在沉降区有效地分离,大量菌体会随液流冲出,无法维持发酵的正常操作。研究中发现,当稀释率  $D=0.1\sim 0.12\text{h}^{-1}$  时,发酵过程平稳,  $\text{CO}_2$  的扰动能被有效消除,颗粒分离良好,流出液中菌体浓度仅为  $0.3\text{g(dwt)}/\text{L}$  左右,较好地实现了无载体固定化目标。

**2.3.3 保证颗粒不被剪切破坏:**在此种反应器内,对颗粒的剪切破碎主要是由气升管内导入的空气和发酵过程中产生的  $\text{CO}_2$  所造成。气升管内表现气速在其顶端截面处最大,应采取有效措施控制此气速。同时,在研究中发现,稀释率  $D=0.1\text{h}^{-1}$  时,发酵产生的  $\text{CO}_2$  释放平稳,颗粒紧密结实,形态良好;并能较好地替代空气推动反应器内的环流状态,避免葡萄糖效应的过量发生,导致菌体大量增生,以利提高总糖利用率。

## 参 考 文 献

- [1] Khorakiwala K H, Cheryan M, Mehaia M A, et al. *Biotechnol Bioeng Symp*, 1985, 15: 249~261.
- [2] Favela-Torres E, Allais J J, Baratti J, et al. *Biotechnol Bioeng Symp*, 1986, 28(6): 850~856.
- [3] Lee J H, Pagan R J, Rogers P L, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25(3): 659~669.
- [4] Toran-Diag I, Jain V K, Baratti J, et al. *Biotechnol Lett*, 1983, 5(10): 697~702.
- [5] Margaitis A, Merchant F J A. *CRC Crit Rev Biotechnol*, 1984, 1(4): 339~393.
- [6] Esser K, Ursula K. *Process Biochem*, 1983, 18(6): 21~23.
- [7] 马悦,吴佩琮,周祥山,等.无锡轻工大学学报,1998,17(2):22~27.
- [8] 张龙翔,张庭芳,李羚,等.3,5-二硝水杨酸比色定糖法.见:张龙翔等主编.生化实验方法和技术.北京:高等教育出版社,1997.1~3.
- [9] 天津轻工业学院等编.工业发酵分析.北京:中国轻工业出版社,1980.129~137.
- [10] Lee J M, Pollard J F, Coulman G A, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1983, 25(2): 497~512.
- [11] Richardson J F, Zaki W N. *Chem Eng Sci*. 1954, 3(1): 65~78.

# CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION USING TAPIOCA STARCH BY IMMOBILIZED YEAST CELL WITHOUT CARRIER

Ma Yue

(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Zhou Xianshan Wu Peicong

(Wuzi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract:** A widespread interest has been noted in continuous power ethanol fermentation utilizing systems with immobilized yeast cell through self-flocculating. We studied continuous ethanol fermentation by a naturally flocculent strain of *Schizosaccharomyces pombe* and the performance of two-stage continuous ethanol fermentation system using suspended-bioreactors (total effective volume 1.5L) has been established; the high biomass levels achieved allow efficient ethanol conversion (72.7 g/L, average), residual glucose (3.74 g/L) and high productivity (9.7 g/L.h) for 150 g/L glucose concentration in feed (tapioca syrup) with average 90% total conversion of substrate. The system was run steadily during a month research.

**Key words:** *Schizosaccharomyces pombe*, Suspended-bioreactor, Tapioca, Floccs, Ethanol

## 重 要 声 明

凡本刊刊出的稿件,除在本刊出版使用外,还要以《光盘版》等多种形式出版使用,作者如不同意,敬请来稿时声明。

从 2000 年开始,凡被本刊录用的稿件,编辑部将及时发出录用通知;对未被录用的稿件,将及时函告,并说明原因,稿件一律不退,请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部