

丙酮丁醇連續发酵的研究*

焦瑞身 鄭幼霞 沈永強 王丽雯 藍澄平

(中国科学院植物生理研究所, 上海)

一、引言

丙酮丁醇发酵是較老的发酵工业之一,远在第一世界大战前后英美等国已經开始,很早便普遍在各国应用。四十多年以来,丙酮丁醇工业經過不少改进,如分离产生不同溶剂比例的菌种;研究不同原料的利用以及馴养和分离抗噬菌体的菌种等^[1,2,3]。这些改进对丙酮和丁醇的生产都起了极为重要的作用。为了更进一步改变这个古老工业的面貌以满足我国日益增长的社会主义建設需要,我們研究了丙酮菌的連續发酵。

微生物連續生长动力学的基本規律虽由 Monod^[4], Novick 和 Szilard^[5] 分別提出,但仅在近五、六年来才引起比較普遍的重視,許多国家开始进行微生物連續发酵的研究。根据 1958 年在捷克举行的微生物連續培养討論会的論文来看,丙酮菌的实验室連續培养虽已有初步报导,但在結合生产进行丙酮丁醇連續发酵方面尚无文献可供参考^[6]。丙酮菌发酵的古典文献都比較一致的认为丙酮菌經過多次营养菌体的移植就呈現生理上的衰退^[7,8]。在傳統的丙酮丁醇生产上对种子传代更是严格遵守这种見解,认为由孢子出发只能移植一定次数,因而丙酮菌的連續发酵是不可能的。近年来进一步提供論据支持这种主张的仍有,如 Kutzenok 和 Aschner^[9] 应用 *Clostridium butylicum* 証明几次营养菌体的移植便引起菌体衰退,不仅发酵能力減低,而且形态上也有显著变化。Dyr^[10] 指出 *Clostridium acetobutylicum* 在生长对数期(生酸期)連續移植后生成溶剂的能力即行降低。但是这些文献并未阻止人們对丙酮菌連續培养的研究。Dyr 等^[11] 用活力較強的一株丙酮菌在小玻璃瓶中完成連續培养,結果指出,将生长和溶剂产生分为多級发酵来掌握是維持菌体正常的關鍵。Jerusalimskij^[12], Пинаева^[13] 也都在玻璃瓶中完成 *Cl. acetobutylicum* 的連續培养。Finn 和 Nowrey^[14] 应用 *Cl. saccharo-acetobutylicum* 发现传代 4 次后菌体出現衰退,但連續培养 14 天菌体仍能保持正常产生溶剂的能力。这些实验室結果都和本文报导的丙酮菌連續发酵的結果是一致的。

我們知道丙酮菌分批发酵具有两个明显的生理阶段,第一是菌体生长和产酸的阶段,第二是将有机酸和殘糖轉变为溶剂的阶段。从連續生长的观点来看,要进行連續发酵必須維持菌体的迅速生长,在这方面我們根据連續生长的理論由控制玉米膠的浓度来維持丙酮菌的生长。在溶剂产生的阶段,我們主要考虑的是給以足够的時間使溶剂产生完毕,同时也参考了 Dyr 等的工作,将溶剂产生阶段分为多級发酵,使菌体对溶剂有一定的适应,以減輕或避免菌体的衰退。本文报导应用两种发酵設備完成丙酮菌的連續发酵,指出

* 本工作在 1959 年 10 月完成。
本文 1963 年 8 月 23 日收到。

丙酮菌連續发酵的可能性,并証明可以縮短发酵周期,提高溶剂产量。

二、材料及方法

(一) 材料

1. 菌种: *Clostridium acetobutylicum*, 所有培养都在 37℃ 恆温室进行。

2. 培养基(醪): 在玻璃瓶进行发酵时应用 5% 的玉米醪,在五升发酵罐应用 8% 的玉米醪。将糊化后的玉米醪盛入貯桶,在 1.5 公斤蒸汽压力下消毒 2 小时,后来为了保证玉米醪无菌,采用間歇消毒,第一次 3 小时,保温 1 天后再消毒 2 小时。在五升罐发酵試驗中有时应用含有 20% 废醪的玉米醪。

(二) 設備和操作

本工作分两个阶段进行,共使用两种不同的发酵設備。

1. 玻璃瓶連續发酵設備和操作方法: 由連結 3 只 2—5 升蒸餾水瓶而成,两瓶之間和第三瓶之后有計量管,連結方法如下:

A 瓶——計量管 1——B 瓶——計量管 2——C 瓶——計量管 3。每瓶上口橡皮塞装有进料玻璃管和排气管,排气管系通常氯化鈣管,內填棉花作过滤气体之用。每瓶下口橡皮管与計量管相連。先将糊化后的玉米醪加入瓶中,各瓶分开消毒后于无菌情况下再行連結。3 瓶同时接种,接种量 5%,种龄是 16—20 小时。

接种后全部設備放在恆温室內进行培养,酸度到一定高度时开始連續,操作是間歇的,每隔半小时取样、放料和加料各一次。每次在取样等操作之前,将瓶中醪液混合均匀,在加料之后同样将醪液混合。每次操作由 C 瓶开始,按照稀釋度要求由計量管 3 放出每半小时应放出醪液,移入計量管 3 的醪液再由支管移入消毒三角瓶中,作为 C 瓶样品。第二步操作是由 B 瓶中按稀釋度要求放一定量醪液入計量管 2,其中一部分加入 C 瓶,保持 C 瓶体积不变,其余部分由支管取出作为 B 瓶样品。由同样操作将一定体积 A 瓶醪液加入 B 瓶,同时取出样品。最后由玉米醪貯瓶加一定体积新鮮醪到 A 瓶,以保持 A 瓶体积不变。在三瓶中所取样品进行化学分析和菌体显微镜观察。

2. 五升发酵罐連續发酵設備和操作: 五升連續发酵設備(图 1A、B)包括:

(1) 五升发酵罐: 系直径 20 厘米高 30 厘米的鉄制发酵罐,罐內及罐盖等处鍍鉻,罐盖上装有封閉严密的攪拌軸套,攪拌軸系不銹鋼制。此外,罐盖上尚有二直径各为 1 厘米的接种口及排气口。溢流管銲接在罐身上,有螺絲接口調节高低以改变管內发酵液体积。

(2) 自动連續进醪器: 醪液貯罐和第一級发酵罐以橡皮管相連,醪液进入第一級罐的速度是由自动进醪器控制(图 1 甲)。自动进醪器由变速馬达帶动进醪輪旋轉,进醪輪上装有三个小輪,当进醪輪旋轉时小輪挤压在輪下槽內的橡皮管,将管內的醪液向前推进,同时由于管內醪液挤出产生負压,能将較粘厚的玉米醪不断吸入橡皮管內。进醪速度即由改变变速馬达的速度而控制。

五升罐連續发酵的操作如下:

(1) 消毒: 消毒是采用单罐消毒,消毒時間 2 小时(1.5 公斤蒸汽压力),然后以无菌操作将各罐連結。

(2) 接种: 接种是在无菌室內进行,种龄 12—16 小时,种量 5%。

(3) 进醪: 进醪量是用变速馬达調节进醪輪速度控制。每一实验进行之前由第一罐稀釋度和醪液体积計算每分鐘进醪体积,从而决定变速馬达速度。

(4) 取样: 我們設計了无菌取样裝置(图 1B 乙)以保证无菌取样。取样裝置的操作主要分两步完成:(1)每次取样都由第三罐开始,先将第三罐和貯瓶之間的橡皮管挾住,醪液就由支管流入第三取样管,取得一定体积后,打开夹子,停止醪液流入計量管,再由計量管下部的取样口放入已消毒的取样

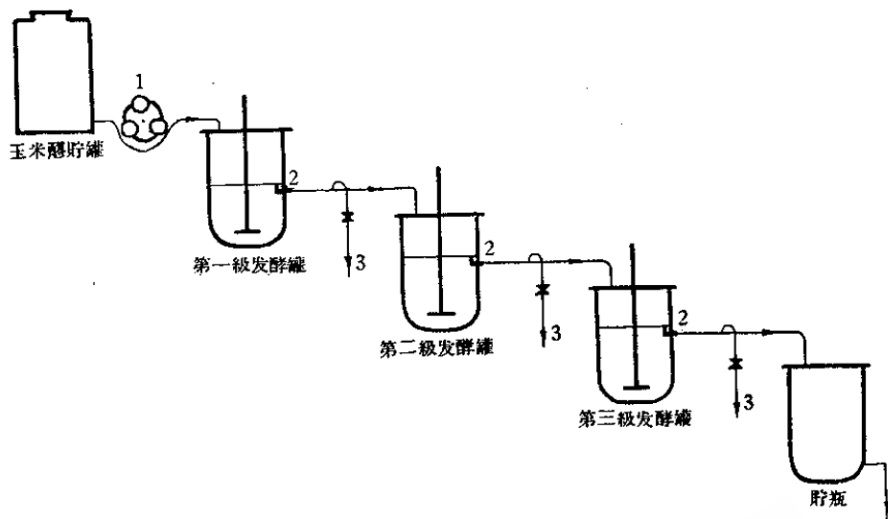
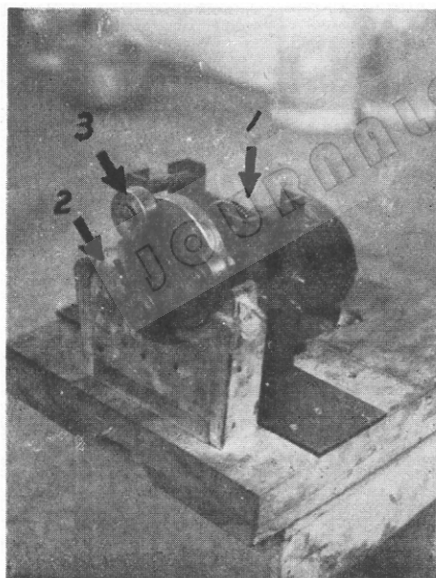


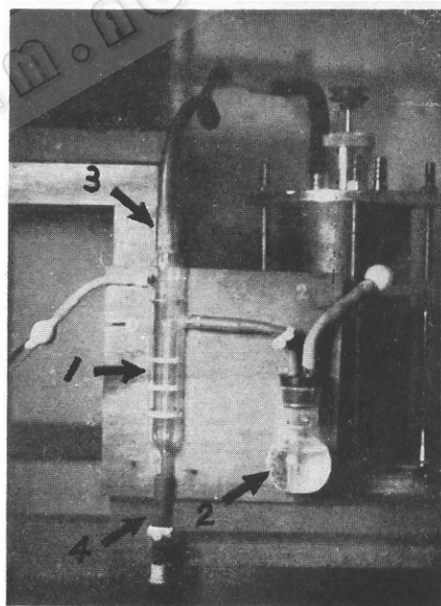
图 1 A 多級五升連續发酵流程图

1. 自动进醪器(图 1B 甲); 2. 溢流管; 用螺絲接口調節高低; 3. 接无菌取样装置(图 1B 乙)。



甲: 自动进醪器

1. 变速马达及减速装置; 2. 放置橡皮管的圓形槽; 3. 轉輪。



乙: 无菌取样装置

1. 計量管; 2. 氯化高汞溶液貯瓶; 3. 发酵液入口; 4. 发酵液出口。

图 1B 五升連續发酵罐附屬設備

瓶中, 取样口在不使用时浸沒在 0.5% 氯化高汞溶液中。(2) 取样后吹气将氯化高汞溶液自貯瓶中压入計量管, 以保証計量管的无菌。在下次取样时在另一端吹气将氯化高汞溶液压回貯瓶, 每次取样时样品瓶不放完, 所以計量管的出口始終是被样品或氯化高汞溶液封住, 以保証发酵罐的无菌。

样品取出后就迅速进行下列工作: (1) 进行斜面划綫作无菌检查。(2) 美蓝退色時間的測定。(3) 用显微镜检查菌体。(4) 定糖样品加硫酸, 溶剂分析样品加入少許固体氯化高汞以停止发酵。

(三) 化学分析方法

在样品中进行测定和分析的有酸度, 退色时间, 丙酮和还原糖。在确定溶剂比例时, 也测定丁醇和酒精。酸度用 10 毫升醪液所消耗 0.1N 的氢氧化钠的毫升数表示。退色时间是 10 毫升样品使 1 毫升 0.05% 美蓝溶液全部退色的时间, 以分来表示。丙酮分析采用 Goodwin^[15] 改进的 Messinger 法。丁醇和酒精采用 Johnson^[16] 的方法。淀粉用 Sumner 和 Graham^[17] 二硝基水杨酸的方法。

(四) 显微镜检查

丙酮菌分批发酵过程中形态呈现规律性的变化^[18]。连续发酵是将整个发酵过程在各罐中分阶段的掌握, 每一罐代表一定的阶段, 丙酮菌也有一定的形态, 所以我们进行镜检目的在于确定各罐菌体的形态是否正常, 在连续发酵过程中, 各罐菌体是否保持稳定的形态。

(五) 产量计算方法

连续发酵可以由两种方式开始进行连续, 如以三罐连续发酵为例: 第一方式是将三罐同时接种, 第一罐发酵到应维持的阶段时开始进入新鲜培养基, 同时第二、第三罐亦同样开始进料和出料, 这时第三罐的出料中发酵尚未完毕, 产量尚未达到应有水平, 必须在连续进行一定时间后, 第三罐出料中溶剂才达到应有水平。由接种开始到第三罐出料中发酵达到应有水平的一段时间称作总过渡时间。另一种方式是先接种第三罐, 一定时间后接种第二罐, 再过一定时间接第一罐, 第一罐发酵到应维持的阶段时开始进入新鲜醪液, 整个连续即行开始, 这时第三罐出料中发酵已完毕, 产物浓度达到最高水平。由第三罐开始接种, 到开始连续的一段时间称作总过渡时间, 理论上讲, 同一发酵由两种方式进行时, 总过渡时间应相同。总之, 在计算产量时, 应将总过渡时间减去, 虽然在过渡时间内第三罐出料中有一定产量。我们实验室的工作采用第一种方式。

我们将两种设备中进行连续发酵的结果与分批发酵比较, 方法是计算一定时间内采用连续发酵或分批发酵所能产生的发酵完毕的发酵液数量。

设 V_1 、 V_2 、 V_3 为三罐使用体积(毫升)

$$V_T = V_1 + V_2 + V_3 \text{ (毫升)}$$

$$t_B = \text{分批发酵周期(小时)}$$

$$F = \text{流速(每小时第一罐进入量 = 第三罐流出量)(毫升/小时)}$$

$$D = \frac{F}{V_1} = \text{稀释度}$$

$$t_t = \text{总过渡时间(小时)}$$

$$T_c = \text{连续发酵总时间(小时)}$$

在连续 T_c 小时内, 连续发酵的产量是 $F(T_c - t_t) + V_3$, 这里 V_3 是第三罐醪液, 因为发酵在 T_c 小时之末停止时, 第三罐的全罐中发酵液维持在最高水平。应指出的是, 第二罐亦已大部分发酵, 有一定的产量, 但这里略去不计。同样, 在总过渡时间 (t_t) 内第三罐出料中产量也逐渐提高, 这里亦略去不计。

分批发酵应用同样三罐单独进行发酵, 在 T_c 小时内可以进行 $\frac{T_c}{t_B}$ 次, 每次的总体积是 $V_T = V_1 + V_2 + V_3$, 总产量是 $\frac{T_c}{t_B} \cdot V_T$

所以连续发酵与分批发酵产量的比较是:

$$\frac{F(T_c - t_t) + V_3}{\frac{T_c}{t_B} \cdot V_T} = \frac{D \cdot V_1(T_c - t_t) + V_3}{\frac{T_c}{t_B} \cdot V_T}$$

在实际比较溶剂产量时, 5% 玉米醪分批发酵周期以 36 小时计算, 8% 玉米醪以 40 小时计算。

三、实 驗 結 果

(一) 玻璃瓶連續发酵

玻璃瓶的工作分为以下两方面:

1. 不同稀释度对酸度的影响: 丙酮丁醇連續发酵第一阶段的要求是維持丙酮菌在生长对数期, 因为生长和酸度的上升大致相平行^[18], 所以我們以酸度来代表生长。先比較五种不同稀释度所能維持的稳定状态下的酸度, 結果如表 1 所示。

表 1 玻璃瓶連續发酵中稀释度对酸度变化的影响

第一瓶 ¹⁾ 稀释度	出 料 (升/小时)	連續后維 持 酸 度	每小时 ²⁾ 酸产量 (毫克当量)	稳定状态的醪 液表面現象	丙 酮 (毫克/100毫升)	残 糖 (毫克/毫升)
0.1	0.1	-2.5(后期)	2.5	起醪盖	279.5	12.5
0.2	0.2	2.7(后期)	5.4	同 上	160	24
0.3	0.3	3.0—3.5(前期)	9.0—10.5	絮 状	<50	~35
0.4	0.4	-2.6(前期)	10.4	絮状, 大气泡	0	~31
0.5	0.5	-1.6(前期)	8.0	小气泡	0	~31

注: 1) 稀释度 = $\frac{\text{每小时进醪体积}(=\text{出料体积})}{\text{第一瓶体积}}$ 。

2) 每小时酸产量 = $0.1 \times \frac{\text{酸度}}{10} \times 1000 \times \text{出料体积(升)}(\text{毫克当量})$ 。

由表 1 結果可以看出, 在 5% 的玉米醪中 0.3 稀释度可維持最高酸度在 3.0—3.5。从每小时酸的生产量計算, 当稀释度在 0.3—0.4 时最高。稀释度在 0.1 和 0.2 时所維持的酸度相当于分批发酵后期, 与这些酸度相对应的生长已超过对数生长期, 所以应用这样的稀释度时連續发酵不能維持較长的時間。关于 0.1 和 0.2 两稀释度所維持的酸度是相当于分批发酵后期的酸度, 可以从醪液的表面現象, 丙酮的含量和殘糖来决定。

2. 玻璃瓶連續发酵結果: 在玻璃瓶中我們进行 7 次实验, 結果总结在表 2 中, 典

表 2 玻璃瓶連續发酵結果

实 驗	稀 释 度 ¹⁾	总 停 留 时 間 ²⁾ (小时)	各瓶稳定状态时的酸度		第三瓶溶剂 浓 度	溶剂产量与 分批发酵 比較 ³⁾
			前 期	后 期		
1	0.3—0.3—0.1	16.6	-3.6	-3.0, -3.0	比对照高	1.3
2	0.3—0.25—0.1	17.3	3.0	-2.5, 2.1	与对照同	1.6
3	0.3—0.4—0.1	15.8	3.0, 3.5	2.4	同 上	1.5
4	0.3—0.4—0.2	10.8	2.5 3.0	2.3	比对照低	—
5a	0.5—0.4—0.1	14.5	1.5 3.2	—	与对照同	1.6
5b	0.5—0.4—0.15	11.2	—	—	比对照低	—
6a	0.5—0.4—0.1	14.5	1.5, 3.5	2.6	与对照同	2.0
6b	0.5—0.4—0.15	11.2	—	—	比对照低	—
7	0.4—0.25—0.15	13.2	2.3	-2.8, 2.6	与对照同	2.0

注: 1) 稀释度 0.3—0.3—0.1 表示第一瓶稀释度是 0.3, 第二瓶是 0.3, 第三瓶是 0.1, 其余类推。

2) 总停留時間是各瓶停留時間的总和, 如实验 1, 稀释度是 0.3—0.3—0.1, 則总停留時間是

$$\frac{1}{0.3} + \frac{1}{0.3} + \frac{1}{0.1} = 16.6 \text{ 小时。}$$

3) 溶剂产量計算方法見前, 表中結果是指連續发酵中发酵液总体积与在相同時間內分批发酵应得发酵液总体积之比, 連續发酵液溶剂产量未到分批发酵水平者一概不作比較。

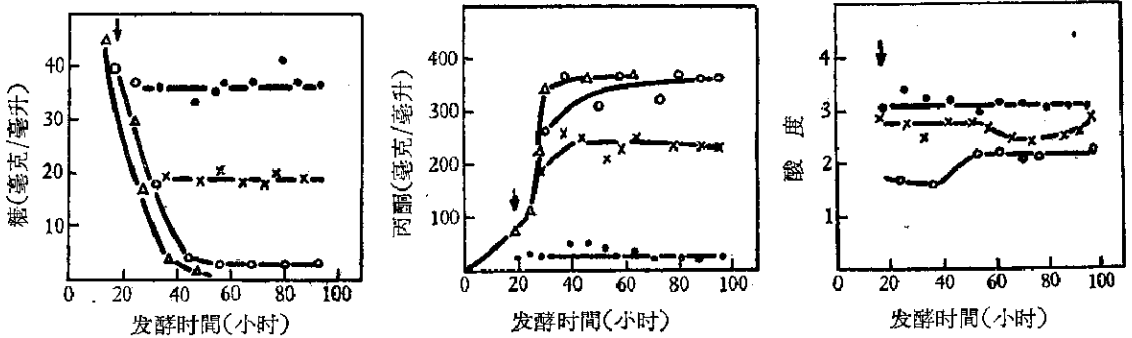


图2 玻璃瓶連續发酵变化过程

玉米醪浓度: 5%; 稀释度: 0.3—0.25—0.1; 箭头所示处表示开始連續。
 —△—分批发酵对照; —●—第一瓶; —x—第二瓶; —○—第三瓶。

型的发酵过程(实验2)见图2。显然,应用間歇操作也能使三瓶分別維持在不同的发酵阶段,图2中酸度、丙酮含量和殘糖量曲綫都說明这点。由于丙酮丁醇发酵过程可以区分为两个生理阶段,在实验1、2和7中我們用单瓶維持生长和生酸的生理阶段,用两瓶維持溶剂生成的阶段,在实验3、4、5a和6a中我們应用两瓶来維持酸度上升阶段,将溶剂完成阶段用一瓶来維持。从7次实验結果来比較,除实验4、5b、6b外,其余几次实验发酵都已完毕,总停留时间在13.2—17.3小时間,显然用5%玉米醪最短停留时间是13.2小时。如果再进而降低停留时间,发酵便不能完毕。所謂最低停留时间实际上就是当发酵到达稳定状态后,使玉米醪发酵完毕所需的最短时间,它代表連續发酵的发酵速度。就5%玉米醪来比較,分批发酵周期通常在36小时,而应用連續发酵周期可縮短到13.2小时。說明連續发酵的优点是无可怀疑的。

根据玻璃瓶結果,我們对連續发酵和分批发酵的产量作了比較,由表2結果指出,連續发酵产量接近分批发酵的两倍。

(二) 五升罐連續发酵

玻璃瓶間歇操作进行連續发酵的結果指出,应用連續发酵可以縮短发酵周期,因而提高了产量。我們于是应用五升发酵罐进行連續操作的連續发酵。五升罐具有連續进醪設備,并且各罐都有攪拌器以使罐中发酵液保持均一,这都是連續发酵应有的条件。此外,因有攪拌設備,在五升罐中我們应用浓度8%的玉米醪。

1. 生长阶段最适稀释度的决定: 在五升罐中我們先进行一系列稀释度实验,目的在比較不同稀释度下所能維持的稳定酸度,从而找出产酸阶段的最适稀释度。我們应用一罐或两罐来維持酸度上升,結果如表3所示。在两罐共同維持酸度时我們用总停留时间計算出相应的稀释度,例如两罐結合的情形是0.5—0.3,总停留时间 $2 + 3.3 = 5.3$,于是与两罐相当的稀释度应是 $1/5.3 = 0.186$ 。表中相对产酸率是用稀释度和酸度的乘积来表示,就是第一罐每升发酵液每小时內所輸出的总酸量。此外,为了明确在不同稀释度下溶剂的变化,我們也测定了丙酮含量。在不同稀释度下,酸度、丙酮和产酸率的变化如图2所示。根据图3我們可以总结以下几点:

(1) 酸度因稀释度增加而变化的情形和按照連續培养理論所指出的相符合,但在高稀释度时酸度下降較慢,可能是由于攪拌不均和部分醪液粘在罐壁上所致。由图3可以

表 3 五升罐連續发酵中稀释度和酸度的关系

稀 释 度 (D)	酸 度 (A)	丙 酮 (毫克/100 毫升)	产酸率 (D×A)	备 注
0.15	3.8	136.6	0.57	两罐 0.6—0.2
0.184	4.2	200	0.77	两罐 0.7—0.25
0.186	4.21	120	0.78	两罐 0.5—0.3
0.2	4.13	20.5—118.3	0.83	两罐 0.4—0.4
0.2	3.73	—	0.75	两罐 0.6—0.3
0.2	3.82	—	0.76	一罐 0.2
0.3	3.34	18.8	1.00	一罐 0.3
0.4	4.05	13.2—3.41	1.62	一罐 0.4
0.5	3.35	23.3—59.3	1.68	一罐 0.5
0.6	2.33	8—15	1.4	一罐 0.6
0.7	2.22	0—24	1.55	一罐 0.7
0.25	4.43	68.8—75.4	1.1	两罐 0.5—0.5

看出,临界稀释度在 0.6—0.7 附近,高于临界稀释度时,第一罐中菌体将迅速被冲洗而出,第一罐将不能维持。

(2) 由产酸率曲线可以看出和最高产酸率相当的稀释度是 0.5。

(3) 由丙酮含量的变化可以看出稀释度在 0.2 以上时醪液维持在生酸阶段,在 0.2 以下时丙酮含量迅速上升,表示已进入溶剂生成阶段,所以根据图 3 我们决定在 8% 的玉米醪中生酸阶段的最适稀释度应是 0.5。

2. 五升罐連續发酵的结果:

在玻璃瓶和五升罐关于生长阶段稀释度实验的基础上我们进行一系列的

連續发酵实验,主要考虑的是如何使連續发酵进行较长时间。观察在連續发酵中菌体有否衰退现象出现? 如何避免? 我们采用的方法是提高营养条件和 Dyr 等(1958)所应用的多级发酵。在营养条件方面据国外^[2]及国内的經驗,我们試驗了废醪的作用。此外,根据初步工作得知 8% 玉米醪中連續发酵周期为 20 小时左右,所以以下实验在最后一級罐之后再加一貯瓶以调节总停留时间,保证发酵完毕。实际上貯瓶的作用等于是一級发酵罐。

(1) 实验 8: 稀释度为 0.4—0.13—0.13—貯瓶(2 小时),总停留时间 $2.5 + 7.7 + 7.7 + 2 = 19.9$ 小时。实验共进行 151.5 小时,內連續 126 小时,各級罐丙酮含量变化如图 4 甲所示。在 60 小时左右第二、第三級罐和貯瓶开始变化,丙酮下降,同时酸度上升,糖的利用减低,貯瓶中醪液、醪盖和泡沫消失,醪液变为混浊。说明在 60 小时左右,第二、第三級罐中菌体生理上起了变化,发酵能力降低。和发酵力下降的同时,丙酮菌形态上也

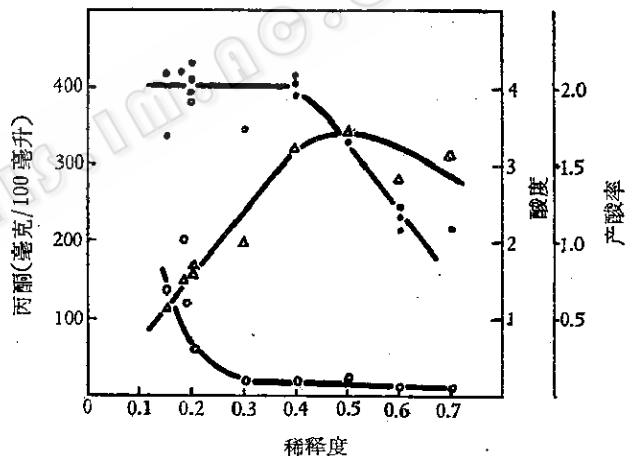


图 3 酸度、产酸率、丙酮含量和稀释度的关系
玉米醪浓度: 8%。—●—酸度; —△—产酸率;
—○—丙酮含量。

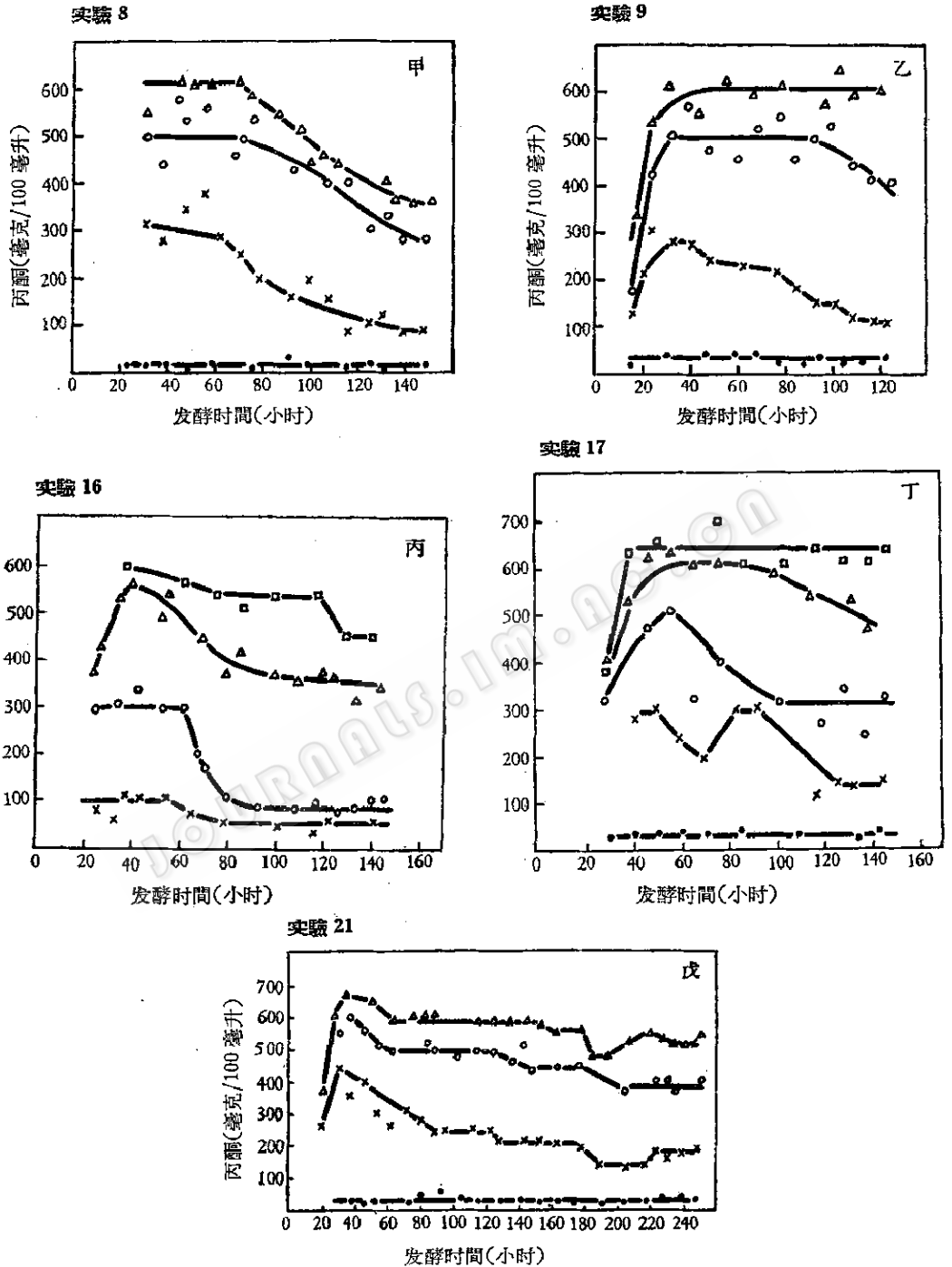


图4 五升罐連續发酵过程中丙酮含量的变化

- 甲. 稀释度: 0.4—0.13—0.13—貯瓶(2小时), 玉米醪浓度: 8%;
乙. 稀释度: 0.4—0.23—0.13—貯瓶(6小时), 玉米醪浓度: 8%;
丙. 稀释度: 0.5—0.33—0.27—0.15—貯瓶(6小时), 玉米醪浓度: 8%;
丁. 稀释度: 0.5—0.33—0.4—0.15—貯瓶(6小时), 玉米醪浓度: 8%+废醪 20%;
戊. 稀释度: 0.5—0.14—0.14—貯瓶(4小时), 玉米醪浓度: 8%+废醪 20%。
—●—第一級罐; —×—第二級罐; —○—第三級罐; —△—第四級罐; —□—貯瓶。

有轉變。例如在連續开始时菌体长度为 1.5—2 微米，到連續 120 小时左右，杆菌长度达 3—4 微米，并且染色不匀，显然已不是健壮菌体。但在全部过程中，貯瓶醪液退色時間仍保持在 4 分鐘以下，而在分批发酵末期退色時間通常在 15—60 分鐘，甚至完全不退色。

(2) 实验 9： 稀释度为 0.4—0.23—0.13—貯瓶(6 小时)，总停留時間 $2.5 + 4.3 + 7.7 + 6 = 20.5$ 小时。为了使二級罐中丙酮維持較低水平，将二級罐稀释度加大，同时为保持总停留時間在 20 小时左右，将貯瓶放料時間增加为 6 小时。本实验全部发酵時間 124 小时，連續 112 小时，发酵过程丙酮含量变化如图 4 乙所示。实验 9 与实验 8 有类似情况，第一級罐酸度和溶剂都很稳定，但第二、三两罐和貯瓶有下列变化：(1)第二、三两罐在 70 小时左右酸度上升。(2)第二級罐在 70 小时，第三級罐在 100 小时丙酮下降。(3)与丙酮浓度下降相应的糖的利用減低。(4)在 60—70 小时貯瓶中醪液、醪盖和泡沫消失，醪液变为混浊。在实验过程中菌体也有变长現象，連續开始时杆菌长度約 2 微米，至 88 小时后第一級罐和第二級罐菌体长达 3 微米，第三罐长短不齐，发酵到 104 小时第二和第三罐菌体长达 3—4 微米。但应指出的是，菌体虽然变长而着色仍較均匀。此外，貯瓶中醪液与实验 8 相同，退色時間保持 4 分鐘以下。总之，实验 9 与实验 8 比較，过程相似，但丙酮产量維持較長時間，可能二級罐稀释度的提高对菌体是有利的。为了避免实验 8 和 9 菌体的变化，我們將第一、第二級罐稀释度再加大，并且全部发酵增加到五級发酵，进行实验 16 和 17，在实验 17 中又增加废醪作为丰富营养物质。

(3) 实验 16： 稀释度 0.5—0.33—0.27—0.15—貯瓶(6 小时)，总停留時間 $2 + 3 + 3.7 + 6.7 + 6 = 21.4$ 小时，发酵共 124 小时，內連續 104 小时，过程中丙酮产量变化如图 4 丙所示，和实验 8 結果相似，在 60 小时左右各罐有显著变化。

(4) 实验 17： 稀释度 0.5—0.33—0.4—0.15—貯瓶(6 小时)，总停留時間 $2 + 3 + 2.5 + 6.7 + 6 = 20.2$ 小时。实验 17 和 16 不同之处是将第三級稀释度加大，希望进一步使菌体对溶剂适应。此外，并增加 20% 废醪。实验全部发酵時間 143.5 小时，連續 137.5 小时，过程中丙酮变化如图 4 丁所示。丙酮产量在四級罐和貯瓶較在实验 16 中稳定，这个結果由于废醪的作用还是第三級罐稀释度的影响，尙待肯定。

(5) 实验 21： 为了肯定废醪的作用，我們进行基本上与实验 8 相当的实验，稀释度为 0.5—0.14—0.14—貯瓶(4 小时)，停留時間 $2 + 7 + 7 + 4 = 20$ 小时。实验 21 共发酵 253 小时，內連續 241 小时，在 150 小时以前各級罐中丙酮含量稳定，在 160—180 小时后有显著下降，分析結果发现在这時間內所用玉米醪浓度較稀，显然产量的下降原因在

表 4 五升罐連續发酵溶剂產量和分批发酵的比較

实验	稀 释 度	发酵時間 (小时)	連續時間 (小时)	計算貯瓶 ¹⁾ 体 积比分批发酵 產量增加倍数	不計算貯瓶体 积比分批发酵 產量增加倍数 ²⁾
16	0.5—0.33—0.27—0.15—貯瓶(6小时)	124	104	2.1	2.8
17	0.5—0.33—0.4—0.15—貯瓶(6小时)	145.5	133.5	2.5	3.4
20	0.5—0.5—0.4—0.15—貯瓶(7小时)	135	95	2.2	3.2
21	0.5—0.14—0.14—貯瓶(4小时)	150 ¹⁾	120	2.5	3.9

注：1) 实验 21 共发酵 253 小时，內連續 241 小时，产量計算到 150 小时为止。
2) 溶剂产量計算方法見前，表中結果是連續发酵中发酵液总体积与在相同時間內分批发酵应得发酵液体积之比。

于此,而非由于菌体发酵能力下降所致。当玉米醪浓度恢复后产量即渐上升,到 220 小时完全达到正常水平(图 4 戊)。由于时间限制,实验在連續 10 天后停止。以上两个实验的结果,充分显示出废醪的作用。

3. 五升罐連續发酵产量与分批发酵的比較: 我們对五升罐連續发酵的溶剂产量与在相同时间内分批发酵作了比較,結果如表 4 所示,証明产量能增加貳倍以上。

(三) 連續发酵中溶剂比例

典型的发酵淀粉的丙酮菌所产生的溶剂中丁醇:丙酮:酒精接近于 6:3:1。当然菌株的不同和发酵情况的改变是会影响溶剂比例的。在生产上重視溶剂比例是因为在經濟价值上丁醇和丙酮高于酒精,因此,如何降低酒精比例是丙酮丁醇发酵工业上一个重要的問題。我們在連續发酵进展的不同阶段都对溶剂比例作了分析,結果見表 5。从表 5 中可以看出,在玻璃瓶和五升罐連續发酵所产生的溶剂中酒精含量都显著低于分批发酵,看来这也是連續发酵优点之一。但在連續发酵过程中,酒精在溶剂中所占比例随連續发酵的进展而下降。如在第二級罐中溶剂比例平均是 5.1:3.2:1.7,但在第三級罐和貯瓶溶剂比例接近于 5.7:3.3:1.0,显然,在发酵初期酒精生产較多。丙酮不是还原作用的产物,所以丙酮的比例沒有显著变化。至于連續发酵过程中酒精和丁醇比例的轉变是否与氧化还原电位有关,則尚待研究。

表 5 連續发酵与分批发酵的溶剂比例

醪 液 浓 度	溶 剂 比 例 ¹⁾	
	分 批 发 酵	連 續 发 酵 (各級发酵罐平均值)
5%	5.40:2.67:1.72 (玻璃瓶)	三級罐 5.96:3.10:0.93 (玻璃瓶)
8% 加 20% 废醪	5.17:2.98:1.62 (玻璃瓶)	二級罐 5.05:3.15:1.68 三級罐 5.72:3.28:0.97 四級罐 5.70:3.27:1.02 (五升发酵罐)

注:溶剂比例: 丁醇:丙酮:酒精。

四、討 論

(一) 連續时间与菌种衰退問題

丙酮菌連續发酵能維持多久? 連續一定時間后会不会出現菌体发酵能力的衰退? 如有衰退現象又如何避免? 这些問題既是丙酮菌生理問題又是采用連續发酵生产所應該解决的問題。我們在五升罐几次連續发酵的实验中,发现有菌体发酵能力衰退的現象,在采用多級发酵的方法后似乎可以延迟衰退的出現,但比較实验的数据不多,还不能作肯定的結論。至于废醪的应用,根据我們的实验結果看来,可以使連續发酵进行較長時間。Mc-Cutchan 和 Hickey^[2] 总结适量废醪的作用是能增加溶剂产量和避免 Cu^{++} 的毒害作用的。废醪含有丰富的营养物質。丙酮菌所以能維持較長時間的健壯,很可能是由于某种营养因素的作用。

至于如果采用連續发酵生产,我們认为尚可使用补充新种子的方法,在連續发酵进行一定時間后观察到发酵能力稍显降低,即补入大量強壯的新种子以取代已开始衰老的菌体,連續发酵即可繼續进行。这样虽不能根本解决丙酮菌衰退問題,但应是生产上延长連續時間的有效方法。

(二) 連續发酵的产量問題

連續发酵之所以能提高产量是由于縮短发酵周期,因而提高设备的利用率。分批发酵不仅发酵周期較长,并且每一批发酵完毕后,須有一系列的操作,因而使实际生产上的周期更长。連續发酵不仅縮短周期,同时也省去两次分批发酵間的一切操作。連續发酵所以能縮短发酵本身的周期者有二方面,第一連續生长減少生长阶段所需時間,第二在代謝产物生成阶段連續发酵也可以減少发酵時間。例如在 8% 玉米醪中 (5% 接种量) 分批发酵酸度达到最高点需时 15 小时左右,但在連續发酵中酸度达到最高点时不超过 5 小时 (图 3), 使生长阶段縮短 10 小时左右。又如在分批发酵中由酸度最高点到发酵完毕需时 20—25 小时,但根据我們五升罐連續发酵溶剂生成阶段所需時間估計不超过 16 小时。显然,在連續发酵两阶段共需時間在 20 小时左右,比分批发酵的 40 小时縮短一半。

五、結 論

本文报导了丙酮丁醇連續发酵的研究,結果总结如下:

(1) 丙酮丁醇連續发酵可将菌体生长和产酸、溶剂生成两个生理阶段分别采用多級发酵来掌握。各級发酵罐在确定的稀释度下能分別維持一定阶段,在酸度、丙酮含量、殘糖量以及醪液表面現象上維持一定水平。应用 5% 玉米醪生长和产酸阶段的最适稀释度是 0.3, 应用 8% 玉米醪第一阶段的最适稀释度是 0.5。在溶剂生成阶段,稀释度,也就是停留時間的决定,主要是有足够的时间使发酵完成,溶剂达到应有的水平。应用 8% 玉米醪,这个阶段的停留時間在 10—15 小时之間。

(2) 应用連續发酵可以将丙酮丁醇发酵的周期縮短,在 5% 与 8% 的玉米醪,連續发酵的周期分別为 13 小时与 20 小时,而分批发酵的周期則分別为 30—36 小时与 40 小时,由于发酵周期显著的縮短与連續時間的延长 (五升罐連續达 240 小时), 丙酮菌連續发酵溶剂的产量达到分批发酵的 2.3 倍。

(3) 在五升罐中連續发酵进行几十小时后菌体发酵能力衰退,但在玉米醪中加入废醪可使菌体衰退延迟,最长的連續发酵进行 10 天之后仍未有任何衰退現象出現。废醪的有益作用是否由于所含营养因素則尚待研究。采用多級发酵能否延迟菌体衰退現象的出現,尚不能肯定。

(4) 应用的丙酮菌在分批发酵中溶剂比例 (丁醇: 丙酮: 酒精) 不是典型的 6:3:1, 而是酒精比例較高, 丁醇較低, 但实验室連續发酵結果指出溶剂比例好轉, 酒精下降, 丁醇上升。

参 考 文 献

- [1] Beesch, S. C.: *Ind. Eng. Chem.*, 44:1677—1682, 1952.
- [2] McCutchan, W. N. and Hickey, R. J.: in *Industrial Fermentations*, Vol. I, 347—390, (Underkofler, L. A. and Kichey, R. J.), 1954.

- [3] Prescott, S. S. and Durn, C. G.: *Industrial Microbiology*, 3rd ed., 250—284, 1959.
- [4] Monod, J.: *Ann. Inst. Pasteur*, **79**:390—410, 1950.
- [5] Novick, A. and Szilard, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **36**:708—719, 1950.
- [6] Málek, I.: *Continuous cultivation of microorganisms*, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1958.
- [7] McCoy, E. and Fred, E. B.: *J. Bact.*, **41**:90—91, 1941.
- [8] Perlman, D.: *Arch. Biochem.*, **16**:79—85, 1948.
- [9] Kutzenok, K. A. and Aschner, M.: *J. Bact.*, **64**:829—836, 1952.
- [10] Dyr, J.: *Výroba organických rozpouštědel Kvasnou cestou. Sborník Přednášek Vědecké Konference V. Banské Štiavnici*: 59, 1954.
- [11] Dyr, J., Protiva, J. and Praus, R.: *Formation of neutral solvents in continuous fermentation by means of Clostridium acetobutylicum. in Continuous Cultivation of Microorganisms*, (Málek, I.) 210—226, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1958.
- [12] Jerusalimskij, N. D.: A Study of the process of development of microorganisms by the continuous flow and exchange of media method, *in Continuous Cultivation of Microorganisms* (Málek, I.), 62—66, 1958.
- [13] Пинаева, Г. В.: *Микробиол.*, **28**: 495—501, 1959.
- [14] Finn, R. K. and Nowrey, J. E.: *Appl. Microbiol.*, **1**:27—29, 1959.
- [15] Goodwin, L. P.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **42**:39—45, 1930.
- [16] Johnson, M. J.: *Ind. Eng. Chem., Anal. ed.*, **4**:20—22, 1932.
- [17] Sumner, J. B. and Graham, V. A.: *J. Biol. Chem.*, **47**:5—9, 1921.
- [18] Peterson, W. H. and Fred, E. B.: *Ind. Eng. Chem.*, **24**:237—242, 1932.

STUDIES ON THE CONTINUOUS ACETONE-BUTANOL FERMENTATION

CHIAO JUI-SHEN CHENG YU-HSIA SHEN YUNG-CHIANG
WANG LI-WÊN LANG CHENG-PING

(Laboratory of Microbiological Physiology, Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

Continuous acetone-butanol fermentation using *Clostridium acetobutylicum* in corn mash was studied with a flow system consisting of 3~6 laboratory fermentors fitted with stirrers. The results obtained are summarized as follows:

1) *Cl. acetobutylicum* fermentation could be separated into two different physiological phases, the phase of cellular growth and acid formation and the phase of solvent production. Both these phases could be maintained at definite states with regard to acidity, solvent content, and residual carbohydrate by controlling the feed rate.

2) By means of continuous cultivation it was possible to reduce the fermentation time to less than one-half of that required for the batch process, and therefore the yield of solvents on the time basis was increased. The maximal yield obtained was more than twice that of the batch process.

3) The fermentation activity of the culture used was found to decline gradually after a few days when straight corn mash was used. However, when some stillage was incorporated into the mash, this degenerative process was greatly delayed and continuous operation could be prolonged up to 10 days without any noticeable abnormality. The beneficial effect of the "slop-back" may be essentially nutritional in nature.