

融合株 SPSC 发酵生产酒精的工艺研究—— 自絮凝细胞颗粒粒径分布、细胞生长和产物酒精生成动力学*

白凤武¹ 靳 艳¹ 冯朴荪¹ 何秀良²

¹(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

²(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

摘 要 在测定了融合株 SPSC 自絮凝颗粒分布的基础上,研究了其培养过程细胞颗粒生长和连续发酵过程产物酒精生成的动力学规律,建立了如下的动力学模型:

$$\mu = \frac{0.134S}{19.23 + S} \quad \nu = \frac{0.747S}{10.871 + S} \left[\left(1 - \frac{p}{126.3} \right)^{2.593} \right]$$

关键词 自絮凝细胞颗粒,细胞生长,酒精发酵,动力学

分类号 TQ920.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0455-60

以酵母细胞自絮凝形成颗粒作为固定化细胞方法实现酒精连续发酵,与各种载体固定化酵母细胞技术相比,以细胞固定化方法简单、没有载体材料消耗、生物反应器中可以获得更高细胞浓度的突出优点,展示出了良好的工业前景^[1],近年来越来越引起人们的重视^[2-5]。以具有自絮凝能力的粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株和具有优良酒精发酵性能的酿酒酵母变异株(*Saccharomyces cerevisiae*)为亲株,采用原生质体融合技术选育的融合株 SPSC,既具有优良酒精发酵性能,又能够自絮凝形成颗粒^[6],可以在生物反应器中实现固定化。反应器中产物酒精生成动力学是整个连续发酵工艺过程实现优化控制的基础,尽管人们已经对酵母细胞酒精发酵过程中产物酒精生成动力学进行了大量的研究,提出了各种模型方程来描述这一过程^[7-11]。但是融合株 SPSC 自絮凝形成的颗粒与通常的游离酵母细胞有很大的差异,不仅颗粒的尺度远远大于游离酵母细胞,而且所形成颗粒的形状极不规则。

本文在对融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒酒精发酵基本工艺参数包括自絮凝能力、耐温性、适宜 pH 值范围等进行初步研究的基础上^[6],对自絮凝细胞颗粒的特征进行了描述,进而深入研究了自絮凝细胞颗粒酒精连续发酵过程中产物酒精生成过程的宏观动力学。

1 材料和方法

1.1 菌种

采用原生质体融合技术选育的融合株 SPSC,该菌株与亲株 *S. pombe* 比较,其酒精发

* 国家自然科学基金青年基金课题资助(No. 29706001)。

收稿日期:1998-11-20,修回日期:1999-06-14。

醇的耐高温性和耐酒精性均有明显改善^[6],与亲株 *S. cerevisiae* 相比,具有强自絮凝特征,由中国科学院沈阳应用生态研究所选育并提供。

1.2 培养基

以玉米粉为原料,采用双酶法制备的糖化液,总还原糖浓度 90~205g/L。

1.3 分析方法

酒精浓度采用气相色谱分析,菌体浓度以单位体积悬浮液中细胞干重来表示,糖的分析采用酒精发酵工业规定的统一方法^[12]。

1.4 生物反应器

使用自行设计加工的悬浮床生物反应器,有效容积 1.5L^[5]。

2 结果与讨论

2.1 融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒的描述

图 1 所示为电镜下的自絮凝酵母细胞颗粒,可以看出细胞虽然密集凝聚在一起形成颗粒,但细胞之间的空隙较大,这对于营养底物向颗粒内部细胞的扩散和颗粒内部细胞产生代谢产物向外部环境的扩散是十分有利的,与通常的各种载体固定化酵母细胞过程相比,细胞自絮凝形成颗粒的内扩散阻力很小。

能够定量描述自絮凝细胞颗粒的特征是固定化细胞生物反应器设计的前提条件,这种细胞自絮凝形成的颗粒与通常的颗粒相比有很大的不同,不仅形状极不规则,而且为非刚性颗粒,强度很差,在生物反应器中特定的流体力学和发酵工艺条件下与基质呈悬浮状态时呈特定的粒度分布。我们用生物反应器中特定发酵工艺条件下的 Stokes 等沉降速度当量直径来描述这种自絮凝细胞颗粒的大小,即:

$$d_p = \sqrt{\frac{18u_s\mu}{\rho_s - \rho_L}}$$

通过实测自絮凝细胞颗粒在发酵液中的沉降速度 u_s 、湿密度 ρ_s 、发酵液的物性参数 μ 和 ρ_L ,就可以计算出颗粒的等沉降速度当量直径 d_p ,图 2 所示为融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒的粒径分布情况。

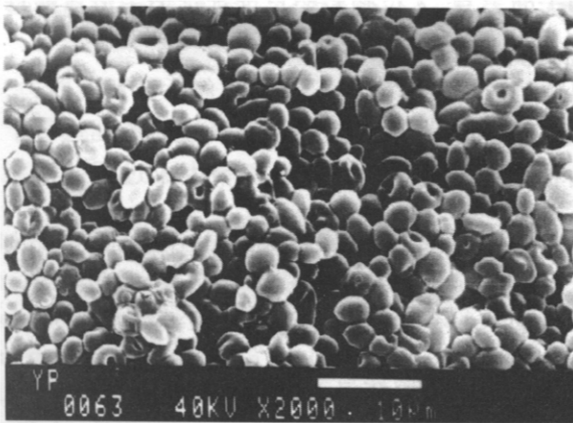


图 1 自絮凝酵母细胞颗粒的电镜照片

Fig.1 The electron micrograph of yeast flocs

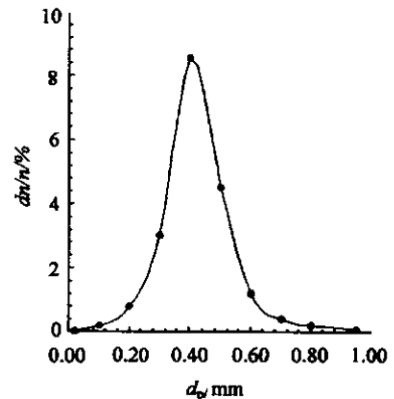


图 2 自絮凝细胞颗粒的粒径分布

Fig.2 The diameter distribution of flocs

从图 2 可以看出,在正常发酵状态下 SPSC 自絮凝细胞颗粒的粒径分布基本上呈正态分布,其均值为 0.405mm。

2.2 融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒培养过程的生长特征

表 1 所示为反应器中 SPSC 自絮凝细胞颗粒培养阶段细胞生长的实验数据,图 3 所示为限制性底物糖浓度对比生长速率的标绘,可以看出基本符合 Monod 细胞生长模型,因为培养过程反应器中代谢产物酒精浓度比较低,没有体现出对自絮凝细胞颗粒生长的抑制效应。

将表 1 的实验数据按照 Monod 生长动力学模型进行回归,可以获得模型参数

$\mu_m = 0.134\text{h}^{-1}$, $K_S = 19.23\text{g/L}$, 因此描述 SPSC 自絮凝酵母细胞颗粒培养过程细胞生长的动力学模型方程可以表达为:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S} = \frac{0.134S}{19.23 + S}$$

2.3 融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒最大酒精耐受性的测定

酵母细胞酒精发酵的动力学特征为典型的产物抑制型,其最大酒精耐受性是建立发酵动力学模型的基本参数之一。我们在实验研究所用的小型悬浮床生物反应器中采用间歇发酵并补加高糖浓度底物的措施,维持发酵液中 20~30g/L 的适宜糖浓度,使酒精浓度不断提高,直到因产物酒精的强烈抑制使发酵速率停止,实测融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒的最大酒精耐受性,结果如图 4 所示,可见最大受酒精浓度为 126.3g/L。

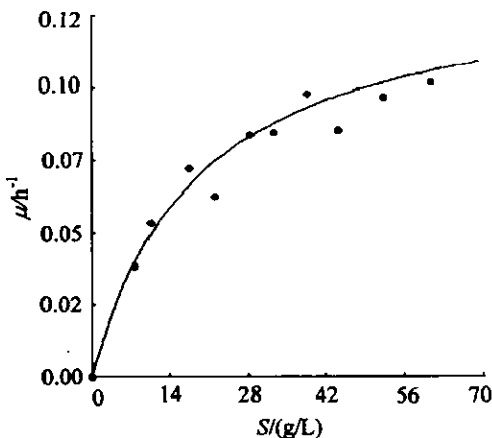


图 3 培养阶段 SPSC 细胞颗粒的生长曲线

Fig. 3 The curve of SPSC flocs during cultivation

表 1 SPSC 自絮凝细胞颗粒的细胞生长动力学数据
Table 1 The data of SPSC floc growth during cultivation

No.	S/(g/L)	P/(g/L)	μ/h^{-1}
1	7.80	42.9	0.0366
2	10.63	39.0	0.0510
3	17.44	12.0	0.0693
4	22.10	40.8	0.0600
5	28.50	42.0	0.0812
6	32.63	59.0	0.0804
7	38.63	28.0	0.0801
8	44.25	32.8	0.0925
9	52.12	36.0	0.0930
10	60.75	37.9	0.0979

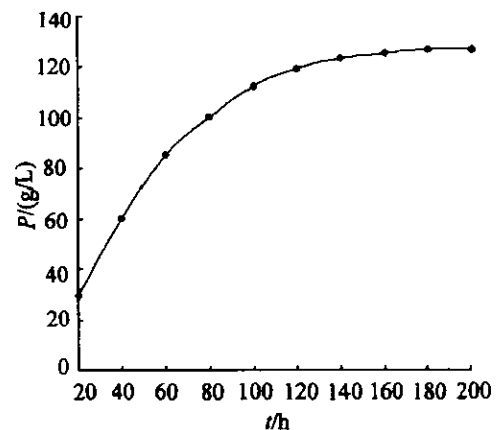


图 4 SPSC 自絮凝颗粒酒精耐受性

Fig. 4 The ethanol tolerance of SPSC flocs

2.4 融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒连续发酵过程产物酒精生成动力学

在最适发酵温度 34℃, 自然 pH 值 3.8~4.0, 通风比 0.12vvm 的操作条件下, 改变生物反应器连续操作的稀释速率和底物初始糖浓度, 在一定的稀释速率和底物初始糖浓度下, 由于在发酵条件下自絮凝酵母细胞颗粒的生长受到比较强烈的产物酒精抑制, 反应器的操作可以达到“拟稳态”, 测定“拟稳态”时的实验数据, 如表 2 所示。

表 2 融合株 SPSC 自絮凝细胞颗粒酒精连续发酵拟稳态基础动力学数据

Table 2 The continuous ethanol fermentation kinetic data of SPSC flocs

$S_0/(g/L)$	D/h^{-1}	$S/(g/L)$	$P/(g/L)$	$X/[g(d\cdot w)/L]$	v/h^{-1}
91.85	0.1	2.18	39.0	19.2	0.1500
	0.2	6.70	37.5	21.2	0.2875
	0.3	16.88	33.8	28.0	0.3620
	0.4	23.25	30.0	32.0	0.4500
	0.5	30.88	26.9	33.0	0.5112
111.25	0.1	3.13	52.1	25.7	0.1750
	0.2	11.25	49.5	27.8	0.3561
	0.3	25.63	42.9	32.1	0.4250
	0.4	38.50	34.9	27.0	0.5400
	0.5	43.65	31.9	26.4	0.6042
142.08	0.1	3.40	67.7	29.6	0.1550
	0.2	23.88	56.9	23.7	0.4802
	0.3	48.75	44.3	23.8	0.5584
	0.4	56.25	37.5	24.1	0.6622
	0.5	72.00	32.0	24.0	0.6667
178.75	0.1	19.75	71.9	22.0	0.3268
	0.2	47.50	66.0	31.9	0.4450
	0.3	70.00	53.6	28.5	0.5642
	0.4	78.13	45.5	29.0	0.6275
	0.5	84.38	34.4	25.1	0.6853
203.12	0.1	43.13	81.0	19.3	0.4196
	0.2	60.63	67.5	26.3	0.5133
	0.3	83.75	59.2	30.2	0.5891
	0.4	101.25	46.1	28.3	0.6516
	0.5	111.88	42.3	30.8	0.6844

在 SPSC 自絮凝酵母细胞颗粒酒精连续发酵过程中, 对动力学特征的影响主要来自两方面因素。一方面为限制性底物糖浓度, 在连续发酵状态下反应器中始终保持比较低的糖浓度, 因此不会出现间歇发酵中遇到的底物抑制现象, 对产物酒精生成动力学的影响

可以用描述细胞生长的 Monod 模型描述;另一方面为产物酒精浓度,其对产物生成的抑制始终存在,可以采用反抛物线模型描述^[11]。上述两方面影响因素在数学上可以叠加,即:

$$v = \frac{v_m S}{K_p + S} \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^\alpha \right]$$

采用非线性最小二乘拟合法对实验数据进行回归,可以得到各模型参数如下:

$$v_m = 0.747 \text{ h}^{-1} \quad K_p = 10.871 \text{ g/L} \quad \alpha = 2.593$$

获得描述 SPSC 自絮凝细胞颗粒连续发酵过程酒精生成动力学的数学模型,可以用来指导发酵工艺过程的优化控制。

$$v = \frac{0.747S}{10.871 + S} \left[1 - \left(\frac{P}{126.3} \right)^{2.593} \right]$$

将实验数据与上述动力学模型计算的预测值进行比较,结果如图 5 所示。误差分析显示:最大负偏差为 -20.8%,平均负偏差为 -6.3%;最大正偏差为 20.5%,平均正偏差为 9.4%。表明该模型能够很好地描述 SPSC 自絮凝细胞颗粒发酵过程酒精生成规律。

其中 v_{exp} 和 v_{cal} 分别为实验测定的比酒精生成速率和模型预测的比酒精生成速率。

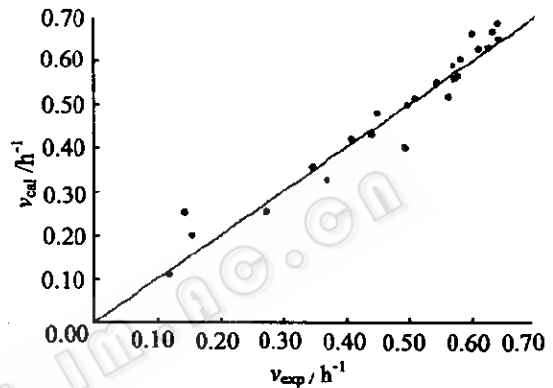


图 5 模型预测结果与实验测定结果的比较

Fig. 5 The comparison of calculated values with that of experimenting

符号说明

- μ ——自絮凝细胞颗粒的比生长速率/ h^{-1}
- μ_m ——自絮凝细胞颗粒的最大比生长速率/ h^{-1}
- v ——比酒精生成速率/ h^{-1}
- v_m ——最大比酒精生成速率/ h^{-1}
- K_s, K_p ——描述自絮凝细胞颗粒生长和酒精生成的 Monod 模型参数/(g/L)
- S ——限制性底物糖浓度/(g/L)
- P ——酒精浓度/(g/L)
- P_m ——自絮凝细胞颗粒发酵过程最大酒精耐受浓度/(g/L)

参 考 文 献

- [1] 白凤武,冯朴荪,李 宁等.化工学报,1995,46,106-111.
- [2] E.Roca et al. *Bioprocess. Eng.*, 1995, 12(5):269-272.

- [3] K. Kida *et al.* *J. Ferment. Biogeng.*, 1989, **68**(2):107~111.
 [4] K. Kida *et al.* *J. Ferment. Biogeng.*, 1990, **69**(1):39~45.
 [5] 白凤武, 秦金来, 史金兰等. 食品与发酵工业, 1993, **19**(1):11~16.
 [6] 靳 艳, 白凤武, 冯朴荪等. 微生物学报, 1996, **36**(2), 115~120.
 [7] T. K. Ghose, R. D. Tyagi. *Biotech. Bioeng.*, 1979, **21**, 1387~1420.
 [8] S. Aiba *et al.* *Biotech. Bioeng.*, 1968, **10**:845~852.
 [9] M. Nagatami *et al.* *J. Ferment. Tech.*, 1980, **46**:241~250.
 [10] B. L. Maiorella *et al.* *Biotech. Bioeng.*, 1984, **26**:1003~1025.
 [11] J. H. T. Luong *et al.* *Biotech. Bioeng.*, 1985, **27**:280~285.
 [12] 胡嗣明, 张天杭. 酒精生产分析检验, 北京: 轻工业出版社, 1987.

Studies of Ethanol Fermentation Using a Fusant SPSC Floccs—— Description of Floccs, Growth and Ethanol Fermentation Kinetics

Bai Fengwu Jin Yan Feng Pusun

(*Department of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012*)

He Xiuliang

(*Shenyang Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015*)

Abstract Based on a description of the floccs from a fusant SPSC, the growth and ethanol fermentation kinetics of this floccs was obtained as follows:

$$\mu = \frac{0.134S}{19.23 + S} \quad \nu = \frac{0.747S}{10.871 + S} \left[\left(1 - \frac{p}{126.3} \right)^{2.593} \right]$$

Key words Self-flocculating particles(floccs), flocc growth, ethanol fermentation, kinetics