

初始条件对高浓度乙醇连续发酵过程的影响及振荡行为提高发酵效率的机理分析

申渝^{1,2}, 葛旭萌², 白凤武²

1 重庆工商大学废油资源化技术与装备教育部工程研究中心, 重庆 400067

2 大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

摘要: 前期实验在稀释速率为 0.027 h^{-1} 的高浓度乙醇连续发酵过程中, 发现了一种长周期、宽振幅的参数振荡现象。本实验进一步考察了不同稀释速率下的连续发酵过程, 发现在稀释速率为 0.04 h^{-1} 条件下, 也能出现类似的振荡现象; 在稀释速率为 0.027 h^{-1} 或 0.04 h^{-1} 的条件下, 改变系统的初始状态可以得到振荡和稳态两种不同的发酵过程。比较振荡和稳态过程的实验数据后, 发现在稀释速率为 0.04 h^{-1} 的条件下, 与稳态过程相比, 振荡过程的平均残糖浓度降低了 14.8%, 平均乙醇浓度提高了 12.6%, 平均设备生产强度提高了 12.3%。进一步分析表明: 与稳态过程相比, 振荡过程动力学行为不仅存在滞后, 而且在相同残糖和乙醇浓度条件下, 所对应的平均比生长速率提高了 53.8%。

关键词: 高浓度乙醇连续发酵, 振荡, 酿酒酵母, 发酵效率提高

Impact of fermentation system initial status on oscillations in very high gravity ethanol continuous fermentation process and analysis of fermentation efficiency improvement

Yu Shen^{1,2}, Xumeng Ge², and Fengwu Bai²

1 Engineering Research Center for Waste Oil Recovery Technology and Equipment, Ministry of Education, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

2 Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China

Abstract: Prior research reported the oscillatory behavior characterized by long period and high amplitude during high gravity continuous ethanol fermentations at the dilution rate of 0.027 h^{-1} . In this paper, high gravity continuous ethanol fermentations using *Saccharomyces cerevisia* at different dilution rates were carried out. Similar oscillations were observed when the dilution rate was switched to 0.04 h^{-1} . Both oscillatory and steady processes can be achieved at dilution rates of 0.027 or 0.04 h^{-1} , which depends on the initial status of the fermentation system. However, compared to steady process at the same dilution rate of 0.04 h^{-1} , the average residual sugar concentration was lowered by 14.8% for the oscillatory process, while the average ethanol concentration and productivity were increased by 12.6% and 12.3%, respectively. Further investigation revealed that besides the lag time, oscillatory processes were different from steady ones in kinetics because a higher specific growth rate can be achieved at the same residual sugar

Received: December 24, 2009; **Accepted:** February 2, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA10Z358), National Natural Science Foundation of China (No. 20806014), Initial Science Foundation of Chongqing Technology and Business University (No. 09-56-05).

Corresponding author: Yu Shen. Tel: +86-23-62768317; E-mail: 1981shenyu@sohu.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA10Z358), 国家自然科学基金项目 (No. 20806014), 重庆工商大学科研启动项目 (No. 09-56-05) 资助。

and ethanol concentrations (increased by 53.8% in average).

Keywords: very high gravity continuous ethanol fermentation, oscillation, *Saccharomyces cerevisia*, fermentation efficiency improvement

振荡现象普遍存在于细菌、真菌、藻类等多种微生物的连续培养过程^[1-2]。与稳态操作相比, 振荡行为难以预测和控制, 因此通常选取合适的操作条件加以回避, 或开发相应的弱化策略^[3]; 仅有少量文献报道了振荡过程中反应器生产能力提高的现象, 对振荡行为的利用则更为罕见^[4-5]。

白凤武等在利用普通酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisia* 进行高浓度乙醇连续发酵的实验中, 发现在特定的稀释速率条件下 (0.027 h^{-1}), 会出现一种特殊的振荡现象^[6-10]: 振荡周期 (4~7 d) 和振幅 (乙醇浓度变化达 20~40 g/L) 分别是以往报道的几十和十几倍。前期研究通过引入权值函数, 建立了过程动态模型; 随后利用串联装填填料的管式反应器使振荡得以弱化, 并研究了其弱化机理^[8-9]。但仍有以下两个关键的问题有待解决:

1) 模拟结果表明, 非稳态过程的参数特征强烈依赖于初始条件, 但此前的振荡过程均采用相同的起始状态, 有关初始条件对以上连续发酵过程稳定性 (及振荡是否产生) 的影响, 尚无实验证据。

2) 前期实验发现总稀释速率为 0.012 h^{-1} (相对于第一级反应器的稀释速率为 0.027 h^{-1}) 条件下的振荡过程发酵效率优于总稀释速率为 0.006 h^{-1} (相对于第一级反应器的稀释速率为 0.013 h^{-1}) 条件下的稳态过程^[10], 但这并不能说明振荡过程本质上发酵效率优于稳态过程。因为, 振荡过程中残糖和乙醇浓度在一定范围内波动, 其平均发酵速率实际上是各时刻发酵速率的平均值, 由于发酵动力学的非线性特征, 这一平均值有可能超过在平均残糖和乙醇浓度条件下的发酵速率, 从而造成振荡过程优于稳态过程的假象。因此, 需要对发酵过程的动力学进行进一步的分析。

然而, 前期实验采用 CSTR 与三级管式反应器串联的发酵系统, 振荡优于稳态的现象出现在末级反应器, 而不是第一级的 CSTR 反应器^[10]。由于末级反应器的发酵受上一级反应器发酵参数的影响,

而上一级反应器的发酵参数并未测量, 从而无法比较振荡与稳态过程的动力学。因此, 需要重新进行不同稀释速率下的连续发酵实验, 以获得充分的证据。

针对以上问题, 本实验考察了不同稀释速率下, 高浓度乙醇发酵的稳态和振荡过程, 探索了振荡产生的必要条件; 并对稳态和振荡过程的实验数据及动力学进行了比较和分析。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养方法

普通工业酿酒酵母 ATCC4126, 大连理工大学生物工程系保藏。保存及活化方法见文献[7]和[8]。

1.2 培养基

一级种子培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 酵母粉 5, 蛋白胨 3; 二级种子培养基 (g/L): 葡萄糖 120, 酵母粉 5, 蛋白胨 3; 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 280, 酵母粉 5, 蛋白胨 3。

1.3 连续发酵

连续发酵在一台全自动搅拌式发酵罐中进行, 有效体积为 1500 mL。将活化后的一级种子 (活化方法详见文献[8])按 10%的比例接入装有二级种子培养基的发酵罐内, 在 pH 4.5、温度 30°C 、转速 300 r/min 和通气量 0.05 vvm (无菌空气) 的条件下培养至残糖浓度小于 1 g/L , 然后按照设定的稀释速率流加发酵培养基进行连续发酵, 其他操作条件保持不变。具体方案如下: 1) 连续切换稀释速率, 从 0.015 h^{-1} 开始启动连续发酵, 运行一定时间以后依次切换 0.025 、 0.027 、 0.04 、 0.06 、 0.08 h^{-1} ; 2) 分别培养二级种子, 按稀释速率 0.02 、 0.03 、 0.04 、 0.06 、 0.08 h^{-1} 重新启动连续发酵。

以上操作方案中, 每种条件下的连续发酵至少维持 4 d 以达到稳态, 或至少经历 3 个振荡周期; 然后切换稀释速率, 或进行下一批连续发酵。

1.4 分析方法

葡萄糖、乙醇和生物量浓度的测定方法参照文献[9]。

2 结果与讨论

2.1 振荡产生的必要条件

图 1 给出了 6 种稀释速率下的连续发酵依次切换的过程中, 残糖、乙醇和生物量浓度随时间的变化情况。由图 1 可见, 在稀释率为 0.04 h^{-1} 的条件下产生了明显的振荡现象, 而其他稀释速率条件下, 系统均达到稳态。

前期实验中, 多次采用 0.027 h^{-1} 作为起始稀释速率, 均可产生长周期、宽振幅的振荡^[6-8,10]; 本实验中, 在经历稀释速率为 0.015 h^{-1} 和 0.025 h^{-1} 的连续发酵后, 再将稀释速率切换至 0.027 h^{-1} , 却没有出现振荡现象。

然而, 当稀释速率由 0.027 h^{-1} 切换至 0.04 h^{-1} 后, 这种长周期、宽振幅的振荡再次出现; 而随后进行的起始稀释速率为 0.04 h^{-1} 的连续发酵过程则达到了稳态 (图 2)。

由此可见, 这种振荡行为的产生不仅依赖于一定的操作条件 (例如稀释速率), 还依赖于系统的初始状态。产生振荡的条件具体总结如下: 特定稀释速率, 0.027 h^{-1} 或 0.04 h^{-1} ; 分别对应特定的初始状态, 二级种子培养结束后直接启动高糖连续发酵 (0.027 h^{-1}), 高糖连续发酵过程中稀释速率从较低切换到较高值 (0.04 h^{-1})。

2.2 稳态与振荡过程的发酵参数比较

表 1 给出了稀释速率为 0.027 h^{-1} 和 0.04 h^{-1} 的

条件下, 稳态和振荡过程的平均发酵参数。在二级种子培养完成后直接按 0.027 h^{-1} 稀释速率流加发酵培养基启动连续发酵则产生振荡, 而在稀释率逐级递加的条件下形成稳态; 在稀释速率 0.04 h^{-1} 时却有完全相反的结果, 操作条件直接开始于稀释率 0.04 h^{-1} 时, 形成稳态, 振荡只在稀释率逐级递加的条件下发生 (图 1)。由表 1 可见, 在相同稀释速率条件下, 振荡过程可达到较低的残糖浓度、较高的乙醇浓度、以及较高的设备生产强度。具体表现为: 在稀释速率为 0.027 h^{-1} 的条件下, 平均残糖浓度降低 3.9%, 平均乙醇浓度提高 9.0%, 平均设备生产强度提高 9.1%; 在稀释速率为 0.04 h^{-1} 的条件下, 平均残糖浓度降低 14.8%, 平均乙醇浓度提高 12.6%, 平均设备生产强度提高 12.3%。

通常对于稳态的连续发酵过程, 随着稀释速率的降低, 系统中的残糖浓度会进一步降低, 乙醇浓度进一步升高 (如图 1 及表 1 所示)。然而, 如表 1 所示, 振荡过程在相同的稀释速率下, 可达到比稳态过程更低的残糖浓度和更高的乙醇浓度; 不仅如此, 与较低稀释速率 (0.027 h^{-1}) 下的稳态过程相比, 较高稀释速率 (0.04 h^{-1}) 下的振荡过程, 反而达到了更低的平均残糖浓度和更高的平均乙醇浓度。为何振荡过程的平均发酵指标与稳态过程相比会有如此显著的提高? 最初推测: 可能是长时间 (500~600 h) 的连续发酵使菌种的发酵性能有所提高。

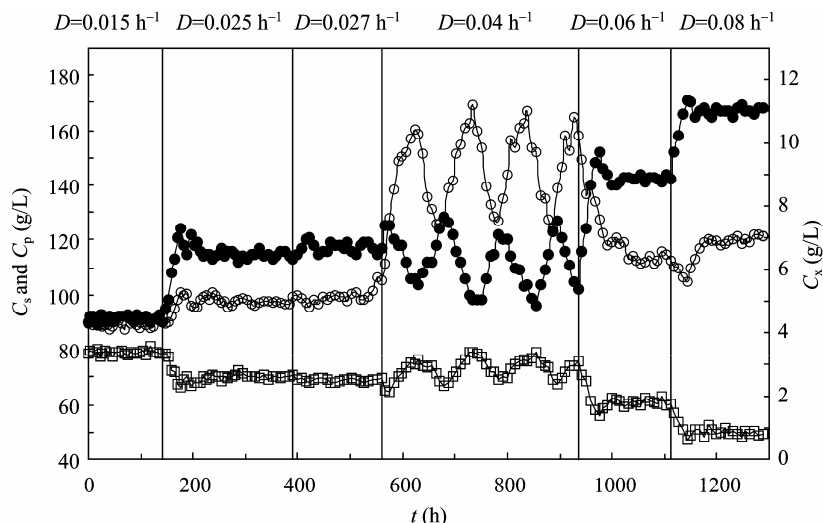


图 1 依次切换稀释速率的连续发酵过程中, 残糖、乙醇和生物量浓度随时间的变化情况

Fig. 1 Residual sugar (\bullet), ethanol (\square) and biomass (\circ) concentration vs time during continuous ethanol fermentations at different dilution rates.

表 1 稀释速率分别为 0.027 h^{-1} 和 0.04 h^{-1} 条件下的稳态和振荡过程发酵参数比较Table 1 Comparison of fermentation performance between steady and oscillatory processes at the dilution rate of 0.027 h^{-1} and 0.04 h^{-1}

$D (\text{h}^{-1})$	State	$C_s (\text{g/L})$	$C_x (\text{g/L})$	$C_p (\text{g/L})$	$Y_{p/s} (\text{g/g})$	$P (\text{g/(L·h)})$
0.027	Oscillatory	113.1	3.95	75.1	0.450	2.03
	Steady	117.5	5.24	68.88	0.424	1.86
0.04	Oscillatory	111.7	9.27	73.36	0.436	2.93
	Steady	128.2	5.84	65.14	0.429	2.61

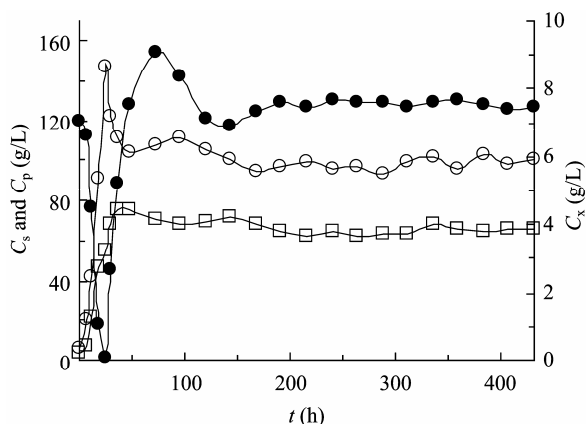
图 2 稀释速率为 0.04 h^{-1} 的稳态连续发酵过程中, 残糖、乙醇和生物量随时间的变化

Fig. 2 Residual sugar (\bullet), ethanol (\square) and biomass (\circ) concentration vs time during continuous ethanol fermentation process at a dilution rate of 0.04 h^{-1} .

分析数据发现: 图 1 中稀释速率在 0.06 h^{-1} 和 0.08 h^{-1} 下的稳态发酵过程参数, 是在系统连续运行了 900 h 之后得到的。为考察运行时间对菌种发酵性能的影响, 随后进行了起始稀释速率分别为 0.06 h^{-1} 和 0.08 h^{-1} 的连续发酵过程, 虽然运行时间仅为 300 h (均为稳态, 数据未显示), 但与运行时间超过 900 h 的发酵过程 (稀释速率分别为 0.06 h^{-1} 和 0.08 h^{-1}) 相比, 其残糖浓度并无显著差异, 未发现菌种的发酵性能在长时间连续发酵后有明显改变。因此, 上述振荡过程平均发酵指标高于稳态过程的现象, 其原因不在于菌种性能的差异, 而在于过程本身。

2.3 振荡过程与稳态过程的动力学及差异

对于采用 CSTR 反应器的连续发酵过程, 系统的稀释速率等于细胞的比生长速率; 而比生长速率与底物和产物浓度有关^[11-12], 通常表示为 $\mu = f(C_s, C_p)$ 的非线性函数形式。理论上存在同一比生长速率对应不同残糖和乙醇浓度的可能; 而且与稳态过程相比, 振荡过程中的残糖和乙醇浓度在较大范围内波动, 由

于非线性函数的均值可能大于其自变量均值的函数值, 因此振荡过程中的平均比生长速率有可能大于相同平均残糖浓度和平均乙醇浓度条件下稳态过程的比生长速率。以上两种原因均可能导致更高稀释速率对应更低残糖浓度和更高乙醇浓度的现象, 但取决于细胞生长动力学的具体形式。为此, 本研究考察了高浓度乙醇连续发酵过程的动力学特征。

表 2 给出了高浓度乙醇连续发酵过程中, 不同稀释速率下的稳态过程实验数据。由表 2 可见, 在残糖浓度和乙醇浓度为 $91.3\sim 167.1 \text{ g/L}$ 和 $49.9\sim 78.9 \text{ g/L}$ 的范围内 (包括了振荡过程所经历的残糖和乙醇浓度范围: $96\sim 129 \text{ g/L}$ 和 $65.9\sim 78.6 \text{ g/L}$), 比生长速率与残糖浓度正相关, 与乙醇浓度负相关, 未发现同一比生长速率对应不同残糖浓度和乙醇浓度的现象。

通过数据分析, 发现表 2 中的残糖浓度 (C_s) 与乙醇浓度 (C_p) 之间具有以下线性关系:

$$C_p = -0.394 \times C_s + 116 \quad (R^2 = 0.9931) \quad (1)$$

因此, 基于表 2 数据的动力学模型可简化为具有单一自变量的函数形式, 具体为:

$$\mu = 3.58 \times 10^{-6} \times C_s^2 + 2.71 \times 10^{-5} \times C_s - 2.25 \times 10^{-2} \quad (R^2 = 0.9792) \quad (2)$$

表 2 连续发酵稳态过程实验数据

Table 2 Experimental data of continuous ethanol fermentation at steady states

$C_s (\text{g/L})$	$C_p (\text{g/L})$	$D \ \& \ \mu (\text{h}^{-1})$
91.3	78.9	0.015
103.5	75.3	0.020
114.6	70.2	0.025
117.5	68.8	0.027
120.7	68.7	0.030
127.6	64.7	0.040
142.2	61.0	0.060
167.1	49.9	0.080

对于图 1 中稀释速率为 0.04 h^{-1} 的振荡过程, 残糖浓度 (C_s) 与乙醇浓度 (C_p) 之间也具有与方程 (1) 近似相同的线性关系:

$$C_p = -0.391 \times C_s + 117 \quad (R^2 = 0.8614) \quad (3)$$

若该振荡过程各时刻的动力学与稳态过程相同, 则各数据点所对应的比生长速率可用公式 (2) 估算。图 3 比较了稀释速率为 0.04 h^{-1} 的振荡过程中, 各时刻比生长速率的实测值和由公式 (2) 得到的计算值。

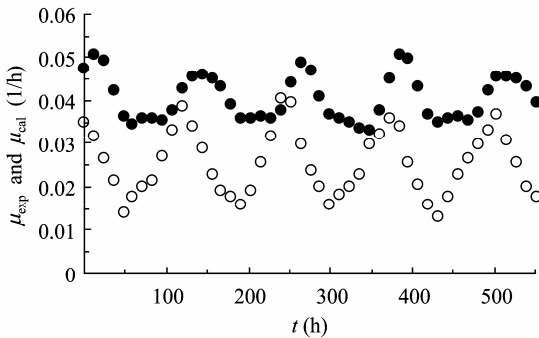


图 3 稀释速率为 0.04 h^{-1} 的振荡过程中比生长速率实测值与计算值的比较

Fig. 3 Comparison of the experimental data (●) with the data predicted by model (○) for specific cell growth rates during oscillation process at the dilution rate of 0.04 h^{-1} .

由图 3 可见, 振荡过程中实际的比生长速率明显高于按照稳态动力学数据得到的计算值, 且存在时间上的平移。因此, 振荡过程各时刻的细胞动力学与稳态并不相同, 对于稀释速率为 0.04 h^{-1} 的振荡过程, 在经历相同的残糖和乙醇浓度条件下, 其平均比生长速率 (0.04 h^{-1}) 比稳态过程 (0.026 h^{-1}) 提高了 53.8%。

对于振荡过程与稳态过程动力学差异的报道, 主要涉及细胞对环境胁迫的延迟反应 (滞后), 即细胞的比生长速率不仅与当前时刻的底物和产物浓度有关, 而且与前面时刻的底物和产物浓度有关, 虽然利用权值函数可模拟这种滞后现象, 但比生长速率的平均值仍与稳态过程相同^[13-14]。也有报道表明, 细胞的比生长速率受乙醇浓度升高速率的负面影响, 但其结果是振荡过程的平均比生长速率低于稳态过程^[15-17]。对于实验中振荡过程提高发酵效率和平均比生长速率的现象, 除了利用数学模型来解释

以外, 较为合理的解释是: 抑制型产物连续发酵过程中, 产物浓度周期性变化给细胞提供了恢复活性的时间, 因此能够在平均产物浓度相同的条件下保证较高的平均比生长速率; 乙醇属于初级代谢产物, 细胞平均比生长速率提高发酵效率也就提高。类似振荡现象在其他产物抑制型连续发酵过程也有报道^[13,15,18], 但是由于缺少相应条件下稳态过程的数据, 还不能证明其他过程是否也存在提高平均比生长速率和发酵效率的现象。

3 结论

- 1) 高浓度乙醇连续发酵过程中的振荡行为的产生与操作条件和系统的初始状态有关;
- 2) 在相同稀释速率下, 与稳态过程相比, 振荡过程具有更低的残糖浓度、更高的乙醇浓度和更高的设备生产强度;
- 3) 与稳态过程相比, 振荡过程的动力学不仅存在滞后, 而且经历相同残糖和乙醇浓度条件下, 振荡过程的平均比生长速率明显高于稳态过程。

符号说明

- C_s —— 残糖浓度, g/L;
 P —— 设备生产强度, g/(L·h);
 C_p —— 乙醇浓度, g/L;
 t —— 时间, h;
 C_x —— 生物量浓度 (干重), g/L;
 $Y_{p/s}$ —— 产物对底物得率, g/g;
 CSTR —— 连续搅拌式反应器;
 μ —— 比生长速率, h^{-1} ;
 D —— 稀释速率, h^{-1} 。

REFERENCES

- [1] Richard P. The rhythm of yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(3): 547-557.
- [2] Pratap R, Patnaik. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of mechanisms and models. *Biotechnol Adv*, 2003, 21(1): 183-192.
- [3] Wittmann C, Hans M, Winden WA van, et al. Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle

- during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89**(3):839–847.
- [4] Yang RYK, Su J. Improvement of chemostat performance via nonlinear oscillations. *Bioprocess Eng*, 1993, **9**: 97–102.
- [5] Warren RK, Hill GA, Macdonald DG. Improved bioreaction kinetics for the simulation of continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*, 1990, **6**(2): 319–325.
- [6] Bai FW, Ge XM, Anderson WA, *et al.* Parameter oscillation attenuation and mechanism exploration for continuous VHG ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **102**(1): 113–121
- [7] Bai FW, Chen LJ, Anderson WA, *et al.* Parameter oscillations in a very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on a multistage packed column bioreactor system. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(5): 558–566.
- [8] Yang L, Chen LJ, Bai FW. Dynamic models of VHG continuous ethanol fermentation and mechanisms of oscillation attenuation by packing. *J Chem Eng*, 2007, **58**(3): 715–721.
杨蕾, 陈丽杰, 白凤武. 高浓度酒精连续发酵过程中振荡行为的模拟及填料弱化振荡的机理. *化工学报*, 2007, **58**(3): 715–721.
- [9] Chen LW, Ge XM, Zhao XQ, *et al.* Attenuation mechanism of wood chips on oscillatory behavior in high-gravity continuous ethanol fermentation. *J Chem Eng*, 2007, **58**(10): 2624–2628.
陈令伟, 葛旭萌, 赵心清, 等. 木块填料对高浓度乙醇连续发酵过程中振荡行为的弱化机制. *化工学报*, 2007, **58**(10): 2624–2628.
- [10] Luo XP, Chen LJ, Wang F, *et al.* Effects of dilution rates on the oscillatory behaviors of a very high gravity continuous ethanol fermentation system. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(4): 604–608.
罗鑫鹏, 陈立杰, 汪芳, 等. 稀释速率对高浓度酒精连续发酵过程振荡行为的影响. *生物工程学报*, 2005, **21**(4): 604–608.
- [11] Luong JHT. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1985, **27**(2): 280–285.
- [12] Rogers PL, Lee KJ, Tribe DE. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnol Lett*, 1979, **1**(1): 165–170.
- [13] Daugulis AJ, McLellan PJ, Li J. Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56** (1): 99–105.
- [14] Daugulis AJ, McLellan PJ, Li J. The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(4): 667–680.
- [15] Borzani W. Variation of the ethanol yield during oscillatory concentrations changes in undisturbed continuous ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, **17**(2): 253–258.
- [16] Borzani W, Gregori RE, Vairo MLR. Some observations on oscillatory changes in the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic continuous undisturbed culture. *Biotechnol Bioeng*, 1977, **19**(9): 1363–1374.
- [17] Zamamiri AQM, Birol G, Hjortso MA. Multiple stable states and hysteresis in continuous, oscillating cultures of budding yeast. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **75**(3): 305–31.
- [18] Seki M, Ohzora C, Takeda M, *et al.* Taxol production using free and immobilized cells of *taxus cuspidate*. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **53**(3): 214–219.