

好氧发酵法生产甘油的 转化率和生产强度

杨海麟 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 设计了小型玻璃连续发酵反应器, 考察了甘油发酵的生产强度和转化率变化规律。结果表明: 转化率随发酵时间的延长趋于一定值。对甘油发酵过程作碳源衡算, 求得理论转化率 $Y_P = 1.57$; 甘油浓度对发酵时间作图是一条“S”形曲线, 生产强度随发酵时间有一峰值的变化。采用了高密发酵来提高发酵生产强度, 结果表明: 菌体浓度为11%~12%发酵液发酵60 h 甘油浓度达到108.9 g/L, 生产强度为1.81 g/(L·h), 80 h 甘油浓度为142 g/L, 生产强度为1.77 g/(L·h)。发酵结束转化率达到52%。

关键词 甘油发酵; 生产强度; 转化率; 产甘油假丝酵母

中图分类号 TQ 923

0 前言

甘油是重要的工业原料, 广泛应用在炸药、医药、食品、化工等国民生产各领域。无锡轻工大学开发利用甘油酵母 *Candida glycerolgenesis* Zhuge^[1] 发酵法生产甘油, 并实现工业化大生产, 为解决甘油紧缺开拓了新的途径。提高发酵的生产强度和转化率是实现工业化经济效益的关键因素, 对生产强度和转化率的研究, 也就是对发酵动力学和发酵代谢机理的研究。夏友坤提出了甘油发酵的动力学图形为“S”的数学模型, 并指出理论转化率为76.7%^[2]。笔者在对甘油发酵过程作营养物质与产物之间碳源衡算的基础上, 探求理论转化率, 并提出了提高甘油发酵生产强度的有效措施。

1 材料与方法

1.1 菌种

产甘油假丝酵母 *Candida glycerolgenesis* Zhuge WL2002-5^[3] 系耐高渗透压酵母, 无锡轻工大学甘油中心提供。

1.2 培养基

甘油发酵斜面、种子和摇瓶培养基组成: 按文献[2]制备。

1.3 培养方法

斜面菌种→活化→接种一环至250 mL三角瓶中, 33 ℃摇床做种子培养→以10%的接种量接种于装发酵培养基三角瓶中, 33 ℃摇床发酵。

1.4 分析方法

甘油含量的测定按文献[4]方法; 总糖、还原糖的测定按文献[5]方法; 磷的测定按文献[6]方法; 传氧速率的测定: 亚硫酸盐法; 酵母量的测定有2种方法: 第1种以每10 mL发酵液经3 000 r/min, 5 min离心后计; 第2种以吸取3 mL发酵液经10 000 r/min高速离心5 min, 洗涤3次, 然后80 ℃干燥24 h, 称重。

1.5 发酵设备

小型玻璃连续发酵反应器: 自制^[7], 实验中采用0.45 μm, ∅25 mm的滤纸来截留菌体, 先用种子培养基培养菌体24 h; 然后连续流加高浓度分析纯葡萄糖, 使反应器内糖浓维持在5%~10%, 反应每4 h取样一次; 高密发酵在20 L不锈钢发酵罐中进行。

2 结果与讨论

2.1 甘油发酵过程的生产强度和转化率

生产强度和转化率是衡量发酵好坏的两个重要指标, 其定义为:

生产强度 = $\frac{\text{发酵产生的甘油量}(\text{g/L})}{\text{发酵时间}(\text{h})}$

转化率 = $\frac{\text{发酵产生的甘油量}(\text{g/L})}{\text{发酵耗糖量}(\text{g/L})}$

小型连续发酵甘油浓度、生产强度和转化率变化见图1。

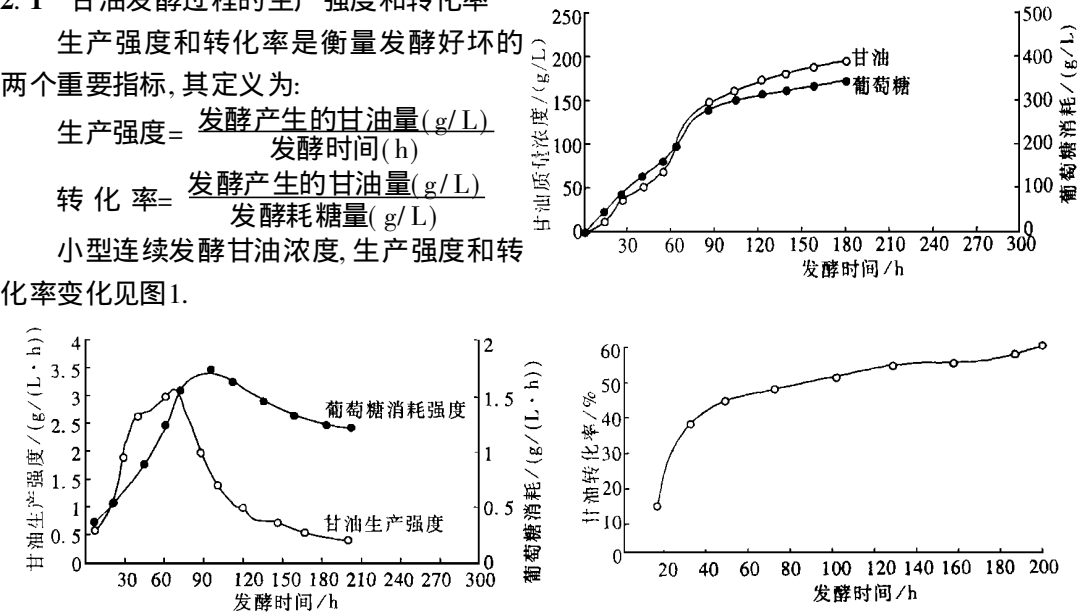


图1 小型连续发酵甘油浓度、生产强度和转化率变化曲线

由图1可知: 转化率随着发酵的进行不断上升而趋于一定值; 生产强度则随着发酵时间的延续有一个峰值的变化, 在60~90 h生产强度最高, 而后为下降的趋势。

2.2 甘油发酵的转化率的研究与计算

2.2.1 微生物反应过程中碳源的衡算 大部分的发酵过程都是以糖作为碳源。在微生物反应过程中碳源主要消耗于:

- 1) 满足于微生物菌体生长的需要, 用 $(\Delta S)_c$ 表示;
- 2) 维持微生物生存的消耗(如菌体的运动和营养物质的摄取和代谢产物排泄等主动运输的耗能), 可 $(\Delta S)_m$ 用表示;

3) 生成代谢产物的消耗, 可用 $(\Delta S)_P$ 表示。

根据发酵中营养物质(S)、菌体(X)、产物(P) 作碳源的衡算则有:

$$-\Delta S = (-\Delta S)_G + (-\Delta S)_M + (-\Delta S)_P \quad (1)$$

或者:
$$-\frac{ds}{dt} = \left(-\frac{ds}{dt}\right)_G + \left(-\frac{ds}{dt}\right)_M + \left(-\frac{ds}{dt}\right)_P \quad (2)$$

在反应中, 转化率是很关键的指标, 公式(2) 以转化率表示为:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_G} \cdot \left(-\frac{dx}{dt}\right) + mx + \frac{1}{Y_P} \cdot \left(-\frac{dp}{dt}\right) \quad (3)$$

式中: m : 碳源维持常数 $\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$

Y_G : 菌体理论得率,

$$Y_G = \frac{\text{生成菌体质量}}{\text{用于同化为菌体碳源消耗}} = \frac{dx}{(-ds)_G}$$

Y_P : 产物理论得率

$$Y_P = \frac{\text{生成代谢产物的摩尔数}}{\text{用于异化为代谢产物的碳源消耗}} = \frac{dp}{(-ds)_P}$$

则营养物质的消耗比速

$$Y = \frac{1}{Y_G} \cdot \mu + m + \frac{1}{Y_P} \cdot Q_P \quad (4)$$

在产甘油阶段, 菌体处于稳定期, 微生物菌体生长比速 $\mu \approx 0$

即
$$Y = m + \frac{1}{Y_P} \cdot Q_P \quad (5)$$

2.2.2 Y_P 的求解 由式(5)可知该式为一

直线方程, 处理甘油发酵实验数据作 $Y-Q_P$

图, 见图2。该直线在纵坐标的截距为 m , 其

斜率为 $\frac{1}{Y_P}$ 。计算中选取的实验点都是在发

酵 36 h 后($\mu \approx 0$) 测得的。

由图2得:

$$m = 2 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$$

$$Y_P = 1.57 \text{ (相当理论转化率的}$$

80.3%)

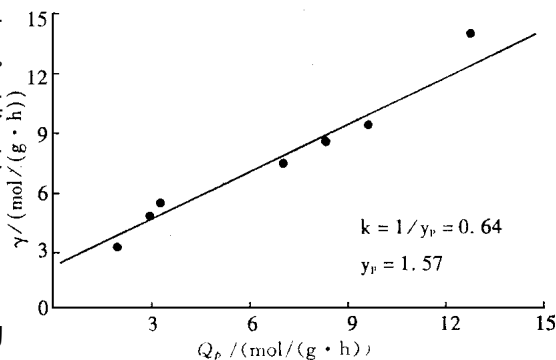


图2 $Y-Q_P$ 曲线

2.2.3 甘油发酵转化率的讨论 以上是

从微生物生化反应过程的质量衡算推出的甘油发酵理论转化率, 实际发酵中体现的转化率为表观转化率:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{产生甘油的质量}}{\text{发酵所耗的糖源质量}} \times 100\%$$

由于 $Y_{P/S}$ 考虑了发酵中所有糖源的消耗, 其中包括长菌体所耗糖源、维持代谢所耗糖源和副产物产生所消耗的糖量, 所以 $Y_{P/S} < Y_P$ 。

产甘油阶段的转化率, 因为此时 $\mu \approx 0$, 耗糖只用于维持细胞代谢和产生甘油两部分, 所以此段时间的转化率更能清楚体现产甘油耗糖占所有耗糖的比重。

若取 $Y_P = 1.57$, 由式(5) 得:
$$Y_{P/S} = \frac{Q_P \times 92}{Y \times 180} = \frac{1.57(Y - 2 \times 10^{-4}) \times 92}{Y \times 180} \quad (6)$$

在 24 ~ 78 h 内, 取 $Y = 7.71 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 得 $Y_{P/S} = 59.3\%$

以上计算的转化率59.3% 为理论转化率的73.8%左右, 相当于夏友坤论文^[1]转化率的

78.6%, 这已是较高的水平, 因为即便在实验室摇瓶实验中, 甘油对耗糖的转化率很少突破60%, 这也说明甘油发酵在转化率方面的开发潜力并不大。若考虑在长菌体阶段, 由于葡萄糖消耗主要用于长菌体, 而甘油产量较少, 因此整个甘油发酵的转化率是达不到这样高的水平, 见表1。

表1 表观转化率在发酵中的变化

发酵过程	耗糖比速 y 用于	$Y_{P/S} = \frac{Q_P}{y}$
发酵开始阶段	$\frac{1}{Y_G}\mu + m$	$\frac{Q_P}{y} \rightarrow 0$
随着发酵的进行	$\frac{1}{Y_G}\mu$ 数值不断下降 $m + \frac{1}{Y_P}Q_P$ 数值不断上升	$\frac{Q_P}{y}$ 不断上升
发酵时间延续	$m + \frac{1}{Y_P}Q_P$	$\frac{Q_P}{y}$ 上升并趋于一定值

式(6) 可进一步变形为:

$$Y_{P/S} = (Y_P - \frac{m \times Y_P}{y}) \times \frac{92}{180} \times 100\%$$

(7)

式(7) 表明提高发酵转化率应控制好培养条件以使 m 尽可能小; 良好的发酵, 耗糖比速较快, 往往在 72 ~ 80 h 内完成。

通过流加碳源, 延长发酵时间也可以提高转化率。但长时间的发酵则会降低发酵生产强度。

2.3 甘油发酵的生产强度

甘油发酵既要考虑转化率, 又要兼顾生产强度。作甘油浓度 - 发酵时间的曲线, 见图3。图3通过原点、相交于曲线的直线, 其斜率系曲线上该点的平均生产强度, 即:

$$\text{平均生产强度 } P = \frac{C}{t}$$

图上两直线所夹的发酵部分(相对应的发酵时间是 $T_1 \sim T_2$) 具有较高的平均生产强度。

发酵曲线呈“S”型, 在发酵中部, 存在一拐点, 拐点附近(相对应的发酵时间为 t_1

~ t_2) 甘油发酵的生产强度最高, 而在曲线其他部分的切线斜率较小。因此, 提高甘油生产强度的可行方案有以下2种:

1) 菌浓的增加提高生产强度。由于生产强度只关系到甘油浓度与发酵时间两个变量, 而单位菌体产生甘油的能力在一定的培养条件下较为恒定, 故提高菌浓相应的增加了发酵液中甘油的浓度, 生产强度也随之上升。但菌浓的增加要受通风量的限制。

2) 流加发酵提高生产强度。由图上可知, 在时间 $t_1 \sim t_2$ 内发酵强度最高, t_2 以外发酵强度由于酵母胞内蛋白酶的分解破坏作用, 甘油产率开始下降。由实验可知, $t_1 \sim t_2$ 为发酵 30 ~ 50 h 之间, 为细胞生长的平稳期, 此时比生长速率近似等于零。因此, 通过补充带适量营养源的培养基, 维持菌体繁殖, 既能保证菌体的活力, 又能保证足够的菌浓。但流加发酵存在发酵液残糖高, 发酵转化率相对低等缺点。

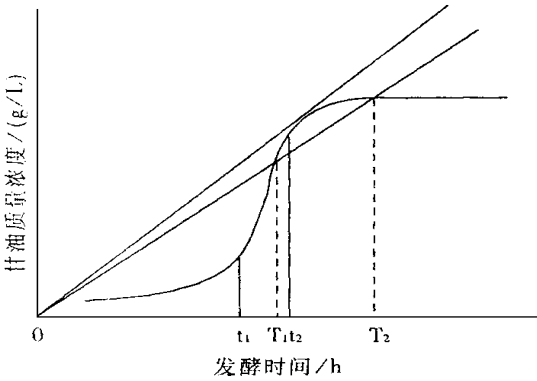


图3 甘油发酵过程中的生产强度

2.4 高生产强度的甘油发酵

高生产强度的发酵可以由高菌浓发酵实现,而增加菌浓,无疑要加重对发酵培养基的负担,其中影响最大的为发酵罐的通风量和发酵底物的浓度。

2.4.1 高菌浓发酵的菌量控制 在对甘油发酵培养基的研究过程中发现磷量、酵母浓度和通风量三者是统一的:正常发酵培养中,磷是菌体生长的限制性底物,磷量决定了酵母浓度,而单位浓度的酵母在发酵中有一最适通风量^[8]。本实验在20 L 小型标准不锈钢通用发酵罐中进行,尽管此种罐有较宽的通风范围,考虑高转速的机械搅拌对酵母生长的负作用,以及高密度酵母培养细胞间对营养物的竞争作用,选定菌浓为10%~12%(普通摇瓶实验菌浓为5%~6%),通风比1:1,搅拌转速600 r/min,此时亚硫酸盐法测得 K_{La} 值为 420 h^{-1} 。做摇瓶实验得培养菌体培养基为:玉米浆10~13 g/L,尿素2~4 g/L。

2.4.2 葡萄糖的流加 研究葡萄糖对甘油发酵的影响^[7]可知,低浓度的葡萄糖加速甘油酵母的生长繁殖;而高浓度的糖不利于甘油的生产,有利的糖浓应控制在小于20%。

采用的葡萄糖流加方案见表2。

表2 高密发酵葡萄糖流加方案

发酵时间/h	流加糖浓/(g/(1·h)) (以发酵罐体积计)	营养源的补加%	
		磷量	尿素
0~24	100	1.2	0.3
24~72	+ 150	0	0
72~120	+ 150	0	0

2.4.3 高密发酵小试实验数据 见图4,图5。

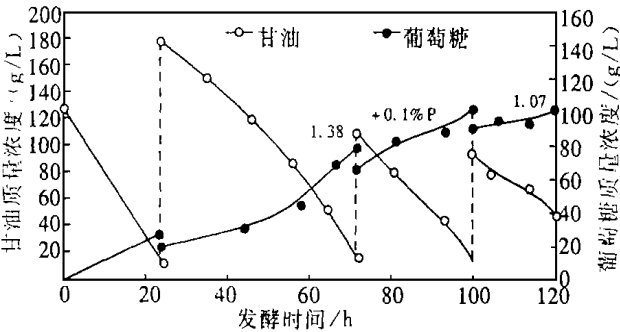


图4 菌浓8%~9%发酵液的高密发酵

图4中发酵补加葡萄糖浓为70%~80%,高浓度的糖对发酵液稀释较少,所以菌浓变化不大,发酵前期无需补加营养源;菌浓控制在8%~9%发酵液,其发酵最终转化率为48.8%;生产强度并无明显提高。为此,实验B菌浓提高至11%~12%发酵液;另外考虑工业化生产所用糖液为双酶法制得,其浓度一般不高于500 g/L。而添加低浓度的糖液对发酵有稀释作用,所以添加浓度为 $500\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 的糖液

同时补加营养源,营养源的添加量依发酵罐内菌体量而定,以维持较高浓度的菌体浓度。

由图5看出:菌体浓度为11%~12%发酵液的发酵其生产强度可明显提高,发酵60 h 甘油浓度达到108.9 g/L,生产强度为 $1.81\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$;80 h 甘油浓度为142 g/L,生产强度为 $1.77\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。发酵结束转化率达到52%。

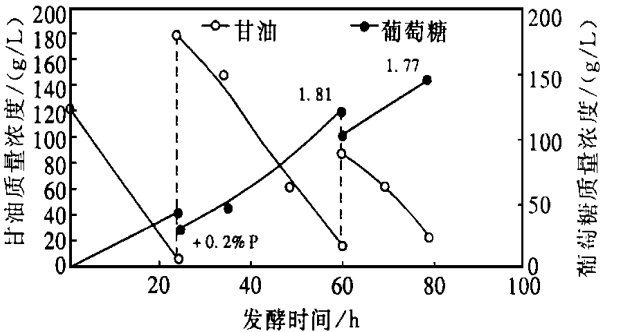


图5 菌浓11%~12%发酵液的高密发酵

参 考 文 献

- 1 Wang Z X, Zhuge J. A new osmotolerant and high-glycerol-producing species of *Candida* sp. *Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. Nov Acta Microbiological Sinica, 1997
- 2 夏友坤. 好氧发酵法生产甘油动力学研究. [博士论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1994
- 3 诸葛健, 方惠英. 好氧发酵法生产甘油新菌株的获得及其筛选方法. 中国专利. 1082608A, 1994
- 4 Lambert M, Neish A C. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. Can J Research, 1950, 28: 83 ~ 89
- 5 Miller G L, Blum R, Glennon W E, Burton A L, et al. Anal Biochem, 1960, 2: 127 ~ 132
- 6 Edgley M, Brown A D. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Science, 1944, 100: 45 ~ 51
- 7 杨海麟. 好氧发酵法生产甘油发酵工艺的研究. [硕士论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1995
- 8 杨海麟, 诸葛健, 沈微. 好氧发酵法生产甘油发酵培养基的优化. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(4/A): 16 ~ 21

Studies on Glycerol Productivity and Yield in Aerobic Fermentation Process

Yang Hailin Zhuge Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract Productivity and yield are two important criteria for fermentation. Designed the small-scale glass continue fermenter and investigated the regulations of glycerin productivity and yield, the experiments results show that yield would approach to a constant with the fermentation extent. By calculating in accordance with the carbohydrate balance between the nutrients and products, we can obtain the theory yield to 1.57. The curve of glycerol concentration to time likes "S" shape with a productivity peak. High-yeast-density fermentation is the effective methods to increase the productivity. The satisfied results, 60 h, productivity up to 1.81 g/(L·h) and 80 h down to 1.77 g/(L·h), can be obtained when the yeast density is up to 11% ~ 12%. The yield is still 52%.

Key words glycerol fermentation; productivity; yield; high-glycerol-producing species of *Candida* sp.; *Candida glycerolgenesis* Zhuge sp.

(责任编辑: 陈 娇)