

## 自絮凝酵母高浓度重复批次乙醇发酵

李凡, 葛旭萌, 李宁, 白凤武

大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

**摘要:** 利用发酵性能优良的自絮凝酵母 *Saccharomyces cerevisiae flo*, 研究开发了重复批次高浓度乙醇发酵系统, 以节省下游加工过程的能耗。在终点乙醇浓度达到 120 g/L 左右的条件下, 发酵系统的乙醇生产强度达到 8.2 g/(L·h)。然而实验中发现, 随着发酵批次的增多, 自絮凝酵母沉降性能逐渐下降, 从发酵液中沉降分离所需时间相应延长, 导致发酵液中高浓度乙醇对酵母的毒害作用加剧, 影响其发酵活性和发酵系统运行的稳定性, 发酵装置运行 11 个批次后无法继续运行。实验结果表明, 絮凝能力下降导致的酵母絮凝颗粒尺度减小是其沉降性能下降的主要原因。进一步研究发现, 酵母的絮凝能力通过再培养可以恢复。在此基础上对发酵系统操作进行改进, 每批发酵结束后可控采出一定比例菌体, 调节系统的酵母细胞密度和乙醇生产强度以刺激酵母增殖, 保持其絮凝能力。在达到相同发酵终点乙醇浓度条件下, 虽然发酵系统的乙醇生产强度降低到 4.0 g/(L·h), 但运行 10 d 后絮凝颗粒酵母尺度趋于稳定, 继续运行 14 d, 未发现絮凝颗粒酵母尺度继续下降的现象, 系统可以稳定运行。

**关键词:** 絮凝酵母, 高浓度乙醇发酵, 重复批次工艺

## Consecutive very-high-gravity batch ethanol fermentation with self-flocculation yeast

Fan Li, Xumeng Ge, Ning Li, and Fengwu Bai

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

**Abstract:** In order to save energy consumption for the downstream processes, consecutive very-high-gravity batch fermentation was developed for ethanol production with the self-flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae flo*. The fermentation system exhibited a high ethanol productivity of 8.2 g/(L·h) with average ethanol concentration around 120 g/L. However, deterioration of the sedimentation performance of yeast flocs was observed as the consecutive fermentation process was prolonged, which significantly extended the time required for yeast flocs to separate from fermentation broth, and exaggerated the inhibition of high ethanol concentration on the yeast flocs, making them quickly lost viability and the fermentation system interrupted after 11 consecutive batches. Experimental results illustrated that decrease of the size of yeast flocs was the main reason, which could be prevented by stimulating the propagation of the yeast flocs. Thus, yeast was purged from the fermentation system at the end of each batch, and the concentration of yeast flocs within the fermentor was maintained at a relatively low level to stimulate their propagation. Although the ethanol productivity was decreased to 4.0 g/(L·h), the size of yeast flocs was stabilized after 10 consecutive batches and maintained for another 14 batches without further decrease, indicating the fermentation system could be operated reliably.

**Received:** June 12, 2009; **Accepted:** July 17, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA10Z358).

**Corresponding author:** Fengwu Bai. Tel/ Fax: +86-411-84706329; Email: fwbai@dlut.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA10Z358)资助。

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae* flo, very-high-gravity ethanol fermentation, consecutive batch process

高浓度(Very high gravity, VHG)乙醇发酵,是指发酵基质的糖浓度在 250 g/L 以上,发酵终点乙醇浓度大于 15%(V/V),即 120 g/L 的发酵过程。该工艺不仅直接节省发酵液精馏操作能耗,而且还可以减少精馏产生废糟液及发酵系统物料流总量,进而节省采用多效蒸发技术处理废糟液及发酵系统物料流加热与冷却操作的能耗,是乙醇发酵行业和燃料乙醇生产节能的重要研究和方向<sup>[1-2]</sup>。虽然 VHG 发酵可以通过采用同步糖化发酵(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)<sup>[3]</sup>或流加 VHG 培养基补料的方式有效减轻底物抑制效应<sup>[4]</sup>,但系统中逐渐积累的高浓度乙醇产生的产物抑制,却无法采用经济上可行的方法避免,如耦合膜渗透蒸发虽然可以从系统中分离乙醇,减轻产物抑制效应<sup>[5]</sup>,但真空系统的能耗、膜组件自身的成本、粗原料对膜的污染等诸多技术经济问题,使其难以被工业界接受。严重的产物抑制,导致发酵速率显著降低,发酵时间大大延长,甚至出现残糖浓度很高,发酵却过早停止的现象(Stuck fermentation)<sup>[6]</sup>。

在研究酵母细胞乙醇抑制机理的基础上,构建乙醇耐受性好的工程菌株,无疑是 VHG 乙醇发酵的重要研究方向,但迄今为止尚未取得预期进展。添加氨基酸、维生素等营养组分,虽然能够在一定程度上提高酵母细胞在 VHG 发酵条件下的活性及乙醇耐受性<sup>[7-9]</sup>,但这些营养组分对乙醇这样大宗低值发酵产品生产来说价格昂贵。提高 VHG 发酵系统酵母细胞浓度,可以提高发酵速率,缩短酵母细胞历经高浓度乙醇抑制的时间,减轻高浓度乙醇对酵母细胞的损伤,保持其高发酵活性。基于这一思想,本课题组利用自行选育的乙醇发酵性能优良的自絮凝酵母在发酵后易于从发酵液中自沉降分离,使发酵系统维持高细胞密度和高发酵活性的特点,研究开发了重复批次 VHG 乙醇发酵技术(Consecutive VHG batch ethanol fermentation)。

本研究对自絮凝酵母 VHG 条件下的重复批次乙醇发酵系统性能进行了考察,研究了实验运行过程中随着重复发酵批次的增加,自絮凝酵母沉降性

能逐渐衰退,从发酵液中自沉降分离所需时间延长,酵母细胞受高浓度乙醇抑制损伤增加,发酵活性逐渐降低的现象,针对絮凝能力衰退的菌体其絮凝能力可以通过培养增殖得以恢复的特点,对发酵操作方式进行改进,可控采出部分酵母,使发酵系统的酵母得以自我更新,维持其絮凝性能,实现了重复批次高浓度乙醇发酵系统的持续稳定运行。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* flo,由大连理工大学生物科学与工程系保藏。

#### 1.1.2 培养基和缓冲液

斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 4, 蛋白胨 3, 琼脂 15, 4°C 保藏。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 酵母粉 5, 蛋白胨 5, 121°C 灭菌 15 min。

扩大培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 酵母粉 5, 蛋白胨 5, 121°C 灭菌 15 min。

发酵培养基 I (g/L): 葡萄糖 320, 酵母粉 6.75, 蛋白胨 8.5, 110°C 灭菌 15 min。

发酵培养基 II (g/L): 葡萄糖 255, 酵母粉 5.25, 蛋白胨 6.75, 115°C 灭菌 15 min。

解絮缓冲液 (mol/L): 醋酸钠 0.05, EDTA 二钠 0.02。

絮凝缓冲液 (mol/L): 醋酸钠 0.05, 氯化钙 0.01。

醋酸钠缓冲液 (mol/L): 醋酸钠 0.05。

### 1.2 培养和发酵

#### 1.2.1 摇瓶种子初级培养

自斜面上接一环菌体于含有 100 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中,在摇床上以 150 r/min、30°C 的条件培养 24 h。

#### 1.2.2 发酵罐种子扩大培养

摇瓶酵母种子培养液静置沉降 1 min, 弃去上清液,将酵母接入含有 0.4 L 扩大培养基的发酵罐中

进行间歇扩大培养;待葡萄糖浓度降至 1 g/L 以下时,切换为流加培养。其培养条件为:温度 30°C, pH 4.5, 搅拌速率 300 r/min, 通气量 0.5 vvm。控制流加速率使残糖浓度维持在 1 g/L 以下,共加入 1 L 扩大培养基。

### 1.2.3 高浓度乙醇对酵母细胞活性的影响

扩大培养结束后,暂停通气和搅拌,自絮凝酵母沉降至罐底,抽出 0.6 L 上层清液(保留 500 mL 含菌体发酵液);开启通气和搅拌,同时流加发酵培养基 I,每 30 min 取样 1 mL 测定残糖,并调节流加速率,使残糖浓度维持在 1 g/L 左右,而乙醇浓度逐渐上升。当乙醇浓度达到 120 g/L 后,停止流加和通气。从流加发酵开始,每隔 4 h 取样 4 mL 以测定各发酵参数及菌体存活率。

### 1.2.4 重复批次 VHG 发酵

扩大培养结束后,停止通气和搅拌 1 min,使自絮凝酵母沉降,然后抽出 1.1 L 上层清液,恢复搅拌和通气,随即用蠕动泵在 25 min 内补加 1 L 发酵培养基 I,使系统从低乙醇浓度的扩大培养状态,迅速进入 VHG 发酵状态,待葡萄糖浓度降至 1 g/L 以下时,认为发酵达到终点。对于第 2 批及之后的各批次间歇发酵,均在前一批发酵结束后停止通气和搅拌,使自絮凝酵母沉降,抽出上层清液,保留 400 mL 菌体被浓集的发醇液,补加 1.4 L 发酵培养基 II,进行 10 批如此的重复批次发酵。发酵条件控制如下:温度 30°C, pH 4.5, 搅拌速率 150 r/min, 通气量 0.05 vvm。

## 1.3 絮凝酵母不同粒径分布体系的沉降性能

### 1.3.1 不同颗粒大小分布絮凝酵母的制备

收集扩大培养的絮凝酵母菌体,经去离子水洗涤 2 次后离心,称取 4 份等量湿重的菌体,每份 70 g,悬浮于含有解絮缓冲液的刻度烧杯中,定容至 300 mL,磁力搅拌使菌体分散成游离体系。分别在各烧杯中加入 0.005、0.0157、0.0324、0.0495 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液 100 mL,定容 450 mL 并调节 pH 为 4.70,得到不同颗粒分布的絮凝酵母体系,利用激光聚焦反射测量技术(Focused beam reflectance measurement, FBRM)测定絮凝酵母的颗粒分布<sup>[10]</sup>,定量考察其对沉降性能的影响。

### 1.3.2 不同颗粒分布絮凝酵母表观粘度与沉降性能的考察

从各样品烧杯中,取出 25 mL 菌体悬浮液,采用 NDJ-1 旋转粘度计测量表观粘度,测量方法参考文献[11];停止搅拌后,将刻度烧杯中菌悬液转移至 500 mL 量筒中,测量菌体出现界面时体积及沉降时间,表征其沉降性能。

### 1.4 发酵过程酵母絮凝特征的研究

收集第 1 批次和第 14 批次发酵终点的絮凝酵母样品,去离子水洗涤 2 次后,离心收集菌体,各称取 70 g 湿重的菌体,用 EDTA 解絮缓冲液洗涤 2 次,离心收集菌体,再用醋酸钠缓冲液洗涤 2 次,离心后悬浮于含有醋酸钠缓冲液的刻度烧杯中,定容至 450 mL,分别加入 0.0495 g 过量无水  $\text{CaCl}_2$ <sup>[12]</sup>使菌体恢复絮凝并调节 pH 为 4.70,消除发酵后环境条件差异对菌体絮凝及沉降性能影响,考察发酵过程菌体絮凝能力的变化。

收集第 14 批次发酵终点的絮凝酵母悬浮液 2 mL,将其接种至含有 100 mL 种子培养基的摇瓶中,在摇床上以 150 r/min、30°C 的条件培养 24 h 后,收集摇瓶中菌体,测量菌体絮凝及沉降性能,考察其絮凝性能恢复情况。

### 1.5 改进的重复批次 VHG 发酵

实验方法同 1.2.4,絮凝酵母经过扩大培养并切换至 VHG 发酵后,在每批次发酵终点菌体沉降之前抽出一定体积菌体悬浮液,以此调节发酵罐内生物量浓度,使每批次发酵时间及终点生物量浓度保持稳定。其余操作条件均与上述相同。

## 1.6 分析方法

### 1.6.1 发酵参数、自絮凝颗粒酵母粒径分布及酵母活性的测定

在每批次终点取 2 份各 4 mL 发酵液样品进行发酵参数的测量。乙醇浓度、葡萄糖浓度、生物量的分析、每批次发酵终点中利用 FBRM 在线监测及罐外测定酵母粒径分布的实验方法均参考文献[13]。

去离子水洗涤酵母样品后,用 0.2 mol/L 柠檬酸钠溶液解絮并适当稀释,采用 0.2% 亚甲基蓝溶液染色,显微镜下直接计数测定酵母细胞总数和未着色的活细胞数,计算活细胞比率,所有样品均测量 2

次, 每份样品测量细胞数均大于 500 个。

### 1.6.2 发酵液上清液粘度及絮凝酵母悬浮液表观粘度的测定

在每批次发酵终点, 抽取 25 mL 絮凝酵母悬浮液测量表观粘度, 待酵母沉降后, 抽取 25 mL 发酵上清液测量其表观粘度, 所有样品测量 3 次。测量方法均参考文献[11]。

### 1.6.3 发酵上清液密度及酵母表观密度的测定

在每批次发酵终点酵母沉降后, 取 100 mL 发酵液, 利用比重计室温下测量上清液密度, 并进行温度补偿校正。酵母表观密度测量参考文献[14]进行, 即取一定体积酵母悬浮液样品称重, 5000 r/min 离心分离菌体与发酵液后, 室温下测量发酵液体积与质量, 利用质量体积差量法计算酵母表观密度, 每个样品取 3 份平行样。

### 1.6.4 沉降性能测量

在每批次发酵至终点后, 停止搅拌, 酵母菌体开始沉降, 从沉降开始计时, 至菌体界面沉降至罐体某一固定刻度处停止计时, 所用时间即为沉降时间, 对应体积为沉降体积, 每份样品测量 2 次。

### 1.6.5 絮凝值的测量

酵母细胞絮凝值 (Flocculence) 的测定, 根据酵母悬浮液在试管内经过特定时间沉降后, 取液面下方某固定刻度处测量 OD 值 A, 并与解絮后游离酵母 OD 值 B 进行比较, 定义  $F = (1 - \frac{A}{B}) \times 100\%$ , 具体方法参见文献[15], 所有样品均测量 2 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高浓度乙醇对酵母活性的影响

尽管酵母细胞自絮凝形成颗粒后乙醇耐受性得以改善<sup>[16]</sup>, 但高浓度乙醇对其毒害作用仍然十分突出。如图 1 所示, 当乙醇浓度由 45 g/L 上升至 85 g/L 时, 其存活率由 74% 下降至 48%; 随着乙醇浓度的进一步上升, 酵母细胞的乙醇耐受性提高, 存活率下降趋势变缓, 并维持在 50% 左右。在乙醇浓度上升至 120 g/L 后 (图 1 中虚线右侧), 酵母细胞在该乙醇浓度下停留 4 h, 其存活率仍维持在 50% 左右; 之后随着时间的延长, 存活率迅速下降, 停留 11 h 后

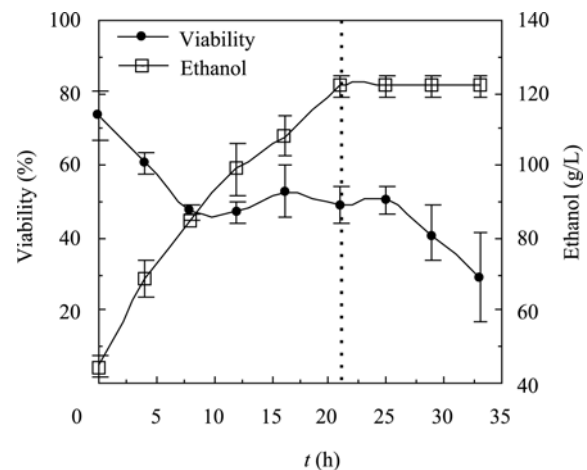


图 1 乙醇浓度对酵母细胞活性的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on yeast viability.

存活率下降至 30%。因此, 只要在一定的时间(如 2 h)内完成酵母细胞与高乙醇浓度发酵液的分离, 即可在酵母细胞大量死亡前, 将其回用至发酵初始阶段, 以提高发酵罐的设备生产强度。

### 2.2 重复批次发酵耦合絮凝沉降工艺的运行效果

在考察高浓度乙醇对酵母活性影响的基础上, 设计了耦合酵母絮凝沉降的重复批次发酵工艺, 进行 VHG 乙醇发酵, 实验结果如表 1 所示。可见每批发酵终点的残糖浓度均低于 1 g/L, 乙醇浓度在 120 g/L 左右, 乙醇得率在 0.46 左右, 生物量浓度大于 20 g/L, 并随着批次的增加逐渐增加, 从而使每批发酵时间由 14 h 逐渐减少至 8 h, 发酵罐的乙醇设备生产强度指标从 6 g/(L·h) 相应增加至 11 g/(L·h)。

与游离酵母发酵过程相比, 絮凝酵母的优势在于发酵初始阶段可富集较高的生物量浓度, 从而显著提高发酵速率, 缩短发酵时间<sup>[17-18]</sup>。对于 VHG 发酵而言, 则可避免酵母经受长时间高浓度乙醇的毒害, 且在发酵结束时, 可以利用菌体自絮凝沉降的特性, 使高乙醇浓度的发酵液与菌体快速分离。与文献中报道的利用游离酵母进行批次或连续 VHG 发酵, 设备生产强度指标仅为 1~2 g/(L·h) 相比<sup>[19-20]</sup>, 在终点乙醇浓度基本相同的条件下, 本实验采用的重复批次发酵方式, 平均设备生产强度可以达到 8.2 g/(L·h)。

然而, 在实验中发现, 随着发酵批次的增多, 菌体的沉降性能逐渐下降, 达到同一沉降体积所需的时间由初期的 0.3 min 增至约 25 min。而且, 随

表 1 凝酵母 *S. cerevisiae flo* 高浓度乙醇重复批次发酵实验结果Table 1 Results of the consecutive VHGB batch fermentation with the self-flocculating yeast *S. cerevisiae flo*

Batoh No.	$t$ (h)	$t_s$ (m)	$S_f$ (g/L)	$P_f$ (g/L)	$X_f$ (g/L)	$V_s$ (L)	$q$ (g/(L·h))	$Y$ (g/g)	Viability (%)
1	14.00	0.3	0.28	120	31.2	0.30	6.07	0.445	97.85
2	12.75	0.8	0.90	115	24.0	0.40	7.18	0.464	95.52
3	13.50	1.3	0.88	119	29.8	0.40	6.87	0.466	95.85
4	11.67	2.0	0.19	122	31.5	0.40	7.97	0.472	94.46
5	10.25	3.1	0.55	122	32.3	0.45	9.03	0.473	94.77
6	9.33	4.3	0.33	119	34.8	0.40	9.84	0.451	93.87
7	8.25	6.7	0.23	118	34.7	0.42	10.95	0.462	91.50
8	8.00	9.6	0.75	120	30.9	0.42	11.35	0.469	86.70
9	8.80	13.4	0.75	120	32.4	0.40	10.62	0.461	84.87
10	7.72	18.5	0.44	120	35.3	0.50	10.58	0.463	78.35
11	8.00	24.6	0.20	120	38.5	0.50	11.89	0.470	74.85

随着发酵批次的增加, 菌体活性逐渐下降。由于发酵终点菌体处于高乙醇浓度和营养匮乏的胁迫条件下, 沉降时间的增加, 势必会延长高浓度乙醇对酵母毒害作用的时间, 使菌体活力受到损失。因此当酵母沉降比较困难时, 采出部分菌体以降低系统酵母浓度, 改善沉降性能(第 7 和 8 批次), 同时适当增加酵母的沉降体积, 以减少沉降时间, 降低乙醇对酵母的毒害作用, 这些措施虽然能够维持这一系统的发酵性能, 但是菌体的沉降性能仍在继续衰退。因此, 有必要对絮凝酵母沉降性能下降的原因进行分析。

### 2.3 重复批次 VHGB 发酵过程中絮凝酵母沉降性能变化的定性考察

基于上述分析, 首先定性考察了重复批次 VHGB 发酵过程中絮凝酵母沉降性能的变化, 结果如图 2 所示。可见在第一个批次结束和最后一个批次结束时, 絮凝酵母的沉降性能发生了明显变化, 由自由沉降转变为干扰沉降, 界面位置随批次的增多而提高。

颗粒酵母自由沉降行为一般可由 Stokes 公式描述, 影响颗粒沉降性能的因素包括: 粒径、液相表观粘度、颗粒和液相的密度<sup>[21-22]</sup>。为此, 在另一组重复批次发酵实验中, 对总共 14 个批次每批发酵终点絮凝酵母粒径、悬浮液粘度、酵母与发酵液密度进行了测量, 定量分析絮凝酵母沉降性能改变的主要因素, 实验结果如表 2 所示。

可见发酵过程中, 伴随生物量浓度逐渐增加, 悬浮液表观粘度由发酵初 14 mPa·s 逐渐增大到 114 mPa·s\*, 这种变化规律与本课题组之前报道的结果一致<sup>[12]</sup>。进一步观察发现, 随着发酵过程的延

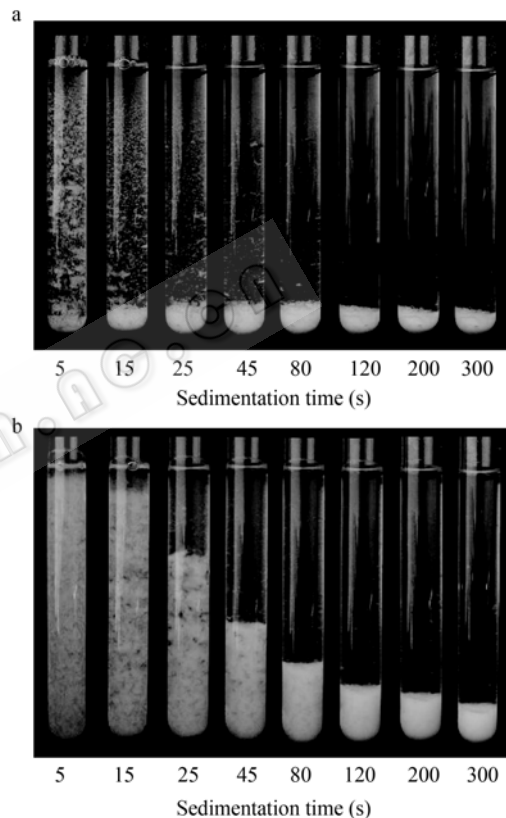


图 2 重复批次发酵过程中酵母菌体沉降特征的定性考察  
Fig. 2 Sedimentation of the yeast flocs during the consecutive VHGB batch fermentation. (a) Sampling at the end of the 1st batch fermentation. (b) Sampling at the end of the last batch fermentation.

续, 当终点生物量维持在 42~44 g/L 时, 悬浮液表观粘度急剧下降至 69 mPa·s。整个发酵过程中, 上清液的粘度基本保持不变, 发酵液密度和菌体密度基本没有太大改变, 这也与文献报道相符合<sup>[14,22]</sup>, 表明

\* 由于粘度计量程限制, 当粘度超过 50 mPa·s 时, 需要更换转子, 剪切速率改变, 第 10 批发酵终点表观粘度因而发生阶跃变化。

表 2 发酵过程中絮凝酵母沉降性能相关参数的测定结果

Table 2 Parameters affecting sedimentation of the yeast flocs during the consecutive VHG batch fermentation

Batch No.	$t_s$ (m)	$X_f$ (g/L)	$V_s$ (L)	$\mu_p$ (mPa·s)	$\mu_0$ (mPa·s)	$\rho_0$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_c$ (g/cm <sup>3</sup> )	$M$ ( $\mu$ m)
1	0.3	31.43	0.40	14.18	3.00	0.991	1.047	313
2	0.9	32.18	0.40	18.35	3.00	0.991		302
3	1.4	32.20	0.40	19.22	3.00	0.990		295
4	3.1	34.33	0.40	23.70	3.00	0.991		273
5	4.1	33.88	0.40	29.42	3.50	0.991		268
6	5.6	38.23	0.40	30.93	3.00	0.991	1.041	259
7	7.0	37.98	0.40	33.75	3.00	0.992		238
8	10.3	38.43	0.40	36.18	3.00	0.992		193
9	15.7	42.68	0.40	44.97	3.25	0.992		178
10	22.3	44.25	0.40	99.90	3.50	0.992		146
11	13.8	43.31	0.50	114.82	3.25	0.992		127
12	16.2	43.21	0.50	99.93	3.25	0.993		112
13	20.5	42.26	0.50	84.78	3.25	0.992		102
14	26.8	42.05	0.50	69.24	3.75	0.992	1.042	96

密度不是影响菌体沉降的主要因素。但随着发酵的进行, FBRM 监测到的菌体粒径逐渐减小, 从发酵初期 313  $\mu$ m 减少至 96  $\mu$ m, 并且在发酵中后期下降较快, 菌体的动态颗粒粒径不断下降, 表明酵母菌体絮凝能力不断降低。

从悬浮液粘度、酵母颗粒粒径、酵母和发酵液密度的测量结果可以初步推测, 酵母絮凝能力的下降导致颗粒粒径的减小, 可能是菌体沉降性能下降的主要原因。

#### 2.4 絮凝酵母颗粒粒径对沉降性能影响的研究

为了验证絮凝酵母颗粒粒径减小对沉降性能的影响, 使用扩大培养结束发酵开始之前的絮凝酵母, 以消除不同批次发酵条件的影响, 按照 1.3.1 节的实验方法制备了平均粒径依次为 93、160、211 和 280  $\mu$ m 的絮凝酵母颗粒体系, 在相同条件下, 测量了菌体的沉降时间、界面形成时的体积和表观粘度等, 结果如图 3 所示。

可见当絮凝酵母平均粒径为 93  $\mu$ m 时, 沉降时间为 1530 s, 但平均粒径增加到 280  $\mu$ m 时, 沉降时间迅速下降到 238 s, 同时沉降界面的体积由 256 mL 逐渐减小到 91 mL, 这与发酵罐中观察到的实验现象基本一致, 即粒径越大, 沉降性能越好。实验结果还显示出表观粘度随着颗粒粒径的增大逐渐增大, 由于生物量浓度相同, 不同颗粒体系表观粘度的增大, 表明菌体微观作用力即絮凝作用力的增强。进而利用 ASBC(American

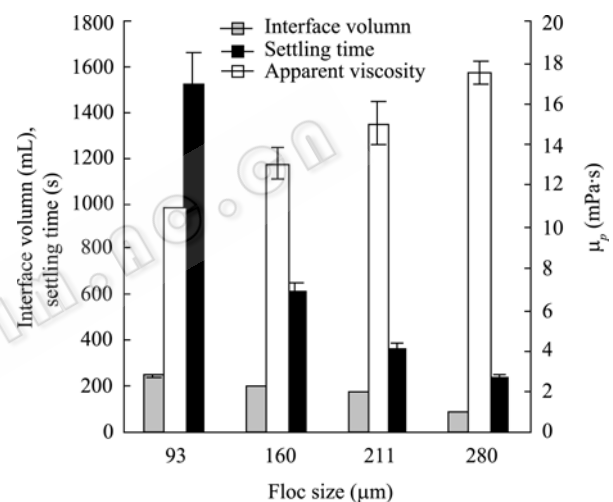


图 3 絮凝酵母粒径对沉降性能及表观粘度的影响

Fig. 3 Effects of the yeast floc size on sedimentation and interface development and the apparent viscosity of the slurry.

society of brewing chemists)酵母絮凝检测方法<sup>[15,23]</sup>, 对不同颗粒体系的絮凝值进行了测量, 结果如图 4 所示, 各颗粒体系的絮凝值均大于 80%, 且颗粒粒径越大, 絮凝值越大, 即使在沉降性能很差的体系, 如 93  $\mu$ m 体系中, 絮凝值仍较高, 即游离酵母的比例仍很少。可以推测, 重复批次发酵过程中絮凝酵母絮凝能力的衰退, 不是从絮凝退化为非絮凝, 而是酵母颗粒之间结合能力的下降, 颗粒变小而且松散。

#### 2.5 发酵过程初期、末期以及重新培养后絮凝酵母的对比

按照 1.4 节的实验方法, 利用 FBRM 考察了第 1

和第 14 批次发酵结束后絮凝酵母的粒径及沉降性能, 结果如图 5 所示。钙离子是絮凝酵母形成颗粒的必要前提, 相同生物量浓度的样品经过处理后, 在确保钙离子过量及其他相同条件下, 第 1 批次发酵结束后酵母体系平均颗粒粒径大, 沉降时间短, 界面体积小, 并且表观粘度较第 14 批次终点酵母体系大, 说明这一阶段絮凝酵母的沉降性能优越, 菌体颗粒之间作用力即絮凝能力强。

菌体絮凝能力降低导致颗粒分布向小尺度方向推移。本实验室也发现在种子罐培养过程中发生游离细胞替换絮凝细胞的现象, 其原因在于游离酵母比生长速率高于大尺度的絮凝颗粒酵母。因此开发

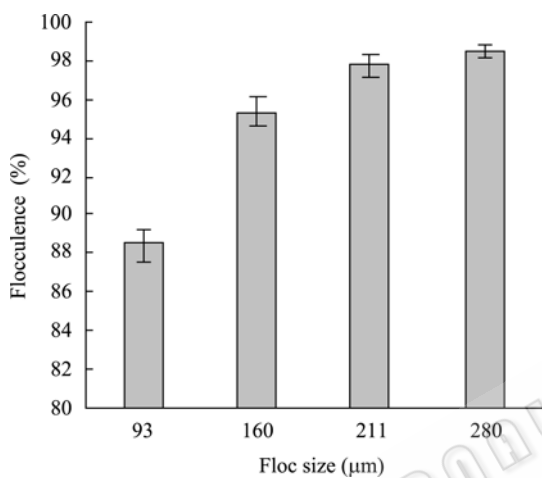


图 4 不同粒径酵母体系的絮凝值  
Fig. 4 Flocculence of the yeast flocs with different size distributions.

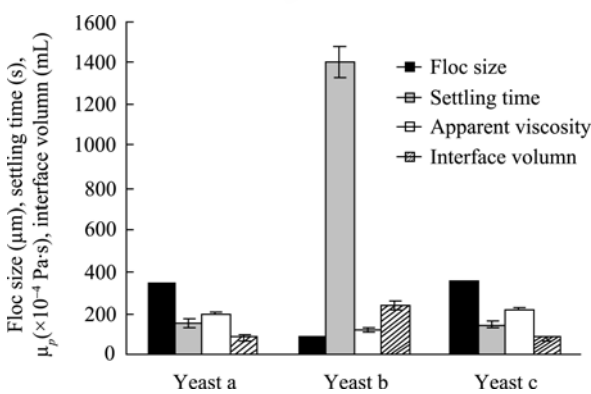


图 5 重复批次发酵过程初期、末期及重新培养的酵母絮凝及沉降性能  
Fig. 5 Sedimentation of yeast flocs and interface development and apparent viscosity of the slurry. a: yeast sampling at the end of the 1st batch; b and c: yeast sampling at the end of the 14th batch without and with re-cultivation treatment.

高浓度重复批次发酵工艺, 防止菌体絮凝能力持续衰退是解决问题的关键。

鉴于酵母絮凝能力衰退是发酵过程环境因素对酵母细胞施加的各种影响所致, 对絮凝性能衰退的菌体进行再培养, 解除其所受压力, 则有可能恢复其絮凝能力, 为此将表 2 中第 14 批次发酵后的菌体取出, 按照 1.2.1 的培养条件进行恢复性培养, 并与未进行恢复性培养的菌体比较, 发现酵母的絮凝能力和沉降性能均得以恢复, 达到了第 1 批次发酵结束时的状态, 表明刺激生长可以补偿酵母絮凝能力的衰退。然而对于重复批次发酵系统, 若每一批次发酵结束后, 都对菌体进行絮凝恢复性培养, 将增加工艺操作的复杂程度, 从工业应用的角度来看, 是不可取的。针对重复批次这样的发酵系统, 在每批发酵结束后, 可以通过采出一定量的酵母, 适当降低发酵罐中酵母细胞浓度, 进而减轻乙醇生产强度高对菌体产生的胁迫, 来刺激酵母细胞生长, 维持其絮凝性能。

### 2.6 重复批次发酵工艺的改进

针对表 1 所示发酵系统为了追求高生物量浓度而未及时采出酵母导致酵母生长缓慢, 絮凝性能持续衰退的问题, 对工艺操作方案进行改进, 在每批次发酵结束后采出部分酵母菌体, 待酵母沉降并移除上清液后加入新培养基, 继续进行下一批次发酵, 实验持续运行 24 个批次, 结果如图 6 所示。可见, 在保证终点乙醇浓度维持在 120 g/L 左右及残糖小于 1 g/L 的条件下, 每批次发酵结束后抽出 800 mL 菌体悬浮液, 经过前 5 个批次的调整后, 每批次发酵

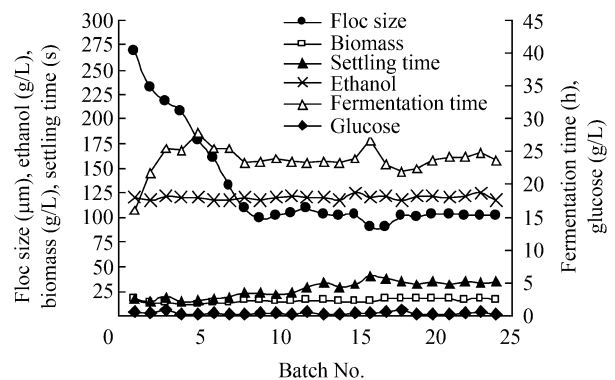


图 6 改进后的重复批次发酵实验结果  
Fig. 6 Results of the modified consecutive VHG batch fermentation system.

时间可以维持在 24 h 左右, 生产强度为 4.0 g/(L·h), 每批次发酵过程中, 酵母菌体通过自我增殖, 可维持终点生物量浓度在 16~18 g/L。酵母颗粒粒径自第一批次发酵后呈现下降趋势, 经过约 10 个批次后酵母平均粒径稳定在 100  $\mu\text{m}$  左右, 且对应沉降体积为 400 mL 的沉降时间也趋于稳定, 为 30 s 左右, 其中第 16 批次发酵时间延长及其他参数波动是意外供电故障扰动所致, 但系统很快恢复稳定。

絮凝基因的表达产物絮凝蛋白是酿酒酵母具备絮凝能力的内在条件<sup>[24]</sup>, 絮凝基因的转录水平、转录后的修饰、絮凝蛋白在细胞壁上的空间分布、细胞壁表面甘露糖残基的含量及分布, 都会影响到絮凝蛋白与其配基甘露糖残基的正确结合, 从而影响絮凝能力<sup>[25-26]</sup>。游离酿酒酵母中絮凝基因处于沉默状态<sup>[27]</sup>, 因此絮凝基因作为酵母生理代谢非必需基因, 其表达水平可能因外界环境胁迫受到抑制<sup>[15]</sup>, 这也可能是酵母对于环境压力做出的一种应答。目前在转录水平上已证实 *S. cerevisiae flo* 絮凝基因的转录水平与絮凝性能密切相关, 更深入的工作正在进行中。下一步工作应当分析乙醇浓度及发酵速率对絮凝酵母絮凝基因的转录、絮凝蛋白的修饰及转运过程的影响, 以解释发酵工艺条件与酵母生理变化尤其是絮凝性能之间更详尽的关系, 进而从理论上为絮凝酵母菌种改良及工业化应用提供指导依据。

### 3 结论

1) 利用自絮凝酵母 *S. cerevisiae flo* 进行高浓度乙醇发酵, 研究了重复批次发酵工艺的可行性, 该工艺与传统的批次发酵及连续发酵工艺相比, 具有较大技术优势。

2) 在自絮凝酵母重复批次乙醇发酵实验中, 随着发酵过程的进行, 酵母沉降性能逐渐衰退, 而且在发酵后期衰退比较严重。

3) 酵母颗粒粒径的减小是造成其沉降性能衰退的主要原因, 模拟实验也表明, 颗粒越大, 自絮凝酵母沉降越迅速, 自絮凝酵母粒径的大小反映酵母絮凝能力的强弱。

4) 絮凝性能的衰退可以通过调控发酵系统酵母细胞浓度和乙醇生产强度, 依靠菌体自我更新来

补偿, 使这一高浓度乙醇发酵系统稳定运行。

### 符号说明

- $M$  —— FBRM 测量得到的酵母细胞平均粒径,  $\mu\text{m}$ ;
- $P_f$  —— 重复批次发酵每批次发酵终点乙醇浓度, g/L;
- $q$  —— 生产强度, g/(L·h);
- $S_f$  —— 重复批次发酵每批次发酵终点残葡萄糖浓度, g/L;
- $t$  —— 发酵时间, h;
- $t_s$  —— 沉降时间, m;
- $V_s$  —— 重复批次发酵每批次发酵终点沉降体积, L;
- $X_f$  —— 重复批次发酵每批次发酵终点生物量浓度, g/L;
- $Y$  —— 乙醇得率, g/g;
- $\rho_o$  —— 发酵液沉降后上清液表观密度, g/cm<sup>3</sup>;
- $\rho_c$  —— 酵母细胞表观密度, g/cm<sup>3</sup>;
- $\mu_p$  —— 发酵液表观粘度, mPa·s;
- $\mu_o$  —— 发酵液沉降后上清液表观粘度, mPa·s。

### 下角标

- c —— 酵母细胞;
- f —— 发酵终点;
- o —— 上清液;
- p —— 酵母悬浮液;
- s —— 沉降。

### REFERENCES

- [1] Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochem*, 1996, **31**(4): 321-331.
- [2] Bai FW, Anderson WA, Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol Adv*, 2008, **26**(1): 89-105.
- [3] Devantier R, Pedersen S, Olsson L. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**(5): 622-629.
- [4] Alfenore S, Cameleyre X, Benbadis L, et al. Aeration



- strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**(5): 537–542.
- [5] O'Brien DJ, Craig Jr JC. Ethanol production in a continuous fermentation/membrane pervaporation system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **44**(6): 699–704.
- [6] Bisson, LF. Stuck and sluggish fermentations. *Am J Enol Vitic*, 1999, **50**(1): 107–119.
- [7] Thomas KC, Ingledew WM. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mash. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(7): 2046–2050.
- [8] Reddy LVA, Reddy OVS. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: role of finger millet (*Eleusine coracana* L.) flour. *Process Biochem*, 2006, **41**(3): 726–729.
- [9] Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(5): 1519–1524.
- [10] Ge XM, Zhao XQ, Bai FW. Online monitoring and characterization of flocculating yeast cell flocs during continuous ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **90**(5): 523–531.
- [11] Yu L, Ge XM, Bai FW. Rheology of self-flocculating yeast suspension of SPSC01. *Chin J Biopro Eng*, 2007, **5**(4): 37–43.  
俞路, 葛旭萌, 白风武. 自絮凝酵母 SPSC01 悬浮液 的流变行为. *生物加工过程*, 2007, **5**(4): 37–43.
- [12] Ge XM, Zhang L, Bai FW. Impacts of temperature, pH, divalent cations, sugars and ethanol on the flocculating of SPSC01. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39**(4): 783–787.
- [13] Ge XM, Bai FW. Intrinsic kinetics of continuous growth and ethanol production of a flocculating fusant yeast strain SPSC01. *J Biotechnol*, 2006, **124**(2): 363–372.
- [14] Klein J, Maia J, Vicente AA, *et al.* Relationships between hydrodynamics and rheology of flocculating yeast suspensions in a high-cell-density airlift bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89**(4): 393–399.
- [15] Govender P, Domingo JL, Bester MC, *et al.* Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(19): 6041–6052.
- [16] Lei JJ, Zhao XQ, Xue C, *et al.* Influence of floc size distribution on the ethanol tolerance of a self-flocculating yeast strain SPSC01. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(2): 309–314.  
雷娟娟, 赵心清, 薛闯, 等. 絮凝颗粒粒度分布对自絮凝酵母 SPSC01 乙醇耐受能力的影响. *生物工程学报*, 2008, **24**(2): 309–314.
- [17] Jones ST, Korus RA, Admassu W, *et al.* Ethanol fermentation in a continuous tower fermentor. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **26**(7): 742–747.
- [18] Bu'lock JD, Comberbach DM, Ghommidh C. A study of continuous ethanol production using a highly flocculent yeast in the gas lift tower fermenter. *Chem Eng J*, 1984, **29**(1): B9–B24.
- [19] Bayrock DP, Ingledew WM. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *J Ind Microbiol Biot*, 2001, **27**(2): 87–93.
- [20] Bafrncová P, Šmogrovičová D, Sláviková I, *et al.* Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 1999, **21**(4): 337–341.
- [21] Domingues L, Lima N, Teixeira JA. Contamination of a high-cell-density continuous bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **68**(5): 584–587.
- [22] Van Hamersveld EH, Van Der Lans RGJM, Luyben KCAM. Quantification of brewers' yeast flocculation in a stirred tank: effect of physical parameters on flocculation. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56**(2): 190–200.
- [23] D'Hautcourt O, Smart KA. The measurement of brewing yeast flocculation. *J Am Soc Brew Chem*, 1999, **57**(4): 123–128.
- [24] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, *et al.* Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**(3): 197–205.
- [25] Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, *et al.* Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol*, 1997, **179**(15): 4929–4936.
- [26] Iung AR, Coulon J, Kiss F, *et al.* Mitochondrial function in cell wall glycoprotein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 625 (wild type) and [rho0] mutants. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(12): 5398–5402.
- [27] Liu H, Styles CA, Fink GR. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 1996, **144**(3): 967–978.