

不同类型载气对乙醇气提发酵的影响

张君, 刘宏娟, 刘德华

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 研究了在乙醇气提发酵过程中, 分别使用空气、二氧化碳、氮气和高纯氮作为气提载气对细胞生理及乙醇发酵的影响. 结果表明, 空气能维持细胞生长和活力, 但发酵效果最差, 二氧化碳使细胞发酵能力波动不稳定且抑制副产物甘油合成; 而以浓度为 99.5%~99.8%的氮气为气提载气取得了较好的效果, 乙醇和甘油的生产速率比不气提批式发酵分别提高 2 倍和 1.9 倍. 对以高纯氮(99.999%)为气提载气的研究发现, 发酵进行到 47 h 开始出现菌种大量死亡现象, 此时适当通氧和补充生长所需营养物质, 细胞数量回升, 活性恢复, 最终乙醇生产速率比不气提时提高 1.3 倍.

关键词: 气提; 乙醇发酵; 气提因子; 细胞活性; 生产速率

中图分类号: TS264.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2005)03-0349-04

1 前言

乙醇发酵过程中乙醇浓度累积超过 50~80 g/L^[1]就会抑制酵母细胞生长, 气提法能够消除这种产物抑制现象. 气提发酵以其工艺简单而又经济、气提产物能够直接收集、且产品浓度和纯度较高等特点已成为乙醇发酵过程中在线分离产物的主要方法之一. Chang 等^[2]曾用氮气对发酵液进行气提, 以降低产物抑制, 并得出气提能延长发酵时间、提高乙醇平均生产速率的结论. 岑沛霖等^[3]就 CO₂ 循环气提乙醇并用活性炭吸附产物的方法进行了研究, 证明了 CO₂ 气提乙醇在工业中应用的可行性. Taylor 等^[4]也研究了与细胞循环回用相结合的 CO₂ 和氮气混合气气提乙醇过程, 并得到了较高的乙醇生产速率. Karl 等^[5]研究发现发酵液中溶解不同浓度的 CO₂ 会导致不同的发酵效果, Ron 等^[6]也证实不同比例的氮氧混合气、高纯氮在发酵过程中营造的微氧和厌氧环境会对酵母的发酵能力产生不同影响. 由此可推测, 气提过程所需的大流量气体在传质过程中一定会对酵母产生种种影响, 导致不同的气体类型产生不同的发酵效果, 因此气提过程中选用何种气体对于整个发酵过程至关重要. 本工作分别利用空气、二氧化碳、氮气和高纯氮作为载气进行乙醇气提发酵, 探讨了不同气提载气对细胞生理及产物合成的影响, 为乙醇气提发酵提供了有益的信息.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 编号 2.1364,

购自中国科学院微生物研究所.

2.1.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 50, (NH₄)₂SO₄ 2, KH₂PO₄ 5, 酵母浸粉 5, 无水 MgSO₄ 0.2, 无水 CaCl₂ 0.2, 自然 pH, 115 °C 下灭菌 15 min.

发酵培养基: 葡萄糖 50~250 g/L, 其余同种子培养基.

2.1.3 载气来源

空气来自空压机; 二氧化碳来自工业钢瓶, 纯度约为 99.5%; 氮气来自 Np Da-0.5 型变压吸附制氮机(北京鑫南龙科技有限公司), 纯度约 99.5%~99.8%; 高纯氮来自工业钢瓶, 纯度约 99.999%.

2.2 培养方法

种子培养用装 100 mL 培养基的 500 mL 摇瓶, 恒温摇床培养 16 h, 温度 30 °C, 转速 100 r/min. 培养结束后, 于 4 °C 以 5000 r/min 冷冻离心 10 min. 洗涤 1 次, 再以 10%(φ)接种量接入发酵培养基. 发酵培养采用 5 L GBCS-5 型搅拌式发酵罐(镇江东方生物工程设备有限公司), 温度 30 °C, 搅拌转速 150 r/min.

2.3 乙醇批式发酵

初糖浓度 130 g/L, 装液量 2 L. 起始发酵为自然 pH (4.7), 发酵过程中流加 5 mol/L 的 NaOH 控制 pH 为 3.8, 残余葡萄糖低于 1 g/L 时终止发酵.

2.4 乙醇气提连续发酵

初糖浓度 150 g/L, 初始装液量 2 L, 其余同批式发酵. 发酵至残余葡萄糖浓度为 50 g/L 时, 开始匀速流加浓度为 600 g/L 的葡萄糖溶液(流加速率由批式发酵的菌体耗糖速率估测), 使发酵液糖浓度维持在 50 g/L 左右. 当发酵液中乙醇浓度超过 50 g/L 时开始气提, 气流量

6.5 L/min(通气量计算方法见文献[7])保持不变直至发酵结束. 从气提开始时算起, 定期取出一定醪液, 使发酵液体积始终保持 2 L 左右. 气提产物用 -15°C 冷凝器回收, 尾气水洗后排空.

2.5 分析方法

2.5.1 细胞干重

先称出干燥的 1.5 mL Enppendorf 空管的质量, 取 1 mL 发酵液放于管中, 10000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 洗涤 2 次后在 80°C 烘干至恒重, 用电子天平称重. 计算得出 1 mL 发酵液中细胞的干重.

2.5.2 细胞活性

发酵液稀释 10 倍, 滴在细胞计数板上, 用亚甲基蓝溶液染色后显微镜下同时数出细胞总数和死亡细胞数.

2.5.3 葡萄糖浓度

发酵液稀释 100 倍, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液用葡萄糖分析仪(山东省科学院生物研究所)测定.

2.5.4 乙醇浓度

发酵液稀释 100 倍, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液用高效液相色谱仪(日本岛津公司出品)测定. 色谱柱为 Aminex® resin-based 柱(Bio-Red, 美国), 柱温 65°C , 流动相为 $0.005\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$, 流速 0.800 mL/min ; 检测器为 RID-10A 检测器(岛津公司).

2.5.5 乙醇生产速率

乙醇生产速率是单位时间单位发酵体积内的乙醇产量. 气提发酵的乙醇总产量由三部分组成: 发酵罐中乙醇浓度 \times 装液量、冷凝器中的乙醇浓度 \times 冷凝液体积、水洗装置中的乙醇浓度 \times 水洗液体积. 文中涉及的乙醇生产速率都是指发酵全过程的平均生产速率.

3 结果与讨论

3.1 乙醇气提发酵过程中不同载气对细胞生长的影响

图 1 是不同类型载气的乙醇气提发酵实验中细胞生物量变化曲线. 由图可知, 无论应用何种气体进行气提, 与对照的不气提批式发酵相比, 产物抑制现象均得到改善, 平均细胞生物量都高于对照.

以空气作为气提载气, 细胞生物量一直缓慢增长, 直至发酵后期不下降. 表明氧气充足的条件下, 菌体呼吸作用旺盛, 细胞活力和数量能得以长久维持.

以 CO_2 作载气, 气提时生物量有较大的波动, 先增加后降低, 维持一段时间后再次出现下降. 气提初期生物量的小幅增加可能是气提带出大量乙醇和水使发酵液短时间浓缩后测到的不稳定值, 而细胞死亡率实验测

定结果表明, 细胞的死亡率由气提初期的 7% 上升到发酵末期的 19%. 这种趋势说明 CO_2 作为载气不利于菌体生长, 这与 Karl 等^[5]的研究结果一致. Karl 等对酿酒酵母乙醇发酵的研究发现, 将 CO_2 通入发酵罐中并维持一定压力, 随着 CO_2 分压的提高, 细胞生长速率和耗糖速率均减慢, 后期发酵阶段的活性细胞数量降低, 细胞死亡率提高. Rice 等^[8]的研究也表明, CO_2 对酿酒酵母会产生抑制作用, 且抑制程度取决于 CO_2 溶解的浓度而非它的分压. 目前 CO_2 对细胞生长的抑制机理还不清楚, Karl 等^[5]提出 CO_2 对细胞的主要或全部的抑制都是针对细胞膜, 与乙醇对细胞的抑制作用相似.

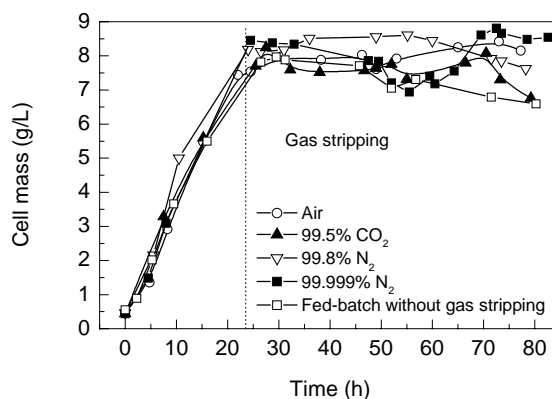


图 1 不同载气的乙醇气提发酵过程中细胞生物量变化
Fig.1 Time-course of cell mass in different types of gas

与对照相比, 以 99.5%~99.8% 的氮气作为载气, 细胞生物量并无明显变化, 仅在发酵末期略有降低. 由于 99.5% CO_2 和 99.5%~99.8% 的氮气中均含有微量 O_2 , 因此, 又进一步研究了以 99.999% 高纯氮作为气提载气对细胞生长的影响. 发酵至 24 h 时用高纯氮气提产物乙醇, 结果显示当气提至发酵进行到 47 h 时, 生物量出现明显下降的趋势, 此时细胞总数由气提前期的 $2.2 \times 10^8\text{ mL}^{-1}$ 降至 $0.9 \times 10^8\text{ mL}^{-1}$, 且死亡率由 5% 上升到 35%, 说明严格厌氧环境下细胞因缺氧而大批死亡. 此时改单纯流加糖为 2 倍速率流加培养基(组成与无糖的种子培养基相同), 且切断高纯氮气源, 改为空气气提, 前 2.5 h 流量 1.5 L/min , 然后改为 6.5 L/min 气提 5 h, 发酵进行到 60.5 h 时再切换回高纯氮气源. 观察到细胞生物量浓度已经逐渐回升, 细胞死亡率已经由 35% 下降到 11%, 发酵至 70 h 细胞死亡率降至 6%.

3.2 乙醇气提发酵过程中不同载气对乙醇合成的影响

图 2 是不同类型载气的乙醇气提发酵实验中罐内乙醇浓度的变化曲线. 由图可知, 无论应用何种气体进行气提, 与对照的不气提批式发酵相比, 发酵液中乙醇浓度均维持在 60 g/L 以下, 大量乙醇均由气体带入 -15

℃冷凝器中回收。以空气为气提载气的过程中细胞生物量提高的同时细胞也表现出较高活性，但该体系中乙醇浓度较低，发酵末期降到 40 g/L 左右。

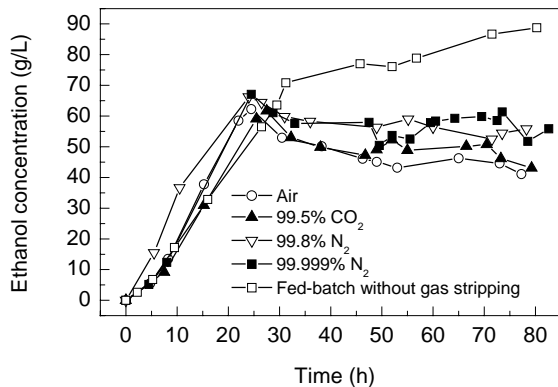


图 2 不同载气的乙醇气提发酵过程中乙醇产量的变化
Fig.2 Ethanol production in different types of gas

以 CO₂ 进行气提时，细胞生长波动较大，乙醇浓度不高，维持在 40~50 g/L 之间。实验还发现，CO₂ 对发酵液 pH 影响十分显著，如果不进行调控，pH 可降至 2.8。酵母细胞是通过“离子传输”机理维持内部 pH，此过程要消耗很大能量，但其效果也是显著的，在能量足够的情况下，CO₂ 和乙酸、丙酸等一些能透过生物膜的弱酸对细胞内部 pH 造成的扰动很小(胞外改变 4 个单位，胞内改变 1 个单位^[5])。但因过程需要大量三磷酸腺苷(ATP)，而 99.5% CO₂ 中 O₂ 的含量不到 0.5%，Ron 等^[6]的研究表明，当酿酒酵母发酵环境中氧气浓度小于 0.42%时，呼吸作用贡献的 ATP 只占发酵产生 ATP 的不到 1%，产能环节只能依靠发酵，由此可以推断 CO₂ 在一定程度上促进了酵母发酵代谢。尽管如此，CO₂ 对菌体的损害一定会影响到酵母的发酵能力，因此 CO₂ 对气提发酵的促进与抑制作用并存，在菌体生长速率快、数量多的发酵初期，促进作用占优势，乙醇合成增多；而当发酵时间延长，进入发酵末期的菌体生长变慢，数量降低，抑制作用表现得更为明显，乙醇合成也随之下降。

相比而言，以氮气作为载气细胞发酵能力稳定，乙醇浓度始终维持在 50~60 g/L 之间。Ron 等^[6]在对微氧环境乙醇发酵效果的研究中发现，当氧气在与氮气组合中所占的比例从 0.38%减少到 0.025%时，发酵产生乙醇的

速率从 0.84 g/(L·h)上升到 1.32 g/(L·h)，增加了 57%。但当氧气浓度降到 0.0058%后产率又会锐减，这与 Cysewski 等^[9]较早时得出的结论一致，也与本实验的氮气气提结果相吻合。引起这种现象的机理很复杂，Ron 等^[10]认为细胞内部积累的一定浓度的 ATP 在微氧环境下激发了葡萄糖的传输，促进了发酵，但 ATP 的持续积累又会抑制糖酵解酶系，使发酵受到抑制。在以高纯氮为气提载气时，由于细胞生物量下降，合成乙醇能力也同时下降，发酵液中乙醇浓度降低，而此时换用空气气提 7.5 h 后，随着细胞生物量的上升，细胞发酵产乙醇的能力也恢复到较高水平，且能够保持一段时间。

3.3 乙醇气提发酵过程中不同载气的发酵参数比较

表 1 列出了不同载气气提的发酵过程参数。从表可知，以不同气体作为气提载气，产物乙醇和副产物甘油的合成均呈现明显差异。相对于不气提的批式发酵，以空气为气提载气时乙醇生产速率提高 0.56 倍，甘油生产速率提高 1.92 倍；CO₂ 气提下乙醇和甘油的生产速率分别提高 1.1 和 1.2 倍，而氮气气提下则分别提高 2 和 1.9 倍。对表 1 结果进一步比较还可以看出，以空气作为载气的气提发酵大大促进了甘油的生成，甘油转化率最高，乙醇转化率较低；而 CO₂ 作为气提载气的发酵过程中，甘油的转化率和生产速率均最低，这证明甘油的合成受到 CO₂ 的严重抑制。Oura^[11]在其研究中发现，CO₂ 对提高发酵副产物甘油的产量有促进作用，他认为甘油的大量产生是校正琥珀酸形成造成的氧化还原不平衡

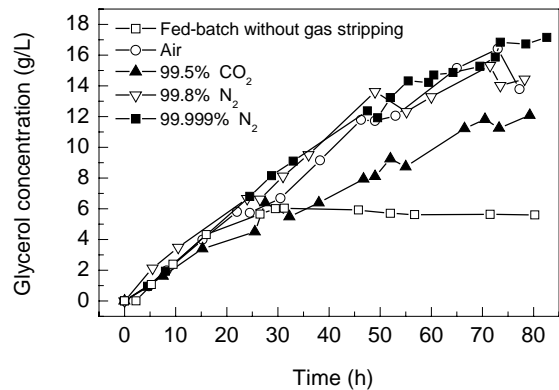


图 3 不同载气的乙醇气提发酵过程中甘油产量的变化
Fig.3 Glycerol production in different types of gas

表 1 不同类型载气的乙醇气提发酵过程参数

Table 1 Comparison of fermentation parameters among four different types of gas

Gas	Glycerol yield (g/g)	Ethanol yield (g/g)	Rate of the glycerol formation [g/(L·h)]	Rate of the ethanol formation [g/(L·h)]	Rate of the glucose consumption [g/(L·h)]
No stripping (batch)	0.028	0.467	0.060	1.00	2.14
Air (fed-batch)	0.041	0.369	0.175	1.56	4.23
99.5% CO ₂ (fed-batch)	0.022	0.457	0.132	2.09	4.57
99.8% N ₂ (fed-batch)	0.026	0.451	0.173	2.98	6.61
99.999% N ₂ (fed-batch)	0.032	0.345	0.213	2.31	6.79

所致. Karl 等^[5]对 *Oura* 的结论进行了关键性的补充和修改, 他指出高 CO_2 分压使发酵液中溶解的 CO_2 量增加, 当增加到一定的水平之后就会使发酵体系中甘油的总产量受影响而降低. 因此, 较低浓度的 CO_2 可促进细胞代谢产甘油, 而较高浓度 CO_2 会对细胞产生抑制作用, 从而导致甘油产量降低. 甘油产量变化如图 3 所示.

4 结论

通过对不同载气气提的乙醇发酵过程中细胞生长及产物合成的研究, 得到以下结论:

(1) 空气作为载气气提对乙醇生产速率的提高效果不明显, 且会降低乙醇转化率, 但有利于甘油的产生.

(2) CO_2 作为载气不利于菌体生长, 虽然能够提高乙醇的生产速率, 但促进和抑制作用并存, 当 CO_2 的溶解浓度较高时会对甘油的总产量有抑制作用.

(3) 氮气作为载气未发现对细胞有抑制作用, 并且对酵母利用糖发酵的能力有明显的促进作用, 表现为乙醇和甘油的生产速率及葡萄糖的消耗速率都很快.

(4) 高纯氮的实验证明酵母在经历长期严格厌氧发酵之后, 活性会大大下降, 死亡率上升. 若此时适当地通氧和补充生长营养, 细胞数量和活性就会回升, 并且发酵能力也会相应地回升.

因此, 普通制氮机制备的浓度 99.5%~99.8% 的氮气应是最有利于乙醇气提发酵的气体类型. 由于空气成本最低, 将空气应用于气提发酵比较适合于希望产物中甘油浓度较高的厂家. 大规模发酵法产酒精的工厂有很丰富的 CO_2 资源, 如果 CO_2 用于气提, 其成本将大大低于制氮机供应的氮气成本. 氮气气提的发酵效果最好, 但是由于成本较高很可能限制其在工业中的广泛应用. 因此采用哪种类型气体作为发酵过程中的气提载气, 工厂可以在综合考虑经济效益之后作出选择.

参考文献:

- [1] Walsh P K, Liu C P, Findley M E, et al. Ethanol Separation from Water in a Two-stage Adsorption Process [J]. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 1983, 13: 629-637.
- [2] Chang H P, Qing H G. Simultaneous Fermentation and Separation in the Ethanol and ABE Fermentation [J]. *Sep. Purif. Methods*, 1992, 21(2): 127-174.
- [3] 岑沛霖, 顾兵, 王衍平, 等. CO_2 循环、活性炭吸附酒精发酵的研究 [J]. *化学反应工程与工艺*, 1988, 4(1): 30-35.
- [4] Taylor F, Kurantz J M, Goldberg N, et al. Control of Packed Column Fouling in the Continuous Fermentation and Stripping of Ethanol [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 51: 33-39.
- [5] Karl W D, Roth M K, Schendel J F, et al. Carbon Dioxide Effects on Fuel Alcohol Fermentation: Fuels and Chemicals from Biomass [A]. Badal C S, Jonathan W. American Chemical Society Symposium Series 666 [C]. Oxford: Oxford University Press, 1997. 93-109.
- [6] Ron G, Gregory S. Physiological, Biochemical, and Mathematical Studies of Micro-aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*—I. Hysteresis, Oscillations, and Maximum Specific Ethanol Productivities in Chemostat Culture [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36: 1006-1019.
- [7] 张君, 唐昌平, 刘德华, 等. 指数流加模型在乙醇气提发酵过程中的应用研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2004, 7: 43-47.
- [8] Rice J F, Helbert J R, Garver J C. The Quantitative Influence of Agitation on Yeast Growth During Fermentation [J]. *Am. Soc. Brewing Chem. Process*, 1974, 34: 94-96.
- [9] Cysewski G R, Wilke C R. Utilization of Cellulosic Materials through Enzymatic Hydrolysis—I. Fermentation of Hydrolysate to Ethanol and Single-cell Protein [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, (18): 1297-1313.
- [10] Ron G, Gregory S. Physiological, Biochemical, and Mathematical Studies of Micro-aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*—II. Intracellular Metabolite and Enzyme Assays at Steady State Chemostat Cultures [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36: 1020-1029.
- [11] *Oura* E. Reaction Products of Yeast Fermentations [J]. *Process Biochem.*, 1977, 12: 19-36.

Effect of Different Types of Gas in Gas Stripping Ethanol Fermentation (GSEF)

ZHANG Jun, LIU Hong-juan, LIU De-hua

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The effect of air, CO_2 , N_2 and pure N_2 as stripping gas on the cell physiology and ethanol production in GSEF was studied. The experimental results indicate that different stripping gases have different effects on the cell growth as well as ethanol and glycerol production in GSEF. Aeration stimulated cell growth and glycerol production, and maintained cell count and viability, but decreased ethanol productivity. CO_2 appeared to be inhibitory to yeast growth and decreased overall glycerol production. 99.5%~99.8% N_2 was verified to be the best type of gas in GSEF, for ethanol and glycerol productivity increased respectively by 2 and 1.9 times than that of the control (fed-batch fermentation without gas stripping). Furthermore, study on pure N_2 (99.999%) employed in GSEF showed that the rate of cell growth decreased greatly after 47 h of the fermentation. However, the cell count, viability and ethanol productivity could recover original levels when changing the stripping gas from N_2 to air, and the data obtained proved that the final ethanol productivity increased by 1.3 times than the control.

Key words: gas stripping; ethanol fermentation; stripping factor; cell viability; productivity