

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03807001.4

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100434509C

[22] 申请日 2003.3.19 [21] 申请号 03807001.4
[30] 优先权

[32] 2002.3.26 [33] JP [31] 87215/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/003332 2003.3.19

[87] 国际公布 WO2003/080814 日 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.24

[73] 专利权人 有限会社新世纪发酵研究所

地址 日本福冈县

共同专利权人 三和酒类株式会社

株式会社大麦发酵研究所

[72] 发明人 石崎文彬 大森俊郎 古田吉史
梅本泰史

[56] 参考文献

JP7-177876A 1995.7.18

US5981260A 1999.11.9

JP58-98085A 1983.6.10

JP53-75033 1978.7.4

审查员 安玉苹

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称

厌氧菌的连续培养法

[57] 摘要

在使用厌氧菌的连续生产有机酸或乙醇的连续发酵系统中，为了将培养液的 pH 控制在一定，通过以添加的碱累计消耗摩尔数为基准进行底物的加料，将培养液中的残糖浓度控制在一定。

1. 厌氧菌的连续培养法,其特征在于是在控制培养厌氧菌,控制发酵罐的菌浓度为一定的培养法,底物与碱交替地加料时,通过以单位时间碱消耗量作为基准进行底物的加料控制培养液的残糖浓度。

2. 根据权利要求1的厌氧菌的连续培养法,其特征在于通过与用于控制培养液 pH 而添加的碱累计消耗摩尔数成比例的摩尔数的底物的加料,使残糖浓度保持一定。

3. 权利要求1或2的厌氧菌连续培养法,其特征在于相应于菌体浓度的增加通过稀释碱的浓度提高循环培养液的稀释效果,从而维持菌的比活性,维持高的生产率。

4. 权利要求1或2所述的厌氧菌的连续培养法,其特征在于,采用通过控制浊度来维持一定菌体浓度的培养系。

5. 权利要求4所述的厌氧菌的连续培养法,其特征在于,在使用含有葡萄糖的培养基的连续培养法中,在设定的 pH 的下限值,通过碱的加料进行 pH 调节,底物的添加速度 F_2 与葡萄糖的必要量 G_Q 和碱的加料速度 F_1 的关系用下式表示:

$$F_2 = \frac{G_Q}{1,000 \times S} \quad \text{l/h}$$

上式中, S 表示加料培养基液的糖浓度

$$G_Q = \frac{f F_1 \times 90}{0.95} + C \quad \text{g/l h}$$

上式中, f 表示 1N-NaOH 的当量因子, C 表示残糖误差校正值。

6. 权利要求5所述的厌氧菌的连续培养法,其特征在于,在设定的 pH 的上限值下进行底物的加料,并在设定的 pH 的下限值下进行碱的加

料，葡萄糖的必要量 G_Q 用下式计算：

$$G_Q = \frac{f F_1 f_H \times 180}{0.95} + C \text{ g/l h}$$

上式中， f_H 为加入葡萄糖 1 摩尔所需 1N-NaOH 量的倒数。

7. 权利要求 5 所述的连续培养法，生产乳酸或乙醇。

8. 权利要求 6 所述的连续培养法，生产乳酸或乙醇。

9. 权利要求 3 所述的厌氧菌的连续培养法，其特征在于，采用通过控制浊度来维持一定菌体浓度的培养系。

10. 权利要求 9 所述的厌氧菌的连续培养法，其特征在于，在使用含有葡萄糖的培养基的连续培养法中，在设定的 pH 的下限值，通过碱的加料进行 pH 调节，底物的添加速度 F_2 与葡萄糖的必要量 G_Q 和碱的加料速度 F_1 的关系用下式表示：

$$F_2 = \frac{G_Q}{1,000 \times S} \text{ l/h}$$

上式中， S 表示加料培养基液的糖浓度

$$G_Q = \frac{f F_1 \times 90}{0.95} + C \text{ g/l h}$$

上式中， f 表示 1N-NaOH 的当量因子， C 表示残糖误差校正值。

11. 权利要求 10 所述的厌氧菌的连续培养法，其特征在于，在设定的 pH 的上限值下进行底物的加料，并在设定的 pH 的下限值下进行碱的加料，葡萄糖的必要量 G_Q 用下式计算：

$$G_Q = \frac{f F_1 f_H \times 180}{0.95} + C \text{ g/l h}$$

上式中, f_H 为加入葡萄糖 1 摩尔所需 1N-NaOH 量的倒数。

12. 权利要求 10 所述的连续培养法,生产乳酸或乙醇。

13. 权利要求 11 所述的连续培养法,生产乳酸或乙醇。

厌氧菌的连续培养法

技术领域

本发明涉及厌氧菌的连续培养法。

背景技术

厌氧菌中存在大量丙酮丁醇细菌、乳酸菌和乙醇产生菌等的工业产业上有用细菌，但是对于使用这些厌氧菌的可以实际应用的效率高的工业工艺完全还不清楚。例如丙酮丁醇发酵为近代发酵工业的鼻祖，到上次世界大战前在世界各国曾积极地进行实施，但是随着石油化学的崛起该工业正在完全地消失之中。此外，虽然乳酸菌是乳制品加工或发酵乳的制备、酿造、酱菜的制造等领域广泛被使用的有用细菌，但作为有机酸工业中的乳酸发酵技术来说，与通过好氧菌的近代发酵工业的谷氨酸发酵中具有代表的氨基酸-核酸发酵比较，基本上还处于未起步的状态。因此，虽然已知通过厌氧菌的乙醇生产比经酵母的生产率要高，但是虽探讨了通过固定化方法的连续发酵法，但至今为止能够用于实际应用的工艺的开发还未成功。然而，由于担心近来石油资源的枯竭，要求摆脱对于石油燃料的依赖、应付降低二氧化碳以及塑料垃圾问题等，作为针对严重的全球化问题的技术来说，人们对于厌氧菌的应用的期待迅速地变得越来越高。特别是，作为生物降解性塑料、有望扩大市场聚乳酸，其作为原料提供方法的作为有机酸工业的乳酸发酵、或者作为安全的柴油添加剂、需求正在扩大的乙醇发酵的生产率的提高已经成为当务之急的技术开发课题。但是，使用乳杆菌属或乳球菌属的乳酸发酵或使用发酵单胞菌属的乙醇发酵的实际现状是还未确立工业化可能的连续发酵技术。历来，关于这些厌氧菌的连续发酵，已有不少学术论文的报道，但这些学术论文都是以单纯的恒化培养（ケモスタット）为基本的内容，虽然瞬间性的生产率并不一定低，但是由于没有建立其系统控制法，不

能够维持长时间的发酵速度的稳定, 由于不能稳定其发酵速度, 底物的消耗速度也就不稳定, 其结果就是不能控制发酵罐内的底物浓度(残糖浓度), 这样离开实用性也就很远。

众所周知, 工业用的连续发酵系统是必须能够长时间维持恒定的状态。也就是说, 必须是底物的消耗速度保持一定, 而且流出液(回收产物为目的)中的底物浓度保持在极其低下的一定的水平, 原料损失降为最小。由于该原因, 好氧菌的连续培养法被称为 DO-stat, 是非常优良的方法。

该方法中, 一旦底物浓度达到低的极限值时, 其结果是代谢活性也下降、氧消耗速度降低, 而氧的接种量下降使所溶解存在的氧浓度(DO)上升。这时判断为底物用尽的信号, 对底物进行追加补料, 就可以继续恢复进行发酵。

然而, 厌氧菌的情况下, 由于本来就并不消耗氧, 从原理上讲就不能够采用该方法。而且, 在好氧菌的连续培养法中, 也有不用 DO, 而用 pH 的上升作为底物用尽的信号(pH-auxostat)。厌氧菌中, 并不局限于酸的生成, 也有产生乙醇、随着代谢的进行 pH 降低的情况, 所以可以考虑将 pH 的反转上升看作是底物用尽的信号, 以此作为底物加料的时机。但是, 实际上以该方法进行底物加料是不可能的。因为厌氧菌当 pH 反转上升时菌体立即失活, 发酵速度不可逆地下降, 使之不可回复。即, 如图 1 所示, 厌氧菌的培养中 pH 接近下限时(A), 残糖浓度接近临界值(critical value), 如果在达到临界值的时刻立即加料糖液(B), 发酵就可以继续进行。而如图 2 所示, 在 pH 达到临界值也不进行糖液的加料的任其放置的情况下, 菌体就失活, 发酵速度下降, 发酵不能够继续进行。这是厌氧菌所共有的, 而与好氧菌不同的特征。因此, 还并没有发现实施厌氧菌连续培养的适合的底物加料方法。

厌氧菌的另一个特征是, 产生发明人以“不育细胞(sterile cell)”定义的失去增殖能力的细胞。因此, 随厌氧菌的增殖菌浓度达到极限, 分批培养中菌的浓度停留在很低的水平。为提高发酵速度, 虽可以采用可以有效增加菌体浓度的经细胞再循环法(cell recycling)浓缩培养液, 但随

着细胞浓度的上升，产物的浓度也上升，最终产物的抑制变得强烈。由于这样的原因，经细胞再循环法进行的菌体浓缩培养法由于最终产物抑制引起的菌体活性下降，使发酵变得不稳定，导致明显的生产率下降。

在此，本发明课题就是为解决上述问题，在使用乳酸菌生产高纯度的 L-乳酸的有机酸生产工艺或使用厌氧菌生产燃料用乙醇等，提供必须高经济效率运作才能成立的厌氧菌连续发酵工艺的实用化中不可缺少的新的控制方法：残糖控制的方法、减少最终产物的抑制以及维持菌活性的新的方法。

发明内容

本发明为解决上述课题，提供了，第 1，厌氧菌的连续培养法，在培养厌氧菌，控制发酵罐的菌体浓度为一定的培养法中，其特征在于底物与碱交替加料时，通过以单位时间的碱消耗量作为基准进行底物加料，控制培养液的残糖浓度。

第 2，加料与用于控制培养液的 pH 为一定值而添加的碱累计消耗摩尔数成比例的摩尔数的底物，使残糖浓度保持一定为特征的连续培养法。

第 3，以降低碱浓度提高循环培养液的稀释效果，维持菌的比活性，从而维持高生产率为特征的连续培养法。

如上所述的本发明中，发明人进行了如下的探讨。

首先为了控制残糖水平为一定，历来是认为直接检测培养液中底物水平低下从而进行反馈控制，但由于在作为对象的培养中找不到可以用于该目的的信号，从为了调节 pH 的碱加料量的累计值求得底物消耗量，从该值求得需要追加底物的量，这样只要在培养液中加入所规定量的底物，结果发现可以保持残糖浓度为一定。并且，实现该方法中，为得到高的生产率，菌的高密度培养被认为是必要的。在这样的条件下，发现了强的最终产物的抑制作用，结果引起菌体的失活，菌的活性（单位重量菌体的代谢活性 = 比速度）不能维持一定，其结果用上述方法的进行残糖控制就相当困难，但通过浊度控制来保持菌体浓度为一定的培养系中，如相应于菌体浓度的增加通过稀释中和剂碱的浓度来加大稀释效果，

由于降低了产物的浓度减弱了抑制作用，其结果可以维持稳定的菌比活性，从而发现了通过上述方法可以进行的残糖控制。

本发明是根据以上认识所完成的发明。

根据本发明，通过控制残糖浓度在低的水平可以将原料的损失降低在最低限，使厌氧菌的连续发酵工艺成为可能，而且，由于可以抑制残糖浓度在低的水平，可以极大地提高最终产品的乳酸等的纯度。

附图的简单说明

图 1，显示厌氧菌培养中，pH 接近下限时（A）残糖浓度接近临界值（critical value），达到临界值的时候立即加料糖液的情况下（B）发酵可以继续进行的模式图。

图 2，显示当达到临界值时未进行加料糖液而任其放置情况下，菌体失活，发酵不能够继续进行的模式图。

图 3，显示用于本发明的装置构成的概要构成图。

发明的具体实施方式

如上所述，在本发明中，培养厌氧菌，控制发酵罐的菌浓度为一定的培养系统中，底物与碱交替地连续加料时，以单位时间的碱消耗量为基准，例如通过加料与以该消耗量乘以一定系数的摩尔数相等的底物克数量，进行培养液的残糖浓度的控制。从而，可以控制经连续发酵的底物损失在最小限度，降低生产成本的同时，可以提高产品的质量。

本发明在上述培养系统中，由于当提高循环培养液的培养液菌浓度时，也增加了产物的浓度，这样会由产物抑制引起菌的活性下降。但是用降低碱浓度提高稀释效果，可以维持菌的比活性从而维持高的生产率。从这一点可以看出，保持稳定的菌的比活性，使本发明的厌氧菌的连续培养成为可能。

以下，关于本发明的实施方案用附图进行说明。

图 3 显示了实施本发明的适合的培养系统的流程示意图 SFD (Schematic Flow Diagram)。图中 A 为发酵罐，B 为菌体浓缩用的交叉流

过滤器, C 为 pH 测定控制器, D 为碱添加量的累计器, E 为激光浊度测定控制器, P_1 、 P_2 、 P_3 为蠕动移液泵。 F_1 为用于控制 pH 的碱加料速度, F_2 为从碱添加量算出的底物加料速度, F_3 为用于控制浊度而添加的不含糖的营养成分培养基的加料速度, F_4 为与 F_1 等量的培养滤液抽出速度(通过 C 进行的反馈控制), F_5 为与 F_2 等量的培养滤液抽出速度(通过 D 进行的反馈控制) F_6 为与 F_3 等量的培养液抽出速度(通过 E 进行的反馈控制)。另外, 速度均为 ml/min。该控制系统为了保持发酵罐 A 内的液量 V 为一定, $F_1=F_4$, $F_2=F_5$, 而且, 为了保持 V 为一定量的发酵罐 A 内的菌体浓度一定, 必须满足 $F_3=F_6$ 的条件。该系统中, 流入量的总量为 $F_1+F_2+F_3$, 流出量为 $F_4+F_5+F_6$, 由于具有 $F_1+F_2+F_3 = F_4+F_5+F_6$ 的关系, 当发酵罐流量为 V 时, 连续发酵的稀释率表示为以下方程式 (1)

$$D(\text{总稀释率}) = \frac{(F_1+F_2+F_3)}{V} = \frac{(F_4+F_5+F_6)}{V} \quad (1)$$

另外, 由于发酵罐内的菌增殖量 μXV 与抽出的量 XF_6 必须相等, 所以菌的比增殖速度符合这样的关系 $XF_6 = \mu XV$, 成为以下方程式 (2)

$$\mu = \frac{F_6}{V} \quad (2)$$

这一关系不遵循增殖速度 μ 与稀释率 D 相同状态下建立恒定的状态的以往的连续发酵原则 $\mu = D$, 是一种全新的连续发酵方法。上述方程式中, 底物的加料速度以 F_1 的函数而给出。如 F_1 为低当量(规定度)时其数值增大, D 值就变大, 从而获得稀释效果。用这种方法, 可以降低最终产物的抑制, 维持高的菌比活性的同时能将残糖浓度控制在一定。

以下显示实施例进行进一步具体说明。当然本发明并不局限于以下这些实施例。

实施例

(实施例 1)

使用发明人独立分离的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 10-1 (JCM7638)。使用于 -85°C 冷冻保存的菌于 TGC 培养基 (Difco) 上静止培养的菌作为种菌, 将其接种在由葡萄糖 3%、酵母提取物 0.5%、胨 0.5%、NaCl 1% 构成的 100 ml 分注于锥形瓶并经 120°C 高压灭菌 5 分钟的培养基中, 取接种 8 小时的培养物作为菌种(seed)。用于乳酸发酵的培养装置系统构成与图 3 显示的一样。主发酵培养基为葡萄糖 5%、酵母提取物 0.5%、胨 0.5%、NaCl 1%, 灭菌条件与上面相同。主发酵罐为全容量 1 升的玻璃罐, 内部设置有磁性搅拌子的搅拌器, 以大约为 400rpm 的转数进行缓慢地搅拌。整个罐浸入水浴中, 循环 37°C 的温水控制培养温度在 37°C 。罐中装有 pH 测定用的复合玻璃电极, 用 pH 计 (pH meter) (东亚电波制造) 进行测定, 在 pH6.0(下限)加碱(1N-NaOH)、进行 pH 控制。用葡萄糖分析器适当时候测定培养基中的残糖浓度, 当残糖浓度为 3 g/l 的时候, 与碱加料速度成比例求得的葡萄糖加料速度进行培养基的添加, 开始连续发酵。关于此时的碱加料速度与葡萄糖的加料速度关系, 可以如下考虑。

即, 葡萄糖的必要量(G_Q)用下式 (3) 表示

$$G_Q = \frac{f F_1 \times 90}{0.95} + C \text{ g/l h} \quad (3)$$

(应予说明, f 是 1N-NaOH 的当量因子, C 为残糖误差校正值)

也就是说相对于 1N 的碱的加料速度 F_1 的乳酸克数 (乳酸的分子量为 90) 为必要的葡萄糖的量 (克数), 而且加料的葡萄糖的 5% 是用于 F_2 的再生, 所以有必要除以 0.95。另外, 由于实际上的控制多少产生控制偏差, 增加其的修正值 C 进行校正。

因此, 使用糖浓度 S g/l 的加料液, 提供由方程式 (3) 得到的糖量, 培养基的添加速度由下式 (4) 表示

$$F_2 = \frac{G_0}{1,000 \times S} \quad \text{l/h} \quad (4)$$

(其中, S 为培养基(加料液)糖浓度)

培养基加料槽中送入与主发酵同样组成的培养基,一边加料由该计算求得的量一边进行连续培养。当进行连续培养时,从罐中抽出培养液,使用交叉流型超滤膜(MICROZAPSP 103 旭化成)进行培养液循环,从进行了微生物浓缩的过滤膜的外侧抽出除菌液,取出作为产品的乳酸液。另外,罐中设置工艺在线(Process online)的浊度仪的探针,其输出输入 DDC 控制器(DDC controller)(Model LA-300 ASR),进行罐中的浊度的控制,也编入进行菌浓度管理的系统。作为浊度控制系统,抽出培养液(含菌液),以无糖培养基(由酵母提取物 0.5%、胨 0.5%、NaCl 1%组成的培养基)作为稀释水进行加料。经蠕动移液泵进行同样的调节。这样,连续培养提供了 3 种液体(F_1 、 F_2 、 F_3),并抽取 2 种液体(F_4 、 F_5 和 F_6),也即相对于为了控制 pH 以碱液(1N-NaOH)添加量的累计值进行了相应的底物糖的加料。

开始批次培养发酵约 12 小时后,残糖的水平达到约 3 g/l 时,开始进行连续加料以及菌的再循环,随着菌的浓度的增加,底物加料的速度也慢慢地增加,达到菌体浓度为 10.5 g/l(以 DCW 计)。此时,由于比糖浓度的目标值 2 g/l 高,为 4.5 g/l,通过上述的由残糖误差校正值 C 进行残糖水平的修正,约 3 小时可以将残糖控制在 2 ± 0.5 g/l。此后以 0.7 l/h 的总稀释率进行 10 日约 250h 的连续运转,可以稳定地维持残糖水平,L-乳酸浓度为平均 45g/l。因此,该系统的生产率为 31.5g/l h。

当将该乳酸浓缩为 90 % L-乳酸液时,混有的糖相对于乳酸在 5 % 以下,作为聚乳酸原料具有充分的质量。

(实施例 2)

使用发明人独立分离的乳酸乳球菌(Lactococcus lactis) I0-1 (JCM7638)。使用于 -85°C 冷冻保存的菌于 TGC 培养基(Difco)上静止培养的菌作为种菌,将其接种在由葡萄糖 3 %、酵母提取物 0.5%、胨 0.5%、

NaCl 1% 组成的 100 ml 分注于锥形瓶并经 120℃ 高压灭菌 5 分钟的培养基中, 取培养了 8 小时的培养物作为菌种(seed)。所用的培养装置的系统构成与实施例 1 中所示的相同。主发酵罐为全容量 1 升的玻璃罐, 内部设置有磁性搅拌子的搅拌器, 以大约为 400rpm 的转数缓慢地进行搅拌。整个罐浸入水浴中, 37℃ 的温水循环控制培养温度在 37℃。罐中装有 pH 测定用的复合玻璃电极, 用 pH 计(东亚电波制造)进行测定, 在 pH6.0 (下限) 加料碱 (1N-NaOH), 进行 pH 控制。主发酵用培养基使用的是玉米淀粉酶糖化液 (使用酶 NOVO Thermamyl 120L、Dextrozyme 225/75L) 经稀释调整为葡萄糖 5%, 其中添加入玉米浆(CSL)1%, 调节 pH 后 120℃ 5 分钟灭菌。用葡萄糖分析仪适当时候测定培养基中的残糖浓度, 当残糖浓度达到 1.5 g/l 的时候, 用与碱加料速度成比例求得的葡萄糖加料速度进行培养基的添加, 开始连续发酵。此时, 碱加料速度与葡萄糖加料速度的关系通过实施例 1 中所用的方程式计算而得。

经过该计算, 从计算机向培养基加料槽发出指令, 一边进行糖加料, 一边移入连续培养。当实施连续培养时, 从罐中抽出培养液, 使用交叉流型超滤膜 (MICROZAPSP 103 旭化成) 进行培养液再循环, 从进行微生物浓缩的过滤膜的外侧抽出除菌的液体, 取出作为产品的乳酸液。另外, 罐中设置有工艺在线的浊度仪探针, 其输出输入 DDC 控制器(Model LA-300 ASR), 进行罐中的浊度的控制, 也编入进行菌浓度管理的系统。作为浊度控制系统, 抽出培养液 (含菌液), 将无糖培养基 (CSL1% 溶解于水中, 并进行灭菌者) 作为稀释水进行加料。经蠕动移液泵进行同样的调节。这样, 连续培养提供了 3 种液体 (F_1 、 F_2 、 F_3), 并抽取出 2 种液体 (F_4 、 F_5 和 F_6), 也即为控制 pH 相对于碱液 (0.5N-NaOH) 添加量的累计值进行了相应的底物糖的加料。

开始批次培养约 18 小时后, 残糖的水平达到约 1.5 g/l 时, 开始进行连续加料以及菌的再循环, 随着菌的浓度的增加底物加料的速度也慢慢地增加, 达到菌体浓度为 12.3 g/l (以 DCW 计算)。此时, 由于比糖浓度的目标值 1.5 g/l 低, 为 1.0 g/l, 通过校正系数 C 进行残糖水平的修正, 约 1 小时可以将残糖控制在 1.5 ± 0.2 g/l。此后以 1.0 l/h 的总稀释率进行 3

周约 525h 的连续运转,可以稳定地维持残糖水平, L-乳酸浓度平均值为 40.5g/l。因此,该系统的生产率为 40.5g/l h。

当将该乳酸浓缩为 90 % L-乳酸液时,混有的糖相对于乳酸在 5 % 以下,作为聚乳酸原料具有良好的质量。

(实施例 3)

使用菌为运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) NRRLB-14023。使用于 -85℃ 冷冻保存的菌接种于 YM 培养基上静止培养所得的菌作为种菌,将其接种在由葡萄糖 100g、酵母提取物 10g、KH₂PO₄ 1g、(NH₄)₂SO₄ 1g、Mg(SO₄)·7H₂O 0.5g 溶于 1l 去离子水中, 100 ml 分注于锥形瓶并经 120℃ 高压灭菌 5 分钟的培养基中,取培养了约 8 小时的培养物作为菌种 (seed)。乙醇连续发酵用的培养装置的系统构成与图 3 所示的一样。即,主发酵罐为全容量 1 升的玻璃罐,内部设置有磁性搅拌子的搅拌器,以大约为 400rpm 的转数缓慢地进行搅拌。整个罐浸入水浴中, 37℃ 的温水循环控制培养温度。罐中装有 pH 测定用的复合玻璃电极,用 pH 计(东亚电波制造)进行测定,进行下限的 2 点控制。当进入连续运转时,在 pH 上限进行底物加料,在 pH 下限 (5.5) 进行碱 (0.5N-NaOH) 加料。另外,罐中设置有工艺在线的浊度仪探针,其输出接入 DDC 控制器 (Model LA-300 ASR),建立进行罐中浊度控制的系统。从罐中抽取出培养液,使用交叉流型超滤膜 (MICROZAPSP 103 旭化成) 进行培养液循环,进行菌浓缩的同时从过滤膜的外侧抽出除菌液,取出含乙醇液。另外,作为浊度控制系统,加料灭菌的无糖培养基,抽出培养液 (含菌液)。此时,水的提供以及培养液的抽出由蠕动移液泵同一步调进行。连续培养与实施例 1 一样,进行 3 种液体的提供和 2 种液体的抽出。也即在 pH 下限时为控制 pH 添加碱液 (0.5N-NaOH),取代实施例 1 所显示的计算式,用如下式 (5)

$$G_Q = \frac{f F_1 f_H \times 180}{0.95} + C \text{ g/l h} \quad (5)$$

(其中, f_H 为加入葡萄糖 1 摩尔所需要 1N-NaOH 量的倒数)计算得到的糖加料速度进行培养基加料。乙醇发酵与乳酸发酵不同, 从葡萄糖生成乙醇时产生 CO_2 , 其产率达不到 100%, 通常为 50%。

这里, 从葡萄糖到乙醇的换算率以 f_H 表示, 根据与式 (1) 同样的考虑, 建立式 (5)。

往罐中提供加料液和碱液时, 通过蠕动移液泵等量的除菌液从超滤膜外侧抽出, 保持罐的液量一定。另外为了控制浊度, 如上所述抽出培养液, 这也是为使罐的液量保持在一定, 使用蠕动移液泵供给无糖培养基。主发酵与菌种同样的组成, 即, 葡萄糖 10%、酵母提取物 1%、 KH_2PO_4 0.1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g 的培养基 400ml 中接入菌种 20ml 开始发酵, 一边加料碱一边维持 pH 为 5.5。

开始分批培养约 8 小时后, 培养基中残糖浓度接近 1.0 g/l 时, 开始进行连续底物加料以及菌的再循环, 随着菌的浓度的增加底物加料速度也慢慢地增加, 菌体浓度达到 7.5 g/l (以 DCW 计算)。此时, 由于比残糖浓度的目标值 1.0 g/l 高, 为 1.5 g/l, 进行由校正值 C 进行残糖水平的修正, 约 2 小时可以将残糖控制在 1.0 ± 0.3 g/l。此后以 0.5 l/h 的总稀释率进行 7 日约 150h 的连续运转, 可以稳定地维持残糖水平, 在此期间乙醇的浓度为 52g/l。因此, 该系统的乙醇生产率为 26g/l h。

工业实用性

本发明中, 不固定菌体, 以活菌体状态下维持微生物的代谢活性, 将丧失活性的菌体洗脱掉的同时, 使新的菌体再生。如此运转建立了发酵系统中仅由具有一定代谢活性菌体构成的生物反应器。这样的反应器中, 由于通过浊度的控制维持微生物浓度为一定, 发酵速度就可以成为一定, 底物连续地加料, 形成以与该速度相对应的速度抽取出产物的连续发酵系统。在这个时候, 其稀释率由含碱液的加料液的容积所决定, 所以如果降低碱浓度, 稀释率就变大, 从而可以降低最终产物的抑制。因此, 如果提高菌的浓度使得最终产物浓度提高, 而降低碱浓度, 稀释率就提高可以降低最终产物的抑制, 并可以维持高的生产速度。如此的

生物反应器是至今为止完全未知的生物反应器。由于这样的反应器其反应速度为石油化学的连续反应中接近的反应速度，与以往的批次发酵相比，可以获得其数十倍的装置所产生的生产率。

图1

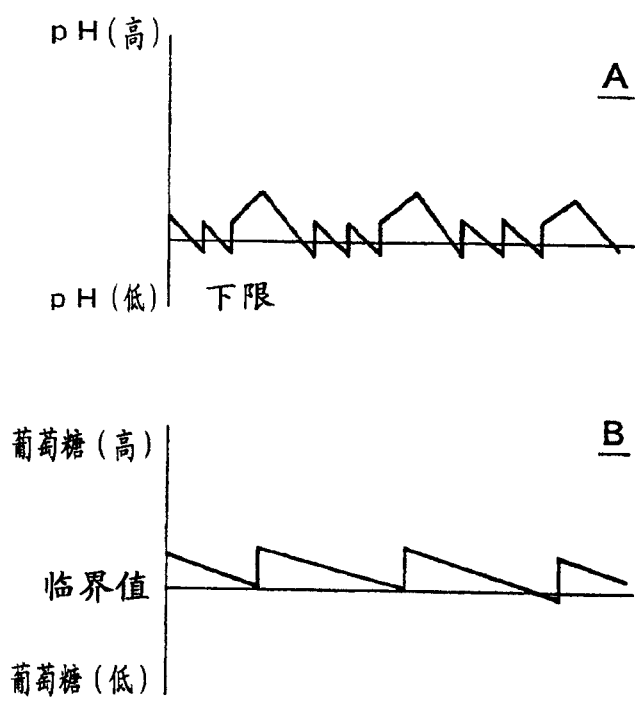


图 2

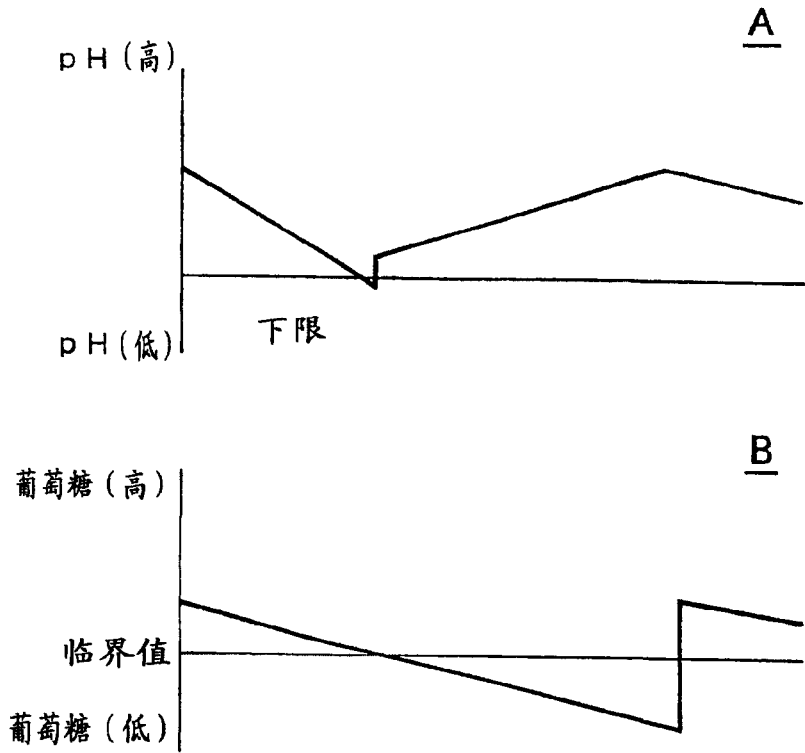


图 3

