

絮凝酵母 SPSC01 连续培养最适生长条件的研究

王江龙 孜力汗* 白凤武

(大连理工大学生物科学与工程系 大连 116023)

摘 要 采用均匀设计实验法对气升式内环流生物反应器中絮凝酵母 SPSC01 的高密度培养条件进行了研究,确定了各因素与目标函数之间的关系,并通过综合调优,获得该菌株的最佳培养条件:温度 30℃,通气量 0.714vvm,培养基组成为:双酶法制备的玉米糖化液,糖浓度为 220g/L,添加 4 mL/L 玉米浆和 3g/L (NH₄)₂HPO₄,稀释速率控制为 0.02h⁻¹。在上述条件下进行絮凝酵母的连续培养,培养液中的酵母细胞密度达到了 20g(d.w)/L 以上。

关键词 均匀设计,絮凝酵母,回归分析

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)01-0093-03

自絮凝酵母 SPSC01 是发酵生产酒精的良好菌株。该菌株在培养过程中可以自絮凝形成毫米级大小的颗粒,在发酵罐中实现自固定化,显著提高了发酵罐中的酵母细胞密度,缩短了平均发酵时间^[1~3]。提高发酵终点酒精浓度和发酵温度并尽可能多地回收酵母是工业化生产追求的目标,因为发酵液中的高酒精浓度可显著降低精馏操作的能耗和废糟液产生的总量,提高发酵温度可降低发酵罐运行过程中的冷却费用,回收酵母进一步加工成高附加值的产品,可以提高酒精生产过程的综合经济效益。目前工业化生产中发酵终点的酒精浓度可达到 12%(V/V)左右,发酵温度控制在 32℃~34℃。这样的环境条件显然不利于酵母细胞的生长,进而影响酒精发酵的正常进行。因此,设计专门的絮凝酵母种子培养罐,定量向发酵系统补充新鲜酵母是十分必要的。

均匀设计法是我国数理统计学家方开泰、数学家王元将数论与多元统计相结合而建立起来的一种实验方法^[5],对于多因素多水平试验条件的选择,可以大大减少试验次数,提高效率。本研究运用此实验方法对气升式内环流悬浮床生物反应器中絮凝酵母的培养条件进行优化,其结果可供工业化装置设计和操作时参考。

1 材料和方法

1.1 原料和试剂

脱皮脱胚玉米粉购自铁岭市玉米综合加工厂;

玉米浆购自安徽丰原生物化学股份有限公司; α -淀粉酶和糖化酶为 Novozymes 公司提供(20000U/mL 和 100000U/mL)。

1.2 菌株

融合株 SPSC01,系具有自絮凝能力的栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株和酒精发酵性能优良的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)变异株的融合株。

1.3 培养基

前期生长培养基:每升含酵母粉 3.85g,蛋白胨 3g,葡萄糖 30g,pH4.5,在 0.1MPa 压力下灭菌 30min。斜面培养基:前期生产培养基中加 40%琼脂。流加培养用培养基:双酶法制备的玉米糖化液,添加适量无机盐,在 0.025MPa 压力下灭菌 30min。

1.4 培养方法

1.4.1 摇瓶培养 将菌种接入装有 100mL 生长培养基的 250mL 锥形瓶中,在 30℃,转速 150r/min 条件下进行摇瓶培养。培养 24h 后静置,使酵母颗粒沉降,倾去上清液,换入新鲜培养基,并分瓶扩大培养,直至发酵罐接种需要的种子量。

1.4.2 发酵罐接种及培养 将摇瓶种子和生长培养基接入自行设计的发酵罐中,在通风条件下进行培养,发酵罐有效容积 1400mL。监测发酵罐中残糖浓度变化,至残糖约 1g/L 时开始进行连续培养,控制稀释率为 0.02 h⁻¹。

本试验装置的流程如图 1 所示。

基金项目:安徽丰原生物化学股份有限公司与大连理工大学合作资助项目。

* 通讯作者。Tel 86-411-4706308;Fax 86-411-4706329;E-mail:zilihan@163.com

作者简介:王江龙(1973-)男,辽宁鞍山人,硕士研究生。E-mail:hwangjl73@163.net

收稿日期:2003-02-20,修回日期:2003-08-21

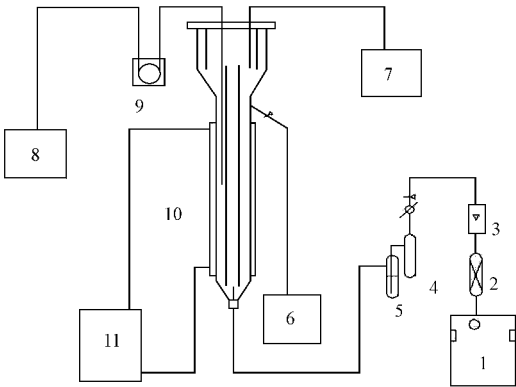


图 1 絮凝酵母 SPSC01 连续培养流程图

Fig.1 Process diagram for flocculating yeast cell culture

1. Air compressor 2. Air filter 3. Air flowmeter ;
4. Buffer tank 5. Humidifier 6. Broth storage tank ;
7. T and pH controller units 8. Medium storage tank ;
9. Pump ;10. Suspended-bed bioreactor ;11. Thermostat tank .

1.5 分析方法

1.5.1 酵母浓度 酵母浓度以单位体积培养液中细胞干重来表示 ,取样后置于预先烘干称重的滤纸上过滤 ,并用蒸馏水洗涤菌体 2 ~ 3 次 ,然后置 85℃ 的烘箱中烘至恒重后称重。

1.5.2 残糖 :由斐林反滴定法测定^[6]。

1.5.3 其它各项技术指标的分析检测 均按酒精发酵行业规定的统一方法进行^[6]。

2 结果和讨论

2.1 试验设计

2.1.1 因素与水平的确定 :选择影响 *SPSC01* 生长的 5 个主要因素作为研究对象 ,包括温度 T (30℃ ~ 33℃)- X_1 、通气量 U_G (300mL/min ~ 1000mL/min)- X_2 、流加糖液浓度 S_0 (160 g/L ~ 230 g/L)- X_3 、玉米浆添加量 C_1 (4mL/L ~ 11mL/L)- X_4 、 $(NH_4)_2HPO_4$ 添加量 C_2 (1.25 g/L ~ 3.0 g/L)- X_5 ,采用 8 水平的均匀设计。

2.1.2 目标函数的选择 选择酵母培养过程中所能达到的最大的比生长速率 μ (h^{-1})- Y_1 、限制性底物糖浓度 S (g/L)- Y_2 、相应的生物量 X (g/L)- Y_3 ,作为目标监测值。

2.2 均匀设计试验安排和结果

试验安排运用 5 因素 8 水平的均匀设计表 $U_8(8^5)$ (8⁵) 将影响因素填入表 1 中并检测试验结果。

表 1 均匀设计表 $U_8(8^5)$ 及结果

Table 1 Uniform design table $U_8(8^5)$ and experimental results

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Y_1	Y_2	Y_3
1	30.0	400	190	8	3.00	0.02765	1.4	36.23
2	30.5	600	230	10	2.75	0.01775	1.3	33.15
3	31.0	800	180	6	2.50	0.01875	1.1	32.93
4	31.5	1000	220	4	2.25	0.01709	1.2	35.85
5	32.0	300	170	11	2.00	0.00613	2.5	30.53
6	32.5	500	210	9	1.75	0.00890	2.9	27.70
7	32.5	700	160	7	1.50	0.00853	2.8	28.01
8	33.0	900	200	5	1.25	0.00726	2.9	29.55

2.3 回归分析

采用中国数学协会的均匀设计软件 UD3.0 进行线性逐步回归分析(见表 2 ,入选水平 1.0 ,剔除水平 1.0)^[7]

回归方程如下 :

$$Y_1 = -0.239 X_1 - 1.69 \times 10^{-5} X_2 + 3.86 \times 10^{-5} X_3 - 2.429 \times 10^{-3} X_4 + 0.239$$
$$Y_2 = -1.627 \times 10^{-3} X_2 - 1.362 X_5 + 5.965$$
$$Y_3 = -2.837 X_1 - 0.554 X_4 + 125.63$$

综合调优结果(加权系数 Y_1 :1、 Y_2 :-1、 Y_3 :1)

$$X_1 = 30 , X_2 = 1000 , X_3 = 230 , X_4 = 4.0 , X_5 = 3.0 ;$$

$$Y_1 = 0.02838 , Y_2 = 0.2508 , Y_3 = 38.295$$

表 2 回归分析结果

Table 2 Results of regression analysis

r	s	SE	SR	ST	F
0.9899	0.0016	0.0000	0.0004	0.0004	36.5697 > F_{α} (0.0100) = 28.7100
0.9962	0.0935	0.0350	4.6000	4.6350	175.2381 > F_{α} (0.0100) = 16.6900 ;
0.9212	1.5267	11.6538	65.2972	76.9510	14.0077 > F_{α} (0.0100) = 13.2700

r :Complex correlation coefficient ; s :Residual standard deviation ; SE :Residual quadratic sum ; SR :Regression quadratic sum ; ST :Total quadratic sum ; F : F test .

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2.4 各因素的影响情况

由 Table 1 及应用软件检验可以看出对 μ 、 S_r 、 X 影响程度的强弱为 $X_1 > X_3 > X_2 > X_5 > X_4$ 。

2.5 优化实验

考虑后续发酵的实际情况和调优结果,选择以下条件做验证试验 (1) 培养条件:温度 T : 30°C , 通气量 U_G : 0.714vvm ($1000\text{mL}/\text{min}$) (2) 培养基组成:由于酒精连续发酵过程中,流加糖浓度为 $220\text{g}/\text{L}$ 的情况下,终点酒精浓度可以达到 12% (v) 以上。考虑到絮凝酵母 SPSC01 酒精连续发酵并联产酵母工艺工业化生产中简化工序及降低成本的需要,我们选择絮凝酵母 SPSC01 连续培养过程流加糖液浓度 S_0 为 $220\text{g}/\text{L}$, 玉米浆添加量为 $4\text{mL}/\text{L}$, 同时添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $3.0\text{g}/\text{L}$ 。

2.6 验证性实验

在上述絮凝酵母 SPSC01 连续培养最适生长条件优化实验结果的基础上,在絮凝酵母 SPSC01 酒精连续发酵并联产酵母的小型实验装置上进行了实验验证,全部实验装置由一套单级容积规模与种子罐相同、三级串联的连续发酵系统和一台种子培养罐组合而成。装置稳定运行 30d, 种子罐每天可采出酵母 16g (干重) 用于补充后续酒精连续发酵系统,培养过程酵母细胞的平均比生长速率在 0.028h^{-1} 左右,生物量浓度可维持在 $20\text{g}/\text{L}$ 以上,保证了后续发酵装置在规定酵母采出量(以酵母干重计占酒精总量的 5%,其中 1/3 由种子罐补充到发酵系统 2/3 在发酵系统中自产)条件下的稳定运行,这一新工艺的

研究目前尚未见文献报道。

3 结论

(1) 通过采用均匀设计法,在试验次数较少的情况下,得到了较满意的试验结果,经回归分析,获得了最佳的培养条件。

(2) 在优化后的酵母培养条件下运行絮凝酵母 SPSC01 酒精连续发酵并联产酵母实验装置中的种子罐,培养过程稳定,采出的酵母活性好,保证了后续发酵装置的稳定运行,为絮凝酵母 SPSC01 酒精连续发酵并联产酵母工艺的工业化设计和操作奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 白凤武, 靳 艳, 冯朴荪, 等. 融合株 SPSC 发酵生产酒精的工艺研究—自絮凝细胞颗粒粒径分布、细胞生长和产物酒精生成动力学. 生物工程学报, 1999, 15(4): 455–460.
- [2] Hoshino K, Tanikuchi M, Marumoto H, et al. Continuous ethanol production from raw starch using a reversibly soluble-auto precipitating amylase and flocculating yeast cells. J Ferment Bioeng, 1990, 69: 228–233.
- [3] Roca E, Ghommidh C, Navarro J M, et al. Hydraulic model of a gas-lift bioreactor with flocculating yeast. Bioprocess Eng, 1995, 12(5): 269–272.
- [4] 李东侠, 白凤武, 宋 琪, 等. 自絮凝颗粒酵母酒精连续发酵过程精馏废液循环回用工艺的研究. 应用与环境生物学报, 1999, 5(5): 533–536.
- [5] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表. 北京: 科学出版社, 1994, 14: 69.
- [6] 胡嗣明, 张天杭. 酒精生产分析检验. 北京: 轻工业出版社, 1987.
- [7] 方开泰. 实用回归分析. 北京: 科学出版社, 1988.

Optimization of Growth Parameters During the Continuous Culture of Flocculating Yeast Strain SPSC01

WANG Jiang-Long ZI Li-Han* BAI Feng-Wu

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

Abstract : Using uniform design principles, the continuous culture of flocculating yeast strain SPSC01, a fusant from *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* was investigated in an air-lift suspended-bed bioreactor with a working volume of 1400mL. The optimum culture conditions for this flocculating yeast strain were obtained as follows: temperature, 30°C ; aeration rate, 0.714vvm ; medium (based on corn powder two-step enzymatic hydrolysis) contained sugar of $220\text{g}/\text{L}$, corn steep liquor of $4\text{mL}/\text{L}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ of $3\text{g}/\text{L}$. As high as $20\text{g (d. w)}/\text{L}$ yeast cells was achieved in the broth for the continuous culture system when the dilution rate was controlled at 0.02h^{-1} .

Key words : Uniform design, Flocculating yeast, Regression analysis

* Corresponding author. Tel 86-411-4706308, Fax 86-411-4706329, E-mail: zilihan@163.com

Received date: 02-20-2003