

# 利用溶氧控制策略进行高密度和高强度乙醇发酵的初步研究\*

何向飞<sup>1</sup>, 张 梁<sup>1</sup>, 石贵阳<sup>1,2</sup>

1(江南大学生物工程学院生物资源研究室, 江苏无锡, 214122)

2(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122)

**摘 要** 在搅拌罐式生物反应器中, 考察了乙醇发酵过程中不同溶氧控制条件对菌体量和其它发酵参数的影响。结果表明, 溶氧浓度和通气时间是影响菌体生长和乙醇发酵强度的重要因素。通过将溶氧控制在较为合适的水平, 发酵 48h, 菌体密度达到 5.5~6 亿个/mL, 发酵强度为 2.71g/(L·h), 比传统发酵分别提高了 200% 和 48.9%。为进一步深入研究溶氧控制策略, 实现高密度和高强度乙醇发酵提供了依据。

**关键词** 溶氧浓度, 高密度, 乙醇发酵, 发酵强度

乙醇作为现代食品、医药和化工工业用原料, 在国民经济中占有重要地位。传统的乙醇发酵是厌氧发酵, 发酵液中的酵母细胞数一般为 1~1.5 亿个/mL, 对应的发酵强度也只有 1.8~2.2 g/(L·h), 发酵时间长达 50~68 h<sup>[1]</sup>。这种低酵母密度对应低水平乙醇发酵强度是必然的。因此, 为了大幅度提高发酵法生产乙醇的产量, 提高发酵强度, 降低成本, 提高经济效益, 高密度和高强度乙醇发酵日益成为研究的热点。但是目前大量的研究基本上都是围绕着发酵培养基的改善, 固定化酵母发酵技术和酵母细胞分离回用技术等方面<sup>[2~4]</sup>展开的, 关于溶氧对乙醇发酵影响的研究很少。有关研究指出在乙醇发酵过程中供应必要的氧气是提高酵母菌增殖和高浓度乙醇发酵的保障措施<sup>[5,6]</sup>。但这些仅仅是从表面上提出溶氧对乙醇发酵的重要性, 并没有更深入的研究通过怎样的溶氧控制策略来进行乙醇发酵。

乙醇发酵过程中, 发酵强度受菌体密度, 发酵速度以及酵母发酵活力等多种因素的影响。溶氧条件是影响菌体的生长重要因素, 酵母细胞密度和发酵活力的高低又会影响发酵速度, 从而最终影响发酵强度。因此, 要实现高强度乙醇发酵, 找到一种最适的溶氧控制策略变得非常重要。文中在以葡萄糖为底物的清液乙醇发酵过程中, 首先初步探讨了溶氧浓度和通气时间对菌体生长, 乙醇体积分数, 乙醇发酵强度等参数的影响, 以期为进一步找到高细胞密度和高强度乙醇发酵过程中最适的溶氧控制策略提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 种

酿酒酵母(SC), 实验室保藏。

#### 1.1.2 培养基

种子培养基: YEPD。

发酵初始培养基: 葡萄糖 4%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, pH4.5~4.7。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 种子培养

将种子接入摇瓶活化 24 h 后转接入种子培养基中, 30℃ 转速 100r/min, 摇床培养 12 h

#### 1.2.2 发酵培养

在 15 L 发酵罐上扩大培养, 初始装液量 9 L, 接种量 6%, 在 30℃ 调节不同的通气量、搅拌转速, 自动添加质量分数为 25% 的氨水将 pH 控制在 4.6±0.1 的水平。其中相对溶氧(%)、pH、温度以及空气流量全程采集控制<sup>[7]</sup>, 间隔一定时间取样分析, 发酵培养 48h。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 菌体浓度测定

将酵母菌悬液做适当倍数稀释后, 用可见光分光光度计于波长 600nm 处测定吸收值( $OD_{600}$ )。

浓度 =  $OD_{600}$  读数 × 稀释倍数

#### 1.3.2 细胞菌数测定

血球计数法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.3 葡萄糖浓度的测定

采用 SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)测定。

第一作者: 硕士研究生(石贵阳教授为通讯作者)。

\* 国家 863 计划资助课题(2007AA102359)

收稿日期: 2007-09-11, 改回日期: 2007-10-23

### 1.3.4 乙醇体积分数测定

蒸馏-比重法<sup>[9]</sup>

## 2 结果与分析

### 2.1 菌体的生长同溶氧的关系

由图1可知,菌体发酵过程中通过自动提高或降低搅拌转速(Stir)将溶氧控制在50%,在菌体培养的开始阶段,Stir设为100 r/min,通气量为2 L/min,此时溶氧浓度为100%。培养10 min左右细胞即进入对数生长期,细胞比生长速率高,营养基质消耗快,细胞浓度不断增大,表现在细胞对氧的需求旺盛,培养2 h,培养液中溶氧(DO)迅速下降到50%左右,通过不断提高转速来满足酵母增加对氧的需求。培养14 h,菌体对氧的需求达到最大值,转速提高到170 r/min,细胞的OD值达到38。之后细胞比生长速率降低,细胞增殖速度减慢,对氧的需求也逐渐降低,搅拌转速逐渐下降。

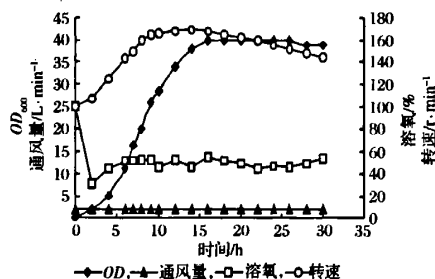


图1 溶氧的控制同菌体生长的关系

### 2.2 不同溶氧控制对酵母菌体的影响

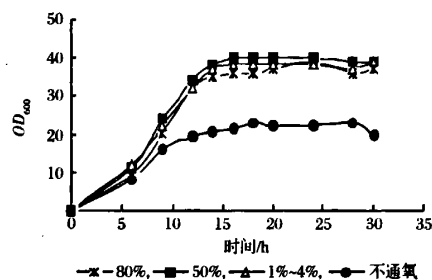


图2 不同溶氧浓度对细胞浓度的影响

从图2可以看出,通气与否对发酵过程中菌体的生成量有很大的影响。有氧控制的条件下,菌体的生成速度和最终菌体浓度明显高于不通气的发酵条件。从图3可以看出,在通少量氧的条件下,发酵4 h左右溶氧就基本降到了1%左右,然而这并没有影响菌体的生长,不同溶氧控制条件对菌体的生长并没有明显的影响。由此表明,在发酵过程中,将溶氧控制在较

低水平,就能获得较高的菌体密度,进一步提高溶氧水平,虽然可以提供更为充足的氧,但并不能明显的提高菌体密度。

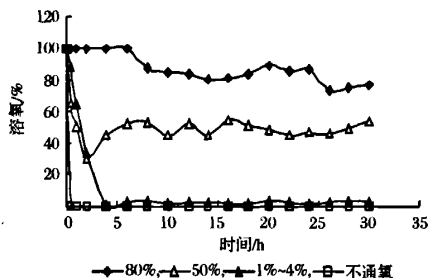


图3 不同溶氧浓度随时间的变化曲线

### 2.3 不同溶氧浓度下酵母对葡萄糖的利用

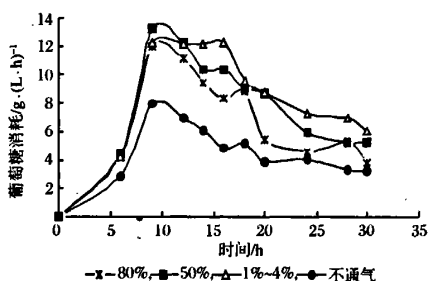


图4 不同溶氧条件对葡萄糖消耗的影响

从图4可以看出,在有氧条件下菌体对葡萄糖的消耗明显高于厌氧条件下对葡萄糖的消耗。在菌体的对数生长期,细胞对葡萄糖的消耗在有氧的条件下达到12~14 g/(L·h),而厌氧条件下的消耗速度仅有8 g/(L·h)。10 h左右,由于菌体生长速率逐渐降低,酵母对葡萄糖的消耗逐渐下降,且溶氧浓度越高,葡萄糖的消耗速度下降越快。

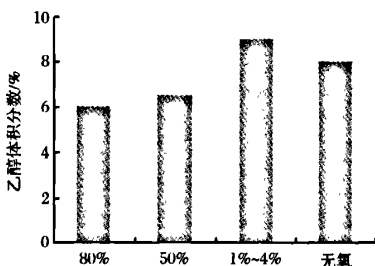


图5 不同溶氧条件下的乙醇体积分数

氧气的存在会促使酵母采取有氧呼吸的代谢途径,从而破坏乙醇发酵的厌氧代谢过程。但是,研究表明,糖浓度在3~100 g/L内,即使有相当量的氧存在,乙醇发酵也能进行<sup>[10]</sup>。从图5可以看出,在不同溶氧控制条件下均有不同浓度的乙醇产生,且溶氧浓

度越低,越有利于乙醇的生成;无氧条件下发酵生成的乙醇低于溶氧控制在1%~4%条件下生成的乙醇。这主要是由于无氧条件下的菌体量远远低于有氧条件下菌体量,而乙醇的生成与菌体量有很大的联系。

## 2.4 不同通气时间对菌体生长及产物的影响

由图6和图7可知,随着通气时间的增加,菌体密度也随着增加,且通气时间越长,菌体浓度越高;在通气12h的情况下最终的乙醇产率最高,而通气19h的情况下乙醇度最低。由此表明,恰当的通气时间对于整个发酵过程是非常重要的,它既要有利于前期菌体的生长,又要有利于中后期厌氧过程中乙醇体积分数的提高。通气时间短,菌体密度较低,相同的发酵时间下最终的乙醇产量较低;通气时间长,菌体密度高,乙醇度不高,乙醇发酵主要是厌氧的过程,通气时间过长尽管可以提高菌体密度,但它并不利于乙醇的生成。

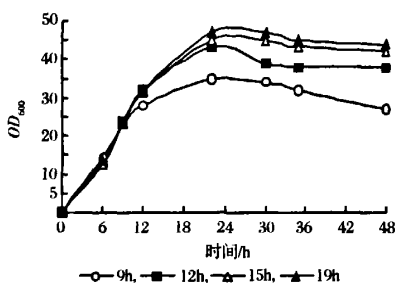


图6 通气时间对细胞浓度的影响

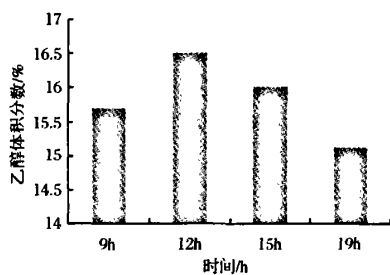


图7 通气时间对乙醇度的影响

表1为不同通气时间下各项参数的计算结果,由表1可以看出,与不通氧乙醇发酵过程相比,前期通入一定量的氧气,细胞密度在较短的时间内达到5.5~6亿个/mL(不通氧的条件下细胞密度为1.8~2.2亿个/mL),乙醇产量和发酵强度均有大幅度的提高。实验表明,最佳通气时间为12h,在此条件下乙醇度和发酵强度分别达到16.5%和2.71 g/(L·h),乙醇得率为44.9%,基本达到了高密度和高强度乙醇发

酵的目的。

表1 不同通气时间下的发酵参数的比较

通气时间/h	发酵时间/h	耗糖量/%	乙醇体积分数/%	得率/%	发酵强度/g·(L·h) <sup>-1</sup>
0	58	26.7	13.4	40.0	1.82
9	48	29.6	15.7	41.8	2.58
12	48	29.0	16.5	44.9	2.71
15	48	31.3	16.0	40.3	2.63
19	48	29.7	15.1	40.0	2.48

## 2.5 不同通气时间下葡萄糖的消耗

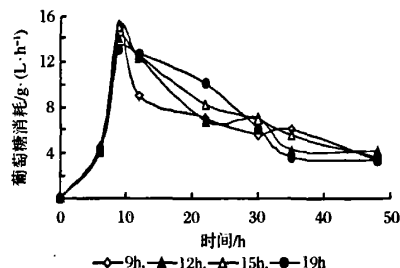


图8 通气时间对葡萄糖消耗的影响

由图8可知,前9h不同控制条件下菌体对于葡萄糖的消耗大致相同,此时菌体均处于快速繁殖阶段,葡萄糖的消耗随着菌体的增加而增加;9h到30h左右葡萄糖的消耗速度逐渐下降,通气时间越长,葡萄糖的消耗速度下降越慢。

## 3 讨论

发酵效率通常与细胞密度有关,因此发酵过程的首要任务通常是研究如何尽可能地达到高的细胞密度,以便提高生产率、简化下游加工、减少废水排放量、降低培养容积、生产成本及设备投资,使目的产物产生良好的成本效益<sup>[11]</sup>。溶氧是高密度发酵过程中影响菌体生长的重要因素,溶解氧浓度过高或过低都会影响微生物的代谢。因此利用溶氧控制策略是实现高密度高强度乙醇发酵重要途径。

文中通过控制不同溶氧浓度和通气时间进行乙醇发酵,在对溶氧控制条件进行初步优化的条件下,菌体密度达到5.5~6亿个/mL,发酵48h,乙醇体积分数为16.5%,乙醇得率为44.9%,发酵强度达到2.71 g/(L·h)。酵母细胞密度和发酵强度比传统发酵分别提高了200%和48.9%。研究表明,适量通氧对采用高细胞密度、高强度乙醇发酵是必要的,推测其原因是通氧可使酵母细胞产生更多的能量,细胞结构物质得以合成和更新,细胞活力得以长久维持,既提高酵母菌体浓度,又增强了酵母生产乙醇的能力。

这为进一步深入研究最适的溶氧控制策略,实现高密度和高强度乙醇发酵提供了依据。

### 参考文献

- 1 李雪雁. 实现乙醇高效率发酵的控制途径[J]. 酿酒, 2002, 29(4): 66~67
- 2 Casey GP, Magnus CA, Ingledew WM. High gravity brewing; nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast[J]. Biotechnology Letters, 1983, (5): 429~434
- 3 Jones AM, Ingledew WM. Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation[J]. Process Biochemistry, 1991, 29: 483~488
- 4 Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 860~865
- 5 Salmo JM. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations; Practical implications[J]. Food Science and Technology, 2006, 39(9): 959~965
- 6 秦耀宗. 乙醇工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- 7 刘桃英, 孔慧. CAN 总线在分布式生物发酵过程控制系统中的应用[J]. 江苏大学学报, 2004, 25(2): 109~111
- 8 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994
- 9 菜定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1988
- 10 章克昌. 乙醇与蒸馏酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995
- 11 Lu YH, Knol JC, Linskens MHK, etc. Cultivation of immobilized *Dictyostelium discoideum* for the production of soluble human Fas ligand[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65: 547~552

## The Preliminary Study of High Cell-density and Intensity Ethanol Fermentation Employing the Dissolved Oxygen Control Strategy

He Xiangfei<sup>1</sup>, Zhang Liang<sup>1</sup>, Shi Guiyang<sup>1,2</sup>

1(Laboratory of Biomass Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(Key Laboratory of industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiang Nan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** The effect of different dissolved oxygen concentration on the biomass and other fermentation parameters was investigated in the process of ethanol fermentation using stirred tank fermentor. It showed that dissolved oxygen concentration and aeration time were important factors which influenced the growth of cells and the ethanol fermentation intensity. At preferred dissolved oxygen level, the biomass amounted to 5.5~6 hundred million/mL and the fermentation intensity reached 2.71g/(L·h) after 48h fermentation, which increased 200% and 48.9% than traditional fermentation. This study might provide foundation for further investigation of optimum dissolved oxygen control strategy in order to achieve the goal of high density and high intensity ethanol fermentation.

**Key words** dissolved oxygen, high cell-density, ethanol fermentation, ethanol intensity

市场  
动态

### L-阿拉伯糖的食品应用前景看好

食品的健康概念已经不是欧美发达国家消费者的专利,随着中国经济的发展和人们生活品质的提高,越来越多的国内食品生产厂家将健康食品“新概念”融入其产品开发、市场策略甚至企业形象再塑之中,功能性低糖食品配料的广泛应用就是明证,而L-阿拉伯糖在食品行业的普及应用无疑将成为新的行业热点。

近年来科学家和营养学家就L-阿拉伯糖在肠道内对糖类代谢的作用作了大量的研究工作;Danisco公司与丹麦哥本哈根大学人类营养学院合作于2005年9月进行的临床试验表明L-阿拉伯糖对蔗糖的代谢转化具有阻断作用,使得它在减肥、控制糖尿病等方面的应用前景看好。日本Unitika公司也在2006年5月公布了L-阿拉伯糖具有阻止肥胖和糖尿病方面的功效,该论文于2006年日本营养与食品科学60周年的年会上发表。