

## 应用热冲击处理技术提高发酵甘油的产率

谢东明 刘德华\* 张 岩 朱丙田 刘天中 苏志国

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 当甘油发酵进入细胞指数生长期的中段时,对发酵体系在 45℃ 下进行大约 30 min 的热冲击处理,这种处理可以显著提高发酵甘油的产率,但对细胞生长和残糖消耗的影响不大。

**关键词** 甘油 发酵 热冲击

中图分类号 TQ923 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0383-04

对于微生物发酵过程,恒温培养并不一定是实际过程的最佳温控模式,比如热冲击酵母(*S. cerevisiae*)在其常规发酵温度高出 10~20℃ 的温度下经受一段时间的刺激后,胞内海藻糖的含量显著增加<sup>[1-3]</sup>。Lewi<sup>[4]</sup>的研究还发现,细胞内积累的某些溶质如海藻糖或甘油对耐受外界的刺激极为重要,热冲击能提高细胞对盐渗透压的耐受能力。由于甘油发酵是在高渗透压环境中进行,因此可望通过热冲击来增加细胞在高渗环境下的代谢活力,提高发酵甘油的产量。Toshiro<sup>[5]</sup>在对多种酿酒酵母的实验中发现,热冲击可使胞内 3-磷酸甘油脱氢酶的活性提高 15%~25%,并导致副产物甘油的含量增加,由此可通过热冲击来改善酒的风味。虽然 Toshiro 的研究是针对酿酒而言,但对耐高渗酵母发酵生产甘油仍有着很重要的启示作用。

为此,本文考察了热冲击在耐高渗酵母发酵生产甘油过程中的可行性,确定了热冲击操作的温度及其进行的最佳时机和最佳持续时间。另外,本文还在 15L 气升式反应器上对热冲击的放大进行了初步研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 实验菌种:耐高渗酵母菌 ICM-Y-05(*Candida krusei*)

1.1.2 培养基:种子培养基组成为:葡萄糖 10%,玉米浆 0.3%,尿素 0.3%;发酵培养基组成为:葡萄糖 20%~30%,玉米浆 0.2%~0.25%,尿素 0.25%,初始 pH 值均为 4.0~4.5。

#### 1.2 方 法

1.2.1 实验操作:在摇瓶实验中,种子先培养 24 h,按 10%接种量接入发酵摇瓶中,开始进行常规发酵,温度控制在 35℃ ± 1℃。待发酵进行 8~32 h,

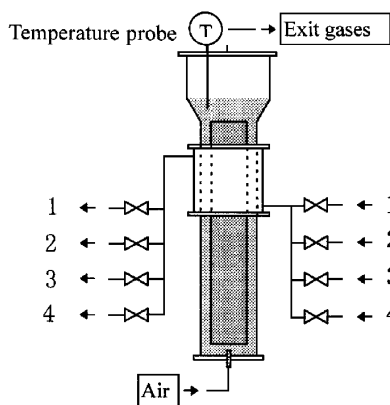


图 1 可变温操作的 15L 气升式反应器简图

Fig. 1 The 15 L airlift reactor with a multi-temperature controlling system

基本处于细胞指数生长期内进行热冲击操作。在摇瓶中热冲击的具体步骤为:先将待热冲击的摇瓶从摇床中取出,放入 60~70℃ 的恒温水浴中快速升

收稿日期:1999-07-21 修回日期:1999-12-02。

基金项目:国家“九五”攻关项目(96-C03-03-03A),国家重点工业性实验项目。

\* 通讯联系人及课题负责人,现地址为:清华大学化学工程系,北京 100084。

温约 1~2 min,使发酵液温度接近 40~50℃;再将摇瓶置于 40~50℃的恒温水浴振荡器中,维持规定的热冲击时间。最后将摇瓶转入普通摇床中继续进行常规发酵,直至结束。

15L 气升式反应器上的放大实验:种子经摇瓶(24 h)、1L 气升式反应器(12 h)二级培养后,以 8%的接种量接入 15L 气升式反应器中,发酵 12~16 h 后开始进行热冲击,之后再恢复到常规发酵。图 1 即为本文实验中 15L 气升式反应器的结构简图。

进行热冲击时,反应器夹套先通以 60~70℃的热水<sup>[1]</sup>;待反应器温度显示接近 45℃时,改通 45℃的热水<sup>[2]</sup>,维持规定的时间后,再改通冷自来水冷却<sup>[3]</sup>,最后待发酵温度基本降至 35℃时通 35℃恒温水<sup>[4]</sup>,恢复常规发酵。

**1.2.2 分析方法:**采用血球计数板计数法确定细胞浓度,用菲林定糖法测定葡萄糖浓度,用高碘酸氧化法分析甘油浓度<sup>[7]</sup>。同时考虑到发酵过程中因蒸发造成的体积变化,本文将以发酵初始体积为基准对所得浓度进行修正,以利于比较分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 热冲击的最佳条件

对于热冲击操作而言,最关键的因素为热冲击的温度,另外还必须确定热冲击的进行时机以及持续时间。为此本文按正交表  $L_9(3^4)$  组织了一组三水平的正交实验,并与无热冲击的普通发酵作对照。由于热冲击的温度必须在细胞能够正常生长的范围之内<sup>[6]</sup>,一般不超过常规发酵温度 20℃,因此温度水平分别选择 40℃、45℃、50℃。另外,将热冲击的操作控制在细胞活性较高的指数生长期,且冲击时间一般不超过 2 h,以免细胞受热过度而损伤<sup>[1-5]</sup>。对于摇瓶中的甘油发酵,细胞生长一般在发酵约 30~36 h 后达到或接近静止期,为此热冲击进行时机的水平选为 8 h、16 h、30 h,分别处于细胞指数生长的前期、中期和晚期,热冲击持续时间的水平分别选择为 15 min、30 min、60 min。实验组织及 96 h 后的发酵结果如表 1 所示;正交实验的因子分析如表 2 所示。

表 1 热冲击的进行时机与持续时间的正交实验结果(序号 1~9)及其与常规发酵结果(序号 10)的比较

Table 1 Comparison of the final results between the orthogonal experiment with heat-shock treatment(No. 1~9) and the normal fermentation(No. 10)

No.	Orthogonal factors			Error	Final fermentation results		
	Temperature /℃	Start time /h	Duration time /min		Cell /( $10^8$ cells/mL)	Glucose /%	Glycerol /%
1	40(1)	8(1)	15(1)	(1)	6.073	9.448	4.893
2	40(1)	16(2)	30(3)	(2)	6.202	8.613	5.224
3	40(1)	30(3)	60(3)	(3)	6.494	9.144	4.072
4	45(2)	8(1)	30(2)	(3)	6.650	8.018	5.388
5	45(2)	16(2)	60(3)	(1)	6.236	10.619	5.475
6	45(2)	30(3)	15(1)	(2)	6.553	9.513	4.472
7	50(3)	8(1)	60(3)	(2)	7.193	9.827	5.308
8	50(3)	16(2)	15(1)	(3)	8.123	11.273	5.079
9	50(3)	30(3)	30(2)	(1)	7.672	12.479	4.627
10	Normal fermentation at constant 35℃				6.270	8.529	4.690

(1)(2) and (3) represent the levels of the orthogonal factors

实验中,初始细胞、葡萄糖浓度分别为  $0.74 \times 10^8$  cells/mL、26.1%。由表 1 可以看到,与普通发酵相比,大多数的热冲击方式均使得甘油产率有不同程度的提高,这说明热冲击对提高甘油产率是行之有效的。由表 2 中对因子水平的分析可知,热冲击的最佳温度为 45℃,最佳进行时机为指数生长期中段的第 16 h,最佳持续时间为 30 min。对发酵最终甘油浓度的方差分析和显著性分析结果表明,热冲击的进行时机对发酵结果影响最大。

### 2.2 热冲击对甘油发酵过程的影响

为进一步考察热冲击作用对甘油发酵过程的影响,在摇瓶上组织了三组平行对照实验。按照 2.1 节正交实验的结果,热冲击操作的温度为 45℃,在发酵的第 16 h 进行,并持续 30 min。实验结果如图 3 所示(图中所有数据点均取自三组平行实验的平均值)。

可见,在该条件下的热冲击对细胞生长及残糖消耗影响不大,但能使甘油产量随着发酵过程的进

行逐步增加,发酵 96 h 后,最终甘油浓度增加 32.6%。

表 2 基于最终甘油浓度的正交因子分析

Table 2 Analysis of the orthogonal factors based on final glycerol concentration

Factor	$I/^\circ\text{C}$	Start time	Duration time	Error
I/3	4.730	5.196	4.815	4.998
II/3	5.112	5.259	5.080	5.001
III/3	5.005	4.390	4.952	4.846
Variance $S_i$	0.2330	1.4088	0.1054	0.0471
$V(S_i/f_i)$	0.1165	0.7043	0.0527	0.0236
$F_i$	4.943	29.886	2.236	
Prominence test		**		

I, II and III represent the sum of final glycerol concentration of level (1) (2) and (3) respectively,

\*\* Represents  $F_i > F_{0.05}(2, 2)$  and  $F_{0.10}(2, 2) = 9.00$ ,  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2, 2) = 99.01$ .

### 2.3 热冲击在 15L 气升式反应器上的放大

热冲击提高甘油产率在摇瓶实验中已得以证实,为探索该方法在工业应用中的可行性,又进一步在 15L 气升式反应器上进行了放大实验。在前面的摇瓶正交实验的方差分析中,发现热冲击的进行时机对发酵结果影响最大;在摇瓶发酵中,热冲击

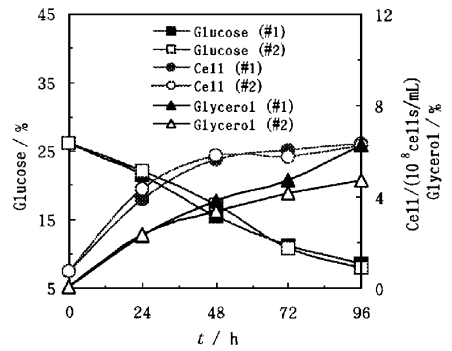


图 2 热冲击作用对甘油发酵过程的影响

Fig. 2 Effects of heat shock treatment on process of glycerol fermentation (#1) with heat shock treatment, (#2) without heat shock treatment

的最佳进行时机为发酵的第 16 h。但根据以前的经验,在 15L 气升式反应器上的甘油发酵中,由于溶氧传质好于摇瓶,细胞生长一般在发酵 24 h 左右达到或接近静止期,相比摇瓶发酵,其速度明显加快,因此在 15L 气升式反应器上的甘油发酵中,热冲击操作的进行时机有可能提前。为此本文组织了两组对比实验,热冲击操作分别在发酵 12 h 和 16 h 后进行。实验结果如图 3(A) 和 (B) 所示。

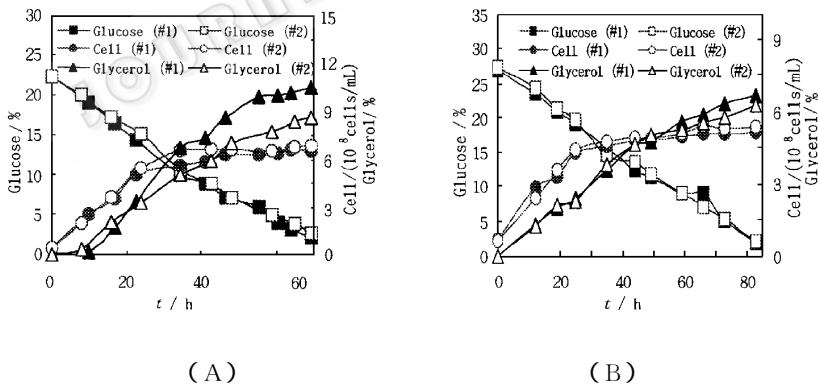


图 3 15L 气升式反应器上有 30 min 热冲击 (#1) 与无热冲击 (#2) 的对比实验

Fig. 3 Comparative fermentation in 15L airlift reactor between with (#1) and without

Heat shock treatment (#2) for 30 min, and the start time of the heat shock treatment were 12 h (A), 16 h (B), respectively

可见,当然冲击操作选在发酵 12 h 后进行时,此时发酵处于细胞指数生长期的中段,计算放大实验的结果与上面摇瓶实验结果相类似,热冲击对细胞生长和残糖消耗几乎没有影响,但发酵 69.5 h 后,甘油对总糖转化率增加 22.3%。而当热冲击操作选在发酵 16 h 后进行时,此时发酵处于细胞指数生长期的后段,放大实验对甘油产出的增加并不十分

明显。

### 3 结论

应用适度的热冲击技术能显著提高发酵甘油的产率,但对细胞生长和残糖消耗的影响不大,热冲击的最佳温度为 45 $^\circ\text{C}$ ,最佳持续时间为 30 min,并且在细胞指数生长期的中段进行时效果最好。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Thomas H ,Thomas B ,Andres W. *FEBS Lett* ,1987 **220**( 1 ):113~115
- [ 2 ] Thomas H ,Thomas B ,Andres W. *FEBS Lett* ,1989 **255**( 2 ):431~434
- [ 3 ] Claudio De Virgilio ,Peter Piper ,Thomas Boller et al. *FEBS Lett* ,1991 **288**( 1 , 2 ):86~90
- [ 4 ] Lewis R P L ,Waston K. *Microbiology* ,1995 **141** :687~694
- [ 5 ] Toshiro O ,Kiyoshi O ,Yasufumi U. *J Ferment Bioeng* ,1996 **82**( 2 ):187~190
- [ 6 ] Pringle J R. *Methods Cell Biol* ,1975 **12** :149~184
- [ 7 ] 范质良.“ 耐高渗酵母发酵生产甘油的工艺优化研究 ” 中科院化冶所硕士论文 ,1996

## Enhancement of Fermentative Glycerol Yield with Heat Shock Treatment

XIE Dong-Ming LIU De-Hua ZHANG Yan ZHU Bing-Tian LIU Tian-Zhong SU Zhi-Guo

( *State Key Lab of Biochemical Engineering ,Institute of Chemical Metallurgy ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080* )

**Abstract** A heat shock treatment was studied in glycerol fermentation of osmotolerant yeast *Candida krusei*. The experiment results showed that the optimal temperature and duration time for heat shock is 45°C and 30 min respectively ,and the optimal start time of the treatment is at the mid term in exponential growth stage. With such treatment ,glycerol yield was enhanced greatly ,while no significant effects on both cell growth and glucose consumption were observed.

**Key words** Glycerol ,fermentation ,heat shock treatment