

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0322 - 05

超声波在生物发酵工程中的应用

王 武¹, 杨海麟¹, 吕霞付², 杨胜利¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 通信与控制工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:综述了超声波作用于生物发酵过程的基本原理,并详细讨论了超声波在遗传育种、改善发酵工艺及发酵产物的提取与分离、发酵产物浓度的在线检测等方面的主要应用.一定强度的超声波作用于发酵过程可缩短发酵时间,改善生物反应条件,提高生物产品的质量和产量.

关键词:超声波;发酵工程;应用

中图分类号:TB 559

文献标识码:A

The Application of Ultrasonic in Fermentation Engineering

WANG Wu¹, YANG Hai-lin¹, LU Xia-fu², YANG Shen-li¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Information & Control Engineer, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This review briefly presents the fundamental principle of ultrasonic acting on fermentation. The main application of ultrasonic in breeding, improving ferment technique, distilling and separating ferment production, on-line measuring the concentration of ferment products is discussed in details.

Key words: Ultrasonic Wave; Fermentation Engineering; Application

由于发酵技术对环境的污染小、生产效率高,在轻工、化工和食品工业等领域,目前利用发酵技术生产产品所占的比重已越来越大.随着发酵技术在轻化工和食品等行业应用的不断深入和拓展,对发酵技术本身的要求也越来越高.

一是传统的发酵工艺已越来越难以满足现代生物发酵工程的需要,迫使人们不断利用相关学科最新的科研成果来改进发酵工艺.迄今,一些物理量如光、电、热、磁等对发酵过程生物学特性(如酶的活性等)的影响,人们已进行了一定的研究且取得了不少成果.近年来由于功率超声设备的普及和发展,超声波对发酵过程的影响正引起人们强烈的

兴趣和高度的重视.研究表明:合适强度的超声波作用于发酵液,可增加细胞膜的通透性和选择性,促进酶的分泌,增强细胞的代谢过程,从而缩短发酵时间,改善生物反应条件,提高生物产品的质量和产量.由于国内生物反应设备研究和开发的滞后已严重影响生物技术的进一步发展,故利用生化工程的方法,结合声、光、磁等手段研究新型生物反应器和专用设备,籍以提高生物反应的效率,对我国生物工程领域的发展尤显重要.

二是目前对发酵过程参数的在线检测还缺乏有效的手段,这在一定程度上限制了人们对发酵过程动态特性的了解,也阻止了发酵技术的进一步发

收稿日期:2002-03-31; 修订日期:2002-04-27.

作者简介:王武(1952-),女,福建福州人,教授,博士生导师.

万方数据

展. 目前发酵过程中的一些物理化学参数, 如罐压、流量、温度、pH 值、溶氧等均可在线测量; 而一些生化过程参数, 如基质浓度、发酵产物的浓度、发酵液的粘度等仍较难实现在线测量. 究其原因, 主要是缺乏合适的在线测量传感器. 近年来利用酶电极和光电技术已取得了一些成果, 但在实际应用中仍存在较多问题. 利用超声技术对发酵液的浓度和粘度进行动态测量, 不仅可以对发酵过程参数进行实时监控, 而且可进一步研究发酵过程的动力学机制及发酵液的流变特性, 进而科学地指导生物反应器内部结构的设计优化, 因此具有重要的理论意义和实际意义.

1 超声波作用于生物发酵工程的机理

应用于生物发酵工程的超声波可分为功率超声波和检测超声波, 功率超声波主要用于改进发酵工艺或改善发酵过程, 其作用机制分为热作用、空化作用和机械传质作用, 作用的强弱与超声波的频率及强度等有关.

热作用是超声波在介质内传播过程中, 其能量不断地被传播介质吸收而使介质的温度升高的一种现象. 在生物发酵工程中超声热作用可用于杀菌或使酶失活.

空化作用是超声波在介质中传播时, 液体中分子的平均距离随着分子的振动而变化, 当其超过保持液体作用的临界分子间距, 即形成空化. 超声波空化分稳态空化(声强 < 10 W/cm²)和瞬态空化(声强 > 10 W/cm²)两种. 瞬态空化绝热收缩至膨胀瞬间, 泡内可产生高温高压(5 000 K, 50 MPa), 可破坏细胞结构或破碎细胞, 使酶失活; 稳态空化可使酶或细胞颗粒受到微声流产生的切应力作用. 在生物发酵工程中, 这一过程主要发生在界面层、膜或细胞壁附近及细胞液内.

机械传质作用是超声波在介质中传播时, 可使介质质点进入振动状态, 加速发酵液的质量传递, 这一过程可发生在细胞壁附近或细胞内, 超声波可增强细胞膜及细胞壁的质量传递, 进而提高发酵过程的反应速度, 促进生物传质作用.

此外, 微弱声波在液体介质中传播时, 其传播特性(声速、传播衰减、辐射阻抗等)受介质性质的影响. 如: 声速变化和液体介质浓度变化在一定范围内存在着线性关系, 即: $d = \sum \sum A_{nm} C^n T^m$, d ——液体浓度, A ——由液体种类决定的固有常数, C ——声速, T ——温度. 因此, 只要测得某一温度下液体的声速, 即可求出液体浓度. 在生物发酵

工程中利用超声波检测技术可实现某些发酵过程参数的在线非接触测量.

2 超声波在生物发酵工程中的应用

2.1 功率超声波的应用

2.1.1 超声波应用于发酵工程上游技术 基因工程是在基因水平上的遗传工程, 即用人造方法把所需的某一供体生物的遗传物质(DNA)提取出来, 在离体条件下剪切后, 把它和载体的 DNA 分子连接起来, 然后导入某一受体细胞内, 外来的遗传物质在受体内进行复制和表达, 从而获得新品种. 超声波的空化作用, 可能导致空泡周围细胞的细胞壁和质膜的击穿或可逆的质膜透性改变, 使细胞内外发生物质交换, 将外源基因导入细胞中, 这种方法称之为超声波诱导基因转移法. Joersbo 等^[1]利用这种方法将外源基因导入植物组织及原生质体内, 获得了极高的稳定转化率. 许宁等^[2]1990 年首次在国际上提出应用超声波诱导植物细胞基因转移的方法, 并使用自制的超声波诱导基因转移仪, 取得了一系列的研究结果, 以后他们又将此方法推广应用到哺乳动物细胞基因转移中, 并对该方法诱导基因转移的机制进行了研究. 丁志山等^[3]用 24 kHz、20 W 的超声波处理酵母原生质体, 将外源 DNA 导入酿酒酵母原生质体中, 获得了每微克 DNA 有 10³ 转化子的转化率, 并发现酵母原生质体的转化率受超声波处理时间的影响较大, 如图 1 所示. 刘春朝等^[4]利用新型超声波生物反应器培养青蒿不定芽生产青蒿素, 得到的青蒿素的产量分别为固体培养和摇瓶培养的 2.9 和 3.2 倍. 林炜铁等^[5]利用超声波法破碎酵母细胞原生质体, 研究了超声波在酵母细胞原生质体拆合技术中的应用, 建立了一种新的遗传育种方法.

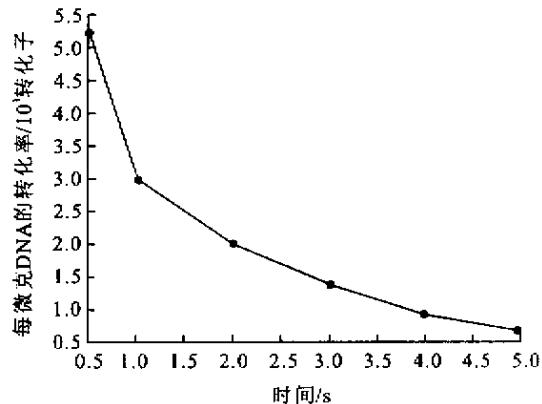


图 1 超声波处理时间对酵母原生质体转化率的影响
Fig. 1 The effect of ultrasonic treating time on the transform rate of yeast protoplast

2.1.2 超声波应用于发酵工程中游技术 低强度超声波依靠机械振动和稳态空化效应使传质边界层减薄,并且使溶质粒子运动加速,这对于反应物进入酶或细胞活性部位及产物进入液体介质的传质扩散作用有利,可提高生物反应速度.适宜的低强度超声波作用于动植物细胞时会产生胞内微流、胞内质的旋转及涡流运动,并且提高了细胞膜和细胞壁的穿透性,这些效应可以提高细胞的新陈代谢功能.图 2 是超声波生物发酵装置原理结构图.关于这方面的研究工作国外开展得较早也相对较多,如:Wood 等^[6]研究了废纸发酵生产酒精过程中,用超声波处理可使酒精产量提高近 20%;Matsuura 等^[7]研究了超声辐射对葡萄酒、啤酒和清酒发酵过程的影响,发现经超声辐射后葡萄酒和清酒中氨基酸的含量比对照组明显减少,从而产生大量的高级醇,增加了酒香,并缩短了发酵时间;Stephen 等^[8]研究了超声波水浴作用下,α-淀粉酶和糖化酶对淀粉和糖原水解活性的变化的影响,发现在高强度超声波作用下,酶催化反应速率和转化酶对蔗糖的水解活性显著升高;Jackson 等^[9]研究了超声波处理对淀粉水溶性的影响,发现超声波处理可增加淀粉在水中的溶解度;Toba 等^[10]研究了超声活化 β-乳糖苷酶催化乳糖中乳糖的分解情况,发现经超声波处理后,乳糖降解大大提高;Azhar 等^[11]研究了在工业发酵中用马铃薯淀粉代替谷物淀粉时超声波的影响,发现超声波处理可引起淀粉颗粒的物理降解,导致淀粉糊表观粘度下降;Wang D Z 等^[12]研究了牛奶发酵中超声辐射的作用,发现超声辐射可促进乳糖的水解和细胞活性;Thomas 等^[13]研究了低剂量超声波处理对细胞生长和生物制品产量的影响,发现小剂量、短周期的超声辐射可改变细胞生长速率,进而影响生物制品的产量.

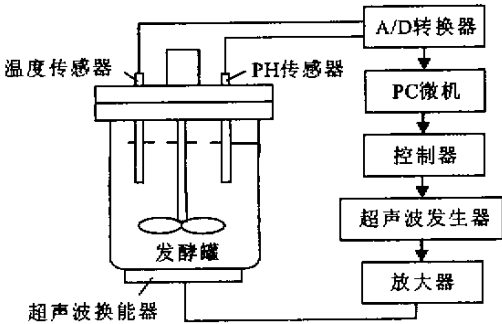


图 2 超声波生物发酵装置原理结构图

Fig.2 The principle chart of ultrasonic bio-reactor

国内这方面的研究工作虽然开展较晚,但也取得了不少成就.如:中科院化工冶金研究所研究了超声波在青霉素发酵过程中的应用,发现经超声波

处理后,青霉素产量可提高 10% 以上^[14];林影等^[15,16]研究了微超声波在脆壁克鲁维氏酵母菊糖酶发酵生产中的应用,结果表明:在 20 kHz、10 W 的微超声波作用下,脆壁克鲁维氏酵母菊糖酶产量提高 1 倍以上;同时,他们还研究了超声波促进固定化菊糖酶催化作用的机理,结果表明,频率为 20 kHz、功率为 20 W 的超声波作用后,以蔗糖为底物的酶活力提高了 60%;李柏林等^[17]依据超声波作用原理,改变菌丝体胞壁对庆大霉素(gentamicin, GM)的吸附性能,使部分被胞壁吸附的 GM 释放到发酵液中,研究表明运用超声波处理 80~90 h 龄的发酵液可提高 GM 发酵效价 1.5 倍;于淑娟等^[18]对超声场下纤维素酶反应动力学进行了研究,结果表明,使用超声波催化法具有水解率高、产品质量好,以及优化反应条件等优点;高大维等^[19]研究了线性超声波辐射对啤酒酵母细胞生长的影响.此外,超声波处理还可改良发酵过程的生化反应操作条件,如溶氧、消泡等^[20].

2.1.3 超声波应用于发酵工程下游技术 在发酵产物的提取和分离中,离心和过滤是最常用的方法,传统的离心方法难以实现在线操作,而常规的过滤要使用各种各样的膜,这些膜过滤器使用时经常会被堵塞,因此需经常清洗或更换.超声过滤有如下特点:1)可使溶液中的细胞(或微细颗粒)凝聚,提高过滤速度;2)使细胞(或微细颗粒)部分地悬浮于液体中,从而为溶解成分留出更多的通道,可防止堵塞;3)超声过滤无机械活动部件,不需要滤纸或滤膜^[22].Coakley^[21]用超声驻波场对发酵产物进行了细胞分离和利用,不仅可实现在线操作,而且不会出现堵塞现象;Hawkes 等^[22]利用 1 MHz 的超声驻波场连续过滤酵母细胞的悬浮液,在体积流量为 4.8 mL/min 的条件下,得到了 99% 的滤过率,而酵母细胞悬浮液的最大浓度可达 1.7×10^{10} mL⁻¹.此外,超声波还可用于发酵产品的干燥,与常规的干燥方法相比,超声波干燥可在较低温度下进行,可减少产品的氧化与降解.

2.2 检测超声波的应用

当微弱超声波信号在发酵介质中传播时,其能量不足以对发酵液中细胞或酶的生化性能或生物学性能产生影响,但发酵液的一些物理参数(如发酵产物或底物的浓度、发酵液的粘度等)的变化会改变超声波的传播特性,如超声波的传播频率、声速、传播损耗等.由此可利用在发酵液中传播的超声波的声学特性变化来监测基质浓度、发酵产物的浓度或发酵液的粘度等参数.这方面的工作目前国

内外都有人在做,如 Endo 等^[23]研究了利用超声波技术来实时检测发酵液的粘度;Cowan 等^[24]利用声板波传感器来检测大肠杆菌的浓度;Forrest 等^[25]用在线测量法研究了啤酒发酵过程中声速与发酵产热、酒精浓度及底物密度等之间的关系.本文作者利用超声波技术进行了啤酒发酵过程中酵母浓度测量的实验研究,图 3 为测量装置图,所用超声波频率为 5.8 MHz,整个测量过程由微机控制.图 4 是以麦汁为底物,在不同温度下酵母浓度与超声波传播时间差的关系曲线.在声程一定时,它实际上反映了酵母浓度和声传播速度之间的关系.可见,在温度一定时,酵母浓度的变化对声传播速度的影响较大.

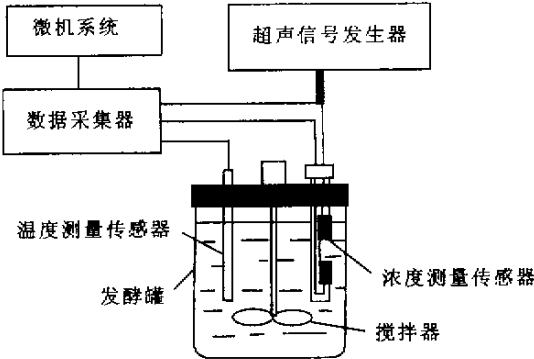


图 3 酵母浓度测量实验装置图

Fig.3 Ultrasonic sensor using on measuring the yeast concentration

3 结 语

超声波可广泛应用于生物发酵工程,不同频率

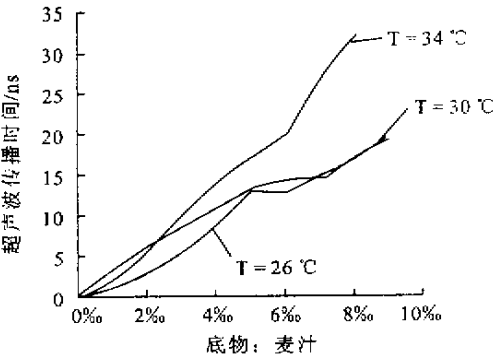


图 4 不同温度下酵母浓度对声传播时间的影响曲线

Fig. 4 The effect of yeast concentration on sonic transit time

和强度的超声波对发酵过程的作用是不同的,使用时应视具体的发酵工艺和使用条件进行选择.尽管人们在利用超声波技术改造传统的生物发酵过程方面已进行了一些研究,但有关的应用基础研究还相当欠缺,特别是相应的超声波生物反应设备和超声波生物传感器的开发研究几乎是空白.另外,利用超声波技术系统地研究工业微生物遗传性状,以及细胞结构与工业性能的改良,尚未见报导.目前国内的生物技术领域急需多学科和多种技术(生物化学、生物物理、电子学、材料科学、计算机技术等)的相互交叉渗透,通过开发新型的生物反应设备与先进的工艺来推动生物技术的发展,尤其是利用有效生物物理手段,藉以研究生物反应的机理并提高生物反应的效率,这对我国生物发酵技术的发展具有重要的意义.

参考文献:

[1] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication[J]. *Plant Cell Reports*, 1990,9 (4) 207-210.

[2] 许宁. 超声波诱导基因转移[D]. 北京 清华大学,1993.

[3] 丁志山,沃兴德. 超声波法转化酵母原生质体[J]. *生物技术*,1996,6(4) 41-43.

[4] 刘春朝,王玉春,康学真等. 利用新型雾化生物反应器培养青蒿不定芽生产青蒿素[J]. *植物学报*,1999,41(5) 524-527.

[5] 林炜铁. 酵母细胞原生质体拆合技术的研究[D]. 广州 华南理工大学博士论文,1991.

[6] WOOD B E, ALDRICH H C, INGRAM L O. Ultrasonic stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper[J]. *Biotechnol Prog*, 1997,13(3) 232-237.

[7] MATSUURA K, HIROTSUNE M, NUMOKAWA Y, et al. Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation[J]. *J Ferment Bioeng*, 1994,77(1) 36-40.

[8] STEPHEN M, BULLOCK K, LIN W Y, et al. sonolytic enhancement of the bactericidal activity of irradiated titanium dioxide suspensions in water[J]. *Chem Intermed*, 1997,23(4) 311-323.

[9] JACKSON D S, CHOTO-OWEN C, WANISKA R D, et al. Characterization of starch cooked in alkali by aqueous high-performance size-exclusion chromatography[J]. *Cereal Chemistry*, 1988,5(6) 493-496.

[10] TOBA T, HAYASAKA I, TAGUCHI S, *et al.* A new method for manufacture of lactose-hydrolysed fermented milk[J]. **J Sci Food Agric**, 1990,52 403 – 407.

[11] AZHAR A,HAMDY M K. Sonication effect on potato starch and sweet potato powder[J]. **Journal of Food Science**, 1979,44 : 801 – 804.

[12] WANG D Z, SAKAKIBARA M, KONDOH N, *et al.* Ultrasonic-enhanced lactose hydrolysisin milk fermentation with lacto-bacillus bulgaricus[J]. **J Chem Tech Biotechnol**, 1996,65 86 – 92.

[13] THOMAS B J, MCINTOSH D, TAYLOR S R, *et al.* Effect of low-dose ultrasonic treatment on growth rates and biomass yield of Anabaena flos aquae and Selenastrum capricornutum[J]. **Biotechnol Tech**, 1989,3(6) 389 – 392.

[14] 张建国. 超声波在青霉素发酵中的应用[A]. 首届全国轻化工生物技术研讨会,无锡,1999.

[15] 林影,高大维,梁宏等. 微超声波对脆壁克鲁维氏酵母葡萄糖酸生产的作用[J]. 华南理工大学学报,1997,25(10) :110.

[16] 林影,高大维,李国基等. 超声波对菊糖酶催化作用的影响[J]. 华南理工大学学报,1997,25(9) :142 – 144.

[17] 李柏林,储炬,李友荣等. 在线超声波处理对庆大霉素生物合成的影响[J]. 中国抗生素杂志,1997,22(4) 250 – 253.

[18] 于淑娟,高大维,闵亚光. 超声波作用下纤维素酶水解反应动力学研究[J]. 厦门大学学报,1997(3) :112 – 114.

[19] 高大维,高文宏,雷德柱等. 线性超声波辐射对啤酒酵母细胞生长的影响[J]. 华南理工大学学报,1999,27(12) :79 – 81.

[20] MORIKAWA T, OKA K, KOJIMA K. Fluidization and foam separation in brewing[J]. **Tech q Master Brew Assoc Am**, 1996,33(1) 54 – 58.

[21] COAKLEY W T. Ultrasonic separations in analytical biotechnology[J]. **Tibtech**, 1997,15 506 – 511.

[22] HAWKES J J,COAKLEY W T. A continuous flow ultrasonic cell-filtering method[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1996,19 (1) 5.

[23] ENDO H, SODE K, ISAO K, *et al.* On-line monitoring of the viscosity in dextran fermentation using piezoelectric quartz crystal[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1990,36 636.

[24] COWAN S E, BLACK J, KEASLING J D, *et al.* Ultrasonic flexural-plate-wave sensor for detecting the concentration of settling *E. Coli* W3110 cells[J]. **Analytical Chemistry**, 1999,71(16) 3622 – 3625.

[25] FORREST I S. In-line instruments, the way towards brewing efficiency[J]. **Ferment**, 1996,9(5) 273 – 280.

(责任编辑 秦和平)

(上接第 321 页)

[8] MORGENROTH E, SHERDEN T. Aerobic Granular Sludge in a Sequencing Batch Reactor[J]. **Wat Res**,1997, 31(12) : 3191 – 3194.

[9] PENG D C, NICOLAS B, JEAN-PHILIPPE D, *et al.* Aerobic granular sludge-A case report[J]. **Wat Res**, 1999,33(3) :890 – 893.

[10] BEUN J J, HENDRIKS A. Aerobic Granulation in a Sequencing Batch Reactor[J]. **Wat Res**,1999,33(10) :2283 – 2290.

[11] BEUN J J, BAN LOOSDRECHT M C M, HEIJNEN J J. Aerobic granulation[J]. **Wat Sci Tech**, 2000, 41(4-5) 41 – 48.

[12] ETTERER T, WILDERER P A. Generation and properties of aerobic granular sludge[J]. **Wat Sci Tech**, 2001,43(7) :19.

[13] 竺建荣, 刘纯新, 何建中,等. 厌-好氧交替工艺的生物除磷特性研究[J]. 环境科学学报, 1999, 19(4) :394 – 398.

[14] 竺建荣, 刘纯新. 好氧颗粒活性污泥的培养及理化特性研究[J]. 环境科学, 1999, 20(2) 39 – 41.

[15] 卢然超, 张晓健,张悦,等. SBR 工艺运行条件对好氧污泥颗粒化和除磷效果的影响[J]. 环境科学,2001, 22(2) :87.

[16] IRVINE R L. Controlled unsteady state processes and technologies-an overvies[J]. **Wat Sci Tech**, 1997,35(1) 1 – 10.

(责任编辑 秦和平)