

Increasing productivity of bio-ethanol by using *Pichia stipitis* fermentation in continuous dual-tank

黃重睿、王維麒

E-mail: 345518@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

To avoid grain prices rising and causing inflation, production of the biomass fuel alcohol of the second era is mostly abandoned grain crops, and used the non-grain crops of abundant biomass cellulose or agriculture waste as raw materials. The saccharides that biomass fiber through preprocessing hydrolysis and producing are used by organism methods for fermentation to get alcohol, and the saccharides of the kind of raw materials obtained possess the two classes of five carbon and six carbon. In order to amply use these reducing sugars, developing co-fermentation process is an important topic. The bacteria strains that are able to ferment five carbon saccharides are quite rare in the nature world, and therefore using gene recombination to develop new bacteria strains is an important work. Besides the fermentation rate of the five carbon saccharides is quite slow, and therefore the rising of efficiency is also an important research. This research is according to the earlier established *Pichia stipitis* fermentation model, and analyzing the efficiency problem of two-tank continuous fermenting glucose and xylose the mixture solution to produce alcohol. The used substrate sources of two-tank continuous fermentation, in accordance with preprocessing, can be classified as 50 g/L pure glucose and the mixture solution of 8 g/L glucose/24 g/L xylose, the two sorts. Therefore, this research is designed that tank-one and tank-two are particular fed one kind of substrates, and the first tank is fed two kinds of substrates at the same time, et cetera, many kinds of operating method, to confer ethanol production rate, ethanol produced ratio, and substrate used ratio, et cetera, the variation under respective sorts of combination, and analyze the ethanol production rate. When comparing two-tank continuous fermenting and one-tank continuous fermenting, two-tank ethanol production rate is not certainly higher, but substrate used ratio is higher. For example of pure glucose fed, one-tank ethanol production rate in dilution rate 0.06 1/hr is 0.24 g/L/hr, and substrate used ratio is 0.265; and two-tank ethanol production rate, in the first and second dilution rate particularly 0.06 1/hr and 0.30 1/hr, is 0.232 g/L/hr, and substrate used ratio is 0.306. And the case of the first tank fed mixture solution substrates and the second tank fed pure glucose of two-tank continuous fermenting, mixture solution fed dilution rate 0.015 – 0.1 1/hr, and pure glucose fed dilution rate 0.050 1/hr, and dilution rate of liquid flowing from the first tank into the second tank 0.0005 1/hr, equivalent to the volume of the second tank being at least 30 times of the volume of the first tank, can get the most ideal ethanol production rate 0.267 g/L/hr, but neither ethanol produced ratio 0.323 nor substrate used ratio 0.34 are ideal. Because dilution rate is lower, ethanol production rate is lower, but ethanol produced ratio and substrate used ratio are higher. That is ethanol produced ratio and substrate used ratio needing sacrificing in order to obtain the highest ethanol production rate.

Keywords : continuous fermentation、*Pichia stipitis*、bio-ethanol、operating strategy

Table of Contents

封面內頁 簽名頁 中文摘要	iii	英文摘
要	v	誌謝
錄	viii	圖目錄
錄	xiii	1. 前言
顧	3	2.1 共發酵
子	4	2.3 共發酵之動力模式
式	6	2.3.1 Monod模
式	6	2.3.2 Contois模式
式	7	2.3.3 Modified Contois模
究	7	2.3.4 動力模式之應用
生長模式	8	2.4 共發酵之動力模式研
立	10	3. 研究方法
式	12	3.1 控制論模式建構之微生物
式	12	3.2 單槽動態模式
式	18	3.3 雙槽連續式之動態模式建
式	20	3.3.1 僅第一槽單進料之雙槽串聯連續式發酵之公式
式	21	3.3.1.1 第一槽公
式	21	3.3.1.2 第二槽公式
式	23	3.3.2 第一槽雙進料之雙槽串聯連續式發酵之公
式	24	3.3.2.1 第一槽公式
式	24	3.3.2.2 第二槽公式
式	25	3.3.3 分別於一、二槽
式	25	3.3.3.1 第一槽公式
式	26	3.3.3.2 第二槽公
式	26	3.4 生產指標
式	27	3.4.1 單槽連續式發酵之生產指

標-----	28 3.4.2 雙槽串聯連續式發酵之生產指標-----	28 3.4.2.1 第一槽單進料-----	28
3.4.2.2 第一槽雙進料-----	29 3.4.2.3 分別於一、二槽之雙進料-----	29 3.5 參數與初始值的代	
入-----	30 3.6 模擬實驗-----	32 3.6.1 單槽批次實	
驗-----	32 3.6.2 單槽連續式實驗-----	34 3.6.3 雙槽連續式實驗的方	
法-----	34 4. 結果與討論-----	40 4.1 批次發酵的模擬結	
果-----	40 4.2 單槽的連續式發酵的模擬結果-----	44 4.3 雙槽的連續式發酵的模擬結	
果-----	46 4.3.1 第一槽單進料混合液而第二槽不進料 (case A) -----	51 4.3.2 第一槽單進料純葡萄糖液而第二	
槽不進料 (case B) -----	51 4.3.3 第一槽進料混合液與純葡萄糖液而第二槽不進料 (case C) -----	56 4.3.4 第	
一槽進料混合液與第二槽進料純葡萄糖液 (case D) -----	61 4.3.5 第一槽進料純葡萄糖液與第二槽進料混合液		
(case E) -----	64 4.4 討論-----	67 5. 結	
論-----	72 參考文獻-----	74 參數符號	
說明-----	76 附錄-----	78 圖目錄 圖3.1	
僅第一槽單進料之串聯雙槽連續式發酵之示意圖-----	22 圖3.2 第一槽雙進料之串聯雙槽連續式發酵之示意圖-----	22 圖3.3 分	
別於一、二槽進料之串聯雙槽連續式發酵之示意圖-----	22 圖4.1 模擬批次混合液發酵時各項濃度與時間之關係-----	41 圖4.2	
模擬批次混合液發酵時各項指標與總時間的關係-----	42 圖4.3 模擬批次純葡萄糖液發酵時各項濃度與時間之關係-----	43	
圖4.4 模擬批次純葡萄糖液發酵時各項指標與總時間之關係-----	43 圖4.5 模擬單槽連續式混合液中各項濃度		
與稀釋速率的關係-----	45 圖4.6 模擬單槽連續式純葡萄糖液中各項濃度與稀釋速率的關係-----	45	
圖4.7 模擬混合液單槽曲線圖，X軸為單槽稀釋速率， part 1-----	47 圖4.8 模擬混合液單槽曲線圖，X軸為單槽		
稀釋速率， part 2-----	48 圖4.9 模擬純葡萄糖液單槽曲線圖，X軸為單槽稀釋速率， part 1-----	49	
圖4.10 模擬純葡萄糖液單槽曲線圖，X軸為單槽稀釋速率， part 2-----	50 圖4.11 模擬雙槽case A的等高線圖，X軸		
與Y軸為第一槽與第二槽之稀釋速率， part 1-----	52 圖4.12 模擬雙槽case A的等高線圖，X軸與Y軸為第一槽與第二槽之稀釋		
速率， part 2-----	53 圖4.13 模擬雙槽case B的等高線圖，X軸與Y軸為第一槽與第二槽之稀釋速率， part 1-----	54 圖4.14 模擬	
雙槽case B的等高線圖，X軸與Y軸為第一槽與第二槽之稀釋速率， part 2-----	55 圖4.15 模擬case C的第一槽等高線圖，X軸		
與Y軸為兩個進料稀釋速率， part 1-----	57 圖4.16 模擬case C的第一槽等高線圖，X軸與Y軸為兩個進料稀釋速率， part		
2-----	58 圖4.17 模擬雙槽case C的等高線圖，X軸與Y軸為兩個進料稀釋速率，當DII = 0.7 1/hr， part 1-----	59 圖4.18 模	
擬雙槽case C的等高線圖，X軸與Y軸為兩個進料稀釋速率，當DII = 0.7 1/hr， part 2-----	60 圖4.19 模擬雙槽case D的等高		
線圖，X軸與Y軸為兩個進料稀釋速率，當DII1 = 0.0005 1/hr， part 1-----	62 圖4.20 模擬雙槽case D的等高線圖，X軸與Y軸		
為兩個進料稀釋速率，當DII1 = 0.0005 1/hr， part 2-----	63 圖4.21 模擬雙槽case E的等高線圖，X軸與Y軸為兩個進料稀釋		
速率，當DII1 = 0.5 1/hr， part 1-----	65 圖4.22 模擬雙槽case E的等高線圖，X軸與Y軸為兩個進料稀釋速率，當DII1 = 0.5		
1/hr， part 2-----	66 表目錄 表3.1 王 (2008) 研究所得到的參數數據-----	31 表3.2 一些初始值與變數的輸	
入-----	33 表3.3 批次的一些初始值與變數的輸入-----	35 表3.4 第一種單槽連續式的一些初	
始值與變數的輸入-----	36 表3.5 第二種單槽連續式的一些初始值與變數的輸入-----	36 表3.6 五種雙槽連續式的進料基質情	
形-----	38 表4.1 比較混合液發酵的批次、單槽連續式與雙槽連續式之最佳結果-----	69 表4.2 比較純	
葡萄糖液發酵的批次、單槽連續式與雙槽連續式之最佳結果-----	69 表4.3 比較雙進料的雙槽連續式之最佳結		
果-----	70		

REFERENCES

1. 王子興。2008。以cybernetic模式建構Pichia stipitis菌之酒精發酵模式與操作策略分析。國立臺灣科技大學化學工程系碩士論文。
2. 王周芳、陳明、王冰冰、夏黎明。2007。基因重組酵母發酵木糖產酒精的研究。林產化學與工業。27 (3) :33-36。
3. 沈志忠、張聖明。2009。MATLAB程式設計與應用。全華出版社。台北，台灣。
4. 宋昕磊、張鵬。2007。不同條件對木糖酒精發酵菌種發酵性能的影響。釀酒。34 (1) :40-43。
5. 林志達。2004。酵母菌在混合糖醱酵之模式建立。國立中正大學化學工程研究所碩士論文。
6. 莊政道。1994。溶氧對木糖酒精發酵影響之研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文。
7. 張為憲等。1995。食品化學。華香園出版社。台北，台灣。
8. 曾勝賢。2009。生質柴油發電機排放多環芳香烴碳氫化合物特性之研究，國立屏東科技大學環境工程與科學研究所碩士論文。
9. 葉倍宏。2009。MATLAB 7程式設計基礎篇。全華出版社。台北，台灣。
10. C. Ben Youssef, V. Guillou, A. Olmos-Dichara. 2000. Modelling and adaptive control strategy in a lactic fermentation process. Control Engineering practice. 8:1297-1307.
11. Frank K. A., Guillermo CK, Mads TS, Kevin S. W. 2006. Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis. Process Biochemistry. 41:2333 – 2336.
12. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. 2005. Microbiology, Brief Edition. Pearson Benjamin Cummings.
13. H. R. Horton, Laurence A. Moran, K. Gray Scrimgeour, Marc D. Perry, J. David Rawn. 2006. Principles of Biochemistry, Fourth Edition. Pearson Education, Inc.
14. James C. du Preez, Machiel Bosch, Bernard A. Prior. 1986. Xylose fermentation by Candida shehatae and Pichia stipitis: effects of pH, temperature and substrate concentration. Enzyme and Microbial Technology. 8(6):360-364.
15. Jared L. H., Michael A. H., Radhakrishnan M. 2007. Genome-Scale Analysis of Saccharomyces cerevisiae Metabolism and Ethanol Production in Fed-Batch Culture. Biotechnology and Bioengineering. 97:1190-1204.
16. J. P. Delgenes, R. Moletta, J. M. Navarro. 1989. Communications to the Editor Fermentation of D-xylose,

D-glucose, L-arabinose Mixture by *Pichia stipitis*: Effect of the Oxygen Transfer Rate on Fermentation Performance. *Biotechnology and Bioengineering*. 34:398-402. 17. Keikhosro Karimi, Giti Emtiazi, Mohammad J. Taherzadeh. 2006. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochemistry*. 41:653-658. 18. Lei Zhao, Xu Zhang, Tianwei Tan. 2008. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass and Bioenergy*. 32, 1156-1161. 19. Masayuki Taniguchi, Toshihiro Tohma, Takahiro Itaya, Michihiro Fujii. 1997. Ethanol Production from a Mixture of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* and a Respiratory-Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 83(4):364-370. 20. P. J. Slininger, R. J. Bothast, M. R. Ladisch, M. R. Okos. 1990. Optimum pH and Temperature Conditions for Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 35:727-731.