

分批培养过程中有机酸浓度的在线估计

汪恩浩* 谷口正之 饭岛信司 小林 猛

(名古屋大学工学部化学工学科, 日本, 名古屋)

利用脉冲计数器积分碱泵动作时间, 并将其输入计算机以计算微生物发酵产生的有机酸浓度。这种在线估计方法运用于只生成乳酸的乳脂链球菌(*Streptococcus cremoris*)和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*), 以及能生成丙酸、醋酸和CO₂的谢氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanii*)的培养获得了成功。实验表明它是监控生成有机酸的微生物培养过程的一种有效方法。

关键词 在线估计; 有机酸浓度; 有机酸发酵; 乳脂链球菌; 干酪乳杆菌; 谢氏丙酸杆菌

微生物在培养过程中通常能将糖类代谢分解成有机酸, 从而导致培养液 pH 的逐渐下降。有时有机酸是培养的目的产物, 但它的积累往往抑制代谢过程。因此有机酸浓度和生成速度的估计对微生物的培养和控制很重要。

现在实验室用发酵罐可连续测定温度、pH、搅拌速度、溶氧和CO₂浓度等参数, 利用气体分析仪和计算机还可以在线测定耗氧速度、CO₂释放速度和呼吸商。最近又出现了可连续测定发酵液中葡萄糖浓度和细菌浊度的装置^[1,2]。发酵液中有机酸的浓度仍采用定期取样、人工分析的方法测定。分析乳酸的方法有比色法、高效液相色谱法、酶法等。最近报道了用酶电极测定乳酸的方法^[3,4], 但尚不能直接在线测定发酵液中的乳酸。定期取样分析方法对于生长迅速的微生物, 测到的只是相当过时的数据, 难以用于对培养过程进行精确、有效的控制。

Luedeking^[5]在同型乳酸发酵过程中定期记录加入发酵罐中碱的体积, 由此换算成乳酸浓度。再图形微分乳酸浓度的时间曲线, 得到产酸速度。作者用恒 pH 计

控制一个蠕动泵加碱于罐内, 以维持发酵罐内 pH 恒定。将碱浓度和加碱用蠕动泵的流速固定, 用计算机记录并积分泵动作的时间, 同时换算成酸浓度和产酸速度。本文报道此方法及其应用的实验结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养基

参见下表。

(二) 培养装置

当罐内 pH 低于 6.6 时, pH 自动控制仪启动蠕动泵, 将事先精确标定好的 NaOH 溶液加入罐内。蠕动泵动作时间被转变为 0.2 秒的脉冲输入计算机(NEC PC-9801), 见图 1。转换装置在图中以虚线表示。计算机根据碱浓度、泵的流速、培养时间和泵动作时间算出酸浓度和产酸速度。

(三) 培养方法

菌培养液在无菌条件下离心(8000 rpm, 5 min), 弃去上清液, 菌体用少量灭菌后培养基分散, 接种于装有培养基的

本文于 1987 年 5 月 22 日收到。

* 现在单位: 北京市营养源研究所。

菌种和培养基

| 菌种 | <i>S. cremoris</i> | | <i>L. casei</i> | | <i>P. shermanii</i> |
|---|--------------------|--------|-----------------|--------|---------------------|
| | 种子 | 发酵 | 种子 | 发酵 | |
| 培养基成分 (%) | 种子或发酵 | | | | |
| 葡萄糖 | 2 | 5 | | | 2 |
| 乳糖 | | | 2 | 5 | |
| 蛋白胨 | 1 | 1 | 0.8 | 0.8 | 1 |
| 酵母膏 | 0.5 | 0.5 | | | 0.5 |
| 肉膏 | 0.5 | 0.5 | | | |
| 醋酸钠 | 0.5 | | 0.5 | | |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.05 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.0167 | 0.0167 | 0.05 | 0.05 | |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.0033 | 0.0033 | 0.0033 | 0.0033 | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.0013 | 0.0013 | 0.0013 | 0.0013 | |
| NaCl | | | 0.01 | 0.01 | |
| 枸橼酸铵 | 0.2 | | 0.1 | | |
| L-半胱氨酸 | 0.01 | | | | |
| 吐温-80 | 0.1 | | | | |
| pH | 6.6 | | 6.6 | | 6.6 |
| 温度 | 30°C | | 37°C | | 30°C |

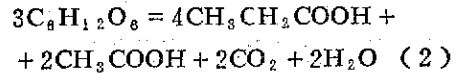
C 碱浓度 (mol/L)

 M_w 乳酸分子量 (g/mol)

V 培养液体积 (L)

乳酸在30°C时, $pK_a = 3.86$, 当pH = 6.6时, 仅有不到0.2%的乳酸未电离, 可忽略不计。

P. shermanii 将葡萄糖转化为丙酸和醋酸的反应按下式进行^[8]:



令 $\text{CH}_3\text{COO}^- = \text{A}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = \text{B}$, $\text{HCO}_3^- = \text{C}$, 忽略碳酸的二次电离和气化, 则

$$\frac{[\text{H}^+][\text{A}]}{[\text{HA}]} = K_{a1A} \quad (3)$$

$$\frac{[\text{H}^+][\text{B}]}{[\text{HB}]} = K_{a1B} \quad (4)$$

$$\frac{[\text{H}^+][\text{C}]}{[\text{HC}]} = K_{a1C} \quad (5)$$

$$[\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}] = r_p \cdot \Sigma t_p \cdot C/V = d \quad (6)$$

$$[\text{HB}] + [\text{B}] = 2[\text{HA}] + 2[\text{A}] \quad (7)$$

$$[\text{HA}] + [\text{A}] = [\text{HC}] + [\text{C}] \quad (8)$$

30°C时, $K_{a1A} = 1.75 \times 10^{-5}$, $K_{a1B} = 1.34 \times 10^{-5}$, $K_{a1C} = 4.49 \times 10^{-7}$ 。解

(3) — (8) 式得: $[\text{A}] = 0.275d$, $[\text{HA}] = 0.004d$, $[\text{B}] = 0.547d$, $[\text{HB}] = 0.010d$, $[\text{C}] = 0.178d$, $[\text{HC}] = 0.100d$ 。故培养液中醋酸的浓度为 $[\text{A}] + [\text{HA}] = 0.279d$, 丙酸的浓度为 $[\text{B}] + [\text{HB}] = 0.557d$ 。滴定度d是可以测定的。

有机酸生成的总速度可由下式求出:

$$Q_p = r_p \cdot [(\Sigma t_p) t + \Delta t - (\Sigma t_p)_t] \cdot C/V/\Delta t \quad (9)$$

(五) 分析

葡萄糖和乳糖用Somogyi法分析; 乳酸用酶法分析^[7]; 醋酸和丙酸用气相色谱

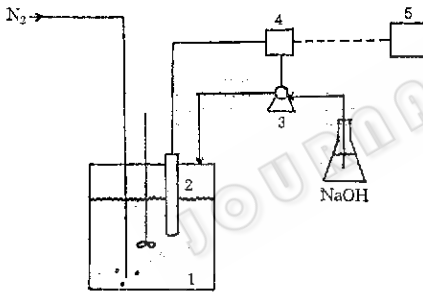


图1 培养装置简图

Fig.1 Schematic diagram of culture system

1. 培养罐 Fermenter 2. pH电极 pH electrode
3. 蠕动泵 Peristaltic pump 4. 自动电位滴定计 pH controller 5. 计算机 Personal computer

罐内。在培养过程中缓缓通入 N_2 气。

(四) 计算方法

培养液 pH 主要受生成的有机酸的影响, 设微生物在培养过程中只生产乳酸, 则

$$P = r_p \cdot \Sigma t_p \cdot C \cdot M_w / V / 6000 \quad (1)$$

式中: P 乳酸浓度 (g/L)

r_p 加碱泵流速 (ml/min)

Σt_p 加碱泵累计动作时间(sec)

谱法分析^[8]；测培养液在570nm处的光密度(OD₅₇₀)用以表示菌体浓度。

结 果

(一) 从Σt₂与OD₅₇₀的关系来看。S.cremoris在培养过程中，产酸与菌体生长在对数期显然是伴随型的。在对数期以后，菌体虽逐渐停止增殖，乳酸仍继续以相当高的速度产生，二者呈非伴随型关系(图2)。乳酸浓度的取样分析值与在线估计值符合得很好(图3)。不仅在伴随型的对数期，在非伴随型的培养后期，二者也是十分一致的。

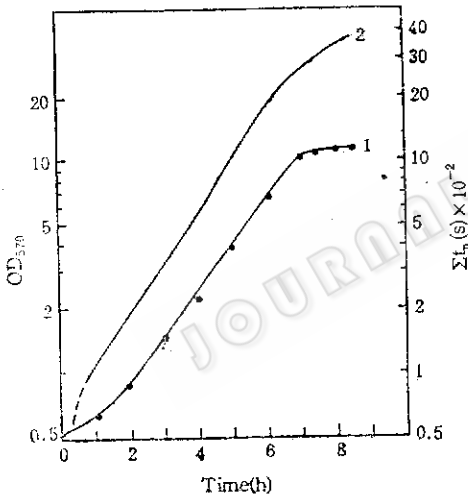


图2 分批培养过程中乳脂链球菌的密度和Σt₂
Fig.2 Cell density and Σt₂ versus time in batch-culture of S.cremoris

1. 菌体密度 Cell density OD₅₇₀ 2. 碱泵动作时间 Running time of alkaline feed pump Σt₂

(二) 由图3还可看出，乳酸生成速度的在线估计值在6.5h左右达最大值，然后急剧下降。Luedeking^[5]用只产乳酸的德氏乳杆菌(Lactobacillus delbrueckii)进行培养，乳酸生成速度也有一个最大值峰^[5]。当乳酸生成速度急剧下降时，残糖浓度尚高达20g/L，培养结束时，残糖

浓度仍在5g/L左右(图3)，说明产酸速度的下降不可能由于基质不足引起。实验证明^[9]，S.cremoris的比增殖速度随乳酸浓度的增加呈对数下降。随着培养的进行，乳酸对增殖的抑制越来越大，其浓度超过一定值时，乳酸菌增殖速度急剧下跌(图2)，产酸速度也随之下跌。

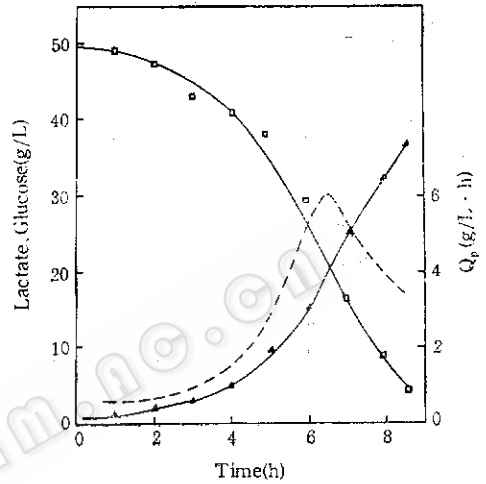


图3 乳脂链球菌分批培养过程中的乳酸浓度、乳酸生成速度和葡萄糖浓度

Fig.3 Lactate concentration, rate of lactate production and glucose concentration during batch-culture of S.cremoris

▲ 乳酸(测定值) Lactate (measured value)(g/L)
— 乳酸(估计值) Lactate (estimated value)(g/L)
--- 乳酸生成速度 Rate of lactate production (g/L·h)
□ 葡萄糖浓度 Glucose concentration(g/L)

(三) 培养L.casei时也得到了类似结果。在菌增殖进入静止期以前，增殖与产酸也呈伴随型。乳酸浓度的测定值与在线估计值基本上符合一致。乳酸生成速度在10h左右达最大值，然后下降(图4)。

(四) P.shermanii在培养结束时(40h)，其滴定度d=93.3mmol/L，则[H₂CO₃]=0.1d=9.3mmol/L，远低于CO₂在水中的溶解度30mmol/L(30℃)。故在培养过程中H₂CO₃的气化可以忽略的假设成立。由图5可见，进入静止期以前，菌体增殖与总酸也呈伴随型关系。醋酸和

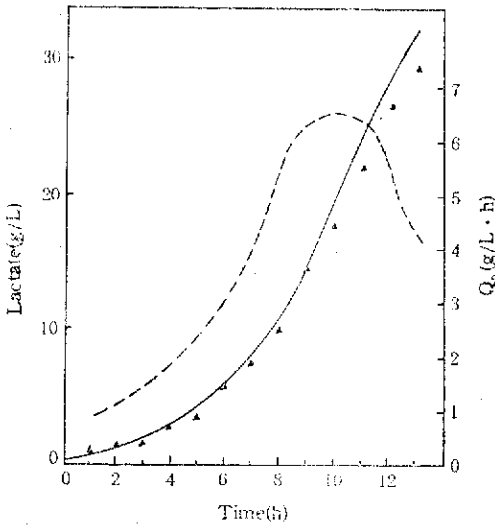


图4 干酪乳杆菌分批培养过程中的乳酸浓度、乳酸生成速度

Fig.4 Lactate concentration, rate of lactate production during batch-culture of *L. casei*

▲ 乳酸 (测定值) Lactate(measured value) (g/L)
 —— 乳酸 (估计值) Lactate(estimated value) (g/L)
 ···· 乳酸生成速度 Rate of lactate production (g/L·h)

丙酸浓度的在线估计值与测定值符合得相当好。和前述两株乳酸菌的培养一样，产酸速度也有一个很陡的最大值峰(图6)。

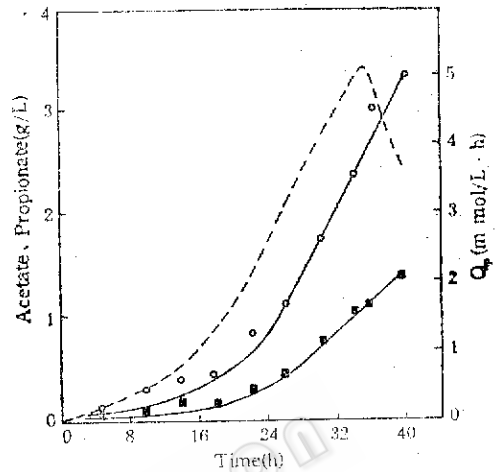


图6 谢氏丙酸杆菌分批培养过程中的醋酸和丙酸浓度以及总酸生成速度

Fig.6 Acetate and propionate concentrations and rate of total acid production during batch-culture of *P. shermanii*

■ 醋酸 (测定值) Acetate(measured value) (g/L)
 ○ 丙酸 (测定值) Propionate(measured value) (g/L)
 —— 估计值 Estimated value (g/L)
 ···· 酸生成总速度 Rate of total acids production (mmol/L·h)

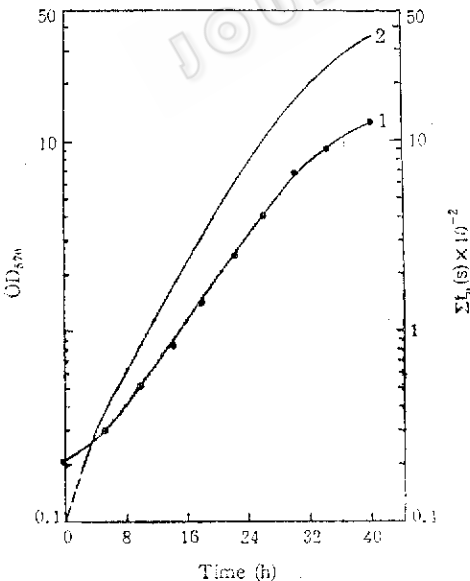


图5 分批培养过程中谢氏丙酸杆菌的密度和 Σt_p
 Fig.5 Cell density and Σt_p versus time during batch-culture of *P. shermanii*

1. 菌体密度 OD_{570} 2. 碱泵动作时间 Σt_p

讨 论

(一) 所试两种乳酸菌能把单一基质转化为单一的产物(乳酸)，中间产物和副产物的生成可以忽略。培养过程中，乳酸浓度的取样分析值与根据加碱泵动作时间得到的估计值相互一致，证明了这一在线估计方法的可靠性和可行性。

(二) 用能产生一种以上酸的 *P. shermanii* 进行了实验。根据有机酸和 CO_2 在培养液中的摩尔比以及酸的电离常数，可决定各种酸在总滴定度中占的比例。醋酸和丙酸浓度的估计值和测定值十分吻合，从而预示该法也有可能用于其他能生成一种以上有机酸的复杂培养系统。

(三) 在微生物培养过程中, pH 的变化不仅取决于产酸, 而且受培养基成分和培养条件等因素的影响。利用上述方法在线估计有机酸浓度时, 因为 pH 是从培养罐外部加碱控制, 故可除去培养基中仅起缓冲作用的生理碱性或酸性盐等成分。

(四) 这种在线估计方法与取样分析或图解微分不同, 它得到的是有机酸的即时浓度, 而不是几小时、十几小时以前的过时信息, 以及有机酸产生的准瞬时速度(约 5 min 内的平均值), 也不是以小时计算的培养时间内的平均速度。无疑这对于及时把握培养状况, 精确有效地控制培养过程非常重要。近年来盛行发酵动力学的研究, 并开始用于发酵过程控制和最优化。这种在线估计方法可以迅速得到有机酸浓度和生成速度的数据, 可望成为研究某些微生物生长、代谢动力学的有效工具。

(五) 根据菌体浓度和产酸速度, 可得到比产酸速度, 它代表单个细胞的代谢活性, 是代谢抑制产物浓度和限制性基质浓度的敏感性函数。作者利用一种能连续测定细菌、酵母之类菌体浓度的仪器与本文所述在线估计有机酸的系统联用, 成功地在线估计了 *S. cremoris* 在培养过程中的

比活性^[10]。

(六) 由于有机酸对细胞代谢的抑制, 本文所试 3 种菌的增殖速度和产酸速度在分批培养过程中均增加到最大值后即迅速下降。由此设想如在产酸速度剧降之前, 将有机酸滤出培养体系, 则可使细胞维持对数增长速度, 很快达到很高的浓度, 同时得到很高的产酸速度。我们利用过滤培养技术, 培养了 *P. shermarii*。在对数增殖后期开始过滤操作, 借助于超滤装置滤去代谢抑制物醋酸和丙酸, 同时向罐内流加新鲜培养基。经 70h 培养, 菌体浓度达 227g (干重) /L^[11]。

(七) 作者将 *S. cremoris* 的过滤培养系统当成生产乳酸的生物反应器。为了实现乳酸的高效率生产, 有必要把罐内乳酸浓度控制在最佳值附近。作者根据乳酸生成速度和乳酸因过滤而被排出的速度构成微分方程, 用计算机在线解此方程得乳酸浓度。当乳酸浓度高于设定的最佳值时, 由计算机启动滤液泵, 反之则关闭滤液泵。结果成功地将乳酸浓度控制在 $\pm 10\%$ 设定值以内^[10]。证明该法不仅可应用于有机酸的分批培养, 且有可能应用于连续或半连续培养系统的监测与控制。

参 考 文 献

- [1] Mizutani, S., et al.: *J. Ferment. Technol.*, 65: 330, 1987.
- [2] Iijima, S., et al.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, (in press).
- [3] 松永 是等: 日本化学会誌, 10: 1537, 1980.
- [4] Tsuchida, T., and Yoda, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, 3: 326, 1981.
- [5] Luedeking, R., and Piret, E. L.: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Engng.*, 4: 393, 1959.
- [6] Stanier, R. Y., et al.: *The microbiol world*, 4th edition, p. 692, 1976.
- [7] Taniguchi, M., et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 438, 1987.
- [8] Taya, M., et al.: *J. Ferment. Technol.*, 58: 463, 1980.
- [9] Taniguchi, M., et al.: *J. Ferment. Technol.*, 65: 179, 1987.
- [10] Wang, E., et al.: *J. Chem. Eng. Japan*, 21(1): 36—40, 1988.
- [11] Hatanaka, H., et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 470, 1988.

ON-LINE ESTIMATION OF ORGANIC ACID CONCENTRATION IN BATCH CULTURE

Wang Enhao Masayuki Taniguchi Shinji Iijima Takeshi Kobayashi
(Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering Nagoya
University, Nagoya, Japan)

In microbial culture, pH of the broth drops gradually when the organisms produce organic acid(s) as metabolite(s). Usually, the pH is maintained constant by pH-stat: alkaline solution is supplied into the medium by a pump. In this paper, running time of alkaline feed pump was integrated by a pulse counter and transmitted to a personal computer to calculate the production rate of organic acid(s). This on-line estimation method was successfully applied to the cultures of *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus casei* that produce only lactate. The method also could work very well with *Propionibacterium shermanii* which produces propionate and acetate in addition to carbon dioxide. These results indicate that this on-line estimation is very effective for monitor and control of culture of microorganisms that produce organic acids.

Key words

On-line estimation; organic acid concentration; organic acid fermentation; *Streptococcus cremoris*; *Lactobacillus casei*; *Propionibacterium shermanii*;