

以摇瓶所得摄氧率为基准进行发酵放大

范代娣

俞俊棠

(西北大学化工系 西安 710069) (华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

摘要 通过设计特殊摇瓶,用亚硫酸盐法测出摇瓶口纱布层氧通透率的基础上,在实际发酵情况下通过测定瓶内气、液相氧的变化得出其发酵过程中的摄氧率(OUR)及氧传递系数(K_La)。以特制摇瓶取得的菌体 OUR 为基准进行发酵过程和发酵罐的放大。通过质谱仪在线检测及采样分析,研究了3种不同供气流量及搅拌转速下的放大结果。摇瓶与发酵罐在菌体 OUR 、菌体产量方面吻合很好,而在整个放大过程中,发现摇瓶与发酵罐内的氧传递系数(K_La)、溶解氧(c_L)差异较大。

关键词 摇瓶, 摄氧率, 氧传递系数, 发酵放大

发酵过程的放大不但需要一定的工艺信息而且还必须具备一定的工程信息,而在常规摇瓶中难以获得这些信息。60年代初,我国学者朱守一等^[1]对摇瓶与发酵罐中的通气搅拌效率的测定与对比作过探讨。合叶修一^[2]、石川阳一^[3]、清水羲浩^[4~5]、李友荣等^[6]也作过摇瓶用于工程放大方面的研究及讨论,但均不能在真实发酵条件下测得 OUR 、 K_La 等工程参数。本文通过设计特殊摇瓶在用亚硫酸盐法测定摇瓶口纱布层氧通透率^[7]的基础上,着重报道用这种特制摇瓶进行啤酒酵母的培养以测定真实发酵情况下的 OUR 、 K_La 等工程参数并以 OUR 为依据进行发酵过程和发酵罐的放大。

1 实验材料、方法与计算

1.1 实验装置

1.1.1 特制摇瓶(见图1)

1.1.2 发酵罐:采用西德B. Braun公司生产的BIOSTAT B型2.5发酵罐。

1.2 发酵

1.2.1 菌株:啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

1.2.2 发酵液:麦芽汁(由力波啤酒厂提供)

1.2.3 摇瓶发酵条件:25℃,种量10%~20%,转速180~250r/min,偏心矩1.5cm。

1.2.4 罐发酵条件:25℃,接种量10%,通气量: $F=0.5\sim1.2\text{L/min}$,搅拌转速:300~450r/min。

1.3 参数检测及分析

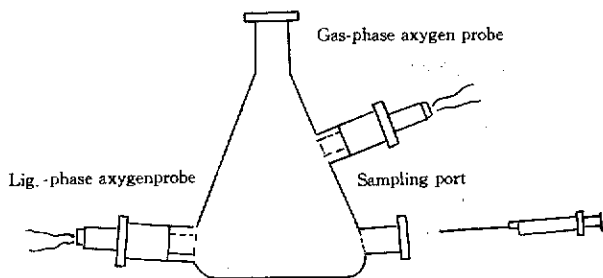


图1 特制摇瓶
Fig. 1 Specially designed shake flask

1.3.1 溶氧、气相氧：摇瓶内气相氧、溶解氧的测定由直接插入瓶壁接口中的氧探头测定氧的饱和度，由记录仪记录其变化；罐内溶解氧测定由罐体溶氧检测部分进行检测。

1.3.2 发酵过程中菌体产量及糖耗的测定：取不同发酵时期的样液，用斐林法^[8]测定其糖耗；菌体干重的测定则是量取定量液样，在离心机上 4 000r/min 离心 10min，称鲜重，80℃下烘 24h 称干重。

1.3.3 尾气分析：用英国 VG 公司生产的 Prima 600 型质谱仪在线检测进、出口氧气 (O₂)、惰性组分氮气 (N₂)、氩 (Ar) 及排气二氧化碳 (CO₂) 含量。

1.4 质谱仪的标定及罐内氧电极溶解氧百分点及零点标定

用上海市测试技术研究所的 He 99.995%；Ar 1.0%，CO₂ 3.07%，O₂ 18.0%，N₂ 余；CO₂ 2.95%，Ar 余 3 种不同组份的标定气标定。溶氧零点的标定是在刚刚灭菌后，趁高温调零点；溶氧百分点饱和值的标定是在未接种前与发酵操作完全相同条件（搅拌转速、发酵温度、供气速度）下进行设定。

1.5 计算公式

1.5.1 摇瓶发酵

$$OUR = P_m A (p_{atm} - p_{iask}) / v_L \quad (1)$$

$$K_L a = OUR / (c_{iask}^* - c_L) \quad (2)$$

1.5.2 罐发酵时 OUR 、 $K_L a$ 、 CO_2 释放率 (CER) 的计算：

$$\begin{aligned} OUR &= (F_{CO_2 in} - F_{CO_2 out}) \times 60 \times 10^3 \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{22.4} \\ &= \frac{F}{v} \times 60 \times 10^3 \times \frac{1}{22.4} (c_{CO_2 in} - c_{CO_2 out}) \end{aligned} \quad (3)$$

$$K_L a = OUR / (c^* - c_L) \quad (4)$$

$$\begin{aligned} CER &= (F_{CO_2 out} - F_{CO_2 in}) \times 60 \times 10^3 \times \frac{1}{22.4} \times \frac{1}{v} \\ &= \frac{F}{v} \times 60 \times 10^3 \times \frac{1}{22.4} (c_{CO_2 out} - c_{CO_2 in}) \end{aligned} \quad (5)$$

注：(3)、(5) 式输入质谱仪经质谱仪分析后在线示出。

2 实验结果

2.1 摇瓶实验

2.1.1 发酵过程中摇瓶内气相氧分压和液相氧浓度的变化：图 3 是培养条件下气相氧分压 (p_{iask}) 与液相氧浓度 (c_L) 随培养过程的变化情况。图上示出：气相氧分压与液相氧浓度的变化趋势比较一致，在刚刚接种 4h 内，气相氧分压与液相氧浓度几乎没多大变化，但 4h 后开始减小，液相氧浓度降低到最低点时气相氧浓度同样降至最低点，而后维持 2h 左右气相氧分压又开始缓慢回升，而液相氧未见明显回升，只有稍许波动。

2.1.2 发酵过程中摄氧率的变化情况：图 4 示出，在其它条件相同时，增加摇床转速， OUR 值增加，在摇床转速 (r/min)，为 18、220、250 时，其 OUR 最大值 (mmol/L·h) 分别为 10.80、11.60 和 13.94。在生长迟滞期， OUR 值有快速增加的趋势，而在对数生长阶段，其变化比较平缓。摇床转速的增加使得表面通气加剧从而使得氧传递率和摄氧率增大。根据文献 [9] 报道，啤酒酵母的最大 OUR 值为 10~15mmol/L·h，与用本法测定结果是基本一致的。

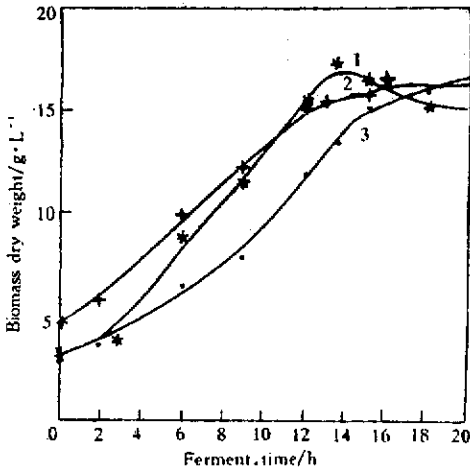


图 2 摇瓶发酵过程中菌体生长曲线

Fig. 2 Variation of biomass during shake flask fermentation

	Rotation Speed (n)/r · min ⁻¹	Inoculum (I) size/%
1.	250	10
2.	220	20
3.	220	10

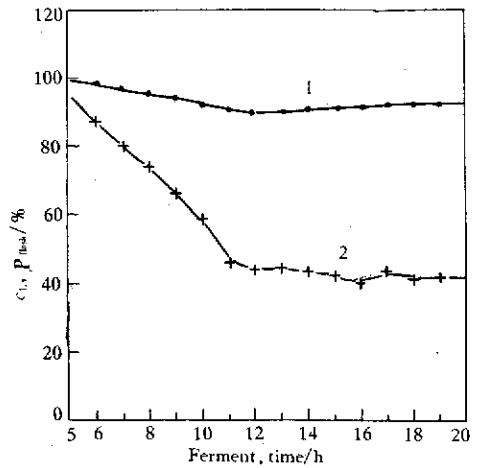


图 3 摇瓶内气相氧分压与液相氧浓度曲线

Fig. 3 Oxygen concentration variation of gas-phase and liquid-phase during fermentation course

I: 10%, n: 220r · min⁻¹
1. P_{gas}, 2. c_L

图 5 示出：在相同转速，不同接种量时，*OUR* 值在发酵前期差异较大。接种量为 10% 时，其 *OUR* 值在接种后第 13.5h 达极大值 11.60mmol/L · h，在 10~20h 内，其 *OUR* 值变化范围为 10~12mmol/L · h。对比图上曲线可以看出，接种量大者，在刚开始发酵时 *OUR* 值较接种量小者大，到对数生长末期，11h 后有急促下降的趋势，而接种量小者则因还未到菌体对数生长末期，其 *OUR* 值还具有稍稍上升趋势。

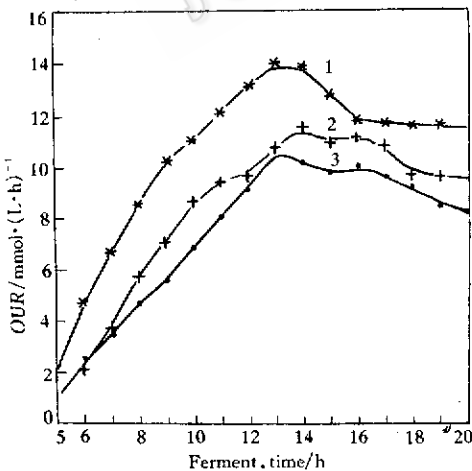


图 4 转速对发酵过程中 *OUR* 的影响

Fig. 4 Effect of shaker speed on oxygen uptake rate (*OUR*)

I: 10%; n/r · (min)⁻¹: 1. 250; 2. 220; 3. 180

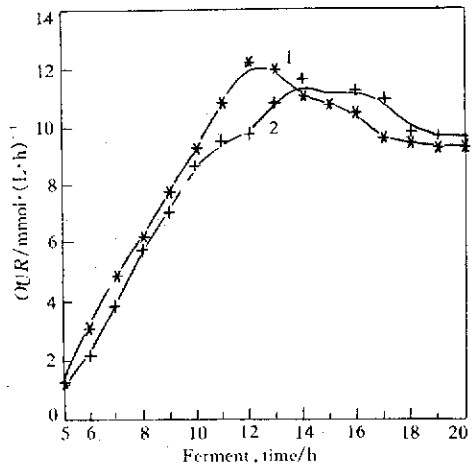


图 5 接种量对摄氧率 *OUR* 的影响

Fig. 5 Effect of inoculum on (*OUR*)

n: 220r · min⁻¹, I/%: 1. 20; 2. 10

2.1.3 发酵过程中氧传递系数 K_{La} 的变化情况: 图 6 示出, 在同样条件下, 随着摇床转速的增加, K_{La} 值增大, 当转速为 $180\text{r}/\text{min}$ 时, 发酵稳定期后 K_{La} 值在 50h^{-1} 左右, 而当摇床转速为 $220\text{r}/\text{min}$ 时, 发酵稳定期后 K_{La} 值为 90h^{-1} 左右, 当摇床转速增至 $250\text{r}/\text{min}$ 时, 发酵到达稳定期后 K_{La} 值为 120h^{-1} 左右。总的趋势是在刚刚开始发酵时, K_{La} 值很大, 随着培养时间的增加, 因菌体浓度增加, 培养液粘度增加而使 K_{La} 下降。

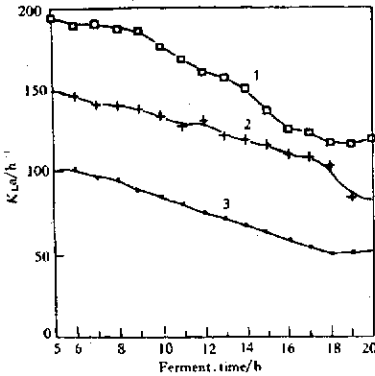


图 6 转速对发酵过程中 K_{La} 值的影响

Fig. 6 Effect of shaker speed on k_{La} during fermentation course

1: 10% ; $n/\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$; 1. 250; 2. 200; 3. 180

2.2 发酵罐内放大实验

图 7~10 是接种量为 10% , 供气流量为 $0.5\text{L}/\text{min}$, 搅拌转速为 $450\text{r}/\text{min}$ 时整个发酵放大过程中质谱仪在线检测数据图。

图 7 示出, 排气 O_2 含量在 13h 左右降至谷底 20.1193% , 之后又缓慢回升。图 8 示出, 排气 CO_2 在发酵 10h 左右出现峰值为 2.4783% , 之后又急促下降。由图 9 知, 在刚刚开始发酵时, 摄氧率急促升高, 13h 左右达峰值 ($\text{mmol}/\text{L} \cdot \text{h}$) 76.2 , 其后两小时内陡降至 6.73 , 而 16h 后 OUR 值几乎不变。 CO_2 释放率的峰值为 22 , 16h 后缓慢降低, 20h 后基本平稳。

本研究作了 3 种条件下的放大实验, 现将放大结果汇总如下表。由表 1 可以清楚地看出: 1. 增加搅拌速度或提高通气量, 均可使菌体摄氧率增大; 2. 摄氧率越大, 菌体产量也越高; 3. 以 OUR 为基准进行放大 (罐批 3) 所得菌体干重与摇瓶实验 ($n = 250\text{r}/\text{min}$) 所得菌体干重相等, 但 K_{La} 值差异较大, 这是因为 K_{La} 值除与系统物性有关外, 还与设备类型、特性、操作方式等有关。

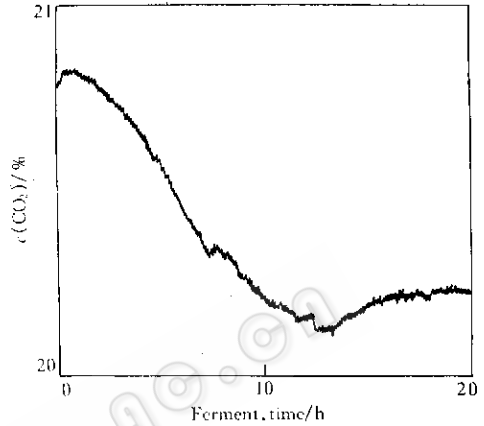


图 7 出口 O_2 浓度随发酵进程曲线

Fig. 7 Variation of exit O_2 conc. during ferment

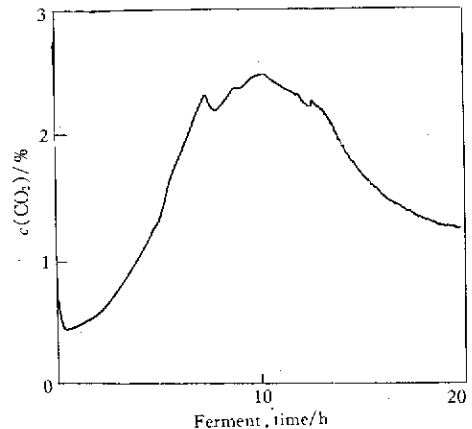


图 8 出口 CO_2 浓度随发酵进程曲线

Fig. 8 Variation of exit CO_2 conc. in ferment course

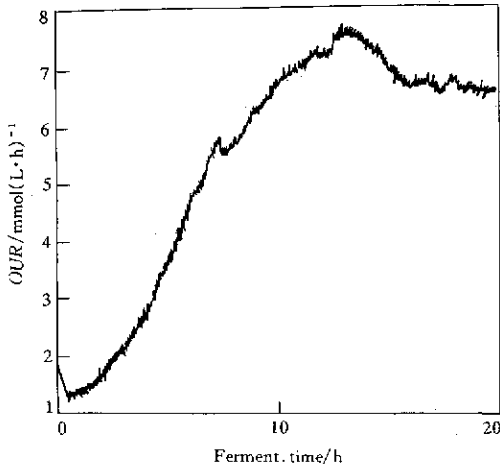
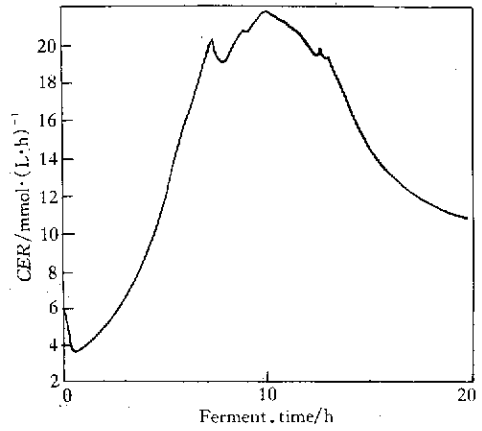
图 9 OUR 随发酵进程曲线Fig. 9 Variation of OUR during ferment.图 10. CO_2 释放率 (CER) 随发酵进程曲线Fig. 10 Variation of CER during ferment.

表 1 不同罐批放大结果比较

Table 1 Scale-up results under different fermentation condition

Parameters	Fermentation No.		
	1	2	3
$F_{in}/L \cdot \min^{-1}$	0.5	1.0	1.2
$n/r \cdot \min^{-1}$	450	380	450
$OUR/\text{mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	1.2~7.7	3~1.2	2~14.7
$CER/\text{mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	3.6~21.8	9~31	5~41.4
$O_2/\%$	20.96~20.11	20.96~20.37	20.96~20.29
$CO_2/\%$	115~50	78~40	0.4~1.99
$K_{La}/1/h$	115~50	78~40	167~80
pH	6.0~5.23	5.99~5.22	5.99~5.21
$\Delta S/S/\%$	48 (20h)	56.5 (20h)	69 (20h)
$X/g \cdot L^{-1}$	11.5 (20h)	14.9 (20h)	17.0 (20h)

注：一个发酵周期为 20h。

3 结论及建议

本文介绍了一种从摇瓶中直接测定发酵过程中摄氧率、氧传递系数等工程参数的便利方法，所测数据与文献报导数据相近。设计的摇瓶具有方便、可靠的优点并能同时连续测定整个培养或发酵过程中的 OUR 和 K_{La} ，它比以往实验室采用的华勃呼吸仪更方便，且能连续地在真实发酵情况下进行测定 OUR 及华勃呼吸仪不能测定的 K_{La} 值。它与实验室用可测 OUR 及 K_{La} 的小型发酵罐相比，具有价格便宜的优点，且不必使用昂贵的气体分析仪。这种特制摇瓶有望可作为过程和发酵罐放大的有力实验工具。对这种特制摇瓶及其功能的研究具有其独创性。 OUR 很可能至少是一类菌放大必需满足的技术指标。从啤酒酵母放大来看， OUR 增大，菌体产量增加；开展是否有临界 (OUR)_{crit} 的研究，这对于供气的经济性有很重要的价值。

符 号 说 明

OUR ——摄氧率/ $\text{mmol} (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	c_L ——溶解氧浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
P_m ——氧通透率/ $\text{mmol} (\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{MPa})^{-1}$	F ——标态下气体流量/ $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$
A ——摇瓶口内截面积/ m^2	X ——生物量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
p_{atm} ——大气中氧分压/ MPa	$c_{\text{O}_2, \text{in}}, c_{\text{O}_2, \text{out}}$ ——分别为进、出口氧浓度/%
p_{flask} ——摇瓶内氧分压/ MPa	v ——发酵液体积/ L
v_L ——摇瓶内装培养液量/ L	c^* ——最大溶氧饱和浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
$K_{L,a}$ ——体积氧传递系数/ $1/\text{h}$	CER —— CO_2 释放率/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
c_{flask} ——与 p_{flask} 相对应的饱和氧浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 本研究采用的 c^* 为同温、同压下纯水 c^* 的 80% ^[9]	$c_{\text{CO}_2, \text{in}}, c_{\text{CO}_2, \text{out}}$ ——分别为进、出口 CO_2 浓度/%

参 考 文 献

- [1] 朱守一, 李 祯, 熊泉福. 抗菌素研究-I. 上海: 上海科学技术出版社, 1963, 211~255.
- [2] 合叶修一. 生物化学工程, 上海: 上海轻工业出版社, 1981, 267~277.
- [3] 石川阳一. 公开特许公报, 昭 59~109169, 6月23日, 昭和 59年 (1984).
- [4] 清水義浩, 山田勝成. 公开特许公报, 昭 64-90044, 4月5日, 昭和 64年 (1989).
- [5] 渡部乙比古, 桂 徼. 公开特许公报, 昭 64-68511, 3月14日, 昭和 64年 (1989).
- [6] 李友荣, 储 炬. 生物工程学报, 1991, 7 (1): 95.
- [7] 范代娣, 俞俊棠, 魏东芝. 生物工程学报, 1994, 10 (2): 114.
- [8] 朱懿德. 工业发酵分析, 北京: 中国轻工业出版社, 1991, 37~59.
- [9] 叶 勤, 俞俊棠. 华东化工学院学报, 1982, 8 (3): 313.

Research on Fermentation Scale-up Bases on the OUR Obtained from Shake Flask

Fan Daidi Yu Juntang*

(Chemical Engineering Department of Northwest University, Xian 710069)

(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)*

Abstract On the basis of determination of oxygen permeability p_m of gauze layers covered on a specially designed shake flask by the method of sulfite oxidation, the variations of gas-phase and liquid-phase oxygen concentration were measured during the course of fermentation and then the oxygen uptake rate (OUR), oxygen transfer coefficient ($K_{L,a}$) could be determined. Fermentation process and fermentor scale-up were carried out based on the $(OUR)_{\text{max}}$ obtained from shake flask. With scale-up process was studied in different air flow and agitation speed in 2.5L fermentor. Through the analysis by mass spectrometer and sampling, it was found that OUR and biomass obtained from fermentor were little different with that obtained from shake flask, but quite different in $(K_{L,a})$ and c_L .

Key words Shake flask, oxygen uptake rate, oxygen transfer coefficient, fermentation scale-up.