

基于酶电极系统的葡萄糖浓度在线控制

贾宗剑 张先恩*

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

补料分批技术在发酵工业中被广泛应用,其物流加方式有3类,其中恒流速和指数补料属无反馈控制操作,靠经验或预设的数学模型决定补料速度,但由于发酵过程的复杂性,实际过程往往偏离预设的模型;恒底物浓度流加属反馈控制,通过对特定参数的检测,根据参数的变化情况反馈控制物料的流加,可控制菌生长在最佳条件下,从而获得高浓度的目的产物。反馈控制分直接控制和间接控制。间接控制是以溶解氧、pH、尾气中CO₂分压等为检测参数,结合数学模型,判断发酵状态控制底物流加^[1-3]。直接控制是对发酵底物进行适时测定,根据底物消耗情况,通过指示执行机构补料。由此可见,直接控制显然优于间接控制。遗憾的是由于技术上的障碍,尤其缺乏在线测量重要参数的传感器,使直接控制方式的使用受到限制,随着传感技术,尤其生物传感技术和采样技术的进步,已发展了一些在线检测系统^[4-9]。由于葡萄糖是广泛使用的微生物碳源底物,对它的在线检测显得尤为重要。Mizutani等^[6]和Ghoul等^[7]分别用葡萄糖酶电极系统和葡萄糖自动分析仪实现了对酵母发酵的葡萄糖在线控制。本实验室曾报道过酶电极葡萄糖在线检测研究^[9]。本文利用此系统,采用ON-OFF补料策略,实现了恒定葡萄糖浓度在线控制,并初步分析了在不同的糖浓度下大肠杆菌(*E. coli*)生长变化情况。

1 材料与方 法

1.1 工作系统

工作系统流程图见图1。大肠杆菌培养是在简易的2l玻璃发酵罐(自制)中进行的。培养液以1.6ml/min的速率通过管式过滤器(德国ABC公司)连续取样,由蠕动泵(LDB-M,象山仪器厂)送入自动进样阀(16-A,信通公司)。注射频率为每3分钟一次,将样品送入FAS/C系统^[6]测糖。取样体积为50 μ l,载流液为自来水,一个测定周期为1.5min。过滤的样品液通过 ϕ 0.45 μ m醋酸纤维素膜(上海医工院)回流发酵罐。当样品的测定浓度低于在FAS/C主机中设定的控糖阈值时,FAS/C主机启动

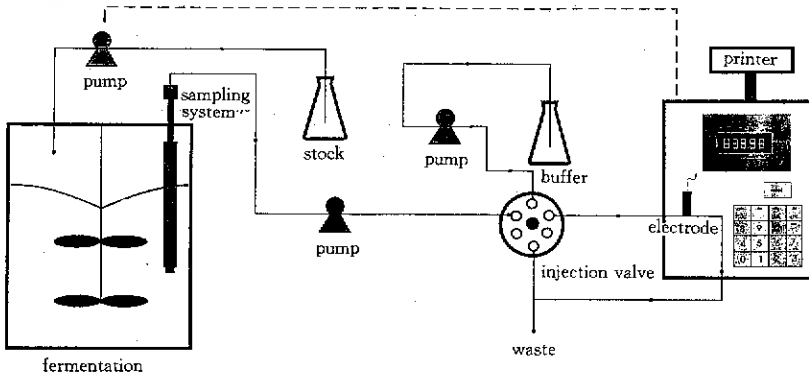


图1 工作系统流程图

Fig. 1 Schematic diagram of working system

联系人。

本文于1994年12月12日收到。

蠕动泵补糖,并以 ON-OFF 方式控制补料。

1.2 酶电极制作

酶电极的基本制作方法参见文献 [10]。为获得高活性的酶膜来检控低浓度的糖,可适当加大 GOD 酶量。不用时,酶膜保存在 pH7 的磷酸缓冲液里,放置 4℃ 冰箱。

1.3 菌种及培养条件

大肠杆菌 *E. coli* 11130, 系本所赖林翰先生赠送。

培养基组成:蛋白胨 7.6g/L,牛肉膏 4.2g/L,NaCl5g/L,葡萄糖 6mmol/L(控 2mmol/L 和 5mmol/L 糖值)或 15mmol/L(控 10mmol/L 和 15mmol/L 时)。用自来水配制, pH7.2。

补糖溶液:牛肉膏 10g/L,葡萄糖 100mmol/L。自来水配制。

斜面菌种接一环入 100ml 培养液的三角瓶, 37℃, 150r/min, 摇床培养 14h。接入发酵罐(工作体积为 1.7L), 于 37℃ 培养。以 4.5L/min 的空气流量通过 $\phi 0.45\mu\text{m}$ 的醋酸纤维素膜过滤通气, 以磁力搅拌器(81-2, 上海司乐仪器厂)最大挡速搅拌。

1.4 分析方法

每 0.5 或 1h 取样, 以培养基为对照, 于 660nm 波长处测发酵液的 OD 值。将样品离心, 取上清在酶电极上离线测定糖浓度。

2 结果与讨论

2.1 控糖精度

利用 FAS/C 反馈控制系统将大肠杆菌发酵的葡萄糖浓度 (mmol/L) 分别控制在 2, 5, 10 和 15。图 2 是 5 和 10 糖浓度下菌的生长曲线和糖浓度变化。从图上可以看到葡萄糖浓度的控制误差大约为 $\pm 1.5\text{mmol/L}$, 离线 (2) 和在线 (3) 的测定值基本上吻合。

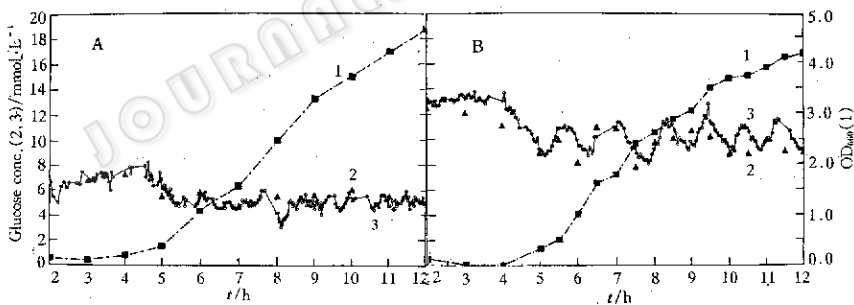


图 2 大肠杆菌的生长曲线及控糖曲线
葡萄糖浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: A. 5; B. 10

其它流加控制方式是基于间接参数指标,难以真实地反映底物浓度,控制较粗放。而本系统采用直接控制方式,底物浓度相对恒定。通过缩短从发酵器到酶电极的流程,提高过滤取样的速度和采样的频率,可以进一步提高控制精度。但一定的滞后是不可避免的。另外,补料液的糖浓度应尽可能高,一来可以满足微生物快速耗糖的需要,二来补料体积小,罐液体积变化不大,有利于结果分析。在本实验中从罐到电极的时间大约 2min,加上电极的响应洗脱时间 1min,总的滞后约 3min,采样频率为 3min。

2.2 发酵动力学分析

培养过程中补料液浓度约是控糖浓度的 10 倍,补料速度约 2ml/min,相比发酵体积,可以忽略补料带来的体积变化,故可以近似地求出菌在生长期的比生长速率。此外复合培养基中成分复杂,微生物生长经历连续变化,比生长速度不断降低,看不出明显的指数生长期^[11],但在发酵初期一段时间可以认为细菌只利用同种碳源、氮源和其它营养物,不产生二次生长,则这段时间的指数期比生长速率可表

现为一定值。表 1 列出大肠杆菌在 2, 5, 10, 15mmol/L 的糖浓度下发酵生长情况。

表 1 葡萄糖浓度控制水平与大肠杆菌的生长参数

| Glucose conc. /mmol · L ⁻¹ | Specific growth rate/h | Lag phase/h | Exponential phase/h | Production rate/g · (L · h) ⁻¹ |
|---------------------------------------|------------------------|-------------|---------------------|---|
| 2 | 0.470 | 2 | 7 | 0.42 |
| 5 | 0.655 | 3 | 5 | 0.52 |
| 10 | 0.965 | 4 | 3 | 0.46 |
| 15 | 1.210 | 5 | 3 | 0.36 |

* Production rates at 12th hour of fermentation.

从表 1 中看到菌生长随着控糖浓度的提高而加快, 另从图 3 可以看到比生长速率与糖浓度有线性相关, 求得线性方程 $u=0.3666+0.0573 \times [S]$, $r=0.9952$, 由此可认为 15mmol/L 糖浓度下的比生长速率仍在 K_s 值附近, 并没有达到大肠杆菌的最大比生长速率。这种反馈控制下的培养如忽略因补料带来的体积变化, 可以看作处准恒器状态, 适用 Monod 生长方程。图 4 是 $1/u-1/[S]$ 作图, 从 5, 10, 15mmol/L 糖浓度的点可得一线性方程 $1/u=0.4977+5.1718 \times [S]$, $r=0.9942$, 由此求得 $U_m=2.01/h$, $K_s=10.39\text{mmol/L}$ 。这一结果和文献 [9] 中大肠杆菌对葡萄糖的 K_s 值相差很大, 但文献 [9] 中给的两个值也相差甚远, 分别为 $6.8 \times 10^{-2}\text{mg/L}$ 和 4.0mg/L 。在 K_s 值左右比生长速率与基质浓度可认为成直线, 而本实验中比生长速率线性到 15mmol/L 糖浓度, 所得的 K_s 值和实验结果相吻合。另外由 U_m 求得大肠杆菌的倍增时间为 $T_d=20.69\text{min}$, 这也与文献 [9] 中大肠杆菌在最佳生长条件下的倍增时间 15~20min 接近。至于 K_s 值差异的原因还不清楚。

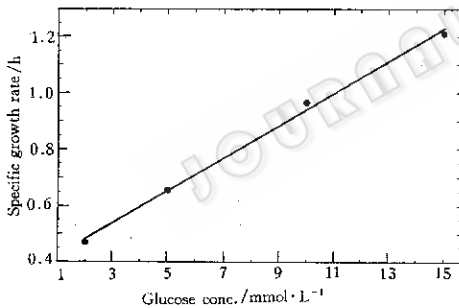


图 3 比生长速率与糖浓度回归曲线

Fig. 3 Regression curve of growth rate vs. glucose concentration

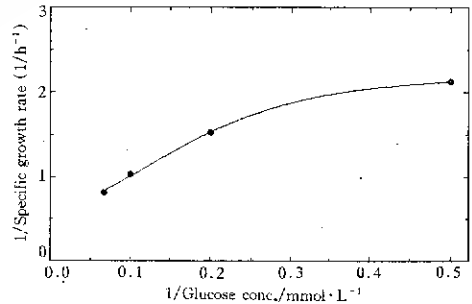


图 4 比生长速率与糖浓度的双倒数曲线

Fig. 4 Double reciprocal curve of growth rate vs. glucose concentration

从表 1 中也可看到大肠杆菌生长的延迟期随糖浓度提高而增长。原因可能是葡萄糖较易进入细胞, 而复合培养基中其它生长营养成分需要胞外分解或难以进入细胞, 接种后, 较高的糖浓度在细胞内可能导致某些代谢途径改变, 菌不平衡生长, 不利于分解胞外物质的酶和细胞分裂所需物质的合成, 这样就使较高糖浓度下菌适应新环境, 合成细胞分裂所需物质的时间增长, 导致延迟期增大, 这种现象可能也是本实验得到高 K_s 值的原因之一。

随着糖浓度的提高指数期缩短, 菌很快进入线性生长, 可能是较高糖浓度下菌生长快, 加上不平衡生长造成某些生长因子的浪费, 使较高糖浓度下某些生长因子较快地成为限制性物质。另外因实验条件的限制, 可能在发酵后期搅拌和通气没跟上, 导致供氧不足。

在分批培养中大肠杆菌在 10h 左右就进入稳定期, 补料延长了菌的生长期, 菌直至 14h 仍保持生长势头, 并且在实验条件下通过直接控糖, 获得了较 Kole 等人^[4]报道要高的生产率 (表 1), 他们通过

氨浓度的检控间接补料控糖, 获得了生物量为: $0.41\text{g/L}\cdot\text{h}$ 。

3 结 论

在以往的发酵研究中, 难以对底物直接检测, 动力学的研究多在恒化器中进行, 现在利用此系统可将葡萄糖较精确地控制在某一浓度下, 简化了研究过程, 方便实验结果的解析, 并且有利于补料分批技术的优化控制。我们用这一系统对大肠菌进行了补料分批的初步研究并分析了其发酵特性, 结果表明这一系统可成为发酵研究和优化补料工艺的有用工具。相信随着更多基质传感器的开发的建立, 将为发酵研究和控制提供更多的可检参数, 促进发酵工业的发展。

参 考 文 献

- [1] Kole, M M, Ward D, Gersor D F. *J Ferment Technol*, 1998, **64**: 233~238.
- [2] Williams D, Yousefpor P, Willington F M H. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **28**: 631~637.
- [3] Mizutani M, Iijima S, Morikawa M *et al.* *Ferment Technol*, 1987, **65**: 325~331.
- [4] Ghoui M, Ronat E Engasser J M. *Biotech Bioeng*, 1986, **28**: 119~121.
- [5] Bradley J, Anderson P A, Dear A M *et al.* in: Fish N M, *Computer Application in Fermentation Technology* Oxford: Elsevier Science Publisher Ltd., 1989, pp. 4751
- [6] 张先恩, 张治平, 张晓梅等. 生物工程论文集. 北京: 化学工业出版社, 1994, pp. 22~27
- [7] 张先恩, 张 兴, 夏祥明等. 生物化学杂志, 1990, **6** (4): 294~300.
- [8] 高培基, 曲音波, 钱新民等. 微生物生长与发酵工程, 济南: 山东大学出版社, 1990, pp. 165, 167
- [9] 李友荣, 马辉文. 发酵生理学, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1989, pp. 3, 37

On-line Control of Glucose Concentration Based On Enzyme Electrode System

Jia Zongjian Zhang Xianen*

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract This study has incorporated a smart enzyme electrode flow injection analysis and a sampling system for on-line control of glucose in the fermentation of *E. coli*. Using the system we has realized the fed-batch operation for constant glucose concentration in fermenter. And we has analyzed the fermentative characteristic of *E. coli* at four variety of glucose concentrations.

Key words Enzyme electrode, on-line control; *E. coli*, glucose, fed-batch