

微生物发酵中二氧化碳释放速率变化规律

李 强 曹竹安

(清华大学化学工程系 北京 100084)

摘 要 选择了青霉素、古龙酸、二元酸和葡萄糖酸发酵等四个体系,对 CO_2 释放速率[CER]的变化规律进行了研究,结果表明,无论对于霉菌、酵母菌、细菌,单液相体系、双液相体系,纯种发酵、混合菌发酵,[CER]的变化与体系状态的变化有着密切的联系,根据[CER]的变化规律可以有效、准确地把握发酵过程。

关键词 微生物发酵,二氧化碳释放速率,动力学

微生物发酵过程是个复杂的生化过程。在宏观上表现为整个发酵过程的有规律性,即都有停滞、快速生长、过渡、稳定和衰亡等阶段;同时由于诸多因素的影响,又使得各个发酵阶段与具体的时间关系表现为无规律性。这就给发酵过程的准确控制带来了困难。目前多数工业发酵过程都是时序控制,因此生产的波动很大。

近几年来,随着计算机的普及和检测技术的不断发展,对发酵过程的控制更加精细,同时由于这些技术的发展也为准确判断发酵过程提供了可能性。微生物本身千差万别,发酵体系也不尽相同,用什么标准作为判断体系状态的依据,有没有共同的规律可循,有没有一种简便、易行的判断发酵不同阶段的方法是人们比较关心的问题。判断体系状态的方法有很多,如观察菌体形态法、菌量分析法、pH分析法、溶解氧分析法、ATP分析法、呼吸商分析法及氧消耗速率分析法等^[1-3],但多数都有局限性。

微生物代谢过程中一个共同的规律就是需要能量,生物体内能量的主要来源是ATP,ATP产生的主要途径是酵解和三羧酸循环。无论对有氧还是无氧代谢,能量利用的外部表现都主要是 CO_2 的释放,因此 CO_2 的释放是不同发酵体系的共同特征。对发酵体系的不同阶段,总是伴随着代谢途径的转变和能量需要量的变化,其外部表现就是 CO_2 释放量及释放速度的变化,因此, CO_2 的释放应该能够比较准确地反映发酵的不同阶段。本文将通过实验来分析 CO_2 释放与发酵阶段的关系,探索用于过程判断及控制的可能性。

1 实验设备和发酵体系

1.1 实验设备

计算机控制发酵系统包括5L发酵罐及自控设备,能够在线采集和控制温度、pH、DO、搅拌转速、空气流量、罐压、尾气氧和尾气 CO_2 等8个参数,并自动控制四种物料的流加。以下

本文于1995年8月28日收到。

实验均在该装置上进行,有关的离线变量均通过间隔取样,用相应的分析方法得到。

1.2 发酵体系

几种发酵体系如表 1 所示。这几种体系的不同点在于:发酵的目的产物不同;菌种不同,有霉菌、酵母菌和细菌,体系 2 还是混合菌;体系的相不同,其中体系 3 是水和烷烃双液相体系。体系的共同点是它们都不是生长耦联型的。

表 1 几种发酵体系的特点

Table 1 The features of some fermentation systems

NO.	Type of microorganism	Carben source	T/°C	Main product	ferm. time t/h
1	<i>Penicillin chrysogenum</i>	Glucose	24~26.5	Penicillin G	>120
2	<i>Bacillus megaterium</i> (big) and <i>Gluconobacter</i> <i>oxydan</i> (small)	Sorbose, A little of Glucose	28~30	2-Keto-L-gulonic acid	about 50
3	<i>Candida tropicalis</i>	Sucrose, alkanes	30~32	Undecane dicarboxylic acid	>120
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glucose	30~32	2-Keto-D-gluconic acid	about 30

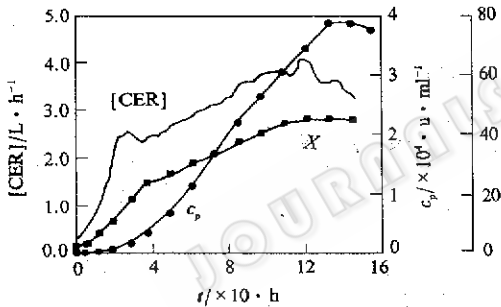


图 1 青霉素发酵体系 [CER]、青霉素浓度 c_p 和菌浓 x 时变曲线

Fig.1 The time curooes of [CER], penicillin concentration (c_p) and cell concentration (x) in penicillin fermentation

1.3 实验方法

1.3.1 菌种:体系 1:系产黄青霉菌(*Penicillin chrysogenum*),华北制药厂提供;体系 2:系由巨大芽孢杆菌(*Bacillus cegaterium*)和氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydan*)组成的混合菌,东北制药总厂提供;体系 3:系热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)多倍体变异菌株,抚顺石油化工研究院提供;体系 4:系荧光假单孢杆菌(*Pseudomonas fluorescens*),南京制药厂提供。

1.3.2 培养基:体系 1:由玉米浆、花生饼粉等组成^[4];体系 2:由山梨糖和玉米浆等组成^[5];体系 3:由蔗糖、尿素、酵母膏、玉米浆、十三碳烷烃及无机盐按比例配制;体系 4:由葡萄糖、玉米浆、及无机盐按比例配制。

1.4 分析方法

体系 1:[CER]由尾气 CO₂ 分析仪测定(下同),其它见文献^[4];体系 2:见文献^[5];体系 3:菌浓度测定采用干重法,十三碳二元酸采用重量法^[6];体系 4:葡萄糖浓度采用血糖试剂盒法,葡萄糖酸浓度采用旋光分析。

2 实验结果和讨论

2.1 产青霉素发酵体系 CO₂ 释放的变化特性

图 1 是产青霉素发酵体系 CO_2 释放速率 [CER]、青霉素浓度及菌体浓度随发酵时间

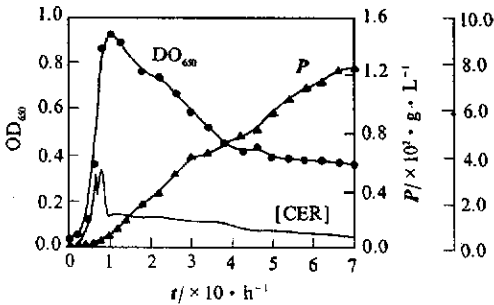


图 2 古龙酸发酵中 [CER]、菌体吸光度 (OD_{650}) 及古龙酸浓度 P 时变曲线

Fig. 2 The time curves of [CER], cell absorbance (OD_{650}) and 2-Keto-L-gluonic acid concentration (P) in fermentation

伴生下才能快速生长。图 2 描述了古龙酸发酵过程中 [CER] 的变化情况。从图 2 可以看出, [CER] 同样有一个快速上升到达极大值而后下降的过程, 与 2.1 体系不同的是: ① [CER] 有两个极大值, ② 过了极大点以后, [CER] 基本上是下降趋势。将这些特点与图 3 曲线对照来看, 就不难看出 [CER] 对过程的转变是十分敏感的。第一个极大点的出现是因为葡萄糖比山梨糖容易被利用(图 3), 第一个极大点对应于葡萄糖被利用完的点。当葡萄糖被利用完后, 细胞就转入利用山梨糖的阶段, 在这种状态调整过程中, 必然伴随着细胞内部酶系的调整, 因此, [CER] 也就有一个明显的外部反映。第二个极大值点对应于古龙酸浓度由慢速增长转入快速增长的点, 是体系的过渡点, 同时此点也对应于菌体浓度的最大点, 由于该体系中的大菌开始从营养体状态转入芽孢状态, 菌体颗粒的体积变小, 因此, 吸光度 (OD) 出现极大值。同样, 当体系进入快速产生古龙酸, 产酸曲线达到斜率最大时, [CER] 曲线也达到极大值, 当进入稳定期后, [CER] 比较平稳并慢速下降, 这点与 2.1 体系不同, 主要是因为 2.1 体系在稳定期必须保持一定的菌体增长, 才能正常产生青霉素^[1]。而这个体系由于大菌不断变成芽孢, 体系的营养体细胞不断减少, 总的代谢强度减弱, 造成了 [CER] 的下降。以上结果表明, 体系状态的变化, 都能反映在 [CER] 曲线的变化上, [CER] 的变化

的变化曲线, 从图中可以看出, 随着发酵时间的增加, [CER] 经历了快速增加、缓慢下降、缓慢增加和再逐渐下降 4 个阶段, 分别对应于菌体的快速增长期、过渡期、产青霉素稳定期和菌体自溶产青霉素至少下降的衰亡期(下同)。从整个发酵过程来看, [CER] 的确能反映发酵各个时期的变化情况和特点, 因此, 用 [CER] 来监测、判断各个发酵阶段是可行的。

2.2 产古龙酸发酵体系 CO_2 释放的变化特性

此发酵体系与 2.1 体系有很大的不同(见表 1), 其中大菌不产古龙酸, 只起伴生作用, 小菌产生古龙酸, 但小菌必须在大菌

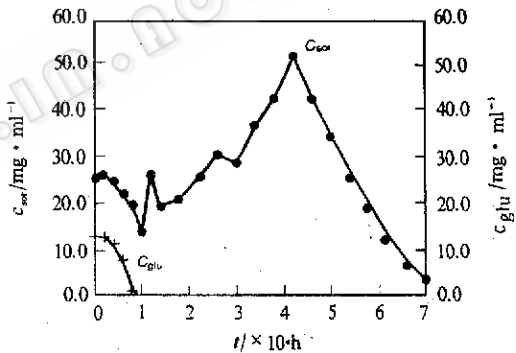


图 3 古龙酸发酵中葡萄糖浓度 (c_{glu}), 山梨糖浓度 (c_{sor}) 时变曲线

Fig. 3 The time curves of glucose (c_{glu}) and sorbose (c_{sor}) concentration in 2-Keto-L-gluonic acid fermentation

2.3 石油发酵体系 CO₂ 释放的变化特性

石油发酵体系是一个双液相发酵体系,水相和油相(主要是十三碳烷烃,占总液相的30%以上)。该体系[CER]、产物十三碳二元酸浓度及菌体浓度随时间的变化情况如图4所示,从图中可以看出,随着菌体浓度的增加,[CER]不断增加,[CER]达到极大值,对应于菌体浓度的极大值,随后[CER]快速下降,此时菌体浓度呈水平趋势,而产物十三碳二元酸的浓度几乎为0,当菌体浓度稳定以后,[CER]也在一个较低的水平上趋于稳定,此时进入发酵稳定期,产物开始快速产生。在这个体系中,[CER]曲线的变化与菌体生长、产物生成等阶段吻合得很好。虽然该体系是一个双液相体系,但是[CER]的变化与体系2.1、2.2相比,还是比较简单的。

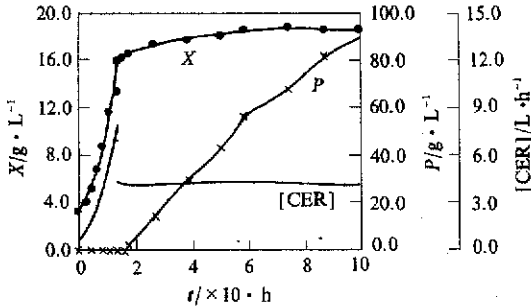


图4 石油发酵体系中[CER],十三碳二元酸 P 和菌体浓度 X 时变曲线
The time curves of [CER], undecare dicarboxylic acid concentration (P) and cell concentration (X) in petroleum fermentation

二元酸的浓度几乎为0,当菌体浓度稳定以后,[CER]也在一个较低的水平上趋于稳定,此时进入发酵稳定期,产物开始快速产生。在这个体系中,[CER]曲线的变化与菌体生长、产物生成等阶段吻合得很好。虽然该体系是一个双液相体系,但是[CER]的变化与体系2.1、2.2相比,还是比较简单的。

2.4 产葡萄糖酸发酵体系 CO₂ 释放的变化特性

这是一个典型的批式发酵体系,培养基和菌体一次加入发酵罐,在发酵过程中没有物料的补加和放料。图5是葡萄糖酸发酵[CER]、产物葡萄糖酸浓度随发酵时间的变化情况,从图中可以看出,

[CER]与产物的生成有明显的对应关系,也经历一个快速上升,到达极值点;而后快速下降到逐渐下降的过程。这说明在该体系中[CER]的变化也能较好地反应体系各阶段的变化规律。

2.5 [CER]变化规律的动力学分析

对于微生物发酵过程,无论体系多么复杂,菌体的生长、产物的生成及[CER]都可以分别表示成式(1)~(3)的形式^[7,8]:

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu(xV) \tag{1}$$

$$\frac{d(pV)}{dt} = Q_p(xV) \tag{2}$$

$$[CER] = \frac{d(CO_2)}{dt} = Y_{CO_2/x} \cdot \frac{d(xV)}{dt} + m_{CO_2} \cdot (xV) + Y_{CO_2/p} \cdot \frac{d(pV)}{dt} \tag{3}$$

式中: X, P, CO₂——分别为细胞浓度、产物浓度、CO₂ 释放总量;

V——发酵液体积;

μ, Q_p ——分别为比生长速率和产物比生成速率;

$Y_{CO_2/x}$ ——产生单位菌体放出的 CO₂ 量;

$Y_{CO_2/p}$ ——产生单位产物放出的 CO₂ 量;

m_{CO_2} ——单位菌体单位时间维持正常代谢放出 CO₂ 的量。

由(1)~(3)式整理可得(4)式。(4)式是微生物发酵过程中[CER]变化规律的通式,其中

$$Y_{CO_2/x}, m_{CO_2}, Y_{CO_2/p}$$

$$[CER] = (Y_{CO_2/x} \cdot \mu + m_{CO_2} + Y_{CO_2/p} \cdot Q_p) \cdot (xV) \quad (4)$$

在体系一定,对于某种基质来讲应该是常数。因此对于不同的发酵阶段,(4)式可以简化为:

停滞期: $\mu \approx 0, Q_p \approx 0, (xV) \approx \text{常数}$

$$[CER] = m_{CO_2} \cdot (xV) = \text{常数} \quad (5)$$

快速生长期: $Q_p \approx 0, (xV) \neq \text{常数}$ (纯粹的生长偶联型除外),

$$[CER] = (Y_{CO_2/x} \cdot (\mu + m_{CO_2})) \cdot (xV) \quad (6)$$

过渡期: $\mu \neq 0, q_p \neq 0, (xV) \neq \text{常数}, [CER]$ 如(4)式所示

稳定期: 当 $\mu = 0$ 时, $[CER]$ 表达式为:

$$[CER] = (m_{CO_2} + Y_{CO_2/p} \cdot Q_p) \cdot (xV) \quad (7)$$

当 $\mu \neq 0$ 时, $[CER]$ 表达式如(4)式所示。

以上的分析表明,在发酵的不同阶段 $[CER]$ 与 (xV) 关系有不同的表达式,因此在各阶段中, $[CER]$ 的变化趋势就出现明显的不同。

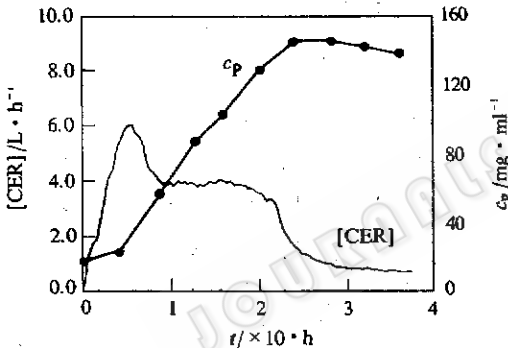


图5 葡萄糖酸发酵中 $[CER]$ 和葡萄糖酸浓度 (c_p) 随发酵时间的变化

Fig. 5 The change with time of $[CER]$ and gluconic acid concentration (c_p) in gluconic acid fermentation

以体系 1 为例作一说明,在发酵初期,由于细胞快速生长,因此 $[CER]$ 按(6)式的规律变化,随着 (xV) 的快速上升而上升,当进入过渡期时,由于 μ 下降很快,从 $0.15h^{-1}$ 下降到 $0.01h^{-1}$ 以下,此时 Q_p 开始上升,由 $0h^{-1}$ 上升到 $0.0075h^{-1}$ (放罐单位 $35000\mu/ml$, 发酵周期 $130h$ 左右),上升得比较慢,同时由于 μ 的快速下降使 (xV) 的增长明显变慢,在一般情况下,合成菌体所消耗的能量都大于合成产物消耗的能量,即 $Y_{CO_2/x} > Y_{CO_2/p}$,所以当体系进入过渡期后, $[CER]$ 按(4)式的规律总体上呈下降的趋势,当过渡期结束后, μ 值保持一个较低的数值 (0.01^{-1} 左右)^[1], Q_p 快速上升达到很高的数值, (xV) 以 $\mu = 0.01h^{-1}$ 左右的比生长速率

增长, $[CER]$ 符合(4)式的规律,因此 $[CER]$ 又开始缓慢上升,直到发酵后期 Q_p 下降,菌体开始自溶,出现菌体增长,使 $[CER]$ 按(7)式规律下降。

对于体系 2,由于混合菌体表现 μ 值自过渡期以后一直为负值,即 (xV) 逐渐下降,所以 $[CER]$ 按(7)式的规律变化,在进入稳定期后 Q_p 达到稳定, $[CER]$ 随着 (xV) 的下降而逐渐下降。因此从 $[CER]$ 的动力学分析也可以看出,不同发酵阶段 $[CER]$ 遵循不同的变化规律, $[CER]$ 曲线上的转折点对应的就是发酵状态的转变点。

3 结 论

发酵过程中, CO₂ 释放速率[CER]是发酵过程的敏感变量,是生物代谢规律的直接反映;发酵体系的变化引起的代谢途径或代谢强度的突变,都会在[CER]的变化上得到反映,反之,[CER]的突变也一定伴随着体系阶段的变化;将[CER]用于发酵状态的判断是可行的,具有一定的普遍性;为发酵过程的控制提供了可靠的依据。该监测变量数据容易获得,对于工业生产有很好的适用性。

参 考 文 献

- [1] Dueng Gang Mou, Charles L. C. *Biotech Bioeng* 1983, (25):225~253.
- [2] Nestsas N, Demain A L. *European J Appl. Microbiol Biotechnol*, 1981, 12:170~172.
- [3] Nestsas N. *Biotech. Bioeng.*, 1983, 25(3), 781~785.
- [4] 何鸣鸿, 刘大陆, 刘德华第五届全国生物化工学术会议论文集, 北京: 化学工业出版社, 1993年, pp. 143~147.
- [5] 李强, 刁劲羽, 向波涛等. *微生物学报*, 1996, 36(1):19~24.
- [6] 中科院林业土壤研究所等. *微生物学报*, 1979, 19(1), 64~67.
- [7] 丹尼尔等著. 华侨大学化工系生物工程教研室译, *发酵与酶工艺学*, 福州: 福建科学技术出版社, 1988, pp. 71~97.

Variation of Carbon Dioxide Expiration Rate in Microorganism Fermentations

Li Qiang Cao Zhu'an

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The fermentation systems of penicillin, 2-Keto-L-gulonic acid. Undecane dicarboxylic acid and gluconic acid are individually studied to obtain the variation of carbon dioxide expiration rate [CER]. The results show that in either case of mould, yeast and bacterium, single-liquid-phase system and two-liquid-phase system, pure strain fermentation and mixed culture fermentation the variation of [CER] closely related to the system states. The states of fermentation can be effectively and precisely grasped according to the variation of [CER], which provides the reliable information for the intelligent control with a computer.

Key words Microorganism fermentation, carbon dioxide expiration rate, kinetics