

基于 pH 的反馈补料方法在谷氨酸发酵中的应用

邢宇^{1,2}, 张丽叶¹, 丛威², 岳雷³, 陈崇安³, 马吉银³

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

3 宁夏伊品生物科技股份有限公司, 银川 750100

摘要: 为简化谷氨酸发酵补料工艺, 提出了一种新型的基于 pH 的补料方式。考察谷氨酸发酵过程中氨消耗量 (x) 和糖消耗量 (y) 发现, 两者之间存在较好的线性关系 ($y=7.4744x$, $R^2=0.9989$), 以此为 pH 反馈补料工艺中补料液中葡萄糖与氨的混合比例, 能较好地使谷氨酸发酵过程中葡萄糖浓度稳定在 12~21 g/L。比较恒定葡萄糖浓度补料工艺与 pH 反馈补料工艺发现, 采用 pH 反馈补料工艺进行发酵, 葡萄糖转化率、谷氨酸产酸速率分别提高了 9.06% 和 17.5% 左右, 同时发酵周期缩短 2 h 以上。

关键词: 谷氨酸发酵, pH 反馈补料, 葡萄糖浓度

Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in glutamic acid fermentation

Yu Xing^{1,2}, Liye Zhang¹, Wei Cong², Lei Yue³, Chongan Chen³, and Jiyin Ma³

1 *Collage of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China*

2 *National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*

3 *Ningxia EPPEN Biotech Co., Ltd., Ningxia 750100, China*

Abstract: A novel method based on pH value was proposed to simplify the substrate feeding method for glutamic acid fermentation. The linear relationship between the consumption amounts of ammonia (x) and that of glucose (y) was established ($y=7.4744x$, $R^2=0.9989$) which could be used as the ratio of the amount of ammonia and that of glucose in the feeding broth. Thus the concentration of glucose could be controlled through the adjustment of pH automatically. In the glutamic acid fermentation using the pH feedback-controlled glucose feeding method, the glucose concentration in fermentation broth was maintained between 12 and 21 g/L. Compare with the constant glucose concentration feeding method, the glucose conversion rate and glutamic acid productivity increased by 9.06% and 17.5% respectively, when the pH feedback-controlled glucose feeding method was employed, and fermentation period was shorten above 2 h.

Keywords: glutamic acid fermentation, pH feedback-controlled substrate feeding method, glucose concentration

Received: April 13, 2011; **Accepted:** June 23, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020301).

Corresponding author: Wei Cong. Tel: +86-10-82627060; E-mail: weicong@home.ipe.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA020301) 资助。

谷氨酸发酵过程中,流加糖工艺必不可少。流加糖工艺成功的关键在于如何确保糖代谢速率与流加糖速率的平衡,它包括菌体耗糖速度、流加量、流加时间、流加次数、流加浓度等^[1]。目前,流加糖工艺主要有恒速流加补料、恒糖浓度流加补料、溶氧控制的脉冲流加补料等。恒速流加补料工艺即在整个发酵过程中保持补料液流速恒定,此种补料方式下葡萄糖浓度易出现产酸期偏低,发酵后期偏高的情况;恒糖浓度流加补料工艺则根据上一时间间隔的耗糖量,预测下一时段的耗糖量,从而将流速调至适宜水平,由于葡萄糖浓度需离线测量,且各时段补糖量是以前一时段消耗量为依据,糖浓度控制存在滞后性;溶氧控制的脉冲流加补料工艺,是根据溶氧值变化随时调整流加速率,溶氧值上升表明糖浓度偏低,应增加流加量,使溶氧值保持在合适范围内,同样存在滞后性^[2-3]。目前,在谷氨酸发酵生产中应用较为广泛的是恒定葡萄糖浓度流加补料工艺^[4]。

发酵法生产谷氨酸的生物反应式为^[5]:

菌体生长阶段: $2C_6H_{12}O_6 + NH_3 + 3.5O_2 \rightarrow C_8H_{13}O_4N + 4CO_2 \uparrow + 7H_2O$;

菌体产酸阶段: $C_6H_{12}O_6 + NH_3 + 1.5O_2 \rightarrow C_5H_9O_4N + CO_2 \uparrow + 3H_2O$ 。

可以看出,谷氨酸发酵过程中糖消耗与氨消耗成一定比例关系。通过考察发酵过程中菌体在产酸期糖、氨消耗情况,获得两者间比例关系。据此以pH反馈信号为控制条件,以一定比例的糖氨混合溶液为补料液,将营养物利用与pH反馈相偶联,使得pH反馈系统向发酵罐中流加氨的同时实现糖的补加^[6-8]。在产酸过程中,菌体消耗葡萄糖,生成谷氨酸,导致pH下降,此时pH反馈系统自动补加氨以控制发酵液pH,由于该工艺以糖氨混合溶液作为补料液,因此在补加氨的同时会补加一定量的葡萄糖以维持葡萄糖浓度的相对稳定。菌体产酸旺盛时,氨补加量增加,相应的葡萄糖补加增多;而当菌体产酸能力下降时,发酵液pH变化减缓,pH反馈控

制系统停止补碱,此时葡萄糖补加过程也同时终止。

本研究结合谷氨酸发酵生产菌株,考察基于pH的反馈补料工艺控制糖浓度的适用性,并与恒定葡萄糖浓度补料工艺进行比较。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* FM,由宁夏伊品生物科技股份有限公司提供。

1.2 培养基组成

种子培养基 (g/L): K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4$ 0.7, 糖蜜 1.2, 玉米浆 25, 尿素 5, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 0.002, 葡萄糖 30^[9]。于 118 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基 (g/L): K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4$ 0.7, 糖蜜 10, 玉米浆 0.6, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 0.002, KCl 0.5, 葡萄糖 110。于 118 °C 灭菌 20 min。

1.3 试剂与实验设备

K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 购于天津科密欧化学试剂有限公司; KCl 购于国药集团化学试剂有限公司; 硫酸锰、硫酸铁、尿素购于天津凯通化学试剂有限公司; 糖蜜、玉米浆购于宁夏伊品生物工程股份有限公司; 葡萄糖购于秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司)。

10 L-三联发酵罐 (上海国强生化工程装备有限公司); YZ1515X 蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司); LS-B50L 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海华线医用核子仪器有限公司); BX41 数码摄像显微镜 (OLYMPUS); SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所); FE-20pH 计 (METTLER-TOLEDO); TDL-5-A 离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.4 发酵过程控制条件

1.4.1 种子培养

按照 1% (V/V) 的接种量将种子接入种子培养基,恒定 pH 6.8,通过调节转速控制相对溶氧 >15%, 32 °C~33 °C 培养 5~7 h。

1.4.2 10L 发酵罐发酵培养

种子液按 10% (V/V) 接种量转入 10 L 发酵罐中。发酵过程中用 22.82 g/100 mL 的氨水调节发酵液 pH, 发酵初期, 由于菌种对 pH 较为敏感, pH 过高会抑制菌体生长, 因此 pH 设定较低; 菌体经对数生长期后向产酸期转型的过程中, 逐步提高 pH 控制水平, 以利于菌体转型; 进入产酸期, 考虑到 pH 对谷氨酸脱氢酶、氨基转移酶活性的影响, 将 pH 逐步降至 7.6 左右促进产酸; 发酵结束前, 为使后续提取工艺顺利进行, 调节 pH 下降至 7.3 左右, 具体参数设定如表 1 所示。发酵过程中温度采用程序升温, 0~10 h 时温度为 (34±0.02) °C; 10~23 h 为 (36±0.02) °C; 23 h 至发酵结束为 (37±0.02) °C。发酵液中溶氧水平保持在 10% 以上, 通过调节搅拌转速数和通气量控制, 罐压维持在 0.05 MPa 左右。

表 1 谷氨酸发酵过程中 pH 控制参数

Table 1 The pH-control in glutamic acid fermentation

Time (h)	pH value
0-4	7.2-7.3
4-6	7.4-7.5
6-12	7.7-7.8
12-24	7.7-7.6
24-28	7.6-7.5
28-32	7.5-7.4
32-	7.4-7.3

1.5 补料方式

1.5.1 恒定葡萄糖浓度补料

当菌体浓度达到一定水平、葡萄糖浓度降至 20 g/L 左右, 开始补料。补料过程中, 每间隔 2 h 测定一次葡萄糖浓度, 根据发酵液中葡萄糖浓度的变化情况, 计算上一时段葡萄糖消耗速率, 并以此为依据预测下一时段的需糖量, 同时对补料泵转速进行相应的调整。

1.5.2 pH 反馈补料

将恒定葡萄糖浓度补料工艺与 pH 反馈控制策

略相结合, 实现补料过程中碳源和氮源同时补加。其操作方法是将 116 °C 灭菌后的糖液 (680 g/L) 与浓氨水 (22.82 g/100 mL) 按照一定比例混合 (该比例通过恒定葡萄糖浓度补料实验确定), 混合所得糖氨混合溶液中糖浓度为 450 g/L (与工业生产过程中流加糖浓度相当), 氨浓度为 6.021 g/100 mL。发酵进入产酸阶段后, 以 pH 为反馈条件控制糖氨混合液的流加, 实现 pH 控制的同时完成补糖操作。

1.6 离线参数测定

谷氨酸、乳酸含量通过 SBA-40C 生物传感仪分析测定^[10]; 菌体浓度采用分光光度法在 620 nm 下测定; 还原糖采用菲林法测定^[11]。

2 结果与分析

2.1 发酵产酸期葡萄糖与氨消耗关系

考虑到补料方式对谷氨酸转化率的影响, 为获得适用于 pH 反馈方式下的糖氨混合比, 本文采用恒定葡萄糖浓度补料方式进行谷氨酸发酵。以葡萄糖为碳源、以氨水为无机氮源和 pH 调节剂, 计量产酸期氨消耗量和葡萄糖消耗量, 并以此为基础计算两者之间的比例关系。三批次谷氨酸发酵产酸期补料时段中氨消耗量与葡萄糖消耗量关系如图 1 所示, 实验获得糖氨消耗关系为 $y=7.4744x$ (式中 x 、 y 分别表示氨消耗量、葡萄糖消耗量), $R^2=0.9989$, 糖氨消耗比例为 7.4744 g 糖/g 氨, 按此比例配制糖氨混合溶液, 作为后续 pH 反馈补料方式下的补料液。严格意义上, 此比例关系仅适用于该菌种产酸期, 不涉及发酵 0~10 h 的菌体生长阶段。之所以如此, 是因为生产之初培养基中的初始糖浓度完全可满足菌体生长期需求。随着菌种进入产酸期, 菌体对糖的需求增加, 葡萄糖浓度逐步降低, 当糖浓度降至一定水平时, 需补加葡萄糖以维持菌体正常产酸。目前工业生产中, 糖浓度一般维持在 15~20 g/L 之间, 因此本文的 pH 反馈补料工艺在糖浓度降到 20 g/L 时开始进行。

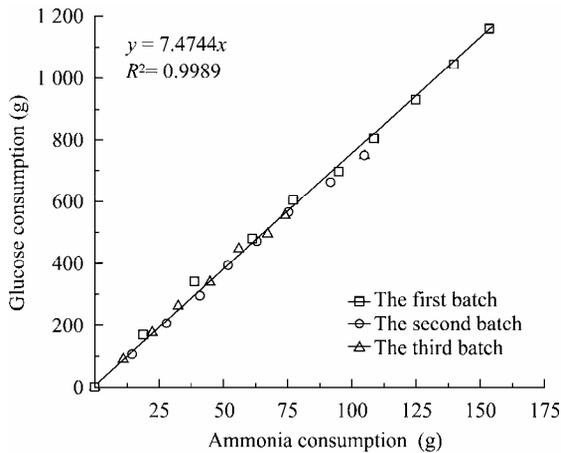


图 1 三批次谷氨酸发酵产酸期氨消耗量与葡萄糖消耗量关系

Fig. 1 Relationship between the consumption amounts of ammonia and glucose in 3 batches fermentation.

2.2 补料方式对葡萄糖浓度影响

采用恒定葡萄糖浓度补料工艺与 pH 反馈补料工艺分别进行三批次重复实验, 对比两种补料工艺对谷氨酸发酵过程中葡萄糖浓度的影响。其中, 在控制补料操作开始即发酵 10 h 前, 保持发酵过程中温度、pH、溶氧情况一致。

由于补料开始前, 各控制参数一致, 菌体对糖的消耗情况也基本相同, 当葡萄糖浓度降至 20 g/L

左右 (发酵 10 h 时), 分别采用两种补料工艺开始补料。如图 2 所示, 恒定葡萄糖浓度补料方式下, 葡萄糖浓度在 5~29 g/L 之间波动, 补料过程中易出现糖浓度过高或不足的情况, 葡萄糖浓度的波动造成发酵体系的不稳定, 不利于菌体代谢。相比之下, pH 反馈补料方式在补料阶段使葡萄糖浓度维持在设定值附近, 稳定在 12~21 g/L 之间。pH 反馈补料工艺由于采用糖氨混合溶液作为补料液, 其中的碳源、氮源配比恰好满足菌体维持生长和产酸的需求, 使进入发酵体系的碳源、氮源及时被菌体代谢消耗, 并可根据菌体产酸情况对葡萄糖补加量进行及时调整, 从而避免了葡萄糖浓度大幅波动, 有效地维持葡萄糖浓度稳定。

2.3 补料方式对谷氨酸产酸过程的影响

在葡萄糖浓度稳定的基础上, 考察了两种补料方式对谷氨酸产酸速率的影响。图 3 是谷氨酸浓度的变化。葡萄糖浓度的稳定控制使菌体所处发酵环境相对稳定, 减轻了环境因素对菌体造成的不利影响, 从而使菌体产酸能力提升。采用恒定葡萄糖浓度补料进行发酵, 产酸期平均产酸速率为 4.56 g/(L·h); 而采用 pH 反馈补料时平均产酸速率为 5.36 g/(L·h), 提高了 17.5%。

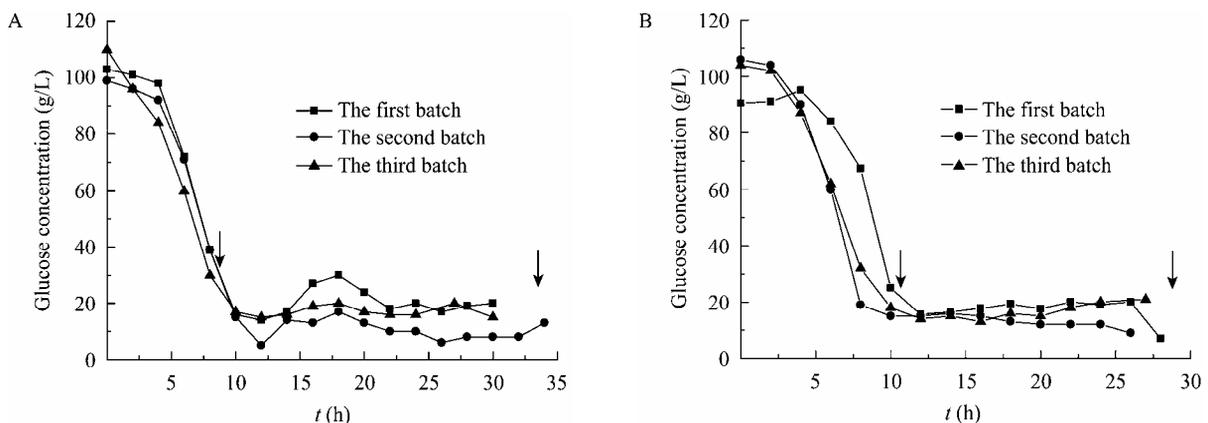


图 2 补料方式对葡萄糖浓度的影响

Fig. 2 Effect of glucose-fed methods on glucose concentration. (A) Constant glucose concentration fed-batch method. (B) pH feedback-controlled substrate feeding method. The first arrow indicates the start of glucose addition and the second arrow stands for the end of glucose feeding.

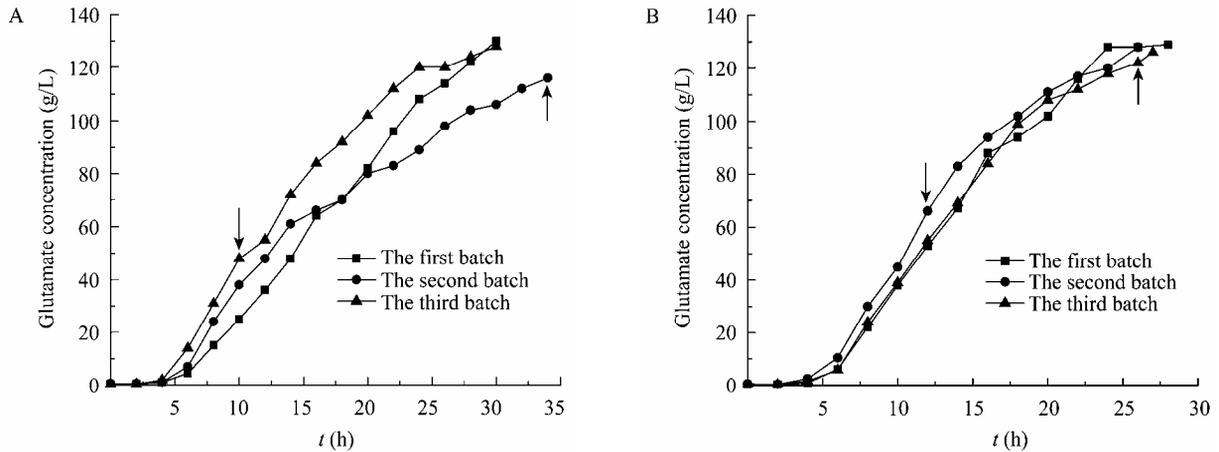


图3 补料方式对谷氨酸浓度的影响

Fig. 3 Effect of glucose-fed methods on glutamic acid concentration. (A) Constant glucose concentration fed-batch method. (B) pH feedback-controlled substrate feeding method. The first arrow indicates the start of glucose addition and the second arrow stands for the end of glucose feeding.

2.4 补料方式对谷氨酸转化率的影响

pH 反馈补料方式下, 由于发酵液中葡萄糖浓度得到有效控制, 有利于菌种对葡萄糖的消耗利用, 同时因葡萄糖浓度对乳酸生成有一定影响, 故以乳酸为主的发酵副产物浓度下降, 提高了葡萄糖的转化率 (以谷氨酸量为分子, 以总加糖量为分母)。如图 4 所示, 恒定葡萄糖浓度补料工艺下, 葡萄糖转

化率为 48.33%; 采用 pH 反馈补料工艺时, 葡萄糖转化率提高到了 52.71%。

表 2 是两种补料方式下, 分别进行三批次发酵结果汇总。通过表 2 可以看出, 与恒定葡萄糖浓度补料工艺相比, pH 反馈控制补料工艺总加糖量相当, 转化率提升明显, 两种补料方式下, 因补料结束即停止发酵, 发酵液残糖浓度与产酸期糖浓度水

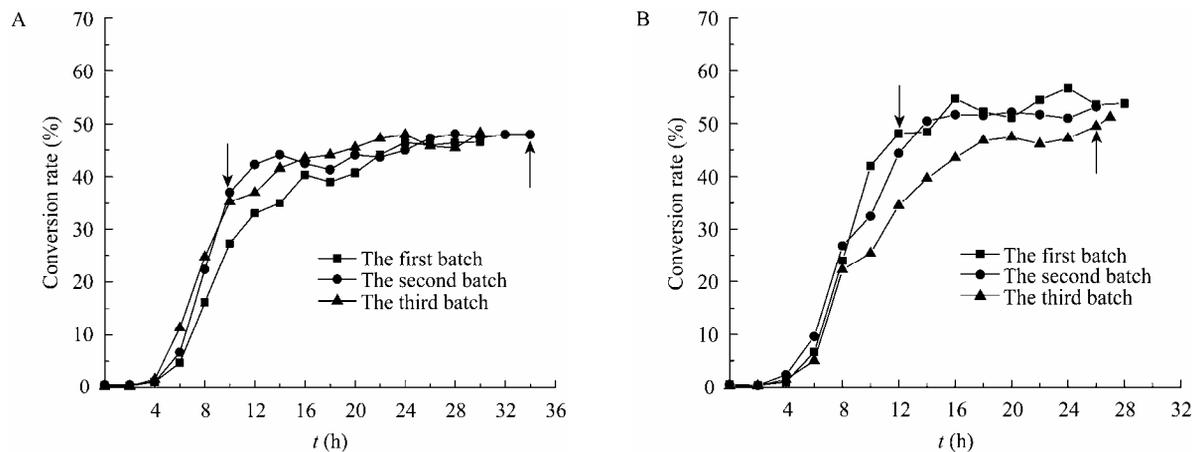


图4 补料方式对葡萄糖转化率的影响

Fig. 4 Effect of glucose-fed methods on conversion rate. (A) Constant glucose concentration fed-batch method. (B) pH feedback-controlled substrate feeding method. The first arrow indicates the start of glucose addition and the second arrow stands for the end of glucose feeding.

表 2 两种补料方式下, 发酵结果比较

Table 2 Results of fermentation experiment under two kind of glucose-fed methods

Glucose-fed method	Constant glucose concentration fed-batch method			pH feedback-controlled substrate feeding method		
Glutamate production (g/L)	130	116	124	129	128	126
Amount of sugar (g/L)	271.3	237.4	257.1	240.0	240.8	246.1
Conversion rate (%)	47.91	48.86	48.23	53.76	53.16	51.21
Residual glucose concentration (g/L)	20	13	15	7	9	21
Lactic acid production (g/L)	4.2	7.0	3.2	4.2	2.8	2.6
Fermentation period (h)	30	34	30	28	26	27
Production rate(g/(L·h))	4.96	3.83	5.09	5.34	5.70	5.18

平相当, 其中两批次 pH 反馈补料发酵在补料结束后, 继续流加氨水 1 h, 因而残糖浓度略有下降; 其次在 pH 反馈补料过程中葡萄糖浓度的稳定控制使乳酸含量下降; 再者 pH 反馈补料方式使发酵速率提高, 发酵时间明显缩短 2 h 以上, 且菌体产酸情况稳定。

3 结论

采用恒定葡萄糖浓度补料方式获得谷氨酸发酵产酸阶段的糖氨比例, 配制糖氨混合液, 用于 pH 反馈补料, 能将谷氨酸发酵过程中葡萄糖浓度控制在相对窄的范围。

稳定的葡萄糖浓度不仅提高了葡萄糖转化率和谷氨酸产酸速率, 而且缩短了发酵周期。恒定葡萄糖浓度补料工艺时, 谷氨酸葡萄糖转化率为 48.33%, 平均产酸速率 4.56 g/(L·h); 而采用本文设计的 pH 反馈补料工艺, 葡萄糖转化率达到 52.71%, 平均产酸速率提高至 5.36 g/(L·h), 发酵周期缩短了 2 h 以上。

pH 反馈补料工艺操作简单, 利于工业应用。

REFERENCES

[1] Chen JX, Wang LQ, Ye PH. Research and practice of glucose feeding method in glutamic acid fermentation. *Fajiao Keji Tongxun*, 2000, 29(1): 1-2.
陈建新, 王立清, 叶蓓华. 谷氨酸发酵流加糖工艺的探

索与实践. *发酵科技通讯*, 2000, 29(1): 1-2.

- [2] Feng ZB, Liu JJ, Wang DY, et al. Optimization of culture conditions for post-biosynthesis of L-glutamic acid by *Brevibacterium tianjinense* S9114. *Food Sci*, 2009, 30(4): 40-43.
冯志彬, 刘进杰, 王东阳, 等. 提高 L-谷氨酸产量的后期发酵工艺参数的研究. *食品科学*, 2009, 30(4): 40-43.
- [3] Cai J, Sun ZH, Wang J, et al. Application of fed-batch fermentation process and its research progresses. *Indus Microbiol*, 2005, 35(1): 42-48.
蔡谨, 孙章辉, 王隽, 等. 补料发酵工艺的应用及其研究进展. *工业微生物*, 2005, 35(1): 42-48.
- [4] Zhao EH. Explore the glucose feeding method in glutamic acid fermentation (three). *Fajiao Keji Tongxun*, 2008, 37(4): 4-5.
赵二红. 谷氨酸发酵生产流加糖工艺探索 (三). *发酵科技通讯*, 2008, 37(4): 4-5.
- [5] Feng RB. Analysis the process of glutamic acid fermentation. *Fajiao Keji Tongxun*, 1993, 22(3): 18-21.
冯容保. 谷氨酸发酵过程分析. *发酵科技通讯*, 1993, 22(3): 18-21.
- [6] Cong W, Lv WH, Kang RJ, et al. A pH feedback-controlled substrate feeding method in glutamic acid fermentation: CN, 200510130636.9. 2005-12-6.
丛威, 吕文华, 康瑞娟, 等. 基于 pH 的反馈补料生产谷氨酸的方法. 中国专利, 200510130636.9. 2005-12-6.
- [7] Cong W, Liu H, Zhang Y, et al. A pH feedback-controlled substrate feeding method in lysine fermentation. CN, 200910089872.9. 2009-7-27.
丛威, 刘辉, 张勇, 等. 基于 pH 的反馈补料生产赖氨酸的方法. 中国专利, 200910089872.9. 2009-7-27.

- [8] Ding J, Cao Y, Shi ZP. An automatic glucose feeding system for glutamate fermentation process. *J Biol*, 2010, 27(2): 40-42.
丁健, 曹艳, 史仲平. 谷氨酸发酵过程葡萄糖自动流加系统. *生物学杂志*, 2010, 27(2): 40-42.
- [9] Zhang CY, Gao P, Shi ZP, et al. An on-line glutamate production rate for the glutamate fermentation process based on a metabolic reaction model. *Food Ferment Ind*, 2005, 31(4): 54-56.
张成燕, 郜培, 史仲平, 等. 基于代谢网络模型的谷氨酸发酵产酸速率在线预测. *食品与发酵工业*, 2005, 31(4): 54-56.
- [10] Zhang HJ, Duan ZY, Mao ZG. The emendation of calibrating value of glutamic acid detection using enzymatic method with SBA-Biosensor. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2002, 21(5): 529-532.
张宏建, 段作营, 毛忠贵. SBA 生物传感仪酶法测定谷氨酸定标值的校正. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(5): 529-532.
- [11] Guo JG, Zhen SC, Zhang F, et al. Research the test method of reducing sugar. *Hebei Chem Eng Ind*, 2009, 31(11): 34-35.
郭金格, 郑树朝, 张芳, 等. 还原糖测定方法的研究. *河北化工*, 2009, 31(11): 34-35.