

通过参数相关性分析对豆油在发酵过程中的作用的探讨

张明 樊滔 苏丽明 马天良 张嗣良

(华东理工大学国家生化工程技术研究中心, 上海 200237)

关键词 豆油, 消泡, 代谢途径, 参数相关性分析

中图分类号 TQ920.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0750-05

在微生物发酵过程中,为了供氧和增加物质与能量的传递,必须进行通气与搅拌,同时由于代谢气体的逸出及培养基中糖、蛋白质、代谢物等稳定泡沫的表面活性物质的存在,使发酵液中产生一定数量的泡沫,因而泡沫伴随在整个过程中。泡沫的存在对微生物发酵具有两方面的影响,一方面,泡沫过多会造成逃液与染菌,给生产带来损失,主要表现在:(1)降低了发酵罐的装料系数(2)增加了菌体的非均一性,影响菌体的整体效果(3)增加了染菌机会(4)为减缓起泡而降低通气量或加入消泡剂会干扰工艺过程(5)消沫剂的加入将给提取工序带来困难^[1]。这是人们常看见的泡沫的负面作用。而它的正面作用往往被忽视,即:对于一个能量输入(搅拌)已给定的系统来说,由于气泡的存在,使得气液接触面积大大增加,从而使系统的气液交换性能成倍提高。若一味抑制泡沫,将造成供氧困难,其结果可能导致代谢异常,或以增加能耗为代价。因而,在发酵过程中如何对泡沫的控制达到最优化就显得相当重要。

在发酵过程中,培养液的性质随微生物的代谢而不断变化。已有研究表明^[2]泡沫中富集了蛋白质、碳水化合物、 α -酮基酸、亲脂性表面活性剂以及超细胞色素、盐份和短链醇等。要对泡沫进行适当控制,在选择好合适的消沫剂的基础上,关键是如何恰当地使用消沫剂。

常用的消沫剂,一类为化学合成物,如聚醚类和聚硅氧油类等,消沫效果虽好,但对菌体生长和抗生素的合成有一定的毒性;另一类为天然油脂类,如豆油、米糠油及动物油脂等,在发酵过程中不仅用作消沫剂,同时作为培养基的碳源,对微生物的新陈代谢产生额外的作用。正由于这种双重作用,使其在如何合理使用上变得难以把握。

为此,本文利用计算机技术,对发酵过程的在线参数及离线参数进行分析,研究了在发酵过程中添加天然消沫剂豆油后所产生的一系列变化及其相关性,以对豆油的使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以金色链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)为菌种,在玉米浆、豆饼粉、淀粉等基础培养基中进行批培养。

1.2 仪器与方法

本实验检测与控制参数共涉及直接参数 Temp、P、F、RPM、pH、 CO_2 、 EO_2 、DO,其中:

pH:采用 METTLER TOLEDO 电极在线检测,精度 0.01 pH,误差 0.03 pH。

DO:采用 METTLER TOLEDO 电极在线检测,精度 0.1%,误差 1%。

CO_2 、 EO_2 :采用 H&B 尾气分析仪在线检测,精度 0.01%,误差 0.03%。

间接参数 CER、OUR、RQ、 K_{La} ,计算公式为:

$$CER = \frac{F \times (ECO_2 - 0.03)}{22.4 \times V} \quad OUR = \frac{F \times (20.95 - EO_2)}{22.4 \times V}$$

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad K_{La} = \frac{OUR}{C^* - C_L}$$

多参数全自动发酵罐(全容积 50L,装料 26L)及其控制与分析软件,由华东理工大学国家生化工程技术研究中心(上海)提供。

参数检测与过程控制如图 1 所示。

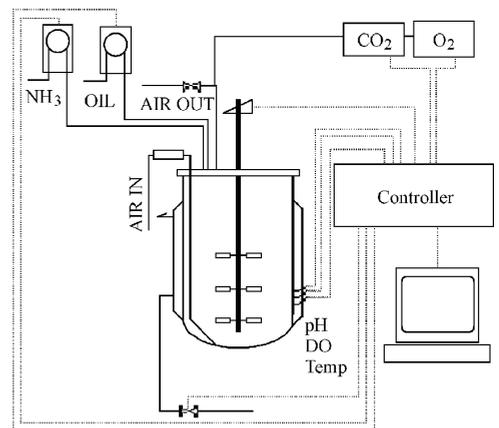


图 1 参数检测与过程控制流程图

2 结果与讨论

在微生物发酵过程中,各种参数(包括检测的在线参数、离线参数及计算后的间接参数)及外观现象间存在着错综复杂的相关性,并且随着代谢过程的进行而变化。各参数间的

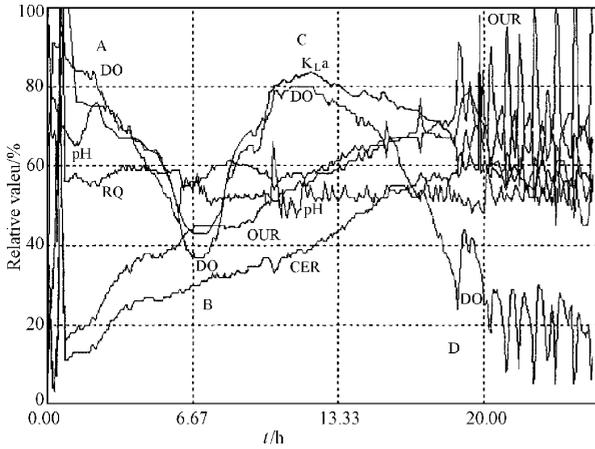


图2 过程数据曲线记录

相关性可分为理化相关和生物相关。理化相关是由参数之间纯系物质的理化性质的变化所引起的。生物相关是由细胞的生命活动引起的参数之间耦合相关,主要表现为两种方式:因细胞生长代谢引起培养液物性变化进而引起的参数相关;因细胞及代谢途径的不同引起的活性变化,这是发酵控制中最重要的相关问题。

微生物发酵实质上是在分子水平上的遗传特性、细胞水平上的代谢调节和工程水平上的传递特性这3个不同水平上发生调控的^[3]表现在各参数间的复杂的相关性,一个参数的变化都可能引起其他参数的变化,从而在不同水平上对发酵过程产生影响。

图2是实验过程中由计算机实时记录的有关参数曲线。为便于分析各参数间的相关性,将各参数曲线表示在同一图中。在实验过程中,保持罐压 P 、空气流量 F 、发酵温度 $Temp$ 、搅拌转速 $Agit$ 的恒定,以便于分析;同时忽略发酵体积的变化, CO_2 、 EO_2 与 CER 、 OUR 完全对应,故上述各参数均不加以显示,仅显示 CER 、 OUR 、 RQ 、 DO 、 K_{La} 、 pH 。即便如此,图中所显示的曲线依然错综复杂,相互关联。

2.1 发酵初期泡沫变化情况与溶氧的相关性

发酵初期各参数变化见图2。其中 DO 的变化可分为A~B、B~C、C~D三个阶段。

泡沫外观变化过程与溶氧的相应变化见表1。

发酵过程中泡沫的性质最初取决于培养基的组分,随后是细胞与培养基间交互作用的结果^[2]。第一阶段(A~B)中,泡沫主要为机械泡沫,由培养基中的蛋白质等通过搅拌而产生。随着接种后培养基中蛋白质等的被菌体降解,泡沫减少, K_{La} 降低,结果导致溶氧的降低。第二阶段(B~C),菌体逐渐繁殖,开始耗氧;而代谢泡沫的增多,使 K_{La} 上升,供氧得到改善,二者相比较,供氧大于耗氧,溶氧上升。两阶段

中溶氧出现一个转折点(B点),此时亦为机械泡沫过渡为代谢泡沫的转型点。第三阶段(C~D),代谢趋于旺盛,耗氧大于供氧,同时由于菌丝体的繁殖,发酵液粘度增加使 K_{La} 下降,导致溶氧下降,表示发酵开始进入旺盛期(对数生长期)。

表1 泡沫外观变化过程与溶氧和 K_{La} 的相应变化

阶段	对应时间/h	泡沫外观变化	溶氧的相应变化/%	K_{La} 的相应变化/ h^{-1}
A~B	0~7	数量较少,个体较大,不稳定,逐渐变少	90~37	3700~2200
B~C	7~12	数量增多,个体变小,趋稳定,逐渐增多	37~80	2200~4300
C~D	12~18	泡沫细密,稳定,泡沫层增厚	80~22	4300~3300

2.2 发酵中期添加豆油后参数间的相关性

为便于清楚地观察与分析各参数间的相关特性,将计算机实时采集的各参数曲线依不同比例相互拉开,并将时间轴拉长。

图3为发酵中期(20h开始)添加豆油时(每次1mL)各参数的变化曲线。图中可以看出,随着每次豆油的加入,各种曲线呈有规律的变化,且这种变化相互间具有完全的相关性。(在此过程中,温度、压力、空气流量、搅拌速度不变,系统只是间歇性添加豆油与氨水,其中氨水每小时加15次,每次1mL,而曲线在10h中变化了13次,与加油次数及时间吻合,故这一周期性变化与氨水的添加无关,完全是由添加豆油而引起。)

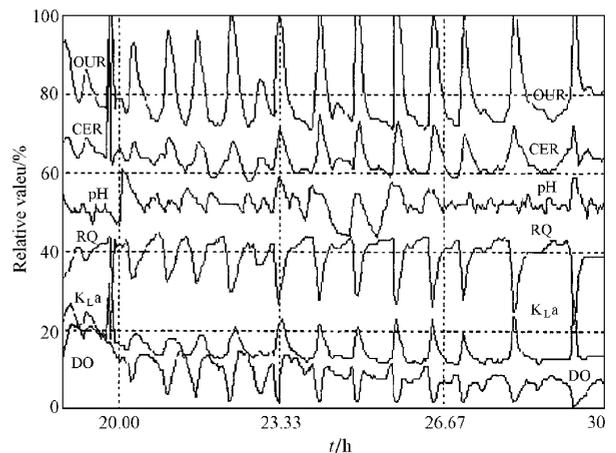


图3 添加豆油时参数变化曲线

对其中一段过程进行详细分析,见图4。豆油在a时刻加入,各参数开始变化,b时刻变化达到极限,到c时刻基本复原。

由图中可看出,随着豆油的加入(a位), OUR 、 CER 、 K_{La} 、 pH 上升, RQ 、 DO 下降。

为区分这一系列变化到底是由于气泡破裂而引起的物理(化学)过程,还是代谢变化过程,同时在相同发酵阶段用泡沬作消泡剂加入发酵液中进行比较。表2列出了加油与

加泡敌后参数变化的差异(油的加量为每次 1 mL,泡敌按常用比例稀释后每次加量为 1 mL,从消沫效果看两种方法效果相当。表中参数下标是 1 的为加油后变化的参数,参数下标是 2 的为加泡敌后变化的参数)。

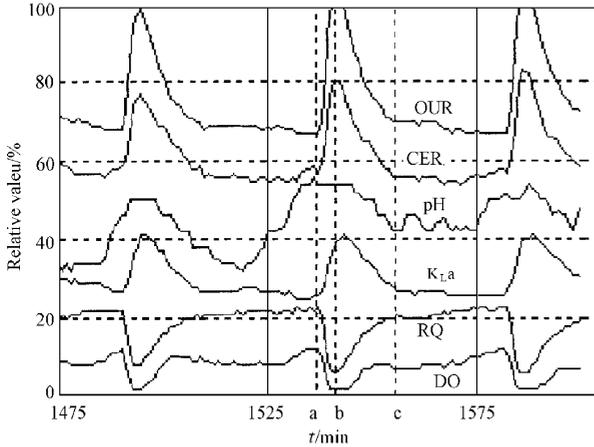


图 4 参数变化详细过程

表 2 加油与加泡敌对各参数的影响

参数	DO ₁	DO ₂	OUR ₂	OUR ₁	CER ₁	CER ₂	RQ ₁	RQ ₂	K _L a ₁	K _L a ₂
峰值/初始值	0.212	0.924	1.953	1.317	1.208	1.295	0.62	0.83	1.54	1.28
油与泡敌峰值比		0.23		1.48		0.93		0.75		1.20

微生物利用的碳源基质的变化,有可能导致代谢途径的变化。碳源限制程度越深或时间越长,对代谢的影响也越大。这一点为油的适时、适量利用(包括基础培养基和过程补料)提供了代谢水平上的依据。

需要指出的是,微生物对豆油的利用能力,不仅受碳源限制程度的影响,还受到菌体本身特性(如脂肪酶活力)的影响。

2.2.2 与 DO 的相关性:加入消泡剂后,发酵液气泡减少,气液接触面积减小,使 DO 降低。相对加泡敌而言,加油后 DO 降得更低(见表 2)。

消除气泡使 DO 下降,而本身被利用使耗氧(OUR)增加,造成 DO 的进一步下降。这与前述的油除了破坏气泡外本身也被代谢利用的结论是一致的。如油加入过量,使得 DO 长期处于偏低水平,将可能导致菌体代谢的异常。

同时,从图 4 中 DO 的曲线变化可看出,溶氧在通常情况下处于相对稳定水平,而在加豆油前总有一个上升过程。这一特性对自动消泡过程中如何避免因泡沫粘附在消泡电极上而产生误动作有积极意义。在发酵罐中通常用泡沫指示电极控制消泡剂的加入。当泡沫粘附在电极上时,就会造成虚假信号而使消泡剂加入失控。如能将消泡前后的特性变化与泡沫电极信号相关联,来控制消泡剂的加入,这种误动作的情况有可能得到改善。

2.2.3 与 K_La 的相关性:在发酵液中加入消泡剂后,K_La 上升,加油后 K_La 的上升幅度略高于加泡敌后的上升幅度(可认为基本无差异)。

据报道^[4],在水中加油后,K_La 有明显上升。油的加入

从图 4 及表 2 中分析消泡过程与各参数间的相关性:

2.2.1 与 OUR、CER 及 RQ 的相关性:加油与加泡敌后,OUR₁、OUR₂ 与 CER₁、CER₂ 均有所上升,但 OUR 的峰值比显著大于 1 相应地,RQ₁ 的峰值较 RQ₂ 小(见表 2)。

泡敌不能被微生物利用,OUR₂、CER₂ 的上升主要是由于气泡释放。而加油后 OUR₁ 较 OUR₂ 显著上升,CER₁ 与 CER₂ 基本相近,RQ₁ 则显著低于 RQ₂,表明豆油除了消泡外,还被微生物利用,因为豆油被氧化时 RQ 值较低(约为 0.6~0.7)^[1]。

通常在微生物代谢过程中,葡萄糖较其他碳源易于被微生物先行利用。实验中随着油的加入,RQ 快速上升后下降的过程(见图 4)所反映的油被利用的现象,实质上表明了此时葡萄糖水平已不能满足代谢需求,即这段时间处于碳源限制状态。为验证上述分析推论,在该发酵阶段将 25% 浓度的葡萄糖以 0.5 mL/min 的速度流加,结果 1 min 左右就产生 OUR、CER 上升、DO 下降的现象,表明此时碳源限制的情况确实存在。

对氧传递系数 K_La 的影响可分为分别对 K_L 和 a 的影响,其中 K_L 为液膜传递系数,a 为气液接触比表面积。气泡的消除,导致气液接触比表面积 a 下降;而 K_La 的上升,表明油的加入使 K_L 上升,且上升幅度大于 a 的下降幅度。

而在发酵液中加入消泡剂后,K_La 同样上升,表明 K_L 的上升幅度大于 a 的下降幅度,供氧得到改善。

2.2.4 与 pH 的相关性:从图 4 曲线中可看出,随着豆油的加入,pH 有一个先升后降的过程,表明气泡破碎后 CO₂ 释放,使培养基中 CO₃²⁻ + H⁺ ⇌ H₂CO₃ ⇌ CO₂ + H₂O 的平衡向右移动,引起 pH 上升。

2.3 发酵后期添加豆油后参数间的相关性

以上所讨论的是发酵中前期加油后有关参数的相关变化。而在发酵后期加油后参数的变化特性有所不同(见图 5)。

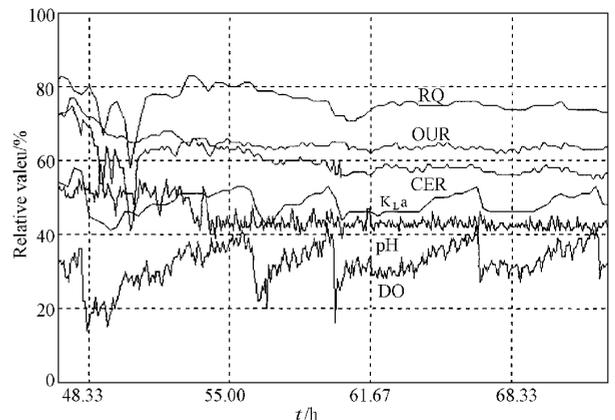


图 5 发酵后期加油后参数变化

主要表现为 OUR、CER 及 RQ 基本无变化,DO 下降,而 $K_{L,a}$ 也下降。

这表明,此时油的加入已不再被菌体利用,而仅起消泡作用。前述已说明,油被利用表明碳源处于限制状态。同样,油不被利用则说明碳源处于非限制状态。通过对发酵液中还原糖浓度的离线检测,发现中期与后期还原糖浓度接近,说明相对于菌体代谢活力而言,碳源限制的浓度水平后期已较中期降低,即菌体活力下降,并在一定程度上影响脂肪酶活力,进而降低了对油的利用。

由于气泡的消除,减小了气液传质面积,使 $K_{L,a}$ 下降,与中期加油后 $K_{L,a}$ 上升的现象相反,表明随着代谢的进行,发酵液的流变特性发生了变化。

2.4 加油与 DO、OUR、CER、RQ 及 $K_{L,a}$ 相关性的综合分析

以上加入油后所发生 DO、OUR、CER、RQ 及 $K_{L,a}$ 等参数相关特性的变化,实质上是以氧为对象的细胞代谢消耗与反应器内的氧传递的物料平衡过程的变化。我们必须注意这种平衡与不平衡现象的发生与克服。

氧传递速率 OTR 可由下式表示:

$OTR = K_{L,a}(C^* - C_L)^{0.5}$ 由于培养液中的氧浓度变化一般相对较慢,可以把 OTR 看成与菌体细胞的氧吸收速率 (OUR) 相等,则:

$$K_{L,a} = \frac{OUR}{C^* - C_L} = k \times \frac{OUR}{C^* - DO}$$

由此式可看出,在 k 不变即搅拌转速、通气量、压力不变的情况下:

A. 若 DO 与 OUR 的趋势具有相反性,则 $K_{L,a}$ 相对接近稳态,表明传递过程接近稳态,此时 DO 上升,OUR (CER) 下降,说明氧的供应大于氧的消耗;DO 下降,OUR (CER) 上升,说明氧的消耗大于氧的供应,但尚能满足代谢的需求。这一现象表明限制因素为菌体本身的代谢问题,而不是工程水平的氧的传递问题。

B. 若 DO 与 OUR 的趋势具有同一性,此时 $K_{L,a}$ 呈现无规则的变化,已无法正确表征氧的传递过程。DO 上升则 OUR 上升,DO 下降则 OUR 下降,表明 DO 小于菌体生长所需溶氧的临界值。此时 DO 成为菌体代谢的限制性因素,亦即工程水平的氧传递因素成为限制性因素。

图 6、图 7 的试验曲线较好地验证了上述推论。

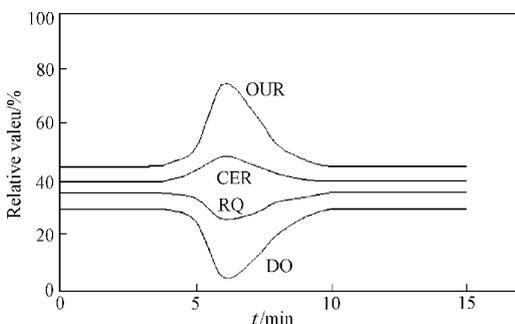


图 6 发酵中期适量加油后曲线变化

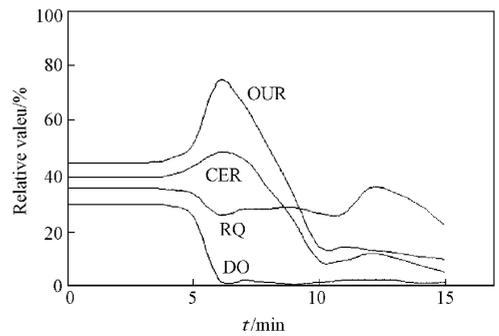


图 7 发酵中期过量加油后曲线变化

比较图 6、图 7 的差异,我们可发现:

当油加入适量时,曲线变化正常,能够恢复。其所反映的是:1) 加油后耗氧增加 (OUR 上升),促使 DO 下降;RQ 下降,表明油被利用,进而提示碳源限制。2) 随着油被不断消耗而减少,RQ 上升,耗氧减少,使溶氧上升。3) 溶氧的变化主要取决于耗氧,为代谢问题。

而当油加入过量,起初曲线正常,当 DO 低于某一值后,OUR、CER 下降,曲线变化异常,且无法恢复。其所反映的是:1) 加油后一方面耗氧增加,另一方面消泡过头使供氧困难,DO 偏低后形成溶氧限制,迫使耗氧下降,反过来,供氧降低,油来不及被即时利用。这种状况持续时间一旦过长,将引起代谢异常。2) 氧的供需矛盾从细胞水平的代谢问题转化为工程水平的传递问题,又反过来影响了代谢过程。

在发酵过程中,菌体的代谢阶段、培养基组分、物流流变特性以及细胞壁通透性等都会发生变化及相互影响,表现在对氧的需求上是动态的,因而,临界氧水平应该是一个动态的概念。通过对 DO 与 OUR (CER) 的相关性分析,有助于正确把握临界氧水平。

3 结 论

综合加油后所引起的 DO、OUR、CER、RQ 及 $K_{L,a}$ 的变化及其相关性,以及在发酵中前期及中后期加油后参数变化的差异,我们可以得出如下结论:

1) 在发酵过程的不同阶段,豆油起不同作用。

在发酵中前期加入豆油后,豆油的作用一方面作为表面活性剂起消泡作用,另一方面作为一种碳源而被菌体吸收利用。后者表现在曲线上突出的是 RQ 的降低,提示我们其原因为首先因碳源限制,迫使菌体利用其它碳源;同时此时菌体的脂肪酶活力较高,使油得以在消泡的同时被菌体利用。

在发酵中后期加入豆油后,RQ、OUR、CER 未发生明显变化,仅 DO 下降,表明中后期加入的豆油仅起消泡剂作用。提示我们可能是碳源足够或菌体活力下降。

通过在线参数相关性分析,对如何把握半饥饿状态具有参考意义。

2) 由于油的加入,菌体代谢所利用的碳源有一定的变化,即豆油也参与了代谢,使 RQ 下降。如加入过量,将导致整个发酵代谢的异常,其原因一方面为碳源利用途径的变

化,另一方面为溶氧长期过低,引起代谢过程的一系列变化。这一点对优化消泡操作具有积极意义。

3)从加油后溶氧与 OUR(CER)的相关性分析可知,当 DO 与 OUR(CER)同向变化时,表明其限制因素为工程水平的氧的传递问题;当 DO 与 OUR(CER)反向变化时,表明其限制因素为细胞水平的菌体代谢活力问题。这一点有助于客观地、动态地把握临界氧水平及氧平衡的制约因素。

符号说明:

ECO ₂ :	排气二氧化碳浓度/%
EO ₂ :	排气氧浓度/%
CER:	二氧化碳释放率/(mmol/L·h)
OUR:	氧吸收率/(mmol/L·h)
RQ:	呼吸商(CER/OUR)
DO:	溶解氧/%
K _{L,a} :	容量传递系数/h ⁻¹

参 考 文 献

- [1] 俞俊棠. 生物工艺学. 上海:华东理工大学出版社, 1992, pp. 152~153
- [2] Ian Noble, Mark Collins, Neil Porter *et al.* *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **44**: 801~807
- [3] 张嗣良. 无锡轻工大学学报, 1996, **15** (2/A): 6~12
- [4] Jia S R, Chen G B, Prihardi kahar *et al.* *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, **87** (6): 825~827
- [5] Zabriskie D W. *Data Analysis, Bioreactor Design, Operation and Control*, pp. 180~181

The Affection of Soybean Oil in Fermentation Process with Co-relation Analysis of Parameters

ZHANG Ming FAN Tao SU Li-Ming MA Tian-Liang ZHANG Si-Liang

(The National Engineering Research Center for Biotechnology, ECUCT, Shanghai 200237)

Abstract It was reported that addition of soybean oil results the variations of on-line parameters, such as ECO₂, EO₂, CER, OUR, DO, RQ, K_{L,a} and so on, during the fermentation and their co-relation was analyzed in this paper. It has show that: first, the function of soybean oil were different at different phases of fermentation through parameter co-relative analysis, namely soybean oil was an anti-foam regent and a carbon resource substrate at the middle phase of fermentation, while the oil was only an anti-foam regent at the final phase. Second, the uses of metabolic substrates will be changed when the soybean oil was a carbone resource to some extent that was related with the carbon resource restriction and cell's activity. Third, the affection factors at balance of oxygen can be realized to optimize the soybean oil feed through parameter co-relative analysis.

Key words Soybean oil, anti-foam, metabolic pathway, parameter co-relative analysis