

(12)

317-319

摇瓶发酵中间过程的检测方法

TS 262.5

范代娣¹⁾ 俞俊棠²⁾

(1)西北大学化工系,710069,西安;(2)华东理工大学生物工程研究所,200237,上海;第一作者 29岁,女,博士研究生)

A 摘要 通过特制摇瓶进行采样分析,以啤酒酵母为研究对象,分析了中间采样与发酵最终结果所测发酵目的产物量、糖耗等的异同,验证了采样方法的可行性。这种特制摇瓶简单易行,可作为一个有力的实验工具和良好的分析手段。

关键词 摇瓶;啤酒酵母;采样分析;发酵参数

分类号 TQ920.1;TS262.5

检测,中间过程

常规实验用的摇瓶只能对最终结果做出评判,无法检测菌体代谢过程中环境条件的改变情况。当然,用多个摇瓶批量实验可得到上述参数,但是,从这个摇瓶难以追索另一摇瓶在培养进程中发生的变化,并且环境条件也不尽相同,测定结果必然有较大的误差。从摇瓶发酵中取得有用参数的研究^[1~7],对摇瓶内的氧传递^[1~2],剪切作用^[8]等也有报道。

我们设计了特制摇瓶,以求发酵动力学参数,通过实验认为特制摇瓶是可行的,为工业化放大提供了如环境改变情况、产物累积及基质消耗等情况。

1 实验材料及方法

1.1 设备及材料

摇瓶:见图1(总容积 $V=500\text{ mL}$);菌株:无锡太湖清水啤酒酵母(*Sacch. cerevisiae*);培养液:麦芽汁(力波啤酒厂提供);培养条件: 25°C , 220 r/min ,接种量10%,摇瓶未接种前 $V_L=45\text{ mL}$;摇床:江苏太仓医疗器械厂出品,偏心距1.5 cm。

1.2 测定方法

1.2.1 糖利用率的测定 从摇瓶采样口采取不同时期的样液,用高速离心机以 $4\ 000\text{ r/min}$ 的速度离心10 min,取上清液,用斐林法^[9]分析其糖含量。

1.2.2 菌体重量的测定 取离心后的样液,倾其上清液,称其鲜重,然后换算成在 80°C 下烘干24 h后的干重。

1.3 摇瓶内培养与采样方法

1.3.1 补料采出法 于500 mL特制摇瓶内盛液45 mL,接种量10%,摇床转速 220 r/min , 25°C 培养,

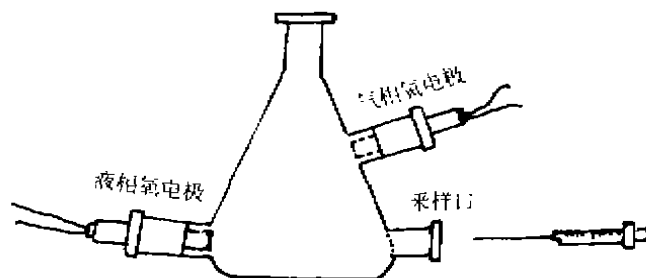


图1 特制摇瓶

Fig. 1 Specially Designed Shake Flask

• 国家教委博士点基金、陕西省教委专项基金资助课题

收稿日期:1994-08-30

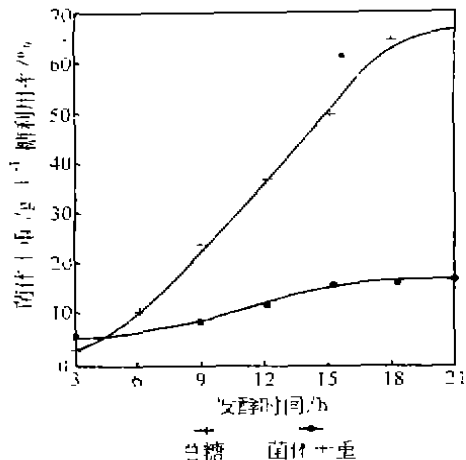


图 2 糖利用及菌体生长曲线

*注:补料采出法 I

Fig. 2 The Consumption of Sugar and Biomass Growth in the Course of Fermentation

每隔 3 h 通过采样口的橡胶膜采样一次,采样 1 mL,每次采样时同时补入同样体积的新鲜培养液,培养 21 h 结束。采出补入时用两种方法:第 I 种是先采取 1 mL 样液后补入同样体积的培养液;第 II 种是先补料 1 mL 后精确采出 1 mL 样液。

1.3.2 非补入采出法 第 I 种方法是每隔 3 h 采样 1 mL 不补入培养液;第 II 种方法是不采样只分析最终结果。

2 实验结果与讨论

2.1 采出补入法

图 2 是补料采出时第 I 种方法所得的菌体生长及糖利用曲线。图上示出:糖利用率最高 65% 左右,菌体产量在 15 h 左右达 15.4 g/L。

2.2 补入采出与非补入采出法所得结果对比

由表 1 看出:啤酒酵母补入采出与非补入采出法糖利用在刚开始培养时有些许差别,但随着培养时间的增加,这种差异消失,趋于一致。这可能是刚开始培养时,菌体处于迟滞生长阶段,补料使浓度稍高,随着对数生长期的到达,菌体的大量增殖,少量新鲜料液不足以引起多大差异。由表 1 的相对差值得出:摇瓶内少量的体积变化不致引起明显糖利用情况的差异。

表 1 两种采出糖利用率测定结果的比较

Tab. 1 The Comparison of Sugar Consumption between Different Sampling Methods

发酵时间/h	补料培养				非补料培养	
	方法 I		方法 II		方法 I	方法 II
	糖利用率	相对差值	糖利用率	相对差值	糖利用率	糖利用率
3	3.5	0	2.75	-0.07	3.5	
6	10.5	-0.11	9.5	-0.22	12.2	
9	23.8	-8×10^{-3}	24	0	21	
12	38.7	-7.6×10^{-3}	36.3	-0.69	39	
15	49.6	-0.016	47.8	-0.05	50.4	
18	64.4	$+6.25 \times 10^{-3}$	63.2	-0.016	61.1	
21	65.4	$+3.07 \times 10^{-3}$	65.8	$+9.2 \times 10^{-3}$	65.2	63.2

注:220 r/min, 25°C 接种量 10%。

表 2 两种方法菌体产量的对比

Tab. 2 The Comparison of Biomass between Two Kinds Methods of Sampling

发酵时间/h	补料培养				非补料培养	
	方法 I		方法 II		方法 I	方法 II
	菌体产量 g/L	相对差值	菌体产量 g/L	相对差值	菌体产量 g/L	菌体产量 g/L
3	5.49	+0.015	5.51	+0.018	5.41	
6	6.71	+0.032	6.62	+0.018	6.50	
9	8.08	+0.018	7.74	-0.025	7.94	
12	11.83	-5.88×10^{-3}	12.11	+0.019	11.89	
15	15.45	+0.019	14.99	-0.015	15.16	
18	16.19	+0.011	15.91	-0.012	16.02	
21	16.25	-1.23×10^{-3}	16.31	$+2.45 \times 10^{-3}$	16.27	16.11

注:25°C, 220 r/min, 接种量为 10%。

由表 2 测得的菌体量对照可以看出,啤酒酵母补入采出与非补入采出培养时菌体产量在刚开始时

有一点差别,随着培养时间的增加,菌体产量基本相等。不论是先采样后补料还是先补料后采样所得结果均趋一致。这说明瓶内少量体积变化不会引起发酵罐单位与摇瓶单位之间的差异。

3 结 论

(1)对摇瓶发酵来说,在采样量不大,时间间隔较大,发酵周期不长的情况下,补入采出与非补入采出培养法所测得的发酵参数(糖利用率、菌体产量等)差别不大,这种取样的分析方法是可靠的。

(2)在特制摇瓶内实现了中间发酵分析,结合流加分析数据,便可求得发酵动力学参数,如产物得率系数($Y_{X/S}$)、菌体倍增时间(τ_d)、最大比生长速率(μ_m)等。

(3)这种取样分析方法便于掌握摇瓶内环境条件的改变,从而实现摇瓶内的优化操作。

(4)结合特制摇瓶对气、液相氧的检测,氧传递系数($K_L a$)呼吸强度(Q_{O_2})及摄氧率(OUR)等工程发酵参数均可求出,这样为发酵放大提供了更多的信息,减少了放大的盲目性。

参 考 文 献

- 1 石川阳一振とラフラスコ,公开特许公报,昭59-109169,1984
- 2 渡部乙比古,一轴配向纤维のファイブリアル化方法,公开特许公报,昭64-68511,1987
- 3 清水義浩,振荡培养フラスコ,公开特许公报,昭64-30944,1987
- 4 李友荣,发酵摇瓶测氧电极FCY-Ⅲ型的研制及其应用,生物工程学报,1991,7(1):95~98
- 5 Sumino Y, Akyama S. Measurement of the overall volumetric coefficient of heat transfer of a shaking-flask. J. Ferment. Technology, 1987, 65(3): 285~291
- 6 范代娣,俞俊棠,摇瓶的体积氧传递系数和氧传递率的测定,生物工程学报,1994,10(2):154~157
- 7 Yu J T, Fan D D. Determination of Oxygen Uptake and Volumetric Oxygen Transfer Coefficient from Shake Flask for Scale-up-Purpose, Singapore; Proceeding of the Third Asia Pacific Biochemical Engineering Conference, June, 1994. 377~380
- 8 朱守一,李桢. 抗菌素研究Ⅱ. 上海:上海科学技术出版社,1983. 211~225
- 9 朱懿德. 工业发酵分析. 北京:中国轻工业出版社,1991. 37~59

责任编辑 时正丽

The Apparatus and Method for Analysis the Process and Fermentation Parameters in Specially Designed Shake Flask

Fan Dajdi¹⁾ Yu Juntang²⁾

(1) Department of Chemical Engineering, Northwest University, 710069, Xi'an;

2) East China University of Science and Technology, 200237, Shanghai)

Abstract Some fermentation parameters, sugar consumption and biomass etc., of *Sacch. cerevisiae* obtaining by sampling from specially designed shake flask in the course of fermentation were compared with only analysis these parameters in the end of fermentation, through comparison and analysis, the sampling analysis method was proved reliable. A better base for obtaining kinetics parameters, product ration $Y_{X/S}$, maximum growth ration μ_m and observing the variation of cultured condition in the process of fermentation or culture were founded. simultaneously, a simple and reliable laboratory-scale tool and analysis method were provided.

Key words shake flask; *Sacch. cerevisiae*; sampling; fermentation parameters