第11卷　无锡轻工业学院学报　Vol. 11
第3期　JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY　1992 No. 3

薯干原料柠檬酸发酵菌体浓度的测定

吴佩琮　　胡　军
（无锡轻工业学院）　（北京市发酵工业研究所）

摘要　采用物料平衡的方法导出了碳平衡间接测定菌体浓度的计算公式，并用实验结果进行了验证，结果发现通过碳平衡间测定菌体浓度的计算值与实测值误差甚小，证实了碳平衡法间接测定菌种浓度的可行性，从而解决了粗料发酵生产柠檬酸过程中菌体浓度难于测定的问题，为建立柠檬酸发酵数学模型打下了基础。

关键词　柠檬酸发酵；菌体浓度测定；碳平衡法

0　前　言

近几年来我国的柠檬酸发酵工业发展较快，尤其是在菌种及工艺方面，已赶上国际先进水平，柠檬酸对糖转化率及发酵周期均与国外相近似[1,2]，但在柠檬酸发酵的自动控制方面还很落后，为了用计算机对发酵过程进行优化控制进而提高发酵水平，必须建立柠檬酸发酵过程的数学模型，但到目前为止，国际国内还未有山芋粉柠檬酸发酵数学模型的报道，究其原因主要是粗料发酵过程中菌体浓度难于测定，从而难于建立。本文对柠檬酸粗料发酵菌体浓度的测定进行了研究，为建立其发酵过程的数学模型创造了条件。

1　实验材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌种　无锡市第二制药厂提供的黑曲霉T419菌株。

1.1.2　发酵培养基　山芋粉20%，液化酶0.4‰（系无锡酶制剂厂生产，活力为2000单位/g酶），自然pH.

1.1.3　发酵设备　无锡轻工业学院发酵工程系　ISF-200型30L全自动发酵罐及自动测量和控制系统。

1.2　实验方法

1.2.1　山芋粉发酵工艺条件　温度36±10℃，转速500r/min，风量13L/min.

收稿日期：1991-11-14

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.2.2 总酸测定 NaOH 滴定法[3]。

1.2.3 总糖测定 浓硫酸把培养基中淀粉水解成单糖，用斐林法滴定[3]。

1.2.4 还原糖测定 斐林法滴定[3]。

1.2.5 发酵液中柠檬酸纯度测定 纸上层析法[3]。

1.2.6 发酵液中柠檬酸含量测定 五溴丙酮法[4]。

1.2.7 菌体干重(对水解糖发酵) 样品用∅9cm 滤纸过滤，该滤纸事先在 85℃干燥 24h，并在衡重至 mg 之前在干燥器内冷却。过滤出的饼状物以 50ml 蒸馏水洗涤 2 次，在 85℃干燥 24h，并于称干重前在干燥器内冷却。

2 菌体浓度的间接测定

我国的柠檬酸发酵是用薯干原料直接发酵的，发酵液中固形物颇多，给菌体浓度测定带来了很大的困难，笔者探讨了各种方法，最终找到了解决问题的途径——通过碳平衡间接计算菌体浓度，这在一些资料上已有所报道[5,6]。

2.1 测定公式的推导

微生物生长代谢过程中，微生物的元素成分是相对稳定的。根据基质(S)、菌体(X)、产物(P)和二氧化碳中含碳元素数量可以写出微生物生长代谢过程碳元素的平衡关系为[7]：

$$(-\frac{ds}{dt})\alpha_1 = (-\frac{dx}{dt})\alpha_2 + \frac{dCO_2}{dt}\alpha_3 \frac{dP}{dt}\alpha_4 \quad (1)$$

式中

α_1——每 mol 基质中碳的含量，$\alpha_1 = 72.06$[g 碳 /mol 葡萄糖]

α_2——每 g(干) 菌体内碳的含量，[g 碳 /g 菌体]

α_3——每 mol 二氧化碳中碳的含量，$\alpha_3 = 12.01$[g 碳 /mol CO_2]

α_4——每 mol 产物中碳的含量，[g 碳 /mol 产物]

在柠檬酸发酵中，淀粉最终是被分解成葡萄糖而被菌体利用的，我们可以认为进行碳平衡计算，基质是以葡萄糖为基础的。对于柠檬酸发酵，黑曲霉菌体中含碳量为 47.9%(g/g)[8]，故 $\alpha_2 = 0.479$[g 碳/g 菌体]；而 $\alpha_4 = 72.06$[g 碳/mol 柠檬酸]。

在本研究中，基质为单一基质，即葡萄糖(由淀粉水解得)产物可假定只有单一产物柠檬酸(经分析证明，产生的其它代谢产物可忽略)，这样，即可用公式(1)间接测定柠檬酸发酵中的菌体浓度。本文"实验结果与讨论"中用实验数据进行了验证。

将各已知数据代入公式(1)，得

$$(-\frac{dx}{dt}) \times 72.06 = \frac{dx}{dt} \times 0.479 + \frac{dCO_2}{dt} \times 12.01 + \frac{dP}{dt} \times 72.06 \quad (2)$$

通过单位换算，有

$$(-\frac{ds}{dt}) \times \frac{72.06}{180.16} = \frac{dx}{dt} \times 0.479 + \frac{dCO_2}{dt} \times \frac{12.01}{44.01} + \frac{dP}{dt} \times \frac{72.06}{192.13} \quad (3)$$

ds/dt，dx/dt，dCO_2/dt，dP/dt 单位统一即可。

由式(3)可得：

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$(-\frac{ds}{dt})\times\frac{72.06\times10}{180.16}=\frac{dx}{dt}\times0.479+\frac{dCO_2}{dt}\times\frac{12.01\times10}{44.01}+\frac{dP}{dt}\times\frac{72.06\times10}{192.13} \quad (4)$$

式中

ds——[g 葡萄糖 /100ml 发酵液]

dx——[g 菌体 /L 发酵液]

dCO_2——[g 二氧化碳 /100ml 发酵液]

dP——[g 柠檬酸 /100ml 发酵液]

由气体状态方程，有

$$m'=\frac{P'V'}{RT}\cdot M \quad (5)$$

式中

m'——二氧化碳质量[g]

P'——罐压(实际压力)[Pa]

R——气体常数，为 0.082

T——发酵液温度，(K)

M'——二氧化碳的分子量 44

V'——$\varDelta t$ 时间内，发酵过程中所排出 CO_2 的体积[L]

而

$$V'=Q\times\varDelta t\times(CO_2\%)\times1000 \quad (6)$$

式中

Q——$\varDelta t$ 时间内发酵罐排气流量平均值，[m^3/h]；

(CO_2)——$\varDelta t$ 时间内发酵罐排气中 CO_2 含量平均值，单位：[ml CO_2/ml 空气]

将(6)式代入(5)式，得到

$\varDelta t$ 时间内从整个发酵罐中排出 CO_2 的量为：

$$m'=\frac{MP'}{RT}\cdot Q\cdot\varDelta t\times(CO_2\%)\times1000[g]$$

设发酵罐实装醪液体积为 V_1，单位[m^3]，则 $\varDelta t$ 时间内通过每 ml 发酵液所排出 CO_2 的量为：

$$\frac{MP'}{RT}\cdot Q\cdot\varDelta t\times(CO_2\%)\times1000\times\frac{1}{10^6}V_1[g]$$

故 100ml 发酵液在 $\varDelta t$ 时间内所排出 CO_2 的量为：

$$\varDelta CO_2=dCO_2=\frac{MP'}{RT}Q\varDelta t\times(CO_2\%)\times\frac{1}{10V_1}[g] \quad (7)$$

将(7)式代入(4)式，化简为：

$$(S_1-S_2)\times\frac{72.06}{180.16}=(X_2-X_1)\times0.479+\frac{12.01}{44.01}\times\frac{MP'}{RT}Q\varDelta t\times(CO_2\%)\times\frac{1}{10V_1}+(P_2-P_1)\times\frac{72.06}{192.13} \quad (8)$$

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

即
$$\Delta X = \frac{1}{0.479}\left[(S_1-S_2)\times\frac{72.06}{180.16}-\frac{12.01}{44.01}\times\frac{44.01}{10}\times\frac{PQ\Delta t\times(CO_2\%)}{TV_1\times 0.082} - \frac{(P_2-P_1)\times 72.06}{192.13}\right] \quad (9)$$

$$\Delta X = 8.35\times(S_1-S_2)-7.83\times(P_2-P_1)-305.77\times\frac{PQ\Delta t\times(CO_2\%)}{TV_1}$$

由公式(9)即可求出一段时间Δt内菌体浓度的增量。

2.2 产物成分的测定

2.2.1 五溴丙酮法测定发酵液中的柠檬酸

a. 配制1%,3%,5%,7%,9%的标准柠檬酸溶液,并测其光密度如下表：

表1 不同柠檬酸浓度下的光密度值

柠檬酸百分含量	1.0007	3.0000	4.9999	7.000	9.000
光密度	0.08	0.24	0.40	0.57	0.73

b. 测发酵液中光密度,从标准曲线查柠檬酸含量所采用的发酵液由山芋淀粉发酵得。测得结果如表2所示。

从表2可以看出,在柠檬酸发酵过程中,除初期(长菌期,16h之前)外,杂酸很少,柠檬酸 所占总酸百分比达95%以上。

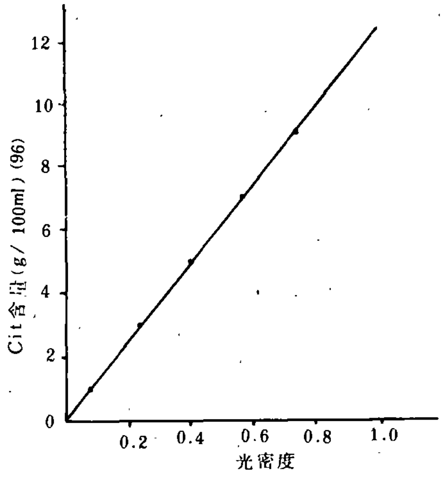

图1 五溴丙酮法所作Citric Acid标准曲线

2.2.2 纸上层测定柠檬酸纯度 对发酵16h,63h和发酵结束时3个样品进行了纸上层析,结果发现发酵初期16h以外,产酸期均未测出杂酸。

表2 发酵过程中不同时刻下的总酸、柠檬酸对照

发酵时间 (h)	总酸 (%)	光密度	柠檬酸 (%)	柠檬酸占总酸百分数
1	pH4.5	0.006	0.15	/
16	1.55	0.095	1.20	79.7
38	6.7	0.540	6.6	98.5
63	10.1	0.790	9.6	95.1
终点	11.8	0.925	11.3	95.8

2.2.3 液相色谱分析结果 对另一批发酵进行了高压液相色谱分析,结果如表3.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　发酵液相色谱分析结果

指　标	18(h)	40(h)	60(h)
总　酸	1.28%	6.86%	8.46%
柠檬酸	1.17%	6.77%	8.39
柠檬酸占	91.41%	98.68%	99.17%
绝对误差	0.11	0.09	0.07
相对误差	9.40%	1.33%	0.83%

由表 3 可以看出柠檬酸的含量(总酸中所含)在 98%以上(除发酵初期为 91.41%外)。若以测总酸代替测柠檬酸,由此带来的相对误差都在 9.4%以下;40～66h 误差只有 1.33%以下。

从上述三种方法:五溴丙酮法、纸上层析、高压液相色谱对柠檬酸发酵的分析结果可知,除发酵初期发酵液中含杂酸稍多外,整个发酵过程中含杂酸甚微,所以可以通过测总酸来代替测柠檬酸,误差在允许范围内。

3　实验结果与讨论

3.1　水解发酵

用称干重法求菌体浓度,发酵过程如下:

3.1.1　薯干粉培养基液化　条件:80～90℃,pH 自然,30min,120℃灭菌 10min.

3.1.2　糖化　条件:55℃,pH4.5±,10h,120℃灭菌 15min.

3.1.3　过滤　用双层纱布过滤。滤液上罐,120℃灭菌 20min.

3.1.4　发酵　工艺条件同薯干粉发酵。用称干重法测得菌体浓度如表 4 所示。

表 4　干重法所测柠檬酸发酵的菌体浓度

发酵时间(h)	0	6	10	15	18	22	26	30	41
菌体浓度(g/L)	0.05	0.79	3.107	5.709	5.810	5.819	5.861	5.832	5.863

3.2　碳平衡法间接测菌体浓度

根据水解糖发酵的实验记录数据,可由公式(9)求出一段时间内菌体浓度增量($\triangle X$),把各段时间间隔的($\triangle X$)累加起来,即可求出任一时刻的菌体浓度。

求得各个时期的菌体浓度增量见表 5.

将干重法、碳平衡法所测菌体浓度对照如表 6 所示。

从表 6 中可知,用碳平衡法计算测菌体浓度的相对误差均在 2.17%以下。

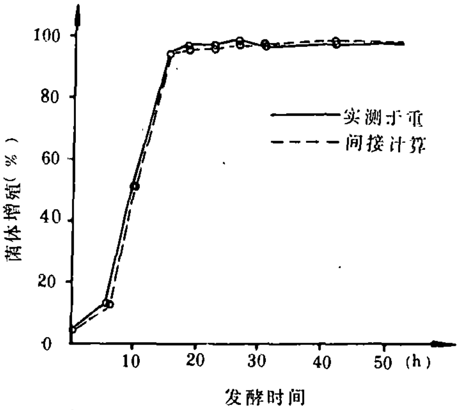

图 2　菌体增殖曲线

用表 6 所列菌体浓度的间接计算值和实测干重值作时间关系的图像,如图 2 所示(虚线为间接计算值)。由此可见碳平衡法间接计算值与干重法实测值(图中实线)吻合较好,说明用

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

碳平衡法间接测菌体浓度之方法精度较高，可以代替干重法。这样在薯干粉柠檬酸发酵中即可用碳平衡法间接测定测菌体浓度，解决了长期以来我国柠檬酸发酵行业菌体浓度难以测定的问题，亦为进一步研究发酵过程打下了基础。

表 5 发酵过程中各个时期菌体浓度的增量

时间(h)	0	6	10	15	18	22	26	30	41
总糖(S)(%)	12.18	12.08	11.63	10.26	9.29	8.13	6.95	5.79	2.77
总酸(P)(%)	0.32	0.32	0.32	1.17	2.13	3.30	4.52	5.74	8.93
⊿S(S)(%)	/	0.1	0.45	1.37	0.97	1.16	1.18	1.16	3.02
⊿P(S)(%)	/	0	0	0.85	0.96	1.17	1.22	1.22	3.19
菌体浓度⊿X	/	0.729	2.268	2.67	0.039	0.079	0.098	-0.036[1]	0.093

[1]增量为负，可能由实验误差引起

表 6 干重法、碳平衡测菌体浓度对照

时间	菌体浓度(g/L)		绝对误差(g/L)	相对误差(%)
	间接计算	实测干重		
0	0.24(干重)	0.24	/	/
6	0.779	0.79	−0.011	1.39
10	3.047	3.107	−0.060	1.93
15	5.717	5.790	0.008	0.14
18	5.756	5.810	−0.0054	0.93
22	5.835	5.819	0.016	0.27
26	5.933	5.861	0.072	1.23
30	5.897	5.832	0.065	1.11
41	5.990	5.863	0.127	2.17

参考文献

1 天津工业微生物研究所.天津微生物，1985；4：15
2 陈陶声.工业微生物，1981；4：1～2
3 金其荣等.有机酸发酵工艺学.轻工业出版社，北京：1989：310～311
4 天津工业微生物研究所.柠檬酸生产基本知识.轻工业出版社，北京：1978
5 [日]吉田敏臣等.应用微生物，1979；3：18～19
6 徐亲民.微生物研究与应用，1990；2：35～37
7 吴佩琮.食品与发酵工业，1982；1：76～78
8 武汉大学等.微生物学.人民教育出版社，北京：1979

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Determination of Mycelium Concentration for Citric Acid Fermentation with Sweet Potato Powder

Wu Peizong (The Wuxi Inst. of Light Ind.)

Hu Hun (Beijing Inst. of Ferm. Eng.)

Abstract The determination of mycelium concentration for the citric acid fermentation process is studied. By using material balance method, based on carbon balance, the calculating formula, with which we can calculate indirectly the mycelium concentration in medium, is given and verified wiht the results of experiment. The results show that there are very few differences between the actual determining values and the calculating values of mycelium concentration determined indirectly by carbon balance. The feasibility of calculation mycelium concentration indirectly by carbon balance is confirmed. And the difficulties in determining mycelium concentration in citric acid production with crude starchy material is solved. This lays a foundation of creating mathematical models for citric acid fermentation.

Key-words Citric acid fermentation; Determinaion of mycelium concentraiton; The balance of carbon

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net