

溶氧控制和 pH 控制在赖氨酸分批 发酵过程中的应用

宫 衡 伦世仪

(发酵科学与工程系)

摘要 研究了溶氧和 pH 值对赖氨酸产生菌 FB42 发酵的影响,结合发酵过程的动力学分析,得出了分批发酵操作的溶氧和 pH 控制模式。结果表明两种控制都使发酵水平得到提高,但以溶氧控制更有效,在溶氧控制模式下,发酵的转化率从 33.6% 提高到 38.1%。

关键词 赖氨酸;分批发酵;过程控制;溶氧;pH

0 前 言

赖氨酸是人体和动物所必需的氨基酸,在许多粮食原料中,赖氨酸相对缺乏,因此赖氨酸在食品、饲料和医药中得到广泛的应用,目前赖氨酸已成为第二大发酵产氨基酸产品^[1]。我国赖氨酸发酵的研究始于60年代末^[2],目前发酵产酸已达9%,然而总转化率仅为0.37^[3],这同国外先进水平总转化率0.5相比差距很大,由于发酵转化率太低,成本过高,使得国内赖氨酸的需求大量依赖于进口^[4]。提高初始糖浓度和选育解除反馈抑制的高产菌株,可以提高发酵单位,但提高发酵过程的转化率非常困难,它必须有目的地控制基质的消耗较多的转化为目标产物,这就要求对发酵过程进行控制。由此,作者对赖氨酸发酵过程(包括分批与流加发酵)的优化控制进行了较为全面的研究。研究菌株选用黄色短杆菌 FB42,对于15%的糖,62h 发酵产酸为5%。

在发酵过程优化控制的研究中,分批发酵占有重要的地位:一方面流加控制发酵是建立在分批发酵过程研究的基础之上;另一方面分批发酵过程中的一些可变参数如溶氧、pH、温度本身就可作为控制手段。本文着重讨论了溶氧和 pH 对赖氨酸分批发酵过程的影响,并在此基础上进行了分批发酵过程的优化控制。

收稿日期:1994-04-13

1 材料与方 法

1.1 菌种

L-赖氨酸产生株黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) FB42 (leu⁻, Thr^L, AEC^r, str^r, AHV^r, LysHx^r) 由作者在 FB21^[5]的基础上获得。

1.2 培养基

1) 斜面培养基(%) 葡萄糖 1, 牛肉膏 0.5, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH 7.0.

2) 种子培养基(%) 葡萄糖 2, (NH₄)₂SO₄ 0.4, K₂HPO₄ 0.1, 玉米浆 2.5 MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 豆饼水解液 0.5, CaCO₃ 1.0, pH 7.0.

3) 发酵培养基(%) 葡萄糖 15, (NH₄)₂SO₄ 3.0, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 玉米浆 3.0, 豆饼水解液 2.0, 泡敌 0.03, pH 7.2.

1.3 发酵设备

瑞士 INFORS, 30L 实验用自控发酵罐, 发酵液溶氧自动指示, 温度自动控制, pH 自动控制。

1.4 培养条件

斜面活化 24h. 种子在 31~32 C 下振荡培养 17~19h. 30L 的发酵罐中装液量 16L, 接种量 10%, 温度为 32 C, 通风比 1:1vvm, 罐压 5.06 × 10⁴Pa, 流加氨水控制所需的 pH 值, 搅拌转速根据所需的要求定。

1.5 分析方法

1) 菌体干重 光密度法(620nm), 所得的光密度值与吸光度-干重曲线对照, 计算出菌体浓度。

2) 葡萄糖浓度^[6] 3,5-二硝基水杨酸法。

3) 赖氨酸浓度^[7] 酸性茚三酮比色法。

2 结果与讨论

2.1 溶氧对发酵的影响

氧在反应器中参与菌体的生长、产物的形成和维持细胞的代谢。发酵开始时产物的积累很低, 氧的消耗主要是由于菌体的生长, 随着发酵的进行, 细胞浓度逐渐达到饱和时, 氧的消耗主要是由于产物的形成和细胞的维持代谢。当 K_{la} 为 825.2h⁻¹时, 反应器中的溶氧在 0~24h 内下降很快, 此时对应着菌体的大量生成, 24~36h 氧的消耗有一个最大值, 这时菌体仍有生长而产物已开始大量形成, 随后反应器中的溶氧开始升高; 当 K_{la} 减少时, 发酵初期(0~12h)溶氧很快下降, 但在以后很长的一段时间内反应器中的溶氧都处于一个较低的水平, 并与 K_{la} 有一对应关系, 如图 1。

实验中通过改变搅拌转速控制不同的 K_{la}(体积溶氧系数)值, 从而达到控制反应器中的溶氧水平。发现过高、过低的溶氧对发酵均不利; 当溶氧很低时(K_{la} = 295.1h⁻¹)对发酵尤为不利, 表现为菌浓下降、产酸降低、发酵时间延长; K_{la} 在 400~550h⁻¹之间, 发酵较佳, 产酸为 50g/L 左右, 试验结果见表 1。

表1 K_{la}对发酵的影响

K _{la} (h ⁻¹)	初糖(g/L)	菌浓(g/L)	产酸(g/L)	发酵时间(h)	残糖(g/L)
295.1	150.8	15.66	38.04	84	8.0
406.2	152.1	17.54	51.02	62	4.0
531.8	149.3	17.74	50.26	62	4.9
825.2	150.1	17.59	41.09	60	3.5

图2为发酵过程的菌体生长曲线,在不同的溶氧水平下(除非K_{la}很低),菌体的生长量

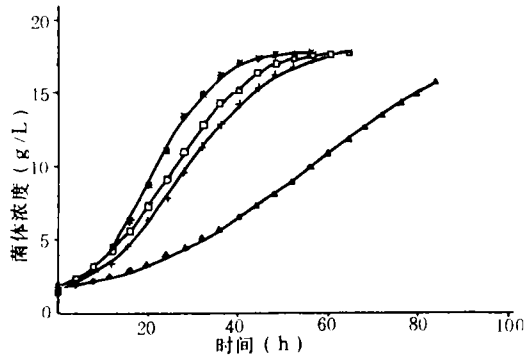
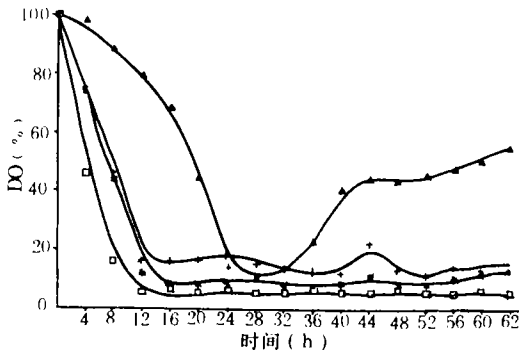


图1 不同K_{la}值反应器中溶解氧的变化

图2 不同K_{la}值菌体生长的变化

—●— K_{la}=825.2h⁻¹ —+— K_{la}=531.8h⁻¹
 —*— K_{la}=406.2h⁻¹ —□— K_{la}=295.1h⁻¹

—▲— K_{la}=825.2h⁻¹ —+— K_{la}=531.8h⁻¹
 —*— K_{la}=406.2h⁻¹ —□— K_{la}=295.1h⁻¹

都能达到一个相同的饱和值,但菌体的生长速度是不一样的,结果发现当K_{la}=531.8h⁻¹时,菌体的生长比速最大,过高的K_{la}反而对菌体的生长有抑制作用(图3)。

图4为不同溶氧条件下产物形成比速Q随时间的变化关系,从图4可以看出K_{la}为

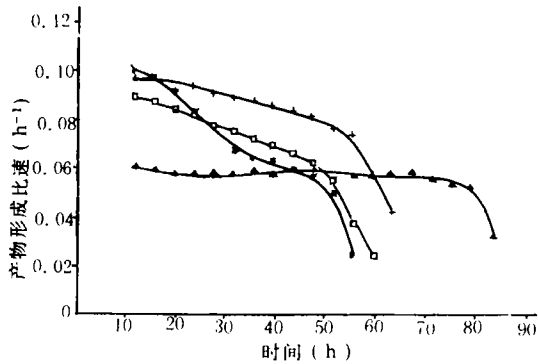
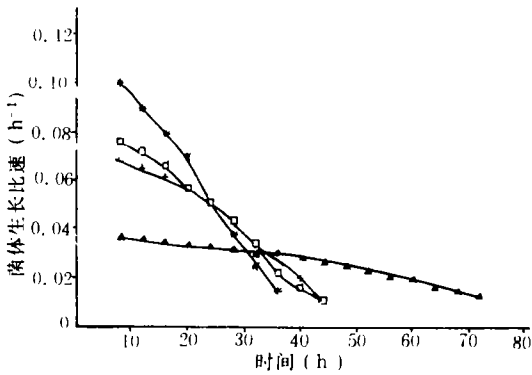


图3 不同K_{la}值菌体的比生长速率

图4 不同K_{la}值产物比生成速率的变化

—▲— K_{la}=295.1h⁻¹ —+— K_{la}=406.2h⁻¹
 —*— K_{la}=531.8h⁻¹ —□— K_{la}=825.2h⁻¹

—▲— K_{la}=295.1h⁻¹ —+— K_{la}=406.2h⁻¹
 —*— K_{la}=531.8h⁻¹ —□— K_{la}=825.2h⁻¹

406.2h⁻¹时,产物的生成比速最大。结合溶氧对菌体生长的影响来看,溶氧过低不但菌体的

生长最不利,而且此时产物的形成比速也最小,所以对发酵影响最大;对于产物形成最适的 K_{La} 值和对于菌体生长最适的 K_{La} 值是不一样的,因此对于 K_{La} 恒定的操作不能同时使得菌体生长和产物形成处于最适的环境中。

2.2 pH 值对发酵的影响

pH 对许多酶的催化过程和许多细胞之间的特性传递过程有很大的影响,pH 值的变化能改变体系的酶环境和营养物质的代谢流,使得诱导物和生长因子在活性和非活性之间变化。结果表明 pH 值对赖氨酸的发酵影响很大:当 pH7.0 时产酸最高,pH 值偏高或偏低,产酸均降低;菌体的生长量只在 pH9.0 才发现有降低,而当 pH 值为 6.0 时菌体的生长量还有提高,见表 2。

表 2 pH 对发酵的影响

pH	初糖(g/L)	菌浓(g/L)	产酸(g/L)	发酵时间(h)	残糖(g/L)
6.0	150.8	17.80	48.35	62	8.0
7.0	149.3	17.74	50.26	62	4.9
8.0	150.2	16.63	42.30	68	5.0

进一步研究发现 pH 值同时影响了菌体的生长比速和产物的形成比速,偏低的 pH 值对菌体的生长是有利的,实验范围内 pH6.0 时菌体的生长比速最高;产物形成比速在 pH7.0 时最大(图 5、6)。

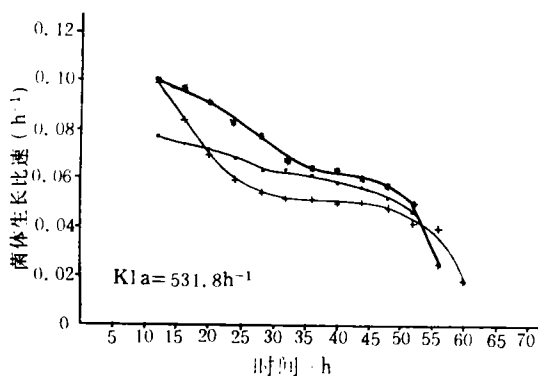


图 5 不同 pH 菌体比生长速率的变化

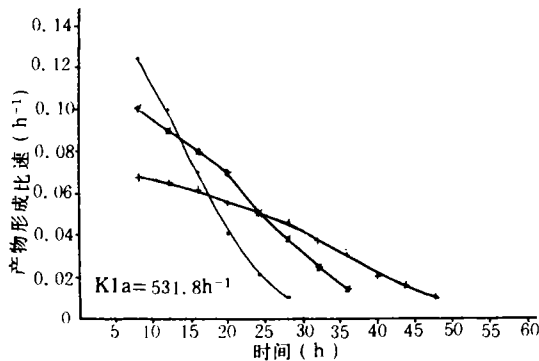


图 6 不同 pH 产物比生成速率的变化

—•— pH=6.0 —+— pH=8.0 —*— pH=7.0 —•— pH=6.0 —+— pH=8.0 —*— pH=7.0

2.3 发酵过程的溶氧与 pH 控制

2.3.1 发酵过程的动力学分析 图 7 为 pH7.0, K_{La} 为 $531.8h^{-1}$ 的动力学分析。从图 7 中可以看出菌体的生长比速 μ 开始表现出极大,随后明显下降;产物生成比速 Q 开始随 μ 的变化而有一定的降低,但当 μ 很低时, Q 仍很大,符合 GADEN 二类发酵:它在发酵前期有较高的生长活力,以生长为主,中后期有较高产物形成活力,以产物形成为主,产物的形成和菌体的生长仅有一定程度的相关性。

发酵开始时伴随着菌体的生长细胞同时分泌出赖氨酸;另一方面生长好的细胞仍有赖氨酸合成酶系的活力,进一步催化底物合成赖氨酸,赖氨酸的形成动力学可以描述为:

$$Q = \alpha f_1 + f_2 \tag{1}$$

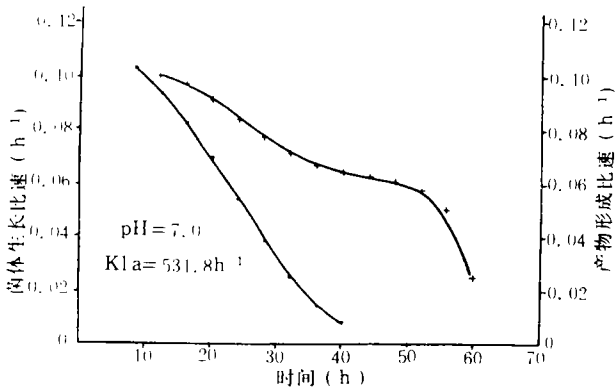


图7 赖氨酸发酵过程的动力学分析

---●--- CELL - - + - - LYS. HCl

式中： Q 为赖氨酸的生成比速； α 为相关系数； f_1 为菌体生长动力学 μ 的函数表达式，与各影响因子如基质浓度、产物浓度、溶氧水平、pH有关； f_2 的实质为活性细胞催化底物合成赖氨酸的酶反应动力学，也是各影响因子如基质浓度、产物浓度、溶氧水平、pH的函数。

当发酵处于中、后期时， $f_1 \rightarrow 0$ ，式(1)可以简化为：

$$Q = f_2 \quad (2)$$

2.3.2 分批发酵过程的控制 发酵过程中较多地合成产物，是分批发酵过程控制的目的。由于产物的形成

速度不但和 Q 有关，还和菌体浓度有关，结合式(1)分析，我们可以看出：首先必须使得菌体在较佳的环境得到生长，即控制条件，使 f_1 取最大值；随即必须控制条件使得菌体在较佳的环境中最大限度的合成底物，即控制条件，使 f_2 取最大值。往往某一影响因素满足 f_1 和 f_2 的最佳值是不一样的，这就必须对发酵过程进行分段控制。

前面的研究结果说明溶氧、pH对菌体生长和产物形成的影响是不一样的：以溶氧而言， $KLa = 531.8 h^{-1}$ 对菌体生长有利、 $KLa = 406.2 h^{-1}$ 对产物的形成有利；以pH而言，pH=6.0对菌体生长有利、pH=7.0对产物的形成有利。从发酵过程来看进行到24h后，菌体基本长好，因此选定溶氧和pH的控制模式为：

赖氨酸发酵的溶氧控制模式

0~24h $KLa = 531.8 h^{-1}$ 24h后 $KLa = 406.2 h^{-1}$

赖氨酸发酵的pH控制模式

0~24h pH=6.0 24h后 pH=7.0

从表3可以出，在优化的控制模式下赖氨酸的发酵水平得到了提高。

表3 控制方式对发酵的影响

控制方式	初糖(g/L)	菌浓(g/L)	产酸(g/L)	发酵时间(h)	残糖(g/L)	转化率(%)
方式一	149.3	17.74	50.26	62	4.88	33.6
方式二	147.3	17.73	56.12	62	4.0	38.1
方式三	152.1	17.66	51.12	56	4.1	33.6
方式四	149.5	17.69	52.09	58	3.5	34.8

方式一 溶氧、pH恒定($KLa = 531.8 h^{-1}$, pH=7.0)

方式二 溶氧分段控制

方式三 pH分段控制

方式四 溶氧结合pH分段控制(0~24h $KLa = 531.8 h^{-1}$ pH=6.0, 24h后 $KLa = 406.2 h^{-1}$ pH=7.0)

2.3.3 溶氧控制与pH控制的比较 在两种控制方式下，赖氨酸的发酵水平都得到了提高，但是两种控制所得到的结果是不一样的：溶氧控制方式提高了发酵过程的转化率，从表

3 中可以看出同方式一相比发酵的转化率从 33.6% 提高到 38.1%; pH 控制方式缩短了发酵周期提高了发酵的生产强度。这与 pH 和溶氧各自对菌体生长和产物形成调节的特异性与敏感性有关, 对于赖氨酸发酵两种控制中以溶氧控制为好。进一步实验发现, 当同时使用溶氧和 pH 分段控制, 所得的结果不很理想(见表 3), 说明这两种控制方式的结合, 控制效果并不简单地表现出加合性。

3 结 论

1) 在赖氨酸发酵过程中溶氧和 pH 值同时影响了菌体的生长和产物的合成, 但最适生长和最适产酸的溶氧水平和 pH 值是不一样的。

2) 通过发酵过程的动力学分析, 得出了分批操作过程的溶氧和 pH 控制模式, 结果表明两种控制模式都提高了赖氨酸的发酵水平。比较发现对于赖氨酸发酵以溶氧作为控制手段最有效, 提高了发酵过程的转化率。

参 考 文 献

- 1 Yamada K. *Biotech. Bioeng.*, 1977, 16:1563
- 2 中国科学院微生物学研究所. *微生物学通报*, 1980, 7(12):20
- 3 上海工微所. L-赖氨酸中试扩大实验报告. 内部资料. 1992
- 4 李秀君. *有机化工原料通讯*. 内部资料. 1993, 23:1
- 5 童兆坤. 无锡轻工业学院硕士学位论文, 1988
- 6 蔡武城. *生物物质常用化学分析法*. 科学出版社, 1982
- 7 石渡昭男. *特许公报*, 1975, 20:874

The Application of Dissolved Oxygen and pH Control in Lysine Fermentation

Gong Heng Lun Shiyi
(Dept. of Ferm Sci.)

Abstract The influence of dissolved oxygen and pH on lysine fermentation by *Brevibacterium flavum* FB42 in batch process was studied. By means of controlling K_{La} , dissolved oxygen tension was controlled. Aimed with kinetic analysis of fermentation process, the K_{La} control and pH control strategies were obtained successfully. The results indicated that the lysine production was enhanced by using either of the two strategies. Comparison of K_{La} and pH control showed the former more effective with the increase of the overall process yield from 0.336 to 0.381g. Lys. HCl/g. glucose.

Key-words Lysine; Batch fermentation; Process control; Dissolved oxygen; pH