

发酵过程中细胞浓度在线检测系统*

陈宏文^{1,3} 金福江² 方柏山³ 王蔚³ 胡宗定¹

(天津大学化工学院生化工程系 天津 300072)¹

(华侨大学信息科学与工程学院 泉州 362011)² (华侨大学生物工程与技术系 泉州 362011)³

摘要: 利用微软、硬件技术,设计了一套比浊法细胞浓度在线检测系统,并应用于5L发酵罐中木糖醇发酵过程细胞浓度在线检测。该系统能及时、较准确地反映发酵过程中菌体浓度随时间的变化情况,在规模化生产中具有较强的适用性、通用性,可为实现其它分析仪器的计算机在线检测系统提供值得借鉴的设计思路和实现方法。

关键词: 细胞浓度, 在线检测, 木糖醇

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0039-04

THE CELL CONCENTRATION ON-LINE MEASUREMENT SYSTEM IN FERMENTATION

CHEN Hong-Wen^{1,3} JIN Fu-Jiang² FANG Bai-Shan³ WANG Wei³ HU Zong-Ding¹

(College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)¹

(College of Information Science & Engineering Hua Qiao University, Quanzhou 362011)²

(Department of Bioeng & Biotech Hua Qiao University, Quanzhou 362011)³

Abstract: The cell concentration on-line measurement system using turbidity method is developed by technology of microcomputer hardware and software and is applied in 5L fermentor during xylitol fermentation process. Variety of the cell concentration during fermentation can be detected rapidly as well as truly and applied in large scale. Its designing method can also be used in on-line measurement systems development of other analytical instruments.

Key words: Cell concentration, On-line measurement, Xylitol

* 国家自然科学基金资助项目 (No.29776025)

Project Granted by Chinese National Natural Science Found (No.29776025)

生物反应器工程国家重点实验室开放课题资助项目

收稿日期: 2002-08-19, 修回日期: 2002-11-10

随着生物技术的深入发展,单凭经验或经典实验数据来控制生产已不能满足优化生产发展的要求。近年,借助计算机系统和其它先进手段对生化过程状态变量进行检测、数据分析和实施最优控制受到极大关注。

细胞浓度是反映生化过程微生物生理生化特征的表现参数,也是研究生物反应动力学不可缺少的状态变量。一般所采用的细胞浓度测量方法包括直接法(如测体积、称干重、显微计数等)和间接法(如比浊法、生理指标法等)。它们大多以离线测量为主,在进行高频率、长时间检测时,分析人员工作强度较大。

比浊法利用分光光度计测得的光密度值与细胞总量成正比的原理进行测量。此法简单直接、无摧毁性且易实现在线测量,适合用于培养液不含固形营养成分的单细胞微生物培养过程。木糖醇发酵液无固形营养物,生产所用莫格假丝酵母(*Candida Mogii*)为单细胞微生物,为此,我们采用比浊法研究和设计了一套发酵过程细胞浓度在线检测系统,并将其运用在木糖醇分批发酵过程中细胞浓度的在线测量。该系统能及时、较准确地反映细胞浓度随时间的变化情况,减轻分析人员的工作强度,与PC机联机,实现数据记录、保存和分析,研究结果表明,该系统有较好的工业应用前景。

1 细胞浓度在线检测实验装置研制

实验装置由发酵罐、系统硬件和系统软件三部分组成,见图1。

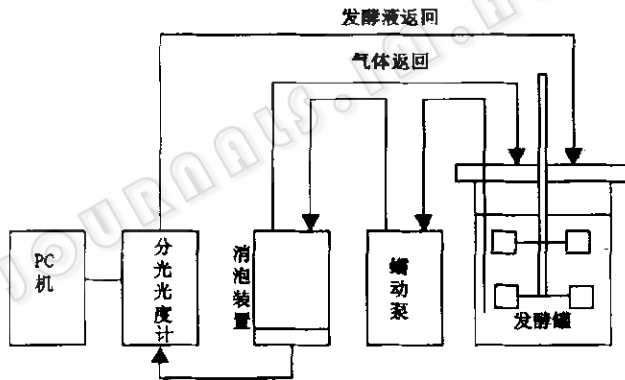


图1 细胞浓度在线检测实验装置

1.1 发酵罐

为德国 B. Braun 公司产的 BIOSTAT B 型 5L 发酵罐, 能实现温度、pH 值、溶解氧、泡沫及液位的自动测量和控制。

1.2 系统硬件

1.2.1 循环装置: 循环装置的主要作用是利用发酵罐控制器上的蠕动泵通过软管将发酵液引出发酵罐、流经自制消泡装置和分光光度计内流通比色皿、再回到发酵罐。

实验所用分光光度计为 WFZ-D3B 单光束紫外/可见光光度计, 在 600nm 测光密度。石英黑体流通比色皿为宜兴市仪器仪表总厂制品。

此外, 由于流通比色皿贯穿于整个发酵过程中连续使用, 如果整个循环系统流速太慢的话, 细胞会在流通比色皿内壁生长形成细胞吸附层, 或者细胞沉积在流通比色皿底部产生死角, 严重影响测量精度。经考察, 我们将流速控制在 7mL/min 以上, 稀释度

为 $12.15 (\text{min}^{-1})$ ，在这种情况下不致产生吸附或死角。

1.2.2 自制消泡装置：由于发酵液含有大量的糖、蛋白质，加上通气、搅拌及尾气（如 CO_2 ）排放，会产生大量泡沫，单用消泡剂难以完全去除，残余泡沫进入流通比色皿，数据波动很大，严重干扰细胞量测量。我们利用输液器的消泡原理，将一自制消泡装置连入循环装置系统即控制发酵液流速，使之在消泡管中形成一定液位，这样气泡滴进液面即破碎被去除，并将所产生的气体返回发酵罐中。

1.2.3 微机、A/D 转换卡：系统采用 P II 400 微机。一般数据采集有两种方式：一种是 A/D 转换在现场，进行现场数据采集，用串行方式与 PC 机进行通讯，用 PC 机对采集数据进行处理；另一种是将现场模拟信号送至 PC 机中，由插在 PC 机扩展槽中的 A/D 卡进行数据采集，以并行的方式与 PC 机进行通讯^[1]。第二种方式具有结构简单，无需另配置稳压电源，可靠性好，易实现，成本低的优点，本系统就采用该种方式，即电信号通过分光光度计记录仪插口由屏蔽信号线输出至 PC 机中 A/D 卡输入端，经过 A/D 转换变为相应透光率，再根据公式 $A = -\log T$ （式中 A 为光密度， T 为透光率）转换成光密度。A/D 转换卡主要技术参数如下：（1）分辨率：二进制八位，设计要求最大测量误差小于 0.1%，选用 8 位 A/D 转换器，可达到设计要求；（2）通道数：8 路，使用一台微机可对 8 台分光光度计的检测数据进行控制、显示和处理；（3）转换时间：100 μs ，远大于设计要求的 100ms。

1.3 系统软件^[2]

软件设计是在 WINDOWS98 操作系统下，使用 VISUAL BASIC6.0 开发研制的，软件设计主要包括：（1）A/D 卡和 PC 机的接口设计；（2）操作直观、简单可靠的良好人机图形界面设计；（3）可对采集的数据进行存储、显示、打印处理的实时数据库设计；（4）可对检测数据进行筛选、分类、方差分析等数据分析处理功能设计。

2 细胞浓度在线检测系统在木糖醇发酵过程中的应用

2.1 实验材料与方法

发酵过程中所用的菌种、培养基等实验材料以及培养方法、分析方法详见参考文献 [3]。

2.2 实验结果与讨论

2.2.1 分光光度计零点设置：常规比浊法是以不含细胞时发酵液的浊度为零点，一般在接种前进行调零。但在高浊度测量时，光密度 OD 与细胞量呈非线性关系，甚至 OD 值会超出分光光度计读数范围，导致无法测量。利用比浊法测量细胞含量，细胞生长到中后期，常会出现上述情况。若为离线测量，一般采用稀释法解决，而此法难以用于在线测量。我们通过重新设置分光光度计零点的方法，即示差分光度法^[4]，解决了该问题。我们以蒸馏水比色皿加适当中性消光玻璃片为零点，将初始 OD 值调在分光光度计线性范围内读数偏低的位置，一般在接种后马上进行零点设置。随着菌体浓度增加，当 OD 值将超过线性范围时，改换不同中性消光片重新调零，即可继续测量。一般在结束发酵前，调零一至两次即可满足要求。 OD 值计算公式： $A = A_{\text{读}} + (A_0 - A_0)$ (1) 式中： A ：计算 OD 值； $A_{\text{读}}$ ：分光光度计实际读数（保持在线性范围内）； A_n ：读数时所加消光片的 OD 值（以蒸馏水为空白）； A_0 ：发酵初始所加消光片的 OD 值（以蒸馏

水为空白)。

2.2.2 建立细胞浓度——光密度标准曲线:在线测量发酵液光密度(波长 600nm),每隔 4h 人工取样,离心弃上清液,沉淀细胞洗涤 3 次,105℃烘干过夜,测量细胞干重,建立细胞浓度——光密度标准曲线(图 2)。用一元线性方程回归表达: $Y = -33.2 + 10.2X$ (2)

式中: Y: 细胞浓度 (g/L), X: 计算 OD 值, 相关系数为 0.9755, 所建立的标准曲线线性较好。今后所采集的光密度数据可由 PC 机根据标准曲线自动转换成细胞干重浓度。

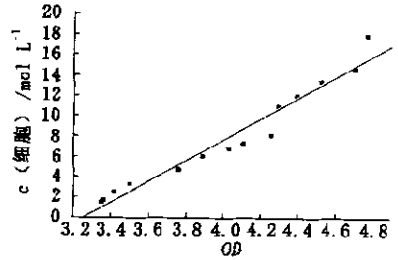


图 2 细胞浓度——光密度标准曲线

2.2.3 数据采集频率:设置微机读数频率 2 次/s, 记录频率 1 次/10min, 若数据波动超过 1% 也记录数据, 并保存在数据文件中, 这样做既不至于数据文件过大又不会遗漏变化较大的数据。采集的数据依标准曲线转换为细胞浓度。

2.2.4 木糖醇发酵过程中各参数的变化:使用消泡装置前木糖醇发酵过程(图 3)。由图 3 可见, 木糖初始浓度为 49.5g/L, 随着反应进行, 木糖浓度逐渐下降, 木糖醇不断积累, 上升至最大值为 35.3g/L, 此时木糖浓度为 2.0g/L, 已基本耗尽, 木糖醇转化率为 74.3%, 随后木糖醇浓度开始下降, 原因详见文献 [5]。在整个发酵过程中, 细胞浓度从接种时 1.48g/L 逐步增至 18.98g/L。这表明细胞浓度在线测量是建立在稳定、正常的发酵过程基础之上。在整个过程中, 细胞浓度在线检测记录值和实测浓度总体吻合较好(图 4), 但由于气泡干扰, 数据偏差较大。

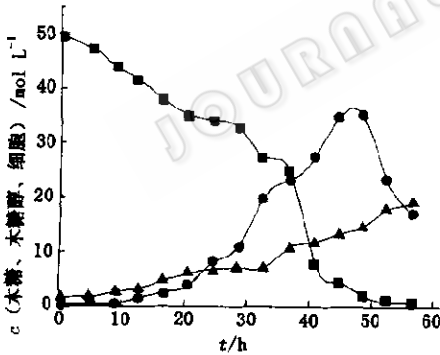


图 3 木糖醇发酵过程曲线(消泡前)

■ 木糖, ● 木糖醇, ▲ 细胞

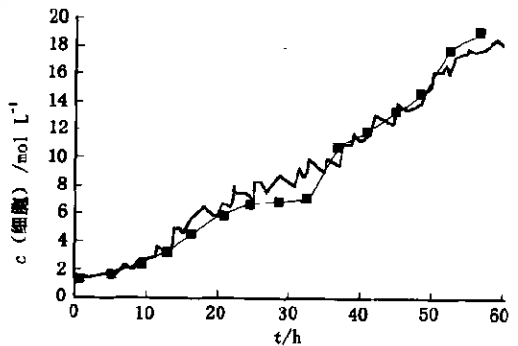


图 4 细胞浓度在线测量值与实际值比较(消泡前)

■ 细胞浓度, — 细胞浓度在线测量系统记录值

消泡后木糖醇发酵过程如图 5 所示(实验过程的其它培养条件与图 3 相同)。图 5 中各参数的变化趋势类似于图 3。但经消泡作用后, 细胞浓度在线数据波动明显小于消泡前, 与实测浓度吻合也更好(见图 6)。说明该系统可有效、及时地反映出细胞浓度的变化趋势。

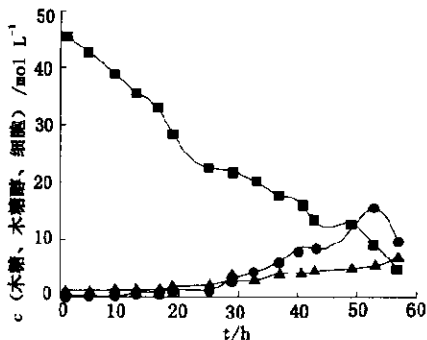


图5 木糖醇发酵过程曲线(消泡后)

■—木糖, ●—木糖醇, ▲—细胞

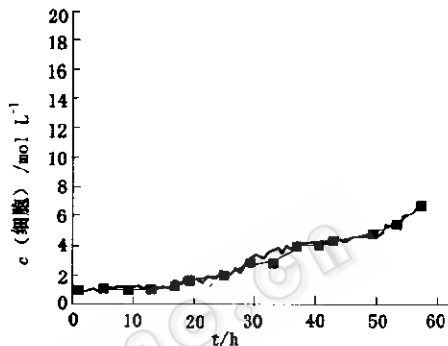


图6 细胞浓度在线测量值与实际值比较(消泡后)

■—细胞浓度, ○—细胞浓度在线测量系统记录值

3 结束语

通过实验装置的不断改进,在小型发酵罐中初步建立了木糖醇发酵过程细胞浓度在线检测系统,该系统能及时、较准确地反映细胞浓度随时间的变化情况。系统结构简单、性能可靠、成本低,在规模化生产中具有较强的适用性、通用性,也可为实现其它分析仪器的计算机在线检测提供值得借鉴的设计思路和实现方法。

参考文献

- [1] 李华. MCS-51系列单片机实用接口技术. 北京: 北京航空航天大学出版社, 1993.
- [2] 金福江, 陈宏文. 自动化博览, 2001, 02: 22~24.
- [3] 陈宏文, 方柏山, 谢晓兰, 等. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(1): 20~23.
- [4] 北京大学化学系仪器分析教研组. 仪器分析教程. 北京: 北京大学出版社, 1997.
- [5] 陈宏文, 方柏山. 华侨大学学报, 1998, 19(4): 416~419.