

生物量浓度实时在线检测方法的研究*

王贻俊¹⁾ 樊育

(山东轻工业学院自动化系, 济南 250100)

L. OLSSON J. NIELSEN

(Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark)

摘要 微生物的存在会改变发酵液的电特性, 发酵液在无线电频率范围内的电容率增量是测量频率和生物量浓度的函数。基于对发酵液电容率分布的研究, 提出了测量生物量浓度的新方法。用此方法不用取样就能对发酵液中的生物量进行实时在线测量, 而且测得的是活的生物量浓度。制作的电极直接插入发酵器中并满足高温蒸气灭菌条件。此方法在生化制药、食品发酵、啤酒酿造、污水检测等工业领域里有很好的推广应用前景。

关键词 发酵液, 生物量浓度, 实时在线检测, 电容率分布, 高温灭菌

学科分类号 Q93-338

酿酒和制药都要经过发酵过程。影响发酵过程的因素很多, 如发酵液的成分和浓度、溶解氧含量、温度、pH 值、搅拌速度、酵母的种类、活性和浓度等。在上述因素中, 酵母浓度是最重要的工艺参数, 因为在一定条件下, 发酵的得率与酵母浓度密切相关^[1]。因此酵母浓度的实时在线检测, 对了解和控制发酵进程, 提高产品的质量具有重要意义。通过微生物的繁殖生长过程, 在生物反应器中生产有用物质的过程, 与在化学反应釜中通过催化作用生产化学物质的过程有很大的不同, 因为在生物反应器中酵母的数目每时每刻都在发生变化。生物量浓度的检测对任何发酵过程都是非常重要的。

生物量的传统测量方法主要有干重法、光密度法和亚甲基蓝染色法等, 这些方法都是离线的。用离线法测量生物量浓度既费时又费力, 还要从发酵罐中抽取样品, 在取样过程中极易带进杂菌而感染发酵罐。采用离线方法的另一个缺点是, 人们不能用这种方法来实现对发酵过程进行自动控制。

本文研究微生物的存在对发酵液电容率分布的影响, 在此基础上提出了用电容率增量法对生物量浓度进行在线实时测量的方法并设计了相应的仪器。

1 电容率增量法的基本原理

本方法的依据是 Maxwell-Wagner 原理或 β 分布, 即发酵液的电容率对于酵母浓度和测量频率的依赖性^[2]。

从电学的角度来说, 一切物质 (包括发酵液)

的电特性都可以用电导率和电容率来表征。发酵液的电导率可定义为其传导电荷的能力; 而发酵液的电容率可定义为其储存电荷的能力。

设酵母的形状是球形的, 用 r 表示酵母的平均半径 (单位为 m); C_m 为细胞膜单位面积的电容 (单位为 F/m^2); ϵ_0 是真空中电容率 (单位为 F/m , 其值大约等于 $8.85 \times 10^{-12} F/m$); P 是体积系数, 它是所有酵母菌的体积与发酵液体积的比, P 是一个远远小于 1 的数, 无量纲; ϵ_∞ 是当测量频率 $f \rightarrow \infty$ (相对于测量频率而言) 时发酵液的相对电容率 (无量纲)。随着生物量浓度的不同, 同一发酵液的 ϵ_∞ 会略有不同, 但与运用测量频率下由于生物量浓度的变化所引起的电容率变化量相比, ϵ_∞ 的变化很小, 对一定的介质, ϵ_∞ 可看作常数。 ϵ_f 是发酵液在测量频率下的相对电容率 (无量纲)。则在一定测量频率范围内 ($0 < f < \infty$), 发酵液的相对电容率可表示为^[3]:

$$\epsilon_f = 9PrC_m/4\epsilon_0 + \epsilon_\infty \quad (1)$$

由 (1) 式可知, 当培养基中没有酵母时, 即 $P=0$ 时, $\epsilon_f = \epsilon_\infty$ 。因此由于酵母的存在所引起的电容率的变化为:

$$\Delta\epsilon_f = 9PrC_m/4\epsilon_0 \quad (2)$$

$\Delta\epsilon_f$ 称为电容率增量, 它与体积系数 P 成正比。

水的相对电容率在 60 到 85 之间, 其典型值是

* 中国-丹麦协作研究项目和山东省教委资助项目(J94F11)。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (0531) 8911791

收稿日期: 1999-07-01, 修回日期: 2000-04-10

78. 随着温度和电导率的不同, ϵ 会有所变化. 如果测量电压比较低, 水的电容率几乎与测量信号频率无关. 如果把水放入发酵器中, 其电容率受其中溶解的气体和非细胞物质的影响较小, 当测量含有酵母的发酵液的电容率以确定生物量时, 水的电容率可作为参照信号.

当培养基中加入酵母后, 其电容率会显著增加. 当测量频率由高到低变化时, 发酵液的电容率会在培养基电容率的基础上逐渐增加(培养基的电容率可作为参照信号或基准信号). 我们把电容率随测量频率变化而变化的现象叫作电容率分布, 电容率的频率特性或电容率频谱. 发酵液的电容率分布可划分为三个主要区域: α 分布, β 分布和 γ 分布. α 分布发生在音频范围内, 主要是由于带电离子在细胞膜表面作切向运动引起的. β 分布又称为 Maxwell-Wagner 效应或 Maxwell-Wagner 分布. β 分布发生在无线电频率范围内, 主要是由于活的酵母细胞具有粒子不能透过的细胞膜引起的. γ 分布发生在比 β 分布更高的频率范围内(甚高频或射频), 它主要是由于偶极子(例如水偶极子)的旋转引起的. γ 分布不是活的微生物细胞特征的表现形式.

Maxwell-Wagner 分布, 即 β 分布是本文的理论基础, 因为 β 分布是具有完整细胞膜的微生物细胞特征的表现形式. 关于 Maxwell-Wagner 分布产生的机理, 一般解释为: 活的微生物细胞都具有完整的细胞膜, 完整的细胞膜是良好的绝缘体. 在一般情况下, 细胞内的带电离子很难穿过细胞膜到达细胞的外部; 细胞外的带电离子也很难渗透到细胞的内部. 如果将发酵液置于电场中, 在细胞膜的内外表面上会有大小相等, 符号相反的电荷堆积, 每个细胞很像一个小电容器. 在一定条件下, 单位体积内的酵母细胞所束缚的正电荷(或负电荷)的数量与酵母数目成正比. 酵母浓度越大, 它们所束缚的电荷越多, 发

酵液的电容率越大, 这就意味着我们可以通过测量发酵液的电容率来测量生物量浓度. 由于细胞膜很薄, 它所呈现出的细胞膜电容是很大的, 单位面积上的细胞膜电容 C_m 一般在 $0.6 \sim 1.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 之间.

发酵液的电容率和电导率是两个独立的参数, 但要准确地测量出来并非易事, 特别是当发酵液的电导率比较高的时候更是如此. 即便在高频情况下, 电极上也会存在极化电压, 电极和引线会引入分布电容. 发酵液成分的变化, 温度的变化等都可能引起电容率的改变.

一般说来, 物质(特别是发酵液)的电容率和电导率不能直接测得, 但是我们可以用测量电容的方法来确定两电极间发酵物的电容率. 如果在发酵液中放置一对电极(实际上构成了一个电容器), 设电极的表面积为 A , 距离为 d , 则发酵液的电容率 ϵ , 电极电容 C 之间有如下关系:

$$\epsilon = dC/A\epsilon_0 \quad (3)$$

$$\text{或} \quad \epsilon = KC \quad (K = d/A\epsilon_0) \quad (4)$$

上面的式子中, d/A 定义为电极常数, 其单位为 cm^{-1} . 电极常数与电极的形状和电极尺寸有关. 在本文中, $\Delta\epsilon$ 经过标定之后, 用来指示酵母浓度.

2 测量系统的组成

测量系统由发酵器、铂电极、惠普网络分析仪(HP 4194A)、A/D 转换器、计算机、显示器、打印机等组成, 如图 1a 所示. 制作的电极如图 1b 所示. 电极由工程塑料棒、铂金丝、橡胶密封圈和引线组成. 为了克服极化电压对测量结果的影响, 电极用铂丝制作. 这个电极有四个小电极, a 、 a' 为一组, b 、 b' 为另一组. 这两组电极有不同的电极常数. 电极常数通过测量浓度为 10 mmol/L KCl 溶液的电导来确定.

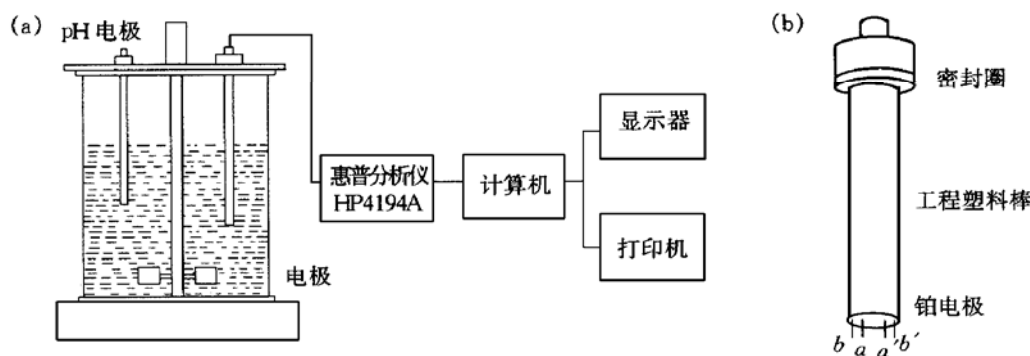


图 1 测量系统的组成

(a) 测量系统示意图; (b) 电极示意图.

3 实验材料、方法及结果

3.1 实验场所

丹麦技术大学工业微生物研究中心 (Center for Process Biotechnology, Technical University of Denmark, Building 223, DK-2800 Lyngby, Denmark).

3.2 实验材料

a. 实验所用菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* DGI 342. 酵母取自丹麦技术大学工业微生物研究中心的菌种储藏库. b. 实验所用介质为 CBS^[4] 介质. 它主要由盐溶液、痕量金属元素溶液、除泡沫剂、葡萄糖等组成.

3.3 实验方法

3.3.1 原始酵母在标准的 CBS 介质中在 28 °C 的条件下培养 20 h, 然后在 2 500 r/min 下离心 10 min, 分离出来的酵母放入新的 CBS 介质中, 用灭过菌的蒸馏水进行酵母浓度调节.

3.3.2 在接种前, 电极和介质在 122 °C 的蒸气中灭菌 40 min. 灭菌后介质的 pH 值调至 5.0. 为了避免葡萄糖和铵离子发生 Maillard 反应, 葡萄糖是单独灭菌的. 灭菌后冷却至 40 °C 再把它加入 CBS 介质. 维生素是经过过滤除菌后加入的.

3.3.3 发酵条件: 批量发酵是在标准的 5 L 发酵器内进行的, 内盛 4 L 介质, 搅拌速度为 700 r/min, 通气量为 2 L/min. 发酵温度控制在 30 °C, 通过加入 NaOH 或 H₂SO₄, 发酵液的 pH 值自动地控制在 5.0 左右.

3.3.4 酵母浓度的离线测量. a. 干重的测量 (dry cell weight): 将样品用 0.45 μ m 的过滤纸过滤, 用蒸馏水冲洗, 然后放入微波炉中干燥 20 min, 再放入干燥器中干燥 20 min, 在电子天平上称量, 连做三次, 取平均值. b. 光密度 (optical density) 的测量: 测量波长为 525 nm.

3.3.5 酵母浓度的在线测量: 用本文的仪器, 当发酵液的温度稳定在 30 °C, 仪器上电 40 min 后将仪器调零, 将酵母接种到发酵器中, 初始酵母浓度为 0.1 g/L, 大约相当于 10⁶ 个/ml.

3.3.6 测量频率范围为 0.1~51.2 MHz, 测量频率按等比级数增加, 即下一个测量频率都是当前测量频率的两倍. 在每一个测量频率上, 连续测量 5 次, 取其平均值.

3.4 实验结果

3.4.1 图2画出了含有酵母的 CBS 介质的电容率

分布曲线, 从图 2 可以看出, 对酵母浓度一定的介质, 当测量频率由低到高逐渐增加时, 其电容率逐渐减小, 这表明发酵液的电容率具有频率依赖性, 即电容率的大小与测量频率有关. 如果测量频率不变, 发酵液中酵母浓度越大, 测得的电容率越大, 这说明发酵液的电容率具有酵母浓度的依赖性, 即电容率与酵母浓度有关.

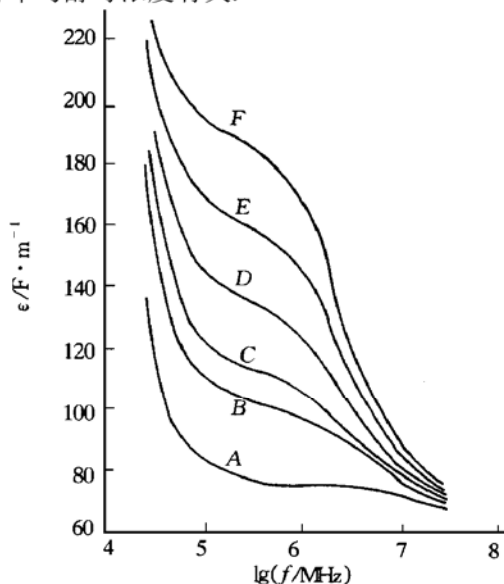


图2 含有酵母的 CBS 介质的电容率分布

A~F 表示不同的酵母浓度. A: 0.0 g/L; B: 2.5 g/L; C: 5.0 g/L; D: 10.0 g/L; E: 15.0 g/L; F: 25.0 g/L.

3.4.2 图3画出了 *Saccharomyces cerevisiae* DGI342 在 CBS 介质中的生长曲线. 曲线具有典型的酵母生长曲线的特征: 它具有滞后期、指数生长期和平衡期三个阶段. 用本装置对酵母浓度进行在线测量, 所得结果与用离线方法测得结果比较接近.

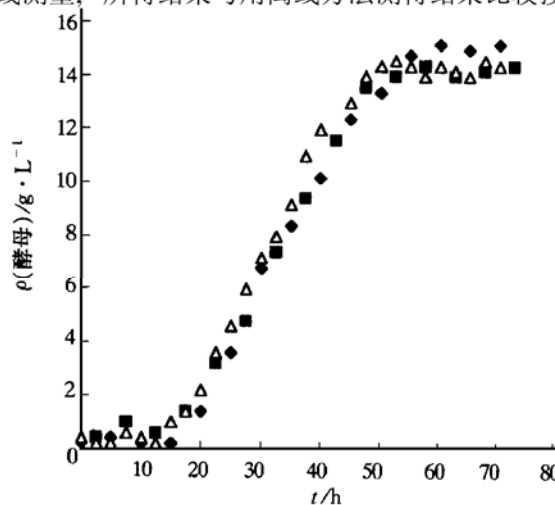


图3 *S. cerevisiae* DGI342 在 CBS 介质中的生长曲线

△: 用电容率法测得的结果; ■: 用光密度法测得的结果; ◆: 用干重法测得的结果 (用电容率法和光密度法测得的结果已换算成干重).

4 讨 论

a. 从图 2 可以看出: 在无线电频率范围内, 发酵液存在着一个明显的电容率分布. 如果酵母浓度不变, 当测量频率由高到低逐渐减小时, 发酵液的电容率逐渐增加; 另一方面, 如果测量信号频率不变, 则发酵液中酵母的数目越多, 电容率越大.

b. 实验表明, 发酵液在无线电频率下的电容率增量确实是酵母浓度的单值函数, 我们可以通过测量发酵液电容率的变化来确定酵母浓度.

c. 实验表明, 用本文的装置对酵母浓度进行在线实时测量, 所得结果与用离线法 (干重法和光密度法) 测得的结果是比较接近的.

d. 从图 3 可以看出, 发酵进行大约 52 h 后进入平衡期, 在此阶段用本文的方法测得的结果要比用干重法和光密度法所得的结果低一些. 这一现象与我们所说的“用本方法测得的是活的酵母浓度”相吻合, 这是本仪器的一个优点. 这一现象的出现与酵母生理状态密切相关. 在平衡期由于营养物的缺乏, 酵母繁殖变得缓慢, 有些细胞开始衰老或死亡, 致使其体积收缩, 细胞膜的绝缘程度下降或丧失, 导致了所束缚的电荷的减少. 所以本仪器还可用来研究酵母生理状态的变化.

致谢 本实验是在丹麦技术大学工业微生物研究中心完成的. 该实验中心的高级实验师 Tina 小姐给予很多帮助, 对此作者表示深深地感谢.

参 考 文 献

- 1 Olsson L, Nielsen J. On-line and *in-situ* monitoring of biomass in submerged cultivations. Trends Biotech, 1997, 15 (11): 517~522
- 2 Pethig R, Kell D B. The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. Phys Med Biol, 1987, 32 (8): 933~970
- 3 Schwan H P. Electrical properties of tissue and cell suspensions. Adv Biol Med Phys, 1957, (5): 147~209
- 4 Schulze U. Anaerobic Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Copenhagen: Denmark Technical University Press, 1995. 242~243

Studies of On-line and In-situ Measuring Method for Biomass Concentration. WANG Yijun, FAN Yu (Department of Electrical Engineering, Shandong College of Light Industry, Jinan 250100, China); L. OLSSON, J. NIELSEN (Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark).

Abstract A method and a device were developed to monitor biomass concentrations on-line and *in-situ* in a fermentation process. The presence of microbial cells would affect the dielectrical properties of microbial suspensions. At radio-frequencies the dielectric permittivity of cell suspensions are monotonic function of the measuring frequency and cell density. Based on this understanding a new method for measuring biomass concentration is proposed. Using this method the biomass concentrations are measured on-line and *in-situ* without taking samples from the bioreactor, and only viable cells are detected. The electrode could be directly inserted into the fermentor and could be sterilized in place. The method has a wide use in the industrial field of pharmacy, brewery, sewage disposal.

Key words cell suspension, biomass concentration, on-line and *in-situ* measuring, permittivity dispersion, sterilizing in place

抗 CEA 单链抗体与链亲和素融合基因的表达*

任 军¹⁾

(第四军医大学西京医院肿瘤中心, 西安 710032)

季万胜 周绍娟 陈 峥 张学庸 樊代明

(第四军医大学西京医院消化内科, 西安 710032)

摘要 克隆分泌 CEA 杂交瘤细胞重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L), 以 Linker 连接 V_H 及 V_L 构建抗 CEA 单链抗体. 同时以 Spacer 连接单链抗体和链亲和素, 构建成功单链抗体和链亲和素融合基因, 克隆该融合基因

* 国家自然科学基金资助 (39400159, 39870787) 和国家“九五”攻关课题资助项目 (96C02-01-17). ¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (029) 3375407, E-mail: renjun@fmmu.edu.cn 收稿日期: 1999-11-02, 修回日期: 2000-02-17