

论单通道检测在发酵尾气分析中的应用

公维丽^{1,2}, 刘仲汇^{1,2}, 马耀宏^{1,2}, 史建国^{1,2}

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 生物研究所, 山东 济南 250014; 2. 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014)

摘要: 发酵尾气分析技术在业内的应用已逐渐展开, 但人们对单通道检测的认识依旧模糊。从尾气分析的意义、生物过程的“实时性”以及发酵过程的“临界点”反映发酵状态的改变等方面, 阐述了发酵尾气分析应采用实时、连续、在线检测; 通过以尾气分析获得的“临界点”在发酵工程中的应用(指导转速调整、流加补料、乳糖诱导及处理异常发酵), 进一步阐明只有单通道检测才能真正做到检测的实时、连续、在线, 捕捉到有价值的“临界点”信息。

关键词: 发酵; 尾气分析; 单通道; 检测

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 1674-2214(2022)04-0217-05

DOI: 10.16774/j.cnki.issn.1674-2214.2022.04.009

Discussion on the application of single channel detection in fermentation tail gas analysis

GONG Weili^{1,2}, LIU Zhonghui^{1,2}, MA Yaohong^{1,2}, SHI Jianguo^{1,2}

(1. Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Biology Institute, Jinan 250014, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Jinan 250014, China)

Abstract: The technology of fermentation tail gas analysis has been gradually developed and applied in the industry, but single-channel detection is still poorly understood. In this paper, we expounded that fermentation tail gas analysis should adopt real-time continuous online detection from the significance of fermentation tail gas analysis, the “real-time” of biological process, and the critical point of fermentation tail gas analysis curve reflecting the change information of process state, and the critical point obtained from tail gas analysis in fermentation engineering (guidance of speed adjustment, flow feeding, lactose induction and treatment of abnormal fermentation) illustrated that only single channel detection can achieve real-time, continuous and online detection, and capture valuable “critical point” information.

Keywords: fermentation; tail gas analysis; single channel; detection

发酵尾气分析指在发酵过程中在线检测尾气中的 CO₂ 和 O₂ 的体积分数, 计算呼吸代谢参数 CO₂ 释放率(Carbon dioxide evolution rate, CER)、摄氧率(Oxygen uptake rate, OUR)和呼吸商(Respiratory quotient, RQ), 得到细胞代谢信息, 是发酵工程的一种过程分析技术(Process analysis technology, PAT)。无论是在微生物生长阶段, 还是在产物合

成阶段, CER 的变化都与菌体生长状态、碳源的消耗和供氧情况密切相关。OUR 虽然取决于菌体浓度, 但是也与发酵液的营养成分、溶氧水平、菌体的比生长速率以及碳源的种类和浓度等因素有关。RQ 的变化反映了微生物胞内代谢的变化, 揭示了发酵过程中微观代谢途径通量的变化, 是微生物菌体生长、能量代谢维持、产物和副产物合成代谢共同

收稿日期: 2022-09-01

基金项目: 齐鲁工业大学科教产教融合试点工程基础研究类基金资助项目(2022PY067); 齐鲁工业大学科教产教重大创新专项(2022JBZ01-06); 山东省重点研发计划项目(重大关键技术)(2016ZDJS07A20)

作者简介: 公维丽(1988—), 女, 山东临沂人, 副研究员, 研究方向为生物传感器技术、微生物发酵工程, E-mail: 15264110812@163.com。

通信作者: 刘仲汇高级工程师, E-mail: sws2605384@163.com。

作用的结果^[1-7]。利用这些参数及相关性分析,可以更好地对发酵过程进行监测、分析,从而深入了解发酵规律,优化发酵工艺,控制发酵过程,提高发酵产率和产量,降低成本,加快新品研发和产业化。

与溶解氧和 pH 检测相比,尾气分析得到的参数 CER, OUR 和 RQ 在一定程度上反映了发酵过程的部分特质,揭示了微生物的生理特性,具有生物学意义。尾气分析时仅采集发酵罐排出的尾气,不影响发酵罐结构,不接触发酵液,无染菌风险^[8-10],更容易被业界接受,故成为现代发酵工程的重要分析手段,已被应用于发酵、制药、生化、农业、环保和食品等领域。虽然该技术已在业内得到应用,但是由于历史原因以及设备成本等因素的影响,对检测设备是否需要采用独立的单通道,认识依旧模糊。因此,笔者从理论与实际应用两方面对该问题加以分析探讨。

1 发酵尾气分析应实时连续在线

在发酵过程中,微生物生长一般需要经历迟缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期^[11]。常规的液态好氧分批发酵周期一般为数小时至数天。在看似较长的发酵过程中,发酵状态的转变往往发生在很短的时间内,某些代谢变化可能用时更短。

张嗣良等在《多尺度微生物过程优化》^[12]及相关论文^[13]中详细阐述了生物过程的“实时性”:1) 从生物过程发生的时间以及生物技术发展特点来看,对于以活细胞为主体的细胞大规模培养的生物反应过程,可粗分为在以基因水平的分子尺度、代谢调节的细胞尺度和工艺控制的反应器尺度上发生的;2) 可将微生物和细胞在酶活性水平上(包括酶的激活、抑制,亚基的结合和解离以及共价修饰和降解)控制的时间常数描述在毫秒至秒的范围内,在基因表达调控水平上(诱导、转录的阻遏和去阻遏)描述至分钟。考察微生物和细胞代谢调节,在以秒为单位的时间尺度上是合适的。因此,作为动态观测记录细胞代谢状况的发酵尾气分析设备,应对排出的尾气进行实时连续在线检测,只有这样,才能准确捕捉到发酵过程中代谢的改变。

2 合理利用发酵过程中的临界点

2.1 发酵过程中的临界点

李强等^[14]在《微生物发酵中二氧化碳释放速率变化规律》中,通过青霉素、古龙酸、二元酸和葡萄糖酸 4 个体系的发酵实验及动力学分析,对 CER 的变

化规律进行了探究,研究结果表明:无论是霉菌、酵母菌、细菌、单液相体系、双液相体系,还是纯种发酵、混合菌发酵,CER 的变化都与体系状态变化有着密切联系;CER 曲线上的转折点对应的就是发酵状态的转变点。由该文献的 CER 曲线可以发现:在这些转折点处曲线发生了方向性改变,即由升转为降,或者由降转为升,曲线出现明显的峰或谷,发酵体系的状态都发生了显著改变。

在发酵过程中还存在另一类极具价值的变化点,即发酵体系的状态变化由缓慢到快速,或由快速转为缓慢的时间点,比如在微生物生长由迟缓期进入对数生长期,由对数生长期进入稳定期以及由稳定期进入衰亡期的那些时间点上,都有可能出现该情况。在这类时间点上,虽然发酵体系的 CER 曲线没有发生方向性改变(由升到降或由降到升),但是发生了变化速率的显著改变,或者说发生了从一个发酵阶段转变到另一个发酵阶段。这类变化点在发酵过程中普遍存在,不仅有着明确的生物学意义,而且具有非常重要的应用价值。可将发酵过程中这类变化速率显著改变的点,以及发生方向性改变的转折点统称为临界变化点,简称“临界点”,其特征是发酵体系发生了从一个状态到另一个状态的改变,亦或从一个阶段到另一个阶段的改变。

应用发酵尾气分析技术进行实时连续在线监测,可方便、直观地获得发酵过程中的临界点。这些临界点提供的丰富信息可以帮助人们辨识发酵过程状态,为调整搅拌转速/通气量、流加补料、基因诱导,以及异常发酵处理等一系列工艺操作提供明确指导,同时也为工艺放大提供对比数据。充分重视和利用这些临界点信息对优化发酵工艺具有重要意义。

2.2 利用发酵过程临界点指导操作

2.2.1 利用临界点调整供氧

溶解氧是好氧发酵微生物生长及产物合成所必需的。在发酵过程中,特别是在高密度工程菌培养中,溶解氧往往成为限制性因素。如何适时调整搅拌转速和通气量以达到最适溶解氧,是发酵工艺的关键点之一^[15-17]。一般根据溶解氧 DO、pH 及镜检结果等进行调整,比较粗放,而利用尾气分析曲线的临界点,则可以准确把握调整时机。

在山东省科学院生物研究所承担的“植酸酶工程菌高密度发酵智能控制关键技术”(山东省重点研发计划项目 2016ZDJS07A20)项目中,在 10 L 实验室发酵罐上,采用 FGA 发酵尾气分析仪,对重组毕赤酵母表达植酸酶过程进行实时在线检测。发酵温度 30 °C,初始发酵液体积 7 L,通气量 5 L/min,搅

拌转速 200 r/min。发酵 6 h 5min 时, CER 开始缓慢上升; 发酵 25 h 26 min 时, CER 出现快速上升, 曲线上形成明显的临界点, 预示发酵进入对数生长期, 此时立刻调整搅拌转速至 400 r/min; 之后随着 CER 的上升, 阶段性小步调整搅拌转速达 530 r/min, 并保持至发酵 48 h 30 min, 之后调整搅拌转速至 500 r/min, 直至发酵结束。该发酵过程的 CER 变化曲线如图 1 所示。在该过程中, 发酵 15 h 时进行甲醇诱导, 诱导 5 h 后开启蛋白表达, SDS-PAGE 检测植酸酶表达见文献[18], 最终酶活达 3 000 U/mL。

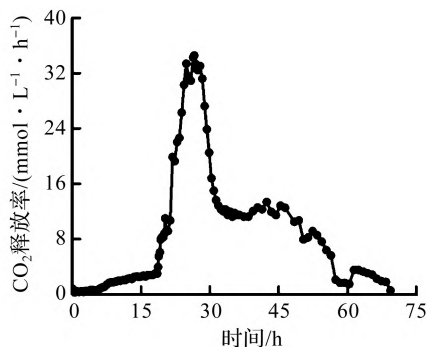


图 1 植酸酶工程菌高密度发酵尾气 CER 曲线

Fig. 1 The tail gas CER curve of engineered phytase production strain in high density fermentation

由图 1 可知: 在临界点改变搅拌转速后, 细胞快速进入对数生长期。实验中根据临界点及曲线变化趋势, 恰当掌握搅拌转速调整时机, 满足供氧需求,

使植酸酶表达量及酶活均达较高水平。

2.2.2 利用临界点进行补料

流加补料-分批发酵^[19-23]是现代发酵工程普遍采用的方式, 可以较好地解决底物阻遏, 按设备能力供氧, 减缓代谢有害物的不利影响; 尤其对于基因工程菌高密度发酵, 流加补料是实现高密度发酵必不可少的手段。流加补料技术的关键是对补料时机的把握, 利用发酵尾气分析曲线中的临界点能够比较精准地掌控补料时机。

某大型药企在重组大肠杆菌培养白细胞介素-II 生产过程中, 在 1 t 生产罐上应用 FGA 发酵尾气分析仪, 监测尾气变化, 其发酵过程 CER 曲线如图 2 所示。由图 2 可以看出 CO₂ 的整体变化规律: 1) 发酵开始后, CER 先有极短的平缓区, 很快在 1 h 32 min 时曲线出现快速上升的临界点, 预示重组大肠杆菌生长进入对数生长期, 此时开始流加补料, 并根据 DO 反馈值调整搅拌转速, 保持 DO 在较高水平。2) 在 CER 迅速上升的对数生长期, 逐渐提高流加补料速率, 在达到峰值, 出现临界点时, 流加速率达到最大。3) 在发酵后期, 补料速率维持在某一稳定水平, 直至发酵结束。整个发酵过程约 10 h, 产物表达量占菌体总蛋白的 40%。发酵过程中对数生长期起点和终点(临界点)的出现都发生在 1 min 内, 如非采用实时连续在线检测是难以观察到的。

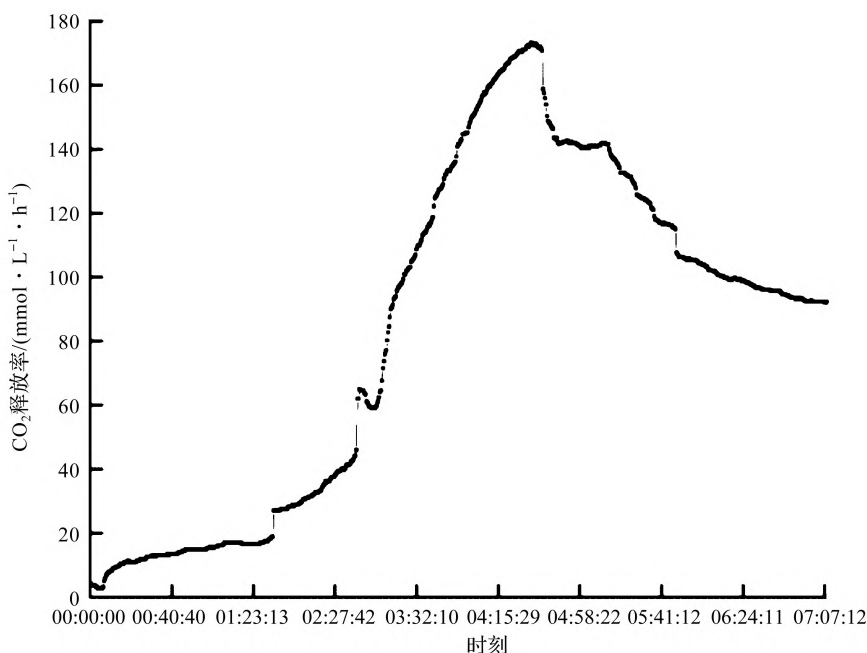


图 2 重组大肠杆菌培养白细胞介素-II CER 曲线

Fig. 2 CER curve of interleukin-II production strain of recombinant *Escherichia coli*

2.2.3 利用临界点进行诱导

在重组大肠杆菌发酵过程中, 通常采用 IPTG 诱导剂进行诱导。IPTG 诱导剂具有一定毒性, 对

宿主和代谢产物有抑制作用, 且费用高昂, 在工业化大规模生产中较难推广。乳糖是一种廉价资源, 可以作为碳源被大肠杆菌代谢利用, 有报道在重组蛋白培

养中用其作诱导剂,但尚不普遍,究其原因,除诱导机理复杂外,乳糖诱导时机不易把握也是重要因素。

张毅等^[24]在 LB 培养基中,分别在对数生长期的早期、中期以及后期对融合蛋白表达菌 BL21 (DE3)(pFu)进行乳糖诱导,发现:乳糖的加入会造成菌体生长迟滞,在早期、中期进行诱导均不理想,只有在后期进行诱导效果最佳,此时既可以得到较高的表达产物,又可以获得较高的菌体密度。有研究报道^[22-30]表明:在培养基葡萄糖刚刚耗尽,细胞浓度增加缓慢或略有下降时开始诱导,效果最佳。

应用发酵尾气分析技术,可以直观地辨识菌体生长的各个阶段。一般在对数生长期的后期,即培养基中葡萄糖刚刚耗尽,细胞浓度增加缓慢或略有下降时,尾气分析的 CER 曲线会出现一个由上升转为下降的临界点,利用该临界点可以方便地确定诱导时机,及时进行乳糖诱导。

2.2.4 利用临界点处理异常发酵

虽然微生物发酵是一个非线性时变系统,包含了生物、化学及物理的各种变化,过程较为复杂,但是当各种条件固定后,微生物细胞代谢又遵循一定的规律。从发酵尾气分析得到的大量数据来看,在某种发酵体系中,当工艺条件确定后,其分析曲线整体形态是确定的,一旦发生改变,通常预示着某种代谢的改变。因此,捕捉那些异常临界点,对异常发酵的及早发现和um处理很有意义,特别是对工业大生产和高附加值的生物制药更是如此。就此而言,尾气分析的敏感性和实用性均超过了 pH、DO 等其他现有检测手段。

在广东某高校进行的重组大肠杆菌发酵药物蛋白实验中,发酵开始后,经过短暂的迟缓期,CO₂ 曲线开始缓慢上升,约 2 h 后发酵快速进入对数生长期;20 min 后,CO₂ 曲线突然出现了下折,CO₂ 体积分数迅速下降,在不到 30 min 的时间内下降到接种前水平,镜检观察,发现此时发酵液中的工程菌已经消失,判断感染了噬菌体,随即停止发酵,并迅速进行灭菌处理。该实验过程的 CO₂ 体积分数变化曲线如图 3 所示。

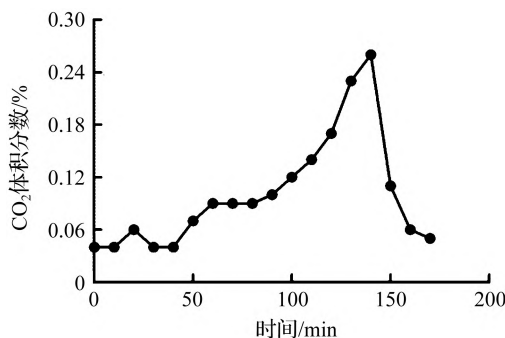


图 3 重组大肠杆菌培养蛋白药物 CO₂ 曲线

Fig. 3 CO₂ curve of recombinant *Escherichia coli* in protein drug fermentation process

3 实时连续在线检测

3.1 实时连续在线检测的意义

利用发酵尾气分析技术,特别是利用分析曲线上的临界点,监测发酵过程中细胞的代谢变化,可以为发酵操作及进一步工艺优化提供依据。发酵尾气分析技术的关键在于对发酵过程中尾气的 CO₂ 及 O₂ 进行实时连续在线监测,只有这样才能捕捉到发酵状态改变的临界点,监测到细胞代谢状态的改变。由于发酵过程中临界点的出现和状态的改变往往发生在极短的时间内,所以实时连续在线检测尤为重要。

3.2 采用单通道确保实时连续在线检测

随着现代科技的发展,发酵尾气分析所采用的各检测部件本身的响应时间非常短,一般在毫秒级,但从发酵罐排气口到检测腔,尾气的传输需要时间,相比之下检测时间可忽略不计,故完成一次检测的时间主要取决于尾气的传输时间。

虽然采用一套检测部件加转换开关对多套发酵设备分时切换轮巡检测的方式,可以实现一套尾气分析系统测定多点尾气,降低发酵设备的平均成本,但是在切换过程中,气路转换无法瞬间完成,必须反复用后一通道的尾气顶出前一通道的尾气,会造成尾气混合带来检测误差,此外还存在传输时间长、信号延时等问题,也增加了染菌风险。因此,在进行发酵尾气分析检测时,应该采用独立的单通道检测,即一套检测设备连接一个发酵罐,唯有采用此方式才可以实现实时连续在线检测,捕捉到那些极其重要的临界点。

4 结 论

应用发酵尾气分析技术可以深入了解细胞的代谢状况。分析曲线上的“临界点”往往反映了发酵过程状态的改变,对研究发酵工艺至关重要。要捕捉这些临界点就需要进行实时连续在线检测,唯有采用独立的单通道检测方能做到。目前,发酵尾气分析技术日臻成熟,尾气分析装置也成为发酵罐的标准配置。随着设备的普及和尾气分析在多方面应用的深入开展,业界对其应用效果的期望愈来愈高,单通道检测在发酵尾气分析中的意义会日益清晰明了,该检测方式有望被业界广泛接受。

参考文献:

- [1] ZHAO L, FU H Y, ZHOU W C, et al. Advances in process monitoring tools for cell culture bioprocesses[J]. Engineering

- in life sciences, 2015, 15(5): 459-468.
- [2] BIECHELE P, BUSSE C, SOLLE D, et al. Sensor systems for bioprocess monitoring[J]. Engineering in life sciences, 2015, 15(5): 469-488.
- [3] 储炬,李友荣.现代工业发酵调控学[M]. 3版.北京:化学工业出版社,2016.
- [4] 叶勤.发酵过程原理[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [5] 王萍,王泽建,张嗣良.生理代谢参数RQ在指导发酵过程优化中的应用[J].中国生物工程杂志,2013,33(2):88-95.
- [6] 刘仲汇,史建国,朱思荣,等.尾气在线检测分析在发酵中的应用[J].发酵科技通讯,2012,41(4):32-35.
- [7] 王泽建,王萍,张琴,等.微生物发酵过程生理参数检测传感器技术与过程优化[J].生物产业技术,2018(1):19-32.
- [8] 徐有斌,章海红.尾气检测在泰乐菌素发酵中的作用[J].生物化工,2020,6(6):61-64.
- [9] HAUSMANN R, HENKEL M, HECKER F, et al. Present status of automation for industrial bioprocesses[M]//Current developments in biotechnology and bioengineering. Amsterdam: Elsevier, 2017: 725-757.
- [10] HÜTTEL S, MÜLLER R. Methods to optimize myxobacterial fermentations using off-gas analysis[J]. Microbial cell factories, 2012, 11(1): 1-11.
- [11] 沈萍.微生物学[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [12] 张嗣良,储炬.多尺度微生物过程优化[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [13] 庄英萍,田锡炜,张嗣良.基于多尺度参数相关分析的细胞培养过程优化与放大[J].生物产业技术,2018(1):49-55.
- [14] 李强,曹竹安.微生物发酵中二氧化碳释放速率变化规律[J].生物工程学报,1996,12(增刊1):237-242.
- [15] LÜ P J, QIANG S, LIU L, et al. Dissolved-oxygen feedback control fermentation for enhancing β -carotene in engineered *Yarrowia lipolytica* [J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 17114.
- [16] LOMAN A A, ISLAM S M M, JU L K. Production of Arabinol from enzymatic hydrolysate of soybean flour by *Debaryomyces hansenii* fermentation[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2018, 102(2): 641-653.
- [17] GUO J J, WU Y X, TANAKA T, et al. Development of redox potential-driven fermentation process for recombinant protein expression[J]. Biotechnology letters, 2021, 43(1): 99-103.
- [18] 王悦鹏,吴涛.微生物发酵产L-色氨酸的研究进展[J].发酵科技通讯,2020,49(3):153-160.
- [19] 孙新强,陈克杰,杨一恭,等.营养条件和温度对利福霉素B生产强度的影响[J].发酵科技通讯,2020,49(2):63-67.
- [20] 韩庆晔,公维丽,史建国,等.通过参数相关性分析对发酵控制策略在植酸酶高密度发酵中的作用探讨[J].工业微生物,2021,51(1):8-17.
- [21] CHANG Y H, CHANG K S, CHEN C Y, et al. Enhancement of the efficiency of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* via gradually batch-wise and fed-batch increasing the glucose concentration[J]. Fermentation, 2018, 4(2): 45.
- [22] YU C L, WANG H P, QIAO T S, et al. A fed-batch feeding with succinic acid strategy for astaxanthin and lipid hyperproduction in *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource technology, 2021, 340: 125648.
- [23] LIU W C, INWOOD S, GONG T, et al. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production[J]. Critical reviews in biotechnology, 2019, 39(2): 258-271.
- [24] 张毅,屈贤铭,杨胜利.乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J].生物工程学报,2000,16(4):464-468.
- [25] 樊祥臣,陈瑞东,刘佳,等.L-谷氨酸氧化酶高密度发酵及催化合成 α -酮戊二酸[J].过程工程学报,2016,16(2):292-297.
- [26] 林晓翔,林新坚,邱宏端,等.乳糖诱导对重组大肠杆菌表达CGTase的影响[J].食品工业科技,2015,36(17):114-120.
- [27] TIAN H S, TANG L, WANG Y, et al. Lactose induction increases production of recombinant keratinocyte growth factor-2 in *Escherichia coli* [J]. International journal of peptide research and therapeutics, 2011, 17(2): 123-129.
- [28] WURM D J, VEITER L, ULONSKA S, et al. The *E. coli* pET expression system revisited: mechanistic correlation between glucose and lactose uptake[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2016, 100(20): 8721-8729.
- [29] FANG S Y, LI J H, LIU L, et al. Overproduction of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Escherichia coli* by a two-stage glycerol feeding approach [J]. Bioresource technology, 2011, 102(22): 10671-10678.
- [30] KITTLER S, KOPP J, VEELTURF P G, et al. The Lazarus *Escherichia coli* effect: recovery of productivity on glycerol/lactose mixed feed in continuous biomanufacturing [J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2020, 8: 993.

(责任编辑:应艳杰)