

第一章 生物工艺过程相关参数的检测

第一节 菌体量的测定

一、微生物菌体量的测定

对于微生物培养与管理、动力学研究及细胞成分分析，微生物菌体量的测定是不可缺少的工作，其测定方法可分为基于细胞物理性质变化的直接法和基于细胞内（或外）成分变化换算而得出的间接法。这些方法有的可迅速得到结果，有的虽精度很高但非常费时，因此在实际使用中应根据使用目的与要求，选择适宜的方法。当微生物细胞以单细胞（无凝集性）形式生长时，培养基中悬浮粒子数的增加可作为生长菌体量；对于霉菌、放线菌等以菌丝体形式生长的，菌体量与悬浮粒子间无对应关系。另外，液态培养基中的不溶成分会影响到菌体量的测定。固态培养中由于载体颗粒的影响，更多的是采用间接法测定微生物菌体量。

（一）质量法

菌体量的测定方法中，质量法是最基本的方法，其测定步骤如下。

1. 取样（培养液量）

通常从 100ml 培养液中可得到 10~90mg 的干菌体，基于此数据可决定取样量并确定称量精度。另外，可根据每一个大肠杆菌细胞的干重为 10^{-13} g 这一数值，决定取样量。三角瓶培养中，最好取全部培养液。从大型发酵罐中取样时应注意菌体可能出现的附壁生长现象。另外，从取样管取样时应去除最初流出的培养液后再取样。对于霉菌培养中菌体量的测定，取样误差占测定误差的主要部分。

2. 菌体分离

(1) 过滤法根据实验的目的，选择适宜的滤纸，过滤装置也极简单。这是过滤法的优点。滤纸可分为深层过滤滤纸和表层过滤滤纸两类一般定性、定量用纤维滤纸或玻璃纤维滤纸的纤维内部能够保留颗粒，因此为深层过滤用滤纸。醋酸纤维或硝化纤维制成的隔膜滤纸的表面上孔隙度均一，能够截留颗粒，因此分类为表层过滤用滤纸。

由于隔膜滤纸的微孔为过滤液中颗粒覆盖，使液体过滤速度急剧下降，因此，一般隔膜滤纸主要用于细胞数较少时培养液的浓缩和进行微生物分析等工作时的过滤除菌。

通过过滤收集菌体时，滤纸截留颗粒的性能很重要，有必要根据细胞的大小、形状选择适宜的滤纸。颗粒的截留量以全部颗粒的 98% 被截留作为选择依据，隔膜滤纸的孔径范围为 $0.1 \sim 5.0 \mu\text{m}$ ，玻璃纤维滤纸为 $0.7 \sim 2.7 \mu\text{m}$ ，定性、定量纤维滤纸的孔径范围为 $2.5 \sim 25 \mu\text{m}$ 。

一般细菌、酵母、霉菌等微生物细胞的收集可采用玻璃纤维滤纸。通常将滤纸置于布氏漏斗（Buchner filter）中，进行过滤。玻璃纤维滤纸可耐 550 高温，并且过滤速度快。滤纸使用前，应在室温条件下真空干燥，并称重。

有的样品在过滤前需要进行处理。微生物培养过程使用 CaCO_3 调节 pH 时，应使用盐酸或乙酸使残留 CaCO_3 溶解。培养基中含有玉米浆（corn steep liquor）时，有时会出现蛋白质沉淀，加大过滤难度另外，培养液的黏度与多糖含量有关，多糖含量高时黏度会明显增加，此时可通过加热、添加凝聚剂或水的方法进行处理。作为凝聚剂，可使用 CaCl_2 或 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ，用量为 $1 \sim 3 \text{g/L}$ 发酵液，必要时可加入定量好的助滤剂。

(2) 离心分离法 一般的离心分离条件是：酵母量为 $1200 \sim 3000 \times g$ ，细菌量为 $5000 \sim 8000 \times g$ ，分离时间为 $5 \sim 10 \text{min}$ 。换算为转数 $n(\text{r/min})$ 。以 $3000 \times g$ 为例：

$$n = \sqrt{\frac{3000}{1.11 \times 10^{-5} \times r}} \quad (1-1)$$

式(1-1)中, r 为转轴至离心管中心的距离 (cm)。当细胞浓度很低时, 以细菌为例, 浓度在 10^7 细胞/ml 以下, 离心分离的效果较差。特别是从离心完成后取出过程的操作, 是产生误差的主要环节。水洗涤菌体时, 应注意细胞内成分的渗漏。特别是像枯草杆菌等革兰氏阳性菌体, 洗涤中会出现溶菌现象。洗涤操作最好在 0°C 附近 (以下) 进行, 可采用 1% 胨的水溶液或合成培养液等取代洗涤水。另外, 洗涤可能导致细胞所带的静电性质发生变化, 使细胞沉淀性能变差。

3. 干燥

干燥方法有 105°C 常压干燥, 80°C 或 40°C 减压干燥及冷冻干燥等一般常压干燥需要 3h 达到恒重, 温度降低 10°C , 干燥时间约增加 1 倍干燥温度高, 有可能使部分细胞发生分解, 除水分以外的挥发性成分也随之丧失。另外, 由于氧化作用, 总重量也可能增加, 结果与低温 (40°C) 减压干燥的结果相近。进行减压干燥时, 真空干燥器内常放有硫酸或硅酸和五氧化二磷。使用硫酸和五氧化二磷时, 由于减压作用, 两者混合形成雾状, 并与菌体细胞发生反应, 因此应将硫酸和五氧化二磷分别放置干燥器内。硫酸放置于一多孔板上; 五氧化二磷薄薄地铺展在一器皿上, 在空气中放置, 当表面形成皮肤膜状时, 再放入干燥器。冷冻干燥时, 洗涤后的细胞浓度以培养菌体浓度的 5 倍 (610nm 时约等于 10 倍) 为宜, 取 3ml 置于称量瓶 (内径 40mm 左右) 中, 放入冰箱冷冻后, 采用小型冷冻干燥器时, 进行一夜干燥, 最终将温度升至 40°C 左右。通入干燥空气的同时, 快速称量。

4. 称重

干燥后细胞很易吸潮, 应在低温下尽快称重。

5. 湿润质量法

菌体的干燥称重法是测量精度较高的方法, 但由于需要培养液

的量较大，干燥时间较长等原因，在操作与管理上不十分方便。对于霉菌菌丝可采用省去干燥操作的称取湿细胞质量的方法。取 20~50ml 培养液，过滤后用滤纸收集菌体，菌丝体从滤纸上剥下后用 2~3 枚新滤纸将成型的菌丝片中的水分压出，反复进行 2 次以上后称重。用滤纸吸水时，可采用滚筒压的方法，以保证受力一致。一般菌体的湿重为干重的 2.5~5.0 倍，如果能事先已知湿重与干重的关系，就可以将所测菌体湿度这一参数用于培养过程的监控，并且得到的湿菌体还可以用于细胞成分分析和生理实验。

6. 含有碳氢化合物培养液中的菌体量的测定

这是较特殊的例子，可采用 Hug 和 Fiechter 的方法。培养液中加入等量的甲醇、丁醇、氯仿混合物（10:10:1），在带有塞子的离心管中，充分振荡后， $4500 \times g$ 离心 10min，经水洗涤、离心后，105℃ 干燥至恒重。

(二) 浊度法

1. 原理

采用光学方法进行菌体量测定主要是比浊法（turbidimetry）。比浊法是指，当白色光通过光孔照射到菌体悬浮液时，会产生光散射和光的透射现象。当利用浊度计测定菌体悬浮液的浊度时，通过测定样品的透射光率和散射光率，可确定菌体悬浮液的相对浓度。

当光通过细胞悬浮液时，入射光的强度为 I ，透射光通过厚度为 h 的悬浮液介质层后的强度为 I_0 ，根据 Lambert-Bear 经验式，以下关系式应成立：

$$I = I_0 e^{-\tau h} \quad (1-2)$$

式中 τ —— 浊度（turbidity），其可由式（1-3）给出：

$$\tau = \rho \tau' \quad (1-3)$$

式中 ρ —— 悬浮液中颗粒质量浓度（mg/ml）

τ' —— 浊度系数

当 $h = 1\text{cm}$ 时，

$$\log \frac{I_0}{I} = \left(\frac{\tau'}{2.303} \right) \rho = K\rho \quad (1-4)$$

式 (1-4) 的左边 $\log(I_0/I)$ 为吸光度 (absorbance), 其反映了液体浊度的变化。在普通光电光度计上把 $\log(I_0/I)$ 换算为吸光度刻度标出对于微生物培养液所测结果常称之为 OD(optical density) 值进行测定操作时, 应事先针对被监测菌做出标准曲线, 不言而喻, 即使是同一种菌, 也会因菌的生理性质等的不同而改变干重与浊度之间的关系, 当然, 多数情况下其还是相对稳定的。选样测定波长要考虑培养基的颜色, 一般肉汤等用红色滤光片, 无色悬浊液用蓝色滤光片。

K 是与散射光相关的系数, 因此, K 值随光束、波长、试样皿的形状、细胞大小的平均分布、细胞的形状和培养基成分的屈光率等而变化。

2. 制作标准曲线

取约 100ml 菌悬液 (发酵培养液), 其中 20ml 用于浊度测定, 其余测定细胞干重, 以获得细胞干浓度。当原液的吸光度值小于 0.3 时, 应离心浓缩细胞, 然后按原液、原液 $\times 0.8$ 、原液 $\times 0.6$ 、原液 $\times 0.4$ 、原液 $\times 0.2$ 和原液 $\times 0.1$, 用缓冲液或原液离心后所得上清液稀释, 获得吸光度与细胞浓度之间的关系, 吸光度在 0.05~0.3 范围内, 并为一直线。

3. 波长的确定

可选择的波长范围是 300~800nm, 使用中选低波长时, τ' 值较大, 灵敏度好。但一般培养液中短波段吸收能力较大, 为避免这种影响, 故多使用 500~660nm 波长。另外, 由于浊度测定法的优点是迅速, 因此在实际发酵过程分析中常被采用。但是, 在培养过程的中后期, 往往会出现测定值超出线性关系范围。基于这一原因, 使用感度较低的长波段可能效果更好些, 例如, 选用 610nm 和 660nm 波长。

4. 测定中应注意的几个问题

测定与标准曲线制作时应注意如菌体、培养条件、测定条件 (分光光度计、波长等) 的一致, 为保证 K 值一定, 还应注意采

用同一稀释液稀释。当培养条件、测试条件发生变化时，需重新制作标准曲线。培养液中有絮凝现象时，可加入阴离子或非离子型表面活性剂。

(三) 细胞充填容积法 (packed cell volume)

采用如图 1-1 所示的带有刻度的两种离心管，(a) 管为下部

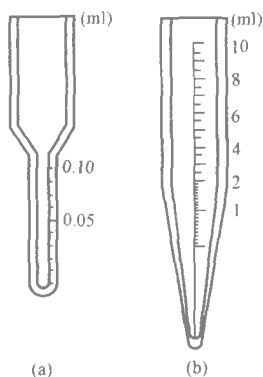


图 1-1 带有刻度的离心管

是毛细沉淀管的离心管，装液量为 5ml，毛细管部分的总刻度为 0.10ml，最小刻度为 0.01ml。(b) 管的装液量为 10ml，最小刻度是 0.1ml。(a) 管适用于细菌、酵母及孢子等，(b) 管适用于霉菌等丝状菌。离心分离条件，以酵母为例 $1200 \times g$ ，10min 即可。为将所获得的细胞容积换算成干重，可取部分培养液采用质量法测定菌体量，然后换算出菌体干重。应用细胞充填容积法测定菌体量时，菌体浓度应足够高。例如，酵母菌的浓度在 10mg 干细胞 /ml 左右

为宜。

细胞充填容积法的优点是，可迅速获得结果，对于难以过滤的细胞培养液也能适应，即使培养液中含有不溶性物质，由于离心作用，杂物与细胞分层存在，因此能从刻度上将其扣除。

离心管内细胞的容积因离心条件、容器形状和悬浮液的组成等的变化而变化，例如，含有大量像 NaCl 这样的电解质，会使细胞之间的容量加大。因此，如果能同时进行细胞间容积的测定，可提高测量精度。为进行细胞间容积的测定，需在菌体溶液中加入菊糖、右旋糖酐或聚乙烯吡咯烷酮等不能进入细胞内的物质。离心后去除上清液，采用稀释法测定细胞间填充物的量。

(四) 间接测定法

1. 氮量测定法

一般，细菌的氮含量为 6.5%~13%，霉菌菌丝的氮含量为 4.5%~8.5%，酵母菌的氮含量在 7.5% 左右。根据含氮量再乘以 6.25，可获得菌体的粗蛋白（包括杂环氮和氧化型氮）含量。测定氮含量的方法有很多，如用微量凯氏定氮（Micro-Kjeldal）法、奈氏（Nessler）法、过氯酸和磷酸等消化法和 Dumas 测氮气法。这些方法的特点是取样量不要求很多，如测定细胞量为 1mg，取 10ml 培养液就可以了。这些方法的不足是测定比较费时，并且难以同时测定多个样品。单位细胞的氮含量随培养时间和条件而变化，这在菌体量测定中应充分注意。Dumas 测氮气法是将样品与氧化铜混合，在 CO_2 气流中加热后产生氮气，收集到呼吸器中，用 KOH 吸去 CO_2 后即可测定氮气体量。

2. 基于细胞其他成分的测定法

可通过测定细胞中的核酸、过氧化氢酶和二氨基庚二酸（diaminopimelic acid）等的含量，换算为菌体量。测定细胞干重时，常将细胞外成分同时称重，因此在细胞成分分析时，有必要对测定结果进行修正。霉菌细胞壁的主要成分氨基葡糖可采用如下方法测定。

取 1 份米曲加 4 份水，加入淀粉酶消化后过滤，加入 HCl 水解，游离出来的氨基葡糖通过 Dowex50 的树脂去除其他成分后，比色定量。据报道，菌丝体中氨基葡糖的含量为 $110\mu\text{g}/\text{mg}$ 。测定样中的核酸，可通过加入 $0.5\text{mol}/\text{L}$ 高氯酸，加热处理后在 260nm 的吸光度下测定，然后计算出菌丝含量。

3. 根据胞外物质的变化测定菌体量

培养液中的细胞浓度，可通过培养液中基质的减少，或产物的增加而获得。其中，最为常用的方法是测定氧的呼吸速度 I_{O_2} [$\text{mlO}_2/(\text{g 培养液} \cdot \text{h})$]。大型发酵设备中，通过连续测定通风与排风中氧的浓度变化，可很方便地获得 I_{O_2} ，对于小型培养装置，可采用瓦氏呼吸仪进行测定。若单位菌体的氧呼吸速度为 Q_{O_2} [$\text{ml O}_2/(\text{mg 干菌体} \cdot \text{h})$]，则有：

$$I_{O_2} = mQ_{O_2} \quad (1-5)$$

同样，单位菌体的二氧化碳生成速度为 Q_{CO_2} ，则有：

$$I_{CO_2} = mQ_{CO_2} \quad (1-6)$$

式中 m ——单位培养液中细胞量（mg 细胞/g 培养液）

Q_{O_2} 和 Q_{CO_2} 随培养时间和条件而变化，在所采用的培养条件范围内，应保证 I_{O_2} 与 m 成比例变化为宜。这一方法对于固态培养特别有效。 I_{O_2} 与培养物的发热量成比例关系，采用热量计可很方便地进行测定。

（五）细胞数的测定

细胞数的测定方法有多种，包括血球计数板法、库尔特计数法（Coulter counter）、液体稀释法、平板菌落计数法、MPN（most probable number）法、延迟增长时间法等。这些方法中有的在微生物实验教材中已有详细论述，这里就不再涉及。

1. 血球计数板法（haemocytometer）

血球计数板的中部是由 4 条平行槽构成 3 个平台，中间的平台较宽且下陷 0.1mm，其中间又被一短槽隔成两半，每个半边各刻一方格网，即作为计数板的计数室。计数室的长、宽各为 1mm，盖上盖玻片后，盖玻片与载玻片之间的高度为 0.1mm。所以每个计数室的容积为 0.1mm^3 。稀释样品时以每小格 5 个左右细胞（ 2×10^4 细胞/ml）为宜。操作中，先将盖玻片放在计数室上面，用吸管吸取一滴已稀释好的菌液滴于盖玻片的边缘，让菌液自行渗入。多余的菌液用滤纸吸去。静置 5~7min 让细胞沉淀至计数室底部后在 300~600 倍显微条件下计数。对于有运动性的细菌，菌悬液中加入 4% 聚乙烯醇（polyvinyl alcohol）后再利用血球计数板测定。计数的细节见《微生物实验手册》。

2. 库尔特计数法

（1）原理 将适当稀释的培养液置于库尔特计数器中含有电解质颗粒溶液的容器中，里边放有一根细管子，在管内与容器内

各安装一电极，以形成电位差。当有电流通过时，电阻的大小取决于细管内电解液的容积。当细胞颗粒通过细管时，电解液的容积发生变化。通过脉冲强度分析仪测定细胞颗粒数。由于脉冲的大小与颗粒直径有关，其可通过购买标准颗粒而获得两者的对应关系。

(2) 应注意的几点 应注意测定管口的直径，以细胞颗粒的直径为管口直径的 2%~10% 时为好。对于细菌、酵母菌，采用管口直径 $50\mu\text{m}$ 为好。待测菌体悬浮液及培养基应事先采用 $0.25\mu\text{m}$ 孔径的膜或滤纸去除大颗粒杂质。对于需直接测定的培养液，其培养过程需使用棉塞。溶液中的电解质以生理盐水中所含电解质的量为宜。测试液中的颗粒数以 20000 个/ml 以下为好。该仪器可计数到 500 细胞/s。

二、微生物菌体密度的测定

微生物菌体及其悬浮液的密度、黏度等的物理性质是细胞分离、悬浮液输送等物理操作及装置设计上不可缺少的参数。本节介绍微生物菌体密度的测定。有关培养液黏度的测定将在下一节中介绍。

(一) 与密度测定相关的基本概念

设微生物细胞的密度 ρ_m ，则：

$$\rho_m = m/V \quad (1-7)$$

式中 m —— 细胞质量

V —— 细胞体积

如果已知或能够求得细胞的质量 m 与体积 V ，利用式 (1-7) 可直接求出 ρ_m ，但是，对于微生物而言，准确测定 m 和 V 不是一件容易的事情。因此，首先介绍微生物细胞悬浮液的密度的测定。

设微生物细胞悬浮液的密度为 ρ ，则：

$$\rho = \varphi \cdot \rho_m + (1 - \varphi) \rho_w \quad (1-8)$$

$$\rho_m = \frac{\rho - (1 - \varphi) \rho_w}{\varphi} \quad (1-9)$$

式中 φ —— 悬浮液中细胞的体积分数

ρ_w —— 溶剂密度

如果能够测定获得体积分数 φ 及 ρ 和 ρ_w ，则由式 (1-9) 可求出微生物细胞的密度 ρ_m 。

确定单位体积溶液中的细胞量 (体积分数) φ 的方法有：细胞计数法，利用显微镜直接测量细胞大小的方法，或测定沉降速度或黏度的间接测定法等

进行细胞悬浮液的制备时，如果已知分散于悬浮液中细胞的总质量为 m_t ，分散溶剂的质量为 m_w ，则：

$$\rho = \frac{m_t + m_w}{\frac{m_t}{\rho_m} + \frac{m_w}{\rho_w}} \quad (1-10)$$

$$\rho_m = \frac{m_t}{\frac{m_t + m_w}{\rho} + \frac{m_w}{\rho_w}} \quad (1-11)$$

当 m_t 、 m_w 已知时，测得 ρ 和 ρ_w ，则求得 ρ_m 。

(二) 密度的测定方法

进行液体或悬浮液的密度测定时，一般使用密度瓶，其操作简单。测量液体密度的密度瓶，大小不同、形状各异，应以保证测量精度为目的。选择相应的密度瓶。当密度瓶内装满溶液后，盖上盖，置于恒温槽中，此时，通过毛细管可能会溢出部分溶液，应擦去，并将密度瓶外部仔细擦干后称重。

密度瓶的容积为 V ，加入水后称重为 m_1 ，无水空瓶重为 m_0 ，则：

$$V = \frac{m_1 - m_0}{\rho_w} \quad (1-12)$$

式中 ρ_w —— 所测温度下水的密度

(三) 微生物密度测定的实例

1. 酵母

使用酿酒酵母，培养基组成为牛肉膏 0.3%，酵母膏 0.3%。

蛋白胨 0.5% 或葡萄糖 1%，pH 为 5。于 30℃ 下摇瓶培养 48h 后，离心分离，用 0.05mol/L，pH 5 的 KH_2PO_4 缓冲液反复洗净，并用此缓冲液制成菌悬液。测定该菌悬液的密度为 ρ 和 ρ_w 。700 $\times g$ 离心 10min 后求沉淀体积分数 φ_c 。将这些数值带入式 (1-9)，可求出 $\rho_m = 1.098\text{g/cm}^3 (\pm 0.008)$ 。

2. 细菌

所用细菌为 *Serratia marcescens*，培养基组成为牛肉膏 1%，蛋白胨 1%，葡萄糖 2%，NaCl 0.2%，pH 7，于 30℃ 下摇瓶培养 48h 后，使用 pH 7 的 Michaelis 缓冲液洗涤后，用同一缓冲液配制成菌悬液。为测出此菌悬浮液中菌体的体积，首先离心 5 min (1000 $\times g$)，然后改用表面倾斜的离心机离心 5 min (1700 $\times g$)，确定沉淀体积。由所求出的 φ 和 ρ ，利用式 (1-9) 可计算出 $\rho_m = 1.098\text{g/cm}^3 (\pm 0.008)$ 。

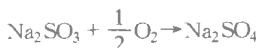
第二节 容积氧传递系数的测定

氧是难溶气体，在 25℃ 和 $1 \times 10^5 \text{Pa}$ 时，空气中的氧在纯水中的溶解度仅为 0.25mol/m^3 左右。培养基中含有大量的有机物和无机盐，因此氧在培养基中的实际溶解度更低。另外，培养基中微生物菌体浓度比较大，其呼吸强度比较高。如果停止供氧，菌体在几秒钟内会把培养基中的溶解氧耗尽，因此，在培养过程中有效而经济地供氧是极为重要的。

好氧生物反应中，氧气如何由气相传递至液相，并如何为微生物消耗，是人们急需了解的事情。假定微生物不形成絮状体或颗粒状，并呈很好的分散状态时，氧传递过程的限速阶段为通过液膜阶段，此时描述氧传递性能的重要参数是 k_{La} 。 k_{La} 也是生化反应器设计与操作过程中的重要参数。另外，了解 k_{La} ，对于建立好氧微生物生长、繁殖与氧的消耗之动力学关系也是有意义的工作。

一、亚硫酸盐法

容积氧传递系数 k_{La} 的测定有多种方法，亚硫酸盐法是应用较为广泛的方法之一。在正常条件下，亚硫酸根离子的氧化反应非常快，远远大于氧的溶解速度。所以，氧一旦溶解于液相中立即被氧化，反应液中的溶解氧浓度为零。此时氧的溶解速度（氧传递速度）最大。以铜（或钴）离子为催化剂，亚硫酸钠的氧化反应式为：



反应剩余的 Na_2SO_3 与过量的碘作用，反应式为：



然后用标准的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定剩余的碘，反应式为：



根据 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液消耗的体积量，可求出 Na_2SO_3 的浓度。

(一) 试剂

1. 0.1mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液（需标定）

在使用前 1~2 周配制。

2. 淀粉溶液

称 1g 淀粉，放入装有 100ml 水的烧杯中，煮沸 2min，冷却后过滤，水浴锅上加热杀菌。

3. 0.05mol/L 的碘溶液（需标定）

取 13g 碘和 25g KI 于 200ml 烧杯中，加少许蒸馏水，搅拌至碘全部溶解后，转入棕色瓶中，加水稀释至 1L。塞紧，摇匀后放置过夜。由于碘溶液不稳定，需蔽光保存。

4. 0.1 mol/L CuSO_4 溶液

作为亚硫酸钠的催化剂，每升亚硫酸钠溶液中加入 1ml 的 0.1mol/L CuSO_4 溶液。

(二) 实验操作

在测定 k_{La} 的反应装置（三角瓶或搅拌罐或气升式生化反

应器等)中加入适当浓度 $x \text{ mol/L}$ 的 Na_2SO_3 溶液,每升 Na_2SO_3 溶液中加入 1ml 0.1 mol/L CuSO_4 溶液。

采取与实际培养相同的搅拌与通风条件,通入空气后,在一定时间间隔取样,取样量略少于 $2.5/x$,以便于取样为准。由于所取样品极易氧化,所以取样后应迅速从中吸取 10ml 放入 0.05 mol/L $\text{I}_2(25\text{ml})$ 溶液中。此时应注意,吸管的出口应尽可能靠近 I_2 液的液面。然后利用标准的 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定。

(三) $k_L a$ 的计算

由于 Na_2SO_3 溶液中的实际溶解氧浓度为零,因此,时间 t_1 开始,至 t_2 这段时间里,吸收氧的量为 $c \text{ mol}$ 。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 mol/L , 消定量 $a \text{ ml}$ 。

I_2 0.05 mol/L , 使用量 25 ml

Na_2SO_3 $x \text{ mol/L}$, 取样量 $b \text{ ml}$ 。

Na_2SO_4 $y \text{ mol/L}$ 。

根据以上定义,式(1-13)应成立:

$$\frac{0.1af_1}{1000} + \frac{by}{1000} = \frac{2.5f_2}{1000} \quad (1-13)$$

$$\text{整理上式,有: } y = \frac{25f_2 - af_1}{10b} \quad (y_0: \text{初始浓度}) \quad (1-14)$$

$$x = y_0 - y \quad (1-15)$$

$$c = \frac{x}{4} \quad (1-16)$$

氧的吸收速度 N_{O_2} :

$$N_{O_2} = K_L a \cdot p \quad (1-17)$$

由于氧的吸收速度受液膜限制,所以:

$$N_{O_2} = k_L a \cdot c^* = k_L a \cdot \frac{p}{H} \quad (1-18)$$

由于 N_{O_2} , 可通过滴定由下式求出:

$$N_{O_2} = \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1} \quad (1-19)$$

因此， k_{La} 可由下式给得：

$$k_{La} = \frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{H}{p} \quad (1-20)$$

式 (1-20) 中， H 为亨利常数， p 为实验装置内的压力。

二、动态法

虽然亚硫酸盐法简便，使用范围广，但其测定 k_{La} 时是在非培养条件下进行的，因此所测 k_{La} 值与实际培养体系的 k_{La} 值不同。采用氧电极测量 k_{La} 除具有操作简单，受溶液中其他离子干扰少外，还可在微生物培养状态下快速、连续地测量，所得信息可迅速为发酵过程控制所参考，因此在实际培养体系中常使用氧电极法测定 k_{La} 。利用氧电极进行 k_{La} 的测量有多种方法，动态法是常用方法之一。

微生物通风培养液中对氧进行物料衡算，有：

$$\frac{d\rho}{dt} = k_{La} (\rho^* - \rho) - Q_{O_2} \cdot X \quad (1-21)$$

式中 ρ —— 培养液中的溶解氧浓度 (g/L)

ρ^* —— 无微生物耗氧时与气相平衡时的饱和溶解氧浓度 (g/L)

X —— 菌体浓度 (g 细胞/L)

Q_{O_2} —— 比呼吸速度 [g O₂ / (g 细胞 · h)]

k_{La} 中的 a 为单位培养液中的气液比表面积 (1/m)。当处于稳定状态时， $d\rho/dt = 0$ 。于是：

$$\rho = \rho^* - Q_{O_2} \cdot \frac{X}{k_{La}} \quad (1-22)$$

当停止通风，根据培养液中溶解氧浓度变化速率可以求出 $Q_{O_2} \cdot X$ 。当液体的溶氧浓度下降到一定程度时（不低于临界溶解氧浓度），在此时刻 t 恢复通气，培养液中溶解氧浓度逐渐升高，最后恢复到原先的水平。在此过程中溶解氧浓度的变化

$\rho(t)$ ，可通过对式 (1-22) 积分而得到。

$$\rho(t) = \rho + (\rho_0 - \rho) \exp(-k_{La} \cdot t) \quad (1-23)$$

从这一非常稳定的解析式中可求得 k_{La} 。

以上操作过程中降低溶解氧浓度的方法是利用微生物的呼吸作用。也可使用氮气置换溶液中溶解氧出去的方法，此时， $Q_{O_2} \cdot X$ 项为零。

(一) 实验装置

1. 小型自控发酵罐

小型自控发酵罐的使用方法见第二章第一节及第二节。

2. 氧电极

溶解氧电极分为极谱型和原电池两种。电极的表面都覆盖有一氧的通透性很高的聚四氟乙烯膜。

以原电池型氧电极为例 (图 1-2)，聚四氟乙烯膜覆盖在阴极 (银或铂) 上，阳极材料为铅，电解液为碱性溶液 (如氢氧化钾等)。当氧通过覆膜在阴极被还原，则产生电动势，有电流产生，此时的电极反应如下。反应中生成的电流的大小与参加反应的氧的浓度成正比。

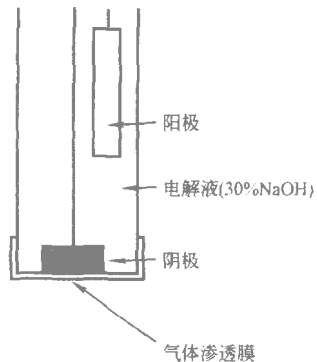
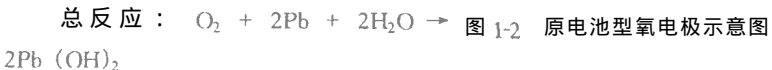
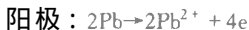
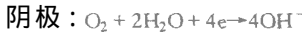


图 1-2 原电池型氧电极示意图

(二) 溶解氧 (DO) 浓度的测定

不同类型的氧电极，其使用方法有一定区别，使用时应严格参照各自使用说明书操作。这里举例作一简要介绍。

(1) 将组装好的氧电极与测定装置连接好，插入水中，接通

电源约 5min (长时间未使用的氧电极预热约需 30min)。

(2) 将氧电极浸入无氧水 [饱和亚硫酸钠溶液：在 100ml 三角瓶中加入亚硫酸钠 19g (实际溶解度是 28)，加入 50ml 蒸馏水] 中，DO 值减小到一定后，调节溶氧仪的调节旋钮，使仪表指针至零点。

(3) 从无氧水中取出氧电极后，用水冲洗，并用滤纸吸去覆膜上的水滴后将氧电极插入已充分通入空气的纯水中，至指针稳定后，调节校正旋钮使指针与饱和 DO 值吻合 (水温 37℃ 时，溶解氧浓度为 6.86mg/kg，或 20.9%)，对于没有温度补偿的溶氧仪，应采用与培养温度相同的水。将水加入到发酵罐中测定更好。

(4) 重复 (2)、(3) 两步骤，使显示数值稳定在一定范围内。

(5) 同时应调整好记录仪的零点与 100% 这两点。

在进行上述操作中，特别应注意的是：为减小氧扩散的影响，测定液需充分搅拌；除温度外，其他溶质的浓度也影响氧的溶解度；③在氧电极的使用中，应保证电极内外压力一致；覆膜电极所指示的数值，不是测试样品中的绝对氧含量。

(三) $k_L a$ 的测定

$k_L a$ 测定系统见图 1-3。

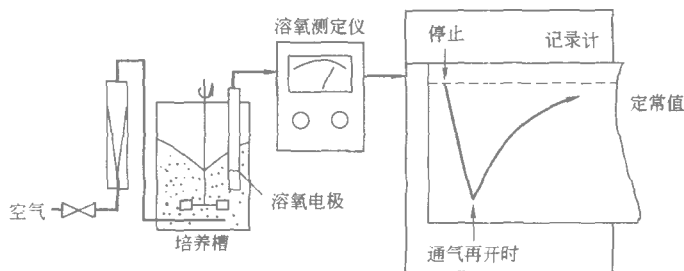


图 1-3 $k_L a$ 测定系统

(1) 将培养基加入至发酵罐 (若仅为测定 $k_L a$ 值，培养基可不必杀菌)，插入调整好的氧电极，设定好相应的温度、通风

量及搅拌转速。

(2) 连接氧电极输出端，设定记录仪的传输速度。

(3) 接入适量的种子液，开始培养。

(4) 培养一定时间（如 30min），此时 DO 值为一定，停止通气。

(5) 当 DO 值降至 $1 \sim 2\text{mg/kg}$ 时，通气，DO 值迅速回升，渐渐恢复至原值。

(6) 进行不少于 3 个搅拌转速条件下的测定（针对搅拌转速对 k_{La} 之影响），每一搅拌转速条件下至少进行两次测定，这样得出搅拌转速与 k_{La} 的关系式。

$$k_{La} = A \cdot N^\alpha \quad (1-24)$$

式 (1-24) 中， A 和 α 为常数， N 为搅拌转速，由 $\log k_{La}$ 对 $\log N$ 做图，可求出 A 和 α 值。

(7) k_{La} 值不仅受通风、搅拌的影响，而且也受搅拌叶、挡板形状及其安装位置的影响。

另外，测定中还应注意的是：① 提高调节，确保记录装置的灵敏度与 DO 电极输出电压相吻合；② 确定记录纸的传输速度（表 1-1）；通气停止时，应降低搅拌转速（ $100 \sim 200\text{r/min}$ ）以防止高搅拌转速将空气从培养液表面带入培养液中，再通气时，搅拌转速恢复到原设定值。

表 1-1 测定 k_{La} 时记录纸的传输速度

搅拌转速/ (r/min)	传输速度/(cm/min)	
	通气停止时	通气再开时
400	2	6
600	2	18
800	2	18

采用氮气置换法时，由于没有微生物，停止通入空气的同时，转通氮气，此时记录 DO 值的下降变化，随后通入空气，记