

## 在线检测用发酵液透析分离器的研究

张先恩 胡伟平 赵国强\* 张治平 张晓梅  
桂益群\* 张兴 危宏平

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

设计了一种膜透析分离器, 以期用于发酵液中葡萄糖浓度的在线检测。对两种膜材料进行了比较, 研究了压差、流速、温度和载流液种类对透析分离的影响。在给定的条件下, 葡萄糖浓度在 10—70mmol/L 范围内透过率约为 12%。透过率随操作压差、温度而变化, 重现性好, CV < 4%, 对酵母发酵液进行透析分离, 葡萄糖透过率至少稳定 48h。用于发酵过程在线检测, 结果与离线检测相吻合, 相关系数  $r = 0.985$ 。

**关键词** 透析分离器; 葡萄糖测定; 透过率; 酶电极

目前, 虽已发展出多种类型的生物传感器, 但发酵液中有有机质(如葡萄糖)的在线测定一直未能很好地解决。主要原因是生物传感器不耐高温灭菌, 难以实现原位测定。罐外引流测定法是解决的方法之一<sup>[1-3]</sup>, 需要用超滤技术将发酵液引至罐外。但对分析目的而言, 现有超滤器存在死体积较大和因浓差极化作用产生的透过率随时间持续下降现象<sup>[4]</sup>, 难以满足快速和长时间连续测定的要求。早在 1978 年就有人设计了一种发酵罐内挡板式透析装置<sup>[4]</sup>, 由于成本较高而未能实际采用。作者设计制作了一种盘式膜透析分离器, 用于发酵液中葡萄糖的透析, 以实现葡萄糖的连续测定。由于测定的精度很大程度上取决于透析分离过程中葡萄糖的透过率的稳定性, 本文主要报道有关葡萄糖透过率的实验结果。

### 材料和方法

#### (一) 仪器设备

透析分离器为不锈钢材料, 其结构见

图 1 所示。分 A 流道板和 B 流道板, 流道呈阿基米德螺旋线型, 长 440mm, 截面积为 2.4mm<sup>2</sup>, 分别有进液口和出液口, A、B 两流道板之间有一层滤膜, 醋酸纤维素膜由无锡酶制剂厂程鹏先生提供, 切割分子量为 30,000Da, 透析膜为市售

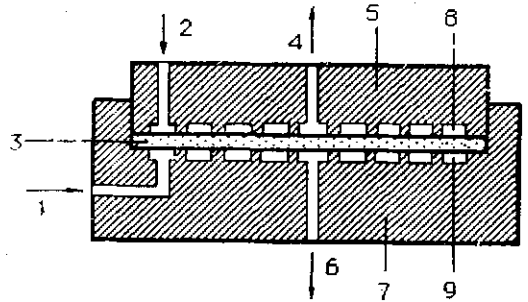


图 1 透析分离器结构示意图

Fig.1 Diagram of the dialysis-separation module

1. Primary sample;
2. Carrier stream;
3. Membrane;
4. Secondary sample;
5. Channel-A board;
6. Drain the liquid away;
7. Channel-B board;
8. Channel A;
9. Channel B

本文于 1992 年 4 月 27 日收到。

\* 武汉大学生物系毕业实习生。

(270DM)。两流道板相互嵌合并用螺丝紧固，与Amicon公司薄层流道型超滤池的主要区别在于A流道和B流道均以一定压力通入液体，A板为样品(发酵液)流道，B板为载液(蒸馏水或PBS)流道。A板样品液流中的被分析成份因化学能差而向B板载液透析扩散，因而为一透析分离过程而不是超滤过程。

LDB-M电子蠕动泵购自浙江象山定山仪器厂，2L发酵器购自NBS公司(Model C30)，酶电极流动注射分析系统由中国科学院武汉病毒研究所研制<sup>[4]</sup>。在线实验装置见图2。

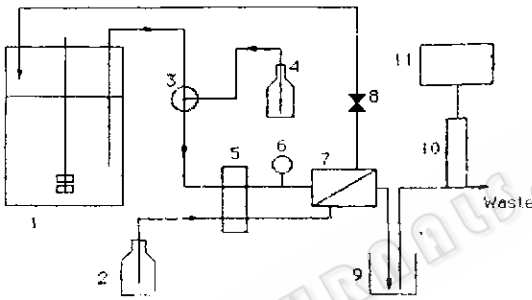


图2 酵母发酵液连续透析实验装置

Fig.2 Diagram of continous dialysis system for yeast fermentation broth

1. Fermentor; 2. Carrier stream; 3. Three way valve; 4. Glucose calibration solution;
5. Peristaltic pump; 6. Pressure meter;
7. Dialysis-seperation module; 8. Ramp clamp; 9. Air saturation; 10. Enzyme electrode; 11. Amplifier.

## (二) 药品试剂

所用药品试剂均为市售分析纯。菌种选用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisia*, AS 2,1364),由中国菌种保藏中心提供。

## (三) 实验方法

1. 葡萄糖溶液的配制：将葡萄糖于100℃烤箱中烘烤2h，然后称取一定量于容量瓶中定容，配制成0.1mol/L的葡萄糖母液。配制后应放入4℃冰箱过夜或室

温放置6h，让葡萄糖充分变旋。实验中稀释至需要的浓度。

2. 培养基配方(g/L)：葡萄糖30，NaCl 0.9，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5，(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 1.4，CaCl<sub>2</sub> 0.32，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.34，(以下为mg/L)：FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 15，ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 9，MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 10.5，CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2.4，肌醇60，D-泛酸30，维生素B<sub>1</sub> 6，维生素B<sub>6</sub> 15，酵母汁0.5，蒸馏水1000ml，pH自然，灭菌0.05MPa min。

3. 菌培养：酵母菌经麦芽精斜面活化后接种液体培养基，摇床培养24—48h，转速150—180r/min，控温32℃。

4. 发酵液的处理及测定方法：将培养48h的酵母菌悬液于100℃沸水浴30min，杀死菌体。并离心沉淀(4000r/min, 30min)，除去上清液。沉淀细胞转入新鲜灭菌培养基，该处理的培养液用于考查葡萄糖连续透析时透过率的稳定性。发酵液和载液经蠕动泵驱动连续流过透析分离器，发酵液回流至发酵器，载液及透过液则被收集，经搅拌充气通入酶电极流动分析仪测定葡萄糖。样品流速一般为12.8ml/min。用10%福尔马林流动清洗消毒透析分离器和管道系统，流动时间30min，再用无菌蒸馏水清洗系统30min。然后再经无菌操作法将管道系统与高压灭菌的发酵罐连接起来。

5. 葡萄糖浓度测定：采用酶电极法，操作步骤见文献[4]。葡萄糖透过率的计算：在透析分离器A板样品出口和B板载液出口处分别取样，经酶电极法定糖，葡萄糖透过率的计算式为：

葡萄糖透过率 =

$$\frac{\text{透析液(B板)葡萄糖含量}}{\text{样品(A板)葡萄糖含量} + \text{透析液(B板)葡萄糖含量}} \times 100\%$$

## 结果与分析

### (一)膜材料和载流液的选择

试验用膜为醋酸纤维膜和透析膜，使用前先用无水乙醇浸泡数小时作亲水处理，然后用蒸馏水清洗，再安装在透析分离器内。实验样品为葡萄糖溶液(10mmol/L)，透过液载流为蒸馏水或PBS(0.01mol/L)，操作压差为0.02MPa。实验了膜、载流液及其浓度对葡萄糖透过性的影响。结果见图3。当载流液为蒸馏水时，透析膜对葡萄糖的透过性能较好，而载流液换成PBS时，醋酸纤维素膜对葡萄糖的透过性较好，进而考查PBS浓度对醋酸纤维素膜透过性能的影响。当PBS浓度为0.01mol/L时，样品中的葡萄糖即有足够高的透过率，再增加PBS浓度对透过率无影响，由此选择醋酸纤维素膜作进一步实验，载流液为0.01mol/L的PBS。

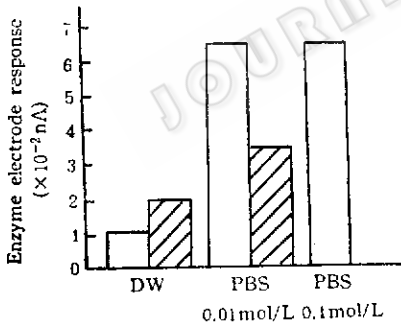


图3 不同膜材料和载流液对透过性的影响

Fig.3 Effect of different filter membrane and carrier solution on glucose penetration  
Glucose concentration, 10mmol/L, Flow rate, 12.8ml/min, Pressure difference, 0.02 MPa, Temperature, 12℃.

□Dialysis membrane,  
▨Cellulose acetate membrane

### (二)压差对透过率的影响

通过限压阀调节控制原液管道的压差，流速为12.8ml/min，葡萄糖浓度为25mmol/L。实验结果见图4，随操作压

力增加，透过率也增高。在0.06MPa范围内透过率与压力成正相关。通过调节压差来控制葡萄糖透过率，能够使酶电极适应不同浓度范围的原液。在发酵工程中，罐压通常为0.02MPa。若罐压过高可在原液流道与发酵罐之间加一减压装置。

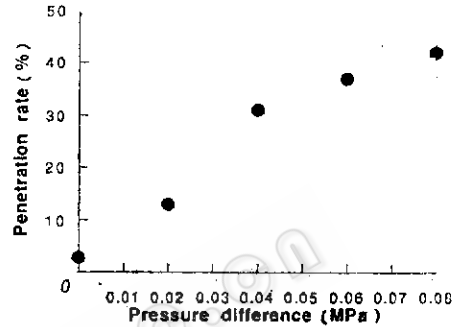


图4 压差对葡萄糖透过率的影响

Fig.4 Effect of pressure difference on glucose penetration

Glucose 25mmol/L, Flow rate 12.8ml/min, temperature 25℃

### (三)停留时间对葡萄糖透过的影响

样品溶液在透析分离器中的停留时间t可定义为t=V/U，V为A流道体积(约1ml)，U为样品流速，用酶电极对样品透过液的响应信号强度来表示葡萄糖透过相对量。如图5所示，停留时间越长，透过葡萄糖量越大，然而停留时间过长，不利于适时测定，并带来测定时间滞后。

### (四)温度对透过率的影响

对浓度为25mmol/L的葡萄糖样品溶液在不同温度下透析，工作温度变化范围为10—40℃，控温精度为±0.1℃，在每一温度下平衡至少10min，以获得稳定的透过率再进行样品测定。结果见图6，在20—30℃范围内，透过率受温度影响较大。因此，透析需要在相对恒定温度下进行。若环境条件不能满足，可以设计与酶电极仪共用一恒温系统。

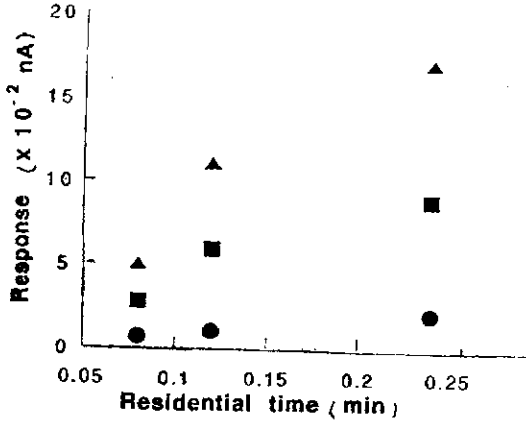


图5 停留时间对不同浓度葡萄糖溶液透过的影响

Fig.5 Effect of residential time on glucose penetration

Pressure difference 0.02MPa, Temperature 26℃

▲ 10mmol/L; ● 1mmol/L; ■ 5mmol/L

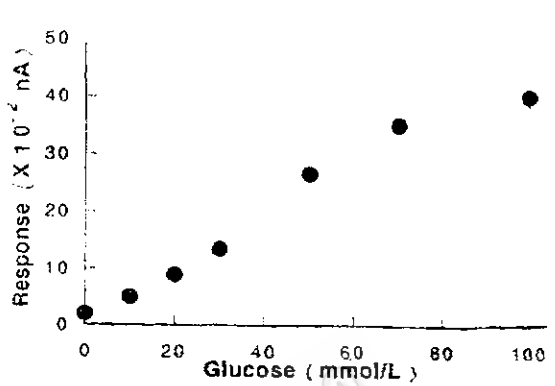


图7 透析分离器透过葡萄糖的线性范围

Fig.7 Linera range of glucose penetration with the dialysis-seperation cell

Pressure difference, 0.02MPa; Flow rate 12.8ml/min; Temperature, 26℃

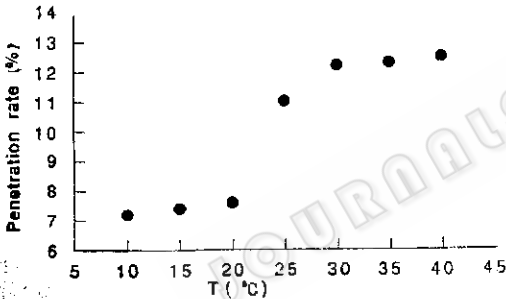


图6 温度对葡萄糖溶液透过率的影响

Fig.6 Effect of temperature on glucose penetration

Pressure difference 0.02MPa; Flow rate 12.8ml/min; Glucose 25mmol/L

### (五) 葡萄糖透过线性范围

用蒸馏水配制一系列浓度的葡萄糖样品溶液, 每种浓度的溶液分别透析10min, 用酶电极测定透过液的葡萄糖量, 用其响应值对葡萄糖浓度作图, 得到图7。可见在一定的操作条件下, 葡萄糖样品浓度在10—70mmol/L 范围内透过液与响应值间呈良好的线性关系, 其线性回归系数  $r = 0.9777$ 。进而测定各浓度葡萄糖溶液的透过率, 结果见表1。在线性工作范围内,

各浓度溶液的透过率十分接近, 平均透过率  $\bar{X} = 12.26\%$  对  $\bar{X}$  的平均相对偏差为 6.11%。实验观察到的线性范围与一般发酵液中的糖浓度变化范围接近。

表1 葡萄糖浓度与透过率的关系

Table 1: Glucose concentration vs penetration

Glucose concentration (mmol/L)	Penetration rate (%)
10	12.5
20	11.3
30	11.5
50	13.5
70	12.5

### (六) 透过率的重现性

配制10mmol/L和20mmol/L葡萄糖溶液。分别透析7次。每次10min, 其间泵入蒸馏水以冲洗透析管道。测定并计算透过率, 结果见表2, 两种浓度的溶液透过率的平均变异系数 CV 为3.25%。这种重现性尚属较好。但透析取样为在线测定过程中的一个环节, 其产生的误差仅为在线测定系统误差的一部分。

### (七) 透过率的稳定性

为了考查透析分离器对发酵液中的葡萄糖透析效果, 按前述方法将煮沸灭活的

表 2 膜通过的重现性

Table 2 Reproducibility of glucose penetration

Glucose concentration (mmol/L)	Penetration rate (%)			X (%)	CV (%)
10	17.8	18.0	17.5	17.7	2.64
	17.5	17.0	17.8		
20	17.8	18.6	17.5	17.4	3.85
	16.7	17.1	16.7		

Flow rate 12.8ml/min, Pressure difference 0.05MPa, Temperature 26℃.

酵母细胞与新鲜培养基混合，使发酵液中葡萄糖浓度约为 30mmol/L 并至少稳定 10h，以便测定透过率，酵母菌体浓度约为 5g/L(干重)，经 48h 连续透析，未见透过率下降。结果见图 8。

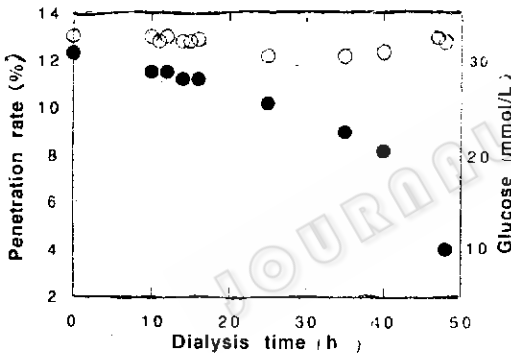


图 8 发酵液透过率的稳定性

Fig.8 Stability of penetration rate with yeast fermentation broth

Glucose 20mmol/L, Flow rate 12.8ml/min, Pressure difference 0.02MPa, Temperature 26℃, ●Glucose concentration, ○Penetration rate

(八) 发酵过程葡萄糖在线测定

将透析分离器与酵母发酵器连接起来(如图 2)，培养基体积 1.5L，种子为对数生长期酵母细胞，接种量为 20%。通过透析对发酵液中葡萄糖进行在线测定，并取发酵液样品同时进行离线分析，比较在线和离线测定，结果见图 9。在连续 8h 的

发酵过程中，在线测定与离线测定结果吻合性较好，相关系数 r = 0.985。

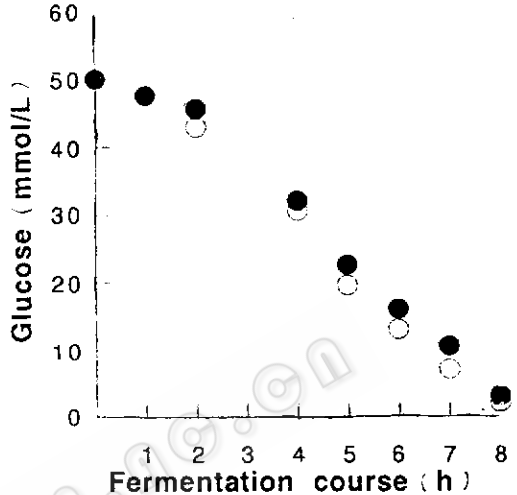


图 9 酵母发酵过程中葡萄糖浓度的在线测定和离线测定

Fig.9 In-line and off-line determination of glucose in a yeast fermentation process

○ In-line determination, ● Off-line determination

膜分离器是发酵液自动取样装置的关键部分，其基本要求是耐灭菌和不易堵塞。与其它膜分离器比较，本透析分离器的主要特点是：1) 结构简单、成本低；2) 在一定操作条件下透过率稳定，不堵塞，几乎无浓差极化现象。原因在于透析过程伴随着水分子在膜的两侧不断地进行双向扩散，其作用比超滤过程中间歇反冲效果更好；3) 可能用于发酵液中多种成分的分离和在线测定。

在本试验中，透析的动力是浓度差和压力差兼而有之的，这有利于提高葡萄糖的透过效率，使得在短时间内有较多的葡萄糖分子透过膜进入载流液，以满足快速测定的需要。

## 参 考 文 献

- [1] 水谷悟等, *Journal of Fermentation Technology*, 65:325, 1987.  
[2] Haketa, Y. et al.; Abst. The First World Congress on Biosensors, Singapore, p.290, 1990.  
[3] Dremel, B.A.A Etal.; Personal Communication, 1991.  
[4] 高以恒, 叶凌碧; 膜分离技术基础, 科学出版社, p.22, 1989.  
[5] Zabriskie, D. W. and Humphrey, A.E.; *Biotechnol. & Bioeng.* 22:1295, 1978.  
[6] 张先恩等; 酶电极流动注射分析法测定葡萄糖, 生物化学杂志, 6:294, 1989.

## A Dialysis-seperation Cell for In-line Determination of Glucose in Fermentation Broth

Zhang Xianen Hu Weiping Zhao Guoqiang Zhang Zhiping  
Zhang Xiaomei Gui Yiqun Zhang Xin Wei Hongping  
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

A thin channel dialysis-seperation cell was designed and tested for its use in in-line determination of glucose in fermentation broth. The glucose contained in effluents of both sample stream channel (Channel A) and carrier stream channel (Channel B) was detected with an enzyme electrode flow injection analysis system. Glucose penetration rate was evaluated and defined as  $R$ ,  $R = G_b / (G_a + G_b)$ , here  $R$  was glucose penetration rate under certain condition,  $G_a$  and  $G_b$  meant glucose concentration in effluents of channel A and B respectively. Higher penetration rate was obtained when using phosphate buffer (0.01mol/L) as carrier solution instead of using distilled water. Operation pressure difference, temperature and residential time affected glucose penetration. Under the condition of 0.02MPa pressure differences and 0.23 minute of residential time, the glucose penetration kepted at about 12% in range of 10--70mmol/L and showed good reproducibility with  $CV < 4\%$ . When sample stream was yeast broth, the glucose penetration rate was stable for 48 hours at least. The cell had been used for in-line determination of glucose in a yeast fermentation process, good relationship was observed between in-line and off-line determination of glucose, the correlation coefficient,  $r = 0.985$ .

**Key words** Dialysis-seperation cell; determination of glucose; dialytic rate; enzyme electrode