

间接估计酒精发酵过程参数的研究

管 斌

吴佩琮

王鸿祺

(山东轻工业学院)

(无锡轻工业学院)

摘 要

本文初步探讨了用呼吸商(RQ)和耗氧速率(OUR)来间接估计耗糖速率(GUR)、菌体得率系数($Y_{X/S}$)和酒精得率系数($Y_{P/S}$)。在此基础上,根据酵母生长动力学,通过对限制性基质物料衡算,得出了用糖流加速率来估计菌体比生长速率的数学模型。

主题词: 酒精发酵; 间接估计; 呼吸商; 耗氧速率; 数学模型

近年来,随着微生物代谢机制和调节机理的逐渐明瞭以及微生物发酵动力学的深入研究,电子计算机在发酵工业上的应用不断发展,用电子计算机来实现发酵过程的最佳控制成为可能^[1]。

实现对某一发酵过程的最佳控制,首先遇到的问题是发酵过程参数(如菌体浓度、基质浓度、产物生成速率等)的测定,而这些参数目前还难以用传感器直接测定。因此,如何估计发酵过程参数就显得非常重要。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

1.1.1 菌种 酒精酵母菌种(*S. cerevisiae* KG)是从无锡轻工业学院生化工程实验室多种优良酒精发酵酵母中分离得到的。

1.1.2 培养基 菌体生长培养基:葡萄糖150克,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)2克,酵母膏6克,硫酸氨5克,磷酸二氢钾8克,硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)0.1克,加水至1升, pH4.1~4.5。菌体补料培养基:葡萄糖500克,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)10克,酵母膏15克,硫酸铵30克,磷酸二氢钾15克,硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)0.2克,加水至1升, pH4.1~4.5。发酵培养基:葡萄糖600克,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)4克,酵母膏6克,硫酸铵6克,磷酸氢二钾2克,加水至1升, pH4.1~4.5。

以上培养基在0.6大气压(表压)下灭菌15分钟。

1.1.3 培养条件 生长温度28~29℃,发酵温度32~35℃,pH一般控制在4.5~5.5。可用氨

水和氢氧化钠溶液调节pH。

1.2 分析和测定方法

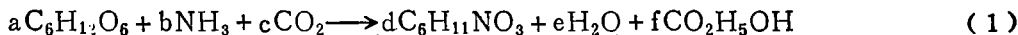
1.2.1 乙醇浓度 发酵液经蒸馏, 用G103型气相色谱仪测定。

1.2.2 酵母浓度 用离心沉降法测定。

1.2.3 还原糖浓度 将离心后的上清液用斐林定糖法^[3]测定。

1.2.4 pH值 用精密pH试纸或酸度计测定。

1.2.5 CER、OUR、RQ的测定和计算由酵母生长和酒精发酵综合方程式:



可知, 在发酵反应器中, 由于酵母生长和酒精发酵, 使进、出发酵反应器的空气量、二氧化碳、氧含量发生变化, 为此, 我们以空气中氮气为基准, 对进、出发酵反应器的二氧化碳、氧量进行物料衡算得到:

$$OUR = F_N \cdot \left[\frac{P_{O(in)}}{P_{T(in)} - P_{O(in)} - P_{C(in)} - P_{H(in)}} - \frac{P_{O(out)}}{P_{T(out)} - P_{O(out)} - P_{C(out)} - P_{H(out)}} \right] \quad (2)$$

对进、出发酵反应器的气体进行干燥处理, 使 $P_{H(out)}$ 为零, 在常压下操作, 则上式可化为:

$$OUR = F_N \cdot \left[\frac{0.21}{0.79} - \frac{P_{O(out)}}{1 - P_{O(out)} - P_{C(out)}} \right] \quad (3)$$

同理可得:

$$CER = F_N \cdot \left[\frac{P_{C(out)}}{1 - P_{O(out)} - P_{C(out)}} \right] \quad (4)$$

其中CER为二氧化碳释放速率, 氮气流量:

$$F_N = Q_0 \cdot \frac{0.79}{22.4}, \quad Q_0 = Q_i \cdot \frac{P_i T_0}{P_0 T_i}$$

呼吸商(RQ)是判断微生物代谢途径的一项指标。

$$RQ = CER / OUR \quad (5)$$

2 实验过程与结果

2.1 实验装置

如图1所示。

2.2 实验过程与结果

2.2.1 菌体培养过程

2.2.1.1 菌体得率系数($Y_{x/s}$), Wang D. h. C. 曾就 $Y_{x/s}$ 与气体分析参数进行研究, 结果认为:

$$RQ = f(Y_{x/s})$$

本文就RQ与 $Y_{x/s}$ 关系进行实验得图2。

从图2可看出, 当 $RQ < 1.0$ 时, $Y_{x/s}$ 随RQ的增加呈抛物线形状增加, 这是“巴斯德效应^[5]”的一种反映。当 $RQ > 1.0$ 时, $Y_{x/s}$ 随RQ值的增加而呈抛物线形状降低, 这说明细胞

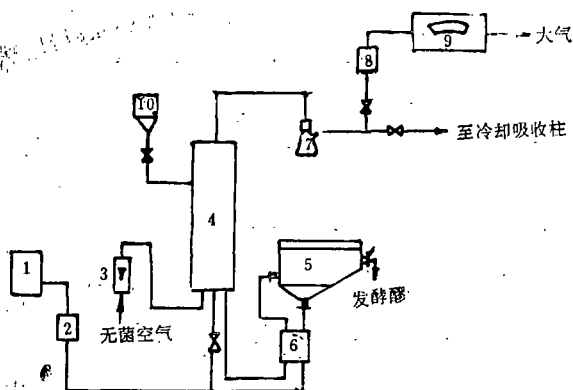
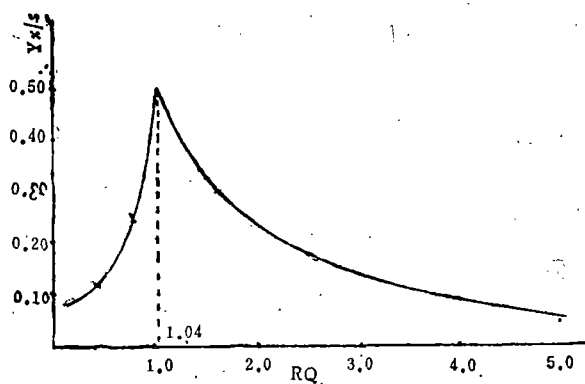


图1 酵母培养和发酵实验装置

1—原料罐；2—单向蠕动泵；3—空气流量计；4—气升式反应器；5—酵母分离槽；6—双向蠕动泵；7—缓冲瓶；8—干燥器；9—CO₂、O₂分析仪；10—碱液流加瓶

图2 RQ与Y_x/μ的关系曲线

利用葡萄糖产生酒精而使细胞物质合成能力减弱，这表现为“反巴斯德效应^[6]”。

2.2.1.2 耗糖速率(GUR) 在间歇培养过程中，酵母的耗糖速率为：

$$GUR = q_{s,x} \cdot x = \frac{\Delta S}{\Delta t} \cdot \frac{1}{M_s} \quad (7)$$

图3是 $q_{s,x} \cdot x$ 与OUR的关系曲线。从图3可以看出，在酵母菌体培养过程中，OUR随 $q_{s,x} \cdot x$ 在一定范围内呈线性增加。

$$\text{即: } \frac{OUR}{q_{s,x} \cdot x} = \frac{\text{mmol (氧消耗速率)}}{\text{mmol (糖消耗速率)}} = K_x \quad (8)$$

由图3得知，*S. cerevisiae* KG $K_x = 0.80$ 。

由耗糖物料衡算得知：

$$\frac{d}{dt}[V(t) \cdot S(t)] = F(t) \cdot S_F - V(t) \cdot q_{s,x} \cdot X(t) \cdot M_s - V(t) \cdot q_{p,p} \cdot P(t) \cdot M_p \quad (9)$$

积分代入初始条件 $S(0) = S_0$, $V(0) = V_0$ 。

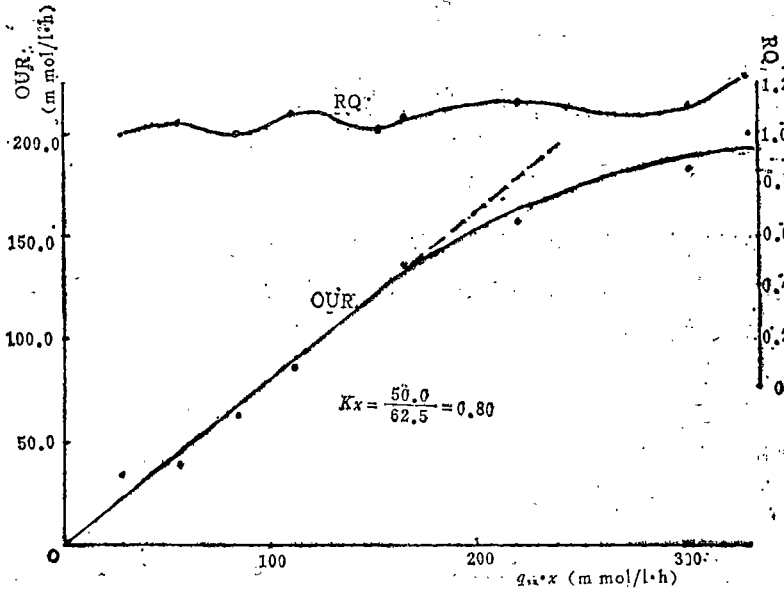


图3 耗糖速率与耗氧速率的关系曲线

$$S(t) = \frac{S_F \int_0^t F(t) dt}{V(t)} - \frac{M_x(t)}{V(t)} - \frac{M_p(t)}{V(t)} + \frac{V_0}{V(t)S_0} \quad (10)$$

$$\text{其中} \quad M_x(t) = \frac{M_s}{K_x} \int_0^t \text{OUR}(t) \cdot V(t) dt \quad (11)$$

在间歇流加培养时, 罐内糖浓度

$$S_i = \frac{V_0}{V_i} S_m + (1 - \frac{V_0}{V_i}) \cdot S_F - \frac{M_{x,i}}{V_i} \quad (13)$$

应流加糖量:

$$V_{Fi} = \frac{M_s}{K_x} \cdot \frac{\text{OUR}_i V_i \Delta t_i}{(S_F - S_m)} \quad (13)$$

依据OUR控制糖流加的模型为:

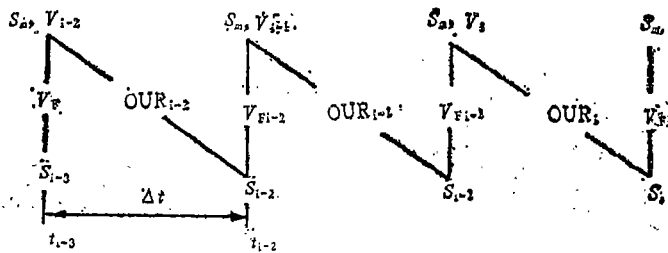


图4 依据OUR控制糖流加速率的模型

在间歇培养过程中, $RQ = 1.0^{[1]}$ 时,

则有

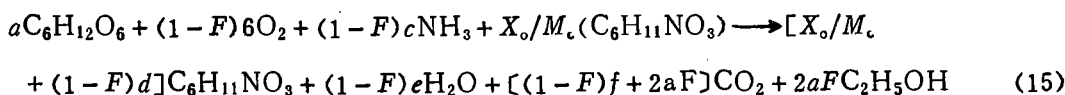
$$\begin{aligned}
 M_p &= \frac{M_s}{K_p} \int_0^t RQ(t) \cdot V(t) dt \\
 &= \frac{M_s}{K_p} \int_0^t V(t) dt \\
 &= \text{常数}
 \end{aligned} \quad (14)$$

即在菌体生长过程中,酒精生成速率恒定,而且较低。而到后来,随着菌体浓度的提高,菌体所处的环境为厌氧环境以及“反巴斯德效应”起作用,以致 $RQ > 1.0$,产生较多酒精, M_p 可用(14)式表示。

2.2.2 酒精发酵过程

2.2.2.1 得率系数($Y_{p/s}$)

酵母生长和酒精发酵方程式^[8]为:



由上式可知:

$$RQ = \frac{(1-F)f + 2aF}{(1-F)b} = \frac{f}{b} + \frac{2aF}{(1-F)b} \quad (16)$$

令 $RQ_o = f/b$, 即在无酒精形成时,细胞合成的RQ值,其特点是RQ对 $Y_{x/s}$ 非常不敏感。当 $RQ = 1.04$ 时, $Y_{x/s} = 0.5$ 克菌体/克糖。

通常,在有乙醇形成时,(16)式即为:

$$RQ = RQ_o + \frac{EPR}{OUR} \quad (17)$$

其酒精得率系数为

$$Y_{p/s} = \frac{p}{q} = \frac{1/x \cdot EPR}{(\mu/Y_{x/s})1/180} \cdot (RQ - RQ_o)$$

化简得

$$Y_{p/s} = K' \cdot (RQ - RQ_o) \quad (18)$$

其中

$$K' = \frac{OUR}{(\mu \cdot x/Y_{x/s}) \cdot 1/180}$$

为验证RQ与 $Y_{p/s}$ 的关系,通过试验,得到图5 RQ与 $Y_{p/s}$ 的关系曲线。

由图5可知,在酒精发酵过程中, $Y_{x/s}$ 随RQ在一定范围内呈线性增加,即式(18)中 K' 为常数。

2.2.2.2 耗糖速率(GUR)

在酒精发酵过程中,酵母的耗糖速率为

$$GUR = q_{sp} \cdot P(t) = \frac{\Delta S}{\Delta t} \cdot \frac{1}{M_s} \quad (19)$$

由图6可知,

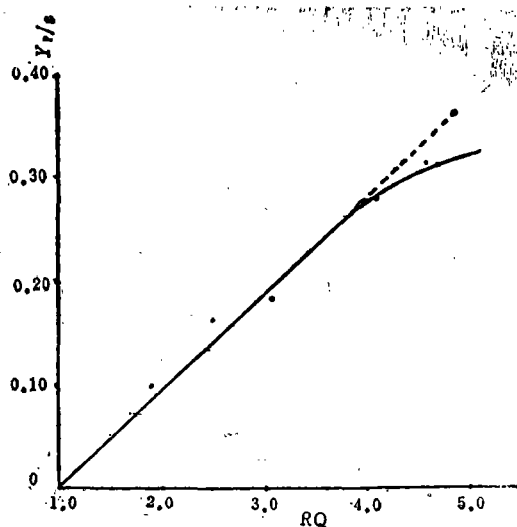


图5 Y_p/s 的关系曲线

通过试验得出 $q_{sp} \cdot P(t)$ 与RQ的关系曲线如图6。

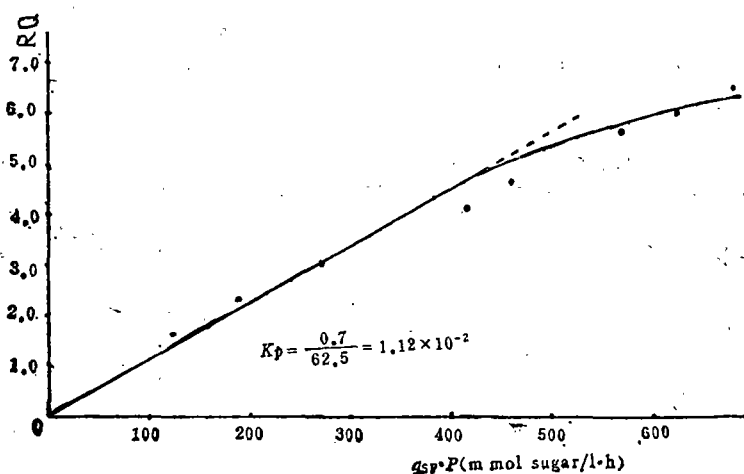


图6 GUR与RQ的关系曲线

由图6可知,
$$\frac{RQ}{q_{sp} \cdot P(t)} = \frac{\text{呼吸商}}{\text{耗糖速率}} = K_p \quad (20)$$

对*S. cerevisiae* KG图解得 $K_p = 1.12 \times 10^{-2}$

由式(10)知,
$$S(t) = \frac{V_0}{V(t)} S_0 + \frac{S_F}{V(t)} \int_0^t F(t) dt - \frac{M_p(t)}{V(t)} - \frac{M_x(t)}{V(t)}$$

其中

$$M_p(t) = \frac{M_s}{K_p} \int_0^t RQ(t) \cdot V(t) dt$$

在连续酒精发酵过程中, M_x 是菌体进行酒精发酵时自身代谢所消耗的糖,即维持菌体生存(或代谢)所消耗的糖(维持相)。在酒精生产能力和菌体浓度一定时,维持相(M_x)几乎

是个常数。

从(10)式不难看出,耗糖速率(GUR)是由 M_p 项来控制的,即可根据RQ值来间接估计GUR,进而达到控制的目的。

3 讨论

3.1 酒精酵母间歇流加培养

因为

$$\mu' = \frac{1}{X_i} \cdot \frac{dx_i}{dt} \cdot \frac{1}{X_i V_i} \cdot \frac{d(X_i V_i)}{dt} = \frac{1}{X_i} \cdot \frac{dx_i}{dt} + \frac{1}{V_i} \cdot \frac{dV_i}{dt} = \mu_i + \frac{F_i}{V_{oi} + F_i \Delta t_i} \quad (21)$$

所以

$$\frac{\Delta X_i}{\Delta t_i} = \mu_i \cdot x_i = \left(\mu_i' - \frac{F_i}{V_{oi} + F_i \Delta t_i} \right) \cdot x_i \quad (22)$$

由限制性基质物料衡算得

$$S_i [V_{oi} + F_{oi} (t_i - t_o)] - S_o V_o = S_F \cdot F_o (t_i - t_o) - 1/Y_o \{x_i [V_{oi} + F_{oi} (t_i - t_o)] - X_o V_o\} \quad (23)$$

整理得

$$\frac{\Delta S_o}{\Delta t_o} = \frac{F_o (S_F - S_o)}{V_o + F_o \Delta t_o} - \frac{1}{Y_o} \cdot \mu_o \cdot x_o - \frac{1}{Y_o} \cdot \frac{F_o X_o}{V_o + F_o \Delta t_o} \quad (24)$$

化为一般式

$$\frac{\Delta S_i}{\Delta t_i} = \frac{F_i (S_F - S_i)}{V_{oi} + F_i \Delta t_i} - \frac{1}{Y_i} \cdot \mu_i \cdot x_i - \frac{1}{Y_i} \cdot \frac{F_i \cdot x_i}{V_{oi} + F_i \Delta t_i} \quad (25)$$

当 $\Delta S_i / \Delta t_i \rightarrow 0$, $S_F \gg S_i$ 时,上式可化为

$$F_i \cdot S_F = \frac{F_i \cdot X_i}{Y_i} + \frac{1}{Y_i} (V_{oi} + F_i \Delta t_i) \cdot \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} \quad (26)$$

对间歇补料(流加)培养的 Y_i 几乎是一个常数。

对第*i*项,

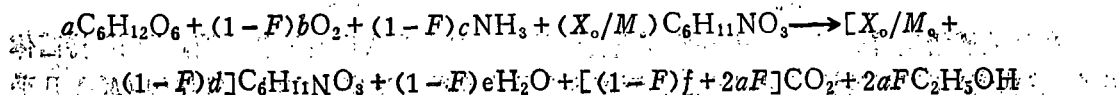
$$F_i \cdot S_F (t_{i+1} - t_i) = \frac{1}{Y_i} (X_{i+1} - X_i) \quad (27)$$

$$F_i = \frac{1}{S_F \cdot Y_i} \cdot \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} = \frac{\mu_i \cdot X_i}{Y_i \cdot S_F} \quad (28)$$

由(28)式可知,对于某一株酒精酵母流加培养,控制 $F_i (S_F)$ 速率,可间接控制菌体量(X_i)一定时的比生长速率。

3.2 $Y_{x/s} = f(RQ)$ 关系式的讨论

根据酵母生长和酒精发酵方程式



那么
$$RQ = \frac{(1-F)f + 2aF}{b(1-F)} = \frac{f}{b} + \frac{2aF}{b(1-F)} = RQ_0 + \frac{2aF}{b(1-F)}$$

整理得
$$\begin{cases} RQ - RQ_0 = \frac{2aF}{b(1-F)} \\ Y_{x/s} = \frac{d(1-F)}{a} \end{cases} \quad (29)$$

$$Y_{x/s} = \frac{d(1-F)}{a} \quad (30)$$

方程式系数矢量为

$$\vec{\alpha} = \{-a, -(1-F)b, -(1-F)b, (1-F)d, (1-F)e, [(1-F)f + 2aF], 2aF\}^T \quad (31)$$

元素矩阵为

$$\vec{E} = \begin{pmatrix} 6 & 0 & 0 & 6 & 0 & 1 & 2 \\ 12 & 0 & 3 & 11 & 2 & 0 & 6 \\ 6 & 2 & 0 & 3 & 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{matrix} C \\ H \\ O \\ N \end{matrix} \quad (32)$$

由物料衡算知:

$$\vec{E} \cdot \vec{\alpha} = 0 \quad (33)$$

把(29)、(30)与(33)式联立、整理化简得

$$Y_{x/s} = \frac{12}{13} (1-F) - \frac{4}{13} F \cdot \frac{1}{(RQ - RQ_0)} \quad (34)$$

(34)式中 $Y_{x/s}$ 值取决于 F 、 RQ 的取值。 F 是限制性基质(碳源)转化为代谢产物的分率。 F 趋于1.0,说明底物几乎全部转化为酒精,即 F 与 RQ 有关。根据前面的推理可得到 $Y_{x/s} = (RQ)$,这与Wang D.I.C.所得的结果相符。如果对式(34)进行微机仿真,可得出类似图2的结果。

参 考 文 献

- [1] Wang D I C. Biotechnol. Bioeng, 1979, 21: 975~995
- [2] 高以成. 生物工程学报, 1985, 1(3): 56~63
- [3] 无锡轻工业学院等. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1980
- [4] Wang D I C. Biotechnol. Bioeng, 1979, 9, 13~23
- [5] 上原梯次郎. 发酵工程, 1978, 35(5): 374~385
- [6] Ciabtie H G. Biochem J, 1929, 23: 536
- [7] 吴佩琮. 食品与发酵, 1983, 2: 69
- [8] Wang D I C. Biotechnol Bioeng, 1977, 19: 55~67

The Researches for the Indirect Estimation of Alcohol Fermentation Processing Data

Guan bin

Abstract

In this paper, an indirect estimation method was used to determine the substrate (glucose) utilization rate (GUR), the growth yield coefficient ($\bar{y}_x/s$), and the alcohol yield coefficient (y_p/s) merely by the oxygen uptake rate (OUR) and quotient (RQ). Thus far, depending upon the Kinetics of yeast's culture, a mathematical model, which was used to determine the specific growth rate on the total cells mass by controlling the feed rate of fresh medium, Was derived from the growth-limiting substrate balance.

Subject words: Alcohol fermentation, Indirect estimation respiration quotient, Glucose utilization rate, Mathematical model.