文章编号:1009-038X(2003)06-0009-06

一株产高质量浓度酒精酵母的间歇发酵动力学初步研究

吕 欣, 李永飞, 段作营, 史仲平, 毛忠贵
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要: 对一株产高质量浓度酒精的酿酒酵母的间歇发酵动力学进行了初步研究. 分别对基质、产物和菌体对时间的变化,所得回归方程显示,3 个状态参量与时间呈对数关系;而后采用比生长速率、某一时段的菌体浓度、某一时段的葡萄糖质量浓度、某一时段的酒精质量浓度来描述整个发酵过程中菌体、基质和产物之间的关系,通过二次曲面回归得到了间歇发酵动力学数学模型,与传统的 Monod 模型和 Logistic 模型相比,该模型对试验数据拟合和预测性能较好. 最后,用 Simplex 优化方法对间歇发酵动力学进行动态模拟,得到很好的拟合结果. 将得到的模型参数用于预测初糖质量浓度为 24.7 g/dL 的间歇发酵,预测结果也较好. 因此,该模型可用来预测高初糖质量浓度下间歇发酵过程.

关键词: 酒精发酵;动力学;酿酒酵母;模型
中图分类号:TQ 920.1 **文献标识码**: A

Study on the Kinetics of High Concentrated Ethanol Fermentation by A Strain of *Saccharomyces cerevisae*

LU Xin, LI Yong-fei, DUAN Zuo-ying, SHI Zhong-ping, MAO Zhong-gui
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The kinetics of high ethanol fermentation by a strain of *Saccharomyces cerevisae* were studied in this paper. The regression models were used to describe the time-courses of substrate, product and biomass, respectively. It showed that the three state variables could be modeled in form of logarithmic functions with regards to time. Then the ratio of specific growth rate to maximum specific growth rate, and the ratios of cell, glucose, and ethanol average concentrations at certain time interval to their corresponding maximum values were used to model the batch fermentation process by conicoid regression. Compared with Monod and Logistic models, the result of these mathematic models were consistent with experimental data. Finally, the simplex optimization method was used to construct an unstructured dynamic model with good data fitness. The model was also used to predict the batch fermentation with 24.7 g/dL initial glucose concentration, and good predicting performance was obtained. As a result, those models could be used to predict batch ethanol fermentation under high substrate concentration.

收稿日期:2002-11-01; **修回日期**:2003-07-15.
基金项目:科技部科技型中小企业技术创新基金无偿资助项目(01C26213200325)资助课题.
万方数据
作者简介: 吕欣(1975-),男,上海人,发酵工程博士研究生.

Key words: ethanol fermentation; kinetics; *Saccharomyces cerevisiae*; model

始于 20 世纪 70 年代的“能源危机”,使人们开始认识到,廉价的原油是会用枯竭的. 利用可再生资源(如粮食或植物纤维)发酵生产酒精作为生物能源来代替或部分代替汽油被提到了议事日程上[1]. 在发酵法生产酒精中,获得高酒精含量一直是追求的目标,这一方面是由于高质量浓度酒精可以大大节约能耗,降低成本;另一方面是由于提高发酵液中的酒精质量浓度,可明显降低废水的排放,并为最终实现酒精生产的清洁工艺提供前提条件. 目前,以淀粉质原料作为发酵底物,美国的酒精工厂生产的最终酒精质量浓度可达到 12 g/dL,而我国大部分的酒精厂则在 8~10 g/dL 之间[2]. 作者所在实验室筛选到一株能够在高基质质量浓度下发酵产生高质量浓度酒精的酿酒酵母,在基质质量浓度为 30 g/dL 条件下,最终发酵酒精质量浓度可高达 16 g/dL 以上,具有进行高质量浓度酒精发酵的潜力.

目前国内外学者对高质量浓度酒精发酵进行了一定的研究[6~10],但是在高初始基质质量浓度和高质量浓度产物条件下相关动力学的研究还未见报道. 作者通过研究该酒精高产菌株的间歇发酵特性,建立了高基质质量浓度和高酒精质量浓度条件下的数学模型,为高质量浓度酒精发酵优化提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 酿酒酵母 S-2002,由江南大学生物工程学院下游工程实验室保藏.

1.1.2 培养基

1)种子培养基:组分(g/dL):葡萄糖 10,酵母膏 8.5,NH_4Cl 1.3,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1,$CaCl_2$ 0.06. 0.08 MPa 下灭菌 15 min.

2) 发酵培养基:组分(g/dL):葡萄糖 300,酵母膏 5,NH_4Cl 1.5,$MgSO_4$ 0.65,KH_2PO_4 1.5,KCl 1.2. 0.08 MPa 下灭菌 30 min.

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养 接一环生长良好的斜面酵母至 250 mL 种子培养基中,摇床培养. 培养条件为 28 ℃,100 r/min 条件下培养 24 h.

1.2.2 间歇发酵 以 10%接种量将种子接入发酵培养基中,在 10 L 发酵罐中于 30 ℃保温发酵.

1.3 分析方法

1.3.1 酒精质量浓度 准确量取 100 mL 发酵液加入 500 mL 圆底烧瓶中,再加入 50 mL 水后置于蒸馏装置上,用 100 mL 容量瓶收集馏出液,定容至 100 mL,混匀后倒入 100 mL 量筒中,用酒精计(标温 20 ℃)测酒精度(以下缘为准),同时测定温度,然后换算成 20 ℃时酒精度(酒精相对密度以 0.789 计算)[3].

1.3.2 菌体质量浓度 干重法[4].

1.3.3 葡萄糖质量浓度测定 DNS 法[5].

2 结果与讨论

2.1 菌体生长、基质消耗和产物生成动力学

接种初期,由于高基质质量浓度的抑制作用,酵母生长缓慢,迟滞期较长,约为 12 h;当延迟期过后,酵母进入对数生长期,生长逐渐加快. 由于酒精的不断生成,酵母逐渐处于基质和产物的双重抑制作用下,随着基质的消耗,酵母的生长逐渐由基质抑制为主变为产物抑制占主导. 在发酵后期,由于所生成高质量浓度酒精的抑制作用,菌体死亡率大大上升,同时由于菌体自溶等原因,菌体质量浓度呈逐渐下降的趋势. 从比生长速率的趋势也可看出,当发酵进入 72 h 后,菌体比生长速率达到了负值,说明此时由于酒精(酒精质量浓度达123.837 g/L)对菌体的抑制使菌体的死亡速率非常高,生长则很少.

从表 1 可以看出,在发酵的前 12 h,由于高质量浓度的基质影响,微生物处在生长延迟期,耗糖缓慢;从 12 h 开始,随着微生物生长速率的增加,耗糖速率也迅速上升,降糖速率加大;48 h 后,由于酒精的抑制效应,降糖速率下降,直至发酵结束. 酒精质量浓度在酵母生长初期,缓慢增加,随着菌体量的不断增加,酒精质量浓度也逐渐上升,在发酵后期,基质消耗殆尽,菌体大量死亡,酒精质量浓度不再上升,并有下降的趋势.

对数据进行拟合,得到酒精质量浓度与时间的对数关系模型:

$$c_X(t) = -3.490\,812 + 5.018\,469 \lg t$$

$$R^2 = 0.966\,3$$

$$c_S(t) = 574.488\,32 - 288.219\,2 \lg t$$

$$R^2 = 0.987\,5$$

$$c_P(t) = -153.158 + 162.712 \lg t$$

万方数据

$R^2=0.990\ 8$

其中:c_X为菌体质量浓度;c_S为残糖质量浓度;c_P为酒精质量浓度;t为发酵时间.

表 1　菌体质量浓度、残糖质量浓度和酒精质量浓度与发酵时间的关系

Tab. 1　Time courses of biomass concentration, glucose concentration and ethanol concentration

发酵时间/h	菌体质量浓度/(g/L)	比生长速率/h^{-1}	残糖质量浓度/(g/L)	酒精质量浓度/(g/L)
0	0.99	0	308.8	0
6	1.16	0.0251	306.6	0.8
12	1.44	0.0360	299.7	8.6
18	1.90	0.0459	251.2	22.8
24	2.56	0.0488	174.1	47.3
30	3.42	0.0462	158.8	65.4
36	4.36	0.0406	126.5	76.5
42	5.39	0.0350	100.4	84.4
48	5.96	0.0169	85.2	97.0
54	6.32	0.0097	69.2	104.1
60	6.74	0.0107	52.3	113.6
72	6.55	−0.0024	26.6	123.8
84	6.15	−0.0052	9.1	131.7
96	5.69	−0.0064	4.4	138.8
108	5.25	−0.0067	2.8	134.9

根据对菌体质量浓度、产物生成和基质消耗随时间变化的分析,可以发现菌体质量浓度、产物生成和基质消耗的变化规律均可用对数模型来描述.

2.2　高质量浓度基质和高质量浓度产物条件下基质、产物和生物量的关系

前面已分别对基质、产物和菌体量随时间的变化规律进行了初步研究,但是在微生物发酵过程中,基质、产物和菌体量是 3 个相互关联相互影响的状态参数,因而对 3 个状态参数之间的内在联系进行了研究.

Monod 模型描述了单一限制性基质质量浓度和微生物生长之间的关系[11],S. Aiba 给出了在酒精发酵过程中的产物抑制动力学[12]. 分别采用 Monod 模型和 Logistic 模型对所得数据进行模拟(Monod 模型和 Logistic 模型中的参数均用最小二乘法求取),如图 1 所示. Monod 模型(模型参数 $\mu_{max}=0.030\ 53$ 和 $K_s=17.828$)和 Logistic 模型(模型参数 $\mu_{max}(K)=0.143\ 3$,$c_{Xm}=6.74$)对该株酵母的动力学描述均存在较大的偏差,不能反映实际发酵过程,主要原因是由于同时存在基质和产物抑制,导致两类模型失真.

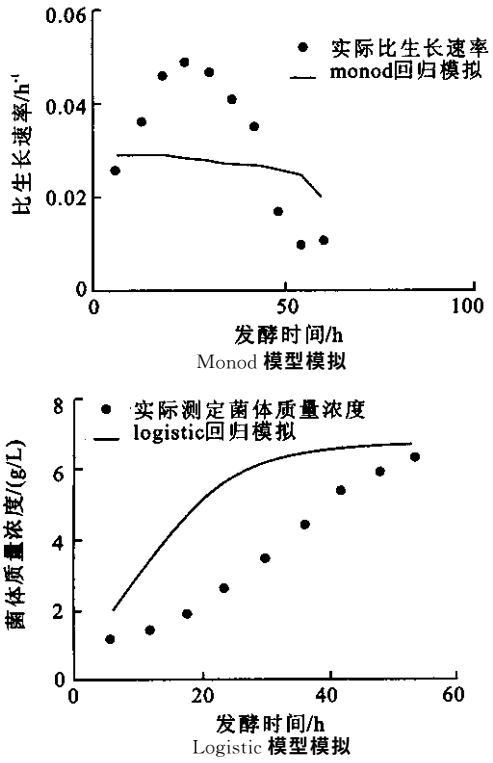

图 1　Monod 模型模拟和 Logistic 模型模拟

Fig. 1　Simulation result of Monod and Logistic models

因此,采用比生长速率/最大比生长速率、对应于某一时段的平均葡萄糖质量浓度/初始葡萄糖质量浓度、对应于某一时段的平均酒精质量浓度/最大酒精质量浓度来描述这一发酵过程中菌体、基质和产物之间的关系,通过 MATLAB 进行二次曲面回归得到二次曲面方程. 由表 1 可知,最大比生长速率取 18～24 h 的均值(0.4735),由于发酵后期比生长速率为负值,因而未列入回归范围,回归方程的适用范围为酵母生长的延迟期、对数期、稳定期(比生长速率大于 0). 最大酒精质量浓度采用取值范围内的最大值,见表 2.

在 99% 的置信区间下进行回归,回归方程如下:

$$\frac{\mu(t)}{\mu_{max}}=167.56-341.57\frac{c_s(t)}{c_{s_0}}-277.84\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}}+286.65\frac{c_s(t)}{c_{s_0}}\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}}+174.52\left(\frac{c_s(t)}{c_{s_0}}\right)^2+114.47\left(\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}}\right)^2$$

$$\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}}=2.6065-2.84787\frac{c_x(t)}{c_{x_{max}}}-4.6246\frac{c_s(t)}{c_{s_0}}+3.135\frac{c_s(t)}{c_{s_0}}\frac{c_x(t)}{c_{x_{max}}}+1.2206\left(\frac{c_x(t)}{c_{x_{max}}}\right)^2+1.9276\left(\frac{c_s(t)}{c_{s_0}}\right)^2$$

万方数据

$$\frac{c_s(t)}{c_{s_0}} = 1.0292 - 0.41038\frac{c_x(t)}{c_{x_{max}}} - 0.83711\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}} - 3.7936\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}}\frac{c_x(t)}{c_{x_{max}}} + 1.9839\left(\frac{c_x(t)}{c_{x_{max}}}\right)^2 + 2.0164\left(\frac{c_p(t)}{c_{p_{max}}}\right)^2$$

式中：$\mu(t)$，μ_{max} 为比生长速率和最大比生长速率(h^{-1})；$c_x(t)$，$c_{x_{max}}$ 为 t 时刻的平均菌体质量浓度和最大菌体质量浓度(g/L)；$c_s(t)$，c_{s_0} 为 t 时刻的平均基质质量浓度和初始基质质量浓度(g/L)；$c_p(t)$，$c_{p_{max}}$ 为 t 时刻的平均产物质量浓度和最大产物质量浓度(g/L).

表 2 比生长速率、平均残糖质量浓度与平均酒精质量浓度

Tab. 2 Specific growth rate, average glucose concentration, average ethanol concentration

平均葡萄糖质量浓度/(g/L)	平均酒精质量浓度/(g/L)	比生长速率/h^{-1}	平均葡萄糖质量浓度/初始葡萄糖质量浓度	平均酒精质量浓度/最大酒精质量浓度	比生长速率/最大比生长速率
307.7	0.4	0.0251	0.996	0.0036	0.534
303.2	4.7	0.036	0.982	0.043	0.766
275.5	15.7	0.0459	0.892	0.144	0.977
212.7	35.1	0.0488	0.688	0.322	1.039
166.5	56.4	0.0462	0.539	0.518	0.983
142.6	71.0	0.0406	0.462	0.652	0.864
113.4	80.4	0.0350	0.367	0.739	0.745
92.8	90.7	0.0169	0.300	0.833	0.359
77.2	100.5	0.0097	0.250	0.923	0.206
60.8	108.8	0.0107	0.197	1	0.227

从图 2 及图 4 可见，该组方程能较好地拟合试验所得数据. 另外，应用所得的回归模型于初糖质量浓度为 24.7 g/dL 时进行间歇发酵，并与相应的实测数据进行比较，结果见图 3. 在发酵的初期，菌体增殖模型的预测性能较好，而到后期，偏差逐渐偏大，预测效果并不十分理想，但是对残糖质量浓度和酒精质量浓度(见图 5)的预测均较好.

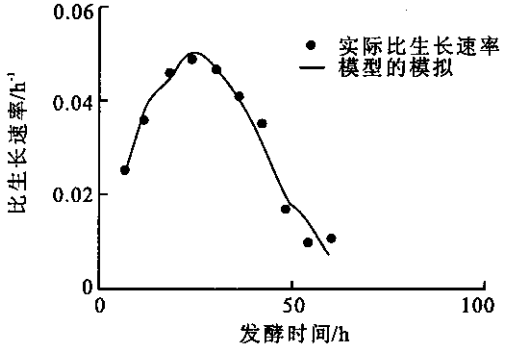

图 2 二次曲面模型拟合菌体生长(初始葡萄糖质量浓度 30 g/dL)

Fig. 2 Result of quadratic surface model (specific growth rate, 30 g/dL initial glucose)

万方数据

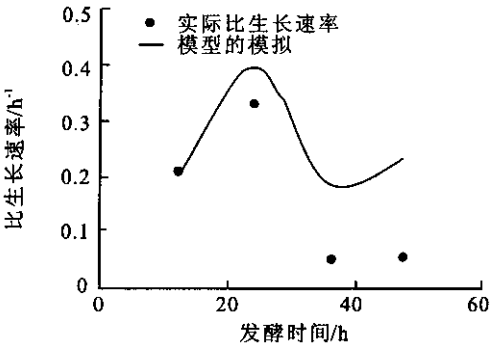

图 3 二次曲面模型预测菌体生长(初始葡萄糖质量浓度 24.7 g/dL)

Fig. 3 Estimated result of quadratic surface model (specific growth rate, 24.7 g/dL initial glucose)

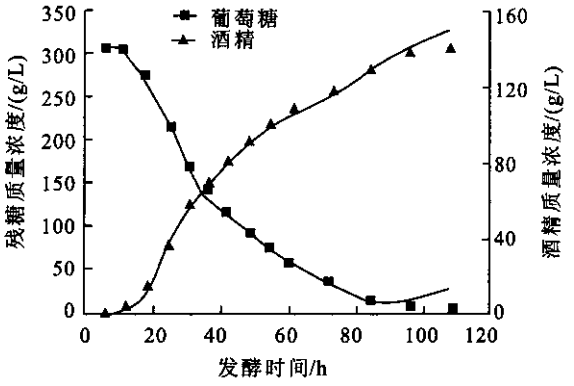

图 4 二次曲面模型拟合酒精生成和基质消耗(初始葡萄糖质量浓度 30 g/dL)

Fig. 4 Result of quadratic surface model (ethanol formation and substrate consumption, 30 g/dL initial glucose concentration)

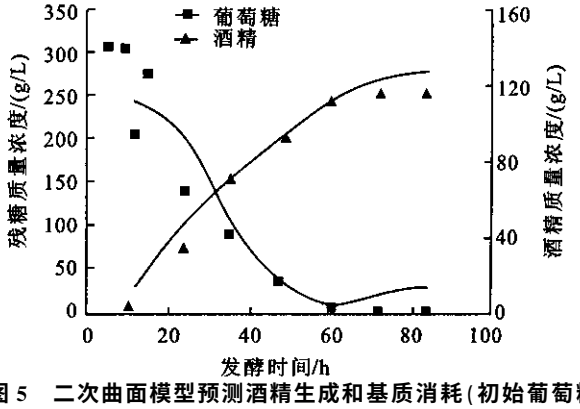

图 5 二次曲面模型预测酒精生成和基质消耗(初始葡萄糖质量浓度 24.7 g/dL)

Fig. 5 Estimated result of quadratic surface model (ethanol formation and substrate consumption, 24.7 g/dL initial glucose concentration)

2.3 非构造动力学模型描述间歇发酵过程

根据 Aiba[12] 和 Moser[13] 所提出的动力学模型，结合考虑基质抑制效应[14]，提出如下非构造动力学模型对发酵过程进行模拟和预测. 在指定初始质量浓度条件下，利用 Runge-Kutta 法求解微分方

程,以下列目标函数为评价指标,用 Simplex 法对非构造动力学模型中的 11 个参数进行优化求解.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_d X \qquad X(0) = X_0$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} X - \frac{(\upsilon+\beta)}{Y_{P/S}} X \qquad S(0) = S_0$$

$$\frac{dP}{dt} = (\upsilon+\beta) X \qquad P(0) = P_0$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} S^n}{(1+\frac{P}{K_P})(K_S + S^n + \frac{S^{2n}}{K_I})}$$

$$\upsilon = \frac{\upsilon_0 S^n}{(1+\frac{P}{K'_P})(K_S + S^n + \frac{S^{2n}}{K_I})}$$

$\mu, \upsilon, Y_{X/S}, Y_{P/S}$ 分别表示比增殖速率、比产物生成速率、菌体对基质得率和产物对基质得率.β 表示 Leudeking-Piret 比产物生成速度式中的非耦联参数.

目标函数:

$J = (X - X_m)^2 + (S - S_m)^2 + (P - P_m)^2 \rightarrow$ 最小

其中 X, X_m, S, S_m, P, P_m 分别表示菌体质量浓度、基质质量浓度和酒精质量浓度的计算值和实测值.

通过 Simplex 法优化得到如下具有物理意义的动力学参数:$\mu_{max} = 0.437\ 6\ h^{-1}$, $\upsilon_0 = 1.28\ h^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.04\ g/g$, $Y_{P/S} = 0.88\ g/g$, $K_P' = 274\ g/L$, $n = 1.1$, $K_I = 4.81 \times 10^4$, $K_P = 3.56\ g/L$, $\beta = 0.054\ h^{-1}$, $K_S = 250$, $K_d = 0.005\ h^{-1}$. 用初糖质量浓度为 30 g/dL的数据对模型参数进行拟合,并将得到的模型参数用于预测初糖质量浓度为 24.7 g/dL 的间歇发酵.结果发现,拟合和预测结果均较好(见图 6,7).采用 MATLAB 6.0 内含的 Runge-Kutta 和 Simplex 软件计算包进行计算.

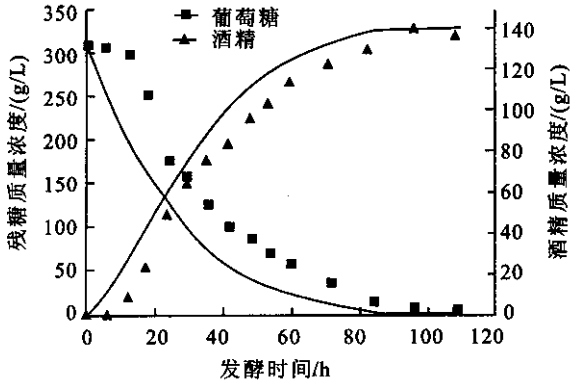

图 6　非构造模型拟合酒精生成和基质消耗(初糖质量浓度为 30 g/dL)

Fig. 6　Result of unstructed model(ethanol formation and substrate consumption, 30 g/dL initial glucose concentration)

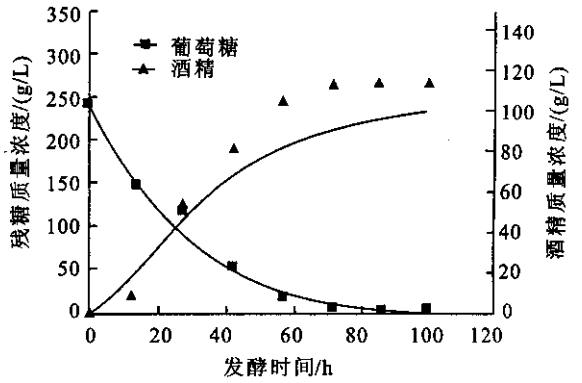

图 7　非构造模型拟合酒精生成和基质消耗(初糖质量浓度为 24.7 g/dL)

Fig. 7　Result of unstructed model(ethanol formation and substrate consumption, 24.7 g/dL initial glucose concentration)

3　结　论

1) 通过建立 $t-\mu(t)$, $t-c_S(t)$ 和 $t-c_P(t)$ 回归模型,可以直观地看到发酵过程中 3 个重要发酵过程参数随时间的变化规律.由于同时存在的基质抑制和产物抑制,用传统的 Monod 模型和 Logistic 模型已不能很好地反映该株酵母的发酵特性,而结合比生长速率、葡萄糖质量浓度、酒精质量浓度等实测发酵过程参数,采用二次曲面回归所得模型方程能与实测数据较好地拟合,模型中的交互项反映了同时存在的基质抑制和产物抑制.

2) 利用 Simplex 优化法得到的具有物理意义的动力学模型可以较好地拟合和预测高初始基质质量浓度的间歇操作发酵过程.利用该模型可以直观地预测发酵过程时间曲线,从而对间歇发酵过程的控制和操作具有一定的指导意义.

3) 建立的非构造动力学模型对基质质量浓度和产物质量浓度的拟合和预测较好,而对菌体质量浓度的拟合和预测精度不好,这一点与二次曲面回归的结果相似.但是,本研究的主要目的在于预测产物的生成过程和基质的消耗过程,因此虽然对菌体质量浓度的拟合和预测精度不好,但并不影响研究目标.模型参数中 $Y_{P/S}$ 的值为 0.88,与理论值(0.51)相差较大,这是由于采用 Simplex 法进行多参数优化时的多峰性所致,计算得到的优化参数很大程度上取决于所给定的参数的初始值.因此,这种方法得到的解为局优解,而不是整体最优解.为得到整体最优解,需要使用遗传算法等全局优化计算方法.

万方数据

参考文献:

[1]章克昌. 发展燃料酒精的建议[J]. 中国工程科学,2000,2(6):89－93.

[2]谢林,张禾. 美国考察漫谈[J]. 酿酒科技,2000,1:85－89.

[3]蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京:轻工业出版社,1988.

[4]诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.

[5]北京大学生物系. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1979.

[6]Thomas K C. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Appl Environ Microbiol**,1994,60:1519－1524.

[7]Thomas K C, Ingledew W M. Fuel alcohol production:effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1990,56:2046－2050.

[8]Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology:effect of sugar concentration and temperature[J]. **Appl Biochem and Biotechnol**, 1993,43:211－226.

[9]黄宇彤,伍松陵,杜连祥,等. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化[J]. 食品工业科技,2002,23(8):67－70.

[10]秦成国. 玉米粉高浓度酒精发酵的研究[J]. 酿酒科技,1997,4:52－54.

[11]戚以政,汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京:化学工业出版社,1999.

[12]S Aiba,M Shoda,M Nagatani. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1968, 10(6):845－864.

[13]山根恒夫. 生物反应工学[M]. 东京:产业图书株式会社, 1980.

[14]Michael L Shuler,Fikret Kargi. Bioprocess Engineering(second edition)[M]. Englewood Cliffs N J: Prentice Hall PTR Prentice-Hall Inc, 2002.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 4 页)

参考文献:

[1] Hirata, Negoro, Okada. Molecular basis of isozyme formation of beta-galactosidase in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two beta-galactosidase genes, *bga*A and *bgaB*[J]. **J Bacteriol**,1984, 160: 9－14.

[2] 陈卫,葛佳佳,张灏,等. 半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中过量表达及 IPTG 诱导条件[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(5): 492－495.

[3] Quirk PG, Dunkley EA , Lee P, *et al*. Identification of a putative *Bacillus subtilis rho* gene[J]. **J Bacteriol**, 1993, 175(3):647－654.

[4] Sciochetti SA, Piggotpj, Blakely GW. Identification and characterization of the *dif* site from *Bacillus subtilis*[J]. **J Bacteriol**,2001, 183:1058－1068.

[5] Josephs, David WR. Molecular cloning :A Laboratory Mannual(3rd Edition)[M]. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[6] Yasbin RE, Wilson GA , Young FE. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage in competent cells[J]. **J Bacteriol**,1975,121:296－304.

[7] Colinrh,Simon MC. Molecular Biological Methods for *Bacillus*[M]. England:John Wiley & Sons Ltd,1990.

[8] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M],钱嘉译. 北京:中国轻工业出版社,1992.

[9] Kunst F. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. **Nature**,1997,390 (6657): 249－256.

[10] 王磊,马平,唐上华. 碱性蛋白酶基因在 *Bacillus licheniformis*2709 中的整合和扩增[J]. 工业微生物,1998,28(2):4－9.

(责任编辑:李春丽)

万方数据