

# 酿酒酵母在硅橡胶膜生物反应器中 连续发酵的生长动力学

伍 勇 肖泽仪 黄卫星 石 尔

(四川大学化工学院化工机械系, 四川 成都 610065)

**摘要:** 实验研究了酿酒酵母在硅橡胶膜生物反应器中的细胞生长速率与操作参数之间的关系。在三水平正交实验基础上, 用 Gauss-Newton 非线性最小二乘法拟合了细胞比生长率与葡萄糖浓度、乙醇浓度和细胞浓度 3 变量之间的关系式, 得到硅橡胶膜生物反应器乙醇连续发酵的细胞最大比生长率、饱和常数、产物抑制常数和群聚抑制常数等基本动力学参数, 表明当细胞浓度达到 15 g/L 或乙醇浓度达到 70 g/L 时细胞生长受到完全抑制。连续发酵实验验证了硅橡胶膜生物反应器中的细胞生长动力学满足拟合模型的规律。

**关键词:** 酿酒酵母; 膜生物反应器; 乙醇连续发酵; 细胞生长

**中图分类号:** TQ033; Q27

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2003)12-0034-04

## Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in a silicone rubber membrane bioreactor by continuous fermentation

WU Yong, XIAO Ze-yi, HUANG Wei-xing, SHI Er

(School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** The effects of operating conditions on the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* was experimentally studied in a silicone rubber membrane bioreactor. Dependence of the specific growth rate on glucose, ethanol and cell concentrations and the principal kinetic parameters were quantified by nonlinear least-square data fitting with Gauss-Newton method based on orthogonal three-level experiments. The results indicated that the cell growth would be totally inhibited when cell concentration reached 15 g/L or ethanol concentration reached 70 g/L. The continuous fermentation experiments proved that the kinetic behaviors of the yeast cell in the silicone rubber membrane bioreactor agreed with the fit models.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; membrane bioreactor; continuous ethanol fermentation; cell growth

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种单细胞真核微生物, 其生长代谢过程受到产物抑制的影响。致密硅橡胶膜能够通过渗透气化选择性分离发酵液中的乙醇, 可与发酵过程耦合而减弱产物抑制效应<sup>[1]</sup>。利用硅橡胶膜的选择分离性和对生物无害性, 可以构造膜生物反应器而实现连续发酵<sup>[2]</sup>。

膜生物反应器中的细胞生长规律可以用比生长率  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) 来描述, 它表明了单位时间内单位细胞对应的增长量。Monod 方程  $\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_S + S)$  常用来描述单一细胞在限制性基质中均衡生长时的比生长率变化规律 ( $\mu_{\max}$  为最大比生长率,  $S$  为浓度,  $K_S$  为饱和常数), 在 Monod 方程的基础上, 许多学者又提出了各种包含产物抑制的双因素模型来描述酿酒酵母的比生长率规律<sup>[3-5]</sup>。细胞浓度、葡萄糖浓度

和乙醇浓度是连续硅橡胶膜生物反应器中影响细胞生长 3 个重要的操作参数, 笔者将通过实验考察它们对细胞生长的影响规律, 并由回归分析建立 3 因素的比生长率模型。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料

实验菌株采用湖北安琪 (Angel) 酵母公司的耐高温酿酒活性干酵母, 基本培养基为: 蒸馏水, 葡萄糖, 酵母膏 8 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.55 g/L, 无水  $\text{CaCl}_2$  0.15 g/L (葡萄糖为工业级, 其他成分为试剂级)。

### 1.2 实验方法

采用葡萄糖浓度、乙醇浓度和细胞浓度的 3 水

收稿日期: 2003-09-16; 修回日期: 2003-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20176030)

作者简介: 伍勇 (1973-), 男, 博士生; 肖泽仪 (1960-), 男, 博士, 教授, 主要从事生化与膜分离方面的研究, 通讯联系人, 028-85405209, mgch@peoplemail.com.cn。

平正交实验研究细胞比生长率变化规律。根据硅橡胶膜生物反应器中的各操作参数的范围<sup>[6]</sup>,将葡萄糖初始质量浓度分别控制在 10、30、60 g/L,乙醇初始质量浓度控制在 0、20、40、60 g/L,细胞初始质量浓度控制在 1、3、6、9、12、15 g/L,进行交叉正交实验。

称取相应质量的干酵母,用质量分数为 2% 的糖液在 38℃ 条件下复水 15 min 后,再降温到 34℃ 活化 3 h。保持基本培养基的成分和含量不变,根据实验方案在锥形瓶中配制 500 mL 相应葡萄糖浓度和乙醇浓度的培养基。将活化酵母细胞引入到培养基混合均匀后,取 50 mL 的发酵液测量酵母浓度、葡萄糖浓度和乙醇浓度的初始值。发酵在模拟硅橡胶膜生物反应器的条件下进行,温度控制在 35℃,pH 值控制在  $4.5 \pm 0.5$ ,搅拌但不鼓氧。发酵进行 1 h 后取 50 mL 的发酵液测量酵母浓度、葡萄糖浓度和乙醇浓度的变化,然后重新称取干酵母和配制培养基进行下一组实验。

### 1.3 分析

将取得的发酵液用 0.8  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜进行过滤,截留的细胞在 80℃ 下烘干后用电子天平称量作为细胞干重。过滤后的滤液先蒸馏出其中的乙醇,然后分别测量母液中的葡萄糖含量和蒸馏液中的乙醇含量以确定发酵液中的葡萄糖与乙醇浓度。葡萄糖用折光率仪测量,乙醇用气相色谱(6890, AGILENT)和酒精计进行测量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 葡萄糖对细胞比生长率的影响

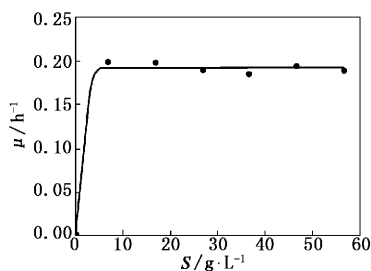


图 1 比生长率随葡萄糖浓度的变化关系

实验得出细胞比生长率随葡萄糖浓度的变化规律如图 1 所示。实验结果表明在大于 10 g/L 的葡萄糖浓度范围内,细胞比生长率基本保持恒定,表现出零级动力学的特征。而在低浓度区域,细胞比生长率会受到葡萄糖浓度的影响。根据实验结果的规律,可将细胞比生长率随葡萄糖浓度的变化描述为饱和生长关系  $\mu = k \cdot S / (K_s + S)$ 。在实验测量的葡

萄糖浓度范围内 ( $< 60 \text{ g/L}$ ),细胞生长没有出现基质抑制现象,故在考察硅橡胶膜生物反应器中的细胞生长动力学时,可不计基质抑制效应的影响。

### 2.2 乙醇对细胞比生长率的影响

细胞生长代谢的产物乙醇在发酵液中积累时会抑制酵母细胞的生长,实验得出细胞比生长率随乙醇浓度的变化规律如图 2 所示。当发酵液中的乙醇质量浓度接近 70 g/L 时,细胞几乎停止生长,这也是传统发酵不能连续进行的原因。为了使发酵连续有效的进行,应将发酵液中的乙醇浓度维持在较低水平。较多学者采用线性方程来描述乙醇浓度对细胞比生长率的影响规律,也有采用指数关系和倒数关系等其他形式的<sup>[3]</sup>。

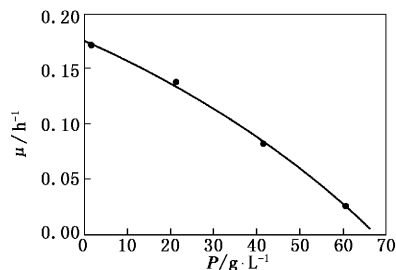


图 2 比生长率随乙醇浓度的变化关系

### 2.3 细胞群聚对比生长率的影响

实验得出细胞比生长率随细胞浓度的变化如图 3 所示。随着发酵液中细胞浓度的增加,比生长率呈显著下降的趋势,当细胞质量浓度达到约 15 g/L 时,细胞停止生长,这与硅橡胶膜生物反应器中连续发酵实验的结果相一致<sup>[5]</sup>。由于细胞浓度的增加对细胞生长所表现出来的结果为抑制作用,因此可采用抑制动力学的相关形式(如指数方程、线性方程等)来描述其作用规律。

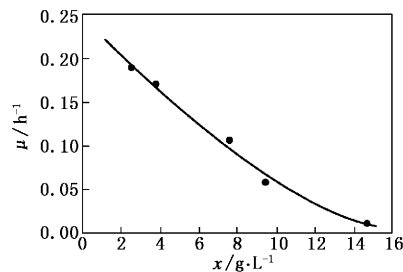


图 3 比生长率随细胞浓度的变化关系

### 2.4 非线性回归模型

采用饱和生长规律描述细胞比生长率与葡萄糖浓度的关系,分别用线性、倒数和指数等规律描述比生长率与乙醇浓度和细胞浓度的关系,通过 Gauss-Newton 最小二乘法对正交实验数据进行非线性拟合,其中收敛的模型如表 1 所示。

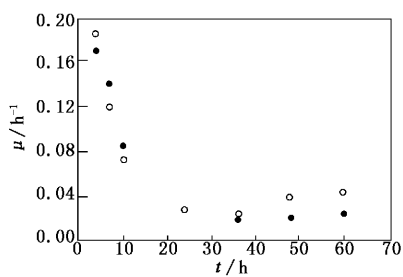
表 1 比生长率的非线性回归模型

模 型	1	2	3	4
	$\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} e^{-\frac{x}{K_x}}$	$\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{K_P}\right) \left(1 - \frac{x}{K_x}\right)$	$\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P} \left(1 - \frac{x}{K_x}\right)$	$\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{K_P}\right) e^{-\frac{x}{K_x}}$
$\mu_{\max}/g \cdot L^{-1}$	0.306	0.240	0.246	0.308
$K_S/g \cdot L^{-1}$	1.5	1.6	1.0	1.8
$K_P/g \cdot L^{-1}$	33.8	69.6	26.1	76.2
$K_x/g \cdot L^{-1}$	7.25	15.2	15.6	6.85
R	-0.041 ~ 0.034	-0.056 ~ 0.036	-0.046 ~ 0.038	-0.047 ~ 0.030
$\sigma^2$	0.00031	0.00038	0.00036	0.00029

注： $\mu_{\max}$ 最大比生长率，S为葡萄糖浓度，P为乙醇浓度，x为细胞浓度， $K_S$ 为葡萄糖饱和常数， $K_P$ 为产物抑制常数， $K_x$ 为细胞群聚抑制常数。

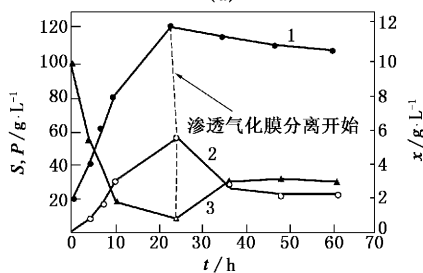
与其他学者的拟合工作相似<sup>[3]</sup>，最大比生长率因选取的模型不同而有所差别。各模型中的  $K_S$  值越小，细胞生长受葡萄糖浓度影响的范围就越小。 $K_P$  和  $K_x$  的值越大，表示细胞能在越大的乙醇浓度和细胞浓度范围内生长。回归模型 2 和 4 表明，该酿酒活性干酵母在 35℃ 条件下乙醇质量浓度的完全抑制值约为 70 ~ 76 g/L。而回归模型 2 和 3 表明，细胞浓度的完全抑制值约为 15 g/L，该值即为细胞自由生长的极限浓度。在所取的样本空间内，回归模型 4 的方差最小。

### 2.5 回归模型的检验



● 实验值 ○ 模型 4

(a)



1—细胞浓度；2—乙醇浓度；3—葡萄糖浓度

(b)

图 4 膜生物反应器中的比生长率随时间变化关系

为了检验模拟实验条件下的回归结果，将模型 4 的比生长率估计值与在实际膜生物反应器中测得

的比生长率进行比较。膜生物反应器的操作温度为 35℃，细胞初始质量浓度为 2 g/L，葡萄糖初始质量浓度为 100 g/L。当发酵进行 24 h 后，细胞质量浓度增加至 12 g/L，乙醇质量浓度增加至 55.5 g/L。此时开始进行渗透气化原位分离乙醇，连续补充葡萄糖并重力沉降分离出少量细胞。在发酵-分离耦合作用下，乙醇质量浓度维持在约 22 g/L，葡萄糖和细胞浓度也处于相对稳定的水平。如图 4(a)、(b) 所示，当反应器中细胞浓度和乙醇浓度升高时，细胞生长受抑制而表现为比生长率的降低。在渗透气化膜分离开始后，由于发酵液中乙醇浓度的有效降低，酵母比生长率略有升高。拟合公式 4 估计的结果正确反映了比生长率的这一变化趋势，其值与实测结果较为吻合，绝对误差范围为 -0.02 ~ 0.018。模型 1、2 和 3 对比生长率的估计值与模型 4 相近。

### 3 结论

耐高温酿酒活性干酵母在 35℃ 的复合培养基中不通风生长时，细胞比生长率在很大的葡萄糖浓度范围内保持稳定，而随着发酵液中乙醇浓度和细胞浓度的增加呈现显著下降的趋势。3 水平正交实验的拟合公式表明，比生长率随乙醇浓度的变化可以描述为倒数关系或线性关系，而随细胞质量浓度的变化可表示为指数关系或线性关系。拟合公式指出乙醇浓度的完全抑制值约为 70 g/L，而细胞浓度的完全抑制值为 15 g/L。非线性回归数值拟合得到了硅橡胶膜生物反应器乙醇连续发酵的细胞最大比生长率、饱和常数、产物抑制常数和群聚抑制常数等基本动力学参数，模型的估计值与实测值有较好的吻合。

(下转第 39 页)

而影响整个分子链的振动频率,导致蓝移。在谱线2中,N—H键的振动在红外光谱中表现在 $3412\text{ cm}^{-1}$ 处,而在谱线1中, $\text{Y}_2\text{O}_3$ 与聚吡咯复合后,这个峰的强度变小了,说明N—H键一部分已经变成其他形式存在了。在 $3120\text{ cm}^{-1}$ 处出现一个峰,据推测这是N—H转化的一部分所致,其形式应为 $\text{N}\cdots\text{Y}\cdots\text{O}$ 。

#### 2.4 拉曼光谱分析

图5为聚吡咯/ $\text{Y}_2\text{O}_3$ 纳米复合材料的拉曼光谱。与前人的工作比较<sup>[8-10]</sup>,图中 $1576\text{ cm}^{-1}$ 峰对应着吡咯结构中C=C的伸缩振动, $1360\text{ cm}^{-1}$ 对应着吡咯环的振动。 $1038\text{ cm}^{-1}$ 处的峰是由氧化态的吡咯环引起的。与前面的红外光谱测试的结果在 $3410\text{ cm}^{-1}$ 处对应的N—H键的峰消失这一现象相比较,可以推测这是由于聚吡咯与 $\text{Y}_2\text{O}_3$ 复合后有化学键的作用,得到的伸缩振动引起的。从结构和光谱上分析, $\text{Y}_2\text{O}_3$ 与聚吡咯之间的化学键的作用应发生在 $\text{N}^+\cdot$ 处。

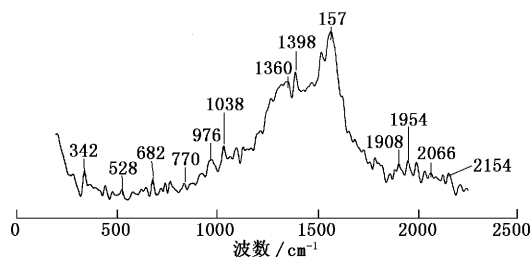


图5 复合纳米材料的拉曼光谱

#### 2.5 复合材料的电导率

纯聚吡咯的导电性能很低,其电导率为 $0.01\sim 0.1\text{ S/cm}$ ,加入掺杂剂后导电性能迅速增加,如掺杂 $\text{FeCl}_3$ 则电导率可达 $10\sim 25\text{ S/cm}$ ,本实验中 $\text{FeCl}_3$ 既是掺杂剂又是氧化剂。从表1可以看出纳米氧化钇的加入,降低了聚吡咯的导电性能,使复合材料的电导率下降了2个数量级,这说明纳米氧化钇的加入,使聚吡咯的共轭大 $\pi$ 键的共轭程度减小,从而使复合材料的导电性能降低,而且随着 $\text{Y}_2\text{O}_3$ 的比例的增大,复合材料的电导率呈下降趋势,当掺杂比例到一

定比例时,电导率的变化不大。

表1  $\text{Y}_2\text{O}_3/\text{PPy}$ 的掺杂比例和电导率的关系

$m(\text{Y}_2\text{O}_3) : m(\text{PPy})$	电导率/ $10^{-5}\text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$
5:95	3.42
10:90	2.21
15:85	1.67
20:80	1.45
25:75	1.43
30:70	1.42

### 3 结论

在聚吡咯/氧化钇复合材料中,氧化钇纳米颗粒的加入使得聚吡咯复合材料的红外吸收发生较大程度的蓝移,在拉曼光谱中, $1038$ 、 $976\text{ cm}^{-1}$ 附近产生有2个宽的散射谱带,对应着环的伸缩振动,说明聚吡咯与氧化钇之间有化学键合作用。复合材料的透射电镜照片表明,纳米微粒被聚吡咯包裹着形成核壳结构。

#### 参考文献

(上接第36页)

#### 参考文献

[1] Lipnizki F, Field R W, Po-Kiong Ten. [J]. Journal of Membrane Science, 1999, 153: 183 - 210.  
 [2] O'Brien D J, Craig J C. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 44: 699 - 704.

[1] 时雨荃,张淑芬,胡明,等.[J].高分子材料科学与工程,2001,17(1):1-4.  
 [2] 樊莹,柳士忠.[J].无机化学学报,2002,18(6):20-24.  
 [3] You Qingshen, Mei Xiangwan. [J]. Synthetic Matels, 1998, 96(2): 127 - 132.  
 [4] 冷波,葛树琴,刘红波.[J].材料开发与应用,2002,17(2):13-15.  
 [5] 张显,成来飞,张立同,等.[J].硅酸盐学报,2003,31(2):209-212.  
 [6] 刘力,张立群,金日光.[J].中国稀土学报,2001,19(3):196-199.  
 [7] Dudley H, Fleming W L.有机化学中的光谱方法[M].王剑波,施卫峰译.北京:北京大学出版社,1998.22-29.  
 [8] 高劲松,陈箐,陈衍珍,等.[J].电化学,1995,1(4):389-396.  
 [9] 陈凤恩,石高全,徐景坤,等.[J].光散射学报,2002,14(4):54-57.  
 [10] Liu Yuchuan, Hwang Bingjoe. [J]. Synthetic Metals, 2000, 113(1-2): 203 - 207. ■  
 [3] Birol G, Doruker P, Kirdar B, et al. [J]. Process Biochemistry, 1998, 33: 763 - 771.  
 [4] Sing Kiong Nguang, Xiao Dong Chen. [J]. Biochemical Engineering Journal, 1998, 11: 131 - 136.  
 [5] Taylor F, Kurantz M J, Goldberg N, et al. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48: 311 - 316.  
 [6] 钟月华,肖泽仪,黄卫星,等.[J].四川大学学报(工程科学版), 2003, 35: 49 - 53. ■