

## 稀释速率对高浓度酒精连续发酵过程振荡行为的影响

# Effects of Dilution Rates on the Oscillatory Behaviors of a Very High Gravity Continuous Ethanol Fermentation System

罗鑫鹏<sup>1</sup>, 陈丽杰<sup>1</sup>, 汪芳<sup>2</sup>, 白凤武<sup>1\*</sup>

LUO Xin-Peng<sup>1</sup>, CHEN Li-Jie<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>2</sup> and BAI Feng-Wu<sup>1\*</sup>

1. 大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

2. 安徽丰原集团工程设计部, 蚌埠 233010

1. Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China

2. Department of Engineering Design, BBKA, Bengbu 233010, China

**摘 要** 在一搅拌罐和三段管式反应器组成的组合反应器系统中, 使用葡萄糖浓度为 280g/L, 添加 5 g/L 酵母膏和 3g/L 蛋白胨的底物, 在总稀释速率分别为 0.032h<sup>-1</sup>, 0.024h<sup>-1</sup>, 0.017h<sup>-1</sup>, 0.012h<sup>-1</sup> 和 0.006h<sup>-1</sup> 的条件下, 考察了稀释速率对高浓度酒精发酵系统振荡行为的影响。结果表明, 振荡行为在特定的稀释速率条件下呈现, 进而基于数学上的分岔理论, 分析了振荡行为发生的可能性及对应的稀释速率范围, 并与实验结果进行了比较, 在此基础上, 讨论了振荡行为对酒精发酵过程的影响。

**关键词** 高酒精连续发酵, 稀释速率, 振荡行为, 分岔理论

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0604-05

**Abstract** Continuous ethanol fermentation using very high gravity medium containing 280 g/L glucose, 5 g/L yeast extract and 3 g/L peptone was run at the dilute rates of 0.006 h<sup>-1</sup>, 0.012 h<sup>-1</sup>, 0.017 h<sup>-1</sup>, 0.024 h<sup>-1</sup> and 0.032 h<sup>-1</sup> (based on the total working volume) in a combined bioreactor system composed of a stirred tank and three-stage tubular bioreactors in series. Oscillations marked by big fluctuations of residual glucose, ethanol and biomass were observed at the dilution rate of 0.012 h<sup>-1</sup>. The Hopf Bifurcation theory was used to analyze and predict the occurring of these oscillations and the dilution rates that incited oscillations. Theoretical analysis revealed that oscillations can occur at designated specific growth rates and was validated by experimental results. The benefits of oscillations for the fermentation system were also discussed by comparing the fermentation results with those without oscillations.

**Key words** Hopf Bifurcation theory, oscillation, dilution rate, very high gravity, continuous ethanol fermentation

振荡现象在微生物连续培养过程中是普遍存在的, 文献报道涉及到细菌、真菌、藻类等微生物细胞<sup>[1]</sup>。其中酵母细胞培养过程中呈现振荡现象的机理被认为是细胞的同步生长<sup>[2]</sup>。白凤武等人正在进行

高浓度酒精连续发酵时观测到一种新的振荡行为, 与迄今为止报道的各种酵母细胞培养过程的振荡行为相比, 振荡周期显著延长, 从几个小时延长到几天, 振幅提高, 提高幅度达到 10 倍以上, 由此提出高

Received: March 9, 2005; Accepted: April 27, 2005.

This work was supported by the grants from the National Key Scientific Research Program of China (No.2004BA713B08).

\* Corresponding author. Tel: 86-411-4706308; E-mail: fwbai@dlut.edu.cn

国家“十五”重点科技攻关项目(No.2004BA713B08)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

浓度酒精发酵条件下振荡行为源于反应器内部的高酒精浓度及酵母细胞对酒精浓度变化反应的延迟<sup>[3]</sup>。另有文献报道 振荡行为与溶氧、pH、比生长速率等环境因素有关<sup>[4,5]</sup>。根据连续培养与发酵理论,细胞的比生长速率与稀释速率是直接相关的,在恒化或稳态条件下,比生长速率等于稀释速率。因此,改变稀释速率可以很方便地调控比生长速率。本文在白凤武等人<sup>[3]</sup>的工作基础上,考察了稀释速率对高浓度酒精发酵系统振荡行为的影响,以期进一步发现诱发这种振荡行为的因素,并分析其内在的机理,为实现其调控提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

一株普通的酒精发酵酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),由大连理工大学生物工程系保藏。

### 1.2 培养基

**1.2.1 摇瓶生长培养基(g/L):**葡萄糖 30,酵母膏 5,蛋白胨 5,121℃温度下灭菌 20min。

**1.2.2 间歇发酵培养基(g/L):**葡萄糖 120,蛋白胨 5,酵母膏 3,121℃温度下灭菌 20min。

**1.2.3 连续发酵培养基(g/L):**葡萄糖 280,酵母膏 5,蛋白胨 3,110℃温度下灭菌 10min。

### 1.3 培养方法

从斜面接数环菌体于含有 100mL 生长培养基的 250mL 摇瓶中,在旋转式摇床上以 150 r/min、30℃ 的条件培养 24h 后,可以向搅拌罐接种,接种量约 10%。接种后在转速 300r/min、30℃、pH4.5 和通气量为 0.1vvm 条件下培养,待糖基本上耗竭后,按照设定的稀释速率流加连续发酵培养基,进行连续发酵。

### 1.4 连续发酵

连续发酵在图 1 所示的组合反应器系统中进行。第一个反应器为一操作状态为 CSTR 的搅拌罐,有效体积为 1680mL,转速为 300 r/min,温度为 30.0℃,pH4.5,通气量为 0.05vvm。CSTR 后接三段管式反应器( $\phi 4\text{cm} \times 2\text{cm}$ ),标定有效体积分别为 648mL、648mL 和 640mL,后两段管式反应器因发酵能力弱,产生的  $\text{CO}_2$  不足以维持菌体悬浮,在底部通以 0.005vvm 的微量空气以维持菌体悬浮。管式反应器组的温度控制在 30.0~30.6℃。尾气经去离子水洗涤以回收气体夹带的酒精。实验设定的几组总稀释速率分别为  $0.006\text{h}^{-1}$ 、 $0.012\text{h}^{-1}$ 、 $0.017\text{h}^{-1}$ 、 $0.024\text{h}^{-1}$ 、 $0.032\text{h}^{-1}$ (对 CSTR,稀释速率则为  $0.013\text{h}^{-1}$ 、 $0.026\text{h}^{-1}$ 、 $0.037\text{h}^{-1}$ 、 $0.052\text{h}^{-1}$ 、 $0.069\text{h}^{-1}$ )。

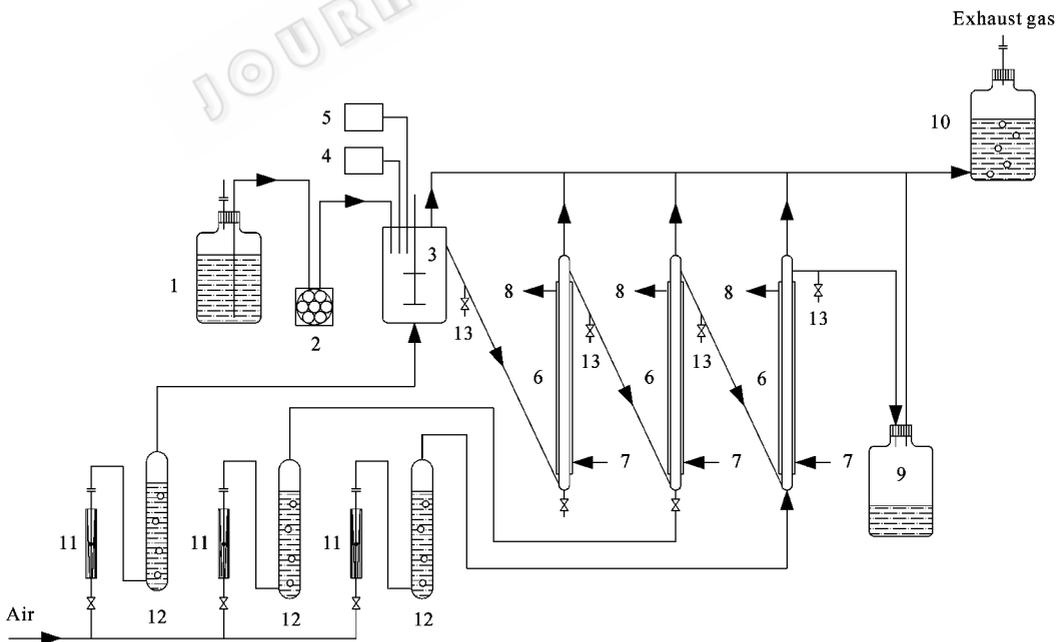


图 1 高浓度酒精连续发酵过程

Fig.1 Process diagram for high gravity continuous ethanol fermentation

1 : substrate storage tank ; 2 : peristaltic pump ; 3 : stirred tank fermenter ; 4 : pH controlling unit ; 5 : temperature controlling unit ;  
6 : tubular fermenters ; 7 : thermostat water inlet ; 8 : thermostat water outlet ; 9 : broth storage tank ; 10 : exhaust gas washing tank ;  
11 : air flowmeters ; 12 : air humidifiers ; 13 : sampling ports .

## 1.5 分析方法

**1.5.1 酒精**:取一定量的发酵液离心后,以水按 1:1 稀释后蒸馏出原有体积的馏分,气相色谱(Agilent 6890A GC, FID 检测器)分析,以正丁醇为内标物,同时以无水乙醇配成相近浓度的样品,按同样方法蒸馏,测量蒸馏前后酒精浓度变化,校准酒精的蒸馏损耗。

**1.5.2 葡萄糖**:采用葡萄糖自动分析仪(SBA-50 型生物传感分析仪)分析。

**1.5.3 菌体浓度**:以单位体积悬浮液中细胞干重表示,取 5mL 发酵液离心,并以去离子水洗菌体二遍,在 85℃ 烘箱中干燥 24h 至恒重。

## 2 数学模型

由物料衡算得出以下模型方程:

$$\left. \begin{aligned} \frac{dX}{dT} &= \mu X - DX \\ \frac{dS}{dT} &= -\frac{1}{Y_{vs}} \mu X + D(S_0 - S) \\ \frac{dP}{dT} &= vX - DP \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

根据不同稀释速率下实验测定的  $Y_{vs}$  数据,拟合  $Y_{vs}$ :

$$Y_{vs} = -2304.3D^3 + 272.18D^2 - 7.89D + 0.08$$

陈丽杰等人在研究高浓度酒精发酵动力学时,提出如下模型方程<sup>[6]</sup>:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2/K_1} \left(1 - \frac{P}{P_1}\right)^4 + \mu_0 \quad (2)$$

$$\nu = \frac{\nu_m S}{K_s^* + S + S^2/K_1^*} \left(1 - \frac{P}{P_1}\right) + \nu_0 \quad (3)$$

在  $D \leq 0.015 \text{ h}^{-1}$  时,方程(2)和(3)预测的结果远远高于实验测定的结果,通过重新拟合  $\mu_0$  和  $\nu_0$  进行必要的修正,根据实验数据,  $\mu_0$  和  $\nu_0$  的拟合结果为:

$$\mu_0 = 3 \times 10^6 D^3 - 116825 D^2 + 1419.24 D - 5.563 \text{ h}^{-1}$$

$$\nu_0 = -0.12 \text{ h}^{-1}$$

## 3 理论分析

按微分方程组稳定性理论,周期解对应于振荡现象,而分岔理论则用于预测微分方程组周期解出现的可能性,因此参照文献[7,8],以分岔理论预测振荡存在的可能性,并设其稳态解为  $(X_c, S_c, P_c)$ , 则:

$$\mu = D, X_c = (280 - S_c) Y_{vs}, P_c = v X_c / D \quad (4)$$

在稳态处的 Jacobi 矩阵为:

$$J = \begin{pmatrix} \frac{\partial \mu}{\partial X} X_c & \frac{\partial \mu}{\partial S} X_c & \frac{\partial \mu}{\partial P} X_c \\ -\frac{1}{Y_{vs}} \left( \frac{\partial \mu}{\partial X} X_c + D \right) & -\frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} X_c - D & -\frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial P} X_c \\ \left( \frac{\partial \nu}{\partial X} X_c + v \right) & \frac{\partial \nu}{\partial S} X_c & \frac{\partial \nu}{\partial P} X_c - D \end{pmatrix}$$

$$\text{其中 } \frac{\partial \mu}{\partial X} = 0, \frac{\partial \nu}{\partial X} = 0$$

由  $\text{de}(\lambda I - J) = 0$  得其特征方程为:

$$\lambda^3 + C_2 \lambda^2 + C_1 \lambda + C_0 = 0 \quad (5)$$

$$C_2 = 2D + \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} X_c - \frac{\partial \nu}{\partial P} X_c$$

$$C_1 = D^2 - \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} \frac{\partial \nu}{\partial P} X_c^2 + \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} X_c D$$

$$- \frac{\partial \nu}{\partial P} X_c D + \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial P} \frac{\partial \nu}{\partial S} X_c^2$$

$$+ \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} X_c D - \frac{\partial \mu}{\partial P} X_c v$$

$$C_0 = -\frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} \frac{\partial \nu}{\partial P} X_c^2 D + \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial S} X_c D^2$$

$$- \frac{\partial \mu}{\partial P} X_c v D + \frac{1}{Y_{vs}} \frac{\partial \mu}{\partial P} \frac{\partial \nu}{\partial S} X_c^2 D \quad (6)$$

根据分岔理论,当  $\text{de}(J) = \alpha$  (等价于  $C_0 = 0$ ), 特征方程有一零特征根,方程将出现一个分岔点或极限点,而当特征方程有一对纯虚根,且其它特征根均为负实部时,则会发生分岔,同时出现极限环。设其一对纯虚根为  $\pm i\omega$ , 代入特征方程可得:

$$C_0 = C_1 C_2, \omega^2 = C_1 \quad (7)$$

当式(7)满足  $C_0 > 0$  且  $C_1' \neq 0$ , 则可确定各入口条件下分岔点的位置,同时式(7)后一项还可确定分岔点振荡的周期。

## 4 结果与讨论

### 4.1 理论分析

由于后续管式反应器受 CSTR 的振荡行为强制激发,我们只需考察 CSTR 的振荡行为,即可确定组合反应器系统的振荡行为。CSTR 的稀释率是与比生长速率相关的,因此可以控制 CSTR 的稀释速率来表征比生长速率。计算  $D = 0.01 \text{ h}^{-1}$  以上的稳定性,结果表明,当  $D < 0.042 \text{ h}^{-1}$  时出现分岔,大于此值则分岔消失,则表明在  $0.01 \text{ h}^{-1} < D < 0.042 \text{ h}^{-1}$  存在振荡的可能。

令  $D = 0.026 \text{ h}^{-1}$ , 则  $S_c = 122.8 \text{ g/L}$ ,  $P_c = 77.09 \text{ g/L}$ ,  $X_c = 2.99 \text{ g/L}$ ,  $C_1 = 0.002715$ ,  $C_1' = 0.313$ , 其振荡周期约为  $2\pi/\omega = 120.48 \text{ h} = 5.02 \text{ d}$ 。

### 4.2 实验结果与讨论

在上述理论分析的基础上,我们设定了 5 个不同的稀释速率,检测残糖浓度、酒精浓度和酵母细胞

浓度的变化情况,结果如图2所示。

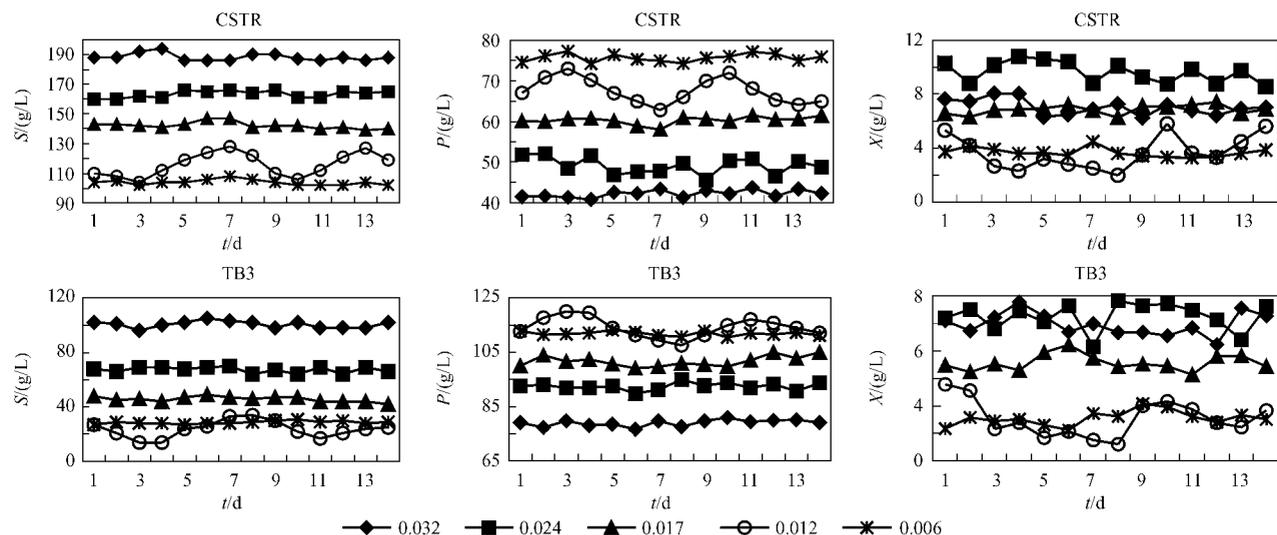


图2 CSTR和第三级管式反应器中发酵参数和稀释率的对应关系

Fig.2 The fermentation parameter patterns versus dilute rates for the CSTR and the 3th tubular bioreactor

由图2实验结果可以看出,在稀释速率为 $0.012\text{h}^{-1}$ (对应CSTR的稀释速率为 $0.026\text{h}^{-1}$ )条件下,系统呈现明显的振荡行为。CSTR中残糖浓度、酒精浓度和酵母细胞浓度振荡幅度分别为 $104\sim 128\text{g/L}$ 、 $62.4\sim 74.4\text{g/L}$ 和 $2.0\sim 5.4\text{g/L}$ ,后续管式反应器在CSTR振荡的激发下呈伴随性振荡,第三段管式反应器中的残糖浓度、酒精浓度和酵母细胞浓度伴随振荡幅度分别为 $14\sim 33\text{g/L}$ 、 $110.4\sim 122.4\text{g/L}$ 和 $2.6\sim 4.5\text{g/L}$ 。与以往文献报道相比<sup>[4,5]</sup>,该系统的振荡具有周期长、振幅大的特点,进一步支持了文献3对高浓度酒精发酵系统振荡行为发生机理的推断,即高酒精浓度对酵母细胞的抑制及酵母细胞内酶系对这种抑制效应反应的延迟。

高浓度酒精发酵系统的振荡行为出现于特定的稀释速率或比生长速率条件下,是本研究工作的新发现,本研究组徐铁军等人<sup>[9]</sup>在自絮凝性酵母酒精连续发酵系统也获得了类似的实验结果。两个使用不同菌株的系统,呈现振荡行为的稀释速率或比生长速率不同,表明振荡行为可能受菌株特性影响<sup>[10]</sup>。

实验观测稀释速率为 $0.012\text{h}^{-1}$ 条件下的振荡周期为 $6\sim 7\text{d}$ ,与5.1中理论分析的预测结果 $5.02\text{d}$ 比较,有一定的偏差。产生这一偏差的主要原因在于5.1中建立的模型过于简单,特别是酵母细胞对外部环境反应的延迟或时滞,没有在模型中体现出来。随着人们对胞内代谢途径数学描述的深化和完善,能够更好地预测高浓度酒精发酵系统振荡行为,并

对其进行人为调控的数学理论和模型,会逐渐发展起来。

### 4.3 振荡现象的利弊分析

实验数据表明:尽管CSTR内残糖浓度随稀释速率的增加迅速提高,酒精浓度相应降低,但未级管式反应器中的残糖浓度和酒精浓度在出现振荡现象的稀释速率 $0.012\text{h}^{-1}$ 与处于拟稳态的稀释速率 $0.006\text{h}^{-1}$ 相比,却并不遵循以上规则。稀释速率 $0.012\text{h}^{-1}$ 时的残糖平均值为 $24.5\text{g/L}$ ,酒精浓度为 $123.3\text{g/L}$ ,而稀释速率为 $0.006\text{h}^{-1}$ 条件下,终点残糖为 $28.7\text{g/L}$ ,酒精为 $111.8\text{g/L}$ 。其缘由推测可能是由于稀释速率 $0.006\text{h}^{-1}$ 时系统处于拟稳态,始终受高浓度酒精的抑制,因而发酵能力明显减弱,而稀释速率 $0.012\text{h}^{-1}$ 下尽管也受高浓度酒精的抑制作用,但由于存在振荡行为,酵母通过动态平衡调整酶系以适应振荡下高浓度酒精的冲击,从而有了缓冲与适应的过程,最终使其耐受酒精的能力从总体上有所提高。以往人们对振荡现象的认识多停留在不利的一面,如导致系统操作不稳定,难以预测和控制等,而忽视了振荡现象如本实验观察到的有利的一面。最近,振荡行为的这一特点逐渐开始为人们所利用,如有人以气升环流生物反应器发酵好氧耐渗透酵母生产甘油时发现,周期性改变通气方向可明显提高甘油的产量<sup>[11]</sup>;另一方面振荡也用于提高基因工程菌质粒的稳定性<sup>[1]</sup>。

## 5 结论

酵系统的振荡行为是在特定稀释速率范围内产生的,并与酵母细胞的比生长速率相关。一定条件下振荡行为,有利于酵母细胞在高酒精浓度条件下调节自身代谢系统,改善活性,提高发酵强度。

致谢 感谢大连理工大学应用数学系孙丽华教授的指导。

### 符号说明

$\mu$  — 酵母细胞的比生长速率/ $\text{h}^{-1}$

$\mu_m$  — 酵母细胞的最大比生长速率/ $\text{h}^{-1}$

$\nu$  — 比酒精生成速率/ $\text{h}^{-1}$

$\nu_m$  — 最大比酒精生成速率/ $\text{h}^{-1}$

$K_s, K_s^*$  — 描述酵母细胞生长与酒精生成的 Monod 模型参数( $\text{g/L}$ )

$K_i, K_i^*$  — 描述酵母细胞生长与酒精生成的底物抑制模型参数( $\text{g/L}$ )

$P_L$  — 酵母细胞发酵过程中最大酒精耐受浓度( $\text{g/L}$ )

CSTR — 罐式搅拌反应器

TB3 — 第三级管式反应器

$\lambda$  — 特征根

$I$  — 单位矩阵

$C_1'$  —  $C_1$  对  $D$  的一阶导数

det — 行列式

$\ominus$  — 偏微分

$S$  — 底物浓度( $\text{g/L}$ )

$P$  — 产物浓度( $\text{g/L}$ )

$X$  — 生物量浓度( $\text{g/L}$ )

### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Xiu ZL (修志龙), Zeng AP (曾安平). A Study progress in oscillatory and chaotic behavior in microbial continuous culture. *Advance in Bioengineering* (生物工程进展), 1999, 19(6) : 58 - 63

[ 2 ] Hjortso MA, Nielsen JA. Conceptual model of autonomous oscillations in microbial culture. *Chemical Engineering Science*,

1994, 49(8) : 1083 - 1095

- [ 3 ] Bai FW, Chen LJ, Anderson WA *et al.* Parameter oscillation in high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system. *Biotechnol and Bioeng*, 2004, 88(5) : 558 - 566
- [ 4 ] Beuse M, Bartling R, Diekmann H *et al.* Oxygen, pH value, and carbon source induced changes of the mode of oscillation in synchronous continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 63 : 410 - 417
- [ 5 ] Parro D, Martegani E, Raizi BM *et al.* Oscillations in continuous culture of budding yeast: a segregated parameter analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32 : 411 - 417
- [ 6 ] Chen LJ (陈丽杰), Bai FW (白凤武), Anderson WA *et al.* Observed quasi-steady kinetics of yeast cell growth and ethanol fermentation under very high gravity medium condition. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering* (生物加工过程) 2004, 2(2) : 25 - 29
- [ 7 ] Wang HI (王洪礼), Gao WL (高卫楼), Yuan QP (袁其朋). Study on oscillation behavior of biochemical reaction in CSTR. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应工程与工艺), 1997, 3 : 270 - 275
- [ 8 ] Sun LH (孙丽华), Xiu ZL (修志龙), Ma YF (马永峰). Model analysis of multiplicity and bifurcation in continuous culture of microorganisms. *Journal of Dalian University of Technology* (大连理工大学学报) 2001, 5 : 300 - 304
- [ 9 ] Xu TX (徐铁军), Zhao XQ (赵心清), Bai FW (白凤武). Continuous ethanol fermentation using self-flocculating yeast strain and bioreactor system composed of multi-stage tanks in series. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, 21(1) : 113 - 117
- [ 10 ] Wang HI (王洪礼), Guo SQ (郭树其), Tan X (谭欣). The study on time lags and nonlinear oscillation in biochemical systems. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应工程与工艺), 1999, 15(4) : 401 - 406
- [ 11 ] Xu YX (徐圆圆), Liu DH (刘德华), Xie DM (谢东明). Study on the effects of forced oscillating period on mass transfer characteristic in airlift loop reactor. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* (高校化工学报) 2002, 16(1) : 13 - 16