

固定化细胞的混合糖连续发酵动力学模型

邓旭*

岑沛霖

(厦门大学化工系 厦门 361005)* (浙江大学化工系 杭州 310027)

摘 要 利用固定化啤酒酵母和固定化毕赤酵母在两个串联的固定床内连续发酵由葡萄糖和木糖组成的混合糖制取酒精的过程,建立了连续发酵的非结构动力学模型。该模型以带抑制项的米氏动力学方程为酶动力学基础,考虑了抑制物抑制、底物抑制、轴向弥散及膜传质等因素。成功地引入了一个综合考虑颗粒相内外传质的总有效因子简化模型的计算,并取得了较为满意的仿真结果。

关键词 固定化细胞,乙醇,连续发酵,动力学

对稻草、麦秸、蔗渣等生物质再生资源的利用是根据近几十年来能源及环境保护方面的需求而发展起来的。就木质纤维素为主的农林废料而言,最常用的方法是首先将其水解成可发酵性糖,然后再进行发酵处理。木质纤维素的水解混合糖主要由葡萄糖和木糖组成,比例约为2:1。利用固定化啤酒酵母和固定化毕赤酵母串联发酵混合糖制取酒精的发酵策略是一种具有工业前景的新工艺^[1],它既实现了发酵过程的连续化操作,又消除了葡萄糖效应对木糖发酵的影响,保证了木糖发酵与葡萄糖发酵在串联流程中的同步性,从而大大缩短了混合糖发酵的周期,提高了整体发酵速率。虽然人们对固定化细胞的一些动力学特征进行过研究^[2,3],但在多碳源的固定化细胞连续发酵动力学方面却未见报导。本文将着重对固定化啤酒酵母的混合糖连续发酵过程建立动力学模型,并对固定化毕赤酵母连续发酵及整个发酵过程进行初步的仿真计算。

1 实验材料与分析方法

该部分内容请参阅文献[1]。

2 结果与讨论

2.1 固定化啤酒酵母的混合糖连续发酵动力学模型计算

2.1.1 模型的提出: 对装填固定化细胞颗粒的固定床反应器,根据物料衡算可得出连续性方程为:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 S}{\partial z^2} - u \frac{\partial S}{\partial z} - \frac{1-\epsilon}{\epsilon} \eta_S v(S) \quad (1)$$

定解条件为:

本课题由国家自然科学基金资助。

* 通讯联系人:厦门大学 2223 信箱,厦门 361005。

本文于 1996 年 7 月 8 日收到。

$$z = 0, -D_L \frac{\partial S}{\partial z} = u(S_f - S) \tag{2}$$

$$z = L, D_L \frac{\partial S}{\partial z} = 0 \tag{3}$$

$$t = 0, S = S(0, z) \tag{4}$$

式(1)中的 $v(S)$ 为以主体相底物浓度为基准的米氏方程。对啤酒酵母, 因木糖不被利用, 但木糖的存在又会对葡萄糖发酵产生竞争性抑制^[4], 于是:

$$v(S) = \frac{V_m S_1}{K_S(1 + i/K'_i) + S_1 + S_1^2/K_i} \tag{5}$$

η_s 为综合考虑颗粒相内外传质的总有效因子, 由下式确定^[5]:

$$\frac{1}{\eta_s} = \frac{1}{\eta} + \frac{\Phi^2}{B_i} \tag{6}$$

式中 η 为不考虑膜传质因素的有效因子, Φ 为席勒模数, B_i 为 Biot 数。很显然, 总有效因子的引入避免了对颗粒相的传质计算, 从而大大简化了模型求解。有关总有效因子的详细讨论及计算方法请参考文献[6]。

式(1)中的 D_L 可由 Chung 和 Wen 提出的关联式计算^[7]:

$$P_e = \frac{uL}{D_L} = \frac{L(0.2 + 0.011Re^{0.48})}{2Re} \tag{7}$$

P_e 为 Peclet 常数, 其物理意义为特征对流速率与轴向弥散速率之比。

式(5)中的 4 个米氏动力学常数只是温度的函数。对于以海藻酸钙包埋啤酒酵母代谢葡萄糖的发酵体系, 已有一些学者作过本征动力学研究, 但得出的数据各有不同。本文以文献值为初值, 利用 Powell 法从实验得出的稳态数据中回归出这 4 个动力学常数。

2.1.2 模型计算结果: 表 1 为米氏动力学参数的计算结果。

表 1 米氏动力学参数的实验回归值与文献值的比较

Table 1 Comparison of Michaelis parameters between experiemntal value and literature data				
Data sources	$v_m/\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$	$K_s/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_i/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$K'_i/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Reference [3]	220	2.3~2.8	227	/
Reference [8]	493	7.2	/	/
Reference [9]	480	4.24	216	/
Regressed value/32℃	140.4	1.36	118	2.33
Regressed value/35℃	158.4	1.21	116	2.30

从回归的结果来看, 各项动力学参数基本与文献值保持在同一数量级。35℃ 下的最大反应速率比 32℃ 的高, 饱和常数低于 32℃ 的数值, 说明温度升高对发酵有利; 其它两个抑制项常数对温度不敏感。 K'_i 的数值较小, 表明木糖对发酵的影响还是比较大的。

联立式(1)~(6), 用多项式将(1)式离散成常微分方程组, 再用隐式 Gear 法积分求解就可得出发酵过程的动态模拟结果。图 1A、1B 为固定化啤酒酵母连续发酵过程的仿真结果。从图 1 来看, 模型计算值与实验值拟合情况良好, 说明该模型基本上能反映出固定化啤酒酵母在固定床的发酵动力学特性。

2.1.3 轴向弥散对发酵过程的影响: 图 2 的结果表明在本发酵体系中轴向返混的作用

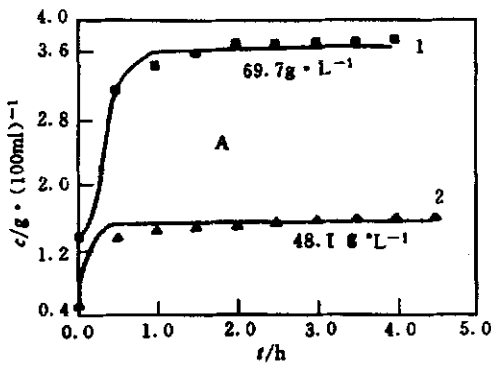


图 1A 稀释率的影响

Fig. 1A Effect of dilution rates

Temperature: 32℃, — Modeling value, ■, ▲ Experiment value; Glucose in feed: 1. 69.7 g · L⁻¹, Dilution rate: 0.84h⁻¹→2.0h⁻¹; 2. 48.1 g · L⁻¹, Dilution rate: 1.3h⁻¹→2.1h⁻¹

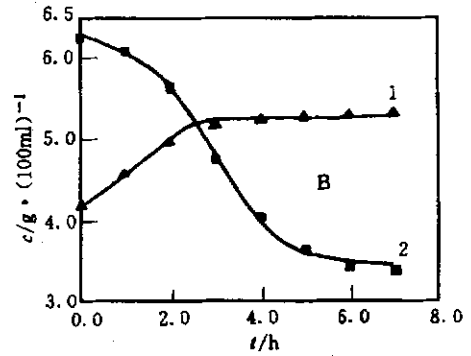


图 1B 初始混合糖浓度配比影响

Fig. 1B Effect of composition of initial mixed substrates

Temperature: 32℃, Dilution rate: 0.52h⁻¹; — Modeling value, ■, ▲ Experiment value; 1. Glucose/xylose (98.3 : 71.8) g · L⁻¹→(64 : 52.2) g · L⁻¹; 2. Glucose: xylose (90.5 : 47.6) g · L⁻¹→(98.3 : 71.8) g · L⁻¹

很小,可以忽略不计,这与本实验中固定床的高径比较大有关;图 2B 所显示影响略大一些,我们认为主要原因是因为稀释率较小(0.52h⁻¹),致使轴向返混的影响显得突出,图 2A 的稀释率在 0.84h⁻¹以上,主体相流速的加快削弱了轴向返混对整个发酵过程的作用。

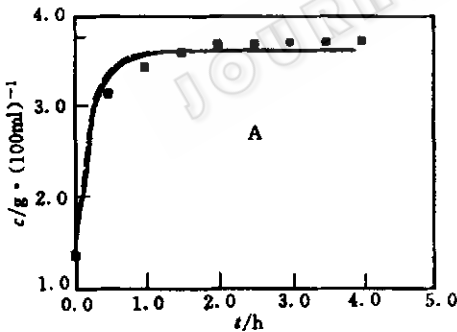


图 2A 轴向返混的影响

Fig. 2A Effect of axial diffusion

Temperature: 32℃, Glucose in feed: 69.7 g · L⁻¹, Dilution rate: 0.84h⁻¹→2.0h⁻¹, ■ Experiment value, — Modeling value, --- Modeling value not considering axial diffusion.

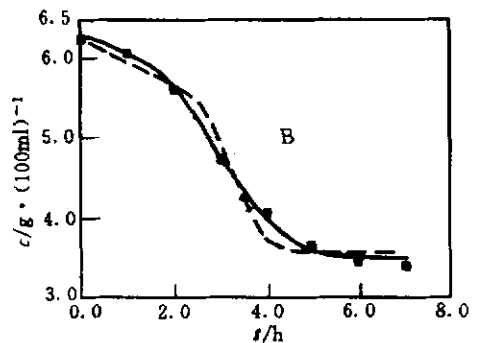


图 2B 轴向返混的影响

Fig. 2B Effect of axial diffusion

Temperature: 32℃, dilution rate: 0.52h⁻¹, glucose/xylose: (98.3 : 71.8)→(64 : 52.2) g · L⁻¹ ■ Experiment value, — Modeling value, --- Modeling value not considering axial diffusion.

2.1.4 内外扩散对发酵过程的影响: 大量研究表明,对于固定床反应器,内扩散传质过程为整个反应的控制步骤。从图 3 的结果可以看出,液膜传质阻力对发酵的影响非常小,完全可忽略不计;而内扩散阻力的影响却显著得多。制约内扩散传质的瓶颈在于固定化

介质的物理性质;颗粒粒径,粒内结构和孔隙率等。

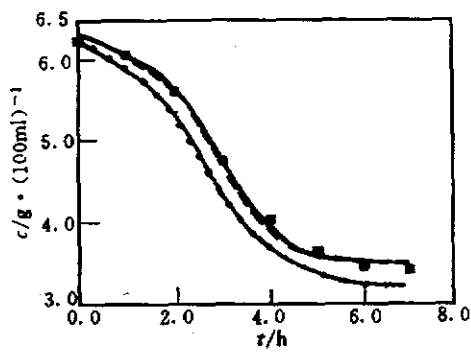


图 3 内外扩散阻力的影响

Fig.3 Effect of film diffusion and intra-particle diffusion

Temperature: 32℃, Dilution rate: 0.52h⁻¹, Glucose: xylose (98.3; 71.8) → (64; 52.2) g · L⁻¹, ■ Experiment value, --- Modeling value, - - - Modeling value not considering film diffusion, ··· Modeling value not considering intra-particle diffusion.

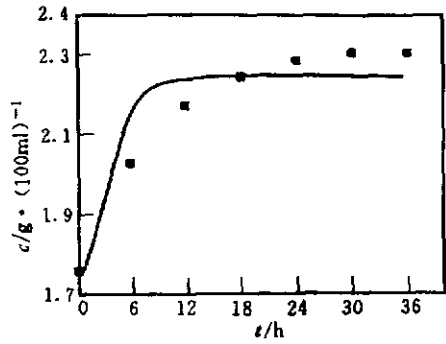


图 4 木糖发酵中产物抑制的影响

Fig.4 Effect of product inhibition in xylose fermentation

Temperature: 30℃, Dilution rate: 0.14h⁻¹, Xylose in feed: 40g · L⁻¹, aeration: 60ml · min⁻¹, Ethanol in feed: 28.5g · L⁻¹ → 32.5g · L⁻¹, ■ Experiment value, --- Modeling value

2.2 固定化毕赤酵母连续发酵动力学

混合糖发酵液流经固定化啤酒酵母柱后,适宜的操作条件可使其中的葡萄糖基本消耗完,故进入毕赤酵母柱时发酵液组成主要为木糖及产生的酒精。木糖发酵需要一定的通气量,因此产物抑制及通气量的影响应在酶反应动力学中体现出来。但在毕赤酵母发酵过程中,通氧量很小,溶氧浓度已难以采用氧电极测定,我们在实验中无法获得该数据,只能尝试将溶氧的作用归并到酶反应动力学的几个模型参数中,于是酶动力学式为:

$$V = \frac{V_m \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] S_2}{K_S + S_2 + S_2^2 / K_i}$$

(8)

式中的 5 个模型参数可通过稳态实验数据回归出来。

表 2 固定化毕赤酵母发酵木糖的米氏动力学参数

Table 2 Michaelis parameters of xylose fermentation by immobilized *P. stipitis*

Aeration/ml · min ⁻¹	V _m /g · (L · h) ⁻¹	K _s /g · L ⁻¹	K _i /g · L ⁻¹	P _m /g · L ⁻¹	n
60(30℃)	1.407	0.631	105.2	75.2	1.257
94(33℃)	1.471	0.936	649.3	72.5	1.255
134(33℃)	1.498	0.565	112.9	70.1	1.258

表 2 与表 1 啤酒酵母的动力学参数相比,最大的差异体现在最大反应常数 V_m 上,表明毕赤酵母的发酵速率远比啤酒酵母小。将式(8)代入式(1)~(6)中计算得出固定化毕赤酵母的固定床连续发酵动态仿真结果。我们对一酒精抑制的情况进行了动力学计算。

可以看出,图 4 的模拟偏差比固定化啤酒酵母的计算误差大得多,难以令人满意。这种偏差显然是对溶氧作用的不合理简化处理造成的。对于毕赤酵母的微氧发酵,溶氧是一项十分重要的工艺指标,简单地将之归并到几个酶反应动力学模型参数里去难以从机理上加以解释。

2.3 固定化啤酒酵母和固定化毕赤酵母串联发酵模型计算

考虑到毕赤酵母代谢木糖的速率远低于啤酒酵母利用葡萄糖,因此在混合糖的串联发酵中我们采用了较大体积的固定化毕赤酵母柱,填充体积约为固定化啤酒酵母柱的十倍,以保证木糖和葡萄糖在两个固定床中代谢的同步性。以初始混合糖浓度作为柱 1 的进口值,并以柱 1 出口值为柱 2 的初始值,分别在(1)式左边项为零时进行计算,可得出稳定状态下串联发酵过程的模拟结果。

从表 3 可以看出,柱 1 出口残葡萄糖的计算误差较小,基本可令人满意;而柱 2 出口的残木糖的计算偏差就大许多,即使与上一节单木糖的动态计算结果相比也显得突出。引起计算误差的原因来自三个方面:最主要的原因是前面提到的对溶氧作用的不甚合理的简化处理;其二为固定床体积的增大导致传质情况尤其是通气状况的改变;其三则是前面的柱 1 所产生的负面影响,比如流出液中的一些酶及未代谢完的少量的葡萄糖都有可能对柱 2 的木糖发酵产生影响。

表 3 串联发酵过程的稳态计算结果

Table 3 Modeling results of cascade fermentation at steady state

Aeration/ ml·min ⁻¹	Flow rate/ ml·min ⁻¹	Feed (glucose/xylose)	Effluent of volume 1 (glucose)		Effluent of volume 2(xylose)	
			Experiment	Calculation	Experiment	Calculation
134	1.17	21.5/17.2	0.0	1.0	6.4	4.3
	1.20	19.8/16.3	2.3	1.2	5.5	3.6
	1.62	19.8/16.3	3.3	2.4	7.1	5.1
94	1.10	19.8/16.3	0.0	0.7	5.8	3.4
	1.03	23.0/28.5	1.8	1.2	10.6	8.4
	1.26	23.0/28.5	3.9	3.1	13.2	9.9
	1.00	46.6/19.2	13.4	12.4	10.3	7.1

At/32℃, Conc./g·L⁻¹

3 结 论

对固定化啤酒酵母的混合糖发酵过程建立了以带抑制项的米氏方程为酶动力学基础的非结构模型,并引入了综合考虑颗粒相内外传质的总有效因子简化模型的计算,仿真结果令人满意。

对固定化毕赤酵母的连续发酵动力计算表明,将溶氧的作用简单归并到酶动力学的几个模型参数中进行仿真将会导致较大的偏差。精确测定溶氧在发酵过程中的变化情况,找出其变化规律是提高仿真精度的唯一办法。

符号说明

B_i	无因次 Biot 准数	S_i	进料底物浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
i	竞争型抑制酶反应动力学的抑制物 (木糖)浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	V_m	最大反应速度/ $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$
K_i	底物抑制常数/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Φ	无因次 Thiele 模数
K_s	饱和常数/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	K'_i	抑制物抑制常数/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
P	产物酒精浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	L	固定床填料高度/cm
P_m	产物抑制作用使微生物发酵行 为完全停止时的酒精浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	P_e	无因次 Peclet 准数
R	固定化颗粒半径/cm	S_1, S_2	主体相葡萄糖及木糖浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
η_s	总有效因子	u	床层线速度/ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
		ϵ	床层空隙率

参 考 文 献

- [1] 邓 旭, 郑重鸣, 岑沛霖. 食品与发酵工业, 1995, 6: 39~43.
- [2] Dominguez H, Nunez M J, Chamy R. Biotechnol Bioeng, 1993, 41: 1123~1132.
- [3] 张治根, 俞俊棠, 苏尔霞. 生物工程学报, 1989, 5(1): 77~83.
- [4] 邓 旭, 郑重鸣, 岑沛霖, 谢 熠. 化学反应工程与工艺, 1995, 11(3): 297~301.
- [5] James E B, David F O, Biochem E F. John Wiley, New York: 1985, 208~215.
- [6] Deng X, Cen P L. Chinese Journal of Chemical Engineering, Accepted, 1997.
- [7] Chung D F, Wen C Y. AIChE J, 1968, 14: 857~861.
- [8] Vives C, Cases C, Godia F. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38: 467~472.
- [9] Williams F M, F. Theoret Biol, 1967, 15: 190~197.
- [10] Luong J H T. Biotechnol Bioeng, 1985, 27: 280~285.

Kinetic Model of Continuous Fermentation with Mixed Substrates by Immobilized Cells

Deng Xu

(Department of Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Cen Peilin

(Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract An unstructured model was developed to simulate continuous ethanol fermentation with mixed substrates consisting of glucose and xylose, in which process, was operated in two cascade columns by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and immobilized *Pichia stipitis* CBS5773. The model was based on enzyme inhibition kinetics, taking into account substrate inhibition, xylose inhibition, axial diffusion and film diffusion. A total effectiveness factor was proposed considering both extra- and intra- particle diffusions to simplify the model calculation and a good agreement with experimental data was achieved.

Key words Immobilized cell, ethanol, continuous fermentation, kinetic model