

锌酵母分批流加发酵动态优化

陈 敏 刘万卉 王静馨

(烟台大学 烟台 264005)

摘 要 对锌酵母分批流加发酵过程的控制变量反应温度和 pH 的动态最优化进行研究。基于酵母流加发酵有抑制的状态模型,通过龙格-库塔法计算微分方程组、单纯形法优化对模型参数进行估计。采用不同的温度和 pH 控制策略进行研究,由此获得动力学模型参数与温度和 pH 关系的回归模型。在此基础上,以极大值原理、梯度法优化求解以获得最高锌酵母产量为目标的最优温度和 pH 分布 $T^*(t)$ 、 $pH^*(t)$ 。实验验证,在 $T^*(t)$ 和 $pH^*(t)$ 下操作,锌酵母产率可提高 13.7%。

关键词 锌酵母,分批发酵,动态优化

反应温度和 pH 是发酵过程中对细胞增殖和代谢合成影响很大的两个参数,并且是属于基本解决了测量和控制的参数。分批发酵过程中,随着过程的进展,除了基质浓度、菌体浓度随时间变化外,由于一系列分解和合成代谢的结果,引起温度和 pH 的变化。这些变化如不加控制,必然会严重影响过程的正常进行^[1]。分批发酵过程的温度和 pH 都是时间的函数,因此它的过程控制是寻找最佳时间结构,在时间连续变化过程中,搜索最优参数,即 $T(t)$ 、 $pH(t)$ 的最佳值。本文以获得锌酵母最高产量为目的,对发酵过程的最佳温度和 pH 动态结构进行优化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

- 1.1.1 菌种:啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) CY26,上海酵母厂烟台分厂提供。
- 1.1.2 发酵设备:上海制药机械四厂生产 BⅢ-6 型 6 升玻璃发酵罐及温度、pH 自动控制系統。
- 1.1.3 发酵培养基(%):按文献[2],以味精废液添加薯干、木薯糖化液使总糖为 2.2, KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.1, 玉米浆 0.5, $ZnSO_4$ 0.16。

1.2 分析方法

- 1.2.1 发酵液菌体浓度:取发酵液 5ml,用水稀释 10 倍,以 721 型分光光度计在波长 605nm 处测定 OD 值。
- 1.2.2 菌体干重:取发酵液 5ml,离心后蒸馏水洗涤三次,105℃烘干至恒重后称重。
- 1.2.3 还原糖测定:斐林快速定糖法^[3]。
- 1.2.4 酵母细胞含锌量:原子吸收光谱法^[4]。

1.3 发酵工艺条件

参加实验工作的还有:田 泉,纪东升,刘仙娜,唐美燕。
本文于 1993 年 12 月 30 日收到。

1.3.1 发酵液流加速度: 流加液糖浓度 100g/L, 其它营养成分浓度同发酵培养基。初始发酵液 2950ml, 流加总体积 1050ml。接种量为 1g/L。发酵时间 12 小时。流速的控制 (Flow control) 如下:

| 时间(h) | 0-1 | 1-2 | 2-3 | 3-8 | 8-9 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 流速(ml/min) | 0.778 | 1.167 | 1.944 | 2.330 | 1.994 |

1.3.2 温度和 pH 条件, 以不同的温度和 pH 组合设定值进行发酵实验。设定情况见表 1。

2 结果与讨论

2.1 动力学模型参数估计

采用文献[5]提出的酵母分批流加发酵有抑制模型:

选用龙格-库塔法结合单纯形优化进行参数估计。在以上微分方程组中有 7 个待定参数 $\mu_m, K_S, K_M, Y_G, m, \alpha, \beta$ 。首先根据经验和文献资料, 初步确定 7 个参数的可行域范围, 以两水平单纯形⁽⁶⁾确定初始单纯形参数值。然后以四阶龙格-库塔法解微分方程组, 得到独立变量 X, S 随时间变化的数据, 将计算数据与 X, S 实验数据比较, 取其差值的不等权平方和作为参数优化目标函数, 推进单纯形进行参数优化, 得出 7 个参数的最优值。为了校核数学模型的适用性, 将模型计算结果与实测数据绘图比较于图 1, 由图 1 可见, 该模型用于描述锌酵母分批流加发酵是可行的。图 1 的环境条件: $T=29^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4.6$ 。

2.2 动力学参数与控制变量间的回归模型

控制变量温度和 pH 对状态变量 X, S 的影响表现为对动力学参数的影响。采用不同的温度和 pH 进行发酵试验, 得到在各温度、pH 条件下的 X, S 随时间变化的实验数据。

然后按上述动力学参数估计方法进行参数估计, 得到在不同温度、pH 下的各参数值如表 1。由表 1 数据, 以多元回归分析方法⁽⁷⁾得到动力学模型参数与控制变量温度与 pH 间关系的回归模型。表 2 列出回归模型的系数及模型剩余平方和及复相关系数⁽⁷⁾。

回归模型的形式为:

$$Y = b_0 + b_1 \cdot \text{pH} + b_2 \cdot T + b_{11} \cdot \text{pH}^2 + b_{22} \cdot T^2 + b_{12} \cdot \text{pH} \cdot T$$

从表 2 中的复相关系数和 F 检验看到, 7 个回归模型均为回归显著。为进一步考核模型的可用性⁽⁸⁾, 再进行数组控制不同温度和 pH 的发酵实验, 以回归模型计算参数值, 再以四阶龙格-库塔法计算状态变量 X, S 随时间变化的数据, 计算数据与实测数据比较列于表 3。

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu(VX)$$

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_F - \frac{1}{Y_G} \mu(VX) - m(VX)$$

$$\frac{d(VI)}{dt} = (\alpha\mu + \beta)(VX)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \mu = \frac{\mu_m S}{(K_S + K_M S^2)(1 + I^2)}$$

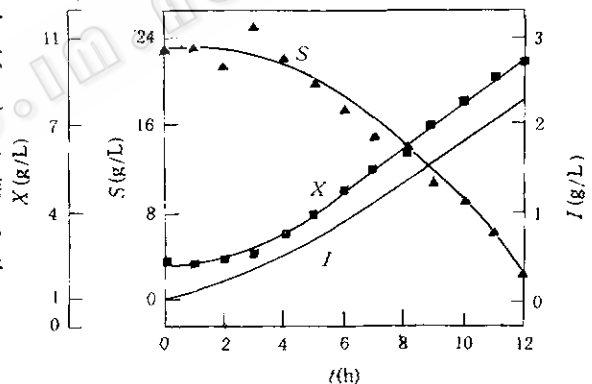


图 1 状态模型曲线

Fig. 1 Curve of state model

■, ▲ Determination data
— Model calculation data

表 1 不同温度、pH 下的动力学参数估计算

Table 1 Kinetic model parameter estimation values at different temperatures and pH

| pH | T(°C) | Kinetic model parameter value($\times 10^{-2}$) | | | | | | |
|------|-------|---|-------|-------|-------|------|----------|---------|
| | | μ_m | K_S | K_M | Y_G | m | α | β |
| 4.4 | 27 | 26.0 | 82.4 | 5.3 | 30.7 | 0.49 | 14.23 | 1.51 |
| 4.8 | 27 | 33.6 | 95.8 | 4.8 | 28.2 | 0.16 | 15.71 | 1.12 |
| 4.35 | 29 | 18.5 | 60.1 | 3.9 | 21.7 | 0.58 | 12.31 | 1.44 |
| 4.4 | 29 | 28.8 | 62.9 | 4.8 | 28.7 | 0.73 | 12.92 | 1.35 |
| 4.6 | 29 | 35.4 | 80.2 | 4.9 | 27.4 | 0.82 | 13.50 | 1.29 |
| 4.84 | 29 | 36.6 | 72.6 | 6.0 | 25.4 | 0.66 | 14.55 | 1.23 |
| 5.0 | 29 | 35.8 | 38.5 | 6.5 | 23.1 | 0.46 | 14.60 | 1.20 |
| 4.4 | 31 | 23.5 | 44.6 | 4.4 | 22.8 | 0.10 | 12.12 | 1.30 |
| 4.6 | 31 | 26.7 | 47.6 | 3.6 | 23.9 | 0.14 | 7.35 | 3.87 |
| 4.8 | 31 | 19.7 | 57.0 | 2.4 | 21.5 | 0.09 | 20.96 | 1.99 |
| 4.65 | 30 | 40.6 | 63.2 | 6.1 | 24.5 | 0.85 | 18.60 | 1.36 |
| 4.6 | 26.5 | 25.6 | 43.5 | 6.0 | 23.9 | 1.02 | 11.19 | 0.92 |
| 5.0 | 25 | 27.5 | 49.9 | 5.9 | 28.5 | 0.96 | 12.06 | 0.83 |

表 2 动力学模型参数与控制变量温度、pH 间的回归模型及模型显著性检验

Table 2 Regression models for kinetic parameter with controlling variables T and pH and significance test of regression models

| Y | Regression model coefficient | | | | | | SSe | R_Y . 12345 | F |
|----------|------------------------------|---------|----------|----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------------|--------|
| | b_0 | b_1 | b_2 | b_{11} | b_{22} ($\times 10^{-3}$) | b_{12} ($\times 10^{-3}$) | | | |
| μ_m | -40.5847 | 9.1302 | 1.35113 | -0.69005 | -16.553 | -87.85 | 1.8×10^{-2} | 0.82 | 10.3** |
| K_S | -56.2727 | 25.2418 | 0.00753 | -2.68963 | -1.229 | -9.98 | 2.4×10^{-2} | 0.85 | 13.0** |
| K_M | -2.4858 | 0.2654 | 0.13530 | -0.00123 | -1.755 | -8.28 | 6.2×10^{-4} | 0.78 | 7.8* |
| Y_G | -4.1116 | 2.3622 | -0.05142 | -0.27914 | -0.024 | 6.95 | 4.1×10^{-3} | 0.87 | 15.6** |
| m | 0.8977 | 0.0628 | -0.07382 | -0.01329 | 1.156 | 2.02 | 2.3×10^{-5} | 0.79 | 8.3** |
| α | 3.3556 | 1.2481 | -0.43989 | -0.24135 | 4.90 | 35.97 | 8.0×10^{-4} | 0.94 | 38.0** |
| β | 1.2806 | -0.2637 | -0.04562 | 0.01267 | 0.424 | 5.01 | 2.1×10^{-5} | 0.89 | 1.91** |

* Significant at $\alpha=0.05$ ** Significant at $\alpha=0.01$.

表 3 模型考核数据

Table 3 Model-test data from experiments*

| pH | T | Q_1 | Q_1/\bar{X} | Q_2 | Q_2/\bar{S} | Q | $Q/(1.8\bar{X}+0.3\bar{S})$ |
|-----|----|-------|---------------|-------|---------------|------|-----------------------------|
| 4.6 | 29 | 0.70 | 0.13 | 2.03 | 0.096 | 1.45 | 0.097 |
| 4.9 | 29 | 1.11 | 0.18 | 3.14 | 0.12 | 2.50 | 0.14 |
| 4.8 | 31 | 1.15 | 0.20 | 4.59 | 0.18 | 2.93 | 0.17 |
| 4.4 | 27 | 1.13 | 0.19 | 5.05 | 0.20 | 3.13 | 0.18 |

* $Q_1 = \sqrt{\sum (X_i - \bar{X}_i)^2 / N}$; $Q_2 = \sqrt{\sum (S_i - \bar{S}_i)^2 / N}$; $Q = \sqrt{[1.7 \sum (X_i - \bar{X}_i)^2 + 0.3 \sum (S_i - \bar{S}_i)^2] / N}$

表 3 表明,总相对偏差在 0.1—0.2 范围内。对于这样复杂的系统,参数众多,经过两次模型计算;此外,用味精废液和薯干糖化液作为培养液,其成分变动大,测量误差和误差传递等因素是偏差偏大的原因。从进一步优化的精度分析认为,此偏差在可接受范围内。

2.3 动态过程优化控制

最优化问题表述为:在规定时间内(取 $t_f=12\text{h}$),温度约束范围为 $25^\circ\text{C}\leq T\leq 33^\circ\text{C}$, pH 约束为 $4.4\leq\text{pH}\leq 5.0$ 条件下,确定控制参数的 $T(t)$ 和 $\text{pH}(t)$ 分布,使锌酵母浓度为最大。这是一个控制参数有约束的动态优化问题。采用梯度法⁽⁹⁾求解该优化控制问题。泛函性能指标和哈密顿函数分别为:

$$J = \text{Max} \int_{t_0}^t \mu V X dt \quad (T(t), \text{pH}(t))$$

$$H = \mu V X + \lambda_1 \mu V X + \lambda_2 (F \cdot S_f - \frac{1}{Y_G} \mu V X - m V X) + \lambda_3 (\alpha \mu + \beta) \mu X$$

共轭方程组为:

$$\lambda = - \frac{\partial H}{\partial X}$$

$$= - \begin{pmatrix} \frac{\partial H}{\partial X} \\ \frac{\partial H}{\partial S} \\ \frac{\partial H}{\partial I} \end{pmatrix}$$

控制参数

$$U(t) = \begin{pmatrix} T(t) \\ \text{pH}(t) \end{pmatrix}$$

梯度为:

$$\frac{\partial H}{\partial U} = \begin{cases} \frac{\partial H}{\partial T} = \frac{\partial H}{\partial \mu_m} \cdot \frac{\partial \mu_m}{\partial T} + \frac{\partial H}{\partial K_s} \cdot \frac{\partial K_s}{\partial T} + \frac{\partial H}{\partial K_M} \cdot \frac{\partial K_M}{\partial T} + \frac{\partial H}{\partial Y_G} \cdot \frac{\partial Y_G}{\partial T} \\ \quad + \frac{\partial H}{\partial m} \cdot \frac{\partial m}{\partial T} + \frac{\partial H}{\partial \alpha} \cdot \frac{\partial \alpha}{\partial T} + \frac{\partial H}{\partial \beta} \cdot \frac{\partial \beta}{\partial T} \\ \frac{\partial H}{\partial \text{pH}} = \frac{\partial H}{\partial \mu_m} \cdot \frac{\partial \mu_m}{\partial \text{pH}} + \frac{\partial H}{\partial K_s} \cdot \frac{\partial K_s}{\partial \text{pH}} + \frac{\partial H}{\partial K_M} \cdot \frac{\partial K_M}{\partial \text{pH}} + \frac{\partial H}{\partial Y_G} \cdot \frac{\partial Y_G}{\partial \text{pH}} \\ \quad + \frac{\partial H}{\partial m} \cdot \frac{\partial m}{\partial \text{pH}} + \frac{\partial H}{\partial \alpha} \cdot \frac{\partial \alpha}{\partial \text{pH}} + \frac{\partial H}{\partial \beta} \cdot \frac{\partial \beta}{\partial \text{pH}} \end{cases}$$

控制参数初值选取:对控制参数首先进行静态优化,得到静态最佳温度和 pH 值,以此作为动态优化初值。作者应用回归正交设计法进行了静态优化⁽¹⁰⁾,确定初值为 $T(0)=29^\circ\text{C}$, $\text{pH}(0)=4.7$ 。

求解过程如下:

(1) 给定初始控制参数分布 $U^0(t)$ 。设定为恒定值,即 $T^0(t)=29^\circ\text{C}$, $\text{pH}^0(t)=4.7$ 。

(2) 将 $U^k(t)$ 值代入状态方程,从 t_0 到 t_f 正向积分状态方程求出 $X^{(k)}(t)$ 。

(3) 计算 $J(U^k)$ 。

(4) 将 U^k 和 X^k 代入共轭方程组,由 t_f 到 t_0 反向积分状态方程组求出 $\lambda^k(t)$, $\lambda(t_f)=0$ 。

(5) 计算 $J(U)$ 在 U^k 处的梯度 $\Delta J(U^k) = \left(\frac{\partial H}{\partial U} \right)_k$ 。

(6) 如果 $\left(\frac{\partial H}{\partial U} \right)_k = 0$, 计算结束, $U^* = U^k$, $X^* = X^k$ 。否则转向 7。

(7) 由一维搜索求 $\alpha_k > 0$, 使成立

$$J \left(U^k + \alpha_k \left(\frac{\partial H}{\partial U} \right)_k \right) = \min J \left(U^k + \alpha_k \left(\frac{\partial H}{\partial U} \right)_k \right)$$

(8) 置 $U^{k+1} = U^k + \alpha_k \left(\frac{\partial H}{\partial U} \right)_k$, 转向 [2]。

由此求解最优控制轨线及在最优控制轨线下的状态函数轨线为图 2、图 3。

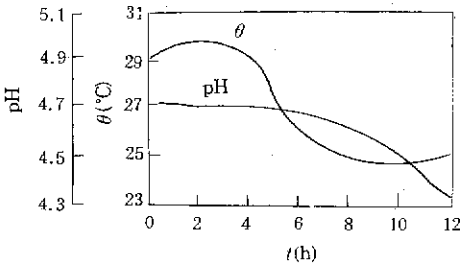


图 2 最优控制轨线

Fig. 2 Optimal control profiles $T^*(t)$ and $pH^*(t)$

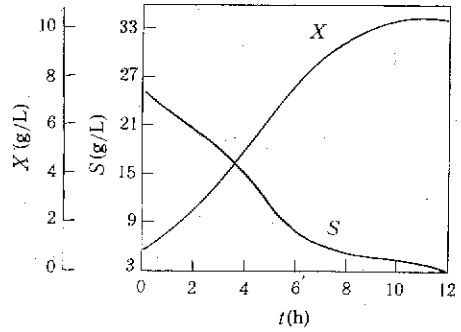


图 3 最优控制轨线下的状态轨线

Fig. 3 State model profiles at $T^*(t)$ and $pH^*(t)$

2.4 实验验证

比较图 1 和图 3 可以看到,最终锌酵母浓度在恒定控制 ($T=29^{\circ}\text{C}$, $pH=4.6$) 下为 9.90g/L ,由优化计算,动态优化控制 ($T=T^*(t)$, $pH=pH^*(t)$),提高至 11.4037g/L 。为验证优化计算结果,进行了三批平行发酵实验,温度和 pH 控制为:以 $T^*(t)$ 和 $pH^*(t)$ 为基础,将最佳轨线按半小时为时间间隔变动 T 和 pH ,24 个时间区段的 T 和 pH 控制程序如表 4。最终锌酵母浓度平均为 11.2596g/L ,提高了 13.7%;残糖由恒定控制的 5.8g/L 下降至 3.1g/L 。

表 4 实际的 T 和 pH 控制条件
Table 4 Practical control of T and pH

| Time division | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| T | 29.2 | 29.4 | 29.6 | 29.8 | 29.8 | 29.8 | 29.6 | 29.3 | 28.7 | 27.9 | 26.9 | 26.2 |
| pH | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 |
| Time division | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| T | 25.7 | 25.4 | 25.3 | 25.2 | 25.1 | 25.1 | 25.0 | 25.0 | 25.1 | 25.1 | 25.3 | 25.3 |
| pH | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.5 | 4.5 | 4.4 | 4.4 | 4.4 | 4.3 | 4.3 |

2.5 酵母含锌量

经测定酵母中含锌量为 $3.5 \times 10^{-3} - 4.5 \times 10^{-3}$,实行动态优化控制对细胞对锌的吸收率基本无影响。

符 号 说 明

| | | | |
|-------|-----------------|-------|-----------------------------|
| F | 基质流加速度 (L/h) | S | 基质浓度 (g/L) |
| H | 哈密顿函数 | S_F | 基质流和浓度 (g/L) |
| I | 抑制物浓度 (g/L) | t_0 | 起始时间 (h) |
| J | 目标函数 | t_f | 最终时间 (h) |
| K_M | 抑制常数 | T | 发酵温度 ($^{\circ}\text{C}$) |
| K_S | 基质葡萄糖饱和常数 (g/L) | U | 控制向量 $[T, pH]^T$ |
| m | 维持常数 (g/L) | V | 发酵体积 (L) |

| | | | |
|----------|----------------|--------------------------|-------------------|
| X | 菌体浓度 (g/L, 干重) | μ | 比生长速率 (g/g · h) |
| Y_G | 菌体生长得率系数 (g/g) | μ_m | 最大比生长速率 (g/g · h) |
| α | 衡算常数 | λ | 协状态变量 |
| β | 衡算常数 | $T^*(t), \text{pH}^*(t)$ | 最优温度和 pH 分布 |

参 考 文 献

- [1] Cheruy A, Durand A. *Biatech Bioeng Symp*, 1979, 9: 303.
- [2] 林稚兰, 李爱芬, 邓昌亮等. *微生物学通报*, 1992, 19(4): 207.
- [3] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. *生化实验方法和技术*, 北京: 高等教育出版社, 1986, pp. 6—9.
- [4] 林稚兰, 李爱芬, 肖显华等. *烟台大学学报*, 1992, 1—2: 101.
- [5] 张 进, 杜仰光, 邵惠鹤等. *全国首届生化过程模型化与控制学术讨论会文集*, 上海: 华东化工学院出版社, 1989, p. 83.
- [6] 中国科学院优选法组. *优选法*, 北京: 科学出版社, 1978, pp. 61—64.
- [7] 周复恭. *应用线性回归分析*, 北京: 中国人民大学出版社, 1989, pp. 88—97.
- [8] 张启锐. *应用回归分析*, 北京: 地质出版社, 1988, p. 272.
- [9] 薛履中. *工程最优化技术*, 天津: 天津大学出版社, 1988, pp. 128—132.
- [10] 陈 敏, 王静馨, 纪东升等. *食品与发酵工业*, 1993, 9(2): 168.

Dynamical State Operation Optimization of the Zinc Yeast Fed-batch Fermentation Process

Chen Min Liu Wanhui Wang Jingxin

(Yantai University, Yantai 264005)

Abstract Dynamical state optimization of controlling variables temperature and pH for zinc yeast fed-batch fermentation process was studied. Based on the kinetic model of a fed-batch baker's yeast fermentation with vestraint, the model paremeters were estimated with Runge-Kutta and Simplex method. The fermentation processes were carried out at different temperature and pH, the obtained model paremeters were corelated with temperature and pH by regression. Based on the kinetic and the regression models, the optimal temperature and pH profiles $T^*(t)$ and $\text{pH}^*(t)$ were determined using Pantryagin's maximum principle and the constrained gradient method. The productivity of zinc yeast at $T^*(t)$ and $\text{pH}^*(t)$ up increased by 13.7% compared with that at the constant $T^*(29^\circ\text{C})$ and $\text{pH}^*(4.6)$.

Key words Batch fermentation, dynamical state, optimization, zinc yeast