

酒精发酵非结构动力学模型及其参数估计

吕欣^{1,2}, 董明盛¹, 张晓娟³, 史仲平², 毛忠贵²

(1 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095;

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036;

3 总后勤部军需装备研究所, 北京 100010)

[摘要] 对1株产高浓度酒精的酿酒酵母的间歇发酵动力学进行了研究。建立了非结构发酵动力学模型, 以描述高基质(葡萄糖)和高产物(酒精)浓度条件下的酒精间歇发酵过程, 采用改进遗传算法对非结构发酵动力学模型中的参数进行了求取, 并将该模型用于预测24.7%初糖浓度下的酒精间歇发酵, 预测结果显示该模型可应用于高基质(葡萄糖)和高产物(酒精)浓度条件下的酒精发酵过程。

[关键词] 高浓度酒精发酵; 动力学模型; 酿酒酵母; 参数估计

[中图分类号] TQ920.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)11-0078-05

始于20世纪70年代的“能源危机”, 人们开始认识到廉价石油是会用完的。因此, 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]。在发酵法生产酒精的过程中, 提高酒精含量一直是人们追求的目标, 这一方面是由于高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浓度, 可明显降低废水的排放, 并为最终实现酒精的清洁化生产提供前提条件。目前, 以淀粉质原料为发酵底物, 美国的酒精工厂生产的最终酒精浓度可以达到12%, 而我国大部分酒精厂在8%~10%^[2]。作者筛选到1株能够在高基质(葡萄糖)浓度下发酵产生高浓度酒精的酿酒酵母, 在基质(葡萄糖)浓度为30%条件下, 发酵产生的最终酒精浓度达16%以上, 具有以淀粉质为原料进行高浓度酒精发酵生产的潜力。

目前, 国内外学者对高浓度酒精发酵进行了一定的研究^[3~7], 但有关高初始基质(葡萄糖)浓度和高产物(酒精)浓度条件下相关动力学研究鲜有报道。本试验通过研究该高产菌株的间歇发酵特性, 建立了高基质(葡萄糖)浓度和高产物(酒精)浓度条件下的非结构动力学数学模型, 并采用遗传算法求取了非结构动力学模型中的参数, 以期为高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生物加工实验室保藏。

1.1.2 培养基 种子培养基: 葡萄糖 10 g/L, 酵母膏 8.5 g/L, NH_4Cl 1.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCl_2 0.06 g/L, 0.08 MPa 条件下灭菌 30 min。

发酵培养基: 葡萄糖 300 g/L (250 g/L), 酵母膏 5 g/L, NH_4Cl 1.5 g/L, MgSO_4 0.65 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, KCl 1.2 g/L, 0.08 MPa 条件下灭菌 30 min。

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养 将一环生长良好的斜面酵母 S-2002 接种到 250 mL 种子培养基中, 28 °C, 100 r/min 摇床培养 24 h。

1.2.2 间歇发酵 以 10% 接种量将种子培养液接入发酵培养基中, 在 10 L 发酵罐中, 30 °C 保温发酵。

1.3 分析方法

1.3.1 酒精浓度 准确量取 100 mL 发酵液加入到 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

[收稿日期] 2005-03-14

[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); 南京农业大学青年科技创新基金项目(KJ05017)

[作者简介] 吕欣(1975-), 男, 上海市人, 讲师, 博士, 主要从事发酵过程控制与优化研究。E-mail: xinlu-syu@163.com

温 20℃)测酒精度(下缘为准),同时测定温度,然后换算成 20℃时的酒精度(酒精相对密度以 0.789 计算)^[8]。

- 1.3.2 菌体浓度 用干重法测定^[9]。
- 1.3.3 葡萄糖(残糖)浓度 用 DNS 法测定^[10]。

2 结果与讨论

2.1 高基质(葡萄糖)浓度下的酒精间歇发酵过程

接种初期,由于高基质(葡萄糖)浓度的抑制作用,酵母生长缓慢,延迟期较长,约为 12 h,当延迟

期过后,酵母生长进入对数生长期,生长速度逐渐加快,此阶段由于酒精的不断生成,使酵母同时处于基质和产物双重抑制作用下。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为主。在发酵后期,由于生成高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,菌体浓度呈逐渐下降趋势。从平均比生长速率可以看出,当发酵进入 72 h 后,菌体比生长速率达到负值,说明此时由于酒精(此时酒精浓度达 123.8 g/L)对菌体的抑制而使菌体的死亡速率非常高,生长则很少(表 1)。

表 1 高基质(葡萄糖)浓度下酒精间歇发酵过程中的菌体浓度、葡萄糖浓度和酒精浓度

Table 1 Concentration of biomass,glucose and ethanol				
发酵时间/h Time	菌体浓度/(g·L ⁻¹) Biomass concentration	平均比生长速率/(h ⁻¹) Average specific growthrate	葡萄糖浓度/(g·L ⁻¹) Residue glucose concentration	酒精浓度/(g·L ⁻¹) Ethanol concentration
0	0.99	0	308.8	0
6	1.16	0.025 1	306.6	0.8
12	1.44	0.036 0	299.7	8.6
18	1.9	0.045 9	251.2	22.8
24	2.56	0.048 8	174.1	47.3
30	3.42	0.046 2	158.8	65.4
36	4.36	0.040 6	126.5	76.5
42	5.39	0.035 0	100.4	84.4
48	5.96	0.016 9	85.2	97.0
54	6.32	0.009 7	69.2	104.1
60	6.74	0.010 7	52.3	113.6
72	6.55	-0.002 4	26.6	123.8
84	6.15	-0.005 2	9.1	131.7
96	5.69	-0.006 4	4.4	138.8
108	5.25	-0.006 7	2.8	134.9

从表 1 可以看出,在发酵的前 12 h,由于高浓度基质的影响,微生物处在生长延迟期,耗糖缓慢;从 12 h 后,随着微生物生长速率的增加,耗糖速率迅速上升,降糖速率也加大;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,酒精浓度不再上升,而有下降趋势。

2.2 非结构动力学模型的建立

根据 Aiba 和 Moser 提出的动力学模型^[11~14],考虑到高基质和高产物的抑制效应,本文以非结构动力学模型对发酵过程进行模拟和预测。本研究采用 Runge-Kutta 法求解微分方程,以目标函数(J)为评价指标。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X, X(0) = X_0,$$
$$\frac{dS}{dt} = -(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\nu}{Y_{P/S}})X, S(0) = S_0,$$

$$\frac{dP}{dt} = \nu X, P(0) = P_0,$$
$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{(K_S + S + \frac{S^2}{K_{SI}})} \frac{K_P}{(K_P + P + \frac{P^2}{K_{PI}})},$$
$$\nu = \frac{\nu_0S}{(K'_S + S + \frac{S^2}{K'_{SI}})} \frac{K'_P}{(K'_P + P + \frac{P^2}{K'_{PI}})}.$$

目标函数:

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

式中,X,X_m,S,S_m,P,P_m 分别表示菌体浓度、葡萄糖浓度和酒精浓度的实测值和计算值,共有 Y_{X/S},Y_{P/S},μ_{max},K_P,K_S,K_{SI},K_{PI},ν₀,K'_P,K'_S,K'_{SI},K'_{PI} 12 个动力学参数,其中 Y_{X/S}为对基质菌体得率,Y_{P/S}为对基质产物得率,μ_{max}为最大比生长速率,K_P为乙醇对菌体生长饱和常数,K_S为葡萄糖对菌体生长饱和常数,K_{SI}为葡萄糖对菌体生长抑制常数,K_{PI}为乙

醇对菌体生长抑制常数, ν_0 为最大比产物生成速率, K_P 为乙醇对产物生成饱和常数, K_S 为葡萄糖对产物生成饱和常数, K_{SI} 为葡萄糖对产物生成抑制常数, K_{PI} 为乙醇对产物生成抑制常数。

2.3 改进遗传算法求取非结构动力学模型参数

动力学模型的建立离不开对模型参数的估计^[15]。对于发酵动力学模型参数的求取有 Simplex 法、Powell 法、Fuzzy 法和遗传算法等^[16~18], 其中遗传算法 (Genetic Algorithm, 简称 GA) 是一类借鉴生物自然选择和自然遗传机制的随机化搜索方法, 由美国 Michigan 大学的 Holland 教授于 1975 年首先提出。它是一种新的全局优化算法, 其收敛性与初值的设定无关。这样既克服了传统算法容易陷于局部最优的问题, 又避免了传统算法的收敛及收敛精度在很大程度上依赖于参数初值的缺点^[17,19~21]。

2.3.1 参数编码 标准遗传算法一般采用二进制编码, 解的集合称为“种群”, 解中的变量称为“基因”。但二进制编码在求解优化问题时首先必须将连续的空间离散化, 将实数码转化为二进制码, 这样增加了计算量, 引入了量化误差, 使精度受到了限制。要提高精度必须以采用较长编码、加大计算量为代价。而实数编码是问题的自然描述, 取消了编码、解码的过程, 提高了算法的速度和精度, 优点非常明显。而且, 对本研究而言, 由于各参数的取值范围不同, 有的差几个数量级, 如果采用二进制编码, 码串长度会很大, 计算量十分巨大, 且计算精度差。因而, 本研究对标准遗传算法^[19,20]进行了改进, 在参数编码策略上采用了实数编码。

2.3.2 初始种群的生成 根据 12 个动力学参数的取值范围, 随机生成 N 个初始可能解向量 $x_1, x_2, \dots, x_N$, 作为初始种群, 其中每个可能解均为 12×1 向量。

$X = [x_1, x_2, \dots, x_N]$, 为初始种群矩阵 ($12 \times N$)。

2.3.3 适应度计算 在 Simplex 法求取动力学方程参数中, 其目标函数为:

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

一般而言, 遗传算法的适应度函数通常要求是非负的, 且适应值越大表明个体的性能越好。对本研究来说是求最小值, 所以这时需要将目标函数进行适当变换, 以转化成标准适应度函数方式, 即求最大值。采用如下方法计算:

$$fitness(i) = \frac{1}{1 + J(i)}。$$

式中, $fitness(i)$ 表示第 i 个解向量所对应的适应度函数值 ($i=1, 2, \dots, N$)。这样, 最小化问题就变为求最大值问题。

2.3.4 遗传操作 选择操作: 根据“适者生存”原则, 适应值越大的个体被选择的机会就越多。选择的方法有赌轮法、最佳个体保存法、期望值法、排序选择法和联赛选择法等^[19,20]。本研究结合最佳个体保存法和排序选择法, 提出了选择操作方式: 在每一次适应度计算之后, 对适应度函数值进行排序, 保留最佳个体 (不参与交叉和变异), 然后以最佳个体替代最差个体。

交叉操作: 交叉操作分为两步, 首先随机从种群中取出两个个体, 然后进行交叉操作, 从而产生由新的基因串组成的两个新个体。采用整体算术交叉, 操作过程如下:

假设 $x_1(v_1, v_2, \dots, v_{12})$ 和 $x_2(w_1, w_2, \dots, w_{12})$ 是两个父解向量, 而 $O_1(y_1, y_2, \dots, y_{12})$ 和 $O_2(z_1, z_2, \dots, z_{12})$ 为通过交叉而产生的两个后代, 首先生成 $(0, 1)$ 区间内 12 个随机数 $(a_1, a_2, \dots, a_{12})$, 则后代向量 O_1 和 O_2 中每个基因的交叉规则为

$$y_i = v_i \cdot a_i + (1 - a_i) \cdot w_i,$$

$$z_i = v_i \cdot (1 - a_i) + a_i \cdot w_i。$$

变异操作: 采用自适应变异进行变异操作。设 $x_i(v_1, v_2, \dots, v_{12})$ 为一个父解向量, f_i 是它的适应度值, $f_{\max}$ 是最大适应度值, 其变异温度为 $T = 1 - \frac{f_i}{f_{\max}}$ 。如果 v_i 被选择来进行变异, 其定义区间为 $[a_k, b_k]$, 则变异后的解为

$$v_i = \begin{cases} v_i + (b_k - v_i)(1 - \gamma^{\lambda}), & \gamma < 0.5 \\ v_i - (v_i - a_k)(1 - \gamma^{\lambda}), & \gamma > 0.5 \end{cases}$$

式中, γ 为 $(0, 1)$ 间的随机数, λ 为变异参数, 一般取 2~5。

经过上述遗传操作, 获得了新的种群, 然后对新的种群再次进行适应度计算、遗传操作, 如此周而复始, 直至满足终止规则。

2.3.5 终止规则 一般而言, 终止规则的设计有两种, 一种是个体的偏差小于给定的精度 ϵ , 则停止运算; 另一种是设定遗传代数。本文选择设定遗传代数作为终止规则, 遗传 25 代。

采用 MATLAB 编写程序, 种群数 $N=800$, 交叉概率 $P_c=0.95$, 变异概率 $P_m=0.01$, 变异参数 $\lambda=4$, 计算得到如下优化的发酵非结构动力学模型参数值。

$Y_{X/S}=0.160\ 4,Y_{P/S}=0.498\ 6,$
 $\mu_{\max}=0.113\ 2,K_P=28.779,$
 $K_S=101.276,K_{SI}=106\ 500,$
 $K_{PI}=5\ 968,\nu_0=0.998\ 2,$
 $K'_P=660.54,K'_S=9.196,$
 $K'_{SI}=296\ 540,K'_{PI}=16.658.$

如图 1 所示,种群平均适应度值在 17 代已趋向常数,算法收敛很快.从图 2a 可以看出,遗传算法所得参数的非结构动力学模型可以很好地描述高基质(葡萄糖)浓度条件下的酒精发酵过程.为了进一步考察所得模型的可靠性,将模型用于预测 24.7% 初糖浓度下的酒精间歇发酵过程,结果如图 2b 所示,模型预测结果较好,说明该模型可以较好地描述和预测高基质(葡萄糖)浓度条件下的酒精发酵过程.

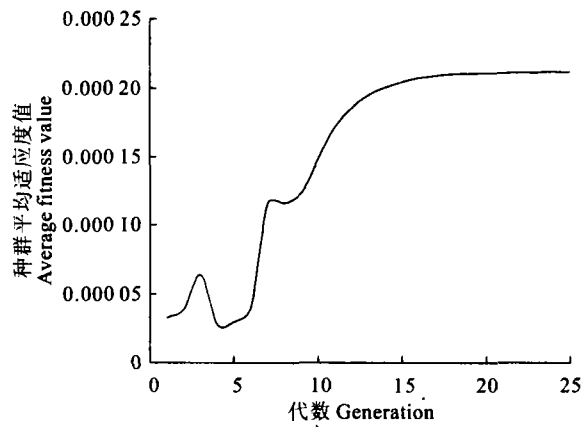


图 1 遗传算法寻优跟踪图
Fig.1 Trace figure of GA optimization

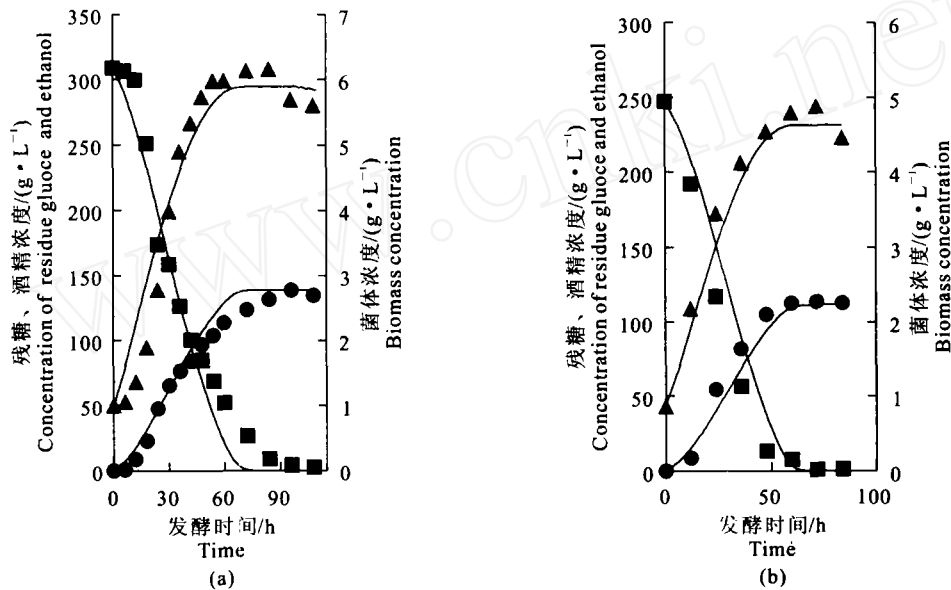


图 2 非结构动力学模型拟合发酵过程曲线
a. 30.8% 初糖; b. 24.7% 初糖; ■. 残糖浓度; ▲. 菌体浓度; ●. 酒精浓度
Fig.2 Result of unstructured model (time courses of ethanol fermentation)
a. 30.8% initial glucose concentration; b. 24.7% initial glucose concentration; ■. Residue glucose concentration;
▲. Biomass concentration; ●. Ethanol concentration

[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] 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.
[4] 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.
[5] 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.

- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1988.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 戚以政,汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [12] Aiba S, Shoda M, Nagatani M. 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]. 第 2 版. 日本东京: 产业图书株式会社, 1998.
- [14] Michael L S, Fikret K. Bioprocess Engineering[M]. 2th ed. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall PTR Prentice-Hall Inc, 2002.
- [15] 陈国良,王煦法,庄镇泉,等. 遗传算法及其应用[M]. 北京: 人民邮电出版社, 1996.
- [16] 陈 敏,王静馨,刘万卉. 间歇发酵过程动力学模型参数估计的 Fuzzy 方法[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 1995, (1): 30-34.
- [17] 陈宏文,方柏山,胡宗定. 遗传算法应用于分配发酵动力学模型参数估算[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2000, 21(1): 71-75.
- [18] 方柏山,林金清. 分批发酵动力学模型参数的估算[J]. 生物工程学报, 1992, 8(3): 283-287.
- [19] 邢文训,谢金星. 现代优化计算方法[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999.
- [20] Marzio Marseguerra, Enrico Zio, Luca Podo llini. Model parameters estimation and sensitivity by genetic algorithms[J]. Annals of Nuclear Energy, 2003, 30: 1437-1456.
- [21] Wang Q J. Using genetic algorithms to optimise model parameters[J]. Environmental Modelling and Software, 1997, 12(1): 27-34.

The unstructured kinetics of high ethanol concentration fermentation by a strain of *Saccharomyces cerevisiae* and evaluation of the kinetics parameters

LU Xin^{1,2}, DONG Ming-sheng¹, ZHANG Xiao-juan³, SHI Zhong-ping², MAO Zhong-gui²

(1 The college of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China;

3 The Quartermaster Equipment Institute of the GID of PLA, Beijing 100010, China)

Abstract: The batch kinetics of high concentrated ethanol fermentation by a strain of *Saccharomyces cerevisiae* was studied in this paper. The unstructured kinetics model was established to describe the process of high substrate and high product concentration fermentation. The Genetic Algorithm was used to seek best parameters value for good data simulation, the model described the fermentation process well. Then the model was used to predict the batch ethanol fermentation at 24.7% initial glucose concentration with good predicting performance. As a result, the unstructured kinetics model could be used to describe and predict high substrate and high product concentration batch ethanol fermentation process.

Key words: high ethanol concentration fermentation; kinetics model; *Saccharomyces cerevisiae*; evaluation of the kinetics parameters