

柠檬酸发酵的数学模型研究

胡 军

(北京市发酵工业研究所, 北京 100022)

吴佩琮

(无锡轻工业学院发酵工程系, 无锡 214038)

对柠檬酸发酵过程中菌体生长、基质消耗及产物生成的动力学进行了研究, 得到了描述柠檬酸发酵过程的数学模型, 并以实验统计数据为基础, 通过对模型进行分析, 推断了模型参数, 同时用实验结果对模型进行了验证, 结果表明模型计算与实测结果拟合良好, 从而显示所建立的模型基本正确地描述了柠檬酸发酵过程, 这对应用电子计算机控制发酵过程, 实现发酵过程的最佳化有着重要意义。

关键词 柠檬酸发酵; 数学模型

柠檬酸发酵在我国起步较晚, 深层发酵始于60年代末期, 但发展较快, 特别是近年来, 我国的柠檬酸发酵在某些方面已赶上国际先进水平, 比如柠檬酸对糖转化率现已达99%, 与国外相似, 发酵周期为3天, 较国外报道为短^[1,2], 但在动力学研究和自动控制方面还很落后, 因此生产波动较大。计算机控制是以发酵过程的数学模型为基础的, 有了可供实用的数学模型才能进行优化控制, 提高和稳定柠檬酸发酵水平。然而在柠檬酸发酵行业, 特别是对于我国的山芋粉粗料发酵, 至今还未见描述其过程的数学模型报道, 为此本文在这方面进行了探讨, 旨在为自动控制柠檬酸发酵创造条件。

材料与方 法

(一) 实验材料

1. 菌种: 采用黑曲霉 T 419 菌株。
2. 发酵培养基: 山芋粉20%, 液化酶0.4%(系无锡酶制剂厂生产, 酶活力为2 000 U/g酶), 自然pH。
3. 发酵设备: 无锡轻工业学院发酵工程系ISF-20型30L自动发酵罐及自动测

量和控制系统。

4. 工艺条件: 温度 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 罐压 $1.0 \times 10^5 \text{Pa}$ (表压)。

(二) 测定方法

1. 总酸测定: 采用 NaOH 滴定法^[3]。
2. 总糖测定: 采用浓硫酸水解培养基中淀粉成单糖, 用斐林法滴定^[3]。
3. 还原糖测定: 采用斐林法^[3]。
4. 菌体浓度测定: 采用碳平衡间接测定法^[4]。

结果与讨论

(一) 柠檬酸发酵菌体增殖的数学模型

有关菌体生长的数学模型国内外研究较多, 在柠檬酸发酵中借鉴了下列模型^[5]:

$$x_t = \frac{\mu'/k'}{1 + \left(\frac{\mu'/k' - x_0}{x_0}\right)e^{-\mu't}} \quad (1)$$

其中, x_0 代表接种后菌体的原始浓度;

本文于1991年12月27日收到,

x_t 代表发酵过程中 t 时刻菌体浓度； 1。

μ' 、 k' 为常数。

由方程式(1)可知:

当 $t \rightarrow \infty$ 时, $e^{-\mu' t} \rightarrow 0$, $x_{m,x} = x_m =$

μ'/k' , 故在此可取发酵终了的 x 为 $x_{m,x} =$

$\mu'/k' = 0.624$, 由式(1), 有:

我们将生产过程按比例缩小得到操作条件为 $n = 500\text{r/min}$, 通气量 13.0L/min , 用三罐实验数据进行了处理, 结果见表

表 1 柠檬酸发酵的菌体浓度(批号905*)

Table 1 Mycelium concentration of citric acid fermentation

Time(h)	0	6	10	14	18	22	26	30
Mycelium concentration (g/100ml)	0.024	0.080	0.311	0.546	0.589	0.584	0.593	0.601
Time(h)	34	38	42	46	50	54	58	61
Mycelium concentration (g/100ml)	0.6046	0.6060	0.6056	0.6133	0.6126	0.6187	0.6128	0.6244

$$\mu' = \frac{1}{t} \ln \left[\frac{x_t(x_m - x_0)}{x_0(x_m - x_t)} \right] \quad (2)$$

(1), 即可求出发酵过程中不同时刻的菌体浓度 x_t 。将此计算结果与实测数据(本实验为用碳衡算的间接计算求得) 绘图比较于图 1, 可见模型计算值(图中虚线)与实测值(图中实线)符合得较好, 说明柠檬酸菌体增殖的数学模型能够反映发酵过程中菌体生长的规律。

将发酵过程中各时间的 t , x_t 及 $\mu'/k' = 0.624$ 代入式(2), 求得平均值 $\bar{\mu}' = 0.310$ 。

将 $\bar{\mu}' = 0.310$, $x_m = 0.624$ 及 t 代入式

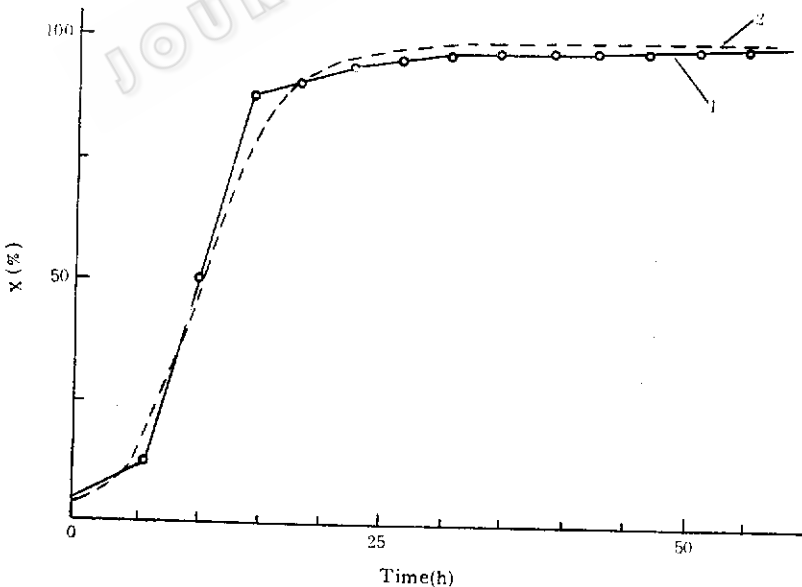
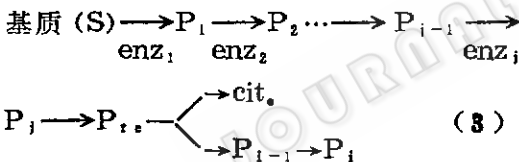


图 1 菌体增殖曲线
Fig.1 Curve of mycelium reproduce
1. Determination data
2. Model calculation data

(二) 柠檬酸发酵产物生成的数学模型

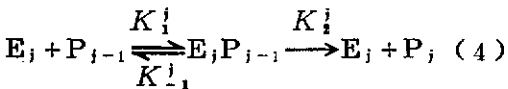
1. 柠檬酸生成数学模型的建立：对柠檬酸发酵机制的研究成果为获得其数学模型创造了条件。Chmiel^[6]研究了蔗糖无机盐基质中黑曲霉进行柠檬酸发酵的动力学，从他的研究中可知，30 h以前主要是菌体增殖阶段，基本不产酸；30 h以后主要为产酸阶段，菌体干重虽再度增加，但比生长速率很低。说明微生物生长和产物合成基本上是分开的，由此看来，按照Gaden的分类，柠檬酸发酵似乎属于Ⅱ型，有些资料上也提到了柠檬酸发酵属于Ⅱ型发酵^[7-9]，通过实验也证明了柠檬酸发酵确属Ⅱ型发酵^[10]。

在柠檬酸发酵中，产物的生成实际上是菌体内一系列酶促反应的结果，基于此，我们可以把柠檬酸发酵过程用一系列酶促反应按如下形式表达：



式中：P_{j-1}——各步酶反应的中间物质；
 P_{j+1}——cit.或P_i的前体；
 cit.——发酵过程最终产物柠檬酸；
 P_i——菌体增殖的前体物质；
 enz_{1-j}——催化各部反应的酶。

假定柠檬酸的生化合成过程符合Michalis-Menten酶反应理论的话，则在菌体内获得cit.前体P_j的酶反应就可用下述式子表示：



式中：E_j——在j阶段反应的酶；
 P_j——生成柠檬酸的前体物质；
 K₁^j, K₂^j, K₃^j——分别表示在j

阶段的各步反应的反应速度常数。

发酵过程中，j阶段应存在准稳定状态，应用恒态法：

$$\begin{aligned}
 d(\text{E}_j\text{P}_{j-1})/dt &\approx 0, \text{由式(4)可得,} \\
 d(\text{E}_j\text{P}_{j-1})/dt &= K_1^j \cdot (\text{E}_j) \cdot (\text{P}_{j-1}) \\
 &- K_{-1}^j \cdot (\text{E}_j\text{P}_{j-1}) - K_2^j \cdot (\text{E}_j\text{P}_{j-1}) \\
 &= 0,
 \end{aligned}$$

$$\text{故, } (\text{E}_j\text{P}_{j-1}) = \frac{K_1^j (\text{E}_j) (\text{P}_{j-1})}{(K_{-1}^j + K_2^j)} \quad (5)$$

设在j阶段酶总浓度为(E_j)₀，则有，
 (E_j) = (E_j)₀ - (E_jP_{j-1})，代入式(5)，得：

$$(\text{E}_j\text{P}_{j-1}) = \frac{(\text{E}_j)_0 (\text{P}_{j-1})}{\frac{K_{-1}^j + K_2^j}{K_1^j} + (\text{P}_{j-1})}$$

设 $K_j = \frac{K_{-1}^j + K_2^j}{K_1^j}$ ，则

$$(\text{E}_j\text{P}_{j-1}) = \frac{(\text{E}_j)_0 \cdot (\text{P}_{j-1})}{K_j + (\text{P}_{j-1})} \quad (6)$$

由式(4)得到P_j的生成速度：

$$\begin{aligned}
 \frac{d(\text{P}_j)}{dt} &= K_2^j \cdot (\text{E}_j\text{P}_{j-1}) = \\
 &\frac{K_2^j \cdot (\text{E}_j)_0 \cdot (\text{P}_{j-1})}{K_j + (\text{P}_{j-1})} \quad (7)
 \end{aligned}$$

P_j用途有二，一部分继续反应变成所需的终产物cit.，另一部分供菌体增殖。故有：

$$\begin{aligned}
 \frac{d(\text{cit.})}{dt} &= a_0 \frac{d(\text{P}_j)}{dt} - \\
 a_1 \frac{d(\text{P}_j)}{dt} &\quad (8)
 \end{aligned}$$

而每个菌体的增殖速度μ应与菌体内前体物质生成速度d(P_j)/dt成正比，即：

$$a_1 \frac{d(\text{P}_j)}{dt} = a\mu = \frac{a}{x} \times \frac{dx}{dt} \quad (9)$$

如式(3)所述，(P_{j-1})为单个细胞内前体的浓度，而S是产物生成阶段限制性基质在培养基中的浓度，分配到每个细

胞内,其浓度为 $[S/x]$, $[P_{j-1}]$ 作为 j 阶段的反应基质,实际上与产物生成阶段限制性基质分配到每个细胞内的浓度 $[S/x]$ 相当,令 $b_0 = K_1^2/[E_j]_0$, 一并代入式 (7), 得

$$\begin{aligned} \frac{d[P_{j-1}]}{dt} &\cong b_0 \frac{S/x}{K_j + S/x} \\ &\cong b_0 \frac{S}{K_j x + S} \end{aligned}$$

在产物生成阶段,可假设 $dx/dt \cong 0$, 则此时可取 $x = \text{const}$, 由此上式可化为:

$$\frac{d[P_j]}{dt} \cong b_0 \frac{S}{K + S}, \quad (10)$$

其中 $K = K_j x$,

将式 (9)、(10) 代入式 (8), 有

$$\begin{aligned} d[\text{cit.}] / dt &= bS / (K + S) - \\ a(dx/dt) / x \end{aligned} \quad (11)$$

其中 $b = a_0 b_0$ 。

此式是对单个菌体而言,当发酵液中菌体浓度为 x 时,产物生成速度为下列方程,亦即柠檬酸生成速度的数学模型。

$$\begin{aligned} \frac{dP}{dt} = x \frac{d[\text{cit.}]}{dt} &= b \frac{S}{K + S} x - \\ a \frac{dx}{dt} \end{aligned} \quad (12)$$

式中, P : 柠檬酸的浓度;

S : 柠檬酸生成期限制性基质的浓度 (可看成葡萄糖浓度);

x : 菌体浓度; a, a_1, b, b_0 : 均为常数

2. 柠檬酸生成速度数学模型分析:

从实验中可知,在柠檬酸生成期菌体增殖与衰亡并非完全平衡,这可从图 1 菌体增殖曲线看出,但二者几乎平衡,故可把产物积累期菌体生长速度视为零,那么柠檬酸生成速度数学模型便可简化为:

$$\frac{dP}{dt} = b \frac{S}{K + S} x$$

$$\text{亦即 } V_p = \frac{dP}{xdt} = \frac{bS}{K + S} \quad (13)$$

3. 柠檬酸生成速度模型参数的推断: 模型参数的推断,可采用实验结果的解析法或观测值本身的最小二乘法^[11]来进行。简化后的柠檬酸生成速度模型中的常数,可用 Lineweaver-burk 图解法很易推得。

将式 (13) 改写成倒数的形式, 则:

$$\frac{1}{V_p} = \frac{K}{b} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{b} \quad (14)$$

将 $1/V_p$ 值对应于 $1/S$ 绘图,即可得出一直线,此直线与纵坐标之交点是 $1/b$, 与横坐标相交于 $-1/K$, 故可求出特性常数 b 及 K_0 。

直接用线性回归程序在计算机上进行处理,将三批实验平均统计数据输入程序,得 $1/b = 2.157$, $K/b = 0.595$, 故, $b = 0.464$, $K = 0.276$ 。

4. 柠檬酸生成速度数学模型的检验: 用回归分析方法对所做实验 (905°A, 905°B, 905°C 三批) 的实验数据进行处理,结果如图 2 中实线所示。

将实验数据代入柠檬酸生成速度模型公式 (12) 中,求得柠檬酸生成速度计算值如图 2 中虚线所示。由此可见模型计算值与实测值拟合良好,计算精度较高,证明柠檬酸生成速度的数学模型可以较好地反映发酵过程中产酸规律。

(三) 柠檬酸发酵耗糖的数学模型

1. 模型推导: 在柠檬酸发酵过程中,基质(糖)主要用于①满足菌体增殖需要,构成菌体成分,用 $(\Delta S)_0$ 表示;②维持菌体生存和代谢的需要,用 $(\Delta S)_M$ 表示。

对发酵过程中基质进行物料衡算有^[12]:

$$\Delta S = (\Delta S)_G + (\Delta S)_M \quad (15)$$

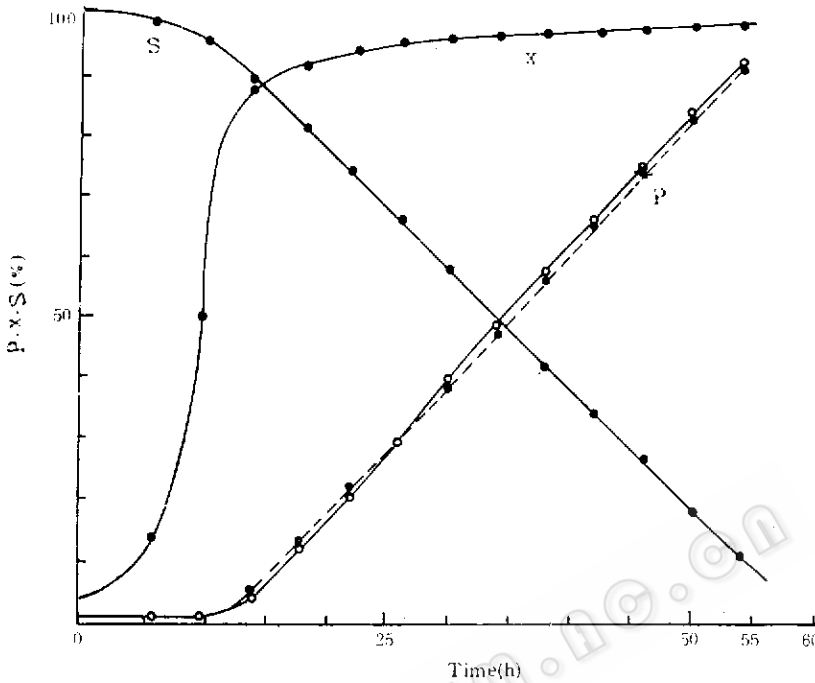


图 2 产物生成曲线
Fig.2 Curve of product formation
-○- Determination rates,
····· Model calculation rates

x = Mycelium concentration; S = Substrate concentration, P = Product concentration. The values of x, P and S are relative concentration. The initial value of S and the broth-out value of P, x are equal to 100%.

$$(-dS/dt)_G = \frac{1}{Y_G} \frac{dx}{dt} \quad (16)$$

其中 $(-dS/dt)_G$ 为 $(\Delta S)_G$ 的消耗速率, Y_G 为当糖消耗 $(\Delta S)_G$ 后, 菌体增加 Δx 的比例常数, 即 $Y_G = \Delta x / (\Delta S)_G$.

对于呼吸和发酵的消耗 $(\Delta S)_M$ 可表示为^[13]:

$$(-dS/dt)_M = \frac{1}{Y_M} \times \frac{dP}{dt} + mX \quad (17)$$

式中 $(-dS/dt)_M$ 为 $(\Delta S)_M$ 的消耗速率, m 为碳源维持常数, 即菌体呼吸耗糖的比例常数 (1/h), Y_M 为当发酵得到产品 ΔP 时相应所消耗的糖 $(\Delta S)_M$ 之间的比例常数,

$$\text{即 } Y_M = \frac{\Delta P}{(\Delta S)_M}$$

将式(15)、(16)和(17)综合并整理, 得

$$\begin{aligned} -\frac{dS}{dt} &= -\left[\left(\frac{dS}{dt} \right)_G + \left(\frac{dS}{dt} \right)_M \right] \\ &= \frac{1}{Y_G} \times \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_M} \times \frac{dP}{dt} + mX \end{aligned} \quad (18)$$

此式即为柠檬酸发酵过程中糖消耗的数学模型。

2. 模型参数的估计: 前已述及, 在柠檬酸发酵中, 比较明显地分为菌体增殖和产物生成二个阶段。在菌体生长期, 基本不产酸, 即 $dP/dt \approx 0$, 因此可以认为糖的消耗全部用于菌体增殖, 故公式(18)可简化为:

$$-dS/dt = \frac{1}{Y_G} \frac{dx}{dt} + mX \quad (19)$$

$$\text{亦即: } Q_s = \frac{1}{Y_G} \mu + m \quad (20)$$

其中 Q_s 为基质消耗的比速, μ 为菌体生长比速。

可以看出式(18)为一直线方程, 将 Q_s 对 μ 作图, 即可画出一直线, 直线在纵坐标上的截距即维持常数 m , 其斜率即为碳源对菌体生长得率 Y_G 的倒数。

将所做实验 905*A、905*B、905*C 三批的实验数据进行处理, 求出菌体繁殖阶段的 μ 及 Q_s , 作图如图 3, 求得 $1/Y_G = 1.8116$, $Y_G = 0.552$, $m = 0.0127$ 。

在柠檬酸产生期, 尤其是在发酵 18 h 之后, 菌体增殖与衰亡基本达到平衡, 可以认为只产酸不长菌 (如图 1、图 2 所示)。即糖的消耗全部转化成柠檬酸, 用

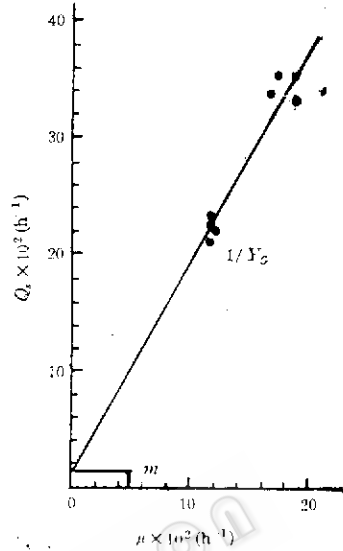


图 3 柠檬酸发酵过程中菌体生长期 μ 与 Q_s 的关系
Fig. 3 Relation between μ and Q_s in the period of mycelium growth for citric acid fermentation

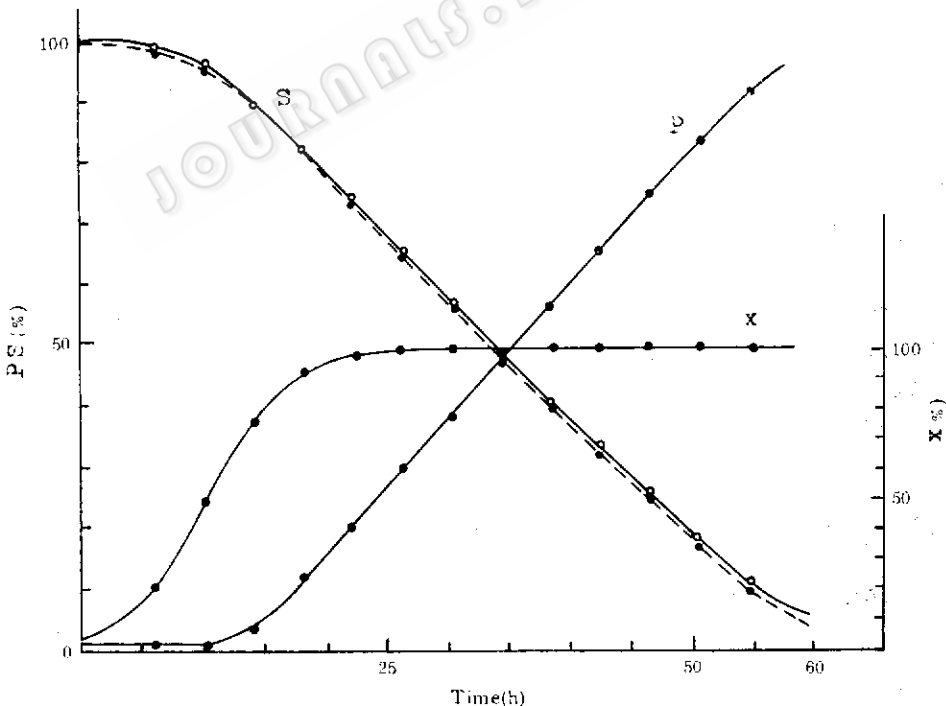
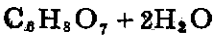
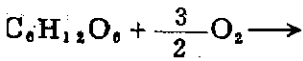


图 4 基质消耗曲线

Fig.4 Curve of substrate consumption

--- Determination rates ····· Model calculation rates
Legend of x , P , S are as Fig. 2

反应式表示如下：



理论转化率为 106.7%，则 $Y_M = 1.067$

在忽略菌体生长的情况下，式(18)可写为：

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_M} \times \frac{dP}{dt} + mX \quad (21)$$

将实验数据及 $Y_M = 1.067$ 代入上式，求得 m 的平均值， $m = 0.01272$ ，与菌体生长期求得的 m 值相符，故可取 $m = 0.0127$ ，由此有：

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{0.552} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{1.067} \frac{dP}{dt} + 0.0127x \quad (22)$$

3. 耗糖模型的验证：将实测值与由耗糖模型式(22)求得的结果绘于图 4 中，可见模型计算值（图中虚线），与实测值（图中实线）相差甚小，因此我们可以用耗糖模型式(18)来描述发酵过程中的耗糖规律。

可以说明，以上所推导的数学模型基本上能够描述柠檬酸发酵过程，因此可以用来预测发酵液中产物的浓度，判断发酵正常与否，此外还可以了解为使产物获得理想结果对有关参数的要求，以便加以控制。这些参数往往是由操作条件如罐温、罐压、溶氧以及 pH 所决定，当用计算机控制发酵过程时，便能及时反应和控制各参数的大小，实现发酵过程的最佳化。

参 考 文 献

- [1] 天津工业微生物研究所，天津微生物，4:16，1985。
- [2] 陈陶声，工业微生物，4:1—2，1981。
- [3] 金其荣等，有机酸发酵工艺学，轻工业出版社，北京，pp. 310—311，1989。
- [4] 吴佩琼、胡 军，无锡轻工业学院学报，11(3):1992。
- [5] 吴佩琼，食品与发酵工业，4:76—77，1982。
- [6] Berry D.R. and Chmiel, A., et al., Genetics and Physiology of *Aspergillus*, pp.405—406, 1977。
- [7] 天津轻工业学院等，氨基酸工艺学，轻工业出版社，北京，pp. 163—166，1983。
- [8] Max Röhr and Christian P. Kubicek, Biotechnology—a comprehensive treatise in 8 Vol., p. 448, 1983。
- [9] Schügerl, Karl, Bioreaction engineering—reactions involving microorganisms and cell, Vol. 1, pp. 30—49, 1987。
- [10] 胡 军、吴佩琼，湖北工学院学报，7(2):70—74，1992。
- [11] 费荣昌、费定晖，概率统计，山东科技出版社，济南，pp. 149—164，1985。
- [12] 贾士儒，生物反应工程原理，南开大学出版社，天津，pp. 125—126，1990。
- [13] 合叶修一、永井史郎(胡章助译)，生物化学工程——反应动力学，化学工业出版社，北京，p. 101，1984。

Mathematical Model for Citric Acid Fermentation

Hu Jun

(Beijing Institute of Fermentation Industry, Beijing 100022)

Wu Peizhong

(Department of Fermentation Engineering, Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi 214036)

The kinetics for the biomass proliferation, medium consumption and citric acid production in the course of citric acid fermentation were stu-

died, and the mathematical models describing the course of citric acid fermentation were obtained in this paper. Based on statistical experiment figures, the paper inferred the model parameters by analysing the models and verified the models with the results of experiment. The results showed that the curves obtained by model calculation accorded with the ones determined by the experiments well. It is displayed that the models created described correctly the course of the citric acid fermentation. This is of important reality mean to use computer to control the course of fermentation and realize the optimum of fermentation process.

Key words Citric acid fermentation; mathematical model

JOURNALS.IM.AC.CN