

## 固定化酵母反应动力学的研究

张治根\* 俞俊棠 苏尔馥

(华东化工学院, 上海)

本文采用微分反应器初速度法对以海藻酸钙为载体的固定化酵母的耗糖动力学进行了研究。测得了固定化酵母的表观动力学常数, 并进一步求得了固定化酵母的本征动力学常数。实验结果表明, 固定化酵母的表观动力学常数显著受内外扩散的影响, 其本征动力学常数与游离酵母的动力学常数比较, 也有较大的不同。此外, 对内扩散对反应动力学的影响进行了理论分析和实验验证。

**关键词** 固定化酵母; 动力学; 本征动力学常数; 有效因子

在固定化酶和固定化细胞反应系统中, 酶反应速度通常要受到扩散的影响, 特别是底物或产物在载体微环境内扩散的影响。许多研究者<sup>[1-6]</sup>考察了内外扩散对固定化酶反应动力学的影响, 并通过适当的处理, 获得了一些固定化酶的本征动力学常数。对于固定化细胞系统, 较少有人做过这方面的工作。随着固定化细胞在工业上的广泛应用, 为了模拟和优化固定化细胞反应系统, 便于固定化细胞反应器设计、放大和操作, 对固定化细胞反应动力学的研究有较大的实用意义。本文采用微分反应器初速度法对以海藻酸钙为载体的固定化酵母的反应动力学进行了研究。

### 理论分析和公式推导

在消除外扩散影响的情况下, 考虑分布在球形载体上的固定化细胞, 假定符合下列条件: a) 反应动力学能够用米氏(Michaelis—Menten)方程描述; b) 反应是等温的, 颗粒内压力梯度可忽略不计; c) 在载体内部和外部之间不存在屏

障效应; d) 底物在多孔结构中的扩散作用可用Fick定律表示。

$$\text{通量} = D_e \cdot \frac{dS}{dr} \quad (1)$$

式中:  $D_e$ : 载体内部的有效扩散系数  
 $r$ : 距载体中心的距离  
 $S$ : 与 $r$ 相应的底物浓度

对一半径为  $R$  的固定化细胞颗粒, 在距中心为  $r$  处取一厚度为  $dr$  的微元壳体, 在稳态时, 对反应组分进行物料衡算可得:

$$4\pi(r+dr)^2 D_e \left( \frac{dS}{dr} \right)_{r+dr} - 4\pi r^2 D_e \left( \frac{dS}{dr} \right)_r = 4\pi r^2 dr \frac{V_{m,x} \cdot S}{(K_s + S)} \quad (2)$$

式中:  $V_{m,x}$ : 单位体积载体的最大反应速度;  $K_s$ : 固定化细胞的饱和米氏常数  
式(2)两边同除以  $dr$ , 并两边取极限  $dr \rightarrow 0$  得:

本文于1987年10月26日收到。

\* 现在地址: 上海科技大学生物工程系。

$$\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dS}{dr} = \frac{V_{max} \cdot S}{D_e(K_s + S)} \quad (3)$$

其边界条件:  $r=R$  时,  $S=S_r$ ;  $r=0$

时,  $\frac{dS}{dr} = 0$

定义无因次值:  $X = \frac{r}{R}$ ,  $C = \frac{S}{S_r}$

$$K = \frac{K_s}{S_r}$$

则方程式 (3) 成为:

$$\frac{d^2C}{dX^2} + \frac{2}{X} \frac{dC}{dX} - \frac{KC}{K+C} \phi_m^2 = 0 \quad (4)$$

式中:  $\phi_m = R \sqrt{\frac{V_{max}}{K_s \cdot D_e}}$  为类似西勒

(Thiele) 模数, 反应内扩散影响的无因次数。

其边界条件成为:  $X=1$  时,  $C=1$ ;

$X=0$  时,  $\frac{dC}{dX} = 0$

根据方程式 (4) 并参考文献<sup>[7]</sup>报道可得出:

$$\left. \begin{aligned} K_s' &= f(\phi_m') \\ V_{max}' &= g(\phi_m') \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

式中:  $K_s'$ : 表观米氏常数;  $V_{max}'$ : 表观最大速度;  $\phi_m'$ : 表观西勒模数<sup>[7]</sup>, 定义为  $\phi_m' = R \sqrt{\frac{V_{max}'}{K_s' \cdot D_e}}$

式 (5) 表明表观最大速度和表观米氏常数是表观西勒模数的函数。因为  $\phi_m'$  是反应内扩散影响的无因次数, 所以当  $\phi_m' \rightarrow 0$  时, 可以认为不存在内扩散阻力, 此时的动力学常数可以认为是本征动力学常数。即:

$$\left. \begin{aligned} K_s &= \lim_{\phi_m' \rightarrow 0} K_s' = \lim_{\phi_m' \rightarrow 0} f(\phi_m') \\ V_{max} &= \lim_{\phi_m' \rightarrow 0} V_{max}' = \lim_{\phi_m' \rightarrow 0} g(\phi_m') \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

## 实 验

### (一) 固定化酵母的制备和增殖

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (由上海酵母厂提供) 经摇瓶培养 24h (28℃, 摇床转速 200r/min, 培养基 (%): 葡萄糖 3.50, 酵母浸出液 0.75, 蛋白胨 0.60,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.13,  $\text{MgSO}_4$  0.01,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15,  $\text{KCl}$  0.10)。所得培养液经离心收集酵母, 然后用无菌水洗 3 次, 制得  $3.50 \times 10^9$  个/ml 左右的酵母悬浮液。吸取 1 ml 此液, 与 9 ml 浓度为 3% (W/V) 的海藻酸钠溶液混合均匀, 再用注射器喷入 0.20mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液中。并通过调节注射器针头的大小, 制得粒径大小不同的固定化酵母颗粒。隔夜水洗后, 于 28℃ 下在培养基中增殖 48h, 使固定化酵母的活力达到恒定, 此时固定化酵母中的酵母数为  $3.00 \times 10^9$  个/ml 凝胶。

### (二) 葡萄糖含量的测定

采用 3, 5 - 二硝基水杨酸法测定<sup>[8]</sup>。

### (三) 微分反应系统

系统如图 1 所示。将 10ml 固定化酵母装入玻璃柱反应器中 (直径 3cm, 高为 6cm)。在反应前使恒温槽 1 中水温维持在 28℃。同时启动致冷器 7 和恒温槽 6, 使恒温槽 6 中的水温维持在较低的水平 ( $< 5^\circ\text{C}$ )。然后在贮槽 4 中加入 400ml 一定浓度的葡萄糖发酵液, 启动输液泵 3 进行反应 (发酵液的流量由输液泵的调速装置控制), 每 10min 取样一次, 分析发酵液中的葡萄糖浓度。共取样 3 次, 30min 后停止反应。反应速度以反应初始线性区间内每毫升固定化细胞每小时消耗的葡萄糖的克数来表示。

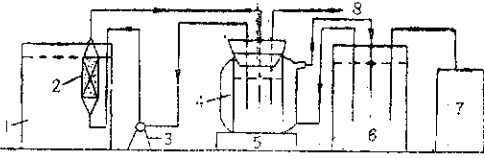


图 1 微分反应器示意图

Fig.1 Experimental apparatus of differential reactor system

1. 超级恒温槽 Super constant temperature tank 2.玻璃柱反应器 Glass column reactor 3.可  
调输液泵 Adjustable pump 4. 贮槽 Reservoir 5.  
磁力搅拌器 Magnetic stirrer 6. 超级恒温槽 Super  
constant temperature tank 7. 致冷器 Refrigerator  
8. 取样口 Sampling pot

## 结果与讨论

### (一) 外扩散的影响

通过调节输液泵,改变反应物的流速,考察了外扩散对反应速度的影响。以粒径为3mm的固定化酵母,初始糖浓度为30g/L的反应液实验,结果如图2所示。由图可见,随着反应液流速的增加,反应速度逐渐增加。当流速大于1cm/s时,流速对反应速度已基本上没有什么影响,此时可以认为外扩散阻力已经消除。以下实验采用的流速为1.20cm/s。

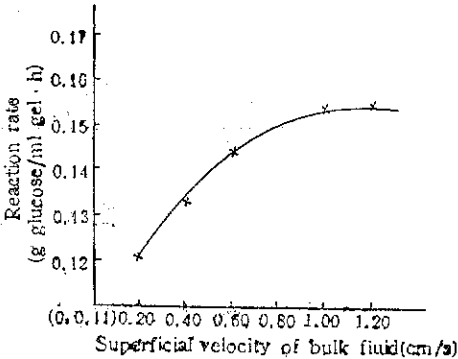


图 2 流速对固定化酵母反应速度的影响

Fig.2 Effect of superficial velocity of bulk fluid in the immobilized cell reactor on the reaction rate of immobilized yeast cell

### (二) 内扩散的影响——不同粒径的固定化酵母对表观米氏常数和最大反应速度的影响

以不同粒径的固定化酵母(1.2、2.1、3.0、4.2mm)进行实验,并分别进行双倒数图解(图3)。从图3可以求得不同粒径的固定化酵母的表观动力学常数(表1)。此外,图3的各条双倒数图解曲线没有发生明显的弯曲现象,这主要是由于葡萄糖浓度较低的缘故,此时双倒数图解基本上成直线关系<sup>[7,8]</sup>。

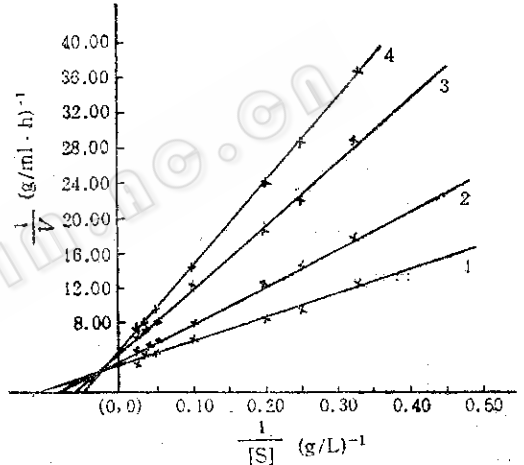


图 3 不同粒径下的Lineweaver-Burk图

Fig.3 Lineweaver-Burk plots at different particle diameters of immobilized yeast gel

- 固定化酵母粒径 Particle diameters of immobilized yeast gel  
1.  $d_1 = 1.2\text{mm}$  2.  $d_2 = 2.1\text{mm}$  3.  $d_3 = 3.0\text{mm}$   
4.  $d_4 = 4.2\text{mm}$

### (三) 本征动力学常数的确定

表 1 不同粒径的固定化酵母的表观动力学常数

Table 1 The apparent kinetic parameters of immobilized yeast cells at different particle diameters of gel

粒 径 Particle diameter(mm)	1.2	2.1	3.0	4.2
$\phi_m'$	10.91	15.60	18.11	20.14
$K_s'$ (g/L)	9.24	10.91	13.34	20.14
$V_{max}$ (g/L·h)	330	260	210	200

表观西勒模数  $\phi'_m = \sqrt{\frac{V'_{m,x}}{K'_s \cdot D_c}}$ , 式中

$D_c$  和固定化细胞载体的性质有关, 因此可认为不同粒径的固定化酵母的  $D_c$  值相同。根据有关文献报道<sup>[9]</sup>, 海藻酸钙固定化酵母的  $D_c$  值为  $3 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ 。以下计算取  $D_c = 3 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ 。表 1 为不同粒径的固定化酵母的表观动力学常数。以表观动力学常数  $K'_s$  和  $V'_{m,x}$  对表观西勒模数  $\phi'_m$  作图得图 4, 采用曲线回归法得:

$$\left. \begin{aligned} K'_s &= f(\phi'_m) = 0.009\phi'^2_m + 0.12\phi'_m + 7.22 \\ V'_{m,x} &= g(\phi'_m) = -14.85\phi'_m + 493 \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

采用外推法求得本征动力学常数:

$$K_s = \lim_{\phi'_m \rightarrow 0} f(\phi'_m) = 7.20 (\text{g/L})$$

$$\begin{aligned} V_{m,x} &= \lim_{\phi'_m \rightarrow 0} g(\phi'_m) = 493 (\text{g/L} \cdot \text{h}) \\ &= 0.493 \text{g/ml} \cdot \text{h} \end{aligned}$$

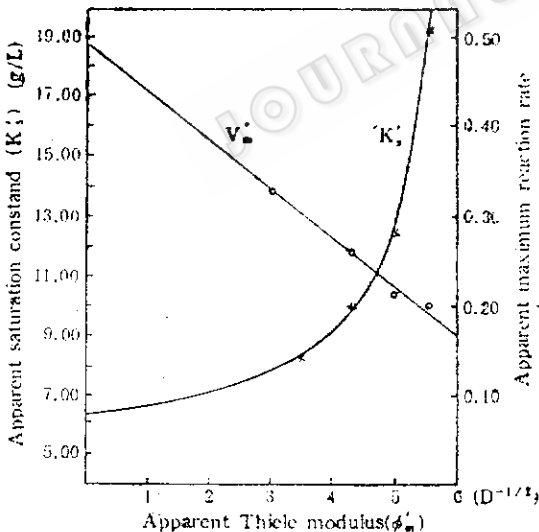


图 4 表观动力学常数 ( $K'_s$  和  $V'_{m,x}$ ) 随表观西勒模数 ( $\phi'_m$ ) 的变化

Fig.4 Changes in the apparent kinetic parameter ( $K'_s$  and  $V'_{m,x}$ ) as a function of the apparent Thiele modulus ( $\phi'_m$ )

从表 1 和图 4 可以看出, 表观饱和常

数  $K'_s$  随着固定化细胞颗粒的粒径的增加而增加, 表观最大速度则反之。而且进一步可看出, 粒径对  $K'_s$  的影响更显著, 它与  $\phi'_m$  近似成二次函数关系,  $V'_{m,x}$  则几乎与  $\phi'_m$  成线性关系。

我们得到的固定化酵母的本征饱和常数 ( $K_s = 7.20 \text{g/L}$ ) 比 Aiba<sup>[10]</sup> 等报道的游离酵母的饱和常数 ( $K_s = 0.22 \text{g/L}$ ) 高得多, 这可能是由于载体的屏障效应对酵母的生理活性的影响所致。另外微环境效应也会对其产生影响。Dewey 等<sup>[8]</sup> 也曾测定了固定化酵母 (以海藻酸钙为载体) 的本征动力学常数, 所得的结果为  $K_s = 4.24 \text{g/L}$ ;  $V_{m,x} = 480 \text{g/L} \cdot \text{h}$ 。与我们的实验结果比较可知,  $V_{m,x}$  比较相近, 而  $K_s$  则有较大的差别。

#### (四) 内扩散阻力与有效因子

考虑到制备上的困难以及其他因素, 在工业上应用的固定化酵母颗粒一般说来是较大的, 内扩散阻力对反应速度的影响很重要。下面就球形固定化酵母, 讨论内扩散阻力对反应速度的影响, 并引入有效因子 (鉴于外扩散阻力已通过加大流速消除, 故不予考虑)。

有效因子定义为有扩散影响的反应速度与无扩散影响的反应速度之比。根据定义有:

$$\eta = \frac{V_{\text{表观}}}{V_{\text{理论}}} = \frac{\text{实际反应速度}}{\text{理论上可以达到的反应速度}} \quad (8)$$

对于球形固定化细胞, 由 (8) 式可化为

$$\begin{aligned} \eta &= \frac{\text{整个球体上的总反应速度}}{V_{\text{理论}}} \\ &= \frac{\int_0^R 4\pi r^2 \cdot \frac{V_{m,x} \cdot S(r)}{K_s + S(r)} dr}{\frac{4}{3} \pi R^3 \cdot \frac{V_{m,x} \cdot S_r}{K_s + S_r}} \end{aligned}$$

$$= 3(1+K) \int_0^1 X^2 \frac{C(r)}{K+C(r)} \quad (9)$$

式中:  $S(r)$ : 与颗粒中心距  $r$  对应的底物浓度 (浓度分布函数);  $C(r) = \frac{S(r)}{K_s}$ ,

$$X = \frac{r}{R}, K = \frac{K_s}{S_i}$$

对微分方程 (4) 进行数值积分, 可求出底物浓度分布函数  $C(r)$ , 然后根据 (9) 式可求出有效因子  $\eta_0$ 。由此可见有效因子  $\eta$  是  $K$  和  $\phi_m$  的函数。

$$\text{即 } \eta = f(K, \phi_m) \quad (10)$$

为了减轻求有效因子的繁杂计算, Bischoff 等<sup>[11,12]</sup>提出总模数  $m$  的概念。其最初定义为:

$$m = \frac{Rr_1(S_i)}{\sqrt{2r_2(r)}} \cdot \frac{\int_0^R r^2 r_2(r) dr}{\int_0^R r^2 dr} \cdot \frac{1}{[\int_0^R D_e r_1(S) dS]^{0.5}} \quad (11)$$

对于我们所讨论的问题来说:

$$r_1(S_i) = \frac{V_{max} \cdot S_i}{K_s + S_i} \quad (12)$$

$$r_2(r) = 1 \quad (13)$$

$$r_1(S) = \frac{V_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (14)$$

此时 (11) 式可化为:

$$m = \frac{R \cdot V_{max}}{\sqrt{2D_e(1+K)(I)^{0.5}}} \quad (15)$$

$$\text{式中: } I = \int_0^{S_i} \frac{V_{max} \cdot S}{K_s + S} dS$$

$$= V_{max} \cdot S_i [1 - K \ln(1 + K^{-1})] \quad (16)$$

(16) 式代入 (15) 式得:

$$m = \frac{\xi}{(1+K)[1-K \ln(1+K^{-1})]^{0.5}} \quad (17)$$

式中:  $\xi = R \sqrt{V_{max}/2D_e} \cdot S_i$ , 根据文献报道<sup>[12]</sup>, 有效因子可通过

下列方法估算:

$$\eta_1 = \frac{3}{m} \left( \frac{1}{\tanh m} - \frac{1}{m} \right) \quad (18)$$

$$\eta_0 = \begin{cases} 1 & (0 < m \leq \sqrt{3}) \\ 1 - \left( \frac{1}{2} + \cos \frac{\psi + 4\pi}{3} \right)^2 & (m > \sqrt{3}) \end{cases} \quad (19)$$

$$\text{式中: } \psi = \cos^{-1} \left( \frac{6}{m^2} - 1 \right)$$

$$\text{有效因子 } \eta = \frac{\eta_0 + K\eta_1}{1+K} \quad (20)$$

采用 (17) — (19) 式对不同  $K$  和  $\phi_m$  下的固定化酵母的有效因子进行理论计算, 我们得表 2。

表 2 不同  $K$  和  $\phi_m$  下的有效因子的理论计算结果  
Table 2 The theoretical values of effectiveness factor at different  $K$  and  $\phi_m$

$K = \frac{K_s}{S_i}$	0.18	0.24	0.36	0.72	1.44	1.80	2.40
$\phi_m = R \sqrt{\frac{V_{max}}{K_s \cdot D_e}}$	有效因子 Effectiveness factor						
15.09	0.42	0.38	0.32	0.26	0.22	0.21	0.21
26.41	0.25	0.24	0.19	0.16	0.13	0.13	0.13
37.73	0.18	0.16	0.13	0.11	0.10	0.09	0.09
52.80	0.13	0.11	0.10	0.08	0.07	0.07	0.06

此外由 (8) 式可得:

$$\eta_{\text{实验}} = \frac{V_{\text{实验}}}{\frac{V_{max} \cdot S_i}{K_s + S_i}} \quad (21)$$

式中,  $V_{\text{实验}}$ : 实验测得的表现反应速度

$V_{max}$ : 本征最大速度

$K_s$ : 本征饱和常数

$S_i$ : 反应液葡萄糖浓度

这样, 可根据所得实验结果, 对表 2 的不同  $K$  和  $\phi_m$  下的有效因子进行估算, 所得结果见表 3。

比较表 2 和表 3 可知, 有效因子的实验值与理论值有较大的差别, 实验值普遍

表 3 不同 $K$ 和 $\phi_m$ 下的有效因子的实验结果  
Table 3 The experimental values of effectiveness factor at different  $K$  and  $\phi_m$

$K = \frac{K_s}{S_s}$	0.18	0.24	0.36	0.72	1.144	1.80	2.40
$\phi_m = R \sqrt{\frac{V_{max}}{K_s \cdot D_e}}$	有效因子 Effectiveness factor						
15.09	0.68	0.62	0.60	0.58	0.58	0.58	0.55
26.41	0.50	0.46	0.46	0.43	0.39	0.39	0.39
37.73	0.37	0.36	0.34	0.28	0.27	0.26	0.24
52.80	0.34	0.31	0.29	0.24	0.21	0.20	0.19

高于理论值。这是由于在以上推导过程中是以细胞在整个载体上均匀分布的假设为前提的。但对固定化酵母，实际上是接近表面的细胞浓度较高。在这种情况下，其有效因子比理论预测值要高一些。此外，从表 2 和表 3 可以看出，有效因子随 $\phi_m$ 的增加（即固定化酵母粒径增加）或 $K$ 的增加（即初糖浓度下降）而下降。

总模数 $m$ 包括了所有动力学参数和传质因素，它和有效因子存在一定的函数关系。在双对数坐标上，将有效因子的实验值和理论值对 $m$ 作图得图 5。从图 5 中可清楚地看出有效因子的实验值与理论计算值的差别。

从上面讨论所得结果可知，对于我们讨论的固定化酵母系统，其有效因子普遍较低（ $<0.7$ ），说明内扩散阻力较大。为了提高有效因子，可采取减少固定化细胞粒径或增加基质浓度的方法。所以在实际生产中，在综合考虑制作上的难易以及压力降等问题，固定化细胞应选择尽可能小的尺寸，并适当提高基质的浓度。

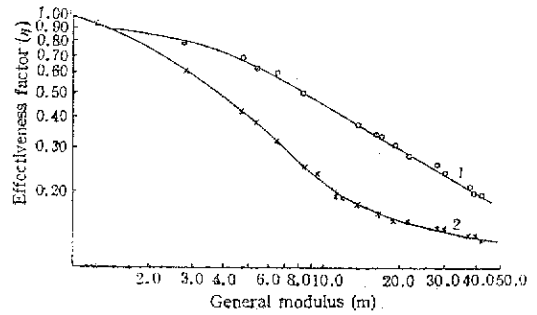


图 5 有效因子 ( $\eta$ ) 和总模数 ( $m$ ) 的相互关系  
Fig. 5 Relationship between effectiveness factors ( $\eta$ ) and general modulus ( $m$ )  
1. 实验值 Experimental values 2. 理论值 Theoretical values

## 总    结

1. 固定化酵母细胞的表观动力学常数 $K'_s$ 和 $V'_{max}$ 显著受内外扩散的影响。 $K'_s$ 的值随着固定化酵母的粒径的增加而增加，而 $V'_{max}$ 则反之。

2. 通过引入表观西勒模数 $\phi'_m = R \sqrt{\frac{V'_{max}}{K'_s \cdot D_e}}$ ，发现 $K'_s$ 和 $V'_{max}$ 与 $\phi'_m$ 成一定的函数关系。并求得了固定化酵母的本征动力学常数。

$$\begin{cases} K'_s = 7.20 \text{ g/L} \\ V'_{max} = 493 \text{ g/L} \cdot \text{h} \end{cases} \quad (\text{以葡萄糖为基质})$$

3. 通过对内扩散和反应过程的理论分析，我们从理论上计算了在不同条件下的有效因子，并和实验值作了比较。

4. 本文介绍的实验方法对其他固定化细胞系统的发酵动力学研究同样适用。

## 参    考    文    献

- [1] Kay, G. and Lilly, M. D.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 198: 276—286, 1970.
- [2] Regan, D. L. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 6: 1081—1093, 1974.
- [3] Engsser, J. M.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 526: 301, 1978.
- [4] Lee, G. K. et al.: *Chem. Eng. Sci.*, 36: 1987, 1981.
- [5] Chibata, I. et al.: *Appl. Microbiol.*, 21: 875, 1974.
- [6] Engsser, J. M. et al.: *J. Theor. Biol.*, 42: 137—155, 1973.

- [7] Hamilton, B.K. et al.: *J. AICHE.*, 20: 503, 1974.  
[8] 贾淑颖等: 水解工业, 2: 1—5, 1982.  
[9] Deway, D.Y. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 62: 255—261, 1984.  
[10] Aiba, S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 9: 413, 1967.  
[11] Bischoff, K.B.: *J. AICHE.*, 11: 351, 1965.  
[12] Kobayashi, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15: 27, 1973.

## STUDY ON ASSIMILATION KINETICS OF IMMOBILIZED YEAST

Zhang Zhigen Yu Juntang Su Erfu

(East China Institute of Chemical Technology, Shanghai)

In this paper, we have researched the glucose assimilation kinetics of the Ca-alginate immobilized yeast cell using a differential reactor system. The apparent kinetic parameters of an immobilized yeast cell system can be significantly influenced by internal and external diffusion limitations. By means of both a theoretical analysis of diffusion in the gel particles and an experimental determination of apparent kinetic parameters, the intrinsic kinetic parameters of immobilized yeast cell were estimated. The effectiveness factors for immobilized cell were calculated theoretically, and make a comparison with the effectiveness factors determined by our experiment.

### Key words

Immobilized yeast; kinetics; intrinsic parameter; effectiveness factor