

细胞循环-代谢模型在面包酵母耐贮存力控制中的应用

袁景淇

(华东理工大学自动化研究所, 上海 200237)

Bellgardt K. H.

(Institute of Chemical Engineering, Hannover University, D30167 Hannover, FRG)

摘要 基于作者早期提出的面包酵母细胞循环-代谢模型设计了3次最优控制实验,目的是使发酵终了时的带芽细胞分率 *FBC* 趋于极小值,以期提高酵母的耐贮存力。实验成功地得以实施,不仅 *FBC* 的终值接近理论上的极小值,而且样品的耐贮存力得到了明显提高。另一方面,发酵力分析结果也表明,面包酵母的质量控制将随产品种类的不同而异。如对速用型鲜酵母的生产, *FBC* 的控制就不宜以极小化为目标。

关键词 压榨酵母, 流加发酵, 循环-代谢模型, 耐贮存力, 最优控制

与其他发酵产品相比,面包酵母的工业化生产可能历史最长,但其质量控制至今尚未得到完全解决。用于面点制作的面包酵母的质量指标有两个,即速用鲜酵母和活性干酵母的发酵力及压榨酵母的耐贮存力。本文研究的是耐贮存力控制问题。一般认为,耐贮存力与酵母细胞的内在品质有关,所谓内在品质主要是指细胞中海藻糖、蛋白质的含量及细胞的成熟度。海藻糖含量高、蛋白质含量低均有利于酵母的贮存,成熟度则是由带芽细胞分率 *FBC* (Fraction of Budding Cells) 来表征的。成熟度高者 *FBC* 低,其耐贮存力亦强⁽¹⁾。如何在实际生产中有效地控制一些相关变量(进料流量、营养条件、发酵温度等)以改善酵母细胞的上述品质指标,长期以来尚无定论^(2,3)。在成熟度控制方面,德国商用酵母的 *FBC* 值为7—8%,我国则高达10—30%。本文借助作者早期建立的酵母细胞循环-代谢组合模型对 *FBC* 的极小化控制问题进行了实验研究。

1 优化控制实验

1.1 实验概况

优化控制实验共进行了3次,所用菌株均为 H620 (ATCC7754)。它是德国面包酵母商用菌株中的一种。实验1所用发酵罐是30L 不锈钢罐 (B. Braun), 实验2—3用的是5L 玻璃罐 (B. Braus Melsungen AG FRG)。这些发酵罐配备了温度自动控制系统(设定值为32℃), pH自动控制系统(设定值为5.0)和溶解氧控制系统(间歇发酵阶段其设定值为10%,流加阶段为20%,种液、间歇发酵培养基和补料液液的配方如下(g/L):

获国家教委优秀青年教师基金及留学生基金资助。
本文于1993年3月30日收到。

种液: 葡萄糖 30.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.3, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.7, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.48, 微量元素及维生素溶液各 1ml, 两种溶液的配方详见文献 [4]。

间歇发酵培养基: 葡萄糖 30.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.5, KCl 0.98, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.42, 微量元素及维生素溶液各 1ml。

补料料液: 葡萄糖 250, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 37.3, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 16, KCl 7.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.7, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5, 微量元素及维生素溶液各 8ml。

1.2 实验过程

实验 1: 2L 的种液在 30℃ 的摇床上培养 25 小时后接入 15.2L 的间歇发酵培养液, 15 小时后开始流加基质, 时经 10 小时, 补料总量为 4.6L。

实验 2: 0.4L 的种液在 30℃ 的摇床上培养 25 小时后接入 3.15L 的间歇发酵培养液, 16.25 小时后开始流加基质, 时经 10 小时, 共计补料 1.34L。

实验 3: 0.4L 的种液在 30℃ 的摇床上培养 25 小时后接入 2.8L 的间歇发酵培养液, 16.3 小时后开始流加基质, 时经 10 小时, 共计补料 1.2L。

1.3 最优补料策略的确定

流加发酵阶段的补料时间序列 $F(i)$ ($i=0, 1, 2, \dots, 9\text{h}$) 系由组合模型系统⁽⁵⁻⁷⁾对下述目标函数进行的优化仿真决定的:

$$\min_{F_{\min} < F(i) < F_{\max}} J(t = T_f) = S^2 + E^2 + FBC^2 + (45 - X)^2 \quad (1)$$

式中 F_{\min} 和 F_{\max} 分别是对 $F(i)$ 优化搜索的下限和上限, F_{\min} 为一很小数值, F_{\max} 则与流加发酵期 $\mu = 0.25\text{h}^{-1}$ 相对应。 T_f 为流加发酵终端时刻, 本文所有讨论仅限于流加发酵。使 J 极小化意为在 T_f 处, 糖浓度 (S) 和乙醇浓度 (E) 应该接近于 0, FBC 则应尽可能地低, 常数 45 是为了将对细胞浓度 X 极大化转换为与总目标函数相一致的极小化问题而引入的; 因为在给定的条件下, X 不会超过 45g/L。需要指出的是, 取用上述目标函数仅仅是为了探讨模型系统在酵母生产质量控制上的应用价值, 故着重研究 FBC 的受控情况。当然在优化 FBC 的同时, 也不能偏废产率、得率指标。此即上述目标函数的来由。对实际生产过程, 目标函数的选择应该是唯一的, 即基于物料、能量衡算的效益函数⁽⁸⁾。用于确定最优进料策略的模型系统包括两个部分, 即细胞循环模型和动力学模型。前者主要用于计算循环变量 FBC 及细胞密度 X , 该模型已在文献 [7, 8] 中详细给出, 在此不再赘述。细胞循环模型的输入变量是比生长速率 μ 。通常 μ 是难以直接测量的, 但可由动力学模型估计出来。本文取用 Bellgardt 提出的面包酵母生长动力学模型^(6,9), 它具有如下形式 (这里仅给出适用于流加发酵过程的反应器模型):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V_F} X \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_s X + \frac{F}{V_F} (S_R - S) \quad (3)$$

$$\frac{dE}{dt} = (r_{E1} - r_{E2})X - \frac{F}{V_F}E \tag{4}$$

式 (2) — (4) 中的反应速率满足下述关系：

$$A \begin{bmatrix} r_s \\ \mu \\ r_{AC} \\ q_{O_2} \\ r_{E_2} \\ r_{E_1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} q_s \\ 0 \\ m_{ATP} \\ 0 \end{bmatrix} \tag{5}$$

其中 A 为系数矩阵：

$$A = \begin{bmatrix} 1 & K_{B1} & 0 & 0 & 0 & K_{EG} \\ 2 & -4K_{B3} & 5 & -2 & 1 & -1-2K_{EG}-K_{B2} \\ 2+R & (-r_s & -K_{B3}-\frac{1}{Y_{ATP}} & 1 & 2P/O & 0 & -2K_{EG} \\ 2 & 0 & -1 & 0 & 1 & -1-K_{Ad} \end{bmatrix} \tag{6}$$

进一步，由于细胞代谢调节总是向获得最大比生长速率的方向进行^[9]，故有

$$\mu(S, r_s, r_{AC}, q_{O_2}, r_{E_2}) \rightarrow \max \tag{7}$$

细胞代谢调节的边界则由现有的各反应速度限制条件构成：

- (1) 乙醇限制 $r_{E_2} \leq K_E E$ (8)
- (2) 溶氧限制 $q_{O_2} \leq K_O O_F$ (9)
- (3) 由 Crabtree effect 导致的限制 $r_{AC} \leq r_{ACmax}$ (10)
- (4) 呼吸容限 $q_{O_2} \leq q_{O_2max}$ (11)
- (5) 葡萄糖限制 $q_s = q_{smax} S / (K_S + S)$ (12)

式 (2) — (12) 的求解详见文献 [9]，有关符号的意义及量纲见符号说明。大量实验证明^[9]，代谢模型 (5) — (12)，能够用于描述面包酵母的全部动力学行为。它和反应器模型 (2) — (4) 一道，即可根据流加发酵的进料流量给出 μ 的仿真值， μ 再被输入至 CCM，即构成完整的酵母生长动力学-细胞循环模型系统。基于该模型系统和目标函数 (1) 可获得 3 次质量最优控制实验的最优补料时间序列，见表 1。这些时间序列系由单纯形优化算法得到的，且是唯一解。

表 1 质量控制实验的补料策略

Table 1 Optimal feeding rate simulated by the model system

Time (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F (L/h) for exp. 1	0.350	0.700	0.400	0.200	1.150	0.700	0.200	0.350	0.460	0.190
2	0.063	0.124	0.115	0.108	0.224	0.160	0.224	0.076	0.064	0.080
3	0.063	0.089	0.112	0.098	0.251	0.140	0.216	0.098	0.058	0.072

1.4 FBC、 X_n 和耐贮存力的分析测定方法

循环变量 FBC 是在显微镜下目测计数数出的。显微镜放大倍数调至 500 倍；样品稀释 2—5 倍后涂在载玻片上，有微小突出的细胞及至即将分离但仍粘连在一起的细胞均计

为带芽细胞。它除以所数过的细胞总数即 FBC 。每个样品至少要数 1000 个细胞。 X_n 借助血球计数板在显微镜 ($\times 80$ 倍) 下目测分析。样品需作数十至数百倍的稀释, 以使血球计数板小网格内的细胞数为 3—8 个。每个样品分析两次, 取其均值作为 X_n 的测量分析值。由于 FBC 和 X_n 均为目测计数而得, 故分析误差较大, 其中, FBC 的分析误差估计为 10%, X_n 的误差为 5%。 FBC 和 X_n 的分析耗时很多, 故样品均先放在冰室中, 待发酵结束后分析。

面包酵母耐贮存力定义为: 随着贮存时间的推移, 样品发酵力的下降速率。因此, 发酵力的测量是个关键。发酵力是指由一定量的面粉和酵母样品制成的面团在一定的时间内产生 CO_2 的能力。面团的制备有不同的方法。本文是按 Burrows⁽⁸⁾ 法制备的, 即面团由 20g 面粉、15ml 去离子水和与 150mg 干物质相当的压榨酵母拌和而成, 并将在 $30 \pm 0.05^\circ C$ 的温度下, 3 小时内所产生的 CO_2 气体的总量作为发酵力的表征。测试装置是按文献 [10] 中的原理自制的。

2 实验结果及样品耐贮存力分析

图 1 给出了代谢模型仿真计算值和实验值的比较, 不难看出, 二者非常吻合。这样就可获得具有足够高精度的比生长速度 μ 的估计值。据此可对循环模型进行仿真。细胞循环变量的仿真值与实验值的比较示于图 2 中。图中 X_n 是细胞密度。定性地看, 仿真值与实验结果是基本一致的; 但定量地, 二者还是有一定的偏差。偏差的一部分固然是由分析误差所致, 而另一部分, 也是更主要的则属模型本身的误差。这是因为我们所用的细胞循环模型是非常复杂的酵母分裂过程的近似描述, 故偏差在所难免。这也是该模型需作改进之处。但事实证明, 这一不尽完善的模型系统已经能用于实际过程的质量控制。表 2 中给出了质量控制实验的产率、得率和 FBC 终值。

表 2 质量控制实验的一些特征指标

Table 2 Characteristic indices in quality control experiments

Exp. No.	1	2	3
(Productivity) g/(L·h)	2.23	2.79	2.40
(Yield) g/g	0.54	0.52	0.46
FBC ($t=T_f$) %	1.7	0.8	0.3

可以看出, 3 次质量控制实验的产率和得率均维持在较高的水平, 而 FBC 的实测终值则达 1.7%、0.8% 和 0.3%, 已接近理论上的最小值 0%。用传统的递增型补料策略是不可能得到这样的结果的。作者曾参照德国传统工业补料策略做过四次实验, FBC 值分别为 6.0%、8.8%、10%

和 18.6%。德国目前市场出售的压榨酵母的 FBC 值为 7—8%, 而国内则高达 10—12%。

现在进一步的问题是, 在 FBC 实现了极小化后, 耐贮存力是否真正得到了改善, 为此我们对实验 2 的 7 号和 9 号样品 (分别采自第 7 和第 9 个小时) 的耐贮存力作了分析。这两个样品的 FBC 值分别是 29% 和 1.8%。样品贮存在 3—5 $^\circ C$ 冷藏间, 经 5 天、27 天和 41 天后分别测试样品的发酵活力, 图 3 给出了分析结果。

在经 5 天的贮存之后, 两个样品的发酵力并无大的差异。7 号样品的发酵力甚至比 9 号样品还略高些。但第 27 天, 二者的差别已可明显地看出。 FBC 很低的 9 号样品失活明显小于 7 号样品。与第 5 天相比, 9 号样品相对失活 6.5%, 但 7 号样品则为 25%, 至第 41 天, 这一对比更为悬殊, 仍与第 5 天相比, 9 号样品的相对失活 16.3%, 但 7 号样品

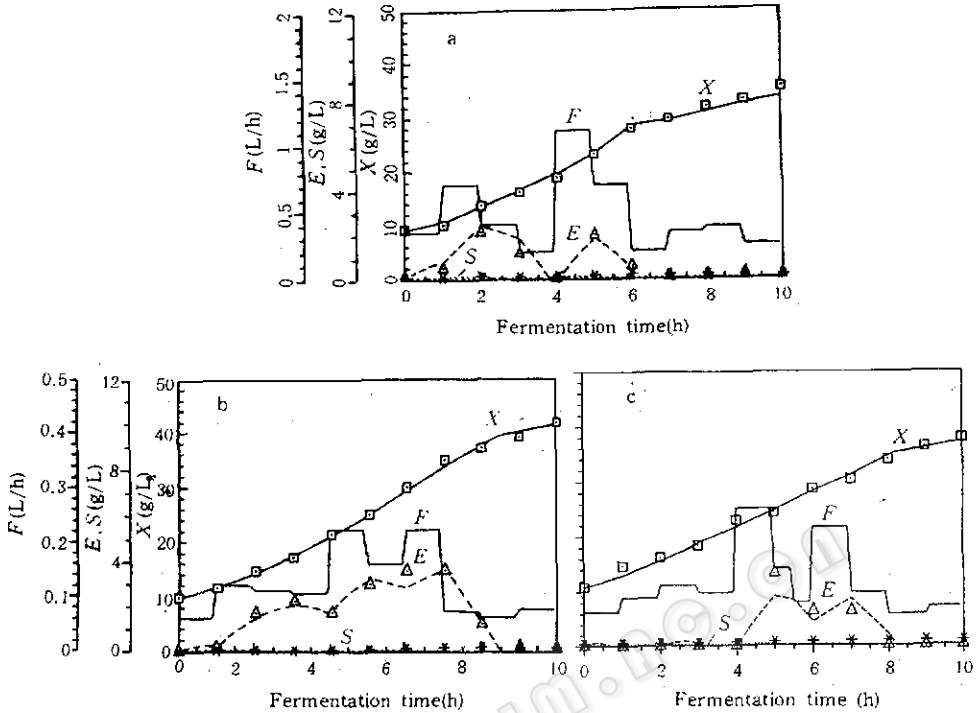


图1 代谢模型仿真结果(曲线)与最优控制实验测量值(符号)的比较

Fig. 1 Comparison of modeled simulation (lines) and measured data (symbols) for metabolic variables.

(a)–(b) Corresponding to experiment 1–3, X : Biomass concentration, E : Ethanol concentration, S : Sugar concentration, F : Substrate feeding rate

已高达 48%。可见 FBC 极小化后, 耐贮存力大为提高。

需要说明的是, 这里之所以仅对同一实验的样品进行发酵力分析和讨论, 而不是对不同罐批的样品作横向比较, 是因为不同罐批的产品质量并不是由进料策略唯一决定的, 它还与菌种状态、发酵条件等有关, 这样横向比较就很难处于同一基准。当然基于大量统计数据进行横向比较是完全可能的, 它也是本控制方案推广应用时需要做的事情之一。

3 讨论

本文利用酵母细胞循环-代谢组合模型对面包酵母的耐贮力控制是开环的, 它有别于通常的反馈控制。这是由过程本身的特征所决定的, 因为把发酵最终产品的产量作为控制变量, 并根据其测量值来调整补料策略在时间坐标上是没有意义的。另一方面, 本文通过实验证实, 基于模型系统进行的开环控制已完全能实现使 FBC 极小化的目标。文中确定各次实验最优进料仿真的模型参数分别由上次实验的参数辨识结果, 实验 1 的参数则取自文献 [4] 中实验 4 的参数辨识结果。应该指出, 模型参数主要是由菌株性质、原料成分和反应器结构所决定的。这些因素均是慢时变的, 故在实际应用中模型参数辨识周期可长达数月。

在图 2 中, 最优补料曲线呈双峰型, 这样的补料策略使 FBC 产生一定程度上的增幅

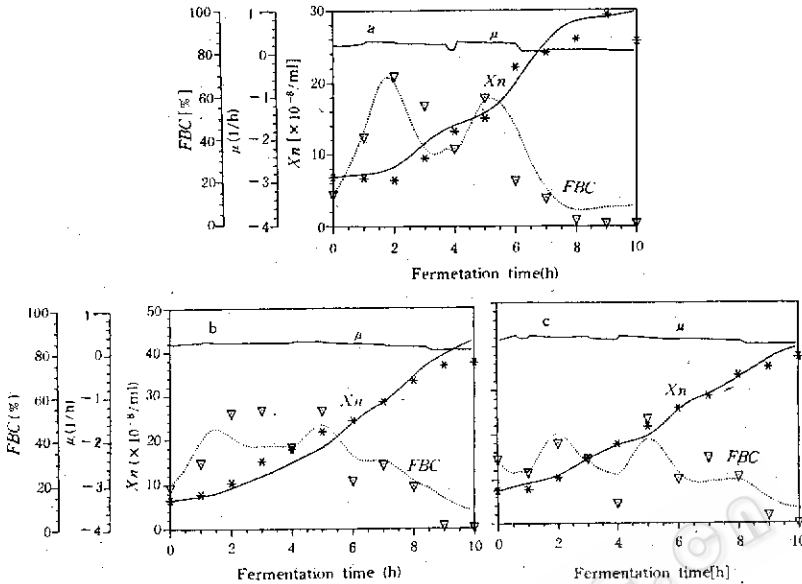


图2 细胞循环变量 X_n 和 FBC 仿真值 (曲线) 与最优控制实验测量值 (符号)

Fig. 2 Comparison of simulated cell cycling variables X_n and FBC and experiment data (symbols).

(a) — (c) Corresponding to experiment 1—3. X_n , Cell number concentration, μ , Specific growth rate, FBC , Fraction of budding cells

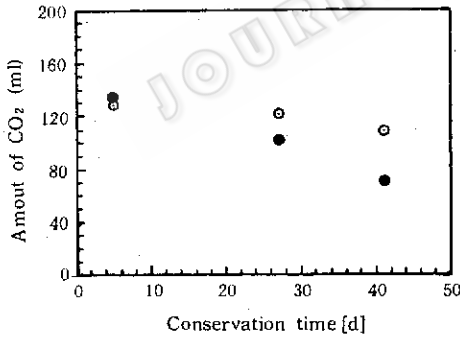


图3 最优控制实验中不同样品耐贮存力的比较

Fig. 3 Storage stability of the samples taken from the quality control experiment 2

Amount of CO_2 : Produced within 3 hours,

○ Sample at 9th hour, FBC (Fraction of budding cell) = 1.8%, ● Sample at 7th hour, FBC =

23.0%

振荡并使 T_i 时刻的 FBC 位于振荡曲线的波谷。若在优化目标函数中去除 FBC^2 项, 则可得传统的递增型补料策略。在工业生产上, 一般也采取一些措施来降低 FBC 值, 典型的做法是在发酵过程接近结束时停止进料, 维持一段时间 (一般 1—2 小时) 的饥饿操作。对此通常的解释是, 细胞在此期间将继续利用发酵液中的残留物质; 并使 FBC 值下降。然而, 从作者的实验结果看, 这样做未必是明智的。其一, 停止进料后, 发酵液中的营养物质一般很少, 从尾气 CO_2 的分析结果可知, 残余物质只能维持细胞几分钟、至多十几分钟的能量需求; 其二, 饥饿操作虽在一定程度上降低了 FBC , 但当发酵液中少量的残留营养物质消耗完毕, 细胞势必开始消耗贮存在体内的少量糖源以提供维持能量。这部分糖源以海藻糖为主, 而海藻糖恰恰是维持酵母细胞发酵活力稳定性的主要物质^(11,12), 故其消耗可能反而会对酵母产品耐贮存力产生不利影响。出于提高压榨酵母耐贮存力的考虑, 流

加控制策略可采用本文的双峰控制, 也可在传统的流加工工艺上稍作改进, 即在饥饿期代之以少量的进料。

耐贮存力的提高即意味着保质期的延长。对此本文已阐明其有效途径是使 FBC 极小化。然而, 耐贮存力控制仅当产品需较长时间存放 (数周至数月) 方有必要。对速用型鲜酵母生产而言, 产品一般在数日内耗用, 故发酵力是唯一的质量指标。从图 3 中可见, 在样品贮存的第 5 天, FBC 高的 7 号样品较 9 号样品略高, 这与第 27 天和第 41 天的情形完全相反, 它并不是偶然现象, 进一步的实验研究表明, 速用鲜酵母发酵力与 FBC 有近乎正比的关系, 对此作者将在后继论文中加以详细讨论。

符 号 说 明

E 液相乙醇浓度 g/L	r_{E2} 比乙醇消耗速率 $mol/(g \cdot L)$
F 进料流量 L/h	r_m 比糖酵解速率 $mol/(g \cdot L)$
FBC 带芽细胞分离率%	$R(\cdot)$ 开关函数
μ 比生长速率 $1/h$	S 葡萄糖浓度 g/L
m_{ATP} 维持系数 $mol/(g \cdot h)$	S_R 进料浓度 g/L
O_F 溶解氧浓度 mg/L	T_i 流加发酵周期 h
P/O 好氧磷酸化效率系数	V_F 发酵罐装液量 L
q_{O_2} 比氧消耗速率 $mol/(g \cdot L)$	X 菌体浓度 g (dry mass) $/L$
q_s 比葡萄糖消耗速率 $mol/(g \cdot L)$	X_n 菌体密度 $\times 10^{-8}/ml$
r_{AC} 比乙酰辅酶 A 消耗速率 $mol/(g \cdot L)$	Y_{ATP} ATP 得率系数 $g/(mol, ATP)$
r_{E1} 比乙醇生成速率 $mol/(g \cdot L)$	下标 amx, min 相应变量的最大最小值
$K_{A4}, K_{B1}, K_{B2}, K_{B3}, K_E, K_{EG}, K_O, K_S,$	代谢模型中的参数

致谢: 作者对 GBF 的 K. Schaller 先生、A. Afschar 博士、H. Biebl 博士、C. Posten 博士在本文实验工作期间的热情帮助表示感谢。

参 考 文 献

- (1) Suomalainen H. Eur J Appl Microbiol, 1975, 1: 1-12.
- (2) Reed G and Peppler H J (Eds). Yeast Technology, Westport Connecticut, USA; The AVI Publishing Company, Inc, 1973. pp. 53-164.
- (3) Moo-Young M (ed). Comprehensive Biotechnology, Headington Hill Hall, Oxford, UK; Pergamon Press, 1986, pp. 429-461.
- (4) Yuan J Q, et al. Bioprocess Engineering, 1993, 9: 173-182.
- (5) Yuan J Q et al. In: Reuss M, et al. eds, Biochemical Engineering-Stuttgart, FRG; Gustav Fischer Verlag, 1991, pp. 369-372.
- (6) Bellgardt K H and Yuan J Q. in: Schugerl K ed. Biotechnology, Second, Completely Revised Edition, Weinheim, FRG, VCH; 1991, Vol 4, pp. 383-406.
- (7) 袁景洪, 蒋慰孙, Bellgardt K H. 生物工程学报, 1993, 9 (1): 74-78.
- (8) 袁景洪, Bellgardt K H. 生物工程学报, 1993, 9 (3): 231-236.
- (9) Bellgardt K H. PhD Dissertation of University Hannover, FRG, 1993.
- (10) Burrows S. Proceedings of 6th International Congress on Cereal Technology and Cereal Chemistry, DDR; Potsdam Papers, 1975. pp. 295-305.
- (11) Becker M J and Rapoport A I. Adv Biochemical Eng/Biotechnol, 1987, 35: 127-182.
- (12) Suomalainen H and Pfaffli S. J Inst Brew, 1961, 67: 249-254.

Application of the Metabolic and Cell Cyclic Model System in the Control of Storage Stability for *S. cerevisiae*

Yuan Jingqi

(*Institute of Automatic Control*

East China University of Chemical Technology, Shanghai 200237)

Bellgardt K. H.

(*Chemical Engineering Institute of Hannover University, D30167 Hannover, FRG*)

Abstract Three experiments for storage stability control of baker's yeast were designed and carried out in laboratory scale fermenters. The feeding strategies of the fed-batch cultivation were determined by optimal simulation of the metabolic and cyclic model system for *S. cerevisiae*, which was proposed and well tested earlier, and coupled with an objective function in which the quality index of storage stability *FBC* (Fraction of Budding Cells) was included, since the enhanced quality of storage stability is eventually expected through minimizing of *FBC* at the harvesting time. The experiments were realized very successfully. Not only the optimized *FBC* value have approached the theoretical minimum, but also the storage stability was greatly improved after minimization of *FBC*.

Key words Compressed baker's yeast, storage stability, metabolic and cyclic model, quality control