

高发酵活力面包酵母的高产率流加培养策略研究

李寅¹ 陈坚¹ 宋祺² Yoshio Katakura³ 伦世仪¹

(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室 无锡 214036)¹

(中国科学院上海生物工程中心 上海 200233)² (大阪大学工学部生物技术系 大阪 565 日本)³

摘要 首先优化了面包酵母生产过程中分批培养阶段的操作条件,然后在连续培养实验的基础上,确定了面包酵母流加培养的最佳参数,并得出了发酵活力与比生长速率之间的关联式。根据这一关联式和指数流加培养模式,提出了两阶段控制比生长速度的流加培养策略。研究表明:采用初糖浓度为 15~30g/L、残糖控制浓度为 3~6g/L 以及分阶段控制搅拌转速以提供不同的传氧速率;应用提出的流加培养策略进行面包酵母培养,在产率达到 0.432g/g 的同时发酵活力达到 1180ml,可实现面包酵母培养过程高产率和高发酵活力的统一。

关键词 面包酵母,流加培养,产率,发酵活力

面包酵母生产是发酵工业的重要组成部分,其产量正逐年递增^[1]。长期以来,人们致力于提高面包酵母培养过程的产率和生产强度,已研究出多种培养方法和控制技术^[2~10]。实际上,面包酵母生产过程的优化控制应当以低生产成本(高产率)和高产品质量(良好的发酵活力和耐贮存力)相统一为目标^[1,10],遗憾的是,对这种统一或组合国内外至今仍缺乏深入的研究。本文在优化了分批培养阶段操作条件的基础上,以连续培养作为研究手段,确定了面包酵母流加培养的最佳参数,并得出了发酵活力与比生长速率之间的关联式。据此,结合已得到的流加培养模式^[11],本文提出了两阶段控制比生产速率的流加培养策略,实验证明该策略能够从理论和实践上实现面包酵母培养过程高产率和高发酵活力的统一。

1 材料和方法

1.1 菌种

面包酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) WSH-J7 是日本面包酵母商用菌株中的一种。

1.2 培养基和培养方法

见文献 [11]

1.3 发酵罐

美国 VIRTIS2.5L 实验用台式玻璃发酵罐,配备温度、pH 自动控制系统。

1.4 分析方法

本文于 1996 年 8 月 14 日收到。

1.4.1 细胞干重测定: 菌体在 -20°C 冷冻 2h 后, 真空干燥至恒重后称重。

1.4.2 还原糖浓度测定: 3, 5-二硝基水杨酸法。

1.4.3 体积传氧系数 k_{La} 测定: 亚硫酸盐法。

1.4.4 发酵活力测定: (i) 标准方法: 称取 2.6g 鲜酵母, 加 0.2g 食盐和 280g 面粉制成面团, 在 30°C 下预发酵 1h, 收集后继 2h 的 CO_2 , 以其体积作为样品发酵力的表征, 当气体体积达到 650ml 时即认为样品合格。(ii) 小样法: 称取 0.26g 鲜酵母, 加 5g 在 30°C 下恒温 1h 的面粉制成面团, 置于 30°C 水中, 测定面团从水底浮起的时间。浮起时间在 15min 内认为样品合格。

1.5 WSH-J7 流加培养模式^[11]

$$F_i = \mu^* V_0 X_0 \exp(\mu^* t) / Y_{x/s} (S_F - S) \quad (1)$$

2 结果和讨论

2.1 分批培养阶段操作条件的优化

面包酵母的生产过程可分为前期短时间的分批培养和后期长时间的流加培养两个阶段^[1]。分批培养阶段时间虽短, 却是整个培养过程中的重要环节。这是因为: (1) 分批培养的结果将决定流加培养模式中的初始条件和某些状态参数; (2) 分批培养阶段操作条件的选择对最终酵母的产量和质量、对整个过程的产率和生产强度都有较大的影响。因此, 优化分批培养阶段的操作条件, 是实现整个面包酵母生产过程优化和控制的基础性工作。

2.1.1 基质浓度对分批培养过程的影响: 为了确定分批培养阶段较优的初糖浓度并探索糖浓度对面包酵母活力的影响, 采用不同的初糖浓度进行分批培养, 最终结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出, 提高初糖浓度不仅会导致过程的产率下降, 而且由于培养时间的延长, 过程的生产强度也将随之下降。当初糖浓度在 15~30g/L 范围内时, 不仅可以获得较高的产率和较优的发酵活力, 细胞的比生长速率也相对较高。因此, 在面包酵母的生产过程中, 应当选择较低的初糖浓度 (15~30g/L) 以保证细胞在前期分批培养阶段能够获得较高的比生长速率、产率和较优的发酵活力, 为流加培养阶段的优化创造有利条件。

表 1 不同初糖浓度对 WSH-J7 分批培养的影响

Table 1 Effect of various initial sugar concentration on batch-culture of WSH-J7

ISC /g·L ⁻¹	RSC /g·L ⁻¹	t /h	DCW /g·L ⁻¹	Optimal FA /ml	$Y_{x/s}$ /g·g ⁻¹	μ /h ⁻¹
13.8	2.88	5	3.8	950	0.352	0.186
24.6	2.91	7	7.2	1040	0.323	0.224
31.0	2.72	9	7.8	1020	0.276	0.183
43.0	2.62	11	7.9	980	0.198	0.151
67.5	2.87	14	8.0	900	0.125	0.120

为了考察分批培养过程中面包酵母发酵活力的影响因素, 图 1 给出了不同初糖浓度

下 WSH-J7 发酵活力随培养时间的变化曲线以及发酵活力取得最佳值时所对应的残糖浓度。可以看出, WSH-J7 的发酵活力随着培养时间的延长、残糖浓度的下降而不断升高。当残糖浓度控制在 3~6g/L 时酵母发酵活力可稳定在 12min 以内, 但当残糖浓度低于 3g/L 时发酵活力反而下降。前文^[11]已对这一现象进行了较详细的解释。因此, 为了使酵母的发酵活力高而稳定, 就应当将残糖浓度控制在 3~6g/L。

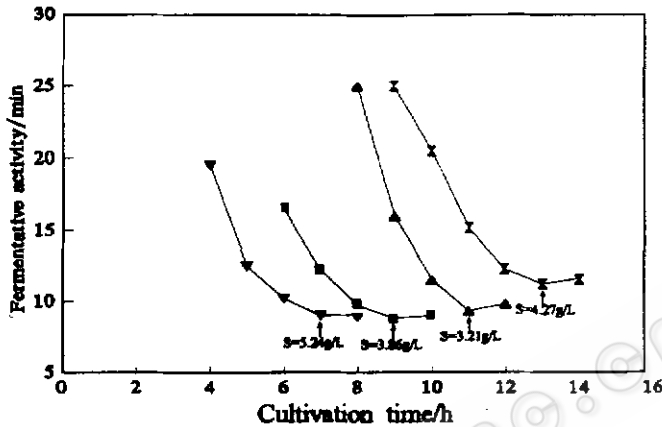


图 1 不同初糖浓度的分批培养中 WSH-J7 发酵活力的变化曲线
 Fig. 1 Time-course of FA of WSH-J7 in batch cultures with different initial sugar concentration

The initial sugar concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was: ▼24.6 ■ 31.0 ▲ 43.0 ⋈ 67.5

2.1.2 搅拌转速对分批培养过程的影响: 在面包酵母的生产过程中, 溶氧和基质一样, 是影响酵母生长和代谢的重要因素。在通气量不变的情况下, 提高搅拌转速可以有效地提高发酵罐中的传氧速率, 从而保证细胞生长和代谢所需溶氧的供给。发酵罐传氧速率的大小通常用体积传氧系数 k_La 来表征, 为了考察 k_La 对 WSH-J7 的产量和发酵活力的影响, 首先在冷模状态下测定了不同搅拌转速下所对应的 k_La 值 (如表 2 所示),

表 2 不同搅拌转速所对应的 k_La 值

Table 2 relation between the value of k_La and stirring speed

Stirring speed/ $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$	200	400	600	800	1000	1200
The value of k_La/h^{-1}	98.5	177.6	275.4	412.6	598.2	825.7

然后在实际发酵过程中通过改变搅拌转速以控制不同的 k_La , 在其它条件相同的情况下, 测定了不同搅拌转速下 WSH-J7 的生长曲线及发酵活力变化曲线, 结果如图 2A 和图 2B 所示。

实验发现: (1) 过高或过低的搅拌转速均将降低酵母的发酵活力。当搅拌转速为 $800\text{r}/\text{min}$ (k_La 为 412.6h^{-1}) 时, 发酵后期酵母的发酵活力稳定在 8min (小样法) 左右, 相当于 1090ml (标准法)。(2) 发酵前期搅拌转速过高或后期搅拌转速过低均将抑制酵母的生长。(3) 搅拌转速低 (k_La 也较低), 细胞进入对数生长期就较早, 酵母的

发酵活力也随之较快地达到稳定的最佳值，但产率将下降。因此，在实际流加培养过程中，前期应控制较低的搅拌转速（600r/min）以提供较低的 k_La 值，这样迟滞期可相对缩短；在对数生长期后期应迅速增大搅拌转速（提高到 1200r/min），使 k_La 值达到 $800h^{-1}$ 以上，以满足细胞快速生长对溶氧的要求，提高产率；在培养末期应调节搅拌转速至 800r/min 左右，使 k_La 值处于 $400\sim 500h^{-1}$ 之间，确保酵母能够获得优良的发酵活力。

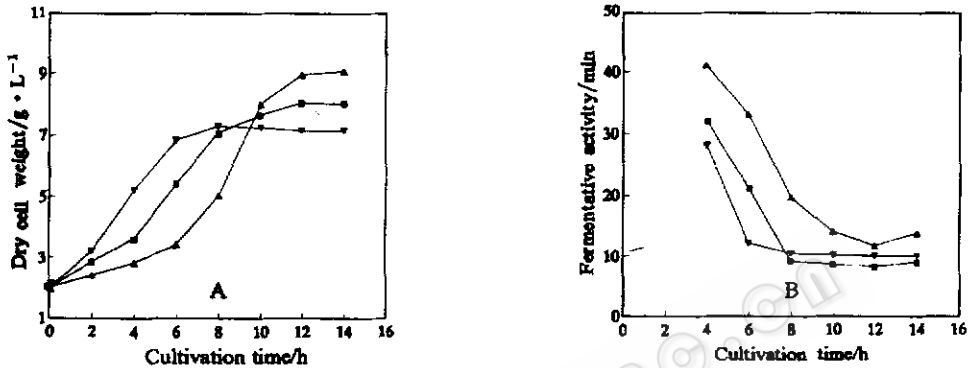


图 2 不同搅拌转速对 WSH-J7 分批培养过程的影响

Fig. 2 Effect of different stirring speed on batch cultures of WSH-J7

A. Time-course of cell concentration, B. Time-course of fermentative activity

The value of stirring speed (r·min⁻¹) was: ▼ 600 ■ 800 ▲ 1200

2.2 WSH-J7 最佳培养参数的确定

由于实际的面包酵母培养过程包括分批培养和流加培养两个部分，因此，仅仅优化分批培养阶段的操作条件是远远不够的。在确定流加培养策略之前，人们最关心的是酵母在怎样的环境条件下、以怎样的生长速率生长才能获得最高的产率、最大的生产强度和最优的发酵活力。连续培养技术就是获得这些参数的最有效手段。采用不同的稀释率 (D) 进行连续培养实验，在经过四个以上停留时间确定系统达到稳态 ($D = \mu$) 后，测定了发酵罐内细胞浓度及残糖浓度与比生长速率的关系，结果如图 3 所示。然后计算得出了产率及生产强度与比生长速率的关系，结果见图 4。由图 3 和图 4 可知，当比生长速率 (μ) = $0.2h^{-1}$ 时能够得到最高产率 $Y_{x/s} = 0.456g/g$ ，在这一比生长速率下，所对应的细胞干重和残糖浓度分别为 $8.35g/L$ 和 $2.03g/L$ 。但生产强度则是在 $\mu = 0.27h^{-1}$ 时才取得最大值 $1.893g/L \cdot h$ 。这意味在实际培养过程中最高转化率和最大生产强度难以取得统一，如果培养的目标是获得最高转化率， μ 应控制在 $0.2h^{-1}$ 左右；而如果培养的目标是获得最大生产强度，就应将 μ 控制在 $0.27h^{-1}$ 左右。

在连续培养实验中还发现，当系统处于稳态时，酵母的发酵活力也十分稳定，只随比生长速率的变化而改变。发酵活力与比生长速率的关系如图 5 所示，不同比生长速率下所对应的发酵活力值是当系统处于稳态、酵母的发酵活力趋于稳定时连续 5 次测定的平均值。

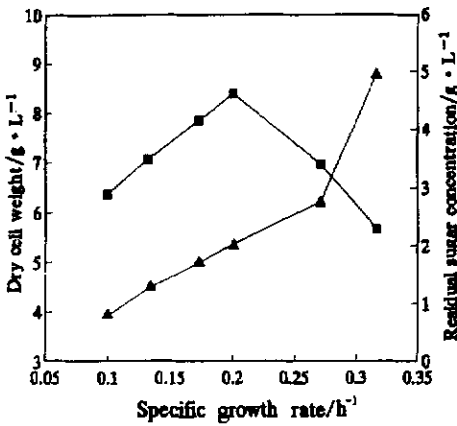


图3 细胞浓度及残糖浓度与比生长速率的关系

Fig. 3 Relationship between DCW, RSC, and μ
 ■ DCW ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), ▲ RSC ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

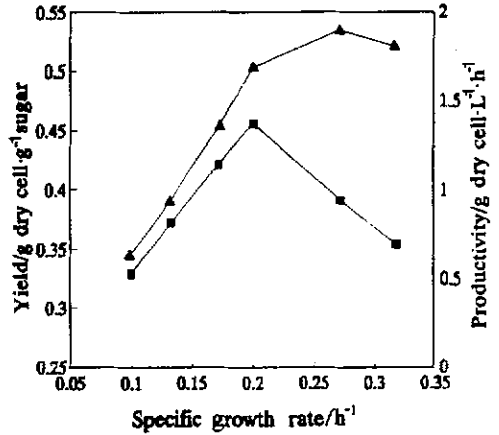


图4 产率及生产强度与比生长速率的关系

Fig. 4 Relationship between $Y_{x/s}$, P and μ
 ■ $Y_{x/s}$ ($\text{g dry cell} \cdot \text{g}^{-1} \text{sugar}$),
 ▲ P ($\text{g dry cell} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

如图5所示, 酵母的发酵活力和比生长速率存在着简单的函数关系, 这种关系可以用两条相交于 μ_c (临界比生长速率) = 0.178h^{-1} 的回归直线方程来表示, 如式 (2a)

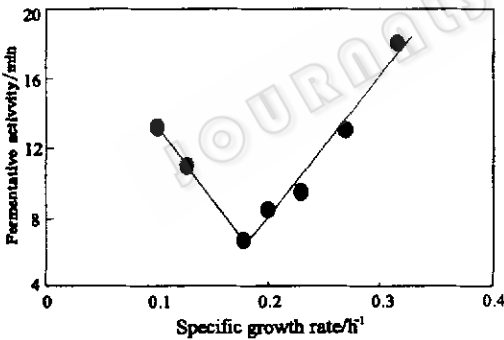


图5 WSH-J7 发酵活力 (FA) 与比生长速率 (μ) 的关系

Fig. 5 Relationship between the fermentative activity (FA) and the specific growth rate (μ)

和 (2b) 所示:

$$FA(\mu) = \begin{cases} 21.567 - 83.461\mu & \mu < \mu_c (2a) \\ -7.823 + 79.342\mu & \mu > \mu_c (2b) \end{cases}$$

从图5中得知, 当 μ 处于 $\mu_c = 0.178 \text{h}^{-1}$ 时, WSH-J7 可获得最佳发酵活力 6.7min (标准法 1220ml)。从式 (2a) 和 (2b) 还可以计算得到: 要使 WSH-J7 的发酵活力在 12min 以内, 比生长速率应当控制在 $0.115 \sim 0.25 \text{h}^{-1}$ 的范围内。这表明, 在面包酵母的流加培养过程中, 可以通过改变流加速率来控制酵母的比生长速率处于 μ_c 附近, 从而获得最优的发酵活力。

2.3 WSH-J7 流加培养过程的优化与控制

制

由连续培养实验可以发现, 要实现 WSH-J7 流加培养过程的最优化, 应将培养过程分为两阶段控制: 一是在细胞最大生长阶段, 控制 μ 在 0.2h^{-1} 左右; 二是在最佳发酵活力稳定阶段, μ 控制在 0.178h^{-1} 为佳。为此作者采用 WSH-J7 的指数流加培养模式^[11]进行了不同的流加培养实验, 其中两次典型的流加培养过程曲线如图 6A 和图 6B 所示。在实验 A 中, 初糖浓度为 29.2g/L , 流加糖浓度为 80.4g/L , 前 6h 为分批培养

阶段, 从第 6h 开始流加, 6~12h 内 μ 设为 0.2h^{-1} , 12~18h 内 μ 设为 0.178h^{-1} ; 在实验 B 中, 初糖浓度为 29.6g/L , 流加糖浓度为 55.9g/L , 前 1.5h 为分批培养阶段, 从第 1.5h 开始流加, 1.5~18h 内 μ 均设为 0.2h^{-1} 。实验 A 和 B 中 $Y_{x/s}$ 均设为 0.456g/g , 搅拌转速的控制策略为: 0~6h, 600r/min ; 6~12h, 1200r/min ; 12h 以后, 800r/min 。表 2 给出了两次实验中实验值与设定值的比较 (其中发酵活力的设定值是以实际 μ 代入式 (2a) 和 (2b) 计算得到的)。从中可以看出, μ 、 $Y_{x/s}$ 和 FA 的实验值均与设定值或计算值基本相近。

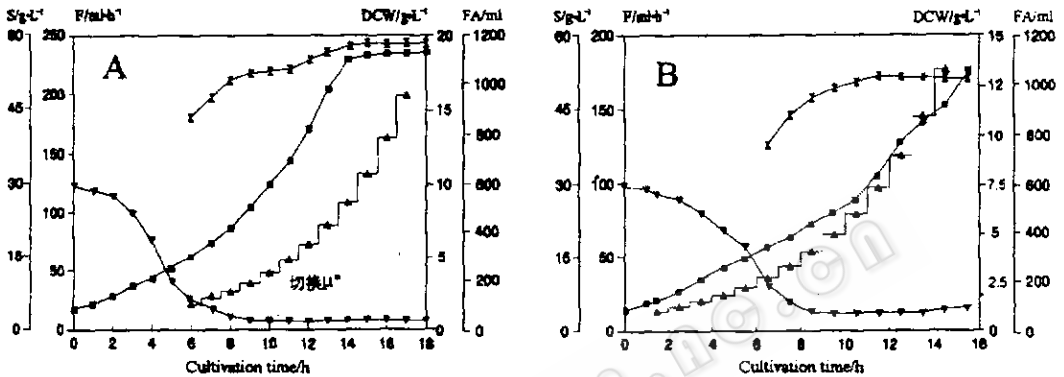


图 6 典型的 WSH-J7 流加培养过程曲线

Fig. 6 Typical fed-batch culture time-course of WSH-J7

A: The ISC and S_F was 29.2g/L and 80.4g/L respectively, B: The ISC and S_F was 29.6g/L and 55.9g/L respectively.

▲ Feeding rate ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$), ▼ Residual Sugar concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ■ Dry Cell weight ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), X Fermentative activity (ml)

表 3 两次流加培养实验中各参数设定值与实验值的比较*

Table 3 Comparison of the set value and the experimental data of various parameters in twice typical fed-batch cultures

Experiment	A					B		
	μ/h^{-1}		$Y_{x/s}/\text{g}^{-1}$	FA/min		μ/h^{-1}	$Y_{x/s}/\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	FA/min
Culture phase /h	6~12	12~18	0~18	6~12	12~18	1.5~18	0~18	1.5~18
Set value	0.201	0.178	0.456	7.7	7.4	0.201	0.456	8.4
Experimental data	0.195	0.169	0.432	8.4	7.1	0.205	0.442	9.1

* The value of fermentative activity (FA) is the average value of successive five-time measurements when the system is in relative stable state (the residual sugar concentration is constant). FA 7.1min (little sample method) equals to 1180ml (standard method), 8.4min equals to 1085ml, 9.1min equals to 1015ml.

比较图 6A 和图 6B, 作者发现, 实验 A 中培养进行到 14h 后细胞增长速度明显变慢, 这可能是因为 (1) 比生长速率设定值降低, 导致流加速度降低, 不能满足细胞对基质的需求; (2) 细胞浓度较大而搅拌转速从 1200r/min 下降到 800r/min 导致供氧不足。但总的说来, 实验 A 的产率 (0.432g/g) 和发酵活力 (1170ml) 都是非常高的。这种高产率和高发酵活力的统一表明, 对于必须兼顾产量和质量的实际生产过程, 两阶

段控制比生长速率的流加培养策略能够在降低生产成本(提高产率)的同时确保产品的质量(提高发酵活力)。此外,也研究了海藻糖对面包酵母耐贮存力的影响,并提出了以高海藻糖含量为目标的流加培养模式,研究结果将于另文发表。目前,本研究室正在本文和前文^[11]的基础上,进行以高产率、高发酵活力和优良的耐贮存力相组合为目标的面包酵母培养策略研究。

3 结 论

在面包酵母生产过程的分批培养阶段,选择较低的糖浓度(15~30g/L)并将残糖浓度控制在3~6g/L;培养过程中分阶段控制搅拌转速以获得较优的供氧条件,是面包酵母获得较高比生长速率和优良发酵活力的基础保证。

面包酵母 WSH-J7 的连续培养实验发现,当 $\mu = 0.2\text{h}^{-1}$ 时获得最高转化率 $Y_{x/s} = 0.456\text{g 干细胞/g}$, 当 $\mu = 0.27\text{h}^{-1}$ 时获得最大生产强度 $1.893\text{g 干细胞/L}\cdot\text{h}$, 当 μ 处于 $\mu_c = 0.178\text{h}^{-1}$ 时可获得最佳发酵活力 6.7min (标准法 1220ml)。并得出了发酵活力和比生长速率之间的关联式。

根据面包酵母 WSH-J7 发酵活力和比生长速率之间的关联式及其指数流加培养模式,确定了在面包酵母最大生长阶段和最佳发酵活力稳定阶段分别控制比生长速率的流加培养策略。应用这一培养策略,可实现面包酵母培养过程高产率和高发酵活力的统一,从而可在降低生产成本的同时提高产品的质量。

符号说明

DCW—Dry cell weight / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	S_F —Sugar concentration in the feed / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
FA—Fermentative activity / ml or min	t —Cultivation time / h
Fi—Substrate feed rate / $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$	V_0 —Initial volume at feeding time 0 h / L
ISC—Initial sugar concentration / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	X_0 —Initial cell conc. at feeding time 0 h / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
k_{1a} —Volumetric oxygen transfer coefficient / h^{-1}	$Y_{x/s}$ —Cell to sugar yield coefficient / $\text{g dry cell}\cdot\text{g sugar}^{-1}$
P—Productivity / $\text{g dry cell}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	μ —Specific growth rate / h^{-1}
RSC—Residual sugar concentration / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	μ^* —Operational specific growth rate / h^{-1}
S—Sugar concentration in the fermentor/	μ_c —Critical specific growth rate / h^{-1}

参 考 文 献

- [1] Reed G, Nagodawithana T W. Yeast Technology, Van Nostrand Reinhold, 1989, 261~314.
- [2] Peringer P. Biotechnol Bioeng, 1974, 16: 31.
- [3] Aiba S, Nagai S, Nishizawa Y. Biotechnol Bioeng, 1976, 18: 1001~1016.
- [4] Rosen K. Proc Biochem, 1977, 12 (3): 10~12.
- [5] Wang H Y, Cooney C L, Wang D I C. Biotechnol Bioeng, 1979, 21: 975~995.
- [6] Daiaku K, Yamasaki Y, Kuki K *et al.* Biotechnol Bioeng, 1981, 23: 2069~2081.
- [7] Daiaku K, Izumoto E, Morikawa H *et al.* J Ferment Technol, 1983, 61: 189
- [8] Takamatsu T, Shioya S, Okada Y *et al.* Biotechnol Bioeng, 1985, 27: 1675~1686.
- [9] Williams D, Yousefpour P, Wellington E M H. Biotechnol Bioeng, 1986, 28: 631~645.
- [10] 袁景淇, Bellgardt K H. 生物工程学报, 1993, 9 (3): 231.

- [11] 陈 坚, 李 寅, 宋 祺等. 药物生物技术, 1995, 2 (4): 37~42.
[12] 宋 祺, 无锡轻工大学硕士学位论文, 1995.12.

Fed-batch Culture Strategy for High Yield of Baker's Yeast with High Fermentative Activity

Li Yin¹ Chen Jian¹ Song Qi² Yoshio Katakura³ Lun Shiyi¹

(*Lab. of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Wuzi University of Light Industry, Wuzi 214036*)

(*Shanghai Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233*)²

(*Department of Biotechnology, Osaka University, Osaka 565, Japan*)³

Abstract In this paper, the operational conditions of batch culture stage in baker's yeast production were optimized at first. Based on the determination of optimal parameters for fed-batch culture from continuous culture, a correlation, which describes the relationship between fermentative activity (FA) and specific growth rate (μ), was obtained. Combining this correlation and the exponential fed-batch culture equation, a fed-batch culture strategy was developed to get high yield and high fermentative activity by controlling μ in different stages. The results showed that: (1) when the initial and residual sugar concentration was controlled to be 15~30g/L and 3~6g/L, respectively, and different stirring speed was applied at different stages to provide optimal oxygen transfer conditions; (2) the proposed fed-batch culture strategy was used in fed-batch culture, the yield of baker's yeast could reach 0.432g/g with high fermentative activity (1180ml). Thus, the unitary of high yield and high fermentative activity was realized.

Key words Baker's yeast, fed-batch culture, yield, fermentative activity