

# 面包酵母生长动力学研究

袁庆辉 刘雁然 李强 郝确 王子栋 郭林琪 郭波

## 引言

虽然酵母生产在食品、医药工业方面有着重要而广泛的用途,但国内对它的生长动力学研究很少。本实验的主要目的就是通过在一定的工艺条件下,培养面包酵母(啤酒酵母 *Saccharomyces Cerevisiae* Hansen),从而对其生长过程的动力学进行初步的探讨,建立一个简单的数学模型。同时也对影响酵母生长的主要因素(糖浓度、溶氧等)做些简单的讨论。并希望实验的结果在酵母的实际生产中对工艺条件的控制提供有用的数据。也为使生产酵母的工厂从目前的半经验生产方式过渡到建立在严格的理论基础上的现代化生产方式做点有益的贡献。

## 原理 方法 步骤

动力学的监测以两种形式进行,一种是动态的或分批培养系统,另一种是稳定态或连续培养系统。在实际酵母生产中,多数工厂采用半连续培养的方法。而我们的实验是以分批培养条件下的动力学为研究手段,从而对半连续和连续法提供数据,同时也对半连续法的条件进行探讨。

众所周知,微生物的发酵过程中发生的各种生化反应彼此紧密相关,形成一个极其复杂的反应网络。因此,目前的发酵过程的数学模型通常仅描述系统的宏观性质。

用于描述细胞生长的基本动力学模型是人们都熟悉的对数定律(Logarithmic Law),

$$dx/dt = \mu x \quad (1)$$

式中,  $dx/dt$  为菌体生长速率 (mg 干重/ml·hr);  $x$  为菌体浓度 (mg 干重/ml);  $\mu$  为比生长速率(hr), 它的定义是:

$$\mu \equiv \frac{1}{x} \cdot dx/dt \quad (2)$$

如果  $\mu$  的数值不变,为一常数,则式(2)表示指数生长,即生长速率与已有的细胞浓度成正比。这个模型只局限在对数期阶段中反映细胞生长过程的规律性。但在分批发酵中,生长环境条件不能保持恒定。由于营养物质的消

耗,代谢产物、尤其是对微生物本身有抑制作用的毒性物质的积累等原因,会使细胞量的增长偏离简单的对数关系。如在典型的分批培养过程中出现稳定期、衰亡期就是明显的例子。

考虑这些因素, D. G. Kendoll 提出了一个改进形式,称之为逻辑(Logistic)定律:

$$dx/dt = K_1 x - K_2 x^2 \quad (3)$$

式中,  $K_1$ 、 $K_2$  为待定常数;  $x$  为菌体浓度;  $dx/dt$  为菌体生长速率。这个模型是基于有限生长的概念而建立的。在细胞浓度增加到极限 ( $K_1/K_2 \rightarrow x$ ) 时, 细胞生长速率接近为零, 故(3)式右边第一项可理解为一级生长项, 第二项为二级死亡项。这一模型在其他的发酵动力学的研究中已多被采用。由于它增加了一个修正项  $K_2 x^2$ , 因而对于在分批培养条件下的菌体生长速率与菌体浓度之间关系的描述更接近真实情况。

本实验所讨论的问题也是在分批培养情况下研究酵母生长动力学的问题。对酵母的生长过程来说, 用此方程来描述也是适宜的。因此我们也选用这一数学模型作为酵母生长过程的动力学模型。

为了简化式中待定系数  $K_1$ 、 $K_2$  的确定方法, 可将此式整理如下:

$$\frac{1}{X} \cdot dx/dt = K_1 - K_2 X \quad (4)$$

根据实验数据, 分别求出各个试验点的  $\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$  及  $X$  值。在坐标纸上, 以  $\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$  为纵坐标,  $X$  为横坐标作图, 并在图上找出各试验点值的位置, 画出近似的直线。则直线的斜率即为  $K_2$ , 在纵坐标上的截距即为  $K_1$ 。

(2) 式中的  $\mu$  为比生长速率, 它表示着菌体量增长的快慢程度。欲得到高产量的菌体, 比生长速率是一个重要的控制因子。影响比生长速率的因素主要有发酵液的糖浓度、溶氧情况等。我们的实验对这些方面也进行了一些探讨。

我们的实验是以糖蜜为原料, 在一定的工艺条件下, 用丹麦26酵母在MJ-N型玻璃发酵罐内进行分批培养实验。MJ-N型玻璃发酵罐装有四档四直叶搅拌器以及自动的pH、温度控制、显示、记录设备, 还有溶氧显示、自动记录和自动消泡剂添加设备等。试验所用的培养基-糖蜜的处理, 采用一般工厂中常用的方法热酸水解法(详细情况见《酵母生产工艺学》)。接种的酵母用逐步扩大培养的一代酵母。在培养过程中每隔1小时取样一次, 测定耗糖情况(残糖)、光密度、菌体干重并记录溶氧、温度、pH值。

实验过程中, 溶氧通过溶氧电极由仪器自动显示记录。培养温度控制在酵母的最适生长温度30°C, pH控制在4.4。光密度用721分光光度计测定。发酵液中, 随着发酵时间的延长, 菌体浓度和糖浓度都在不断变化, 因而其对光的吸收量也就不断变化。根据这一点, 通过测量光密度的变化, 并将其与相应的菌体浓度变化和耗糖情况的变化对应起来, 以减少实验中的一些偶然差错造成的影响。我们测定光密度时采用的波长为500nm。菌体干重的测量方法为: 样液先用布氏漏斗抽滤并用蒸馏水洗滌, 然后用真空干燥器干燥至恒重称重。发酵过程中, 发酵液糖浓度的测定采用高铁氰化钾热糖滴定法测定发酵液中还原糖的含量。(测定原理见《食品化学分析》)。酵母扩大培养

所用的培养基是12°Bx的麦芽汁。培养过程为两级扩大培养, 培养方法为30°C摇瓶振荡。培养时, 接种量为10%。

## 结果 分析

### 一、糖的影响

在酵母的糖代谢过程中, 不仅有巴斯德效应, 还有反巴斯德效应(Crabtree效应), 即当发酵液中糖浓度过高时, 氧的效应出现, 呼吸作用受抑制转而迫使酵母进入酒精发酵。有人研究过, 当葡萄糖浓度超过5%, 就会阻滞酵母细胞中呼吸酶的合成和线粒体的形成。因此, 培养基中的糖浓度是和氧一起影响酵母细胞的糖代谢途径。当培养基中糖浓度高时, 即使在有氧条件下, 也迫使酵母转化可发酵性糖而生成一定量的乙醇, 从而影响酵母细胞量的生产。从我们的实验情况来看, 在相同的通风量和搅拌转速条件下, 发酵液的糖浓度高时, 对数期的比生长速率低; 反之, 比生长速率则高, 酵母菌体量对糖的得率也高(表1)。由此看来, 反巴斯德效应在酵母生产中是值得注意的。资料表明, 在用葡萄糖和果糖(如用糖蜜为原料时)作碳源和能源时, 供给的糖浓度必须低。不论在分批或连续生产中, 糖应采用流加进料法加到强烈通风的发酵液中, 以减少反巴斯德效应。我们在实验中也做了几次流加糖的实验。所用培养基的原发酵液糖浓度为1.0%; 流加糖浓度为17.8%。事实证明, 采用流加进料法基质得率(酵母菌体量对糖的转化率)高。另外, 流加进料法对于控制比生长速度也是很有效的。发酵初始, 发酵液糖浓度选择一个低水平(如1%)发酵过程中通过流加糖来补充菌体消耗的糖, 使发酵液的糖浓度

表 1 发酵液糖浓度的影响

发酵液糖浓度	对数期比生长速率	基质得率%
7.21%	0.308 hr <sup>-1</sup>	17.94
5.07%	0.218 hr <sup>-1</sup>	19.17
3.65%	0.873 hr <sup>-1</sup>	23.44

保持初始水平，从而控制了比生长速率。当然，要控制好比生长速率，还要考虑到其它的影响因素。

表 2 分批法与流加法的比较

项 目 培养类型	总 糖*	发酵终了的总菌体量	基质得率%
分批培养	3.19	0.747g/100ml	23.44
流加糖培养	3.08	0.856g/100ml	27.79

\* 发酵液中菌体消耗掉的全部糖 (g/100ml)

需要指出的是，低糖培养虽可提高转化率和比生长速率，但相对高糖发酵来说，单位时间内生产的菌体量较少，设备利用率低。考虑两方面的影响，需选择一个较合适的浓度范围。限于时间，这方面未做更多的比较。

在酵母培养过程中，根据所得数据绘成酵母耗糖的曲线与酵母的四个生长阶段有明显的相对应的关系（图 1）。在迟缓期，耗糖少，曲线下降缓慢；在对数期，耗糖迅速增加，曲线急剧下降；而到稳定期和衰亡期，糖耗曲线渐趋平稳直至发酵液中残糖不再减少。各阶段的耗糖速率分别为：

- (1) 迟缓期 2.5mg/ml/hr;
- (2) 对数期 13mg/ml/hr;
- (3) 稳定期 3.2mg/ml/hr;
- (4) 衰亡期几乎不耗糖。

根据耗糖曲线，我们可以看出：对于分批培养的酵母生产，一到稳定期（约在第10~12小时）就应结束培养以免菌体老化。而对于流加糖法培养，开始流加糖的时间应在第2~3小时以后为宜。此时菌体生长开始进入对数期，糖耗迅速增加。流加的糖正好补充菌体消耗的糖。另外，此时发酵液的光密度值也迅速上升，这也说明发酵液中菌体浓度在迅速增加。

## 二、溶氧情况

本实验由于时间的关系，对溶氧问题未做太多的探讨，只是在一定的通风量（10l/分钟）和转速（250rpm）下观察了溶氧的变化情况。并根据记录的数据绘成溶氧曲线（图 1）。

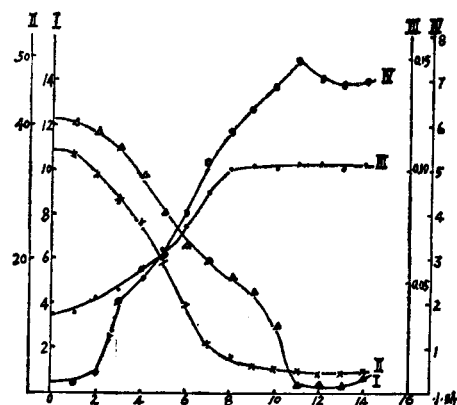


图 1

- I 溶氧曲线 (ppm)
- II 耗糖曲线 (毫克/毫升)
- III 菌体干重曲线 (毫克/毫升)
- IV 光密度曲线

在菌体生长的迟缓期，耗氧很少，溶氧曲线几乎不下降。对比生产上此段时期，微量通风是适宜的。这样不仅可以节省动力，也可以使菌体更好地适应新的生长环境；在对数期，菌体生长旺盛，溶氧曲线大幅度下降，溶氧下降速率为 1.36ppm/hr；至稳定期，溶氧维持在一个低水平上，约为 0.2~0.4ppm。这表明，此期的菌体量虽不再增加，但菌体的代谢作用还很强烈而继续大量消耗发酵液中的溶氧。此时菌体的死亡与增长速率相等，菌体量达到了极限值  $K_1/K_2$ 。在衰亡期，由于新生速率的减小，死亡速率超过了新生速率，菌体耗氧能力下降，而使溶氧曲线有所回升。总的来说，溶氧曲线呈“S”形下降。因此在酵母生产中，宜采用前段（0~2或3小时）微量通风，后段强烈通风的方法。有资料介绍，当酵母在发酵液中被充分分散开并于 30°C 培养时，发酵液中溶氧有一个临界值，大致在 0.1~10ppm 范围内。如溶解氧超过临界值，则由于高浓度的溶解氧对酶反应的抑制作用而使细胞的呼吸比速下降。呼吸比速与比生长速率有着线性关系。因此比生长速率也会下降。生产中需氧量可根据酵母连续地增殖，使培养液内干酵母浓度达 4~4.5%，在发酵最后一小时，则将需要 450克氧/100升发酵液容量/小时。根据 100 升

表 3 菌体浓度对时间的变化

时 间	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
$X(\frac{\text{mg}}{\text{ml}})$	0.225	0.260	0.432	2.10	2.54	3.04	4.07	5.19	5.84	6.34	6.86	7.48	7.08	6.88	7.62
$\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$		0.135	0.398	0.794	0.173	0.164	0.253	0.216	0.111	0.079	0.076	0.083	-0.056	-0.029	0.620

空气中含有30克氧，假使每分钟通入 100 升空气，则每小时可送入发酵罐内1800克氧。而转入到液体中的有效氧一般不超过20%，即 360 克氧。所以实际上供氧量不能满足酵母的需要，而造成通风量（供氧）不足，呼吸商（ $Q_{\text{CO}_2}/Q_{\text{O}_2}$ ）增大，而不能达到应有的菌体产量。前面说过，供氧问题与比生长速率有关。比生长速率过大，会加剧供氧不足现象，使呼吸商增大。故此酵母生产中，比生长速率要加以控制。在现有设备情况下，比生长速率最好不超过  $1 \text{ hr}^{-1}$ 。

在实验中，我们还注意到，搅拌比通风量对溶氧的影响更大。这一点在别人做过的实验中也有报道。因此酵母生产中，使用搅拌罐时，在不过多消耗动力的情况下，可通过增加搅拌转速来提高溶氧，增加产量。

### 三、动力学模型的建立

前面已经谈到过，本实验所采用的模型为：

$$dx/dt = K_1 X - K_2 X^2$$

此方程中的待定系数  $K_1$ 、 $K_2$  可根据实验数据编成程序，通过计算机计算得出。但此式比较简单，只有两个待定系数，因而可以通过作图法简化确定方法。将此式整理成：

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} = K_1 - K_2 X$$

分别求出各试验点的  $\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$  和  $X$  值。通过权衡，我们采用发酵液糖度为3.65%的一罐的实验数据为准，求出各  $\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$  和  $X$  值(表3)。

以  $\frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt}$  为纵坐标， $X$  为横坐标作图(图2)，在图上找出各试验点的位置并画出近似的直线。由图求出：

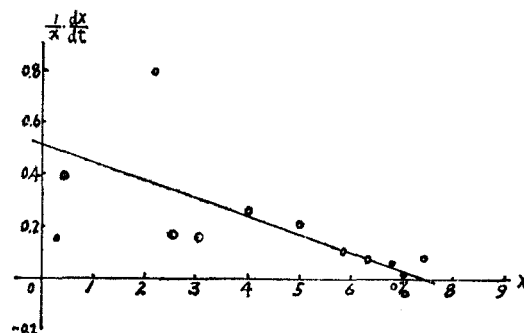


图 2 作图法  $K_1$ 、 $K_2$

$$K_1 = 0.518 [\text{hr}^{-1}]$$

$$K_2 = 0.072$$

将  $K_1$ 、 $K_2$  代入选定的模型中，得到分批培养条件下的酵母生长动力学模型为：

$$dx/dt = 0.518X - 0.072X^2$$

我们在实验中，培养酵母所采用的工艺条件是以天津幸福食品厂酵母生产的工艺条件为基础的。因此，上面所建立的数学模型有一定的实际意义。该方程显示了酵母生产中，酵母菌体的生长速率与菌体浓度的关系，也间接表现了在此工艺条件下，酵母生长速率随时间变化的规律。对于酵母生产过程中，工艺条件的操作控制有一定的指导作用。然而，本实验主要是探讨了酵母生长动力学研究方法。在此基础上建立的数学模型虽有一定的意义，但因  $K_1$ 、 $K_2$  是在一定的工艺条件下通过实验得出的，因此有局限性。当改变工艺条件时，需要重新测定。

### 小 结

1. 通过实验，对酵母的生长过程建立了一个简单的数学模型：

$$dx/dt = 0.518X - 0.072X^2$$

它对于进一步研究酵母生长动力学的问题做了准备。下面要继续进行的工作是,根据建立起来的数学模型,用Л.С.Понрягин的连续最优原理对酵母生产过程中的各单元操作(如通气搅拌控制、流加糖控制等)求取最佳化操作曲线,实现这些工艺的最佳化操作,以提高酵母的产量。

2.测得酵母在生长的四个典型期间内的耗糖速率分别约为:

- (1) 迟缓期 2.5mg/ml/hr
- (2) 对数期 13mg/ml/hr
- (3) 稳定期 3.2mg/ml/hr
- (4) 衰亡期几乎不耗糖。

3.在不考虑发酵液在发酵过程中的变化对溶氧的影响时,测得酵母在其生长的四个典型期间的溶氧下降速度分别约为:

- (1) 迟缓期 0.25ppm/hr
- (2) 对数期 1.36ppm/hr
- (3) 稳定期 0~0.1ppm/hr
- (4) 衰亡期溶氧回升

以上这两组数据对于酵母的生产有一定的参考价值。为工艺条件的操作控制提供了一些数据。

4.不同糖浓度的培养基对酵母的比生长速率和基质得率有较大影响。对于生产酵母菌体来说,一般以低糖培养为好,糖浓度最好不超过5%。

5.采用流加糖的方法半连续化的培养过程培养酵母时,开始流加糖的时间以在第2~3小时以后为宜。因为此时已开始进入对数生长期。流加糖的培养方法不仅可以有效地减低反巴斯德效应,而且对控制比生长速率也很有益,并提高了基质得率。培养时原发酵液糖浓度要低,约在1%左右,流加糖的浓度也不宜过高,其浓度和数量可根据发酵液中剩余糖的浓度维持在1%左右为宜。

本实验为酵母生长动力学的研究作了初步探讨,也得出了一些有意义的结果。但是限于时间关系未能做进一步更深入的研究,因此还需在此基础上,再做实验,进一步完善建立的数学模型并对其它方面也做更深入的研究。

## 参 考 书

- [1] S. S. Wang «Biochemical Engineering»
- [2] 合叶修一、阿瑟·伊·汉弗莱、南锡·弗·米利斯,《生物化学工程》
- [3] 上海市科学技术编译馆、中国农业科学院资料室,《食用酵母的生产和研究》
- [4] E. A. 勃列瓦柯、P. B. 给瓦尔托夫斯基合著、沈学源、檀耀辉、傅建生译:《酵母生产工艺学》
- [5] 上海食品检验局主编:《食品化学分析》
- [6] 华南工学院等四院校合编:《发酵工程与设备》
- [7] 北京大学生物系生化教研室编著:《生物化学实验指导》
- [8] 上海化工学院 成都科技大学 大连工学院编,《化学工程》(上册)
- [9] 轻工业部食品发酵工业科学研究所 中国轻工业会发酵学会《发酵学报》(1981试刊号)

## 茶叶的色、香、味、形的形成(二)

刚 保 中

### (三) 茶叶的滋味

在新鲜的茶叶里有几种主要的有味物质:儿茶素、茶黄素、氨基酸、咖啡碱,可溶性糖和果胶物质,它们各有各的滋味。如绿茶中含有大量的 L—EC, L—EGC, L—ECG 及 L—EGCG 的儿茶素,大量的儿茶素有收敛的涩味和爽口的回味;茶黄素是香味和鲜爽度的因

子;氨基酸有鲜味;咖啡碱有苦味,可溶性糖和果胶物质有甜味,果胶质还有粘稠性,可以使茶汤具有味厚之感。

红茶滋味的形成,也由于氧化缩合的茶多酚失去了原来的苦涩味,使滋味醇厚,而有收敛性,并与氨基酸、咖啡碱、可溶性的糖、果胶等相互配合,彼此协调,形成了红茶所特有