

文章编号:1673-1689(2010)06-0941-07

酵母产细胞壁多糖分批发酵条件优化与发酵动力学

刘媛媛, 王强* 刘红芝

(中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室, 北京 100193)

摘要: 为提高酿酒酵母产细胞壁多糖能力, 进一步了解酿酒酵母菌体生长、多糖的生成、底物消耗的特性, 作者采用 5 L 发酵罐对酿酒酵母发酵条件进行优化, 通过考察搅拌转速、pH 值、温度对生物量、葡聚糖、甘露聚糖生成量的影响, 确定最佳发酵条件为: 搅拌转速 400 r/min, pH 4, 温度 32℃。并利用 BP 神经网络对试验数据进行训练, 建立试验模型, 最终确定 BP 模型及拟合曲线。通过对预测值进行验证, 证明该模型能较好地模拟菌体生物量、糖消耗量及细胞壁多糖生成的变化。

关键词: 酿酒酵母; 葡聚糖; 甘露聚糖; 人工神经网络; BP 网络

中图分类号: TQ 920.3

文献标识码: A

Fermentation Conditions Optimization and Kinetics Analysis for Cell Wall Polysaccharides Production of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch Culture

LIU Yuan-yuan, WANG Qiang*, LIU Hong-zhi

(Key Laboratory of Agricultural Product Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to further increase the production of the cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* and to better understanding of the physiological properties of cell growth, products formation and substrate consumption, the environmental conditions of *Saccharomyces cerevisiae* were optimized in 5L fermentor. Firstly, the effect of stirrer speed, pH value and temperature on biomass, glucan and mannan production were carefully investigated by single factor experiment, and the optimum fermentation conditions were determined as follows: stirrer speed 400 r/min, pH value 4, temperature 32℃. Experimental models were constructed using BP neural network to train experimental data and the BP models and fitting curves were determined. The predicted values of the models were compared with the experimental values. These models were proved to well simulate the change of biomass, sugar consumption and cell wall polysaccharides production.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, glucan, mannan, artificial neural network (ANN), BP network

收稿日期: 2009-11-26

基金项目: 中国农业科学院杰出人才基金项目。

* 通信作者: 王强(1965—), 男, 山东高密人, 农学博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事功能活性物质的研究。

Email: wangqiang365@263.net

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的细胞壁约占细胞干重的20%~30%,酵母细胞壁由29%~64%的 β -葡聚糖,31%的甘露聚糖,13%的蛋白质,9%的脂类和1%~2%几丁质组成^[1]。 β -葡聚糖具有良好的免疫调节活性,同时还具有抗氧化、降低血液中的胆固醇、促进伤口愈合等医学功效^[2]。甘露聚糖具有增强动物体液免疫和细胞免疫能力,调节肠道菌群平衡,结合吸附外源性病原菌等功能^[3]。基于酵母细胞壁多糖优良的功能性质,有关这方面研究已成为热点。

酿酒酵母发酵产多糖水平主要取决于发酵条件。王颖等人采用优化后的培养基及培养条件,酿酒酵母菌液的 OD_{600} 值和细胞密度分别比优化前提高了24.2%和22.0%^[4]。摇床转速和装液量显著影响酿酒酵母的生物量,增大摇床转速促进氧气溶解,提高生物量,但过高的转速会增加机械剪切力,产生疤点和芽痕,因此选择合适的转速十分重要^[5]。刘红芝等人优化了酿酒酵母摇瓶最佳培养条件,酵母葡聚糖生成量的影响大小依次为装液量、起始pH值、温度、接种量。优化后酵母葡聚糖质量浓度增加至1.403 mg/mL^[6]。但是,目前关于酿酒酵母发酵产细胞壁多糖的试验主要集中于摇瓶发酵方面,所以有必要利用发酵罐对其进行放大试验。

由于发酵过程高度非线性、非稳态,所以给发酵过程建模带来很多困难,传统的数学方程所描述发酵过程有一定的局限性。而人工神经网络(artificial neural network, ANN)具有处理复杂非线性系统的能力,特别是具有优良的学习能力,因此受到人们的广泛接受和认可^[7]。人工神经网络的种类很多,而反向误差传播算法(Back Propagation, BP算法又称BP网络)是应用最广泛的一种。BP网络由输入层、隐藏层、输出层组成,见图1。其基本思想是比较模型输出值与试验真实值,并将误差分摊到各层,通过不断修正内部权值使误差达到可接受的程度或预先设定的学习次数为止,从而充分逼近输入输出所确定的各种非线性函数关系^[8]。

作者对酿酒酵母产细胞壁多糖的分批发酵条件进行了优化,得到产细胞壁多糖最佳发酵条件,并利用人工神经网络对试验数据进行训练,得到了酵母细胞壁多糖发酵动力学模型。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 AS 2.0016-M; 购于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心,后经“实践八号”空间诱变返回筛选所得菌株。

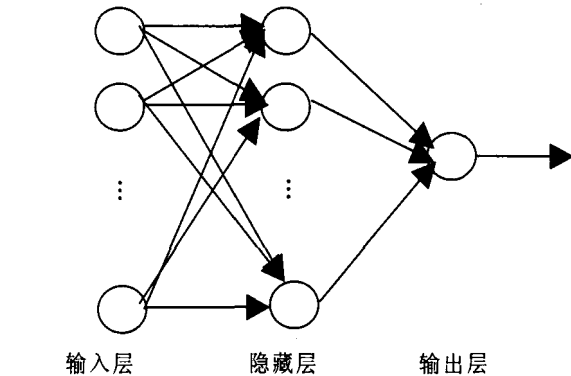


图1 BP网络结构

Fig. 1 The structure of BP network

物研究所菌种保藏中心,后经“实践八号”空间诱变返回筛选所得菌株。

1.2 培养基组成

1.2.1 斜面培养基(组分 g/dL) 葡萄糖 2,大豆蛋白胨 2,酵母膏 1,琼脂 2; 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.2.2 种子培养基(组分 g/dL) 葡萄糖 2,大豆蛋白胨 2,酵母膏 1; 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.2.3 发酵培养基(组分 g/dL) 蔗糖 5,大豆蛋白胨 4,酵母膏 3,甘油 1.6; 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.3 试剂与仪器

大豆蛋白胨、酵母膏:购自北京奥博星生物公司;蔗糖、葡萄糖:购自北京化学试剂公司;甘油:购自西陇化工有限公司;其余为国产分析纯;BIOTECH-5BG型5 L发酵罐:上海保兴生物工程公司制造;恒温振荡培养箱 HZQ-F160:哈尔滨东联公司制造;超净工作台 DL-CJ-1F:哈尔滨东联公司制造;紫外分光光度计 UV-1201:北京 BRAIC 公司制造;分析天平 TB-214:美国 DENVER 公司制造;离心机 LXJ-II B:上海安亭科学仪器厂制造;立式压力蒸汽灭菌器 YXQ-LS-30S II:上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造;微型漩涡混合仪 WH-3:上海沪西分析仪器厂有限公司制造。

1.4 培养方法

1.4.1 种子培养 250 mL 三角瓶,装液量 60 mL,于恒温振荡培养箱中培养。培养温度 28 °C、转速 200 r/min,培养时间 12 h。

1.4.2 分批发酵培养 取发酵 12 h 的种子液 60 mL 接种到 5 L 发酵罐中,装液量为 2 L,通气量为 1 vvm,培养 72 h,采用流加 H_3PO_4 、NaOH 的方式在线控制 pH 值,并定期取样测定生物量、多糖生成量及残糖质量浓度。

1.5 测定方法

1.5.1 生物量测定 4 200 r/min 离心洗净菌体 5 次,洗净后于 106 °C 烘至恒重,测定生物量^[9]。

1.5.2 残糖质量浓度测定 苯酚-硫酸法^[10]

1.5.3 酵母细胞壁多糖质量浓度测定 β -葡聚糖测定^[11], 甘露聚糖测定^[12]。

2 结果与讨论

2.1 不同搅拌转速对酵母发酵的影响

根据 1.4 的培养方法,分别考察了 200、400、600 r/min 3 个搅拌转速下酵母发酵情况的变化,见图 2。搅拌转速对酵母发酵的影响较为显著。由图 a 可知,当搅拌转速为 200 r/min 时,溶氧水平在 10 h 后就趋近于 0,无法保证菌体有足够的供氧,此时,酵母无氧发酵产生乙醇,因而细胞的产量下降。搅拌转速为 400、600 r/min 时,溶氧在前 16 h 迅速降低,40 h 附近溶氧达到最低。48 h 后,搅拌转速 600、400 r/min 的溶氧水平分别大于 90%和 50%。由图 b 可知,200 r/min 时的酵母生物量最高仅为 1 590.00 mg/dL,远低于其他转速下的生物量水平,在 600 r/min 的搅拌转速下,其生物量最高为 2 296 mg/dL,虽然溶氧始终保持较高的水平,但是较高的搅拌剪切力对酵母细胞壁产生损伤,不利于其生长代谢,另外发酵时产生大量泡沫,需要加入消泡剂,过多的消泡剂易聚集在微生物表面,大大降低氧的传递效率。而搅拌转速为 400 r/min 时,其生物量最高为 2 546.00 mg/dL, β -葡聚糖、甘露聚糖生成量最高分别为 230.32、129.41 mg/dL,均为最高,故 400 r/min 是最佳搅拌转速。

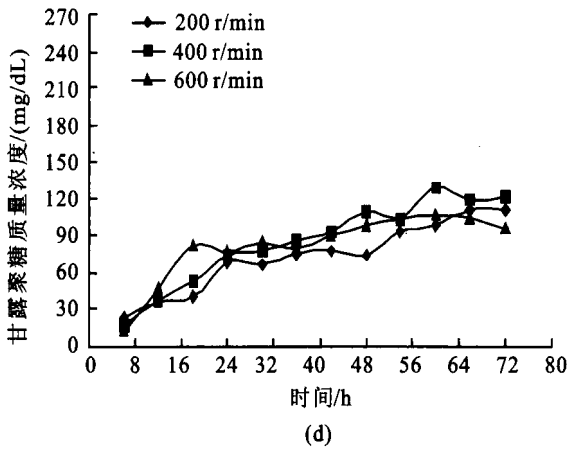
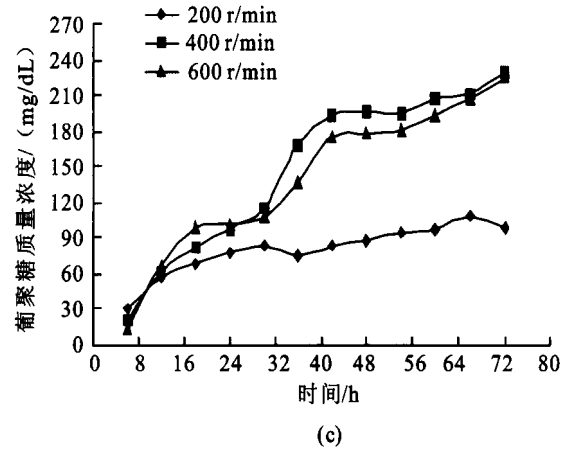
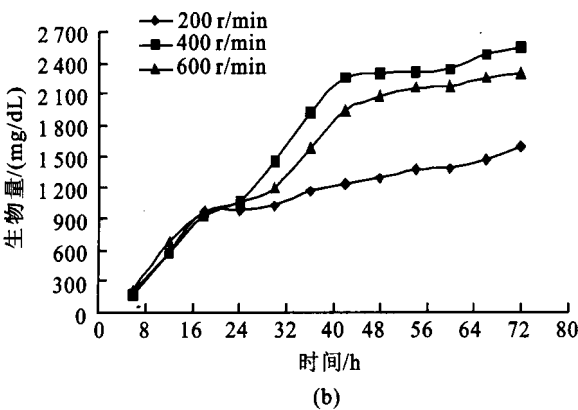
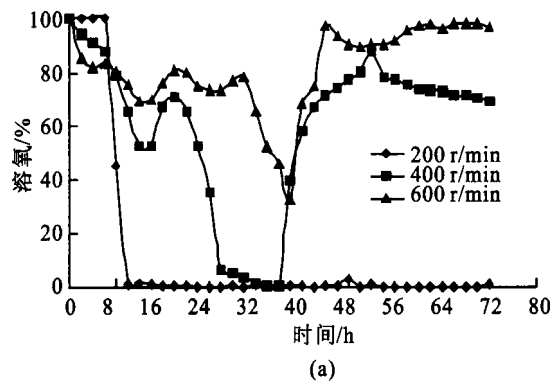


图 2 不同搅拌速度对发酵的影响
Fig. 2 Effect of different stirrer speeds on the fermentation

2.2 不同 pH 值对酵母发酵的影响

考察了不同 pH 值对酵母发酵的影响。因为酿酒酵母更容易在微酸性环境下生存,故选择的各水平 pH 值均小于 7。pH 值影响酶的活性,从而影响菌体生长和产物的合成,pH 值也会改变酵母细胞膜和线粒体膜内外两侧的氧化还原电位,从而影响离子通透、物质运输、线粒体中的氧传递、还原力的生成以及能量的代谢。由图 3 可知,当 pH 值为 4 时,酵母的生物量、 β -葡聚糖、甘露聚糖质量浓度最高分别达到 2 514.00、294.52、259.58 mg/dL,均处于最高的水平,这可能是因为微酸性的环境中,为了抵抗低渗应激,酵母的细胞结构和形态会发生变化,细胞壁增厚以维持适宜的细胞体积和膨压^[13]。而当 pH 值为 3 时,酵母生物量最高仅为 1810.00 mg/dL,远低于其他 3 个 pH 值时的生物量,说明过酸的环境使酵母胞内酶活性受到抑制,从而影响菌体对营养物质的吸收和产物的形成。

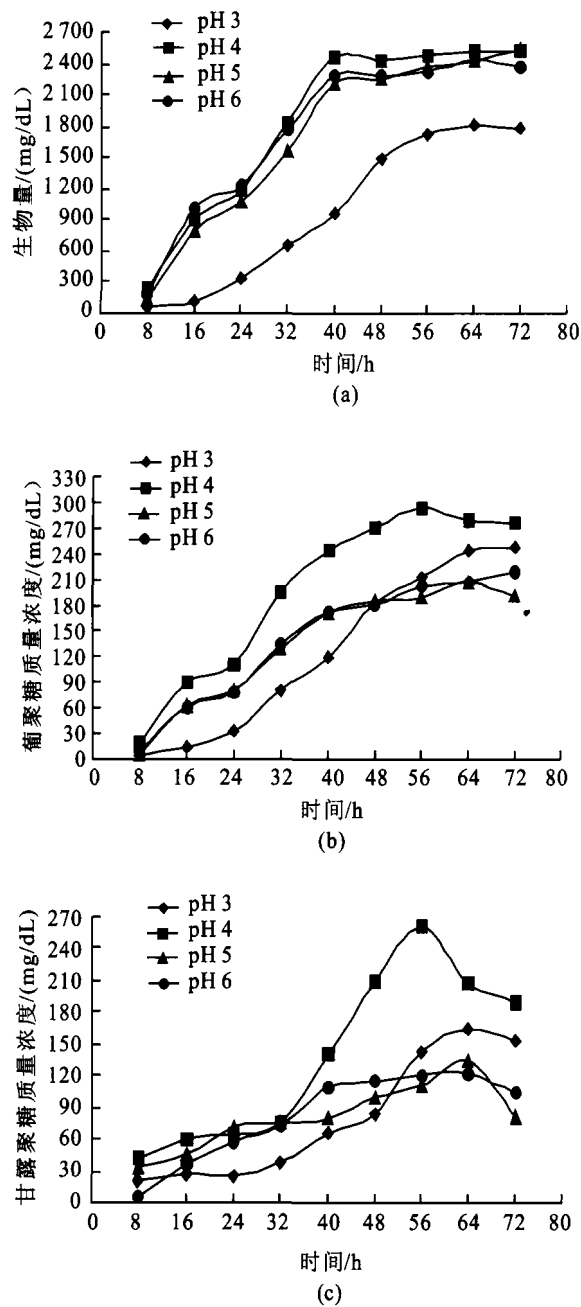


图 3 不同 pH 值对酵母发酵的影响

Fig. 3 Effects of different pH values on the fermentation

2.3 不同温度对酵母发酵的影响

温度对酵母发酵的影响是各种因素综合表现的结果。首先,温度通过影响酵母体内的各种酶反应而影响生物体的生命活动。温度升高,酶反应速度加快,生长代谢加快,产物生成增加,但温度越高,酶失活越快,菌体容易衰老,影响产物的合成。其次,温度会影响发酵液的理化性质如发酵液的黏度、氧在发酵液的溶解度和传递速率,基质的分解和吸收效率等,进而影响菌体生长和产物的合成^[14],见图 4。在 28~34 °C 范围内,温度对酵母生物量变化的影响不大,酵母生物量均能达到 2 000 mg/dL 以上,由图 a、b 可知,32 °C 时酵母生物量及葡聚糖生成量均最高,分别为 2732.00、365.16 mg/dL。

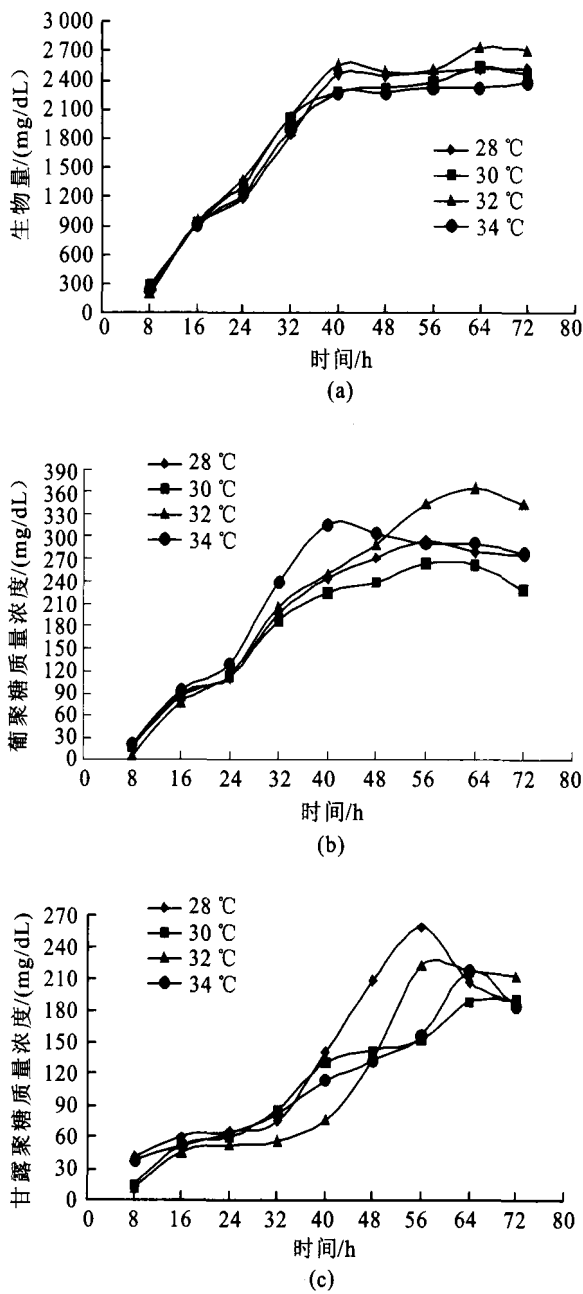


图 4 不同温度对酵母发酵的影响

Fig. 4 Effects of different temperatures on the fermentation

2.4 人工神经网络模型的建立

在 pH 值为 4, 发酵温度 32 °C, 搅拌转速 400 r/min 条件下测定 72 h 内菌体生物量、 β -葡聚糖、甘露聚糖生成量以及残糖质量浓度的变化,并利用人工神经网络建立模型。通常,人工神经网络建立模型需要以下几步:收集、分析、前处理数据;神经网络训练;训练网络的检测;使用训练的人工神经网络来仿真和预测。影响酵母发酵的最重要因素是底物质量浓度、产物质量浓度、生物量等,用这些变量就能完成建模任务。选取试验得到的 22 组数据的 19 组进行网络训练,另外 3 组数据对训练好的网络进行验证。利用 MATLAB 软件编程建立生物量、产物质量浓度、底物质量浓度的 BP 网络,其中产物质量浓度包括 β -葡聚糖及甘露聚糖生成质量

浓度,隐藏层神经元个数初步选择 5~20,经过验证神经元数目为 15 的时候误差最小,仿真效果最好。采用 $1 \times 15 \times 1, 4 \times 15 \times 1, 4 \times 15 \times 1, 4 \times 15 \times 1$ 四种三层 BP 网络结构^[15-16]。由于生物量、 β -葡聚糖、甘露聚糖生成量、残糖质量浓度 4 种输入数据值之间差距较大,为了保证神经网络运行平稳,在建立模型之前,对数据进行了归一化预处理,使变换后的数据位于 $[-1, 1]$ 之间。模型的允许误差为 0.001,最大训练次数为 1 000 次,学习速率为 0.01。

2.4.1 生物量的人工神经网络模型 以发酵时间为输入,生物量为输出的 BP 模型,拟合的最大相对误差为 3.03%,平均相对误差为 1.06%,3 组验证数据的拟合值及真实值见表 1。图 5 是生物量拟合曲线,该曲线较好地拟合了酵母生物量变化。在发酵的前 2 小时,菌体生物量增长较为缓慢,2~48 h,菌体快速生长,为对数生长阶段。发酵 54 h 时,生物量达到 2 696 mg/dL,54 h 后生物量基本趋于稳定。

表 1 生物量模型拟合值与真实值比较
Tab. 1 Comparison of model and experimental values for biomass

时间/h	生物量拟合值/(mg/dL)	生物量真实值/(mg/dL)
12	904.30	892.00
24	1709.70	1708.00
48	2 680.00	2 680.00

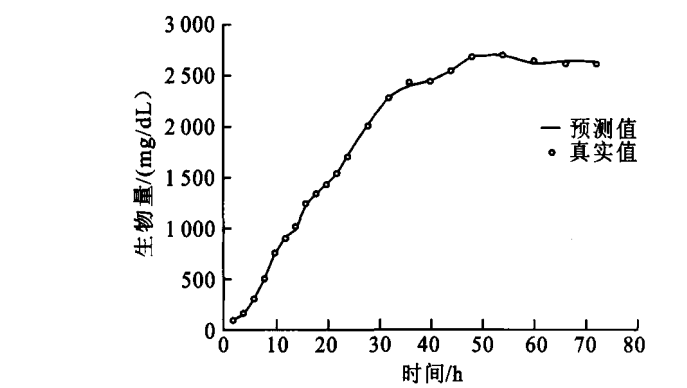


图 5 生物量拟合曲线
Fig. 5 Fitting curve of biomass

2.4.2 β -葡聚糖的人工神经网络模型 以发酵时间、生物量、残糖质量浓度、甘露聚糖生成量为输入,葡聚糖生成输出的 BP 模型,拟合的平均相对误差为 6.17%,3 组验证数据的葡聚糖生成量拟合值及真实值见表 2。图 6 是葡聚糖拟合曲线,该曲线较好地拟合了酵母葡聚糖生成变化。发酵的前 6 小时,因为菌体浓度较低,葡聚糖质量浓度增长较

为缓慢,后随着菌体细胞大量增殖,葡聚糖质量浓度也迅速增加,并在 54 h 达到最高值,后随着发酵时间延长,略有下降。

表 2 葡聚糖模型拟合值与真实值比较
Tab. 2 Comparison of model and experimental values for glucan

时间/h	葡聚糖拟合值/(mg/dL)	葡聚糖真实值/(mg/dL)
12	80.01	79.68
24	133.55	133.55
48	207.49	207.42

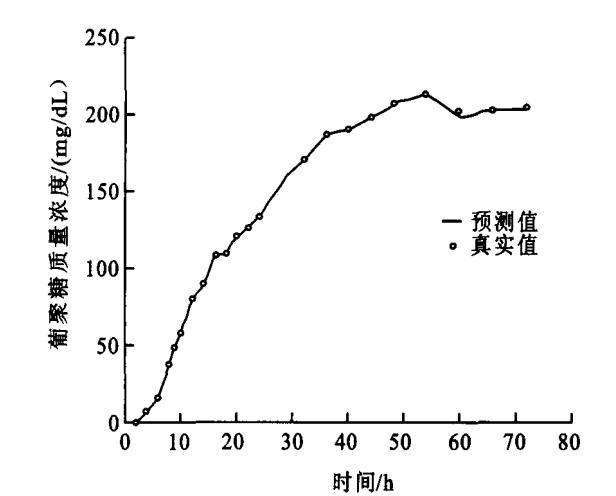


图 6 β -葡聚糖拟合曲线
Fig. 6 Fitting curve of β -glucan

2.4.3 甘露聚糖的人工神经网络模型 以发酵时间、生物量、残糖质量浓度、葡聚糖生成量为输入,以甘露聚糖生成输出的 BP 模型,最大相对误差为 5.12%,平均相对误差为 1.30%,3 组验证数据的甘露聚糖生成量拟合值及真实值见表 3。图 7 是甘露聚糖生成量拟合曲线,该曲线能较好地拟合酵母甘露聚糖生成变化。同葡聚糖一致,在前 6 小时,甘露聚糖含量增长较为缓慢,后随着菌体细胞大量增殖呈现波动增加,并于 50~56 h 达到最高值,后随着发酵时间延长,略有下降。

表 3 甘露聚糖模型拟合值与真实值比较
Tab. 3 Comparison of model and experimental values for mannan

时间/h	甘露聚糖拟合值/(mg/dL)	甘露聚糖真实值/(mg/dL)
12	65.63	65.40
24	98.97	98.20
48	130.70	132.59

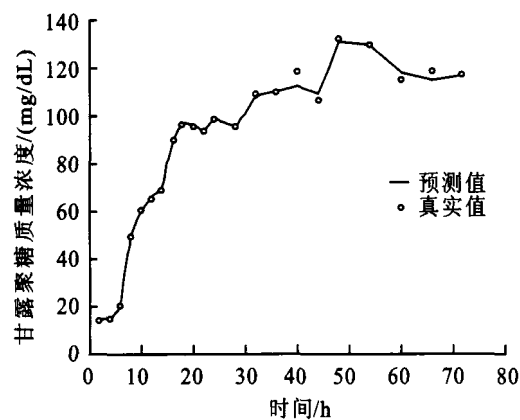


图 7 酵母甘露聚糖拟合曲线
Fig. 7 Fitting curve of mannan

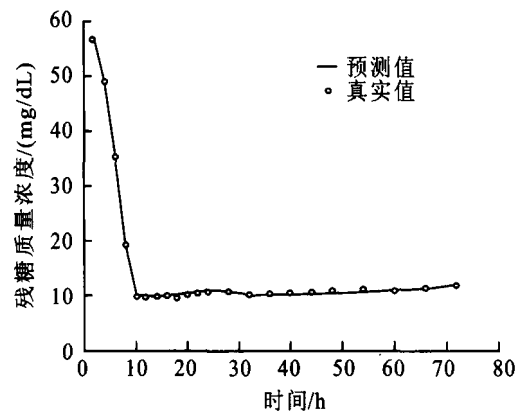


图 8 酵母残糖质量浓度拟合曲线
Fig. 8 Fitting curve of residual sugar content

2.4.4 残糖含量的人工神经网络模型 以发酵时间、生物量、甘露聚糖、葡聚糖生成量为输入,以残糖含量输出的 BP 模型,其中拟合的最大相对误差为 7.14%,平均相对误差为 0.94%,3 组验证数据的残糖含量拟合值及真实值见表 4。图 8 是残糖质量浓度拟合曲线,该曲线能较好地拟合酵母残糖质量浓度变化。由拟合曲线可知,在发酵的前 10 小时,蔗糖被迅速消耗,残糖质量浓度由 60 mg/mL 附近迅速降低到 10 mg/mL 附近,后趋于平衡,此时底物质量浓度处于较低的水平。

表 4 残糖质量浓度模型拟合值与真实值比较

Tab. 4 Comparison of model and experimental values for residual sugar content

时间/h	残糖质量浓度 拟合值/(mg/dL)	残糖质量浓度 真实值/(mg/dL)
12	9.79	9.76
24	10.62	10.59
48	10.99	10.98

3 结 语

搅拌转速对酵母发酵的影响较为显著,当转速为 400 r/min 时,能满足菌体对氧气的需求同时有较高的多糖含量。pH 值为 4 时,多糖含量最高。32 ℃时酵母生物量及葡聚糖生成量均最高。由人工神经网络拟合曲线可知,在发酵的前 10 小时,蔗糖被迅速消耗,菌体快速生长,酵母生物量增长了将近 10 倍。10 h 后残糖含量趋于平衡,β-葡聚糖、甘露聚糖质量浓度也随之迅速增加,并在 48~54 h 时达到最高。54 h 后 β-葡聚糖、甘露聚糖含量缓慢下降。此时,因为培养基中的碳源被大量消耗,底物质量浓度处于较低的水平,延长发酵时间并不能大量提高生物量及多糖生成量,反而造成成本的增加,资源的浪费,故而发酵时间控制在 54 h 左右较好。

参考文献(References):

[1] Silke C Jaehriga, Sascha Rohnb, Lothar W Krohb, et al. Antioxidative activity of (1→3), (1→6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media[J]. **LWT**, 2008, 41:868—877.

[2] 刘红芝,王强,周素梅,等. 酵母 β-葡聚糖的功能活性及其分离提取研究进展[J]. 食品科学,2006,27(11):552—556.
LIU Hong-zhi,WANG Qiang,ZHOU Su-mei, et al. Extraction and activated function of yeast β-glucan[J]. **Food Science**, 2006,27(11):552—556. (in Chinese)

[3] 刘红芝,王强,周素梅. 酵母甘露聚糖分离提取及功能活性研究进展[J]. 食品科学,2008, 29(5):465—468.
LIU Hong-zhi,WANG Qiang,ZHOU Su-mei. Research progress on extraction and activated function of yeast mannan[J]. **Food Science**,2008, 29(5):465—468. (in Chinese)

[4] 王颖,何宁,李清彪,等. 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 高密度培养条件优化研究[J]. 工业微生物,2007,37(1):34—38.
WANG Ying,HE Ning,LI Qing-biao,et al. Optimization of high cell density cultivation conditions of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Industrial Microbiology**,2007,37(1):34—38. (in Chinese)

- [5] 王亚军. 酵母培养制备(1→3)- β -D-葡聚糖方法及相关基础研究[D]. 杭州, 浙江大学, 2004.
- [6] 刘红芝, 王强, 周素梅, 等. 高含量 β -葡聚糖酿酒酵母培养条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(8): 82–85.
LIU Hong-zhi, WANG Qiang, ZHOU Su-mei, et al. Fermentation optimization for high content β -glucan of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2007, 33(8): 82–85. (in Chinese)
- [7] S K Lahiri K C. Artificial neural network model with the parameter tuning assisted by a differential evolution technique: the study of the hold up of the slurry flow in a pipeline[J]. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, 2009, 15(2): 103–117.
- [8] 张宇, 许敬亮, 袁振宏, 等. 纤维素酶水解动力学的人工神经网络模型研究[J]. 催化学报, 2009, 30(4): 355–358.
ZHANG Yu, XU Jing-liang, YUAN Zhen-hong, et al. Kinetic model study on enzymatic hydrolysis of cellulose using artificial neural networks[J]. **Chinese Journal of Catalysis**, 2009, 30(4): 355–358. (in Chinese)
- [9] Dedsousa S R, Lalue C, Miguel J. Effects of organic and inorganic additives on flotation recovery of washed cells of *Saccharomyces cerevisiae* resuspended in water[J]. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2006, 48: 77–83.
- [10] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 10–11.
- [11] 刘晓永, 王强, 刘红芝, 等. 酿酒酵母 β -D-葡聚糖测定方法的研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(2): 150–157.
LIU Xiao-yong, WANG Qiang, LIU Hong-zhi, et al. Studies on the determination of β -D-glucans in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science**, 2007, 33(2): 150–157. (in Chinese)
- [12] 张运涛, 谷文英. 紫外分光光度法测定啤酒酵母中甘露糖[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(5): 32–36.
ZHANG Yun-tao, GU Wen-ying. Determination of mannose in yeast by ultraviolet spectrometry[J]. **Food and Fermentation Industries**, 1999, 25(5): 32–36. (in Chinese)
- [13] Kayingo G, Kilian S G, Prior B A. Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypoosmotic stress [J]. **Archives Microbiology**, 2001, 177: 29–35.
- [14] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1995: 137–139.
- [15] 赵丽丽. L-缬氨酸高产菌的选育及其发酵条件研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2003.
- [16] 王莹, 孙永海, 朴美子, 等. 基于BP神经网络的羊肚菌液体发酵量化方法[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 140–142.
WANG Ying, SUN Yong-hai, PIAO Mei-zi, et al. Quantified method for morchella submerged fermentation based on BP neural network [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(1): 140–142. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)