溶氧量对以玉米培养基流加培养生产酵母的影响

李竹生[1]，宋娜[1]，牛方芳[2]
（1. 郑州职业技术学院，河南郑州 450121）（2. 郑州金成制粉工程技术有限公司，河南郑州 450001）

摘要：本文通过以玉米为培养基流加培养生产酵母过程中，用控制通氧的方法研究溶氧量对酵母细胞浓度和酵母细胞生长速率的影响，得出通氧量的控制与酵母生长的关系。结论为：溶氧量达到50%的时候，酵母细胞产率最大，达到38%。

关键词：玉米酵母；溶氧量；流加培养

文章篇号：1673-9078(2012)7-832-834

Effect of Dissolved Oxygen on Fed-batch Culture of Yeast in Maize-containing Media

LI Zhu-sheng[1], SONG Na[1], NIU Fang-fang[2]
(1.Zhengzhou Technical College, Zhengzhou 450121, China)
(2.Zhengzhou Jincheng Milling Engineering Technology Limited Company, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The effect of dissolved oxygen on the concentration of yeast cells in fed-catch culture was studied with maize as raw culture materials. Results showed that the yield of yeast reached 38% when 50% dissolved oxygen was used in the process of fed-batch culture.

Key words: maize yeast; dissolved oxygen; fed-batch culture

中华民族有着五千年的璀璨文明，形成了独特的饮食文化。馒头是中华民族的传统食品[1]。用酵母制作馒头可以保证产品的卫生与安全；酵母能够让面团发酵稳定的进行，满足了工业化生产的需求[2]。以玉米作为培养基生产酵母，是我国传统手工制作馒头酵母的方法之一。酵母为兼氧微生物，在有氧呼吸或无氧发酵条件下都会生长。在氧存在时会诱导能量代谢由发酵向呼吸转化，俗称“巴斯德效应”，这种效应提高了能量的利用效率，使之能够合成更多的酵母细胞。所以在酵母培养过程中溶氧量会对酵母产率的大小有很大的影响。研究表明，适量通氧对采用高细胞密度是必要的，推测其原因是通氧可使酵母细胞产生更多的能量，细胞结构物质得以合成和更新，细胞活力得以长久维持，提高了酵母菌体浓度[3]。本文通过研究以玉米为培养基流加培养生产酵母过程中，溶氧量对酵母细胞浓度和生长率的变化，确定最佳溶氧量。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

材料：玉米粉,脱皮脱胚玉米粉（过60目筛），购于郑州市伊河路市场；酵母，梅山酵母，中国番禺梅山-马利酵母有限公司。

试剂：α-淀粉酶（生化试剂）：邢台万达生物工程有限公司；糖化酶（生化试剂）：湖北立业生物制品有限公司；七水硫酸镁（分析纯）、磷酸二氢钾（分析纯）、肌醇（生化试剂）、硫酸亚铁（分析纯）：天津科密欧化学试剂开发中心；无水氯化钙（分析纯）：宿州化学试剂厂；硫酸铵（分析纯）：开封开化（集团）有限公司试剂厂；盐酸硫胺（生化试剂）：中国惠兴生化试剂有限公司；生物素（生化试剂）、D-泛酸钙（生化试剂）：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 设备

BMR-A10USIP 型发酵罐：上海傲中生物工程设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 玉米培养基制备[4]

将玉米粉加入3~5倍的自来水，加1.5% α-淀粉酶于pH 7.0，80 ℃下液化1 h；然后于100 ℃下煮沸10 min灭酶，调节pH至4~4.5，冷却至50~65 ℃，添加0.5%糖化酶糖化1 h；然后经过过滤、灭菌即得。

1.3.2 流加培养流程

培养温度为30 ℃，pH实施在线检测并通过不断的添加氢氧化钠和硫酸自动进行控制；接种量：一般为2%~15%，发酵开始活化（只搅拌不通气）时间为1 h左右。流加培养流程为：

收稿日期：2012-04-12

作者简介：李竹生（1978-），男，硕士，讲师，研究方向生物食品食品的研制与开发

灭菌→准备→接种→适应期→积累期→成熟期

1.3.3 溶氧量的影响

分别采用 30%，50%，80%的溶氧量来讨论溶氧量对酵母产率的影响，培养条件为：采用发酵罐流加培养的方法，营养盐 3 倍，微量元素单倍，接种量为 10%，发酵液糖度控制在 0.15%左右。

1.3.4 酵母菌细胞浓度测定[5]

制作酵母菌溶液细胞浓度标准曲线：将干酵母在 40 ℃通风干燥 5 h，配成不同浓度，用分光光度计测定吸光值，利用 Excel 软件作出标准曲线，求出回归方程。

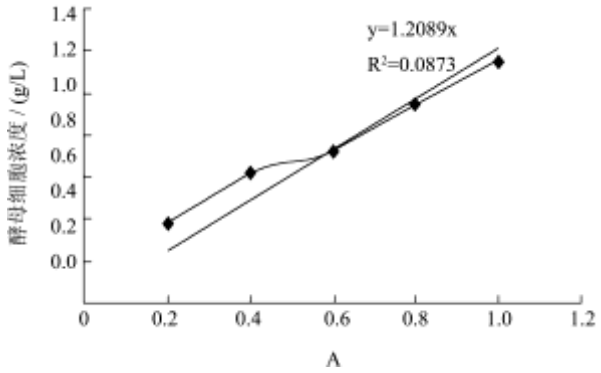


图 1 酵母细胞浓度标准曲线

Fig.1 Calibration curve of the concentration of yeast

酵母菌细胞浓度测定：取酵母菌溶液 2.5 mL 或 1 mL，3000 r/min 离心 20 min，同样条件下用蒸馏水洗涤酵母菌沉淀两次，准确量取 5 mL 蒸馏水溶解酵母菌，以蒸馏水为参比液，在 540 nm 测定吸光度值，通过标准曲线计算得酵母细胞浓度。

2 结果与讨论

在搅拌通风发酵中，好氧微生物发酵时，主要是利用溶解于水中的氧，只有当这种氧达到细胞的呼吸部位时才能发挥作用，所以增加培养基的溶解氧后，可以增加推动力，使更多的氧进入细胞，以满足代谢的需要。微生物利用空气气泡中氧的过程可分为两个阶段进行，空气中的氧首先要溶解在液体中，这个阶段叫做“供氧”；然后微生物才能利用液体中的溶解氧进行呼吸代谢活动，这个阶段叫做“耗氧”。微生物不断消耗发酵液中的溶解氧，同时通入的空气又不断地予以补充，使整个过程达到平衡[6]。

2.1 不同溶氧量对流加培养玉米酵母细胞的影响

由图 2 可知，通氧与否对发酵过程中菌体的生成量有很大的影响。当溶氧量为 50%时酵母的细胞浓度要远远高于溶氧量为 30%和，最终细胞浓度达到了 38.10 g/L。而通氧量为 30%时细胞浓度最大只有 11.62 g/L，过低的溶解氧，首先影响微生物的呼吸，进而造成代谢异常；同时不利于代谢产物的合成，因为溶解氧不仅为生长提供氧，同时也为代谢供给氧，并造成一定的微生物的生理环境，它可以影响培养基的氧化还原电位[7]。但当溶氧量为 80%时，过多的氧气并没有使酵母细胞浓度升高，反而细胞浓度也在较低的水平，分析其原因，过量的通氧造成了细胞的分解和自溶，并且在控制较高溶氧时，不仅要提高通气量、搅拌转速，并且还要通入纯氧，使得生产成本大为增加[8]。

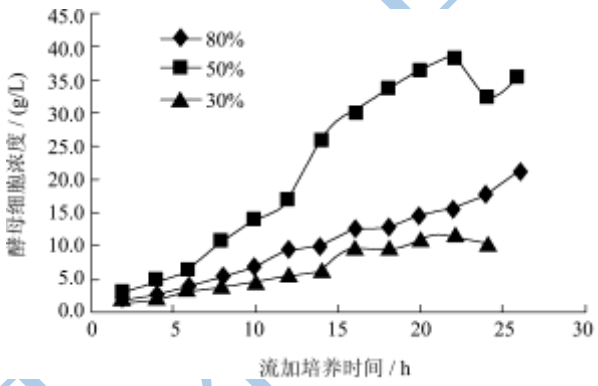


图 2 不同溶氧量的流加培养中细胞浓度的变化

Fig.2 Effect of dissolved oxygen on the concentration of yeast

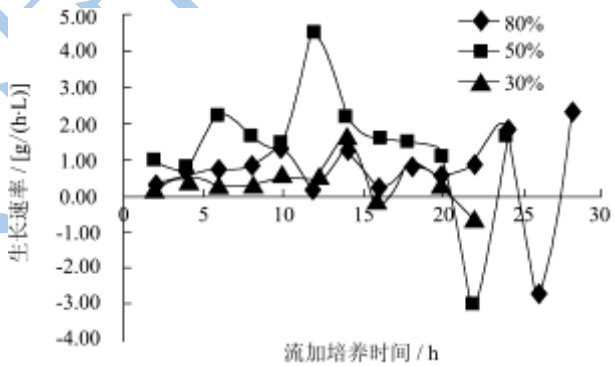


图 3 不同溶氧量的流加培养中细胞生长速率的变化

Fig.3 Effect of dissolved oxygen on the cell growth rate

从图 3 可知，在发酵的开始阶段，通氧量为 50%的生长速率都较其它两种高，说明过高或者过低的溶氧都对酵母生长不利。通氧量为 50%的生长速率在第 12 h 时达到最高水平为 4.51 g/(h·L)，之后就开始降低，到第 22 h 时甚至出现负值；溶氧 80%的负值较其它两种出现较晚，分析其原因，是由于较大的通氧量最终细胞数量相对较少，抑制作用不明显，但是过长的发酵时间对细胞生长不利。

2.2 菌体的生长同溶氧量的关系

从以上试验可知，合适的溶氧量可以促进酵母细胞的生长，采用 50%的溶氧量研究溶氧与酵母细胞生长的关系。

菌体发酵过程中通过自动提高或降低搅拌转速将溶氧控制在 50%，由 4 可知，在菌体培养的开始阶段，

即酵母的适应期，搅拌转速设为100 r/min，通气量为2 L/min，此时溶氧浓度为100%。培养30 min左右细胞即进人对数生长期，细胞比生长速率高，营养基质消耗快，细胞浓度不断增大，表现在细胞对氧的需求旺盛，培养3h后，培养液中溶氧迅速下降到50%左右，因此必须通过不断提高转速及通氧量来满足酵母增加对氧的需求。培养10h，菌体对氧的需求达到最大值，将转速提高到459 r/min，通氧量为7 L/min，但是此时仍然不能保证酵母细胞的需氧量，因此需要通入纯氧，但是由于纯氧不安全，未采用此措施。由于在反应的后期，较大的转速会产生大量泡沫，将转速设为350 r/min，最终细胞的OD值最大达到38.25 g/L。之后细胞比生长速率降低，细胞增殖速度减慢，对氧的需求也逐渐降低，搅拌转速逐渐下降。愈来愈多的事实表明：氧的供应不足可能引起生产菌种的不可弥补的损失或可能导致细胞代谢转向不需的化合物的产生。由于菌体的新陈代谢与氧气呼吸有关，调节通风和搅拌，可影响发酵周期时间的长短和代谢产物生成的高低。而了解长菌阶段和代谢产物形成阶段的最适需氧量，就可能分别地合理地供氧，因此，溶解氧的控制是及其重要的[3]。

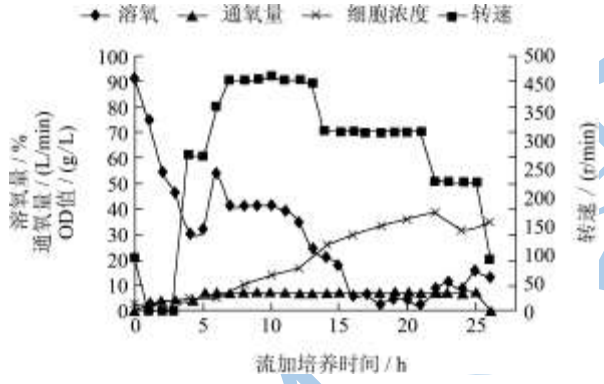


图4 溶氧的控制同菌体生长的关系

Fig.4 The relation of dissolved oxygen and the cell growth rate

2.3 溶氧量对酵母产率的影响

由表1可知，溶氧量对酵母的生长有很大的影响，30%溶氧量的酵母细胞重量只有34.83 g/L，产率只有15%；当溶氧量为50%时，细胞重量为99.81 g/L，高出167.51%，产率也比较高，为38.10%；但是当溶氧量为80%时，细胞重量没有继续增加，反而下降。这有可能是由于通气量的增加，相应的发酵醪运动的剪切力会增加，对酵母细胞造成损伤。虽然气升式反应器剪切力较小，酵母细胞壁也较厚，但在出芽点处和疤点处酵母细胞壁依然薄弱，高的搅拌速度，会造成高的剪切力和高的湍流强度，容易由剪切力引起机械损伤，影响细胞的生长和代谢[9]。所以采用50%的溶氧量为最终发酵条件。

表1 不同溶氧量的细胞产率比较

Table 1 Effect of dissolved oxygen on the cell yield

溶氧量/%	糖浓度/°Be	流加糖体积/mL	酵母重量/(g/L)	产率/%
30	15	431	34.83	15.23
50	15	1100	99.81	38.14
80	15	670	70.32	31.09

3 结论

实验结果表明：以玉米粉为培养基流加培养生产酵母过程中，当溶氧量为50%时，酵母细胞的浓度达到38.10 g/L；生长速率在第12 h时达到最高水平为4.51 g/(h·L)；酵母细胞的产率达到38.14%，因此采用50%的溶氧量为最终发酵条件。

参考文献

[1] 吕鸿雁,陈叶福,周大伟,等.产谷胱甘肽面包酵母的选育及发酵条件优化研究[J].现代食品科技,2011,27(5):559-563

[2] 陈娜,乔长晟,胡玉霞,等.面包酵母中谷胱甘肽抽提方法的研究[J].现代食品科技,2008,24(2):157-160

[3] 何向飞,张梁.利用溶氧控制策略进行高密度和高强度乙醇发酵的初步研究[J].食品与发酵工业,2008,34(1):22-23

[4] 李寅,陈坚等. 高发酵活力面包酵母的高产率流加培养策略研究[J].生物工程学报,1997,13 (2):160-167

[5] 郑铁松,龚院生.生化实验指导[M].河南医科大学出版社,1996

[6] 王秀道.啤酒酵母的干燥和利用[J].酿酒科技,1998,1:70-71

[7] Mori. H. J. Ferment Technol., 1983, 61 (4): 391-401

[8] 张建勇,王晓港.溶氧对重组毕赤酵母高密度发酵生产腺苷蛋氨酸的影响[J].齐鲁药事,2007,26(7):428-429

[9] 刘振,刘普.CO_2通气量对酵母细胞生长的影响[J].酿酒科技,2008,5:50-52