

# Закономерности роста и размножения хлебопекарных дрожжей на бесприточных стадиях технологического процесса накопления биомассы

Т.В. МЕЛЕДИНА, КХАЛИЛ МУХАННАД  
СПбГУНиПТ

*The work shows that the amount of inoculation determines the intensity of multiplication of yeasts ( $\mu$ ). The reverse dependence between the amount of inoculation, weight of cells and the content of RNA and protein in them is shown. It was found that the yield of biomass during cultivation of yeast on the stage without tributaries doesn't depend upon the strain peculiar features of the yeasts.*

Процесс накопления биомассы при производстве хлебопекарных дрожжей включает ряд бесприточных стадий, когда все питательные компоненты вносят единовременно в начале процесса культивирования. При этом исходная концентрация сбраживаемых сахаров настолько велика, что преобладает спиртовое брожение. В данных условиях с точки зрения регулирования процесса культивирования хлебопекарных дрожжей необходимо выяснить:

- ✓ влияние величины засева на физиологическую активность дрожжей, и прежде всего на удельную скорость их роста;
- ✓ взаимосвязь между начальной концентрацией дрожжей в аппарате и выходом биомассы;
- ✓ влияние концентрации сбраживаемых сахаров на выход биомассы при использовании различных штаммов хлебопекарных дрожжей.

В работе использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штаммы Л-128, ЛВ-7, ЛК-14 и Л-2. Эти штаммы хорошо изучены и нашли широкое применение в хлебопекарной промышленности.

Для культивирования дрожжей использовали мелассу, физико-химические показатели которой приведены в табл. 1.

Для определения содержания белка в клетках использовали модифицированный метод Лоури, по которому измерение окраски производят на фотоэлектрокалориметре при 656 нм в кювете толщиной 5 мм. Стандартный график строят по раствору чистого препарата альбумина человеческой сыворотки фирмы «Reanal» (Венгрия).

Содержание РНК определяли спектрофотометрически по методу А.С. Спирина [5]. Для этого к 1 мл

дрожжевой суспензии, содержащей не более 20 мг (по сырой массе) биомассы, добавили 0,25 мл охлажденной 1 н.  $HClO_4$  и после 20 мин выдержки при 0 °C на ледяной бане пробу центрифугировали, осадок дважды промывали 2 мл охлажденной 0,2 н.  $HClO_4$ . К осадку добавляли 1 мл 1 н. KOH, пробу помещали в термостат при 37 °C на 18 ч или кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Супернатант сливали в мерную пробирку. Осадок дважды промывали 2 мл 1 н.  $HClO_4$ , после чего в нем спектрометрическим методом определяли содержание РНК [4].

Для того чтобы проследить за размножением дрожжей, пробы отбирали через различные в зависимости от поставленной задачи промежутки времени ( $\Delta t = 0,5 \dots 4$  ч) и рассчитывали удельную скорость роста дрожжей по формуле

Таблица 1  
Физико-химические показатели мелассы

Показатель	Допустимые пределы		
	Минимум	Оптимум	Максимум
Сухие вещества, %	71,0	74,0	85,0
Сумма сбраживаемых сахаров, %	40,0	46...50	57,0
Инвертный сахар, %	0,1	—	1
Общий азот, %	0,5	Не менее 1,4	2,1
Аминный азот, %	0,1	Не менее 0,3	0,5
Оксись калия, %	2,0	Не менее 3,5	5,0
Сумма оксидов кальция и магния, %	0,1	Не более 1	1,5
pH	4,9	6,5...8,5	8,5

Таблица 2

Показатели процесса культивирования дрожжей на мелассе при разной величине засева

Показатель	Расход посевного материала, % от сахара (% от $M_{46}$ )			
	0,11 (0,05)	1,1 (0,5)	4,4 (2,0)	11,0 (5,0)
Выход, % от расхода сахара	46,2	42,8	45,2	43,7
Выход, % от $M_{46}$	22,3	19,7	20,8	20,1
$\mu, \text{ч}^{-1}$	0,354	0,293	0,274	0,172
Время удвоения, ч	1,8	2,4	2,5	4,02
Длительность, ч	17	13	10	7

где  $X_0 (\Delta_0)$  – количество дрожжей в момент засева,  $\text{кг}/\text{м}^3$  (кг);  $X (\Delta)$  – количество дрожжей через время  $t$ ,  $\text{кг}/\text{м}^3$  (кг).

Глубину исчерпания субстрата оценивали по количеству потребленного сахара. Эффективность использования сахара определяли по величине экономического коэффициента. Экономический коэффициент, или выход биомассы, рассчитывали путем деления урожая клеток, содержащих 25 % сухих веществ, на количество потребленного субстрата (сахара или мелассы с содержанием 46 % сахара) и выражали в %.

#### Влияние величины засева на репродуктивную активность хлебопекарных дрожжей

Практически, согласно представлениям Рихардса [2], размер инокулята может быть уменьшен до ничтожно малой величины, вплоть до одной клетки, но при этом необходимо создать оптимальные условия для ее развития. Однако сложность будет состоять в том, что с уменьшением дозы инокулята длительность культивирования может увеличиться на неопределенно долгое время.

Сведения, приведенные в литературе, не позволяют установить зависимости выхода биомассы клеток сахаромицетов и их физиологической активности от расхода посевного материала.

В опытах варьировали расход посевного материала в пределах 0,05 – 5 % в расчете на мелассу с содержанием 46 % сахара, или 0,11 – 11,0 % в расчете на сахар. Выбор интервала изменения расхода посевного материала диктуется практикой накопления посевного материала пивных и хлебопекарных дрожжей. Мелассная среда содержала 5,75 % сбраживаемых сахаров, 1,06  $\text{кг}/\text{м}^3$  сульфата аммония, 0,88  $\text{кг}/\text{м}^3$  диаммонийфосфата (соли азота и фосфора давали из расчета содержания в дрожжах азота 4 %,  $P_2O_5$  – 2,0 %), биотина – 10 мкг/л.

Из результатов, приведенных в табл. 2, видно, что величина инокулята при выращивании дрожжей на мелассной среде не влияет на выход биомассы, тогда как удельная скорость роста и длительность процесса, естественно, находятся в тесной зависимости от этого параметра.

Принято считать, что величина удельной скорости роста отражает физиологическое состояние клеток и их репродуктивную активность [2]. В связи с этим проследили за кинетикой изменения удельной скорости роста (рис. 1) и за биосинтети-

ческой активностью дрожжей (табл. 3 и 4) в ходе культивирования при разной величине инокулята. В одном случае начальная концентрация дрожжей ( $\Delta_{25}$ ) в ферментере составляла 0,07  $\text{кг}/\text{м}^3$ , или 0,11 % от сахара; во втором – 2,8  $\text{кг}/\text{м}^3$ , или 4,4 % от сахара (табл. 2).

Для изучения кинетики изменения удельной скорости роста необходимо прежде всего выбрать интервал между двумя измерениями концентрации биомассы. Это связано с тем, что удельная скорость роста ( $\text{ч}^{-1}$ ) есть отношение общего прироста численности популяции в единицу времени к численности популяции в данный момент времени:

$$\mu = dX/dt X. \quad (1)$$

Однако на практике рассчитывают не мгновенные значения удельной скорости роста, а некоторую среднюю конечную величину:

$$\mu = \Delta X / \Delta t X. \quad (2)$$

Васильев с соавт. [1] предлагает при выборе этого интервала (ч) пользоваться следующим правилом:

$$\Delta t = 0,2/\mu. \quad (3)$$

Исходя из этого, в первом случае отборы проб необходимо делать каждые 0,6 ч, во втором – 0,8 ч. Для удобства был взят один интервал времени 0,5 ч. В результате проведения экспериментов установлено, что изменение экономического коэффициента (рис. 2), так же как и удельной скорости роста (рис. 1), носит колебательный характер, причем амплитуда и



Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста от величины засева



Рис. 2. Изменение экономического коэффициента в зависимости от величины засева

частота колебаний зависит от концентрации дрожжей (рис. 3).

Ранее другие авторы [3] в ходе периодического культивирования микроорганизмов, и в частности *S. cerevisiae*, наблюдали асцилляции в содержании липидов, ненасыщенных жирных кислот, эргостерина, интенсивности поглощения кислорода, однако это не связывали с изменениями удельной скорости роста в ходе выращивания и с величиной засева. Несомненно, что причины этих асцилляций связаны со стадиями клеточного цикла.

В результате исследований установлено, что начиная с 12 ч в первом и с 4 ч во втором варианте, т.е. когда концентрация биомассы составляет 10...12 кг/м<sup>3</sup> (рис. 3), резко уменьшаются амплитуда и частота колебаний  $\mu$ , что свидетельствует о десинхронизации культуры.

Наличие двух разных физиологических состояний в ходе экспоненциального роста популяции наглядно видно при построении кривых роста в полулогарифмическом масштабе. Для первого участка кривой  $\mu_{\max} = 0,38 \text{ ч}^{-1}$  при  $X_0 = 0,07 \text{ кг/м}^3$  и  $\mu_{\max} = 0,37 \text{ ч}^{-1}$  при  $X_0 = 2,8 \text{ кг/м}^3$ . Для второго участка значения  $\mu_{\max}$  ниже и равны соответственно 0,185 и 0,173 ч<sup>-1</sup>. Снижение скорости роста нельзя связать с недостатком питательных компонентов, так как концентрация их намного превышает потребности дрожжей. Причиной может являться как недостаток растворенного в среде кислорода, так и ингибирующее влияние накопившегося в среде спирта, концентрация которого составляет к моменту перехода клеток



Рис. 3. Зависимость удельной скорости роста дрожжей от содержания дрожжей в культуральной жидкости

из одного физиологического состояния в другое 0,6 – 0,8 %.

Следует обратить внимание, что изменение всех показателей, характеризующих процесс, а также изменение биохимического состава клеток наблюдаются независимо от величины засева при одной и той же величине соотношения между количеством оставшегося в среде сахара и накопившимися к данному моменту времени дрожжами. Эта величина составляет 2,7... 3,2 кг/кг.

#### Влияние величины засева на биохимический состав дрожжей

На ряде микробных объектов показано, что физиологическое состояние клеток, их репродуктивная способность определяются содержанием в них белка и РНК и коррелируют с удельной скоростью роста. Было обнаружено (табл. 3 и 4), что переход сахаромицетов из одного физиологического состояния в другое характеризуется изменением массы клеток и содержания в них (в расчете на миллиард клеток) РНК и белка и не зависит от величины засева. Так, при малой величине инокулята ( $X_0 = 0,7 \text{ кг/м}^3$ ) содержание белка в переходный период составляет 9,09 мг/10<sup>9</sup> клеток, а РНК – 3,42 мг/10<sup>9</sup> клеток; при начальной концентрации дрожжей 2,8 мг/л количество белка и РНК соответственно равно 8,95 и 3,03 мг/10<sup>9</sup> клеток.

#### Влияние штамма дрожжей на выход биомассы

Анализ результатов, приведенных выше, позволяет сделать заключение о том, что на бесприочных стадиях в среде с высокой концентрацией сахара, когда в энергетическом обмене клеток преобладает гликолиз, процессы, связанные с накоплением биомассы и интенсивностью размножения клеток различных штаммов хлебопекарных дрожжей, должны иметь много общего.

В литературных источниках приводятся сведения относительно влияния концентрации сахара на экономический коэффициент, однако общим является лишь то, что при концентрации сахара менее 0,01 % выход биомассы составляет 216 % в расчете на дрожжи с 25 % СВ и сахар. В связи с этим было изучено влияние концентрации сбраживаемых углеводов в производственных средах, а именно в мелассном и солодовом сусле, на выход биомассы. Исследования проводили при температуре культивирования 30 °C, pH среды поддерживали на уровне 4,5 ± 0,2. Для построения графиков (рис. 4 и 5) объединены результаты, полученные для штаммов хлебопекарных дрожжей ЛВ-7, ЛЯ и Л-128.

На рис. 4 и 5 видно, что при использовании соло-

Таблица 3

Масса клеток и содержание в них белка и РНК при начальной концентрации дрожжей в аппарате  $X = 0,07 \text{ кг}/\text{м}^3$

Показатель	Длительность культивирования, ч					
	0	6	8	10	12	15
Масса $10^9$ клеток, мг СВ	37,5	53,4	44,9	30,5	29,8	34,1
Число клеток в 1 г дрожжей с 25 % СВ, $10^9$	6,7	4,7	5,6	8,2	8,4	7,3
Белок	% от СВ	28,3	36,9	32,4	35,5	32,5
	мг/ $10^9$ клеток	10,6	19,7	14,6	9,09	11,2
РНК	% от СВ	7,6	9,8	11,7	13,3	7,6
	мг/ $10^9$ клеток	2,85	5,23	5,29	3,42	2,63

Таблица 4

Масса клеток и содержание в них белка и РНК при начальной концентрации дрожжей в аппарате  $X = 2,8 \text{ кг}/\text{м}^3$

Показатель	Длительность культивирования, ч				
	0	2	4	7	
Вес $10^9$ клеток, мг СВ	37,5	28,1	29,7	27,4	
Число клеток в 1 г дрожжей с 25 % СВ, $10^9$	6,7	8,9	8,4	9,1	
Белок	% от СВ	28,3	31,8	31,3	33,4
	мг/ $10^9$ клеток	10,6	8,95	9,31	8,80
РНК	% от СВ	7,6	10,8	10,6	10,4
	мг/ $10^9$ клеток	2,85	3,03	3,15	2,73

дового сусла, которое имеет меньшую цветность, чем меласса, выход биомассы на 6 – 7 % выше, нежели на мелассном сусле. Следует обратить внимание, что выход биомассы на беспри точных стадиях не зависит от штаммовых особенностей дрожжей.

Таким образом, в периодической культуре накопление дрожжей на углеводном субстрате характеризуется двумя фазами экспоненциального роста, которые не связаны с явлением диауксии, т.е. с переходом на потребление другого субстрата (см. рис. 1).

Независимо от величины засева  $\mu_{\max}$  для первого участка составляет  $0,37 \dots 0,38 \text{ ч}^{-1}$ , для второго –  $0,17 \dots 0,18 \text{ ч}^{-1}$ . Величина засева определяет длительность первого участка экспоненциальной фазы роста, в то время как продолжительность второго участка не зависит от начальной плотности популяции.

Снижению удельной скорости роста предшествуют уменьшение массы клеток и изменение со-



Рис. 4. Зависимость выхода биомассы от содержания сахара в солодовом сусле

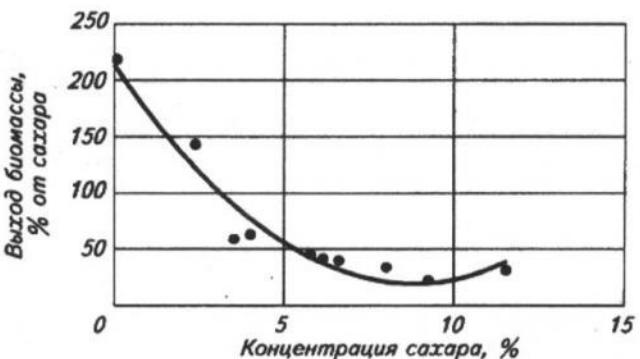


Рис. 5. Зависимость выхода биомассы от содержания сахара в мелассном сусле

держания в них белка и РНК в расчете на миллиард клеток при относительно постоянной величине содержания этих компонентов в биомассе (в % от СВ). Показано, что существует обратная зависимость между величиной засева, массой клеток и содержанием в них РНК и белка. Исходя из этого, сделан вывод, что чем меньше величина засева, тем выше репродуктивная активность полученных дрожжей.

Выход биомассы при культивировании дрожжей на беспри точной стадии не зависит от штаммовых особенностей дрожжей и определяется при прочих равных условиях только концентрацией сбраживаемых сахаров в сусле в момент внесения посевного материала.

#### Список литературы

- Бирюков Б.В. Практическое руководство по применению математических методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий в многофакторных процессах. – Рига: Зиннатне, 1969.
- Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – Мир, 1978.
- Позмогова И.Н. Ответные реакции микроорганизмов на периодически изменяющиеся условия // IV Вс. конф. «Управляемое культивирование». – Пущино, 1986.
- Пулкова В.И., Сальников С.П. Количественное определение кислот, белка, углеводов и липидов в биомассе микроорганизмов // Биотехнология. 1985.
- Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23, № 5.