

Исследование влияния некоторых факторов на кинетику роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при периодическом культивировании

Д-р техн. наук, акад. МАХ В.Б ТИШИН, К. АЛЬСААД, М.М. КХАЛИЛ

Санкт-Петербургский государственный университет низкотемпературных и пищевых технологий

*This research produces the equation of kinetics of growth of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Unknown parameters, which enter in the equation of kinetics, had determined experimentally through a cultivation of yeast in the fermenters of bubbling, by periodical method without providing substratum to the fermenter.*

В последние два десятилетия стала развиваться технология производства пекарских дрожжей при высоких концентрациях биомассы в культуральной среде. Так, в работе [4] указывается на возможность достижения конечной концентрации биомассы $x_k = 100\ldots120 \text{ кг АСБ}/\text{м}^3$ (АСБ – абсолютно сухая биомасса) при начальной концентрации $x_0 = 12,5\ldots73,3 \text{ кг АСБ}/\text{м}^3$. Было указано также, что, несмотря на падение почасового прироста биомассы α от 1,2 до 1,06 (падение удельной массы скорости μ от 0,25 до 0,064 1/ч), с ростом концентрации биомассы и снижением кратности разбавления мелассы продуктивность процесса возрастала. То есть увеличение конечной концентрации и снижение кратности разбавления экономически выгодно. Следует отметить, что эти результаты были получены при культивировании дрожжей доливным методом в высокоинтенсивном струйно-инжекционном аппарате (КСИА), отличающемся от применяемых в настоящее время на большинстве отечественных и зарубежных дрожжевых заводов барботажных ферментеров более высокими массообменными характеристиками.

Наряду с положительными сторонами КСИА имеет один существенный недостаток, связанный с затратами энергии на циркуляцию жидкости и создание высокой кинетической энергии жидкой струи, обеспечивающей в зоне аэрации культуральной жидкости высокую степень турбулентности и, как следствие этого, высокие скорости массообмена между газом и жидкостью и жидкостью и клеткой. Если к тому же учесть, что время пребывания жидкости в емкости-накопителе биомассы не должно превышать 40–60 с, то становится очевидным – применение КСИА ограничено сравнительно малыми объемами. Например, если попытаться использовать струйную аэрацию в существую-

щих барботажных аппаратах объемом 200 м³, то при необходимом напоре насоса 15–20 м вод.ст. мощность двигателя (при КПД, равном 0,7) должна быть равна 950…1400 кВт. Установка оборудования такой мощности на дрожжевых заводах весьма сомнительна. Поэтому работа КСИА возможна при объеме аппарата не более 20…30 м³, т.е. он может быть задействован на стадии производства чистых культур дрожжей, что также немаловажно, так как рост конечной концентрации требует увеличения количества засевной культуры.

Указанные обстоятельства заставляют задуматься над тем, а нельзя ли провести культивирование при высоких концентрациях биомассы в обычных, применяемых на заводах барботажных аппаратах, основное достоинство которых заключается в простоте и надежности? Какие условия для этого необходимо создать? Для ответа на поставленные вопросы требуются теоретические и экспериментальные исследования кинетики культивирования дрожжей с целью выяснения влияния на скорость прироста биомассы различных факторов: кратности разбавления мелассы, расхода воздуха, начальной и конечной концентрации, методов культивирования.

С целью определения общих кинетических закономерностей развития дрожжевых клеток необходимо провести исследования по культивированию периодическим методом, без подачи субстрата, на модели барботажного дрожжерастительного аппарата, ограничиваясь на первой стадии установлением влияния на скорость прироста биомассы только кратности разбавления мелассы и расхода воздуха. Такие исследования были выполнены в аппарате объемом $V_c = 0,007 \text{ м}^3$, кратность разбавления мелассы K_p бралась равной 4,4; 8,4; 20,4 кг культуральной среды/кг M_{46} (M_{46} – количество стандартной мелассы, содержащей 46 % сахара,

кг); удельный расход воздуха $q_v = 31,43; 92,85$ и $213,3 \text{ м}^3/\text{ч} \cdot \text{м}^3$ среды); температура культивирования поддерживалась постоянной в пределах $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Начальная концентрация биомассы при заданной кратности разбавления мелассы рассчитывалась по формуле

$$x_h = M_{46} A / V,$$

где $A = 8\%$ – величина засева дрожжей, % от количества стандартной мелассы;

V – объем культуральной жидкости в аппарате, м^3 .

В опытах использовалась нестандартная меласса с массовой долей сахара 47,2 %. При обработке экспериментальных данных время лаг-фазы и стационарного роста (если таковые имели место) во внимание не принималось.

Во время опытов через каждый час отбирались пробы на определение концентрации биомассы и сахара. Эксперименты показали, что изменение концентрации биомассы во времени зависит как от кратности разбавления мелассы, так и от расхода воздуха. На рис. 1 представлены наиболее характерные результаты измерений x и концентрации субстрата S .

Из опытных данных находились локальные значения удельной скорости роста клеток по формуле

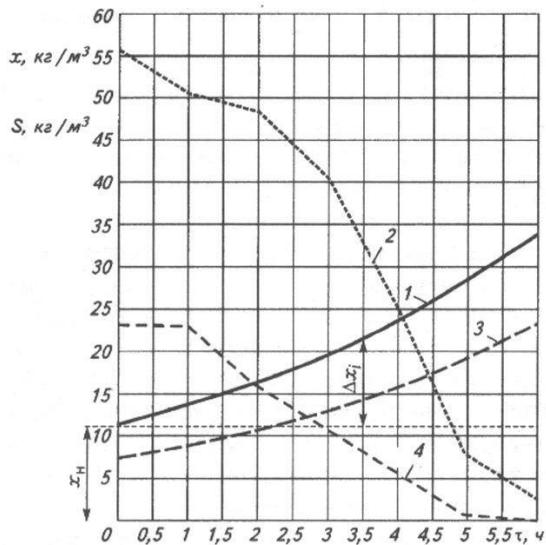


Рис. 1. Изменение концентрации дрожжей (влажность 75 %) и сахара во времени при периодическом культивировании:

$$q = 92,85 \text{ ч}^{-1}; K_p = 8 \text{ кг/кг}, 1 - x, 2 - S; K_p = 20 \text{ кг/кг}, 3 - x, 4 - S$$

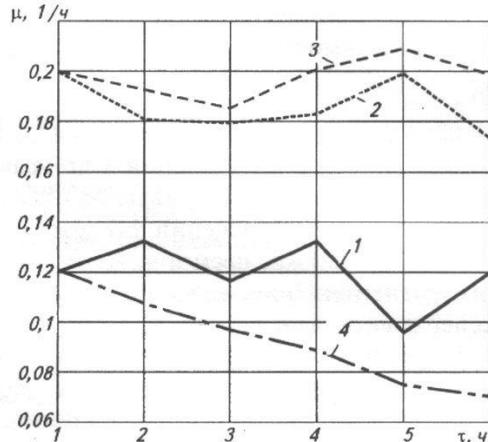


Рис. 2. Изменение локальной удельной скорости во времени:

$$q = 92,85 \text{ ч}^{-1}; 1 - K_p = 4, 2 - K_p = 8, 3 - K_p = 20; q = 31,43 \text{ ч}^{-1}; 4 - K_p = 4$$

$$\mu = \ln \frac{x_{i+1}}{x_i} \frac{1}{\Delta \tau},$$

где $\Delta \tau = 1 \text{ ч}$;

x_i и x_{i+1} – значения концентраций в предыдущей и поступающей пробах соответственно.

На рис. 2 в графическом виде представлены зависимости μ от τ . Обращает на себя внимание в большинстве случаев колебательный характер изменения значений μ , обусловленный, видимо, цикличностью размножения популяции клеток, что отмечалось и в других работах [5].

Последнее, скорее всего, связано с падением концентрации субстрата и накоплением этанола.

Строгой зависимости между локальной удельной скоростью и концентрацией субстрата установить не удалось. Обработка опытных данных по формуле Моно

$$\mu = \mu_m [S/(K_S + S)] \quad (1)$$

показала, что константа насыщения K_S не является величиной постоянной и зависит от условий культивирования. Этот факт не нов и подтверждается многими исследователями [1, 2].

При расчетах по формуле (1) за максимальную скорость принималось в одном случае наибольшее значение μ в данном опыте, в другом – среднее $\bar{\mu}$, которая находилась из уравнения

$$x_b = \frac{x_i}{x_h} = e^{\bar{\mu} \tau}. \quad (2)$$

Как в том, так и другом случае K_S менялась в широких пределах и никакой зависимости изменения K_S от расхода воздуха и кратности разбавления мелассы не прослеживалось.

Для расчета $\bar{\mu}$ в уравнении (2) была получена эмпирическая зависимость

$$\bar{\mu} = aK_p^b, \quad (3)$$

где $a = 0,0257q^{0,247}$; $b = 0,387$.

Точность расчета при определении x по уравнениям (2) и (3) невелика. Максимальное отклонение экспериментальных значений x от расчетных составляет 30 %. Однако, несмотря на этот недостаток, из уравнения (3) все же видно, что $\bar{\mu}$ в пределах эксперимента зависит от q и K_p . Скорее всего, причина этого кроется в связи $\bar{\mu}$ с физическими свойствами среды (плотность, вязкость, коэффициент диффузии, осмотическое давление) и гидродинамической обстановкой в аппарате, которые влияют на условия массообмена как между жидкостью и воздухом, так и клеткой и жидкостью.

В поисках более удачного вида уравнения, описывающего кинетику культивирования дрожжей, был выбран несколько иной подход к решению поставленной задачи. Согласно рис. 1 можно записать

$$x_i = x_h + \Delta x, \quad (4)$$

где Δx – приращение биомассы за время τ относительно x_h .

Или в безразмерном виде

$$x_6 = x_i/x_h = 1 + \Delta x/x_h, \quad (5)$$

где $\Delta x/x_h$ – безразмерное значение относительного прироста биомассы за время τ .

Из графиков (рис. 3) видно, что $\Delta x \sim \tau^n$, в этом случае уравнение (5) можно представить в следующем виде:

$$x_6 = 1 + (\mu_1 \tau)^n. \quad (6)$$

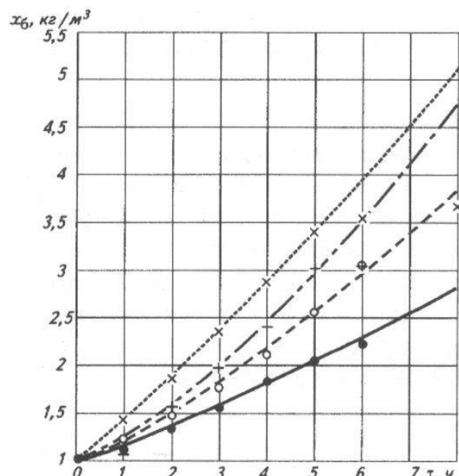


Рис. 3. Зависимость прироста биомассы x_6 от времени культивирования τ :

$K_p = 8$; q : • – $31,43 \text{ l}/\text{ч}$; ○ – $92,85 \text{ l}/\text{ч}$; + – $214,3 \text{ l}/\text{ч}$
 $K_p = 4$; q : × – $31,43 \text{ l}/\text{ч}$

По физической сущности μ_1 есть удельная скорость относительного прироста биомассы в промежутке времени от $\tau = 0$ до $\tau = \tau_f$. В общем случае она должна зависеть от K_p и q , а при высоких концентрациях биомассы – и от x .

Анализ данных эксперимента привел к интересным выводам. Оказалось, что величина $1/\mu_1$ представляет собой время удвоения концентрации от $x = x_h$ до $x = 2x_h$.

Необходимо заметить, что результаты обработки опытных данных, полученных при культивировании дрожжей доливным методом в КСИА [4], по уравнению (6) дали такой же результат [3]. Можно предположить, что кинетика роста дрожжевых клеток в экспоненциальной фазе не зависит от методов культивирования.

Наиболее точную зависимость μ_1 от K_p и q дает уравнение вида

$$\mu_1 = \mu_{m1} \frac{1}{1 + a_1 e^{-b_1 K_p}}. \quad (7)$$

На основе опытных данных были получены эмпирические формулы для расчета μ_{m1} и b_1 :

$$\mu_{m1} = 1/(3,615 - 4,486 \cdot 10^{-5} q^{1,837}); \quad (8)$$

$$b_1 = 0,023 \cdot 0,993^q q^{0,816}; \quad (9)$$

$$a_1 = 4,75.$$

Проанализируем уравнение (7) при крайних значениях K_p и q . При $K_p \rightarrow \infty$ и заданном расходе воздуха $\mu_1 \rightarrow \mu_{1\max} = \mu_{m1}$. С другой стороны, при $K_p \rightarrow 0$ μ_1 будет стремиться к минимальному значению:

$$\mu_{1\min} = 0,174 \mu_{m1}. \quad (10)$$

Иными словами, согласно уравнениям (7), (8), (9), (10) прирост биомассы будет иметь место и при культивировании на неразбавленной мелasse, но при наличии интенсивного аэрирования. Этот вывод требует экспериментальной проверки.

Интересен и другой вариант – $q = 0$, соответствующий культивированию без принудительной подачи воздуха в аппарат, т.е. кислород будет в культуральную среду поступать из атмосферы через свободную поверхность жидкости за счет молекулярной диффузии. В этом случае μ_1 будет стремиться к постоянной величине, равной $0,0481/\text{ч}$, т.е. время удвоения биомассы в таком случае составит около 20 ч. Этот вариант также требует опытной проверки.

В целом погрешность расчетов коэффициентов μ_{m1} и μ_1 по уравнениям (7), (8) и (9) не превышает 2 %, за исключением двух случаев – $K_p = 8,4$ при $q = 92,85$ и $q = 214,31/\text{ч}$, где ошибка составляет 6 % и 8 % соответственно. Для наглядности в таблице приведены расчетные и опытные значения μ_{m1} и μ_1 .

Расчетные (μ_{mlp} , μ_{lp}) и опытные (μ_{mo} , μ_{lo}) значения коэффициентов

| q, 1/ч | μ_{mlp} , 1/ч | μ_{lp} , 1/ч | $K_p = 4,4$ | | | | $K_p = 8,4$ | | | | $K_p = 20,4$ | | | |
|-----------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|-------|---------------------|---------------------|-------|-------|---------------------|---------------------|-------|-------|
| | | | μ_{lo} , 1/ч | μ_{lp} , 1/ч | n_0 | n_p | μ_{lo} , 1/ч | μ_{lp} , 1/ч | n_0 | n_p | μ_{lo} , 1/ч | μ_{lp} , 1/ч | n_0 | n_p |
| 31,43 | 0,279 | 0,278 | 0,125 | 0,1258 | 0,977 | 0,977 | 0,205 | 0,206 | 1,22 | 1,21 | 0,277 | 0,276 | 1,61 | 1,6 |
| 92,85 | 0,291 | 0,2907 | 0,173 | 0,176 | 1,18 | 1,191 | 0,28 | 0,264 | 1,3 | 1,285 | 0,291 | 0,2906 | 1,41 | 1,418 |
| 214,3 | 0,363 | 0,3628 | 0,176 | 0,211 | 1,45 | 1,81 | 0,315 | 0,323 | 1,4 | 1,6 | 0,363 | 0,363 | 1,335 | 1,355 |

Заканчивая анализ эмпирического уравнения (7), можно сказать, что, несмотря на ограниченность его условиями эксперимента, оно дает повод к размышлению о дальнейших путях исследования процессов развития микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях.

В уравнение (6) входит еще одна неизвестная величина — показатель степени n . Как свидетельствуют опыты, он так же, как и μ_1 , зависит от K_p и q . Связь его с этими параметрами можно выразить эмпирической степенной зависимостью

$$n = a_2 K_p^{b_2}, \quad (11)$$

$$\text{где } a_2 = 0,21 + 0,0445 q^{0,637}, \quad (12)$$

$$b_2 = 2,514 - 1,648 q^{0,083}. \quad (13)$$

Уравнение (6) совместно с формулами (7) — (13) позволяет прогнозировать изменение концентрации биомассы во времени и решать вполне конкретные задачи в пределах изменения q от 31,43 до 214,3 м³ воздуха/(ч·м³ среды), и K_p от 4,4 до 20,4. Например, определить время культивирования при заданных значениях отношения x/x_n :

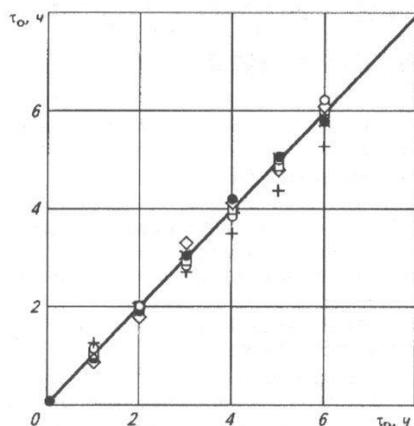


Рис. 4. Сравнение опытных и расчетных значений времени культивирования:

$K_p = 8$; q : • — 31,43 1/ч; ○ — 92,85 1/ч; + — 214,3 1/ч;

□ — опытное значение;

$K_p = 4$; q : × — 31,43 1/ч; ◇ — опытное значение

$$\tau_p = \frac{\left(\frac{x}{x_n - 1} \right)^{1/n}}{\mu_1}. \quad (14)$$

На рис. 4 дано сопоставление рассчитанных по уравнению (14) значений τ_p с опытными τ_o , из которого видно, что в большинстве случаев отклонение τ_p от τ_o составляет не более 8 %.

Выводы

Исследования по культивированию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* периодическим методом позволили получить уравнение кинетики роста дрожжей в экспоненциальной фазе при различных значениях кратности разбавления мелассы и удельного расхода воздуха, дающее возможность прогнозировать прирост биомассы во времени в условиях, ограниченных условиями эксперимента.

В работе показано, что обратная величина коэффициента μ_1 есть время первой генерации дрожжей.

Анализ полученных уравнений выявил необходимость проведения дальнейших исследований в аэробных условиях и низких кратностях разбавления мелассы, а также в анаэробных условиях в широком диапазоне изменения кратности разбавления с целью подтверждения или опровержения сделанных предположений.

Список литературы

- Арзамасцев А.А., Андреев А.Н. О возможности использования различных моделей кинетики биосинтеза // Биофизика. 2001. № 6. Т. 46.
- Боскошьян И.А., Бирюков В.В., Крылов Ю.М. Математическое описание основных кинетических закономерностей процесса культивирования микроорганизмов // Микробиология. Т. 5. — М.: ВИНТИ. 1976.
- Дужий А.Б., Альсаад К., Тишин В.Б. Культивирование пекарских дрожжей при высоких концентрациях биомассы / Материалы науч.-практ. конф. «Пищевая и пекарская биотехнология: проблемы и перспективы». — Калининград, 2006.
- Тишин В.Б., Меледина Т.В., Новоселов А.Г. Пути повышения выхода клеточной массы при выращивании *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 в ферментере струйно-инъекционного типа / Микробиология и фитопатология. 1994. № 3. Т.28.
- Тишин В.Б., Новоселов А.Г., Меледина Т.В. О скорости роста биомассы при культивировании в высококонцентрированных средах // Журнал прикладной химии. 1990. № 7.