

朱娅媛, 王晓谦, 苗春雷, 等. 风味酵母 A10-2 的高密度培养及其生长动力学 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 153-159. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030030

ZHU Yayuan, WANG Xiaoqian, MIAO Chunlei, et al. High Density Culture Process and Growth Kinetics of Flavor Yeast A10-2[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 153-159. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030030

· 生物工程 ·

风味酵母 A10-2 的高密度培养及其生长动力学

朱娅媛¹, 王晓谦¹, 苗春雷¹, 李巧连¹, 朱新贵^{1,2,*}

(1. 李锦记(新会)食品有限公司, 广东江门 529100;

2. 华南农业大学, 广东广州 510642)

摘要:为实现一株自分离风味酵母的高密度培养及生长动力学预测模型构建, 本文对从酱油发酵醪中筛选的产 4-乙基愈创木酚的风味酵母 A10-2 进行了高密度培养工艺的研究, 对培养基种类(氮、碳源)、浓度进行了研究及优化, 并对酵母的生长、基质消耗过程进行了数学模型的构建和验证。结果表明:磷酸二氢铵作为无机氮源, 浓度 0.2 g/100 mL 为最适氮源流加补料方案; 使用糖蜜作为唯一碳源时, 培养液中持续流加保持总糖浓度为 0.4~0.6 g/100 mL 可获得最佳菌体生长速度; A10-2 酵母的生长符合 Logistic 方程 S 形曲线, 基质(总糖)消耗符合 Leudeking-Priet 方程, 比生长速率最大值 μ_m 为 0.4764 h⁻¹, 最大菌体生长得率系数 Y_G 值为 0.5879 g/g, 维持系数 $m_s=0.0127$ g·L⁻¹·h⁻¹。所建立模型能够较好的描述酵母在高密度培养过程中的生长和耗糖情况, 具有预测指导意义。

关键词:风味酵母, 高密度培养, 生长动力学, 基质消耗动力学

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)24-0153-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030030



本文网刊:

High Density Culture Process and Growth Kinetics of Flavor Yeast A10-2

ZHU Yayuan¹, WANG Xiaoqian¹, MIAO Chunlei¹, LI Qiaolian¹, ZHU Xingui^{1,2,*}

(1. Lee Kum Kee (Xinhui) Foods Co., Ltd., Jiangmen 529100, China;

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to realize the high-density culture and establish the predictive growth kinetics model of a self-isolated flavor yeast, the high-density culture process was studied of 4-ethyl-2-methoxyphenol producing yeast A10-2, which screened from soy sauce fermentation mash. The type of culture medium (nitrogen and carbon source) and concentration were studied and optimized. The growth kinetics and the substrate (total sugar) consumption models were established and verified. The results showed that (NH₄) H₂PO₄ fed to make the concentration of culture medium 0.2 g/100 mL was the best inorganic source of nitrogen. To obtain the best cell growth rate, molasses as the only source of carbon, should be fed which controlled the concentration of total sugar in the culture medium to 0.4-0.6 g/100 mL. The growth of A10-2 yeast followed the S-shaped curve of a Logistic model, and the substrate (total sugar) consumption followed the Leudeking-Priet equation. The maximum obtained biomass specific growth rate μ_m was 0.4764 h⁻¹, while the maximum biomass growth yield coefficient Y_G was 0.5879 g/g. The maintenance coefficient was 0.0127 g·L⁻¹·h⁻¹. The established models could better describe the growth and sugar consumption of yeast in the process of high-density culture, and have predictive significance.

Key words: flavor yeast; high density culture; growth kinetics; substrate consumption kinetics

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2020B020226006); 江门市基础与应用基础研究重点项目(2020030103190009059)。

作者简介: 朱娅媛(1987-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 农食品工程, E-mail: 175215328@qq.com。

* 通信作者: 朱新贵(1967-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 调味品科学与技术, E-mail: nicky@126.com。

调味品是现代生活的必需品。研究表明发酵类调味品在酿造过程中产生的风味物质已知有 300 余种^[1-2],其风味的形成是多菌种相互作用的结果,如米曲霉、乳酸菌及酵母菌等。其中酵母菌在发酵过程中主要产生的酯类、醇类等物质,对酱料风味的形成具有十分重要的贡献^[3]。在发酵特定阶段接种选育的耐盐产香酵母,使其在发酵过程中合成及积累特征性风味物质,如苯乙醇、呋喃酮、4-乙基愈创木酚等,可合理改善及优化酱料风味协调性及提升最终感官指标^[4-5]。近年来,充分发挥酵母菌在酱醪中的生香作用,是国内外酱料生产企业所重点关注的研究内容^[6],而目前对人为筛选获得可应用于酱料的风味酵母的高密度培养工艺及生长动力学研究较少,对其高密度批量培养工艺的研究及实现是其可应用化的前提。

高密度培养指微生物在液体培养中细胞群体密度超过常规培养 10 倍以上时的生长状态的培养技术^[7]。流加补料工艺在高密度培养技术广泛应用:通过流加工艺进行培养基限制性底物的不间断补充,如碳、氮源,确保菌体维持高速生长、繁殖,而最终得到高浓度菌体的培养液,有效节省培养容器体积及培养基的消耗,降低生产周期及成本^[8]。因此,研究风味酵母的高密度培养工艺及优化是具有实践意义的。生长动力学将培养过程中菌体繁殖、基质消耗、产物生成有关的因素用一定形式的数学模型进行表达和定量描述^[9-11]。在酱料风味调控技术中,酱醪中产香酵母的筛选、驯化及繁殖应用是非常关键的环节,建立目标酵母的生长动力学模型,将为风味酵母的高密度产业化培养提供理论及实践指导基础^[12]。

本文通过对酱醪中筛选的风味酵母 A10-2 的高密度流加分批补料工艺进行研究,对培养基质氮源、碳源优化,生长动力学、基质消耗动力学进行参数探索及模型构建,分析其生长及基质消耗的动态平衡形成条件以及内在规律,以获得培养的最大菌体干重浓度以及最短培养时间。同时,根据生长动力学模型对目标酵母培养条件进行分析,评价所建生长动力学预测模型的有效性,为设计合理的风味酵母高密度流加补料培养工艺及酵母生长指标的预测提供理论指导依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 由李锦记(新会)食品有限公司酱油醪筛选所得,经分析为高产 4-乙基愈创木酚的风味酵母,初步鉴定为 *Wickerhamiella versatilis*,命名为 A10-2^[13];葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 等均为国产分析纯;维生素 B_1 、维生素 B_5 、维生素 B_6 、生物素均为阿拉丁纯品;糖蜜 广西陆屋欧亚糖业有限公司。

30 L 自吸式发酵罐 南京天汇生物技术装备有

限公司;BlueStar B 紫外可见分光光度计 北京莱伯泰科仪器股份有限公司;H2050R 离心机 湖南湘仪离心机仪器有限公司;MS3002TS/02 电子秤 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;794 自动点位滴定仪 瑞士万通公司;ZWY-211C 摇床 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基制备 种子液培养基:酵母浸粉 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L。

发酵培养基配方:维生素 B_1 20 mg/L,维生素 B_6 20 mg/L,维生素 B_5 20 mg/L,生物素 10 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L, KH_2PO_4 0.1 g/L。酸化糖蜜作为培养基碳源根据其总糖含量添加,控制培养液总糖浓度为 10 g/L。

pH 调节剂:10% H_2SO_4 , 10% Na_2CO_3 。

流加补料液配方:碳源为酸化糖蜜(50°Brix;硫酸调节 pH 至 4.3,4 h 后调整 pH 至 5.3),氮源按单因素实验优选氮源配成,磷源为 10% KH_2PO_4 。

单因素实验筛选培养基:在发酵培养基配方基础上去除碳源与氮源,加入所需筛选因素配成。

1.2.2 种子液培养 取新鲜斜面菌种接种至灭菌(121 °C, 15 min)后装有 100 mL 种子液培养基的 250 mL 摇瓶中,在 30 °C、180 r/min 条件下摇床培养 24 h。

1.2.3 氮源单因素实验设计 使用发酵培养基,添加酸化糖蜜至培养液中总糖浓度为 20 g/L。分别使用磷酸氢二铵、磷酸二氢铵、尿素、氯化铵作为氮源变量,配制不同浓度(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 g/100 mL)培养基各 100 mL 于 250 mL 三角瓶中,分别接种斜面新鲜菌种,于 30 °C、180 r/min 条件下摇床培养,48 h 后测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.4 发酵罐补料流加高密度培养 将 20 L 发酵培养基加入发酵罐(最大装液量 30 L),实消后取液体菌种按 10% 接种量接种至发酵培养基中,使用自吸式发酵罐进行酵母高密度培养,培养过程控制溶氧大于 30%,pH 4.8~5.3,温度(30±0.3) °C。每 2 h 测定菌体干重浓度,对数期增长后菌体干重浓度不再升高定义为培养终止状态。酸化糖蜜作为碳源,选择单因素实验优选氮源进行流加补料,根据《酵母生产与应用手册》,流加糖液速度符合函数关系式^[14]:

$$F = \frac{\mu V_0 X_0}{Y_{x/s}(S_F - S)} e^{\mu t} \quad \text{式 (1)}$$

式中: V_0 表示初始培养液体积, L; X_0 表示初始菌体干重浓度, g/L; μ 表示设定比生长速度(根据定期菌体干重浓度变化进行计算及调整), h^{-1} ; $Y_{x/s}$ 表示菌体对基质(总糖)得率, g 菌体干重/g 基质; F 表示浓基质(糖液)的流加速度, L/h; S_F 表示浓基质浓度, g/L; S 表示培养液中基质浓度, g/L; t 表示培养时间, h。

1.2.5 高密度培养过程流加工艺碳源最适浓度的研究

多批次补料流加培养菌体, 调整碳源(酸化糖蜜)泵入流速, 通过持续流加糖液保持培养液总糖浓度不同批次分别为 0~0.2、0.2~0.4、0.4~0.6、0.6~0.8、0.8~1.0、1.0~1.2、1.2~1.4 g/100 mL, 根据培养终酵母干重浓度与培养时间, 对比不同批次发酵培养液中不同碳源(总糖)浓度对菌体干重平均生长速度的影响。

1.2.6 高密度培养菌体生长动力学模型建立 流加补料高密度培养, 培养过程中每 2 h 进行取样, 检测菌体干重。根据菌体生长情况, 以进入对数生长时期的时间为起点, 取样时间缩短为每 0.5 h, 同时检测总糖含量、菌体干重, 计算进入对数生长时期后单位体积菌体生长所需的总糖耗用量。通过研究高密度培养过程中菌种干重与时间及基质(总糖)消耗的对应关系, 建立生长动力学、基质消耗动力学模型。

1.2.6.1 菌体生长动力学模型的建立 Logistic 方程是用来描述培养过程中菌体生长随时间变化规律最常用的模型, 是典型的“S”形曲线, 选择使用 Logistic 方程建立酵母 A10-2 的生长动力学, 菌体生长模型的微积分表达式如公式(2)所示^[15]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) X \quad \text{式 (2)}$$

对式(2)进行积分后得到:

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \quad \text{式 (3)}$$

式中: X_0 表示菌体初始浓度, g/L; X 表示菌种浓度, g/L; X_m 表示菌种浓度, g/L; μ_m 表示最大比生长速率, h^{-1} ; t 表示发酵时间, h。

1.2.6.2 菌体底物消耗动力学模型的建立 由物料恒算可知, 限制性底物的消耗用于菌体生长、菌体维持和产物合成这 3 个方面^[16]。对于限制性底物的消耗一般采用类似 Luedeking-Piret 方程^[17-18]来描述:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{Y_{x/s}} + \frac{dP}{Y_{p/s}} + m_s X \quad \text{式 (4)}$$

由于培养过程中尽可能地抑制菌体代谢, 其代谢产物所耗用的基质则微乎其微。忽略菌体代谢产物所耗用的碳源后:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{Y_{x/s}} + m_s X \quad \text{式 (5)}$$

比底物消耗速率方程为:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s \quad \text{式 (6)}$$

将式(5)微积分后得:

$$S = S_0 - \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{Y_{x/s} (X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t})} + \frac{X_0}{Y_{x/s}} - \frac{X_m m_s}{\mu_m} \ln \left(\frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \right) \quad \text{式 (7)}$$

式中: X 表示菌体干质量浓度, $g \cdot L^{-1}$; P 表示产物浓度, $g \cdot L^{-1}$; $Y_{x/s}$ 表示菌体对基质(总糖)得率, g 菌体干质量/g 基质; $Y_{p/s}$ 表示产物对基质得率, g 产物/g 基质;

m_s 表示维持系数, $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$; $q_s = dS/Xdt$, 底物比消耗速率, $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$; $\mu = dX/Xdt$ 比生长速率, h^{-1} ; t 表示培养时间, h。

1.2.7 分析检测 菌体干重测定: 准确量取 100 mL 培养液, 离心 10 min (4000 r/min), 弃上清液。加 100 mL 蒸馏水洗涤, 再次离心 10 min, 弃上清液后以蒸馏水将菌种打散洗出至培养皿, 置于烘箱中 105 °C 至恒重后进行测定^[19]。

总糖测定: 采用酸水解法, 使用 3, 5-二硝基水杨酸进行测定^[20]。

1.3 数据处理

采用 Excel 2019 软件对 3 次重复数据进行统计分析并作图, 取平均值作为拟合数据。使用 SAAinc-Elisa 软件对数据进行拟合。

2 结果与分析

2.1 碳、氮源优选实验

2.1.1 氮源优选单因素实验 糖蜜中含有少量氮源, 甘蔗糖蜜中总氮含量约为 0.6% (质量比), 其中大部分以生物碱及胺态氮形式存在^[21-22]。流加补料高密度培养工艺中, 糖蜜所带入培养液的总氮不足 0.1 g/L, 远不足以支持酵母的增殖。为解决氮源缺乏而导致的生长迟缓问题, 需通过外加氮源进行补充。菌体对有机氮源的利用优于无机氮源, 但批量生产中, 使用无机氮源更符合对成本的控制需求^[23]。

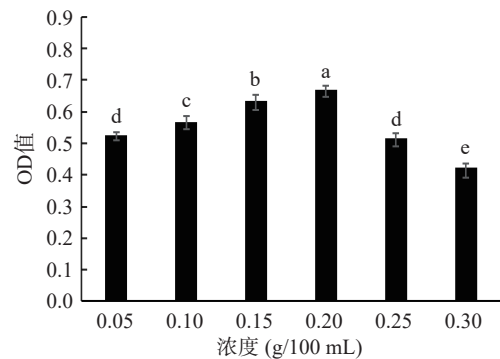


图 1 不同浓度尿素(氮源)对培养终酵母浓度的影响

Fig.1 Effects of different concentration of CH_4N_2O as nitrogen on the maximum density of yeast

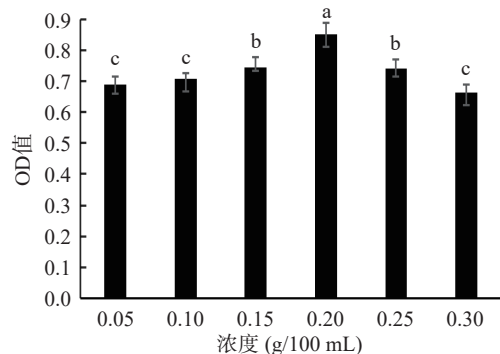


图 2 不同浓度磷酸二氢铵(氮源)对培养终酵母浓度的影响

Fig.2 Effects of different concentration of $NH_4H_2PO_4$ as nitrogen on the maximum density of yeast

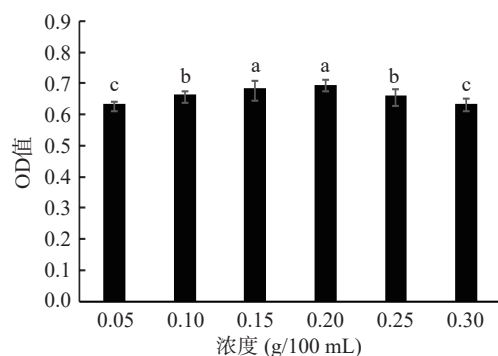


图3 不同浓度磷酸氢二铵(氮源)对培养终酵母浓度的影响

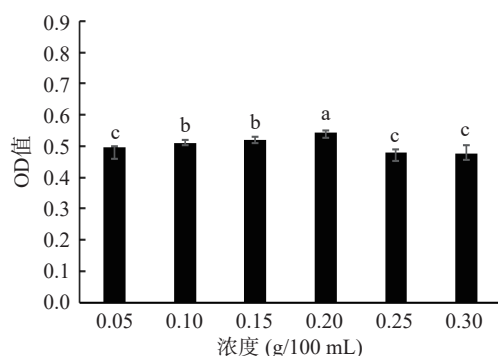
Fig.3 Effects of different concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as nitrogen on the maximum density of yeast

图4 不同浓度氯化铵(氮源)对培养终酵母浓度的影响

Fig.4 Effects of different concentration of NH_4Cl as nitrogen on the maximum density of yeast

使用摇瓶法进行氮源优选实验,因单次培养基投入摇瓶培养而收获菌体浓度小,为避免低浓度时检测菌体干重的误差,使用 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 检测值作为干重浓度的反馈。根据检测数据及统计分析,在不同氮源条件下,如图1~图4所示,氮源浓度在 0.05~0.2 g/100 mL 时,各实验组均呈现了菌体吸光度随氮源浓度增加而增大的趋势;在氮源浓度大于 0.2 g/100 mL 时,菌体吸光度随氮源浓度增加而减少。结果表明,氮源浓度在 0.05~0.3 g/100 mL 范围内,尿素与磷酸氢二铵对酵母菌体培养效果无显著差异 ($P>0.05$),磷酸二氢铵作为氮源的培养效果最佳,氯化铵作为氮源时培养效果较差。在氮源浓度 0.2 g/100 mL 情况下,磷酸二氢铵作为氮源得到吸光度最大 ($P<0.05$),即反馈菌体干重浓度最大。

2.1.2 高密度培养过程流加工艺碳源最适浓度的研究 糖蜜中含有大量的蔗糖和转化糖,根据研究,甘蔗糖蜜中总糖占比约 50% (糖蜜固形物 80°Brix~85°Brix),其中非发酵性糖仅占总糖含量的 10% 左右^[24]。除碳源、氮源外,糖蜜中还含有钾、钙、磷、硫及维生素等微量元素,亦能促进酵母菌体的增长^[25]。使用糖蜜作为高密度培养过程的唯一碳源,是满足菌体所需且成本低廉、培养效果较好的原料。影响高密度培养的因素有很多,如温度、pH、菌体活性等,而基质浓度则是流加补料高密度培养工艺影响酵母干重得率的关键因素之一^[26-27]。

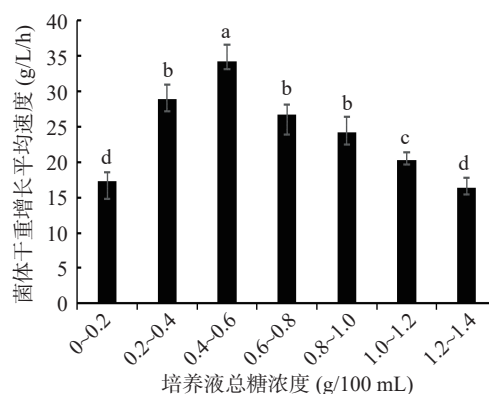


图5 培养液不同总糖浓度对菌体干重的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of total sugar in culture medium on yeast cell dry weight

注:相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$),不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

流加补料过程中,通过调整碳源泵入速度以维持培养液中总糖浓度在设定范围内。根据实验结果,培养液总糖浓度不同,则酵母增长的平均生长速度(培养终状态酵母干重浓度/培养总耗时)也有较大差异。如图5所示,当培养过程中培养液总糖浓度始终维持在 0~0.6 g/100 mL 时,酵母干重平均增长速度随总糖浓度增大而增大。当总糖浓度超过 0.6 g/100 mL,酵母干重平均增长速度随总糖浓度增加而减小。在培养液总糖浓度控制在 0.4~0.6 g/100 mL 时,其干重平均增长速度达到最大。酵母的生长与代谢取决于很多因素,如氧、基质、生长周期等。根据研究,酵母具有“Crabtree 效应”(又称“葡萄糖效应”),当培养液含糖量过高时,即使在氧充足的情况下,酵母也会进行酒精发酵而减少糖的利用率,致使自身细胞增长速度降低^[28-29]。而根据实验结果,在培养液总糖浓度大于 0.6 g/100 mL 时,单位体积酵母的干重增长速度显著降低亦印证了此效应。

2.2 菌体动力学模型建立

2.2.1 菌体生长动力学模型建立 现代微生物动力学理论起源于 Monod 方程,作为描述菌体生长的模型,被认为更适合菌体生长较慢、密度较低且无抑制作用的环境,反馈了菌体增长与基质消耗的 $\mu=\mu(S)$ 情况^[30]。尝试使用 Monod 模型对 A10-2 酵母培养阶段各数据进行拟合,以 $1/S$ 为横坐标, $1/\mu$ 为纵坐标作图,所得结果拟合决定系数并不高 ($R^2=0.807$)。Monod 模型在补料流加高密度培养工艺中,无法描述菌体密度对自身的抑制,且流加基质的补充亦降低了基质对菌体的限制性影响,拟合系数相对较低亦佐证了此理论。Logistic 方程能够很好的诠释分批发酵过程中菌体浓度增加对自身的抑制而呈现 S 形生长曲线^[31]。因此,选择使用 Logistic 方程更适用于描述产香酵母的生长。

如图6所示,使用酵母高密度培养过程中干重与时间数据作图,根据 Logistic 模型进行数据分析,

并运用 SAAinc-Elisa 软件对实验值进行非线性拟合, 得到拟合公式中 μ_m 值为 0.4764 h^{-1} 。将动力学参数 $X_0=1.73\text{ g/L}$ 、 $X_m=36.09\text{ g/L}$ 、 $\mu_m=0.4764\text{ h}^{-1}$ 代入式(3)中, 可得到菌体生长动力学方程:

$$X = \frac{62.43e^{0.4764t}}{34.36 + 1.73e^{0.4764t}}$$

拟合决定系数 $R^2=0.9721$, 验证了 Logistic 方程能够很好地描述产香酵母 A10-2 分批高密度培养过程中菌体的生长情况。

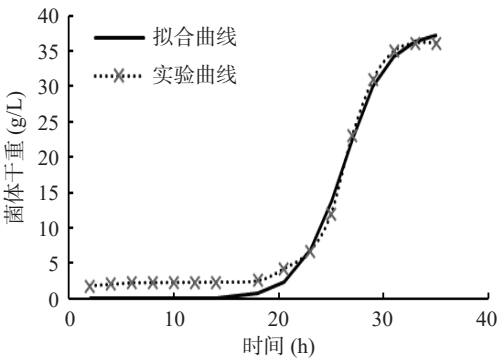


图 6 酵母生长动力学模型拟合曲线
Fig.6 Fitting curve of yeast growth kinetic model

在 高 密 度 培 养 过 程 中, 流 加 补 料 使 培 养 液 总 体 积 增 大。但 由 于 A10-2 酵 母 的 迟 缓 期 时 间 较 长 (约 20 h), 而 对 数 期 时 间 较 短 (8~10 h), 补 料 流 加 时 浓 糖 液 产 生 的 稀 释 率 对 发 酵 液 整 体 体 积 的 影 响 较 小 (耗 用 糖 液 体 积: 培 养 液 终 体 积=1:8.5)。由 此 认 为 取 样 间 隔 时 间 为 2 h 或 更 短 的 情 况 下, 可 忽 略 流 加 造 成 的 体 积 变 化, 此 动 力 学 方 程 对 实 际 生 产 是 具 有 预 测 指 导 意 义 的。

2.2.2 菌体底物消耗模型建立 选用类似 Luedeking-Piret 方程建立菌体总糖消耗模型, 如图 7 所示, 根据式(5)比底物消耗速率方程将 μ 对比底物消耗速率 q_s 作图, 并进行线性回归:

得到拟合方程中 $Y_{x/s}$ 最大值 $Y_G=0.5879\text{ g/g}$, $m_s=0.0127\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。将 Y_G 、 m_s 及生长动力学所得 X 方程代入式(6)得:

$$S = S_0 - \frac{106.19e^{0.4764t}}{34.36 + 1.73e^{0.4764t}} + 2.94 - 0.96 \ln \frac{34.36 + 1.73e^{0.4764t}}{36.09}$$

对于流加补料高密度培养工艺, 溶液中糖液的

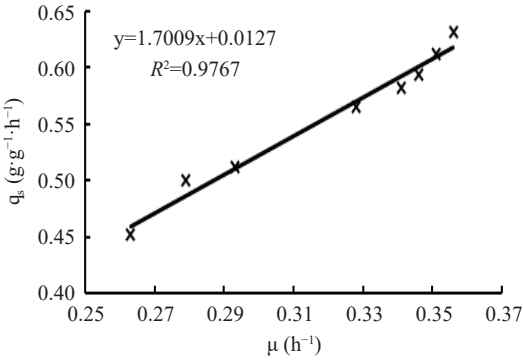


图 7 比生长速率 μ 与底物比消耗速率 q_s 的关系
Fig.7 Relationship curve of μ versus q_s

持续补充使公式中的 S_0 无法赋予定值计算, 而单位体积内总糖的累加消耗量可通过上式变形得到:

$$S_t = S_0 - S = 0.96 \ln \frac{34.36 + 1.73e^{0.4764t}}{36.09} + \frac{106.19e^{0.4764t}}{34.36 + 1.73e^{0.4764t}} - 2.94$$

该方程描述了高密度培养过程中单位体积培养液中总糖的累加消耗情况, 相关系数 $R^2=0.9767$ 说明了模型拟合度高, 方程建立较理想。

2.2.3 模型验证 为检测模型的误差及验证模型的准确性, 重复实验并测定、计算菌体干重数据及单位体积总糖累加消耗数据, 使用实验实际值与拟合公式计算值进行对比, 计算绝对误差(表 1)。

由于菌体适应期(0~22 h)生长缓慢且生物量受接种初期影响较大, 为排除操作性影响而取菌种进入对数期后数据进行研究。数据表明, 菌体干重与单位体积总糖耗用量实验数据与拟合计算数据的绝对误差均小于 10%, 认为所建立菌体生长动力学模型与底物(总糖)消耗模型可较好地描述 A10-2 酵母高密度流加补料工艺的生长与总糖利用情况^[32], 模型准确性较高, 能够为实际培养过程提供理论参考。

3 结论

本文对可应用于酱料增香的风味酵母进行高密度培养补料碳、氮源的优化, 以成本控制为前提有效获得了最佳补料方案: 磷酸二氢铵作为氮源, 0.2 g/100 mL 为优选浓度; 糖蜜作为碳源流加补充, 培养基中总糖流加保持 0.4~0.6 g/100 mL 浓度可获得较高的培养终菌体干重收获率。另外, 本文也探索

表 1 A10-2 酵母高密度培养动力学数据拟合值与实验值对比

Table 1 Comparison of growth kinetics of A10-2 yeast between calculated and experimental data

时间(h)	菌体干重			单位体积总糖耗用量		
	拟合值(g/L)	实验值(g/L)	绝对误差 (%)	拟合值(g/L)	实验值(g/L)	绝对误差 (%)
23	6.84	6.41	6.71	66.02	65.12	1.39
25	13.76	12.86	7.00	66.94	67.38	0.64
27	22.56	23.28	3.10	67.86	68.93	1.54
29	29.94	30.12	0.61	68.78	69.72	1.34
31	34.26	33.87	1.16	69.70	71.19	2.09
33	36.28	35.32	2.71	70.61	74.63	5.38
35	37.13	35.93	3.33	71.53	76.34	6.30

了高密度培养过程风味酵母的生长动力学及基质消耗动力学,对其模型的建立将为培养的预测性及可控性提供理论指导依据。

后续研究将围绕放大生产批量高密度培养工艺进行参数差异的探究及准确性调整,从而建立以高菌体干重收获率为目的的风味酵母 A10-2 高密度补料流加工艺,并根据动力学模型对其进行预测及培养控制。风味酵母高密度批量生产的实现及调控,将对其在酱料中的有效应用及风味强化技术起到辅助性推动作用。

参考文献

- [1] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京: 中国工业出版社, 2011: 44-47. [BAO Q A. Soy sauce science and brewing technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011: 44-47.]
- [2] 童星, 彭勃. 酱油的风味物质及其研究进展[J]. 中国调味品, 2018, 43(10): 195-200. [TONG X, PENG B. Flavor substances of soy sauce and its research progress[J]. China Condiment, 2018, 43(10): 195-200.]
- [3] 吕变梅, 彭东, 徐晓刚, 等. 酱油酿造用耐盐产乙醇风味酵母的选育及其应用[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 119-126. [LÜ B M, PENG D, XU X G, et al. Breeding and application of salt-tolerant ethanol-producing yeast for soy sauce brewing[J]. Food science, 2020, 41(20): 119-126.]
- [4] 彭东, 蒋雪薇, 陈幽, 等. 高盐稀态酱醪中耐盐生香酵母的筛选及生香特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 76-84. [PENG D, JIANG X W, CHEN Y, et al. Screening and aroma-producing characteristics of salt-tolerant aroma-producing yeasts from high-salt liquid-state Moromi[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(13): 76-84.]
- [5] 张雁凌, 张雁南, 刘刚. 乳酸菌和酵母菌的添加对低盐酱油品质的影响[J]. 中国调味品, 2020, 45(12): 45-47, 51. [ZHANG Y L, ZHANG Y N, LIU G. Effects of the addition of lactic acid bacteria and yeast on the quality of low-salt soy sauce[J]. China Condiment, 2020, 45(12): 45-47, 51.]
- [6] SLUIS C V, TRAMPER J, WIJFFEL S R H. Enhancing and accelerating by salt tolerant yeasts in Japanese soy sauce process[J]. Trends Food Sci Technol, 2001, 94(12): 322-327.
- [7] 李玉娥, 马玲. 乳酸菌高密度培养条件优化研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(9): 150-154. [LI Y E, MA L. Optimization of high-density culture condition of lactic acid bacteria[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 150-154.]
- [8] 王松原, 解艳娇, 陈姍, 等. 补料技术在大肠杆菌高密度培养中的研究进展[J]. 当代化工研究, 2019(10): 172-173. [WANG S Y, XIE Y J, CHEN S, et al. Research progress of feeding technology in high density culture of *Escherichia coli*[J]. Modern Chemical Research, 2019(10): 172-173.]
- [9] AZMIAN L, BASSI A, MERCER S M. Investigation of growth kinetics of *Debaryomyces hansenii* (LAF-3 10 U) in petroleum refinery desalter effluent[J]. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2019, 97(1): 27-31.
- [10] 蒋艾廷, 李新玲, 姜淑娟, 等. 一株优选酿酒酵母增殖培养条件优化及发酵动力学模型的构建[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(1): 45-52. [JIANG A T, LI X L, JIANG S J, et al. Optimizing on proliferation conditions of preferred *Saccharomyces cerevisiae* and construction of fermentation kinetics model[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(1): 45-52.]
- [11] 臧荣春, 夏凤毅. 微生物动力学模型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 144-158. [ZANG R C, XIA F Y. Microbial kinetic model[M]. Beijing: Chemical industry press, 2004: 144-158.]
- [12] 王荣荣, 姜兴旭, 朱静. 草莓果酒发酵动力学模型研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2019, 32(4): 649-653. [WANG R R, JIANG X X, ZHU J. The fermentation dynamic of strawberry wine[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2019, 32(4): 649-653.]
- [13] 何理琴, 邹谋勇, 孙启星, 等. 产 4-乙基愈创木酚酵母的鉴定及其在酱油中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 138-144. [HE L Q, ZOU M Y, SUN Q X, et al. Identification of 4-ethylguaiacol producing yeast and its application in soy sauce brewing[J]. Food Science, 2021, 42(12): 138-144.]
- [14] 于景芝. 酵母生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 121-127. [YU J Z. Handbook of the yeast's production and application[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 121-127.]
- [15] 余爱华. Logistic 模型的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2003. [YU A H. A study on logistic model[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2003.]
- [16] KASHID M, GHOSALKOR A. Evaluation of fermentation kinetics of xylose to ethanol fermentation in the presence of acetic acid by *Pichia stipitis*: Modeling and experimental data comparison[J]. Indian Journal of Chemical Technology (IJCT), 2018, 25(1): 31-39.
- [17] MA L J, LI C, YANG Z H, et al. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulose production by fed-batch fermentation[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 166(4): 192-197.
- [18] LUEDEKING R, PIRET E L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 67(6): 636-644.
- [19] 郭庆强, 林建强, 李歧强, 等. 微生物发酵过程的细胞密度在线检测与底物浓度实时控制[J]. 中国科学技术大学学报, 2012, 42(7): 584-589. [GUO Q Q, LIN J Q, LI Q Q, et al. Cell density online detection and substrate concentration real-time control of microbial fermentation process[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2012, 42(7): 584-589.]
- [20] 刘忠义, 欧昌荣, 汤海青, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定葡萄酒中总糖含量的条件优化[J]. 核农学报, 2013, 27(11): 1717-1723. [LIU Z Y, OU C R, TANG H Q, et al. Optimization of conditions for determination of total sugar contents in wine by 3,5-dinitrosalicylic acid method[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(11): 1717-1723.]
- [21] 吴德光, 胡智慧, 刘广新, 等. 甘蔗糖蜜料酒制备工艺优化及品质分析[J]. 食品与机械, 2021, 37(12): 155-160. [WU D G, HU Z H, LIU G X, et al. Preparation technology optimization and quality analysis of sugar cane molasses cooking wine[J]. Food and Machinery, 2021, 37(12): 155-160.]
- [22] 李清岚, 崔春, 王伟. 甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜中主要活性物质

及其生理功能研究进展[J]. *食品与机械*, 2021, 37(4): 207–211.

[LI Q L, CIU C, WANG W. Research progress on the main active components and physiological functions of sugarcane molasses and beet molasses[J]. *Food and Machinery*, 2021, 37(4): 207–211.]

[23] 李卓婷, 李从发, 贾言言, 等. 咖啡渣酿酒酵母的筛选及氮源优化营养条件的研究[J]. *中国酿造*, 2016, 35(4): 61–64. [LI Z T, LI C F, JIA Y Y, et al. Screening of yeast for coffee-grounds wine fermentation and research on nitrogen source for nutritional condition optimization[J]. *China Brewing*, 2016, 35(4): 61–64.]

[24] 徐运杰, 季丰泉, 陈学华, 等. 甜菜和甘蔗糖蜜的理化特征及其在生猪养殖中的应用[J]. *山东畜牧兽医*, 2021, 42(4): 56–60.

[XU Y J, JI F Q, CHEN X H, et al. Physicochemical characteristics of sugar beet and sugarcane molasses and their application in pig breeding[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021, 42(4): 56–60.]

[25] VU V H, KIM K. High-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* KV-25 using molasses and corn steep liquor [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(12): 1603–1611.

[26] ROSSO L, LOBRY JR, BAJARD S, et al. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(2): 610–616.

[27] HU C K, QIN Q, GAO P P. Medium optimization for improved ethanol production in very high gravity fermentation[J].

Biotechnology and Bioengineering, 2011, 19(6): 1017–1022.

[28] ARNE H, TORBORN S, JURE P. Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin[J]. *FEBS Journal*, 2014, 281(21): 4805–4814.

[29] LI X, KANG Y J, YU C, et al. Exponential feeding strategy of high-density cultivation of a salt-tolerant aroma-producing yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in stirred fermenter[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 2(18): 18–23.

[30] TINCO D, SILVEIRA W B D. Kinetic model of ethanol inhibition for *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 (UFV-3) based on the modified Monod model by Ghose & Tyagi[J]. *Biologia*, 2021, 76(11): 1–9.

[31] 张宁. 生物合成番茄红素大肠杆菌发酵工艺和动力学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [ZHANG N. Study of fermentation bioprocess for lycopene biosynthesis by *Escherichia coli* DH416 and a kinetic model[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]

[32] 何勇锦, 柯汉伟, 陈兰孙, 等. 粘红酵母 RG 发酵产油脂动力学模型的构建[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 30(3): 93–99. [HE Y J, KE H W, CHEN L S, et al. Studies on the fermentation kinetics models for the lipid production by *Rhodotorula glutinis* RG[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2014, 30(3): 93–99.]