

# 苹果酒酵母增殖培养基的优化\*

汤高奇<sup>1,2</sup> 岳田利<sup>1</sup> 高振鹏<sup>1</sup> 柳艳霞<sup>3</sup> 林小亮<sup>4</sup>

1(西北农林科技大学,杨凌,712100) 2(杨凌职业技术学院,杨凌,712100)

3(河南农业大学,郑州,450002) 4(陕西蓝马啤酒有限公司,咸阳,712044)

**摘要** 以麦芽汁装液量(mL)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{MgSO}_4$  的质量浓度(g/L)为影响因素,以苹果酒酵母细胞浓度(个/L)为考察指标,利用二次回归正交旋转组合设计研究了1株苹果酒酵母增殖所需培养基的数学模型,进而优化了针对该菌株的增殖培养基。研究结果表明,在100 mL三角瓶中,培养开始酵母细胞浓度为 $1.923 \times 10^8$  个/L,麦芽汁装液量20 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度0.196~1.033 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  浓度2.559~5.566 g/L, $\text{MgSO}_4$  浓度1.778~3.222 g/L的培养条件下,培养24 h后,酵母细胞浓度可望高于 $1.125 \times 10^{11}$  个/L。

**关键词** 苹果酒酵母,增殖培养基,数学模型

目前,国内外用于生产苹果酒的酵母多为葡萄酒酵母或从自然界分离的酵母,这2种酵母都不同程度地存在着酿出的酒香气不足,出酒率低,出酒不稳定等弊端<sup>[1]</sup>。因此,本试验针对苹果酒干酵母的生产,进行了一些基础研究,即通过建立苹果酒酵母增殖培养基的数学模型,确定用于生产高活性苹果酒干酵母的最佳培养基配方。

现已报道的有关培养基优化的研究大多采用单因子试验和正交试验确定,而用回归正交旋转组合设计进行研究的却很少,针对酵母生物量增殖的则更少<sup>[2~5]</sup>。用正交试验法虽然能够得到最佳培养基配方,但是不能确定菌体生物量与培养基各成分间的准确关系,更不能对菌体产量进行预测。为弥补这方面的不足,本试验以新选育的增香型苹果酒酵母为菌种,用二次回归正交旋转组合设计的试验方法来研究用于苹果酒酵母增殖的最佳液态培养基配方。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**材料:**增香型苹果酒酵母 PF14(由西北农林科技大学食品科学与工程学院提供);麦芽汁(由陕西省咸阳市蓝马啤酒公司提供)。

**试剂:** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$  等。

**仪器:**分析天平;手持糖量计;pH计;手提式压力蒸汽消毒器;干燥箱;隔水式电热恒温培养箱;光学显微镜;血球计数板;超净工作台;密度计;冰柜和三角瓶等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 测定方法

麦芽汁 pH 值的测定: pH 计;麦芽汁密度的测定:密度计;麦芽汁含糖量的测定:手持糖量计;酵母细胞浓度的测定:血球计数板法<sup>[6]</sup>。

### 1.2.2 试验流程

(1)麦芽汁处理:用4层纱布将麦芽汁过滤至澄清<sup>[6]</sup>,测其 pH 值、相对密度、含糖量等指标。

(2)菌种的活化:在100 mL三角瓶中装入40 mL 麦芽汁,加压蒸汽灭菌。灭菌结束后,迅速冷却至30℃。在超净工作台上,取斜面培养的 PF14 菌种2环接入该三角瓶中,于30℃条件下恒温培养4 h<sup>[6]</sup>。

(3)生长曲线的绘制:在超净工作台上,将活化后的种子培养液转入盛有150 mL 麦芽汁的500 mL 无菌三角瓶中,摇匀,分装于15支无菌试管中,每支试管装麦芽汁10 mL。于30℃条件下恒温培养,每隔2 h 振摇1次,并取出1支试管,测定其中的酵母细胞浓度,用细胞浓度的对数值对时间绘制生长曲线图。

(4)培养基的筛选:将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{MgSO}_4$  分别按表1所示浓度配成溶液后,与麦芽汁同时进行加压蒸汽灭菌。灭菌后,迅速冷却至30℃,将活化后的菌种接入麦芽汁中,按表1和表2所示试验方案<sup>[7]</sup>,在超净工作台上向已编号的23个100 mL 无菌三角瓶中加入各组分,于30℃下恒温培养至对数期结束,停止培养,用血球计数板法计数。培养期间,每隔12 h 振摇1次<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果酒酵母生长曲线的绘制

第一作者:硕士研究生,讲师(岳田利为通讯作者)。

\* 国家西部专项(2001BA901A19)

收稿日期:2005-09-15,改回日期:2005-12-20

表 1 四因子二次回归正交旋转组合设计因素水平编码

$z_j$	$x_1$ 装液量 /mL	$x_2$ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /g·L <sup>-1</sup>	$x_3$ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /g·L <sup>-1</sup>	$x_4$ MgSO <sub>4</sub> /g·L <sup>-1</sup>
上星号臂 (1.682)	70	10.00	10.00	5.00
上水平(1)	60	7.97	7.97	3.99
0 水平(0)	45	5.00	5.00	2.50
下水平(-1)	30	2.03	2.03	1.01
下星号臂 (-1.682)	20	0.00	0.00	0.00
$\Delta_j$	15	2.97	2.97	1.49

试验菌种的生长曲线见图 1。由图 1 可以看出,培养开始 2 h 后延滞期结束,进入对数增长期,24 h 后对数增长期结束,进入稳定期。

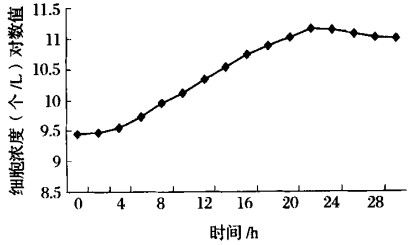


图 1 酵母菌 PF14 的生长曲线

因此,在培养基筛选试验中,在相同操作条件下,培养至 24 h 时终止酵母生长,并测定细胞浓度。

2.2 培养基数学模型的建立与分析

2.2.1 回归模型的建立

表 2 四因子 1/2 实施二次回归正交旋转组合试验设计矩阵与结果分析

试验号	$z_0$	$z_1$	$z_2$	$z_3$	$z_4$	$z_1z_2$	$z_1z_3$	$z_1z_4$	$z_2z_3$	$z_2z_4$	$z_3z_4$	$z_1'$	$z_2'$	$z_3'$	$z_4'$	$y \times 10^{-9}$ /个·mL <sup>-1</sup>
1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	0.406	0.406	0.406	0.406	81.25
2	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.406	0.406	0.406	0.406	84.375
3	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0.406	0.406	0.406	0.406	73.125
4	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	0.406	0.406	0.406	0.406	72.5
5	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.406	0.406	0.406	0.406	35.625
6	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	0.406	0.406	0.406	0.406	41.25
7	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.406	0.406	0.406	0.406	32.5
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.406	0.406	0.406	0.406	28.75
9	1	-1.682	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.234	-0.594	-0.594	-0.594	115
10	1	1.682	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.234	-0.594	-0.594	-0.594	26.875
11	1	0	-1.682	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	2.234	-0.594	-0.594	63.75
12	1	0	1.682	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	2.234	-0.594	-0.594	48.125
13	1	0	0	-1.682	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	2.234	-0.594	54.375
14	1	0	0	1.682	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	2.234	-0.594	38.125
15	1	0	0	0	-1.682	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	2.234	45
16	1	0	0	0	1.682	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	2.234	45
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	49.375
18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	48.125
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	43.75
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	49.375
21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	53.75
22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	57.5
23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.594	-0.594	-0.594	-0.594	55
$B_j$	1242.5	-321.351	-61.906	-22.958	-5.625	4.375	-0.625	-13.125	-13.125	-0.625	4.375	112.552	27.712	-27.08	-34.15	
$d_i$	23	13.658	13.658	13.658	13.658	8	8	8	8	8	8	15.887	15.887	15.887	15.887	
$b_j$	54.022	-23.528	-4.533	-1.681	-0.412	0.547	-0.0781	-1.641	-1.641	-0.0781	0.547	7.085	1.744	-1.705	-2.150	
$U_j$		7560.752	280.591	38.588	2.317	2.393	0.0488	21.533	21.533	0.0488	2.393	797.382	48.340	46.159	73.407	
$F_j$		349.84	12.98	1.79	0.11	0.11	0.00226	0.996	0.996	0.00226	0.111	36.896	2.237	2.136	3.400	
显著水平		0.01	0.01	0.25								0.01	0.25	0.25	0.10	

注:本试验为 1/2 实施; $F_{0.01}(1,15)=8.68$ , $F_{0.025}(1,15)=6.20$ , $F_{0.05}(1,15)=4.54$ , $F_{0.10}(1,15)=3.07$ , $F_{0.25}(1,14)=1.44$ , $F_{0.25}(1,16)=1.42$ ;y 为实测值;j=1,2,3,4

对各项回归系数进行显著性检验(表 2)可得,线性项只有  $z_4$  不显著,交互项都不显著,平方项都达显著水平。因而,在试验条件下,酵母菌 PF14 最终细胞浓度( $y \times 10^9$  个/L)与变量(麦芽汁装液量  $x_1$ 、

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度  $x_2$ 、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 浓度  $x_3$  和 MgSO<sub>4</sub> 浓度  $x_4$ )之间的回归模型为:

$$y = 191.7 - 4.469x_1 - 3.499x_2 + 1.363x_3 + 4.865x_4 + 0.0321x_1^2 + 0.197x_2^2 - 0.193x_3^2 - 0.973x_4^2$$

2.2.2 回归方程的拟合度检验与方差分析

对回归方程进行拟合度检验与方差分析得表 3。

表 3 拟合度检验与方差分析

方差来源	平方和 (SS)	自由度 (d <sub>f</sub> )	均方 (Ms)	F 值	显著性
回归	8845.22	7	1263.60	58.47	**
剩余	324.18	15	21.61		
误差	137.28	6	22.88		
失拟	186.90	9	20.77	0.91	
总和	9169.40	22			

注:(7,15)=4.14,(9,6)=2.96;“\*\*”表示极显著。

$F_{LF}$  = 失拟均方/误差均方 = 0.91 <  $F_{0.10}(9,6)$  = 2.96,即回归方程失拟不显著,说明本试验无其他因素的显著影响,模型是合适的。

$F$  = 回归均方/剩余均方 = 58.47 远远大于  $F_{0.01}(7,15)$  = 4.14,即回归方程在 0.01 水平上极显著,说明试验所选 4 因子对酵母菌 PF14 的增殖有显著影响,所选因子合适。

2.2.3 主效应分析

各因子对产量的影响程度,可以由回归系数绝对值的大小来比较。因为  $|b_1| > |b_2| > |b_3|$  (表 2),所以各因子影响程度为  $z_1 > z_2 > z_3$ ,即从大到小依次为麦芽汁装液量、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 浓度。

2.2.4 最优培养基的确定

用统计选优方法,每个因素取 5 个水平(表 1)。用计算机对  $5^4$  = 625 个方案寻优,可得酵母增殖数量最多的培养基组合为  $z_1 = -1.682, z_2 = -1.682, z_3 = 0, z_4 = 0$ ,即相当于麦芽汁装液量为 20 mL,不添加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为 5g/L, MgSO<sub>4</sub> 为 2.5g/L,此时酵母细胞浓度为  $1.232 \times 10^{11}$  个/L。

在 625 个方案中,酵母细胞浓度大于  $1.125 \times 10^{11}$  个/L 的方案共 33 个,约占全部方案的 5%。对这 33 个方案进行频数分析,结果见表 4。

结果表明,在正常情况下,用 100 mL 三角瓶进行培养,当酵母细胞初始浓度为  $1.923 \times 10^8$  个/L,麦芽汁装液量 20 mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度 0.196~1.033 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 浓度 2.559~5.566 g/L, MgSO<sub>4</sub> 浓度 1.778~3.222 g/L 时,经过 24 h 培养后,酵母细胞浓度可望高于  $1.125 \times 10^{11}$  个/L。

表 4  $y > 1.125 \times 10^{11}$  个/L 的变量数值与频率

水平	因 素			
编码值	$z_1$ 频数	$z_2$ 频数	$z_3$ 频数	$z_4$ 频数
-1.682	33	23	8	4
-1	0	10	8	8
0	0	0	8	9
1	0	0	6	8
1.682	0	0	3	4
平均值	-1.682	-1.475	-0.3155	0
$S_z$	0	0.0546	0.1960	0.1883
置信区间	-1.682	-1.616~ -1.335	-0.821~ 0.190	-0.486~ 0.486
工艺措施( $X_j$ )	20mL	0.196~ 1.033g/L	2.559~ 5.566g/L	1.778~ 3.222g/L

注:置信水平为 99%。第 10 行对应的是用规范变量表示的各因素变化区间,而第 11 行对应的是用自然变量表示的各因素变化区间。

上述工艺措施表明,麦芽汁中含有较多的氮源,而磷源和镁离子较为缺少,生产酵母过程中应加以注意,避免成为酵母正常增殖的限制因子。

3 结 论

(1)本试验中酵母菌 PF14 菌体生物量( $y \times 10^9$  个/L)与培养基配方(麦芽汁装液量  $x_1$ 、硫酸铵浓度  $x_2$ 、磷酸氢二钠浓度  $x_3$  和硫酸镁浓度  $x_4$ )之间的数学模型为:

$$y = 191.7 - 4.469x_1 - 3.499x_2 + 1.363x_3 + 4.865x_4 + 0.0321x_1^2 + 0.197x_2^2 - 0.193x_3^2 - 0.973x_4^2$$

(2)正常情况下,在 100 mL 三角瓶中进行批式培养,苹果酒酵母最佳增殖工艺为:麦芽汁装液量 20 mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度 0.196~1.033 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 浓度 2.559~5.566 g/L, MgSO<sub>4</sub> 浓度 1.778~3.222 g/L 时,培养 24 h 后,酵母细胞浓度可望从初始的  $1.923 \times 10^8$  个/L 增加到  $1.125 \times 10^{11}$  个/L。

参 考 文 献

1 宋安东,吴云汉,李艳梅等.产苹果酒优良酵母菌株的选育研究[J].河南农业大学学报,2002,36(2):183~186  
2 鲁健智,张厚瑞,方 宏,等.正交旋转回归试验优化木糖醇发酵培养基[J].食品与发酵工业,2002,28(3):14~16  
3 Pujari V, Chandra T S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* [J]. Bioprocess Engineering, 2000 (23): 303~307  
4 Maniha D, Aslam Z, Panda T. Optimization of medium composition by response surface methodology for the production of tartaric acid by *Gluconobacter suboxydans* [J]. Biopro-

cess Engineering, 1998(19):285~288

- 5 刘细明.应用二次回归正交旋转组合设计优化抗生素发酵培养基[J].抚州师专学报,1994(3):47~55
- 6 贾士儒.生物工艺与工程实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2002
- 7 袁志发,周静芋.试验设计与分析[M].北京:高等教育出版社,2000

版社,2000

- 8 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986
- 9 陈思斌,萧熙佩.酵母生物化学[M].济南:山东科学技术出版社,1990

## Optimization of Medium for the Biomass Enrichment of An Apple Wine Yeast Strain

Tang Gaoqi<sup>1,2</sup> Yue Tianli<sup>1</sup> Gao Zhenpeng<sup>1</sup> Liu Yanxia<sup>3</sup> Lin Xiaoliang<sup>4</sup>

1(Northwest Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)

2 (YangLing Vocational & Technical College, Yangling 712100, China)

3 (Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

4 (Shaanxi Landmark Brewery Co. LTD, Xianyang 712044, China)

**ABSTRACT** The quadratic orthogonal regression rotary combination design was used to determine the optimal levels of medium nutrients for biomass enrichment of yeast. The medium components considered include wort,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A mathematical model was formulated through this test, and the optimal levels determined by the model were: wort, 20mL;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.196~1.033g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.559~5.566 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.778~3.222 g/L.

**Key words** apple wine yeast, the medium for biomass enrichment, mathematical model

### 市场动态

#### 利乐公司欲在中国罐头食品行业扩大发展

利乐公司预测中国市场留给罐藏食品的成长空间无限广阔。中国消费者人均年消费液态奶30包、方便面20包,但只消费2罐/瓶罐头食品,罐藏食品将在中国食品市场获得更大的份额。

在中国的罐头包装市场,国内玻璃瓶和金属罐仍占主导地位。近年来,随着软包装材料及工艺发展,软包装罐头也开始零星出现,但市场份额较少。罐头保质期一般要达到一年,因此要求外包装有很强的阻隔性。对于一些要进行高温杀菌处理的食品,还要有良好的耐高温性能。国内产品目前虽有少量使用袋装,但普遍存在保质期短、韧性差、易爆袋等问题。因此安全、方便、新颖的罐头包装将具有良好的市场发展潜力。

中国乳业的高速发展对罐头业有一定的借鉴意义,与近年乳业的高速发展形成鲜明对比的是,中国罐头食品业鲜见对市场、对受众的冲击力与诱惑。从市场机遇,从宏观、微观环境来看,罐头食品均有其独特的市场优势所在。

乳品行业与大型的外资机构合作合资的活动非常活跃,行业内的交流较为开放,同时与优秀的供应商合作日趋紧密(从设备,到包装,添加剂,以及广告媒体等等),有效地借助外力资源迅速解决了诸如企业管理、人才培养,到产品开发方面的难题。而罐头企业在设备更新和产能扩张上犹豫不前,忽视国内市场,未能大力提升品牌和销售网络建设,与外界合作交流仍然不足,企业治理水平的提升需要加快。

罐头行业各个品类尚缺乏龙头企业,对消费缺乏引导力。除在八宝粥、肉类制品及番茄罐头有个别领先的企业外,其他品类的市场份额分散,无法对消费市场形成足够的影响。而在乳品业,前5位的企业已占去市场份额的60%以上,广告量占70%以上,大量的媒体宣传对消费者形成巨大的引导,使整个行业充满竞争力。

利乐佳的基本材料是纸,并且可以装着食物进行蒸煮,为生产传统铁罐装和玻璃瓶装加工食品生产商提供了一种全新的包装选择。利乐佳已经被欧洲的主要食品生产商采用了数年,开始被市场广泛接受并得到行业内认可。

#### 利乐公司在全球大力推广立式袋装

立式饮料袋是利乐公司墨西哥分部的Jumex部在2005年研制生产的。此袋由六层塑料复合制成,其中最外层即表层是PET/SiO<sub>x</sub>,该表层既具有极佳的阻氧性能又兼良好的印刷性。由于其轻便、易携带,可站立,此袋一问世就受到了消费者特别是青少年的欢迎。墨西哥市场的成功经验也使利乐公司充满信心,他们计划今年向全球的多个国家开拓市场。他们的市场调研报告显示,已有很多国家对立式袋表示了兴趣,其中有美国、德国、澳大利亚、印度、沙特阿拉伯、中国和日本。