

## 柠檬酸钠提高酿酒酵母谷氨酸合成效率

汤超<sup>1</sup>, 刘立聪<sup>1</sup>, 陈雄<sup>1</sup>, 代俊<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 姚娟<sup>2</sup>, 郑国斌<sup>2</sup>, 王志<sup>1\*</sup>1(发酵工程教育部重点实验室, 湖北省食品发酵工程技术研究中心, 工业发酵湖北省协同创新中心,  
工业微生物湖北省重点实验室, 湖北工业大学, 湖北 武汉, 430068)

2(湖北省酵母功能重点实验室, 安琪酵母股份有限公司, 湖北 宜昌, 443003)

**摘要** 为增加酵母抽提物鲜度以更好地满足其在食品领域的需求, 在 10 L 发酵罐水平研究了柠檬酸钠-糖蜜补料策略对酿酒酵母 J-5 生长及胞内谷氨酸合成的影响。糖蜜流加补料发酵中存在显著的溢流代谢, 乙醇浓度(10 h)高达 22 g/L, 干重和胞内谷氨酸分别达到 36.36 g/L(21 h)和 2.28% (质量分数)(18 h)。而 3~14 h 采用 50 mL/h 的初始速度流加糖蜜(体积 1.8 L, 含 72 g 柠檬酸钠)和每 2 h 流速增加 50 mL 的策略, 能有效地减少碳溢流代谢, 乙醇质量浓度(10 h)仅为对照的 54.5%。同时, 显著提高了胞内谷氨酸合成效率, 其峰值含量达到了 3.7% (质量分数)(11 h), 比优化前提高了 62.3%。该文确定了柠檬酸钠浓度/峰值菌体干重为  $0.238 \pm 0.007$  的优化参数, 为工业化放大实验提供了参数依据。

**关键词** 酿酒酵母; 碳源溢流; 柠檬酸盐; 细胞内谷氨酸合成

酵母抽提物富含多肽、氨基酸、呈味核苷酸、 $V_B$  族及微量元素, 具有纯天然、营养丰富、味道醇厚等诸多优点<sup>[1-2]</sup>, 在各类食品、保健品、调味品生产过程中应用广泛<sup>[3]</sup>, 但其鲜度不够突出(主要是谷氨酸含量偏低)<sup>[4-5]</sup>。

高  $\text{NH}_4^+$  浓度条件下, 酿酒酵母经谷氨酸脱氢酶(NADPH 为辅酶)催化  $\alpha$ -酮戊二酸和铵根合成谷氨酸<sup>[6-7]</sup>。因此, 提高谷氨酸合成效率的基础是增强三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环的碳流量。但是, 酿酒酵母高密度发酵过程存在明显的 Crabtree 效应, 致使糖代谢优先溢流向乙醇合成途径<sup>[8]</sup>, 从而影响了谷氨酸合成前体  $\alpha$ -酮戊二酸的供应效率<sup>[9]</sup>。另外, 谷氨酸是酿酒酵母胞内氨基酸代谢的“中转库”, 细胞总氮的 80% 来自谷氨酸的氨基氮<sup>[10]</sup>。因此, 酿酒酵母生长过程中胞内谷氨酸的积累处于“氨基酸中转平衡”的状态<sup>[11]</sup>。显然, 想要富集胞内谷氨酸一方面需要克服或降低 Crabtree 效应、提高 TCA 循环的效率和  $\alpha$ -酮戊二酸前体的供量, 促进谷氨酸的合成效率, 另一方面需要打破胞内“氨基酸中转平衡”, 降低谷氨酸的“中转站”消耗, 从而可能使其在胞内积累至一定浓度。

作为 TCA 循环中重要的中间产物, 柠檬酸还是调控中心碳代谢途径的效应物之一<sup>[12]</sup>, 具有调控

EMP 途径磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶活性的功能<sup>[13-14]</sup>, 可以降低 EMP 途径丙酮酸节点的碳溢流, 减少或抑制乙醇、有机酸等溢流产物的合成<sup>[15-17]</sup>。而目前基于降低 Crabtree 效应(以乙醇合成效率降低为特征和指标)来提高酿酒酵母胞内谷氨酸含量的策略还未见报道。

为提高酿酒酵母的生物量和胞内谷氨酸含量, 本文优化了柠檬酸钠-糖蜜补料策略, 研究了其对酿酒酵母代谢及胞内谷氨酸合成积累的影响, 为富谷氨酸酵母工业化生产提供理论依据和技术指导。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与仪器

## 1.1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) J-5, 由安琪酵母股份有限公司提供。

## 1.1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 蔗糖 50, 酵母浸粉 20,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, pH 4.8~5.0, 115 °C 灭菌 20 min。

种子培养基(YS 培养基)(g/L): 蔗糖 100, 酵母浸粉 20,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, pH 4.9, 250 mL 三角瓶装液量 100 mL, 115 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 糖蜜(含总糖质量分数 35.8%) 100 mL/L、酵母浸粉 10 g/L、工业蛋白胨 20 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g/L, 115 °C 灭菌 20 min。

第一作者: 硕士研究生(王志教授为通讯作者, E-mail: wangzhi-1002@126.com)。

收稿日期: 2019-03-01, 改回日期: 2019-03-20

补料培养基:糖蜜和柠檬酸钠混合液。

### 1.1.3 仪器

高压灭菌锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;DZF-6020 电热鼓风干燥箱,重庆银河实验仪器有限公司;SPX-150B-Z 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司;TG18M 台式高速离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;HNY-211B 恒温摇床,天津市欧诺仪器仪表有限公司;CJ-1D 洁净工作台,天津市泰斯特仪器有限公司;容声 BCD-560WD11HY 冰箱,海信容声冰箱有限公司;pH 计,赛默飞世尔科技有限公司;高效液相色谱 U3000,安捷伦公司;10 L 发酵罐,上海保兴生物工程设备有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 种子培养方法

将斜面菌种用接种环勾出一环在新鲜斜面培养基上划满整个表面,30 ℃ 培养 12 h;再向培养好的斜面中每支倒入 15 mL 无菌水洗脱表面菌体,并用移液枪吹打均匀成菌悬液,然后转接至摇瓶,每瓶接种量为 10% (5 mL 菌悬液),放置摇床 180 r/min,30 ℃ 培养 10 h。

### 1.2.2 发酵控制

10 L 发酵罐控制:制备 5 L 摇瓶种子液,种子液合瓶后于 4 ℃ 静置 8 h,后弃上清液,浓缩的合瓶种子液体积约 1 L,接入 10 L 发酵罐(定容 5 L 发酵培养基),接种后混合体系体积为 6 L。发酵温度 30 ℃,用 10% (质量分数)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  和浓氨水控制 pH 在 5.3 左右。

### 1.2.3 流加补料策略

补料 1:糖蜜流加补料发酵,第 3~14 h 流加糖蜜,初始流速 50 mL/h,随后每 2 h 增加补料速率,增加梯度为 30 mL/h。如:第 5~7 h 为 80 mL/h,第 7~9 h 为 110 mL/h 等,总量为 1 300 mL,糖蜜含总糖质量分数为 35.8%。

补料 2:糖蜜-柠檬酸钠流加补料发酵,程序同补料 1,糖蜜中混入 48 g 柠檬酸钠。

补料 3:第 3~14 h 流加糖蜜,初始流速 50 mL/h,随后每 2 h 增加补料速率,增加梯度为 50 mL/h,总量为 1 800 mL,糖蜜中混合 48 g 柠檬酸钠。

补料 4:优化后的糖蜜-柠檬酸钠流加补料发酵,补料程序同补料 3,糖蜜中混入 72 g 柠檬酸钠。

### 1.2.4 酵母胞内谷氨酸测定

样品预处理:取发酵培养 24 h 后的发酵液

2.5 mL,6 500 r/min 离心 5 min,倒掉上清,水洗菌体 2 次,再用 5 mL 去离子水重悬菌体,-20 ℃ 冻 1.5 h,80 ℃ 水浴 15 min,反复冻融 4 次。冻融好的菌悬液 6 500 r/min 离心 5 min,取上清 600  $\mu\text{L}$  于 2 mL 离心管再向其中加入 2 倍体积(1.2 mL)冰冻后的无水乙醇,10 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min,0.22  $\mu\text{m}$  的滤头过滤上清于样品瓶,-20 ℃ 保存。胞内游离谷氨酸含量采用 HPLC 检测<sup>[5,18-19]</sup>。

HPLC 分析条件:色谱柱为安捷伦 ZORBAX SB-Aq column(150 mm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ ),Agilent USA;柱温 30 ℃;进样量 20  $\mu\text{L}$ ;紫外检测波长 210 nm;采用 10 mol/L pH 1.8 的  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (磷酸调 pH) 作为流动相;流速 0.6 mL/min。根据所测标品,谷氨酸的保留时间为 4.6 min。胞内谷氨酸含量计算如公式(1):

$$\text{胞内谷氨酸质量分数}/\% = \frac{\text{胞内谷氨酸质量}}{\text{菌体干重质量}} \times 100 \quad (1)$$

### 1.2.5 菌体干重测定

取发酵液 7 mL,6 500 r/min 离心 5 min,倒掉上清水洗菌体 2 次,80 ℃ 烘箱连续烘干 24 h,取出放入干燥器冷却后称质量,得到细胞干重(g/L)。

### 1.2.6 总糖测定方法

总糖质量浓度测定采用硫酸蒽酮法<sup>[20]</sup>。

### 1.2.7 乙醇测定方法

乙醇质量浓度通过生物分析传感仪测定<sup>[21]</sup>。

## 1.3 数据处理

所有试验数据至少 3 个平行试验,采用 Origin 8.5 对试验数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 柠檬酸钠对酿酒酵母摇瓶发酵合成谷氨酸的影响

由图 1 可知,摇瓶中菌体干重约在 8.8 g/L,柠檬酸钠未对酿酒酵母生物量产生显著影响。但是,随着柠檬酸钠浓度的增加,胞内谷氨酸含量呈先升后降的趋势,柠檬酸质量浓度为 2 g/L 时含量胞内谷氨酸质量分数达到峰值(2.96%),比对照组(2.55%)提高了 16.1%,因此选择 2 g/L 为最适添加量。

### 2.2 补料策略 1 对酵母产胞内谷氨酸合成的影响

根据补料 1 的设置,在 3~14 h 流加 1 300 mL 糖蜜,酵母胞内谷氨酸、菌体生长代谢的影响如图 2。补料期间总糖含量在 2.5~10 g/L,细胞以近线性状态增长至 12 h(细胞干重为 28.08 g/L,平均比生长

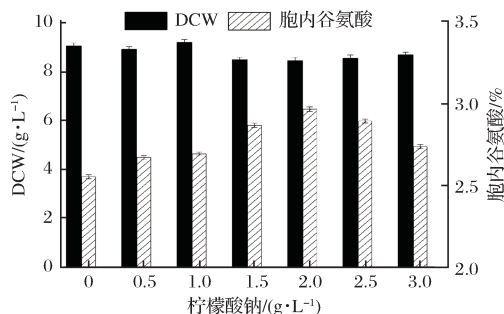


图1 柠檬酸钠对酿酒酵母生物量和胞内谷氨酸的影响

Fig. 1 Effects of sodium citrate addition on biomass and glutamate production in *Saccharomyces cerevisiae* J-5

速率接近  $0.069 \text{ h}^{-1}$ )。3 ~ 14 h 补糖过程中,经丙酮酸溢流合成的乙醇质量浓度由  $16 \text{ g/L}$  缓慢升至  $22 \text{ g/L}$ ,而胞内谷氨酸质量分数则在  $1.5\%$  波动。说明补料期间细胞发生了 Crabtree 效应(乙醇溢流)<sup>[23]</sup>。虽然酵母适应于溢流代谢(乙醇发酵)而快速生长,但 TCA 循环的碳流量下调与增强 TCA 中间产物  $\alpha$ -酮戊二酸前体供量、促进谷氨酸合成的发酵目标相矛盾,使得谷氨酸的合成和积累处于低水平的平衡状态中。

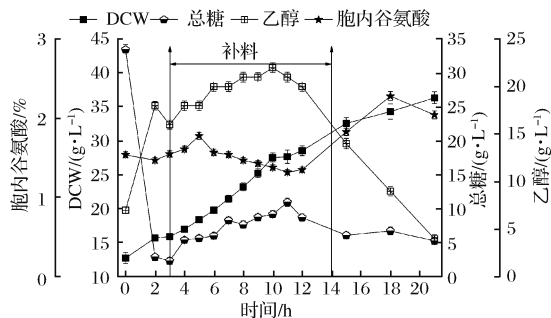


图2 10 L 罐补料策略1对酿酒酵母 J-5 发酵的影响

Fig. 2 Effect of feeding strategy 1 on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* J-5 in a 10 L bioreactor

补糖结束后,总糖由 12 h 的  $8.73 \text{ g/L}$  被快速利用至 15 h 的  $6.11 \text{ g/L}$ ,后维持在  $5 \text{ g/L}$  左右,而乙醇由 12 h 的  $18 \text{ g/L}$  被快速利用至 21 h 的  $1.0 \text{ g/L}$ ,说明 12 ~ 21 h 随着还原糖的利用, Crabtree 效应减弱或消失,乙醇作为储备碳源经乙酰 CoA 回补 TCA 循环和乙醛酸循环<sup>[22]</sup>,维持了细胞的近线性的二次生长,其平均比生长速率约为  $0.019 \text{ h}^{-1}$ ,仅为 1 次生长期间的  $27.5\%$ ,细胞干重在 21 h 达到  $36.36 \text{ g/L}$ 。

虽然细胞以乙醇为碳源的生长效率低于利用葡萄糖的,但由于 Crabtree 效应减弱或解除, TCA 循环的碳通量增大促进了胞内谷氨酸的积累<sup>[23]</sup>,并在 18 h

达到峰值 ( $2.28\%$ )。另外,在以乙醇为主要碳源进行二次生长期间,由于其比生长速率相比于一次生长期间大幅度下降,细胞对谷氨酸“氮库中转”的生理需求<sup>[11]</sup>降低,“谷氨酸合成加速和中转需求降低”是胞内谷氨酸积累的主要原因。而 18 h 后被降解利用,这可能与 18 h 以后碳源不足、谷氨酸做碳源在 GDH2 催化下回补 TCA 循环<sup>[5]</sup>,以满足细胞生长的需要有关。

0 ~ 12 h 发酵体系内碳源充足, EMP 途径通量大,远高于 TCA 循环通量, Crabtree 效应使得谷氨酸的合成和积累处于低水平的平衡状态中,因此,发酵过程中要适度抑制 EMP 途径碳代谢流量,避免中间产物(丙酮酸)过剩造成碳源溢流。由于柠檬酸能显著地降低磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶活性,因而能适当地减缓 EMP 途径的代谢流量<sup>[15-17]</sup>。因此,需要考虑补料与柠檬酸钠的综合作用对谷氨酸、菌体生长代谢的影响。

### 2.3 补料策略2对酵母产胞内谷氨酸发酵过程的影响

根据补料1的生长特点,峰值细胞干重达到了  $36.36 \text{ g/L}$ ,是摇瓶发酵的 4.13 倍。由于柠檬酸钠调控代谢的对象是单个细胞,因此,按细胞干重比例调整柠檬酸钠终质量浓度为  $8 \text{ g/L}$  ( $48 \text{ g}$  柠檬酸钠),形成补料2策略。该补料模式对酵母产胞内谷氨酸、菌体生长和主要代谢的影响如图3。

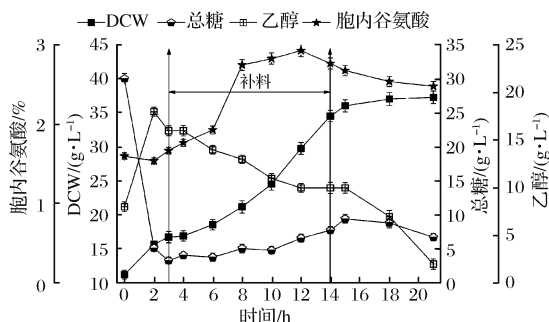


图3 10 L 罐补料策略2对酿酒酵母 J-5 发酵的影响

Fig. 3 Effect of feeding strategy 2 on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* J-5 in 10 L bioreactor

由图3可知,3 ~ 14 h 酵母生物量近线性生长到 14 h ( $34.56 \text{ g/L}$ ),平均比生长速率约  $0.069 \text{ h}^{-1}$ ,与补料策略1 ( $0.069 \text{ h}^{-1}$ ) 相同,说明添加的柠檬酸钠对细胞的生长未产生负面影响。0 ~ 3 h 溢流分子(乙醇)大量积累维持在  $17 \text{ g/L}$  左右,与图2 ( $18 \text{ g/L}$ ) 接近。但是,补料期间(3 ~ 14 h),乙醇持续下降到  $10 \text{ g/L}$ 。这说明柠檬酸钠的调控作用使丙酮

酸溢流生成乙醇的效率降低,并转化乙醇为乙酰 CoA 进入 TCA 循环乙醛酸循环<sup>[24]</sup>。期间,谷氨酸合成效率 > 生长的“氮库中转需求”而在细胞内积累,持续从 3 h 的 1.67% (质量分数) 上升到 12 h 的 2.93% (质量分数),比补料策略 1 谷氨酸峰值浓度提高近 29%。

补料结束后(14~21 h),细胞进入稳定期。而乙醇仍在被迅速利用,由 14 h 的 10 g/L 降至 21 h 的 2 g/L。而胞内谷氨酸也在缓慢地被“中转”转化(21 h 其质量分数降至 2.38%)。对比补料策略 1(图 2)说明在策略 2 条件下,发酵后期碳源不足(乙醇质量浓度仅为 10 g/L,是图 2 的 55.6%),其代谢产生的中间产物和能量不足以维持高细胞浓度条件的生理需求,细胞开始利用胞内的游离谷氨酸,因此胞内含量下降是必然结果。

但补料期间的谷氨酸峰值比补料策略 1(18 h, 质量分数 2.28%) 高出了 29%。这一现象说明了添加柠檬酸钠有效地减缓了 EMP 途径生成丙酮酸的速度,通过减少乙醇溢流途径,来增大 TCA 循环的流量,提高了  $\alpha$ -酮戊二酸的供给,促进了谷氨酸的合成效率。另外,可以考虑增加糖蜜的补料量以增加碳源的供应。

#### 2.4 补料策略 3 对酵母产胞内谷氨酸发酵过程的影响

基于 2.3 中的分析,在策略 2 的基础上提高补料组分中糖蜜的量(柠檬酸钠量不变)形成补料策略 3,该补料模式对酵母产胞内谷氨酸、菌体生长和主要代谢的影响如图 4。

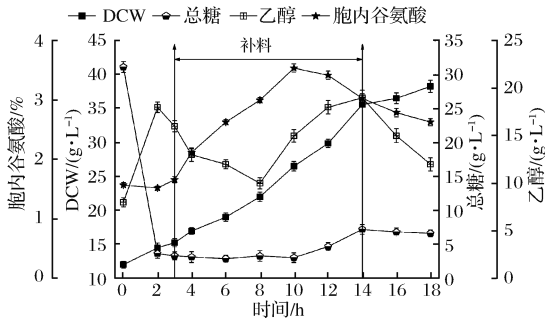


图 4 10 L 罐补料策略 3 对酿酒酵母 J-5 发酵的影响  
Fig. 4 Effect of feeding strategy 3 on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* J-5 in 10 L bioreactor

由图 4 中可知,补料期间平均比生长速率为约  $0.076 \text{ h}^{-1}$ ,较策略 2( $0.069 \text{ h}^{-1}$ ) 提高了 9%,14 h 时干重达 35.6 g/L,这说明同阶段增加补糖可以提高比生长速率。乙醇质量浓度在 3~8 h 处于下降趋势,

在 8 h 降到补料期最低点(10 g/L)后逐渐升高至 14 h 的 19 g/L,说明 8~14 h 发生了二次溢流现象。增加糖的供应后,柠檬酸钠的调控作用不足以缓解此条件下 EMP 途径生成丙酮酸的速度,致使乙醇溢流途径加强,乙醇溢流途径增强会减少 TCA 循环的流量<sup>[25-26]</sup>,这种情况对于谷氨酸合成是不利的,需要考虑继续增加柠檬酸钠的添加量。但即使如此,谷氨酸质量分数在 10 h 也达到了峰值(3.54%),进一步比策略 2 提高了 20.8%。随后因乙醇溢流而减弱了 TCA 循环的碳流,导致谷氨酸合成效率降低。而细胞仍保持着高比生长速率生长,对谷氨酸的“氮库中转”需求旺盛,致使谷氨酸质量分数持续下降到 14 h (3.03%)。补料结束时,二次溢流使乙醇积累至 14 h 的 19 g/L,14~18 h 细胞二次生长的主要碳源和能源是乙醇,期间乙醇的利用效率是  $1.4 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,平均二次生长速率约为  $0.018 \text{ h}^{-1}$ ,仅为补料期间的 23.9%,但与补料策略 1 接近(图 2)。

#### 2.5 补料策略 4 对酵母产胞内谷氨酸发酵过程的影响

基于 2.4 的分析,在策略 3 的基础上提高补料组分中的柠檬酸钠至 72 g,形成补料策略 4,该补料模式对酵母产胞内谷氨酸、菌体生长代谢的影响如图 5。

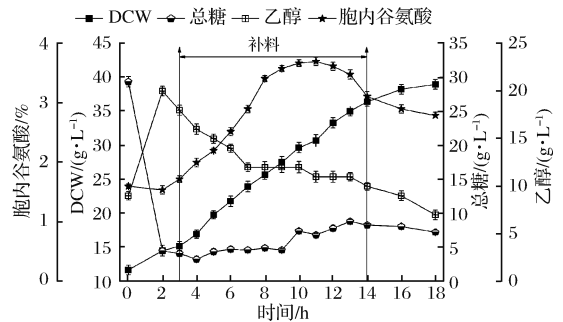


图 5 10 L 罐补料策略 4 对酿酒酵母 J-5 发酵的影响  
Fig. 5 Effect of feeding strategy 4 on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* J-5 in 10 L bioreactor

3~14 h 细胞的平均比生长速率约为  $0.076 \text{ h}^{-1}$ ,这与策略 3 中生长速率一致,14 h 细胞干重达 36.44 g/L。增加柠檬酸钠加量后,总糖在 2~9 h 维持在 4.5 g/L 左右,比策略 3 中残糖(3 g/L 左右)提高 50%,说明在流加糖速率相同的情况下,增加柠檬酸钠可以降低菌体对糖的利用速率。乙醇在 3~7 h 缓慢下降,并在 7~14 h 维持在 11 g/L 左右,胞内谷氨酸质量分数快速升至 8 h 的 3.41%,后缓慢地于 11 h 达到峰值(3.7%)。此过程中生物量由 25.72 g/L 增

加到 35.04 g/L,但胞内谷氨酸几乎没有减少,保持着胞内游离谷氨酸高含量状态。此外,9 h 后总糖质量浓度上升了 2.81 g/L,但乙醇质量浓度由 12 g/L 缓慢下降至 10 g/L,说明在柠檬酸钠的作用下,糖代谢基本不存在乙醇溢流现象,甚至乙醇还代谢回补 TCA 循环。碳源有效代谢并流向谷氨酸合成方向,使得峰值胞内谷氨酸质量分数较策略 1~3 分别提高了 62.3%、26.3%、4.52%,虽然该策略相较策略 3 峰值提高不足一成,但是,就谷氨酸质量浓度(干重质量浓度×谷氨酸质量分数)而言,该策略达到了 1.14 g/L,比策略 1~3 分别提高了 45.3%、30.2%、21.1%。14~18 h 菌体二次生长,平均比生长速率约 0.024 h<sup>-1</sup>,比策略 3 同期高 32.1%,原因可能是,罐内残糖浓度高于策略 3,菌体还在缓慢利用残糖生长。

2.6 柠檬酸钠添加浓度/峰值菌体浓度对谷氨酸积累的影响

既然柠檬酸钠对谷氨酸的积累有显著地促进作用,需要考虑在工业放大生产中如何使用这一参数。有关柠檬酸钠添加质量浓度/峰值菌体浓度(Cit/DW)的数据如表 1 所示。策略 3 流加的柠檬酸不足以抑制溢流代谢(图 4),虽然比策略 2 的胞内谷氨酸提高了 20.4%,但是增加柠檬酸钠后(策略 4),溢流代谢得到了有效地抑制(图 5),谷氨酸浓度比发酵 2 提高了 25.9%,也比策略 3 提高 4.5%。说明就抑制溢流代谢促进谷氨酸合成而言,柠檬酸钠的添加量以摇瓶发酵、策略 2 和策略 4 较为合适。显然,该数据在 3 者中不谋而合,均为 0.237 左右,因此 0.238±0.007 可以作为工业生产放大实验的依据之一。

表 1 柠檬酸钠添加浓度/菌体浓度对谷氨酸积累的影响  
Table 1 Effect of sodium citrate addition concentration/bacterial concentration on glutamate accumulation

指标	摇瓶 发酵	补料 策略 2	补料 策略 3	补料 策略 4
胞内谷氨酸质量分数/%	2.96	2.94	3.54	3.7
Cit/DW	0.237 <sup>a</sup>	0.231 <sup>b</sup>	0.169 <sup>b</sup>	0.247 <sup>b</sup>

注:<sup>a</sup> 摇瓶发酵结束的干重;<sup>b</sup> 补料结束时的干重。

3 结论

本文优化了柠檬酸钠-糖蜜补料策略,研究了其对酿酒酵母代谢及胞内谷氨酸合成积累的影响,结论如下:

(1)酿酒酵母 J-5 在糖蜜补料发酵过程中,存在碳分解代谢阻遏效应。发酵后期菌体能利用乙醇二

次生长,但二次生长效率仅为以糖蜜为碳源的生长效率的 27.5%。这使得细胞对以谷氨酸为核心的胞内“氮库中转”的生理需求降低,促进了谷氨酸的积累。说明促进胞内谷氨酸积累的积极因素包括一定条件下适时地调低生长速率。

(2)发酵过程乙醇溢流对胞内谷氨酸的积累存在消极影响,但适时地添加柠檬酸钠可以减弱乙醇溢流代谢,促进胞内谷氨酸的积累,可提高 62.3% 以上。

(3)柠檬酸钠添加质量浓度(Cit,g/L)可根据补料结束时菌体干重(DW)来决定,当 Cit/DW 在 0.238±0.007 时能有效抑制乙醇溢流、提高谷氨酸合成效率,可作为指导工业化放大生产的参考依据。

参 考 文 献

[1] 朱曼利,郭会明,洪厚胜,等. 酵母抽提物的研究概况[J]. 中国调味品, 2017, 42(2):175-180.

[2] 洪镭,汪晓伟,陈颖秋,等. 酵母抽提物鲜味剂的综述[J]. 轻工科技, 2010, 26(6):17-18.

[3] 林宗英,林民山,郭霏霏. 纯天然酵母粉的制备与应用[J]. 现代食品, 2017(23):101-103.

[4] GOEL A, LEE J, DOMACH M M, et al. Metabolic fluxes, pools, and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux. [J]. Biotechnology & Bioengineering, 1999, 64(2):129-134.

[5] 钱敏,白卫东,赵文红,等. 酵母抽提物中游离氨基酸的测定与分析[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7):878-881.

[6] MAGASANIK B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Eukaryotic Cell, 2003, 2(5):827-829.

[7] 王燕,宋香,杨平平,等. 谷氨酸生产菌 S9114 中的谷氨酸脱氢酶的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(6):725-729.

[8] BENNETZEN J L, HALL B D. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase [J]. J biol chem, 1982, 257(6):3 018-3 025.

[9] KAJIHATA S, MATSUDA F, YOSHIMI M, et al. (13)C-based metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with a reduced crabtree effect [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2015, 120(2):140-144.

[10] FAYYADKAZANM, FELLAR A, BODO E, et al. Yeast nitrogen catabolite repression is sustained by signals distinct from glutamine and glutamate reservoirs [J]. Molecular Microbiology, 2016, 99(2):360-379.

[11] CUETOROJAS H F, SEIFAR R M, PIERICK A T, et al. *In vivo* analysis of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport and central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic nitrogen-limited growth[J]. Applied & Environmental Micro-

- biology, 2016, 82(23):6 831 – 6 845.
- [12] 杜军, 刘辉, 徐庆阳, 等. 基于途径分析的 *L*-谷氨酸发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(11):9 – 12.
- [13] 宋翔, 谢希贤, 徐庆阳, 等. 柠檬酸钠对 *L*-谷氨酸发酵代谢流迁移的影响[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(2):5 – 8.
- [14] LIAO J C, HOU S Y, CHAO Y P. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism[J]. Biotechnology & Bioengineering, 1996, 52(1):129 – 140.
- [15] 余秉琦. 谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环与 *L*-谷氨酸合成[D]. 无锡:江南大学, 2005.
- [16] 陈宁, 刘辉. 柠檬酸钠对 *L*-亮氨酸发酵代谢流分布的影响[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(3):118 – 123.
- [17] 刘新星, 陈双喜, 储炬, 等. 柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌苷积累的影响[J]. 微生物学报, 2004, 44(5):627 – 630.
- [18] 朱广跃, 杨卫, 吴健, 等. HPLC 法定量分析微生物法制备液中产物  $\gamma$ -氨基丁酸和底物 *L*-谷氨酸[J]. 食品科学, 36(24).
- [19] 程勇, 陈玲, 邓晓春. 柱前衍生 HPLC 法测定烟叶中 20 种游离氨基酸含量[J]. 烟草科技, 2010, 47(8):35 – 38.
- [20] 申希峰, 黄杰涛, 张莲姬. 蒽酮-硫酸法测定榛花多糖含量条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(18):150 – 154.
- [21] 杜伟, 李敬龙, 张金玲, 等. 一种快速检测露酒中乙醇含量的新技术[J]. 酿酒科技, 2015(12):71 – 73.
- [22] 王英臣, 安家彦. 酒精发酵的酵母比生长速率与代谢产物及底物的关系[J]. 酿酒, 2005, 32(1):28 – 30.
- [23] 王亮. 酿酒酵母高浓度乙醇连续发酵体系振荡行为[D]. 大连:大连理工大学, 2014.
- [24] 余秉琦, 沈微, 王正祥, 等. 谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环与谷氨酸合成[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2):270 – 274.
- [25] 汤佳鑫. 啤酒酵母在不同碳源条件下中间代谢途径关键酶活性分析[D]. 大连:大连工业大学, 2008.
- [26] CORTASSA S, AON M A. Metabolic control analysis of glycolysis and branching to ethanol production in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, under carbon, nitrogen, or phosphate limitations[J]. Enzyme & Microbial Technology, 1994, 16(9):761 – 770.

## Citrate enhanced intracellular glutamate production in *Saccharomyces cerevisiae*

TANG Chao<sup>1</sup>, LIU Licong<sup>1</sup>, CHEN Xiong<sup>1</sup>, DAI Jun<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>,  
YAO Juan<sup>2</sup>, ZHENG Guobin<sup>2</sup>, WANG Zhi<sup>1\*</sup>

1 (Key Laboratory Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Provincial Food Fermentation Engineering Technology Research Center, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)  
2 (Hubei Province key laboratory of yeast function, Angel Yeast Co., Ltd, Yichang 443003, China)

**ABSTRACT** In order to enhance the freshness of yeast extract to better meet its needs in food industries, the effects of sodium citrate-molasses feeding strategy on the growth and intracellular glutamate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* J-5 were studied at a 10 L fermenter level. During molasses-fed fermentation, there was a significant overflow metabolism, and the ethanol concentration reached 22 g/L in 10 h. Besides, the dry weight and intracellular glutamate reached 36.36 g/L in 21 h and 2.28% in 18 h, respectively. Adding 1.8 L molasses that contained 72 g sodium citrate from 3 h to 14 h at an initial rate of 50 mL/h with an increasing flow rate of 50 mL every 2 h, the carbon overflow metabolism was effectively reduced. Moreover, the ethanol concentration in 10 h was only 54.5% of the control. Furthermore, the intracellular glutamate synthesis efficiency significantly improved, and the peak content reached 3.7% in 11 h, which was 62.3% higher than that of the control. In addition, the parameter of citrate content/the maximal cell dry weight under the optimized condition was  $0.238 \pm 0.007$ , which provides a reference for industrial scale-up experiments.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*; carbon overflow; citrate; glutamate synthesis efficiency