

多元混菌固定化发酵海藻保健酒的研究

王克明

(浙江科技学院生物与化学工程系, 浙江 杭州 310012)

摘要: 采用 PVA 固定化酿酒酵母、产香酵母和醋酸菌双轮发酵海带酿造海藻酒。对游离细胞与固定化细胞的分批发酵和连续发酵产酒的动力学进行研究, 并建立相应的发酵动力学方程。实验结果表明, 酿酒酵母和产香酵母菌种量的最佳配比为 4:1, 发酵温度 20℃, 固定化细胞分批发酵和连续发酵凝胶粒的充填系数分别为 0.25 和 0.5, 游离混合细胞的发酵时间为 7 d, 固定化细胞连续发酵稀释速率 0.12/h, 其发酵时间为 0.5 d 左右。经 160 d 连续发酵实验, PVA 固定化细胞粒子的机械强度良好。

关键词: 固定化发酵; 海藻保健酒; 发酵动力学; 固定化细胞

中图分类号: TS262.91; TQ920.1; Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)10-0075-04

Study on Seaweed Health Wine Production by Immobilized Multi-organism Fermentation

WANG Ke-ming

(Department of Biology and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* and *S. fragrans* immobilized with PVA as carrier were used to produce seaweed health wine by double bottom fermentation. Through the study of batch fermentation and continuous fermentation of free cells and immobilized cells, the corresponding fermentation kinetic equation was set up. The experimental results suggested that the optimal fermentation conditions were as follows: the optimal ratio of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces fragrans* for inoculation as 4:1; fermentation temperature at 20℃; packing ratio of the gel particles for batch fermentation and continuous fermentation were 0.25 and 0.5 respectively; 7 d fermentation time for free cells and the dilution rate for continuous fermentation as 0.12/h with fermentation time about 0.5 d. The mechanical strength of the immobilized cell particles remained in good conditions after 160 d continuous fermentation. (Tran. by YUE Yang)

Key words: immobilized fermentation; seaweed health wine; fermentation kinetics; immobilized cells

海藻中淀粉质含量达 25%, 蛋白质含量为 12%~50%, 含有各种常量和微量元素, 特别富含维生素(A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C)、烟酸、叶酸和胡萝卜素。海藻所含的微量元素和各种维生素的量远超过陆地植物^[1], 海藻具有极高的营养和保健功效, 可用于生产独具特色的保健醋、酒和饮料, 但长期以来未能被有效利用, 造成极大的资源浪费。

固定化微生物可以进行高密度增殖培养, 提高反应器单位体积的生物转化速率, 延长发酵细胞的寿命, 增加稳定性, 利于实现连续化生产, 利于产物分离等。采用固定化, 共固定化细胞生产酒精、啤酒、果酒及食醋等的研究十分盛行^[2-3, 4]。但是采用 PVA 为载体的固定化细

胞多菌种双轮发酵技术生产海藻保健酒的研究, 国内外鲜为报道。本研究以海藻为原料, 采用酸水解酶水解法制取海藻汁, 然后以固定化酿酒酵母和产香酵母进行间歇和连续发酵海藻酒。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 12[#], 15[#], 29[#] 和产香酵母 (*S. fragrans*) 8[#] 均由本校生物工程研究所提供。

1.2 原材料及设备

海带 (*Laminaria japonica*) 购于杭州海产品市场; 聚乙烯醇 (PVA-124, 日本进口分装); 海藻酸钠购于华东医药股份有限公司; 水解用酶购于无锡酶制剂生物工程有

收稿日期: 2005-08-21

作者简介: 王克明, 男, 辽宁大连人, 教授, 硕士, 研究方向: 生物技术与发酵工程。

有限公司;食用酒精由杭州酒厂购入。固定化连续发酵反应器为自制的玻璃柱式反应器(4.5 cm×18 cm)。

1.3 实验方法

1.3.1 海藻汁的制取

海带经 80℃烘干后磨成 80~100 目细粉。海藻粉加入水高压蒸煮后冷却至 45℃,添加水解用酶,于 45℃水浴保温 24 h,酶水解后调 pH 为 2~3,然后加温至 95℃维持 7~8 h,最后 2000 r/min 离心,清液部分即为海藻汁。调兑糖度和酸碱度后用于发酵。

1.3.2 固定化细胞的制备

酿酒酵母和产香酵母分别经种子培养后,取两种酵母的种子液以一定比例与一定量的含 0.6%海藻酸钠的 6%的聚乙烯醇溶液混合均匀,用注射器滴入含 1%CaCl₂ 的 5%硼酸液中,制成直径为 3 mm 的颗粒,浸泡 4 h,滤出固定化颗粒,用生理盐水洗涤 3 遍。

1.3.3 固定化活细胞的增殖

将固定化细胞粒子用无菌水浸洗数次,加入同体积的增殖培养基,于 30℃,160 r/min 通气振荡培养 18 h。

1.3.4 固定化细胞海藻酒发酵

①间歇发酵:用三角瓶,固定化细胞颗粒装填量为 0.25 g/mL(发酵液),18~20℃发酵。②连续发酵:应用玻璃柱式反应器,容积为 280 mL。H:D=4,固定化凝胶粒装填系数取 0.5,稀释率为 0.12/h,发酵温度为 18~20℃。

1.4 分析测定方法

海藻汁和发酵液中的总糖和还原糖的测定采用改进的 Lane-Eynon 法^[5],酵母细胞浓度采用血球计数板测定^[6],酒精浓度采用比色法和蒸馏法测定;氨基酸采用 121 MBAA 分析仪分析(酒液经活性炭脱色,蒸干后用 5%磺基水杨酸和 pH2.2 缓冲液溶解上机);香味成分采用气相色谱分析仪分析:条件 I,色谱柱为长 2 m ϕ3 mm 的玻璃柱,担体为上海试剂厂 101 白色担体(40~60 目),固定液为 6%DEGS,检测器温度 230℃,柱温 195℃,N₂ 40 mL/min, Air 1.4 kg/cm², H₂ 1.4 kg/cm²,衰减 10²×4;条件 II,色谱柱为长 2 m ϕ3 mm 的玻璃柱, GD×102(天津产),柱温 145℃,汽化室温度 180℃,检测温度 180℃,检测器温度 160℃,载气为 N₂ 30 mL/min, Air 300 mL/min, H₂ 30 mL/min,进样量为 2 μL,根据保留时间与各标样对比定性,内标法定量;矿质元素,使用日立 180-80 型原子吸收分光光度计,吸取一定量样品,加酸酸化,根据各元素的检测限适当稀释,上机测定。

2 结果与讨论

2.1 海藻汁的制取

海藻汁液的制取过程中,分别以酸水解和酶、酸水解相结合法处理海藻制得汁液,并测量其氨基酸和矿质

元素含量,结果见表 1、表 2。

表 1 酸水解与酶、酸水解法制备海藻汁的氨基酸 (mg/L)

名称	含量		名称	含量	
	(1)	(0)		(1)	(0)
天门冬氨酸	34.7	32.4	蛋氨酸	17.1	17.2
苏氨酸	15	11	异亮氨酸	21.2	19.9
丝氨酸	14	8.9	亮氨酸	21.1	22.2
谷氨酸	55.6	45.2	酪氨酸	12.3	9.6
甘氨酸	17.4	10.9	苯丙氨酸	15.2	13.8
丙氨酸	19.7	16.7	赖氨酸	16.5	14.3
半胱氨酸	8.4	6.5	组氨酸	13.7	11.2
缬氨酸	23.3	22.1	精氨酸	17.1	13.6
脯氨酸	17.3	17.1			

表 2 酸水解与酶、酸水解法制备海藻汁的矿质元素含量 (mg/L)

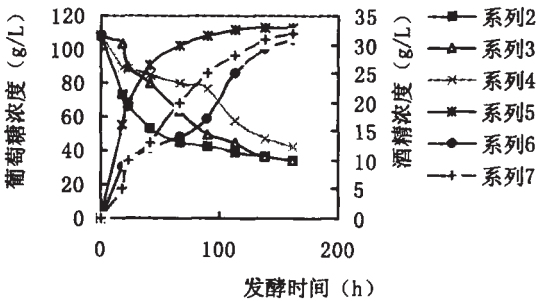
名称	含量		名称	含量	
	(1)*	(0)		(1)*	(0)
铁	18.02	18.03	镁	12.03	12.02
锰	0.56	0.562	铜	1.02	1.02
钾	216	16	磷	8.22	8.21
碘	20	19.8	锌	2.27	2.26

注: *1. 酶酸结合水解法; 0. 酶水解法。

表 1、表 2 的实验结果表明,采用酶、酸水解相结合法制备的海藻汁其氨基酸含量高于单独酸水解处理海藻制取的汁液。

2.2 发酵菌种的筛选与菌种混合配比量发酵试验

分别使用酿酒酵母 12[#]、15[#]、29[#] 3 种菌株与产香酵母 8[#] 以 3:1 的比例混合后进行游离细胞海藻酒发酵实验,结果见图 1。



注:3,7 号曲线示 29[#] 和 8[#] 酵母糖耗和产酒曲线;
6,2 号曲线示 12[#] 和 8[#] 酵母产酒和糖耗曲线;
5,2 号曲线示 15[#] 和 8[#] 酵母产酒和糖耗曲线。

图 1 游离细胞海藻酒发酵试验

由图 1 可知,酿酒酵母 12[#] 菌株与产香酵母 8[#] 混合组产酒速率慢,酿酒酵母 15[#] 菌株与产香酵母 8[#] 混合组发酵速度最快,但所得的酒精醪液风味不如另外 2 组;相比之下,酿酒酵母 29[#] 菌株与产香酵母 8[#] 混合组发酵速率适中,且所得的酒精醪液风味极好,所以在以后的发酵实验中均使用酿酒酵母 29[#] 与产香酵母 8[#] 混合组。

为了考察两种酵母以不同菌种量配比发酵对酒精醪液成分品质的影响,进行了酿酒酵母:产香酵母为1:0 2:1 3:1 4:1 5:1的不同菌种量配比的发酵实验,结果见表3。

表3 酿酒酵母与产香酵母不同配比对海藻酒品质的影响 (mg/L)

组分	配比量				
	1:0	2:1	3:1	4:1	5:1
丙醇	4.2	16.8	14.6	12.4	8.9
戊醇	0.31	1.25	1.1	1.23	0.47
异戊醇	28.98	49.76	48.86	48.03	38.92
异丁醇	9.15	20.6	19.4	20.3	15.7
乙酸乙酯	1.64	3.12	3.56	4.47	4.12
乳酸乙酯	21.02	53.66	56.63	60.47	53.08
酒精	26.9	25.6	26.6	26.8	27.4

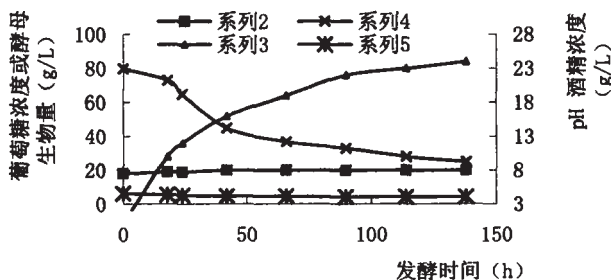
由表3看出,当酿酒酵母与产香酵母菌种量混合比例为4:1时,发酵的酒精醪液中其醇类和酯类的含量均较高,具有浓郁的酒香气。所以,在以后的发酵试验中,酿酒酵母与产香酵母的混合配比量均采用4:1的比例。

2.3 游离混合细胞分批发酵动力学

海藻汁经调兑后,进行游离混合细胞分批发酵,结果见图2。对于底物抑制及酒精非竞争性抑制双重作用的酒精发酵,其反应速率为 $V=V_m(1-P/P_m) \cdot S/(K_S+S+S/K_w)$ 。应用差分法处理实验结果,可以导出游离混合细胞分批发酵的底物消耗和酒精生产动力学模型:

$$-dS/dt = 2.653(1-P/103.2) \cdot S/(30.16+S+S^2/24.65)$$

$$dP/dt = 0.868(1-P/103.2) \cdot S/(30.16+S+S^2/24.65)$$



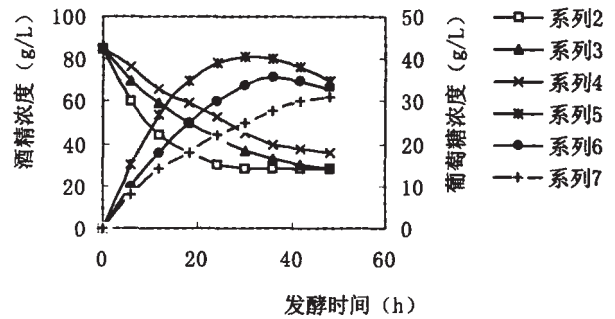
注:3号曲线为酒精浓度曲线;4号曲线为糖耗曲线;2号曲线为菌体浓度曲线;5号曲线为pH曲线。

图2 游离混合细胞分批发酵培养试验

2.4 固定化细胞分批发酵

在固定化细胞的增殖试验中,实验结果表明,增殖时间以18~24 h为宜,此时酵母细胞数量仍在增加,出芽率维持在12%以上。

本研究进行了发酵温度对固定化分批发酵过程的影响试验,酒精的发酵温度控制为13℃、20℃和25℃,其结果见图3。在20℃下,以不同的固定化细胞凝胶粒子添加量进行分批发酵实验,结果见表4。



注:7,4号曲线为13℃时产酒和糖耗曲线;5,2号曲线为25℃产酒和糖耗曲线;6,3号曲线为20℃产酒和糖耗曲线

图3 发酵温度对产酒和耗糖的影响

表4 在20℃下凝胶粒子添加量对海藻酒品质的影响 (mg/L)

项目	凝胶粒子添加量(%)			
	15	25	35	45
丙醇	12.4	12.5	12.4	12.3
戊醇	1.27	1.26	1.27	1.16
异戊醇	48.01	47.03	46.01	45.6
异丁醇	20.2	20.3	20.2	19.1
乙酸乙酯	4.39	4.48	4.45	4.33
乳酸乙酯	61.12	60.45	61.16	58.83
酒精(g/L)	23.3	25.6	27.6	32.5

由实验结果可知,25℃下28 h左右酒精发酵完毕,但所得酒香味较淡,而20℃下经36 h产酒已接近最高值,并且酒精醪液具有浓郁的香味。

由表4可看出,当发酵温度为20℃,固定化细胞粒子装填量为25%~35%(w/v)时,发酵的酒精醪液醇类、酯类等香气成分含量较高。如忽略固定化载体内部传质阻力的影响,并考虑由于海藻汁发酵液初糖浓度较低,对固定化细胞的糖抑制也忽略,采用与游离混合细胞相似的方法,就可导出海藻酒固定化分批发酵动力学模型:

$$-dS/dt = 2.53(1-P/101.6) \cdot S/(36.35+S)$$

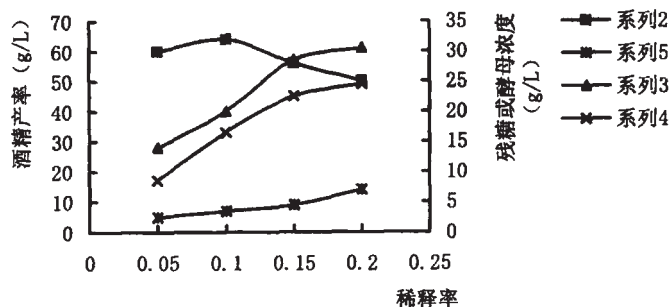
$$dP/dt = 0.87(1-P/101.6) \cdot S/(36.35+S)$$

2.5 固定化细胞连续发酵海藻酒

本研究应用玻璃柱式反应器固定化连续发酵反应系统,首先进行固定化增殖酵母凝胶粒装填量对发酵效果影响的试验。结果表明,装填系数为0.5时,所得酒精醪液的酒度适中,酒的香味浓郁。改变发酵稀释速率进行固定化酵母细胞连续发酵试验,结果见图4。

由图4可看出,稀释速率以 $D=0.12/h$ 为佳,此时酒度较高,且酒精醪液中残糖较低,反应器的生产能力也达到一定水平。再进一步提高稀释速率,虽然产酒能力增加,但酒度下降残糖升高,故稀释率取0.12/h为宜。

在上述发酵条件下,当系统建立稳定态后,进行了



注:2号曲线为酒精浓度曲线;4号曲线为酒精产率曲线;
3号曲线为残糖曲线;5号曲线为酵母浓度曲线。

图4 稀释率对发酵结果的影响

连续发酵动力学研究,导出了酒精醪液产量和酒液酒精度以及反应器有效容积 V 的关系式:

$$G = 4.254 \times 10^{-2} \cdot V / \{4.245 \ln [101.7 / (101.7 - P_0)] + \ln [32.5 / (32.5 - P_0)]\}$$

采用固定化酿酒酵母和产香酵母双菌种连续发酵工艺发酵海藻汁,酿造的酒精醪液其酒液不仅所含氨基酸和矿质元素十分丰富,而且含有多种醇类和酯类,其含量为:丙醇 10.2 mg/L,异丁醇 11.6 mg/L,戊醇 1.12 mg/L,异戊醇 39.21 mg/L,乙酸乙酯 3.08 mg/L,乳酸乙酯 51.46 mg/L。这些醇类和酯类相互混合作用使海藻酒产生浓郁的酒香气。

3 讨论

采用 PVA 固定酿酒酵母和产香酵母的细胞固定化技术发酵海藻,酿制海藻保健酒是可行的。本实验结果表明,采用固定化工艺,酵母活力回收率可达 94.4%,在固定化细胞增殖过程中,增殖时间以 18~24 h 为宜,此间酵母数量仍在不断增加,出芽率维持在 12% 以上。由酿酒酵母和产香酵母游离细胞混合发酵实验可知,由于

添加产香酵母使酒液香气大为增加,可提高酒精醪液质量。但 2 种菌种数量的对比对酒的风味及质量的影响很大。在本实验条件下 2 种菌种的菌量最佳配比为 4:1。在游离细胞的分批发酵过程中不易控制稳定的多菌种配比量,造成产品质量的波动。应用固定化连续发酵工艺不但可以维持比较稳定的菌种配比量,并且可实现连续化生产,其发酵时间由游离细胞发酵的 7 d 缩短为 0.5 d 左右,且其产香成分的醇类和酯类的含量接近游离混合细胞发酵酒精醪液中的含量。由此可见,采用固定化双菌种的工艺发酵酒精醪液质量稳定,生产效率高。采用固定化双菌种的工艺发酵海藻酒产酒工段,在较低温度下进行发酵,有利于醇、醛、酯类等香气成分的形成,对于提高酒精醪液的品质极为有利。本实验条件下,采用 20℃ 合适。从海藻酒的成分分析可以看出,其所含氨基酸和矿质元素无论种类还是数量都十分丰富,尤其含有碘和海藻多糖(未列出)具有重要医疗保健功效。本实验经连续发酵 160 d 后,检查固定化细胞粒子,未发现有破损,而且 PVA 固定化细胞粒子的机械强度仍良好。

参考文献:

- [1] Seibin arasaki, Teruko arasaki. Vegetable from the Sea[M]. Tokyo: Japan Publications. 1983 33-51.
- [2] 张治根, 苏尔复, 俞俊棠. 酵母酒精发酵动力学研究[J]. 工业微生物, 1989 (3): 11-18.
- [3] 王克明, 王雪筠. 固定化细胞发酵海带饮料的研究[J]. 食品科学, 1995 (8): 27-30.
- [4] 王克明, 王雪筠. 固定化细胞发酵食醋的研究[J]. 中国酿造, 1995 (5): 35-37.
- [5] 天津轻工业学院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1986 64.
- [6] 李详麟, 金宁人. 固定化酵母酒精发酵动力学研究[J]. 生物工程学报, 1991 7 (3): 265-271.

2005-2006 健康维权酒饮食品(天津)博览会

展览范围:

烟、酒、饮料、糖、茶、干调食品、休闲食品、冷冻食品、水产品、保健食品、绿色食品、土特产品、乳制品、新型食品、进口食品、食品机械、农产品加工等。

联系人: 董惠鑫 房志新

联系电话: 022-28370684 28031720

传真: 022-28138960

时间: 2005 年 12 月 24 日-2006 年 1 月 3 日

地点: 天津体育展览中心(世锦赛场馆)