

固定化酵母粒子的制备及特性

贺江, 樊明涛, 包飞

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用海藻酸钠包埋法对酿酒酵母 1450 进行固定, 研究了海藻酸钠浓度和氯化钙浓度对固定化颗粒机械强度和包埋量的影响, 同时通过添加材料对固定化颗粒的特性进行了进一步的改进, 并对固定化颗粒的发酵稳定性和贮藏特性进行了探索。结果表明, 采用 6% 海藻酸钠 6% 明胶为 9.0:1.0、氯化钙浓度为 0.05 mol/L 进行酿酒酵母的固定化, 可以获得具有较好机械强度和通透性及细胞渗漏少的固定化颗粒; 固定化酵母连续发酵性能稳定, 在低温条件下贮藏 6 周其活性保持完好。

关键词: 固定化酵母; 制备; 发酵稳定性; 贮藏特性

中图分类号: TS261.1; Q814.2; Q93-3 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2007)11-0029-03

Preparation of Immobilized Yeast Granule and Its Properties

HE Jiang, FAN Ming-tao and BAO Fei

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: Calcium alginate entrapment method was used to immobilize *saccharomyces cerevisiae* 1450. The effects of sodium alginate and calcium chloride concentration on mechanical intensity and entrapment amount of immobilized granule were studied. At the same time, the characteristics of immobilized granule including its fermentation stability and storage properties were also investigated. The results indicated that the use of 6% sodium alginate and 6% glutin (ratio 9.0:1.0) in 0.05 mol/L calcium chloride could produce immobilized granule with high mechanical intensity, good permeability and small leakage, the granule could keep stable fermentation performance for continuous fermentation, and its activity remained well after 6 weeks storage under 4 °C in 0.05 mol/L calcium chloride solution.

Key words: immobilized yeast; preparation; fermentation stability; storage properties

较之于游离细胞的优越性, 细胞固定化技术自 20 世纪 60、70 年代以来, 一直是生物工程领域科研工作者关注的热点之一^[1~2]。细胞固定化的方法较多, 主要分为吸附法和包埋法两大类。其中, 包埋法是目前微生物细胞固定化技术中最有效和最常用的方法^[1~3]。但用包埋法制得的固定化颗粒仍存在机械强度不够高、细胞渗漏严重等问题。本研究以海藻酸钠作为包埋材料, 对酿酒酵母 1450 进行固定, 研究海藻酸钠浓度和氯化钙浓度对固定化颗粒机械强度和包埋量的影响, 同时通过添加材料对固定化颗粒的特性进行了进一步的改进。在此基础上对固定化颗粒的发酵稳定性和贮藏特性进行了探索, 以期对固定化酵母的应用以及将固定化酵母开发为一种新兴酒精发酵剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种: 酵母菌 1450;

培养基: 酵母菌液体培养基: YEPD^[4]; 固定化细胞发酵培养基: 鲜榨苹果汁。

化学试剂: 海藻酸钠, 氯化钙, 碳酸钙, 二氧化硅, 硅藻土, 明胶。

仪器设备: 恒温摇床, 恒温培养箱, 酒精计, 一次性注射器及针头, 血球计数板, 显微镜, 游标卡尺等。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌的固定^[4]

取等量的酵母菌悬液和一定浓度的海藻酸钠溶液混合均匀后, 通过一次性注射器滴入一定浓度的氯化钙

收稿日期: 2007-07-03

作者简介: 贺江(1983-), 男, 江西萍乡人, 硕士生, 主要从事食品生物技术方面的研究。

通讯作者: 樊明涛(1963-), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品微生物及食品安全方面的研究, E-mail: mingtaofan@tom.com。

溶液中造粒,再将固定化颗粒于 4 条件下在氯化钙溶液中保存过夜后备用。

1.2.2 固定化颗粒机械强度的测定

采用按压法,以固定化载体的正面所能承受的最大压力来表征机械强度。随机抽取制得的固定化颗粒 3 粒置于自制正方形小盒内,均匀分布,上面盖上轻的玻璃片。往轻玻璃片上加 50 g 砝码,计时 60 s,用 0~150 mm 游标卡尺分别测量施压前后的颗粒半径,则单个固定化载体的机械强度为: $P_i = 50 / \pi d^2$, 其中 $d^2 = R^2 - [(r_1 + r_2 + r_3) / 3]^2$ ($R=1.50$ mm, 为施压前固定化颗粒的半径, r_1 、 r_2 、 r_3 为施压后固定化颗粒的半径高度,如图 1 所示),如此测量 3 组取平均值即为此固定化载体的平均机械强度 P (g/mm^2), $P = (P_1 + P_2 + P_3) / 3$ 。

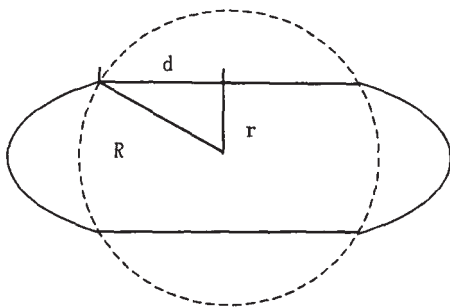


图 1 机械强度测定示意图

1.2.3 固定化颗粒包埋量的测定

取固定化颗粒 3 颗,用 pH5.0 的柠檬酸缓冲液溶解后再用血球计数板计数,最后折算为每个粒子的包埋量。

1.2.4 固定化颗粒渗漏量的测定

将固定化颗粒培养 24 h 后,用血球计数板计数发酵液中的细胞数,用发酵液中的细胞浓度表示固定化细胞的渗漏量。

1.2.5 酒精度的测定

按 GB/T 15038-94 酒精计法。

2 结果与分析

2.1 海藻酸钠浓度和氯化钙浓度对固定化颗粒特性的影响

氯化钙和海藻酸钠浓度是影响固定化颗粒特性的主要因素。本研究为探索这两个因素的最佳水平,进行了 2 因素随机区组实验。实验设置了 4 个氯化钙浓度: 0.05 mol/L、0.10 mol/L、0.15 mol/L 和 0.20 mol/L 和 4 个海藻酸钠浓度: 4%、5%、6% 和 7%。实验结果见表 1。

由表 1 可以看出,在实验所设置的水平范围内,随着海藻酸钠浓度的增加,固定化颗粒的机械强度也随之增大,而随着氯化钙浓度的增大,固定化颗粒的机械

表 1 海藻酸钠浓度和氯化钙浓度对固定化颗粒特性的影响

处理号	氯化钙浓度 (mol/L)	海藻酸钠浓度 (%)	机械强度 (g/mm^2)	包埋量 ($\times 10^8$ /颗)
1	0.05	4	10.47	2.58
2	0.05	5	13.39	1.85
3	0.05	6	18.21	2.61
4	0.05	7	24.09	1.87
5	0.10	4	9.92	1.33
6	0.10	5	11.08	0.94
7	0.10	6	10.40	0.95
8	0.10	7	13.79	1.16
9	0.15	4	8.44	0.99
10	0.15	5	8.84	1.09
11	0.15	6	10.10	1.39
12	0.15	7	11.76	1.25
13	0.20	4	8.33	1.51
14	0.20	5	9.11	1.05
15	0.20	6	9.98	1.74
16	0.20	7	12.74	1.10

强度却呈减小的趋势。在海藻酸钠浓度为 7%,氯化钙浓度为 0.05 mol/L 时,固定化颗粒的机械强度可达 24.09 g/mm^2 。而包埋量与机械强度之间并无直接联系,在处理 1 和处理 3 条件下,固定化颗粒的包埋量分别达到 2.58×10^8 /颗和 2.61×10^8 /颗。综合考虑两个指标,认为在处理 3(0.05 mol/L 氯化钙、6%海藻酸钠)条件下制备的固定化颗粒最为理想。

2.2 固定化酵母性能的改进

文献资料显示,在海藻酸钠中添加一定量碳酸钙、二氧化硅、硅藻土、明胶等材料可以在一定程度上改善固定化颗粒的机械强度或通透特性^[9]。本研究对最适合的添加材料及其添加量进行探索。

2.2.1 碳酸钙添加量对固定化酵母特性的影响

在氯化钙浓度为 0.05 mol/L,海藻酸钠浓度为 6%的条件下,设置碳酸钙的添加量为:0%、0.4%、0.6%、0.8%和 1.0% 5 个水平。实验结果见表 2。

表 2 碳酸钙添加量对固定化酵母特性的影响

碳酸钙添加量 (%)	机械强度 (g/mm^2)	包埋量 ($\times 10^8$ /颗)	渗漏量 ($\times 10^7$ /mL)
0	18.21	2.61	2.10
0.4	18.16	2.57	2.81
0.6	17.76	2.42	3.65
0.8	16.06	2.32	4.12
1.0	24.35	3.05	4.83

由表 2 可知,固定化颗粒的机械强度和通透性能在碳酸钙的添加量小于 0.8% 时和对照样的差异不大。而当添加量达到 1.0% 时固定化颗粒的机械强度和通透性能明显得到改善,但在培养过程中其细胞渗漏情况严重,不符合固定化颗粒的应用要求。所以,碳酸钙不是改善固定化颗粒性能的理想材料。

2.2.2 二氧化硅添加量对固定化酵母特性的影响

在氯化钙浓度为 0.05 mol/L, 海藻酸钠浓度为 6% 的条件下, 设置二氧化硅添加量为: 0%、1%、2% 和 3% 4 个水平。实验结果见表 3。

表 3 二氧化硅添加量对固定化酵母特性的影响

二氧化硅添加量 (%)	机械强度 (g/mm ²)	包埋量 (×10 ⁸ /颗)	渗漏量 (×10 ⁷ /mL)
0	18.21	2.61	2.12
1	18.16	2.61	2.67
2	19.19	2.41	2.78
3	17.12	2.50	3.12

由表 3 可知, 二氧化硅添加量对固定化酵母的机械强度和包埋量影响均不明显, 但随着二氧化硅添加量的增大, 固定化酵母培养过程中细胞渗漏情况愈加严重。可见, 二氧化硅也不是改善固定化颗粒性能的理想材料。

2.2.3 硅藻土添加量对固定化酵母特性的影响

在氯化钙浓度为 0.05 mol/L, 海藻酸钠浓度为 6% 的条件下, 设置硅藻土添加量为: 0%、2%、4% 和 6% 4 个水平。实验结果见表 4。

表 4 硅藻土添加量对固定化酵母特性的影响

硅藻土添加量 (%)	机械强度 (g/mm ²)	包埋量 (×10 ⁸ /颗)	渗漏量 (×10 ⁷ /mL)
0	18.21	2.61	2.12
2	16.77	2.35	2.38
4	18.83	2.94	2.77
6	19.34	2.88	2.75

由表 4 可知, 硅藻土添加量较小(2%)时, 固定化酵母的机械强度有所降低, 而添加量为 4%、6% 时, 机械强度稍有增大, 但没有显著差异; 硅藻土添加量对固定化颗粒包埋量和渗漏量的影响也不明显。说明硅藻土的添加与否并不对固定化颗粒的性能产生多大的影响。

2.2.4 明胶添加量对固定化酵母特性的影响

在氯化钙浓度为 0.05 mol/L 的条件下, 设置不同比例的 6% 明胶和 6% 海藻酸钠。实验结果见表 5。

表 5 明胶添加量对固定化酵母特性的影响

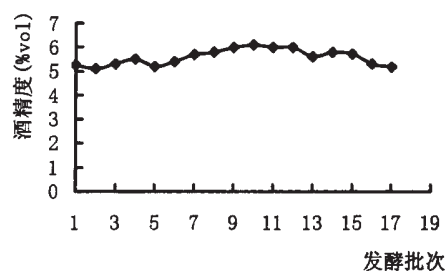
海藻酸钠(6%) : 明胶(6%)	机械强度 (g/mm ²)	包埋量 (×10 ⁸ /颗)	渗漏量 (×10 ⁷ /mL)
10 : 0	18.21	2.61	2.15
9.5 : 0.5	19.14	2.41	2.10
9.0 : 1.0	20.79	2.61	1.54
8.5 : 1.5	14.87	2.78	1.72
8.0 : 2.0	14.30	2.86	1.74
7.5 : 2.5	11.86	3.03	1.98

由表 5 可知, 当 6% 海藻酸钠 6% 明胶为 9.0 1.0 时, 固定化颗粒的机械强度最大。随着配比中明胶比例

的增大, 固定化颗粒的包埋量呈增大趋势, 而固定化酵母在培养过程中渗漏量呈先减小再增大的趋势。综合 3 个指标, 认为在 6% 海藻酸钠 6% 明胶为 9.0 1.0 时, 固定化颗粒各方面特性最优。

2.3 固定化酵母的发酵稳定性

根据 2.1、2.2 的结论, 采用 6% 海藻酸钠 6% 明胶为 9.0 1.0、氯化钙浓度为 0.05 mol/L 进行酿酒酵母的固定化, 可以获得具有较好的机械强度和通透性, 以及细胞渗漏少的固定化颗粒。但固定化酵母在连续发酵过程中的稳定性是决定固定化酵母应用前景的主要因素。本研究将固定化酵母应用于苹果酒发酵中, 以探索其实际应用的可行性。试验结果见图 2。



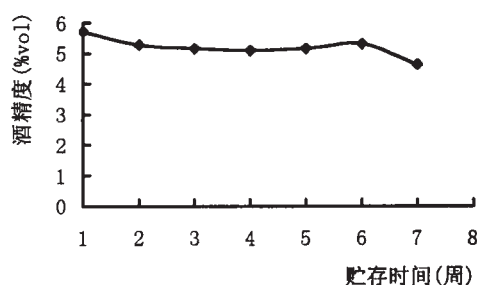
注: 发酵条件为 250 mL 三角瓶装 150 mL 鲜榨苹果汁, 加 10% (w/v) 固定化颗粒, 25~28 °C 厌氧发酵 24 h 后滤出颗粒用于下一批次试验。

图 2 固定化酵母发酵稳定性

由图 2 可知, 固定化酵母在连续 17 次发酵的过程中, 中间批次的酒度要稍高于初始与终了批次, 但每次酒度都稳定在 5.1%vol ~ 6.1%vol 之间, 说明用固定化酵母颗粒发酵具有很好的稳定性。

2.4 固定化酵母的贮藏特性

为了研究固定化颗粒的贮藏稳定性, 特将固定化颗粒于 4 °C 下保存于 0.05 mol/L 氯化钙溶液中, 贮存到一定时间后进行发酵试验, 结果见图 3。



注: 贮藏条件为 0.05 mol/L 氯化钙中, 4 °C 条件下保存。

图 3 固定化酵母贮藏特性

从图 3 可知, 固定化酵母在贮藏的前 6 周中活性保持完好, 发酵后酒精度都稳定在 5.1%vol ~ 5.7%vol 之间。到第 7 周时活性开始略有下降, 发酵后酒精度约为 4.6%vol。

(下转第 33 页)

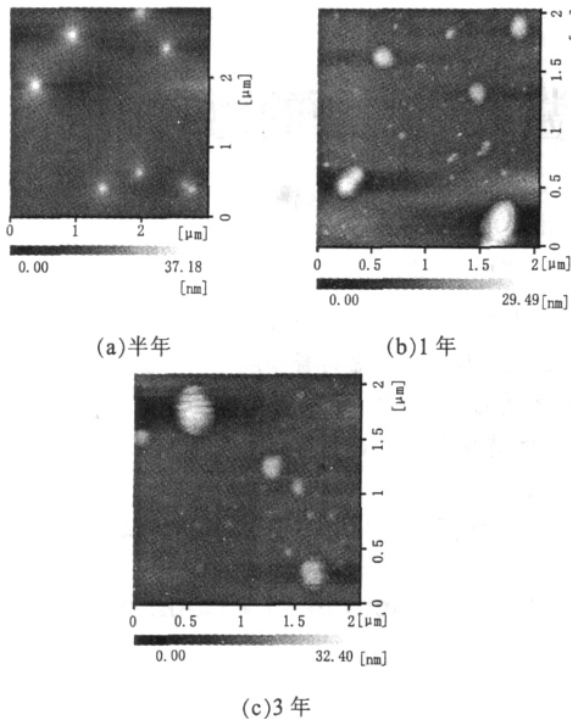


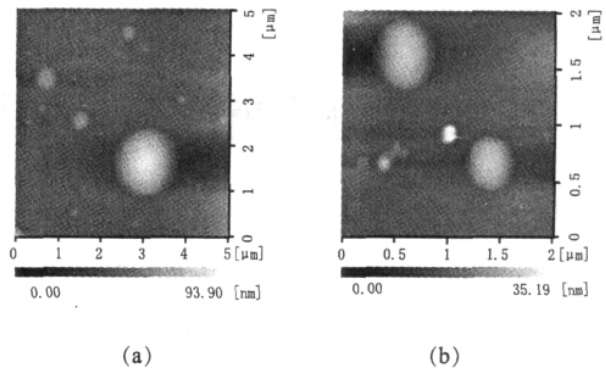
图1 不同贮存期的泸州老窖A等级AFM扫描图

优质半成品酒的AFM扫描结果见图2。

从图2中可看出, 优质半成品白酒, 在适合的贮存期后, 其酒体微观颗粒近似于球状, 大小分布错落有致。酒中呈香呈味的痕量和微量物质形成了特定微观形态。

3 讨论

从图1、图2中可以看到, 经发酵蒸馏得到的新酒, 必须经过一定时间的贮存。经过贮存的白酒, 不仅所含的呈香呈味成分发生了变化, 它们在乙醇-水体系中形成的微观形态也在发生变化。这是因为一些呈香呈味成



注:(a):区域1;(b):区域2。

图2 优质白酒半成品酒样AFM图样

分往往是一端具有与水分子形成氢键的基团, 而另一端则往往是疏水基团。在白酒中形成笼状物, 能形成氢键一端朝向乙醇-水, 而疏水一端朝笼状物内部。一些疏水性化合物则存在于笼状物内部, 形成微观形态。在贮存过程中, 小笼状物逐渐合并, 形成大的分子聚集体——胶团, 这就是我们在AFM图中所看到的球形微观形态。白酒的口感应该与呈香呈味物质的种类和数量有关, 也应该与它们在白酒中形成的微观形态有关。

至于不同品质的白酒其微观形态变化与贮存期的关系, 还需深入探讨。

参考文献:

- [1] 白春礼.扫描隧道显微技术及其应用[M].上海:上海科技出版社, 1992.
- [2] 庄名扬.中国白酒的溶胶性及其应用原理与方法[J].酿酒科技, 2002, (2): 27-30.
- [3] [美]Qwen R.Fennema 著, 王璋, 等译.食品化学[M],北京:中国轻工业出版社, 2003.

(上接第31页)

3 结论

3.1 采用6%海藻酸钠6%明胶为9.0 1.0、氯化钙浓度为0.05 mol/L进行酿酒酵母的固定化, 可以获得具有较好机械强度和通透性及细胞渗漏少的固定化颗粒。

3.2 固定化酵母连续发酵17批次的过程中性能稳定, 在低温条件下贮藏6周固定化酵母活性保持完好。

3.3 要将固定化微生物较之游离微生物的优势充分发挥, 必须将固定化微生物作为一种可应用于实际的商业产品进行开发。而要将固定化微生物商业化, 如何延长固定化微生物颗粒的贮藏期, 是需要解决的重点。

参考文献:

- [1] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I. M. Banat et.al. Immobilization

technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review[J] Food Microbiology, 2004, (21): 377-397.

- [2] Ilkka Virkajrvi, Matti Linko Immobilization: A revolution in traditional brewing[J].Naturwissenschaften, 1999, (86): 112-122.

- [3] 杜双奎, 张菡, 于修烛, 等.酿酒酵母细胞固定化研究[J].西北农业学报, 2006,15(3): 208-211.

- [4] 程丽娟, 薛泉宏.微生物学实验技术[M].西安:世界图书出版公司, 2000.298-299.

- [5] 白雪莲.苹果酒酵母固定化技术[D].杨凌:西北农林科技大学, 2006.

- [6] 刘树文, 李华.改善固定化微生物细胞粒子机械强度的研究[J].微生物学杂志, 2005,25(4): 32-34.