

# 固定化酵母细胞在鼠曲草啤酒中的应用

潘 明

(四川理工学院生物工程系,四川 自贡 643000)

**摘 要:** 探讨了固定化啤酒酵母在鼠曲草啤酒中的应用,采用正交试验确定了固定化酵母的最佳条件和鼠曲草啤酒的发酵工艺条件。固定化酵母细胞的最佳条件为海藻酸钠浓度为6%,氯化钙浓度为0.5%,固化时间为1h;鼠曲草啤酒的发酵工艺为主发酵前添加3.0%的鼠曲草提取液,发酵时间为8d。

**关键词:** 啤酒; 固定化酵母细胞; 鼠曲草

中图分类号: Q814; TS262.5; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2006) 12- 0057- 03

## Application of Immobilized Yeast Cells in the Production of Chapha liumaffine D. Don Beer

PAN Ming

(Department of Bioengineering, Sichuan Institute of Technology, Zigong, Sichuan 643000, China)

**Abstract:** The application of immobilized yeast cells in the production of Chapha liumaffine D. Don beer was studied and the optimal immobilizing conditions and fermentation conditions were determined respectively by orthogonal experiments. The results were as follows: the optimal immobilizing conditions were 6 % Na- Alg, 0.5 % CaCl<sub>2</sub>, and 1 h immobilizing time; the optimum fermentation conditions were addition of 3 % Chapha liumaffine D. Don extracting juice in beer before the main fermentation and fermented for 8 d.

**Key words:** beer; Immobilized yeast cells; Chapha liumaffine D. Don

鼠曲草(*Chapha liumaffine D. Don*)别名:佛耳草、清明菜,系菊花科鼠曲草属植物。本草,原名“鼠耳”始载于《名医别录》,《本草拾遗》称:“鼠曲草,生平岗熟地,高尺余,叶有白毛,黄花”,已收载于《中华人民共和国药典》1977年版一部中<sup>[1]</sup>。全国各地均盛产,以野生为主,可药用也可食用<sup>[2]</sup>。鼠曲草中富含氨基酸、维生素及矿物质,含有多种功能因子,对人体有着各种保健及疾病治疗作用,是集营养、保健、药用功能于一体的<sup>[3]</sup>的野生植物资源,对它进行综合开发利用大有前途。

近年,我国的啤酒工业取得了巨大的进步,已成为世界第一大啤酒生产国。但我国的啤酒品种比较单一,基本上是以淡色啤酒为主,这与美国、德国等啤酒强国的上千种花色品种不能相提并论。随着啤酒市场竞争的日益激烈,广大消费者对啤酒的品种结构和产品质量的要求也越来越高<sup>[4]</sup>。将鼠曲草提取物添加到啤酒中,可赋予传统啤酒以保健作用。

固定化细胞技术是现代生物工程技术的重点之一,它是运用物理或化学的手段将游离的细胞定位于限定的空间区域,使其保持催化活力,并可反复使用。固定化技术的出现,使高细胞密度的高速率发酵成为可能<sup>[5]</sup>。本研究将固定化技术用于鼠曲草啤酒生产中,通过正交试验确定了其最佳生产工艺,得到了一种既有营养又具有保健功能的啤酒。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

菌种:啤酒酵母;

原辅料:优质大麦芽、大米、啤酒花、鼠曲草、海藻酸钠、氯化钙。

#### 1.2 主要仪器和设备

小型粉碎机(北京鑫环亚科技公司)、酒精计(河北省海兴县标准计量仪器厂)、蒸馏设备、恒温培养箱、5 mL

基金项目:四川省教育厅自然科学重点科研项目 2003A136)。

收稿日期:2006- 10- 09

作者简介:潘明(1966-),女,副教授,博士,主要从事生物工程方面的研究。

注射器、恒温水浴箱、TGL-16G型高速离心机、附温比重瓶25 mL、UV-2401 PC型岛津紫外可见分光光度计等,其余均为常规仪器设备。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 固定化酵母的制备

##### 1.3.1.1 操作要点

将啤酒酵母按传统方法逐级扩大培养后,用麦汁作为液体培养基在恒温振荡器中于20℃振荡培养,通过离心分离获得酵母细胞,再用无菌水洗涤2次备用。也可取回收、洗涤的性能优良的啤酒酵母备用。

将25 g湿菌体悬于50 mL无菌去离子水中制成酵母菌悬液,将制成的酵母菌悬液与用麦汁溶解海藻酸钠制成的海藻酸钠溶液以等体积充分混匀。

取已配制含一定浓度的50 mL  $\text{CaCl}_2$ -麦汁放入100 mL无菌三角瓶中,并将其置于37℃水浴10 min,用注射器将海藻酸钠-菌悬液吸入注射器后与静脉注射针头相连接,并适度加力,使溶液滴入该 $\text{CaCl}_2$ -麦汁溶液中,待溶液滴完后,将三角瓶放入20~22℃水浴中维持一段时间,使酵母充分固化,倾去上清液,用100 mL去离子水冲洗固定化酵母1次,然后重新加入 $\text{CaCl}_2$ 溶液-麦汁溶液,平衡24 h即可使用<sup>[9]</sup>。

##### 1.3.1.2 细胞固定化最佳条件选择

根据文献报道,海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、固化时间是影响细胞固定化效果的主要因素。为了确定细胞固定化的最佳条件,以海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、固化时间为试验因素,按照 $L_9(3^4)$ 设计正交试验(见表1),以酒精度为指标。

表1 正交试验因素水平

水平	因素		
	A 海藻酸钠浓度(%)	B 氯化钙浓度(%)	C 固化时间(h)
1	2	0.5	1
2	4	1	2
3	6	1.5	3

#### 1.3.2 鼠曲草提取液的制备

取新鲜鼠曲草,去掉根部及枯败部分,清洗沥干后,干燥,粉碎备用。精确称取鼠曲草粉末,按料液比1:25加入蒸馏水,在温度80℃、超声波功率为140 W的条件下提取30 min,抽滤,浓缩得鼠曲草提取液。

#### 1.3.3 鼠曲草啤酒发酵工艺

##### 1.3.3.1 工艺流程

麦芽 粉碎 投料 蛋白质休止 糖化 过滤 煮沸 回旋沉淀 冷却 主发酵 热处理 过滤 后发酵 杀菌 成品

鼠曲草提取液

原料配比:大麦芽70%,大米30%,啤酒花0.5%,糖化锅加水比1:3.5,糊化锅加水比1:5。

##### 1.3.3.2 工艺设计

利用固定化酵母细胞进行啤酒生产,具有发酵时间短、产量高、节约费用等优点。根据资料显示,与传统发酵方法相比,利用固定化酵母细胞进行发酵,可以使发酵周期由15 d左右降到9 d左右。

根据预试验结果和有关文献报道,对鼠曲草啤酒质量影响较大的是鼠曲草提取液的添加量、添加方式及发酵时间。因此采用 $L_9(3^4)$ 正交试验来确定鼠曲草啤酒的最佳生产工艺参数,其正交试验的因素水平见表2。

表2 正交试验因素水平表

水平	因素		
	A 提取液的添加量(%)	B 添加方式	D 发酵时间(d)
1	3.0	主发酵前	8
2	2.0	后发酵前	9
3	1.0	过滤前	10

##### 1.3.4 分析方法

黄酮含量的测定: 比色法<sup>[6]</sup>;

双乙酰含量的测定: 紫外分光光度法<sup>[7]</sup>;

啤酒的酒精度的测定: 比重瓶法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞固定化最佳条件选择

细胞固定化最佳条件正交试验结果见表3。

表3 正交试验结果

序号	因素			酒精度 (%Vol)
	A	B	C	
1	1	1	1	4.3
2	1	2	2	3.7
3	1	3	3	4.1
4	2	1	3	3.2
5	2	2	1	4.1
6	2	3	2	3.5
7	3	1	2	4.6
8	3	2	3	3.8
9	3	3	1	3.9
$K_1$	12.1	12.1	12.3	
$K_2$	10.8	11.6	11.8	
$K_3$	12.3	11.6	11.1	
$k_1$	4.03	4.03	4.1	
$k_2$	3.6	3.87	3.93	
$k_3$	4.1	3.87	3.7	
R	0.5	0.16	0.4	

表3表明,极差越大,影响越大。由表3还可看出,影响固定化效果的因素大小为: $A>C>B$ ,最佳条件为: $A_3B_1C_1$ ,即海藻酸钠浓度为6%,氯化钙浓度为0.5%,固

化时间为 1 h。

由于最佳组合没有在正交试验表中出现,因而需进行验证试验。按照最佳因素水平进行试验,酒精度为 4.7%Vol,大于试验中任一组合,为最佳。

## 2.2 鼠曲草提取液的制备

提取液的制备采取超声波法与常规热回流法,并对两种方法进行比较,结果见表 4。

表4 超声波法与常规热回流法的比较

项目	超声波法提取	常规热回流法提取时间(h)		
		0.5	1.0	1.5
吸光值(A)	0.355	0.248	0.302	0.228
总黄酮含量(%)	4.53	3.17	3.86	2.92

由表 4 可看出,采用超声波提取技术用于鼠曲草提取液的制备,可以使功能因子黄酮类物质更好地浸出。该方法对黄酮的提取率较高,优于常规提取法,节省时间和溶剂,降低了生产成本,提高了经济效益。

## 2.3 鼠曲草啤酒工艺参数的确定

鼠曲草啤酒工艺参数条件的正交试验结果见表 5 和表 6。

表5 正交试验结果

序号	因素			指标	
	A	B	C	品评	黄酮类物质浓度(mg/mL)
1	1	1	1	8.14	0.255
2	1	2	2	7.16	0.202
3	1	3	3	6.86	0.207
4	2	1	2	8.20	0.171
5	2	2	3	7.54	0.141
6	2	3	1	7.36	0.209
7	3	1	3	9.08	0.146
8	3	2	1	8.14	0.194
9	3	3	2	7.20	0.090

表6 正交试验结果分析

项目	品评			黄酮类物质浓度(mg/mL)		
	A	B	C	A	B	C
K <sub>1</sub>	22.16	25.42	23.64	0.664	0.572	0.658
K <sub>2</sub>	23.1	22.84	22.56	0.521	0.537	0.463
K <sub>3</sub>	24.42	21.42	23.48	0.43	0.506	0.494
k <sub>1</sub>	7.39	8.47	7.88	0.221	0.191	0.219
k <sub>2</sub>	7.7	7.61	7.52	0.174	0.179	0.154
k <sub>3</sub>	8.14	7.14	7.83	0.143	0.169	0.185
R	0.75	1.33	0.36	0.078	0.022	0.065

由表 6 可看出,以品评为指标,影响因素大小排列为 B>A>C,最佳工艺条件为 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>,即最佳工艺条件为在主发酵前添加 1.0%鼠曲草提取液,发酵时间为 8 d;以黄酮含量为指标,影响因素大小排列为 A>C>B,最佳

工艺条件为 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>;即鼠曲草提取液添加量为 3.0%,添加方式为在主发酵前添加,发酵时间为 8 d。结合表 5 的结果,综合考虑两个方面,选择最佳工艺条件为:鼠曲草提取液添加量为 3.0%,添加方式为主发酵前,发酵时间为 8 d。

## 2.4 啤酒指标

理化分析结果,见表 7。

表7 理化指标

项目	数值	项目	数值
酒精度(%Vol)	3.9	二氧化碳(%)	0.39
原麦汁浓度(°P)	10.03	双乙酰(mg/L)	0.03
总酸(mL/100mL)	1.28	黄酮含量(mg/mL)	0.196

感官品评:啤酒清亮透明,泡沫洁白细腻、持久挂杯;有明显的酒花香气,口味纯正、淡爽、协调、柔和,无异香异味。

## 3 结论

根据试验结果,我们可以得到以下结论:固定化酵母细胞的最佳条件为海藻酸钠浓度为 6%,氯化钙浓度为 0.5%,固化时间为 1 h;进行鼠曲草提取液制备时,采用超声波技术,可以使更多的营养成分浸出,提高效率。鼠曲草啤酒的发酵工艺为主发酵前添加 3.0%的鼠曲草提取液,发酵时间为 8 d。

鼠曲草中含有的黄酮类物质在经过发酵后大部分都留在啤酒中,说明该工艺是可行的;但黄酮类物质对啤酒酵母代谢副产物的生成有影响。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院.中药大词典(下册)[M].上海:上海人民出版社,1979.
- [2] 王世宽,潘明,任路遥.鼠曲草的氨基酸含量的测定及营养评价[J].氨基酸和生物资源,2005,27(1):37-39.
- [3] 王世宽,潘明,任路遥.大有开发前景的野生蔬菜-鼠曲草[J].食品研究与开发,2005,(4):55-58.
- [4] 王国良.保健啤酒新产品的开发[J].酿酒科技,2004,(6):97-98.
- [5] 康慧,张华峰.我国保健啤酒的现状与展望[J].食品工业科技,2003,(11):96-99.
- [6] 程江峰,何国庆.固定化酵母细胞啤酒连续后发酵工艺条件的优化[J].中国食品学报,2004,4(2):31-34.
- [7] 贾彦峰.沙芥全草总黄酮提取方法及含量测定的研究[J].陕西林业科技,2004,(2):1-4.
- [8] 管敦仪.啤酒工业手册(中)(第一版)[M].北京:轻工业出版社,1983.

欢迎订阅《酿酒科技》