

固定化猕猴桃酒酵母发酵条件的研究

张明霞, 张秀梅

(河南职业技术学院生物工程系, 河南 新乡 453003)

摘要: 采用混合材料作为载体将猕猴桃酒酵母固定化。通过温度、pH、起始糖度、填充量对固定化酵母发酵影响的分析; 采用 L₉(3⁴) 正交试验对固定化酵母发酵工艺条件进行研究。结果表明, 最佳发酵条件为温度 25℃, pH3.3, 起始糖浓度 270 g/L, 填充量 0.4 g/ml。在此条件下发酵速度快, 发酵的酒果香味浓郁, V_c 保存率高。(孙悟)

关键词: 猕猴桃酒; 固定化; 猕猴桃酒酵母; 发酵

中图分类号: Q814.2; TS261.1; TS262.7 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)03-0068-03

Study on the Fermentation Conditions of Immobilized Yeast for Kiwifruit Wine

ZHANG Ming-xia and ZHANG Xiu-mei

(Bioengineering Department of He'nan Occupational Techniques Normal College, Xinxian, He'nan 453003, China)

Abstract: Mixed materials were used as carrier for yeast immobilization of kiwifruit wine. Through the analysis of the effects of temperature, pH value, initial sugar content and loading level on immobilized yeast fermentation, the fermentation techniques of immobilized yeast was studied by L₉(3⁴) orthogonal test and the results were as follows: the optimal fermentation conditions included temperature at 25℃, pH value as 3.3, initial sugar content as 270 g/L, and loading level as 0.4 g/ml. Under such conditions, rapid fermentation and high preserving rate of V_c realized and the wine had mellow taste. (Trans. by YUE Yang)

Key words: kiwifruit wine; immobilization; kiwifruit wine yeast; fermentation

猕猴桃营养丰富, 含有丰富的维生素 C、维生素 B 类、碳水化合物、蛋白质、脂肪、钙、铁、磷、硒等营养物质。因其维生素 C 含量为其他水果的数倍至十倍, 猕猴桃有“水果之王”的美誉。鲜果及其深加工产品都深受国内外消费者青睐, 尤其是猕猴桃酒的特殊香气成分和酒体中维生素 C 含量特别高, 据检测每升酒中维生素 C 为 480 mg, 比葡萄酒高出数十倍。

细胞固定化是 20 世纪 70 年代在固定化酶的基础上发展起来的一项新技术, 是现代生物技术的重要组成部分。它很容易实现微生物和反应介质的分离, 可以重复使用, 通过固定化还能随意地将不同种类和数量的微生物长时间地保存在反应器中, 保持优势菌种及其数量, 从而加快反应速度, 提高生产转化能力, 在发酵工业中固定化细胞技术的应用越来越广泛。如果将猕猴桃酒酵母固定化并应用到生产, 充分发挥固定化技术的优点, 可优质高产地产猕猴桃酒。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 猕猴桃酵母 1450, 西北农林科技大学提供。

1.1.2 培养基

斜面培养基: 12°BX 麦芽汁+2%琼脂。

酵母扩大培养基: 1/3 果汁+2/3 麦芽汁。

固定化酵母发酵培养基: 猕猴桃果汁 (加入蔗糖调整糖度, 加入柠檬酸或碳酸钙调酸度)。

1.1.3 固定化酵母载体与药品

1.1.3.1 固定化酵母载体

海藻酸钠: 上海试剂分装站。

收稿日期: 2003-10-28

作者简介: 张明霞 (1973-), 女, 河南人, 大学本科, 讲师, 参编《生化工程》等著作 2 部, 发表论文数篇。

聚乙烯醇: 平均聚合度 1750±50, 上海化学试剂厂。

1.1.3.2 药品与试剂: CaCl₂、葡萄糖、蔗糖、盐酸、碳酸钙、柠檬酸、海藻酸钠、聚乙烯醇、果胶酶、膨润土、聚乙烯吡咯烷酮等均作为分析纯。

1.1.4 仪器与设备

SPX-250 生化培养箱、SW-CG-IF 超净工作台、XS-18 显微镜、PHS-3B 精密 pH 计、YXQ-SG41.280 电热手提高压蒸汽消毒器 (医用)。

1.2 内容与方法

1.2.1 操作要点

1.2.1.1 果汁制备

猕猴桃鲜果破碎, 加入 0.05% 的果胶酶, 40~50℃保温 3~4 h, 离心后得到的果汁用 K₂S₂O₈ 调整果汁的 SO₂ 浓度达到 80~100 mg/L。然后在果汁中加入膨润土和聚乙烯吡咯烷酮低温澄清冷藏处理, 备用。

1.2.1.2 固定化细胞的制备方法

1.2.1.2.1 菌悬液的制备

将培养成熟的斜面菌种接种于液体三角瓶中, 在 28℃条件下摇床培养 24~36 h。成熟后, 将培养液在无菌条件下 10000 r/min 离心 10 min 倾去上清液。用无菌生理盐水洗涤菌体, 再离心后得湿菌体。加入无菌水制成一定浓度的菌悬液, 备用。

1.2.1.2.2 固定化凝胶珠的制备

2%海藻酸钠和 6%聚乙烯醇的混合载体溶液, 灭菌与菌悬液混匀, 凝胶内包埋菌量为 4.7×10⁷ cfu/ml。用注射器将其注入交联剂 CaCl₂ 溶液中, 形成小球, 在交联剂中硬化 4 h。用无菌水洗涤后, 置

于增殖培养基中,28℃培养24~36h。

1.2.1.3 发酵 固定化酵母加入经处理的猕猴桃果汁中,于设置的条件下发酵。

1.2.2 分析方法

1.2.2.1 总糖测定:斐林试剂法。

1.2.2.2 残糖测定:斐林试剂法。

1.2.2.3 酒精含量测定:蒸馏-比重法。

1.2.2.4 包埋菌数测定:取一定数量固定化颗粒,用一定量的5%柠檬酸钠彻底溶解后,适当稀释,显微镜下血球计数板计数。

1.2.2.5 发酵速度的测定:

$$\text{发酵速度} = \frac{\text{起始糖量} - \text{残糖量}}{\text{时间}}$$

1.2.2.6 固定化酵母发酵工艺条件试验

以温度A、pH值B、起始糖度C和填充量D为因素,设计为L₉(3⁴)的正交试验(见表1),以果汁中糖的利用速度、发酵终了的残糖量和酒精度为指标分别进行试验。

表1 固定化酵母发酵条件优化正交试验设计

序号	温度(℃) A	pH B	起始糖度(g/L) C	填充量(g/mL) D
1	21	3.3	230	0.35
2	23	3.5	250	0.40
3	25	3.7	270	0.45

2 结果与分析

2.1 固定化酵母发酵单因素分析

2.1.1 温度对固定化酵母发酵的影响

温度选择在18~30℃。通过测定不同温度下的发酵速度和酒精度,研究温度对固定化酵母发酵的影响,结果如图1、图2。

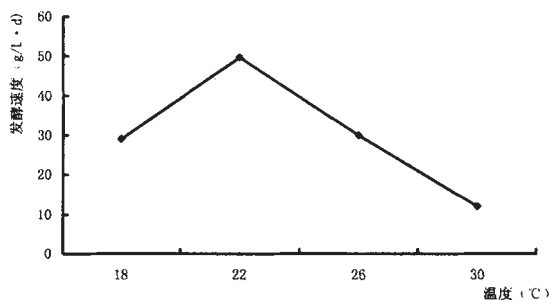


图1 温度对固定化酵母发酵的影响

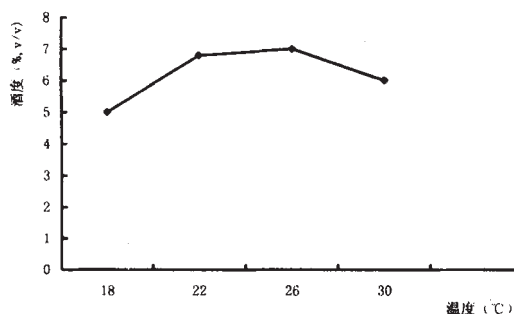


图2 温度对酒度的影响

由图1、图2可知,温度为22℃时,发酵速度最快,为50 g/L·d,酒精度7.0 g/L·d,26℃时固定化酵母发酵的速度明显减慢,酒

度最高;固定化酵母发酵的适宜温度为22~26℃。

2.1.2 pH对固定化酵母发酵的影响(见图3、图4)

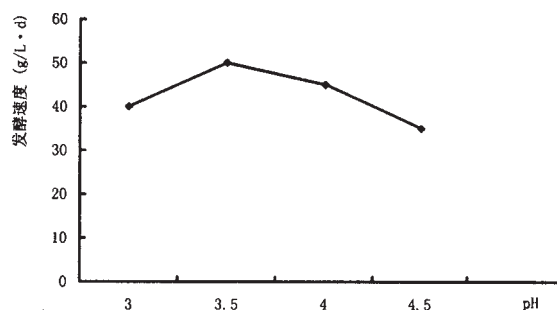


图3 pH值对固定化酵母发酵速度的影响

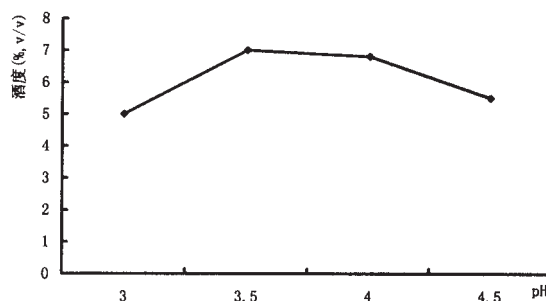


图4 pH对固定化酵母发酵酒度的影响

通过试验发现,当pH值超过4.5后,由于在高pH值条件下杂菌的繁殖抑制了酵母的发酵作用,发酵速度明显降低。

由图3、图4可见,pH3.5的果汁固定化酵母发酵速度为50 g/L·d,高于pH3.0、pH4.0和pH4.5的果汁,酒精度为7.0%,较高。

2.1.3 起始糖度对固定化酵母发酵的影响(见图5)

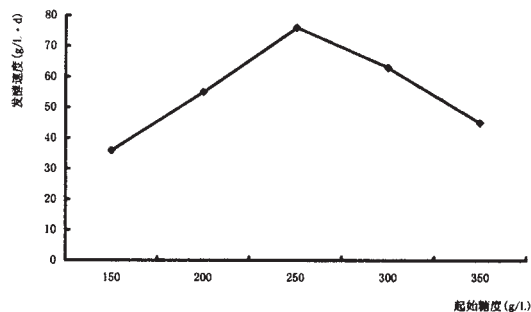


图5 起始糖度对固定化酵母发酵速度的影响

由图5可以看出,起始糖度对发酵速度影响较大,当起始糖度低于250 g/L时,发酵速度随糖度的增加而增加,超过250 g/L时,由于底物浓度过高而抑制酵母的生长,发酵速度反而下降。因此采用250 g/L的糖浓度较为合适。

2.1.4 填充量对固定化酵母发酵的影响(见图6、图7)

由图6、图7可知,填充量越大,酵母含量越多,发酵速度越快,但是用于酵母生长、繁殖的糖量越多,酒精度则随填充量的增加而减少,所以选择填充量时既要考虑发酵速度又要考虑酒精转化率。填充量选择0.4 mg/L较为合适。

2.2 固定化酵母发酵工艺条件试验

以温度A、pH值B、起始糖度C和填充量D为因素,设计为

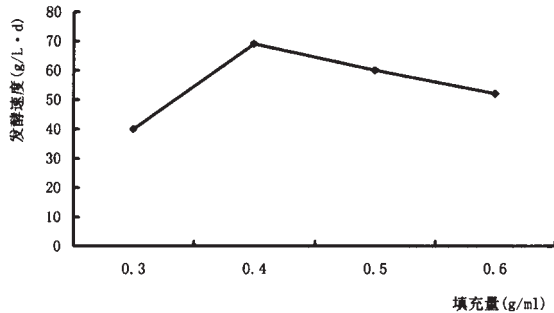


图6 填充量对固定化酵母发酵速度影响

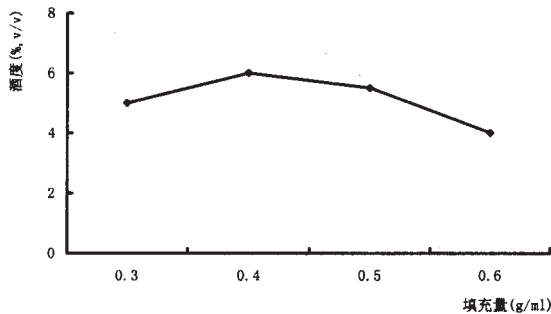


图7 填充量对固定化酵母发酵酒度影响

L9 (3⁴)的正交试验(见表2、表3、表4、表5),以果汁中糖的利用速度、发酵终了的残糖量和酒精度为指标分别进行试验。

表2 固定化酵母发酵条件优化正交试验结果分析

序号	A	B	C	D	发酵速度(g/L·d)
1	1	1	1	1	62.3
2	1	2	2	2	78.3
3	1	3	3	3	85.5
4	2	1	2	3	72.1
5	2	2	3	1	78.3
6	2	3	1	2	76.7
7	3	1	3	2	90.0
8	3	2	1	3	75.0
9	3	3	2	1	77.8

由表4发酵速度的极差和表5酒精度的极差分析可见,二者都是 $R_1 > R_2 > R_3 > R_4$, 因此起始糖浓度对固定化酵母的发酵影响最为显著,其次为填充量、温度和pH值。最佳组合为 $A_2B_1C_3D_2$, 即发酵温度为25℃, pH3.3, 起始糖浓度270 g/L, 填充量为0.4 g/ml。

3 结论

固定化猕猴桃酵母发酵猕猴桃酒的最佳发酵条件: 温度 25

表3 固定化酵母发酵条件优化正交试验结果分析

序号	A	B	C	D	酒精度(% v/v)
1	1	1	1	1	11.5
2	1	2	2	2	12.3
3	1	3	3	3	12.1
4	2	1	2	3	11.4
5	2	2	3	1	13.4
6	2	3	1	2	12.0
7	3	1	3	2	14.0
8	3	2	1	3	11.0
9	3	3	2	1	12.7

表4 发酵条件优化正交试验结果分析

	A	B	C	D
k_1	226.1	224.4	214.0	218.4
k_2	226.5	228.2	228.2	245.0
k_3	242.8	240.0	253.8	232.6
K_1	75.4	78.1	71.0	72.8
K_2	75.5	76.0	76.0	81.6
K_3	80.9	80.0	84.6	77.5
R	5.50	4.00	13.6	8.80

表5 发酵条件优化正交试验结果分析

	A	B	C	D
k_1	35.9	36.9	34.5	37.6
k_2	36.8	36.7	36.4	38.3
k_3	37.7	36.8	39.4	34.5
K_1	12.0	12.3	11.5	12.5
K_2	12.3	12.2	12.1	12.8
K_3	12.6	12.3	13.1	11.5
R	0.60	0.10	1.70	1.30

℃, pH3.3, 起始糖浓度270 g/L, 填充量0.4 g/ml。在此条件下发酵速度快, 发酵的酒果香味浓郁, V_c 保存率高。

参考文献:

- [1] 汪钊, 毛富根, 吴小寒, 赵国桥. 固定化生长酵母桔子酒发酵的研究[J]. 食品工业科技, 1995, (4): 68-70.
- [2] 王克明. 固定化酵母发酵海藻酒的研究[J]. 烟台大学学报, 1995, (4): 28-31.
- [3] 唐学友, 丁庆豹, 邱蔚然. 利用K-卡拉胶-魔芋多糖复配固定化酵母生产三磷酸腺苷[J]. 药物生物技术, 2000, 7(4): 204-208.
- [4] 王敏, 王丁刚, 吴梧桐, 等. 酶工程制备1,6-二磷酸果糖的中试研究[J]. 药物生物技术, 1996, 3(1): 40-42.
- [5] 许苏葵, 何秀良, 鞠京丽, 等. 固定化酵母细胞发酵酒精过程中杂菌污染防治的研究进展[J]. 微生物学杂志, 1997, 17(4): 35-39.
- [6] 张治根, 苏尔复, 俞俊堂. 固定化酵母快速连续发酵啤酒的研究[J]. 工业微生物, 1989, (30): 11-18.

茅台迎宾酒获贵州省名牌产品

本刊讯 近日, 贵州茅台酒股份有限公司研制开发的“茅台迎宾酒”获贵州省名牌产品称号。贵州茅台酒厂集团习酒有限责任公司生产的“五星习酒”和贵州茅台酒厂技术开发公司生产的“茅台醇”同获此殊荣。

为适应市场竞争需要, 激励和引导企业提高产品质量和质量管理水平, 培养具有竞争力的产品, 提高贵州省产品的知名度, 促进贵州省经济发展, 省名牌战略领导小组根据《质量振兴纲要》等文件和办法的规定, 本着企业自愿、科学、公正、公开和不搞终身制的原则, 经过严格的评审, 公示征求社会各界意见, 并经省名牌战略推进领导小组审议通过, 从全省上报的188个产品中, 确认了“茅台迎宾酒”等34个产品为2003年贵州省名牌产品。

从贵州茅台酒销售有限公司了解到, “茅台迎宾酒”自2001年投放市场以来, 深受消费者厚爱, 销售量和销售收入逐年攀升。特别是2003年, “茅台迎宾酒”销售收入达8000多万元, 且年终时在贵阳及其他部分城市还出现了商场和专卖店里的“茅台迎宾酒”被销售一空, 经销商们争相到茅台抢购的喜人场面。销售公司人士认为: “茅台迎宾酒”能获此殊荣和博得市场的追捧, 其主要原因是公司诚信经营、狠抓产品质量的结果, 是公司应市场之需, 及时开发并将其定位为“中档酱香型白酒”的结果, 是公司健全销售网络、提高服务质量的结果。2004年, 公司还将加大对茅台迎宾酒的宣传力度, 提高产品质量, 增加产量, 乘胜前进, 全力满足市场需求, 实现销售收入超亿元的目标。(小江)