

PVA 共固定化双菌种发酵海藻酒的研究*

王克明

(烟台大学生物化学系 烟台 264005)

摘 要 采用 PVA 为载体共固定化酿酒酵母和产香酵母发酵海藻, 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的动力学进行了研究并建立了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二种菌种菌量的最佳配比为 4:1, 发酵温度 20℃, 共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 7d, 共固定化细胞连续发酵稀释速率 0.12/h, 其发酵时间为 0.5d 左右。经 160d 连续发酵实验, PVA 固定化细胞粒子的机械强度良好。

关键词 共固定化, 双菌种, 海藻酒, 发酵动力学, PVA

分类号 Q261.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0362-67

海藻中淀粉含量达 25%, 蛋白质含量 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], 具有极高的营养和保健功效, 可用于酿制独具特色的保健酒和饮料, 但长期以来未被有效利用, 造成了极大的资源浪费。

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, 延长发酵细胞的生命, 增加稳定性, 利于实现连续化生产, 利于产物分离等。共固定化是将几种细胞同时固定于同一载体中形成共固定化细胞系统, 这种系统稳定, 不同功能的微生物可协同作用。采用固定化, 共固定化细胞生产酒清、啤酒、果酒及食醋等的研究十分盛行^[2-4]。但是采用 PVA 为载体的共固定化细胞技术生产海藻酒的研究, 国内外尚未见报道。本研究以海藻为原料, 采用酸水解酶水解法制取海藻汁, 然后以共固定化酿酒酵母和产香酵母进行间歇和连续发酵海藻酒, 以期获得适宜的发酵工艺, 并进行发酵动力学研究, 建立生产数学模型。

1 材料与方 法

1.1 菌种

酿酒酵母(*Sacchromyces cerevisiae*)12 号, 15 号, 29 号, 产香酵母(*S. fragrans*)8 号均由本系提供。

1.2 原材料及设备

海带(*Laminaria japonica*)由烟台市莱山养捕公司提供; 聚乙烯醇(PVA-124, 日本进

* 山东省教委资助项目, 同时受华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室开放课题部分资助。

收稿日期: 1998-08-24, 修回日期: 1999-03-25。

口分装);海藻酸钠由烟台市海藻工业公司提供;水解用酶由烟台星达生物工程有限公司提供;食用酒精购于烟台白酒厂。固定化细胞发酵反应器为玻璃柱式反应器(dia. 4.5cm × 18cm)。

1.3 实验方法

1.3.1 海藻汁的制取:海藻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24h,酶水解后调pH为2~3,然后加热至95℃维持7~8h,最后2000r/min离心,其清液部分即为海藻汁。调兑糖度和酸碱度即可用于发酵。

1.3.2 共固定化细胞的制备: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3mm的颗粒,浸泡4h,滤出固定化颗粒,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,加入相同体积的增殖培养基,于30℃,160r/min通气振荡培养18h。

1.3.4 共固定化细胞海藻酒发酵:①间歇发酵:使用三角瓶,共固定化细胞颗粒装填量为0.25g/mL(发酵液),18~20℃下发酵。②连续发酵:采用280mL玻璃柱式反应器,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,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121MBAA分析仪分析(酒液经活性炭脱色,蒸干后用5%碘基水杨酸和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2m, dia. 3mm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 40mL/min, Air 1.4kg/cm²; H₂ 1.4kg/cm², 衰减10² × 4;条件II:色谱柱为长2m, dia. 3mm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 30mL/min, Air 300mL/min, H₂ 30mL/min. 进样量为2μL,根据保留时间与各标样对比定性,内标法定量;矿物质元素,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。测量其氨基酸和矿物质含量如表1所示。表1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用酸水解处理海藻制取的汁液。

2.2 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号、15号、29号3种菌株与产香酵母8号以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。

表 1 酸水解与酶、酸水解法制备海藻汁的氨基酸和矿质元素含量表

Table 1 Amino acid and mineral element content of seaweed juice with different hydrolysis methods(mg/L)

Item	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Pro	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His
Content (I)*	34.7	14.6	13.7	55.6	17.4	19.7	8.4	23.3	17.3	17.1	21.2	21.1	12.3	15.2	16.5	13.7
(II)*	32.4	11.3	8.9	45.2	10.9	16.7	6.5	22.1	17.1	12.2	19.9	22.2	9.6	13.8	14.3	11.2

Item	Arg	Fe	Mn	K	I	Mg	Cu	P	Zn
Content (I)*	17.1	18.02	0.56	216	20.0	12.03	1.02	8.22	2.27
(II)*	13.6	18.03	0.56	216	19.8	12.02	1.02	8.21	2.26

* (I) Hydrolytic method with enzyme and acid; (II)Hydrolytic method with acid.

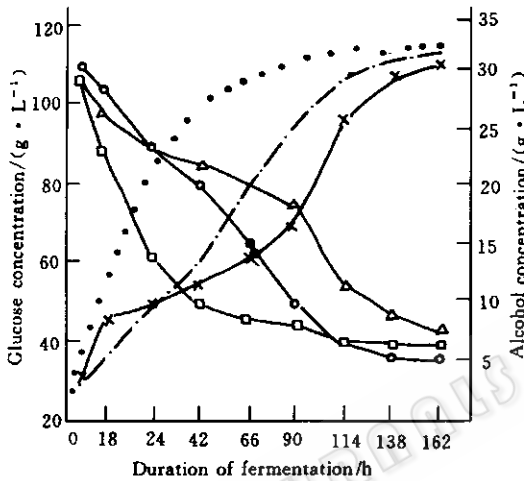


图 1 游离细胞海藻酒发酵试验

Fig.1 Fermentation of seaweed wine with free mixed cell

○. — Alcohol production and glucose consumption of the yeast No. 12 and No. 8 respectively; □. ... Alcohol production and glucose consumption of the yeast No. 29 and No. 8 respectively; △. × Alcohol production and glucose consumption of the yeast No. 15 and No. 8

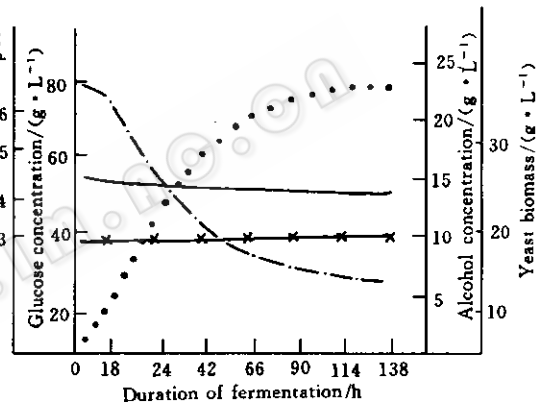


图 2 游离细胞海藻酒分批发酵试验

Fig.2 Batch operation of seaweed wine with free mixed cell

... Alcohol concentration; △ Residual glucose; × yeast biomass; — pH

由图 1 所示的实验结果可知,酿酒酵母 12 号菌株与产香酵母 8 号混合组产酒速率慢;酿酒酵母 15 号菌株与产香酵母 8 号混合组发酵速度最快,但所得的海藻酒风味不如另外二组;相比之下,酿酒酵母 29 号菌株与产香酵母 8 号混合组发酵速率适中,且所得的海藻酒风味极好,所以在以后的发酵实验中均使用酿酒酵母 29 号与产香酵母 8 号混合组。

为了考察两种酵母以不同菌种量配比发酵对海藻酒成分品质的影响,进行了酿酒酵母:产香酵母为 1:0;2:1;3:1;4:1;5:1 的不同菌种量配比发酵实验,结果如表 2。

由表 2 可以看出,当酿酒酵母与产香酵母菌种量混合比例为 4:1 时,发酵的海藻酒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。

表 2 酿酒酵母与产香酵母不同菌种量配比对海藻酒品质的影响

Table 2 Effect of different inoculative ratio of *S. cerevisiae* and *S. fragrans* on seaweed wine (mg/L)

Inoculative ratio of two yeasts	Propyl alcohol	Amyl alcohol	Iso-amyl alcohol	Iso-butyl alcohol	Etnyl alcohol	Etnyl lactate	Alcohol / (g·L ⁻¹)
1:0	4.2	0.31	28.98	9.15	1.64	21.02	26.9
2:1	16.8	1.25	49.76	20.6	3.12	53.66	25.6
3:1	14.6	1.10	48.86	19.4	3.56	56.63	26.6
4:1	12.4	1.23	48.03	20.3	4.47	60.47	26.8
5:1	8.9	0.47	38.92	15.7	4.12	53.08	27.4

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,结果如图 2。对于底物抑制及酒精非竞争性抑制双重作用的海藻酒发酵,其反应速率为 $V = V_m(1 - P/P_m) \cdot S / (KS + S + S/K_w)$ 。应用差分法处理图 2 的实验结果,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为:

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

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

2.4 共固定化细胞分批发酵

共固定化细胞的增殖实验结果表明,增殖时间以 18~24h 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共固定化分批发酵过程的影响试验,海藻酒的发酵温度分别控制为 13℃;20℃;25℃,其结果如图 3 所示。由实验结果可知,25℃ 下 28h 左右海藻酒发酵完毕,但所得酒香味较淡,而 20℃ 下经 36h 产酒已接近最高值,并且所产海藻酒具有浓郁的香味。在 20℃ 下,以不同的共固定化细胞凝胶粒子添加量进行分批发酵实验,结果如表 3 所示。

表 3 凝胶粒子添加量对海藻酒品质的影响

Table 3 Effect of inoculative quantity of gel particle on seaweed wine(mg/L)

T/℃	Inoculative/ % quantity of gel	Propyl alcohol	Amyl alcohol	Iso - amyl alcohol	Iso - butyl alcohol	Etnyl acetate	Etnyl lactate	Alcohol / (g/L)
20	15	12.4	1.27	48.01	20.2	4.39	61.12	23.3
20	25	12.5	1.26	47.03	20.3	4.48	60.45	25.6
20	35	12.4	1.27	46.01	20.2	4.45	61.16	27.6
20	45	12.3	1.16	45.6	19.1	4.33	58.83	32.5

由表 3 可看出,当发酵温度为 20℃,共固定化细胞粒子装填量为 25%~35% (W/V) 时发酵的海藻酒醇类、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,对固定化细胞糖抑制也予忽略,采用与游离混合细胞相似的方法,就可导出海藻酒共固定化分批发酵动力学模型为:

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

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

2.5 共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,首先进行共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,所得海藻酒的酒度适中,酒香味浓郁。改变发酵稀释速率进行固定化酵母细胞连续发酵试验,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,稀释速率以 $D = 0.12/h$ 为佳,此时酒度较高,且海藻酒中残糖较低,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。

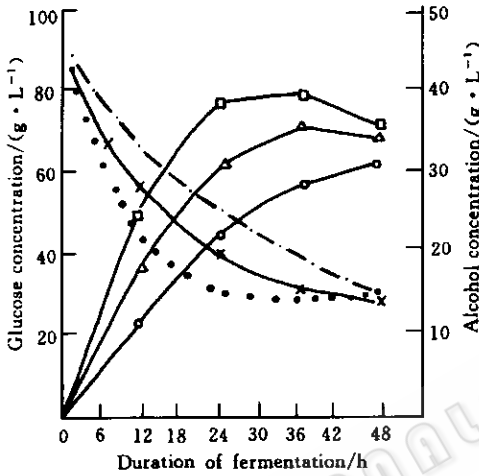


图 3 发酵温度对产酒和耗糖的影响

Fig. 3 Influence of temperature on glucose consumption

○, — Alcohol production and glucose consumption at 13°C; □, ... Alcohol production and glucose consumption at 25°C; △, × Alcohol production and glucose consumption at 20°C

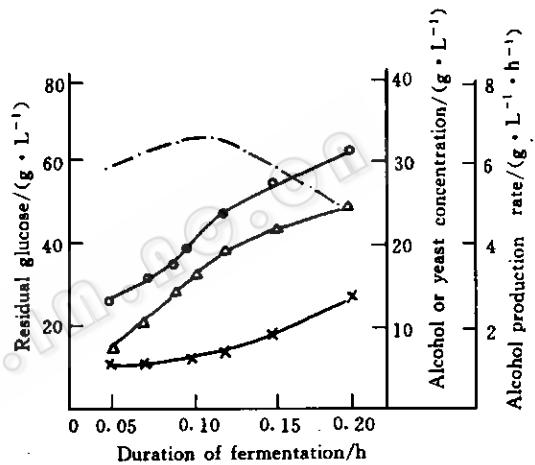


图 4 稀释率对发酵结果的影响

Fig. 4 Influence of dilution rate (D) on fermentation

— Alcohol concentration; ○ Residual glucose; × Yeast concentration; △ Alcohol productivity.

在上述发酵条件下,当系统建立稳定态后,进行了连续发酵动力学的研究,导出了海藻酒产量和酒液酒精度以及反应器有效容积 V 的关系式:

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

采用共固定化酿酒酵母和香酵母双菌种连续发酵工艺发酵海藻汁,酿造的海藻酒其酒液不仅所含氨基酸和矿物质十分丰富而且含有多种醇类和酯类。他们的含量分别为:丙醇为 $10.2mg/L$ 、异丁醇 $11.6mg/L$ 、戊醇为 $1.12mg/L$ 、异戊醇为 $39.21mg/L$ 、乙酸乙酯为 $3.08mg/L$ 、乳酸乙酯为 $51.46mg/L$ 。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 共固定酿酒酵母和产香酵母酿制海藻酒是可行的。结果表明,采用固定化

工艺酵母活力回收率可达 94.4%, 增殖时间以 18~24h 为宜, 出芽率维持在 12% 以上。由二种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。二种菌株种量的配比对酒的风味及质量影响很大, 在本实验条件下, 菌量最佳配比为 4:1。采用共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, 使产品质量稳定并且可实现连续化生产, 发酵时间由游离细胞发酵的 7d 缩短为 0.5d 左右, 其产香成分的醇类和酯类的含量接近游离混合细胞发酵海藻酒的含量。可见, 采用共固定化双菌种的工艺发酵海藻酒质量稳定, 生产效率高。采用较低温度进行发酵, 有利于醇、醛、酯类等香气成分的形成, 对于提高海藻酒的品质极为有利, 本实验条件下, 采用 20℃ 为宜。从海藻酒的成分可以看出, 其所含氨基酸和矿质元素无论种类还是数量都十分丰富, 尤其含有的碘和海藻多糖(未示出)具有重要医疗保健功效。本实验经连续发酵 160d 后, 检查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. Tokyo: Japan Publications, 1983, 33~51.
- [2] 张治根, 苏尔复, 俞俊棠. 工业微生物, 1988, 18(1): 11~18.
- [3] 王克明, 王雪筠. 食品科学, 1995, 16(8): 27~30.
- [4] 王克明, 王雪筠. 中国酿造, 1995, 5(3): 35~37.
- [5] 天津轻工业学院等. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1986, 64.
- [6] 李详麟, 金宁人. 生物工程学报, 1991, 7(3): 265~271.

Fermentation of Seaweed Wine by PVA Co-immobilized two Microorganisms*

Wang Keming

(Department of Biochemistry Yantai University, Yantai 264005)

Abstract Seaweed wine was made by co-immobilized system of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. fragrans* with PVA as carries. A comparative study on batch and continuous fermentation with mixed free yeast cells and co-immobilized cells were carried out, leading to setting up of corresponding kinetics models. The results showed that optimum conditions for the fermentation are: 1. the ratio of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces fragrans* for inoculation is 4:1; 2. temperature is 20℃; 3. packing ratio of the gel particles for batch and continuous fermentation are 0.25 and 0.5 respectively; 4. duration for mixed free cell fermentation is 7 days. 5. duration for co-immobilized continuous fermentation is 0.5 day, with 0.12/h dilution rate. The mechanical strength of the immobilized cell particles was remained in good condition after 160 days continuous fermentation.

Key words Co-immobilized, seaweed wine, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragrans*, kinetics, PVA fermentation

* This Work Was Supported by Grant from the Education Commission of Shangdong Province. Partially Supported by the Open Project Program of the State Key Laboratory of Bioreactor Engineering.