

改善固定化啤酒酵母的性能

朱 仁 华

(嘉兴高等专科学校食品工程系)

摘要 采用吐温、不饱和脂肪酸、甾醇 1、甾醇 2 和甾醇 3 作增活剂,改善固定化酵母的活性,加快发酵速度。吐温的效果优于不饱和脂肪酸。三种甾醇在单独施用,以甾醇 1 最好;与增强剂同时施用,以甾醇 3 最好。

用明胶-戊二醛交联作增强剂可明显改善固定化酵母的机械强度。由于戊二醛的“毒性”,使存活率下降,发酵周期延长。若与增活剂同时施用,可抵销这些缺陷。

关键词 固定化酵母;菌耗率;酒精转化率;细胞泄漏率

固定化酵母酿造啤酒,已从小型实验进入生产应用阶段^[1,2]。国内多数单位用海藻酸钙作包埋剂,固定啤酒酵母。然而用海藻酸作包埋剂,也存在明显的缺陷。麦芽汁中存在磷酸盐和其它多价阴离子等,可将海藻酸钙中的钙离子脱去,使凝胶状的海藻酸钙变成溶胶状的海藻酸盐,致使胶粒破碎,失去固定化的作用。

通常,希望制成的固定化酵母,酵母活力强,发酵速度快,酵母在胶粒内保持持久的生命力,不易衰老,并能继续增殖,延长固定化酵母的使用寿命。本研究的目的,试图解决上述问题,即改善固定化酵母的活性和机械强度。

材 料 与 方 法

(一) 啤酒酵母和麦芽汁

均由嘉兴啤酒厂提供,菌种来源于西德 DAB 公司。

(二) 固定化酵母的制备

1. 增活组:添加吐温、不饱和脂肪酸和三种甾醇作增活剂,改善酵母的活性。

① 增活组 A:由吐温和三种甾醇组成。取甾醇(1或2或3)60mg和吐温2g,溶于8ml热乙醇,溶后加至200ml 3%海藻酸钠溶液中,经灭菌后冷却。加入20ml酵母($>10^7$ 个酵母/ml),搅匀,装入制粒器。逐滴滴入10倍体

积的2% CaCl_2 溶液中,固化40分钟,水洗胶粒待用。

② 增活组 B: 由不饱和脂肪酸和三种甾醇组成。取甾醇(1或2或3)60mg 和不饱和脂肪酸0.5g,溶于8ml 热乙醇,其余操作同增活组 A。

③ 对照组: 除不加吐温、不饱和脂肪酸和甾醇外,其余操作同上。

2. 增强组: 添加明胶,再与戊二醛交联作为增强剂,改善固定化酵母的机械强度。

在上述三组增活组的甾醇、吐温、不饱和脂肪酸和海藻酸钠的混合液中,加入混合液体积的0.25% (g/V) 明胶,明胶溶解后灭菌,冷后加入20 ml 酵母 ($>10^9$ 个/ml), 搅匀装柱,逐滴滴入2% CaCl_2 液中固化40分钟。胶粒经水洗后浸入1% 戊二醛液中,交联3—5分钟,取出胶粒,水洗2—3次待用。

3. 酵母检测: 按浮力法取一定体积的固定化酵母胶粒,用 K_2HPO_4 溶液 (50 mg/ml) 溶解后,在显微镜下计数。每 ml 胶粒的细胞数应在 10^7 。若太少,应增殖。酵母活细胞数检测用美蓝法^[4]。

4. 试剂: 海藻酸钠(高粘度)浙江岱山制碘厂产;吐温(药用)和不饱和脂肪酸(AR)均为浙江龙游化工试剂厂制;戊二醛为 Merck 进口分装;明胶(AR)为上海化学试剂采购供应站制;甾醇1、甾醇2和甾醇3均为上海化学试剂采购供应站分装厂分装。

(三) 发酵试验

采用间歇法发酵,反复发酵五次。

取各组胶粒50 ml,分别装入250 ml 锥形瓶内,加麦芽汁200ml,于室温培养。定时测糖含量。至麦芽汁糖度降至前发酵要求时(4Bx),停止发酵。滤去胶粒,测定发酵液的糖含量和酒精含量。

(四) 测定

1. 糖含量测定: 用 Brixscale 比重计粗测,用 3,5-二硝基水杨酸法^[5] 精确测定发酵液中还原糖含量。

2. 酒精含量测定: 发酵液经蒸馏后,用酒

精比重计和重铬酸钾法^[6] 测定酒精含量。再按酒精转化率的理论值(100g 葡萄糖转化为 92.2 g 酒精时,酒精转化率为 100%^[7]) 计算出酒精转化率。

结果与讨论

(一) 改善固定化酵母的活性

1. 加快发酵速度和酒精转化: 实验结果表明(图1),添加增活剂的各组,发酵速度(糖耗率)明显高于对照组,发酵周期缩短3—4小时。

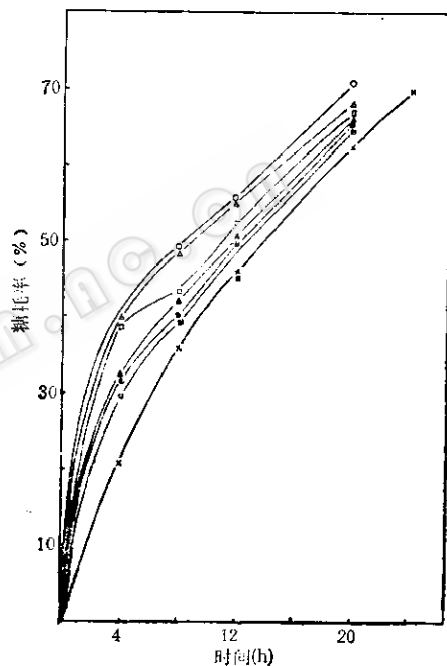


图1 增活剂对固定化酵母发酵速度的影响

×—× 对照 ○—○ 甾醇1+吐温,
●—● 甾醇1+不饱和脂肪酸 △—△ 甾醇2+吐温,
▲—▲ 甾醇2+不饱和脂肪酸 □—□ 甾醇3+吐温,
■—■ 甾醇3+不饱和脂肪酸

其中,不饱和脂肪酸酯(吐温)的增活作用普遍高于不饱和脂肪酸;三种甾醇与吐温混合添加,以甾醇1活性最高、甾醇2次之、甾醇3最低;三种甾醇与不饱和脂肪酸混合添加,活性则按甾醇2、甾醇1和甾醇3顺序递减。

图2是酒精转化率随发酵时间延长而增长的情况。其结果与图1一致,即随着糖耗率的增加,酒精转化率相应增长。添加增活剂各组的酒精转化率均高于对照组,再次证实了增活

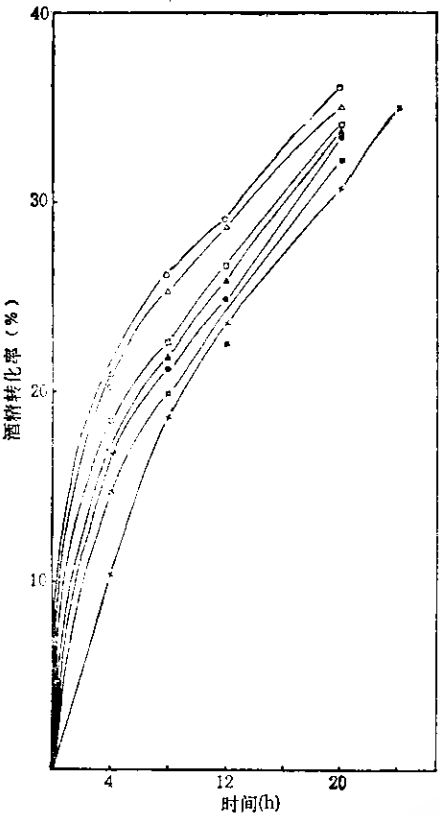


图 2 增活剂对固定化啤酒酵母酒精转化率的影响

×—× 对照, ○—○ 甾醇 1+吐温,
●—● 甾醇 1+不饱和脂肪酸 △—△ 甾醇 2+吐温,
▲—▲ 甾醇 2+不饱和脂肪酸 □—□ 甾醇 3+吐温,
■—■ 甾醇 3+不饱和脂肪酸

剂能加快发酵和酒精生成。其中，吐温的增活作用均优于不饱和脂肪酸。三种甾醇的增活作用与图 1 的结果吻合。

增活剂加速发酵和酒精转化的外部表现，必定会反映在固定化啤酒酵母的内部状态上。为此，分析了固定化胶粒内的细胞情况。

2. 酵母的存活率和泄漏率

① 存活率：添加增活剂的固定化啤酒酵母经五次重复发酵，胶粒内细胞存活率均高于对照组并随发酵次数略有提高(表 1)；从测定每毫升胶粒所含细胞数的情况看，也有类似结果，即随发酵次数增加，细胞数目略有增多。这些结果说明，固定化酵母内添加了增活剂，使酵母保持旺盛的生命力，重复发酵的次数可远远超过五次。

② 泄漏率：表 2 的资料表明，添加增活剂后，使胶粒内细胞的泄漏大大下降，约比对照组下降 5.9—9 倍。添加吐温的三组普遍比添加饱和脂肪酸的三组泄漏率低，平均低 74%。这可能与活细胞和胶粒网格结构的亲和力增强有关。

这些增活剂的作用机理迄今不明。有人认为，这些物质都是酵母细胞自身的产物，是细胞本身所需的生理活性物质。最近，宋任华^[8]报道了一类油菜素类甾醇，已发现约 17 种。它们是从植物中分离得到的，具有生理活性的甾体类植物生长激素。本文所用的三种甾醇，虽不属于油菜素类甾醇，但具有某些相近的结构。从上述结果看，它们都能促进酵母的生长，是否是另一类甾体植物生长激素，值得探究。

(二) 改善固定化酵母的机械强度

采用明胶-戊二醛交联，将凝胶包埋法与交联法结合起来，收到了增加机械强度的效果。但是，戊二醛对酵母有一定的“毒性”，影响发酵速度。因而在添加增强剂的同时，又添加了上述的增活剂，来缓解戊二醛的“毒性”。

表 1 增活剂对固定化啤酒酵母胶粒内细胞存活率的影响

增 活 剂	五次发酵后的存活率(%)					
	1	2	3	4	5	平均
对 照	92.3	90.4	93.8	94.9	96.0	93.5
甾醇 1+吐温	99.3	99.0	100	100	100	99.7
甾醇 2+吐温	98.9	97.6	100	100	100	99.3
甾醇 3+吐温	98.6	97.4	100	100	100	99.2
甾醇 1+不饱和脂肪酸	96.5	95.4	96.3	97.9	99.0	97.2
甾醇 2+不饱和脂肪酸	94.7	93.8	96.7	97.6	98.7	96.3
甾醇 3+不饱和脂肪酸	94.3	93.9	97.6	96.8	98.9	96.3

表 2 增活剂对固定化啤酒酵母发酵过程中细胞泄漏率的影响

增 活 剂	各次发酵中的泄漏率(%)					
	1	2	3	4	5	平均
对 照	0.86	1.20	1.27	1.71	2.62	1.53
甾醇 1+吐温	0.19	0.14	0.21	0.21	0.22	0.19
甾醇 2+吐温	0.11	0.16	0.19	0.21	0.21	0.18
甾醇 3+吐温	0.12	0.15	0.17	0.19	0.24	0.17
甾醇 1+不饱和脂肪酸	0.18	0.17	0.26	0.25	0.28	0.23
甾醇 2+不饱和脂肪酸	0.19	0.17	0.27	0.24	0.45	0.26
甾醇 3+不饱和脂肪酸	0.23	0.17	0.25	0.25	0.32	0.24

表 3 磷酸盐溶液对各组胶粒全溶所需的时间*

试 验 组	全溶所需的时间(秒)	
	未经交联	交 联
对 照	300	420
甾醇 1+吐温	360	480
甾醇 2+吐温	390	470
甾醇 3+吐温	380	495
甾醇 1+不饱和脂肪酸	345	420
甾醇 2+不饱和脂肪酸	360	450
甾醇 3+不饱和脂肪酸	340	450

* K_2HPO_4 浓度为 50 mg/ml, 溶解时用旋涡混合器助溶。

1. 提高机械强度, 减少细胞泄漏: 经增强剂交联后, 胶粒在磷酸盐溶液中的溶解时间延长。

从表 3 可知, 经明胶-戊二醛交联后, 各组胶粒的机械强度明显提高, 以胶溶的延长时间计算, 强度可提高 20—40%。

在多次反复发酵过程中, 用明胶-戊二醛交联各组很少出现开裂的情况, 第五次发酵后取出轻研, 胶粒仍有弹性而不破裂。交联的胶粒

在发酵过程中具有明显的机械强度和抗胶溶的性能。

经明胶-戊二醛交联的固定化酵母, 还能减少细胞泄漏率, 结果见表 4。胶粒经增强剂交联后, 在胶粒表层形成致密的网状结构, 大大减少了胶粒内酵母细胞泄漏到发酵液中。不添加增活剂的对照组经交联后, 使泄漏率降低了 22 倍。添加增活剂吐温各组的泄漏率下降 10 多倍, 添加不饱和脂肪酸的各组泄漏率降低 9 倍多。

2. 交联后, 细胞存活率下降: 由于戊二醛的“毒性”, 使交联的胶粒内细胞存活率普遍下降 10—12%。但添加增活剂各组的存活率普遍高于对照组, 说明增活剂有抵销戊二醛“毒性”的作用。其中添加吐温的各组存活率略高于添加不饱和脂肪酸的各组, 说明吐温抵销戊二醛“毒性”的性能优于不饱和脂肪酸。在五次发酵过程中, 随着发酵次数的增加, 存活率略有提高, 说明戊二醛的“毒性”能随发酵进程的推移而逐渐减弱的趋势。

表 4 增强剂和增活剂对固定化啤酒酵母发酵过程中细胞泄漏率的影响

试 验 组	各次发酵中的泄漏率(%)					
	1	2	3	4	5	平均
对 照	0.86	1.20	1.27	1.71	2.62	1.53
对照+增强剂*	0.076	0.077	0.070	0.061	0.061	0.069
甾醇 1+吐温+增强剂	0.022	0.018	0.018	0.016	0.017	0.018
甾醇 2+吐温+增强剂	0.020	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018
甾醇 3+吐温+增强剂	0.021	0.022	0.017	0.016	0.018	0.019
甾醇 1+不饱和脂肪酸+增强剂	0.032	0.027	0.028	0.020	0.023	0.026
甾醇 2+不饱和脂肪酸+增强剂	0.032	0.027	0.026	0.019	0.022	0.025
甾醇 3+不饱和脂肪酸+增强剂	0.033	0.028	0.028	0.031	0.022	0.028

* 增强剂为明胶-戊二醛交联

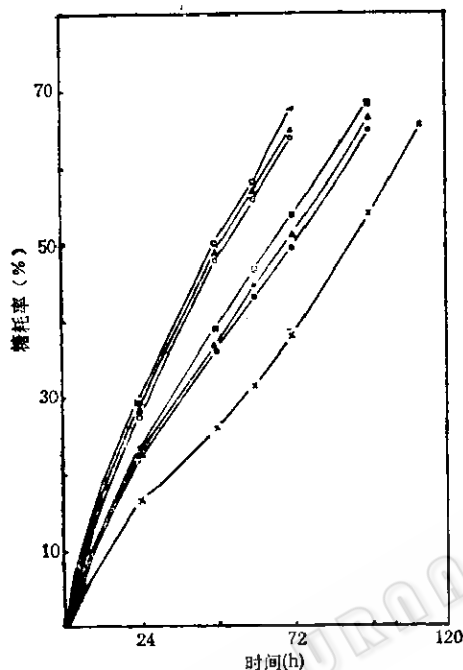


图3 增强剂和增活剂对固定化啤酒酵母糖耗率的影响

- ×—× 对照
- 甾醇 1+吐温+增强剂
- △—△ 甾醇 2+吐温+增强剂
- 甾醇 3+吐温+增强剂
- 甾醇 1+不饱和脂肪酸+增强剂
- ▲—▲ 甾醇 2+不饱和脂肪酸+增强剂
- 甾醇 3+不饱和脂肪酸+增强剂

3. 交联后, 发酵速度和酒精转化变慢: 交联后细胞存活率的减少, 必定会反映到发酵速度下降上来。图3表明, 经增强剂作用后, 无论是对照, 还是添加增活剂各组的糖耗率增长都

变得很缓慢。达到前发酵要求, 即糖耗率在64—68%, 所需发酵时间均延长。与未加增强剂的各组(图1)比较: 对照延长了80小时, 添加吐温的三组延长了48小时, 添加不饱和脂肪酸的三组延长68小时。

从图3可知, 添加吐温的增活作用仍比不饱和脂肪酸的要强。而三种甾醇中, 因添加增强剂, 使甾醇3的效果变为最好, 甾醇2次之, 甾醇1最差, 与图1不同, 说明甾醇3在抵消戊二醛的“毒性”上, 效果优于另二种甾醇。

用明胶-戊二醛交联法, 提高固定化啤酒酵母的机械强度。经物理和化学方法检验以及实际发酵试验, 证明是一种改善机械强度的有效方法。戊二醛“毒性”所引起的存活率减少以及发酵速度变慢等缺点, 可添加增活剂等来缓解。

参 考 文 献

1. 袁晓雄: 食品科学, 10: 8—10, 1987。
2. 彭万霖等: 食品与发酵工业 1: 22—26, 1989。
3. 张晋华等: 食品工业科技, 5: 41—43, 1988。
4. 无锡轻工业学院等合编: 微生物学, 轻工业出版社, 北京, pp.461—465, 1985。
5. 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 北京, pp.9—11, 1985。
6. 王福荣: 白酒生产分析检验, 轻工业出版社, 北京, pp.34—41, 1985。
7. Wada M et al.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 275—287, 1980。
8. 宋任华: 生物化学与生物物理, 17: 105—109, 1990。