

# 苹果酒酵母优良固定化载体的筛选

白雪莲<sup>1</sup>, 章华伟<sup>2</sup>, 岳田利<sup>1</sup>

1 (西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌, 712100)

2 (浙江工业大学药学院, 浙江 杭州, 310014)

**摘要** 以7#苹果酒酵母为试验材料,系统研究了3种固定化载体海藻酸钙、海藻酸钙-聚乙醇醇和海藻酸钙-壳聚糖固定苹果酒酵母后的物理性能和发酵性能,包括固定化载体的机械强度、通透性、显微结构和固定化酵母的酒精发酵能力、发酵苹果酒理化指标、酒精发酵稳定性,结果表明海藻酸钙-壳聚糖具有良好的机械强度(34.32 g/mm<sup>2</sup>)和通透性(0.1209),固定化后苹果酒酵母发酵力强,初始发酵的苹果酒酒质好,原酒酒精精度达9.8%,残糖和酸度分别仅为2.75 g/L、2.77 g/L,且固定化酵母发酵性能稳定,在连续发酵13批次时,原酒酒精精度仍维持在9.1%以上。

**关键词** 苹果酒酵母,固定化载体,海藻酸钙-壳聚糖

苹果酒是利用苹果加工酿制的低度发酵酒,为世界第二大果酒,它具有营养价值高、糖分低、酒度低等优势<sup>[1]</sup>。苹果酒传统酿造工艺采用分批式发酵。缺点是生产费时、费力,终产品质量不稳定。随着科技水平地不断发展,现代苹果酒酿造工艺尝试连续化生产技术<sup>[2]</sup>。苹果酒连续化发酵是将活性酵母细胞固定在多层生化反应器上进行生产,此方法优点是酵母长期保持高活力,发酵周期明显缩短,终产品风味易于控制。苹果酒连续化生产的关键就在于苹果酒酵母的固定化技术,而固定化技术的关键在于优良载体的选择。如果开发一种能长期保持酵母活力且适合连续化生产的载体,那必将极大地推动苹果酒产业的快速发展,带来巨大的经济效益和社会效益。

海藻酸钙、海藻酸钙-聚乙醇醇和海藻酸钙-壳聚糖(ACA)是3种常用于固定化酶和微生物的载体,但它们应用于固定化酿酒酵母发酵生产苹果酒目前还未见有报道,本试验在前期实验的基础上<sup>[3]</sup>,研究了这3种固定化载体的物理性能和发酵性能,结果表明载体海藻酸钙-壳聚糖是一种适用于苹果酒酵母连续发酵的良好载体,具有工业化的应用前景。

## 1 试验材料

### 1.1 主要试剂与仪器

海藻酸钠、壳聚糖(相对分子质量 $3.3 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^5$ )、聚乙醇醇,均为化学纯试剂。

紫外分光光度计(UV-1700, SHIMADZU)、气

相色谱仪(Trace GC Ultra)、扫描电子显微镜(JSM-6360LV, Japan)、10 mL注射器、0~150 mm游标卡尺、自制正方形塑料小盒(1 cm×1 cm×1 cm)、50 g天平砝码、秒表。

### 1.2 菌种

7#酿酒酵母:由中国食品发酵工业研究院工业微生物菌种保藏中心提供。

### 1.3 培养基

浓缩苹果汁:由陕西恒兴果汁厂提供,含总糖720.0 g/L,还原糖605.0 g/L,总酸25.0 g/L。

完全培养基:酵母膏1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,琼脂1%~2%。

苹果汁液体培养基:将浓缩苹果汁调节到含糖量114.0 g/L,酸度为5.0 g/L(以苹果酸计),加入K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, 121℃灭菌30 min。

苹果汁发酵液:将浓缩苹果汁稀释到含糖量160.0 g/L,酸度为5.0 g/L(以苹果酸计), 121℃灭菌30 min。

## 2 试验方法

### 2.1 固定化酵母的制备

#### 2.1.1 海藻酸钙固定化酵母的制备

将酵母接入苹果汁液体培养基中,28℃培养1天,离心收集菌体,无菌水洗涤2次。称取2.5 g湿菌体移入5 mL双蒸水中,加入5 mL 40 g/L灭菌后的海藻酸钠溶液中,充分混匀后用10 mL注射器注入20 mL 0.05 mol/L CaCl<sub>2</sub>溶液中,形成均匀的颗

第一作者:在职博士研究生,讲师(岳田利为通讯作者)。

收稿日期:2008-09-10, 改回日期:2008-10-22

粒后移入 20~22℃ 水浴中,放置 1 h。再倾去溶液加入 100 mL 无菌水冲洗 1 次,重新加入 50 mL 0.05 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,4℃ 放置 12 h,倾去 CaCl<sub>2</sub> 溶液,向三角瓶中加入苹果汁发酵醪,在 20℃ 下发酵,测定发酵性能。

### 2.1.2 海藻酸钙-聚乙烯醇固定化酵母的制备

将 10% 的聚乙烯醇溶液与 1% 的海藻酸钠及菌悬液(同 2.1.1)混匀后,滴入 0.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,充分反应,滤出洗净,得到球状固定化细胞颗粒,备用。

### 2.1.3 海藻酸钙-壳聚糖固定化酵母的制备<sup>[4]</sup>

将 5 mL 1.5% 海藻酸钠与 5 mL 菌悬液混合于 10 mL 注射器中,然后注射入 1.5% CaCl<sub>2</sub> 溶液中,形成海藻酸钙微球,去掉上清液,用 1.5% CaCl<sub>2</sub> 溶液洗涤固化 1 h,再与 0.1% 壳聚糖的 1% 冰醋酸溶液充分混合进行成膜反应,15 min 后用 0.15% 的海藻酸钠溶液处理微胶囊表面 5 min,再用 0.055 mol/L 的柠檬酸钠溶液浸泡 10 min,滤去处理液,用双蒸水洗涤 2 次,加无菌水备用。

全文中将游离酵母、海藻酸钙固定化酵母、海藻酸钙-聚乙烯醇固定化酵母和海藻酸钙-壳聚糖固定化酵母分别编号为 A、B、C 和 D。

## 2.2 固定化载体物理性能的测定方法

### 2.2.1 固定化载体机械强度的测定方法<sup>[5]</sup>

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。随机取制得的固定化载体 3 个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 50g 砝码,计时 60 s,用 0~150 mm 游标卡尺分别测量施压前后的载体直径,然后计算其差值  $d$ 。则单个固定化载体的机械强度为: $P_1=50/d^2$ , $d=[(D_1+D_2+D_3)/3]-[(d_1+d_2+d_3)/3]$ ,( $d_1$ 、 $d_2$ 、 $d_3$  为施压后固定化载体的直径, $D_1$ 、 $D_2$ 、 $D_3$  为施压前固定化载体的直径),如此测量 3 组取平均值即为此时固定化载体的平均机械强度  $P(\text{g}/\text{mm}^2)$ , $P=(P_1+P_2+P_3)/3$ 。

### 2.2.2 固定化载体通透性的测定方法<sup>[4]</sup>

随机取固定化载体颗粒 30 个放于无菌的 150 mL 三角瓶内,加入 0.8 mg/mL 的标准葡萄糖溶液 100 mL 浸泡,放于 28℃ 恒温培养箱保温 24 h,再用 DNS 法测定浸泡前后葡萄糖溶液浓度(检测波长为 483 nm)<sup>[6]</sup>,浸泡前后的 2 次葡萄糖溶液浓度差即可反映该固定化载体的通透性。差值越大表明通透性越好,以同样处理的空白固定化载体滤过液作对照,

以消除背景干扰。

## 2.3 苹果酒理化指标的测定方法

### 2.3.1 苹果酒中的总糖和还原糖

GB/T15038-1994 费林试剂法。

### 2.3.2 总酸

GB/T15038-1994 酸碱滴定法。

### 2.3.3 乙醇

气相色谱法,柱温 200℃,气化室和检测器温度 240℃,载气流量(氮气)40 mL/min,氢气流量 40 mL/min,空气流量 500 mL/min。

## 3 结果与分析

### 3.1 三种载体的物理性能比较

用于连续化生产的固定化酿酒酵母应具有较强的机械强度,这样才能在生产苹果酒的过程中承受连续流动发酵液的剪切力,满足连续化生产的要求,但是载体的强度常常是以牺牲载体的通透性为代价的,而载体的通透性如果太低就会严重影响酵母发酵,因此考察载体的物理性能应把强度和通透性 2 者兼顾。由表 1 可知,海藻酸钙载体的机械强度最大,海藻酸钙-壳聚糖的强度略低,海藻酸钙-聚乙烯醇的强度最低,在制备过程中也发现海藻酸钙、海藻酸钙-壳聚糖的成球性很好,而海藻酸钙-聚乙烯醇不易成球,即使成球,球体较软,易碎。在通透性方面,海藻酸钙-壳聚糖的通透性明显优于其他 2 种载体,海藻酸钙-聚乙烯醇的通透性要优于海藻酸钙载体。从试验结果综合考虑认为,海藻酸钙-壳聚糖表现出的物理性能比其他 2 种更适于苹果酒的连续化生产。

表 1 不同酵母载体物理性能比较

序号	载体	机械强度 $P/\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$	通透性
1	海藻酸钙	37.15	0.0310
2	海藻酸钙-聚乙烯醇	26.99	0.0548
3	海藻酸钙-壳聚糖	34.32	0.1209

### 3.2 三种固定化载体的表面扫描电镜照片

观察分析不同载体表面的电镜照片可以发现,海藻酸钙膜表面交联的比较紧密,组织形态呈不规则的块状,交织态不明显,这一结构将有助于抵抗外界压力,但同时这种紧密的结构也可能会影响小分子自由的穿过载体,从而影响包埋后微生物的生长和代谢。海藻酸钙-聚乙烯醇膜表面交联呈平面状,网格清晰、规则,但网格之间的连接比较单薄,而海藻酸钙-壳聚糖膜的表面交联呈较为规则的立体结构,膜表面分布着较为致密的小孔,孔和纹路的交织表明微胶囊

膜具有三维的空间结构,这一结构有助于它保持好的机械强度和通透性。

通过观察和分析不同载体的显微结构,发现了它

们在形成微胶囊膜结构上的差异,为进一步研究改善载体的物理性能和发酵性能提供了依据。

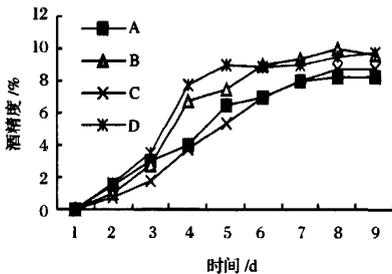
海藻酸钙表面扫描电镜图 (×1300)      海藻酸钙-聚乙烯醇表面扫描电镜图 (×2000)      海藻酸钙-壳聚糖表面扫描电镜图 (×2200)

图1 不同载体材料表面扫描电镜图

### 3.3 三种载体固定化酵母的发酵性能比较

#### 3.3.1 三种载体固定化酵母的发酵酒精实验

将7#酵母分别用海藻酸钙、海藻酸钙-聚乙烯醇和海藻酸钙-壳聚糖3种载体固定化,按5%的比例接种到苹果汁增殖培养基中,30℃摇床培养2d,滤去培养基,接入苹果汁发酵醪,20℃静止发酵,同时以游离酵母为对照。发酵过程中每天测定其酒精度。



A:游离态酵母;B:海藻酸钙为载体;C:海藻酸钙-聚乙烯醇为载体;D:海藻酸钙-壳聚糖载体

图2 不同固定化酵母和游离酵母的发酵酒精实验

由图2知,酵母B、C和D发酵苹果酒的最大酒精度均高于游离酵母A所达到的最大酒精度8.3%。B、D载体固定化的酵母生产酒精能力较强,最大酒精度分别达到9.8、10,且能在一定时间内维持很强的发酵力。C载体固定化酵母发酵时有部分珠体上浮,并有软化破裂现象,乙醇生产能力也低于B和D<sup>[7]</sup>。由于D载体内为液态环境,其传质效果要比内部为凝胶状的B和C固定化载体好得多,所以D的酒精发酵效率较B和C高。

#### 3.3.2 三种载体固定化酵母酿制苹果酒发酵实验

取1000 mL三角瓶,加入800 mL苹果汁(糖度160 g/L),按5%的接种量接入固定化酵母(经增殖培养的固定化酵母),在20℃下发酵。发酵至第12

天过滤掉固定化颗粒,再陈酿10天后,测定苹果酒的理化指标。

表2 三种载体固定化酵母对发酵苹果酒理化指标的影响

菌株	酒精度/% (质量百分比)	还原糖 /g·L <sup>-1</sup>	总糖 /g·L <sup>-1</sup>	总酸(以苹果 酸计)/g·L <sup>-1</sup>
A	8.3	2.59	6.98	2.90
B	9.5	2.11	6.10	2.85
C	8.8	3.09	6.15	2.07
D	9.8	2.75	5.90	2.77

酒精度的高低可反映出酵母降糖和发酵生产酒精的能力。苹果酒的残糖量影响苹果酒的口感和风味,是酿酒工业中控制生产和决定工艺的重要参数。总酸是苹果酒中很重要的呈味物质,也是苹果酒感官指标的重要体现;总酸过高或过低,都会对酒质产生不良的影响<sup>[8]</sup>。由表2可知,海藻酸钙-壳聚糖载体固定的酵母D发酵的原酒酒精度最高,达到9.8,且其酸度仅为2.77 g/L适中;酵母B发酵耗糖能力次之,其原酒的酒精度达9.5;酵母C发酵力弱,残糖较高,酒精度低,酸度也偏低。

#### 3.3.3 三种载体固定化酵母的发酵酒精稳定性能比较

固定化酵母是为了实现连续化生产的需要,减少倒罐等生产步骤,尽量避免杂菌的污染,因此固定化载体的优劣还需通过多批次发酵实验考察其发酵酒精的稳定性,以及抗杂菌污染的能力<sup>[9]</sup>。将酵母A、B、C和D按5%比例接种到苹果汁增殖培养基中,28℃摇床培养48 h,滤去培养基,接入苹果汁发酵醪20℃静止发酵,发酵结束后测定其最终酒精度,再将酒液滤出,更换新的与上一批相同的苹果汁发酵醪,如此反复直至载体基本破裂或载体内酵母发酵力基本丧失,记录各批次酒精最终生成量。同时以它的游

离酵母为对照。

表3 三种载体对多批次发酵试验最高酒精度(%,质量百分比)的影响

批次	A	B	C	D
1	9.1	9.5	9.0	9.5
2	8.9	10.0	10.1	11.0
3	8.8	10.0	9.2	10.5
4	7.5	9.5	—	10.0
5	7.4	9.0	—	10.0
6	7.0	9.0	—	9.8
7	7.0	8.0	—	9.5
8	7.1	8.2	—	9.6
9	6.5	8.0	—	9.4
10	6.4	7.5	—	9.2
11	6.2	7.2	—	9.2
12	6.0	7.3	—	9.1
13	5.6	7.1	—	9.1

由表3可知,接种酵母的D载体发酵酒精的稳定性能最好,从第2批到第5批均达到了很高的酒精度,发酵旺盛,直到第13批次一直保持着较强的发酵力,且固定化颗粒仅有极少量破碎,无上浮现象。第13批发酵的酒液仍保持澄清透明,酒液有光泽,泡沫丰富;B载体发酵酒精的稳定次之;C载体最差,由于发酵过程中珠体破裂,部分发生粘结,还有部分上浮,酒体混浊,在第4批即停止发酵。

#### 4 结论

通过对3种固定化载体海藻酸钙、海藻酸钙-聚乙烯醇和海藻酸钙-壳聚糖的显微结构、物理性能及其固定化酵母发酵性能系统比较研究,结果表明海藻

酸钙-壳聚糖具有良好的通透性(0.1209)和机械强度(34.32 g/mm<sup>2</sup>),利用该载体固定化后苹果酒酵母发酵力强,初步发酵的苹果酒酒质好,且多批次发酵性能稳定。因此,海藻酸钙-壳聚糖是一种较好的固定化苹果酒酵母载体,将具有广阔的工业化应用前景。

#### 参 考 文 献

- 1 马兆瑞. 苹果酒酿造技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2004. 1~7
- 2 Nigam JN. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 80: 189~193
- 3 白雪莲, 岳田利, 袁亚宏, 等. 制备苹果酒酵母固定化载体海藻酸钙-壳聚糖的研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(3): 74~81
- 4 付颖丽, 雄鹰, 刘袖洞, 等. 海藻酸钠-壳聚糖固定化载体固定化大肠杆菌的研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 239~241
- 5 李朝霞, 朱建良. 制备海藻酸钠-壳聚糖生物固定化载体的技术研究[J]. 盐城工学院学报(自然科学版), 2005, 18(2): 58~62
- 6 齐香君, 苟金霞, 韩戎琰, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(3): 17~19, 30
- 7 Jiang TD. Chitosan [M]. Beijing: Press of Chemical Industry, 2001
- 8 Verbelen PJ, De Schutter DP, Delvaux F, et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(19): 1 515~1 525
- 9 陈爱政, 万宁. ACA 微胶囊固定化细胞发酵木糖醇[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 42~44

## Screening of Better Carriers to Immobilize Cider Yeast

Bai Xuelian<sup>1</sup>, Zhang Huawei<sup>2</sup>, Yue Tianli<sup>1</sup>

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

2 (School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**ABSTRACT** In our continuous study on screening of superior carriers to immobilize cider yeast 7<sup>#</sup>, three kinds of material were selected, including alginate-Ca, PVA-alginate-Ca and chitosan-alginate-Ca (ACA). The physical and fermentative properties of these immobilized carriers were systematically investigated. The results were shown that cider yeast immobilized by ACA has better mechanical intensity(34.32g/mm<sup>2</sup>), penetrability(0.1295) and continuous fermentation capability. The alcoholicity of primary cider can achieve at 9.8%. The content of residual sugar and acid are 2.75g/L, 2.77g/L, respectively. It was suggested that ACA is a superior carrier to immobilize cider yeast and would have potential applicability in cider production.

**Key words** cider yeast, immobilized carrier, chitosan-alginate-Ca (ACA)