

流态化微胶囊固定酵母技术在啤酒生产中的应用研究

李建飞¹, 王德良², 傅力¹

1(新疆农业大学食品科学学院, 新疆乌鲁木齐, 830052) 2(中国食品发酵工业研究院, 北京, 100027)

摘要 采用微胶囊包埋法固定酵母细胞, 同时利用流态化技术, 使胶囊化的酵母细胞悬浮于稳定状态的发酵液中。通过控制流量、温度和压力, 连续进行麦汁的二级主发酵, 然后不断取走嫩啤酒, 从而实现啤酒的连续化生产。结果表明连续发酵生产的啤酒与分批发酵相比, 风味、口感都比较接近。

关键词 流态化, 微胶囊, 固定化酵母, 发酵

利用固定化酵母进行啤酒连续发酵的设想, 由来已久。与分批发酵相比, 固定化酵母技术缩短了生产时间, 简化了生产过程和操作, 便于酵母的分离和回收, 可以大幅度减少投资, 而产量较大罐生产可节省投资 80% 左右^[1]。

将固定化酵母用于啤酒的连续发酵, 其机理是将活的酵母细胞高度密集于载体内, 并不断地生长繁殖, 形成高浓度的生物催化剂, 从而大大加快反应速度, 使反应器的生产能力大幅度提高。但是连续发酵生产的啤酒在风味和口感方面有一些缺陷, α -氨基氮和双乙酰高, 而酯类物质较低, 这些缺陷是由酵母生长和新陈代谢环境的改变而造成的^[2]。从这一点可以看出, 用固定化酵母细胞技术使啤酒主发酵最佳化, 最关键的因素在于载体的制作, 酵母菌的选育和所设计的反应器^[3]。

本论文研究尝试从以下三个方面加以改进, 首先在载体制作方面不是简单的应用包埋法, 而是在包埋的基础上再胶囊化, 改变酵母的生长微环境; 其次, 在菌种的选育方面, 使用激光和氯化锂化学的诱变手段筛选优良的菌株; 最后自行设计发酵罐。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

菌株: 中国食品发酵工业研究院菌种保藏中心保藏。

壳聚糖, 国药集团化学试剂有限公司; 氧化铝、二氧化硅、海藻酸钠, 广东省汕头市西陇化工厂; 柠檬酸钠、无水 CaCl_2 , 北京化工厂; NaCl , 天津市北方天医化学试剂厂, 以上试剂均为分析纯。

SJ-8 He-Ne 激光仪, 河北激光研究所; UV-2401PC 分光光度计, Shimadzu; LRH-250 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; 自行设计发酵罐; BH-2 电子显微镜, OLYMPUS; PerkinElmer 气相色谱; TURBOMATRIX 40 型自动顶空进样器; HL-2S 恒流泵, 保定兰格恒流泵有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选

1.2.1.1 降糖能力强的菌株的筛选

由于微胶囊固定化酵母发酵啤酒除要求保证质量外, 还强调快速发酵过程, 所以菌株的降糖速度很重要。本实验采用 He-Ne 激光照射进行酵母的选育, 照射时间分别为 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 原菌株作为对照, 输出功率 12mW, 由试管底垂直向上照射。上述菌株放到培养箱在相同条件下分别经微胶囊固定化并增殖后, 进行发酵栓实验, 用 CO_2 失重法筛选降糖能力强的菌株。

1.2.1.2 还原双乙酰能力强的菌株的筛选

双乙酰也是在微胶囊固定化连续发酵啤酒中需要重视的问题, 如果经主发酵后 α -乙酰乳酸与双乙酰水平较高, 对缩短发酵周期有负面作用。

取 1.2.1.1 中筛选出的酵母细胞, 涂布在 5 个含有氯化锂(诱变剂)和 300 mg/L 双乙酰的麦汁平板培养基上, 以抗双乙酰特性为突变菌株挑出诱突变菌, 进行单菌落培养, 做发酵栓实验, 跟踪双乙酰还原过程。

1.2.2 微胶囊的制作

本试验采用聚电解质络合的方法制备微胶囊。该方法的显著优点是制备过程温和, 微胶囊化的细胞活性在制备中的损失很少。采用壳聚糖和海藻酸钠作为阴、阳离子聚电解质材料。

在陈爱政^[4]微胶囊化细胞的基础上, 改进制作方

第一作者: 硕士研究生(王德良为通讯作者)。

收稿日期: 2006-12-11

法,在海藻酸钠溶液中加入 Al_2O_3 和 SiO_2 [5]。

1.2.3 连续发酵动力学模型的建立

用高 200 mL、宽 45 mL 的玻璃柱子模拟流化床,恒流泵作为动力进行啤酒的连续发酵,微胶囊的装入量为总容积的 1/3,原麦汁浓度是 10°P ,麦汁储罐体积为 280 mL,流量为 1.2 mL/min,温度控制在 13°C 。每隔 1h,用手持糖度计测 1 次糖度。

1.2.4 连续发酵嫩啤酒理化、风味指标分析

原液测定:比重瓶法[6];酒精度:比重瓶法[6];双乙酰的测定:邻苯二胺比色法[6];挥发性物质的测定:气相色谱自动顶空进样。

1.2.5 微胶囊固定化酵母的培养增殖及连续发酵试验

把已经微胶囊好的酵母小珠倾入盛有麦汁的无菌容器中,微胶囊中酵母数是 2.0×10^7 个/mL,装填量为 30%(V/V),控制温度为 28°C ,培养增殖 24 h,使载体微胶囊固定的细胞量接近极限容量。

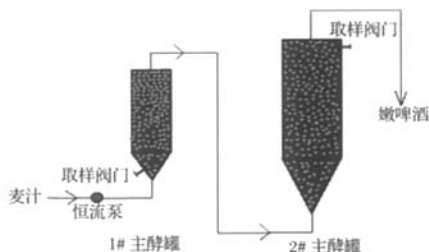


图1 连续发酵系统示意图

连续发酵系统如图1所示,分为有氧和厌氧二级发酵。首先将培养增殖好的微胶囊分别装到1#、2#主发酵罐中,装填量也为 30%(V/V),通过恒流泵将准备好的麦汁以 185 mL/h 流量打入1#主发酵罐中进行有氧发酵,由于发酵产生的大量 CO_2 气体以胶囊为“气核”包裹在胶囊的周围,使胶囊的浮力增加,浮到上面,但是由于微胶囊中加入了 SiO_2 增大了胶囊的密度,等气泡上升到液面破裂后,胶囊重新沉下来,这样反复上浮下沉,从而使胶囊能与麦汁充分接触,形象地称为“流态化”,1#主发酵罐中的微胶囊发酵产生的压力将1#主发酵罐中发酵液压到2#主发酵罐中进行厌氧发酵,控制发酵温度为 13°C 。反应器用有夹套层的容器控制温度,用乙二醇制冷,开始时先测定麦汁的糖度,然后通过泵将麦汁注满1#和2#主发酵罐后,每隔 1.0h 从反应器出口处取样测定发酵后的糖度和释放酵母细胞数,直到其数值保持基本不变,则反应系统可视为达到稳态。

2 结果与讨论

2.1 激光诱变后筛选目的菌株

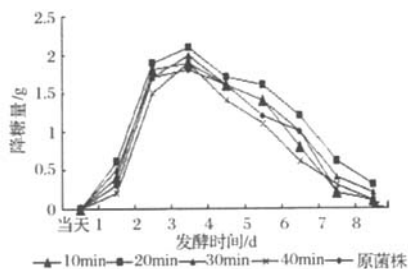


图2 激光照射处理后酵母的降糖情况

由图2可知,照射 10 min 时,可能是由于细胞对激光环境不适应,降糖能力基本和原菌株差不多。但是随着时间的延长,细胞内积累的激光剂量增大,温度增加,达到细胞生长的最适温度,使得细胞裂殖更容易,从而使酵母菌的繁殖在相同时间内比对照快。20 min 后,温度超过最适温度,细胞开始自溶,酵母数减少,表现为降糖力不强,当照射达到 40 min 时,可能是激光对啤酒酵母细胞内的乙醇脱氢酶的生理活性有直接影响,从而影响酵母菌细胞的正常生理代谢。因此以激光照射 20 min 为好。

2.2 还原双乙酰能力强的菌株的筛选

在对已长出的 3 个平板上菌株分别进行单菌落培养,并微胶囊固定化后做发酵栓实验,跟踪双乙酰的还原情况,见图3。

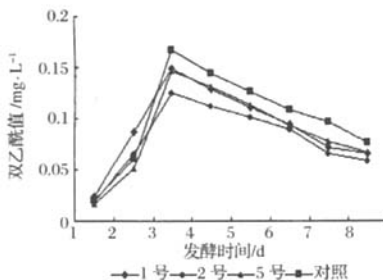


图3 双乙酰还原曲线

由图3可知,在氯化锂诱变剂的作用下,双乙酰平板上长出的菌落生成的双乙酰峰值都比对照低,可能是由于诱变引起细胞内还原酶活性的提高,3 个平板上长出的菌株的还原双乙酰的速度基本一致,但从图3可以看出,2号菌株生成的双乙酰的峰值最低且还原曲线比较稳定,因此2号平板上单菌株是最终要选的目的菌株。

2.3 降糖动力学模型(见图4)

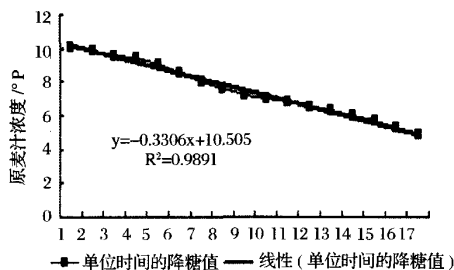


图4 降糖动力学模型

由图4可知,酵母开始时降糖能力较弱,可能是还没有适应微胶囊内环境,也可能是麦汁营养物质还没有渗透到胶囊内,但是随着时间的延长,酵母已经适应了内环境,所以降糖速度加快,12h时胶囊内酒精含量达到了一定值,对酵母的代谢产生了一定的影响,降糖速度稍微减慢;15h时可能是营养物质的渗入和酵母代谢产物的排出达到了动态平衡,降糖曲线基本上趋于一条直线。

2.4 连续发酵的嫩啤酒的风味以及理化指标

具体结果见表1~表3。

表1 连续发酵与分批发酵生产的啤酒理化指标对比

项目	连续发酵	分批发酵
原麦汁浓度/°P	9.89	9.76
真正发酵度/%	60.25	58.35
酒精度/%,w/w	3.45	4.50
pH值	4.30	3.64
色度/EBC	0.28	0.21
双乙酰/mg·L ⁻¹	0.12	-

表2 连续发酵与分批发酵生产啤酒的风味物质对比

项目	连续发酵	分批发酵
乙醛/mg·L ⁻¹	8.564	9.723
正丙醇/mg·L ⁻¹	9.531	10.7365
异丁醇/mg·L ⁻¹	10.148	12.2183
异戊醇/mg·L ⁻¹	53.877	56.811
乙酸乙酯/mg·L ⁻¹	11.513	9.597
甲酸乙酯/mg·L ⁻¹	0.105	0.135
己酸乙酯/mg·L ⁻¹	0.142	0.072
辛酸乙酯/mg·L ⁻¹	0.117	0.087
乙酸异戊酯/mg·L ⁻¹	0.833	0.629

由表3可知,经过13~14h时,外观精度基本保持在4.8°P,可视为稳态,此时释放的酵母数一直维持在10³数量级。

2.5 啤酒的品评结果

连续发酵的啤酒有醇厚感,酯香味,但稍有苦味,杀口力较正常啤酒稍差。

表3 稳态前数据跟踪

时间/h	精度/°P	释放的酵母数
0.0	9.5	2.0×10 ⁵
1.0	9.2	1.6×10 ⁵
2.0	9.0	1.5×10 ⁵
3.0	8.4	1.7×10 ⁵
4.0	7.9	1.7×10 ⁵
5.0	7.4	1.9×10 ⁵
6.0	6.9	1.9×10 ⁵
7.0	6.5	1.9×10 ⁵
8.0	6.2	1.8×10 ⁵
9.0	5.7	1.9×10 ⁵
10.0	5.4	1.7×10 ⁵
11.0	4.9	1.8×10 ⁵
12.0	4.8	1.7×10 ⁵
13.0	4.8	1.8×10 ⁵
14.0	4.8	1.7×10 ⁵

3 结 论

(1)适当剂量的 He-Ne 激光与化学诱变剂的双重诱变,可以影响酵母细胞内酶的活性,有利于选育到降糖力强且还原双乙酰快的啤酒酵母菌株,同时微胶囊该菌株后,建立了发酵动力学模型,为以后大规模生产奠定了理论基础。

(2)流态化微胶囊酵母在发酵液中自由运动,可以充分地利用麦汁,不至于形成营养梯度,造成内外压力不平衡,且释放的酵母数少,可以反复利用,定期活化。同时设计了有氧和厌氧两级连续主发酵,满足了酵母的生长代谢过程,生产的啤酒和分批发酵的啤酒在口感和风味上没有太大的差异。

(3)利用微胶囊固定化酵母进行啤酒连续发酵经验还不很成熟,如何将小型试验比拟放大到实际生产中去,还有许多实际问题需要进一步研究和探索。

参 考 文 献

1 管敦仪. 啤酒工业手册(修订版)[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998. 449~452

2 Umemoto S, Goffin O, Van Beveren', et al. Primary Fermentation with Immobilized Yeast in a Fluidizes Bed Reactor[J]. MBAA TQ 1998,35(2):58~61

3 Vikto Nedovic, Rajdle P, Andries M, et al. New porous matrices and procedures for yeast cell immobilization for primary beer fermentation[C]. Proceedings of the 30th EBC Congress, PRAGUE,2005,48: 401~403

4 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

5 张书祥, 李宁, 石俊, 等. 固定化酵母连续发酵生产酒精工业应用的研究[J]. 生物学杂志,1999,16(3):27~28

6 全国食品发酵标准化中心, 中国标准出版社第一编辑室
编. 中国食品工业标准汇编(第二版)——饮料酒卷[M].

北京: 中国标准出版社, 2001. 11~21

Research and Application of Immobilized Yeast Using Fluidized Microcapsule Technology in Beer Industry

Li Jianfei¹, Wang Deliang², Fu Li¹

1(Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830052, China)

2(China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT In this article, the microcapsule method, combined with the fluidized technique, were applied to immobilize yeast cell in order to keep the yeast cell suspending in the continuous dilution fermented liquid. By controlling the flow rate, temperature and pressures, the primary fermentation has been carried out continuously, and the corresponding beer was taken away. As a result, beer was produced continuously. The result indicates that the flavor and taste of beer produced by continuous fermentation was consistent, in compared with that produced from the batch fermentation.

Key words fluidized, microcapsule, immobilized yeast, fermentation

政策法规标准

《鸡粉调味料》、《调味料酒》、《酱油中乙酰丙酸的测定方法》三项行业标准发布

2007年6月20日, 由中国调味品协会主办、广东佳隆食品股份有限公司协办的“《鸡粉调味料》、《调味料酒》、《酱油中乙酰丙酸的测定方法》”新闻发布会暨宣贯会”在京召开。SB/T10415—2007《鸡粉调味料》、SB/T10416—2007《调味料酒》、SB/T10417—2007《酱油中乙酰丙酸的测定方法》等3项新的调味品国内贸易行业标准已于2007年1月25日正式发布, 将于2007年7月1日起在全国正式实施。

《鸡粉调味料》、《调味料酒》、《酱油中乙酰丙酸的测定方法》的制定与实施, 是为彻底解决鸡粉调味料、调味料酒、酿造与配制酱油3个行业中存在生产标准不统一、产品质量良莠不齐、市场假冒伪劣严重等诸多问题, 化解市场与行业矛盾, 维护生产企业及消费者合法权益。中国调味品协会于2004年向商务部上报了以上3个行业标准计划并获批准。几年来, 在国家有关部门和中国调味品协会的共同努力下, 全国各主要生产企业积极参与工作, 《鸡粉调味料》《调味料酒》《酱油中乙酰丙酸的测定方法》三项国内贸易行业标准终于公布实施。

2006年鸡精调味料全国产量达到20万t, 鸡粉调味料也在15万t以上, 鸡粉调味料中鸡肉的风味更浓一些, 更适合调制各类汤菜。而调味料酒标准的颁布, 对促进调味料酒品牌产品的形成, 减轻调味料酒生产企业的税负影响更为深远。酱油作为我国调味品生产中产销量最大的品种, 年产量已达到550万t以上。而《酱油中乙酰丙酸的测定方法》, 作为《酿造酱油》国家标准、《配制酱油》国家标准和《酱油卫生标准》在贯彻执行中的有益补充, 对于区分酿造酱油和配制酱油提供了检测依据。

据悉, 此3项行业新标准的颁布与实施, 只是中国调味品协会行业标准化工作的一个方面, 在今年初对外公布的《中国调味品行业五年标准计划》中, 目前市场上的层出不穷的调味新品: 鸡汁、火锅调料、虾精、调味汁、鱼露、汤料、牛肉粉、西餐调料等, 都已经纳入。行业标准化工作一直是行业协会为行业、企业、市场服务所做的重要基础工作, 对于促进全国调味品行业生产的发展、技术进步, 促进调味产品品牌的形成等方面都有着积极的作用。

国家、行业标准的颁布与实施, 对于提高品牌企业的市场竞争力、维护生产企业及消费者合法权益等方面都有好处, 上级部门的支持、行业协会的协调, 企业的标准化生产, 市场和消费者的监督, 四方合力, 正是现在调味品这一传统行业在现阶段在中国经济稳定发展、食品工业飞速发展, 人民生活水平不断提高的大环境下, 得到繁荣发展的最大原因。为给人们的厨房餐桌“输送”更为“美味、健康、营养”的各种调味佳品, 生产企业将会依据国家、行业标准制订更高的企业标准, 从源头上保证人民的食品安全, 提供更多的美味选择。