

某些添加物对固定化酵母的影响

嘉兴高等专科学校 朱仁华

摘 要

在海藻酸钙固定化酵母中,添加0.25%明胶,再与戊二醛交联,使胶粒的机械强度大增,使细胞泄漏率明显减少。在固定化酵母中添加甾醇、吐温和不饱和脂酸,使发酵速度加快,细胞存活率提高。

前 言

用海藻酸钙作为包埋剂,来制备固定化酵母胶粒。由于方法简便,有一定的机械强度,且酵母活性较高,已被较广泛采用。国内沿海海藻工业的发展,提供了大量海藻酸钠产品,价格较低,加上国内已制成适于工业化生产的造粒机^[1],使海藻酸钙固定化酵母能用于酿酒工业生产^[2]。然而麦汁中存在磷酸盐等多价阴离子,它们与海藻酸钙中的钙离子作用,而使钙离子脱去。凝胶状的海藻酸钙变成溶胶,胶粒变软变脆,导致开裂,甚至崩解,大大缩短了固定化酵母的使用寿命。另一方面,如何提高胶粒中酵母细胞的活性,维持酵母较持久的生命力,延长活细胞的寿命,也是一个重要的研究领域。

本研究在固定化酵母内添加某些物质,一是为提高胶粒的机械强度,减少胶粒内酵母细胞泄漏至发酵液中,这些添加物称之为增强剂。二是为提高酵母活性,加速发酵,延长细胞的寿命而添加的物质,称之为增活剂。

材料和方法

一、酵母菌

啤酒酵母和麦汁由嘉兴啤酒厂提供。酒精酵母由嘉兴酒厂提供。

二、海藻酸钠:高粘度级,浙江岱山制碘

厂产品。

三、固定化酵母制备

(一) 增活组

1. 增活组1。取甾醇1或2 60mg,吐温2g溶于8ml热乙醇中,溶后加至200ml3%海藻酸钠溶液,灭菌后冷却,加入20ml酵母($>10^9$ 个细胞/ml),搅匀后装入制粒器,逐滴滴入10倍体积的2%CaCl₂溶液中,固化40分钟,水洗待用。

2. 增活组2。取甾醇1或2 60mg和不饱和脂酸0.5g溶于8ml热乙醇,其余操作同增活组1。

3. 对照组。除不加甾醇、吐温和不饱和脂酸外,其余操作与增活组1和2相同。

(二) 增强组。将海藻酸钙包埋法与明胶-戊二醛交联法联合应用

在上述增活组(1或2)的甾醇、吐温、不饱和脂酸和海藻酸钠的混合液(对照组仅为海藻酸钠溶液)中,加入该液体积的0.25%(g/v)明胶,明胶溶解后灭菌,冷后加入20ml酵母($>10^9$ 个细胞/ml),装制粒器,逐滴滴入2%CaCl₂液中固化,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,制得三种增强组固定化酵母。

(三) 酵母检测与增殖

按浮力法取一定体积的固定化酵母胶粒,用K₂HPO₄液溶解后计数,每毫升胶粒的细

胞数应在 10^9 个。若细胞数太少,放入完全培养基(10%葡糖、0.15%酵母浸膏、0.25%氯化铵、0.55% K_2HPO_4 、0.02% $MgSO_4$ 、0.1% $NaCl$ 、0.001% $CaCl_2$ 、0.3% 柠檬酸,调pH至5)增殖至 10^9 个细胞/ml胶粒为止。

酵母细胞的存活情况,用美兰法^[3]检测。

四、发酵试验

将增殖组三组和增强组三组固定化酵母,各取50ml胶粒,分别放入250ml锥形瓶,再加200ml发酵糖液(啤酒酵母加麦汁,酒精酵母加10%葡糖),于室温培养,定时测定糖含量和酒精浓度。啤酒酵母发酵到糖度为4Bx,达到前酵要求时停止发酵。酒精酵母发酵到糖全部转变为酒精时停止发酵。滤去发酵液,再重复发酵。

五、测定

(一) 糖的测定

1. 糖度计法 用Brixscale比重计测定。

2. Somogyi-Nelson 法^[4,5]测定还原糖含量。

(二) 酒精测定

1. 酒精比重法 用酒精比重计测定。

2. 重铬酸钾法 按王福荣的方法测定^[6]。

(三) 计算

1. 糖耗率 = $\frac{\text{初始含糖量} - \text{剩余含糖量}(\text{mg})}{\text{初始含糖量}(\text{mg})} \times 100\%$

2. 酒精转化率 当100g葡糖转化为92.2g乙醇时,为100%酒精转化率的理论值^[7]。

结果与讨论

1. 添加物对胶粒直径的影响

增殖剂	直径 (mm)	增强剂	
		未交联	明胶-戊二醛交联
啤酒酵母	甾醇1+吐温	2.8	2.8
	甾醇1+不饱和脂肪酸	2.6	2.5
	对照	3.1	3.2
酒精酵母	甾醇1+吐温	2.8	2.8
	甾醇1+不饱和脂肪酸	2.6	2.6
	对照	3.1	3.2

一、添加物对固定化酵母胶粒直径的影响
从表1可知,添加增殖剂后胶粒直径明显变小,其中添加不饱和脂肪酸组更甚,与杨伯华等^[8]的实验结果一致,这与增殖剂的脂溶性有关。而添加增强剂的,其直径无明显变化。

用甾醇2对啤酒酵母试验,得到相似结果。其中加不饱和脂肪酸的固定化酵母胶粒直径最小,加吐温的次之,同样与它们的脂溶性有关。

未交联的各试验组,胶粒在发酵液中上浮的现象很少,其中加不饱和脂肪酸组最明显,这与不饱和脂肪酸的消泡作用有关。而交联各组仍上浮。

二、胶粒经明胶-戊二醛交联,可提高机械强度

胶粒在完全培养基中增殖5小时,由于完全培养其中含有0.55%磷酸氢二钾和0.3%柠檬酸,这两种物质能使固定化酵母中的海藻酸钙,脱钙而裂开。从表2可知,经明胶-戊二醛交联后的海藻酸钙,形成致密的三维空间结构,使强度提高,不易脱钙,因而很少发现胶粒开裂的现象。而未交联的胶粒在25℃完全培养其中增殖5小时,近半数的胶粒均有裂缝。

表2. 于25℃在完全培养基中增殖5小时,胶粒开裂的情况

增殖剂	增强剂	增殖剂		对照
		甾醇1+吐温	甾醇1+不饱和脂肪酸	
啤酒酵母	未交联	+++++	+++++	+++++
	明胶-戊二醛交联	+	+	+
酒精酵母	未交联	+++++	+++++	+++++
	明胶-戊二醛交联	—	—	—

注:“—”号表示无开裂,“+”号表示个别开裂,“++”号越多,表示开裂程度越大。

用甾醇2取代甾醇1,对啤酒酵母试验,得到与表2中甾醇1相似结果,说明甾醇种类的改

变, 不影响胶粒的机械强度。

用浓度为6mg/ml的 K_2HPO_4 溶液浸溶胶粒试验, 结果表明, 未经交联的胶粒在浸溶48小时后, 全部裂开。经明胶-戊二醛交联过的胶粒, 即使浸溶时间延长至70小时, 也仅有少数胶粒裂开, 实验结果如表3所示。

表3. K_2HPO_4 溶液对不同强度胶粒的解凝¹情况

解凝情况 不同强度	浸泡时间 (小时)			
		40	48	70
未经交联		半数裂开	全部裂开	崩解
明胶-戊二醛交联		个别裂开	个别裂开	少数裂开

注: 1) 均为未添加增活剂的对照组。

2) 解凝条件为10ml胶粒(约275粒), 浸泡于50ml K_2HPO_4 (6mg/ml) 中。

固定化啤酒酵母经5次麦汁发酵后, 检查胶粒的机械强度情况。由于麦汁中含有磷酸盐等多价阴离子, 与海藻酸钙胶粒中的钙离子作用, 使胶粒部分脱钙, 未经交联的胶粒为乳白色不透明状, 且体积增大, 用手指轻研胶粒。疏松而破裂(表4)。而用明胶-戊二醛交联的胶粒, 经5次发酵后, 胶粒仍为淡黄色半透明状, 体积不增大, 用手指轻研胶粒, 仍有弹性而不破裂。添加增活剂(甾醇1、吐温和不饱和脂酸)各组对机械强度无明显影响(表4)。

表4. 不同强度的固定化啤酒酵母, 经5次麦汁发酵后, 胶粒的弹性情况

弹性情况 不同强度	增活剂	甾醇1 +	甾醇1 +	对 照
		吐 温	不饱和脂酸	
未经交联		++++	++++	++++
明胶-戊二醛交联		+	+	+

注: +++++表示用手指轻研能裂。+表示用手指轻研而不破, 且有弹性

三、添加物对防止固定化酵母泄漏的影响

由于添加物掺入海藻酸钙凝胶中, 很可能引起凝胶内部结构的改变, 尤其是明胶-戊二醛交联, 使胶粒形成更緻密的结构, 提高了它的机械强度(表2、3和4)。为此, 检查了完全培养基中(表5)和发酵液中(表6)酵母细胞从胶粒内泄漏至溶液的情况。在完全培养基中增殖5小时后(表5), 经明胶-戊二醛交联各组的泄漏数(细胞数/ml), 普遍比未交联各组都有明显减少。其中固定化啤酒酵母各组平均泄漏数减少17%; 固定化酒精酵母各组平均泄漏数减少44%。固定化啤酒酵母经5次麦汁发酵, 检查了第5次发酵液中的泄漏情况(表6), 同样证明, 用明胶-戊二醛交联各组的泄漏情况比未交联的好, 交联各组平均泄漏数比未交联各组减少30%。

表5. 固定化酵母在完全培养基中增殖5小时后, 酵母细胞的泄漏情况

不同强度	增 活 剂	甾醇1 +	甾醇1 +	对 照	平 均 值
		吐 温	不饱和脂酸		
啤酒酵母	未经交联	2.15×10^7	2.20×10^7	2.05×10^7	2.13×10^7
	明胶-戊二醛交联	1.70×10^7	1.85×10^7	1.75×10^7	1.77×10^7
酒精酵母	未经交联	1.10×10^7	1.10×10^7	1.05×10^7	1.08×10^7
	明胶-戊二醛交联	6.05×10^6	6.10×10^6	6.05×10^6	6.0×10^6

注: 泄漏数为固定化酵母在增殖期间漏至培养液中的细胞, 经显微镜观察计数而得

表6. 固定化啤酒酵母经5次发酵后, 酵母细胞泄漏的情况

不同强度	增 活 剂	甾醇1 + 吐温	甾醇1 + 不饱和脂肪酸	对 照	平 均 值
	泄漏数(个/ml)				
未 经 交 联		1.75×10^6	1.88×10^6	1.63×10^6	1.75×10^6
明 胶 - 戊 二 醛 交 联		1.25×10^6	1.15×10^6	1.30×10^6	1.23×10^6

注: 泄漏数为第五次发酵后, 残留于发液中的细胞数。

以上结果说明, 凡经明胶-戊二醛交联之后, 无论是在发酵之初(增殖期), 还是在多次(至少5次)发酵之后, 都能使胶粒保持较高的机械强度和致密的网格结构, 使细胞泄漏数大大降低。在这些性能上, 明胶-戊二醛

交联是一种较为理想的增强剂。

表5和表6的结果表明, 增活剂(甾醇1、吐温和不饱和脂肪酸)在防止和减少胶粒中的细胞泄漏至溶液中去, 无明显的作用。

四、对固定化酵母存活率的影响

表7. 添加物对固定化啤酒酵母存活率的影响

添 加 物	5 次 发 酵 的 存 活 率 (%)					平均
	1	2	3	4	5	
对 照	92.3	90.4	93.8	94.9	96.0	93.5
对照+明胶-戊二醛交联	82.8	79.6	83.9	84.7	85.3	83.3
甾醇1+吐温	99.3	99.0	100	100	100	99.7
甾醇1+吐温+明胶-戊二醛交联	87.3	85.7	89.8	87.4	87.8	87.6
甾醇1+不饱和脂肪酸	96.5	95.4	96.3	97.9	100	97.2
甾醇1+不饱和脂肪酸+明胶-戊二醛交联	85.9	83.8	86.3	86.8	87.3	86.0

添加物对固定化啤酒酵母存活率的影响, 用美兰染色法^[3]检查每次发酵后胶粒内细胞的存活率, 连续检查五次, 结果如表7所示。经增强剂——明胶-戊二醛交联处理后, 胶粒内细胞存活率普遍降低, 平均约降低10~12%。这是由于戊二醛对酵母细胞有抑制作用。尽管在交联后用水洗胶粒, 但残留的戊二醛不易洗净, 表7的结果表明, 随着发酵次数增加, 残留的戊二醛逐渐减少, 存活率略有提高。

表7还表明, 添加增活剂——吐温的, 不论交联与否, 其存活率比相应的各组都高, 说明吐温对酵母有明显的增活作用; 当交联时, 吐温有抵消戊二醛抑制的作用。添加甾醇1和不饱和脂肪酸的, 也有增活作用, 但不如添加甾醇1和吐温的大。

五、对发酵速度的影响

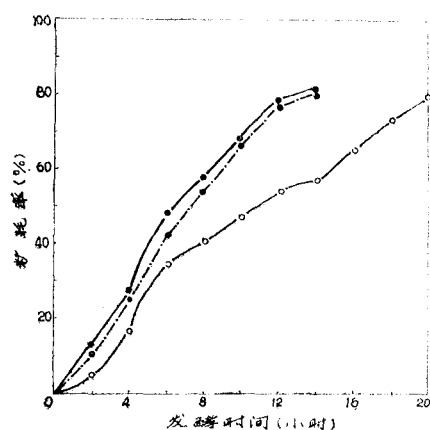


图1. 增活剂对固定啤酒酵母发酵速度的影响

○—○ 对照
○- - -○ 甾醇1 + 吐温
· · · 甾醇1 + 不饱和脂肪酸

1. 增活剂对发酵速度的影响

增活剂(甾醇1、吐温和不饱和脂酸)对固定化啤酒酵母发酵速度(用糖耗率表示)的影响,如图1所示。添加增活剂的两组达到前酵要求(糖耗率64~68%)的发酵时间,比对照组缩短了6个多小时,说明这些添加物都能促进啤酒酵母生长,加快发酵速度。其中,添加吐温的增活作用大于添加不饱和脂酸的。

增活剂对固定化酒精酵母发酵速度的影响,表示在图2。结果表明,这些增活剂同样能促进酒精酵母生长,使发酵速度加快。其中添加吐温的增活效果更好,达到100%糖耗率所需的发酵时间比对照缩短了5个小时;而添加不饱和脂酸的效果比吐温略差些,但比对照有明显的增活作用,达到100%糖耗率所需的发酵时间,比对照缩短了四个小时。

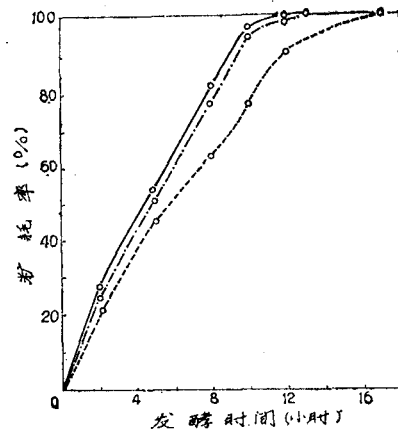


图2. 增活剂对固定化酒精酵母发酵速度的影响

○—○ 对照
 ○—○ 甾醇1+吐温
 ○—○ 甾醇1+不饱和脂酸

增活剂对固定化酒精酵母转化酒精的作用,表示在表8。添加增活剂的两组显示能加

表8. 增活剂对固定化酒精酵母酒 转化率的影响

增 活 剂	时 间 (小时)	酒 精 转 化 率 (%)						
	0	2	5	8	10	12	13	14
对 照	0	16.5	40.0	58.5	67.5	80.0	85.5	100
甾醇1+吐温	0	28.5	47.5	71.5	85.5	100	100	100
甾醇1+不饱和脂酸	0	21.5	44.0	68.0	82.0	95.0	100	100

速酒精转化,其中添加吐温组效果比添加不饱和脂酸组好。达到100%酒精转化率,吐温组比对照组缩短了5个小时;不饱和脂酸组比对照组缩短4个小时。

2. 增强剂和增活剂对发酵速度的影响

用明胶-戊二醛交联固定化酵母胶粒,使胶粒强度大大提高,已如前述(表2、3和4)。然而明胶-戊二醛交联后,因胶粒中的戊二醛不易洗净,残余的戊二醛对酵母有一定的抑制作用,减缓了发酵速度,对啤酒酵母的影响(图3)更甚于酒精酵母(图4)。

为了减弱和消除增强剂的不利影响,同时还加添加了增活剂,收到了预期的效果。图3表示增强剂和增活剂对固定化啤酒酵母发酵速度

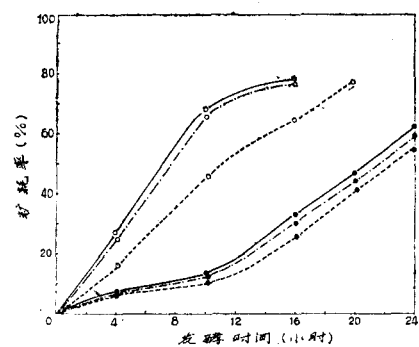


图3. 增强剂和增活剂对固定化啤酒酵母发酵速度的影响

○—○ 对 照
 ○—○ 甾醇1+吐温
 ○—○ 甾醇1+不饱和脂酸
 ···· 对照+明胶-戊二醛
 ···· 甾醇1+吐温+明胶-戊二醛
 ···· 甾醇1+不饱和脂酸+明胶-戊二醛

的影响。用明胶-戊二醛交联的三组,发酵速度大大减慢,与未交联的相应组比较,达到前酵要求,对照组发酵速度慢了近10小时,添加增

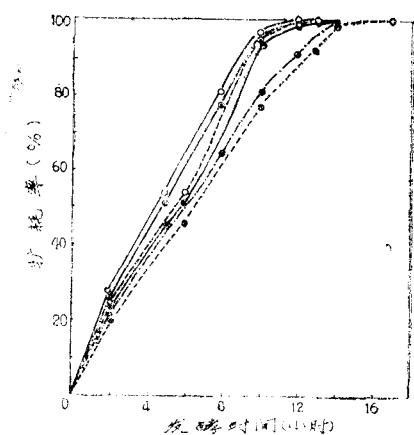


图4. 增强剂和增活剂对固定化酒精酵母发酵速度的影响

- 对 照
- 甾醇1+吐温
- 甾醇1+不饱和醇酸
- 对照+明胶-戊二醛
- 甾醇1+吐温+明胶-戊二醛
- 甾醇1+不饱和脂肪酸+明胶-戊二醛

活剂的两组慢了14个小时多。在交联的三组中,添加增活剂的两组都比对照组发酵速度快1~2小时,其中添加吐温的比添加不饱和脂肪酸的好。以上说明,增活剂确能减轻戊二醛的有害作用。

增强剂对固定化酒精酵母发酵速度的影响(图4),似乎不如啤酒酵母明显,经明胶-戊二醛交联的三组,其发酵速度略低于未交联的相应三组。

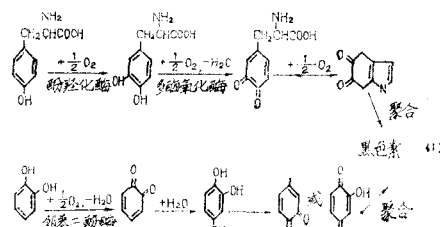
参 考 文 献

- [1] 张晋华等:食品工业科技,5,41-43,1988.
- [2] 袁晓雄:食品科学,10:8-10,81987.
- [3] 无锡轻工业学院等合编:微生物学,轻工版,1985, P.461-465.
- [4] Somogyi, M.: J. Biol. Chem., 195: 19-23, 1952.
- [5] Nelson, N.: J. Biol. Chem., 153: 375-381, 1944.
- [6] 王福荣:白酒生产分析检验,轻工版, pp.34-41.
- [7] Wada, M. et al.: European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 10: 275-287, 1980.
- [8] 杨伯华等:食品与发酵工业,1:14-18,1988.

以基质络合化法防止果蔬酶促褐变的研究

吉林职业师范学院 侯金铎 白宝兰

酶促褐变是果蔬在受到损伤时,组织被暴露于空气中,自身所含有的酚类基质被酚酶所催化与 O_2 发生氧化还原反应而醌式化,再经过一系列的聚合反应而聚合成黑色素的过程。这种使食品色泽变褐的现象给果蔬的贮藏与加工带来十分不利的影响,所以人们对防止酶促褐变方法的研究也极为重视。目前学术界对酶促褐变的机理已经有了清楚的认识,下面是以L-酪氨酸与邻苯二酚为基质的反应模式。



从上述反应过程可以看出,醌式形成之后系列反应就不需要酶促也很少需要氧气了,而