

# 共固定化双菌种发酵海藻酒动力学研究

王宇光<sup>1</sup>,徐 晖<sup>2</sup>,王克明<sup>2</sup>

(1. 烟台大学 化学与生物理工学院, 山东 烟台 264005;  
2. 浙江科技学院 生物与化学工程学系, 浙江 杭州 310012)

**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两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 7 d, 共固定化细胞连续发酵稀释速率 0.12/h 其发酵时间为 0.5 d 左右。经 160 d 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

**中图分类号:** TS261.43      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1671-8798(2003)01-0004-05

海藻中淀粉质含量达 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<sup>[1]</sup>, 海藻具有极高的营养和保健功效, 可用于生产独具特色的保健酒和饮料, 但长期以来未能被有效利用, 造成极大的资源浪费。

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, 延长发酵细胞的寿命, 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, 有利于不同功能的微生物协同作用。采用固定化、共固定化细胞生产酒精、啤酒、果酒及食醋等的研究十分盛行<sup>[2-4]</sup>, 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(*S. cerevisiae*) 12 号、15 号和 29 号, 产香酵母(*S. fragrans*) 8 号均本系生物工程教研室提供。

### 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, 日本进口分装), 海藻酸

---

收稿日期: 2002-11-01

基金项目: 教育部高等学校国家重点实验室访问学者基金资助(FB-C-2000)

作者简介: 王宇光(1977—), 男, 黑龙江通河人, 烟台大学化学与生物理工学院 2001 届毕业生; 王克明(1949—), 男, 辽宁大连人, 教授、博士导师, 主要从事微生物及海洋生物工程方面的教学与研究工作, 本项目负责人。

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,食用酒精由烟台白酒厂购入。

固定化连续发酵反应器为自制的玻璃柱式反应器(直径 4.5 cm,长 18 cm)。

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 24 h,酶水解后调 pH 为 2~3,然后加温至 95 ℃ 维持 7~8 h,最后 2 000 r/min 离心,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% CaCl<sub>2</sub> 的 5% 硼酸液中,制成直径 3 mm 的颗粒,浸泡 4 h,滤出固定化颗粒,以生理盐水洗涤 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 ℃、160 r/min 通气振荡培养 18 h。

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 0.25 g/mL(发酵液),18~20 ℃ 下发酵。

(2)连续发酵:应用玻璃柱式反应器,容积为 280 mL。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<sup>[5]</sup>;酵母细胞浓度采用血球记数板测定<sup>[6]</sup>;酒精浓度采用比色法和蒸馏法测定;氨基酸采用 121 MBAA 分析仪分析(酒液经活性炭脱色,蒸干后用 5% 磺基水杨酸和 pH 2.2 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 2 m,直径 3 mm 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 ℃,N<sub>2</sub> 40 mL/min, Air 1.4 kg/cm<sup>2</sup>; H<sub>2</sub> 1.4 kg/cm<sup>2</sup>,衰减 10<sup>2</sup>×4;条件 II:色谱柱为长 2 m,直径 3 mm 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 N<sub>2</sub> 30 mL/min. Air 300 mL/min, H<sub>2</sub> 30 mL/min. 进样量为 2 μL,根据保留时间与各标样对比定性,内标法定量;矿质元素使用日立 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

2.1 海藻汁的制取

在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备汁液,并测量其氨基酸和矿质元素含量,结果如表 1 所示。

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

												mg/L	
成分	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Pro	Met	Ile	Leu	Tyr
含量 (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
(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
成分	Phe	Lys	His	Arg	Fe	Mn	K	I	Mg	Cu	P	Zn	
含量 (I)	15.2	16.5	13.7	17.1	18.02	0.56	216	20	12.03	1.02	8.22	2.27	
(II)	13.8	14.3	11.2	13.6	18.03	0.56	216	19.8	12.02	1.02	8.21	2.26	

注:(I)酶与酸水解相结合法;(II)酸水解法。



由表 1 的实验结果表明,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酸水解处理海藻制取的汁液,但金属离子含量基本没有差别。

## 2.2 发酵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 号和 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。

由图 1 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两组;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 所示。

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,发酵的海藻酒的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。

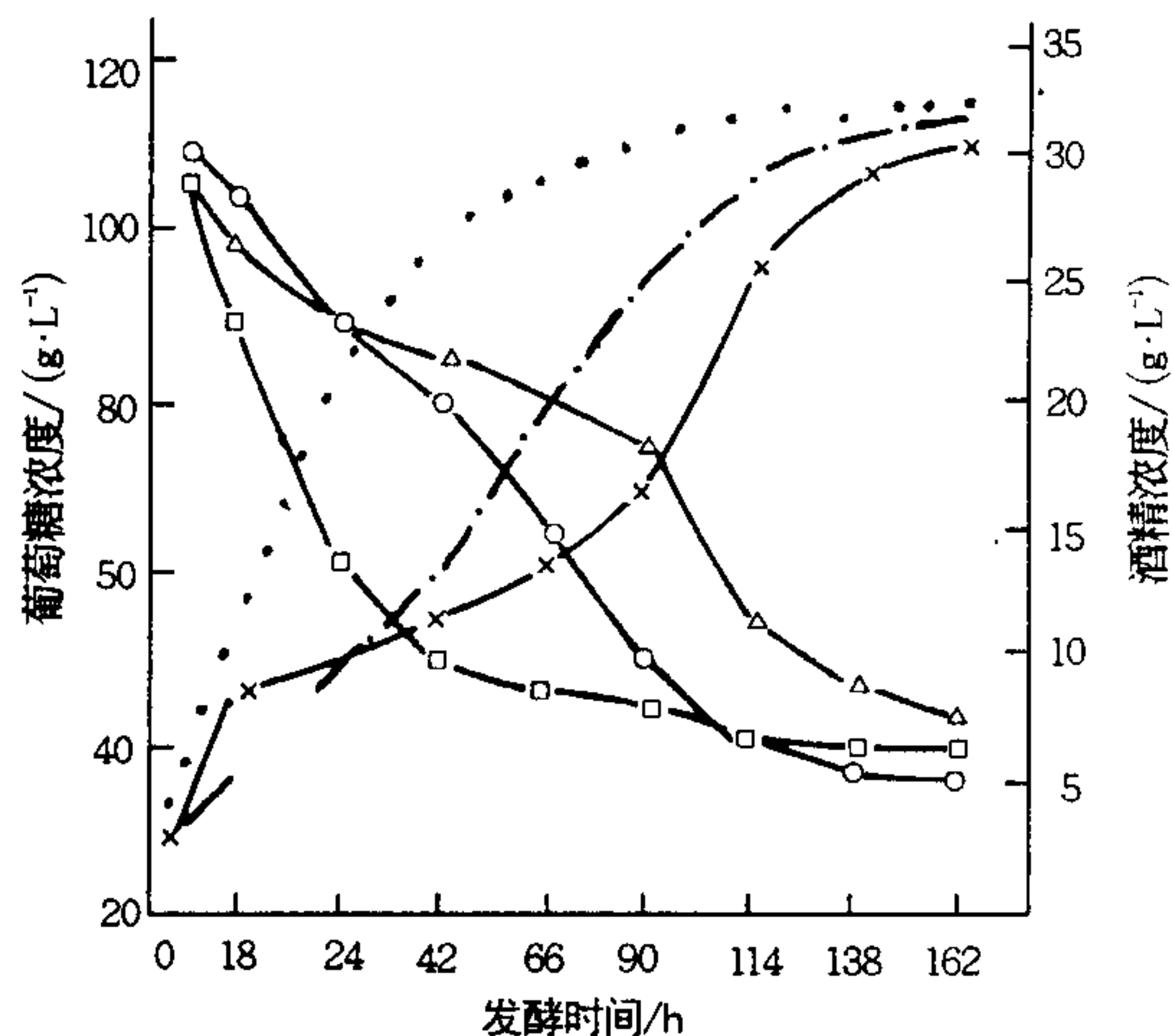


图 1 游离细胞海藻酒发酵试验

○, — · — 12 号菌株和 8 号菌株混合组的产酒率和耗糖量  
□, ..... 15 号菌株和 8 号菌株混合组的产酒率和耗糖量  
△, x—x 29 号菌株和 8 号菌株混合组的产酒率和耗糖量

表 2 酿酒酵母与产香酵母不同菌种量对比对海藻酒品质的影响

mg/L

菌种配比	Propyl alcohol	Amyl alcohol	Iso - amyl alcohol	Iso - butyl alcohol	Etnyl alcohol	Etny lactate	Alcohol /(g · L <sup>-1</sup> )
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,结果见图 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

在共固定化细胞的增殖试验中,实验结果表明,增殖时间以 18~24 h 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

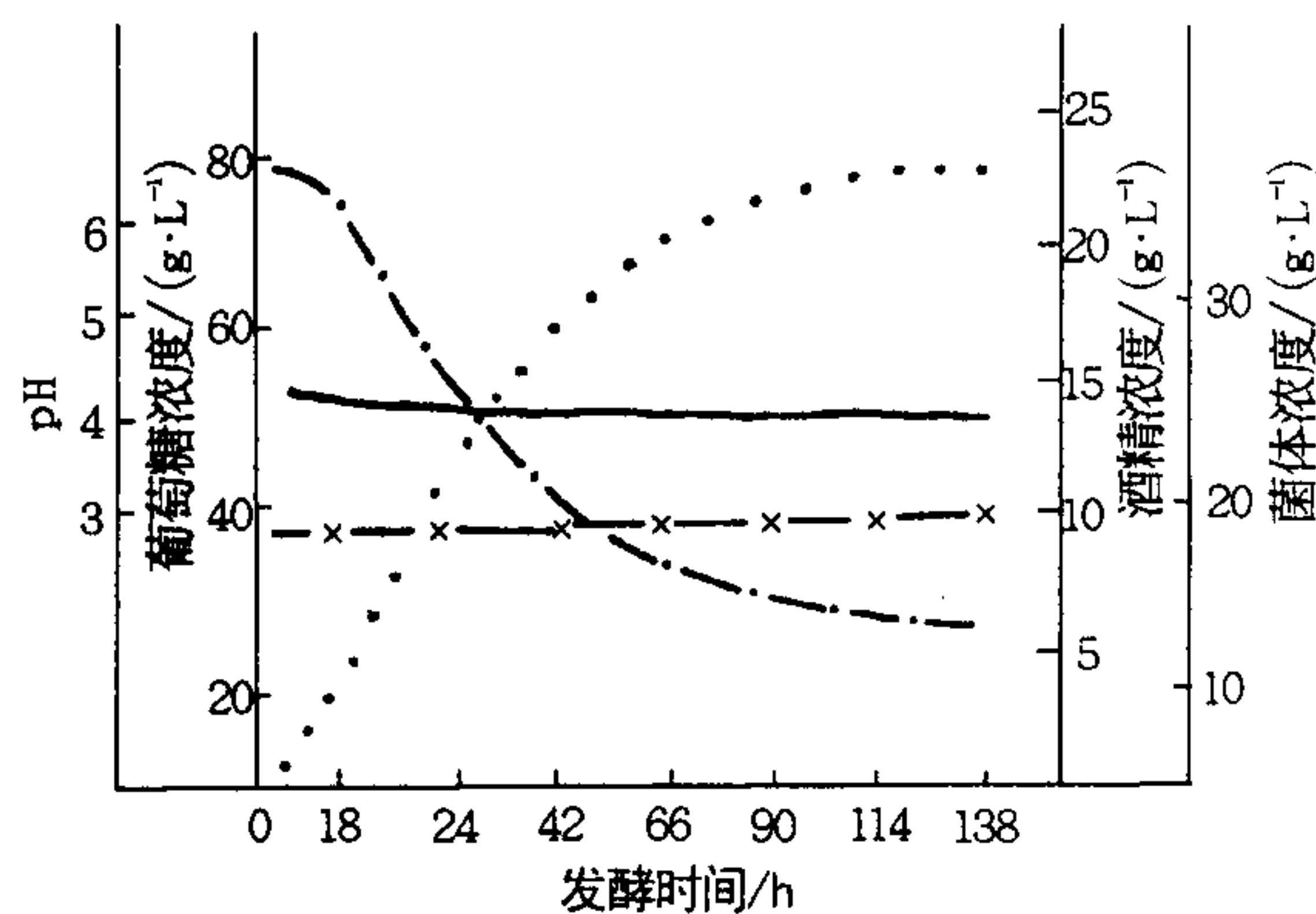


图 2 游离细胞海藻酒分批发酵试验

..... 酒精浓度; — · — 剩余葡萄糖  
x—x 菌体浓度; — pH 值

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 28 h 左右海藻酒发酵完毕,但所得酒香味较淡,而 20℃下经 36 h 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填加量进行分批发酵实验,结果如表 3 所示。

表 3 凝胶粒子填加量对海藻酒品质的影响

温度/℃	凝胶填加量/%	Propyl alcohol	Amyl alcohol	Iso - amyl alcohol	Iso - butyl alcohol	Etnyl acetate	Etnyl lactate	Alcohol /(g · L <sup>-1</sup> )
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,对固定化细胞的糖抑制也予忽略,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。

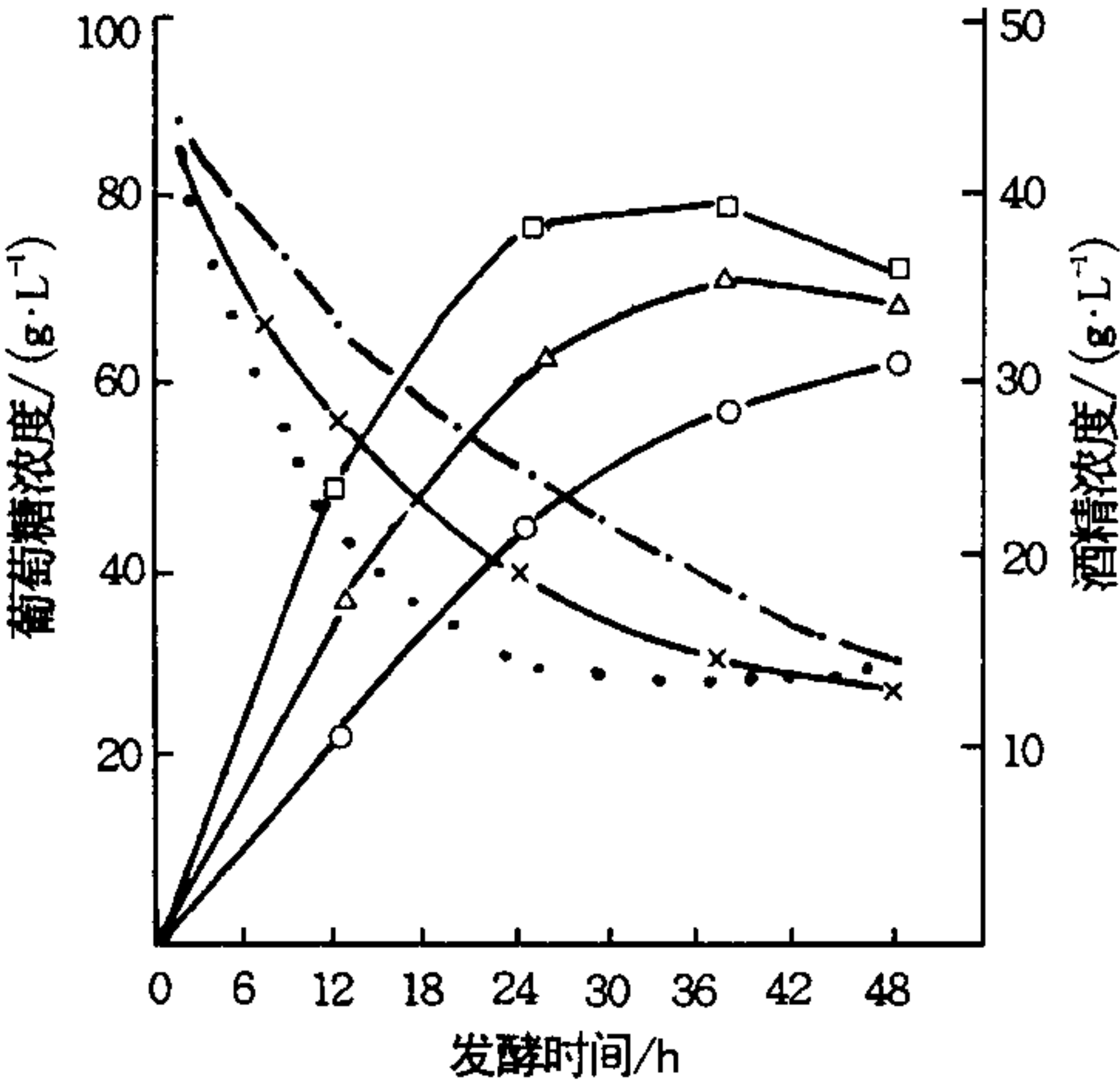


图 3 发酵温度对产酒和耗糖的影响  
○,--- 13℃时产酒率与耗糖量  
□,..... 25℃时产酒率与耗糖量  
△, x—x 20℃时产酒率与耗糖量

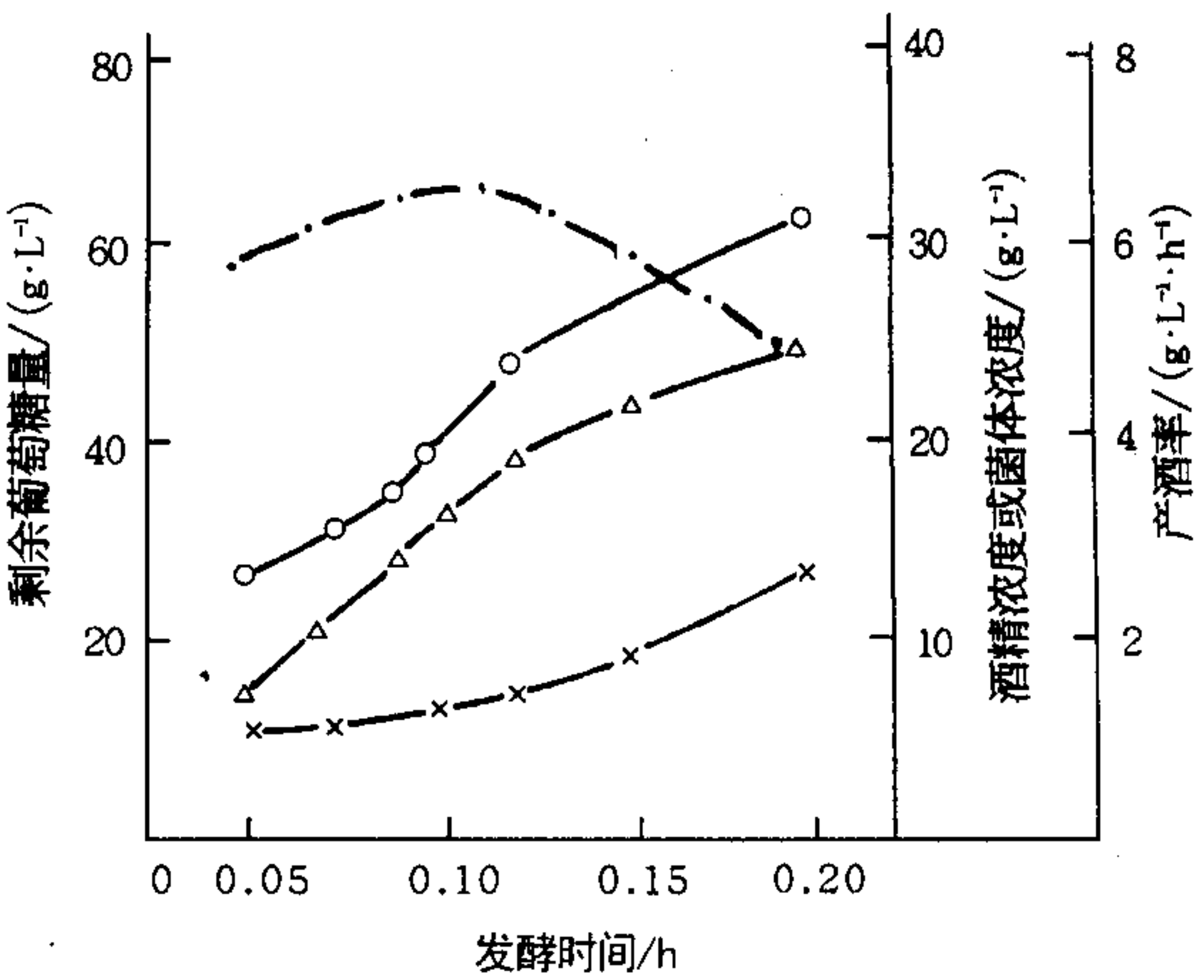


图 4 稀释率对发酵结果的影响  
--- 酒精浓度  
○---○ 剩余葡萄糖量  
△---△ 产酒量  
x—x 菌株浓度

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:

$G = 4.254 \times 10^{-2} \cdot V / \{ 4.245 \ln[101.7 / (101.7 - P_0)] + \ln[32.5 / (32.5 - P_0)] \}$

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质元素十分丰富,而且含有多种醇类和酯类。他们的含量分别为:丙醇为 10.2 mg/L、异丁醇 11.6 mg/L、戊醇为 1.12 mg/L、异戊醇为 39.21 mg/L、乙酸乙酯为 3.08 mg/L、乳酸乙酯为 51.46 mg/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的细胞固定化技术发酵海藻, 酿制海藻酒是可行的。本实验结果表明, 采用固定化工艺酵母活力回收率可达 94.4%, 在共固定化细胞增殖过程中, 增殖时间以 18~24 h 为宜, 此间酵母数量仍在不断增加, 出芽率维持在 12% 以上。由酿酒酵母和产香酵母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, 提高了海藻酒的质量。但两种菌种数量的配比对酒的风味及质量影响很大, 在本实验条件下, 两种菌种的菌量最佳配比为 4:1。在游离细胞的分批发酵过程中不易控制稳定的多菌种配比量, 造成产品质量的波动。应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, 并且可实现连续化生产, 其发酵时间由游离细胞发酵的 7 d 缩短为 0.5 d 左右, 且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。由此可见, 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。采用共固定化双菌种的工艺发酵海藻酒, 在较低温度下进行发酵, 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℃ 合适。从海藻酒的成分分析可以看出, 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 160 d 后, 检查固定化细胞粒子未发现有破损而且 PVA 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[M]. Tokyo: Japan Publications, 1983. 33-51.
- [2] 张治根, 苏尔复, 俞俊棠. 酵母酒精发酵动力学研究[J]. 工业微生物, 1989, (3): 11-18.
- [3] 王克明, 王雪筠. 固定化多菌种发酵海洋饮料的研究[J]. 食品科学, 1995, (8): 27-30.
- [4] 王克明, 王雪筠. 固定化双菌种发酵乙酸的研究[J]. 中国酿造, 1995, (5): 35-37.
- [5] 天津轻工业学院, 无锡轻工学院, 大连轻工学院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1986.
- [6] 李详麟, 金宁人. 固定化酵母发酵酒精动力学研究[J]. 生物工程学报, 1991, 7(3): 265-271.

## Fermentative of seaweed wine by co-immobilized two microorganisms

WANG Yu-gang<sup>1</sup>, XU Hui<sup>2</sup>, WANG Ke-ming<sup>2</sup>

(1. Institute of Chem. and Biol., Yantai University, Yantai 264005, China;

2. Dept. of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China)

**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 show that optimum conditions for the fermentation are: 1. the ratio of *Saccharomyces cerevisiae* and *Sacchromyces 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; two microorganisms; seaweed wine; fermentation kinetics; PVA