

# 固定化酵母细胞流化床反应器的 操作与嫩啤酒双乙酰水平

王运吉 张迺谦 刘金珍 刘茵 刘文堂

(大连轻工业学院, 大连)

利用海藻酸钠固定化酿酒酵母细胞和流化床生物反应器进行介质循环发酵。反应器中固定化胶体最适体积分数( $\phi$ )为0.40(v/v)。在给定固定化胶体体积分数( $\phi=0.40$ ), 给定发酵温度(10℃)和循环比( $n=5$ )的条件下, 研究了循环流速对主发酵周期和对嫩啤酒双乙酰水平的影响。结果表明, 发酵周期随流速的增加而减少, 而双乙酰浓度则随流速的增加而提高。当停留时间 $\tau_r=2.8$ h, 发酵周期 $T(=n\tau_r)$ 为14h, 嫩啤酒中双乙酰浓度为0.5ppm。

**关键词** 酿酒酵母; 流化床; 固定化; 双乙酰

近年来, 为了适应啤酒工业发展的需要, 啤酒发酵工艺有了很大的革新, 其中包括陆续出现的快速发酵、连续发酵新工艺。但啤酒酵母的絮凝性能对连续发酵的影响极为重要, 这一点限制了连续发酵工艺的推广, 应用固定化细胞进行啤酒发酵取得了较好的效果<sup>[1]</sup>。应用固定化酵母发酵啤酒的研究在国内外均有不少例子<sup>[2-6]</sup>。

本文研究了固定化酵母菌种的选择, 流化床生物反应器在介质循环系统中的操作条件及其与双乙酰水平的相关性。

## 材料与 方法

### (一) 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为本院生化实验室保藏菌种, 编号为 $y_1$ 、 $y_2$ 、 $y_3$ 与 $y_4$ (均由啤酒厂收集)。

### (二) 固定化方法

将2%(w/v)的海藻酸钠溶液加热至80—90℃, 30min, 加入经灭菌的 $TiO_2$ 或 $SiO_2$ , 搅匀并冷却至38℃以下, 加入酵母

细胞使混合液细胞密度在 $5 \times 10^7$ 个/ml左右, 在0.5mol/L  $CaCl_2$ 溶液中成型, 浸泡后充分洗涤备用。固定化凝胶珠直径为2—3mm左右。

### (三) 固定化细胞的增殖

在三角瓶内, 按麦汁(11°BX)体积10%(v/v)加固定化凝胶珠, 于15℃下静置或在摇床上培养(152r/min), 直至胶体内细胞密度达 $10^9$ — $10^{10}$ 数量级(个/ml胶体)时为止。

### (四) 流化床生物反应器及介质循环发酵系统

连续循环发酵系统如图1所示。将麦汁贮存在贮器(1)中, 通过微量输液泵(2)将麦汁输入反应器(4)中, 反应器内装一定量固定化酵母胶体(3), 通过反应器的发酵液返回贮器中, 如此连续循环发酵, 直至达到4.0BX时, 发酵终止。参加循环的麦汁量为反应器体积的5倍。反应器上部设排气口与出液口, 并设

本文于1988年9月28日收到。

本院87、88届毕业生赵国庆、孟祥伟、于海奎、史剑飞也参加了部分工作。

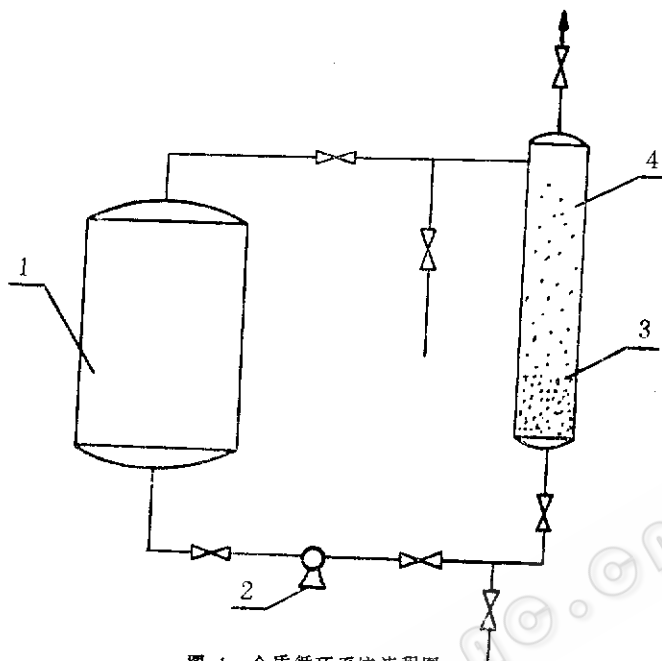


图 1 介质循环系统流程图

Fig. 1 Flowsheet of wort circulating system

1. 贮器 Reservoir      2. 微量输液泵 Mini-peristaltic pump  
3. 固定化细胞床 Immobilized cell bed      4. 生物反应器 Bioreactor

取样口。反应器容积为 0.491L,  $L/D = 10$ 。

### (五) 分析方法

所有分析项目均按[7—9]法进行。

## 结果与讨论

### (一) 菌种选择

啤酒工业评价酵母的主要标准是其对产品质量的影响,故本研究从现用较好的生产菌株中进行选择。由于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,从这一经济要求出发,双乙酰的浓度问题便较突出,因为若经主发酵后 $\alpha$ -乙酰乳酸与双乙酰水平较高,必然对缩短周期有抵消作用。酵母菌种对啤酒中连二酮的含量有重要影响<sup>[1]</sup>。

1. 主发酵双乙酰水平比较:本实验选取了生产中使用的4种菌种,分别编号

为 $y_1$ 、 $y_2$ 、 $y_3$ 和 $y_4$ ,在相同条件下固定化并经增殖后,分别盛装在5000ml三角瓶中,固定化酵母装量分数均为11BX麦汁体积的10%(v/v),在10℃下发酵,并定期测定糖度与双乙酰浓度,均在糖度为4.0BX时结束主发酵,结果如图2所示。

由图2可见,降糖能力的顺序为 $y_4 > y_3 > y_2 > y_1$ ;主发酵液中双乙酰水平的顺序为 $y_1 > y_2$ ,  $y_3 > y_4$ ,  $y_4$ 降糖速率高且双乙酰水平也低。

2. 双乙酰还原能力比较:分别将4种固定化酵母按发酵液体积的0.5%(v/v)添加在各自发酵的嫩啤酒中,在20℃下考察双乙酰还原进程,结果如图3。在25h之前,双乙酰还原速率 $y_2 > y_1 > y_4 > y_3$ ,这种差别也与双乙酰起始浓度有关。可明显看出,除 $y_2$ 与 $y_4$ 外,其余酵母均在25h后还原速率较缓慢,而 $y_1$ 尤其。但是,本结果除起始双乙酰浓度不同外,也没测定

残液中回加水分与标准双乙酰 0.3ppm，分别加固定化酵母在20℃下还原，经 20h 后测定， $y_1$ 、 $y_2$ 、 $y_3$ 与 $y_4$ 还原双乙酰的残余量分别为 0.1615、0.1320、0.1826 与 0.1008ppm。综合上述结果，酵母 $y_4$ 发酵速率高，双乙酰还原能力也强，故以下实验均采用 $y_4$ 酵母。

(二) 生物反应器的操作

1. 固定化酵母装量分数的确定：采用如图 1 的介质循环发酵装置，在固定的体积流量为 10ml/min，10℃ 条件下进行连续循环发酵，循环麦汁的总容积为反应器容积的 5 倍，按反应器体积的 10—50% (v/v) 的固定化胶粒装量，分别测定发酵度达到 4.0BX 时降糖速率。以 10% 装量时的降糖速率为 1.0，求出其他装量时的相对降糖速率，结果见图 4。可见装量分数为 40% (v/v) 时，降糖速率最快。

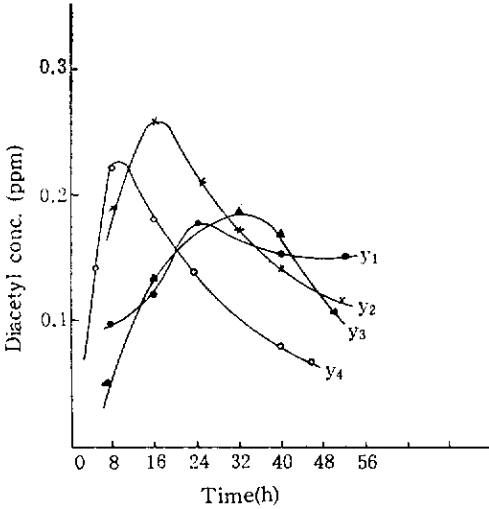


图 2 酵母菌对主发酵过程双乙酰水平的影响  
Fig.2 Influence of yeast strains on the levels of diacetyl during primary fermentation

其 $\alpha$ -乙酰乳酸的生成量，因为乙酰乳酸通过非酶转化为双乙酰，然后再通过酵母细胞酶促还原。

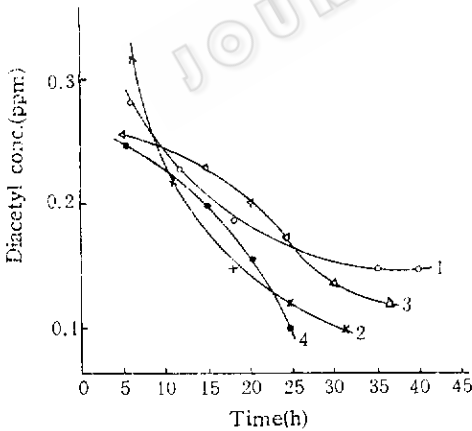


图 3 双乙酰还原进程  
Fig.3 Time course of diacetyl reduction  
Yeast strains: 1.  $y_1$  2.  $y_2$  3.  $y_3$  4.  $y_4$

因本研究未分析乙酰乳酸的含量及其转化，为验证固定化酵母还原双乙酰能力，采用将嫩啤酒经蒸馏除去双乙酰后，在其

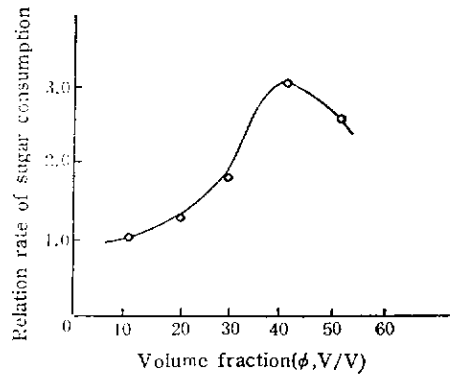


图 4 体积分数与降糖速率的关系  
Fig. 4 Relation between the volume fraction of gel beads and the rate of sugar consumption

2. 体积流速的影响

(1) 体积流速对降糖速率的影响：在固定化胶粒装量分数为 0.40 (v/v)，10℃ 条件下，用 11BX 麦汁进行循环发酵，在流速为 5.0—30ml/min 区间内，分别测定糖度与酒精份，流速与酒精生成速率  $r^A$

关系如图 5 所示。随着流速增大，酒精生成速率提高，随流速继续增大，酒精生成速率趋于一个最大值  $V_m$ 。

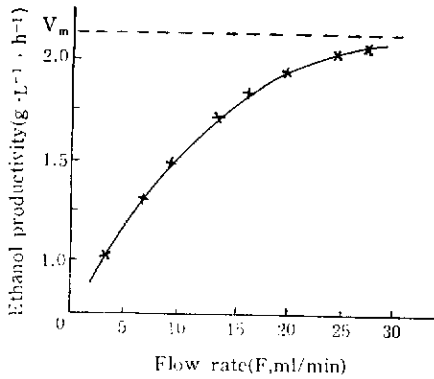


图 5 酒精产率与麦汁流速的关系

Fig. 5 Relation between the flow rates of wort and the productivity of ethanol

(2) 体积流速与总发酵周期的关系：在该操作系统中，各个参数间的关系如下：

$$\tau_r = \frac{V_r}{F} \quad (1)$$

式中  $\tau_r$  发酵液每次通过反应器的停留时间，h

$V_r$  反应器体积，ml  
 $F$  体积流速，ml/min

$$N = \frac{T}{t} \quad (2)$$

式中  $T$  发酵液达到规定糖度时所需的时间，即总循环周期，h

$t$  为全部发酵液在该系统中完成一次循环所需要的时间，h

$N$  在  $T$  周期内发酵液在系统内循环的次数

$$\tau_t = N \tau_r \quad (3)$$

式中  $\tau_t$  发酵液在  $T$  周期内，通过反应器的总停留时间，h

那么总循环周期为

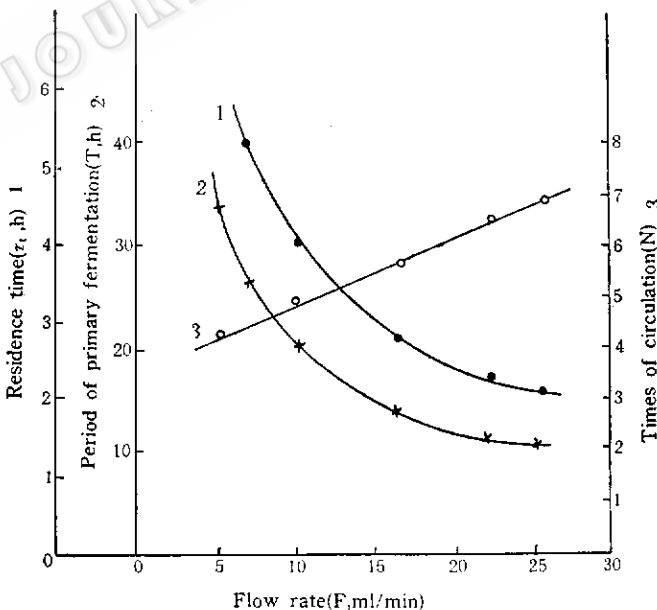


图 6 麦汁流速对主发酵周期的影响

Fig. 6 Effects of the flow rates on the period of primary fermentation

$$T = n \tau_r \quad (4)$$

其中,  $n = V_t / V_r$ ,  $V_t$  为全部发酵液体积 (ml)。本实验  $n = 5$ , 上述参数的关系如图 6 所示。

由上述可见, 可以通过提高流速, 使降糖速率接近最大值, 从而发酵周期 ( $T$ ) 趋于最小。然而在该流化床反应器内是无法实现的, 因为反应器所允许的最大流速是有限度的, 当超过这个限度时, 会因固定化床的膨胀, 胶粒冲出反应器; 同时达到一定流速之后, 其效率的增加是有限的。

### 3; 体积流速对双乙酰水平的影响:

由上述结果可见, 体积流速对降糖速率及

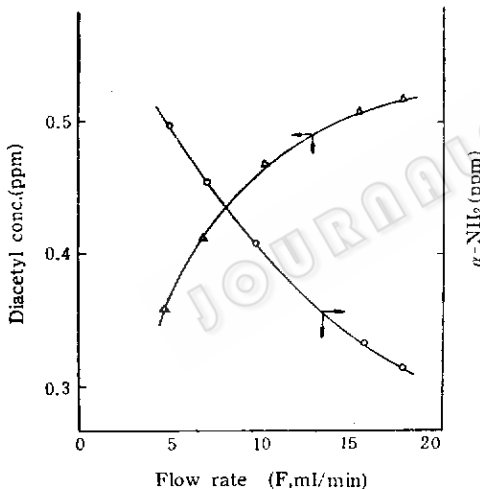


图 7 麦汁流速对双乙酰和  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 水平的影响  
Fig. 7 Influence of the flow rates of wort on the levels of diacetyl and  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>

其他参数有重要影响, 因此本文重点研究了流速对嫩啤酒双乙酰水平的影响, 也顺便考察了对  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 水平的影响。

由图 7 可见, 随流速增高, 嫩啤酒中双乙酰水平提高,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 降低。主要是由于流速增高, 固定化胶粒流化状态佳, 提高了传质效果, 使细胞代谢旺盛所致<sup>[10]</sup>, 因而也缩短了发酵周期。如在  $F = 16 \text{ ml/min}$ ,  $\tau_r = 0.5 \text{ h}$ ,  $\tau_t = 2.8 \text{ h}$  时, 总发酵周期  $T = 14 \text{ h}$ , 双乙酰浓度为  $0.5200 \text{ ppm}$ 。

## 结 论

根据上述研究可得到以下几点结论:

1. 在该介质循环发酵系统中, 流化床固定化胶粒装量分数为  $0.4 (v/v)$  时, 胶粒流化状态好, 反应器效率最高。
2. 提高流速改善流化状态, 使降糖速率 (或酒精生成速率) 提高。
3. 在该系统中, 麦汁流速是影响  $\tau_r$ 、 $\tau_t$  与  $T$  等参数的关键因素。
4. 由于麦汁流速影响了反应器内固定化颗粒的流化状态, 因此, 它对嫩啤酒的双乙酰水平有重要影响, 同时随着流速提高,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 水平降低, 这一点与有关报道一致<sup>[4,5]</sup>。

影响双乙酰水平的因素很多; 针对啤酒生产而言, 生物反应器操作的优劣除其生产效率而外, 对啤酒质量的影响是最根本的判断标准, 这一点有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 戴仁泽编著: 啤酒发酵进展, 轻工业出版社, 北京, p. 61—91, 1985。
- [2] 居乃就: 应用微生物, (4): 23, 1983。
- [3] 居乃就: 食品与发酵工业, (2): 17, 1986。
- [4] Ryder, D.S. et al.: *ASBC Journal*, 43: (2), 66, 1985。
- [5] Onaka, T. et al.: *Bio. Technol.*, 3: (3) 346—470, 1985。
- [6] 王伯飞等: 工业微生物, (1): 1—6, 1987。
- [7] 管敦仪: 啤酒工业手册, 轻工业出版社, 北京, 上册, p. 427, 1982。
- [8] 中华人民共和国轻工业部标准 (修订初稿): 酒及实验方法, p. 2—4, 1976。

[9] 管敦仪：啤酒工业手册，轻工业出版社，北京，中册，，p.234,1982.

[10] Живирблянская, А.Ю. et al. (曹清华等译)：啤酒酵母，饮料与发酵科技增刊，p.50,1987.

## OPERATION OF FLUIDIZED-BED BIOREACTOR CONTAINING IMMOBILIZED YEAST CELLS AND DIACETYL LEVELS IN GREEN BEER

Wang Yunji Zhang Naiqian Liu Jinzhen Liu Yin Liu Wentang  
(*Dalian Institute of Light Industry, Dalian*)

A fluidized-bed bioreactor containing yeast cells immobilized on calcium alginate gel was operated by using a circulating wort system. The optimum volume fraction of gel beads was found to be 0.40 ( $\phi$ , v/v) for fermentation. Under the following conditions, the volume fraction of gel beads at  $\phi=0.40$ , the fermentation temperature at 10°C and the ratio of circulation at  $n=5$ , the effects of the flow rates of wort on the period of primary fermentation and diacetyl levels in green beer were studied. Experimental results has indicated that the period of primary fermentation decreased with increasing the flow rate of wort, whereas the concentration of diacetyl increased with increasing the flow rate of wort. The period of primary fermentation and the concentration of diacetyl were found to be 14 h and 0.5 ppm respectively, when the residence time in the reactor ( $\tau_r$ ) was 2.8h.

### Key words

Brewer's yeast; fluidized bed; immobilization; diacetyl