

固定化细胞技术在调味品生产中的应用研究

王建龙 钱易

(清华大学环境工程系 北京 100084)

【摘要】固定化细胞技术在调味品生产中应用研究十分广泛,包括酱油发酵、酿醋、谷氨酸(味素)发酵以及香味剂生产等,与游离细胞相比,固定化细胞的主要优点是提高生产能力,在连续发酵过程中尤其如此。本文综合评述了固定化细胞在调味品生产领域中的应用研究及最新进展。

关键词:固定化细胞 发酵 调味品 酱油 醋 谷氨酸 调味剂

0 前言

固定化细胞是指用物理方法或化学方法限制或定位在某一特定空间范围内的,保留了其固有的催化活性和存活力的(如果可能和需要),可被重复地,连续地使用的细胞。

固定化细胞与游离细胞相比,具有许多优点:

- 1) 提高对热、pH 值的稳定性,对抑制剂的敏感性下降;
- 2) 能较长时间地反复使用,提高了使用效率;
- 3) 能在高稀释率下操作而不产生流失现象;
- 4) 固定化细胞的密度增加,使反应速率加快,从而提高了生产能力;
- 5) 固定化细胞体系适合于连续化、自动化过程,且过程易于控制;
- 6) 反应产物易于底物分离,简化了提取工艺,降低了生产成本。

因此,固定化细胞技术作为生物工程领域中的一项新兴技术,在食品与发酵工业、化学工业、医药工业、环境保护、能源开发等各个领域具有明显的应用价值和潜力。

近年来,固定化细胞技术在调味品生产中也得到了广泛的研究,如酱油发酵、酿醋、谷氨酸发酵、香味剂生产等。本文就固定化细胞技术在这一领域中的应用研究及最新进展进行综合评述。

1 酱油生产

传统工艺生产酱油,质优味美,但生产用期长达半年至一年。因而,采用现代生物工程技术,特别是固定化细胞技术,缩短生产用期,改善酱油的风味,速酿优质酱油,是一个十分活跃的研究领域。

日本的 Osaki 等人首先对利用固定化细胞生产酱油进行了研究。他们以海藻酸钙为载体,包埋固定化 *Pediococcus halophilus*, *Saccharomyces rouxii* 和 *Torulopsis Versatilis* 细胞,用于连续生产酱油。反应器为 280 升柱式反应器,连续运行时间长达 80 天。结果表明:酱油生产时间(包括酶水解和酱油后酿阶段)缩短为 2 周。通过热加工处理和过滤,产品的组份接近于标准酱油,仅仅在柠檬酸、总氮和氯化钠含量上稍有差别。然而,产品的芳香型与传统的酱油有些不同。Hamada 等人研究了在气升式反应器内,利用海藻酸

钙凝胶包埋固定化 *Zygosaccharomyces rouxii* (对于形成酱油芳香型最主要的酵母菌)连续发酵生产酱油。通过优化发酵参数,如供气量、pH 值、温度等,他们得到了具有与传统酱油芳香型相似的产品。然而,由于海藻酸钙载体的强度问题以及在高盐浓度下可能受到损坏,以海藻酸钙为载体固定化细胞用于长期连续发酵生产酱油似乎不太可能。Horitsu 等人提出了一种利用固定化酵母生产酱油的新工艺。他们以纤细的圆柱状陶瓷为载体,固定化 *Z. rouxii* 和 *Candida versatilis* 细胞。两个反应器串联运行(第一级反应器含固定化 *Z. rouxii* 细胞,第二级反应器含固定化 *C. versatilis* 细胞),用于连续发酵生产酱油。结果表明:产品成份与工业酱油相同,且感官评价很好。并且总的发酵时间缩短至 8 天。随后,他们又以陶瓷颗粒为载体,代替圆柱状陶瓷,进行发酵试验,将反应时间进一步缩短至 6 天,而产品的质量却没有任何区别。

Iwasaki 等人比较研究了上述三种固定化细胞体系(海藻酸钙凝胶,圆柱状陶瓷和陶瓷颗粒)在分批发酵过程中的性能。结果表明:三种固定化细胞的产乙酸能力大致相同,分别为 5.2, 5.3 和 4.8 kg/m³·d, 高于游离细胞的 0.5—1.0 kg/m³·d。

Iwasaki 等人又研究了一种新的酱油生产工艺。他们将细胞截留在一个膜生化反应器中(搅拌罐反应器与超滤装置相结合)。结果表明:通过膜装置连续移去发酵产品,提高了生产能力。这个反应体系对于酱油发酵过程中产乙酸能力性能良好。乙酸生产速率达 0.78—1.23 g/l·h, 而游离细胞和固定化细胞在分批反应装置内的乙酸生产速率分别为 0.02—0.05 g/l·h 和 0.20—0.22 g/l·h。

国内,黑龙江应用微生物所、北京食品酿造所等单位也相继开展了固定化细胞生产酱油的工作。哈尔滨酿造二厂与黑龙江省应用

微生物所合作,研究成功多孔质载体固定化酵母应用于酱油发酵。邱怀广等人采用强度高,使用寿命长的复合载体,包埋固定化鲁氏酵母 (*Saccharomyces rouxii*) 球拟酵母 (*Torulopsis*) 和链球菌细胞,以低盐固态发酵酱油为底物进行短期后酵陈酿,使产品乙酸达 0.80%(W/V) 以上,风味明显提高。

2 酿醋

酿醋是固定化细胞技术最古老的应用。

最早的固定化可以追溯到古代,人们在酿造工业中添加各种固形物,使微生物附着在其表面,以提高微生物的酿造效果。18 世纪,人们发明的“快速工艺”或“滴滤工艺”是基于将产生粘液的醋酸菌吸附在山毛榉木屑上。这种工艺的主要缺点是在载体上会形成厚厚的粘液层,妨碍了氧的扩散,从而降低了生产速率。深层酿醋工艺通过改善供氧,提高了生产能力,从而取代了这种陈旧的生产方式。现代的固定化技术为改进这种传统工艺,使之再生带来了希望。

近年来,利用固定化细胞技术酿醋的研究领域日趋活跃。在大多数情况下,都获得了较高的生产速率(>3g/l·h),且操作稳定性良好,但醋酸的最大浓度却较低(<75g/l)。其主要原因可能是由于固定化细胞内供氧不足引起的。最近, Sun 等人通过三相流化床生化反应器的理论计算也说明了这一点。他们认为,在所有稀释率条件下,反应器内氧气转移系数最佳。最后提出,通过优化反应器中的固定化细胞的加入量(可能为 10—20%)和凝胶颗粒尺寸(直径约 0.5mm),可以使包埋固定化微生物应用于酿醋的实际过程。Sueki 等人利用多孔陶瓷载体吸附固定 *Acetobacter aceto.* 细胞相比,生产能力提高 3 倍。

Pusheva 等人最近提出了利用固定化嗜热细菌 *Acetogenium Rivui*, 在高温条件下(65℃),从 H₂ 和 CO₂ 合成醋酸。但生产速率和最大醋酸浓度均较低,有待于进一步提高。

固定化细胞酿醋的研究也得到了国内酿醋行业的重视。80 年代初,已有实验室研究报道。1987 年以来,大连轻工学院、上海市酿造科学研究所、北京市食品酿造研究所等单位相继进行过小试研究,并通过鉴定。另据报道,天津调味品研究所用固定化醋酸菌生产食品,上海市酿造所用固定化酵母菌及醋酸菌生产食醋,酒精转化率稳定在 80—90%,乙酸生产能力达 4.77g/l.h 醋酸转化率达 80% 以上。广西柳州市登峰生物工程研究所研究开发的细胞固定化快速酿醋新工艺被国家科委列为重点科技成果推广项目。该工艺具有简化工艺,缩短发酵周期,减轻劳动者强度,节省能耗等优点且醋基纯正,经勾兑调制后能保持原有固体醋的色香味特点。

总之固定化细胞技术以其发酵速度快,设备利用率高,便于实现机械化生产等优点,得到了国内外酿醋行业的重视,文献报道也较多,现择主要者列表总结于表 1 所示。

表 1 固定化细胞生产醋酸

固定化载体	醋酸 生产速率 (g, l. h)	醋酸浓度 (g/l)	稳 定 运行时间 (天)
海藻酸钙	7.2	45	10
卡拉胶	4.0	45	460
卡拉胶	6.0	31.9	170
二氧化钛水合物	5.0	69	61
脱乙酰壳聚糖	9.3	33	52
中空纤维	0.2	3.0	30
多孔陶瓷	4.55	3.4	270
多孔陶瓷	1.69	81	50
多孔陶瓷	6.5	53	100
蜂窝状陶瓷	4.37	39.3	30
绵状纤维	2.6	7.5	—
棉布	13.6	46	150

3 谷氨酸生产

味素是谷氨酸钠盐,目前世界年产量在 35 万吨以上,约占氨基酸总产量的 64%

从葡萄糖合成谷氨酸,需要经过 EMP (Embden — Meyerhof — Parnas) 途经和 (TCA (Tricarboxylic acid) 循环。因此,固定化细胞的供氧问题是影响生产速率的重要因素。

翁清清等人用卡拉胶固定化谷氨酸产生菌 T6—13,进行增殖培养后用于发酵生产谷氨酸结果表明:固定化细胞的热稳定性和 pH 值稳定性均高于游离细胞。Slowinski 等人用聚丙烯酰胺包埋 *Pseudomonas Putida* 细胞生产 L—谷氨酸。Fukushima 等人用海藻酸钙凝胶包埋含耐热和耐热性的谷氨酰胺的酵母菌细胞,在酱油发酵中,用于转化谷氨酰胺生成谷氨酸。为防止杂菌污染,培养基中含 12% NaCl。结果表明:在 40℃ 下,固定化酶的半衰期长达 310 天。

Lu 等人利用海藻酸钙凝胶包埋固定化 *Breuibacterium ammoniagenes* 细胞生产谷氨酸。他们利用限制氮源来控制细胞生长并防止其泄落到发酵液中。结果表明:固定化细胞的生产能力为游离细胞的 42%。包埋固定在颗粒中央部位的细胞,由于缺氧导致细胞退化,使得固定化细胞稳定性下降。Li 等人和 Henkel 等人分别利用 *Euchema* 凝胶和烧结多孔玻璃固定化 *C. glutamicum* 生产谷氨酸。他们通过限制生物素来控制细胞生长,并且优化了 L—谷氨酸的生产条件。由于固定化细胞供氧不足,导致副产物乳酸的生成。Ohbona 等人为了改善包埋细胞的供氧状况,利用直径为 500μm 的海藻酸钙微凝胶颗粒固定化细胞。结果表明:包埋在微凝胶颗粒内的谷氨酸和谷氨酰胺生产速率均高于游离细胞和包埋在直径为 3mm 凝胶颗粒内的细胞。他们还发现进一步减小颗粒的尺寸,供氧状况会得到更好的改善。但颗粒太小,会导致固定化细胞与培养基分离困难。

固定化细胞生产谷氨酸总结于表 2。

表2 固定化细胞生产谷氨酸

原 料	酶或微生物细胞	固定化载体
谷氨酰胺 葡萄糖	酵母菌	海藻酸钙
	T6—3 谷氨酸产生菌	卡拉胶
	<i>Pseudomonas putida</i>	聚丙烯酰胺
	<i>Breribacterium ammoniagenes</i>	海藻酸钙
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	卡拉胶
		多孔玻璃
		海藻酸锶

4 其它

4.1 香味剂

Candida versatilis 细胞能产生酚类化合物,如 4—乙基愈创木酚(4—乙基邻甲氧基苯酚,简称 4—EG)和 4—乙基酚。这些物质能增添酱油的风味。酱油中 4—EG 的最适含量为 1—3ppm。Hamada 等人利用海藻酸钙凝胶固定化耐盐性的假丝酵母菌 *Candida versatilis*,用于在气升式反应器中连续生产 4—EG,并且优化了生产条件。结果表明:当停留时间为 5~28h 时,能产生大量的 4—EG(>20ppm),当停留时间缩短为 0.5h 时,4—EG 的浓度为 1—3ppm。连续稳定生产可达 40 天。因此,他们认为利用固定化细胞技术是生产 4—EG 的有效方法。他们还分别利用固定化细胞和游离细胞生产 4—EG,研究了固定化细胞和泄露到培养基中的游离细胞对 4—EG 生产所作的贡献。结果表明:固定化细胞和游离细胞所生产的 4—EG 分别占 80%和 20%,然而,固定化细胞和游离细胞生产 4—EG 的速率却几乎相同。

Rossi 等研究了利用固定化 *Streptococcus diacetylactis* 细胞在奶酪发酵过程中产生双乙酰和乙偶姻(3—羟基丁酮),以改善奶酪的香味。Cavin 等人研究了利用固定化丙酸菌 *Propionibacterium* sp. 在奶酪连续发酵

过程中产生香味物质(双乙酰、乙偶姻和脂肪酸)。Takahashi 等人研究了利用纤维状海藻酸凝胶固定化 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 细胞,生产双乙酰。结果表明:固定化细胞与游离细胞的双乙酰生产能力几乎相同。但是固定在海藻酸钙颗粒中的细胞生产的双乙酰仅为游离细胞的一半。在重复分批发酵过程中,固定在纤维状凝胶内细胞生产双乙酰的能力迅速下降,至第 6 批次时,双乙酰产量下降的原因是由于细胞产生的过氧化氢积累,从而对微生物产生不良影响所致。为了解决这个问题他们将 *L. lactis* subsp. *diacetylactis* 细胞与均浆牛肝(含过氧化氢酶)联合包埋固定化,从而得到了高浓度双乙酰(>30mg/l),并且在 10 批次重复批次发酵后,双乙酰生产能力没有下降。Schmitt 等人研究了连续培养过程中,游离的和固定 *L. lactis* subsp. *diacetylactis* 细胞对柠檬酸的生物转化作用。

2,3—丁烯二醇是乙偶姻和双乙酰的前体物质,*Klebsiella oxytoca* 能利用葡萄糖产生 2,3—丁烯二醇,但以乳糖为底物时,则主要形成乙酸。为了转化用糖为 2,3—丁烯二醇,Champluvier 等人将含 β -半乳糖苷酶的 *Kluyveromyces fragilis* 细胞与 *Klebsiella oxytoca* 细胞联合吸附固定在玻璃棉上,用于连续转化乳酸生成 2,3—丁烯二醇。过程稳定运行达 25 天。2,3—丁烯二醇的生产能力与利用葡萄糖为底物时相同。比利用纯 *Klebsiella oxytoca* 培养时高 10—100 倍。

4.2 辣椒素

由于植物细胞生长缓慢,且生产过程不稳定。因此,固定化细胞技术为利用植物细胞生产代谢产物提供了方便。

Capsaicin(辣椒素),是一种用于食品中增添辣味的重要添加剂,由青辣椒(*Capsicum* spp)产生。Lindsey 等人利用固定化 *Capsicum frutescens* 和 Mill. Cv. *annuum* 细

(下转第 30 页)

表 1 样品溶液中氯化钠测定的重现性

组 分	测定结果(mg/100ml)						标准偏差	相对偏差(%)
	1	2	3	4	5	平均值		
氯化钠	15.06	14.95	15.01	14.90	15.04	14.99	0.066	0.44

表 2 回收试验结果

组 分	样品含量 (mg/100ml)	添加量 (mg/100ml)	测得总量 (mg/100ml)	回收率 (%)
氯化钠	14.99	3.6	18.61	100.6
	14.99	7.8	22.75	99.5
	14.99	15.1	29.59	96.7

2.6 调味品中氯化钠含量测定

试验选择了几种调味品,按前述方法制成样品溶液,用本法进行分析测定,图 4 为食醋稀释溶液的分离色谱图。测定结果见表 3。

2.7 结论

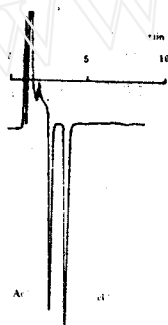


图 4 食醋稀释液的分离色谱图

本法可用于各类调味品中的食盐含量测定或饮料等食品中的氯离子含量测定。本方

法也可用于样品中的亚硝酸根、硝酸根和碘离子等无机阴离子的含量测定。测定结果准确、可靠,方法简便快速。

表 3 调味品中食盐含量测定结果

样品	酱油 1 [#]	酱油 2 [#]	食醋	面酱 (%)
组分				
食盐 (g/100ml)	14.99	22.37	3.1	7.6

参 考 文 献

1. 王瑛等. 调味品加工与检验, 上海科学技术出版社, 60~63, 1987
2. 冯俊贤等. 中国调味品, 4:26, 1994
3. 毛顺聪等. 分析测试学报, 11(3):83, 1992
4. 于泓等. 色谱, 11(2):109, 1993

(上接第 5 页)

胞培养物,生产辣椒素。结果表明:与游离的悬浮细胞相比,辣椒素的产量提高了几倍。Johnson 等人在研究培养固定化 *Capsicum annuum* 细胞生产辣椒素时,在培养基中添加凝胶多糖和黄原胶等物质来诱发辣椒素的生产。

4.3 咖啡因

咖啡因是可乐饮料的添加剂, Furuya 等人报道了利用聚氨酯泡沫固定化 *Coffea arabica* 细胞长期半连续生产咖啡因。

4.4 色素

Naakjima 等人研究了利用固定化 *Lavendula vera* 细胞生产色素,考察了碳源

对色素生产的影响。结果表明:葡萄糖优于蔗糖。他们还研究了固定化植物细胞连续生产蓝色色素,10 天后产量达最大值,然后可继续稳定运行 10 天。Somonoto 等人利用固定化植物细胞连续生产蓝色色素,并对色素的特性进行了研究。

综上所述,固定化细胞技术在调味品生产领域中的应用研究十分广泛。随着固定化技术的不断完善和新型的固定化细胞生化反应器的研制和开发,这项新的技术必将向工业化实用方向迈进,在实际生产中获得应用。

参考文献 46 篇(略)