

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0259 - 05

用固定化生长微生物细胞改善氨基酸调味液品质

汪 钊, 郑裕国, 王春花

(浙江工业大学 生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310014)

摘 要 :利用固定化生长的酵母细胞和黑曲霉菌丝体,对酸法水解的氨基酸水解液进行发酵,除去水解液异臭味,使调味液的口味和风味得到明显改善,产品既有氨基酸调味液的特点,又具有酱油的风味。

关键词 :固定化生长微生物细胞 ; 氨基酸调味液 ; 酵母 ; 黑曲霉

中图分类号 :TS 264

文献标识码 :A

Improvement of the Quality of Amino Acid Liquid Seasoning by the Immobilized Growing Microbial Cells

WANG Zhao, ZHENG Yu-guo, WANG Chun-hua

(Department of Food Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract : The immobilized growing yeast cells and *Aspergillus niger* mycelin were used in the fermentation of amino acid liquid seasoning. After the fermentation, the flavour and taste of the amino acid liquid seasoning were obviously improved.

Key words : Immobilized growing microbial cells ; amino acid liquid seasoning ; yeast ; *Aspergillus niger*

酱油作为我国传统调味料,深受人们的喜爱,传统酱油风味优美,口味浓厚。然而,传统工艺存在生产周期长、成本高、效率低,总氮利用率低、氨基氮游离率低的缺陷,为了解决这些问题,酱油制造工艺从最早的自然发酵、高盐固态发酵、无盐固态发酵,发展到现在的低盐固态发酵、高稀发酵及欧美等国家采用的盐酸水解法生产氨基酸调味液(又称化学酱油)。国内对氨基酸调味液的研究,近年来报道较多^[1~3],由于盐酸水解的氨基酸液腥臭味很浓,所以改善风味是研究氨基酸调味液的重要课题之一,鉴于人们的习惯,常把氨基酸液酱油化,各国一般采用物理或化学处理。王荣民等人对氨基酸液

加游离酵母和酱油曲来改善其风味^[4],许多研究者用固定化细胞改善酱油风味,缩短发酵周期^[5~8],但是利用固定化细胞技术改善氨基酸液的风味,在国内尚未见报导。作者利用酵母、曲霉的细胞共固定化技术改善氨基酸液的风味,去除异味,制得风味较好的调味料。

1 材料与方法

1.1 原料

豆粕 :杭州酿造厂提供,蛋白质质量分数为 42.9% 小麦 :宁波酿造厂提供,蛋白质质量分数为 14.1% 麸皮 :东南面粉厂提供,蛋白质质量分数为

收稿日期 :2001 - 12 - 07 ; 修订日期 :2002 - 03 - 06.

作者简介 :汪钊(1960 -),男,北京人,工学学士,副教授。

万方数据

12.4% 海藻酸钠 :上海化学试剂厂提供.

1.2 菌种

酱油酵母 :浙江工业大学食品系保存菌种 ;黑曲霉 :浙江工业大学食品系保存菌种.

1.3 培养基

酱油酵母斜面培养基 :麦芽汁琼脂培养基 ;黑曲霉斜面培养基 :查氏培养基 ;黑曲霉扩大培养基 :麸皮、米渣培养基 ;酵母、曲霉增殖培养基 :8% 麦芽汁培养基,自然 pH,110 ℃、20 min 灭菌.

1.4 分析方法

还原糖 :亚铁氰化钾法^[9] ;细胞数 :用磷酸盐溶解固定化细胞凝胶颗粒,用血球计数板测定 ;酒精 :比重计法 ;总酸 :氢氧化钠中和法^[9] ;氨基氮 :甲醛法^[9] ;游离氨基酸 :Waters 高效液相色谱法.

1.5 实验方法

1.5.1 酸水解液的制备 将豆粕、小麦原料加入一定量盐酸,在温度水浴中水解 24 h,取出冷却到 30 ℃以下,加碱中和至 pH 5.4,过滤,定容到一定体积,即得酸水解液.

1.5.2 固定化细胞的制备 将 2% 海藻酸钠水溶液 100 ℃灭菌 20 min,冷却到室温,加入细胞和孢子悬液,混合均匀,用吸管滴入 10% CaCl₂ 溶液中,在 4 ℃硬化 10 h,用无菌水洗净,即得固定化细胞或孢子凝胶颗粒.

1.5.3 固定化细胞的增殖培养 将固定化细胞或孢子加入 8% 的麦芽汁,然后在摇床上 30 ℃振荡培养 24 ~ 48 h.

1.5.4 固定化细胞氨基酸水解液的发酵 在 1 L 酸水解液中加入固定化生长的酵母和黑曲霉细胞,进行发酵,酵母发酵温度为 30 ℃,曲霉发酵温度为 35 ℃.共固定化生长的酵母和曲霉细胞进行发酵,温度为 36 ℃.

2 结果与讨论

2.1 不同菌种及其生理状态的初步选择

豆粕酸水解液中虽然氨基酸含量较高,但酸水解后会产生异臭味,据报导主要是蛋氨酸等含硫氨基酸分解产生二甲硫醚^[4],呋喃甲醛等,酸水解液还缺少传统酱油多菌种发酵产生的许多风味物质,如醇、酯、有机酸等.因此可以用酵母发酵产生各种风味物质,增强产品的风味.酵母发酵时产生的二氧化碳也可以将一部分易挥发的异味物质排出.另外利用黑曲霉菌丰富的酶系,特别是葡萄糖氧化酶,使水解液中的异味物质氧化被除去.

作者用游离的、固定化的黑曲霉孢子和菌丝体及游离的和固定化的酱油酵母对酸水解液进行发酵试验,通过感官评定,结果见表 1.

表 1 固定化细胞对酸水解液处理效果比较					
母		固定化黑曲霉		游离黑曲霉	
游离细胞	固定化细胞	孢子	菌丝体	孢子	菌丝体
	风味较好	腥味较重	腥味除去	腥味较重	但风味不
腥味除去		风味无明显改善	酱香味淡	腥味除去	如固定化
酱香稍淡				风味无明显改善	菌丝体
酱香较浓					
+++	++++	+	++++	+	++
综合评定 :++++ 好,+++ 较好,++ 一般,++ 较差,+ 差					

表 1 结果说明,酸水解液经固定化生长细胞处理后,风味、色泽都明显好转,其中固定化酵母,固定化曲霉菌丝体对酸水解液风味改善能力较强,作者选择固定化酵母细胞和固定化黑曲霉菌丝体作进一步试验.

2.2 酵母、曲霉的共固定与分别固定试验

由于固定化酵母、固定化黑曲霉菌丝体对水解液的风味都有显著影响,因此,作者进行了两者的共固定与分别固定共发酵试验,结果见表 2.

表 2 共固定与分别固定发酵的比较	
Tab.2 Effect of the co-immobilized cells and single immobilized cells on the fermentation of amino acid liquid seasoning	

发酵方式	酵母细胞数/个	残糖质量浓度/(g/dL)	乙醇质量分数/%	感官评定
共固定共发酵	3.9 × 10 ⁷	1.0	0.62	风味好,无异味,酱香较浓,色泽较深.
分别固定共发酵	2.4 × 10 ⁸	0.7	1.07	腥味去除,风味尚可,色泽较浅,有霉味.

表 2 表明,共固定共发酵比分别固定共发酵的效果好,出现此现象的原因可能是酵母、曲霉单独生长和共同生长,它们的比例和数量是不同的,这从酵母细胞数可看出,共固定酵母的细胞数比分别固定低,另外酵母和曲霉在海藻酸钙凝胶颗粒中的分布也不同.从水解液发酵后风味及操作等综合因素考虑,作者采用共固定共发酵形式.

2.3 酵母、黑曲霉添加比例试验

酵母和黑曲霉的比例和数量不同直接影响到风味改善的效果,作者以酵母菌悬液(细胞数为 1.8×10^7 个/mL)添加量 2 mL 为基准,按不同比例改变黑曲霉孢子悬浮液(孢子数为 2.2×10^7 个/mL)添加量,包埋在海藻酸钙中,增殖后分别对 150 mL 水解液进行发酵,结果见表 3.

表 3 酵母和黑曲霉添加比例试验结果
Tab.3 Effect of the ratio of yeast cells and *Aspergillus niger* on amino acid liquid seasoning

添加比例	项 目		
	酵母细胞数/(个/mL)	乙醇质量分数/%	感官评定
3:1	1.7×10^8	0.76	酱香偏浓,香味欠柔和.
2:1	1.3×10^8	0.62	酱香适中,香味柔和.
1:1	8.7×10^7	0.31	酱香稍淡泊,香味欠浓.
1:2	4.2×10^7	0.18	酱香淡泊,稍有异味.
1:3	1.8×10^7	0.16	酱香淡泊,异味较浓.

结果表明,固定化细胞增殖前酵母添加的比例与增殖后酵母中细胞数呈正比,发酵后水解液酱香味浓,异味小.酵母细胞数过高时酱香虽浓,但整体

香味不够柔和,过少时酱香淡泊,异味较浓.酵母和黑曲霉添加比例 2:1 为最佳比例,虽然乙醇含量不是最高,但是产品酱香味浓,异味少,风味好.

2.4 酵母和曲霉共固定化细胞发酵温度试验

酸水解液分别在 30、33、36、40 ℃ 下用共固定化细胞发酵,测定发酵后残糖,分别为 1.19、1.33、0.53、1.33 g/dL. 36 ℃ 发酵糖利用最快,发酵后水解液香味较浓,柔和,无异味,取 36 ℃ 发酵较为适宜.

2.5 原料对比对水解液发酵的影响

原料的选择是影响氨基酸调味液品质的重要因素.一般选择糖类含量较少,蛋白质含量高的豆粕为原料.但酱油香气成分主要是糖类经酵母发酵所产生,糖含量少,不利于香气物质的生成.原料配比时在豆粕中加入一定量淀粉含量较高的小麦,水解后增加水解液的糖含量,既提供了酵母发酵的糖分,又可以为黑曲霉葡萄糖氧化酶提供酶反应的底物.不同原料对比对水解液发酵的影响见表 4.可以看出,加入小麦发酵后,氨基酸调味液酱香味明显比单独使用豆粕好,香味柔和,风味改善明显,但是随着小麦比例的增加,水解液的含糖量增加,氨基酸减少,异味也增加,因此小麦的比例不宜过高,加量以 10% 为最好.

2.6 共固定化生长的酵母和曲霉细胞发酵过程试验

取 1 L 酸水解液,用共固定化生长的酵母和曲霉细胞进行发酵,测定发酵过程中乙醇、氨基氮、总酸、pH 值、残糖的变化,结果见图 1.测定发酵前后水解液游离氨基酸组成变化,结果见表 5.

表 4 不同原料对比对水解液发酵的影响
Tab.4 Effect of the ratio of raw material on the fermentation of amino acid liquid seasoning

原料中添加小麦比例/%		总酸质量浓度/(g/dL)	氨基氮质量浓度/(g/dL)	还原糖质量浓度/(g/dL)	乙醇质量分数/%	感官评价
0	发酵前	1.26	0.64	3.0	/	异味较重,无酱香味
	发酵后	0.71	0.65	1.4	0.54	有异味,香味欠柔和
10	发酵前	1.30	0.62	3.5	/	异味较重,无酱香味
	发酵后	0.79	0.60	1.9	0.65	酱香较浓,香味柔和.
20	发酵前	1.04	0.58	4.1	/	异味较重,无酱香味
	发酵后	0.66	0.58	1.8	0.71	酱香淡泊,有异味.
30	发酵前	1.20	0.50	4.9	/	异味较重,无酱香味
	发酵后	0.69	0.53	2.4	0.78	酱香淡泊,异味较浓.

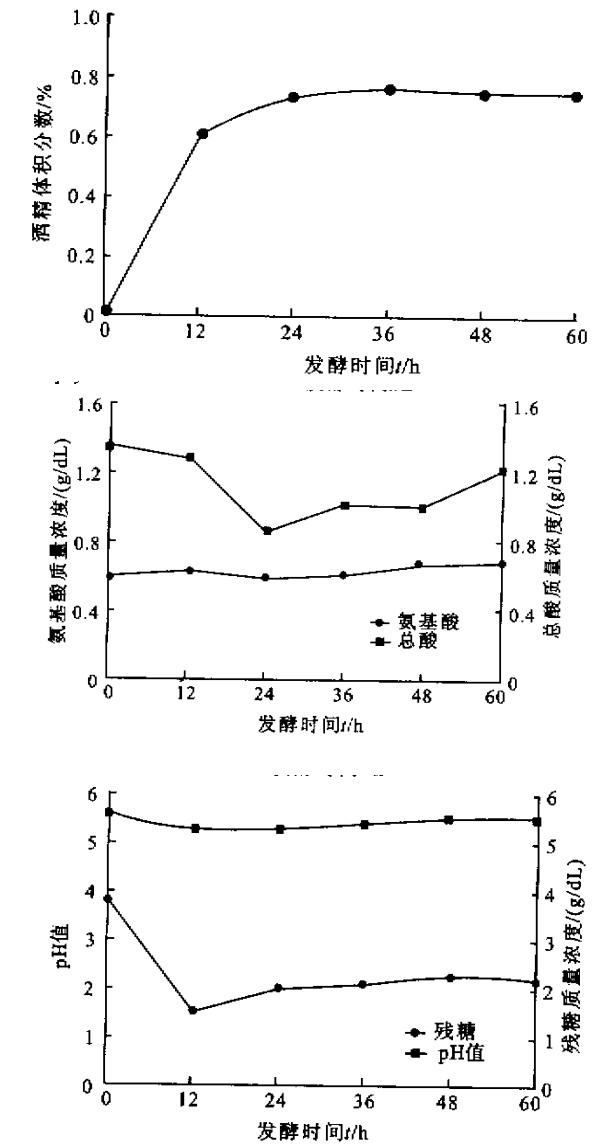


图 1 酸水解液在发酵过程中理化分析值变化曲线
Fig.1 Time courses of amino acid seasoning liquid fermentation

表 5 发酵前后水解液游离氨基酸组成变化
Tab.5 Amino acids in the liquid seasoning fermented with immobilized cells

氨基酸	发酵前游离氨基酸质量分数/%	发酵后游离氨基酸质量分数/%
门冬氨酸	2.43	2.23
异亮氨酸	1.85	1.57
苏氨酸	1.50	1.23
亮氨酸	2.79	2.23
丝氨酸	0.76	1.21
酪氨酸	0.31	0.24
谷氨酸	4.82	3.80
苯丙氨酸	1.22	1.05
甘氨酸	1.06	1.22

续表 5：

氨基酸	发酵前游离氨基酸质量分数/%	发酵后游离氨基酸质量分数/%
组氨酸	1.00	1.92
丙氨酸	2.63	2.34
赖氨酸	2.09	1.83
胱氨酸	微量	微量
精氨酸	0.45	0.27
缬氨酸	2.33	1.87
蛋氨酸	0.68	0.50

从图 1 可见,在发酵 12 h 内,除氨基氮外,各值变化较大,24 h 后,总酸开始增加,其它指标趋于稳定,发酵 36 h 时产品风味最佳,结合发酵时间和产品风味,取 36 h 为最佳发酵时间.分析表 4 可知,固定化细胞发酵前后氨基酸组分和含量没有明显变化.

2.7 固定化细胞的稳定性试验

用固定化细胞进行分批发酵,发酵时间为 2 d,发酵温度为 36 ℃,通过测定发酵液中乙醇体积分数,观察固定化细胞的外观及对水解液风味改善的能力,考查固定化细胞的稳定性,结果如图 2 所示.

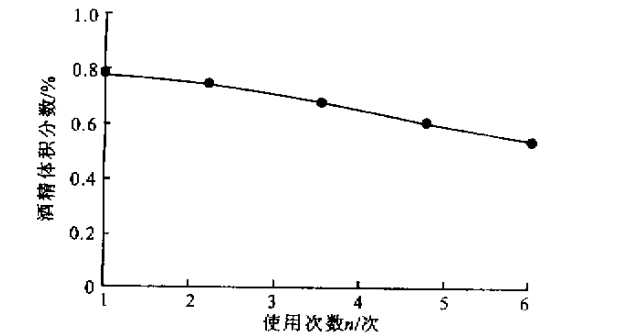


图 2 固定化细胞稳定性试验曲线
Fig.2 Time courses of the stability of immobilized cells

固定化细胞使用 5 批后,产生乙醇的能力降低 30% 左右,改善风味的能力稍有下降,固定化细胞颗粒无破损,弹性、机械强度都较好.发酵能力减弱的主要原因是酵母衰老及酶活力下降,用海藻酸钠固定化细胞的成本低,从发酵后水解液风味等综合指标看,固定化细胞使用 5 批后仍能达到除去异味、改善风味的要求.

分析以本工艺生产的产品,总氮质量浓度为 1.48 g/dL,氨基氮质量浓度为 1.07 g/dL,氨基酸生成率达 72.2%,全氮利用率在 90% 以上,既有氨基酸调味液的特点,又经固定化细胞发酵,具有酱油的风味.与传统酱油相比,出品率高、成本低、生产周期短.产品氨基酸得率高,味鲜,在风格上略有

不同,经过调配,可以制成各种类型的氨基酸调味液,经过浓缩干燥,也可制成固体调味料,具有良好

的市场前景.

参考文献：

[1] 宋焕禄. 复合氨基酸调味液[J]. 北京轻工业学院学报,1994,12(1) 26-31.

[2] 宋焕禄.李贤中. 复合氨基酸调味液的生产及新原料的开发利用[J]. 中国调味品,1993(12) 15-20.

[3] 陈均志. 复合氨基酸调味液的生产[J]. 中国调味品,1991(1) 23-26.

[4] 王荣民.高昊峰.半化学酱油新工艺研究[J]. 食品与发酵工业,1993(3) 8-19.

[5] OSAKI K, OKAMOTO Y. Fermentation of soy sauce with whole cell[J]. J Food Sci, 1985,50 1289-1292.

[6] HORITSU H, MAEDA T. A modified process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts[J]. Agric Biol Chem,1990,54 295-300.

[7] IWASAKI K, NAKAJIMA M. Rapid ethanol fermentation for soy sauce production by immobilized yeasts cell[J]. Agric Biol Chem,1991,55 2201-2207.

[8] 李丽霞.童明容.应用固定化酵母菌提高低盐固态酱油质量的研究[J].微生物学杂志,1990,10(1,2) 38-41.

[9] 上海粮油工业公司.发酵调味品生产技术(下)[M].北京 轻工业出版社,1979.

(责任编辑 杨 萌,朱 明)

(上接第 232 页)

[3] SHIOMIN, IZAWA M. Purification and characterization of sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of *Asparagus* [J]. Agric Biol Chem,1980,44 603-614.

[4] R C MCKELLAR, H W MODLER. Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium spp.* [J]. Appl Microbiol Biotechnol,1989,31 537-541.

[5] 江波,张涛,王璋.利用酵母提高低聚果糖纯度[J].无锡轻工大学学报,2001,20(5) 445-448.

[6] LAMIA L,HOCINE,王璋,等.黑曲霉 AS0023 果糖转移酶和转化酶的酶学特性[J].无锡轻工大学学报,2000,19(2) 133-137.

[7] 北京大学生物化学教研室.生物化学实验指导[M].北京：高等教育出版社,1979.

[8] 熊宗贵.发酵工艺原理[M].北京 中国医药科技出版社,1995.

[9] H. J. 法夫,M. W. 米勒,E. M. 马克. 酵母菌的生活[M].王民俊,黄平,杨锦才,等译. 贵阳：《酿酒科技》编辑部,1984.

[10] MURAMATSU, MASAYOSHI. Process for the preparation of branched fructooligosaccharides[P]. 欧洲专利 EP 0 307 158 A2, 1988-09-05.

(责任编辑 杨 萌,朱 明)