

产酯酵母固定化改善酱油风味的研究

施安辉 曲品 路光东

(山东大学微生物学系, 济南 250100)

摘要 以海藻酸钠做载体, 氯化钙为增强剂, 包埋产酯酵母获得固定化细胞。经过一系列条件试验, 找出了固定化产酯酵母的最适作用条件。经小试和中试证实, 处理后的酱油酱香浓郁, 接近于传统酿造酱油的风味。

关键词 产酯酵母; 固定化

酱油是我国人民日常生活中不可缺少的调味品。但是, 目前国内大多数厂家采用的低盐固态发酵工艺与传统酿造工艺相比, 酱香不足, 风味较差。因此, 从1984年开始我们就着手研究提高低盐固态工艺酱油风味的试验^[1]。

活细胞经过固定化后具有游离细胞所没有的优点, 它的细胞生长停滞的时间短, 细胞密集, 反应快, 对污染的抵抗力强, 可以连续发酵。若采用固定化细胞反应器, 把固定化细胞装柱, 处理酱油等产品就可形成连续化和自动化。固定的产酯酵母细胞利用酱油中的部分糖形成酒精和乙酸乙酯等呈味物质, 从而达到了提高低盐固态工艺酱油的目的。

材料与 方法

(一) 酵母细胞制备

1. 菌种: 耐盐的产酯酵母 (*Hansenula H. et P. Sydow*) 2 号和 8 号, 山东大学微生物学系分离选育^[2,3]。

2. 培养基: 麦芽汁培养基。

3. 酵母细胞制备

(1) 活化菌种: 冰箱中 4℃ 保存的斜面菌种, 接种于麦芽汁斜面上, 30℃, 恒温培养 3 天。

(2) 细胞增殖: 活化后的斜面菌种接种于锥形瓶中, 每瓶装培养液 50ml, 30℃ 恒温培养 2 天, 即得到细胞数目适宜的种子培养液。

(二) 固定化活酵母细胞颗粒的制备

1. 载体: 海藻酸钠 (温州助剂厂出品)。称取一定量的海藻酸钠加入水中, 配成 3% 海藻酸

钠溶液, 煮沸溶解, 冷却至常温。

2. 强化剂: 氯化钙 (济南化工厂出品)。称取一定量的氯化钙加入蒸馏水中, 配成 4% 氯化钙溶液。

3. 酵母活细胞固定化^[4,5]: 3% 海藻酸钠溶液与酵母种子培养液以 10:3 的体积比混合, 搅拌均匀后, 用针筒 (10ml) 吸取混合液滴于 4% 的氯化钙溶液中, 控制滴速, 使液体成颗粒状。海藻酸钠与氯化钙反应生成不溶性的有一定硬度的海藻酸钙, 而酵母细胞即被包埋在其中。滴完后, 颗粒浸泡于 4% 氯化钙溶液中, 置于 4℃ 冰箱中固化 1 小时。取出后用蒸馏水和生理盐水 (0.85%) 各冲洗三次, 得到直径约 5mm 的球形固定化酵母活细胞颗粒。

4. 固定化细胞的活化: 将固定化细胞颗粒浸泡于麦芽汁培养液中, 30℃ 下活化 2 天, 使酵母细胞增殖, 并激活酶系统。

(三) 对低盐固态工艺淋出酱油的处理^[5,6]

取自济南市醴泉酱菜厂的低盐固态工艺酱油, 氨基酸态氮、还原糖和总酸达二级、三级酱油标准, 食盐含量分别为 5, 9 和 18%。

(四) 分析方法

1. 酱油中的各项理化指标 (主要指氨基酸态氮、还原糖、总酸), 按常规理化分析方法测定。

2. 酱油中酒精、乙酸乙酯的含量采用气相色谱分析仪测定。首先把待测酱油样品经过预处理, 去除大部分色素、盐分和混浊物。处理方法: 使酱油通过装有硅藻土的柱子, 脱去部分色素, 再把色

除混浊物,再通过离子交换柱脱去盐分。处理后的酱油直接进样测定。

结 果

(一) 固定化活细胞作用最适条件的选择^[5]

表 1 活化与不活化的性能对比 (单位: mg/100ml)

项目 酵母菌	未活化		活化		原工艺酱油	
	酒精	乙酸乙酯	酒精	乙酸乙酯	酒精	乙酸乙酯
产酯 2 号	61.25	8.53	440.95	19.64	2.22	未检出
产酯 8 号	242.60	6.64	690.02	25.12	1.04	未检出

从表 1 可见,固定化细胞经活化后,酵母细胞产酒精和乙酸乙酯的量明显增加。

2. 不同食盐的含量对固定化细胞的影响: 食盐是酱油的重要成分之一。若食盐浓度过高,则会抑制酵母细胞的生长繁殖和催化作用,使酒精和乙酸乙酯的产量减少,若食盐浓度过低,又会发生酱油霉变。因此,需要找到一个适宜的食盐浓度。

1. 固定化活细胞的活化实验: 在 250ml 锥形瓶中活化,每瓶中各加三级酱油 100ml,固定化酵母颗粒 20ml,酱油与固定化细胞体积比为 10:2。实验分未活化与活化两组进行。两组同时置于 30℃ 下处理 2 天,取样分析。

控制淋出的酱油中食盐浓度分别为 5, 9 和 18%。在 250ml 锥形瓶中, 20ml 固定化酵母处理 100ml 酱油, 30℃ 温度处理 2 天, 取样分析。从表 2 可见,随着酱油中食盐含量的增加,酒精和乙酸乙酯的生成量逐渐减少;反之,酒精和乙酸乙酯的生成量则成倍增加。食盐的浓度控制在 10% 左右为宜。

表 2 不同食盐含量对固定化酵母的影响 (单位: mg/100ml)

酵母菌	产酯 2 号			产酯 8 号			
	食盐浓度 (%)	5	9	18	5	9	18
酒精		813.50	612.30	388.20	1040.20	685.21	260.92
乙酸乙酯		24.64	17.06	7.11	30.40	13.27	2.04

3. 添加糖对固定化酵母细胞的影响: 固定化酵母处理酱油的过程中要消耗一定量的糖。在 250ml 锥形瓶中加酱油 100ml, 固定化产酯 2 号和 8 号分别为 20ml, 并分别加入葡萄糖 1, 2,

3 和 4%, 30℃ 温度处理 2 天, 取样分析。从表 3 可见,添加葡萄糖对固定化酵母细胞生成酒精和乙酸乙酯有明显的促进作用。考虑到生产成本,添加葡萄糖的浓度以 1% 为宜。

表 3 糖对固定化酵母细胞的影响 (单位: mg/100ml)

酵母菌	葡萄糖	0	1%	2%	3%	4%
产酯 8 号	酒精	485.20	1291.11	1563.43	1150.38	836.47
	乙酸乙酯	13.27	17.23	20.86	18.42	15.91
产酯 2 号	酒精	499.92	1093.25	1124.10	952.34	854.27
	乙酸乙酯	14.64	15.51	14.65	11.50	10.92

4. 固定化细胞催化的最适温度: 在 250ml 锥形瓶中加入酱油 100ml, 固定化产酯酵母 8 号 20ml, 分别在 25、30、35、40℃ 下处理 2

天, 取样分析。从表 4 可见, 30℃ 时生成的酒精和乙酸乙酯的量最高, 其中以酒精生成量最明显。

表4 固定化酵母催化的最适温度(单位: mg/100ml)

温度(℃)	25	30	35	40
酒精	509.23	1291.17	1036.50	893.86
乙酸乙酯	10.04	16.23	12.21	14.43

5. 固定化细胞催化的最适 pH: 一般成品酱油 pH 在 4.7—5.0, 实验酱油的 pH 为 4.9。培养酵母的麦芽汁 pH 为 6.0。调节 pH 采用乳酸和氢氧化钠溶液。在 250ml 锥形瓶中分别加入 pH 为 3、5、7、8 的酱油 100ml, 分别加入固定化产酯酵母 8 号 20ml, 温度 30℃, 处理 2 天, 取样分析。从表 5 可见, pH 为 5.0 时催化效果最好。

表5 固定化酵母催化的最适 pH(单位: mg/100ml)

pH	3	5	7	8
酒精	520.47	1291.10	827.42	434.13
乙酸乙酯	10.25	17.23	16.71	9.50

(二) 固定化细胞改善酱油风味的小型试验

通过以上条件试验, 最后得出固定酵母细胞最适催化条件为: 温度 30℃、pH5.0、食盐 10%、葡萄糖添加量 1%、处理酱油与固定化细胞之比为 10:2, 处理时间为 2 天。

表7 固定化酵母处理酱油的中试结果(单位: mg/100ml)

分析项目	对照	第一批		第二批		第三批	
		2号	8号	2号	8号	2号	8号
酒精	2.13	809.25	681.58	402.10	236.38	200.17	327.23
乙酸乙酯	未检出	15.23	10.62	9.45	7.52	4.51	6.49

从表 7 可见, 处理后的酱油与对照相比, 酒精含量最高可增加 400 倍, 乙酸乙酯由未检出到 4.51—15.23mg/100ml。连续使用的结果表明, 第一批的产量最高, 以后依次降低, 原因是酵母细胞逐渐减少。但是, 产酯酵母 8 号有反常现象, 原因是随着连续地使用酵母细胞又逐步适应于环境。

讨论

1. 小试结果表明, 低盐和无盐固态工艺酱

油用固定化产酯酵母处理后, 酒精和乙酸乙酯的含量均显著增加。酱油酱香浓郁, 接近传统酱油风味。

表6 不同工艺酱油小试验催化结果(单位: mg/100ml)

检测内容	酒精	乙酸乙酯
对照酱油	1.925	未检出
低盐固态工艺酱油	1105.30	23.81
无盐固态工艺酱油	1210.45	20.72

(三) 固定化细胞改善酱油风味的中试^[6-8]

在以上小试验基础上, 我们设计了中型试验固定化酵母作用的最佳条件, 并装置了高 1.5 米、直径 0.5 米的催化罐, 一次可处理低盐固态酱油 500 公斤。

首先制备固定化产酯酵母 2 号和 8 号, 并浸泡于麦芽汁培养液中使之活化, 最后装罐。定时放出被处理的酱油, 按期重装固定化细胞。

2. 我们采用高 1.5m、直径 0.5m 的催化罐做为中试处理设备, 一次可处理低盐固态酱油 500kg, 处理后的酱油酱香酯香明显。感官、理化和卫生指标均达到国家有关规定标准。酒精由 2.128mg/100ml 提高至 809.20mg/100ml, 乙酸乙酯由未检出提高至 15.23mg/100ml。所以

说,固定化产酯酵母用于改善酱油风味的技术措施是成功的。

3. 利用简易的固定化技术在酱油贮存罐内进行固定化细胞增香,也取得了一定的成果。

参 考 文 献

1. 施安辉、王守莲: 调味副食品科技, 7:12 — 15, 1983。

2. 施安辉: 食品科学, 3:2 — 5, 1984。

3. 施安辉: 中国酿造, 1:25 — 31, 1988。

4. 李丽霞, 周鑫平: 南开大学学报, 1:47 — 53, 1990。

5. 胡鹏飞, 李书斌: 中国酿造, 4:20 — 23, 1989。

6. 孙瑾方, 堀津浩章(日): 中国酿造, 4:18 — 19, 1989。

7. 堀津浩章: *Bio. Industry*, 4(3): 75 — 81, 1987。

8. 堀津浩章: 特许原昭 60 年, 第 296397 号。

(1992-2-21 收稿)