

尾气分析在发酵食品行业中的应用

Off-gas analysis in fermented foods industry

董克武 黎 路

DONG Ke-wu LI Lu

(上海舜宇恒平科学仪器有限公司, 上海 200233)

(Shanghai Sunny Hengping Scientific Instrument CO., LTD, Shanghai 200233, China)

摘要: 发酵尾气在线监测对于发酵食品的品质控制、产量提高具有重要意义。对发酵尾气数据进行分析,不仅可以了解发酵的状态和进程,判断底物消耗,还能帮助判断发酵终点。文章介绍了常用的尾气分析方法以及目前尾气分析在氨基酸、有机酸、酶制剂等发酵食品中的应用情况。过程气体质谱分析仪是一种高精度、实时的在线气体分析仪器,具有可监测通道数多、长期稳定性好等特点,对于食品发酵过程尾气监测具有极大的应用潜力。

关键词: 尾气分析; 发酵食品; 过程气体质谱分析仪; 在线监测

Abstract: Off-gas analysis plays an important role in the production of fermented foods. It is noninvasive and enables on-line process monitoring of the physiological status of the fermentation, including growth kinetics and substrate consumption. It also helps determine the optimum point to halt the process for maximum yield. Two kinds of analytical method, as well as the applications in fermented food such as amino acid, organic acid, enzymes and so on were introduced. Process mass spectrometer will be potentially used in various of fermented food production fields, which can monitor several fermenters simultaneously with long-term good stability and high-precision.

Keywords: off-gas analysis; fermented foods; process mass spectrometer; on-line monitoring

发酵食品是利用有益微生物加工制造的一类食品,具有独特的风味和一些特异性营养因子,有些功能性发酵食品因具有某种生理活性物质还可以起到调节机体生理功能的作用^[1]。常见的发酵食品有氨基酸、有机酸、酶制剂、酵母、淀粉及淀粉糖、多元醇和特种功能的发酵制品等。发酵食品的生产过程需要利用微生物体的代谢作用,并借助于对代谢过程的控制来获得所需产品,其中包括大量复杂的生化反应和

迁移现象,不同种类的微生物利用碳水化合物、蛋白质等原料,采用不同的代谢途径产生各种代谢产物^[2]。生物发酵反应代谢过程中的参数变化,如:温度、酸碱性、氧化还原电位、溶解氧、尾气组分等,是发酵过程状态的实时反映。在现代化的食品研究和生产中,为了获得更好的产品和更高的产率,提升市场竞争力,就需要通过在线监测实时跟踪这些发酵过程关键参数的变化,实施调控优化发酵过程^[3]。

1 尾气分析的意义

在温度、pH、溶解氧、尾气组分等参数中,尾气组分浓度的变化反映了整个发酵过程中物质的变化情况,尤其对于耗氧和兼性好氧发酵来说,尾气中 CO₂ 和 O₂ 的变化,反映了发酵过程中微生物的代谢状态和代谢途径,已经被作为衡量发酵水平的重要指标气体^[4,5]。通过在线检测 CO₂ 和 O₂ 的变化,可以计算获得摄氧率(oxygen uptake rate, OUR)、二氧化碳释放速率(carbon-dioxide escape rate, CER)、呼吸熵(respiratory quotient, RQ)等呼吸代谢参数。OUR 是单位时间、单位体积发酵液中细胞消耗的氧气量,CER 是单位时间、单位体积发酵液中细胞释放的二氧化碳量,RQ 是 CER 除以 OUR 所得的商^[6],这些指标直接反映了细胞的生长代谢状态,对于发酵状态识别、供氧控制优化、流加补料以及故障预判等,都具有指导意义。尤其在工业发酵的放大过程中,大罐和小罐的细胞代谢特性是否一致是放大成功与否的关键,而要达到此目标,细胞代谢相关的宏观生理参数尤为重要,这些参数在工业规模的发酵大罐中与实验小罐一致时,发酵过程的放大就会取得成功^[7]。

2 尾气分析的主要方法

目前,发酵尾气的检测方法主要有基于红外和顺磁原理的尾气分析仪^[8]和过程气体质谱分析仪^[9,10]。尾气分析仪只能检测氧气和二氧化碳的含量,采样密度也不能太大,一台仪器一般仅能同时监测四路发酵尾气。而近年来,过程气体质谱分析技术悄然兴起,并具有很好的应用潜力。与尾气

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(编号:13DZ2251000)

作者简介:董克武(1968—),男,上海舜宇恒平科学仪器有限公司工程师,硕士。E-mail: kwdong@sunnyoptical.com

收稿日期:2014-11-05

分析仪相比,过程气体质谱分析仪具有分析速度快、检测精度高、可监测通道数多、可同时检测多种气体组分等优势^[11]。早在 20 世纪 90 年代,就已经有质谱仪应用于啤酒酵母的研究中^[9],对摄氧率进行测定。

过程气体质谱分析仪是基于先进的质谱技术原理,不仅能够进行快速、准确和高灵敏度的检测,还提供了解未知物质结构的途径,在研究反应机理和监测反应过程的应用中发挥重要作用。其基本原理和分析过程是:气体分子进入离子源,经电离形成不同质荷比(m/z)的离子,由于不同离子在磁场或电场的运动轨迹不同,离子在质量分析器中按照质荷比分开,依次到达检测器而得到质谱图,根据离子丰度及丰度比得到样品的分析结果^[12]。因此质谱仪的分析速度非常快,可达到 ms 级,远远高于尾气分析仪的响应速度,在多通道检测应用中具有显著优势。一台质谱仪即可同时监测多台发酵罐,根据发酵尾气检测周期的需要,可以同时监测十几甚至几十个发酵位点(见图 1)。对于大规模的工业生产来说,大大降低了设备的购置费用。除此以外,质谱技术能够实现全组分气体分析,除了 O_2 、 CO_2 之外,还可同时提供 N_2 、Ar 等无机气体及多种有机气体定性定量结果,为研究发酵食品尾气组分,指导和调控产品生产,提供更全面的数据支持。

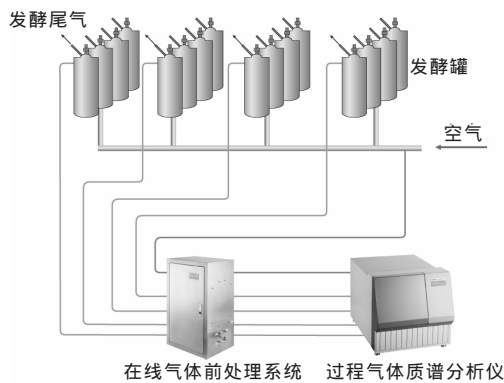


图 1 质谱仪多通道监测示意图

Figure 1 Online multi-stream off-gas analysis with process mass spectrometer

3 尾气分析在发酵食品中的应用

3.1 氨基酸

氨基酸发酵在发酵工业中占有重要地位,其发酵生产菌大多数为需氧菌或兼性厌氧菌,发酵液中的氧是菌体生长与代谢的必需品,因此,对发酵过程中氧的调控极为重要,尾气中 O_2 和 CO_2 的含量可作为实际控制的参考指标^[13]。

谷氨酸是目前世界上产量最大的氨基酸,它不仅是日用调味品味精、鸡精的主体,同时也是其他氨基酸制品、多种化学品、医药品、保健食品的重要原料,应用非常广泛^[14]。肖杰等^[15]在对 RQ 控制在谷氨酸发酵过程中的应用研究中发现,通过调节操作条件,可改变产酸期的 RQ 水平,如果将发

酵过程中的 RQ 值控制在较低水平(0.5),TCA 循环通量可被控制在合理水平上,谷氨酸脱氢酶的高活力同时也得到保持,在这种较低水平的 RQ 调控条件下,可以获得较高水平的谷氨酸发酵产酸率和糖转化率。

赖氨酸是人体所必须的 8 种氨基酸之一,目前采用最多的是液态生物发酵法进行生产,亦属于耗氧发酵,检测氧的含量对发酵工艺优化和放大具有重要意义^[16]。在发酵过程中,通过提高初始糖浓度和选育解除反馈抑制的高产菌株两种方式,都可以将发酵单位提高一定水平,但是在发酵过程中进行控制,将基质更多地转化为目标产物,提高发酵过程的转化率,不仅提升了效率,发酵成本也进一步降低^[17,18]。

3.2 酶制剂

酶制剂由于具有高效、专一和作用条件温和等优点,在食品加工等行业得到越来越广泛的应用。国内外正在使用或开发的酶制剂常用有 α -淀粉酶、半纤维素酶、葡萄糖氧化酶、蛋白酶、脂酶、植酸酶等^[19]。

毕赤酵母表达系统是近年迅速发展起来的一种优秀的真核表达系统,在表达异源蛋白上具有诸多优点,广泛应用于酶制剂发酵生产中,在高密度发酵方面具有巨大潜力^[20]。毕赤酵母具有强烈的好氧生长偏爱性,在发酵过程中保证氧的供给是提高发酵产量的重要因素,仅靠溶氧往往不能获得足够的供氧信息,尤其在溶氧为零的时候。质谱仪测定 OUR 可直接反映出供氧状态,既可避免细胞因供氧不足发生代谢异常从而导致产率降低,也可避免过供氧引起的能量消耗以及对细胞可能造成的伤害。另外,毕赤酵母在发酵过程中需要利用甲醇诱导外源蛋白的表达^[21],而甲醇由于其沸点低、易挥发的特点导致其易随尾气带出,质谱仪是通用型检测仪器,可以通过增加特征监测离子实现对尾气中甲醇含量的测定,为毕赤酵母发酵过程控制提供更为丰富的参考数据^[22]。

木聚糖酶是一类水解植物材料中半纤维素的内切酶,可用于食品、保健品等。张洁等^[23]在以木霉菌作为生产菌株,以麸皮和木屑为培养基,在 2 L 柱式反应器中固态培养木聚糖酶的过程研究中,在线监测尾气中 CO_2 ,发现其含量变化与菌体生长和产酶均有密切关系。对尾气中的 CO_2 进行在线检测,获得固态发酵过程中菌体生长和酶生产的动态信息,从而可以进一步建立过程控制模型,为工艺优化提供可靠依据。

3.3 有机酸

有机酸包括乳酸、柠檬酸、葡萄糖酸等,均是常用的食品添加剂。

乳酸具有很强的防腐保鲜功效,不但可以抑菌、延长食品保鲜期,还有调味、保持食品色泽和提高产品质量等作用。王然明等^[24]在乳酸发酵工艺控制研究中,应用过程质谱仪分析尾气,对于乳酸发酵过程代谢进行分析,利用质谱仪分析尾气对凝结芽孢杆菌发酵乳酸过程进行微耗氧发酵供氧

水平的精确控制,将菌体的摄氧率控制在 $0.70 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 时,凝结芽孢杆菌发酵乳酸的最佳合成速率可以达到 $2.78 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。该研究还发现,尾气数据也是乳酸发酵终点判断的有力依据,根据实时尾气数据获得生理参数的趋势变化,及时判定发酵终点,并对发酵过程副产物的代谢进行分析,对提升乳酸产品质量控制起到了非常关键的作用。质谱仪提供的尾气数据对于乳酸发酵产量和质量均有提高,并可实现在线控制。

柠檬酸在食品工业上广泛用作酸味剂、增溶剂、缓冲剂、抗氧化剂等,被称为第一食用酸味剂,主要通过黑曲霉利用糖类发酵生成。对其代谢途径分析,发现 RQ 是关键参数,反映了底物利用情况、胞内代谢网络通量,与柠檬酸的产量明显相关,二氧化碳的释放速率随着柠檬酸合成速率的增加而迅速下降^[25]。因此在柠檬酸的合成过程中,通过在线监测尾气数据来指导供氧,以控制二氧化碳的羧化利用,从而提高柠檬酸产量和增加转化率,对于柠檬酸的生产效率和成本控制有重要指导意义^[26]。

4 结论与展望

通过监测食品发酵过程的尾气含量,寻找其中的敏感参数,从而获得发酵过程的最佳干预点,对于优化发酵过程、提高产量有着重要的指导意义。随着技术的不断进步,质谱仪为发酵食品过程监测提供了更为丰富的数据^[27]。另一方面,随着中国科学仪器行业的快速发展,国产过程气体质谱分析仪也已在生物发酵尾气监测中广泛应用,如:上海舜宇恒平科学仪器有限公司自主研发的 SHP8400PMS 过程气体质谱分析仪,不仅性能达到了国际先进水平,还针对发酵行业的应用特点完善了系统解决方案。过程气体质谱分析仪由于其快速响应、数据全面的技术优势,在发酵食品在线尾气分析中的应用必将越来越受到关注,为食品发酵工艺优化和过程控制提供可靠的数据支持。

参考文献

- 杜鹏,霍贵成. 传统发酵食品及其营养保健功能[J]. 中国酿造, 2004(3):6~8.
- 梁华正,张燮,饶军,等. 微生物挥发性代谢产物的产生途径及其质谱检测技术[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1):124~133.
- 高畅,高树贤,李华,等. 发酵过程检测技术[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002(5):56~58.
- Wang Yong, Chu Ju, Zhuang Ying-ping, et al. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6):989~995.
- 张嗣良. 发酵过程多水平问题及其生物反应器装置技术研究——基于过程参数相关的发酵过程优化与放大技术[J]. 中国工程科学, 2001(3):37~45.
- 刘仲汇,史建国,朱思荣,等. 尾气在线检测分析在发酵中的应用[J]. 发酵科技通讯, 2014, 41(4): 32~35.
- 张嗣良. 发酵工程原理[M]. 北京:高等教育出版社,2013.
- 姜长洪,宗学军,姜楠,等. 在线分析仪表在发酵工程中的应用[J]. 仪表技术与传感器, 2000(12):39~41.
- 范代娣,俞俊棠. 以摇瓶所得摄氧率为基准进行发酵放大[J]. 生物工程学报, 1996, 12(3): 301~306.
- Patrick N Royce, Nina F Thornhill. Analysis of noise and bias in fermentation oxygen uptake rate data[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992(40):634~637.
- 黎亮,张嗣良,庄英萍,等. 在线质谱仪在工业发酵过程优化与放大中的应用[J]. 分析仪器, 2012(4):103~105.
- 陈耀祖,涂亚平. 有机质谱原理及应用[M]. 北京:科学出版社, 2004.
- 于信令,于军. 氨基酸发酵生产的调控优化[J]. 发酵科技通讯, 2006, 35(1):28~30.
- 张克旭. 氨基酸发酵工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1992.
- Xiao Jie, Shi Zhong-ping, Gao Pei, et al. On-line optimization of glutamate production based on balanced metabolic control by RQ[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2006(29):109~117.
- Zimmermann H F, Anderleit, Büchs J, et al. Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(6): 1 157~1 160.
- Hua Qiang, Fu Peng-Cheng, Yang Chen, et al. Microaerobic lysine fermentations and metabolic flux analysis[J]. Biochemical Engineering Journal, 1998(2):89~100.
- Teresa Lopez-Arenas, Omar Anaya-Reza, Rodolfo Quintero-Ramirez, et al. Modelling, simulation and dynamic analysis of the L-lysine production process[J]. Computer Aided Chemical Engineering, 2014(33):1 723~1 728.
- 王睿,刘桂超. 论我国酶制剂工业的发展[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(1): 68~69.
- 李洪森,王红宁,许钦坤. 毕赤酵母高密度发酵研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(2): 212~212.
- 刘朋,黄晓晶. 过程质谱在生物发酵在线监测中的应用[C]// 闫成德. 第四届中国在线分析仪器应用及发展国际论坛论文集. 北京:[出版者不详], 2011:429~432.
- 郭美锦,吴康华,庄英萍,等. 重组巴氏毕赤酵母恒化培养动力学及代谢迁移特性研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(5): 617~624.
- 张洁,吴克,刘斌,等. 木聚糖酶固态罐发酵及尾气在线测定[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 22~26.
- 王然明,王泽键,田锡炜,等. 生物过程尾气质谱仪在乳酸发酵工艺控制中的应用[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2013, 39(3): 289~295.
- Anastassiadis S, Rehm H J. Continuous gluconic acid production by the yeast-like *Aureobasidium pullulans* in a cascading operation of two bioreactors [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(3): 541~548.
- 王萍,王泽建,张嗣良. 生理代谢参数 RQ 在指导发酵过程优化中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(2): 88~95.
- Virpi Tarkiainen, Tapio Kotiaho, Ismo Mattila, et al. On-line monitoring of continuous beer fermentation process using automatic membrane inlet mass spectrometric system[J]. Talanta, 2005, 65(5): 1 254~1 263.