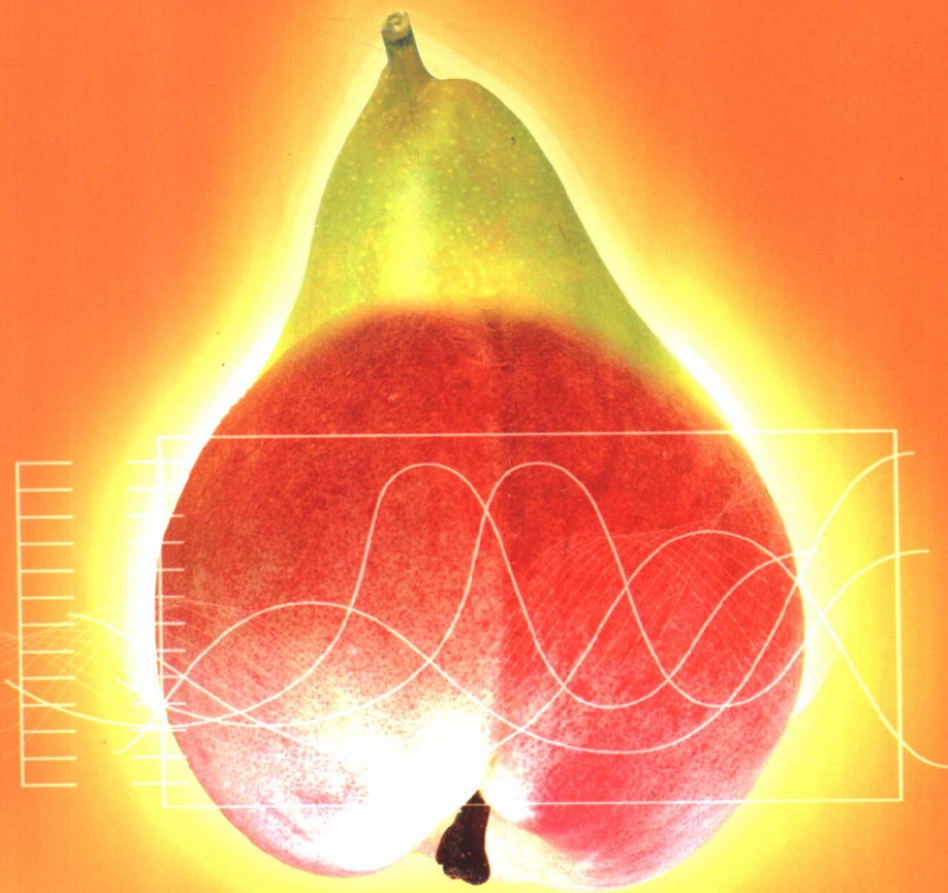


食品风味物质 与生物技术

王 淼 田亚平 编



中国轻工业出版社

食品风味物质与生物技术

王 淼 田亚平 编

ISBN 7-5019-4274-9



9 787501 942749 >

ISBN 7-5019-4274-9/TS · 2530

定价: 25.00元

食品风味物质与 生物技术

王 森 田亚平 编

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

食品风味物质与生物技术/王森,田亚平编.—北京:
中国轻工业出版社,2004.5
ISBN 7-5019-4274-9

I.食… II.①王…②田… III.生物技术—应用—
食品工业 IV.TS201.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 014612 号

责任编辑:李亦兵 马 妍

策划编辑:唐是雯 责任终审:滕炎福 封面设计:刘 鹏
版式设计:郭文慧 责任校对:李 靖 责任监印:吴京一

出版发行:中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编:100740)

印 刷:三河市宏达印刷有限公司

经 销:各地新华书店

版 次:2004年5月第1版 2004年5月第1次印刷

开 本:850×1168 1/32 印张:10.5

字 数:270千字

书 号:ISBN 7-5019-4274-9/TS·2530

定 价:25.00元

读者服务部邮购热线电话:010-65241695 85111729 传真:85111730

发行电话:010-88390721 88390722

网 址:<http://www.chlip.com.cn>

Email:club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

40166K1X101ZBW

前 言

风味物质对于食品、饲料、化妆品和制药工业极其重要。目前,世界上风味和芳香物质的年产值约为 70 亿美元,占据了 25% 的食品添加剂市场,且逐年增长。遗憾的是,在现今生产的风味物质中,85% 的产品是通过化学合成方法得到的。但是用化学法合成的风味物质存在一些严重缺陷,而长期以来植物作为天然风味物质的重要来源,也存在有效成分含量低、分离困难、受气候和植物病害影响等问题。

几十年来,生物技术已经成为许多物质生产的经济、有效的手段,这些物质包括青霉素等抗生素和柠檬酸等化学品。20 世纪 70 年代基因工程的出现给生物加工技术和产品带来了新的生机。由重组菌生产高价值的生物药品引起人们的广泛兴趣,与此同时,生物技术在其他方面的应用也日益增长。由于上述一些原因,人们对风味物质的生物合成越来越感兴趣。这方面的工作不仅为生物技术开辟了一个新的研究领域,而且也是解决食品、制药等工业对天然风味物质的需求不断增长这一问题的一个有效途径。

目前,风味物质的生物合成主要有两条途径:一是利用适当的前体物通过酶进行生物转化,酶可以是微生物或其他生物中提取的纯酶,也可以是利用微生物培养过程中分泌到培养基中的混合酶,通过酶转化可将低附加值的前体物转化成具有高附加值的目的产物;二是从简单、便宜的营养物质开始,如葡萄糖和氨基酸等,经微生物发酵生产出目的风味物质。

在多数情况下,风味和芳香物质是复杂的混合物,一种确切的风味或芳香有时取决于多种物质的均衡,也有时主要取决于一种单一的物质。本书中介绍的风味物质包括芳香(嗅感)风味物质、

味感风味物质(咸味、酸味、甜味、苦味、鲜味)和特殊的感觉物质。虽然国内外学术期刊每年都会发表大量风味物质生物合成的研究报告,但对风味物质的生物技术生产进行系统介绍的书籍尚不多见,国内还是空白。在借鉴了国外最新研究成果的基础上,本书进行了系统概括和总结,并结合作者自身进行的研究作了详细阐述。因此,编写本书的目的是阐述风味物质生物技术生产的基本原理和技术,并通过对国内外特定风味物质生产和研究的分析,为读者开展类似的研究提供分析问题和解决问题的思路与方法。风味物质产品的类别非常多,但生物技术生产和研究的思路与方法是可以通用或借鉴的。在这一方面,相信本书会对读者产生积极的影响。另外,特别要说明的是,一些传统的用生物技术生产的风味物质,由于国内已出版了一些专门的书籍,因此,本书中只进行了简单的介绍。

尽管作者力图在本书中注重系统性、实践性和前沿性,但限于作者本人的学术功底、研究经验和写作能力,书中难免有错误和不妥之处。若蒙赐教,不胜感激!

参加本书编写的还有童群义博士。在编写过程中,作者得到了前辈、同行和朋友们的关心和帮助。

在出版过程中,编者得到了中国轻工业出版社的大力支持。在此,编者向所有对此书的出版给予关心和支持的人们,表示深切的谢意!

目 录

第一章 概述	(1)
第二章 糖苷类芳香化合物的生物合成	(8)
第一节 糖苷类芳香化合物的研究状况	(8)
第二节 前体的分析方法	(9)
第三节 糖苷缩合的风味物质的化学组成	(11)
第四节 在植物中糖苷结合的挥发性化合物的作用	(15)
第五节 糖苷缩合的芳香化合物的生物技术转化	(17)
第六节 基因工程的应用	(25)
第三章 单萜的微生物生物转化	(27)
第一节 概述	(27)
第二节 单萜生物转化的优势	(29)
第三节 单萜生物转化中的问题	(33)
第四节 单萜的生物转化中的微生物转化反应	(39)
第五节 单萜降解途径的遗传学	(52)
第四章 类异戊二烯的生物合成	(54)
第一节 类异戊二烯的生物合成	(55)
第二节 类异戊二烯生物合成的位置	(82)
第三节 类异戊二烯生物合成的方法	(87)
第五章 内酯的生物技术生产	(93)
第一节 概述	(93)
第二节 内酯的发酵法生产	(95)
第三节 内酯的酶法合成	(105)
第六章 酯类化合物的发酵生产	(109)
第一节 酯类化合物的摇瓶发酵条件	(110)
第二节 酯类化合物的分批发酵过程和代谢机理	(122)

第三节	酯类风味物质的萃取发酵·····	(131)
第七章	食品甜味剂的生产·····	(142)
第一节	概述·····	(142)
第二节	淀粉糖及糖质原料类甜味剂·····	(145)
第三节	氨基酸、肽、蛋白类甜味剂·····	(169)
第四节	多元糖醇类甜味剂·····	(175)
第八章	食品酸味剂的生产·····	(180)
第一节	柠檬酸的发酵生产·····	(181)
第二节	乳酸的发酵生产·····	(182)
第三节	苹果酸的发酵生产·····	(187)
第九章	食品鲜味剂的生产·····	(197)
第一节	概述·····	(197)
第二节	发酵法生产食品鲜味剂·····	(201)
第三节	酶法生产食品鲜味剂·····	(231)
第四节	其他复合风味物质的生产·····	(242)
第十章	酶和风味生物技术·····	(245)
第一节	概述·····	(245)
第二节	水解酶·····	(248)
第三节	氧化还原作用·····	(256)
第四节	C—C 键的形成反应·····	(263)
第五节	其他各类酶·····	(264)
第十一章	应用真菌孢子和固定化细胞进行的 特殊转化过程·····	(265)
第一节	概述·····	(265)
第二节	特殊催化剂·····	(267)
第三节	香料化合物生产过程实例·····	(290)
第十二章	植物细胞培养技术生产香气产品·····	(302)
第一节	概述·····	(302)
第二节	植物细胞培养生产香气产品·····	(304)
参考文献	·····	(325)

第一章 概 述

一、风味物质生产现状

风味物质对于食品、饲料、化妆品和制药工业极其重要。目前,世界上风味和芳香物质的年产值约为 70 亿美元,占据了 25% 的食品添加剂市场,且逐年增长。遗憾的是,在现今生产的风味物质中,85% 的产品是通过化学合成方法得到的,但是用化学法合成的风味物质存在以下严重缺陷:

(1) 大量的化学合成物质被发现含有有害成分;

(2) 化学方法合成中由于缺乏专一的底物,造成产品的纯度和产量下降;

(3) 化学法合成的产物中常含消旋混合物,如从中提取目的异构体将是非常困难并且花费巨大;

(4) 人们对化学合成的添加剂用于食品、化妆品和其他日用产品日益反感。

由于这些原因,人们对风味物质的生物合成越来越感兴趣。这方面的工作不仅为生物技术开辟了一个新的研究领域,而且也是解决食品、制药等工业对天然风味物质的需求不断增长这一问题的一个有效途径。

对于自然产物的定义问题,美国联邦法规将天然风味物质(Natural flavour)作了如下描述:

……香精油、含油树脂、香精或其提取物、蛋白质水解物、蒸馏物或任何经焙烤、加热和酶水解的产品为天然风味物质。这些产品来源于含有风味成分的香料、果汁、蔬菜或蔬菜汁、食用酵母、香草、叶芽、树皮、根、叶或类似的植物原料、肉、海味、家禽、蛋、乳制品或发酵产品等。在食品中,这些产品的主要功能是作为调味剂

而不是作为营养物(联邦法规,21CFR101.22.a.3)。

这个定义,包含了活细胞及其发酵产品,也就是说微生物或植物细胞合成的风味物质可认为是天然风味物质。

二、风味物质生物合成的特点

由于风味物质在需求上的变化很大,由此产生了多种生产方法。如前所述,传统的风味物质的生产主要是化学合成法,即从植物性药材和其他资源提取出所需物质后,通过一些加工和化学反应产生风味物质,另外还包括一些传统的发酵技术,如固态发酵。

目前,风味物质的生物合成主要有两条途径:一是利用适当的前体物通过酶进行生物转化,酶可以是从小微生物或其他生物中提取的纯酶,也可以利用微生物培养过程中分泌到培养基中的混合酶,通过酶转化可将低附加值的前体物转化成具有高附加值的产物;二是从简单、便宜的营养物质开始,如葡萄糖和氨基酸等,经微生物发酵生产出目的风味物质。

(一) 生物转化

从某些特定的基质出发,通过不同的酶促反应,如氧化、还原、水解、脱水反应,形成新的 C—C 键,并进一步转化生成风味物质。许多微生物能将萜烯类物质进行特异性的生物转化,生产出高附加值的产品。例如,某些细菌能将一种相当便宜的橙油成分朱桉倍半萜转化为较为昂贵的香柏酮倍半萜,这种物质是葡萄柚的主要香气成分。由每年在森林中会形成大约 $1.75 \times 10^8 \text{ t}$ 的萜烯类化合物可以看出微生物转化萜烯的能力相当强,事实上这些萜烯类化合物主要是由存在于土壤和植物根系中的微生物,通过不同的代谢途径转化产生的。萜烯类化合物是研究生物转化的最好基质,许多微生物能将萜烯类化合物降解或进行特异的生物转化,以生产高附加值产品。目前已有的一些典型报道,见表 1-1。

表 1-1 生物转化合成香味化合物

基质(前体物)	转化用微生物	产 物
DL-薄荷醇乙酸酯	非发酵藻酸单胞菌(<i>Algimonas nonfermentans</i>)	L-薄荷醇, D-薄荷醇乙酸酯
β -茴香酮	霉菌(<i>Lasiodiplodia theobromae</i>)	代谢混合物作为烟草调味剂
脂肪、油类	娄地青霉(<i>Penicillium roquefortii</i>)	2-链烷酮
异戊醇、丁醇、异丁醇	姆拉克汉逊酵母(<i>Hansenula mrakii</i>)	乙酸异戊酯

(二) 微生物发酵生产

人类在很早以前就知道一些微生物能产生出愉快的香味。1923年, Omelianski 就此发表了一篇概述, 分析了微生物产生的香味类型, 并对其呈现出的香味加以描述。比较典型的类群如表1-2所示。

表 1-2 微生物发酵法生产香味化合物

化合物种类	发酵用微生物	典型香味产物
萜烯类化合物	大多是真菌, 多见于腐烂的松木上, 属于子囊菌类和担子菌纲, 如长缘壳菌(<i>Ceratocystis</i>)	香茅醇, 香叶醇, 里那醇, 橙花醇等
内酯类化合物	土壤真菌绿色木霉(<i>Trichoderma viride</i>), 香气掷孢酵母(<i>Sporobolomyces odours</i>)	6-戊烷基-2-吡喃酮(椰子香味), 4-癸内酯(桃香味)
吡嗪类化合物	谷氨酸棒杆菌(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	4-甲基吡嗪
酯类化合物	乳酸菌(<i>Lactostreptococcus</i>), 假单胞菌(<i>Pseudomonas</i>), 帚状地霉(<i>G. penicillatum</i>)	乙酸乙酯, 丁酸己酯, 己酸乙酯, 异戊酸异戊酯

长期以来,人们也把描述香味的方法用于某些微生物的分类。随着有机化学领域中一些仪器分析手段的应用和改进,如气相色谱和质谱分析方法,越来越多的微生物风味挥发物质得以鉴定。实际上,微生物能生产很多种类的风味物质,下面对微生物所生产的风味物质的一些重要类群进行简单介绍。

(1) 萜烯类化合物 通常是赋予精油特殊香味的重要组成部分,它们由异戊二烯单体组所构成,可以是环状的、开链的、饱和的或不饱和的等各种形式。产萜烯的微生物大多是真菌,多见于腐烂的松木上,属于子囊菌类和担子菌纲。

(2) 内酯类化合物 与味觉感应有关系,如它们与果味、椰子味、奶油味、甜味或坚果味有关。现今主要通过化学法合成,但采用微生物法生产此类化合物将比化学法合成有更多的优越性,特别是生产具有旋光性的内酯。例如,土壤真菌绿色木霉(*Trichoderma viride*)在简单生长培养基上可产生具有浓郁椰子味的物质,显示其主体特征的化合物是6-戊烷基-2-吡喃酮,其产物浓度可达170mg/L,而用化学法合成该化合物则需经过七步完成;香气掷孢酵母可通过发酵生产4-癸内酯达1.6mg/L,该物质具有强烈的桃香味。

(3) 吡嗪类化合物 是加热食品中所具有的典型的香味组分,它可使其赋予特殊的焙烤风味或坚果的风味。例如,它存在于焙烤的坚果、咖啡、可可豆、焙烤制品和肉制品中。在正常情况下,这些化合物是通过美拉德反应(氨基和糖的褐变反应)形成的。但从蔬菜中也能分离出吡嗪类化合物,它们具有豌豆或新鲜蔬菜的鲜味。有一些微生物也能合成吡嗪类化合物,如谷氨酸棒杆菌能产生四甲基吡嗪。将吡嗪化合物加入到食品中,能使食品产生坚果味、咖啡味、巧克力味和香蕉味等。对于需要增加焙烤风味的食品,如微波炉食品来说,因其在加工过程中不能进行非酶褐变反应,故需添加天然吡嗪类化合物。

(4) 酯类化合物 是另一类重要的风味物质,具有迷人的水

果香味,它们是水果中的主要香味物质。但在水果中含量很低,大部分只为 1~100mg/kg。早在一个世纪以前,人类就首次合成了这类风味物质,并已经知道可通过微生物法生产。

微生物发酵或转化技术生产风味物质,克服了长期以来植物作为天然风味物质惟一来源而存在的有效成分含量低、分离困难、受气候和植物病害影响等缺陷。具体来说,生物转化或微生物发酵法生产风味物质的优点是:

- (1) 得到的产品是天然的;
- (2) 由于底物和反应的高度专一性,因而可保证产品具有确定的化学立体结构;
- (3) 反应条件的优化可以生产出结构复杂、性质一致的产品,并达到恒定的生产速率;
- (4) 可在温和条件下实现水溶液中化学方法不可能完成的多步反应;
- (5) 此外,这一过程不受气候、植物病害和原料贸易等外界环境条件的影响。

随着生物技术的不断发展,微生物基因工程和植物基因工程技术在风味物质的合成方面已表现出很大的潜力,国际上不少学者进一步认为,植物细胞和组织培养技术将是 21 世纪风味物质生产的最有前途的手段。

三、风味物质生物合成的技术基础

对于任何一种风味物质,要进行其生物合成方面的研究,直至实现工业化生产,涉及到许多技术问题。由于风味物质的多样性,其合成的技术基础也就非常广泛。表 1-3 为风味物质生物合成通常所涉及的一些技术问题。

根据目前风味物质生物合成的主要技术基础和将来的发展趋势,特别是分析开发风味物质生物转化过程所涉及的重要技术问题,可以非常清楚地看到,风味物质生产的生物技术基础知识应该

主要包括基因工程、酶工程、发酵工程和植物细胞培养技术等内容。

表 1-3 开发风味物质生物转化过程所涉及的重要技术问题

-
- (1) 微生物筛选 寻找有所需酶活并能催化所希望反应的细菌、酵母和真菌。根据地球上所存在的大量各种各样的微生物,找出合适的筛选方法,能选择出那些有所需酶活和在生物合成过程中有用的其他特性的目的微生物
- (2) 诱变和基因工程 改良已筛选得到的微生物菌株的性能。这里所说的基因工程技术主要依赖于近来人们所掌握的分子遗传学和蛋白质结构方面的基本知识。虽然现在在许多酶的商业规模生产中有很好的生产菌株,其所含的酶合成基因是从其他自然产生此酶但工业应用较困难的微生物克隆而来
- (3) 酶生物化学 生物催化剂的有效应用依赖于对酶作用的生物化学的深入了解,特别是在一些有精确化学结构的香味化合物产物的生产过程中
- (4) 微生物代谢、生理学和生物化学工程、过程控制工程 包括微生物代谢调控的最佳条件,适宜生物反应器的设计和操作,生物转化过程的优化控制。这些问题的解决将能实现大规模生产,并达到高产率、高转化率和高生产强度
- (5) 下游工程 包括风味物质产品的分离和纯化,对提高产品产量,降低产品成本具有极其重要的意义,所需要的专业知识主要是有关生化产品,特别是不稳定分子及生物聚合物的物理化学特性和行为
- (6) 分析技术 特别是有关生物聚合物和立体异构体的分析方法
-

四、生物技术生产风味物质的工业应用

(一) 存在的困难

尽管已有许多微生物生产香味化合物的报道,但能达到工业应用的还很有限。限制香味化合物生物合成过程的工业应用的原因有多种。首先,通常发酵液中香味化合物的浓度很低,致使提取过程的费用较高,这一点可通过天然香味物质的产品价格比化学合成的产品高 10~100 倍这一事实来加以说明。其次,在技术上面有一些问题。微生物生产香味化合物过程有两个特点:一是许多香味物质的挥发性和较低的水溶性使其难以回收,二是产物对微生物本身具有抑制和毒害作用,常需使发酵液中终产物的浓度

维持在较低水平。近年来,研究人员已研究开发出了一些特殊的发酵和回收技术用以解决这些问题,如在有机溶剂中进行酶法转化,利用非极性溶剂或树脂进行随程连续萃取、吸收或吸附。最后,影响风味物质工业化的还有法规方面的问题。新产品必须经立法机构验证后,方可被确定为“天然产品”。这一过程可能耗时数年而使产品价格提高。

(二) 工业生产情况

尽管存在种种困难,但有些香味化合物已由微生物法生产,并达到了工业生产规模。

德国 BASF 公司已用微生物生产 4-癸内酯,工艺过程为:蓖麻籽经压榨得到蓖麻油,蓖麻油含 80% 的 12-羟基-9-十八烯酸甘油三酯(蓖麻酸)。蓖麻油经酵母转化、降解成羟基酸,再经 β -氧化形成 4-羟基癸酸,最终得到内酯,产酯量可达 6g/L。

英国 Unilever 公司以 5-十二酮酸为原料,采用面包酵母生产 R- δ -十二酸酐,达到 30000L 发酵罐规模。所生产的内酯作为香味物质添加到人造黄油中。

美国 Hercules 有限公司采用丁酸梭菌,在厌氧条件下将葡萄糖转化成丁酸,再与乙醇酯化产生丁酸乙酯,这是一种低阈值的果香物质。

日本 Mining 公司采用生物技术与有机化学合成相结合的方法生产大环麝香化合物。该大环麝香化合物优于传统合成的硝基麝香化合物,不仅感官评价好,而且皮肤的耐受性也很好。 α, ω -烷基二羧酸为合成大环麝香化合物的关键中间体,可以相应的烷烃为基质,采用热带假丝酵母进行发酵生产。该公司以此生产十三烷二羧酸(巴西基酸),再转化成麝香化合物——乙二醇巴西基酸酯,已达到工业生产规模。

由于消费者对用于食品、饲料、化妆品的“天然”添加剂的需求不断增加,采用生物技术生产香味化合物在商业上的重要性在不久的将来将会与日俱增。

第二章 糖苷类芳香化合物的生物合成

早在 25 年前, Francis 和 Allcock 就开始对玫瑰花瓣中糖苷形式的单萜醇的检测进行了研究, 由此开辟了糖苷结合风味物质的一个新的研究领域。现已经确定在水果和其他植物组织中无风味的糖苷常常是芳香物质的存在形式, 非挥发性萜类的二磷酸盐也能够产生挥发性的化合物。这些磷酸酯被公认为是单萜生物合成的中间产物, 并已发现它在甘牛至以及番木瓜果中形成了一个可能的芳香储备。到目前为止, 由于大部分已经鉴定的前体化合物都有一个糖苷的性质, 可以归类为糖苷类芳香化合物, 因此本章主要讨论有关这种极性风味成分分析的进展, 植物中的糖苷缩合物的存在方式等, 包括糖苷类芳香化合物在植物中的作用, 以及通过酶水解来进行糖苷结合的挥发性化合物的风味释放和风味增强等的生物技术方法。

第一节 糖苷类芳香化合物的研究状况

糖苷类芳香化合物前体研究的初期主要集中在单萜糖苷化合物, 对此 1987 年已有两篇文章分别进行了综述, 包括报告了到 1986 年为止鉴定的各种单萜类糖苷的结构和分布, 描述了来自 25 种不同植物中的 22 个单萜糖苷, 最常被检测到的是香叶醇、橙花醇、里那醇和 α -松油醇的缩合物。文章还描述了带有非普通萜类结构的糖苷, 讨论了单萜糖苷的分析和它们在植物中的功能。在这些综述中, 还论述了包括单萜糖苷配基的糖苷酯, 列出了 28 种植物中的 25 种不同配基, 并特别分析了分离方法和单萜糖苷的作用。

初期研究阶段以后,有关糖苷类芳香化合物的研究迅速扩大。1993年 Stahl Biskup 等人发表了糖苷连接的挥发性化合物(包括萜和非萜糖苷)的现状,报告了在 150 个植物种类中分布着近 200 种糖苷配基(脂肪醇、烷基酚、单萜、倍半萜类化合物和去甲基异戊二醇)。此外,对在香精油植物、水果和其他植物组织中糖苷的作用也进行了讨论。后来 Winterhalter 和 Schreier 的综述则主要致力于类胡萝卜素衍生的芳香化合物的分类,即所谓 C_{13} 的去甲基类异戊二烯。大多数 C_{13} 的去甲基类异戊二烯挥发性化合物几乎都是从糖苷前体衍生的,这一认识强烈地促进了这一领域的研究活动。在该综述中还给出了到 1993 年为止出现的 C_{13} -糖苷和它们的化学组成,以及它们作为风味前体的作用。

1993 年 Williams 和他的同事也对风味前体领域的研究进行了综述。综述中重点强调了前体的出现、组成、反应活性和分析,并讨论了与糖苷酶应用相关的问题和对前体水解物感官研究的需要。Gunata 等人总结了在葡萄酒的制作中,从葡萄的糖苷物质中进行风味开发时酶的作用。但是,文中所进行的分析并不是只对葡萄酒制作的,它对于所有其他用酶来释放糖苷结合的挥发性化合物,以增强风味的应用都是同样有价值的。

第二节 前体的分析方法

糖苷类芳香化合物的前体通常是从植物萃取物、水果、果汁和葡萄酒中分离得到的,具体是采用 C_{18} -反相吸附剂或 Amberlite XAD-2 树脂进行选择性的吸附,然后用乙醇或甲醇将留在吸附剂或树脂上的糖苷解析下来(见图 2-1)。

一旦得到了前体的浓缩物,可从事两方面的研究。一是在酶和酸水解后对得到的糖苷配基进行 HRGC-MS 分析。但如果需要确定单个糖苷缩合物的结构,则必须进行更全面的研究。由于糖苷萃取物的非均一性和复杂性,通常需要采用一整套复杂的色