

米渣酱油多菌种制曲工艺研究

戴德慧¹, 黄光荣¹, 蒋家新², 胡伟莲^{1,*}

(1. 浙江科技学院生化学院, 浙江 杭州

310012 2. 中国计量学院, 浙江 杭州

310018)

摘 要: 本研究以红曲霉、米曲霉、黑曲霉为菌种, 以米渣、麸皮为原料, 进行混合制曲, 通过对制曲过程中糖化酶和酸、中性蛋白酶活力的变化分析, 确定了混合菌种发酵米渣的最佳菌种配比、接种量及制曲时间, 得出: 米渣接入红曲霉培养 4d 后, 最佳接种量及菌种配比为 5% 米曲霉 + 5% 黑曲霉混合菌种, 制曲时间为 2d。并通过四因素三水平正交设计方法确定了最佳 pH、初始水分含量、原料配比、温度等制曲条件, 其结果是: 温度为 31℃; 米渣: 麸皮 = 6: 4; 初始水分含量为 35% 及 pH 为 5, 在此条件下, 糖化酶为 4212U/g 干曲, 酸、中性蛋白酶活力分别为 2130U/g 干曲及 2521U/g 干曲。

关键词: 米渣; 混合制曲; 红曲霉; 酶活分析

Study on Mixed Strains Culture Technology of Rice Dredgs Sauce

DAI De-hui¹, HUANG Guang-rong¹, JIANG Jia-xing², HU Wei-lian^{1,*}

(1. Department of Biology and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou

310012, China

2. China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Rice dregs and wheat bran were used as raw materials. *Monascus ruber*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* were adopted as culture strains. The optimal strains match, inoculum size and culture time were confirmed by analyzing the changes of diastatic enzyme activity, neutral protease activity and acid protease activity. 5% *Aspergillus oryzae* and 5% *Aspergillus niger* were both inoculated for two days after inoculated by *Monascus ruber* for four days. Then, the optimum culture pH, culture temperature, original moisture content and raw material match were obtained by orthogonal experiment. The optimal results were: culture temperature 31℃, ratio of rice dregs to wheat bran 6 to 4, original moisture content 35% and pH 5. On these optimum conditions, the diastatic enzyme activity arrives at 4212U/g dry encymic dregs, the acid protease activity is 2130U/g dry encymic dregs and the neutral protease activity is 2521U/g dry encymic dregs.

Key words rice dregs; mixed culture; *Monascus ruber*; enzyme activity analysis

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0234-04

我国是大米的主要生产国, 在大米加工制造饴糖、葡萄糖等淀粉糖生产或味精生产过程中, 有大量米渣被废弃或作为饲料^[1], 其中蛋白质含量达到 35%~45%。高于纯大米 3~5 倍, 其蛋白质含量与豆粕大致相当, 因此, 可以替代豆粕作为调味品发酵的原料, 大大提高大米的综合利用效益, 同时减少环境污染, 降低调味品生产成本。

目前, 国内酱油生产工艺一般采用米曲霉作为单菌种制曲, 酶系较为单一, 如果将红曲霉、黑曲霉等菌种应用到酱油酿造工艺中, 利用三种菌种在酶系组成上的互补优势, 可以改善调味品风味和提高原料利用率。同时利用红曲霉在培养过程中可产生天然色素, 各种有机酸、酯、醇以及多种生理活性物质, 能提高酱油色

价, 同时赋予产品的降脂, 降压等多种保健功能^[2-4]。

本文利用红曲霉、米曲霉、黑曲霉等多菌种混合发酵米渣, 旨在得出提高糖化酶、蛋白酶的最佳菌种组合方式及制曲条件, 为进一步改善酱油风味, 酿制新型红曲保健酱油打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

红曲霉(*Monascus ruber*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) 本实验室保藏。

1.1.2 主要原料

收稿日期: 2006-02-09

*通讯作者

作者简介: 戴德慧(1976-), 男, 讲师, 主要从事应用微生物研究。

米渣 杭州味精厂; 麸皮 杭州酿造食品总厂。

1.1.3 主要仪器

SW-CJ-1F型超净工作台 苏净集团安泰公司; DHZ-DA型恒温电热培养箱 太仓市实验设备厂; CS101Z型电热鼓风干燥箱 重庆实验设备厂; SCA210型电子天平 上海医疗器械三厂。

1.1.4 主要培养基

土豆汁培养基: 马铃薯200ml, 蔗糖20g, 琼脂15~20g, 水1000ml, pH自然。

麦芽汁培养基: 麦芽汁5~6°BX, 琼脂1.8%~2.0%, pH6.4。

发酵培养基: 米渣、麸皮配以不同的比例。

1.2 方法

1.2.1 水分的测定

水分的测定采用105℃恒温法^[5]。

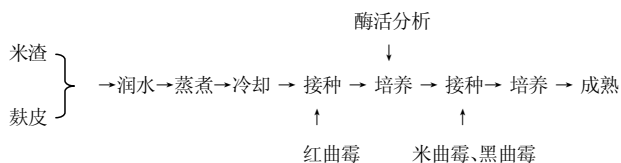
1.2.2 蛋白酶活力测定

蛋白酶活力测定采用福林试剂法^[6]。

1.2.3 糖化酶活力测定

糖化酶活力测定采用费林试剂法^[7]。

1.2.4 工艺流程



1.2.5 主要工艺条件

原料配比: 米渣: 麸皮=6:4。

润水: 80℃热水, 水分控制40%左右。

冷却接种: 37℃左右, 接入5%红曲霉, 30℃培养4d后, 分别接入不同配比的米曲霉及黑曲霉。

培养: 31℃培养, 每隔8h摇瓶一次。

酶活分析: 接种米曲霉、黑曲霉后每隔24h测定一次糖化酶及酸、中性蛋白酶。

1.2.6 正交试验确定各制曲条件对糖化酶和酸、中性蛋白酶活的影响

选定温度、原料配比、初始水分含量、pH等四个因素做四因素三水平正交试验, 各因素水平见表1。

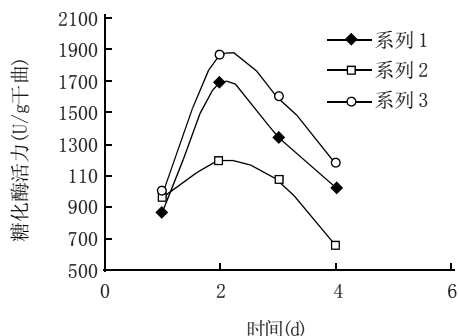
表1 因素水平表
Table 1 Table of factors and levels

因素	水平		
	1	2	3
温度(℃)	28	31	34
原料配比(米渣:麸皮)	5:5	6:4	7:3
初始水分含量(%)	35	45	55
pH	3	5	7

2 结果与分析

2.1 制曲时间及菌种搭配对糖化酶活力的影响

米渣与麸皮以6:4作为发酵培养基, 经灭菌后, 接入5%的红曲霉, 30℃培养4d后, 再分别接入5%米曲霉、5%黑曲霉及2.5%米曲霉和2.5%黑曲霉的混合菌种, 31℃培养, 每隔8h摇瓶一次, 培养4d, 每隔2h测定糖化酶及酸、中性蛋白酶活力。其结果如图1、2、3。



系列1. 红曲霉培养4d后, 接入5%的米曲霉; 系列2. 红曲霉培养4d后, 接入5%的黑曲霉; 系列3. 红曲霉培养4d后, 接入2.5%的米曲霉+2.5%黑曲霉, 下同。

图1 制曲时间及菌种搭配对糖化酶活力的影响
Fig.1 Effects of culture time and strains match on diastatic enzyme activity

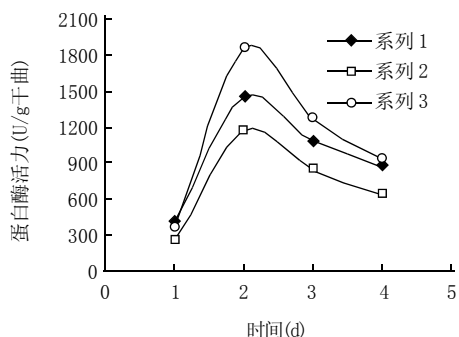


图2 制曲时间及菌种搭配对中性蛋白酶活力的影响
Fig.2 Effects of culture time and strains match on neutral protease activity

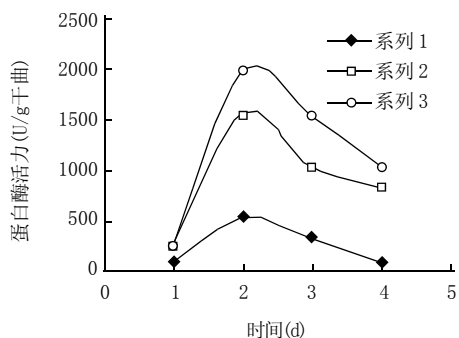


图3 制曲时间及菌种搭配对酸性蛋白酶活力的影响
Fig.3 Effects of culture time and strains match on acid protease activity

由图1、2、3可知,制曲时间及菌种搭配对糖化酶和酸、中蛋白酶活力的影响较大。随着时间的延长,糖化酶、蛋白酶活力渐渐增大,至第2 d 酶活力达到最高,随后减少;红曲霉、米曲霉、黑曲霉混合菌种制曲有着明显的优势,糖化糖、蛋白酶的产量均高于其它组别。因此,菌种搭配选择为红曲霉、米曲霉、黑曲霉混合菌种,制曲时间选择为接种米曲霉、黑曲霉混合菌种后制曲2 d。

红曲霉生长较慢,且红曲色素及生理活性物质均在制曲后期产生,因此,在制曲工艺中,红曲霉先培养4 d,再接种米曲霉和黑曲霉。

2.2 接种量对糖化酶和酸、中性蛋白酶活力的影响

米渣与麸皮以6:4作为发酵培养基,经灭菌后,接入5%的红曲霉,30℃培养4d后分别接入2.5%米曲霉和2.5%黑曲霉、5%的米曲霉和5%的黑曲霉及7.5%米曲霉和7.5%黑曲霉,培养48h后测定糖化酶及酸、中性蛋白酶活力,其结果见图4。

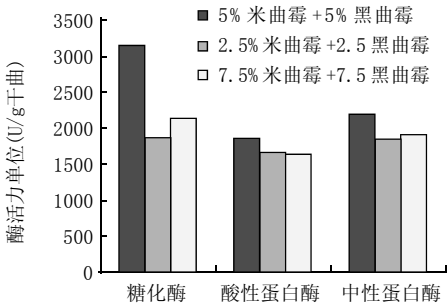


图4 接种量对糖化酶及酸、中性蛋白酶活力的影响

Fig.4 Effects of inoculum size on diastatic enzyme activity, neutral protease activity and acid protease activity

由图4可知,接种量对糖化酶和酸、中性蛋白酶活力的影响较大,曲料接入5%红曲霉培养4d后,再接入5%米曲霉+5%黑曲霉,糖化酶和酸、中蛋白酶活力最高。

接种量多少与酶活力有很大关系,接种量过少,菌丝生长缓慢,培养周期延长,产酶量减少;而接种量过多,虽达到产酶高峰时间缩短,但因营养物质过早被耗尽,酶活力不高,因此适当提高接种量有利于提高酶活力。

2.3 正交试验确定各制曲条件对蛋白酶活力的影响

由表3、图5可知,对糖化酶活力影响因素大小依次为温度,初始水分含量,原料配比及pH,对蛋白酶活力影响因素大小依次为温度,pH,初始水分含量及原料配比。由此可知,对三种酶活力影响最大的因素是温度,并且31℃优于28℃及34℃,这反应出温度是糖化酶及酸、中性蛋白酶合成的重要条件,选取适当的温度可以提高三种酶活力。

pH是影响蛋白酶活力的第二大因素,pH为3~5时有利于酸性蛋白酶的合成,而pH为5~7时则有利于菌体合成中性蛋白酶,综合两者,pH确定为5,能得到较高的两种蛋白酶活力,并且此条件下糖化酶活力为最高。

降低初始水分含量可能会提高三种酶活力,但初始水分含量太低,曲料太干,红曲生长会受较大影响,因此初始水分含量定为35%。

为了满足发酵调味品质量要求,原料配比应考虑原料蛋白的含量,米渣含量越高,蛋白含量越高,但米渣含量过高,不利于三种酶的合成,而原料配比为

表2 正交试验酶活力测定结果

Table 2 Results of enzyme activities by orthogonal test designs

实验号	温度(℃)	原料配比(米渣:麸皮)	初始水分含量	pH	糖化酶活力(U/g干曲)	酸性蛋白酶活力(U/g干曲)	中性蛋白酶活力(U/g干曲)
1	28	5:5	35	3	3155.47	1962.24	804.06
2	28	6:4	45	5	3370.58	1244.32	1323.17
3	28	7:3	55	7	2400.66	730.55	985.15
4	31	5:5	45	7	3194.03	1765.27	2307.32
5	31	6:4	55	3	3197.72	2143.43	1346.47
6	31	7:3	35	5	4106.38	1907.14	1815.28
7	34	5:5	55	5	1881.19	641.28	676.54
8	34	6:4	35	7	3433.87	830.33	1249.57
9	34	7:3	45	3	1070.27	882.65	500.93

表3 正交试验极差分析结果

Table 3 Analysis results of orthogonal test range

指标	糖化酶活力(U/g干曲)				酸性蛋白酶活力(U/g干曲)				中性蛋白酶活力(U/g干曲)			
	温度(℃)	原料配比	初始水分含量	pH	温度(℃)	原料配比	初始水分含量	pH	温度	原料配比	初始水分含量	pH
K ₁	2975.5	2743.6	3565.2	2474.5	1312.4	1456.2	1566.6	1662.7	1037.5	1262.6	1289.6	883.8
K ₂	3499.4	3334.1	2544.9	3119.4	1938.6	1406.0	1297.4	1264.2	1823.0	1306.4	1377.1	1271.7
K ₃	2128.4	2525.8	2493.2	3009.5	784.8	1173.4	1171.8	1108.7	809.0	1100.5	1002.7	1514.0
R	1370.9	808.3	1072.1	644.9	1153.8	282.8	394.8	554.1	1014.0	205.9	374.4	630.2

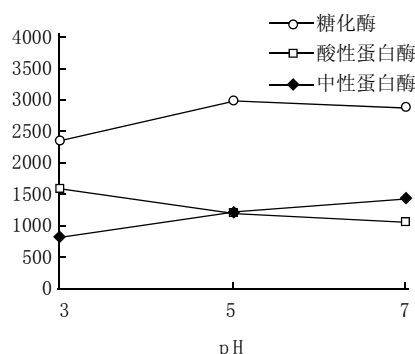
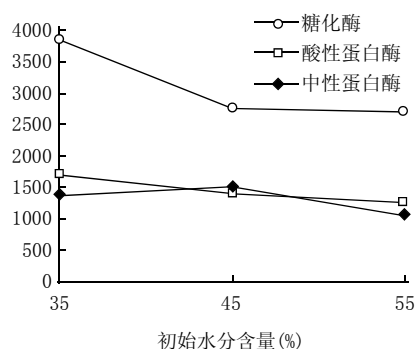
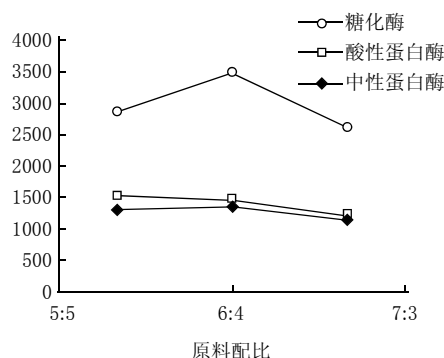
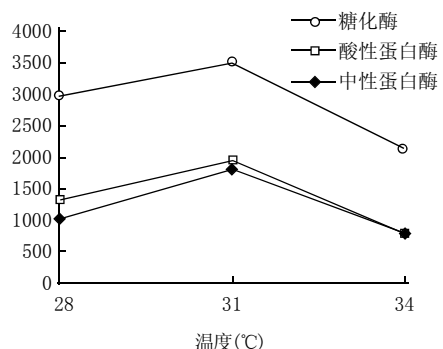


图5 正交试验极差直观分析图

Fig.5 Intuitionistic analysis of orthogonal test range

6:4(米渣:麸皮), 三种酶活力均较高。

综合以上分析, 最佳制曲条件为温度为 31 °C, 原料配比(米渣:麸皮)=6:4, 初始水含量为 35%, pH5。

2.4 最佳条件下糖化酶、酸、中性蛋白酶测定结果及与传统米曲霉制曲工艺对比

在上述实验得出的最佳条件下, 测得曲料中糖化酶活力为 4202U/g 干曲。酸性蛋白酶活力为 2130U/g 干曲, 中性蛋白酶活力为 2521U/g 干曲。与传统米曲霉制曲工艺相比, 糖化酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶有不同程度的提高(见表 4)。

表 4 米渣制曲工艺与传统米曲霉制曲工艺酶活对照
Table 4 Enzyme activation comparison between culture technology from rice dregs and tradition culture technology

	米渣多菌种制曲工艺	传统米曲霉制曲工艺
糖化酶(U/g干曲)	4202	2311
酸性蛋白酶(U/g干曲)	2130	312
中性蛋白酶(U/g干曲)	2521	2235

注: 传统米曲霉制曲工艺数据来源于杭州酿造行业大曲的平均值。

酿造调味品的甜味主要来源于淀粉等多糖类物质水解的还原糖, 鲜味主要来源于蛋白质降解的游离氨基酸, 色泽主要来源于还原糖与氨基酸之间的美拉德反应, 因此糖化酶、蛋白酶活力的高低直接影响酿造调味品的营养、风味及色泽。通过多菌种混合制曲及制曲条件的优化, 能明显提高曲料中糖化酶、蛋白酶的含量, 为进一步开发品质较优的调味品打下基础。

3 结 论

3.1 菌种搭配选择为红曲霉、米曲霉、黑曲霉混合菌种, 制曲时间选择为接种米曲霉、黑曲霉混合菌种后制曲 2 d。

3.2 曲料接入红曲霉制曲 4 d 后, 接入 5% 米曲霉+5% 黑曲霉, 糖化酶及酸、中蛋白酶活力最高。

3.3 通过正交试验得出, 温度对糖化酶和酸、中性蛋白酶活力影响最大。最佳制曲条件为 31 °C, 原料配比(米渣:麸皮)=6:4, 初始水含量为 35%, pH5。在此条件下糖化酶活力为 4202U/g 干曲, 酸性蛋白酶活力为 2130U/g 干曲, 中性蛋白酶活力为 2521U/g 干曲。

参考文献:

- [1] 邱雁临, 曾莹, 夏服宝. 两种曲霉发酵米渣生产酱油的研究[J]. 中国调味品, 1997(4): 4-6.
- [2] 郭爱莲, 戴德慧, 蒋家新. 新型功能性红曲调味品的研究[J]. 食品科学, 2002(7): 80-84.
- [3] ENDO A. Compaction(ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase[J]. J Med Chem, 1985, 28: 401-405.
- [4] KONO I, HIMENO K. Antimicrobial activity of monascus pilosus IF04520 against contaminant of Koji[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63 (8): 1494-1496.
- [5] 李多伟, 尉亚辉, 王义潮, 等. 生物技术实验与仪器操作指南[M]. 西安: 西北大学出版社, 1996: 12-14.
- [6] 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生物化学技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979: 61-63.
- [7] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 311-315.