

米曲霉 1228 制曲条件的优化及酱油酿造的研究

刘晓蓉^{1,2}, 谭才邓^{1,2}, 陈小冰¹, 张惠惠¹

(1. 广东轻工职业技术学院食品系, 广东广州 510300)

(2. 广东高校特色调味品工程技术开发中心, 广东广州 510300)

摘要: 以米曲霉 1228 为发酵菌种, 豆粕和麸皮为原料制曲, 通过单因素试验和正交试验, 优化制曲工艺条件; 采用低盐固态发酵工艺, 进行酱油酿造试验。结果表明: 豆粕与麸皮以 6:4 配比, 采用 90%加水量和 0.5%接种量制曲 32 h, 成曲的中性蛋白酶酶活为 1473 U/g; 发酵 20 d 后, 测得酱油的氨基酸态氮含量为 6.90 mg/mL, 可溶性无盐固形物含量为 163.60 mg/mL, 酱油色泽棕红, 酱香浓郁。

关键词: 米曲霉 1228; 蛋白酶; 制曲; 酱油

文章篇号: 1673-9078(2013)2-291-293

Optimization Conditions of Koji Making by *Aspergillus oryzae* 1228 and Study on Soy Sauce Brewing

LIU Xiao-rong^{1,2}, TAN Cai-deng^{1,2}, CHEN Xiao-bing¹, ZHANG Hui-hui¹

(1. Dept. of Food, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China) (2. Centre of Guangdong Higher Education for Engineering and Technological Development of Speciality Condiments, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Using soya bean meal and wheat bran as material, *Aspergillus oryzae* 1228 was selected for koji making. By single factor test and orthogonal experiment, the optimum processing conditions of koji making were obtained. The brewing experiment of soy sauce was conducted by low-salt solid-state fermentation. The best conditions were as follows: soya bean meal to wheat bran ratio 6:4, water content 90%, inoculating scale 0.5% and koji making for 32 h. Under the optimized conditions, the neutral protease activity in koji was 1473 U/g. After 20 days for fermentation, the contents of amino acid nitrogen and soluble saltless solid were 6.90 mg/mL and 163.60 mg/mL respectively in the soy sauce. The soy sauce showed good flavor and color.

Key words: *Aspergillus oryzae* 1228; protease; koji making; soy sauce

酱油是以豆、麦等粮食为主要原料, 经过米曲霉酶的作用, 发酵水解生成多种氨基酸及各种糖类, 形成具有特殊色、香、味、体的调味品。目前我国酱油生产企业, 大部分仍沿用已有 40 年历史的沪酿 3.042 米曲霉制曲发酵, 生产周期短, 制曲管理容易, 但存在单菌种制曲酶系不全、酶活力低、原料蛋白利用率低等缺点^[1]。因此, 如何选择更优良菌株提高原料利用率, 降低生产成本是酱油行业长期以来的奋斗目标^[2]。

本实验对米曲霉 1228 的制曲工艺条件及其在酱油酿造中的应用进行了探讨, 旨在为提高原料利用率, 改善酱油风味, 并应用于工业化生产提供理论参考。

1 材料与方 法

收稿日期: 2012-10-09

基金项目: 广东高校特色调味品工程技术开发中心建设项目 (GCZX-B1103)
广东轻工职业技术学院科技项目 (KJ2011126)

作者简介: 刘晓蓉 (1973-), 女, 副教授, 研究方向为食品生物技术

1.1 材料与试剂

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 1228, 本实验室保存; 豆粕、麸皮, 市售; 福林-酚试剂, 上海源聚生物科技有限公司; 其余分析试剂均采用国产分析纯。

1.2 仪器与设备

723C 型可见光分光光度计, 上海欣茂仪器有限公司; PHS-3C 型酸度计, 上海申安医疗器械厂; PW/10-002 电热恒温培养箱, 重庆实验设备厂; LDZX-40BI 型立式自动压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程

种曲、面粉混合

↓

豆粕、麸皮→破碎→润水→蒸料→冷却→接种→制曲→成曲→拌盐水→发酵→淋油→加热→半成品。

1.3.2 操作要点

豆粕用沸水浸泡 3 h 后, 与麸皮以一定比例混合均匀, 于 0.1~0.15 MPa 压力下蒸煮 40 min。原料出锅后倒入无菌铝盘中, 打碎结块, 迅速冷却至 40 °C, 接入三角瓶种。种曲先与适量面粉拌匀, 再和豆粕、麸皮混合均匀。曲料接种后摊平, 厚度 2~3 cm。制曲过程中控制室温为 28~30 °C, 品温为 30~32 °C, 品温最高不超过 35 °C。制曲 18 h 后进行第一次翻曲、补水, 补水量为 30%~45%; 22 h 进行第二次翻曲^[3]。当曲料表面着生黄绿色孢子并散发曲香时即出曲^[4]。将成曲装于 1000 mL 的三角瓶内, 缓慢加入 15 °Bé55 °C 的热盐水, 盐水量为原料总量的 65%。待盐水逐渐渗入曲料内, 在酱醅表层加盖 1 cm 厚的食盐, 三角瓶用塑料膜封口。置于 45 °C 恒温箱内保温发酵, 10 d 后翻醅一次, 发酵 20 d。在成熟酱醅中加入原料总重量 3 倍的沸水, 60~70 °C 水浴 15 h, 放出得酱油。

1.3.3 测定方法

1.3.3.1 蛋白酶酶活的测定

采用福林-酚法^[5]。在 40 °C 和 pH=7.5 条件下, 1 min 水解蛋白质产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量, 定义为 1 个蛋白酶活力单位。

1.3.3.2 可溶性无盐固形物的测定^[5]

(1) 总固形物的测定: 将 10% 酱油稀释液 5.00 mL 在 98~100 °C 下烘至恒重, 称重。

(2) 食盐的测定: 取 10% 酱油稀释液 5.00 mL, 以 10% 铬酸钾为指示剂, 用 0.1 mol/L 硝酸银滴定。

可溶性无盐固形物含量=总固形物含量-食盐含量

1.3.3.3 全氮的测定^[5]

取 2.00 mL 酱油经浓硫酸消化, 蒸馏出的氨用盐酸标准溶液滴定。

1.3.3.4 氨基酸态氮的测定

甲醛滴定法^[5]。

1.3.3.5 还原糖的测定

采用斐林氏法^[6]。

1.3.3.6 总酸的测定

按照 GB/T12456-2008 总酸的测定方法。以酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定。

2 结果与分析

2.1 制曲时间对蛋白酶的影响

本试验中, 豆粕与麸皮以 7:3 的比例混合, 在 80% 加水量、0.5% 接种量条件下制曲, 测定不同制曲时间各成曲中性蛋白酶的酶活, 结果见图 1。

翻曲后米曲霉菌丝会大量繁殖, 分子孢子开始着生, 制曲 18 h 后为产酶高峰期; 菌丝繁殖的最适温度为 30~35 °C, 产酶的最适温度为 (30±2) °C^[7]。因

此, 本试验在制曲过程中, 前期品温控制在 30~35 °C 之间, 后期品温为 28~32 °C。由图 1 可知, 制曲 28 h 后, 中性蛋白酶活力开始下降; 制曲时间以 24~32 h 为宜。

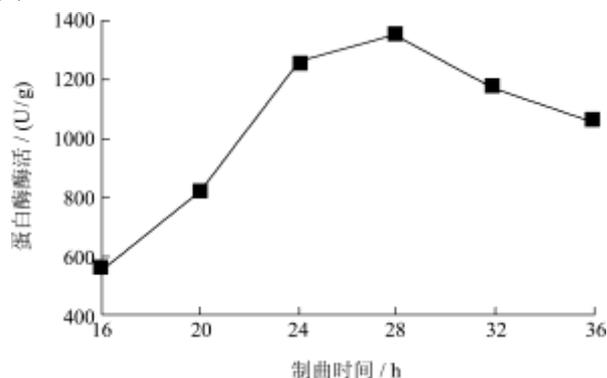


图 1 制曲时间对蛋白酶的影响

Fig.1 Effect of koji-making time on protease activity

2.2 原料配比对制曲的影响

酱油生产中, 原料豆粕和麸皮的配比差异较大。本试验中, 豆粕与麸皮分别以 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7 的比例混合, 在 80% 加水量、0.5% 接种量条件下分别制曲 28 h, 测定酶活, 结果见图 2。

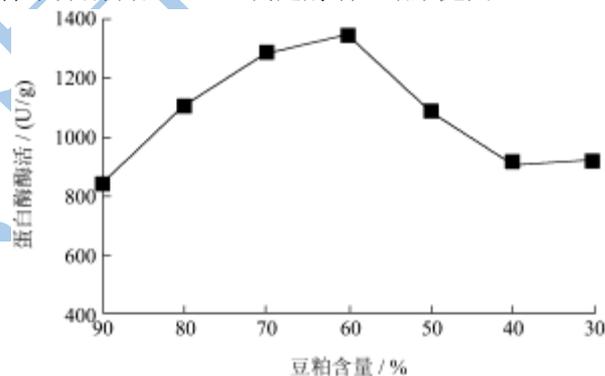


图 2 豆粕含量对蛋白酶的影响

Fig.2 Effect of soya bean meal content on protease activity

由图 2 可知, 豆粕含量为 60% 时中性蛋白酶的酶活最高, 豆粕含量 70% 的酶活稍低。表明适量的麸皮有利于酶活的提高, 因为制曲时适量的淀粉原料, 能促进米曲霉菌丝的粗壮、浓厚生长。淀粉原料也有利于提高产品品质, 因为菌体本身富含的蛋白质, 能提高产品的氨基酸含量; 淀粉水解的六碳糖既能改善酱油的红褐色泽及光亮度, 也能为酵母所利用, 产生风味物质^[7]。

2.3 加水量对制曲的影响

在前述试验基础上, 豆粕与麸皮以 6:4 配比, 分别以 60%、70%、80%、90%、100%、110% 和 120% 的含水量制曲 28 h, 测定接种后各熟料中的水分含量以及成曲蛋白酶活力, 结果见图 3。

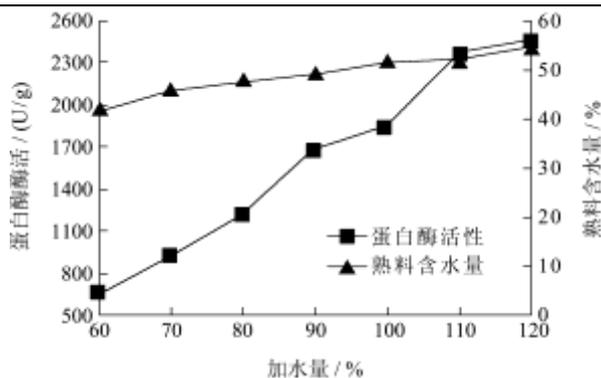


图3 加水量对制曲质量的影响

Fig.3 Effect of water content on koji quality

由图3可知,原料加水量过低,不利于中性蛋白酶的分泌;随着加水量的增大,蛋白酶活性不断增强。在试验过程中发现,加水量过高的曲料易粘结、通气不畅,甚至发粘、发臭,说明曲料加水量太高,易滋生杂菌。当前生产企业制曲,熟料(接种后)水分含量以46%~50%为宜^[8]。由此可见,80%和90%的加水量能满足制曲要求。

2.4 接种量对制曲的影响

原料豆粕与麸皮以6:4配比,加水量为90%,分别采用0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%和1.0%的接种量制曲28h,测定产酶量,结果见图4。

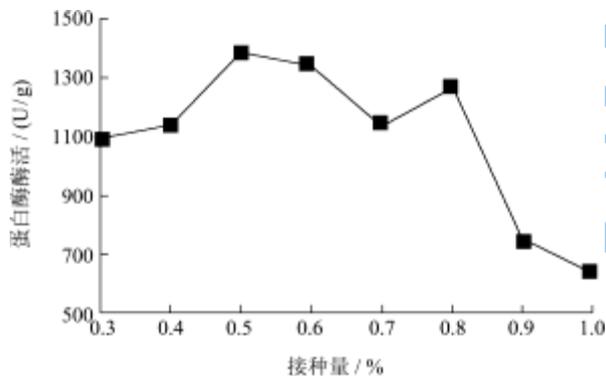


图4 接种量对蛋白酶的影响

Fig.4 Effect of inoculating scale on protease activity

由图4可知,接种量不大时,酶活随接种量的增大而增强;接种量为0.5%时,成曲的中性蛋白酶酶活最高,达1380 U/g;接种量为0.6%时,其酶活性稍低。接种量过大,会引起米曲霉供氧不足、营养物质消耗过快,影响后期孢子的成熟,从而导致产酶量降低。

2.5 制曲工艺条件的优化

根据前面的单因素试验结果,选用L₉(3⁴)表进行正交试验,正交试验结果见表1。

由表1可知,影响成曲蛋白酶活性最大的因素是加水量,其次是接种量,制曲时间和原料配比对酶活的影响程度相同;从理论上分析,制曲的最佳组合为A₃B₂C₂D₂,即制曲的最优工艺条件是:豆粕与麸皮以

6:4 配比、90%加水量、0.5%接种量、制曲30h。

表1 正交试验结果与分析

Table 1 Results and analysis of orthogonal experiment

试验号	A(制曲时间/h)	B(原料配比)	C(加水量/%)	D(接种量/%)	中性蛋白酶酶活/(U/g)
1	1(24)	1(7:3)	1(80)	1(0.4)	865
2	1	2(6:4)	2(90)	2(0.5)	1323
3	1	3(5:5)	3(100)	3(0.6)	1210
4	2(28)	1	2	3	1242
5	2	2	3	1	1194
6	2	3	1	2	1157
7	3(32)	1	3	2	1295
8	3	2	1	3	1226
9	3	3	2	1	1219
K ₁	3398	3402	3248	3278	
K ₂	3593	3743	3784	3775	
K ₃	3740	3586	3699	3678	
k ₁	1133	1134	1083	1093	
k ₂	1198	1248	1261	1258	
k ₃	1247	1195	1233	1226	
R	114	114	178	165	

由于正交试验优化的最佳组合不在设计的9个组合之列,因此对最优组合A₃B₂C₂D₂进行验证试验。3次平行试验所得成曲的平均酶活为1473 U/g,细菌总数为3.7×10⁸ cfu/g,说明正交试验优化结果可行。

2.6 酱油酿造试验

以米曲霉1228为发酵菌种,低盐固态发酵20d后,淋油。测定酱油的各项理化指标,结果见表2。

表2 酱油的理化指标

Table 2 Physiochemical indexes of soy sauce

测定项目	测定结果
无盐固形物/(10 ⁻² g/mL)	16.36
全氮/(10 ⁻² g/mL)	1.36
氨基酸态氮/(10 ⁻² g/mL)	0.69
还原糖/(10 ⁻² g/mL)	3.64
总酸/(10 ⁻² g/mL)	1.24
食盐/(10 ⁻² g/mL)	15.2
比重/°Bé	23.2
pH值	4.7

由表2可知,酱油的氨基酸态氮含量为6.90 mg/mL,计算得出氨基酸生成率为50.7%。酱油色泽以鲜亮的棕红色为主,略有光泽,酱香浓郁,无不良气味,咸味适口,口感佳。

3 结论

米曲霉 1228 以豆粕和麸皮为原料制曲的最适条件为: 豆粕与麸皮以 6:4 配比、在 90% 加水量、0.5% 接种量条件下制曲 32 h, 所得成曲的平均酶活为 1473 U/g。低盐固态发酵 20 d 后淋油, 测得酱油中氨基酸生成率为 50.7%, 可溶性无盐固形物含量为 163.6 mg/mL, 酱油呈鲜亮的棕红色, 略有光泽, 酱香浓郁, 咸味适口。本试验说明米曲霉 1228 是一株有应用前景的酱油生产菌株。

参考文献

- [1] 靳文生. 酱油多菌种制曲改善酶系组成的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(8): 977-979
- [2] 林祖申. UE336-2 米曲霉应用于酱油生产的研究[J]. 中国酿

造, 2003, 4: 24-26

- [3] 陈春香. 酱油种曲的培养. 中国调味品[J], 2009, 34(8): 71, 84
- [4] Bernard F Gibbs, Alexandre Zougman, Robert Masse, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food [J]. Food Research International. 2004, 37: 123-131
- [5] 刘长春. 生物产品分析与检验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 140-145, 238-239, 253-255
- [6] 吴俊明. 食品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 243-245
- [7] 林祖申. 米曲霉制曲过程中酶活性变化及其工艺优化[J]. 中国酿造, 2007(5): 56-59
- [8] 林祖申. 酱油生产技术问答[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000