

淀粉原料焙炒对酱油制曲的影响

崔春, 欧阳珊, 尹文颖, 任娇艳, 赵海锋, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究以小麦、面粉为淀粉原料, 采用焙炒技术, 在最佳焙炒时间下分别比较经焙炒处理的小麦、面粉与未经处理的小麦、面粉对酱油成曲的蛋白酶活、氨基酶活、淀粉酶活、纤维素酶活和氮溶指数 (NSI) 等理化指标的影响。同时, 通过测定酱油大曲酶解液的总糖转化率和蛋白回收率, 筛选最佳焙炒时间。实验表明, 小麦、面粉的最佳焙炒时间均为 20 min, 在此条件下, 焙炒处理对酱油成曲酶系及理化指标的影响较大。经焙炒的小麦所制成曲较生小麦成曲在中性蛋白酶活、氨基酶活、纤维素酶活、孢子数和 NSI 分别提高了 13.06%、12.58%、9.92%、37.04% 和 10.46%; 经焙炒的面粉所制成曲较生面粉成曲在中性蛋白酶活、氨基酶、纤维素酶活、孢子数和 NSI 分别提高了 32.88%、28.17%、18.07%、13.04% 和 10.79%; 但小麦、面粉焙炒后, 酱油成曲淀粉酶活略有降低。综上, 小麦和面粉的焙炒处理均对成曲的酶系增强及理化指标的提高有一定的促进作用。

关键词: 淀粉原料; 焙炒; 酱油成曲; 酶活

文章编号: 1673-9078(2013)8-1911-1915

Effect of Roasted Starch on Soy Sauce Koji-making

CUI Chun, OU Yang-shan, YIN Wen-ying, REN Jiao-yan, ZHAO Hai-feng, ZHAO Mou-ming

(College of Light industry and Food Science, South China University of Technology, Guang zhou 510640, China)

Abstract: In this study, wheat and flour were chosen as raw starch materials to investigate the effect of roasting on soy sauce koji-making. Indexes including activities of protease, aminopeptidase, amylase and cellulose enzyme, NSI and other physiochemical indexes were compared between kojis of the roasted wheat and original wheat, as well as between that of the roasted flour and original flour. All the comparisons were conducted under the optimum roasting time, which was determined by conversion rate of total sugars and protein recovery of kojis hydrolyzates. The optimum roasting time for both wheat and flour was 20 min, under which the enzyme systems and physiochemical indexes of kojis were well influenced. The activities of protease, aminopeptidase and cellulose enzyme, spore and NSI of koji gained from roasted wheat increased by 13.06%, 12.58%, 9.92%, 37.04% and 10.46%, respectively when compared with that from original wheat. The activities of protease, aminopeptidase, cellulose enzyme, spore and NSI of koji gained from roasted flour were increased by 32.88%, 28.17%, 18.07%, 13.04% and 10.79%, respectively. The amylase activities of kojis cultivated with roasted wheat and flour both decreased a little. In conclusion, the use of both the roasted wheat and flour can improve the quality of kojis, thus starch material roasting can be an alternative way to improve the enzyme systems and physiochemical indexes of kojis.

Key words: starch material; roasting; soy sauce koji; enzyme activity

酱油是我国、日本等亚洲国家的重要传统调味品^[1], 不仅味道鲜美、营养丰富, 且含有多种生理活性成分^[2], 在西方餐饮界也越来越受人们青睐。酱油酿造主要包括酱油制曲和酱醪发酵两个重要阶段^[3-4], 其中制曲的主要目的是利用米曲霉等微生物在曲料上生长繁殖而获得酱油酿造时所需的蛋白酶、淀粉酶等各种水解酶类, 为后期酱醪发酵奠定物质基础。淀粉原

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家 863 计划课题 (2012AA021302); 国家自然科学基金项目 (31201416); 中央高校基金 (2012ZM0074); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2011BAD23B01)

作者简介: 崔春 (1978-), 男, 副教授, 从事蛋白质化学与工程, 食品生物技术等方面的研究工作

料是酱油生产的主要原料之一, 一般以小麦粉和面粉为主。在酱油制曲过程中, 淀粉原料可为米曲霉、乳酸菌、酵母等微生物生长提供碳源, 其代谢产物醇、醛、酯、酚、有机酸和呋喃酮等还是构成酱油香气的重要成分^[5-6]。高盐稀态酿造工艺因酿造温度低、后发酵充分、酱油风味醇厚鲜香, 已被众多厂家作为高档酱油的生产工艺。在高盐稀态酿造工艺中使用的淀粉原料多为生面粉, 而日本一直采用焙炒后的小麦^[7-8]。据报道, 小麦和面粉焙炒后, 香气突出, 以之为碳源进行制曲, 具有成曲酶活力高、杂菌少、酱油酱色深等优点^[9]。而目前国内不同碳源对酱油制曲的影响已有较多研究^[10-11], 但探讨淀粉原料焙炒工艺对酱油制曲的影响研究鲜见报道。

本实验以小麦、面粉为淀粉质原料进行酱油制曲；利用高温加速水解技术研究小麦、面粉不同焙炒时间对酱油大曲原料利用率的影响，从而筛选最佳焙炒工艺，并在此基础上研究淀粉焙炒处理对酱油大曲蛋白酶活、氨肽酶活、淀粉酶活、纤维素酶活、孢子数、固形物损失率、NSI、氨基酸转化率等理化指标的影响，旨在为酱油发酵代谢调控提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

大豆、面粉、小麦均为市售；炒小麦、炒面粉，实验室自行炒制；曲精（沪酿 3.042 孢子粉），孢子发芽率≥80%，孢子数≥300 亿/克干基，水分≤10%。

1.2 仪器与amp;设备

A1430 霉菌培养箱，上海智城分析仪器制造有限公司；LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌锅，上海申安医疗器械厂；THZ-82A 恒温振荡器，常州澳华仪器有限公司；UV-2100 型分光光度计，Unico(上海)仪器有限公司；KDN-2C 定氮仪，上海新嘉电子有限公司；GL-21M 高速冷冻离心机，长沙湘仪离心机仪器有限公司；Tim840 自动电位滴定仪，雷迪美特公司。

1.3 试验方法

1.3.1 制曲流程

大豆清洗除杂，温水浸泡 6~8 h，125 ℃下蒸煮 12 min，冷至 40 ℃左右，按 4:1（以干物质算）的比例分别与焙炒 0 min、10 min、20 min、30 min 的小麦粉（60 目过筛）、面粉混合拌匀，接入酱油曲精（0.05%），平铺在各个曲盘，放入霉菌培养箱中培养，44 h 后取出，冷藏备用。

1.3.2 酱油大曲酶解液的制取

分别称 25 g 不同焙炒时间的小麦、面粉大曲（40 目过筛），以料液比 1:6 加去离子水摇匀，置于 55 ℃恒温振荡器内水解，24 h 后，换至 90 ℃下继续水解 2 h，酶解完毕，沸水浴灭酶，离心（6000 r/min，20 min），取上清液 102 定性滤纸过滤，滤液待测。

$$\text{总糖转化率} = \frac{\text{酶解液总糖} \times \text{酶解液质量}}{\text{成曲总糖} \times \text{成曲质量}} \times 100\%$$

$$\text{蛋白回收率} = \frac{\text{酶解液总氮} \times \text{酶解液质量}}{\text{成曲总氮} \times \text{成曲质量}} \times 100\%$$

1.3.3 总氮的测定

凯氏定氮法，参照 GB/T5009.5-2003 测定。

1.3.4 总糖的测定

苯酚硫酸法，参照 GB/T15672-2009 测定。

1.3.5 大曲蛋白酶活力测定

福林酚法，参照 SB/T1037-1999 测定。

1.3.6 大曲氨肽酶活力的测定^[12]

以 L-亮氨酸对硝基苯胺为底物，在 45 ℃、pH 值为 8 的条件下，每分钟水解生成 1 μg 对硝基苯胺所需酶量，定义为一个酶活力单位。

1.3.7 大曲淀粉酶活力的测定

DNS 法，参照张艳芳^[3]的方法进行测定。酶活力定义：在 40 ℃、pH 为 6.5 的条件下，每分钟水解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖，定义为 1 个淀粉酶活力单位。

1.3.8 大曲纤维素酶活力的测定

在张艳芳^[3]的方法上进行改进，以羧甲基纤维素钠为底物，在 50 ℃、pH 5.0 的条件下，每分钟水解释放 1 μg 葡萄糖所需酶量，定义为一个酶活力单位。

1.3.9 大曲理化指标的测定

孢子数参照 SB/T10315-1999 测定；干物质损失率，参照 GB5009.3-2010 测定；NSI、氨基酸转化率和挥发性盐基氮含量均参照欧阳珊^[4]的方法测定。

2 结果与分析

2.1 焙炒时间对酱油成曲酶解液总糖、总氮的

影响

表 1 焙炒时间对成曲酶解液的影响

Table 1 Effect of starch roasting time on the quality of the hydrolyzates

焙炒时间/min	总糖转化率/%		蛋白回收率/%	
	面粉	小麦	面粉	小麦
0	56.28±1.37	54.84±1.14	67.60±0.65	71.10±0.63
10	62.08±0.76	59.50±0.64	69.74±0.31	73.19±0.26
20	63.31±0.79	64.41±0.78	71.53±0.80	75.46±0.67
30	52.23±1.50	57.89±1.18	68.93±0.62	68.89±0.53

酱油大曲酶解是指成曲在一定的料液比和温度条件下，利用米曲霉制曲时产生的各种酶系直接水解曲料自身的过程。它不仅与成曲综合酶活力有关，还与曲料中淀粉质和蛋白质是否易被酶解有关。小麦、面粉焙炒后，水分含量减少，且淀粉结构松散，不仅制曲时有利于米曲霉的生长繁殖，在发酵水解阶段，淀粉也易被淀粉酶作用生成可溶性糖分。如表 1 所示，随着小麦、面粉焙炒时间的增加，成曲酶解液的总糖转化率和蛋白回收率均呈上升趋势，且在焙炒 20 min 时均达最大值，其中小麦、面粉成曲酶解液的总糖转

化率分别提高 17.45%和 12.49%，蛋白回收率分别提高 6.13%和 5.81%。焙炒 30 min 后，小麦粉、面粉水分含量过低（约为 0.2%），质地稀松，不利于对蒸熟大豆的附着，导致小麦粉、面粉大量聚集，而聚集的小麦粉、面粉水分含量过低，并不利曲霉的生长和覆盖，因此大曲酶解液中总糖转化率和蛋白回收率均明显降低。综上，选定小麦、面粉焙炒 20 min 后进行制曲培养。

2.2 小麦、面粉焙炒对酱油大曲蛋白酶活的影响

响

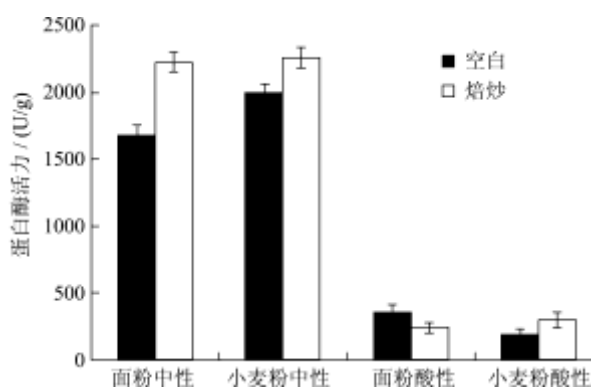


图 1 焙炒对大曲蛋白酶活的影响

Fig.1 Effect of roasted starch on the protease activity of kojis

蛋白酶是酱油酿造的关键酶类，其作用是将大豆中大分子量的蛋白质分解成小分子蛋白、多肽和氨基酸。由于酱油发酵的 pH 为 4~7，所以中性、酸性蛋白酶的作用较为显著。研究表明^[15]，小麦焙炒后淀粉糊化和美拉德产物的生成能提高全小麦成曲的蛋白酶活力。由图 1 可知，未烘焙的小麦粉和面粉与大豆混合进行制曲，其成曲中性蛋白酶活力分别为 2000.73 U/g、1677.64 U/g，焙炒后，酱油成曲的中性蛋白酶活力明显增加，较未烘焙成曲分别提高了 13.06%和 32.88%。小麦和面粉焙炒处理对酸性蛋白酶活变化幅度影响不一；烘焙处理对添加了面粉的酱油大曲而言，其酸性蛋白酶活力下降，对添加了小麦粉的酱油大曲而言，其酸性蛋白酶活力上升。这与徐宁^[9]等研究不同，其中原因可能与实验淀粉原料焙炒程度有关。

2.3 小麦、面粉焙炒对酱油大曲氨肽酶活的影响

响

在酱油发酵过程中，肽酶是水解多肽生成游离氨基酸的重要酶类，其中以氨肽酶贡献最大，并与甲醛滴定氮和谷氨酸形成有着直接的关系，特别是亮氨酸氨肽酶与谷氨酸的生成直接相关^[16]。本实验以亮氨酸

对硝基苯胺为底物测定酱油成曲的氨肽酶活力。如图 2 所示，焙炒前后，小麦成曲氨肽酶活力均高于面粉的氨肽酶活，这可能与小麦粉中麸皮含量较高有关，因为麸皮是培养基中影响氨肽酶高产菌株选育的首要因素^[12]。小麦、面粉焙炒后，酱油成曲氨肽酶活分别达到 1296.83 U/g、1019.59 U/g，较未经烘焙处理的酱油成曲提高了 12.58%和 28.17%，可见淀粉原料焙炒对酱油大曲氨肽酶活力的提高具有一定的作用。

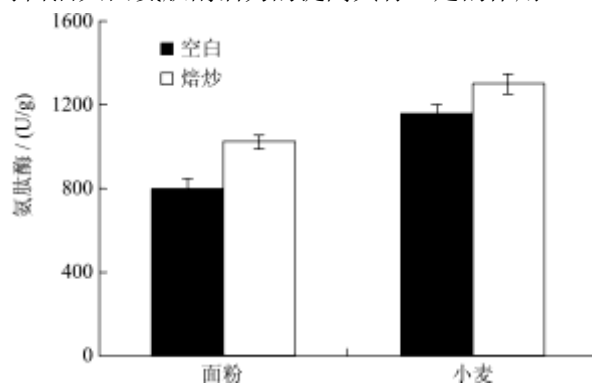


图 2 焙炒对成曲氨肽酶活的影响

Fig.2 Effect of roasted starch on the aminopeptidase activity of kojis

2.4 小麦、面粉焙炒对酱油大曲淀粉酶活的影响

响

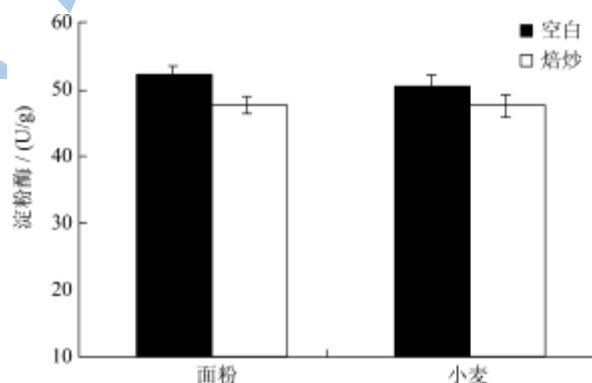


图 3 焙炒对酱油成曲淀粉酶活的影响

Fig.3 Effect of roasted starch on the amylase activity of kojis

淀粉酶是酱油成曲中的主要酶系之一，它可使原料中的淀粉糖化，其降解产物不仅可给酱醅发酵阶段中酵母、乳酸菌等微生物生长提供碳源，而且还是酱油甜味的主要成分之一。米曲霉产生的淀粉酶有 α -淀粉酶， β -淀粉酶、糖化酶和异淀粉酶，在分解淀粉原料过程中，这些酶既单独作用，又协同作用，最终将大分子淀粉水解为葡萄糖、麦芽糖、极限糊精等小分子糖类。本实验中测定的是综合淀粉酶活力，结果如图 3 所示。小麦、面粉焙炒后，成曲淀粉酶活力下降，分别为 47.48 U/g、47.68 U/g，较未烘焙的酱油成曲分

别降低了 6.13%和 9.15%，且淀粉酶是诱导酶，产酶与制曲中淀粉原料密切相关，小麦、面粉焙炒后，淀粉经高温破坏，对米曲霉淀粉酶的诱导能力减弱，因此大曲淀粉酶活力下降，这也与徐宁^[6]等研究一致。

2.5 小麦、面粉焙炒对酱油大曲纤维素酶活的影响

纤维素酶能够催化水解纤维素分子，生成葡萄糖，是酱油成曲中重要的植物崩裂酶类；它可以溶解破坏大豆、脱脂大豆、麸皮、小麦等曲料的植物细胞壁，使原料中的蛋白质、淀粉更易溶出和水解。但酱油成曲中纤维素酶活力普遍较低，如图 4 所示，生小麦的大曲纤维素酶活力为 180.56 U/g，生面粉成曲的纤维素酶活力略高，为 144.04 U/g；小麦、面粉焙炒后，大曲纤维素酶活力均有所提高，分别提高了 9.92%和 18.07%，但提高后的大曲纤维素酶活力仍在 200 U/g 以内，与张艳芳研究中的纤维素酶活力值相差较大，这与曲霉菌种及纤维素酶活定义有关。有报道指

出，目前使用的米曲霉 3.042 菌株植物崩裂酶系活力不足，在酱油酿造过程中，往往添加纤维素酶制剂来提高蛋白利用率和酱油还原糖含量。

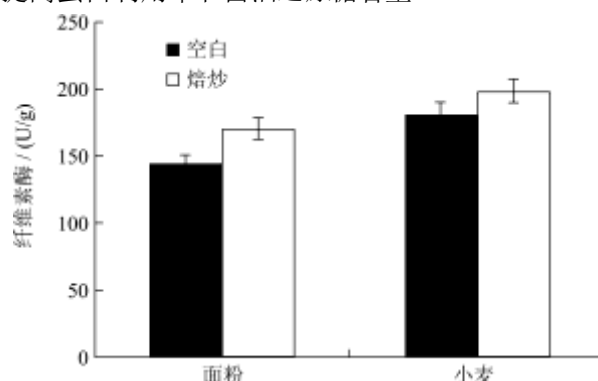


图 4 焙炒对酱油成曲纤维素酶活的影响

Fig.4 Effect of roasted starch on the activity of cellulose enzyme in soy sauce kojis

2.6 小麦、面粉焙炒对酱油成曲理化指标的影响

表 2 小麦、面粉焙炒对酱油成曲理化指标的影响

Table 2 Effect of roasted starch on the physiochemical indexes of kojis

理化指标	孢子数×10 ⁹ 个/g(干基)	固形物 损失率/%	NSI /%	氨基酸 转化率/%	挥发性盐基氮 10 ⁻² g/g(干基)
小麦	1.08±0.07	14.60±0.45	27.43±0.69	12.56±0.47	0.21±0.02
小麦焙炒	1.48±0.09	16.75±0.05	30.30±0.64	13.23±0.82	0.18±0.01
面粉	1.15±0.00	11.90±0.50	26.24±0.37	11.56±0.33	0.26±0.01
面粉焙炒	1.30±0.01	14.96±0.55	29.07±0.81	12.66±0.16	0.22±0.02

如表 2 所示，小麦、面粉经焙炒后，酱油成曲孢子数均增加，较未烘焙成曲，分别提高 37.04%和 13.04%，但焙炒前后，小麦和面粉酱油成曲孢子的数量级均在 10⁹。碳源是米曲霉产孢子的速率限制性底物，小麦、面粉焙炒后，淀粉糊化，为米曲霉生长提供更易利用的碳源，且焙炒后小麦蛋白质变性，更适于米曲霉生长繁殖，故大曲孢子数均增加。炒小麦、炒面粉成曲固形物损失率随孢子数的增加也同步上升，较未焙炒成曲分别提高 14.73%和 25.71%，这是由于米曲霉生长繁殖需要糖分和氨基酸为养料，并通过呼吸作用将糖分分解为二氧化碳和水，同时产生大量的热，因此制曲过程碳水化合物的损耗量较大，且随着产孢子数增多，固形物损失率在一定程度上也会相应地增加。NSI 和氨基酸转化率分别是评价大曲中可溶性氮和游离氨基酸占总氮比例的指标，它与成曲蛋白酶和氨肽酶活高低有关。由表可知，小麦、面粉焙炒后，NSI 和氨基酸转化率同步提高，较未烘焙成曲，均分别提高 3 个百分点和 1 个百分点左右，与小

麦、面粉焙炒成曲蛋白酶活和氨肽酶活力提高步调一致。这是因为制曲过程中米曲霉分泌的蛋白酶和肽酶能将曲料中大分子蛋白分解成小分蛋白、多肽和氨基酸，从而增加大曲中可溶性氮和氨基酸含量，故大曲 NSI 和氨基酸转化率同时上升。挥发性盐基氮是评价大曲杂菌繁殖程度的简易指标，小麦、面粉焙炒后，挥发性盐基氮含量下降，这可能与淀粉原料焙炒后水分含量减少，从而可吸附熟大豆表面浮水抑制大曲表面杂菌繁殖有关。

3 结论

随着小麦、面粉焙炒时间的增加，成曲酶解液的总糖转化率和蛋白回收率均呈先升后降的趋势，并在 20 min 出现最大值，故小麦、面粉的最佳焙炒时间均为 20 min。在此条件下，经焙炒的小麦、面粉所制成曲的蛋白酶活、氨肽酶活、纤维素酶活、NSI 均有提高，较未经焙炒的小麦、面粉所制的成曲，蛋白酶活分别提高了 13.06%和 32.88%，氨肽酶活分别提高了

12.58%和 28.17%，纤维素酶活分别提高 9.92%和 18.07%，NSI 分别提高 10.46%和 10.79%，但淀粉酶活力略有下降。可见小麦和面粉的焙炒处理对酱油成曲的影响步调一致，对成曲的酶系增强及理化指标的提高均有一定的促进作用，且面粉的焙炒处理效果较为明显。

参考文献

- [1] Yin-zhuo Yan, Yu-lin Qian, Feng-di Ji, et al. Microbial composition during Chinese soy sauce Koji-making based on culture dependent and independent methods [J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 189-195
- [2] Ying Li, Haifeng Zhao, Mouming Zhao, et al. Relationships between antioxidant activity and quality indices of soy sauce: an application of multivariate analysis [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45: 133-139
- [3] Yun-zi Feng, Chun Cui, Hai-feng Zhao, et al. Effect of koji fermentation on generation of volatile compounds in soy sauce production [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2013, 48(3): 609-619
- [4] Yasushi Tananka, Jun Watanabe, Yoshinobu Mogi. Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Food Microbiology, 2012, 31(8): 100-106
- [5] Hamada T, Sugishita M, Fukushima Y, et al. Continuous production of soy sauce by a bioreactor system [J]. Process Biochemistry, 1991, 26(1): 39-45
- [6] Fukushima D. Fermented vegetable (soybean) protein and related foods of Japan and China [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(3): 357-362
- [7] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 中国轻工业出版社, 2011
- BAO Qi-an. Soy Sauce Science and Brewing Technology [M]. China Light Industry Press, 2011
- [8] Bull S, Yong F, Wong H. The production of aroma by *Aspergillus oryzae* during the preparation of soy sauce koji [J]. Food Chemistry, 1985, 17(4): 251-264
- [9] 徐宁, 孙娟, 赵丽云, 等. 淀粉原料对酱油制曲酶系的影响研究[J]. 中国酿造, 2011, 11: 79-82
- XU Ning, SUN Juan, ZHAO Liyun, et al. The effect of different starch material on enzyme system of soy sauce starter-making [J]. China Brewing, 2011, 11: 79-82
- [10] 杨兰, 赵谋明. 外加营养物质对酱油种曲孢子数和成曲酶活力的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 297-300
- YANG Lan, ZHAO Mou-ming. Effects of Nutrient Addition on Number of *Aspergillus oryzae* Spores in Seed Koji and Neutral Protease Activity in Soy Sauce Koji [J]. Food Science, 2009, 30(21): 297-300
- [11] 倪海晴, 陶文沂. 添加剂对成曲酶活性和酱油质量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(1): 82-85.
- NI Hai-qing, TAO Wen-yi. The Effects of Additives on the Enzyme Activity of *Aspergillus oryzae* Koji and the Quality of Soy Sauce [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(1): 82-85
- [12] 吴庆勋. 氨基酶高产菌的选育及发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学, 2006
- WU Qing-xun. Breeding on Aminopeptidase-producing Strains and Optimization of Its Fermentation Conditions [D]. Wu Xi: Jiang Nan University, 2006: 15-18
- [13] 张艳芳. 多菌株制曲促进酶系优化与提高酱油质量的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009
- ZHANG Yan-fang. Study on Optimizing Enzyme System by Using Multi-strains during Koji Making and Improving Quality of Soy Sauce [D]. Wu Xi: Jiang Nan University, 2009
- [14] 欧阳珊, 冯云子, 徐欢欢. 酱油制曲过程中蛋白质的降解规律的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 195-197, 339
- OU YANG Shan, FENG Yun-zi, XU Huan-huan. Study on protein degradation rules during soy sauce koji-making [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 195-197, 339
- [15] 黄婵媛, 崔春, 赵谋明. 米曲霉全小麦制曲条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 88-91
- HUANG Chan-yuan, CUI Chun, ZHAO Mou-ming. Study on Optimization of Whole Wheat Koji-making Conditions of *Aspergillus oryzae* [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(4): 88-91
- [16] Alexander M B, Tony B, Kimberly M B, et al. A non-specific aminopeptidase from *Aspergillus* [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2000, 1480: 171-181