

米曲霉和乳酸菌混合制曲对小麦大曲制曲效果的影响

崔春, 彭皖皖, 任娇艳, 赵海锋, 苏国万, 赵谋明

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了米曲霉和乳酸菌混合制曲(KR)及米曲霉单独制曲(KP)条件下, 小麦大曲中菌落总数、中性蛋白酶活力、酸性蛋白酶活力、总酸以及发酵液品质, 探讨了多菌种制曲的可行性, 以期为高品质小麦基调味料的生产提供理论指导。研究结果表明: KR工艺中小麦大曲的乳酸菌和霉菌均繁殖良好, 12 h时乳酸菌达到了 4.15×10^8 cfu/g, 乳酸菌的繁殖对霉菌的生长有一定的抑制效果; 米曲霉和乳酸菌混合制曲比米曲霉单独接种制曲效果好, 制曲48 h时, KR工艺所得到的大曲中性和酸性蛋白酶与米曲霉纯种制曲相比, 分别提高了22.79%和22.26%; KR大曲发酵液的全氮含量、氨基酸态氮含量均高于KP工艺, 发酵60 d时KR发酵液的游离氨基酸含量高于KP, 其中谷氨酸含量明显提高, 对比KP工艺提高了24.21%, 具有更明显的鲜味口感。

关键词: 小麦面筋蛋白; 曲霉; 乳酸菌; 氨基酸

文章编号: 1673-9078(2014)5-156-160

Effects of *Aspergillus oryzae* and *Lactic acid bacteria* Mixture on Wheat Koji-making

CUI Chun, PENG Huan-huan, REN Jiao-yan, ZHAO Hai-feng, SU Guo-wan, ZHAO Mou-ming

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The total bacterial count, neutral protease activity, acid protease activity, total acid and the quality of fermented liquid in separated koji-making by *Aspergillus oryzae* (KP) and mixed koji-making by *Aspergillus oryzae* and *Lactic acid bacteria* (KR) were measured in this paper. The feasibility of multi-strains for koji-making was discussed to provide theoretical guidance for high quality of wheat tasty substance. The results showed that lactic acid bacteria and fungi grew well in KR system, and the count of lactic acid bacteria was reached 4.15×10^8 cfu/g after 12 h, while the growth of lactic acid bacteria had inhibitory action on fungi growth; the effect of mixed koji-making was better than separated koji-making in all respects. The neutral protease activity and acid protease activity of KR after 48 h fermentation were increased by 22.79% and 22.26% compared to KP, respectively. The total nitrogen content and amino acid nitrogen content in KR fermentation liquor were more than those in KP. However, the free amino acid content in KR system was more than that in KP after 60 days fermentation. Especially, glutamic acid was improved by 24.21%, making the fermentation liquid more obvious umami taste.

Key words: wheat gluten; *Aspergillus*; *Lactic acid bacteria*; amino acids

制曲是生产中国传统发酵制品如酱油、豆豉等的关键工序, 其目的在于使曲霉充分繁殖, 产生丰富的酶系(如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等), 这些酶类对发酵制品的风味和品质有重要作用^[1]。然而采用单一菌种制曲的工艺存在大曲酶活力不高、发酵后酿造液的全氮、氨基态氮以及谷氨酸含量不高等缺点。近年来, 采用多菌种制曲能提高大曲的酶活力、发酵液氨基酸利用率的研究越来越多的被报道, 如李大锦等^[2]研究利用黑曲霉 AS3.350 与米曲霉 AS3.042 混合制

收稿日期: 2013-05-03

基金项目: 国家自然科学基金(31201416); 国家 863 计划课题(2012AA021302, 2012AA092104); 中央高校基本科研业务基金项目(2012ZM0074)

作者简介: 崔春(1978-), 男, 副教授, 主要从事食品生物技术方面研究

曲, 成曲的酸性蛋白酶活力提高了 2 倍。徐欢欢等^[3]利用糖化增香曲和米曲霉混合制曲, 发现酱油的全氮、氨基酸态氮提高了 12% 和 14%。

乳酸菌(LAB)能将原料中的糖类转化成大量有机酸, 并将原料中的有机酸转变成其他有机酸。在酱油酿造过程中适当地接种乳酸菌, 对于提高酱油的风味有良好的作用^[4]。目前对于乳酸菌的研究大部分集中在发酵过程中添加, 用于改善酱油风味^[5]。

小麦面筋蛋白是属于小麦子粒中的储藏蛋白, 是小麦淀粉生产过程中的一种副产品。小麦面筋蛋白的蛋白质含量高, 富含的谷氨酰胺、脯氨酸, 占 35~40%^[6], 是制备高品质调味料的优质原料。Schlichtherle 和 Amado^[7]等利用风味蛋白酶对小麦面筋蛋白酶解后得到鲜味明显和苦味低的酶解液。廖兰

等^[8]利用胰酶研究也得到了类似的结论。这些商业酶处理后的小麦面筋蛋白酶解液具有明显的鲜味,可以开发作为呈味基料,但商业蛋白酶价格昂贵,酶解蛋白结构单一,使其酶解工业化道路受阻。微生物产酶具有价格低廉和酶系全面的特点,米曲霉和乳酸菌已广泛用于食品、饲料、酿酒等发酵工业。本文以小麦大曲的菌落总数、中性蛋白酶活、酸性蛋白酶活、总酸以及发酵液品质为指标,研究了米曲霉和乳酸菌混合制曲对小麦大曲制曲效果的影响。

1 材料与方 法

1.1 原料与试剂

小麦,市售;焙炒小麦,实验室自行炒制;小麦面筋蛋白,河南莲花味精集团;曲精,沪酿 3.042 米曲霉孢子粉,孢子发芽率 $\geq 80\%$,孢子数 $\geq 10^{10}/\text{g}$ 干基,水分 $\leq 10\%$;乳酸菌 CICC6064,购于中国工业微生物种保藏管理中心。MRS: CM187,北京路桥技术有限公司;孟加拉红培养基: CM164,北京路桥技术有限公司;纳他霉素: 08C04, DSM, 荷兰;福林酚、酪蛋白、 Na_2CO_3 、 HCl 、 H_2SO_4 、硒粉、 K_2SO_4 、硼酸、 NaOH 、甲醛、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、无水乙醇,分析纯。

1.2 主要仪器

霉菌培养箱, ZJP-A1230, 上海智城分析仪器制造有限公司; 超级洁净工作台, DL-CJ-1ND, 北京东联哈尔滨仪器制造有限公司; 电子分析天平, FA2004N, 上海精科; 立式压力蒸气灭菌锅, YXQ-LS-50S II, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; UV-2100 紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 酸度计, PHS-25, 上海雷磁仪器厂; 水浴恒温振荡器, SHZ-82, 金坛市恒丰仪器厂; 高速冷冻离心机, GL-21M, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 德国曼默博尔自动氨基酸分析仪, A300, 德国曼默博尔公司; $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜, Millipore 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 乳酸菌的活化及扩培

将乳酸菌接入装有培养基的 15×150 试管中,放入 $33\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中 3 d, 活化后将其接入装有培养基的 250 mL 三角瓶中,放入 $33\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 3 d, 计数得 4.28×10^{10} 个/mL。

1.3.2 高盐稀态小麦面筋蛋白发酵液的制备

正常发酵小麦面筋蛋白(KP表示)工艺:

全小麦焙炒 \rightarrow 粉碎 \rightarrow 润水 \rightarrow 造粒^[9] \rightarrow 接种 \rightarrow 定期取样测定大曲指标 \rightarrow 出曲 \rightarrow 添加小麦面筋蛋白和盐水(小麦面筋蛋白:大曲:盐水=1:1:5 ($m/m/m$), 18%盐水) \rightarrow 入发酵罐发酵 \rightarrow 发酵过程中取样后 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱贮藏 \rightarrow 测定发酵液指标

添加乳酸菌(KR表示)工艺:与正常发酵小麦面筋蛋白(KP表示)相比,在润水过程中,添加乳酸菌液(添加量为 2%)与水混合后对粉碎的全小麦进行润水后再造粒制曲,其余同 KP。

1.3.3 微生物检测方法

乳酸菌:采用 MRS 培养基进行培养并计数,在 $30\ ^\circ\text{C}$ 培养 2 d 到 3 d。倾倒入培养基之前按照 0.2% 的比例加入纳他霉素。

霉菌:采用孟加拉红选择性培养基进行培养计数,在 $28\ ^\circ\text{C}$ 培养 5 d。

1.3.4 蛋白酶活力的测定

采用福林酚比色法,参照 SB/T 蛋白酶活力定义:在 $40\ ^\circ\text{C}$, 一定 pH 值下每分钟水解酪蛋白产生 $1\ \mu\text{g}$ 酪氨酸,定义为 1 个蛋白酶活力单位(U, 干基)。

1.3.5 基本指标的测定

全氮按 GB/T 5009.5 规定的方法测定;氨基酸态氮按 GB/T 5009.39 规定的方法测定;总酸按 GB/T 5009.51 规定的方法测定。

1.3.6 游离氨基酸含量分析

取 4 mL 发酵 60 d 的小麦面筋蛋白发酵液,加入 1 mL 的 10% 磺基水杨酸,混匀后放置 $4\ ^\circ\text{C}$ 的冰箱中冷藏 60 min 后于 10000 r/min 下离心 15 min, 获得上清液。将上清液调至 pH 2.2 后经 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。取滤液 20 μL 上德国曼默博尔自动氨基酸分析仪 A300 分析。氨基酸被液相离子交换柱分离后和茚三酮反应,除了脯氨酸是在 440 nm 处测定吸光值,其余氨基酸的吸光值测量在 570 nm 处。

1.4 数据整理和分析

所有的试验均进行 3 次,数据采用平均数 \pm 标准差来表示,组间差别的判定采用方差分析方法。采用 SPSS 11.5 和 EXCEL 2003 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌对米曲霉制曲过程中的影响

2.1.1 制曲中添加乳酸菌对大曲菌落数的影响

制曲过程中的乳酸菌(LAB)菌落数和霉菌菌落数随时间的变化如图 1 所示,可以看出 KR 大曲中 LAB 初始值为 3.15×10^5 cfu/g, 在前 12 h 内大量繁殖,12 h 时显著增加到 4.15×10^8 cfu/g ($P<0.05$), 在制曲

后期生长趋于平衡。KP 工艺的 LAB 小于 10^3 cfu/g, 可能是自然落入的乳酸菌, 和 KR 相比忽略不考虑计入。霉菌数在制曲的前 24 h 的差异性不大, 在 36 h 后 KP 组的霉菌数显著高于 KR 组 ($P < 0.05$)。制曲 48 h 时, KP 大曲中霉菌数为 9×10^8 cfu/g, 是 KR 工艺的 1.10 倍。这表明制曲过程中接种乳酸菌可抑制大曲孢子的生长。

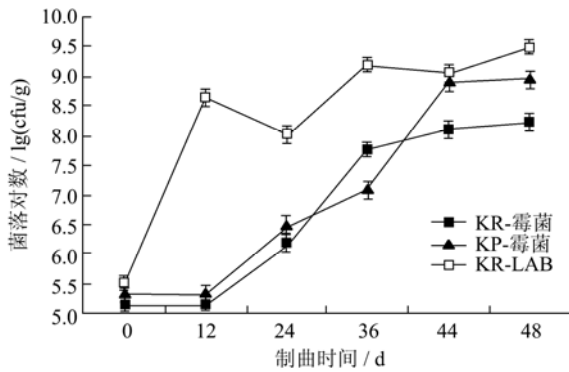


图1 制曲过程中大曲菌落数随时间的变化趋势

Fig.1 Changes of microbial counts of koji during koji-marking process

2.1.2 大曲蛋白酶活力比较

米曲霉固态发酵过程中可产生丰富的酶系, 包括系列酸性、中性和碱性蛋白酶, 它们的作用主要是将原料中蛋白质水解为小分子的肽类^[10]。在高盐稀态酱油酿造体系中对蛋白降解起主要作用的是中性蛋白酶和酸性蛋白酶^[11]。小麦大曲中, 中性蛋白酶活力和酸性蛋白酶活力随培养时间的变化见图 2 和图 3 所示。

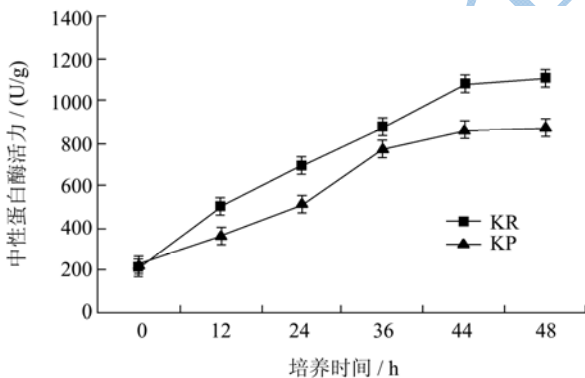


图2 制曲过程中中性蛋白酶活力的比较

Fig.2 Changes of neutral protease activity content during koji-making process

米曲霉的生长分为 4 个阶段: 孢子发芽期、菌丝生长期、菌丝繁殖期、孢子着生期。在制曲 24 h 内, 米曲霉生长处于菌丝生长及繁殖期, 肉眼可见曲料全部发白, 中性及酸性蛋白酶活力均较低。从 24 h 开始, 孢子着生, 蛋白酶分泌旺盛, 酶活力迅速升高, KR 和 KP 大曲的中性、酸性蛋白酶活力显著增加 ($P < 0.05$), 在 44~48 h 达到了最大值, 曲料呈现淡

黄色直至嫩黄绿色。制曲 48 h 时, KR 的中性和酸性蛋白酶活力分别为 1112 U/g 和 972 U/g, 比 KP 高 22.79% 和 22.26%。这种蛋白酶活力的提高可能是因为添加了乳酸菌使米曲霉生长处于更适宜分泌蛋白酶的 pH 状态下, 有利于蛋白酶的提高。这与徐高丹^[12]等人的研究结果相似, 他们发现添加 1.0~2.0% 的乳酸菌液产生的乳酸可抑制大曲中杂菌繁殖, 有利于成曲蛋白酶的提高。

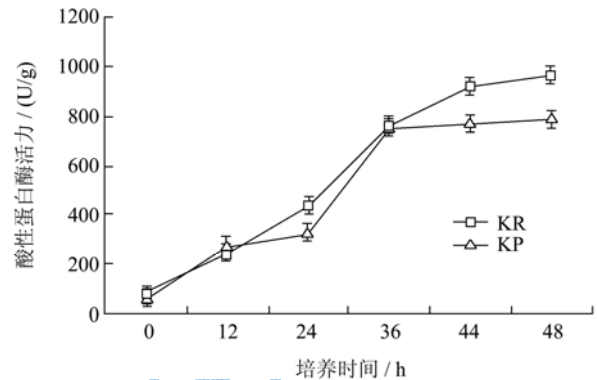


图3 制曲过程中酸性蛋白酶活力的比较

Fig.3 Changes of acid protease activity content during koji-making process

2.1.3 制曲中添加乳酸菌对大曲总酸的影响

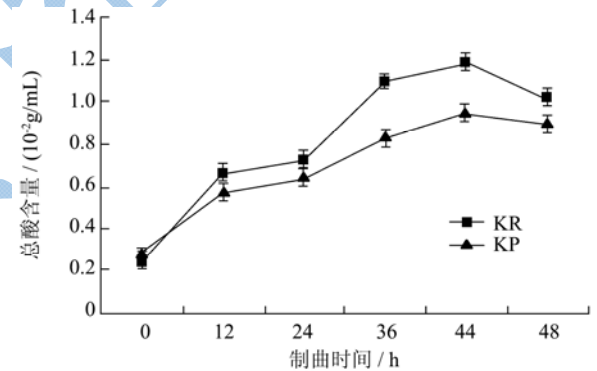


图4 制曲过程中总酸的变化

Fig.4 Changes of total acid during koji-marking process

制曲过程大曲的总酸随时间的变化如图 4 所示, 从图中可以看出制曲初期 KR 和 KP 的总酸含量接近, 这是因为制曲初期乳酸菌还没有大量繁殖。制曲 12~48 h, KR 的总酸含量显著高于 KP 的 ($P < 0.05$), 制曲结束时, KR 大曲的总酸含量为 1.02×10^{-2} g/mL, 比对照组 KP 高 14.38%。因为乳酸菌大量繁殖, 抑制芽孢杆菌的繁殖, 并且分解代谢产生乳酸, 生成更多的乳酸导致 KR 的总酸含量高于 KP 工艺。

2.2 乳酸菌对小麦面筋蛋白发酵过程中的影响

2.2.1 制曲中添加乳酸菌对后期发酵过程中的

全氮和氨基酸态氮的影响

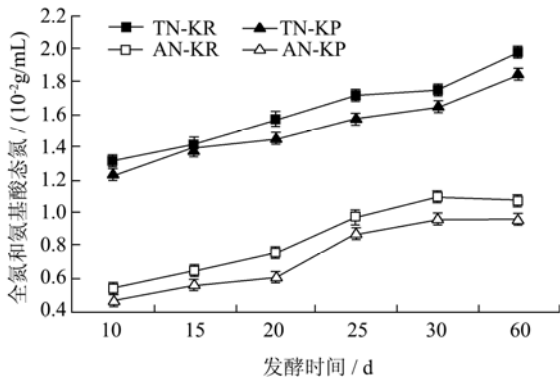


图5 发酵过程中全氮(TN)和氨基酸态氮(AN)的变化趋势

Fig.5 Changes of total nitrogen and amino nitrogen content during fermentation process

全氮和氨基酸态氮是衡量原料蛋白质利用率和氨基酸转化率的两个重要指标。混合制曲对小麦面筋蛋白发酵过程中全氮和氨基酸态氮的影响如图5所示。由图可知,发酵10d时,KR的全氮(TN,以氮计)和氨基酸态氮(AN,以氮计)分别为 1.31×10^{-2} g/mL和 0.54×10^{-2} g/mL是KP含量的1.07和1.17倍。发酵前30d KR和KP工艺的TN和AN都随着时间的增加而增加,且KR的TN和AN含量都显著高于KP(P<0.05)。发酵60d时KR的TN和AN分别为 1.97×10^{-2} g/mL和 1.07×10^{-2} g/mL,是KP的1.07和1.13倍。从可知添加乳酸菌的混合制曲对提高全氮含量和氨基酸态氮含量是有作用的。

2.2.2 制曲中添加乳酸菌对发酵液的游离氨基酸的影响

氨基酸阈值低,呈味强度大^[13-14],制曲中添加乳酸菌对发酵液的游离氨基酸组成和含量的影响如表1所示。KR和KP发酵60d时总游离氨基酸含量分别为93.24 mg/mL和78.49 mg/mL,KR工艺的游离氨基酸总量约为KP工艺的1.19倍,这与KR和KP工艺的菌种酶活力差异有很大关系。呈鲜味的游离氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸,鲜味氨基酸在KR和KP工艺中的含量分别为8.73 mg/mL和6.81 mg/mL,占总游离氨基酸的比例分别为9.35%和8.68%。其中谷氨酸在KR和KP中的含量分别为6.11 mg/mL和4.92 mg/mL,KR工艺的谷氨酸含量与KP工艺相比提高了24.21%。图中所检测的KR和KP两种工艺的19种游离氨基酸中,谷氨酰胺和脯氨酸是其中含量最高的两种游离氨基酸,谷氨酰胺在KR和KP工艺中的含量分别为12.41 mg/mL和10.94 mg/mL,脯氨酸在KR和KP工艺中的含量分别为12.73 mg/mL和10.03 mg/mL。这与酿造发酵原料小麦面筋蛋白中氨基酸成分相关^[6]。表中呈味氨基酸中所占比例最大,在KR

和KP工艺中分别占到了58.09%和58.76%。KR和KP两种工艺发酵液中,人体所必需的八种氨基酸Lys、Trp、Phe、Met、Thr、Ile、Leu、Val所占比例分别为41.36%和42.26%,富含丰富的必需氨基酸,这表明这两种发酵液作为呈味基料其营养价值都比较高。

表1 发酵液中游离氨基酸种类和含量(10⁻²mg/mL)

Table 1 Sorts and contents of free amino acids in the fermentation fluid

氨基酸	KP	KR	阈值 ^[14]
谷氨酸	491.79	610.91	30
天冬氨酸	188.82	261.66	100
鲜味			
小计	680.61	872.57	
占总氨基酸的比例/%	8.68	9.35	
组氨酸	169.05	220.3	20
精氨酸	516.35	558.75	50
缬氨酸	502.13	610.08	40
酪氨酸	166.46	168.17	nd
蛋氨酸	185.47	214.54	30
亮氨酸	721.93	864.15	190
苦味			
异亮氨酸	397.18	503.05	90
苯丙氨酸	764.69	880.41	90
脯氨酸	1002.85	1272.6	300
赖氨酸	185.72	135.36	50
小计	4611.86	4648.36	
占总氨基酸的比例/%	58.76	58.09	
丝氨酸	464.57	589.17	150
甘氨酸	241.19	306.72	130
丙氨酸	252.62	314.76	60
甜味			
苏氨酸	237.33	301.78	260
小计	1195.71	1210.65	
占总氨基酸的比例/%	15.24	16.2	
半胱氨酸	221.55	214.54	nd
色氨酸	45.3	55.57	
谷氨酰胺	1094.05	1241.46	
无味			
小计	1360.9	1511.57	
占总氨基酸的比例/%	17.34	16.36	
总计	7849.05	9323.98	

3 结论

3.1 米曲霉和乳酸菌的混合制曲可显著提高小麦大曲的中性、酸性蛋白酶活力,制曲48h时分别达1112

U/g 和 972 U/g, 较纯种制曲分别提高 26.79%和 22.26%。

3.2 米曲霉和乳酸菌的混合制曲可以显著提高发酵液的全氮、氨基酸态氮含量, 发酵 60 d 时较纯种制曲分别提高 6.77%和 12.83%。

3.3 米曲霉和乳酸菌的混合制曲可以显著提高小麦面筋蛋白发酵液的谷氨酸含量, 在发酵 60 d 时其含量达到了 6.11 mg/mL, 较纯种制曲提高了 24.21%, 增强了其口感的鲜味。检测 19 种游离氨基酸中, 谷氨酰胺和脯氨酸是其中含量最高的两种游离氨基酸。并且其总游离氨基酸含量, KR 工艺发酵 60 d 时较 KP 工艺提高了 18.98%。由此可见乳酸菌和霉菌的混合制曲提高了小麦大曲的制曲效果, 为高品质小麦基调味料的生产提供理论指导。

参考文献

- [1] Zhang Y F, Tao W Y. Flavour and taste compounds analysis in Chinese solid fermented soy sauce [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 8: 673-681
- [2] 李大锦,王汝珍.提高低盐固态发酵法酱油风味的实用技术(下)[J].中国调味品,2006,8:25-30
LI Da-jing, WANG Ru-zhen. Practical technologies to improve the low salt solid state fermentation of soy sauce flavor (below) [J]. China Condiment, 2006, 8: 25-30
- [3] 徐欢欢,欧阳珊,尹文颖,等.混合制曲对酿造酱油理化特性的影响[J].食品与发酵工业,2012,38(7):82-85
XU Huan-huan, OU Yang-shan, YING Wen-ying, et al. Study of the impact of the mixed-koji on the physical and chemical characteristics of brewing soy sauce [J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(7): 82-85
- [4] 杨汝德,潘力,郭迪.耐高渗透压乳酸菌在酱油酿造中的应用研究[J].现代食品科技,2005,21(4):37-40
YANG Ru-de, PAN Li, GUO Di. Study on lactic acid strain with high osmolality stress tolerance applying to brewing of soy sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(4): 37-40
- [5] 曹小红,刘卓,鲁梅芳,等.耐盐乳酸菌与酵母菌在酱醪汁中协同作用的研究[J].中国酿造,2009,3:12-15
CAO Xiao-hong, LIU Zhuo, LU Mei-fang, et al. Synergy of salt-tolerant lactic acid bacteria and yeast in the soy sauce mash [J]. China Brewing, 2009, 3: 12-15
- [6] Grosch W, Wieser H. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid [J]. Journal of Cereal Science, 1999, 29: 1-16
- [7] Synowiecki J, Al-khateeb N A A Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards [J]. Food Chemistry, 2000, 68: 147-152
- [8] Liao L, Liu T X, Zhao M M, et al. Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid [J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 123-130
- [9] 黄婵媛,崔春,赵谋明,等.小麦面筋蛋白的米曲霉蛋白酶系酶解特性研究[J].食品与发酵工业,2012,36(9):38-41
HUANG Chan-yuan, CUI Chun, ZHAO Mou-ming, et al. Research on wheat gluten enzymatic properties of aspergillus oryzae protease system [J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 36(9): 38-41
- [10] Quist E E, Phillips R D, Saalja F K. The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (*Arachis hypogaea* L) protein [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(10): 1717-1721
- [11] 李丹,崔春,王娅琴,等.高盐稀态酱油酿造过程中蛋白质降解规律的研究[J].食品与发酵工业,2010,9:24-28
LI Dan, CUI Chun, WANG Ya-qin, et al. Study on protein degradation rules during the fermentation of high-salt diluted soy sauce [J]. Food and Fermentation Industry, 2010, 9: 24-28
- [12] 徐高丹,蒋予箭,于佳清.pH 值及乳酸菌对米曲霉固态制曲过程的影响[J].食品与发酵工业,2011,7:73-76
XU Gao-dan, JIANG Yu-jian, YU Jia-qin. The Effects of pH and lactic acid bacteria on the process of aspergillus oryzae solid-state koji-making [J]. Food and Fermentation Industry, 2011, 7: 73-76
- [13] Lioe H N, Wada K, Aoki T, et al. Chemical and sensory characteristics of low molecular weight fractions obtained from three types of Japanese soy sauce (shoyu)-Koiku-chi, tamari and shiro shoyu [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1669-1677
- [14] Kirimura J, Shimizu A, Kimizuka A, et al. The contribution of peptides and amino acids to the taste of food stuffs [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1969, 17: 689-695
- [15] 宁正祥,赵谋明.食品生物化学[M].广州:华南理工大学出版社,1995
NING Zheng-xiang, ZHAO Mou-ming. Food biochemistry [M]. Guang ZhouZ: South China university of technology press, 1995