

纯种根霉麸曲制曲工艺优化研究

罗惠波^{1,2}, 谢 军^{1,2}, 黄治国^{1,2}, 边名鸿^{1,2}, 王大地^{1,2}, 杨文斌^{1,2}

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘 要:以高糖化酶活力根霉菌(RMD)为出发菌株,通过单因素试验、正交试验对浅盘制曲工艺条件进行优化,并与市售麸曲进行对比,结果表明:纯种根霉麸曲最佳培养条件为:糖壳添加量 6%、原料含水量 65%、培养温度 28 ℃、培养时间 36 h、培养湿度 $\geq 85\%$,在此条件下制得曲的试饭糖分含量显著优于市售麸曲。培养温度对纯种根霉麸曲的糖化能力具有极显著性影响,原料含水量对其具有显著性影响。

关键词:浅盘制曲;纯种根霉麸曲;正交试验

中图分类号:TS261.4

文献标志码:A

麸曲是以麸皮为原料,经蒸煮灭菌、冷却,接入纯种酿酒微生物,在人工控制下经培养、低温烘干而成的散曲^[1],其主要功能是提供大量的休眠酿酒微生物,其中最主要的是根霉菌和酵母菌。根霉菌含有丰富的淀粉酶,能将淀粉结构中的 $\alpha-1,4$ 键和 $\alpha-1,6$ 键切断,使淀粉较完全地转化为可发酵性糖,在酿酒过程中主要起糖化作用。根霉菌也具有一定的酒化酶活性,使整个发酵过程糖化和发酵连续进行,发酵较彻底,淀粉出酒率较高^[2]。

目前对制曲工艺的研究大多以实验室制曲为主,即三角瓶制曲,但实际生产中主要为浅盘制曲和通风制曲,制曲环境是开放的,制曲条件没有实验室规范,因为制曲的条件和工艺对微生物的生长及其发酵性能具有显著影响^[3],最终影响成品曲和白酒的质量,故应进一步对实验室开放环境制曲工艺进行研究,获得可以指导实际生产的可靠数据。

1 试验材料与方 法

1.1 试验材料

菌种:根霉菌(RMD)筛选自优质小曲,前期试验结果显示其糖化酶活力为 10 425 U/mL,由酿酒生物技术及应用四川省重点实验室提供。

麸曲:市售,麸曲 1(产自成都),麸曲 2(产自云南),麸曲 3(产自湖北),麸曲 4(产自泸州)。

1.2 试验仪器与设备

超净工作台(SJ-CJ-2D型,苏州苏洁净化设备有限公司)、恒温恒湿培养箱(GZ-250MSI刑,韶关市广智科技设备有限公司)、生化培养箱(PR205740RCN型, Thermo Scientitic)、紫外可见分光光度计(T6新世纪,北京普析通用仪器有限公司)。

1.3 试验试剂与溶液

3,5-二硝基水杨酸、标准葡萄糖溶液^[3]、1 mol/L NaOH、5 g/L 酚酞^[4]等(以上试剂均为分析纯(AR),购于成都科龙化工试剂厂)。

1.4 试验方法

纯种根霉麸曲制曲工艺流程如图 1 所示,本试验参照根霉 3.866 在川法麸曲中的应用研究^[5]相关结果,以实验室提供的根霉菌(RMD)为出发菌种,以试饭试验^[6]的糖分和酸度为指标,对纯种根霉麸曲浅盘制曲工艺中的糠壳添加量、原料含水量、培养温度、培养时间和培养湿度进行优化。

(1)三角瓶根霉种曲的制备

三角瓶根霉种曲的制备参考文献[4]。

收稿日期:2015-08-15

基金项目:酿酒生物技术及应用四川重点实验室项目(NJ2013-03)

作者简介:罗惠波(1969-),男,四川自贡人,教授,主要从事酒类发酵方面的研究,(E-mail)1036884458@qq.com

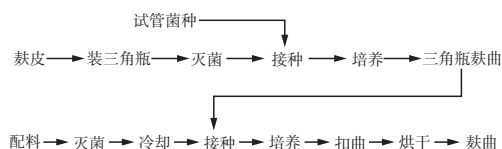


图1 纯种根霉麸曲制曲基本工艺流程

(2) 浅盘纯种根霉麸曲的制备

称取麸皮,拌入一定量糠壳,加水适量,充分拌匀后打散团块,用纱布包裹,0.1 MPa 灭菌 30 min。灭菌后于无菌室内冷却至 30 ℃,按 0.3% 的量接入三角瓶根霉种曲,拌匀后分装于经灭菌的白瓷盘内,厚度约为 2~3 cm,厚薄均匀。放入一定温度和湿度的培养箱内进行培养,培养一段时间后即可扣曲、出曲,烘干至成品曲^[7-8]。

(3) 浅盘制曲工艺单因素试验设计

按上述工艺,在基础条件(糠壳添加量 6%,原料含水量 65%,培养温度 30 ℃,培养时间 48 h,培养湿度 85%)上对糠壳添加量、原料含水量、培养温度、培养湿度和培养时间进行单因素试验,因素水平设计见表 1。

表1 单因素水平设计表

因素水平	糠壳添加量/%	原料含水量/%	培养温度/℃	培养时间/h	培养湿度/%
1	5	50	26	32	70
2	5.5	55	28	36	75
3	6	60	30	40	80
4	6.5	65	32	48	85
5	7	70	34	60	90
6	7.5	75	36	72	95

(4) 浅盘制曲工艺正交试验设计

根据单因素试验结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交表对原料含水量、培养温度和培养时间进行优化,因素水平见表 2,试验正交表见表 3。

表2 正交试验因素水平

水平	因素		
	A 原料含水量/%	B 培养温度/℃	C 培养时间/h
1	60	28	36
2	65	30	40
3	70	32	48

表3 试验正交表 $L_9(3^4)$

组号	因素			
	A 原料含水量	B 培养温度	C 培养时间	D(空列)
1	1(60%)	1(28 ℃)	1(36 h)	1
2	1	2(30 ℃)	2(40 h)	2
3	1	3(32 ℃)	3(48 h)	3
4	2(65%)	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3(70%)	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

(5) 验证试验

以正交试验得到的浅盘制曲最优工艺条件和正交试验中结果最好的工艺条件制曲,做试饭试验,测定所制曲的试饭糖分并与四种市售麸曲进行对比,以判断两种制曲工艺条件下制得的麸曲能否达到市售麸曲质量水平。

(6) 试饭糖分、试饭酸度测定

试饭糖分、试饭酸度测定方法参考文献[9-10]。

(7) 葡萄糖标准曲线的绘制

按表 4 配制葡萄糖标准溶液,充分混匀后于沸水浴中加热煮沸 5 min,流水冲洗试管外壁、冷却后向各试管加蒸馏水定容至 10 mL,混匀。以 1 号为空白对照,在 540 nm 波长测定不同浓度葡萄糖标准溶液的吸光度值,绘制吸光度—葡萄糖浓度曲线。

表4 不同浓度葡萄糖标准溶液配制

管号	葡萄糖溶液/mL	蒸馏水/mL	DNS 试剂/mL
1	0	0.5	1.5
2	0.1	0.4	1.5
3	0.2	0.3	1.5
4	0.3	0.2	1.5
5	0.4	0.1	1.5
6	0.5	0	1.5

1.5 数据分析

试验数据均用 $\bar{X} \pm Sd$ 表示,并借助 Excel、SPSS 软件进行数据分析。

2 试验结果与分析

试验利用不同浓度葡萄糖标准溶液绘制葡萄糖标准曲线(图 2),结果表明:在葡萄糖标准液浓度范围(0~2 mg)内标准曲线线性良好,符合检测要求。

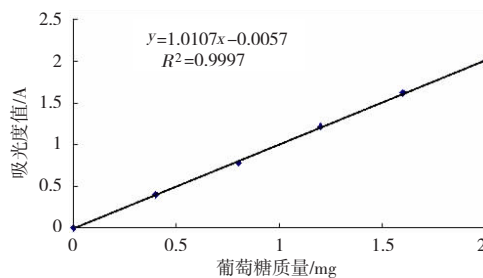
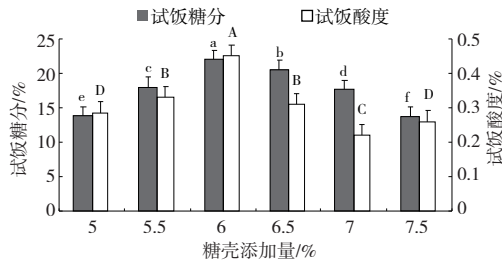


图2 还原糖测定标准曲线

2.1 糠壳添加量对纯种根霉麸曲质量的影响

研究糠壳添加量对纯种根霉麸曲质量的影响,结果表明:随着糠壳添加量的增加,纯种根霉麸曲的试饭糖

分和酸度均呈现先上升后降低的趋势。糠壳添加量为 6% 时与其他糠壳添加量之间具有显著差异,且此时试饭糖分最高,试饭酸度 $< 0.5\%$ 适宜^[9],故糠壳最适添加量为 6% (图 3)。



注:试验组试饭糖分的差异显著性用小写字母表示,试验组试饭酸度的差异显著性用大写字母表示,有相同字母的表示差异不显著 ($P > 0.05$),无相同字母的表示差异显著 ($P < 0.05$),下同。

图 3 糠壳添加量对纯种根霉麸曲质量的影响

2.2 原料含水量对纯种根霉麸曲质量的影响

研究原料含水量对纯种根霉麸曲质量的影响,结果表明:随着原料含水量的增加,纯种根霉麸曲的试饭糖分和酸度均呈现先上升后降低的趋势,原料含水量为 65% 时与其他含水量之间具有显著差异,且此时试饭糖分最高,试饭酸度 $< 0.5\%$ 适宜,符合纯种根霉麸曲质量要求 (图 4)。

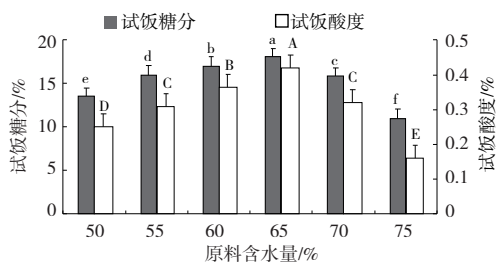


图 4 原料含水量对纯种根霉麸曲质量的影响

2.3 培养温度对纯种根霉麸曲质量的影响

研究培养温度对纯种根霉麸曲质量的影响,结果表明:随着培养温度的升高,纯种根霉麸曲的试饭糖分和酸度均呈现先上升后降低的趋势,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内试饭糖分均保持较高水平,试饭酸度 $< 0.5\%$ 适宜,且与其他培养温度之间具有显著差异 (图 5)。

2.4 培养时间对纯种根霉麸曲质量的影响

研究培养时间对纯种根霉麸曲质量的影响,结果表明:随着培养时间的延长,纯种根霉麸曲的试饭糖分和酸度均呈现先上升后降低的趋势,在 $36\text{ h} \sim 48\text{ h}$ 范围内试饭糖分均保持较高水平,试饭酸度 $< 0.5\%$ 适宜,且与其他培养时间之间具有显著差异 (图 6)。

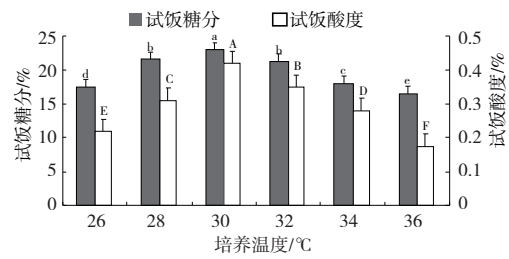


图 5 培养温度对纯种根霉麸曲质量的影响

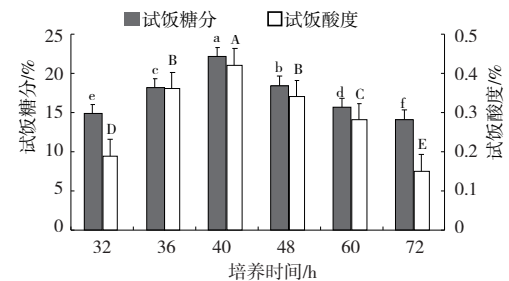


图 6 培养时间对纯种根霉麸曲质量的影响

2.5 培养湿度对纯种根霉麸曲质量的影响

本试验研究了培养湿度对纯种根霉麸曲质量的影响,结果表明:试饭糖分和酸度随着培养湿度的增加呈先上升然后逐渐趋于稳定的趋势,在湿度 $\geq 85\%$ 时,试饭糖分保持较高水平,试饭酸度 $< 0.5\%$,且相互之间不具有显著差异,故在正交试验中,只要控制培养湿度 $\geq 85\%$ 即可 (图 7)。

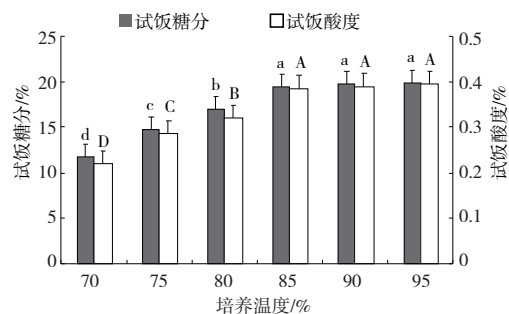


图 7 培养湿度对纯种根霉麸曲质量的影响

2.6 正交试验结果

根据单因素试验结果,在糠壳添加量为 6%、培养湿度 $\geq 85\%$ 条件下按表 2 进行正交试验。试验结果表明:各因素对纯种根霉麸曲试饭糖分即纯种根霉麸曲的糖化力的影响程度依次为 $B1 > A2 > C1$,即培养温度 $>$ 原料含水量 $>$ 培养时间;纯种根霉麸曲浅盘制曲最优工艺条件为:糠壳添加量 6%、培养湿度 $\geq 85\%$ 、原料含水量 65%、培养温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、培养时间 36 h。方差分析表明:培养温度对纯种根霉麸曲的糖化力具有极显著性影响 ($P < 0.01$),原料含水量对其有显著性影响 ($P < 0.05$),

而培养时间对纯种根霉麸曲的糖化力的影响不具有显著性($P > 0.05$)(表5,表6)。

表5 正交试验结果

组号	因素				试饭糖分/%
	A 原料含水量	B 培养温度	C 培养时间	D(空列)	
1	1(60%)	1(28℃)	1(36h)	1	22.32
2	1	2(30℃)	2(40h)	2	21.83
3	1	3(32℃)	3(48h)	3	20.23
4	2(65%)	1	2	3	23.47
5	2	2	3	1	22.06
6	2	3	1	2	21.69
7	3(70%)	1	3	2	22.25
8	3	2	1	3	21.68
9	3	3	2	1	20.14
k_1	21.46	22.68	21.90	21.51	
k_2	22.41	21.86	21.81	21.92	
k_3	21.36	20.69	21.51	21.79	
R	1.05	1.99	0.39	0.41	

表6 方差分析结果

因素	离差平方和(SS)	自由度	均方	F值	$F_{(2,4)\alpha}$	显著性
原料含水量	2.01	2	1.01	7.77	$F_{(\alpha=0.05)} = 6.94$	*
培养温度	6.02	2	3.01	23.15	$F_{(\alpha=0.01)} = 18$	**
培养时间 Δ	0.25	2	0.13			
误差	0.28	2	0.14			
误差 e^Δ	0.53	4	0.13			
总和	8.56					

注: * 代表具有显著性, ** 代表具有极显著性;误差 e^Δ 的离差平方和和自由度为培养时间 Δ 与误差之和。

2.7 验证试验

以正交试验得到的纯种根霉麸曲浅盘制曲最优工艺条件:糠壳添加量6%、培养湿度 $\geq 85\%$ 、原料含水量65%、培养温度28℃、培养时间36h和正交试验中结果最好的工艺条件:糠壳添加量6%、培养湿度 $\geq 85\%$ 、原料含水量65%、培养温度28℃、培养时间40h制曲,分别记为浅盘曲1和浅盘曲2,测定所制曲的试饭糖分与4种市售麸曲进行对比,试验结果表明:以正交试验确定的最优工艺条件和正交试验中结果最好的工艺条件制得浅盘纯种根霉麸曲的糖化能力均略高于四种市售纯种根霉麸曲,能达到市售麸曲的质量。浅盘曲1和2之间没有显著差异,从经济的角度上考虑最终确定纯种根霉麸曲浅盘制曲最优工艺条件为:糠壳添加量6%、培养湿度 $\geq 85\%$ 、原料含水量65%、培养温度28℃、培养时间36h。

3 结束语

浅盘制曲过程中培养温度对纯种根霉麸曲的糖化力具有极显著性影响,这可能是因为根霉菌的生长代谢对温度具有较高的依赖性,温度的变化对菌体生长及酶代谢等有很大的影响;原料含水量是制曲过程中的一个

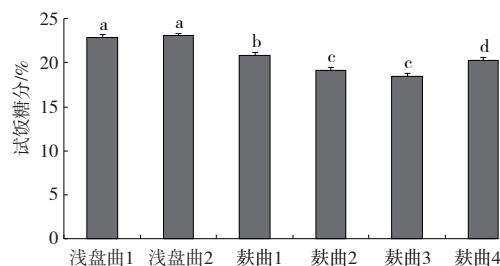


图8 自制根霉酒曲同市售曲糖化酶活力比较研究

重要因素,含水量过低,物料过快干结,达不到微生物需求的湿润环境,从而影响微生物的生长,而含水量过高则会导致曲料结合紧密,供氧和散热不足,致使曲料温度难以控制,从而影响微生物的代谢产酶,所以原料含水量对纯种根霉麸曲糖化力具有显著影响^[11-13]。本次试验研究了影响纯种根霉麸曲浅盘制曲工艺的各个因素,通过单因素和正交试验优化了浅盘制曲工艺,完善优化了实验室条件下的制曲工艺,确定最优工艺条件为:糠壳添加量6%、培养湿度 $\geq 85\%$ 、原料含水量65%、培养温度28℃、培养时间36h。能够在一定程度上指导实际生产,但在麸曲的地域性以及出发菌株上都有一定的局限性,因此后续研究还需开展对麸曲酿造特性的进一步研究。

参考文献:

- [1] 傅金泉.中国酒曲技术的发展和展望[J].酿酒,2002,29(2):7-9.
- [2] 徐成勇,郭波,周莲,等.酿酒小曲研究进展[J].食品与发酵工业,2002(3):72-75.
- [3] 高林峰,汤庆莉,吴天祥.麸曲制备工艺的优化条件[J].中国酿造,2010(11):62-65.
- [4] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [5] 叶光斌,王毅,罗惠波,等.根霉3.866在川法麸曲中的应用研究[J].酿酒科技,2014(9):56-68.
- [6] 肖冬光,邹海晏,郭波.根霉曲试饭糖化力检测方法的研究[J].酿酒科技,1998(5):60-63.
- [7] 肖冬光,邹海晏,刘志红,等.根霉曲生产与检验方法的探讨[J].酿酒科技,1996(2):11-16.
- [8] 周恒刚,沈振寰.麸曲白酒生产基本知识[M].北京:轻工业出版社,1975.
- [9] 肖冬光.白酒生产技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [10] 罗惠波,王毅,边名鸿,等.麸曲糖化酶活力测定方法探讨[J].四川理工学院学报:自然科学版,2014,27(3):6-9.
- [11] 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,2007,17(5):56-59.
- [12] 刘宪春.水分与温度对根霉Q303生产繁殖的影响[J].酿酒科技,2007(6):59-60.
- [13] 周恒刚.试论根霉菌在制曲上的特征[J].酿酒,2001,28(6):23-26.

Research on Optimization of Purebred Rhizopus Bran Koji Making Technics

LUO Huibo^{1,2}, XIE Jun^{1,2}, HUANG Zhiguo^{1,2}, BIAN Minghong^{1,2}, WANG Dadi^{1,2}, YANG Wenbin^{1,2}

(1. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstract: The Rhizopus with high yield of glucoamylase activity was used as a starting strain. The platter bran koji making technics were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. After compared with commercial bran koji, the result showed that: the optimal culture conditions for Rhizopus bran koji were as follows: sugar shell add amount 6%, raw material moisture 65%, culture temperature 28°C, culture time 36 h and culture humidity $\geq 85\%$. Under the condition, the sugar content of the bran koji was significantly better than the commercial bran koji. The culture temperature had an extremely significant impact on saccharification ability of Rhizopus bran koji, so did raw material moisture.

Key words: the platter koji-making; purebred Rhizopus bran koji; orthogonal experiment