

利用根霉提高国产麦芽质量的研究

朱俊勤,李 崎,孙军勇,顾国贤

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要: 用 AS 3.904, AS 3.948, AS 3.866, AS 3.2893 4 株根霉作为实验菌株,研究利用根霉改善国产麦芽质量的可行性。结果表明,AS 3.866 具有较好的效果。以 AS 3.866 为种根霉,考察了接种量、接种时间、孢子活化对制麦效果的影响。制得的根霉麦芽中 β -葡聚糖含量降低了 33%, β -葡聚糖酶和木聚糖酶酶活分别提高了 1150% 和 690%,其他许多参数也有明显的改善。

关键词: 大麦; 麦芽; 质量; 根霉; 孢子

中图分类号 S512.31; TS262.5 文献标识码 A 文章编号: 1001-9286(2005)06-0077-04

Research on Improvement of Domestic Malt Quality by Means of Rhizopus

ZHU Jun-qin, LI Qi, SUN Jun-yong and GU Guo-xian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: The feasibility of the application of rhizopus to improve domestic malt quality was studied. Four rhizopus strains including AS 3.904, AS 3.948, AS 3.866, AS 3.2893 were used as test strains. The results indicated that AS3.866 was the best strain. Besides, the effects of inoculum size, inoculum time and spores activation on malt quality were also studied. β -glucan content in produced rhizopus malt decreased by 33%. However, β -glucanase and xylanase activities increased by 1150% and 690% respectively. Besides, other many parameters improved significantly. The techniques of malt preparation by rhizopus were studied preliminarily in this paper. (Tran. by YUE Yang)

Key words: barely; malt; quality; rhizopus; spores

国产啤酒大麦麦芽较进口大麦麦芽在品质上存在着很大的差距。普遍来讲,国产大麦存在蛋白质含量高、蛋白质溶解困难、胚乳溶解不均匀、成品麦芽 β -葡聚糖含量高、过滤慢、粘度大等缺点。目前,大部分国内啤酒生产企业只有在中低档的产品中使用部分国产麦芽,进口大麦仍然占据主要市场。据不完全统计,我国当前每年需进口啤酒大麦约 200 万吨,耗资 3.5~4.0 亿美元。如何提高国产麦芽的质量,对发展我国的制麦事业有重要意义。

利用微生物提高麦芽质量被视为近年来制麦工业的新进展。能用于制麦接种的微生物种类很多,包括乳酸菌、假单孢菌、曲霉、地霉、毛霉、根霉等。利用根霉制麦被证明是改善麦芽溶解性的一个有效办法^[1],制得的麦芽被称之根霉麦芽。Noots 等^[2]于 1999 年第一个展开了利用根霉改善麦芽品质的研究。2001 年、2003 年^[3]又连续报道了该课题的研究成果。结果显示将根霉添加到制麦过程中能够显著地提高麦芽质量。但是,文献中没

有说明使用根霉的具体菌株,也没有指出制麦工艺会对麦芽质量有什么样的影响。本文研究解决了这两个问题,并探索了可以加强根霉作用的方法,对该课题在国内的推广具有切实而有效的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

AS 3.904, AS 3.948, AS 3.866, AS 3.2893, 中科院微生物研究所。

1.1.2 大麦

甘啤三号,甘肃产。

1.1.3 主要仪器

WP-I 型啤酒大麦试验机,北京市光电设备厂;

Himac CR22G 型高速冷冻离心机,日立公司;

unico UV-2100 紫外/可见分光光度计,上海合利仪器有限公司;

收稿日期: 2004-12-07

作者简介: 朱俊勤(1975-),男,上海人,在读硕士研究生。

2300 Kjeltex 型凯氏定氮仪,FOSS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 根霉的培养

30℃于暗处利用马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA)培养7d。

1.2.2 根霉孢子的收集和萌发

用无菌的生理盐水冲洗生长7d的PDA培养基。离心(1600g,10min),倾去上清液。孢子用无菌生理盐水振荡重悬,计数。再将孢子转入无菌酸化(pH4.0)的营养肉汤培养基中(孢子浓度为 $5\times 10^7/\text{mL}$)42℃水浴摇床培养5.5h后离心(1600g,10min),收集萌发芽孢子。萌发后的孢子在显微镜下能看见明显的隆起状态。

1.2.3 发芽工艺

1.2.3.1 制麦工艺A(147h)

浸麦(29h):浸6断9浸4断6浸4;浸麦条件:15℃;通氧量:10次/h;第一次浸麦开始时添加预萌发孢子,添加量: $10^4/\text{g}$ 绝干麦芽。

发芽(96h):18℃24h,16℃48h,15℃24h;湿度控制90%。

焙燥(22h):45℃5h,50℃6h,60℃6h,70℃2h,83℃3h。

1.2.3.2 制麦工艺B(150h)

浸麦(27h):浸6断8浸4断5浸4;浸麦条件:预萌发孢子添加量: $10^3/\text{g}$ 绝干麦芽。其他同A。

发芽(101h):18℃24h,16℃48h,15℃24h,30℃5h;湿度控制:同A。

焙燥(22h):45℃10h,60℃6h,70℃3h,83℃3h。

1.2.4 大麦的擦皮处理

机械擦皮,实验室自制。

1.2.5 木聚糖酶酶活的测定

称取1.00g麦芽样品,研磨至细。加入5.0mL pH4.7的乙酸钠溶液,室温下震荡浸提20min,快速冷却至 $\leq 10^\circ\text{C}$ 。10℃条件下2800g离心15min。取上清液按照DNS法^[4]测定木聚糖酶酶活。实验结果以麦芽干基计,单位以u/g或者以u/mL计。

1.2.6 β -葡聚糖酶酶活的测定

称取1.00g麦芽样品,研磨至细。加入10.0mL pH4.2的乙酸钠溶液,室温下震荡浸提15min,快速冷却到10℃。10℃条件下1250g离心10min。取上清液按照蓝色大麦 β -葡聚糖法^[5]测定 β -葡聚糖酶酶活。实验结果以麦芽干基计,单位以u/g或者以u/mL计。

1.2.7 β -葡聚糖含量测定^[6]

1.2.8 其他麦芽指标测定^[7]

均指麦芽干基计。

2 结果与讨论

2.1 根霉菌株的选择

Noots等^[1]首先在人工培养基上展开选择微生物的工作,产 β -葡聚糖酶、木聚糖酶活性较高的菌株被视为理想菌株。但是在其后的研究中又指出微生物在人工培养基和实际大麦上的产酶情况并没有一定的相关性^[2]。为此,在本实验中直接将根霉孢子接种于制麦过程来进行微生物的选择。制麦工艺为A。实验结果如表1所示。由表1可知,米根霉(AS 3.866)、华根霉(AS 3.948)、黑根霉(AS 3.904)均能提高麦芽中 β -葡聚糖酶和木聚糖酶的活性,同时降低麦芽中 β -葡聚糖的含量。无根根霉(AS 3.2893)没有表现出较强的产酶效果,可能是因为该菌株在低温条件下生长特别缓慢所致。考虑到米根霉(AS 3.866)来自麦曲,具有更好的安全性,并且易于收集孢子,因此在后来的工作中均以米根霉作为接种根霉,不同根霉菌株对麦芽的影响见表1。

表1 不同根霉菌株对麦芽的影响			
菌株代号	β -葡聚糖 (mg/L)	β -葡聚糖酶酶活 (u/mL)	木聚糖酶酶活 (u/mL)
空白	190	5.2	0.8
AS 3.866	128	59.6	5.5
AS 3.948	130	48.1	5.9
AS 3.2893	181	6.0	1.0
AS 3.904	155	34.5	3.1

2.2 最佳接种量的确定

使用制麦工艺A,测定麦芽中的 β -葡聚糖酶和木聚糖酶的活性。结果如图1所示。

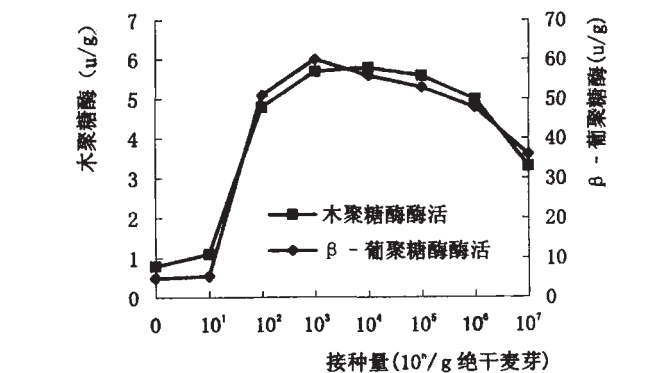


图1 接种量对麦芽的影响

由图1可知,最适接种量在 $10^3\sim 10^4/\text{g}$ 绝干麦芽,当接种量大于 $10^4/\text{g}$ 绝干麦芽时,麦芽中的酶呈下降趋势,这可能是由微生物对氧气的竞争现象造成的。

2.3 接种时间的选择

制麦工艺使用A工艺,分别在浸麦开始、第二次浸麦、第三次浸麦、发芽开始时接种预萌发孢子。实验结果

显示,麦芽中的 β -葡聚糖酶和木聚糖酶的活性会依次下降,在发芽开始时接种几乎没有效果。因此浸麦开始时为最佳接种时间。

2.4 孢子预萌发对麦芽的影响

大麦表皮自然存在着大量的微生物,其在发芽过程中也会大量增殖。为了促进接种微生物的生长,使之在发芽过程中尽可能地获得生长优势,此外还能提供给孢子萌发必要的营养物质,本实验选用了将孢子预萌发的方法。考察了孢子预萌发对麦芽的影响。使用制麦工艺A,在浸麦开始时分别接入经过预萌发和未经预萌发的孢子,空白不接入孢子。实验结果如图2、图3所示。

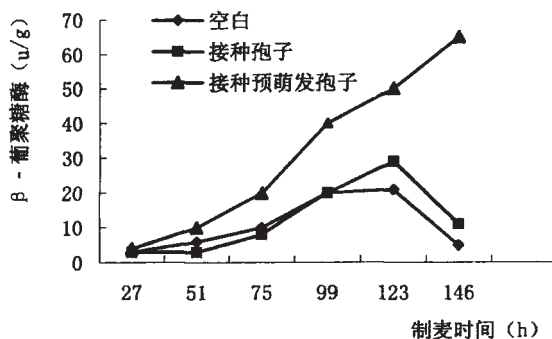


图2 发芽大麦中 β -葡聚糖酶的变化曲线

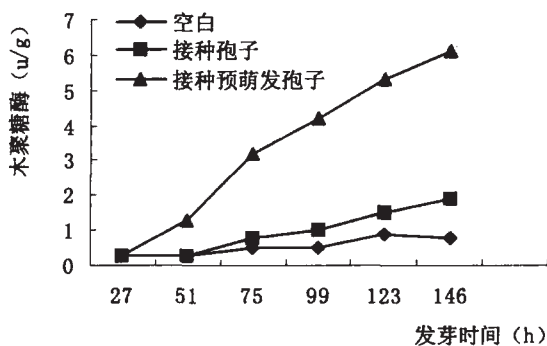


图3 发芽大麦中木聚糖酶的变化曲线

由图2可知,预萌发后的孢子能够明显地提高麦芽中的 β -葡聚糖酶。此外,空白麦芽自身能够产生一定量的 β -葡聚糖酶,焙燥后基本失活。根霉麦芽中有更多的 β -葡聚糖酶,并且这种酶在焙燥结束后仍大量存在。这说明根霉能够产生 β -葡聚糖酶并且这种来自微生物的 β -葡聚糖酶较麦芽中的酶具有更好的耐热性。由图3可知,麦芽本身仅仅产生少量的木聚糖酶,根霉能够产生大量的木聚糖酶并且这种酶在焙燥结束后仍具有很大的活性。

2.5 根霉对成品麦芽质量的改善作用

使用制麦工艺A,考察了根霉麦芽的综合指标,结果如表2所示。

由表2可知,根霉麦芽中的许多指标都发生明显的

表2 根霉麦芽的综合指标

项 目	空白	根霉麦芽
麦芽		
浸出物(%)	79.55	79.83
粗细粉差(%)	2.2	1.7
总氮(%)	12.88	12.80
可溶性氮(%)	4.34	4.61
库值(%)	33.6	36.0
龙丁区分(%)	30:14:56	29:8:63
协定麦汁		
pH	6.10	5.93
总酸(1N NaOH mL/100 mL)	1.50	1.56
色度(EBC)	2.5~3.0	3.0~3.5
粘度(kg/ms)	1.65	1.60
α -氨基氮(mg/L)	206.8	241.7
β -葡聚糖含量(mg/L)	190	128
V_{30min} (mL)	243	305
滤液体积(mL)	303	334
酶活性分析		
β -葡聚糖酶(u/g)	5.2	59.6
木聚糖酶(u/g)	0.8	5.5
糖化力(WK)	272	293

改变,如粗细粉差、库值、粘度、 β -葡聚糖含量和滤液体积。库值的提高说明根霉麦芽得到了更加充分的溶解。龙丁区分的变化显示根霉对蛋白质溶解的帮助主要体现在可溶性氮中的中分子氮部分。麦汁中 α -氨基氮的提高也证实了根霉麦芽中蛋白质加速溶解的现象。麦汁的总酸含量也有一定的提高。但是,麦汁的浊度、色度的提高是对啤酒酿造不利的一面。

2.6 加强根霉作用的方法

根霉的最适生长温度是在30℃,而大麦的发芽过程温度基本在16℃左右。以PDA为培养基,根霉(AS 3.866)在低温下的生长情况如表3所示。

表3 温度对根霉生长的影响

生长时间(h)	15℃	30℃
24	无现象	可见菌丝体
48	可见菌丝体	少量黑色孢子头
72	少量菌丝体	大量黑色孢子头
96	少量菌丝体	大量黑色孢子头
120	大量菌丝体	大量黑色孢子头
144	大量菌丝体	大量黑色孢子头

由表3可知,在低温条件下,根霉的生长明显缓慢,因此研究温度对制麦效果的影响可能是加强根霉作用的一个突破口。

2.6.1 浸麦温度对根霉作用的影响

用制麦工艺B进行发芽实验,空白是在工艺B中的无水浸麦阶段使用室温(25℃左右)。焙燥温度使用45℃,10h是为了加强酶对麦芽的溶解作用。测定成品麦芽中 β -葡聚糖、 β -葡聚糖酶和木聚糖酶含量,其结果

见表 4。

表 4 浸麦温度对根霉麦芽的影响

项目	β-葡聚糖含量 (mg/L)	β-葡聚糖酶酶活 (u/g)	木聚糖酶酶活 (u/g)
空白	95	10.0	0.60
样品	56	16.2	0.96

由表 4 可知 ,浸麦温度是限制米根霉生长的主要因素之一。

2.6.2 发芽温度对根霉作用的影响

用制麦工艺 B 进行发芽实验 ,空白是指发芽最后阶段使用 15℃ 29 h 工艺。同样 ,焙燥温度使用 45℃ ,10 h 是为了加强酶的溶解作用。测定成品麦芽中 β-葡聚糖、β-葡聚糖酶和木聚糖酶含量 ,其结果见表 5。

表 5 发芽温度对根霉麦芽的影响

项目	β-葡聚糖含量 (mg/L)	β-葡聚糖酶酶活 (u/g)	木聚糖酶酶活 (u/g)
空白	122	62	5.8
样品	95	80	8.6

由表 5 可知 ,30℃ 条件下发芽能促进根霉的生长和产霉能力 ,明显提高麦芽中酶的含量 ,有效地降低麦芽中 β-葡聚糖的含量。

2.6.3 外加营养源对根霉麦芽的影响

大麦谷皮的成分是不支持根霉生长的。根霉在其假根尚未穿破大麦谷皮之前生长所需的营养源是受到限制的。因此 ,考虑外加营养源很可能会促进根霉的生长。用制麦工艺 B 进行发芽实验 ,考察了发芽第一天喷洒葡萄糖(0.5% ,对大麦绝干质量)、酪蛋白(0.5% ,对大麦绝干质量)和使用活化孢子、擦皮大麦对大麦的影响。测定成品麦芽中 β-葡聚糖含量 ,结果见表 6。

表 6 外加营养物质对根霉麦芽的影响

项 目	β-葡聚糖含量 (mg/L)
空白	185
葡萄糖(0.5%)	169
酪蛋白(0.5%)	180
活化孢子(10 ³ /g 麦芽)	91
葡萄糖(0.5%)+预萌发孢子(10 ³ /g 麦芽)	62
酪蛋白(0.5%)+预萌发孢子(10 ³ /g 麦芽)	90
擦皮大麦+预萌发孢子(10 ³ /g 麦芽)	ND(无法检出)

由表 6 可知 ,将孢子预萌发是提供营养的最佳方式。添加葡萄糖不能明显地促进麦芽的溶解 ,但是添加葡萄糖+预萌发孢子能够明显降低麦芽中 β-葡聚糖含量。为此 ,可以断定添加葡萄糖能够促进根霉的生长。添

加酪蛋白及酪蛋白+预萌发孢子对制麦效果没有影响 ,这说明根霉在大麦表皮上生长时有其他利用氮源的方式。由擦皮大麦+预萌发孢子制得的麦芽中 β-葡聚糖含量无法检出 ,说明大麦的谷皮是该根霉作用麦芽的限速步骤 ,同时说明根霉是可以利用麦芽胚乳中的营养成分进行生长的。

3 结论

3.1 根霉能够改善麦芽的质量 ,这种改善作用似乎不受菌株的限制。在本研究过程中选用的 AS 3.904 ,AS 3.948 ,AS 3.866 ,AS 3.289 菌株均有一定的改善效果。其中以 AS 3.866 ,AS 3.948 的改善效果最好。制得的成品麦芽的许多指标都明显地优于对照组。

3.2 以 AS 3.866 为接种根霉 ,对溶解性能较差的甘啤三号大麦进行发芽实验。实验证明 ,最适接种量为 10³~10⁴/g 绝干麦芽 ,最适接种时间为浸麦开始时。孢子的预萌发能够明显地促进根霉的生长。

3.3 探索了加强根霉作用的方法。采用室温浸麦、发芽阶段引入 5 h ,30℃ 发芽工艺、发芽过程中外加葡萄糖及使用擦皮大麦能明显地促进根霉的作用。经擦皮处理+预萌发孢子处理后的麦芽中 β-葡聚糖完全降解。

3.4 源自根霉的 β-葡聚糖酶和木聚糖酶较源自麦芽中对应的酶具有更好的耐热性。

参考文献 :

[1] Noots I,Derycke V,Michiels C, et al. Improvement of Malt Modification by Rhizopus VII as Starter Culture[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(b): 3718-3724.

[2] Noots I, Derycke V, Cornelis K, et al. Degradation of Starchy Endosperm Cell Wall in Non-germinating Sterilized Barley by Fungi[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(a): 975-981.

[3] Noots I, Derycke V, Jensen H.E, et al. Studies on Barley Starchy Endosperm Cell Wall Degradation by Rhizopus VII[J]. Journal of Cereal Science, 2003, 81-90.

[4] Bailey.Michael J, Biely, Peter, et al. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanaseactivity[J].Biotechnol,1999, 23(3): 257-270.

[5] 彭莹.β-葡聚糖酶高产菌 Bacillus subtilis 9126-6 的发酵性能研究[J]. 南京农业大学学报 ,1994,(17)59-64.

[6] 李永仙,尹象胜,顾国贤,等.刚果红法测定麦汁和啤酒中的 β-葡聚糖[J].无锡轻工大学学报 ,1997 (16) 8-13.

[7] 管敦仪.啤酒工业手册(中)[M].北京 :轻工业出版社,1985.