

酿酒用米曲霉若干菌株的培养特性研究

周立平, 孙佰申, 陈旭峰

(浙江工业大学生物和环境学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 对国内目前使用较广的米曲霉 4[#], 5[#], 6[#] 及日本生产用米曲霉菌株 1[#], 2[#], 3[#] 的产酶作对比试验, 研究了培养温度、培养基、初始酸度和培养时间对产酶的影响, 分析米曲霉制作过程中的理化性质变化, 探索其最佳制曲条件。本实验三角瓶米曲霉糖化力可达 1400 mg 葡萄糖/g 曲·h, 产酶最适品温为 37~38 °C, 最适 pH 为 5~6; 用 5[#] 制的曲糖化力和酸性蛋白酶活力较高。

关键词: 微生物; 米曲霉; 米曲; 孢子

中图分类号: Q93-33; TS261.1; TQ925.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286 (2004)03-0030-03

Study on the Culture Characters of Some Strains of *Asp. oryzae* for Liquor-making

ZHOU Li-ping, SUN Bai-shen and CHEN Xu-feng

Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Abstract: The comparison tests of the enzyme producing capabilities between Chinese *Asp. oryzae* 4[#], 5[#], and 6[#] and some Japanese *Asp. oryzae* 1[#], 2[#], 3[#] were carried out in this paper. The influences of the culture temperature, medium, initial acidity and the culture time on the enzyme producing were researched. And the physical and chemical characteristics in the cross of making leaven were analysed. The best conditions of making leaven were found out. The saccharification power of leaven made with *Asp. Oryzae* in Er-hewmeyer flask was reached 1400 mg Gluc./g leaven·h. The best temperature for enzyme producing of leaven was 37~38 °C, and the best pH value was 5~6. The activities of saccharifying enzyme and acidic protease of the leaven made with 5[#] were higher than others.

Key words: microbe; *Asp. Oryzae*; leaven; spore

中国黄酒和日本清酒不同于法国的葡萄酒和德国的啤酒, 属于用曲霉作糖化剂发酵的酿造酒。自古以来东方酿酒就有“欲酿酒, 必先制曲”的说法, 绍兴酒酿造中把曲形象地称之为“酒之骨”, 可见曲对酒质具有极重要的作用。

曲的主要作用有 3 方面: 一是为酒母和醪提供酶源, 使原料中的淀粉、蛋白质和脂肪等溶出和分解; 二是在曲菌繁殖和产酶的同时, 产生葡萄糖、氨基酸、维生素等成分, 这是酵母的营养来源, 并生成有机酸、高级醇及酯类等成分; 三是曲香及曲的其他成分, 作为酒的前体物质赋予酒以独特的风味^[1-3]。

1 材料与方法

1.1 菌株

米曲霉 1[#], 2[#], 3[#], 日本菌株, 日本酿酒企业所赠;

米曲霉 4[#], 5[#], 6[#], 国内菌株, 浙江工业大学酿酒研究所保存。

1.2 培养基

1.2.1 米曲制备^[4]

蒸米: 取 500 g 粳米, 洗净后浸泡 25 min, 沥干, 用蒸汽加热, 透汽后再蒸 5 min, 闷 20 min, 再分装入三角烧瓶, 加棉塞, 包牛皮纸, 于 0.1 MPa 压力下灭菌 30 min。

接种培养: 米饭灭菌后, 冷却至 35~40 °C, 以无菌操作接入米曲霉孢子悬浮液, 充分摇匀, 于 30~32 °C 培养 48 h, 中间隔 16 h 摇

瓶 1 次。将培养好的米曲于 38~40 °C 烘箱干燥 8 h, 备用。

1.2.2 米曲培养基制备

米曲 1 份, 加 3 份米曲质量的水, 在 58~60 °C 下糖化 5~6 h, 直至用碘液测定糖化液不变色为止, 用纱布过滤, 调节糖度为 12°Bx 和 pH 5.0, 加琼脂 2% 于 0.1 MPa 下灭菌 30 min。

1.3 分析方法^[5,6]

1.3.1 水分: 烘干法;

1.3.2 酸度: 碱滴定法;

1.3.3 糖化力: 斐林试剂快速滴定法;

1.3.4 液化力: 碘反应法;

1.3.5 酸性蛋白酶活力测定: Folin-酚试剂显色法。

2 结果与讨论

2.1 米曲霉菌株性能比较

2.1.1 米曲霉菌株生长形态观察^[7-9]

把 6 株米曲霉分别接种于 12°Bx 琼脂培养基上, 于 32 °C 下培养, 观察它们的生长形态, 其结果见表 1。

如表 1 所示, 在 6 株米曲霉中, 1[#], 3[#], 5[#] 成熟时为白色, 而 2[#], 4[#], 6[#] 为黄绿色, 说明米曲霉的菌丝和孢子颜色因菌株的不同而异, 并不一定为黄绿色, 但菌丝初生均为白色。

镜检以上菌株的分生孢子, 其形态相似, 而 1[#] 菌株的分生孢

收稿日期: 2004-01-02

作者简介: 周立平 (1947-), 男, 浙江人, 本科, 副教授, 专门从事红曲及其相关产业的研究开发工作。

表 1		6 株米曲霉菌株生长形态观察				
菌株		培养时间(h)				
		20	30	40	50	80
1 [#]	长出白色绒毛	白色绒毛状菌丝逐渐增多	洁白色绒毛状菌丝布满整个平面	培养皿盖上出现水汽	白色菌丝布满,上附许多白色孢子	
2 [#]	长出白色绒毛	白色菌丝生长旺盛,划线中心变黄	划线中心菌丝为黄绿色,周边为白色	有孢子产生	黄绿色菌丝布满,上附许多孢子	
3 [#]	出现白色菌丝	白色菌丝生长旺盛	白色菌丝继续生长	白色菌丝布满平面	白色菌丝上附许多白色孢子	
4 [#]	出现白色菌丝	白色菌丝生长,个别地方变微黄	划线中心菌丝为黄绿色,周边为白色	有孢子产生	菌丝上附满黄绿色孢子	
5 [#]	出现白色菌丝	白色菌丝生长旺盛	平面上布满洁白色菌丝	有孢子产生	白色菌丝上附满白色孢子	
6 [#]	出现白色菌丝	白色菌丝生长,个别地方变微黄	划线中心菌丝为黄绿色,周边为白色	有孢子产生	菌丝上附满黄绿色孢子	

子较多。

2.1.2 米曲霉菌株酶系状况比较

菌株接种于米饭,35℃培养,结果见表 2。

表 2		米曲霉菌株酶系状况比较				
菌株	酸度	水分 (%)	糖化力 (mg/g·h)	液化力 (g/g·h)	酸性蛋白酶 活力(g/g·h)	孢子数 (×10 ⁹)
1 [#]	3.12	29.5	1336	28.2	2964	3.11
2 [#]	8.25	30.0	683	4.59	3286	1.78
3 [#]	5.18	23.6	647	3.83	3882	2.42
4 [#]	2.56	29.5	1186	25.7	3696	3.14
5 [#]	2.44	30.8	1405	24.3	7572	4.74
6 [#]	4.06	21.4	683	3.92	7716	3.09

如表 2 所示,在 6 株米曲霉中,1[#],4[#],5[#] 菌株糖化力、液化力较高,淀粉利用能力强,适用于酿制颜色较浅的米酒,2[#],3[#],6[#] 米曲霉糖化力、液化力较低,淀粉分解利用慢,用作糖化剂时,可适当增大用曲量或添加糖化酶制剂。5[#],6[#] 米曲霉菌株酸性蛋白酶活力较高,利用氮源能力强,可用于较粗糙、氮源较丰富的原料,可试用于制备酱油曲。

2.2 诸培养因素对米曲霉 1[#],4[#],5[#] 菌株的影响^[10-11]

2.2.1 温度对菌株产酶的影响(结果见表 3,表 4,表 5)

表 3		温度对 1 [#] 菌株产酶的影响		
温度 (℃)	项目	培养时间(h)		
		30	40	50
5	糖化力	320	703	914
	液化力	3.76	10.6	13.5
	孢子数(×10 ⁸)	2.02	7.80	1.19
35	糖化力	1041	1447	1219
	液化力	17.3	27.9	23.0
	孢子数(×10 ⁸)	6.40	4.13	6.48
40	糖化力	624	1048	1214
	液化力	9.40	17.0	25.1
	孢子数(×10 ⁸)	7.21	4.22	5.81
50	菌丝死灭			

表 3,表 4,表 5 表明,培养温度为 35℃时,产酶状况最好。因本实验采用三角瓶,当恒温箱中设定温度为 35℃时,三角瓶中米曲品温为 37~38℃,故制曲时应控制品温 37~38℃为好,35~40℃之间,糖化力、液化力较高,但温度超出 40℃,菌株易发生褐变。

2.2.2 pH 值对米曲霉菌株产酶的影响(见表 6)

由表 6 可见,pH 在 4~8 之间,pH 值对菌株产酶影响不大,pH

表 4		温度对 4 [#] 菌株产酶的影响		
温度 (℃)	项目	培养时间(h)		
		30	40	50
25	糖化力	389	716	988
	液化力	3.78	11.0	12.7
	孢子数(×10 ⁸)	1.30	11.2	22.1
30	糖化力	696	928	1042
	液化力	7.47	15.0	18.0
	孢子数(×10 ⁸)	5.50	15.2	42.2
35	糖化力	1107	1453	1288
	液化力	15.8	26.6	22.4
	孢子数(×10 ⁸)	10.1	41.3	51.0
40	糖化力	569	1128	1168
	液化力	8.98	17.4	22.4
	孢子数(×10 ⁸)	7.80	12.1	51.4
50	菌丝死灭			

表 5		温度对 5 [#] 菌株产酶的影响		
温度 (℃)	项目	培养时间(h)		
		30	40	50
25	糖化力	456	745	892
	液化力	2.68	7.77	14.2
	孢子数(×10 ⁸)	1.69	17.0	39.0
30	糖化力	672	835	1150
	液化力	6.41	10.9	22.3
	孢子数(×10 ⁸)	4.54	27.6	41.0
35	糖化力	1111	1279	1219
	液化力	17.0	26.2	22.7
	孢子数(×10 ⁸)	14.2	31.2	46.2
40	糖化力	477	960	1235
	液化力	8.02	15.3	23.2
	孢子数(×10 ⁸)	22.1	37.6	52.0
50	菌丝死灭			

表 6		不同 pH 值对米曲霉菌株产酶的影响				
菌株	项目	pH 值				
		4	5	6	7	8
1 [#]	糖化力	1037	1059	1110	1069	899
	液化力	20.1	22.9	21.8	19.7	18.2
4 [#]	糖化力	1082	1109	1220	1097	956
	液化力	22.3	24.0	23.1	21.0	19.2
5 [#]	糖化力	1064	1093	1145	1042	981
	液化力	19.4	22.2	23.1	22.36	18.0

在5~6之间较适合于菌株产酶,糖化力、液化力较高,但在过酸或过碱环境下,易导致酶失活。

2.2.3 制曲原料的影响(见表7)

表7 不同制曲原料对米曲霉菌株产酶的影响

菌株	项目	原料			
		小麦	杂交米	籼米	粳米
1 [#]	糖化力	664	1078	1120	1099
	液化力	13.0	11.8	12.1	18.4
4 [#]	糖化力	1124	1119	1239	1139
	液化力	12.9	12.7	12.3	19.9
5 [#]	糖化力	1201	1130	1142	1089
	液化力	11.8	12.1	11.7	20.2

表7显示,4[#],5[#]米曲霉菌株除了以粳米为原料的曲的液化力较高外,其他糖化力、液化力接近,可见国内米曲霉对原料要求比较低,条件粗放,这也是4[#]和5[#]能在国内各地广泛使用的原因。1[#]米曲霉菌株以各种大米为原料制的曲的糖化力相近,但以小麦为原料制成的曲的糖化力较低,这可能与日本米曲霉经过特别筛选,不适于小麦有关^[4,10]。

3 结论

3.1 试验表明,供试国内米曲霉和日本米曲霉菌株生长较快,用于制备米曲一般48h即成熟。

3.2 菌株产酶最适温37~38℃,最适pH为5~6。

3.3 用5[#]制的曲糖化力和酸性蛋白酶活力较高。

3.4 日本米曲霉1[#]糖化力和液化力较高,菌丝和孢子皆呈白色,可用于酿制浅色米酒。

3.5 通风制曲和三角瓶制曲种试验,要求制曲掌握:“一熟,二准,

三均匀”。

一熟:要求原料蒸得熟,不夹生,米曲霉菌丝能够生长充分,酶活才高。

二准:水分准,制曲必须水分合适,而米曲霉制曲过程中不补水,水分靠米曲蒸料前一次性加入;温度准确,要适合曲菌的生长与产酶。

三均匀:接种均匀,使曲霉生长基本一致。

笔者采用上述方法培曲,三角瓶制曲糖化力达到1400mg葡萄糖/g曲·h,高于一般制曲糖化力800mg葡萄糖/g曲·h。

* 本试验在浙江文成酿造厂完成,特此致谢!

参考文献:

- [1] 康明官.日本清酒技术 第1版[M].北京:中国轻工业出版社,1986.
- [2] 大连轻工业学院,等.酿造酒工艺学 第1版[M].北京:中国轻工业出版社,1982.
- [3] 黄酒生产工艺编写组.黄酒生产工艺 第1版[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [4] 菅间诚之助.日本酒的形成与制造[J].四川食品与发酵,1994,4): 22-27.
- [5] 天津轻工业学院,等.工业发酵分析 第1版[M].北京:中国轻工业出版社,1980.
- [6] 无锡轻工业学院.微生物学 第1版[M].北京:中国轻工业出版社,1990.
- [7] 陈响声.酱油及酱类制造 第1版[M].北京:化学工业出版社,1980.
- [8] 周恒刚.制曲与水分[J].酿酒,1992,4): 4-9.
- [9] 鲁迎新,等.酱油曲霉优秀菌株的评选[J].中国调味品,1992,4): 7-9.
- [10] 周立平.94国际酒文化学术研讨会文集 第1版[M].杭州:浙江大学出版社,1994.
- [11] 范秀龙,等.微生物学实验(第2版)[M].北京:高等教育出版社,1980.

(上接第33页)

表2 优良根霉糖化力的比较(不加酵母)(30℃,7d)

菌号	原料含糖量(g,以葡萄糖计)	产酸量(g,以乳酸计)
3.866	35.28	1.93
3.867	35.28	2.29
3.852	35.28	0.96
3.868	35.28	1.01

根据以上特点,我们可以判断贵州轻工所的Q303根霉、四川的YG5-5、C-24根霉应归属川黔型根霉,而苏州的协和根霉、崇粮4-16根霉、新5[#]、新6[#]应归属上海型根霉。

3 对上海型根霉与川黔型根霉的认识

3.1 川黔型根霉

川黔型根霉糖化力强,产酸较少。我们常用的是Q303,YG5-5,C-24等。贵州轻工所的同行前辈已研究推广多年。

在培养黄酒用小曲中,用此菌种,不宜培养过老,即小曲已生成大量黑色孢子。无论曲盒培养,还是通风发酵池培养,最高培养温度尽量不超37℃,培养总时间在30~32h为宜。其菌种分离纯化可采用表面菌丝培养技术,以麸皮试管保藏菌种。

3.2 上海型根霉

由于接触和分离到的上海型根霉较多,经我们自行分离的菌种有新2[#]、新5[#]、新6[#]、新9[#]等多个。它们的共同特点是糖化力强,产酸多,但不同菌种又各具特色。

3.2.1 新2[#]、新5[#]菌种在高糖培养基上菌丝白、粗壮、气生菌丝少、不易生成孢子,匍匐菌丝多,形成较厚的菌皮,适应以米粉为原料的甜酒曲的制备。以此菌种做成的小曲,在制造甜酒酿时口感好,糖度高。菌种以在方块米粉曲中保存为佳。

3.2.2 新6[#]菌种在斜面培养基上菌丝生长速度很快,菌皮薄,气生菌丝多,极易长孢子,但该菌产酸大,糖化力强,液化力亦好,不适应在麸皮上培养,却适应在谷粉、米粉上培养,在马铃薯片上生长缓慢。以米粉块曲保存为宜。

3.2.3 新9[#]菌种在斜面培养基上菌丝生长很快,菌皮比新2[#]等略薄,气生菌丝亦旺,易生成孢子。该菌糖化力强、液化力强、产酸高,既可在米粉上培养,又适应在麸皮上培养,是与川黔型根霉搭配制小曲的好菌种。以麸皮试管保存菌种为佳。

我国的传统小曲遍及全国,根霉菌种丰富,解放以来只有方心芳、乐华爱两位前辈,作此大规模的分离研究,功莫大焉。我们应注意平时观察、培养,将试验之观感与同行交流。如有贡献,则感幸甚。笔者目前有优良根霉菌10余株,绝大部分是购来,少部分自行分离,希望与同行共同交流、探讨。也衷心希望黄酒生产大厂,有关科研机构能带个好头,为我国黄酒生产的优良菌种研究多作贡献。

参考文献:

- [1] 方心芳,乐华爱.根霉的研究I.酿酒根霉的研究[J].微生物通讯,1959,1(1,3):
- [2] 乐华爱.工业微生物学成就[M].北京:科学出版社,1998.