

北虫草培养基添加量对酱油制曲及酶活性的影响

张杰^{1a}, 张映^{1a}, 赵博^{1b}, 崔成斌^{1a}, 张国财^{1b*}, 王滨松^{2*}

(1.东北林业大学 a.生命科学学院; b.林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2.黑龙江大学化学化工与材料学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 在酱油发酵基料(由 40 g 豆粕和 60 g 麸皮配制而成)中分别添加 5、10、15、20 g 北虫草培养基(分别称其为处理 1、处理 2、处理 3、处理 4), 以不添加北虫草培养基的处理为对照, 研究其对酱油制曲及对蛋白酶、淀粉酶、亮氨酸氨肽酶、纤维素酶活性的影响; 采用血球计数板法检测种曲孢子数, 观察种曲的感官变化。结果表明: 1)各处理中, 处理 2 种曲的孢子数最多, 孢子生长能力旺盛, 制曲 48 h 时曲料蓬松, 菌丝丰满, 米曲霉孢子为淡黄色, 制曲 54 h 时蓬松的曲料中长出黄绿色丰满的成熟米曲霉孢子; 2)制曲过程中, 蛋白酶、淀粉酶、亮氨酸氨肽酶、纤维素酶活性均呈先上升后下降的趋势, 酸性蛋白酶活性在制曲 42 h 出现峰值, 其余各酶的活性均在制曲 48 h 出现峰值; 3)除亮氨酸氨肽酶活性各处理间与对照间的差异无统计学意义外, 处理组中中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、淀粉酶及纤维素酶的酶活性均高于对照, 在酶活高峰时, 处理 2 的酶活性均显著高于对照组及其他处理组($P < 0.05$)。综上所述, 在制曲过程中添加北虫草培养基, 可显著提高米曲霉沪酿 3.042 制曲的质量, 提高其酶活性, 且以处理 2 的制曲效果较好, 酶活性最高。

关键词: 北虫草; 培养基; 酱油; 制曲; 酶活性

中图分类号: TS202.3; S567.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)03-0276-05

Effect of *Cordyceps militaris* culture medium addition on soy sauce koji-making and enzyme activities

Zhang Jie^{1a}, Zhang Ying^{1a}, Zhao Bo^{1b}, Cui Chengbin^{1a}, Zhang Guocai^{1b*}, Wang Binsong^{2*}

(1. a.College of Life Sciences; b.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2.School of Chemistry and Material Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Effects of respective adding 5, 10, 15, 20 g of *Cordyceps militaris* culture medium (named sample 1, sample 2, sample 3, sample 4) into soy sauce fermentation on soy sauce koji-making and activities of protease, amylase, leucine aminopeptidase and cellulase were studied by adopting none *Cordyceps militaris* culture medium addition as control. The number of spore in mouldstarter was measured using hemocytometer, and sensory changes were observed as well. Results indicated that: 1) In sample 2, the number of spore was the most and appeared vigorous. Plump hypha was overgrown on fluffy basic material and *Aspergillus oryzae* spores appeared at light yellow at 48 h, mature *Aspergillus oryzae* spores with yellow-green color sprout from fluffy basic material at 54 h. 2) Activities of protease, amylase, leucine aminopeptidase and cellulase in the process increased at first and then declined after it reached maximum. Activities of enzymes reached their peak at 48 h, while, that of acid protease reached its peak at 42 h. 3) Activities of neutral protease, alkaline protease, acid protease, amylase and cellulase in samples were higher than those in control, and those in sample 2 were significantly higher than those in other samples ($P < 0.05$), while there was no statistical significance for activity of

收稿日期: 2014-06-19

修回日期: 2015-04-21

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金项目(DL11CA01); 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金项目(RC2012QN002074); 黑龙江省教育厅科学技术项目(12513038); 黑龙江省基金面上项目(E201148); 东北林业大学国家基础科学人才培养基金项目(201218A3)

作者简介: 张杰(1972—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 副教授, 主要从事微生物研究; *通信作者, 张国财, 博士, 教授, 主要从事食用菌开发与利用研究, zhang640308@126.com; *通信作者, 王滨松, 博士, 副教授, 主要从事环境科学研究, 88530878@sohu.com

leucine aminopeptidase between in samples and in control. Therefore, adding *Cordyceps militaris* culture medium into soy sauce fermentation could improve quality of soy sauce koji and activities of enzymes, and they reached the highest in sample 2. The results could provide a reference for the production of soy sauce with *Cordyceps militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*; culture medium; soy sauce; starter propagation; enzymatic activity

酱油作为中国传统发酵食品调料之一,以其丰富的营养成分和滑腻的口感而深受人们喜爱,是人们餐桌上不可缺少的调味食品^[1]。伴随着人们对食品营养的高质量要求,单调、传统的发酵酱油已经不能满足人们的需求,开发具有保健功效的营养型酱油具有很大的市场前景^[2]。酱油制曲的实质是通过培养曲霉菌得到曲菌所分泌的蛋白酶和糖化酶。在酱醅发酵中,蛋白酶分解蛋白质产生的各类氨基酸是酱油的主要呈味物质。糖化酶分解淀粉类物质产生葡萄糖。葡萄糖和氨基酸在较高温度下发生美拉德反应,生成褐色物质,使酱油呈红棕色,可见,酶在制曲过程中起到了很重要的作用^[3]。北虫草培养基中不仅含有发酵基质,还含有北虫草中所特有的虫草素、虫草酸、虫草多糖等保健物质^[4]。笔者以米曲霉沪酿 3.042 单菌种^[5]进行酱油制曲,研究北虫草培养基添加量对酱油制曲及酶活性的影响,旨在为规模化生产虫草酱油提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与原料

试验菌种米曲霉沪酿 3.042 来自于山东省淄博市源康源生物科技有限公司。制曲原料豆粕和麦麸均为市售。

1.2 主要试剂

主要试剂有福林试剂(Folin)、二硝基水杨酸(DNS)试剂及缓冲液。

1.3 方法

1.3.1 种曲制备

将豆粕 40 g 和麸皮 60 g 混合均匀(豆粕和麸皮的质量比为 2 : 3),润以 100%的水,筛去粗粒,将混合好的料装入 1 000 mL 三角瓶(装入厚度 1 cm 左右),再于 121 °C、0.1 MPa 条件下维持 30 min 进行高压灭菌。冷却后分别添加 5、10、15、20 g 北虫草培养基(分别称其为处理 1、处理 2、处理 3、处理 4),以不添加北虫草培养基的处理为对照,再分

别以 0.3%接种量加入沪酿 3.042,30 °C 水浴恒温加热,转入摇瓶培养以防止结块,待瓶中充满孢子即可使用,或置冰箱备用。

1.3.2 种曲质量的测定

1) 孢子数的测定。以每 1 g 曲料中孢子的含量为计量单位,采用血球计数板法检测种曲孢子数。一般要求每 1 g 干基的孢子数在 60 亿个以上。

2) 感官品质的观察。观察制曲 24 ~ 60 h 成曲的感官品质。

1.3.3 酶活性的测定

蛋白酶活性采用 Folin-酚法^[6-8]进行测定。将 40 °C 下每 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量定义为 1 个蛋白酶活力单位(U)。

糖化酶活性参照文献^[2,6]进行测定。将温度 40 °C、pH 5.0 条件下每 1 min 催化生成 1 mg 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

亮氨酸氨肽酶活性参考文献^[9]的方法进行测定。将试验条件下每 1 min 水解 L-亮氨酸-对硝基苯胺产生 1 μg 对硝基苯胺所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

纤维素酶活性参考文献^[2]进行测定。将温度 50 °C、pH 4.8 条件下每 1 min 催化生成 1 μg 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.4 统计分析

用 SPSS 13.0 对数据进行分析,用 Excel 2007 辅助作图。利用 SPSS One-Way ANOVA 方差分析软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 各处理种曲在制曲过程中的感官变化

通过对种曲孢子数进行测定,测得处理 1、处理 2、处理 3、处理 4 每 1 g 发酵液中的孢子数分别为 334 亿、355 亿、343 亿、336 亿个,处理 2 中每 1 g 发酵液中的孢子数比对照高 30 亿个。由表 1 可见,在制曲过程中,不同虫草培养基添加量对种曲

感官产生的影响不同,与对照组相比,处理组米曲霉菌丝体生长厚实,处理 2 米曲霉菌丝体在培养制曲 48 h 曲料蓬松,菌丝丰满,米曲霉孢子呈淡黄色,接近成熟,孢子生长旺盛,在 54 h 后蓬松的曲料中

出现黄绿色丰满的成熟米曲霉孢子。综合孢子数分析和感官观察,认为处理 2 发酵基料中的种曲质量最优。

表 1 各处理种曲在制曲过程中的感官变化

Table 1 Sensory changes of culture medium with different dosage of *Cordyceps militaris* addition in the koji-making process

| 处理 | 感官变化 | | | | | |
|------|--|---|--|--|---|---|
| | 24 h | 36 h | 42 h | 48 h | 54 h | 60 h |
| CK | 成曲曲料略有发白,肉眼可以看到不明显的白色曲霉菌丝体,有淡淡的曲香,并有结块 | 曲料中产生能够辨别的明显的白色菌丝体,略有淡黄色孢子,曲料松散,有独特的曲香味 | 曲料呈微黄色,肉眼可辨别的淡黄色孢子,曲料蓬松且透气性好,有独特的曲香味,无异味、夹心及杂色 | 曲料呈淡黄色且蓬松、松软,所产生的淡黄色孢子比较多,独特曲香味增加,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料呈黄色,淡黄色孢子增多,有比较浓的独特的曲香味,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料整体蓬松,呈黄色,有浓厚的曲香味,无曲霉的不良味道、夹心及杂色,无酸味和氨味等不良味道 |
| 处理 1 | 成曲曲料略有发白,肉眼可见白色曲霉菌丝体,有淡淡的曲香,稍有结块 | 曲料中有能够辨别的明显的白色菌丝体,略有淡黄色孢子,白色菌丝丛生,曲料松散,有独特的曲香味 | 曲料呈微黄色,肉眼可辨别的淡黄色孢子,曲料蓬松且透气性好,有独特的曲香味,无异味、夹心及杂色 | 曲料呈淡黄色且蓬松、松软,所产生的淡黄色孢子比较多,独特曲香味增加,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料呈黄色,淡黄色孢子增多,有比较浓的独特的曲香味,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料整体蓬松,呈黄绿色,有浓厚的曲香味,无曲霉的不良味道、夹心及杂色,无酸味和氨味等不良味道 |
| 处理 2 | 成曲曲料略发白,菌丝丛生可见,有淡淡的曲香,曲料柔软,稍有结块 | 曲料颜色开始发黄,微有淡黄色孢子,白色菌丝厚实,曲料松散,有独特的曲香味 | 曲料呈淡黄色,布满淡黄色孢子,曲料蓬松,曲香味浓郁,无不良异味,无杂色 | 曲料呈黄色,蓬松柔软,菌丝丰满,淡黄色孢子丰满,独特的曲香浓郁,无不良异味,无杂色 | 曲料蓬松,孢子丰满呈黄绿色,浓郁曲香,伴随着虫草独特的味道,无酸味、氨味等不良异味 | 曲料蓬松,孢子丰满呈黄绿色,有曲香味,伴有虫草独特的味道,无酸味、氨味等不良异味 |
| 处理 3 | 成曲曲料略有发白,肉眼可见白色曲霉菌丝体,有淡淡的曲香,稍有结块 | 曲料中有明显的白色菌丝体,略有淡黄色孢子,白色菌丝丛生,曲料松散,有独特的曲香味 | 曲料呈微黄色,肉眼可辨别的淡黄色孢子,曲料蓬松且透气性好,有独特的曲香味,无异味、夹心及杂色 | 曲料呈淡黄色且蓬松、松软,所产生的淡黄色孢子比较多,独特曲香味增加,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料呈黄色,黄绿色孢子增多,有较浓的独特的曲香味,有虫草独特的味道,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料整体蓬松,呈黄绿色,有浓厚的曲香味,有虫草独特的味道,无曲霉的不良味道、夹心及杂色,无酸味和氨味等不良味道 |
| 处理 4 | 成曲曲料略有发白,肉眼可看到白色曲霉菌丝体,有淡淡的曲香,稍有结块 | 曲料中有明显的白色菌丝体,略有淡黄色孢子,白色菌丝丛生,曲料松散,有独特的曲香味 | 曲料呈微黄色,肉眼可辨别的淡黄色孢子,曲料蓬松且透气性好,有独特的曲香味,无异味、夹心及杂色 | 曲料呈淡黄色且蓬松、松软,所产生的淡黄色孢子比较多,有独特曲香味,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料呈黄色,黄绿色孢子增多,有比较浓的独特的曲香味,有虫草独特的味道,无曲霉的不良味道、夹心及杂色 | 曲料整体蓬松,呈黄绿色,有浓厚的曲香味,有虫草独特的味道,无曲霉的不良味道、夹心及杂色,无酸味和氨味等不良味道 |

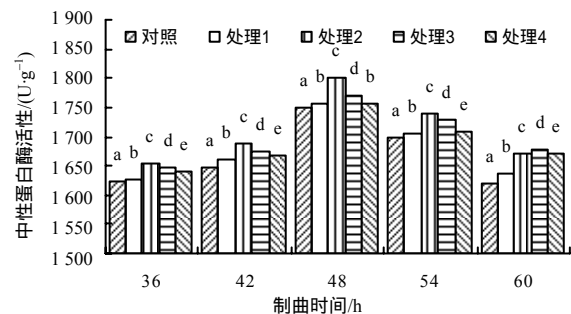
2.2 各处理种曲在制曲过程中酶活性的变化

2.2.1 蛋白酶活性的变化

沪酿 3.042 制曲能够产生 3 种蛋白酶,且碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶的酶活性依次减小,其原因是在单菌种米曲霉制曲过程中,初期制曲的 pH 值较高,呈现出碱性,随着蛋白的分解,pH 值逐渐降低。

中性蛋白酶活性的变化:由图 1 可知,对照和各处理在制曲 36~48 h 均呈上升趋势,在制曲 48~60 h 均呈下降趋势;对照和各处理均在制曲 48 h 出现最大值,且以处理 2 的酶活性最大(每 1 g 干基的酶活性达 1 801.21 U,比对照高 9.01%);与对照相比较,在整

个制曲过程中,各处理的中性蛋白酶活性均显著高于对照;各处理之间相比较,在制曲过程中,处理 2 的中性蛋白酶活性均显著高于其他处理。



图中不同小写字母表示处理间差异显著(P < 0.05),下同。
图1 制曲过程中各处理中性蛋白酶的活性

Fig.1 Neutral proteinase activity in the propagation process

碱性蛋白酶活性的变化：由图 2 可见，对照和各处理在制曲 36~48 h 均呈较快的上升趋势，在制曲 48~60 h 呈缓慢下降趋势；对照和各处理均在制曲 48 h 出现最大值，每 1 g 干基的酶活为 2 078.05 ~ 2 253.96 U，其中处理 2 的酶活性最大(每 1 g 干基的酶活性为 2 253.96 U，比对照高 8.46%)；与对照相比，整个制曲过程中各处理的碱性蛋白酶活性均显著高于对照；各处理之间相比较，整个制曲过程中处理 2 的碱性蛋白酶活性均显著高于其他处理。

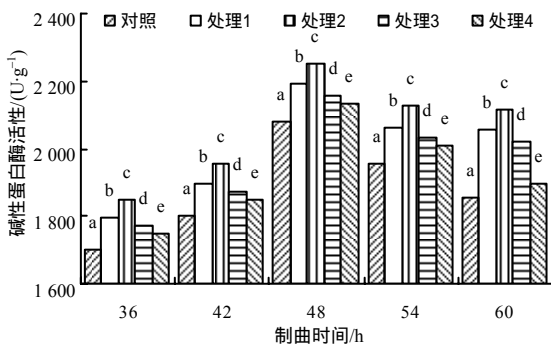


图 2 制曲过程中各处理碱性蛋白酶的活性
Fig.2 Alkaline protease activity in the propagation process

酸性蛋白酶活性的变化：由图 3 可知，酸性蛋白酶的活性远远小于中性蛋白酶和碱性蛋白酶的活性；对照和各处理在制曲 36~42 h 呈缓慢上升趋势，酶活性整体相差不大，且在制曲 48~60 h 呈下降趋势；对照和各处理酶活性均在制曲 42 h 出现最大值，其中处理 2 的酶活性最大(每 1 g 干基的酶活为 259.66 U，比对照高 6.02%)；与对照相比，除 60 h 外，整个制曲过程中各处理的酶活性均显著高于对照；各处理之间相比较，整个制曲过程中处理 2 的酸性蛋白酶活性均高于其他处理(在制曲 36、60 h，处理 2 均显著高于其他处理，在制曲 42 h，处理 2、处理 3 显著高于处理 1 和处理 4，在制曲 48 h，处理 2 显著高于处理 1 和处理 4)。

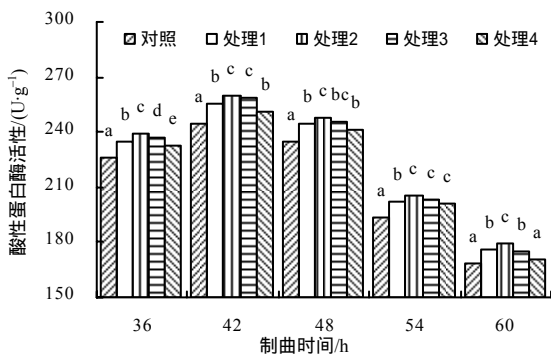


图 3 制曲过程中各处理酸性蛋白酶的活性
Fig.3 Acid proteinase activity in the propagation process

2.2.2 α-淀粉酶活性的变化

由图 4 可知，在制曲 36~48 h，对照和各处理 α-淀粉酶的活性呈上升趋势，在制曲 48~60 h 呈下降趋势；在制曲 48 h，对照和各处理均出现酶活性最大值，且以处理 2 的酶活性最大(每 1 g 干基的酶活性为 50.37 U，比对照高 38.27%)；与对照相比，在制曲 36 h 和 42 h，各处理组与对照组酶活性的差异无统计学意义，在制曲 48 h，处理 1 和处理 2 的酶活性均显著高于对照；在制曲 54 h 和 60 h，处理 1、处理 2 和处理 3 的酶活性均显著高于对照，处理 4 与对照酶活性的差异无统计学意义；各处理之间相比较，在制曲 36 h，各处理间酶活性的差异无统计学意义，在制曲 42~60 h，处理 1、处理 2 与处理 3 酶活性的差异均达显著水平，与处理 4 的差异也均达显著水平。

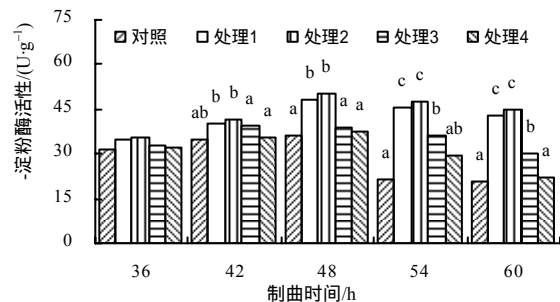


图 4 制曲过程中各处理 α-淀粉酶的活性
Fig.4 α-amylase activity in the propagation process

2.2.3 亮氨酸氨肽酶活性的变化

由图 5 可以看出，在制曲 36~42 h，对照和各处理亮氨酸氨肽酶的活性呈缓慢上升趋势，42 h 后迅速增加，在 48 h 出现酶活性峰值，之后迅速下降，其中处理 2 的酶活性最高(每 1 g 干基的酶活为 842.33 U，比对照高 1.10%)；整个制曲过程中，各处理的亮氨酸氨肽酶酶活性与对照间的差异均无统计学意义。

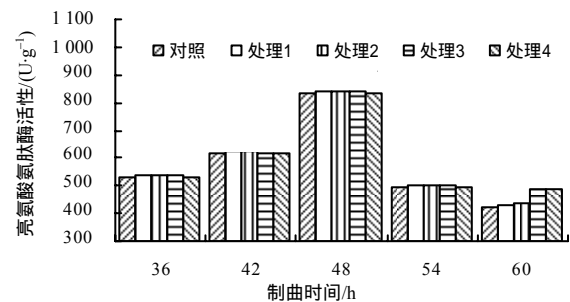


图 5 制曲过程中各处理亮氨酸氨肽酶的活性
Fig.5 Leucine aminopeptidase activity in the propagation process

2.2.4 纤维素酶活性的变化

由图 6 可见,在制曲 36~48 h,对照和各处理纤维素酶的活性缓慢上升,48~60 h 缓慢下降;对照和各处理均在制曲 48 h 出现酶活性峰值,其中以处理 2 的酶活性最高(每 1 g 干基的酶活为 1 801.53 U,比对照高 18.56%);与对照相比,整个制曲过程中,在制曲 48、54、60 h,各处理的酶活性均显著高于对照;各处理之间相比较,整个制曲过程中处理 2 的酶活性均高于其他处理(在制曲 36、54 h,处理 2 均显著高于其他处理组,在制曲 48 h,处理 2、处理 3 均显著高于处理 1 和处理 4)。

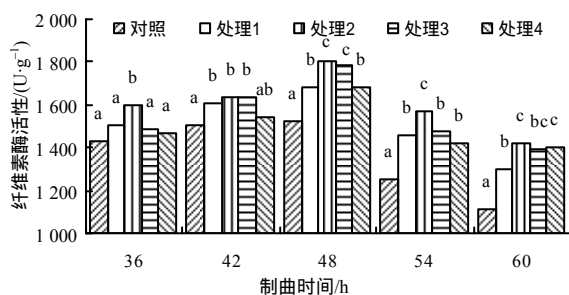


图 6 制曲过程中各处理纤维素酶的活性

Fig.6 Cellulase activity in the propagation process

3 结论与讨论

制曲是酱油发酵的关键。充分利用原料,改善酱油风味,提高制曲工艺水平,从而提升酱油品质,丰富酱油品种是酱油产业发展的必然趋势^[10-11]。本研究结果表明:

在酱油发酵基料中分别添加 5、10、15、20 g 北虫草培养基,以添加 10 g 北虫草培养基处理中每 1 g 发酵液中的孢子数最多,为 355 亿个,比对照高 30 亿个。该处理种曲的孢子数最多,孢子生长旺盛,制曲 48 h 时曲料蓬松,菌丝丰满,米曲霉孢子为淡黄色;制曲 54 h 时,蓬松的曲料中长出黄绿色丰满的成熟米曲霉孢子,由孢子数分析结果和感官观察结果可知,该处理发酵基料中的种曲质量最优。这与向培养基中添加丢糟和黄水提高制曲质量的研究结果^[12-13]相似,且产生的孢子数有所增加。

酱油制曲过程中米曲霉产酶活性的高低将影响原料的利用率及产品的品质,因此,提高成曲酶活性是提高酱油品质的重要途径^[14]。本研究结果表明,所测各酶的活性数值均呈先上升、后下降的趋势。除酸性蛋白酶在制曲 42 h 出现最大值外,其余各酶的活性均在制曲 48 h 出现峰值。在整个制曲过

程中,除亮氨酸氨肽酶活性各处理间与对照间的差异无统计学意义外,各处理中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、 α -淀粉酶及纤维素酶的酶活性均高于对照,且在酶活高峰时,处理 2 酶活性均显著高于对照组($P < 0.05$),表明添加北虫草培养基可以提高制曲过程中酶的活性,且以添加 10 g 北虫草培养基处理的酶活性较高。

将北虫草培养基作为原料加入到酱油发酵基料中,不仅能实现废物利用,解决酱油发酵的原料问题,而且能制造出具有虫草风味的功能型酱油。

参考文献:

- [1] Wei C L, Chao S H, Tsai W B, et al. Analysis of bacterial diversity during the fermentation of inyu, a high-temperature fermented soy sauce, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and the plate count method[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 252-261.
- [2] 赵强强. 酱油制曲及螺旋藻酱油发酵工艺的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [3] 张艳芳. 多菌株制曲促进酶系优化与提高酱油品质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [4] 林群英, 宋斌, 李泰辉. 北虫草研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 4(3): 154-157.
- [5] 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(5): 56-59.
- [6] 周探春, 刘焱, 邓放明. 斑点叉尾鮰下脚料蛋白酶水解工艺优化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 39(1): 95-98.
- [7] 刘晓蓉, 谭才邓, 陈小冰, 等. 米曲霉 1228 制曲条件的优化及酱油酿造的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(2): 291-293, 348.
- [8] GB/T23527—2009 蛋白酶制剂蛋白酶活力的测定 福林法[S].
- [9] 潘进权. 毛霉亮氨酸氨肽酶的纯化及性质研究[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 163-167.
- [10] 李秀婷, 赵进, 鲁绯, 等. 米曲霉固态发酵产酶条件及酶活力研究[J]. 中国酿造, 2009, 203(2): 26-28.
- [11] 王欣宏. 螺旋藻酱油发酵工艺研究以及特征性成分检测[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [12] 边名鸿, 宗绪岩, 刘绪, 等. 丢糟在制曲生产中的添加量与大曲质量关系的初步研究[J]. 食品与发酵科技, 2012(4): 82-84, 99.
- [13] 石磊. 制曲过程中适量添加黄水来提高大曲质量的研究[J]. 山东食品发酵, 2004(1): 25-26.
- [14] 赵文婷, 王颖, 邱璠, 等. 加工工艺及添加面粉发酵对豆酱抗氧化能力和抗氧化成分的影响[J]. 中国酿造, 2011(6): 23-26.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库