

液体曲研究

陈騷声編著

輕工業出版社

6.2

19-60

液 体 曲 研 究

陈 陶 声 編 著

輕 工 業 出 版 社

1958 年 • 北 京

內 容 介 紹

采用液体曲代替固体曲子制造酒精，是酒精工業生产技术上的重大改革。近年来，科学先进国家已先后采用液体曲。我国液体曲的試驗研究工作，最近亦告成功。为适应各地液体曲研究工作日益开展的需要，作者收集国外有关文献資料，結合我国試驗研究成果，而編写这本书。本書內容包括：液体曲的制备方法，所用微生物、培养基，培养条件，液体曲用法之工厂实例及淀粉酶測定法等。

本書可供酒精工業中級以上技術人員、科学研究工作者及大專師生研究参考之用。

液体曲研究

陈駒声編著

*

輕工業出版社出版

(北京广安門內白廣路)

北京市書刊出版業營業許可證出字第099号

北京市印刷一厂印刷

新华書店發行

*

787×1092 公厘 1/32·4⁵⁰/₃₂ 印張·100,000 字

1958 年 11 月第 1 版

1958 年 11 月北京第 1 次印刷

印數：1—2,600 定价：(10) 0.70 元

統一書号：15042·395

目 录

第一篇 液体曲	5
第一章 液体曲法的研究历史	5
第二章 液体曲的各种使用方法圖解	6
第三章 与液体曲法有关的微生物	10
第四章 培养用具	18
第五章 培养方法	22
第六章 原料的配合方法	24
第七章 原料的蒸煮及冷却	39
第八章 pH 值	40
第九章 溫度	50
第十章 通气量	52
第十一章 防止染菌的措施	68
第十二章 防止液曲品質不均的措施	69
第十三章 液体曲各种用法的工厂实例	71
第二篇 阿明諾酒母液体曲混合法	87
第一章 阿明諾酒母液体曲混合法的研究历史	87
第二章 阿明諾法及阿明諾改良法圖解	87
第三章 与阿明諾法有关的微生物	93
第四章 培养用具	100
第五章 培养法及接种量	100
第六章 原料的配合方法	103
第七章 原料的蒸煮	104
第八章 pH 值及溫度	104
第九章 通气量	105
第十章 阿明諾法及阿明諾改良法的工厂实例	108
第三篇 淀粉酶及其測定法	121
第一章 淀粉酶	121
第二章 淀粉酶測定法	140

自序

我国古法釀造，蘊藏丰厚，变化錯縱复杂，制品亦具特殊風格，为人人所喜爱。一八九五年法国科学家曾由我国酒药中分出一种毛霉，应用深層培养的方法，創造了举世聞名的“阿明諾法”。嗣后發現此法尚有缺点，必須加以改良，遂有“阿明諾酒母麩曲混合法”的發明。最近数年間因液体曲研究成功，应用液体曲代替麩曲劳力更省，效率更高。液体曲的应用方法甚多，有“液化阿明諾法”，“阿明諾酒母液体曲混合法”，“液曲酒母液曲混合法”，“液曲酒母法”，“純液曲法”等。液曲淀粉酶的生成原理及管理方法，不是甚么难以掌握的。現在我国液体曲研究正在日益开展之时，关于此类文献，必需广泛收集以便参考。本書內容分为三篇，叙述液体曲的制备与其各种方法。关于液体曲所用微生物、培养基、培养条件、工厂实例以及淀粉酶測定法等，均已举其梗概。但遺漏及錯誤之处，在所不免，尙希同志們指正！

陈 駒 声

1958 年劳动节于上海

第一篇 液体曲

第一章 液体曲法的研究历史

应用淀粉質原料的酒精工厂，最初应用麦芽为糖化剂，1914年，Takamine⁽¹³³⁾ 首先分离純粹的 *Aspergillus oryzae*，並將此霉制造麩曲或米曲。因其色黃名曰黃曲，可代麦芽之用。近年又發現黑曲（应用 *Asp. batatae*、*Asp. usamii* 等黑曲霉制成），糖化力（在 55~65°C 时）較强于黃曲，遂取黃曲的地位而代之。現在我国北方向有数厂采用麦芽为糖化剂，而河南、山东、上海等地酒精厂則全部改用黑曲。应用黑曲为糖化剂的淀粉利用率虽較黃曲高，但是制造时，因为，1. 使用大量麩皮；2. 曲室佔地甚大；3. 曲室內高温、高湿，对工人健康不利；4. 麩曲含有杂菌，不利于酒精發酵；5. 劳动强度大。从事釀造工業的人們，面对此等困难不能不求解决之法，因此遂有液体曲及阿明諾酒母液体曲混合法的發明。茲先述液体曲的研究經過如次：

关于液体曲的研究，1947年美國農部的北部利用研究分所（NURB）發表了一系列論文⁽⁸²⁾，其內容為：1. 菌種的選擇；2. α -淀粉酶及麥芽糖酶的生產條件；3. 在化驗室及小工廠里，自谷類原料制造酒精。

Erb 及 Hildebrandt⁽¹³⁾ 研究液体曲的制造，但是应用的菌种为 *Rhizopus boulard* 或 *R. delemar*，其結果仅能代替 80% 的麦芽。

Adams 等⁽⁷⁾ 及 Erb, Wisthoff 及 Jacob⁽¹⁴⁾ 最后証實了 NURB 的成績。

1953年 Pool 及 Underkofler⁽³⁰⁾ 將 *Aspergillus niger* NRRL 330、*A. niger* NRRL 337, 及 *A. oryzae* I. S. C. 38 B. 的麴曲和液体曲的 α -淀粉酶、麦芽糖酶、残余糊精酶, 以及它們对自玉米制造酒精的产率作了比較。

上述 NURB 方法, 1954年在 Iowa 作了大規模試驗。其結論是: 以液体曲完全代替麦芽有实用的价值, 且可供坏玉米制造酒精之用⁽¹⁶⁾。1950年起日本田边修⁽¹⁴⁾、富金原孝⁽³⁴⁾, 室田晋次⁽¹³⁹⁾、土井新次⁽¹⁴⁰⁾ 等从事液体曲的研究。1954年苏联 Фремель 及 Вяткин 等亦發表液体曲論文^(5~6)。1953年起我国中国科学院⁽¹⁾、华南工学院及 (la) 上海市輕工業研究所^(2~4)、先后从事液体曲的試驗。1955年年底, 上海市輕工業研究所、北京發酵研究所与上海酒精厂共同进行液体曲的中型試驗。1957年10月开始大規模工厂試驗, 一部分業已投入生产。液体曲制造的成功, 在我国酒精工業历史上开辟了新的道路, 真是一件大喜事。

第二章 液体曲的各种使用方法圖解

液体曲的应用方法很多, 在苏联及美国应用簡單的液体曲法, 即以液体曲代替一部分或全部的麦芽; 在日本, 应用的方法更多, 大約分为: 1. 液体曲酒母法; 2. 液体曲酒母液体曲混合法; 3. 阿明諾酒母液体曲混合培养法等等。茲將各法的梗概列下:

(一) 液体曲法

此法是以液体曲代替麴曲或麦芽, 制造酒精。一切操作手續除改用液体曲外, 均与应用麴曲时相同。此法的优点如次:

1. 完全应用机械設備以代人工。
2. 一切应用自动控制仪表, 易于管理。
3. 除另制液体曲培养罐外, 不需要增設其他設備。
4. 操作規程除以液体曲代替麩曲外, 不必更动。
5. 可以酒槽水为原料, 費用較廉。
6. 淀粉利用率至少可与黑曲法相等, 而較麦芽法略优。
7. 各种原料均可应用。

此法的缺点如次:

1. 制造液体曲所需通气量較大, 对醪的容积言, 自25%至60%, 因此电费較昂。
2. 按現在国际水平, 液体曲使用量对醪量言, 为10~20%, 尚嫌太多。
3. 液体曲用量少于10%, 則第一期發酵速度較慢, 因此發酵時間不免迟緩, 影响工厂的日产量。
4. 仍旧应用旧法的酒母醪, 因此發酵不能在绝对無菌状态下进行。

茲將本法的流程簡示如(圖1)

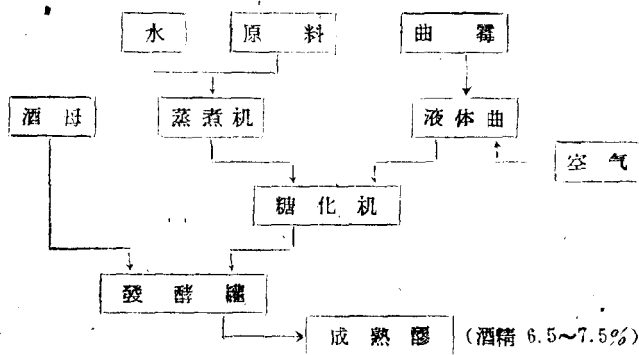


圖1 液体曲法流程簡圖

(二) 液体曲酒母法

上述液体曲法仍旧应用通常酒母操作，不免繁杂。如在液体曲的培养，经过适当时间后，接种酵母，再经过适当时间后，即可直接加于冷至适当温度的蒸煮醪中，使其糖化与发酵同时进行。

此法的优点如次：

1. 不必另制普通酒精厂所用的酒母，手續較簡。
2. 因不用普通酒母，因此杂菌侵入的机会較少。

此法亦有缺点如次：

1. 通風量与液体曲同，而多于阿明諾改良法。
2. 因为蒸煮醪未經液化，而直接冷至发酵温度，因此冷却較慢。
3. 发酵效率較低。

本法的流程簡圖如圖 2：

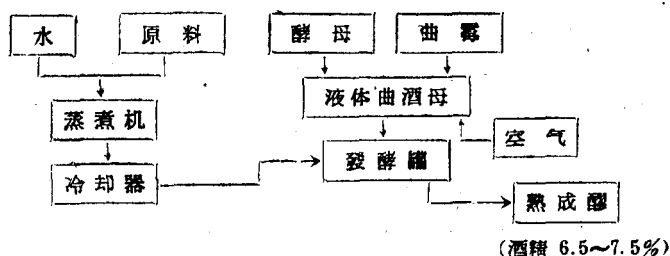


圖 2 液体曲酒母法流程簡圖

据小玉健吉报告⁽⁵²⁾：液体曲酒母应用下述蒸煮法的蒸煮醪，酒精成分可以提高至 8.5~9.5%。

薯干磨碎后，添加全水量約三分之二，加热至 80~85℃，

使成糊狀，在攪拌之下，將余量水加入。當醪的溫度減至 $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ 時，將含有 α -淀粉酶的物料加入，維持此溫度 20 分鐘後，再按常法蒸煮。蒸煮醪冷至適溫後，添加 *Asp. awamori* var. *fumeus*, Nakazawa 及酵母所制的液體曲酒母。此法的發酵效率為 $85\sim 87\%$ ，醪的酒精含量為 $8.5\sim 9.8\%$ （容積）。

此法流程簡圖如下（圖 3）

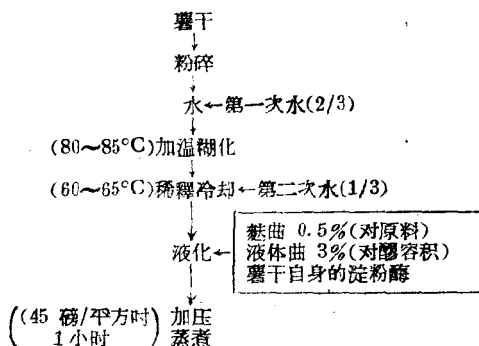


圖 3 預先液化的蒸煮法

（三）液體曲酒母液體曲混合法

前述液體曲酒母法所用蒸煮醪未經液化，所以醪的粘度較高，不但冷卻較緩，且發酵效率亦較低。如將蒸煮醪先用一部分液體曲使其液化後（通常為 60°C ，30 分鐘）再冷至 30°C ，添加液體曲酒母，則上述缺點可以補救。本法的流程簡圖如下（圖 4）：

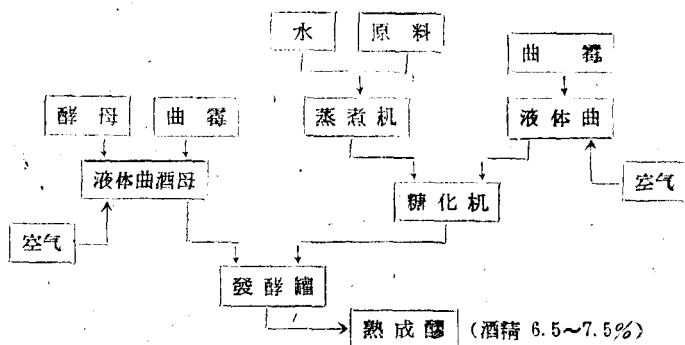


圖 4 液体曲酒母液体曲混合法順序圖

第三章 与液体曲法有关的微生物

(一) 液体曲应用的霉菌

1. 日本制造液体曲用那一种霉菌？日本制造液体曲的目的，大多数在于配合阿明諾酒母之用，单独液体曲法尚未采用。应用的霉菌以 *Aspergillus awamori* 和 *Aspergillus usamii* 为主。

Aspergillus Awamori var. *fumens* Nakazawa,

Simo et Watanabe (136)

本菌是中澤及霜、渡边氏等，于研究泡盛發酵菌时，由冲繩产泡盛曲分离而得。

(1) 形态：在曲汁瓊脂上于最适温度 38°C 培养 5~10 日后鏡檢。

A. 菌絲体：面平滑，無色，不生隔壁。勻質透明，延命菊黃~玫瑰黃色(marguerite yellow~primrose yellow)(註)

(註) 本書所記的色以 Ridgway 的标准色为准。

B. 分生孢子: 球形, 膜厚, 淡黑褐色, 表面粒狀而成連鎖串狀物。分生孢子頭大, 呈不光亮的灰鼠色 (busky drab) 及褐色 (fuscous) 的中間色。

C. 分生孢子柄: 面平滑, 膜厚。內容勻質透明, 近頂囊處呈微黃褐色。

D. 頂囊: 球形, 微黃褐色。

E. 小梗: 生于頂囊的周圍, 上生成作放射狀。二段分歧。微黃褐色。第一小梗為廣闊的棍形或圓柱形, 其上附着 2~3 個第二小梗。第二小梗為小棍形。

F. 各器官的大小(μ):

摘要	菌絲 (闊)		分生孢子柄 (長) (闊)		頂囊 (徑)
極限	1.8~13.7		400~800	3.7~16.8	20~56
普通	6.2~7.5		560	12.5~13.7	36~40
摘要	第一小梗 (縱) (橫)		第二小梗 (縱) (橫)		孢子 (徑)
極限	11.2~15	4.4~6.2	5~40	2.5~3.7	3.7~5.6
普通	13.7	5~5.6	7.5	3.1	4.4~5

(2) 生理:

A. 各種培養基上的繁殖狀態:

將各種培養基放入 200 毫升的三角瓶中, 每日用蒸汽殺菌 30 分鐘, 繼續 3 日後, 各菌分別移植于中央部, 保溫 31°C, 視其繁育情形。(見表 1)

B. 死滅溫度: 60°C, 10 分鐘。

C. 繁殖最適溫度: 35°C。

D. 繁殖最適 pH: pH 3.6~4.4。

E. 明膠液化作用: 曲汁明膠在 20°C, 繁殖 9 日後, 開始液

表 1

培养基 \ 日数	3 日	15 日	60 日
曲汁瓊脂	菌絲白色~帶黃色。 孢子: 褐色(fuscous) 及灰鼠白(chætura drab)的中間色。	全面多凹凸, 孢子密, 呈不光亮的灰鼠 色~褐色 (busky drab~fuscous)。	面粗, 變棕色~帶黑 棕色 (hair drown ~blackish brow- n)。
馬鈴薯	全面生成玫瑰黃色 (primrose yellow) 的菌絲。 大半覆以孢子, 灰鼠 色(chætura drab)。	棕色~深棕色 (clove brown~bister)。	深棕色~褐土色 (sepia~sacchar- os umber)。

化, 20 日后完全液化。

F. 牛乳的凝固並消化作用(添加 0.05% CaCl_2)。

6 日后大半凝固, 10 日后, 全部凝固。13 日后上部大半消化而成飴色。

G. 对各种碳水化合物能否繁殖?

+ 阿刺伯糖	+ 甘露醇
+ 糊精	+++ 甘露糖
+ 衛茅醇 (dulcit)	+ α -甲基糖甙
++ 果糖	+ 棉实糖
+ 半乳糖	+ 鼠李糖
+++ 葡萄糖	++ 蔗糖
+ 菊糖 (inulin)	+++ 山梨醇 (sorbitol)
+ 乳糖	+ 淀粉
++++ 麦芽糖	++ 木糖

H. 对各种碳水化合物能否發酵?

- 阿刺伯糖	- 乳糖	- 鼠李糖
+ 糊精	+ 麦芽糖	+ 蔗糖
- 果糖	- 甘露醇	- 淀粉

—半乳糖	+甘露糖	—木糖
+葡萄糖	— α -甲基糖甙	
+菊糖	—棉实糖	

I. 糖化力: 此菌可以变淀粉为糖。

J. 生成檸檬酸: 应用蔗糖 10%、 NaNO_3 0.3%、 KH_2PO_4 0.03%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、 CaCl_2 1%, 可生相当于蔗糖量 60% 的檸檬酸。

Aspergillus batdtae

形态:

分生孢子: $4 \sim 5\mu$ 球形, 褐色, 初为綠黄色, 有細微的刺, 幼的橢圓形, 平滑。

小梗: 分枝帶黄色, 复于頂囊的全面。

第一小梗, 棒狀, $20 \sim 40 \times 8\mu$ 。

第二小梗, 在第一小梗上形成 4 个, $10 \sim 3.2\mu$ 。

分生孢子柄: 面平滑膜厚, 上部稍帶褐色,

$2000 \sim 4000 \times 12 \sim 20\mu$ 。

頂囊: 球形, 無色, 壁帶褐色。

菌集色: 由白色轉为黄褐色, 再轉为黑色。

被子器: 不形成。

菌核: 不形成。

生理:

明膠液化: 液化力强, 麦芽汁明膠, 4 日可液化。

最适温度: 30°C (繁殖), $60 \sim 65^\circ\text{C}$ (糖化)。

死灭温度: 60°C , 30 分鐘。

备考:

可使淀粉糖化, 以供酒精制造之用。

2. 美国制造液体曲用那一种霉菌?

Le Mense Corman⁽³⁰⁾ 研究 350 个霉菌, 包括: 根霉、毛霉、青霉、曲霉及 *Monilia* 的深层培养结果, 除了数种曲霉外, 其余已研究的霉菌, 仅生有限的淀粉酶, 或者不能生成淀粉酶。曲霉中有: *A. wentii*、*A. oryzae* 及 *A. alliaceus* 生成相当量的糊精化酶 (dextrinizing enzyme)。数系 (strain) 的 *A. niger* 生成糊精化酶及糖化酶。在各系中对淀粉糖化力较强的, 便含有足量的麦芽糖酶。

278 个曲菌包括 41 种不同的种, 其中, 仅有 34 种具有糊精化酶, 每毫升的液曲糊精化酶自 0.1~15.3 单位。*A. oryzae*、*A. wentii* 及 *A. niger* 的糊精化酶含量较高。在最适培养条件下, *A. niger* NRRL 337 的糊精化酶含量最高, 每毫升达 22.5 单位, 以干量计, 每克为 1, 125 单位。

A. niger NRRL 326, 330 及 679, 均含有酶的复体, 使淀粉糊化, 但是, 糊精化酶的生成量不如 *A. niger* NRRL 337。

根霉、毛霉及 *monilia* 等系在同一条件培养时, 生成极少或不生糊精化酶, 但是菌的繁育极旺。*Rhizopus* NRRL 1891 (*Rhizopus* Boulard) 的液曲, 对于谷胶有相当糖化力, 其他根霉及毛霉亦有同样性质, 或者因为这等霉菌所具淀粉酶系统和麦芽及其他已经研究的霉菌不同。而据 Leopold 及 Starbanow (1943) 报告: *R. japonicus* 可以生成 α -及 β -淀粉酶, 这种说法, 与 LeMense 说法是不相同。

3. 我们选出的是何菌种?

上海轻工业研究所对于液体曲选种试验结果, 以 *Aspergillus niger* No. 2 为最佳, *Asp. niger* NRRL 330 次之。但是前一种在酒糟水培养基中培养不甚适宜, 因此现在用 *Asp. niger* NRRL 330 从事试验⁽²⁾

表 2

Aspergillus Niger NRRL 330 及 337

	NRRL 330	NRRL 337
分生孢子	球形, 多数为 $4.3 \sim 5.0 \mu$, 分子孢子膜的表面平滑或不甚平滑, 电子显微镜下粗糙。	球形, 多数为 4.5μ , 最大 6μ , 分生孢子膜的表面, 平滑或不甚平滑, 电子显微镜下略为粗糙。
分生孢子柄	长 $1000 \sim 1500 \mu$, 直径 $14 \sim 17 \mu$, 壁平滑。	大多数长为 $550 \sim 830 \mu$, 直径 $11 \sim 20 \mu$, 壁平滑。
顶 囊	颇似球形, 直径 $45 \sim 68 \mu$ 。	颇似球形, 直径 $25 \sim 48 \mu$ 。
小 梗	二系: 第一小梗 $8.6 \sim 10.0 \mu \times 3.8 \sim 5.7 \mu$; 第二小梗 $8.2 \times 3.2 \mu$ 。	二系: 第一小梗 $6.3 \sim 9.0 \mu \times 3.8 \sim 4.4 \mu$; 第二小梗 $5.7 \sim 6.4 \mu \times 2.5 \times 3.8 \mu$ 。
分生孢子头	颜色: 黑棕, 球形或放射状, 直径 $160 \sim 320 \mu$ 。	颜色: 黑棕, 球形或放射状, 直径常为 $140 \sim 280 \mu$ 。
菌 集	于 30°C 培养 3 天后, 在 Czapek 琼脂上菌集 4.8 厘米, 在曲汁琼脂上 6.2 厘米。	于 30°C 培养 3 天后, 在 Czapek 琼脂上菌集直径 4.0 厘米, 菌丝浅黄色; 在曲汁琼脂及*亚硝酸盐琼脂上, 繁殖迅速。

* 此培养基名为 Sakaguchi-Wang 氏培养基, 供亚硝酸盐同化试验用; 蔗糖 30 克, NaNO_3 1.5 克, K_2HPO_4 1 克, KCl 0.5 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克, FeSO_4 0.01 克, 添加蒸馏水配成一升。

中国科学院把几百株曲霉应用深层培养法进行选择, 其结果黑曲霉以 *Asp. awamori* (科学院编号 3.75) 的糖化力最高。黄曲霉和黑曲霉相比较, 都是黑曲霉的糖化力较高。

(二) 液体曲应用的酵母

液体曲法应用的酵母与普通酒精厂所用的相同, 兹分述如下:

Brenneri-Heffe Rasse II: 此是 Lindner 氏分离的酵母, 对酒精的抵抗力强, 广泛应用于酒精的制造。一般为长卵形, 比后述的 Rasse XII 稍大, $7 \times 5.6 \mu$ 。发酵液内细胞少连接, 大部分个个分离。皮膜形成甚慢, 大约在 13 日以后。所成皮膜为微压状, 易使发酵液混浊。当发酵时, 酵母大量下沉, 形成酵母沉渣。

本种細胞內貯藏大量肝糖。一般較 Rasse XII 死亡为早。

Brennereihefe Rasse XII: Maths 氏在德国一个压榨酵母工場中分离而得, 与 Rasse II 同为酒精制造者所乐用。成長常較 Rasse II 速, 細胞間的連結頗强, 中央部的数个至10个的細胞, 常較終端的幼細胞为大。皮膜形成較速, 在 28°C 6 日生成光澤的、白色的、厚而潤湿的皮膜。發酵液十分稠濁。細胞似卵形, 大小不一, $7 \times 6.8 \mu$ 。孢子形成比 Rasse II 速, 肝糖的蓄积量相当大。

現在我国酒精工厂所用酵母名称不一, 当为上述二种的变系。

(三) 与液体曲發酵有关的細菌⁽¹³⁵⁾

液体曲或阿明諾酒母的培养, 最重要的事是要防止細菌的污染。污染的来源有: 1. 原料蒸煮不透, 以致細菌尚未完全消灭; 2. 当通气或接种时, 杂菌由外面窜入; 3. 培养霉菌时, 所用馬鈴薯或其他培养基灭菌未完全。茲將常見的細菌叙述如下:

(1) 腐敗菌

腐敗菌棲息于各种腐敗物、排洩物等, 可以引起腐敗作用, 与發酵工業有关的有枯草桿菌及馬鈴薯桿菌。

枯草桿菌 *Bacillus subtilis* Ehrenberg: 此菌附着于土壤中或枯草中, 为好气性桿菌, 遍身鞭毛, 形成孢子。此菌孢子極耐热, 在热水中 3 小时不至死灭, 發育温度 37~40°C, 最低 6°C, 最高 50°C, 在肉汁中生薄被膜, 液稠濁發生甘臭。可使肉汁、乳等腐敗。具有溶膠性、牛乳凝固性, 油脂分解力、淀粉糖化力, 果膠分解力, 並發生硫化氫。

馬鈴薯桿菌: 最有名的为 *Bacillus mesentericus* Vulgatus。