

高产糖化酶黄曲霉菌的选育及初步应用

夏艳秋^{1*} 朱强¹ 汪志君²

(1. 淮海工学院 海洋学院 江苏 连云港 222005)

(2. 扬州大学 食品科学与工程学院 江苏 扬州 225001)

摘要: 试验目的是选育优良黄酒糖化菌种。对原始菌株 YA, 采用紫外线与 LiCl 复合诱变、碳酸钡诱发及自然分离方法, 选育到一株淀粉酶活力高、不产黄曲霉毒素的优良黄曲霉突变株 YA4.9。其生长繁殖快, 菌丝粗短密集。最佳制曲时间为 32 h, 糖化酶和液化酶活力分别为 30952 U/g 和 14357 U/g, 比亲株提高 103.46% 和 65.08%, 酿酒性能好。继代培养表明其性状能稳定遗传。

关键词: 黄酒, 黄曲霉, 糖化酶, 黄曲霉毒素, 选育

Breeding of High-Glucoamylase Activity *Aspergillus flavus* and Application

XIA Yan-Qiu^{1*} ZHU Qiang¹ WANG Zhi-Jun²

(1. College of Marine, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

(2. College of Food Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

Abstract: In order to breed excellent diastatic strain using for Chinese Rice Wine fermentation, UV, LiCl, BaCO₃ and natural selection to mutagenize (*Aspergillus flavus*) YA were used. Mutant (*Asp. flavus*) YA4.9 was obtained with properties as follows: growing fast, mycelium dense-dumpy, not producing aflatoxins. The optimum culture time of moldy bran was 32 hours, the glucoamylase activity and α -amylase activity were 30952 U/g and 14357 U/g, comparing to the parent strain, increased by 103.46% and 65.08%, respectively, the finished Chinese Rice Wine has good quality. The inherited characters were steadily by many generations.

Keywords: Chinese Rice Wine(CRW), *Aspergillus flavus*, Glucoamylase, Aflatoxin, Breeding

黄酒是我国的特有酒种, 属于低度、营养、保健的发酵原酒, 因而成为时尚新宠。黄酒发酵是典型的双边发酵, 新工艺黄酒采用大罐深层纯种发酵, 要求糖化、发酵菌种繁殖快、活力高、耐性好, 才能保证发酵的顺利进行。因此, 近年来, 黄酒界对菌种的选育和应用的研究逐年增多, 但主要集中于

酵母菌, 对糖化菌的相关研究未引起足够的重视, 已成为制约黄酒快速发展的重要原因之一。目前, 用于黄酒酿造的糖化菌种主要是黄曲霉菌。黄曲霉菌富含液化酶, 耐高温, 接种后能迅速降低醪液粘度, 但其糖化酶活力低, 发酵后劲不足, 酒中残糖含量高, 导致原料利用不充分, 且极易滋生酸败菌, 严

* 通讯作者: Tel: 86-518-85895430; ✉: xyq78412@163.com

收稿日期: 2009-02-26; 接受日期: 2009-05-26

重影响黄酒品质和产量。因此, 提高黄曲霉菌糖化酶活力已成为黄酒业当务之急。试验采用理化复合诱变, 并首次结合碳酸钡诱变进行菌种选育, 以期获得优良黄酒糖化菌种。

1 材料与方 法

1.1 菌种

1) 黄曲霉菌(*Asp. flavus*)YA, 不产黄曲霉毒素; 黄曲霉菌(*Asp. flavus*)AFP, 产黄曲霉毒素, 系扬州大学食品科学与工程学院微生物实验室保藏菌种;

2) 黄酒活性干酵母, 湖北安琪酵母股份有限公司生产。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 察氏培养基。

1.2.2 初筛培养基(W/V): 可溶性淀粉 1.2%, 酵母膏 0.8%, 琼脂 2%, pH 5.0~5.5。

1.2.3 复筛培养基(W/V): 新鲜麸皮与水 1:1 配料, 添加 NaNO_3 1.5%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, pH 4.0~4.5。

1.2.4 中间培养培养基(W/V): 于察氏培养基中添加葡萄糖 5%, 酵母膏 1.5%, 蛋白胨 1.5%, pH 5.0~5.5。

1.2.5 花生察氏培养基(PCD): 于察氏培养基中添加花生粉 10%, 氮源改为 NH_4Cl 0.16%, pH 5.5~6.0。

1.2.6 HgCl_2 培养基(SM)(W/V): 于察氏培养基中添加花生粉 0.05%, HgCl_2 1.0×10^{-4} mol/L, 氮源改为 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 1%, pH 5.5~6.0。

1.2.7 基础培养基(PGAN)(W/V): 于 7.5 L 花生察氏培养基中, 补加无机盐 A、B 液各 10 mL (A: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, CoCl_2 0.1%; B: CaCl_2 5%), 碳源改为葡萄糖 5%, 氮源改为 NH_4NO_3 0.24%, pH 5.5~6.0。

以上培养基除复筛培养基 1×10^5 Pa 灭菌 50 min 外, 其余均 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 试验处理方法

1.3.1 单孢子悬浮液(MSS)的制备: 于活化好的黄曲霉菌察氏斜面, 倒入无菌水, 刮下孢子, 打散, 过滤, 稀释至孢子数 1.0×10^6 CFU/mL。

1.3.2 初筛: 取 0.2 mL 经过一定处理的 MSS 涂布于初筛培养基, 30°C 培养 2 d~3 d, 倾倒入哥氏碘液, 观察并测量菌落直径(D)及其周围透明圈直径(d), 挑取孢子萌发早, 透明圈清晰, d/D 值大的菌株。

1.3.3 复筛: 将初筛得到的菌株接种察氏斜面,

30°C 培养 5 d~7 d, 挑取 2 环孢子接种复筛培养基, 32°C 摇瓶培养 36 h, 得麸曲, 测定麸曲酶活力, 挑取麸曲淀粉酶活力高的菌株。

1.3.4 麸曲粗酶浸提液的制备: 依提取酶类不同, 将成熟麸曲浸在不同的 pH 缓冲体系(糖化酶用 pH 4.6 醋酸缓冲体系; 液化酶用 pH 6.0 柠檬酸缓冲体系; 酸性蛋白酶用 pH 3.0 乳酸缓冲体系), 30°C 水浴摇瓶浸提 1 h, 过滤, 滤液 3000 r/min 低温离心 20 min, 上清液为粗酶液。

1.3.5 紫外线(UV)和氯化锂(LiCl)复合诱变: 取 5 mL MSS, 置 15 W 紫外灯下 28 cm 处振荡照射不同时间, 避光中间培养 10 h~12 h, 稀释, 涂布含不同 LiCl 浓度的初筛培养基。

1.3.6 碳酸钡(BaCO_3)诱变试验: 每 100 mL PGAN 内加入 1.0 g BaCO_3 。接种待测菌株, 30°C、200 r/min 摇瓶培养, 当分生孢子萌发后, 每隔 24 h 再加入 0.075 g BaCO_3 , 总共加 1 g~2 g。

1.3.7 产黄曲霉毒素菌株的快速检测: 参照文献[1]。接种待测菌株于 PCD 和 SM, 30°C 培养 36 h~48 h, 当发现白色菌丝体生长旺盛, 黄绿色的分生孢子开始少量出现时, 将培养皿置 125 W 紫外灯下检查。

1.3.8 麸曲氯仿抽提液的制备: 3 g 曲加 7.5 mL 水, 匀浆搅拌 5 min, 过滤。滤液加 2.5 mL 氯仿, 振荡 5 min, 静置抽提, 离心, 倾倒入氯仿层, 水层重复用氯仿抽提, 合并 2 次氯仿抽提液, 离心备用。

1.3.9 黄酒发酵工艺: 大米→洗米→浸渍→蒸饭→淋饭→拌曲、接种酵母菌→发酵→后处理→干黄酒

1.4 分析方法

1.4.1 糖化酶活力的测定: 参照糖化酶 GB/T 8276-2002。定义: 1 g 曲在 40°C、pH 4.6 条件下, 1 h 水解可溶性淀粉生成 1 mg 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位。

1.4.2 液化酶活力的测定: 参照文献[2]。定义: 1 g 曲在 60°C、pH 6.0 条件下, 5 min 水解 1 mg 可溶性淀粉的酶量为 1 个酶活力单位。

1.4.3 酸性蛋白酶活力的测定: 参照蛋白酶 SB/T 10317-1999。定义: 1 g 曲在 40°C、pH 3.5 条件下, 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个酶活力单位。

1.4.4 黄酒理化指标的测定: 参照黄酒 GB/T13662-2000。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

采用平板透明圈法初筛, 结合摇瓶复筛, 所得 4 株较优黄曲霉菌性状如表 1。

菌株 Strain	d/D	糖化酶活力 Glucoamylase activity (U/g)	液化酶活力 α -amylase activity (U/g)	酸性蛋白酶活力 Acid-protease activity (U/g)
YA1	1.73	16196	10635	4923
YA2	1.90	17125	10046	4033
YA3	1.91	18011	8359	4875
YA4	2.20	18352	9372	3254

由表 1 可知, YA4 菌株 d/D 大, 淀粉酶活力高, 酸性蛋白酶活力较低。制曲时酸性蛋白酶活力过高, 会抑制淀粉酶的生成及酶活力^[2], 且在酿酒过程中会形成较多的氨基酸, 一方面氮源充足, 酵母菌生长旺盛, 消耗大量的糖分, 降低黄酒出酒率, 另一方面, 酵母菌通过 E. brlich 代谢机制将氨基酸转化为杂醇油, 影响黄酒风味。因此, 选择 YA4 为诱变出发菌株, 进一步提高其淀粉酶活力。

2.2 菌株育种结果

图 1 表明, YA4 菌株对紫外光及 LiCl 非常敏感, UV 单因素作用 3 min 和 4 min, 致死率分别为 37.44%和 88.26%; 结合 0.6% LiCl, 致死率分别上升为 73.63%和 99.91%。资料显示, LiCl 是一种碱金属卤化物, 其本身诱变作用微弱, 但在霉菌及一些抗生素生产菌的诱变育种中与其它诱变剂有协同效应^[3]。试验结果表明, 在 LiCl 的助变作用下, UV 对黄曲霉菌 YA4 的致死率明显提高, 且平板菌落

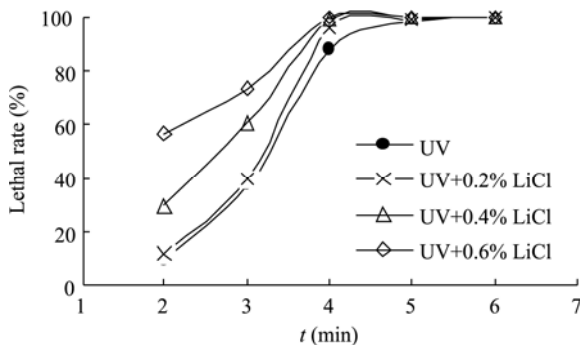


图 1 紫外线与 LiCl 复合诱变 YA4 的致死曲线
Fig. 1 Lethal curves of YA4 UV-LiCl mutagenized

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

及透明圈显示其变异的幅度增大了。因此, 鉴于致死率为 70%~80%时, 正变率较高, 确定以 UV 照射 3 min, 结合 0.6% LiCl 为 YA4 菌株最适复合诱变剂量。

Adye 等人^[4]报道, 钡离子可以抑制黄曲霉菌生产黄曲霉毒素, 还能够由产毒素的黄曲霉菌诱发出产不产毒素的黄曲霉突变株, 且 Ba²⁺对黄曲霉菌的产毒抑制或突变作用是永久性不可逆的。原始菌株 YA 经过 1 次 UV 诱变、2 次 UV 复合 LiCl 诱变、六代 BaCO₃ 连续诱变处理及 4 次自然分离(ns), 获得一高产突变株 YA4.9。选育谱系及选育过程菌株酶活变化分别见图 2 和表 2。

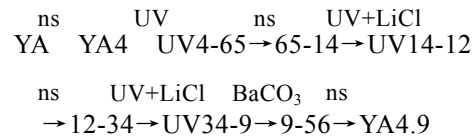


图 2 菌株选育谱系
Fig. 2 Breeding hierarchy of strains

菌株 Strain	d/D	糖化酶活力 Glucoamylase activity (U/g)	液化酶活力 α -amylase activity (U/g)	酸性蛋白酶活力 Acid-protease activity (U/g)
YA	1.70	15213	8697	3065
YA4	2.20	18352	9372	3254
UV4-65	2.22	19964	9053	3643
UV14-12	2.32	23027	10866	4023
UV34-9	3.40	30403	13996	4114
YA4.9	3.47	30952	14357	4175

由表 2 看出, 在选育过程中, 菌株淀粉酶活力提高幅度较大, 酸性蛋白酶活力亦略有增加。与原始菌株 YA 相比, 突变株 YA4.9 的糖化酶和液化酶活力分别提高 103.46%和 65.08%。观察发现, YA4.9 分生孢子梗粗短, 孢子较小, 菌丝紧密结实, 菌落变小。这些均为黄酒酿造用优良黄曲霉菌所应具备的特征。另外, 适当提高酸性蛋白酶活力, 可充分降解酒中蛋白质, 避免浑浊的产生。

2.3 突变株 YA4.9 遗传稳定性

突变株 YA4.9 于察氏斜面连续传代、制曲, 酶活力见表 3。

表 3 表明, 突变株 YA4.9 连续传代 15 次, 酶活力未见降低, 说明其遗传性状是稳定的。

表3 传代对 YA4.9 酶活力的影响
Table 3 Effect of passage on YA4.9 enzymes

传代次数 Generation	糖化酶活力 Glucoamylase activity (U/g)	液化酶活力 α -amylase activity (U/g)	酸性蛋白酶活力 Acid-protease activity (U/g)
0	30952	14357	4175
3	30848	14013	3979
6	30896	14174	4068
9	31119	14560	4395
15	31087	14465	4388

2.4 突变株 YA4.9 黄曲霉毒素的鉴定

黄曲霉毒素是一类在紫外光下能发出强烈的特殊荧光的致癌物质, 毒素会在 222 nm、265 nm 和 362 nm 三个波长处有吸收高峰。值得注意的是, 并非所有黄曲霉都产毒素, 也并非所有发出荧光的物质都是黄曲霉毒素, 维生素 B₂、嘌呤等物质也有荧光^[1]。酿造业用的霉菌是坚决不能产毒素的, YA4.9 菌株的毒素鉴定如表 4 和图 3。

表4 PCD 和 SM 培养基上各菌株的荧光现象
Table 4 Fluorescence of strains on PCD and SM

培养基 Culture medium	菌株 Strain	培养时间 Culture time (d)				
		2	3	4	5	6
PCD	YA4.9	-	-	+	+	+
	YA(CK ⁻)	-	-	-	-	+
	AFP(CK ⁺)	+	++	+++	++++	++++
SM	YA4.9	-	-	-	-	-
	YA(CK ⁻)	-	-	-	-	-
	AFP(CK ⁺)	+	++	+++	++++	++++

注: 荧光强度, +++++: 极强; ++++: 强; ++: 较强; +: 弱; -: 无。
Note: Fluorescence strength, +++++: Best strong; ++++: Strong; ++: Better strong; +: Weak; -: No fluorescence.

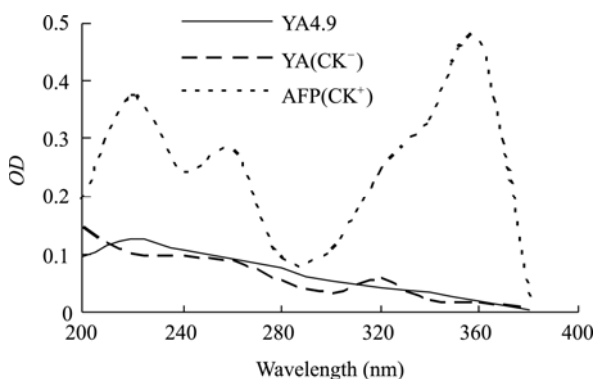


图3 各菌株麸曲氯仿抽提液的紫外吸收光谱
Fig. 3 UV spectrometries of moldy bran abstractions by CHCl₃

通过对照, 由表 4 看出, PCD 上, AFP 菌株的荧光由弱逐渐增强, 说明其分泌的毒素随培养时间延长而增加, 而 YA4.9 和 YA 菌株仅分别于第 4 天、第 6 天出现微弱的荧光。据报道, HgCl₂ 可排除一些非黄曲霉毒素荧光物质的干扰^[1], 通过 SM 培养, 发现 YA4.9、YA 两菌株至孢子成熟的 6 d 内荧光现象完全消失了, 而 AFP 菌株的荧光现象则不变。因此, 初步鉴定 YA4.9 菌株是不产毒素的, 用于生产是安全的, 至于其荧光物质则有待于进一步研究鉴定。图 3 表明, YA4.9、YA 两菌株麸曲氯仿抽提液内, 均不存在典型的黄曲霉毒素吸收光谱, 说明其在制备麸曲时也不产黄曲霉毒素。

2.5 突变株 YA4.9 生长与产酶时效

如图 4 显示, 与原始菌株 YA 比较, 突变株 YA4.9 生长迟滞期较短, 20 h 左右进入快速生长期, 酶活呈直线上升趋势, 32 h~36 h 酶活达到峰值, 之后随营养物质消耗和水份减少及孢子数增加, 酶活快速下降。营养菌丝是酶的主要来源, 因此, YA4.9 菌株麸曲培养 32 h 左右即可, 否则嫩曲糖化力低, 且易污染杂菌, 老曲则加重成品黄酒苦涩味。

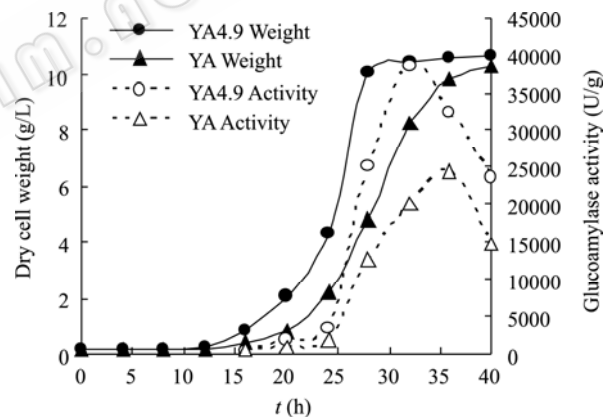


图4 YA4.9 与 YA 生长与产酶时-效曲线
Fig. 4 Time-efficiency curve of YA4.9 and YA

2.6 突变株 YA4.9 用于黄酒酿造结果

表 5 表明, 与原始菌株 YA 麸曲比较, 突变株 YA4.9 麸曲成品酒酒精度高、残糖低, 原料利用充分, 酸度适宜, 口味爽适。但杂醇油含量偏高, 原因是其酶活力强, 导致过多的氮源转化为杂醇油, 因而其添加量应适当降低。

3 讨论

试验选育的优良突变株 YA4.9 糖化酶和液化酶

表5 YA4.9与YA 麸曲成品黄酒理化指标

Table 5 Finished CRW properties of YA4.9 and YA moldy bran

菌株 Strain	酒精度 Alcohol (%Vol)	残糖 Residual sugar (g/L)	总酸 Total acid (g/L)	氨基氮 α -aminonitrogen (g/L)	挥发酸 Volatile acid (g/L)	挥发酯 Volatile ester (g/L)	杂醇油 Fusel oil (g/L)	风格 Flavour
YA4.9	14.4	2.52	4.79	1.057	0.077	0.395	0.387	清醇爽适
YA	13.1	4.01	5.08	0.745	0.162	0.334	0.416	醇厚稍涩

活力分别为 30952 U/g 和 14357 U/g, 不产毒素, 酿酒性能好, 遗传性状稳定。黄酒界有“无曲不成酒”之说, 并把曲誉为“酒之骨”, 可见糖化曲对黄酒酿造的重要性。黄酒界针对各种霉菌的适酸性展开了多年的研究探索, 最终确定黄曲霉菌最适宜用作黄酒糖化菌制曲, 因其酿酒品质好、风味独特。目前, 黄酒业普遍采用的糖化菌仍是中科院黄曲霉 3800 和苏-16, 但是菌种单一和酶活力低已成为突出问题。黄酒是我国的民族特产, 曲法酿造是其特色, 也是中西酒文化的分水岭, 关于其糖化菌选育的相关研究国外未见报道, 国内亦较少^[5-10]。因此, 今后的研究重点仍然是采用各种手段(包括构建基因工程菌)提高黄酒糖化曲的糖化酶活力。YA4.9 与现有报道相比(表 6), 在酶活力及产酶稳定性方面均有一定的优势, 通过进一步优化其制曲条件及酿酒条件, YA4.9 有望在黄酒业得以推广应用。

当今发酵工业使用的优良菌株, 几乎都是通过遗传改良的突变株, 因此, 菌种的稳定性至关重要。一些引起碱基置换的诱变剂(如亚硝基胍)较易回复

突变, 而引起染色体畸变的诱变剂(如 UV)不易回复突变^[11], 一直以来都是工业育种的首选方法。

参 考 文 献

- [1] Hare S, Fennell DI, Hesseltine CW, *et al.* Aflatoxin-producing strains of *Asp. flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. *Appl Microbiol*, 1974, **27**(7): 1118-1123.
- [2] 史永旭, 姜涌明. 蛋白酶对解芽孢杆菌 α -淀粉酶活力的影响. *微生物学通报*, 1995, **22**(1): 22-24.
- [3] 袁琳. 采用氯化锂和紫外线复合诱变方法筛选四环素高产菌株. *宁夏医学杂志*, 2000, **22**(6): 340-341.
- [4] Adye J, Matele RI. Incorporation of labelled compounds into aflatoxins. *Biochem Bioph Acta*, 1964, **86**: 418-425.
- [5] 汪志君, 夏艳秋, 朱强. 关于黄酒酿造采用糖化发酵剂的探讨. *中国酿造*, 2004, **5**: 1-3.
- [6] 汪志君, 夏艳秋, 方维明, 等. 植酸对黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) 糖化力的影响. *中国酿造*, 2003, **5**: 14-16.
- [7] 冯立才, 黄未, 郭润就. 曲霉糖化酶高产菌株平板分离培养基的筛选. *酿酒科技*, 2003, **3**: 37-38.
- [8] 胡志明, 丁美珍, 谢广发. 黄酒糖化菌的筛选. *酿酒科技*, 2003, **3**: 39-40.
- [9] 杜士良. 日本黄曲霉 1# 菌株与苏-16 菌株性能的对比. *酿酒科技*, 2004, **6**: 39-40.
- [10] 曹钰, 陆健, 方华, 等. 绍兴黄酒麦曲中真菌多样性的研究. *食品科学*, 2008, **29**(3): 277-282.
- [11] Kole MM, Altosaar I. Increased chitinase production by a non-pigmented mutant of *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Letters*, 1985, **26**(3): 265-269.

表6 YA4.9 固体曲糖化酶活力与已报道菌株的比较
Table 6 Comparison of the glucoamylase activity of YA4.9 with those reported

菌株 Strain	糖化酶活力 Glucoamylase activity (U/g)
<i>Asp. flavus</i> SJM-4 ^[8]	1403.2
<i>Asp. flavus</i> Su-16 ^[9]	1120
<i>Japanese Asp. flavus</i> 1# ^[9]	960
<i>Asp. Flavus</i> YA4.9	30952