

甜酒曲中产糖化酶根霉菌株紫外诱变选育

邓开野, 林佩芳, 黎尔纳

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225)

摘 要: 从甜酒曲中分离出产糖化酶根霉菌株, 通过平板菌落初筛、测定 HE 值和摇瓶复筛测糖化力, 筛选出 1 株 HE 值大且糖化力高的优良出发菌株, 对其进行紫外线诱变处理, 选育得到优良变异株, 该菌株的 HE 值为 1.76, 糖化力为 1281mg/(h·g), 分别较出发菌株高出 5.4%、59.5%。对此优良变异株的培养条件进行优化, 获得最佳的培养条件为: 培养温度为 30℃, 培养时间为 3d, 添加玉米粉质量浓度为 8g/100mL, 在此条件下糖化力为 1317mg/(h·g)。

关键词: 甜酒曲; 根霉; 紫外线诱变; 糖化力

Breeding of a Glucoamylase-Producing Strain of *Rhizopus* from Sweet Rice Wine Starter by Ultraviolet Radiation

DENG Kai-ye, LIN Pei-fang, LI Er-na

(College of Light Industry and Food Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: An excellent strain of *Rhizopus* with high HE value and saccharification power from sweet rice starter was screened through flat plate primary screening and mutagenized by UV radiation. An excellent mutant strain with an HE value of 1.76 and a saccharification power of 1281 mg/(h·g) was obtained, which were increased by 5.4% and 59.5% compared to those of the original strain, respectively. The optimal culture conditions for the mutant strain were culture temperature of 30 °C, culture time of 3 days and corn flour concentration of 8 g/100 mL. Under the optimal conditions, the saccharification power of the screened strain was up to 1317 mg/(h·g).

Key words: sweet rice starter; *Rhizopus*; UV-induced mutagenesis; saccharification power

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0204-05

中国酒曲历史悠久, 有的学者认为, 制曲酿酒可与我国古代四大发明相媲美^[1-2]。在我国南方各省, 小曲酒在市场中都占据一定优势, 其价廉物美, 深受广大消费者的欢迎^[3]。小曲酒生产用曲量小, 生产周期短, 出酒率高, 耗粮少, 使用原料品种广泛, 酒厂的规模可大可小, 符合国家节约酿酒用粮的要求^[4]。而民间制曲至今在很多地方依然沿袭传统方法, 靠水、空气和原料中的微生物自然发酵, 工艺落后, 设备简陋, 卫生条件差, 质量也不稳定, 产品中常伴随着有害杂菌, 使酿制的酒酿或米酒甜度低, 异味浓, 酸性高甚至酸败, 不能食用。研究表明, 酒药中起主要作用的微生物是根霉^[4-5], 它不但有较强的糖化作用, 能将原料中的淀粉转化为可发酵性糖, 而且还有一定的酒化作用, 将糖转化为乙醇。它还能产蛋白酶、酒化酶和脂肪酶等一系列酶系, 而且在发酵过程中可以产生柠檬酸、乳酸和琥珀酸等多种有机酸, 对小曲酒的质量和风味有着重要的影响^[6]。但是目前对根霉产乳酸^[7]、脂

肪酶^[8]、酯化酶^[9]等研究较多, 而对酒曲中产糖化酶的根霉研究较少, 对甜酒曲中产糖化酶根霉菌株的诱变选育则未见报道。为了提高根霉菌株的产酶能力, 实验从甜酒小曲中分离出糖化酶产生菌, 采用迄今仍然是微生物育种中最常见和有效的紫外诱变剂^[10], 选育出糖化酶活力高的优良变异株并将此优良变异株进行产糖化酶条件优化。用产糖化酶条件优化后的优良变异菌株制作甜酒曲, 用于甜酒发酵, 在节约酿酒用粮, 提高甜酒质量, 改善甜酒风味及质量等方面具有一定的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

酒曲、麸皮、马铃薯下市售。

培养基^[11]: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、淀粉平板培养基、麸皮培养基。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1F 型超净工作台 苏州安泰空气技术有限公

收稿日期: 2011-09-21

作者简介: 邓开野(1968—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为微生物工程。E-mail: dengkaiye1968@126.com

司; 85-2 型数显恒温磁力搅拌器 江苏金坛荣华仪器制造有限公司; CX21FS1 型光学显微镜 日本 Olympus 公司; HZQ-QF 型恒温培养箱 苏州威尔实验用品有限公司。

1.3 方法

1.3.1 分离纯化产糖化酶根霉菌

将酒曲样 0.5g, 放入盛有 10mL 的无菌水试管中, 适当振动, 使酒曲和水充分混合, 制备酒曲样品悬液。并按 10 倍稀释至 10^{-6} , 从 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 的稀释液中各取出各 0.2mL 涂布于 PDA 培养基的培养皿中, 于 30℃ 培养 3d, 进行菌落观察和显微镜检, 根据菌落形态和细胞形态来识别根霉^[12-13]。

从 PDA 培养基平板上挑取菌落生长形态良好, 菌落颜色为白色的根霉, 用点种的方法影印两个淀粉平板培养基, 标记相对应点种的位置。在 30℃ 培养 3d。取其中 1 个淀粉平板培养基进行碘熏, 根据菌落周围是否出现透明圈来区别产酶菌株。根据 HE 值(式(1))大小来初步判断酶活力的强弱^[14]。从另外 1 个淀粉平板培养基上挑取位置相对应的 HE 值大的菌落, 接种于 PDA 斜面试管上, 30℃ 培养 3d, 待长满孢子后备用。

$$\text{HE 值} = \frac{\text{透明圈直径/m}}{\text{菌落直径/m}} \quad (1)$$

1.3.2 筛选出发菌株

用 10mL 无菌水洗下孢子, 制成单孢子悬液, 并按 10 倍稀释至 $10^{-1} \sim 10^{-4}$, 吸取 10^{-4} 稀释浓度的溶液 0.2mL, 分别滴入 3 个 PDA 培养基的培养皿中, 使悬液均匀铺满整个平板。将培养皿置于恒温培养箱中 30℃ 培养 3d。测定其变色圈直径和菌落直径, 初筛出 HE 值最大的 5 个菌落, 斜面保藏, 用于摇瓶复筛^[15]。

称取 5g 绝干质量的酒曲样, 加水 90mL, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.6)10mL, 摇匀 pH4.5, 在 30℃ 水浴锅中浸泡 1h, 浸泡时应经常搅拌, 用双层纱布过滤, 滤液即为酶液, 用于液化力和糖化力的测定。液化力的测定以碘液不变色为终点, 糖化力的测定需预备滴定和正式滴定^[16]。

$$\text{糖化力}/(\text{mg}/(\text{h} \cdot \text{g})) = \frac{(V_B - V_A) \times 0.25 \times 50}{0.25 \times 5} \quad (2)$$

式中: V_B 为空白液 5mL 所消耗 0.25g/100mL 葡萄糖液的体积/mL; V_A 为糖化液 5mL 所消耗 0.25g/100mL 葡萄糖液体积/mL; 2.5 为每 1mL 0.25% 葡萄糖液所含的葡萄糖的质量/mg; 0.25 为 5mL 酶液相当于 0.25g 绝干曲; 50/5 为糖化液、空白液总体积各为 50mL, 取 5mL。

1.3.3 紫外线诱变

用 10mL 无菌水洗下孢子, 制成单孢子悬液, 用血

球计数板调其菌浓度为 $10^6 \sim 10^8$ 个/mL, 将装有单孢子悬液的三角瓶置于 30℃ 水浴锅中, 待孢子萌发 3~4h, 取 1mL 孢子悬液稀释至 10^{-4} , 吸取 0.1mL 各涂布 3 个 PDA 培养基平板, 把涂布后的培养皿置于 30℃ 恒温培养 3d, 作为照射后的对照^[17]。另分别取 6mL 于培养皿中进行紫外线照射(预热 20min), 置于 15W 的紫外灯, 固定距离为 20cm, 同时进行磁力搅拌, 照射时间分别为 0、30、60、90、120、150s, 然后取 1mL 照射后的孢子悬液稀释至 10^{-4} , 吸取 0.1mL 各涂布 3 个 DPA 培养基平板, 把涂布后的培养皿置于 30℃ 恒温培养 3d。培养完毕后, 测定每个平皿的菌落数和计算致死率, 制作致死曲线, 确定紫外线最佳诱变剂量(以致死率为 92%~99% 所需的照射时间为最佳诱变剂量^[18]), 然后再进行紫外线正式诱变。

$$\text{致死率}/\% = \frac{\text{对照菌落数} - \text{照射后的菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.4 筛选高酶活力优良变株

将诱变后的孢子悬液取 1mL 稀释至 10^{-4} , 吸取 0.1mL 各涂布 5 个 PDA 培养基平板, 把培养皿置于 30℃ 恒温培养 3d。以影印的方法分别点种影印 5 个淀粉平板培养基, 把影印后的淀粉平板培养基置于 30℃ 恒温培养 3d, 把培养后的淀粉平板培养基进行碘熏, 从中选出 HE 值较大的 5 株菌落进行糖化力的测定, 选出 1 株高酶活力优良突变株, 斜面保存, 备用。

1.3.5 优良突变菌株产糖化酶条件的优化

1.3.5.1 培养温度对根霉产糖化酶的影响

各接一环突变株的菌种于麸皮培养基中, 使其混合均匀, 分别在 26、28、30、32、34、36℃ 恒温培养 3d 后测糖化力, 确定根霉发酵产糖化酶的最适宜温度。

1.3.5.2 培养时间对根霉产糖化酶的影响

各接一环突变株的菌种于麸皮培养基中, 使其混合均匀, 30℃ 恒温培养 1、2、3、4、5、6、7d 后测糖化力, 确定根霉发酵产糖化酶的最适宜时间。

1.3.5.3 添加玉米粉对根霉产糖化酶的影响

各接一环高酶活力优良变株的菌种于玉米粉质量浓度为 4、8、12、16、20、24g/100mL 的麸皮培养基中, 使其混合均匀, 30℃ 恒温培养 3d 后测糖化力, 以检测根霉发酵产糖化酶的最适碳源质量浓度。

1.3.5.4 正交优化试验设计

在单因素试验结果基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表试验设计, 研究玉米粉质量浓度、培养时间、培养温度对糖化力的影响, 以筛选出最优产糖化酶的条件。

2 结果与分析

2.1 甜酒曲糖化酶产生菌株的识别

用 PDA 培养基 30℃ 培养根霉菌株, 观察。在 PDA 培养基上的菌株菌落颜色为灰白色, 菌落表面干燥, 有少量菌丝匍匐生长。个体观察发现, 菌株具有假根, 假根色淡、量少; 菌丝没有分隔, 呈管状、无隔膜; 孢子囊柄直立生长, 柄的顶端膨胀而形成球形或近球形孢子囊。根据该结果及《真菌鉴定手册》^[14], 初步确定所分离的菌株为根霉。进行重复实验, 结果一致。采用碘熏方法, 分离出糖化酶产生根霉菌。

2.2 出发菌株的筛选

测定诱变前的淀粉平板培养基上菌株的菌落直径和透明圈直径, 初筛出 5 株 HE 值较大的菌株进行摇瓶复筛, 测其糖化力, 选出 1 株糖化力最强的菌株作为诱变出发菌株, 结果见表 1。菌株 4 的 HE 值最大, 为 1.67, 糖化力最强, 为 803mg/(h·g), 该菌株即为优良出发菌。

表 1 5 株优良出发菌株的 HE 值、糖化力值

Table 1 HE values and saccharification power of 5 original strains

指标	菌株编号				
	1	2	3	4	5
透明圈直径/mm	28	27	24	30	26
菌落直径/mm	17	17	16	18	17
HE 值	1.64	1.59	1.5	1.67	1.38
糖化力/(mg/(h·g))	758	735	720	803	696

2.3 紫外线诱变方法的确定

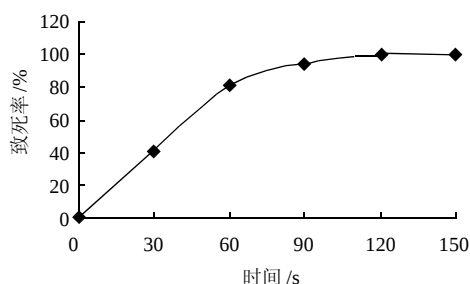


图 1 产糖化酶根霉菌株紫外线诱变的致死曲线

Fig.1 Death curve of *Rhizopus* during exposure to UV

由图 1 可知, 随着照射时间的增加, 菌落的致死率也随着增大。60s 前致死率迅速增长, 60s 后致死率的增长速度有所减慢。根据文献资料^[18], 致死率在 92%~99% 为宜。当照射时间为 90s 时, 致死率为 94.31%。因此, 紫外线诱变糖化酶产生菌根霉的最佳诱变剂量为在 15W 的紫外灯, 固定距离为 20cm, 照射时间为 90s。

2.4 优良突变株的筛选结果

对所筛选出的优良出发菌株 4 进行紫外诱变处理, 在 15W 的紫外灯, 固定距离为 20cm, 照射时间为 90s 的紫外线诱变后, 所涂布的 5 个 PDA 培养基上的菌落数较少, 经过多轮实验, 选出了 3 株 HE 值、糖化力值较高的突变株, 即菌株 4-1、4-2 和 4-3, 结果见表 2。

表 2 3 株优良突变株的 HE 值、糖化力值

Table 2 HE values and saccharification power of 3 mutant strains

指标	菌株 4-1	菌株 4-2	菌株 4-3
透明圈直径/mm	34	37	31
菌落直径/mm	20	21	18
HE 值	1.7	1.76	1.67
糖化力/(mg/(h·g))	1265	1281	1224

由表 2 可知, 菌株 4-2 的 HE 值最大为 1.76, 糖化力最强为 1281mg/(h·g), 分别较出发菌株的 HE 值(1.67)和糖化力(803mg/(h·g)), 高出 5.4% 和 59.5%。

2.5 产糖化酶根霉突变株培养条件的确定

2.5.1 培养温度对根霉突变株糖化力的影响

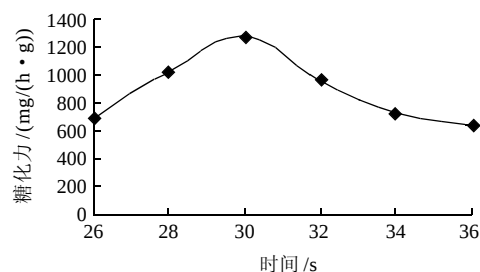


图 2 培养温度对根霉突变株糖化力的影响

Fig.2 Effect of culture temperature on saccharification power of mutant strain 4-2

由图 2 可知, 随着温度的升高, 根霉突变株糖化力迅速上升, 在 30℃ 时, 根霉的糖化力达到最大, 为 1289mg/(h·g), 30℃ 后根霉突变株糖化力开始有所下降。温度通过影响蛋白质、核酸等生物大分子的结构与功能以及细胞结构来影响微生物生长、繁殖和新陈代谢。过高的环境温度会导致蛋白质或核酸的变性失活, 而过低的温度会使酶活力受到抑制, 细胞的新陈代谢活动减弱。每种微生物只能在一定的温度范围内生长和产酶, 根霉也如此。因此, 产糖化酶根霉突变株最佳培养温度为 30℃。

2.5.2 培养时间对根霉突变株糖化力的影响

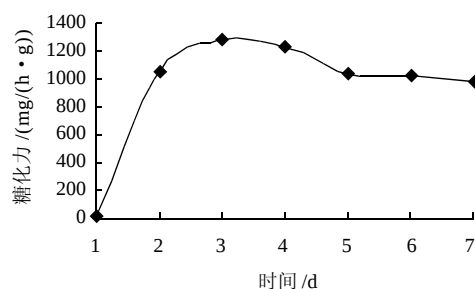


图3 培养时间对根霉突变株糖化力的影响

Fig.3 Effect of fermentation time on saccharification power of mutant strain 4-2

由图3可知,随着培养时间的增加,根霉突变株的酶活力也随着增大,在培养的第3天糖化力出现最大值,为1285mg/(h·g),随后糖化力开始缓慢下降。微生物的生长离不开外界环境,而且它受外界环境影响是相当大的,改变微生物生长环境,也就改变了它的生长速度和代谢能力。培养时间的长短是影响根霉生长的重要因素,培养时间过长和过短都将导致不良结果。因此,根霉突变株的最佳培养时间为3d。

2.5.3 玉米粉质量浓度对根霉突变株糖化力的影响

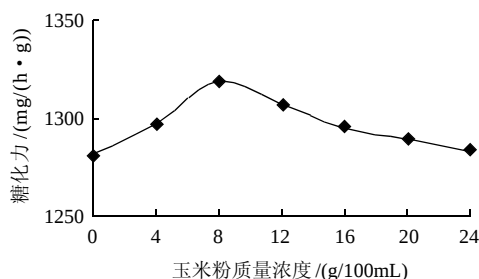


图4 玉米粉质量浓度对根霉突变株糖化力的影响

Fig.4 Effect of corn meal concentration on saccharification power of mutant strain 4-2

由图4可知,在培养基加入一定量的玉米粉能提高根霉突变株的糖化力。随着玉米粉添加量的增加,糖化力也随之上升,在添加玉米粉质量浓度为8g/100mL时,糖化力达到最大为1319mg/(h·g),比没有添加玉米粉增加了3%,当玉米粉质量浓度继续增加时,糖化力则开始下降。玉米粉中的营养成分和大量微量元素促进根霉生长和产酶,但是若添加量过多,会使培养基黏性增加,降低透气性,影响了根霉菌丝的生长,从而影响根霉的产酶。因此,根霉突变株的最佳添加的玉米粉质量浓度为8g/100mL。

2.6 培养条件正交优化试验结果

表3 正交优化试验结果

Table 3 Orthogonal array design and results

试验号	A 培养温度/℃	B 培养时间/d	C 玉米粉质量浓度/(g/100mL)	糖化力/(mg/(h·g))
1	1(28)	1(2)	1(4)	1015
2	1	2(3)	2(8)	1250
3	1	3(4)	3(12)	1217
4	2(30)	1	2	1142
5	2	2	3	1315
6	2	3	1	1266
7	3(32)	1	3	940
8	3	2	1	1101
9	3	3	2	1085
k_1	1160.67	1032.33	1127.33	
k_2	1241.00	1222.00	1159.00	
k_3	1042.00	1189.33	1157.33	
R	199.00	189.67	31.67	

表4 方差分析表

Table 4 Variance analysis for the experimental results of orthogonal array design

方差来源	变差平方和	自由度	方差估计值	F值	显著性
A	60136.22	2	30068.11	145.413	0.007
B	61689.56	2	30844.78	149.169	0.007
C	1905.56	2	952.78	4.608	0.008
误差	413.56	2	206.78		
总和	1.198×10^7	9			

由表3、4可知,对根霉突变株产糖化力的影响的主次顺序为培养温度>培养时间>玉米粉质量浓度,但培养温度和时间较为显著。产糖化酶最佳培养条件是 $A_2B_2C_2$,由于其不在9组试验中,故进行实验验证,测得糖化力为1317mg/(h·g),大于9组试验中糖化力最高值(1315mg/(h·g)),故确定最优培养条件为培养温度30℃、培养时间3d、添加玉米粉质量浓度为8g/100mL。

3 结 论

通过筛选甜酒曲中的根霉菌株,对其紫外线诱变处理,筛选出了优良的突变株。该变异株的HE值为1.76,糖化力为1281mg/(g·h),较出发菌株HE值1.67和糖化力803mg/(h·g)分别高出5.4%和59.5%。

根据正交试验结果可知,培养温度、培养时间、玉米粉质量浓度对根霉产糖化力有显著影响,培养温度和培养时间的影响更为明显,最佳培养条件为培养温度30℃,培养时间3d、添加玉米粉质量浓度8g/100mL,在此条件下,糖化力为1317mg/(h·g)。用产糖化酶条件优化后的优良变异菌株制作甜酒曲,用于甜酒发酵,

在节约酿酒用粮, 提高甜酒质量, 改善甜酒风味等方面具有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] 李建容, 蔡爱群. 民间传统酒曲主要微生物的分离及鉴定[J]. 酿酒科技, 2007(5): 111-115.
- [2] 田国政. 酒曲根霉糖化性质的研究[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2003(2): 19-21.
- [3] 唐玉明, 姚万春, 任道群, 等. 小曲根霉菌的选育及利用研究[J]. 酿酒科技, 1997(3): 25-28.
- [4] WATANABE T, ODA Y. Comparison of suerose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Alnylomyces rouxii*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2008, 12: 3167-3173.
- [5] 陈德兴. 根霉酒曲的生产与应用[J]. 酿酒科技, 1996(1): 14-19.
- [6] 凌生才. 根霉酒曲的传统工艺生产与发展[J]. 酿酒科技, 1999(2): 22-23.
- [7] 胡燕红, 姜绍通, 罗水忠, 等. 米根霉产 L- 乳酸耐温菌株的⁶⁰Co- γ 射线诱变育种[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 452-456.
- [8] 刘秀花, 梁峰. 根霉产脂肪酸发酵条件的研究[J]. 商丘师范学院学报, 2010, 26(9): 99-101.
- [9] 顾立众. 根霉酯化酶用于酱油增香的优化研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 175-179.
- [10] 杨健, 姚笛, 王颖, 等. 紫外诱变球毛壳霉选育木聚糖酶高产菌株[J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 87-89.
- [11] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 348-364.
- [12] 刘建军, 姜鲁燕. 根霉PE-8菌株的选育及其淀粉降解酶类的研究[J]. 山东食品发酵, 1998(2): 1-5.
- [13] 蔡丽, 易响, 陈福生, 等. 传统米酒酒曲的评价及根霉的分类鉴定[J]. 中国酿造, 2010(12): 30-33.
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 60-75.
- [15] 徐成勇, 刘泉勇, 周东阳. 酿酒根霉高糖化力菌株的筛选[J]. 酿酒科技, 2002(5): 26-28.
- [16] 刘云秀, 吕开斌. 华根霉紫外线诱变育种[J]. 中国调味品, 2005(10): 15-18.
- [17] 刘芳, 曹新志, 任晓华. 甜酒曲华根霉淀粉酶菌株紫外线诱变选育[J]. 中国酿造, 2009(7): 78-80.
- [18] 俞俊棠, 唐孝宣, 邬行彦. 生物工艺学: 上册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 37-40.