

芝麻香型白酒高温大曲产脂肪酶菌株的筛选与鉴定*

翟磊¹, 信春晖², 许玲², 程宵宵¹, 苏姣姣¹, 姚粟¹, 程池¹

1(中国食品发酵工业研究院, 中国工业微生物菌种保藏管理中心, 北京, 100015)

2(山东扳倒井股份有限公司, 山东 高青, 256300)

摘 要 芝麻香型白酒是我国传统白酒的创新香型, 以独特的优雅芝麻香味而闻名, 主体香微量成分是在醇、醛、酸、酯多种框架成分含量极其比例关系达到一定基础上再辅以一定量的吡嗪类、呋喃类、酚类等杂环化合物及含硫化合物而形成的复合香, 其中产脂肪酶微生物是形成特殊风味物质的关键。研究采用纯培养技术, 对山东扳倒井高温大曲不同发酵阶段的大曲样品进行产脂肪酶的微生物菌种的筛选与鉴定。结果表明, 采用改进的罗丹明平板法筛选得到 15 株产脂肪酶菌株, 通过活力测定得到 6 株产脂肪酶活性较高的菌株, 对其进行了形态学和分子生物学的鉴定。该研究为今后产脂肪酶功能基因的筛选提供了出发菌株, 为芝麻香型白酒香气成分的解析奠定了理论基础。

关键词 芝麻香型白酒; 高温大曲; 脂肪酶; 功能性菌株

芝麻香型白酒是以小麦(麦麸)、高粱为原料, 经传统固态法发酵、蒸馏、陈酿勾兑而成的, 未添加食用酒精及非白酒发酵产生的香味物质、具有芝麻香型风格的白酒^[1]。其酿酒原料(高、中温大曲)、生产工艺、发酵窖池、糖化发酵剂等融合了浓、清、酱 3 种香型白酒的特点, 并且较上述香型具有醇和细腻、香味协调、余味悠长的特点^[2]。芝麻香曲多酶系、多菌系的特点则是保证芝麻香型白酒维持其芝麻香味幽雅醇正的独特香气的关键。

中、高温大曲为嗜热微生物的纯化提供了有力条件, 并且对于香味物质及其前提物质的形成尤为重要^[3], 而酯类物质和酸类物质是芝麻香型白酒中重要的香味物质。在芝麻香型白酒的生产中, 总酯和总酸含量均要达到一定标准, 如优级高度酒理化要求中总酯含量要大于 2.20 g/L, 总酸含量要大于 0.50 g/L, 优级低度酒理化要求中总酯含量要大于 1.80 g/L, 总酸含量要大于 0.40 g/L。脂肪酶(Lipase)是一类酰基水解酶, 主要水解甘油和不同长度的脂肪酸形成的甘油三酯, 生成脂肪酸、甘油和甘油单酯。同时还催化其他一些水性酯类的水解、醇解、酯化等反应。脂肪酶广泛应用于工业生产中, 在酿酒工业上, 脂肪酶可提高白酒中酯类香味物质的含量, 加快白酒中各

种酸醇酯的反应平衡, 缩短贮存老熟时间, 调节白酒中各种酸醇酯的含量和比例, 使酒质窖香浓郁、绵甜爽冽, 香味协调饱满, 余味悠长, 优质酒品率明显提高。因此, 从高温大曲中筛选产脂肪酶的微生物菌株十分重要^[4-5]。

本研究拟采用纯培养技术分离山东扳倒井芝麻型白酒高温大曲中微生物菌种, 通过改进的罗丹明平板法筛选和酶活力测定筛选产脂肪酶活力高的菌株, 并对这些菌株进行鉴定, 为芝麻香型白酒香气成分分析奠定理论基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品

山东扳倒井芝麻香型高温大曲曲块, 发酵时间分别为 0、2、5、9、12、15、20、25、36、45 d, 共计 10 个样品, 其中发酵 9、20、25、36 d 分别为第一、二、三、四次翻曲后曲块。

1.1.2 培养基及主要试剂

分离培养基: 营养琼脂培养基(NA, 北京陆桥生物技术有限公司)。

初筛培养基: 营养琼脂培养基, 添加 1% 三丁酸甘油酯和 0.02% 罗丹明 B。

复筛培养基: 营养肉汤(NB, 北京陆桥生物技术有限公司)。

主要试剂: 三丁酸甘油酯, 阿法埃莎化学有限公司, 分析纯; 罗丹明 B, 公私合营新中化学厂, 分析纯;

第一作者: 博士研究生(程池教授级高级工程师为通讯作者, E-mail: cheng100027@163.com)。

* 国家微生物资源平台专项(NIMR2015-4); 中国食品发酵工业研究院科技发展基金(博士基金)项目(2015KJFZ-BS-04)

收稿日期: 2015-06-14, 改回日期: 2015-08-26

橄榄油,国药集团化学试剂有限公司,化学纯;聚乙烯醇(PVA),国药集团化学试剂有限公司,分析纯;其余试剂均为国产化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 产脂肪酶微生物菌株的筛选

1.2.1.1 高温大曲微生物菌株的分离纯化

无菌条件下称取 25 g 样品放入盛有 225 mL 无菌水的三角瓶(瓶内预置适当数量的玻璃珠)内,振荡 1 h,之后采用涡旋振荡仪充分振荡 2 min,制成 1:10 的均匀稀释液。吸取 1 mL 菌悬液,注入含有 9 mL 无菌水的试管内,振摇试管 20 s 使管内溶液混匀,制成 1:100 的稀释液。同样方法配制成稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 菌悬液。各取 100 μ L 涂布于 NA 培养基平板上,倒置,37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h。记录每个平板上菌落的数量,同时与培养基平板上进行划线纯化培养,纯化后的细菌接种于 NA 斜面上,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.1.2 产脂肪酶菌株的初筛

将斜面上的菌株接种于初筛培养基平板上,培养 24~72 h。记录产透明圈的菌株,通过比较菌落直径和透明圈直径,初步判断产酶活力大小^[6]。

1.2.1.3 产脂肪酶菌株的复筛

将初筛产酶性质好的菌株,接到 5 mL NB 中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 24 h,再以 2% 接种量接种到 50 mL NB 中,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.1.4 脂肪酶活力测定

将培养 24 h 的菌液依据 GB/T 23535-2009 脂肪酶制剂^[7]进行测定:将 40 g/L 的聚乙烯醇溶液与橄榄油以 3:1(V/V)混合,超声处理 6 min,制成乳白色的 PVA 乳化液,即为底物溶液。取该底物溶液 4.00 mL,PBS 溶液 5.00 mL,构成反应体系,于 40 $^{\circ}$ C 水浴中预热 5 min 后加入 1.00 mL 粗酶液,立即混匀计时,继续保温反应 15 min 后,加入 15.00 mL 体积分数为 95% 的乙醇终止反应。空白对照则在加入 15.00 mL 95% 乙醇后进行预热处理,然后加入粗酶液反应 15 min。之后采用 0.05 mol/L 的 NaOH 标准溶液分别滴定酶作用后的底物溶液和空白对照,根据消耗的碱量计算其酶活力。

1.2.1.5 脂肪酶活力计算

脂肪酶酶活单位定义为:在 pH 7.5,40 $^{\circ}$ C 条件下,每分钟产生 1 μ mol 可滴定脂肪酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U/mL)。

$$\text{酶活力} = \frac{(V_1 - V_2) \times c_{\text{NaOH}} \times 10^3}{t} \quad (1)$$

式中, V_1 滴定样品消耗碱量,mL; V_2 滴定空白消耗碱量,mL; c_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液的浓度,mol/L; t 为反应时间,min。

1.2.2 产脂肪酶菌株的鉴定

1.2.2.1 菌株的形态学观察

将筛选所得的产脂肪酶菌株在营养琼脂(NA)培养基上进行划线纯化,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,观察菌落形态,包括菌落颜色、大小、形状、质地、透明度等,记录菌落图片;并进行革兰氏染色,观察菌体细胞的大小、形状及排列方式等,记录菌体形态图片。

1.2.2.2 菌株的分子生物学鉴定

16S rRNA 序列分析:采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)提取分离菌株的 DNA 作为 PCR 反应的模板。基因扩增采用通用引物:27F(5'-AGAGTTTCATCT GGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3')扩增细菌基因组 DNA 中的 16S rRNA 基因。每 50 μ L PCR 反应体系含有:5 μ L 10 \times buffer、4 μ L dNTP(2.5 mmol/L)、3 μ L 模板 DNA、0.25 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/L)、1 μ L 引物(10 mmol/L),补充无菌超纯水至 50 μ L。扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 过程中阴性对照以去离子水为模板。PCR 扩增产物用 1% 凝胶电泳进行检测后送交北京诺赛生物公司进行测序。

测序后的序列采用 ContigExpress 软件进行拼接成完整的 16S rRNA 基因序列。在 GenBank 数据库中进行序列同源性比对,确定与已知近缘种序列的相似性。

2 实验结果

2.1 产脂肪酶菌株的分离和筛选

采用纯培养技术,从高温大曲 10 个样品中分离微生物菌种,通过菌落大小、颜色以及表面质地比对排重后,筛选得到了 107 株菌株。通过优化的罗丹明平板法筛选得到了 15 株产脂肪酶能力较好的菌株(透明圈与菌落直径比:1.4~2.8)。采用酶活测定法对这些菌株进行复筛,检测其产脂肪酶活力,测定结果如表 1 所示。

脂肪酶测定结果表明,15 株菌株产脂肪酶的活力在 0.60~19.90 U/mL,其中菌株 AD、AE、AF、AG、AM 和 AN 产脂肪酶活力较高,下一步工作是对 6 株产脂肪酶活力高的菌株进行鉴定。

表 1 产脂肪酶菌株筛选结果

Table 1 Screening of lipase-producing strains

菌株 编号	脂肪酶活/ (U · mL ⁻¹)	菌株 编号	脂肪酶活/ (U · mL ⁻¹)	菌株 编号	脂肪酶活/ (U · mL ⁻¹)
AD	10.90	AI	1.03	AN	2.50
AE	9.54	AJ	1.27	AP	0.33
AF	3.90	AK	0.53	AQ	1.33
AG	6.80	AL	0.40	AR	0.60
AH	1.47	AM	2.57	AS	0.80

2.2 产脂肪酶菌株的鉴定

2.2.1 形态学观察

复筛得到 6 株产脂肪酶酶活较高的菌株,对其菌落和菌体形态进行观察,结果如表 2 所示。

2.2.2 分子生物学鉴定

对产脂肪酶酶活较高的 6 株菌株进行 16S rDNA 序列测定,结果如表 3 所示。

表 2 产脂肪酶菌株的形态特征

Table 2 Morphological characteristics of lipase-producing strains

形态特征	AD	AF	AE	AG	AM	AN
菌落大小	0.5 ~ 1 mm	0.5 mm	0.5 ~ 2.5 mm	很小	0.5 mm	0.5 mm
菌落形状	近圆形	圆形	圆形	圆形	近圆形	近圆形
菌落颜色	乳黄	乳黄	乳黄	白色	淡黄	淡黄
表面状态	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
隆起形状	隆起	隆起	较平坦	平坦	隆起	隆起
边缘状况	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐
表面光泽	有光泽	有光泽	有光泽	无光泽	有光泽	有光泽
质地	奶油状	奶油状	奶油状	油脂状	奶油状	奶油状
透明度	不透明	不透明	不透明	不透明	不透明	不透明
大小	0.5 μm × 2.0 ~ 3.0 μm	0.5 ~ 0.6 μm × 1.0 ~ 3.0 μm	0.8 ~ 1.0 μm × 3.0 ~ 5.0 μm	0.5 ~ 0.7 μm	0.6 μm × 1.5 ~ 3.0 μm	0.5 ~ 0.6 μm × 2.0 ~ 3.5 μm
形状	直杆	棒状	杆状	球状	杆状	杆状
排列方式	单个或成对	单个或成对	成链	单个、成对或成堆	单个、成对或呈栅栏状	单个、成对或呈栅栏状
芽胞	无	无	有	无	无	无
革兰氏染色	阴性	阴性	阳性	阳性	阳性	阳性

表 3 产脂肪酶菌株的分子鉴定结果

Table 3 Molecular identification of lipase-producing strains

菌株编号	最相近菌种	GenBank	同源性/%
AD	<i>Klebsiella</i> sp.	KC455419.1	99
AE	<i>Bacillus aryabhatai</i>	KJ009458.1	100
AG	<i>Lactococcus lactis</i>	JQ811214.1	99
AF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JX406150.1	99
AM	<i>Bacillus pumilus</i>	KM265464.1	100
AN	<i>Bacillus pumilus</i>	KM265464.1	100

将菌株的 16SrRNA 基因序列,提交到 Ezbiocloud 数据库进行比对,结果表明产脂肪酶酶活最高的 AD 菌株序列相似度最高的相关菌株为克雷伯氏菌属,与 AE 菌株序列相似度最高的相关菌株为 *Bacillus aryabhatai*,与 AG 菌株序列相似度最高的相关菌株为乳酸乳球菌,与 AF 菌株序列相似度最高的相关菌株为肺炎克雷伯氏菌,与 AM 菌株序列相似度最高的相关菌株为短小芽胞杆菌,与 AN 菌株序列相似度最高的相关菌株为短小芽胞杆菌。

3 讨论

目前报道共有 65 个属的微生物可以产生脂肪

酶,微生物脂肪酶是工业用脂肪酶的重要来源^[8],而且微生物来源脂肪酶极其丰富,具有比动植物源脂肪酶更宽的作用 pH 和作用温度范围,便于工业化生产获得高纯度酶制剂^[9]。产脂肪酶微生物在芝麻香型白酒的生产中具有重要作用,本研究从芝麻香曲中分离得到 6 株产脂肪酶酶活力较高的菌株,并对其进行形态观察和分子生物学鉴定。

近几年对克雷伯氏菌的研究表明克雷伯氏菌属中的一些种可以产生脂肪酶^[10],本研究首次从高温大曲中分离得到产脂肪酶的克雷伯氏菌,且其产脂肪酶酶活力均高于分离出的其他菌株,这为提高脂肪酶产量进而增香酒品提供了新的研究方向。而乳杆菌属产脂肪酶的报道也曾出现^[11],但报道较少,颇有研究价值。芽胞杆菌属产脂肪酶的报道较为多见,其中嗜热芽胞杆菌是产生酱香风味和芝麻香风味的主要菌种^[12]。

本研究基于芝麻香曲中产脂肪酶的微生物,为芝麻香型白酒增香奠定了理论基础,为今后产脂肪酶功能基因的筛选提供了前提条件。

参 考 文 献

- [1] GB/T 20824-2007. 芝麻香型白酒[S].
- [2] 王海平, 来安贵, 赵德义. 芝麻香型白酒的发展[J]. 酿酒科技, 2006, 9(147): 14-107.
- [3] 周瑞平, 王涛. 偏高温大曲发酵过程中可培养细菌群落研究[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 198-201.
- [4] 张搏, 杨江科. 脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 23-27.
- [5] 庄名扬. 中国白酒香味物质形成机理及酿酒工艺的调控[J]. 四川食品与发酵, 2007, 43(2): 1-6.
- [6] 邬敏辰, 孙崇荣, 邬显章. 平板扩散法粗略确定碱性脂肪酶的活性[J]. 2000, 19(2): 168-172.
- [7] GB/T 23535-2009 脂肪酶制剂.
- [8] 汪小锋, 王俊, 杨江科, 等. 微生物发酵生产脂肪酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 47-53.
- [9] 吴向萍. 产脂肪酶菌株的筛选、脂肪酶基因的克隆与表达及其性质研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [10] 张开平, 惠明, 田青. 利用克雷伯氏菌 B-36 生产耐高温酸性脂肪酶发酵条件的优化[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2013, 34(6): 60-64.
- [11] 孙洁. 乳酸菌发酵剂菌株的自溶特性及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [12] 余婷婷, 赖世强. 高温大曲中产酱香耐高温细菌的筛选及鉴定[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(11): 109-112.

Screening and identification of lipase-producing strains from high-temperature Daqu in sesame flavor liquor

ZHAI Lei¹, XIN Chun-hui², XU Ling²,
CHENG Xiao-xiao¹, SU Jiao-jiao¹, YAO Su¹, CHENG Chi¹

1(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, China Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100015, China)

2(Shandong Bandaojing Co., Ltd., Gaoqing 256300, China)

ABSTRACT Sesame flavor liquor is the innovation types of traditional liquor in China, and famous both at home and abroad for unique elegant sesame flavor. The main aroma components are complex flavors of alcohol, aldehyde, acid, ester combined with a certain amount of pyrazines, furans, phenols and heterocyclic compounds. The lipase-producing microorganisms are key to the formation of special flavor. In this study, the microbial strains producing lipase were screened and identified from different fermentation stages of Shandong bandongjing high-temperature daqu using pure culture technology. The results showed that 15 strains producing lipase were obtained with improved rhodamine plate methods. 6 strains with high lipase activities were identified from morphology and molecular characteristics after enzyme activities assays. This study provides original strains for functional lipase-producing genes screening and lays a theoretical foundation for aroma components analysis of sesame flavor liquor.

Key words sesame flavor liquor; high-temperature daqu; lipase; functional strains