

高糖化酶活菌株的选育及其在山西老陈醋酿造中的应用*

吕利华¹, 梁丽绒², 赵良启¹

1(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西太原, 030006)

2(太原市疾病预防控制中心, 山西太原, 030001)

摘 要 采用 N^+ 注入、氯化锂-紫外线复合诱变方法对糖化酶生产菌株黑曲霉 As3.4309 反复进行诱变处理, 获得了 1 株高糖化酶活的突变株 IV5-66, 其糖化酶活力为出发菌株的 3.5 倍, 该菌株具有无霉腐味、不产生色素等特点, 具有较高的应用价值。建立了利用该突变株制备高糖化酶活麸曲的工艺, 并将高糖化酶活麸曲与我们已经构建的产酒生香酵母菌共培养液共同添加到山西老陈醋的酒醪发酵中, 使淀粉利用率提高了 27%, 乙醇产量提高了 34%, 乙酸乙酯产量提高了 1 倍, 酒醪的产量与质量均得到了大幅度的提高。

关键词 糖化酶, 离子注入, 育种, 山西老陈醋, 酿造

山西老陈醋是享誉全国、驰名世界的品牌食醋, 历史悠久, 品质优良, 深受广大消费者喜爱。然而, 与其他许多传统酿造产品一样, 山西老陈醋也存在着原料利用率低、出品率不高等问题。从生产技术的角度剖析原因, 问题主要存在于糖化过程。测试结果表明, 山西老陈醋大曲的糖化酶活力在 800~1 000 u/g, 这样便难以充分利用淀粉质原料和实现产量的最大化。

目前, 国内的糖化酶生产菌株的生产能力普遍较低, 发酵产品糖化酶活力多在 1 800 u/g 左右, 有文献报道, 江西豪德集团生物工程公司 2001 年的糖化酶生产水平平均在 1 800 u/mL^[1], 2006 年湘西河溪香醋厂使用的麸曲优势菌种糖化酶活力为 1 798 u/g^[2]。因此, 选育生产性状优良, 糖化酶活力高的微生物菌株并建立其高酶活制剂的制备方法是十分必要的。

笔者旨在采用 N^+ 注入、氯化锂-紫外线复合诱变方法对糖化酶生产菌株黑曲霉 As3.4309 反复进行诱变处理, 以期获得高糖化酶活的突变株。建立利用该突变株制备高糖化酶活麸曲的工艺, 并将高糖化酶活麸曲与已经构建的产酒生香酵母菌共培养液^[3], 共同添加到山西老陈醋的酒醪发酵中, 代替部分老陈醋大曲, 以提高原料利用率并改善老陈醋酿造过程中酒醪的质量。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

第一作者: 硕士研究生(赵良启教授为通讯作者)。

* 山西省科技攻关项目

收稿日期: 2007-03-27, 改回日期: 2007-07-03

黑曲霉 As3.4309, 酿酒酵母 N219.3, 异常汉逊酵母 N29.8(本实验室保存或分离保存)。

1.1.2 培养基

(1) 分离及斜面培养基: 查氏培养基。

(2) 麸皮培养基: $m(\text{麸皮}) : m(\text{水}) = 1 : 1$ 。

(3) 酵母菌培养基: 麦芽汁培养基, pH 为 4。

1.2 主要仪器与设备

离子注入机(俄罗斯产, 山西省农科院提供)、15W 紫外灯、752C 紫外可见分光光度计等。

1.3 方 法

1.3.1 糖化酶高活力菌株的诱变选育

1.3.1.1 N^+ 注入剂量选择

取 As3.4309 的单孢子悬液 0.1 mL(制备方法见文献[4])涂布于直径 50 mm 平皿, 吹干, 置于离子注入机靶室内, 靶室真空度为 10^{-3} Pa。 N^+ 能量为 20 Kev, 选择不同的剂量进行离子注入诱变。诱变结束后立即洗下孢子, 稀释, 涂布于查氏培养基平板上, 28℃ 培养 48 h, 挑取单菌落并进行糖化酶活力测定, 选正突变率最高点为最佳诱变剂量。

1.3.1.2 紫外和氯化锂复合诱变剂量选择

取 As3.4309 的单孢子悬液 4 mL 于直径 50 mm 的平皿, 磁力搅拌, 以 15W 紫外灯, 距离 30 cm, 分别照射 1, 3, 5, 7, 9 min, 而后将处理后的孢子悬液稀释并涂布于 0.1% 氯化锂的查氏培养基平板上。28℃ 避光培养 48 h, 挑取单菌落, 进行糖化酶活力测定, 选正突变率最高点为最佳照射剂量。

1.3.2 糖化酶高活力麸曲制备工艺建立

采用不同的麸曲培养基配方制备麸曲, 依据麸曲糖化酶活力高低选择合适的麸曲培养基, 而后建立高糖化酶活力麸曲的制备工艺。

1.3.3 对山西老陈醋酿酒工序的优化

1.3.3.1 糖化酶高活力麸曲的制备及优良酵母菌共培养液的构建

依照上述试验建立的方法,制备糖化酶高活力麸曲。同时,按照本实验室建立的优良酵母菌共培养构建的方法^[3],以酵母菌 Nz19.3 和 Nz9.8 构建优良酵母菌共培养液,备用。

1.3.3.2 优化山西老陈醋酒醪发酵工艺

对试验组 1 采用山西老陈醋的传统酒醪发酵工艺参数;试验组 2 以 As3.4309 麸曲置换 50% 的大曲,并在酒醪发酵开始时,将制备好的酵母菌共培养液(3%接种量)加入酒醪中;试验组 3 以筛选到的糖化酶高活力菌株麸曲置换掉 50% 大曲,在酒醪发酵开始时将制备好的酵母菌共培养液(3%接种量)加入酒醪中,试验组 2 和 3 的其余工艺参数同传统生产工艺,每个试验组均施行 3 个平行试验。发酵前后,测定发酵醪中的初糖、残糖、乙醇和乙酸乙酯含量。

1.3.4 检测方法

1.3.4.1 糖化酶活力测定方法

将平板上的单菌落分别挑到查氏培养基斜面上,培养 7 d 后,接种于三角瓶麸皮培养基(每瓶培养基装量为 10 g)中,28℃ 培养 72 h,依据 GB/T1803—1993 法进行糖化酶活力测定。

糖化酶活力单位定义:1 g 酶粉在 pH 4.6、40℃ 条件下,1h 分解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活单位 U。

1.3.4.2 发酵醪中乙醇及乙酸乙酯的测定方法 气相色谱法^[5]。

2 结果与分析

2.1 诱变选育结果

2.1.1 N^+ 注入存活率曲线

按实验方法中的照射剂量进行诱变处理,以经过真空处理的菌样作对照。离子注入不同剂量存活率见图 1,从图中可以看出,其存活率曲线呈典型的“马鞍型”。

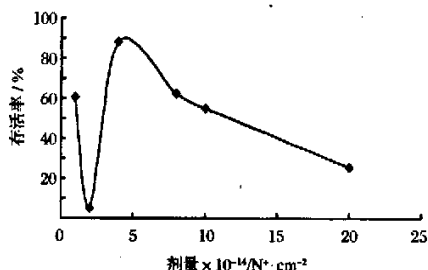


图 1 黑曲霉离子诱变存活率曲线

2.1.2 最佳 N^+ 注入剂量的选择

从不同注入剂量的平板上随机挑取菌株,进行酶活力测定,统计其正突变率(以出发菌株为对照,糖化酶活力提高 10% 以上为正突变),见表 1。由结果可知,离子注入剂量在 $4 \times 10^{14} N^+ / cm^2$ 和 $2 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 时可得到较高的正突变率。因此选择这 2 个注入剂量作为最佳离子注入剂量。

表 1 黑曲霉离子注入正突变率统计

| 剂量 $\times 10^{14} N^+ \cdot cm^{-2}$ | 4 | 8 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 正突变率 / % | 53.33 | 50.00 | 38.46 | 60.87 | 36.00 | 30.00 | 30.77 | 46.67 |

2.1.3 氯化锂-紫外线复合诱变最佳剂量的选择

从不同注入剂量的平板上随机挑取菌株,进行酶活力测定,统计正突变率,如表 2 所示。由结果可知,紫外照射 5 min 和 7 min 时,正突变率较高。因此选择这两个剂量为最适剂量。

表 2 黑曲霉氯化锂-紫外线复合诱变的正突变率

| 剂量 | 1min | 3min | 5min | 7min | 9min |
|----------|------|------|------|------|------|
| 正突变率 / % | 16.9 | 27.5 | 32 | 37.2 | 25.8 |

2.1.4 诱变结果

采用最佳诱变剂量对黑曲霉菌株进行多次诱变处理,最终获得 1 株糖化酶高活力黑曲霉 IV5-66,其酶活力可达 8 002 U/g,约是出发菌株 As3.4309 糖化酶活力的 3.5 倍。突变菌株 IV5-66 孢子稀

少,菌落颜色为黄白色,培养基背面色素较少或无;而出发菌株 As3.4309 孢子较多,菌落颜色为深褐色,培养基背面有深褐色色素。突变株 IV5-66 生长速率与 As3.4309 基本相同,但产酶速率则明显优于出发菌株。同时,突变株 IV5-66 无霉腐味,更加适合于酿造生产使用。

2.1.5 糖化酶高活力菌株 IV5-66 的遗传稳定性检验

将 IV5-66 菌株在查氏培养基上连续传代 5 次,糖化酶活力基本保持稳定(见表 3)。

表 3 黑曲霉 IV5-66 斜面传代糖化酶活变化情况

| 传代 | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | 平均值 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 对照菌酶活 / $U \cdot g^{-1}$ | 2 013 | 2 264 | 2 561 | 2 100 | 2 300 | 2 247.6 |
| IV5-66 酶活 / $U \cdot g^{-1}$ | 8 000 | 8 254 | 8 660 | 8 119 | 8 325 | 8 272 |

2.2 突变株 IV5-66 糖化酶高活力麸曲制备条件优选

将黑曲霉 IV5-66 保藏菌种经两次斜面传代活化后,接种于麸皮培养基,28℃培养 72 h 获种子培养物。按表 4 所示设计不同的麸曲培养基配方,将种子培养物按 5% 的接种量分别接种于不同配方的麸曲培养基中,28℃通风培养,48 h 后翻曲 1 次,培养 84 h 制得麸曲。

表 4 不同配方的麸曲培养基及其麸曲糖化酶活力

| 培养基 编号 | 麸皮 /g | 玉米粉 /g | 水 /g | (NH ₄) ₂ SO ₄ /g | KH ₂ PO ₄ /g | 最终糖化酶 酶活/U·g ⁻¹ |
|-----------|----------|-----------|---------|---|---------------------------------------|-------------------------------|
| 培养基 1 | 100 | 0 | 100 | 0 | 0 | 8 250 |
| 培养基 2 | 100 | 0 | 120 | 0 | 0 | 8 354 |
| 培养基 3 | 100 | 3 | 100 | 0 | 0 | 8 412 |
| 培养基 4 | 100 | 5 | 120 | 0 | 0 | 8 437 |
| 培养基 5 | 100 | 3 | 100 | 0.5 | 0.3 | 8 420 |
| 培养基 6 | 100 | 5 | 120 | 1 | 0.5 | 8 503 |

综合比较各个配方的原材料价格及最终产酶量,我们选用培养基 2 为我们的最佳麸曲培养基。

2.3 优良菌株对山西老陈醋酒发酵工艺的优化

表 5 老陈醋不同酒发酵工艺参数的比较

| 老陈醋酒 发酵工艺 | 初糖质量 浓度/% | 残糖质量 浓度/% | 乙醇体积 分数/% | 乙酸乙酯 体积分数/% | 糖酒转化率 /% | 淀粉利用率 /% | 乙醇产量 提高率/% | 淀粉利用 提高率/% |
|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| 试验组 1 | 17.3 | 6.7 | 5.0 | 0.01 | 37.3 | 61.3 | — | — |
| 试验组 2 | 14.1 | 4.6 | 5.7 | 0.02 | 47.4 | 67.4 | 14 | 10 |
| 试验组 3 | 14.1 | 3.1 | 6.7 | 0.02 | 48.1 | 78.0 | 34 | 27 |

3 讨论

在进行诱变育种的过程中发现,离子注入法可以得到较高的正变率,而连续进行离子注入的诱变效果不及离子注入、氯化锂-紫外线复合交叉处理。最终选育的糖化酶高活力菌株 IV5-66,其糖化酶活力平均为 8 272 U/g,优化培养条件后,绝干曲糖化酶酶活最高可达 12 285 U/g。经-80℃低温甘油管保存及传代培养试验,证明其高糖化酶活性状可稳定遗传。

用黑霉菌 IV5-66 制成麸曲代替传统工艺中的部分大曲,与构建的酵母菌共培养体系共同添加到山西老陈醋的酒发酵过程中,不仅提高了原料的利用率,增加了酒精产量,而且有效的提高了乙酸乙酯含量,实现了在提高酒精出品率的同时改善酒醪风味质量的目的。

黑曲霉 IV5-66 不仅糖化酶活力高,而且不产生或很少产生色素,无霉腐味,这些性状对于该菌株

2.3.1 高糖化酶活麸曲制备结果

突变菌株 IV5-66 制备的麸曲颜色为黄白色,孢子稀少,无霉腐味,绝干曲糖化酶活力为 12 285 U/g。黑曲霉 As3.4309 制备的麸曲颜色为褐色,孢子多,有霉味,绝干曲糖化酶酶活力仅为 3 745 U/g。

2.3.2 不同的老陈醋酒发酵工艺参数的比较

各试验组均进行 18 d 的酒发酵后,应用气相色谱检测酒醪中的乙醇和乙酸乙酯的含量,并测定酒醪的初糖和残糖浓度,对试验数据进行分析如表 5。

从表 5 可以看出,经 IV5-66 麸曲与酵母菌共培养体系优化后的酿酒工艺与传统工艺相比较,淀粉利用率提高了 27%,酒精产量提高了 34%,乙酸乙酯产量提高了 1 倍。说明选育到的 IV5-66 与构建的酵母菌共培养体系对于改善山西老陈醋的酒发酵工艺是非常有效的。而从试验组 2 与试验组 3(优化组)的发酵参数比较可以看出,添加 IV5-66 麸曲可以大大促进淀粉利用率的提高,酒醪中乙醇浓度也有较大幅度的提高,达到了预期的试验目的。

的应用显然是十分有利的。黑曲霉 IV5-66 不仅可以用于白酒、食醋等传统酿造产品的发酵生产,而且可以用于抗生素、有机酸等其他产品的发酵生产中,有着广泛而良好的应用前景。

参 考 文 献

- 王尚健,卢红,卢军. 采用补料法提高糖化酶发酵水平[J]. 食品与发酵工业,2001,27(8):34~37
- 麻成金,黄群,余估,等. 湘西河溪香醋优势糖化黑曲霉筛选及产酶条件的研究[J]. 中国调味品,2006,(3):17~20
- 梁丽绒,吕利华,赵良启. 山西老陈醋酿酒酵母菌共培养体系的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(12):12~15
- 白爱枝,梁运章,杨军,等. 离子注入选育高产木聚糖酶黑曲霉及其发酵条件研究[J]. 菌物学报,2004,(3):412~416
- 熊裕堂,张银文. 山西老陈醋微量酯香成分的液上气相色谱快速定量分析[J]. 食品与发酵工业,1993,19(6):45~49

(下转第 91 页)

较差,仿真最大相对误差分别为 10.08% 和 4.47%,预测能力比较差,需进一步改进。

参考文献

- 1 Douglas A Gee, W Fred Ramirz. A flavour model for beer fermentation[J]. J Inst Brew, 1994, 100: 321~329
- 2 B de Andrés-Toro, J M Girón-Sierra, J A López-Orozco, et al. A kinetic model for beer production under industrial operational conditions[J]. Mathematics and Computers in Simulation, 1998, 48: 65~74
- 3 R Alex Speers, Peter Rogers, Bruce Smith. Non-linear modeling of industrial brewing fermentations[J]. J Inst Brew, 2003, 109: 229~235
- 4 Tony D'Amore, Guy Celotto, Glen D Austin, et al. Neu-

ral network modeling: applications to brewing fermentations[C]. EBC Congress, 1993, 221~231

- 5 R-Hecht-Nielsen. Theory of the Back Propagation Neural Network. J. Conf. on Neural Network, Washington D. C. June 1989, (1): 593~605
- 6 张彦青. 人工神经网络在啤酒酿造过程中的应用研究[D]. 北京: 中国食品发酵工业研究院硕士论文, 2005
- 7 高 隽编著. 人工神经网络原理及仿真实例[M]. 北京: 机械工业出版社, 2003
- 8 Gallant Stephen L. Neural Network Learning and Expert Systems[M]. London, England: The MIT Press, 1993. 195~198
- 9 方柏山. 木糖醇发酵与提纯过程模型化与优化[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2000

Establishment of Predictive Model for Beer Fermentation Process

Zhang Yanqing, Zhang Wujun

(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT Artificial neural network(ANN) was applied to establish the models of fermentation degree and flavor. The model in this paper for fermentation degree has good capacity for simulation and prediction. In four flavor models, isoamyl alcohol model and ethyl acetate model have good capacity for simulation and prediction, whereas acetaldehyde model and diacetyl model do not.

Key words beer, fermentation, artificial neural network, model

(上接第 85 页)

Breeding of *Aspergillus niger* for the High-yield Glucoamylase Strain

Lv Lihua¹, Liang Lirong², Zhao Liangqi¹

1(Chemical Biology and Molecular Engineering Laboratory of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

2(Taiyuan Center for Disease Control and Prevention, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT In this paper, the parent strain of *Aspergillus niger* 3.4309 was treated with the mutagenesis of N⁺ implantation and UV-LiCl. A mutant strain IV5-66 with high production level of Glucoamylase was screened. Compared to the parent strain, its enzymatic activity was 3.5 times higher than the parent strain, with the characterization of no pigment and no fustiness. So it was worth of higher application in brewing. And the high-glucoamylase bran-koji of the mutant strain was made. The bran-koji and the mixed-culture system of yeasts for high production of alcohol and ethyl acetate were added to brew the Shanxi overly matured vinegar. The results indicated that the utility of starch was increased by 27%, and the yield of alcohol and ethyl acetate was increased by 34% and 100%, respectively, which greatly improve the yield and the quality of alcohol.

Key words glucoamylase, ion implantation, breeding, Shanxi overmature vinegar, brewing