

# 腊八豆生产菌株的选育

夏岩石<sup>1</sup>, 夏延斌<sup>2</sup>, 蒋立文<sup>2</sup>

(1.湖南科技学院生命科学与化学工程系, 湖南 永州 425006)(2.湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 将通过平板分离、筛选和紫外诱变得到的毛霉菌株 A2 (含高活力中性蛋白酶) 和根霉菌株 C4 (含高活力的  $\alpha$ -淀粉酶) 按 7:3 的比例混合接种生产腊八豆, 产品的游离氨基酸、氨基态氮和可溶性无盐固型物的含量分别提高了 6%、31% 和 10%, 产品的感官品质有显著的提高。

**关键词:** 腊八豆; 毛霉; 根霉

中图分类号: TS264.2<sup>+</sup>9; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)02-0016-06

## Breeding of Producing Strains for Laba Beans production

XIA Yan-shi<sup>1</sup>, XIA Yan-bin<sup>2</sup>, JIANG Li-wen<sup>2</sup>

(1.Department of Life Science and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425006, China)(2.College of Food Science and Technology, Agriculture University of Hunan, Changsha 410128, China)

**Abstract:** By flat separation, screening and mutation with ultraviolet radiation, *Mucor* strain A2 (containing neutral protease of high activity) and *Rhizopus* strain C4 (containing  $\alpha$ -amylase of high activity) were screened. The results showed that, when the mixture of A2 and C4 (the ratio of A2 to C4= 7:3) were inoculated to produce laba beans, the contents of free amino, nitrogen of amino acid and soluble substance of the final product were improved 6%, 31% and 10%, respectively, and the sensory quality of product were also greatly enhanced.

**Key words:** labadou; *mucor*; *rhizopus*

目前, 在腊八豆工业化生产中, 普遍采用单一纯毛霉菌种接种制曲, 由于该霉菌的生长温度较低, 且酶系单一, 产品经短期后发酵, 成品的酯香味、氨基态氮的含量远不及自然发酵的腊八豆。研究<sup>[1]</sup>表明根霉的生长温度较宽, 糖化力高, 并有一定的酒化力和酯化能力, 能提高发酵豆制品的风味, 并具有较好的共生性, 但该菌的蛋白酶活力较毛霉低。本试验通过选育根霉和毛霉, 并采用两菌株共生发酵来生产腊八豆, 促进酯类物质的形成, 改善产品的风味和品质。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原辅材料

大豆、广合腐乳、浏阳豆豉、邵阳大曲酒、生姜、麸皮和土豆, 全部市售。

#### 1.1.2 供试微生物

A 菌株: 毛霉菌(*Mucor sp.*), 湖南农业大学微生物教研室提供。

B 菌株: 根霉菌(*Rhizopus sp.*), 湖南农业大学微生物教研室提供。

C 菌株: 根霉菌(*Rhizopus sp.*), 浏阳豆豉中分离筛选所得。

D 菌株: 毛霉菌(*Mucor sp.*), 浏阳豆豉中分离筛选所得。

E 菌株: 米根霉菌 (*Rhipus oryzae*), 购买于中国科学院微生物研究所。

F 菌株: 毛霉菌(*Mucor sp.*), 广合腐乳中分离得到。

#### 1.1.3 培养基<sup>[2]</sup>

PDA 培养基: 用于菌种的培养。

马丁氏琼脂培养基: 用于分离霉菌。

酪蛋白培养基: 用于毛霉菌株的选育。

淀粉琼脂培养基: 用于根霉菌株的选育。

察氏培养基: 用于菌种的保藏。

$m$ (粗麸皮): $m$ (豆饼粉): $m$ (水)=9.5:1:10, 用于制作种曲。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 腊八豆制曲菌株的分离选育

#### 1.2.1.1 霉菌分离选育的流程

采样(菌种的收集, 引进)→增殖培养→平板分离纯化→菌种的形态观察和镜检→斜面保藏→菌株的筛选→UV 诱变(被选菌株)→初筛→复筛→产酶稳定性能的测定→斜面保藏

#### 1.2.1.2 毛霉和根霉的分离纯化<sup>[2,3]</sup>

收稿日期: 2006-9-24

作者简介: 夏岩石, 硕士, 湖南科技学院教师。研究方向: 食品营养与安全

分别称取浏阳豆豉和广合腐乳各 10 g, 研磨成浆, 分别放入盛 90 ml 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶中, 振摇 30 min, 使样品与水充分混匀, 将细胞分散, 稀释后涂布于马丁氏琼脂培养基平板上进行分离培养。25 °C 下培养 2~3 d。分别挑取单个霉菌菌落少许, 接种到 PDA 平板上, 培养至产生孢子。挑选生长速度快, 菌丝健壮, 大而饱满的菌落进行稀释平板划线分离纯化, 得到表面色泽一致、个体形态无异的纯菌落。肉眼观察纯化霉菌菌落的特征, 并用显微镜观察孢子囊梗的形状, 着生位置及分枝情况, 假根的有无来鉴别毛霉和根霉。将分离纯化得到的菌株接种到察氏斜面培养基进行保藏。

#### 1.2.1.3 供试菌株适宜生长温度的确定

将收集的 A、B、C、D、E、F 六个菌株活化, 在无菌条件下分别接少许于 PDA 固体斜面上, 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 下恒温培养 2 d, 取出观察菌丝生长情况, 确定六个菌株适宜生长温度。

#### 1.2.1.4 供试菌株的产酶特性

根据试验 1.2.1.3 可知, 菌株 B 出现明显退化, 淘汰菌株 B, 将 A、C、D、E、F 五个菌株的孢子悬浮液分别接种到麸曲培养基中于 25 °C 下恒温培养, 2 d 后, 测定各培养麸曲的蛋白酶活力、 $\alpha$ -淀粉酶的活力和纤维素酶的活力, 选出产酶活力高的毛霉菌株和根霉菌株进行 UV 诱变。

#### 1.2.1.5 被选菌株的 UV 诱变<sup>[4,5]</sup>

选 A 菌株和 C 菌株制成孢子悬浮液, 调整孢子浓度至  $10^3 \sim 10^4$  个/ml 左右, 各取 0.1 ml 孢子液涂布于 PDA 平板表面, 置 20 W 紫外灯进行照射诱变 (距离为 30 cm) 30 min, 照射死亡率控制在 70%~80% 为宜。照射后, 于 25 °C 恒温培养箱中暗培养 2 d。挑选生长速度快, 菌丝健壮、致密, 菌落大而饱满, 外观色泽一致的单菌落, 进行初筛。

A 菌株诱变后获得的菌株分别接种于酪蛋白琼脂平板培养基上进行初筛, 观察菌落直径、菌丝高度和透明圈的大小, 以透明圈直径与菌落直径的比值(HE 值)作初筛指标, 选 3 个 HE 值大的毛霉菌落进行复筛。

C 菌株诱变后获得的菌株分别接种在淀粉琼脂平板上培养 2 d, 涂布碘液与其上, 以透明圈直径与菌落直径的比值 (HE 值) 作为初筛指标, 将三个 HE 值大的根霉菌落挑接在斜面上培养基保藏, 进行复筛。将初筛菌株制成孢子悬浮液, 分别接种到麸曲培养基中于 25 °C 下恒温培养, 2 d 后, 测定各培养麸曲的蛋白酶活力、 $\alpha$ -淀粉酶的活力和纤维素酶的活力, 并与原始菌株进行比较。

#### 1.2.1.6 诱变菌株的产酶稳定性

将 UV 诱变得到的 A2 和 C4 菌株连续传代 8 次, 分别制曲, 培养 2 d, 分别测定中性蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶的活力, 确定诱变菌株的遗传稳定性。

#### 1.2.2 毛霉和根霉共生制曲生产腊八豆

黄豆浸泡熟化后按 V(A2):V(C4) 为 7:3 和 3:7 两个水平接种生产腊八豆, 25 °C 长霉 40~45 h 后添加适当食盐、生姜和白酒, 40 °C 后发酵 4 d。同时与接种纯毛霉 A2 和纯根霉 C4 生产的产品进行比较, 测产品的理化指标和游离氨基酸含量, 并对产品进行感官评价。

### 1.3 检测项目及方法

#### 1.3.1 纤维素酶活力的测定 (Q32021.JW007-1999)

采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)。酶活定义: 1 g 麸曲于 50 °C、pH 5.0 的条件下, 每小时由底物生成  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量, 即为 1 个酶活力单位, 以 u/g 干基表示。

#### 1.3.2 蛋白酶活力的测定

采用福林试剂法<sup>[7]</sup>。酶活定义: 1 g 物质在一定的温度和 pH 值条件下, 1 min 水解干酪素产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸为一个酶活单位, 以 U/g 表示。

#### 1.3.3 $\alpha$ -淀粉酶活力的测定

采用测分光光度法<sup>[7]</sup>。酶活定义: 1 g 物质于 60 °C、pH 6.0 的条件下, 1 h 液化 1 g 可溶性淀粉, 即为 1 个酶活力单位, 以 U/g 干基表示。

#### 1.3.4 理化指标的测定

水分含量的测定: 采用常压干燥法<sup>[6]</sup>。

蛋白质含量的测定: 采用凯氏定氮法<sup>[6]</sup>。

总酸含量的测定: 采用中和法<sup>[6]</sup>。

食盐的测定: 采用莫尔法<sup>[6]</sup>。

水溶性无盐固型物: 按文献测定<sup>[6]</sup>。

游离氨基酸的测定: 由中国科学院农业现代化研究所中心实验室分析检测。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 菌株的分离选育

#### 2.1.1 菌株的分离

从浏阳豆豉中分离纯化得到 C、D 两个菌株, C 菌株为根霉属, 营养菌丝有明显的假根, 其生长速度快, 菌丛高 28 mm, 菌丝呈灰白色, 老后褐色, 孢子多。D 菌株为毛霉属, 营养菌丝中无假根, 生长速度快, 菌丛高 17 mm, 菌丝呈白色, 老后稍褐。两者的菌丝和孢子囊梗的形态见图 1 和图 2。从广合腐乳中分离得到 F 菌株, 为毛霉属, 菌丛高 15 mm, 菌丝呈白色, 老后稍褐, 菌丝生长快, 其菌丝和孢子囊梗的

形态见图 3。



图 1 C 菌株的菌体形态

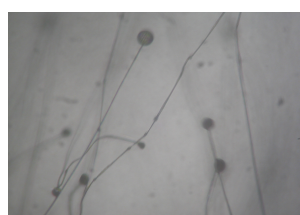


图 2 D 菌株的菌体形态

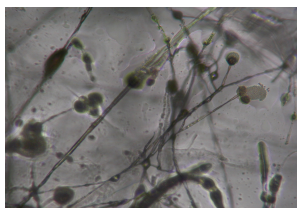


图 3 F 菌株的菌体形态

### 2.1.2 菌株适宜生长温度的确定

A、B、C、D、E、F 六个菌株在不同温度下生长情况见表 1。从表 1 可知菌株 B 生长迟缓，不产生孢子，出现明显退化现象；菌株 A、D、E、F 适宜生长于 20~25 °C，在 30 °C 以上生长受到抑制，不耐高温；菌株 C 有较宽的温度范围，在 20~35 °C 菌丝生长致密，产生孢子多，其耐高温的特性，适合夏季生产腊八豆。

表 1 各菌株不同温度的生长情况

菌株	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
A	++	+++	++++	++	-	-
B	-	+	++	++	-	-
C	++	+++	++++	++++	++++	+
D	++	+++	+++	++	-	-
E	++	+++	++++	++	-	-
F	++	++	+++	++	-	-

注：-菌丝不生长；+菌丝稀而短；++ 菌丝较长，产生少量孢子；+++ 菌丝长而密，孢子较多；++++菌丝长，浓密，孢子特多。

### 2.1.3 菌株的产酶特性

A、C、D、E、F 五个菌株经麸曲培养后，其产酶情况见表 2。

表 2 各菌株的主要酶系及酶活力（单位：u/g 干基）

菌株	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	纤维素酶	α-淀粉酶
A	105.5	332.2	156.1	92.5	62.3
C	92.3	241.8	167.2	257.8	112.9
D	121.1	265.8	135.8	89.3	23.1
E	68.2	89.1	40.3	36.6	38.6
F	98.7	197.5	172.2	127.3	58.6

表 2 知菌株 A 产蛋白酶活力远高于其他菌株，而

其产纤维素酶和 α-淀粉酶能力弱。菌株 C 的纤维素酶活力和 α-淀粉酶均高于其他菌株，但产蛋白酶活力低。根据生产要求故选菌株 A 和菌株 C 进行 UV 诱变。

### 2.1.4 菌株的 UV 诱变

被选菌株 A 和菌株 C 经 UV 诱变试验后，各挑选生长速度快、菌丝健壮的 8 株诱变菌株进行酪蛋白平板和淀粉平板初筛，试验结果见表 3。

表 3 初筛结果

菌株编号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
HE 值	1.10	1.13	1.08	1.18	1.17	1.11	1.02	1.04
菌株编号	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
HE 值	1.51	1.31	1.22	1.74	1.43	1.33	1.41	1.61

根据初筛结果，选取 HE 值大且生长速度快的菌株 A2、A4、A5、C1、C4 和 C8 进行复筛，分别接入三角瓶麸曲培养基中，培养后提取酶液，测定酶活力，试验结果见表 4。

表 4 复筛菌株的酶活力（单位：u/g 干基）

菌株	A	A2	A4	A5	C	C1	C4	C8
中性蛋白酶	351.2	421.5	374.2	378.1	239.5	225.6	221.9	237.5
纤维素酶	82.8	71.1	121.9	111.3	236.2	215.5	295.3	219.2
α-淀粉酶	67.3	66.2	82.1	62.3	126.6	163.5	180.8	152.3

结果表明，菌株 A2 的蛋白酶活力最高，显著高于原始菌株 A，蛋白酶活力提高 20%，但纤维素酶和 α-淀粉酶弱有下降，菌株 C4 的纤维素酶和 α-淀粉酶最高，与原始菌株相比，两种酶活分别提高了 25%和 42%，但蛋白酶活力有些下降。

经 UV 诱变后的毛霉菌株 A2 和根霉菌株 C4 在 25 °C 下生长良好，菌丝致密，色泽一致、无怪味，具有较高的酶活，因而选择 A2 和 C4 进行双菌种制曲生产腊八豆的研究，两菌株的基本性状见表 5。

表 5 菌株 A2 和菌株 C4 的性状（25°C，2d）

菌株	A2	C4
菌落直径(mm)	17	24
菌丛高度(mm)	18	31
菌落色泽	白色	灰色
生长速度	快，18~36h	特快，12~26h
菌落表面	稠密状	致密状
孢子状况	多，灰色	稠密，褐色

### 2.1.5 诱变菌株的产酶稳定性试验

表 6 菌株的产酶稳定性 单位：U/g 干基

项目	传交代数（代）							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	428.9	400.3	372.1	386.0	412.5	419.4	395.2	416.5
B	279.3	288.4	286.5	269.9	282.1	285.5	271.2	277.3

注：A 为 A2 的中性蛋白酶活力；B 为 C4 的 α-淀粉酶活力

将 UV 诱变得到的 A2 和 C4 菌株连续传代 8 次, 分别制曲 2d, 其产酶活力变化不大, 说明 A2 和 C4 菌株的遗传性比较稳定, 适宜生产应用, 结果如表 6。

## 2.2 毛霉和根霉共生制曲生产腊八豆

按照试验 1.2.2 进行腊八豆的生产, 后发酵 4d, 取样测定腊八豆的游离氨基酸含量和常规理化指标, 试验结果见表 7 和表 8。将四个产品分别编号为 H、I、J 和 K, H 为按  $V(A2):V(C4)=3:7$  接种制曲生产的腊八豆产品; I 为纯毛霉 A2 制曲生产的腊八豆产品; J 为按  $V(A2):V(C4)=7:3$  接种制曲生产的腊八豆产品; K 为纯根霉 C4 制曲生产的腊八豆产品。

### 2.2.1 产品游离氨基酸的变化

表7 不同制曲腊八豆游离氨基酸的含量 单位:mg/g鲜重

氨基酸的名称	I	K	J
天冬氨酸(Asn)	0.002	0.037	0.024
丝氨酸(Ser)	0.176	0.332	0.291
谷氨酸(Glu)	0.254	0.230	0.301
甘氨酸(Gly)	0.276	0.283	0.296
组氨酸(His)	0.320	0.303	0.323
精氨酸(Arg)	0.014	0.007	0.016
苏氨酸(Thr)*	0.375	0.241	0.377
丙氨酸(Ala)	0.207	0.125	0.214
脯氨酸(Pro)	0.174	0.145	0.134
胱氨酸(Cys)	0.035	0.025	0.052
酪氨酸(Tyr)	0.085	0.065	0.087
缬氨酸(Val)*	0.178	0.179	0.196
蛋氨酸(Met)*	0.114	0.110	0.119
赖氨酸(Lys)*	0.095	0.054	0.103
异亮氨酸(Ile)*	0.163	0.146	0.172
亮氨酸(Leu)*	0.278	0.248	0.282
苯丙氨酸(Phe)*	0.392	0.426	0.412
氨基酸总量	3.138	2.956	3.318

注: \* 表示必需氨基酸; H产品没有进行氨基酸的测定, 主要因为H产品的外观和口感不好。

表7知3种产品中, 按 $V(A2):V(C4)=7:3$ 制曲的腊八豆游离氨基酸的含量最高, 其次为纯毛霉A2接种产品, 纯根霉C4接种产品游离氨基酸的含量最低。混合接种的产品与纯毛霉接种的产品相比, 除脯氨酸有所下降外, 其余游离氨基酸都有所增加, 游离氨基酸的总量增加了6%。这是由于按 $V(A2):V(C4)=7:3$ 制曲时, 更有利蛋白酶等酶系的形成, 后发酵过程中促进了蛋白质分解成氨基酸, 增加了产品的风味。从营养角度而言, 按 $V(A2):V(C4)=7:3$ 混合制曲有利于营养价值的提高。

### 2.2.2 产品理化指标的变化

由表 8 来看, 以  $V(A2):V(C4)=7:3$  接种制曲的产品的氨基态氮和水溶性无盐固型物的含量最高, 总酸

的含量较低, 符合发酵豆制品的质量要求, 与纯毛霉 A2 制曲的产品相比, 氨基态氮和水溶性无盐固型物的含量分别提高了 31%和 10%。同时发现根霉 C4 的接种比例增大, 总酸和还原糖的含量也随之增加, 这是由于根霉 C4 能分泌较高的淀粉酶, 利于产品中还原糖的形成, 进一步促进了乳酸菌的生长。

表8 不同制曲腊八豆的理化指标 单位:%

产品	水分	水溶性无盐固型物	总酸	氨基态氮	NaCl	还原糖	蛋白质
I	48	6.72	0.57	0.42	5.55	0.43	32.45
K	52	6.23	0.78	0.32	5.74	0.58	32.65
H	51	6.73	0.82	0.38	5.33	0.53	33.26
J	48	7.41	0.63	0.55	5.51	0.46	32.45

### 2.2.3 产品的感官评价

腊八豆后发酵 4 d, 按工艺要求油炸制成熟食产品, 瓶装灭菌后于室温放至 10 d, 取样进行描述性评价。如表 9, J 产品 (即  $V(A2):V(C4)=7:3$ ) 接种制曲, 生产的腊八豆产品的感官评价更优于其他三个产品。

表9 不同制曲腊八豆的描述性评价

产品	感官评价
I	色泽金黄,有特有的腊八豆香味,酯香弱,滋味鲜美,后味短,粒形好,质地稍硬。
K	色泽暗黑,酯香浓,酸涩味明显,质地硬,口感粗糙。
H	色暗,香气浓,滋味鲜美,后味酸涩,质地稍硬。
J	色泽金黄,香气浓郁,滋味鲜美,后味绵长,质地松软。

## 3 小结

通过分离选育,得到了毛霉菌株A2和根霉菌株C4, 其产酶稳定性好, 菌丝生长快, 色白, 适合于腊八豆的生产。两菌株按 $V(A2):V(C4)=7:3$ 接种生产腊八豆, 提高了产品氨基态氮和游离氨基酸的含量, 同时产品的风味、滋味和质地也明显好于纯菌种生产的腊八豆。

## 参考文献

- [1] 周恒刚.试论根霉菌在制曲上的特征[J].酿酒,2002,(6):23-26.
- [2] 赵玉莲,郑学翔.豆腐乳生产用微生物(一)[J].中国调味品,1998,(12):3-7.
- [3] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,2000.
- [4] 周传云,聂明,万佳蓉.酱油生产用菌诱变优化的研究[J].食品研究与开发,2004,25,(1):55-57.
- [5] 徐成勇,刘泉勇.酿酒根霉高糖化力菌株的筛选[J].酿酒科技,2002,(5):26-28.
- [6] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,2001.
- [7] 姜锡瑞.酶制剂应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,2001