

# 米曲霉葡萄糖代谢抑制菌株的选育及发酵性能研究

赵丽云

(佛山市海天调味食品股份有限公司, 广东佛山 528000)

**摘要:** 选择对2-脱氧葡萄糖(2-DG)抗性较强的米曲霉A2.104为出发菌株,通过原生质体诱变育种,进一步获得了葡萄糖代谢抑制突变株A2.104-166。小试规模的酱油酿造实验结果显示:A2.104-166的蛋白酶和谷氨酰胺酶等主要酶系的活力均有不同程度的提升,碳水化合物消耗量下降33%,全糖/全氮、谷氨酸态氮/全氮、游离氨基态氮/全氮均有明显优势;感官鉴评结果表明A2.104-166菌株的酱油咸味弱,甜味和鲜味加强。

**关键词:** 米曲霉;原生质体诱变;2-DG抗性突变株;酱油发酵

文章编号: 1673-9078(2012)8-982-985

## Protoplast Mutation Breeding of *Aspergillus oryzae* Strain with Glucose Metabolic Inhibition and its Fermentation Properties

ZHAO Li-yun

(Foshan Hai Tian Flavoring & Food Co., Ltd, Foshan 528000, China)

**Abstract:** *Aspergillus oryzae* A2.104 was used as the original strain for its stronger 2-DG resistance. A2.104-166 was obtained as glucose metabolic inhibition mutant by protoplast mutation breeding. A bench-scale soy sauce brewing experiment showed that both protease and glutaminase activities of the strain A2.104-166 improved and carbohydrate consumption decreased by 33%. The ratios of total sugar to total nitrogen, glutamate nitrogen to nitrogen and free amino nitrogen to total nitrogen of the source fermented by the mutant were higher than those by the original strain. Sensory evaluation results showed that the soy sauce brewed by A2.104-166 had lighter salty taste but stronger sweet and umami tastes.

**Key words:** *Aspergillus oryzae*; protoplast mutagenesis; 2-DG resistant mutants; soy sauce fermentation

酱油酿造中主要微生物是米曲霉,米曲霉在制曲过程中因呼吸和增殖要消耗碳水化合物。酱油酿造的主要原料大豆中的葡萄糖和蔗糖在制曲过程中几乎全部被消耗<sup>[1]</sup>。不同米曲霉的酶系和酿造特性不同,对碳水化合物的消耗差异也很大。制曲中的碳水化合物在发酵过程转化为还原糖、乙醇、有机酸等,这些物质的多寡对酱油的呈味有很大的影响,尤其是还原糖对甜味有很大的影响。制曲中的碳水化合物消耗量的多少在酱油中的碳水化合物量中可以反映出来,制曲中碳水化合物消耗的多,酱油中碳水化合物的量就少,因此有必要抑制制曲中碳水化合物的消耗量从而提高酱油中的碳水化合物的量。

2-脱氧葡萄糖(2-DG)是D-葡萄糖的结构类似物,

收稿日期: 2012-03-28

基金项目: 粤港关键领域重点突破招标项目(佛山专项)(2009Z52);广东省技术创新项目(200902717、20101022213);佛山市高明区科技计划项目(201021)

作者简介: 赵丽云(1982-),女,工程师,主要从事微生物与发酵工程方面的研究工作

是一种葡萄糖代谢抑制剂,它通常能抑制酵母和丝状真菌的生长<sup>[2]</sup>。在含有一定2-DG浓度的培养基上生长的菌株为抗2-脱氧葡萄糖的突变菌株,突变菌株的葡萄糖代谢被抑制但其仍能够正常生长的原因可能是葡萄糖代谢以外的代谢途径被促进或者激活,造成抗2-脱氧葡萄糖的突变的机制目前还不是十分明确<sup>[3]</sup>。国内研究工作中,2-DG已成功应用于黑曲霉、里氏木霉等的菌种选育,获得了高产柠檬酸<sup>[3]</sup>、木聚糖酶<sup>[4]</sup>以及纤维素酶<sup>[5]</sup>的菌株。日本的研究者将2-DG应用于米曲霉的育种,获得了淀粉酶提高、制曲中碳水化合物的消耗量减少的菌种<sup>[6,7]</sup>。在国内还未见将2-DG应用于米曲霉的育种的报道。

本文对米曲霉采用原生质体紫外线诱变育种技术,选择性筛选具有2-DG抗性的葡萄糖代谢抑制突变株,获得了 $\alpha$ -淀粉酶的酶活力保持不变,但制曲曲料中碳水化合物消耗显著减少的突变株,该菌株同时具备生长速度快、蛋白酶和谷氨酰胺酶活力高、酿造酱油风味好等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) A2.101、A2.102、A2.103、A2.104为佛山市海天调味食品股份有限公司菌种保藏中心保藏。

### 1.2 培养基及培养条件选择

#### 1.2.1 豆汁培养基

大豆4℃冰箱浸泡过夜,反复加水煮汁3h,过滤待冷却后调整浓度,加入无机盐后配制豆汁试管培养基及平板培养基,121℃,0.11MPa灭菌20min;

#### 1.2.2 初筛培养基

采用不同2-DG浓度的选择培养基,具体配方为:1.0% (m/V) 硝酸钠、30mM柠檬酸、30mM木糖、20mM Tris-maleate缓冲液(pH 6.0)、1.5%琼脂,2-DG(适量);选择合适的2-DG浓度作为抗性临界浓度。

#### 1.2.3 复筛培养基

取麸皮12g,豆粕3g于250mL三角瓶中,搅拌均匀后加入8mL水,润水30min,再次拌匀后于121℃,0.11MPa下灭菌20min,冷却前摇散备用。

#### 1.2.4 高渗培养基

相应培养基中添加0.6M的甘露醇作为高渗条件。

#### 1.2.5 液体琼脂培养基

0.8%的琼脂溶液中添加0.6M的甘露醇,40℃保温备用。

### 1.3 原生质体制备及紫外诱变条件

#### 1.3.1 原生质体制备

对米曲霉菌丝体采用混合酶解破壁法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.2 紫外诱变条件选择<sup>[9]</sup>

将制备的原生质体用15W紫外灯在30cm处分别照射8min、10min、15min、20min、30min进行诱变,涂布豆汁培养基培养48h检验致死率,选择合适的致死率为诱变条件。

### 1.4 酱油酿造试验

#### 1.4.1 制曲条件

脱脂大豆加水150%润水1h,121℃加压蒸煮20min,加入1倍重量炒小麦粉混合均匀,冷却到40℃时接种米曲霉孢子进行小型通风制曲。

#### 1.4.2 发酵条件

成曲添加2倍重量高盐盐水,30℃恒温发酵3个月出油,检测相关理化指标并进行感官鉴评。

### 1.5 曲料酶活力检测方法

#### 1.5.1 蛋白酶活力检测方法

参照国标《蛋白酶活力测定法》SB/T 10317-1999进行。

#### 1.5.2 α-淀粉酶活力检测方法

参照轻工业标准《工业酶制剂通用试验方法》(QB/T 1803-1993)进行。

#### 1.5.3 谷氨酰胺酶活力检测方法

定义为40℃下,每1min催化1μmol谷氨酰胺转化为谷氨酸所需的酶活力单位定义为1U。

### 1.6 碳水化合物的消耗

将培养后的固体培养基冻结干燥、粉碎,取一定量,用2N硫酸100℃加水分解2h,然后用氢氧化钠中和。用二硝基水杨酸法(DNS法)检测中和液的还原糖。

碳水化合物的消耗量(%)=(原料中碳水化合物的量-曲中碳水化合物的量)/原料中碳水化合物的量×100%

### 1.7 酱油理化指标分析方法

#### 1.7.1 全氮测定方法

参照食品中蛋白质的测定方法GB/T 5009.5-2003。

#### 1.7.2 氨基酸态氮和总酸测定

采用电位滴定仪进行自动滴定检测。

#### 1.7.3 还原糖测定

参照食品中还原糖的测定方法GB/T 5009.7-2008。

### 1.8 酱油质量感官评价方法

以出发菌株为对照,9个检查官对发酵原油进行感官鉴评,主要评价咸味、甜味和鲜味的强度。

## 2 结果与分析

### 2.1 实验条件的确定

#### 2.1.1 出发菌株及2-DG抗性浓度的确定

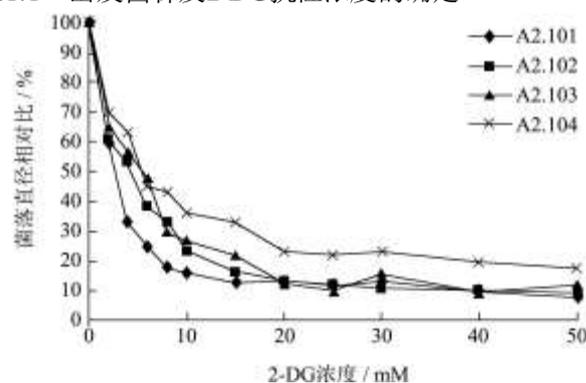


图1 不同2-DG浓度对菌落直径的影响

Fig.1 The influence of different 2-DG concentration on colony diameter

不同菌株对2-DG的抗性不同,需要选出对2-DG的抗性较强的菌株作为出发菌株以及确定合适的2-DG浓度,以实验室保藏的4株优良的米曲霉为菌种来源,制备成适当浓度的孢子悬浮液,涂布于终浓度为0~50mM的2-DG选择培养基,观察菌落相对直径比,结果

如图1所示。不同菌株对2-DG的敏感程度有所不同,当2-DG浓度在10 mM以下时,菌落直径比直线下,菌株生长均受到强烈抑制,当2-DG浓度在20 mM以下时,2-DG的抑制作用平缓,因此,选择2-DG浓度确定为20 mM。同时,菌株A2.104对2-DG抗性最强,选择其为出发菌株。

### 2.1.2 诱变条件的确定

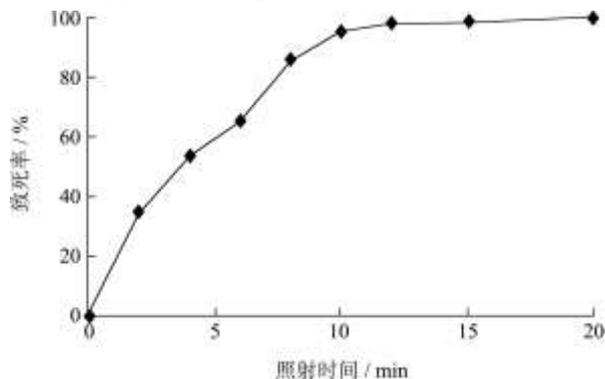


图2 不同紫外诱变时间致死率

Fig.2 The fatality rate of different UV mutagenesis time

将出发菌株A2.104制备原生质体后,调整浓度为 $10^7$ 个/mL,进行不同时间的紫外诱变,涂布豆汁平板,检测致死率,结果如图2。随着时间的延长,致死率不断升高,据报道,紫外诱变时采用低剂量致死率51%~86%发生正突变的频率较高<sup>[10]</sup>。因此,选择8 min为紫外诱变照射时间,其致死率为86%。

### 2.2 葡萄糖代谢抑制菌株的获得

诱变后的原生质体用高渗液调整适当浓度后,加入40℃的液体琼脂,倾注在含20 mM 2-DG的高渗选择培养基上,30℃避光培养一周,挑取菌落直径大且生长良好的菌株;对上述初筛获得的菌株进行三角瓶制曲复筛,分别检测蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶和碳水化合物消耗率,选取酶活力高及碳水化合物消耗率低的菌株。主要检测结果见表1。

表1 原生质体诱变菌株三角瓶制曲检测结果

Table 1 The results of flask koji using protoplast mutagenesis strains

菌株	菌落直径 相对比/%	蛋白酶 /(U/g)	$\alpha$ -淀粉酶 /(U/g)	碳水化合物消耗率/%
出发菌株	100	7500	340	43
A2.104-56	136	11030	350	41
A2.104-87	132	7800	330	32
A2.104-130	150	9080	340	34
A2.104-166	146	7900	330	27
A2.104-232	148	8200	320	46

注:上表中的酶活检测数据均为换算成干基以后的结果。

在获得的5株菌落直径较出发菌株明显提高的突

变株中,A2.104-56的蛋白酶提高47%,但淀粉酶和碳水化合物消耗率相差不大;A2.104-130的蛋白酶提高20%左右,淀粉酶相差不大,碳水化合物消耗量减少约25%;而另一株A2.104-166突变株,虽然其蛋白酶活力提高不明显,淀粉酶也相差不大,但碳水化合物消耗率下降了35%左右,下降幅度最大。本研究的主要目的是获得碳水化合物消耗减少的菌株,因此选择两株碳水化合物消耗量明显减少的A2.104-166菌株进行进一步的研究。

### 2.3 葡萄糖代谢抑制变异株的酱油酿造实验结果

为了验证获得的突变株能够应用于酱油实际生产,筛选获得的酶系及碳水化合物消耗率优良的A2.104-130和A2.104-166两株菌株进行了酱油酿造实验。

#### 2.3.1 成曲的酶活力及曲料干重

检测制曲的主要酶活力及曲料干重,结果见表2。

表2 葡萄糖代谢抑制突变株酱油酿造制曲检测结果

Table 2 The enzyme activities of soy sauce koji fermented by glucose metabolism inhibition mutant

菌株	蛋白酶 /(U/g)	$\alpha$ -淀粉酶 /(U/g)	谷氨酰胺 酶/(U/g)	曲料干 重比/%
出发菌株	2130	370	3.3	100
A2.104-130	2554	360	4.1	115
A2.104-166	2200	370	4.5	133

如表2所示,葡萄糖代谢抑制株的 $\alpha$ -淀粉酶活力相差不大,蛋白酶和谷氨酰胺酶活力均有不同程度的提高。由于在三角瓶制曲中,突变株的碳水化合物的消耗率减少,我们设想成曲重量也会增加,因而对成曲干重进行了检测。以出发菌株为对照,假定出发菌株的曲料干重比为100%,突变株的成曲干重较出发菌株分别提高了15%和33%。

#### 2.3.2 发酵原油的理化指标

检测发酵原油主要理化指标,结果见图3。

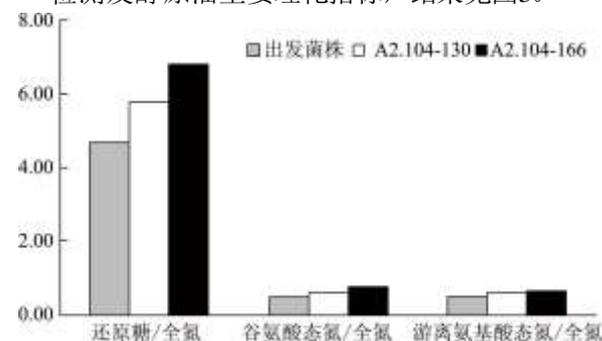


图3 葡萄糖代谢抑制突变株酿造酱油检测结果

Fig.3 Ratios of total sugar to total nitrogen, glutamate nitrogen to nitrogen and free amino nitrogen to total nitrogen of the source fermented by glucose metabolism inhibition mutant strains

如图3所示, A2.104-166菌株的还原糖/全氮较出发菌株提高45%左右, 谷氨酸、游离氨基酸方面, 均有明显提高。还原糖/全氮比较出发菌株明显提高的原因是制曲过程中碳水化合物的消耗量明显减少, 而蛋白酶和谷氨酰胺酶活力的提高更有助与大豆蛋白质的分解, 获得更多的谷氨酸等游离氨基酸以及多肽等呈味成分。

### 2.3.3 感官鉴定

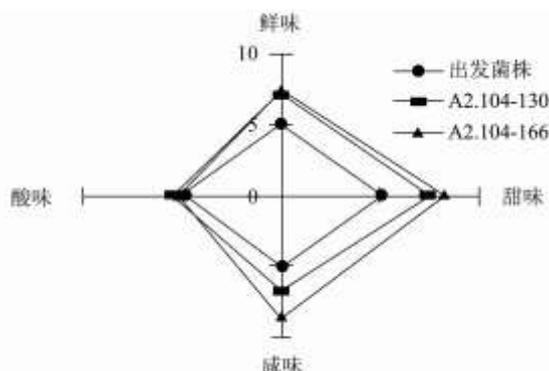


图4 葡萄糖代谢抑制突变株酿造酱油感官鉴定结果

Fig.4 The sensory evaluation of brewing soy sauce using glucose metabolism inhibition mutant strains

对发酵原液进行感官鉴定, 结果如图4。结果显示, 葡萄糖代谢抑制突变株的酿造酱油咸味减弱、甜味和鲜味增强, 酸味差别不明显。酱油的甜味主要来自糖类, 特别是葡萄糖、果糖等还原糖对酱油的甜味贡献很大。酱油中的鲜味主要是以谷氨酸为代表的氨基酸和肽类。从图3可以看出A2.104-166菌株酿造酱油的还原糖和谷氨酸、游离氨基酸都有明显的提高, 氨基酸或者肽的生成量增加会让酱油的咸味变得柔和, 这也是葡萄糖代谢抑制突变株酿造酱油的口感整体提升的原因。

## 3 结论

3.1 本研究通过选育葡萄糖代谢抗性突变株, 解除了葡萄糖代谢抑制, 获得碳水化合物消耗率减少的菌株, 同时提高要蛋白酶酶系(蛋白酶、谷氨酰胺酶)的生成。该菌株在发酵酱油中, 全糖/全氮、谷氨酸态氮/全氮、游离氨基酸态氮/全氮均得到了明显提高。感官鉴

评方面, 提高了鲜味和甜味, 降低了咸味。

3.2 酱油酿造过程是一个多酶系共同作用的过程, 通过选育葡萄糖代谢抑制菌株既可以促进某些酶的形成, 也就必定能够促进另一些酶甚至阻遏部分酶的分泌。日本研究者通过2-DG选育米曲霉葡萄糖代谢抑制菌种, 获得了淀粉酶提高、制曲中碳水化合物的消耗量减少的菌株, 而本研究获得的葡萄糖代谢抗性突变株虽然减少了碳水化合物消耗率, 但是没有提高淀粉酶, 而是提高了蛋白酶和谷氨酰胺酶的生成。造成葡萄糖代谢抑制株突变的机制目前还不是十分明确, 如果能够对葡萄糖代谢抑制株的促进机理进行深入研究, 其实用性将更加广泛, 也能够指导我们选择性调整发酵过程中的酶系组成和活力大小, 从而通过育种来实现发酵食品质量的进一步提高。

## 参考文献

- [1] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011
- [2] 张澎湃. 丙氨酸高产菌株的选育及其发酵条件的研究[D]. 石家庄: 河北大学, 2007
- [3] 高年发, 王庆昭, 杨枫. 2-脱氧葡萄糖抗性黑曲霉高产柠檬酸突变株的选育[J]. 天津轻工业学院学报, 2000, 4: 36-39
- [4] 曾莹, 杨明, 许跃龙. 2-脱氧葡萄糖抗性高产木聚糖酶突变株的选育[J]. 中国酿造, 2007, 1: 31-34
- [5] 管斌, 孙艳玲, 谢来苏, 等. 纤维素酶高产菌株的选育[J]. 中国酿造, 2002, 4: 18-21
- [6] 阿部薰太, 山崎達雄, 稻森和夫, 等. 麹菌のグルコース代謝抑制株の育種(第1報) アミノ酸代謝活性株の性質について[J]. 醬研, 2001, 6: 79-284.
- [7] 阿部薰太, 櫻井浩輔, 織茂良和, 等. 麹菌のグルコース代謝抑制株の育種[J]. 醬研, 2005, 2: 69-760
- [8] 周其洋, 孙娟, 赵丽云, 等. 双亲灭活电融合技术选育酱油生产菌株[J]. 中国酿造, 2011, 9: 72-75
- [9] 周其洋, 陶文沂. 米曲霉多酶系优良菌株的诱变选育[J]. 中国调味品, 2009, 9: 57-60
- [10] 陈亚光, 高朝辉, 陈勇, 等. 沪酿3.042米曲霉紫外诱变及高活力蛋白酶菌株选育[J]. 中国调味品, 2005, 3: 15-18