

传统阳江豆豉发酵过程中 米曲霉的筛选及发酵条件优化

曲直, 蒋爱民, 孙韵, 吴兰芳, 栗俊广

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 对从广东阳江豆豉的曲醅中筛选的米曲霉菌株进行培养基和发酵条件优化, 结果表明, 该菌产酶最适培养基的组成为添加3%的酵母粉、1%的葡萄糖、3%的硝酸钠和0.50%的氯化钙于基础PDA培养基中。该菌株产酶最优发酵条件为温度30℃, pH值为7~8, 250 mL三角瓶中装瓶量为120 mL。在此最优条件下进行生长曲线绘制, 培养12 h时, 开始出现白色菌落, 到36 h时, 白色菌丝体明显增多, 蛋白酶活力也持续增大, 菌株培养48 h时, 黄绿色孢子开始产生, 蛋白酶活力达到最大值, 到60 h时, 菌株增长明显减慢, 产生大量孢子, 颜色较深, 蛋白酶活力开始下降。综合菌量和蛋白酶活力, 培养48 h为最适发酵时间。

关键词: 豆豉; 米曲霉; 纯种发酵; 生长曲线

文章编号: 1673-9078(2013)2-301-305

Screening and Optimization of Fermentation Conditions of *Aspergillus oryzae* Isolated from Yangjiang Lobster Sauce

QU Zhi, JIANG Ai-min, SU Yun, WU Lan-fang, LI Jun-guang

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, China)

Abstract: The optimization of medium and fermentation conditions of *Aspergillus oryzae* were studied, which isolated from Guangdong yangjiang lobster sauce. The results showed that, the optimum medium contained 3% yeast powder, 1% glucose, 3% sodium nitrate and 0.50% calcium chloride in PDA. The optimal fermentation conditions was temperature 30℃ and pH value 7~8. After cultivated 12 h, the medium was appeared white colony. At 36 h, white mycelium noticeably increased, protease activity also continued to increase. After 48 h, yellow-green spores were produced, protease vitality at maximize level, and at 60 h, strain growth slowed significantly, creating a large number of spore, and protease activity began to decline. So 48 h was the optimum fermentation time.

Keywords: lobster sauce; *Aspergillus oryzae*; pure fermentation; growth curve

豆豉是利用微生物发酵的方法改变植物蛋白风味的大豆制品, 以独特的工艺、细腻的品质、丰富的营养及鲜香可口的风味深受广大群众的喜欢^[1-3]。按制曲微生物不同, 豆豉可分为霉菌型和细菌型等, 而霉菌型又分为毛霉型、根霉型和曲霉型^[4] (阳江豆豉主要是米曲霉)。李祥^[5]在细菌型豆豉生产的研究中发现参与细菌型豆豉发酵的微生物主要有豆豉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌和微球菌, 并且发现这些厌氧菌在发酵过程中产生多种蛋白酶, 使蛋白质分解为氨基酸。吴龙英^[6]利用 B1 (自己命名的一株菌) 作为前期发酵菌株生产的豆豉虽然口感突出, 提高了产品质量

收稿日期: 2012-10-10

基金项目: 广东省重大科技专项 (2011A020102001)

作者简介: 曲直 (1982-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 蒋爱民 (1957-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 畜禽产品加工与

质量安全控制

的稳定性, 解决了传统方法利用天然微生物发酵易产生酸败、硬芯、味苦涩等问题。

阳江豆豉尽管历史比较悠久, 但至今仍未摆脱传统的小作坊生产模式, 根本原因在于自然接种, 这种接种方式产品生产周期较长, 要形成产品特有风味的时间较长, 生产效率低^[7-8]。另外阳江豆豉的生产季节性很强, 据分析研究发现^[9-10], 豆豉生产很大一部分仍局限于冬春季, 即气温相对较低的季节。曲中微生物种类主要有根霉属、毛霉属、青霉属及多种细菌。各种微生物作为发酵剂使用的安全性及毒性有待进一步研究^[11]。自然发酵带来的是“质量安全难以控制”的问题, 所以对阳江豆豉纯种发酵的研究具有迫切性^[12]。本试验对阳江豆豉发酵起最主要作用的菌株米曲霉进行了研究, 通过有机碳源、无机碳源、无机氮源和钙盐的分析确定了最优的培养基, 并进一步对该菌发酵条件进行摸索, 本研究对米曲霉活菌制剂的生产

制备具有重大意义,同时对阳江豆豉的纯种发酵奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑豆,采自阳江;乳糖、蔗糖、葡萄糖、果糖,广州化学试剂厂;胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母膏、牛肉膏,广州化学试剂厂;磷酸氢二钠,广州化学试剂厂;磷酸二氢钠,广州化学试剂厂;三氯乙酸,天津化学试剂厂。

UV-1800 紫外可见分光光度计,岛津仪器有限公司;冷冻高速离心机 5804R,德国艾本德仪器公司;PL203 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的优化

1.2.1.1 不同的有机碳源的加入量

分别向PDA培养基中加入2%乳糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、麸皮作为不同碳源,以2%接种量接入菌种,30℃,180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.1.2 不同的有机氮源的加入量

分别向PDA培养基中加入豆粕、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母膏、牛肉膏,以2%接种量接入菌种,30℃,180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.1.3 不同的无机氮源的加入量

分别向PDA培养基中加入(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、NH₄Cl、KNO₃、NaNO₃,以2%接种量接入菌种,30℃,180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.1.4 不同的钙盐的加入量

分别向PDA培养基中加入CaCl₂、CaCO₃、CaSO₄作为不同钙盐,以2%接种量接入菌种,30℃,180 r/min培养24小时,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.2 发酵条件的优化

1.2.2.1 发酵温度对产酶的影响

将2%接种量接种到5瓶最适培养基,再分别放到20℃、25℃、30℃、35℃、40℃的环境培养,以180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.2.2 培养基起始pH对产酶的影响

以磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液溶液调节成pH

分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的PDA培养基,以2%接种量接入菌种,30℃,180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.2.3 三角瓶装料量对产酶的影响

在6个250 mL的三角瓶中分别装有100 mL、110 mL、120 mL、130 mL、140 mL、150 mL的PDA培养基,以2%接种量接入菌种,30℃,180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.2.4 接种量对产酶的影响

配制5瓶最适培养基,以0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%的接种量分别接入菌种,以30℃,180 r/min培养24 h,测其蛋白酶活力,以空白样的无菌PDA培养基作为对照。

1.2.3 菌株的生长曲线

以2%接种量向10瓶优化后的培养基接入菌种,接种后每3 h取出2瓶菌液,一瓶测其蛋白酶活力,另一瓶测其菌量,于660 nm处测其OD值,制作生长曲线。

1.2.4 蛋白酶活力

在40℃下每分钟水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸,定义为1个蛋白酶活力单位。

样品蛋白酶活力单位U(湿基)=(A*4*N)/10

注:A-由样品测得OD值,查标准曲线得相当的酪氨酸微克数(或OD值×K);4-4毫升反应液取出1 mL测定(即4倍);N-酶液稀释的倍数;10-反应10 min。

1.2.5 数据的处理

SPSS 11.5、Excel 分析数据。

2 结果与讨论

2.1 培养基的优化

2.1.1 有机碳源对菌株*Aspergillus oryzae*产酶的影响

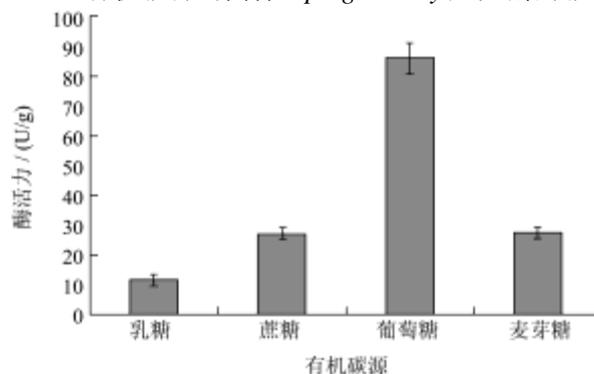


图1 不同的有机碳源对产酶的影响

Fig.1 Effects of different organic carbon on enzyme production

碳源是微生物的细胞物质和微生物生长最基本的营养物质。能够作为微生物碳源的物质很多,对于大多数微生物来说,糖类是最好的碳源,实验室中进行

一般的微生物培养和研究时，常用葡萄糖、蔗糖和乳糖等作为碳源物质。分别向基础发酵培养基 PDA 培养基中加入不同种类有机碳源，2%乳糖、蔗糖、葡萄糖、果糖作为不同碳源，以 2% 接种量接入菌种，30 °C，180 r/min 培养 24 h，以蛋白酶的发酵酶活为考察指标，结果如图 1。添加葡萄糖作为有机碳源效果最好，其培养出的菌种蛋白酶活的活力最高。因为葡萄糖作为单糖可直接被菌种吸收利用，无需再经过转换水解的过程。本实验所提供的几种碳源，菌株均可生长良好并可产生蛋白酶，说明菌株 *Aspergillus oryzae* 对碳源的利用广泛。

2.1.2 有机氮源对菌株 *Aspergillus oryzae* 产酶的影响

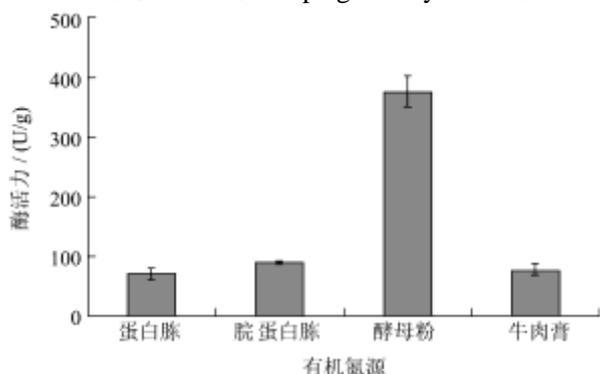


图 2 不同的有机氮源对产酶的影响

Fig.2 Effects of different organic nitrogen on enzyme production

常用的氮源有无机氮和有机氮两大类。分别向 PDA 培养基中加入有机氮源蛋白胨、脲蛋白胨、酵母粉、牛肉膏，以 2% 接种量接入菌种，30 °C，180 r/min 培养 24 h，以蛋白酶酶活为考察指标。结果表明酵母粉对产酶有较明显的促进作用，蛋白胨、脲蛋白胨和牛肉膏的作用则不太明显（图2）。值得注意的是，过多的有机氮源对产酶反而不利，这主要是由于菌株生长和产酶需要一个适宜的碳氮比（C/N），有机氮源浓度过高容易使培养基结块成团，影响培养基的利用率，块状培养基中部的溶氧不足，反而造成产酶下降。

2.1.3 无机氮源对菌株 *Aspergillus oryzae* 产酶的影响

氮是组成微生物细胞的第二大要素，它主要用来合成微生物细胞物质和含氮代谢产物。不同微生物能利用不同的氮源。除了固氮微生物能利用大气中的分子氮外，其它微生物的生长都需要添加化合态的含氮物质为氮源。分别向 PDA 培养基中加入硫酸铵、过硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠，以 2% 接种量接入菌种，30 °C，180 r/min 培养 24 h，以蛋白酶发酵酶活为考察指标。结果表明，四者对产酶均有促进作用，以硝酸钠对产酶有较明显的促进作用，较为有优势(图 3)。

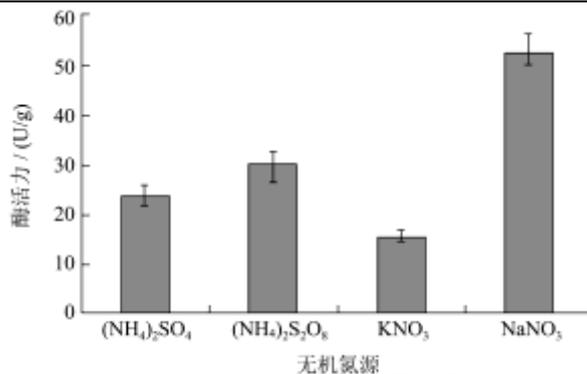


图 3 不同的无机氮源对产酶的影响

Fig.3 Effects of different inorganic nitrogen on enzyme production

2.1.4 钙盐对菌株 *Aspergillus oryzae* 产酶的影响

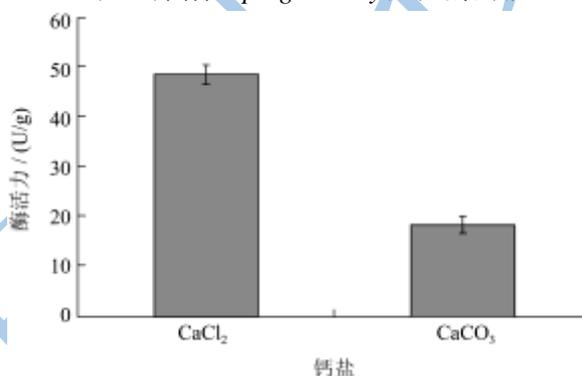


图 4 不同的钙盐对产酶的影响

Fig.4 Effects of different calcium salt on enzyme production

微生物生长繁殖和代谢产物的合成都需要钙盐，不同钙盐对不同的菌株生长产生不同的影响，有些促进生长，而有一些则对其起抑制作用。分别向PDA培养基中加入CaCl₂、CaCO₃作为不同钙盐，以2%接种量接入菌种，30 °C，180 r/min培养24 h。结果表明，两者均对产酶有促进作用，其中添加氯化钙使蛋白酶的酶活更高（图4）。这是因为钙离子对酶来说，是十分重要的稳定剂，添加含钙离子的溶液有助于酶的胞外分泌。

2.1.5 培养基组成的正交实验设计

表 1 培养基正交试验各因素和水平

水平	因素			
	A (酵母/%)	B (葡萄糖/%)	C (NaNO ₃ /%)	D (CaCl ₂ /%)
1	1	1	1	0.4
2	2	2	2	0.5
3	3	3	3	0.6

根据单因素搜索的试验结果，我们选择酵母、葡萄糖、硝酸钠和氯化钙进行4因素3水平的正交试验，以蛋白酶的发酵酶活作为实验分析的指标。试验因素

和水平见表1, 试验结果和极差分析见表2, 方差分析见表3。从表2的极差分析可知, 最适的培养基为: 酵母3%、葡萄糖1%、硝酸钠3%和氯化钙0.50%。从表3的方差分析可知, 酵母、葡萄糖、硝酸钠和氯化钙四者对发酵酶活在本试验中影响不显著。结果表明菌 *Aspergillus oryzae* 在最适培养基中蛋白酶发酵酶活力可达2735 U/g。最适培养基确立后, 我们在250 mL 三角瓶中进行固体发酵培养, 连续72 h, 测定菌 *Aspergillus oryzae* 的生长曲线。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 培养温度对菌 *Aspergillus oryzae* 产酶的影响

将2%接种量接种到5瓶最适培养基, 再分别放到 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 的环境培养, 以180 r/min 培养24 h, 于660 nm 测吸光度。实验结果表明, 菌 *Aspergillus oryzae* 的最佳培养温度在30 °C, 酶活可达158.3765 U/g (图5)。其它温度培养下, 酶活则相对较低。

表2 培养基正交试验结果的极差分析和方差分析

Table 2 Extreme value analysis and variance analysis of orthogonal experiment

序号	A	B	C	D	OD 值	K/($\mu\text{g/mL}$)	U/(U/g)
1	1	1	1	1	0.507	50.949	309.975
2	1	2	2	2	0.576	57.845	399.823
3	1	3	3	3	0.695	69.737	581.607
4	2	1	2	3	1.138	114.008	1556.896
5	2	2	3	1	1.011	101.316	1229.172
6	2	3	1	2	0.609	61.143	446.83
7	3	1	3	2	1.509	151.084	2735.831
8	3	2	1	3	0.869	87.126	908.547
9	3	3	2	1	0.998	100.017	1197.808

K1	430.468	1534.234	555.117	912.318			
K2	1077.633	845.847	1051.509	1194.161		$A_3B_1C_3D_2$	
K3	1614.062	742.082	1515.537	1015.683			
R	1183.594	792.152	960.42	281.843		$R_A > R_D > R_C > R_B$	

偏差平方和	2107472.072	1112148.836	1384131.658	121974.196		$F_{0.05}=4.46$	
方差	1053736.036	556074.418	692065.829	60987.098		$F_{0.01}=8.65$	
自由度	2	2	2	2			
F	1.784	0.941	1.172	0.103			

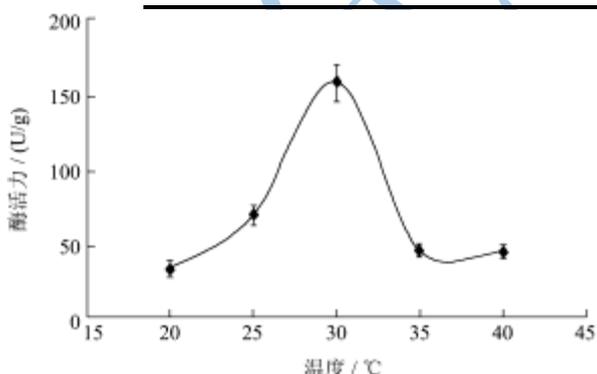


图5 不同培养温度对产酶的影响

Fig.5 Effects of different temperature on enzyme production

2.2.2 培养基起始 pH 对菌 *Aspergillus oryzae* 产酶的影响

以磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液溶液调节成 pH 分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的PDA培养基, 以2%接种量接入菌种, 30 °C, 180r/min 培养24 h, 于660 nm

测吸光度。实验结果表明, 菌株 *Aspergillus oryzae* 的最适 pH 为7~8 (图6)。

2.2.3 装料量对菌 *Aspergillus oryzae* 产酶的影响

在6个250 mL的三角瓶中分别装有100 mL、110 mL、120 mL、130 mL、140 mL、150 mL的PDA培养基, 以2%接种量接入菌种, 30 °C, 180r/min培养24 h, 以蛋白酶活为考察指标, 于660 nm测吸光度。结果见图7, 当培养基的装料量为120 mL时, 菌株 *Aspergillus oryzae* 的产酶活最高43.93 U/g。

2.3 菌种的生长曲线的优化

使用最适培养基组成, 接种量、培养基起始pH和三角瓶装料量均采用最适量, 进行固体发酵培养72 h, 每隔12 h取样测定蛋白酶活、从而得到菌株11604的发酵周期曲线, 如图8所示。试验中可见, 在培养12 h时, 三角瓶瓶壁即可看见零星白色菌落, 此时菌株的蛋白酶活有少量增加; 培养到24 h~36 h时, 三角瓶瓶壁可

看见一圈较细窄的白色的菌丝，产酶活性继续增加，且有保持一段平稳；在48 h~60 h之间，三角瓶瓶壁白色较细窄的白色菌圈颜色深化成米黄色，且圈带变宽变厚，酶活性到达最高状态；60 h~72 h三角瓶的菌株增长量不太明显，颜色较之前深色，酶活性开始有所下降。综合考虑发酵时间及酶活水平，选定40 h~50 h为最适发酵时间。

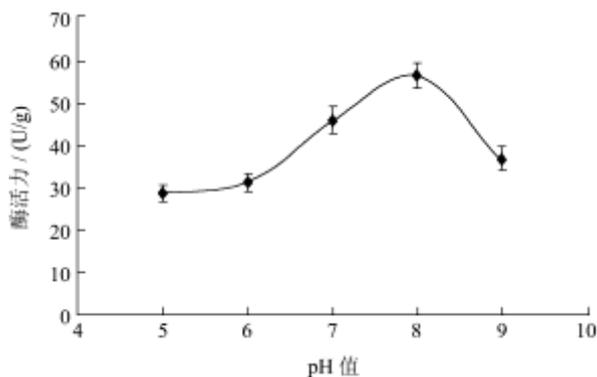


图 6 不同起始 pH 对产酶的影响

Fig.6 Effects of different initial pH on enzyme production

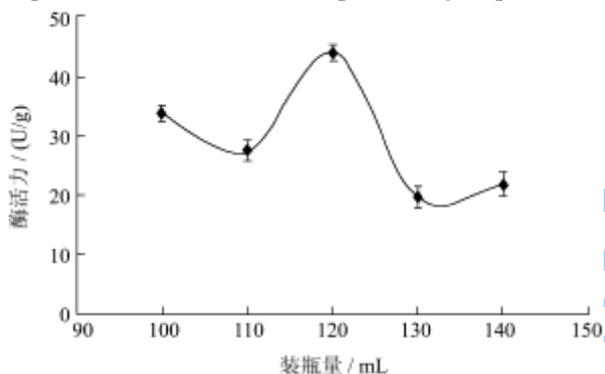


图 7 不同三角瓶装料量对产酶的影响

Fig.7 Effects of amount of culture medium on enzyme production

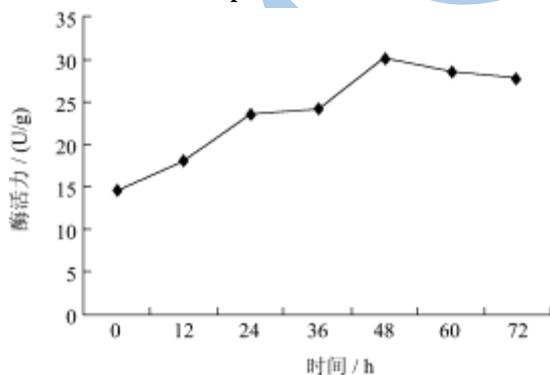


图 8 *Aspergillus oryzae* 发酵下的酶活力

Fig.8 Enzyme production period of *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae 发酵工艺的研究中，以蛋白酶活力为参考指标，采用单因素搜索和正交试验对固体发酵工艺进行优化，结果表明 *Aspergillus oryzae* 适宜在高碳低氮的培养基中生长，适量的有机氮源对产酶有明显的促进作用，这主要是因为有机氮源除了富含生长因子外，还能提供诱导物，对蛋白酶的产生有诱导效应。研究发现，*Aspergillus oryzae* 的发酵培养基基本上可以分为两个阶段：第一个阶段为生长培养期（0~24 h），在这个阶段里菌丝大量形成，但基本上不产酶；第二阶段为产孢泌酶期（24~60 h），这个时期里孢子大量形成，而且产酶量随时间的延长而增加。通过对主要营养要素与环境条件的优化，初步确定了该菌的产酶最适培养基的组成为：酵母 3%、葡萄糖 1%、硝酸钠 3% 和氯化钙 0.50%。

参考文献

- [1] 田秀红,孙丽慧,闰峰.大豆的功能性及保健食品开发[J].中国酿造,2008,10:72-74.
- [2] 鄯晋晓,盛占武,蒋和体.细菌型豆豉的研究现状及发展前景[J].中国酿造,2007,31:14
- [3] 赵德安.中国豆豉[J].中国酿造,2003,4:36-40
- [4] 黄欣,邓放明.豆豉的研究进展[J].中国食物与营养, 2006, 11:20-22
- [5] 李祥.细菌型豆豉生产的研究[J].中国调味品,1999,10:14-17
- [6] 吴龙英.产酱香芽孢杆菌在豆豉发酵上的应用[J].山地农业生物学报,2000,19(3):237-238
- [7] 杨勇,詹永,李征,等.快速发酵豆豉关键技术及问题讨论[J].现代食品科技,2008,24(8):819-821
- [8] Ashenafi B.,BusseM. Growth of *Bacillus cereus* in fermenting tempeh made from various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum* [J].Applied Bacteriology,1991, 70:329-333
- [9] Fukushima D. Fermented vegetable (soybean) Protein and related foods of Japan and China [J]. Modern Food Chemistry Tokyo, 1985, 2: 18-228
- [10] 赵德安.纯种发酵,混合发酵与传统发酵食品[J].中国调味品,2010,22(9):15-17
- [11] KrugerJ E. Change in the levels of Proteolytic enzymes from Hard Spring wheat during Growth and Maturation [J]. Agricultural Biology, 1973, 1: 122-131
- [12] 张兴茂,吴晖,赖富饶.酱油渣蛋白水解产物抗氧化性研究[J].现代食品科技,2011,27(10):1200-1204

3 结论