

米曲霉菌在酿酒工业中的研究进展

赵中开, 龙可, 马莹莹, 杨建刚

(四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000)

摘要: 米曲霉是一种好氧型真菌, 属半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、从梗孢科、曲霉属, 是美国FDA公布的40多种安全微生物菌种之一, 在食品酿造行业中有着极其重要的应用。米曲霉具有酶系丰富, 产酶活性高, 生长速度快, 适应能力强, 不产毒素, 易于管理等特点, 是酒曲微生物的重要组成部分, 广泛存在于各种酒曲中。本文主要对米曲霉的培养及产酶特性、在酿酒制曲中的应用以及菌种选育三个方面作了介绍, 其中对米曲霉在酿酒制曲中的应用这一部分作了重点介绍。

关键词: 米曲霉; 产酶特性; 制曲; 菌种选育

文章篇号: 1673-9078(2013)4-932-935

Research Progress of *Aspergillus oryzae* in Liquor-making Industry

ZHAO Zhong-kai, LONG Ke, MA Ying-ying, YANG Jian-gang

(Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: *Aspergillus oryzae* is a kind of aerobic type fungi. The taxonomic status of the *Aspergillus oryzae* is *deuteromycotina*, *hyphomycetes*, *moniliales*, *moniliaceae* and *aspergillus*. It is one of 40 safe microbial strains that American FDA had published, and has extremely important application in food brewing industry. *Aspergillus oryzae* is characterized by abundant enzyme systems, high active of enzyme production, fast growth, high adaptability, not producing toxin, being easy to manage and so on. It was a very important microbiology for liquor-making and widely consists in all kinds of liqueur starters. This article mainly introduces the cultivation, enzyme-producing characteristics, the application in liquor-making, and strain breeding of *Aspergillus oryzae*.

Key words: *Aspergillus oryzae*; enzyme production characteristics; qu-making; strain breeding

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 是一种好氧型真菌, 属半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)、丝孢纲 (*Hyphomycetes*)、丝孢目 (*Hyphomycetes*)、从梗孢科 (*Moniliaceae*)、曲霉属 (*Aspergillus*)。最适培养温度 35~37 °C, 菌落质地疏松, 初为白色, 产孢子后变为黄绿色 (有报道指出米曲霉菌落在酸度较大的培养基上呈绿色, 在酸度较小的培养基上呈黄色^[1]), 老化后变为褐色至淡绿褐色。但也有报道发现^[2], 米曲霉的孢子颜色并不全都为黄绿色, 在日本烧酒的酿造过程中, 使用的就是产黑色或白色孢子的米曲霉。米曲霉的分生孢子梗生长在厚壁的足细胞上, 分生孢子头放射状, 也有少数为疏松柱状。顶囊近似球形或烧瓶形, 小梗一般为单层, 偶尔有双层, 也有单、双层小梗同时存在于一个顶囊上的。分生孢子幼时洋梨形或卵圆形, 成熟后大多变为球形或近球形, 表面粗糙或近于光滑。米曲霉的菌丝由多细胞组成, 是一类产复合酶的菌株, 除产淀粉酶外, 还可产蛋白酶、纤维素酶、

植酸酶等。在淀粉酶的作用下, 将原料中的直链、支链淀粉降解为糊精及各种低分子糖类, 如麦芽糖、葡萄糖等; 在蛋白酶的作用下, 将不易消化的大分子蛋白质降解为蛋白胨、多肽及各种氨基酸, 而且可以使辅料中粗纤维、植酸等难吸收的物质降解, 提高营养价值、保健功效和消化率, 广泛应用于各种发酵工业。

1 米曲霉产酶特性

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*), 是美国FDA公布的40多种安全微生物菌种之一^[3], 是食品酿造中的常用菌株, 它不仅产酶种类多, 而且酶活高, 在食品酿造工业中发挥着巨大的作用。

1.1 米曲霉产淀粉酶特性

淀粉酶是指能将淀粉水解成各种低分子糖的酶的总称, 是一种应用极广的酶类。米曲霉具有很强的产淀粉酶的能力, 可以高效的利用淀粉质原料, 是酒曲微生物的重要组成部分, 众多科技工作者都对此进行了广泛而深入的研究。王璐^[4]等从绍兴黄酒麦曲中分离出产 α -淀粉酶的菌株, 利用分子鉴定手段确定其为米曲霉。采用离子交换色谱与凝胶过滤色谱, 分别对绍兴黄酒麦曲中的 α -淀粉酶和利用米曲霉固体培养生

收稿日期: 2012-10-17

基金项目: 四川理工学院基金 (2011RC01)

作者简介: 赵中开 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向发酵工程。

通讯作者: 杨建刚

产的 α -淀粉酶进行了纯化,并对其基本酶学性质进行了研究,研究结果二者基本一致。由此,可以推断麦曲中的 α -淀粉酶主要由米曲霉产生。刘晓蓉^[5]等对米曲霉1228产 α -淀粉酶的特性及部分酶学性质的研究结果表明,在初始pH=6.6的条件下,采取3%的接种量,31℃培养108h,所产淀粉酶的酶活最高。该酶的最适作用温度为55℃,最适pH为5.0,Ca²⁺对酶有激活作用,Fe²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺、Ba²⁺和Cu²⁺对其有不同程度的抑制。

1.2 米曲霉产蛋白酶特性

米曲霉产生的蛋白酶包括中性蛋白酶、酸性蛋白酶和碱性蛋白酶,其酶活力的高低将直接影响原料的利用率及产品品质,因此,大量的研究都是围绕如何提高其蛋白酶活力而开展的。刘志伟^[6]等以豆瓣酱中分离的米曲霉为出发菌株,研究了该米曲霉产蛋白酶的分布及最佳培养温度、时间、pH值等,优化了米曲霉最佳培养基的组成,使蛋白酶活力比优化前提高了22.98%。夏克胜^[7]等以马氏珍珠贝为米曲霉制曲原料,蛋白酶活力为指标,研究了珍珠贝蒸煮条件、曲料碳源,曲料初始水分含量、培养温度、培养时间对成曲中性和酸性蛋白酶活力的影响。该实验得到的最优制曲条件为:珍珠贝肉121℃蒸煮10min、曲料初始水分51.89%(m/m),曲精接种量0.5%(m/m)、培养温度32℃、培养时间46h、珍珠贝肉:面粉=3:1(m/m)。在此条件下,珍珠贝肉成曲的中性蛋白酶活力可达1494U/g。传统米曲霉菌株普遍具有产中性蛋白酶和酸性蛋白酶的能力较强而产酸性蛋白酶的能力偏弱的现象,针对此缺点,邓静^[8]等利用原生质体诱变技术对高产酸性蛋白酶的米曲霉菌株进行选育,最终筛选出1株高产酸性蛋白酶的菌株C₂,其产酸性蛋白酶活力是原始菌株的135%。

1.3 米曲霉产脂肪酶特性

米曲霉具有一定的合成脂肪酶的能力,脂肪酶能够催化酯合成反应、转酯化反应、酸解反应等反应,对酒中的主要香气成分-酯类的形成具有重要影响。同时,脂肪酶还具有只改变反应的动力学平衡而不改变热力学平衡及催化作用的特点,恰好能够在短时间内促使酒体中酯、酸、醇达到相对的平衡,达到催陈作用^[9]。王小花^[10]等对米曲霉(*Aspergillus oryzae* CCUG33812)产胞外脂肪酶的培养条件进行了优化,筛选出麦芽糖为最佳碳源,蛋白胨为最佳氮源,平平加O为最佳的表面活性剂。该菌株产脂肪酶的最适培养条件为:麦芽糖0.5%,蛋白胨0.5%,橄榄油1.0%,平平加O 0.032%,发酵液初始pH值为6。

2 米曲霉在酿酒制曲中的应用

中国黄酒和日本清酒不同于法国的葡萄酒和德国的啤酒,属于用曲霉作糖化剂发酵的酿造酒。自古以来东方酿酒就有“欲酿酒,必先制曲”的说法,绍兴酒酿造中把曲形象地称之为“酒之骨”,可见曲对酒质具有极重要的作用。

曲的作用主要有三个方面:一是为酒母和醪液提供酶源,使原料中的淀粉、蛋白质和脂肪等溶出和分解;二是在曲菌繁殖和产酶的同时,产生葡萄糖、氨基酸、维生素等成分,这是酵母的营养来源,并生成有机酸、高级醇及酯类等成分;三是曲香及曲的其他成分,作为酒的前体物质赋予酒以独特的风味^[11]。

2.1 制黄酒曲

黄酒是中国的三大酒之一,“以麦制曲,用曲酿酒”是中国黄酒的特色,也是我国黄酒酿造工艺中的一项传统操作技艺。

2.1.1 混合种黄酒曲

大部分的黄酒企业目前仍采用“踏曲”的方式制作传统麦曲,麦曲中的微生物来自环境、空气、制曲用水、制曲工具以及小麦原料等,曲的质量受到诸多因素影响,而麦曲中的微生物群落也变得极其复杂。麦曲在传统黄酒的酿造过程中既作为糖化发酵剂,又作为少量酿酒原料和营养物质保留在黄酒中,同时麦曲作为一种集生香、增味、成色等诸多功能的复合生化酶制剂是传统浓醪液态发酵黄酒的重要物质保障。因此千百年来酿酒先辈们从实践中总结出了“曲乃酒之骨”和“好曲出好酒”的精辟论断^[12]。

2.1.2 纯种黄酒曲

现在的黄酒企业大都还在采用传统的手工酿造生产方式,相比较机械化的生产方式而言,效率低,成本高、缺乏市场竞争力。而现如今的黄酒行业就已经遇到了这样的困境,若要摆脱现状,使黄酒行业走上健康快速发展道路,就必须勇于改革,引入先进的生产方式,大力推行机械化黄酒生产模式。米曲霉不仅具有很强的产酶的能力,而且它还对原料具有很好的适应性,在生料和熟料基质上都能够良好的生长。这不但可以利用米曲霉进行熟料制曲,而且还为黄酒的机械化生产奠定了一定的理论基础。高永强^[13]等对机械化黄酒中爆麦曲的制备进行了研究,以米曲霉作为唯一菌种,采用纯种通风培养法生产爆麦曲。控制科学便利,质量稳定,酶活力高,其糖化力可达2000mg葡萄糖/g.h,符合机械化黄酒酿造要求,酿制的机械化黄酒发酵正常。但不足之处是不能像自然培养的生麦曲那样,赋予黄酒独有的香、醇、爽、鲜的独有风格,因此尚需进一步研究和不断完善。毛青钟^[14]等研究了用米曲霉菌制黄酒生麦曲,制成的纯种生麦曲

比原生麦曲糖化力和液化力大大提高,实验室酿酒试验与原生麦曲接近,其实验结果证明用米曲霉菌制纯种黄酒生麦曲是可行的。

黄酒行业纯粹培养麦曲普遍以米曲霉苏-16作糖化菌种。苏-16是从自然培养麦曲中筛选出的优良菌株,用该菌种制成的麦曲来酿造黄酒,有原有黄酒的风味特色,因而黄酒行业普遍使用。胡志明^[15]等以自然培养的生麦曲为原料,经筛选得糖化菌(米曲霉)SJM-1、SJM-2、SJM-3和SJM-4,经与苏-16试验比较,糖化力和液化力较高(糖化力最高达1262.7 mg葡萄糖/g·h)。制曲产酒试验结果显示,酒质明显改善,是黄酒生产的优良糖化菌株。高永强^[16]等也对保存的黄酒糖化菌进行分离、纯化和筛选,并与原始菌种同时制备麸曲和麦曲,并对二者的糖化力和液化力进行测定和比较。检验结果表明:筛选后的菌株糖化力和液化力均高于原始菌株。

2.2 制清酒曲

制曲是清酒酿造的主要环节,日本历来就有一曲二酒母三酿造的说法。清酒曲是以粳米为原料,以米曲霉为菌种,采用纯种培养的方法而制成的酒曲。周立平^[17]等对日本米曲霉菌株特性及通风制曲工艺进行了研究,将3株日本米曲霉及5株中国米曲霉菌种进行理化性质比较,优选出1株日本菌株进行实验,结果表明:

(1) 日本米曲的培养周期较短,一般48 h内即成曲。出曲时间可通过检测总酸变化,在总酸消长曲线达高值后15 h左右即可;

(2) 培养温度为32~36℃,不能波动太大;

(3) 当菌株糖化力与液化力同时达到高峰时,对制曲非常有利。该工艺经过通风制曲生产,其糖化力可达1200 U/g·h所酿的酒符合成品酒质量。

于军^[18]对青稞清酒酿造工艺进行了研究,在醱酒和甜醅的酿造基础上,借鉴清酒和喂饭黄酒的酿造原理,选用青藏高原品质优良的青稞为原料,以米曲霉2146或3800为糖化菌,清酒酵母(*sake yeast*)1296为发酵菌株,采用“一次酒母,适时添曲,分次喂饭,高浓配料,多边发酵”的生产工艺,以酸、甜、苦、涩、辣5种口味均衡调和为特色,酒液透明,酸甜爽口,醇厚优雅,酒精度在12~16% vol之间。李健^[19]等采用粳米碎米为原料,以米曲霉为糖化剂,接种清酒酵母,应用液态发酵法,并结合现代清酒酿造新技术,开发研制生产碎米清酒。结果表明,碎米清酒的出酒率高、澄清透明、淡黄色、酒体协调无异味,氨基酸总含量为1.144%,共含有26种香气成分,各项指标完全能够达到日本清酒的标准。

2.3 制米酒曲

米酒是一种以糯米为主要原料,配合酒曲和水酿造而成的酒饮料。其酒精度为3~14% vol,含有丰富的葡萄糖、氨基酸、维生素、有机酸、多糖等,色泽清透,香气淡雅,可谓老少皆宜的滋补型饮品^[20]。米酒是混合菌发酵,其质量和风味的好坏取决于甜酒曲中微生物的群落组成及各菌种之间的代谢关系,代谢产物与产品的比例关系等。李贵凡^[21]等以优质糯米为主要原料,采用米曲霉和米根霉(*Rhizopus oryzae*)纯种制曲、发酵罐复式发酵的方法酿造米酒。该酒配方总质量比率为350%。全部粮食出酒率[按14%(V/V)成品酒计]平均达332%,酒质清亮透明,色泽微黄,三香(醇香、米香、芳香)融合,优雅细腻,醇和干爽,圆润丰满,酒体协调,具有独特的米酒风格。郝莹^[22]等对陕北传统米酒酒曲中的微生物进行分离、纯化、鉴定,在分离得到的17种优势菌株中就包括米曲霉,其液化酶和糖化酶活力分别可达到701 U/g、2538 U/g,是生产米酒的理想菌株。

2.4 在其他酒曲中的应用

米曲霉具有酶系丰富,产酶活性高,生长快,适应能力强,不产毒素等特点,因而广泛应用于食品生产中。刘洪伟^[23]对贵州茅台酒酒曲中5株真菌进行了分离、纯化。通过观察菌落形态与个体形态,参照Klich M A, Reper K B和张纪忠的方法对5株真菌进行了鉴定,其中就有米曲霉。王克明^[24]以根霉:酿酒酵母:产香酵母:米曲霉为4:2:2:1配比制备多菌种共固定化细胞粒子,以10%的共固定化细胞粒子的接种量,在25℃的条件下发酵生产米酒,共重复发酵30批次,其发酵产酒、产酸、产酯及还原糖的生成量均表现比较稳定,而且30批次发酵的米酒均保持良好风味和口感,菌种共固定化细胞粒子未见破损,机械强度较好,同时未发现有杂菌污染。产酒为10%(V/V),制得米酒酒体丰满,香气丰富,是一种低度保健的米酒,证明采用根霉、酿酒酵母、产香酵母、米曲霉多菌以一定比例混合固定化细胞液态发酵低酒度米酒是可行的。

3 米曲霉菌种的选育

酒曲在酒的酿制过程中发挥着至关重要的作用,而性能优良的微生物是生产优质酒曲的前提,所以,菌种选育的工作历来都受到国内外科研人员的高度重视。1971年, Meyrath, J.Bahn^[25]等经过对米曲霉菌株的诱变得到了高产淀粉酶的菌株。Biesebeke^[26]等对米曲霉进行诱变育种,结果表明,突变后菌株产淀粉酶活力提高50%,葡萄糖化酶活力提高近100%,蛋白酶活力提高90%。日本研究人员历经四年零四个月时间成功的破译

了米曲霉基因组,并于2005年12月在《自然》杂志上发表了分析结果^[27],这一成果为从微观领域研究米曲霉打下了一个良好的基础。我国开展这项育种工作已有50多年的时间了,许多研究机构在这方面都做了大量的工作,并取得了可喜的成绩。目前国内大部分酿造厂一直沿用至今的沪酿3.042米曲霉是林祖申先生在20世纪60年代用紫外线诱变和高蛋白质驯养选育出的,该菌株具有生长快、孢子多,制曲管理容易等优点,颇受生产单位欢迎^[28]。在近十年的时间里,新的育种方法不断被尝试和使用,米曲霉的诱变育种工作也取得了显著成绩。邓静^[29]等以去壁米曲霉孢子为诱变对象,采用Lic12微波、DES2超声波复合诱变,最终选出1株高产酸性蛋白酶的菌株C₂,其产酸性蛋白酶活力是原始菌株的135.0%。唐洁^[30]等采用原生质体融合的方法对米曲霉CICC2339和米曲霉AS3.951菌株的原生质体分别进行了微波和紫外灭活,然后在融合剂的作用下对灭活双亲进行融合,筛选出3株生长速度快且蛋白酶活力高的融合株。廖晓霞^[31]等以实验室保藏的一株米曲霉3042为原始出发株,经自然筛选、紫外线诱变,选育出一株米曲霉U180-26,并进一步研究了其粗酶液酶学性质。结果表明,米曲霉U180-26的产酶能力是原始未紫外线诱变的出发株(119 U/mL)的4.1倍,在未经优化的液态发酵条件下,发酵液 β -甘露聚糖酶酶活力达489 U/mL,其遗传性状稳定,粗酶液在pH 6、50℃时酶活最高,在30~55℃有良好的热稳定性,Al³⁺、Ba²⁺对该酶有一定的促进作用,Ca²⁺、Cu²⁺对该酶有抑制作用。随着基因技术的飞速发展,人们开始利用基因工程技术进行菌株改造,X. F. Zheng^[32]等通过构建一株由反义RNA表达而低产丝氨酸羧肽酶的米曲霉突变株,实现了高产多种蛋白酶的愿望。

4 结论

4.1 米曲霉具有酶系丰富,产酶活性高,生长速度快,适应能力强,不产毒素,易于管理等特点,是酒曲微生物的重要组成部分,广泛存在于各种酒曲中。

4.2 目前,大多数的酿酒企业仍然在使用传统的酿造工艺,不仅质量不稳定,而且生产成本低,产品价格贵,市场竞争力不强。有一些黄酒企业现在已经开始尝试走“纯种发酵,机械化生产”的道路,这或许是解决目前所面临问题的一条途径。

4.3 制曲是酿酒过程中的一道重要工序,曲的质量在某种程度上决定了酒的质量,而性能优良的微生物菌种是制备优质酒曲的根本保障。因此,在酿酒行业中选育出优良的微生物菌株就显得尤为重要。特别是近年来基因工程技术的不断成熟和使用,为米曲霉的育

种工作提供了更多的新方法和新思路。

参考文献

- [1] 刘丽萍,丽华.曲霉研究进展与应用[J].国调味品,2008,4:28-2
- [2] Taiki Futagami, Kazuki Mori, Ayaka Yamashita, et al. Genome Sequence of the White Koji Mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, Used for Brewing the Japanese Distilled Spirit Shochu [J]. Eukaryot Cell. 2011, 10(11): 1586-1587
- [3] 张恒成.生料发酵法酿造液体醋工艺应用试验报告[J].中国酿造,1990,8(29):40-43
- [4] 王璐,曹钰,陆健,等.绍兴黄酒麦曲中 α -淀粉酶的初步研究[J].中国酿造,2007,5:38-40
- [5] 刘晓蓉,连晓蔚,朱美娟.米曲霉1228产 α -淀粉酶特性的研究[J].中国调味品,2009,4:36-38
- [6] 刘志伟,谭兴和,周红丽,等.米曲霉产中性蛋白酶条件[J].中国酿造,2011,11:103-106
- [7] 夏克胜,赵谋明,崔春,等.马氏珍珠贝肉固体发酵制曲条件的优化[J].现代食品科技,2011,12:1472-1475
- [8] 邓静,徐静,吴华昌,等.米曲霉高产酸性蛋白酶菌株的选育[J].中国调味品,2010,1:53-59
- [9] 吴华昌,由耀辉,卢中明.脂肪酶催陈白酒应用条件对微量成分影响的研究[J].酿酒科技,2011,9:23-28
- [10] 王小花,洪枫,朱利民,等.米曲霉产胞外脂肪酶培养条件的优化[J].食品与发酵工业,2005,4:25-28
- [11] 周立平,孙佰申,陈旭峰.酿酒用米曲霉若干菌株的培养特性研究[J].酿酒科技,2004,3:30-32
- [12] 汪健国.传统麦曲在黄酒酿造中的作用和特色[J].中国酿造,2004,10(139):29-31
- [13] 高永强,陈细丹.机械化黄酒中爆麦曲的制备与测定[J].酿酒,2009,5:67-68
- [14] 毛青钟,鲁瑞刚,陈宝良.用米曲霉菌制黄酒生麦曲[C].2006年第六届国际酒文化学术研讨会论文集
- [15] 胡志明,丁美珍,谢广发.黄酒糖化菌的筛选[J].酿酒科技,2003,3:39-40
- [16] 高永强,边佳娜.黄酒糖化菌的培养研究[J].江苏调味副食品,2009,6:35-37
- [17] 周立平,陈旭峰,孙佰申.日本米曲霉菌株特性及通风制曲工艺[J].酿酒科技,2004,4:23-26
- [18] 于军.青稞清酒酿造工艺研究[J].酿酒科技,2011,9:35-37
- [19] 李健,刘丹,张若男,等.粳米碎米清酒的工艺研究[J].酿酒科技,2011,2:51-54
- [20] 汪建国.黄酒的营养价值及保健功能[J].中国酿造,1998,6:34-35
- [21] 李贵凡,刘双伍,李广良.一种新型酿造米酒-澳川酒的研制

- [J].酿酒科技,2000,3:85-86
- [22] 郝莹,王卫卫,王莉娟,等.陕北传统米酒曲中优势菌种的分离、纯化及鉴定[J].检验检疫学刊,2010,2:44-47
- [23] 刘洪伟.茅台酒曲中5株真菌的分离、纯化、鉴定初报[J].酿酒,2009,6:35-37
- [24] 王克明.固定化多元菌液态发酵米酒的研究[J].酿酒,2005,6: 87-89
- [25] Meyrath, J. Bahn, M. han, H. E. Altmann, H. Induction of amylase-producing mutants in *Aspergillus oryzae* by different irradiations [J]. Symposium on Use of Radiation and Radioisotopes for Genetic Improvement of Indus Microorg Vienna, 1971: 137-155
- [26] ITO Hi, NESSA A. Induction of *Aspergillus oryzae* mutant strains producing increased levels of α -amylase by gamma-irradiation [J]. Radiation Physics and Chemistry, 1996, 48(6): 811-813
- [27] Machida M., et al. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. Nature, 438: 1157-1161
- [28] 林祖申.UE336-2 米曲霉应用于酱油生产的研究[J].中国酿造,2003,127(4):24-26
- [29] 邓静,徐静,吴华昌.米曲霉高产酸性蛋白酶菌株的选育[J].中国调味品,2010,35(1):53-56
- [30] 唐洁,车振明,王燕.微波-紫外灭活原生质体融合选育米曲霉菌株的研究[J].食品科技,2006,8:31-34
- [31] 廖晓霞,张学武.紫外线诱变对 β -甘露聚糖酶产酶菌株的影响研究[J].现代食品科技,2010,8:801-804
- [32] X. F. ZHENG, Y. KOBAYASHI, M. TAKEUCHI. Construction of a low-serine-type-carboxypeptidase producing mutant of *Aspergillus oryzae* by the expression of antisense RNA and its use as a host for heterologous protein secretion [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 395-441
- [33]