

文章编号: 1000-5862(2018)05-0494-06

传统曲霉型豆豉中高产脂肪酶的米曲霉筛选及鉴定

廖焰焰, 张 菊, 李 翔, 王筱兰*

(江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022)

摘要: 豆豉是中国特色四大传统大豆发酵制品之一, 其中产脂肪酶菌株对豆豉风味的形成发挥着重要作用。实验对传统曲霉型豆豉发酵过程中的脂肪酶产生菌株进行了研究, 以发酵过程中的曲霉型豆豉为样品, 通过对其分离纯化, 得到高产脂肪酶菌株 8 号, 并测出其脂肪酶活力为 $30 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对该菌株进行了形态学和分子生物学鉴定, 通过与 NCBI 数据库中 ITS 序列比对, 发现该菌株与米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 的相似度达 100%, 鉴定该菌株为米曲霉。获得的高产脂肪酶米曲霉, 对豆豉的风味有重要影响, 并且为后续的研究提供了依据。

关键词: 曲霉型豆豉; 米曲霉; 纯化; 分子生物学鉴定

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2018.05.11

0 引言

豆豉是中国特色四大传统大豆发酵制品之一, 既可药食兼用, 又具有驱寒健食等功效^[1]。豆豉中含有多种营养价值, 包括丰富的 VB1、VB2、VE、糖和蛋白质等, 同时具有多种功能成分^[2-3]。米曲霉产生的脂肪酶在豆豉发酵过程中是一类重要的水解酶, 可催化天然底物油脂水解, 生成甘油、脂肪酸和甘油单酯或二酯^[4], 且具有耐有机溶剂、耐高温等性能^[5-6]。张建华等^[7]研究表明豆豉中细菌数量超过 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 霉菌数量达到 $10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 曲霉菌占霉菌总数的 90% 以上, 而豆豉中酵母菌含量较少, 由此可知, 豆豉在自然发酵的条件下主要的微生物菌群是细菌和霉菌。钱家亮等^[8]对曲霉型豆豉研究时发现, 豆豉中以细菌和霉菌为主, 霉菌中米曲霉占 90% 以上, 细菌主要为微球菌和乳球菌, 曲霉的质量直接影响豆豉的品质。张建华等^[9]研究天马山品牌和浏阳豆豉一品香时发现曲霉菌是主要微生物。汪孟娟等^[10]采用 PCR-DGGE 研究豆豉发酵过程中微生物群落的变化, 发现豆豉的功能成分与微生物生态有着密切关系。日本科研工作者成功破译了米曲霉基因组, 发现米曲霉基因有 3 800 万碱基对^[11], 该成果首次从微观角度对米曲霉进行深入研

究。传统的豆豉发酵生产周期较长, 受季节、区域、菌种等影响, 导致产品的质量不稳定, 影响了豆豉的发展^[12]。

本文通过对制曲 7 d 和发酵 8 d 的豆豉进行分离纯化、酶活测定, 获得了 1 株产脂肪酶的菌株, 通过形态学和分子生物学鉴定该菌株为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。研究豆豉在发酵过程中外观及风味的变化, 以期对豆豉工业化生产提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验原料

本文豆豉样品来自南昌稻香园调味食品有限公司, 样品用密封袋装好后放置在 4°C 冰箱中保藏, 并选择制曲第 7 天和发酵第 8 天的样品进行实验研究。

1.2 实验设备

比色皿, 分光光度计, 烧杯, 试管, 量筒, 磁力搅拌器, 超净工作台, 分析天平, 恒温培养箱, 三角瓶, 培养皿, 玻璃棒, 酒精灯, 显微镜, pH 试纸, 酒精灯, 移液枪, 胶头滴管, 鼓风干燥箱, 冰箱, 微波炉, 涂布棒, 接种环, 高压灭菌锅。

1.3 培养基

PDA 培养基: 葡萄糖 2%, 马铃薯 2%, 琼脂

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(31760449)资助项目。

通信作者: 王筱兰(1965-), 女, 江西景德镇人, 教授, 博士, 主要从事食品生物化学及微生物发酵研究。E-mail: xlwang08@aliyun.com

2.7 形态学鉴定

1) 宏观: 将菌株接种于 PDA 培养基上, 连续观察 7 d 菌株菌落的生长情况.

2) 微观: 将复筛后的菌株通过革兰氏染色制成临时玻片, 在高倍显微镜下观察菌株的形态.

2.8 分子生物学鉴定

2.8.1 总 DNA 的提取 按照 OMEGA 公司的真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取.

2.8.2 PCR 扩增 扩增真菌 ITS 序列的通用引物:

ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' 20bp

ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' 19bp

以提取的基因组 DNA 为模板, 用上述 ITS1/4 通用引物扩增目的基因片段. PCR 反应体系总体积 50 μL , 总基因组 DNA ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , ITS1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , ITS4 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , Taq DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL , $10 \times$ Taq PCR Buffer 5 μL , dNTP mix ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , ddH₂O 40.75 μL . 热循环参数: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 29 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min. 反应结束后取 5 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳条件为 100 V、100 mA、30 min, 然后再将产物送至上海生工进行测序.

2.8.3 构建系统进化树 将序列信息同 GenBank 数据库中的其他菌株的 ITS 核苷酸序列进行比较, 采用 MEGA6.06 软件对菌株的测序结果进行系统发育分析, 采用 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 并进行 Bootstrap 分析, 重复次数为 1 000 次.

3 结果与分析

3.1 菌株的分离及初筛

将分离纯化后的单一菌株进行初筛, 观察培养皿上是否产生黄色变色圈, 从而判断是否产生了脂肪酶. 菌落生长情况如图 1, 从中挑选出长势良好且变色圈大的 12 株菌种进行复筛.

3.2 复筛

用显微镜对初筛后的 12 个菌种进行镜检, 观察是否为单一菌株, 镜检为单一菌株后再进行平板筛选, 平板筛选生长图片部分如图 2 所示.

测量出变色圈的直径与菌落直径, 求出这 2 者

的比值 D/d (即 H_c 值) 的大小, 结果如图 3 所示. 3 次平行试验中 D/d 的 S_d 均值均小于 5%, 试验重复性良好. D/d 的比值可间接反映出菌株产脂肪酶的酶活大小. 综合 D/d 比值与 S_d 值的大小, 经过比较, 7 号菌株和 10 号菌株的 H_c 值相对来说比较高, 但是 7 号菌株发酵产酶能力比较稳定, 故选择 7 号菌配置为孢子悬液 (孢子量为 1.2×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 取 200 μL 孢子悬液接入 20 mL 种子液, 进行摇瓶发酵.

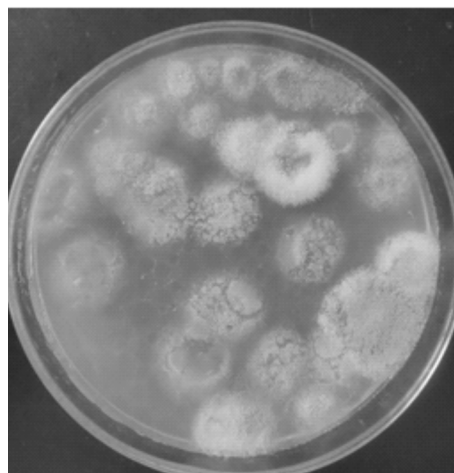


图 1 初筛菌落图

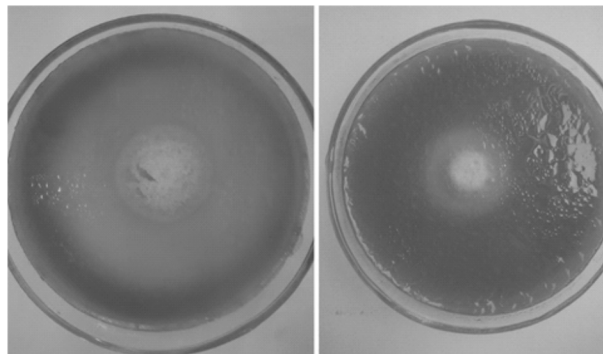


图 2 不同平板菌落的生长情况

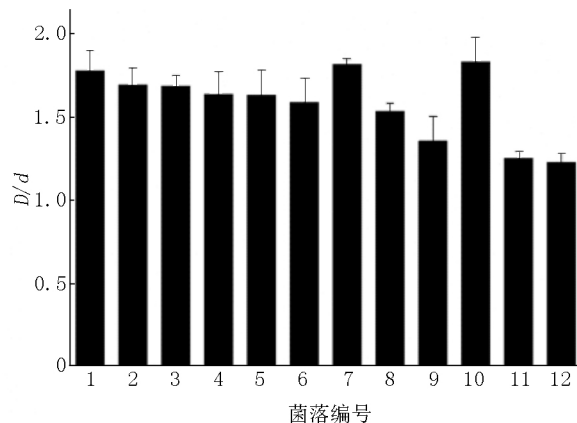


图 3 脂肪酶产生菌株平板筛选结果

3.3 脂肪酶酶活标准曲线的测定

由表 2 和图 4 可知, 对硝基苯酚标准曲线为 $y = 0.01946x + 0.00385$, $R^2 = 0.9997$.

表 2 对硝基苯酚标准数值的测定

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
对硝基苯酚含量/ 10^{-7} mmol	0	4.5	9.0	13.5	18.0	27.0	36.0	54.0	72.0	90.0
OD_{410} /nm	0	0.089 7	0.180 7	0.277 7	0.364 3	0.526 7	0.699 3	1.037 3	1.396 0	1.772 0

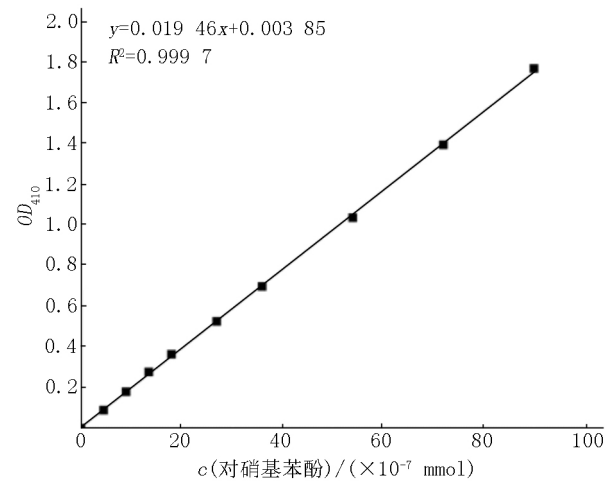


图 4 对硝基苯酚标准曲线

3.4 发酵液中脂肪酶酶活的测定

通过对样品中吸光度的测定由公式及标准曲线计算得出 7 号菌株发酵液中脂肪酶酶活力为 $30\text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.5 形态学鉴定

7 号菌落特征如图 5 所示,培养初期菌株为白色,接着变为米黄色,后中央隆起呈绿色,边缘为米黄色,菌丝易挑起,质地疏松。

显微形态特征如图 6 所示,分生孢子头放射状,直径约 $150 \sim 300\text{ }\mu\text{m}$,也有少数为疏松柱状。分生孢子梗 2 mm 左右,近顶囊处直径可达 $12 \sim 25\text{ }\mu\text{m}$,顶囊近球形或烧瓶形。

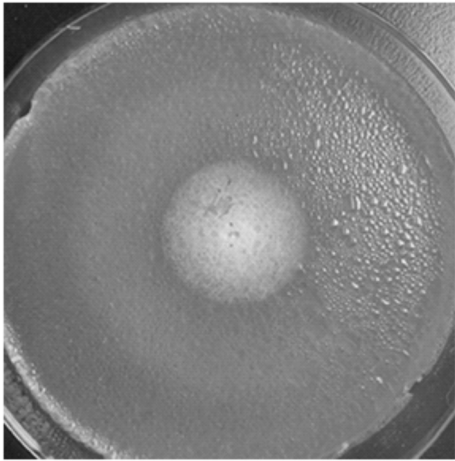


图 5 菌落的形态

3.6 分子生物学鉴定

3.6.1 PCR 扩增片段 PCR 扩增片段如图 7 所示。从图 7 可看出,该菌株的 ITS 序列扩增大小产物

为 550 bp 左右。

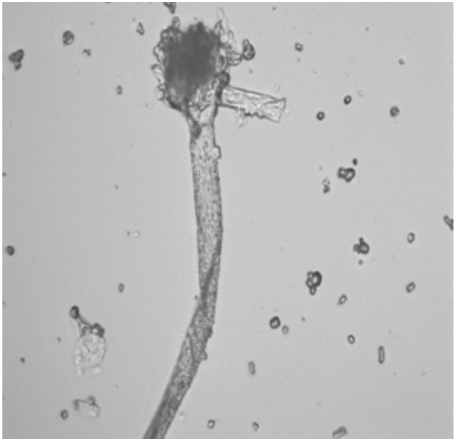


图 6 孢子的形态

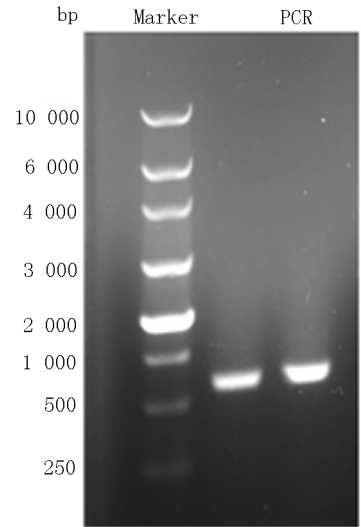


图 7 PCR 产物电泳图谱

3.6.2 测序结果及系统进化树的构建 利用 Clustal X 软件进行比对,通过 Mega 6.0 软件使用邻位相连法构建系统发育树,设置自展检验置信值为 1 000 次,结果如图 8 所示。该目标菌株(WM)在进化树分析中属于米曲霉。通过 ITS 基因序列与 NCBI 基因库中的数据 Blast 对比,结果显示它与 *Aspergillus oryzae*(数据库登录号: KM 999950.1)的序列相似性为 100%。结合之前的菌落形态和孢子形态,将该菌株鉴定为米曲霉(*Aspergillus oryzae*),基因登录号为: MF944082.1。该 ITS 序列为

GGCTAAGGAACGTAGTTCTAGCGAGCCCAAC
CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGC
GGCCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGCTCTCAGC
CCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAAGTC
TGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGC

AATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGTT
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
CTAGTGTGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAGT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAG
CACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCTCCCTCTCCGG
GGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGC
GTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGC
TCTGTAGGCCCGCGCGGCTTGCCGAACGCAAAT
CAATCTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG
ATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGGCGGA
GGAA

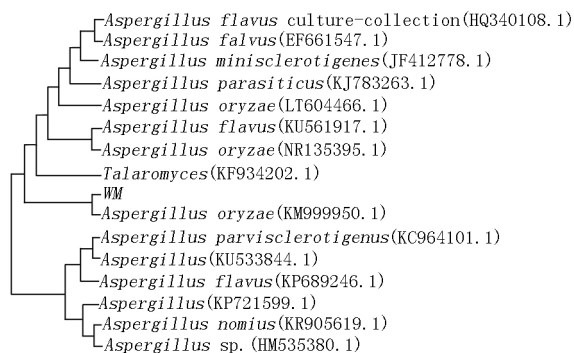


图8 系统进化树

4 讨论

本文以传统曲霉型豆豉发酵过程中的脂肪酶产生菌株为研究对象,取南昌稻香园食品有限公司豆豉样品,通过对其分离纯化、初筛和复筛,得到优势菌株,再对该菌株进行形态学鉴定和 ITS 序列分子生物学鉴定,确定该菌株为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。

脂肪酶作为重要的工业用酶,其应用究已有百年历史。杨永梅等^[13]从泸州油脂厂附近的土壤中,筛选到 1 株产碱性脂肪酶活性较高的细菌,经初步鉴定为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) ,酶活力最高可达 $19.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。马歌丽等^[14]从实验室保藏菌种中筛选得到 1 株产脂肪酶能力较强的根霉菌种 MHL4.07。对该菌摇瓶发酵产酶培养基组成进行了试验,测得脂肪酶活力为 $41.91 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,该产量比初始菌株的酶活提高了 408%。张搏等^[15]从武汉市森林公园富油土壤中通过平板筛选得到 1 株脂肪酶产生菌,分析鉴定该菌株为假单胞菌属,并定名为 *Pseudomonas* sp. 26-2,其酶活力可达 $15.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。目前对于脂肪酶产生菌株的研究已经取得了不少成果,但对于米曲霉产脂肪酶的研究鲜见文献

报道。刘雅琴等^[16]通过平板筛选从富含油脂的土壤、菜籽等中分离出了产酶活力高达 $34.55 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,经鉴定,该菌株为米曲霉。周晶等^[17]从被餐饮油脂污染的土样中,经过 2 轮平板筛选、摇瓶培养和酶活力测定,得到 1 株脂肪酶产生菌株,鉴定为米曲霉属,并将其命名为 *Aspergillus oryzae* CJLU-32。

本文经过一系列的分离筛选,获得了 1 株高产脂肪酶菌株。在平板初筛中,出现了连片的黄色变色块,对于判断脂肪酶产生能力的强弱带来了较大的影响,因此,采用了后续的平板复筛,目的是为了便于观察,对比变色圈与菌落的直径比,得到准确的实验结果。实验结果表明,在豆豉的发酵过程中,米曲霉能够产脂肪酶,菌株的优劣直接影响脂肪酶的产量和质量。通过对其酶活的测定发现,该菌株酶活为 $30 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,相对活力较高,对于脂肪有较强的分解能力,在豆豉发酵过程中可更好地分解利用大豆中的脂肪,提高豆豉的风味及营养价值,为日后豆豉工业化大规模生产提供优势菌种,同时也为工业化生产脂肪酶提供高产菌种。

5 参考文献

- [1] Hiroyuki Fujita, Tomohide Yamagami. Fermented soybean-derived Touchi-extract with anti-diabetic effect via α -glucosidase inhibitory action in a long-term administration study with KKA y mice [J]. Life Sciences, 2001, 70(2): 219-27.
- [2] 陈渝, 王娟, 钟倩霞, 等. 功能性低聚糖益生元的保健功能及开发 [J]. 现代食品科技, 2004, 20(1): 99-101.
- [3] 江洁, 王文侠, 栾广忠. 大豆深加工技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 231-253.
- [4] Tan Tianwei, Lu Jike, Nie Kaili, et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review [J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(5): 628-634.
- [5] Oliveira A C D, Watanabe F M F, Vargas J V C, et al. Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves [J]. Biocatalysis & Agricultural Biotechnology, 2012, 1(4): 295-300.
- [6] Dheeman D S, Frias J M, Henahan G T M. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 [J]. Journal of Industrial Microbiology, 2009, 37(1): 1-17.
- [7] 张建华. 曲霉型豆豉发酵机理及其功能性的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003: 18-22.

- [8] 钱家亮,宋俊梅,宁维颖.豆豉天然制曲过程的动态研究[J].食品与发酵工业,2008,34(2):58-60.
- [9] 张建华,李辉,李里特.曲霉型豆豉曲中微生物分布[J].中国调味品,2006,30(9):15-20.
- [10] 汪孟娟,熊顺强,陈廷涛,等.PCR-DGGE监测豆豉制曲过程中菌群的动态变化[J].南昌大学学报:理科版,2010,34(6):571-574.
- [11] Machida M,Asai K,Sano M,et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. Nature,2005,438(7071):1157-1161.
- [12] Axon A. Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage [J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology,2006,20(4):697-708.
- [13] 杨永梅,韩望,魏武,等.碱性脂肪酶产生菌的筛选与产酶条件及酶学性质研究[J].四川大学学报:自然科学版,2003,40(5):935-938.
- [14] 马歌丽,高建奇,张志刚,等.根霉脂肪酶产生菌筛选及发酵培养基研究[J].饲料工业,2006,27(22):12-16.
- [15] 张搏,杨江科,苏华武,等.脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J].生物技术,2007,17(1):23-26.
- [16] 刘雅琴,任玉锋,周杰,等.脂肪酶产生菌的分离筛选及菌株鉴定[J].食品研究与开发,2014,34(17):103-106.
- [17] 周晶.一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其酶学性质研究[D].杭州:中国计量学院,2012:15-24.

Screening and Identification of *Aspergillus oryzae* from the Traditional *Aspergillus*-Type Douchi

LIAO Yanyan, ZHANG Ju, LI Xiang, WANG Xiaolan*

(College of Life Science, Key Laboratory of the Conservation and Sustainable Utilization for Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: Douchi is one of the four traditional fermented soybean products with Chinese characteristics, among which the production of lipase strains plays an important role in the formation of tempeh flavor. In this study, the lipase producing strain of the traditional *aspergillus*-type douchi is used as the sample and the high-yield lipase strain No. 8 is isolated and purified from it. The activity of the lipase is $30 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the strain is identified by morphological and molecular biology. The similarity between the strain and *Aspergillus oryzae* is 100% by ITS sequence comparison in NCBI database. So that the strain is identified as *Aspergillus oryzae*. The high yield lipase produced by *Aspergillus oryzae* in this experiment has a great influence on the flavor of tempeh and provides the basis for the follow-up study.

Key words: *Aspergillus*-type douchi; *Aspergillus oryzae*; purified; molecular biological identification

(责任编辑:刘显亮)