

植酸对黄曲霉菌糖化酶活力的影响

夏艳秋¹ 朱 强²

(1.扬州大学食品科学院, 江苏 扬州 225009; 2.淮海工学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 通过添加不同浓度的植酸于黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) 02-6-58培养基中,于不同生长时间、不同添加方式测定黄曲霉菌糖化酶活力,研究植酸对黄曲霉菌糖化酶活力的影响。结果表明:(1)加入植酸后其糖化酶活力均有很大提高。其最佳作用浓度范围是0.20%~0.25%,最大可提高44.32%;(2)在黄曲霉菌生长麸曲中添加植酸比在连续培养3代的斜面培养基中加入植酸糖化酶活力提高幅度更大;(3)比较黄曲霉菌生长曲线及产酶曲线,加入植酸后,其对数生长期提前3~4 h,平衡期延长,从而提前进入产酶高峰期。

关键词: 植酸; 黄曲霉菌; 糖化酶活力

中图分类号: TS261.1; TQ925.7; Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2003)06-0033-02

Effects of Phytic Acid on Activity of Glucoamylase in *Aspergillus flavus*

XIA Yan-qiu¹ and ZHU Qiang²

(1.Food Science College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2.Huaihai Technology College, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Different concentrations of phytic acid (PA) were added to *Aspergillus flavus* 02-6-58 medium, its activity of glucoamylase were determined at different cultivated times and in different adding types. The effects of PA on *Aspergillus flavus*'s activity of glucoamylase were studied. The results were follows: (1) *Aspergillus flavus*'s activity of glucoamylase had risen obviously after PA were added into medium. Its optimum concentration was 0.20%~0.25%, which could improve 44.32%. (2) By adding PA, the activity of glucoamylase raised higher in bran more than in three continuous cultivation medium. (3) Compared *Aspergillus flavus* growth curve and producing enzyme curve with no adding PA, its exponential phase advanced 3~4 hour and balanced growth phase prolonged, so the peak of enzyme is ahead of control.

Key words: Phytic Acid (PA); *Aspergillus flavus*; activity of glucoamylase

植酸 (Phytic Acid, 缩写为PA) 是维生素B族一员,主要存在于谷物及种子中,是植物体内有机磷的主要储存形式,其有机磷含量高达总磷的18%~88%^[1]。由于其特殊的环状结构和极强的螯合效应,决定了植酸在食品、医药、化工、环保等方面的特殊生理药理和化学作用^[2-5]。在发酵工业,植酸作为促醇剂,用于提高菌体繁殖速度,增加产物,近年来已逐渐引起人们重视^[6-7]。但由于理论不足,真正用于生产为数不多。黄曲霉菌是酿造传统黄酒的优良菌种(经检测酿酒用的黄曲霉是不产毒素的),被新老工艺广泛应用。黄曲霉菌在生长过程中能产生很多对人类有用的酶,如淀粉酶、糖化酶、植酸酶、葡萄糖苷酶等。目前,国内黄酒业面临的主要矛盾是:黄曲霉菌液化力高,所产黄酒的品质比其他任何曲霉都好^[8,9],但就是糖化酶活力低。提高黄曲霉菌的糖化酶活力已经成为提高黄酒质量的关键。因而,如何在保证高品质的黄酒的同时提高黄曲霉菌糖化酶活力成为黄酒业迫切需要解决的问题。试验了植酸对黄曲霉菌糖化酶活力的影响,得出了一些有益的结论,希望能为发酵工业(尤其是黄酒生产)带来可观的经济效益。

1 材料与方法

1.1 实验菌种:黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) 02-6-58,本院微生物实验室保藏菌种。

斜面活化培养基:改良察氏培养基,121℃灭菌20 min。

液体繁殖培养基:5%葡萄糖,1%酵母膏,0.5%蛋白胨,

收稿日期:2003-04-29;修回日期:2003-07-26

作者简介:夏艳秋(1978-),女,江苏徐州人,研究生,发表论文数篇。

pH5.5,108℃灭菌15 min。

麸皮:市售。

植酸:含量≥70%,分析纯,嘉善巨枫化工厂。

其他试剂均为分析纯。

1.2 麸曲制备:称取一定量新鲜麸皮于250 ml三角瓶中,加水(按麸皮:水=1:1.2)搅拌均匀,121℃灭菌40 min,冷却至30℃接入黄曲霉菌孢子,30℃恒温培养,约18 h长出菌丝体,36~40 h麸曲成熟。

1.3 粗酶液制备:在培养好的麸曲中加0.1 M pH4.6醋酸盐缓冲液50 ml,搅匀,30℃水浴浸提1 h,15 min搅拌一次。冷却,过滤,滤液3000 r/min低温离心20 min,取上清液即为粗酶液。

1.4 糖化酶活力测定:按文献[10]测定。

1.5 生长曲线测定:在300 ml三角瓶中分别装30 ml液体繁殖培养基,接种0.5 ml孢子悬浮液,30℃摇瓶培养,间隔一定时间取出三角瓶,将培养液抽滤于定量滤纸上,100~105℃烘至恒重,称量菌体干重。

2 结果与分析

2.1 植酸浓度对黄曲霉菌不同生长阶段糖化酶活力的影响

制备麸曲时分别添加不同浓度植酸,以水作对照,定时测定黄曲霉菌糖化酶活力,结果见表1。

由表1可知,植酸浓度在0.10%~0.25%范围内对黄曲霉菌生长各阶段糖化酶活力均有不同程度提高,且随植酸浓度提高,糖化

表1 植酸浓度对黄曲霉菌不同生长阶段糖化酶活力的影响 (u/mg)

植酸浓度 (%)	发酵时间(h)				
	16	24	32	36	40
0	0.103	0.810	12.512	19.552	14.837
0.10	0.119	0.886	14.188	20.003	15.895
0.15	0.124	0.943	15.485	21.175	16.523
0.20	0.132	1.169	17.869	24.409	17.056
0.25	0.134	1.080	16.827	22.776	16.017
0.30	0.101	0.868	13.568	19.635	14.795
0.40	0.097	0.800	11.127	18.790	13.668

酶活力增加。在0.20%~0.25%时效果最显著,最大可提高44.32%,在0.30%开始对酶活产生一定的抑制作用。16h孢子萌发产酶并行发生,此时植酸对黄曲霉菌产酶影响较大,即使0.10%植酸也可提高15.53%。有资料表明,植酸是一种生长调节剂(即表面活性剂),处在气-液界面,改善了氧的传递速度,能增加细胞的通透性,从而刺激种子、微生物细胞等提前萌发^[11]。但在孢子萌发阶段不同浓度的植酸对酶活影响差异不大,主要是因为此时孢子刚萌发,产酶是微量的且培养基营养成分是足量的。24~36h黄曲霉菌进入对数生长期,菌丝开始蔓延生长,速度相当快,各种酶也开始大量积累,36h糖化酶活力达峰值。这一阶段需要大量的营养成分供给菌丝生长及产酶需要。麸皮是一种营养极其丰富的天然培养基,几乎能满足各种曲霉生长繁殖,而无机元素中,微生物对磷的需要量很高,一般为0.005~0.01 mol/L。麸皮中的磷元素有70%~80%是以有机植酸形式存在,微生物难以利用,此时加入一定量植酸,黄曲霉菌分泌的植酸酶使植酸降解,产生一定量的肌醇和有机磷酸^[12,13]。肌醇属于生物激素,在发酵过程中能够激活微生物体内的酶系。据报道,肌醇用于白酒生产,能提高淀粉利用率和出酒率^[14]。本实验即验证了这一点。磷是核酸与磷脂的成分,组成高磷化合物和许多酶的活性基;磷进入微生物细胞后即迅速同化为有机的磷酸化合物,磷酸根在能量代谢中起调节作用。肌醇和磷酸只有达到一定量时才能起作用,仅靠原料中的植酸无法满足这一要求。因此,在对数生长期添加适量的植酸于麸曲中,能大大提高黄曲霉菌糖化酶活力;40h左右由于孢子大量生成,糖化酶活力急剧降低,植酸在促成气生菌丝生孢子的同时由于有机磷的大量生成,黄曲霉菌糖化酶活力仍有一定的提高,但幅度不大。

2.2 植酸不同添加方式对黄曲霉菌糖化酶活力的影响

在连传3代斜面培养基中加入不同浓度植酸(36h测糖化酶活力),以制备麸曲时加入植酸为对照,植酸对黄曲霉菌糖化酶活力的影响见图1。

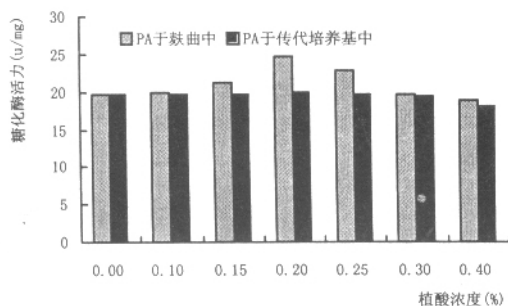


图1 植酸添加方式对黄曲霉糖化酶活力的影响

由图1可知,在连传3代斜面培养基中添加不同浓度植酸对黄

曲霉菌糖化酶活力提高甚微,仅为1.60%,而在制备麸曲时加入植酸,糖化酶活力最大可提高44.30%。在麸曲中,黄曲霉菌处于旺盛的动态生长发酵过程,其产酶功能基团处于激活状态,植酸对其细胞膜刺激作用比较强烈,有助于打破细胞内酶合成的“反馈平行”。而且黄曲霉菌分泌的植酸酶是一种诱导酶,植酸在诱导大量植酸酶产生的同时自身被分解为微生物的营养成分,从而加速菌体生长和产酶。在传代斜面培养基中,黄曲霉菌相对处于静态生长发酵过程,其产酶功能基团相对处于休眠状态,植酸对其细胞膜刺激作用相对较弱,且其所产植酸酶是微量的,不足以使植酸分解。因此在传代斜面培养基中加入植酸对黄曲霉菌糖化酶活力影响较小。

2.3 植酸对黄曲霉菌生长繁殖及产酶的影响

分别在30 ml液体繁殖培养基中和制备麸曲时加入最佳浓度植酸,分析植酸对黄曲霉菌生长繁殖和产酶的影响,其结果见图2、图3。

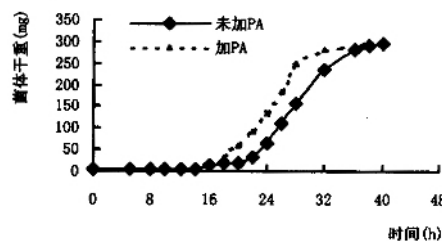


图2 黄曲霉生长曲线

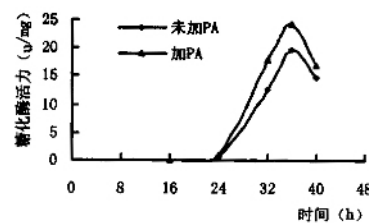


图3 黄曲霉产酶曲线

图2表明,加入植酸后,黄曲霉菌生长迟滞期缩短,对数生长期提前3~4h,且对数生长期延续时间较短,稳定期相对延长。因此,在适宜的条件下,孢子一旦萌发,营养菌丝就迅速生长蔓延,从而提前进入产酶高峰期(见图3),而延长的稳定期将大大提高菌体产酶量。这些特征用于现代化发酵工业将大大缩短生产时间,增加淀粉转化率,提高出酒率及设备利用率。

3 讨论

植酸是近年来新发现的有机天然含磷化合物,是种子、谷物内有机磷储存的重要仓库。植酸因强螯合效应被广泛归类为营养拮抗剂,但其更有利的一面应该大力开发,并应用于工业生产。通常植酸只有在一定的浓度范围内才能真正起到正效应,否则将造成双重损失。

植酸的毒性极低,小鼠口服半致死量(LD₅₀)为4192 mg/kg^[15],比食盐(LD₅₀为4000 mg/kg)更安全,因而美国等发达国家已将其列为新型添加剂广泛用于食品工业。

制曲时添加一定量的植酸,黄曲霉菌系霉菌分泌的植酸酶使植酸降解,产生一定量的肌醇和磷酸,从而提高黄曲霉菌的糖化酶活力。传统黄酒生产使用自然曲和多菌种酒母共同糖化发酵,而新

(下转第37页)

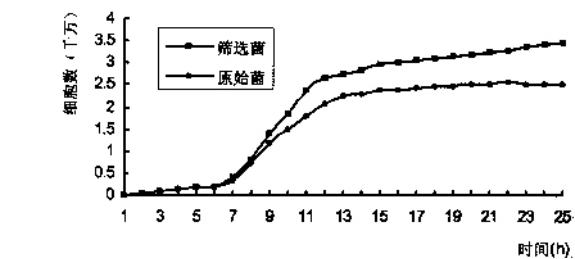


图4 两菌株生长曲线的比较

期,迅速发酵,缩短发酵时间,减少被杂菌污染的机会。

2.5 两菌株发酵失重的比较 (见图5)

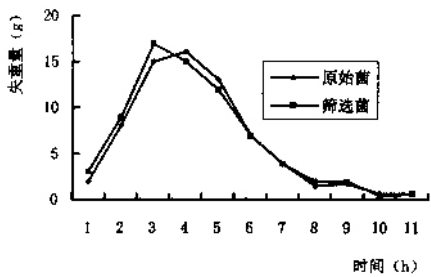


图5 两菌株的发酵失重的比较

筛选菌与原始菌的发酵失重情况见图5,从图中可以看出,筛选菌Y₂与原始菌Y₁比较,发酵同样时间Y₂的失重速度更快,说明其产生的二氧化碳量更多,发酵起步早、速度快,能较早期地达到主发酵期,形成生长优势,有效地抑制杂菌,使发酵过程中的生化反应正常进行,能对白酒的质量有初步的保证。

2.6 两菌株所酿白酒的理化指标的检测

用两菌株Y₁和Y₂分别酿制白酒,将所得的酒样进行各项理化指标的测定。结果见表3,由表3可以看出,两者所酿酒各项理化指标均达到国家小曲酒的质量标准。两者总酯含量的差别不大,但用

表 3 成品酒的成分比较		
项目	原始菌 Y ₁	筛选菌 Y ₂
酒精度(%,v/v)	42.26	43.16
总酸(g/100 ml)	0.10	0.15
总酯(g/100 ml)	0.52	0.50
总醛(g/100 ml)	0.10	0.07
口感	有苦杂味	风味纯正,苦杂味较少
外观	酒液微浑	酒液清亮

筛选菌Y₂生产的白酒酒精度比Y₁高出0.9度,说明筛选菌Y₂发酵能力更强,对原料的利用率更高。适量的醛类对酒的香味起着一定的作用,但醛类物质多了不仅有一定的毒性,还会给酒带来苦杂味^[5],筛选菌Y₂所酿酒的总醛含量更低,其酒质也更好。

3 结论

3.1 用红四氮唑作为指示剂筛选得到的酒精酵母Y₂,同原始菌Y₁相比,它细胞个体大、大小均一、形状规则统一,呈长卵圆形,出芽率高,生长快,死亡率较低,在同样的发酵条件下,它的发酵速度更快,耐酒精能力更强,对原料的利用率更高,产酒精能力更强,且成品酒的品质也较好。从而证明用红四氮唑作为指示剂筛选酒精酵母的方法是有效的,在实际生产中可提高酒精酵母的分离选育效率,降低实验成本。

参考文献:

[1] 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程[M].上海:复旦大学出版社,1993.

[2] 王梅,张澎湃,帅桂兰. TTC在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, (5): 62-64.

[3] 郝林.食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2001.

[4] 欧阳琼.微生物学实验法[M].南昌:江西人民出版社,1980.

[5] 无锡轻工业学院,大连轻工业学院,天津轻工业学院. 工业发酵分析[M].北京:轻工业出版社,1999.

(上接第34页)

工艺大生产则更多的依赖纯种麦曲和纯种酒母,以便于生产管理及安全酿酒,但麦曲糖化力和酒母发酵力不如传统黄酒高。廉价的天然有机物植酸用于提高黄曲霉菌糖化酶活力无疑给酿酒业带来了福音,其是否也能提高酵母发酵力,而不影响黄酒色、香、味、体及各项理化指标,从而提高淀粉利用率,降低酒母和麦曲使用量,节约粮食,推动黄酒新工艺向前迈进,还有待于进一步研究探讨。

参考文献:

[1] Purva Vats, U.C. Banerjee. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 211-217.

[2] 张素华,朱强,夏艳秋,等.蒲菜天然保鲜剂的筛选及其应用研究[J].扬州大学学报, 2002, 23(4): 75-78.

[3] Paivi Ekholm, Lissa Virkki, Maija Ylinen, et. The effect of phytic acid and some nature chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 165-170.

[4] J.R. Vraart, Y. Schouten, C. Gooijer, et. Evaluation of phytic acid as a buffer additive for the separation of proteins in capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography, 1996, 768: 307-313.

[5] Rao RK, Eamakrishnan CV. Inositol phosphatase in developing rat duodenum, jejunum and ileum[J]. Biol Neonate, 1986, 50: 165-166.

[6] 李记明.酵母活性剂在葡萄酒酿造中的应用研究[J].酿酒科技, 2001, (4): 88-89.

[7] Selma H.A. Elyas, Abdullahi H. El Tinay, Nabila E. et. Effect of natural fermentation on nutritive value and in vitro protein digestibility of pearl millet[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 75-79.

[8] 顾振新.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.

[9] 康明官.日本清酒技术[M].北京:轻工业出版社,1986.

[10] 李建武,陈来同,余瑞元,等.生物化学试验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994.

[11] Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytases in legumes and cereals[J]. Advanced Food Research, 1982, 82: 91-92.

[12] A.L. El-Batal, H. Abdel Kareem. Phytases production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation[J]. Food Research International, 2001, 34: 715-720.

[13] Larsson, M., Sandberg, A.-S. Phytate reduction in oats during malting[J]. Journal of Food Science, 1992, 57: 994-997.

[14] 龚士选.生物激素在凤型酒生产中的试验研究[J].酿酒, 1995, (1): 57-58.

[15] 吴谋成,袁俊华.植酸的毒理学评价和食用安全性[J].食品科学, 1997, 18(2): 46-49.