

酱香型白酒大曲中白地霉产蛋白酶液态发酵条件优化

张应莲¹, 黄永光², 邱树毅³, 杨国华¹

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省轻工业科学研究所, 贵州 贵阳 550007; 3. 贵州大学化学与化工学院, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 从茅台镇酱香型白酒生产样品中分离得到 1 株白地霉 MTBD, 对其液态发酵条件下的不同原料比、料水比、pH 值、发酵温度、发酵时间对菌株产蛋白酶活力影响进行了研究。结果表明, 白地霉 MTBD 液态发酵产蛋白酶的最适条件为: 原料高粱:小麦:麸皮为 5:4:1, 料水比为 1:8, pH 值为 5, 发酵时间为 6 d, 发酵温度为 30 ℃。在此条件下发酵测定蛋白酶活力为 3387.61 U/mL。

关键词: 微生物; 白地霉; 液态发酵; 蛋白酶; 正交实验

中图分类号: TS262.33; TS261.4; TQ920; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)06-0032-04

Optimization of Liquid Fermentation Conditions of *Geotrichum candidum* to Produce Protease

ZHANG Yinglian¹, HUANG Yongguang², QIU Shuyi³ and YANG Guohua¹

(1. Life Sciences College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Guizhou Provincial Light Industry Research Institute, Guiyang, Guizhou 550007; 3. Chemistry & Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Abstract: A *Geotrichum candidum* strain MTBD was isolated from Maotai-flavor Daqu samples produced in Maotai town, and the effects of different raw materials ratio, water and materials ratio, pH value, fermenting temperature, and fermenting time on the activity of protease produced by MTBD under liquid fermentation conditions were investigated. The results showed that the optimum liquid fermentation conditions were summed up by orthogonal experiments as follows: the ratio of sorghum and wheat and bran was 5:4:1, the ratio of raw materials to water was 1:8, pH value was 5, fermenting time was 6 d, and fermenting temperature was at 30 ℃. Under the above conditions, the activity of the produced protease was up to 3387.61 U/mL.

Key words: microbe; *Geotrichum candidum*; liquid fermentation; protease; orthogonal

白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 是一种常见真菌, 属于半知菌亚门、丛梗孢科、卵形孢霉族、地霉属^[1], 可从土壤、肥料、食品、烂菜、酒醅、酿酒大曲等中分离得到^[2]。白地霉在发酵代谢过程能产生多种香气成分, 1975年 Gueguen 等发现白地霉可以水解蛋白质而产生香气化合物; 1982年 Koizumi 等证明了一些白地霉菌株可以产脂肪酸酯, 产生特殊的水果香气^[3]。Daigle 等用白地霉菌株 ATCC 62217 发酵酵母废水并通过 HS-GC-MS 分析发酵液, 鉴定出此株白地霉所产风味物质主要有乙酸乙酯、丙酸、丁酸、异丁酸等^[4]。Naziha Mdaini 利用分离到的白地霉菌株, 在以葡萄糖为碳源的培养基上生长时, 分离到的酯类包括乙基酯类和醇类物质, 其中乙酸乙酯达到 9.5 g/L, 苯甲醛达到 1.6 g/L^[5]。2007年, 王庆国等研究

了产果香白地霉菌株 XJB45 和 XJA58。通过 GC-MS 分析白地霉菌株 XJB45 和 XJA58 的产香成分主要为酯类和 β-苯乙醇, 2 株菌产酯能力较强。XJB45 主要产丁酸乙酯、异戊酸乙酯和丙酸丙酯, XJA58 主要产异戊酸乙酯、2-甲基-2-丁烯酸乙酯和惕各酸乙酯^[6]。

酱香型白酒是中国典型的传统香型白酒, 其风格特征为: 酱香突出, 幽雅细腻, 醇厚丰满圆润, 回味悠长, 空杯留香持久; 以国酒茅台为典型代表。酱香白酒的风味形成是诸多因素共同作用的结果, 但是氨基酸在酱香酒风味形成中具有举足轻重的作用, 著名的美拉德反应与酱香酒风味的形成具有密切关系^[7]。因此, 进行白地霉 MTBD 液态发酵产酶研究进而研究其与风味物质形成的关系, 对研究酱香型白酒生产过程产蛋白酶与酱香酒

基金项目: 贵州省重大专项项目支持 黔科合重大专项(2010)6004号 国家科技支撑计划 2011BAC06B12号 黔科合 GZ字(2011)-3015 黔科合 GY字(2011)-3052。

收稿日期: 2012-02-29; 修回日期: 2012-03-05

作者简介: 张应莲, 贵州大学生命科学学院微生物学研究生。

通讯作者: 邱树毅, 教授, 博士, syqiu@gzu.edu.cn。

优先数字出版时间: 2012-03-05; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120305.0951.001.html>。

风味的形成具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

白地霉菌株:从茅台镇典型的大曲酱香型白酒生产企业生产用酱香大曲、酒醅中分离、保存。

高粱、小麦:仁怀市本地种植,2010年生产、采收。

1.2 培养基

菌种保存培养基:PDA斜面培养基;种子培养基:PDA液体培养基。

发酵培养基:高粱:小麦:麸皮以不同比例混合称取样品200g,制成混合汁,过滤取上清液,以0.1MPa灭菌20min,保存备用。

1.3 方法

1.3.1 发酵产酶实验

分别以原料配比、水料比、发酵温度、pH值、发酵时间等因素对产酶的影响进行实验分析,考察各因素对产酶的影响,并通过正交实验得到目标菌株的最适产酸条件。

1.3.2 蛋白酶活力测定

1.3.2.1 粗酶液的制备

发酵液以4000r/min离心15min,上清液即为粗酶液。

1.3.2.2 蛋白酶活力的测定

标准曲线的绘制:分别吸取100μg/mL标准酪氨酸溶液0.1mL、0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL、0.7mL,分别补水至10mL,配成梯度标准液。吸取稀释后的标准溶液各1mL,加入5mL 0.4mol/L碳酸钠溶液和1mL福林酚试剂。在40℃水浴中显色20min,在680nm波长下测定吸光值,以不加酪氨酸为空白,绘制浓度与吸光值的标准曲线。

试样测定:吸取酶液1mL,注入10mL离心管中(3个重复),在40℃水浴中预热5min,准确加入20g/L酪蛋白溶液1mL,保温10min,取出后立刻加入2mL 0.4mol/L三氯乙酸溶液,以沉淀多余的蛋白质,终止酶反应;4000r/min离心15min,吸取上清液1mL注入试管,加入5mL 0.4mol/L碳酸钠溶液和1mL福林酚试剂,摇匀;在40℃水浴中加热显色20min,后于680nm下测其吸光值。按下列公式计算酶活:

$$E(\text{蛋白酶酶活})=K \times A \times 4 \times X \times 1/10$$

式中:A——吸光值;

4——酶反应总体积,mL;

10——反应时间,min;

K——吸光常数;

X——总粗酶液,mL。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

按1.3.2.2方法绘制标准曲线,结果见图1。

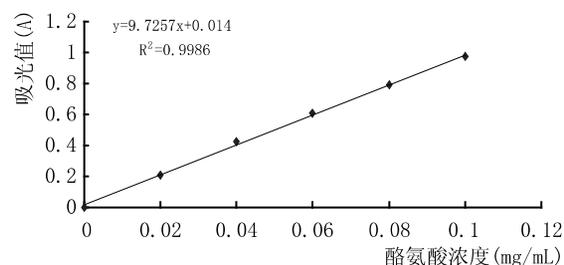


图1 酪氨酸浓度与吸光度标准曲线

由图1标准曲线可知,当吸光值为1时的酪氨酸微克数为101.4μg,即所求K值为101.4。

2.2 不同原料比对产蛋白酶的影响

原料(高粱、小麦、麸皮)比分别设计为:4:5:1、5:4:1、6:3:1、7:2:1、8:1:1、9:0:1,料水比为1:8,加水后按1.2操作方法进行原料处理,取滤液于121℃,0.01MPa下灭菌20min,冷却后接种,接种量为10%(v/v),置于30℃恒温摇床(150r/min)培养5d,取样测定蛋白酶活力,结果见图2。

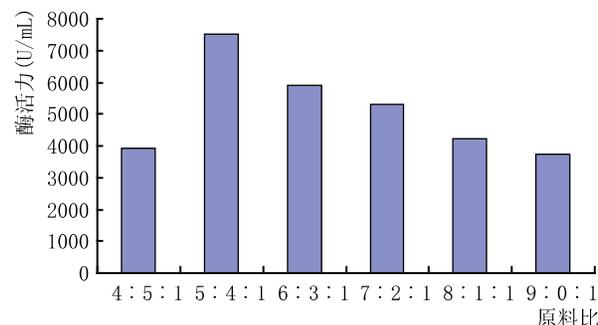


图2 不同原料比对菌株产蛋白酶的影响

由图2可以看出,随着高粱所占比例的提高,蛋白酶活力有下降的趋势,并且在高粱:小麦:麸皮为5:4:1时蛋白酶活力最高。

2.3 不同料水比对菌株产蛋白酶的影响

原料配比按高粱:小麦:麸皮为5:4:1,料水比分别设置为:1:6、1:7、1:8、1:9和1:10。按上述料水比加水,加水后按1.2操作方法进行原料处理,取滤液于121℃,0.01MPa下灭菌20min,冷却后接种,接种量为10%(v/v),置于30℃恒温摇床(150r/min)培养5d,取样测定蛋白酶活力,结果见图3。

由图3可以看出,在料水比为1:8时酶活最高。适宜的水分含量是使物质均匀溶解的保证,底物溶解均匀性直接影响微生物对利用底物产酶。水分过高或过低均不是最佳产酶所需,因此料水比为1:8时为最佳。

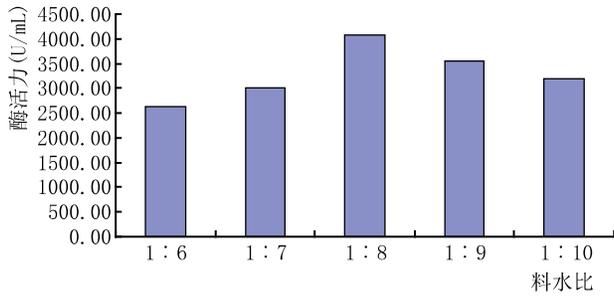


图3 不同料水比对菌株产蛋白酶的影响

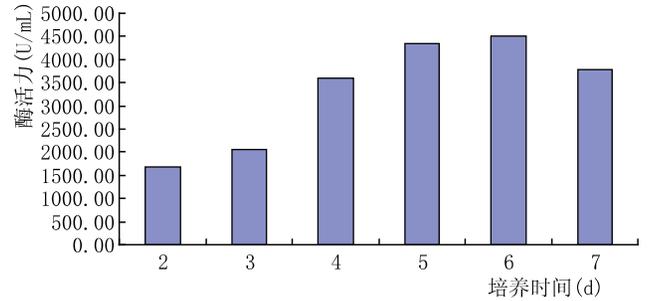


图5 不同发酵时间对菌株产蛋白酶的影响

2.4 发酵液不同 pH 值对产蛋白酶的影响

原料配比按高粱:小麦:麸皮为 5:4:1, 料水比 1:8;加水后按 1.2 操作方法进行原料处理,取过滤液调节 pH 值分别为 5、6、7、8 和 9,于 121 °C,0.01 MPa 下灭菌 20 min,冷却后接种,接种量为 10%(v/v),置于 30 °C 恒温摇床(150 r/min)培养 5 d,取样测定蛋白酶活力,结果见图 4。

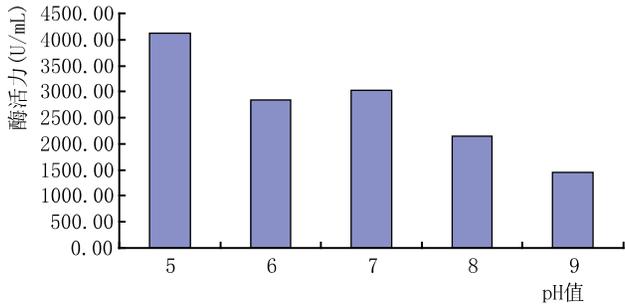


图4 不同 pH 值对菌株产蛋白酶的影响

发酵环境的 pH 值对微生物生命活动的影响很大,主要作用在于引起细胞膜电位的变化,从而影响微生物对营养物质的吸收;其次影响代谢过程中酶的活力,每种微生物都有其生长的最适宜 pH 值和一定适应的 pH 值范围。当低于最低或超过最适 pH 值时,微生物的继续生长受阻,引起菌体死亡及产酶能力下降。同时,pH 值影响细胞膜的透性,导致胞内酶不能进入胞外发酵环境,可检测到的酶活下降。由图 4 可以看出,在 pH 值为 5 时产酶活力最高。

2.5 不同发酵时间对菌株产蛋白酶的影响

原料配比按高粱:小麦:麸皮为 5:4:1,料水比 1:8;加水后按 1.2 操作方法进行原料处理,取滤液于 121 °C、0.01 MPa 下灭菌 20 min,冷却后接种,接种量为 10%(v/v),置于 30 °C 恒温摇床(150 r/min)培养,从发酵第 2 天开始取样测定蛋白酶活力,结果见图 5。

由图 5 可以看出,在最适培养时间范围内,随着培养时间的增加,蛋白酶活力也是增加的。当达到第 6 天之后蛋白酶活力下降,因此可以看出产蛋白酶的最适发酵时间在发酵过程的 6 d 内。最佳发酵产酶时间还受发酵温度、底物浓度、底物营养、发酵方式等影响。

2.6 不同发酵温度对菌株产蛋白酶的影响

原料配比按高粱:小麦:麸皮为 5:4:1,料水比 1:8;加水后按 1.2 操作方法进行原料处理,取滤液于 121 °C、0.01 MPa 下灭菌 20 min,冷却后接种,接种量为 10%(v/v),置于 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 下恒温摇床(150 r/min)培养 5 d,取样测定蛋白酶活力,结果见图 6。

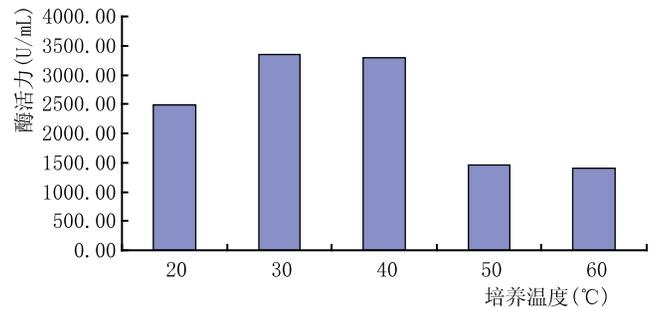


图6 不同发酵温度对菌株产蛋白酶的影响

由图 6 可知,在 30 °C 时酶活力最高,由于过高的温度使得菌株生长缓慢或者停滞,不能利用原料生长、产酶,所以在 40 °C 之后酶活力下降,但是在 50~60 °C 时还具有一定酶活。由于 MTBD 是从酱香型酒酒醅中分离得到的,经过长期的生产驯化已经适应了高温环境,所以,在酱香型酒的高温发酵过程中,酒醅也具有蛋白酶活力,对蛋白质降解和香味物质的生成具有一定作用。

2.7 正交实验优化

通过单因素发酵产酶实验结果,选择对产酶影响较大的因素进行正交优化实验,取不同原料比、不同料水比、不同 pH 值、不同发酵时间 4 个因素,每一因素选 3 个水平。实验因素设计和结果见表 1、表 2 和表 3。

比较极差分析可知:各因素对酶活的影响顺序为 B>A>C>D,说明因素 B 即料水比值对产酶影响最大。同时可看出:因素 D 即培养时间对酶活影响最小,正交试验的最佳组合为 A₁B₂C₁D₂。

由表 3 可以看出,F 比的大小为料水比>原料比>pH 值>时间,即说明各个因素中料水比对白地霉产蛋白酶的影响最大,其次是原料比,然后是 pH 值,影响最小。

表1 正交实验因素水平

水平	因素			
	A	B	C	D
	原料比(高粱:小麦:麸皮)(料水比)(pH值)(发酵时间,d)			
1	5:4:1	1:7	5	5
2	6:3:1	1:8	6	6
3	7:2:1	1:9	7	7

表2 正交试验分析结果

试验号	A	B	C	D	酶活(U/mL)
1	1	1	1	1	3193.14
2	1	2	2	2	3415.63
3	1	3	3	3	3309.58
4	2	1	2	3	2833.85
5	2	2	3	1	3141.56
6	2	3	1	2	3280.79
7	3	1	3	2	2847.09
8	3	2	1	3	3256.01
9	3	3	2	1	3183.15
K1	3306.107	2985.027	3243.313	3172.617	
K2	3085.400	3271.057	3144.200	3181.160	
K3	3095.417	3257.840	3099.411	3133.147	
极差	220.707	313.030	143.903	48.013	

表3 方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	93202.042	2	23.678	19.000	*
B	188050.496	2	47.775	19.000	*
C	32537.766	2	8.266	19.000	
D	3396.150	2	1.000	19.000	
误差	317726.45	2			

注: *表示差异显著。

的为培养时间。

2.8 验证实验

根据正交实验中得出的最佳因素组合 $A_1B_2C_1D_2$ 进行3次平行验证实验,得最佳产酶条件下酶活力分别为3345.65 U/mL、3106.73 U/mL、3710.46 U/mL,取其平均

值,在最佳因素组合下产酶活力为3387.61 U/mL。

3 结论

通过单因素实验结果表明,产酶酶活最高的单因素条件分别为:原料高粱:小麦:麸皮为5:4:1;料水比为1:8;pH值为5;发酵时间为6d;发酵温度为30℃。通过正交实验得到各因素对酶活的影响强弱为 $B>A>C>D$,说明因素B即料水比值对产酶影响最大。同时可看出:因素D即培养时间对酶活影响最小,正交试验的最佳组合为 $A_1B_2C_1D_2$ 。在最佳条件下产酶活力为3387.61 U/mL,验证了正交优化的结果是产蛋白酶的最佳条件。

通过单因素实验和正交实验得到最佳产酶条件,对生产上控制发酵条件,积累有益产物,提高酒的风味有一定的理论意义,然而想弄清楚酱香酒风味物质的主体还需要各研究者的不懈努力。

参考文献:

- [1] Wei J C. Manual for Fungal Identification[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 487-489.
- [2] Dai F L. Collections of Chinese Fungi[M]. Beijing: Science Press, 1979: 967.
- [3] 孙丙升,郑莉莉,刘天明,等.白地霉的应用研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(9):163-166.
- [4] Daigle P, Ge"linas P, Leblanc D.. Production of aroma compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb [J]. Food Microbiology, 1999,16: 517-522.
- [5] Naziha MdAini, Mohamed Gargouri, Mohamed Hammami, Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006,128: 227-236.
- [6] 王庆国,刘天明,韩小龙,等.两株产果香菌株的初步鉴定及香味成分分析[J].食品研究与开发,2007,28(6):16-19.
- [7] 庄名扬,王仲文,等.美拉德反应与酱香型白酒[J].酿酒科技,1997(1):73-77.

《酒道人生》首发式在江苏今世缘举行

本刊讯:由全国著名白酒专家沈怡方、金佩璋编著的《酒道人生》首发式于2012年5月28日在江苏今世缘隆重举行。参加发行仪式的有全国著名白酒专家曾祖训、高景炎、范仲仁、陶家驰、梁邦昌、赖登辉等,以及全国各地部分白酒企业的代表及业内主流媒体的负责同志。会议由江苏今世缘酒业股份有限公司董事长周素明主持,原江苏省白酒协会副会长兼秘书长刘建华介绍了《酒道人生》一书的编辑出版情况,全国著名白酒专家陶家驰题写书名。《酒道人生》中收录沈老和金老的论文56篇,图片206幅,凝聚了两位老人的科学思想、科学实践和科学结晶。沈老从化验、微生物到生产工艺,一切从头学起,一干就是一辈子,做了32年科学研究工作、18年技术管理工作,金老主要从事分析化验工作,同时对精细化工进行了深入研究。

沈老和金老对收录进书中的论文、图片进行了多次精心校订。原江苏省白酒协会会长、江苏洋河股份董事长杨廷栋为《酒道人生》作序,高度概括了两位老人的科技论文和研究成果的突出特点。

苏酒集团党委书记杨廷栋出席首发式并致辞,沈老和金老对全国白酒行业的发展,特别是对江苏白酒业的发展做出了重要贡献。《酒道人生》是两位老人从事一辈子科研工作和科学实践的写真写照。沈老发表了即兴讲话并签名赠书,殷切地希望后辈传承、创新、学习、发展。(小雨、孙悟)



首发式