

一株产己酸乙酯香酯液的生产菌株的鉴定及其生理生化特性研究

胡靖^{1,3}, 胥思霞², 王晓丹¹, 周鸿翔^{1,4}, 吴鑫颖^{1,4}, 吴海², 陶茵^{1,4}, 邱树毅^{1,4}, 胡鹏刚^{1,4}

(1.贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2.贵州青酒集团有限责任公司, 贵州 镇远 557702; 3.贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 4.贵州大学化学与化工学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 从贵州某知名白酒企业浓香大曲中分离筛选得到1株产己酸乙酯的菌株 IS518。根据其形态特征、培养特征、18S rDNA 分子克隆测定及系统发育分析, 鉴定菌株 IS518 为红曲属的紫色红曲霉(*Monascus purpureus*)。对该菌株进行生理生化试验测定, 结果表明, IS518 菌株己酸乙酯酯化力较高, 在实验室条件下可达 62.79 mg/g。

关键词: 香酯液; 己酸乙酯; 鉴定; 红曲霉

中图分类号: TS261.1; Q93-3; TQ925.7; TS262.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)09-0046-05

Identification of A Ethyl Caproate-producing Strain and Research on Its Physiological and Biochemical Properties

HU Jing^{1,3}, XU Sixia², WANG Xiaodan¹, ZHOU Hongxiang^{1,4}, WU Xingyin^{1,4}, WU Hai²,
TAO Han^{1,4}, QIU Shuyi^{1,4} and HU Penggang^{1,4}

(1. Guizhou Key Lab of Fermenting Engineering and Bio-pharmacy, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Guizhou Qingjiu Group Co.Ltd., Zhengyuan, Guizhou 557702; 3. Life Science College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 4. Chemistry and Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: A ethyl-caproate-producing strain IS518 was isolated successfully from Luzhou-flavor Daqu made in Guizhou. It was identified as *Monascus purpureus* by the analysis of its morphology, its culture characteristics, and by cloning measurement of its 18S rRNA. Physiological and biochemical test indicated that strain IS518 had strong ethyl caproate-producing capacity (up to 62.79 mg/g in the Lab). (Tran. by YUE Yang)

Key words: ester liquid; ethyl caproate; identification; *Monascus*

己酸乙酯是一种广泛用作食品调香的酯类香料, 主要用于白酒、香烟和糖果的调香, 它是浓香型白酒的主体香味成分, 其含量高低直接影响白酒的品质。与目前生产中所用的化学法相比, 酶法合成己酸乙酯具有反应条件温和、转化率高、副产物少等优点, 并且用生物方法生产的酯在美国联邦法规(US code of federal regulation)中被认定为天然香料^[1-2], 1991年荷兰 Uno Chema International 公司推出“Bioester0”系列生物酯商品^[3]已有上吨的规模。

目前脂肪酶的逆反应酯化的研究已显示出巨大的应用潜力, 它不但可催化合成甘油脂肪酸酯, 而且还能合成其他酯类^[4]。据报道, 细菌、霉菌、酵母的许多种属均能分泌催化合成己酸乙酯的胞外脂肪酶^[5], 应用微生物酯酶催化合成的香酯液可用于浓香型白酒缩短发酵周期, 提

高酒质, 为浓香型白酒优质高产提供了一条有效途径^[6]。本研究报道了一株从贵州某知名酒厂筛选到的产己酸乙酯香酯液相对较高菌株, 并对其进行了鉴定和生理生化研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、试剂及仪器

菌株: 从贵州某知名酒厂浓香大曲中分离得到, 编号为 IS518, 接种于麸皮浸出液斜面培养基, 在 30~32 °C 培养 3~4 d 后保存菌株。

仪器及试剂: 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 水浴恒温振荡器, 上海博迅医疗设备厂; DF-700 智能型数

基金项目: 黔科合重大专项[2010]6004号 科技部科技支撑计划项目课题(2011BAC06B12)。

收稿日期: 2012-07-14

作者简介: 胡靖(1987-), 贵州都匀人, 理学硕士, 从事应用微生物学研究。

通讯作者: 邱树毅, 博士生导师, syqiu@gzu.edu.cn。

字温度控制器,浙江省余姚市东方电工仪器厂;UV-2550紫外分光光度计,日本岛津公司;JJ-CJ超净工作台,苏州金净化设备科技有限公司;BMJ-250C恒温恒湿培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;YS100光学显微镜,日本尼康;麸皮,河南省台前县兴隆面粉有限公司提供。其他常规试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 培养基及培养条件

保藏培养基:麸皮浸出液培养基,麸皮 250 g/L,葡萄糖 20 g/L,酵母粉 5 g/L,琼脂 15 g/L,自然 pH 值。

固体发酵培养基:麸皮培养基。

鉴定培养基:查氏培养基(CA),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),麦芽汁琼脂培养基(MEA),麸皮浸出液培养基。

以上均为 31 °C 培养。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种鉴定

菌种的形态特征观察:将纯化的菌株分别在查氏培养基(CA),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),麦芽汁琼脂培养基(MEA),麸皮浸出液培养基 4 种培养基上培养 7 d。观察其菌落外观形态,菌丝生长情况,显微镜观察菌丝体大小、形状、分生孢子等。

菌株的分子鉴定:菌株 IS518 取菌丝体接种于麸皮浸出液培养基中,培养 3 d,收集菌丝体,按照文献^[7]提取基因组 DNA,以提取的真菌 DNA 作为模板,用真菌通用引物扩增 18S rDNA 序列。NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 及 NS6 (5'-GCATCACAGACCTGT-TATTGCCTC-3') 扩增供试菌的片段。反应条件:94 °C 维持 5 min;94 °C 保持 30 s,55 °C 保持 35 s,72 °C 下 1 min,35 个循环,延伸 8 min。PCR 产物测序经上海生物工程技术有限公司完成。

系统发育分析:根据测序结果,在 NCBI 上使用 BLAST 程序从 GenBank 数据库中搜索有关种的公认 18S rRNA 标准序列数据,用 ClustalX 1.8 进行多序列对比分析,利用 MEGA 4.0 构建系统发育树^[8]。

1.2.2 菌株生理生化特性研究

麸曲制作方法:将活化好的菌种转接入装有 40 g 麸皮的麸皮培养基中,31 °C 堆积培养 24 h,待布满菌丝后打散,之后每隔 8~12 h 扣瓶 1 次,72~84 h 培养结束后,40 °C 通风干燥。

1.2.3 液化型淀粉酶活力测定

粗酶液制备:准确称取 10 g 麸曲于烧杯中,用 50 mL 预热至 40 °C 的磷酸缓冲液研碎,混合均匀,并置于 40 °C 的水浴中浸提,每 5 min 搅拌 1 次,保温 60 min 后取出,并用滤纸过滤,滤液即为粗酶液。

测定:采用 Young J. Yoo 改良法^[9],反应体系为 5 mL 0.5 % 可溶性淀粉溶液,在 40 °C 水浴中预热 10 min,然后加适当稀释的酶液 0.5 mL,反应 5 min 后,用 5 mL 0.1 mol/L H₂SO₄ 终止反应。取 0.5 mL 反应液与 5 mL 工作碘液显色,在 620 nm 处测光密度。以 0.5 mL 水代替 0.5 mL 反应液,为空白,以不加酶液(加相同的水)为对照酶活力,根据下式计算:酶活力(U/mL) = (R₀-R) / R₀ × 50 × D, 式中 R₀, R 分别表示对照和反应液的光密度, D 为酶的稀释倍数。调整 D 使 (R₀-R) / R₀ 在 0.2~0.7 之间。

酶活力单位定义:在 40 °C, 5 min 内水解 1 mg 淀粉(0.5 % 淀粉)的酶量为 1 个活力单位。

1.2.4 糖化酶活力测定^[10]

粗酶液制备:取 2.000 g 麸曲,先用少量乙酸缓冲液研碎,再加入一定量的缓冲溶液,稀释至固定倍数,充分搅拌、摇匀。通过 4 层纱布过滤,滤液供测定用。

测定:于甲、乙 2 支 50 mL 比色管中,分别加入可溶性淀粉溶液 25.0 mL 及缓冲溶液 5.00 mL,摇匀,于 40 °C 恒温水浴中预热 5 min。在甲管(样品)中加入待测酶液 2.00 mL,立刻摇匀,在此温度下准确反应 30 min,立即各加氢氧化钠溶液 0.20 mL,摇匀,立即将两管取出迅速冷却,并于乙管中(空白)补加待测酶液 2.00 mL。吸取上述反应液与空白液 5.00 mL 分别置于碘量瓶中,准确加入碘溶液 10 mL,再加氢氧化钠溶液 15 mL,摇匀,密塞,于暗处反应 15 min。取出,加硫酸溶液 2.0 mL,立即用硫代硫酸钠标准溶液滴定,直至蓝色刚好消失为其终点,并根据下式计算:

$$X = (A - B) \times c \times 90.05 \times 32.2 / 5 \times 1 / 2 \times n \times 2 \\ = 579.9 \times (A - B) \times c \times n$$

式中: X——样品的酶活力(U/mL),

A——空白标准硫代硫酸钠消耗量, mL;

B——样品标准硫代硫酸钠消耗量, mL;

c——硫代硫酸钠标准溶液浓度, mol/L;

n——稀释倍数。

酶活力单位定义:1 g 固体酶(或 1 mL 液体酶)于 40 °C、pH4.6 条件下,1 h 分解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖,即为 1 个酶活力单位,以 U/g(U/mL)表示。

1.2.5 蛋白酶活力测定

粗酶液制备:称取 10.00 g 麸曲,加入 200 mL, pH7.5 的磷酸缓冲溶液(40 °C 水浴锅预热 20 min),在 40 °C 水浴中浸出 30 min,根据酶活高低可再用缓冲溶液稀释一定倍数,以使吸光度的测定值在 0.2~0.4 范围内,用干燥滤纸过滤(弃去最初几毫升),即为酶浸液。

标准曲线绘制及酶活测定参考《酿酒分析与检测》^[10]。

表1 菌株 IS518 菌落形态

培养基	尺寸	形状	干湿	高度	透明度	颜色及其他
CA	小	圆	干燥	隆起	不透明	气生菌丝丛毛状,白色,菌落中央隆起,菌落背面呈橙黄色,直径27~30 mm
MEA	大	圆	干燥	平坦	不透明	气生菌丝丛毛状,相对稀疏,白色,菌落表面有皱褶,中央稍呈凸起状,内缘13 mm处与18 mm处有圆弧,菌落呈橙黄色,菌落边缘为白色流苏状菌丝,菌落背面呈橙红色,直径67~70 mm
PDA	较小	圆	干燥	隆起	不透明	气生菌丝丛毛状,相对稀疏,白色,菌落表面有皱褶,且中央裂开,呈橙黄色,菌落背面呈橙黄色,直径38~42 mm
麸皮浸出液培养基	较小	圆	干燥	隆起	不透明	气生菌丝絮状,严密,白色,菌落中央凹陷,内缘8 mm处有橙黄色圆弧,可见明显透明圈,菌落背面为浅橙色,直径35~39 mm

酶活力单位定义:1 g 固体酶粉(或1 mL 液体酶),在一定温度和 pH 值条件下,1 min 水解酪素产生 1 μ g 酪氨酸为一个酶活力单位,以 U/g(U/mL)表示。

1.2.6 酯化力测定^[11]

酯化液制备:取 100 mL 己酸乙醇(吸取 1 mL 己酸于 100 mL 容量瓶中,用体积分数 20% 的乙醇稀释至刻度)溶液于 250 mL 蒸馏烧瓶中,加入相当于 5 g 麸曲的曲量,在 30~32 $^{\circ}$ C 保温酯化 100 h。然后加水 50 mL,加热蒸馏,接收蒸出液 100 mL。用化学分析法测定馏出液中己酸乙酯含量。

酯含量测定:吸取 50 mL 馏出液,加 2 滴 5 g/L 酚酞指示剂,用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定至微红。再准确加入 0.1 mol/L NaOH 标准溶液 25 mL,于沸水浴中回流皂化 30 min,冷却后用 0.1 mol/L 硫酸(1/2 H₂SO₄)标准溶液滴定到酚酞粉红色消失为终点。根据下式计算:

$$\text{酯化力}(\text{mg/g})=(c_1V_1-c_2V_2)\times 144\times 100/50\times 1/m$$

式中: c_1, V_1 ——NaOH 标准溶液浓度与加入体积;

c_2, V_2 ——硫酸(1/2H₂SO₄)标准溶液的浓度与消耗体积;

144——消耗 1 mL 1 mol/L NaOH 标准溶液相当于己酸乙酯的质量,mg/mmol;

50——吸取馏出液体积;

100——馏出液体积;

5——麸曲质量,g。

酯化力:以 1 g 干曲在 30~32 $^{\circ}$ C 反应 100 h 所产生的己酸乙酯的毫克(mg)数表示。

2 结果与分析

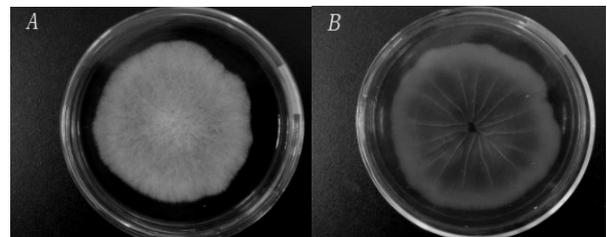
2.1 菌株 IS518 的鉴定

2.1.1 菌株形态结构观察

IS518 在 4 种不同的平板培养基中培养 7 d 的菌落形态见表 1。

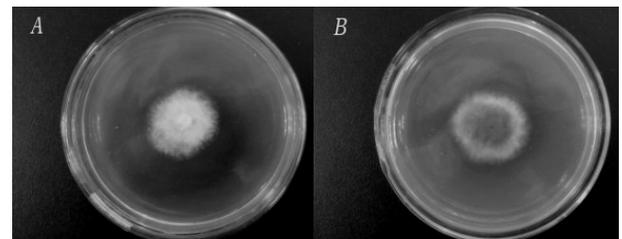
形态特征分析:菌株 IS518 在 MEA 平板上,31 $^{\circ}$ C 下培养 7 d,菌落直径 67~70 mm,菌落平坦,稀疏至中度密集,有时具有少量而且短的气生菌丝,然而通常为丛卷毛状,菌丝体初为白色,随菌落成熟而变成橙色(见图 1);而在 CA 培养基平板上,菌落直径 27~30 mm,菌落

隆起,稀疏,表面质地呈丛毛状,菌丝体白色,背面呈淡色或橙红色(见图 2)。在 PDA 培养基和麸皮浸出液培养基上的菌落形态见图 3 和图 4。



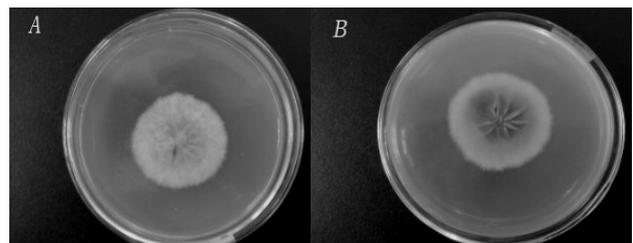
A:正面;B:反面

图1 IS518 菌株在 MEA 培养基上的菌落形态



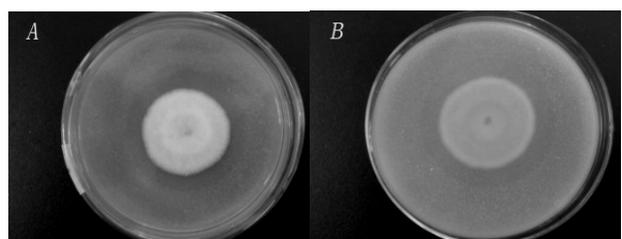
A:正面;B:反面

图2 IS518 菌株在 CA 培养基上的菌落形态



A:正面;B:反面

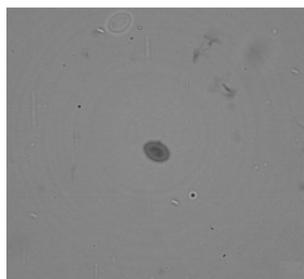
图3 IS518 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态



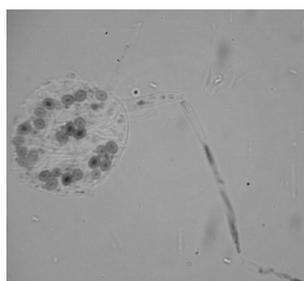
A:正面;B:反面

图4 IS518 菌株在麸皮浸出液培养基上的菌落形态

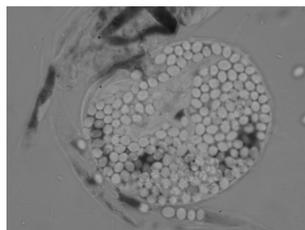
镜检特征见图 5, 菌丝有隔膜, 分生孢子单生, 呈倒梨型 $8 \sim 12 \mu\text{m} \times 8 \sim 11 \mu\text{m}$; 闭囊壳单生在似柄的菌丝上, 直径 $(25 \sim) 45 \sim 60 (\sim 70) \mu\text{m}$, 成熟子囊果直径在 $60 \mu\text{m}$ 左右, 发育中的闭囊壳和分生孢子极多。根据真菌鉴定手册描述^[12], 初步判断该菌株属于红曲属 (*Monascus*)。



菌株 IS518 分生孢子形态图($\times 1000$)



菌株 IS518 闭囊壳形态图($\times 400$)



菌株 IS518 子囊果形态图($\times 400$)

图 5 菌株 IS518 形态图

2.1.2 分子生物学鉴定

为了进一步确定该菌的分类地位, 在形态学的基础上又进行了分子生物学鉴定。用所设计的引物扩增并进行 18S RNA 序列分析, 将测序结果与 NCBI 数据库 BLAST 进行比对, 选取同源性较高的模式菌株进行系统发育分析, 结果见图 6。

由图 6 分析, 菌株 IS518 与 10 株菌株的同一性 (Identity) 均在 99% 以上, 菌株 IS518 与 *Monascus purpureus* 在构建的进化树的同一分枝上, 结合菌株的形态鉴定^[13], 判定菌株 IS518 为红曲霉属的紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*)。

2.2 菌株的生理生化研究

根据 1.2 方法, 分别对菌株 IS518 的液化力、糖化

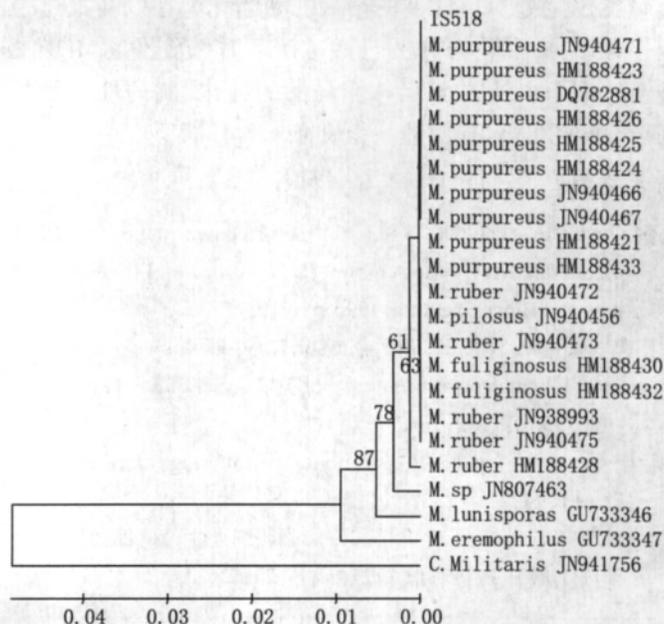


图 6 菌株 IS518 与相关菌株的系统发育树

力、蛋白酶活力 (酪氨酸标准曲线见图 7)、酯化力进行了测定, 测定结果见表 2。

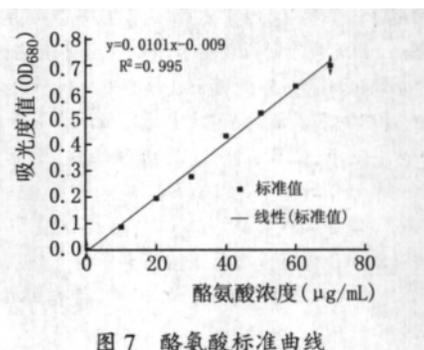


图 7 酪氨酸标准曲线

表 2 菌株 IS518 生理生化能力

项目	结果 (U/mL)
液化型淀粉酶活力	51
糖化酶活力	613
蛋白酶活力	20
酯化力	62.79 mg/g

根据生理生化测定值分析, 菌株 IS518 在液化力、糖化力及蛋白酶活力方面表现普通, 并无突出, 但该菌株对己酸乙酯的酯化力达 62.79 mg/g , 作为己酸乙酯脂肪酶产生菌有着较大的应用潜力。

3 结论

从浓香大曲中得到一株产己酸乙酯脂肪酶的菌株 IS518, 综合形态特征及 18r RNA 系统发育分析, 将菌株 IS518 鉴定为红曲霉属的紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*)。并且对该菌株进行了生理生化能力的研究, 经测定, 该菌的液化型淀粉酶、糖化酶及蛋白酶的活力并无

明显突出之处,但该菌的己酸乙酯酯化力在以往报道中处于较高水平^[1],可作为己酸乙酯香酯液产生菌用于工业生产,同时,有关该菌株脂肪酶的纯化、酶的性质及其对醇、酸的酯化,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Shieh C J, Akoh C C, Yee L N. Optimized enzymatic synthesis of butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 51(3):371-374.
- [2] Welsh F W, Williams R E, Dawson K H. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor[J]. *Journal of Food Science*, 1990, 55(6):1679-1682.
- [3] Evgeny N V. Lipase[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994:271-288.
- [4] 卢世琦,刘光焯,等.合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的筛选及产酶条件[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(1):23-25.
- [5] 刘维英,韩亚杰,胡坤,代斌.合成己酸乙酯脂肪酶产生菌的筛选及发酵条件的研究[J]. *生物技术通报*, 2009(3):115-118.
- [6] 李佐华,吴衍庸,等.浓香型酒酿制酯酶的应用研究[J]. *食品与发酵工业*, 1998, 24(1):42-43.
- [7] 吴乃虎.基因工程原理[M].北京:科学出版社,2001.
- [8] 李秀婷,孙宝国,宋焕禄,吕跃钢,等.一株高产木聚糖酶的枝链霉菌的分离鉴定及产酶[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6):791-797.
- [9] 史永旋,姜涌明,樊鹰,路广强.蛋白酶对解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶活力的影响[J]. *微生物学通报*, 1995, 22(1):22-24.
- [10] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [11] 彭熙敏,黄著,刘超兰,韩瑞枝,等.红曲霉培养条件对酯化力影响的研究[J]. *酿酒科技*, 2009(1):17-20.
- [12] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [13] 李钟庆,郭芳.红曲菌的形态与分类学[M].北京:中国轻工业出版社,2003.

贵州黔酒酒业股份有限公司新品专家品鉴会在筑举行

本刊讯 2012年8月20日,贵州黔酒酒业股份有限公司新品专家品鉴会在贵阳市花溪区花溪迎宾馆举行。本次会议由贵州省轻工科学研究所与贵州黔酒酒业股份有限公司主办,贵州省轻工科学研究所所长、贵州省白酒专家黄平主持。此次品鉴会邀请到的专家有中国资深白酒专家沈怡方、高景炎、陶家驰等7人,另有相关部门领导及各界来宾、新闻媒体等共计150余人参加会议。

品鉴会上,贵州黔酒酒业股份有限公司董事长张方利致词,并向与会专家及来宾简要介绍贵州黔酒酒业股份有限公司的发展历史 and 公司概况。专家组对贵州黔酒酒业股份有限公司所提供的系列酱香型白酒新品——黔酒一号礼宾酒、大师级年份酒、台乡酱酒进行了认真细致的品评,并针对3款酒的品质、市场定位及公司管理、发展等方面进行了讨论,综合品评意见为:

黔酒一号礼宾酒:微黄、清澈透明、酱香突出、醇厚丰满、幽雅细腻、回味悠长、空杯留香持久、酱香风格典型。大师级年份酒:微黄、清澈透明、酱香突出、酒体醇厚、较丰满细腻、回味悠长、空杯留香持久、酱香风格典型。台乡酱酒:微黄、清澈透明、酱香较突出、醇和幽雅、回味长、空杯留香久、酱香风格典型。

贵州黔酒酒业股份有限公司下辖茅台镇等3个酿酒基地,拥有贵州省仁怀市茅台镇乡巴佬酒厂等3个全资子公司。至此,该公司资产突破5亿元,年产大曲酱香2500余吨,浓香、兼香白酒8000余吨,拥有注册商标120个,拥有一个贵州省著名商标和一个贵州名牌产品。(莹子、晓文)

《酿酒科技》获“双核心”期刊专家座谈会在筑举行

本刊讯 2012年8月20日上午,《酿酒科技》获“双核心”(“中国科技核心”与“全国中文核心”)期刊专家座谈会在贵阳市金阳新区举行。本次会议由酿酒科技杂志社主办,邀请到的嘉宾有中国资深白酒专家沈怡方、高景炎、陶家驰等,另酿酒科技杂志社全体同仁参加了此次专家座谈会。会议由酿酒科技杂志社总编黄平主持。

座谈会上,黄平总编就《酿酒科技》杂志的发展历程、办刊思路、目前状况等方面向与会专家作了细致介绍。到会各位专家在听取黄总编的汇报后,针对期刊的发展、办刊思路及栏目的设定等方面提出了宝贵意见。本刊全体同仁认真听取了各位专家的意见,并与在场专家进行了交流。

《酿酒科技》自1980年创刊,已有32个年头,附有英文目次、英文摘要。先后被《中国科技期刊数据库》、《中国农林文献数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、IFIS等列为期刊源。在发展过程中,本刊荣获“国家期刊奖百种重点期刊”、“中国期刊方阵双效期刊”、“《CAJ-CD规范》执行优秀期刊”、“第一届贵州省优秀期刊”,2010年和2011年均获“贵州省报刊出版质量综合评估一级报刊”荣誉,是全面报道中国酿酒工业科学技术的专业杂志,被誉为中国酿酒工业科技进步的向导,2011年《酿酒科技》再度荣获“中国科技核心期刊”及“全国中文核心期刊”。

本刊坚持科技面向经济建设,为生产、科研、教学服务的方向,坚持“双百”方针,内容丰富,信息量大。全面报道中国白酒、啤酒、葡萄酒、黄酒、酒精、果露酒等行业的研究报告和取得的科技进步、科技创新、科技开发和科技应用成果及行业动态,具有行业指导性、科技推广性、生产适用性及科研教学学术参考性。辟有20余个栏目,及时报道海内外科技动态,并向酿酒行业提供相关商品信息和技术服务信息。

此次座谈会上,专家们针对办刊方面所提出的宝贵意见对推动《酿酒科技》的发展具有指导性的重要意义。《酿酒科技》将以严谨的办刊态度继续为中国酿酒行业服务,为行业发展作出应有的贡献。(莹子、晓文)