

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 2 月 17 日 (17.02.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/033010 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) *A23L 27/24* (2016.01)
C12G 3/022 (2019.01) *A23L 17/10* (2016.01)
C12G 3/021 (2019.01) *A23L 17/00* (2016.01)
C12J 1/04 (2006.01) *A23L 5/20* (2016.01)
A23L 27/50 (2016.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/077377

(22) 国际申请日: 2021 年 2 月 23 日 (23.02.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010812299.6 2020 年 8 月 13 日 (13.08.2020) CN
202010812161.6 2020 年 8 月 13 日 (13.08.2020) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 毛健(MAO, Jian); 中国江苏省无锡市滨
湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 刘
双平(LIU, Shuangping); 中国江苏省无锡市滨
湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 张晶
(ZHANG, Jing); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501
张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于
生物材料保藏说明(细则 13 之二. 4(d)(i) 和
48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) **Title:** SACCHAROPOLYSPORA COMPOSITION AND APPLICATION THEREOF IN FOOD

(54) 发明名称: 糖多孢菌组合物及其在食品中的应用

(57) **Abstract:** A Saccharopolyspora composition and an application thereof in food. The composition comprises Saccharopolyspora hirsuta J2 which is screened from wheat koji and has an effect of reducing the content of biogenic amines, and Saccharopolyspora jiangxiensis J3. A hybrid Saccharopolyspora preparation prepared by two strains is used in the preparation process of fermented alcoholic drinks, fermented food, or fermented seasonings, so that the content of amino acids can be increased while the content of biogenic amines is reduced, the nutritional value of fermented products is improved, and then the effects of enhancing the quality of fermented food and improving the safety of the fermented food are achieved.

(57) **摘要:** 糖多孢菌组合物及其在食品中的应用, 该组合物包括从麦曲中筛选获得了具有降低生物胺含量作用的披发糖多孢菌 J2, 和江西糖多孢菌 J3。将两个菌株制备混合糖多孢菌制剂用于发酵酒精饮品、发酵食品或发酵调味品制备过程中, 能够在降低生物胺含量的同时提高氨基酸含量、提高发酵产品的营养价值, 进而达到增强发酵食品品质、提高发酵食品安全性的作用。



WO 2022/033010 A1

糖多孢菌组合物及其在食品中的应用

技术领域

本发明涉及糖多孢菌组合物及其在食品中的应用，属于食品发酵技术领域。

背景技术

黄酒是一种酿造酒，一般以糯米、玉米和黍米为原料，添加麦曲、酵母作为糖化剂、发酵剂，经蒸煮、加曲、糖化发酵、压榨、过滤、煎酒、贮存、勾兑而成。黄酒中除含有水、乙醇主要成分外，还含有 18 种氨基酸，其中包括 8 种必需氨基酸，这 8 种氨基酸比同量葡萄酒、啤酒中多数倍，经常饮用黄酒有益于身体健康；黄酒中含有丰富的抗氧化物质，如多酚、多糖、多肽等，具有抗氧化活性。黄酒酿造不同于啤酒和葡萄酒，采用开放型发酵工艺，发酵体系中氨基酸含量丰富，微生物种类复杂数量繁多，细菌群落结构复杂，参与发酵的细菌主要有醋酸菌、乳酸菌、芽孢杆菌、糖多孢菌等。但是微生物的代谢产物在给黄酒带来独特风味的同时也会使黄酒中含有一些有害物质，如生物胺等。

生物胺是一种含氮有机碱性小分子化合物，由氨基酸脱羧形成，普遍存在于动植物和微生物体内，适量生物胺能够促进生长、清除自由基、增强代谢活性、增强免疫力，在人体内具有重要的生理功能，但过量生物胺的摄入则会引起动脉、血管和微血管的扩大，导致腹泻、头痛、腹部痉挛、呕吐等不良生理反应，甚至会导致死亡。生物胺广泛存在于多种食品中，在酸奶、黄酒、白酒、料酒、酱油、食醋和葡萄酒等发酵食品中含量尤为丰富。

发酵食品中的生物胺主要是由微生物代谢产生的氨基酸脱羧酶作用于游离氨基酸形成的。发酵过程中微生物代谢产生蛋白酶和羧肽酶作用于谷物中的蛋白质，分解产生低分子肽和氨基酸，为生物胺的生成提供了丰富的前体物质，在氨基酸脱羧酶，将会造成生物胺的大量生成。

目前，国内外研究中尚未有关于将糖多孢菌应用于食品发酵及降生物胺方面的报道。因此，利用现代生物技术，筛选优良性能的微生物对于生产高质量、高产量、风味独特优质发酵食品，以及提高发酵食品的安全性具有重要意义。

发明内容

本发明的目的在于解决现有传统酿造食品中生物胺含量较高的问题，提供性能优良的糖多孢菌应用于酒类（白酒和黄酒）、香肠和酱油的发酵过程进行生物强化，以降低发酵食品中的生物胺含量，提高食品的口感和风味，更好的发挥放线菌在传统发酵食品中的应用。

本发明的第一个目的是提供糖多孢菌组合物，含有披发糖多孢菌（*Saccharopolyspora hirsuta*）J2 和江西糖多孢菌（*Saccharopolyspora jiangxiensis*）J3；

所述披发糖多孢菌（*Saccharopolyspora hirsuta*）J2，已于 2020 年 4 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC NO: M 2020103；

所述江西糖多孢菌（*Saccharopolyspora jiangxiensis*）J3，已于 2020 年 4 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为中国，武汉，武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO: M 2020104。

本发明的披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3，均具有如下优良的性能：

- （1）应用于食品发酵体系，不会影响到食品的正常发酵；
- （2）该菌株制作的纯种麦曲适用于黄酒的发酵，可以提高黄酒中氨基酸含量；
- （3）生物胺产生量均小于 2.5 mg/L，生物胺检出量极少；
- （4）对酪胺、组胺、腐胺、尸胺均有降解作用；
- （5）可以适用于香肠、黄酒、白酒、奶酪和酱油发酵，并且具有降生物胺的能力。

本发明的第二个目的是提供含有所述糖多孢菌组合物的微生物制剂。

在一种实施方式中，所述每克或每毫升发酵剂中的糖多孢菌的数量 $\geq 1 \times 10^6$ CFU。

在一种实施方式中，所述微生物制剂是将所述糖多孢菌接种至放线菌液体培养基中，28~30℃培养获得含有糖多孢菌细胞的发酵剂。

本发明的第三个目的是提供应用所述糖多孢菌组合物制备的曲，其制备方法为：将原料破碎经加水搅拌、灭菌后，在无菌环境下接入菌种，接种量为 5%-15%，菌液浓度为 $10^5 \sim 10^8$ cfu/mL，25~55℃培养 72~96 h，培养结束后，保藏备用。

在一种实施方式中，所述糖多孢菌曲原料蒸煮后在无菌条件下摊凉；接入曲和原料混匀过程，以及后期开耙过程均在无菌环境中进行；所述糖多孢菌曲在无菌环境中接种和培养得到。

在一种实施方式中，所述曲是应用所述披发糖多孢菌 J2 或所述江西糖多孢菌 J3 制备的纯种麦曲混合后的混合麦曲。

在一种实施方式中，所述麦曲的制备方法包括如下步骤：

(1) 碾麦：小麦破碎程度为每粒 3-5 片，带少量粉末，使麦粒组织破碎，淀粉外露；

(2) 润麦：向步骤(1)处理后的物料中物料质量加入 30-40%的清水，搅拌 15-25 min，使其充分均匀的吸收水分；

(3) 蒸煮灭菌：将步骤(2)处理后的物料蒸煮灭菌；

(4) 接种：待步骤(3)的物料降温至低于 40℃后，接种活化后的披发糖多孢菌 J2，接种浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL；

(5) 发酵。

在一种实施方式中，所述步骤(5)的发酵包括如下步骤：

a) 孢子发芽期：曲料进盘6小时后，品温缓慢上升至34-35℃左右，自控模式启动小风量间接通风，每次5-10分钟，间隔2小时，使品温降到32℃，要求均匀吹透；

b) 菌丝生长期：间歇通风3-5次后，菌丝开始生长，品温升至35℃以上，曲料开始结块，此时应连续通风，维持品温 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ；

c) 菌丝繁殖期：接种后12小时，品温上升较快，此时应视第一次结块情况进行翻曲，翻曲前，先升起测温探头，开启翻曲机，后摊平，放下测温头，开启通风及喷雾系统；

d) 第一次翻曲后，品温保持在36-37℃之间，保持通风喷雾顺畅，约20小时后，曲料再次结块，眼观曲料发白，温度控制在37℃以下，进行第二次翻曲，二次翻曲过后，品温应控制在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

本发明的第四个目的是提供所述混合麦曲在发酵黄酒中的应用。

本发明的第五个目的是提供所述混合麦曲在制备发酵食品、饮品或调味品中的应用。

在一种实施方式中，所述食品包括但不限于香肠的发酵或半发酵食品。

在一种实施方式中，所述饮品包括但不限于黄酒或白酒发酵。

在一种实施方式中，所述调味品包括但不限于酱油或香肠。

在一种实施方式中，所述应用是采用所述混合麦曲与酿酒原料混合后进行发酵。

在一种实施方式中，所述方法是将纯种麦曲按照 12~16%的接种量在发酵罐中与米饭、酒母等原料混匀后进行发酵，发酵采用传统发酵工艺。

本发明的第六个目的是提供所述糖多孢菌组合物或混合麦曲在香肠、黄酒、白酒、酱油、奶酪中降生物胺的应用。

在一种实施方式中，所述生物胺包括但不限于酪胺、组胺、腐胺、尸胺。

在一种实施方式中，所述酿造黄酒和白酒是先利用所述糖多孢菌制成纯种曲，添加到酒类的发酵中。

本发明的有益效果：

(1) 本发明的菌株应用于食品发酵体系，不会影响到食品的正常发酵；

(2) 用披发糖多孢菌 J2 制作的纯种麦曲可用于黄酒发酵，不仅可以促进酒精产率而且可以提高黄酒中氨基酸含量；纯种发酵黄酒中氨基酸的含量最高达到了 6434.81 ± 123.3 mg/L，相比于对照组样品提高了 40.37%；且该菌株的添加对传统黄酒风味影响不明显；添加 *S. hirsuta* J2 的样品组相比较对照组生物胺含量降低了 21.71%，同时提高了黄酒中氨基酸态含量和营养

价值, 达到了提高黄酒中氨基酸和挥发性物质含量和提升黄酒品质目的。

(3) *S. hirsuta* J2 的生物胺产生量均小于 2.5 mg/L, 生物胺检出量极少, 基本不产生生物胺。*S. hirsuta* J2 对酪胺的降解率达到 77.41%, 对组胺的降解率达到 100%, 对腐胺的降解率分别达到 58.1%, 对尸胺的降解率达到 47.71%, 对总生物胺的降解率达到 72.98%, 具有良好的降生物胺的能力。

(4) 该糖多孢菌同时具有降发酵食品中生物胺的效果, 将其应用于香肠发酵中, 添加 *S. hirsuta* J2 发酵后香肠中生物胺平均含量为 129.60 mg/kg, 生物胺的降低效果显著, 比对照组降低了 36.19%; 添加 *S. hirsuta* J2 的白酒相比较对照组生物胺含量降低了 24.32%; 添加 *S. hirsuta* J2 的酱油相比较对照组生物胺含量降低了 34.28%。添加 *S. hirsuta* J2 的奶酪相较于对照组生物胺含量降低了 16.37%,

(5) 糖多孢菌 *S. hirsuta* J2 具有提质降害的作用, 将其应用于香烟发酵中, 添加 *S. hirsuta* J2 的发酵烟叶有害成分-焦油量、HCN、苯酚、NH₃ 和亚硝酸盐的含量相较对照组分别下降了 23.51%, 16.25%, 19.75%, 27.09% 和 37.62%。

(6) 糖多孢菌 *S. hirsuta* J2 具有提高营养转化率的作用, 将其应用于饲料发酵中, 添加 *S. hirsuta* J2 的发酵饲料中有机酸的含量相较于对照组提高了 26.77%, 氨基酸含量提高了 21.98%, 粗蛋白含量提高了 18.53%。

本发明还提供了含有披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3 的复合菌剂, 该复合菌剂具有如下用途:

(1) 添加糖多孢菌复合菌剂发酵黄酒中氨基酸的含量最高; 菌株的添加对传统黄酒风味影响均不明显; 对生物胺含量的降低降低效果相比于对照组降低了 42.17%, 提高了黄酒中氨基酸态含量和营养价值, 达到了提高黄酒中氨基酸和挥发性物质含量和提升黄酒品质目的;

(2) 糖多孢菌复合菌剂具有降生物胺效果, 添加复合菌剂的臭鳊鱼生物胺含量比对照组下降了 20.87%, 用于生产料酒可使料酒中的生物胺含量相比较对照组降低 23.16%, 用于生产食醋可使生物胺含量相比较对照组降低了 25.08%, 用于生产奶酪可使奶酪中生物胺含量相较于对照组降低了 13.33%。

(3) 糖多孢菌复合菌剂具有提质降害的作用, 将其应用于香烟发酵中, 添加复合菌剂的发酵烟叶有害成分-焦油量、HCN、苯酚、NH₃ 和亚硝酸盐的含量相较对照组分别下降了 30.12%, 17.14%, 22.01%, 16.73% 和 27.15%。

(4) 糖多孢菌复合菌剂具有提高营养转化率的作用, 将其应用于饲料发酵中, 添加复合菌剂的发酵饲料中有机酸的含量相较于对照组提高了 29.18%, 氨基酸含量提高了 10.22%, 粗蛋白含量提高了 14.48%。

生物材料保藏

江西糖多孢菌 (*Saccharopolyspora jiangxiensis*) J3, 分类命名为江西糖多孢菌 (*Saccharopolyspora jiangxiensis*) J3, 已于 2020 年 4 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国, 武汉, 武汉大学, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2020104。

披发糖多孢菌 (*Saccharopolyspora hirsuta*) J2, 分类命名为披发糖多孢菌 (*Saccharopolyspora hirsuta*) J2, 已于 2020 年 4 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为中国, 武汉, 武汉大学, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2020103。

附图说明

图 1 为糖多孢菌 J2 的系统发育树。

图 2 为糖多孢菌 J3 的系统发育树。

图 3 为黄酒发酵过程中理化指标的变化; (A) 酒精度; (B) 还原糖; (C) 可滴定酸; (D) 氨基酸态氮。

图 4 为糖多孢菌 J2 黄酒发酵样品风味物质的主成分分析。

图 5 为糖多孢菌 J3 黄酒发酵样品风味物质的主成分分析。

具体实施方式

黄酒理化指标的检测：酒精度、氨基酸态氮和总酸的测定按照 GB/T 13662-2018 进行检测。生物胺含量风味物质采用高效液相（HPLC）和气质联用仪器（GC-MS）进行检测。还原糖含量测定采用 DNS 方法。

香肠理化指标的检测：粗蛋白含量按照 GB5009.3-2010 半微量凯氏定氮法进行检测；水分含量按照 GB/T 9695.15-2008 方法进行测定。pH 测定：取 10 g 样品加入 90 mL 蒸馏水匀浆后静置 2min，用 pH 计测定上清液 pH 值。

生物胺含量测定方法：准确量取 1 mL 待测液于 15 mL 离心管中，加入 1 mL 饱和 NaHCO_3 溶液，混匀，加入 2 mL 丹磺酰氯（5 mg/mL 丙酮）试剂，混匀后置于 65°C 恒温水浴锅中黑暗衍生 30 min，室温静置后，加入 0.5 mL 饱和 NaCl 溶液，混匀后加入 5 mL 乙醚，涡旋振荡 20 s，静置分层后，转移上层有机相于 15 mL 离心管中，下层水相再萃取一次，合并两次萃取液，50°C 水浴下氮气吹干。加入 1 mL 乙腈振荡混匀，溶解残留物，过 0.22 μm 滤膜，通过高效液相色谱法（HPLC）测定。

实施例 1：糖多孢菌的筛选及鉴定

（1）样品的采集及预处理

麦曲样品采自浙江省绍兴市某黄酒厂，采集的麦曲置于密封的无菌塑料袋中 4°C 保存。称取 5 g 麦曲于 50 mL 离心管中，添加 30 mL 蒸馏水放入 30°C 摇床培养箱中培养 30 min。

（2）菌株的平板筛选

放线菌筛选培养基：硝酸钾 1.0 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，硫酸亚铁 0.01 g/L，氯化钠 0.5 g/L，可溶性淀粉 20.0 g/L，琼脂 15.0 g/L，pH 值 7.2-7.4（25°C）。

在无菌操作环境下，用无菌移液枪吸取 1 mL 样品置于 15 mL 无菌离心管中，加无菌水至 10 mL，充分混匀，制成 10^{-1} 的样品匀液。用无菌移液枪吸取 10^{-1} 样品匀液 1 mL 于 15 mL 无菌离心管中，加无菌水至 10 mL，充分混匀，制成 10^{-2} 的样品匀液。按上述操作，以此制成 10^{-1} ~ 10^{-6} 十倍递增系列麦曲、米浆水、发酵醪稀释匀液。

分别吸取麦曲、发酵醪、米浆水各稀释度菌液 100 μL 涂布于放线菌筛选培养基，28°C 培养 1~7 d。在菌落密度适中的平板上挑取单个乳白色、菌落薄、有隆起或凸面、略皱的菌落，分别划线接种到放线菌筛选培养基上，反复划线确定纯菌落，并保存筛选菌株。

（3）菌株鉴定

提取筛选菌株的基因组，并对筛选菌株进行 16S rDNA 扩增测序。

PCR 扩增引物 27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）和 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）。

PCR 扩增体系（50 μL ）为：2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μL ，上下引物各 1 μL ，模板 1 μL ，加无菌水 22 μL 补充至 50 μL 。

PCR 扩增程序：94°C 预变性 3 min，95°C 变性 30 s，58°C 退火 30 s，72°C 延伸 2 min，共 35 个循环，最后 72°C 延伸 8 min。

PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，并送交基因测序公司测序，根据返回的测序结果，通过 NCBI 官网进行 BLAST 序列比对，用所得的 16S rDNA 序列进行 BLAST 比对，并进行了系统发育分析，结果如图 1~2 所示，菌株 J2 的核苷酸序列（SEQ ID NO.1）与糖多孢菌 *S. hirsuta*（GenBank 登录号：MN515057.1 和 NR_118870.1）的同源相似性达在 98.30% 以上，将菌株命名为披发糖多孢菌 J2。菌株 J3 的核苷酸序列（SEQ ID NO.2）与糖多孢菌属 *S. jiangxiensis*（GenBank 相似序列号：MG255179.1）的同源相似性在 98.84% 以上，将该菌株命名为江西糖多孢菌 J3。

（4）披发糖多孢菌 J2 菌株生物胺代谢能力的分析

菌种活化：将保藏的披发糖多孢菌 J2 接种到放线菌液体培养基中，接种量 10%，30 °C 摇床培养 48 h，得一级种子液。将活化的菌株接种到放线菌液体培养基中，接种量 10%，摇床培养 48 h，转速 150 r/min，温度 30 °C。

样品预处理：将菌种分别接种于检测生物胺产生培养基和检测生物胺降解培养基中，28 °C 摇床培养 5 d，12000 r/min 离心 5 min 收集上清液。

放线菌液体培养基：硝酸钾 1.0 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，硫酸亚铁 0.01 g/L，氯化钠 0.5 g/L，可溶性淀粉 20.0 g/L，pH 值 7.2-7.4 (25 °C)。

检测生物胺产生培养基：放线菌液体培养基中添加 L-酪氨酸 0.4 g/L，L-组氨酸 1 g/L，L-赖氨酸 1 g/L，L-鸟氨酸 1 g/L，5'-磷酸吡哆醛 0.05 g/L。

检测生物胺降解培养基：放线菌液体培养基中添加 50 mg/L 生物胺（包括组胺、酪胺、尸胺、腐胺、精胺、亚精胺、色胺、 β -苯乙胺），调节 pH 至 6.0-6.2。

披发糖多孢菌 J2 降生物胺效果分析：在检测生物胺产生培养基和检测生物胺降解培养基中培养后的披发糖多孢菌 J2 的生物胺产生量小于 2.5 mg/L，生物胺检出量极少，表明基本上没有检测到生物胺的含量，因此认为不产生生物胺。披发糖多孢菌 J2 对酪胺的降解率为 77.41%，对组胺的降解率达到 100%，对腐胺的降解率达到 58.1%，对尸胺的降解率达到 47.71%，对总生物胺的降解率达到 72.98%，说明菌株均有良好的降生物胺的能力。

(5) 糖多孢菌 J3 生物胺代谢能力的分析

对江西糖多孢菌 J3 降生物胺效果进行分析：在生物胺前体存在的培养基中培养后的江西糖多孢菌 J3 的各类生物胺产生量均小于 2.5 mg/L，生物胺检出量极少，表明基本上没有检测到生物胺的含量，因此认为不产生生物胺。江西糖多孢菌 J3 对酪胺的降解率分别 81.55%，对组胺的降解率分别达到 100%，对腐胺的降解率分别达到 51.8%，对尸胺的降解率分别达到 40.01%，对总生物胺的降解率达到 69.09%。说明该菌株具有良好的降生物胺的能力。

实施例 2：糖多孢菌的活化培养

放线菌液体培养基：硝酸钾 1.0 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，硫酸亚铁 0.01 g/L，氯化钠 0.5 g/L，可溶性淀粉 20.0 g/L，pH 值 7.2-7.4 (25 °C 下测定)。

PDA 培养基：马铃薯粉 6.0 g/L；葡萄糖 20.0 g/L，琼脂 20.0 g/L，pH 5.4-5.8，121 °C 高压灭菌 15 min；固体培养基在此基础上添加。

MRS 培养基：牛肉膏 10 g/L，蛋白胨 10 g/L，酵母膏 0.5 g/L，葡萄糖 20 g/L，吐温 80 0.10 g/L，醋酸钠 5 g/L，磷酸氢二钾 2 g/L，柠檬酸氢二铵 2 g/L，硫酸镁 0.58 g/L，硫酸锰 0.28 g/L。

将实施例 1 筛选的披发糖多孢菌 J2 接种到放线菌液体培养基中，接种量 10%，30 °C 摇床培养 48 h，得一级种子液。将活化的菌株接种到放线菌液体培养基中，接种量 10%，摇床培养 48 h，转速 150 r/min，温度 25 ~ 45 °C，获得菌浓为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的菌液，待培养成熟后用于纯种麦曲的制备。

将保藏的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 接种到 PDA 平板上，28 °C 培养 3~5 天；然后用无菌水清洗孢子液，再次转接到 PDA 茄形瓶中，温度 28 °C 培养 3~5 天，获得菌浓为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的菌液，待孢子成熟后用于纯种麦曲的制作。

将保藏的乳杆菌 *L. plantarum* (*Lactobacillus plantarum*) 接种到 MRS 培养基中，接种量 10%，37 °C 恒温厌氧培养 24 h，得到一级种子培养液，将活化的种子液再次接种到 MRS 液体培养基中，接种量为 10%，37 °C 恒温厌氧培养 24 h，获得菌浓为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的菌液，菌种培养成熟后用于纯种麦曲制作。

江西糖多孢菌 J3 纯种麦曲按照上述相同方法制备，区别在于，将披发糖多孢菌 J2 替换为江西糖多孢菌 J3。

实施例 3：糖多孢菌纯种麦曲的制备

(1) 碾麦：小麦破碎程度为每粒 3-5 片，带少量粉末，使麦粒组织破碎，淀粉外露；

(2) 润麦：向步骤(1)处理后的物料中加入约 35~40%的清水，搅拌 20~25 min，使其充分均匀的吸收水分；

(3) 蒸煮灭菌：将步骤(2)处理后的物料于 121℃灭菌 30 min；

(4) 接种：待步骤(3)的物料降温至 36℃后，接种按照实施例 2 的方法活化的菌种，接种菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL，接种量为 5%-15%。

(5) 曲料进盘后保持适当品温及室温，静置培养六小时左右。

a) 孢子发芽期：曲料进盘六小时后，品温缓慢上升至 34-35℃左右，自控模式启动小风量间接通风，每次 5-10 分钟，间隔 2 小时，使品温降到 32℃，要求均匀吹透。

b) 菌丝生长期：间歇通风 3-5 次后，菌丝开始生长，品温升至 35℃以上，曲料开始结块，此时应连续通风，维持品温 35℃左右。

c) 菌丝繁殖期：接种后 12 小时，品温上升较快，此时应视第一次结块情况进行翻曲，翻曲前，先升起测温探头，开启翻曲机，后摊平，放下测温头。开启通风及喷雾系统。

d) 第一次翻曲后，品温保持在 36-37℃之间，保持通风喷雾顺畅，约 20 小时后，曲料再次结块，眼观曲料发白，温度难以控制在 37℃以下，进行第二次翻曲，二次翻曲过后，品温应控制在 35℃左右。

(6) 出曲：培养 72~96 h；培养结束后，将麦曲置于 4-7℃冰柜中储藏备用；

按照以上方法分别制备获得菌体数量级为 10^{15} CFU/g 的披发糖多孢菌 J2 纯种麦曲、江西糖多孢菌 J3 纯种麦曲。

实施例4：糖多孢菌混合麦曲的制备

将实施例 3 制备的披发糖多孢菌 J2 纯种麦曲和江西糖多孢菌 J3 纯种麦曲以任意比例混合，制备获得混合麦曲。

可选地，用于酿酒酒精饮品发酵的混合麦曲是将披发糖多孢菌 J2 纯种麦曲和江西糖多孢菌 J3 以 1: (0.8~1.5) 的质量比混合。

实施例5：糖多孢菌纯种麦曲在黄酒发酵中的应用

(1) 本实施例所选取的传统黄酒发酵的原料配比（以每升发酵体积计）为：

蒸熟的米饭：500 g；清水 417 L；酒母：38 g；

(2) 传统黄酒酿造过程

a) 酵母活化培养：将甘油保藏管的酵母菌，在无菌操作台进行转接到 YPD 培养基中，30℃，150 r/min 条件下培养 24 h；然后转接到制备好的酒母中，将转接好的酵母在 30℃，150 r/min 条件下，进行培养 18-24 h，备用。

b) 酒母的制作：取 600 g 蒸熟的米饭，加入 1600 mL 清水，60 g 生麦曲，800 U/g 米饭的糖化酶进行糖化，糖化的温度控制在 55-65℃，时间 3-4 小时，糖化结束后外观糖度不低于 12°Bx 后，115℃灭菌 15 min，灭菌后冷却至 24~31℃，接入成熟的酵母种子培养液 5%，培养温度不超过 30℃，培养时间 24 h，培养成熟后即得酒母。

c) 按照步骤(1)所述的传统黄酒发酵的原料配比进行落料和发酵。实验组：纯种麦曲：45.3 g 对照组：生麦曲：39.3 g；熟麦曲：6.0g。

前四天为前酵阶段，温度控制在 28~30℃，发酵 4 d，前 4 d 每天开耙不少于 1 次，头耙时间 8-10 h；后酵阶段，温度为 13~15℃，每天搅拌开耙一次，持续发酵 10~15 d。

对照组 (TF Control) 是将本实施例中 c) 中的纯种麦曲调整为工厂取样的生麦曲 39.3 g/L 和熟麦曲 6.0 g/L。

实施例6：糖多孢菌混合麦曲在黄酒发酵中的应用

混合麦曲发酵组采用披发糖多孢菌 J2 纯种麦曲和江西糖多孢菌 J3 纯种麦曲的复配麦曲与酿酒酵母采用传统酿造方法共同发酵。

复合菌剂组 (Mix) 按照菌体数量 1:1 的比例添加披发糖多孢菌 J2 纯种麦曲和江西糖多孢菌 J3 纯种麦曲，添加量共 45.3 g。

黄酒发酵过程中理化指标的变化：为了进一步验证糖多孢菌在黄酒发酵中的作用，对比了传统麦曲和纯种麦曲发酵过程中理化指标（酒精度，还原糖，可滴定酸和氨基酸态氮）的变化。纯种发酵共分为 6 组，分别为 *A. flavus*（黄酒发酵中的常用菌），*A. oryzae*（日本清酒酿造中的常用菌），*S. jiangxiensis* J3，Mix 和 *L. plantarum*，这 5 种纯种麦曲分别与酿酒酵母采用传统酿造方法共同发酵。至发酵结束，除 *L. plantarum* 组外，其他各组酒精度、酸度和氨基酸态氮含量均达到黄酒国家标准（图 3）。*L. plantarum* 组可滴定酸含量迅速增加到 17.50 g/L，样品出现明显的酸败。说明糖多孢菌对黄酒发酵过程中重要理化指标影响不大，发酵正常。

黄酒发酵样品中氨基酸含量：采用 HPLC 方法对发酵黄酒中的氨基酸含量进行了分析，添加 *S. hirsuta* J2 实验组中的氨基酸含量达到 6434.81±123.3 mg/L，相比于对照组提高了 40.37%。Mix，*A. flavus* 和 *A. oryzae* 实验组的氨基酸含量相差不大，但是均显著高于对照组（TF Control）；而添加 *S. jiangxiensis* J3 实验组的总氨基酸含量则与对照组相差不大，部分氨基酸含量显著超出对照组。

表 1 黄酒发酵样品中的氨基酸含量分析

mg/L	TF Control	<i>A. flavus</i>	<i>A. oryzae</i>	Mix	<i>S. jiangxiensis</i> J3	<i>L. plantarum</i>
Asp	172.94±15.89	255±14.24	333.26±7.48	355.99±72.02	199.4±28.17	99.89±7.78
Glu	516.86±42.94	783.95±12.37	866.45±27.67	635.99±106.59	498.28±71.53	415.12±32.04
Asn	123.95±7.52	153.64±30.65	184.51±3.41	195.61±49.55	111.75±23.6	95.89±8.05
Ser	67.66±3.83	90.51±18.2	274.78±5.61	216.54±32.15	101.12±12.5	27.02±7.15
Gln	315.06±17.31	433.09±15.19	438.03±7.36	475.45±103.7	299.04±46.13	115.66±47.26
His	80.01±8.57	105.37±10.58	121.28±5.8	148.57±51.83	62.81±17.83	50.65±18.85
Gly	169.7±19.75	292.95±5.67	374.39±18.53	398.02±44.28	240.61±20.66	80.2±10.89
Thr	101.18±20.49	151.8±6.19	131.38±11.09	146.72±42.94	55.69±7.81	44.36±4.78
Arg	313.12±213.87	524.16±184.11	412.13±5.66	528.4±178.2	384.33±80.6	713.42±74.24
Aala	327.06±33.76	431.84±22.42	553.68±3.08	457.64±161.32	423.41±47.88	154.45±7.95
gaga	86.89±13.71	101.5±3.53	117.58±2.45	137.54±26.05	151.08±62.91	106.25±15.86
tyr	346.68±30.96	334.19±45.55	490.71±6	339.04±74.18	297.97±40.1	250.97±13.44
cys-s	65.91±2.07	101.36±44.88	9.74±1.71	26.19±9.44	28.92±14.23	25.28±21.25
val	241.78±9.77	334.94±3.44	325.35±2.51	263.89±60.77	245.62±33.19	143.27±10.84
met	67.06±0.63	102.32±2.82	77.07±1.76	54.86±13.11	23.53±2.76	41.15±1.46
trp	101.26±5.8	135.6±5.44	139.43±1.15	157.61±26.34	111.35±25.44	83.05±4.56
phe	374.52±10.99	495.37±3.34	451.88±2.66	302.39±62	279.74±37.17	277.99±10.76
ile	179.49±9.85	261.47±10	290.16±5.36	179.84±18.62	149.25±16.88	100.74±7.66
leu	597.15±12.93	836.29±13.54	703.73±6.12	509.94±40.05	377.94±42.1	339.71±20.96
lys	302.76±17.5	338.29±16.8	275.44±0.53	356.05±97.92	208.68±44.52	181.68±26.3
pro	33.26±20.14	43.72±6.69	59±9.81	135.02±27.19	115.82±27.26	128.42±30.41
合计	4584.28±105.2	6307.36±322.1	6630±101.19	6021.30±117.9	4366.34±567.73	3475.15±227.
	8	3		2		53

注：gaga 为 γ -氨基丁酸。

糖多孢菌降生物胺效果分析：所得产品用高效液相法检测黄酒中生物胺含量，添加披发糖多孢菌 J2 的样品组相比较对照组降低了 21.71%；添加江西糖多孢菌 J3 的样品组相比较对照组降低了 35.09%。添加披发糖多孢菌 J2 组和江西糖多孢菌 J3 的复合菌剂（Mix 组）相比较对照组降低了 42.17%。

纯种发酵与传统发酵风味分析：采用主成分分析法对纯种和传统发酵样品中风味成分的变化和相似性进行了分析。所有样本的 biplot 分析表明，披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3 发酵的黄酒中前两个主成分的方差累积贡献率均为 83.6%，这可以解释大多数发酵样本的风

味差异。从图 4 可以看出,传统发酵组与 *S. jiangxiensis* J3 组聚在一起,与曲霉(*A. flavus* 和 *A. oryzae*)组和 *L. plantarum* 组明显分离。这说明糖多孢菌参与了大多数风味物质的合成,并在黄酒发酵中起主导作用。

实施例7: 糖多孢菌菌剂在黄酒发酵中的应用

以实施例 5 中的传统黄酒落料配方进行黄酒发酵,实验组分别设置 Mix 组和江西糖多孢菌 J3 组,区别在于,麦曲接种比例均为 10%;江西糖多孢菌 J3 组接种江西糖多孢菌 J3 组纯种麦曲; Mix 组接种应用江西糖多孢菌 J3 和披发糖多孢菌 J2 混合菌液按照实施例 3 的方法制备的复合菌种麦曲。黄酒酿造工艺和指标测定方法参照实施例 4 进行。

(1) 对黄酒基本理化指标的影响

根据表 2 可以看出发酵结束后各组酒精度达到 14% v/v 左右,所有样品的还原糖、总酸和氨基酸态氮含量均在 4.52-5.03 g/L,均符合黄酒的理化要求。显著性分析表明 Mix 组与江西糖多孢菌 J3 组的酒精度、总酸含量和氨基酸态氮含量与对照组差异均不明显 ($P>0.05$),说明接种糖多孢菌披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3 对黄酒发酵过程中重要理化指标影响不大,不会对黄酒发酵过程带来不利影响。

表 2 发酵结束时黄酒理化指标

指标	对照组	Mix 组	江西糖多孢菌 J3 组
酒精度 (% v/v; 20℃)	14.20±0.60	14.20±0.72	14.30±0.50
还原糖含量 (g/L)	20.02±1.64	24.25±0.23	9.45±3.13
总酸含量 (g/L)	4.68±0.09	4.74±0.26	4.81±0.16
氨基酸态氮含量 (g/L)	0.82±0.04	0.84±0.06	0.82±0.02

(2) 糖多孢菌对黄酒生物胺含量的影响

发酵结束后,接种复合菌剂 Mix 组、江西糖多孢菌 J3 组的样品生物胺含量分别为 15.57±0.44 mg/L 和 16.88±1.41 mg/L,均低于对照组的 26.75±2.39 mg/L。披发糖多孢菌 J2 总胺含量的平均值与对照组相比降低了 41.79%;江西糖多孢菌 J3 组与对照组相比降低了 36.90%。说明复合菌剂 Mix、江西糖多孢菌 J3 均有降低生物胺含量的作用。

综上所述,在黄酒发酵体系中接种复合菌剂 Mix、江西糖多孢菌 J3 均不影响黄酒的正常品质,且对总胺的降解率分别达到了对照组的 41.79%和 36.90%。说明直接添加复合菌剂 Mix、江西糖多孢菌 J3 均有应用于黄酒生产、调控黄酒中生物胺含量的潜力,复合菌剂 Mix 对黄酒中生物胺的降解效果更佳。

实施例 8: 披发糖多孢菌 J2 应用于发酵香肠中降低生物胺含量

(1) 菌种的活化培养

放线菌液体培养基:硝酸钾 1.0 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L,硫酸镁 0.5 g/L,硫酸亚铁 0.01 g/L,氯化钠 0.5 g/L,可溶性淀粉 20.0 g/L, pH 值 7.2-7.4 (25℃下测定)。

将保藏的糖多孢菌 *S. hirsuta* J2 接种到放线菌液体培养基中,接种量 10%,30℃摇床培养 59 h,得一级种子液。将活化的菌株接种到放线菌液体培养基中,接种量 10%,摇床培养 48 h,转速 150 r/min,温度 30℃,待培养至菌浓数量级为 $10^5\sim 10^7$ cfu/mL 后用于发酵香肠。

(2) 发酵香肠的制备

按质量计,取瘦肉 65~80%、肥肉 20~35%。清洗,去除骨、筋腱、肌膜、淋巴、血管、病变及损伤部位。肥瘦分开,切成 4~5cm 肉块。将瘦肉和 5~8%左右冰屑放入斩拌机内,斩拌 1~3min。以猪肉质量为基数,添加亚硝酸钠 0.01~0.15%、食盐 2~3%、复合磷酸盐 0.2~0.3%、抗坏血酸钠 0.05~0.06%。香辛料、胡椒、大蒜、辣椒、肉蔻为原料肉的 0.2%~0.3%。其中两组分别接种 8~12%活化的糖多孢菌,一组不接种作为对照,斩拌 1~2min,再加入肥肉和 5~8%左右冰屑,斩拌 4~6min。腌制后灌入肠衣中。香肠的发酵工艺参数如表 3 所示。

表 3 香肠发酵工艺参数

加工工序	温度/℃	时间	相对湿度/%
腌制	4	12 h	--
发酵	30	pH 值降到 5.1 所需时间	90
成熟 0 d	14~16	1 d	75~80
成熟 1 d	14~16	1 d	70~75
成熟 2~10 d	14~16	9 d	65~70

(3) 披发糖多孢菌 J2 降生物胺效果分析

以实施例 1 中的方法进行菌种活化和生物胺含量的测定。

样品前处理方法：称取绞碎后样品 5.0 g 于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 5% 的三氯乙酸并超声 30 min，转移至 50 mL 具塞离心管中，6 000 r/min 离心 10 min，转移上清液至 50 mL 容量瓶中，残渣用 20 mL 上述溶液再提取 1 次，合并上清液并稀释至刻度。

由表 4 可知，添加披发糖多孢菌 J2 发酵后的香肠在发酵成熟后 pH 分别为 6.16 ± 0.16 ，而对照组则为 6.51 ± 0.17 ，水分含量和粗蛋白含量差异均不明显；添加 *S. hirsuta* J2 发酵的香肠成熟后生物胺平均含量为 129.60 mg/kg，比对照组降低了 36.19%。

表 4 发酵成熟香肠指标

指标	对照组	披发糖多孢菌 J2
pH 值	6.51 ± 0.17	6.16 ± 0.16
水分	62.56 ± 7.04	67.66 ± 2.68
粗蛋白	59.66 ± 3.17	59.31 ± 6.75
生物胺	229.03 ± 12.00	129.60 ± 7.10

实施例 9：糖多孢菌 J2 应用于白酒中降低生物胺含量

白酒酿造使用的糖多孢菌纯种麦曲参照按照实施案例 3 中麦曲制作方法。以实施案例 1 中的方法进行生物胺含量的测定。

白酒酿造方法采用两轮发酵法，第一轮发酵时高粱蒸熟后，风冷降温至 25℃，添加 4% 米曲霉种子液，在 28℃ 温度下培养 24 h。添加稻壳 10%、大曲 15%、麸皮 8%、纯种麦曲 5~9%、按 1% 的比例接入酿酒酵母种子液，然后密封，发酵 30 天后进行蒸酒。二轮发酵时添加中温大曲 10%、按 1% 的比例接入酿酒酵母种子液，酵母菌种子液浓度为 $10^{10} \sim 10^{12}$ cfu/mL，继续发酵 12~15 天后进行蒸酒。

对糖多孢菌 *S. hirsuta* J2 降生物胺效果分析：将蒸馏后的白酒勾兑成酒精度 60% (V/V)，检测勾兑后样品中生物胺含量，添加 *S. hirsuta* J2 的样品组相比较对照组降低了 24.32%。

实施例 10：披发糖多孢菌 J2 应用于酱油中降低生物胺含量

以实施例 1 中的方法进行菌种活化和生物胺含量的测定。酱油采用高盐稀态法进行酿造：

(1) 首先将豆粕和小麦按 1:1 比例混匀，然后蒸熟；

(2) 按照 5%~10% 的比例加入菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的披发糖多孢菌 J2 种子液，然后加入约 1.5~2 倍物料质量的盐水，酱醪最终含盐量约为 18%、含水量为 65%，然后混匀。

(3) 酱醪发酵：起始发酵温度控制在 14~16℃，随着发酵进行温度逐渐升高到约 35℃。持续发酵约 5 个月。

(4) 发酵结束后的将酱醪进行板框压榨，去除酱醪。压榨结束后进行硅藻土过滤和膜过滤，去除沉淀。过滤澄清的酱油经过巴氏灭菌后进行灌装。

披发糖多孢菌 J2 降生物胺效果分析，添加披发糖多孢菌 J2 的酱油产品中的生物胺含量相较于对照组降低了 34.28%。

实施例 11：披发糖多孢菌 J2 用于料酒中降低生物胺含量

按照实施例 5 中酿造方法获得纯种发酵黄酒，向发酵黄酒中加入按质量计 10% 食盐，过灭菌机 85℃ 灭菌 30min 热灌装。

对菌株降低料酒中生物胺含量的效果进行分析：用高效液相法检测料酒中生物胺含量，添加披发糖多孢菌 J2 的样品组与对照组相比，生物胺含量降低。

实施例 12：披发糖多孢菌 J2 用于食醋中降低生物胺含量

按照实施例 5 中酿造方法获得纯种发酵黄酒，作为醋酸发酵原料；以实施例 1 中的方法进行生物胺含量的测定。

醋酸发酵采用固态发酵工艺：将大糠、麸皮、黄酒按照 1:4:10 的质量比拌匀，接入 5% 的醋醅，接种后前 2 天内每天从物料表面翻醅，保持温度为 35-42℃。到 6-8 天时翻到物料底部。第 8-12 天，每天从底部翻醅，温度自然下降。从醋醅中分离后得生醋，在经过 85℃ 灭菌 30 min 后陈酿 12 个月。在灌装前经过高温灭菌后热灌装。

对制备获得的食醋品质进行测定，所得固态发酵酿造食醋中醋酸含量均为 55 g/L。对食醋中生物胺含量进行分析：用高效液相法检测料酒中生物胺含量，添加披发糖多孢菌 J2 的样品组与对照组相比，生物胺含量降低。

实施例 13：披发糖多孢菌 J2 用于奶酪发酵中降低生物胺含量

以实施例 1 中的方法进行菌种活化和生物胺含量的测定。

将新鲜牛乳进行均质和巴氏杀菌处理后待其冷却至室温后添加 0.1 g/L 的发酵剂，搅拌均匀，在 32~35℃ 酸化 30 min 后添加 0.05 g/L 的凝乳酶，混匀待凝乳形成后切割、排乳清得到干酪凝块；在干酪凝块的表面喷洒 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的披发糖多孢菌 J2，置于 30~37℃ 培养 3~5 d，待其生长成熟，加入 3.0 g/L 的食盐，然后压榨成型即得干酪成品。

对发酵奶酪成品进行测定，添加披发糖多孢菌 J2 的干酪成品的生物胺含量相较于对照组降低了 16.37%

实施例 14：披发糖多孢菌 J2 用于香烟发酵中提质降害

以实施例 1 中的方法进行菌种活化。将活化的菌液于 4℃、10 000 g 离心 15 min，将收集的菌体用无菌水配制成 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的披发糖多孢菌 J2 菌液，将菌液均匀喷洒在烟叶表面，充分混匀，以等量无菌水处理做对照，置于 30~37℃、湿度 70~80% 的恒温恒湿箱中发酵培养 15 d，每天进行通风，培养结束后将烟叶烘干至水分低于 15%。

对发酵烟叶品质进行测定，所得发酵烟叶香气成分明显增加、杂气减轻，刺激性减弱；发酵烟叶中有害成分-焦油量、HCN、苯酚、 NH_3 和亚硝酸盐的含量相较于对照组分别下降了 23.51%、16.25%、19.75%、27.09% 和 37.62%。

实施例 15：披发糖多孢菌 J2 用于饲料发酵中提高营养转化率

以实施例 1 中的方法进行菌种活化。将米糠、秸秆和豆粕按照 (1~5): (1~5): 2 的比例混合均匀，粉碎制成发酵物。按照料水比为 1:0.5~0.9 的比例加水，按照 10%~10% 的比例接种菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的披发糖多孢菌 J2，搅拌均匀，自然发酵，发酵温度为 30~40℃，发酵时间为 4~9 d，发酵结束后干燥至含水量低于 15%，即得生物发酵饲料。

对发酵饲料品质进行分析：所得发酵饲料具有特殊香气，且营养丰富、氨基酸均衡，其中有机酸的含量相较于对照组提高了 26.77%，氨基酸含量提高了 21.98%，粗蛋白含量提高了 18.53%。

实施例 16：糖多孢菌于降低发酵鱼中的生物胺含量

以实施例 1 中的方法进行菌种活化。分别制备披发糖多孢菌 J2 菌液、江西糖多孢菌 J3 菌液，将二者按 1:0.7~1.5 混合，获得复合菌液 Mix。

利用中性蛋白酶发酵臭鳊鱼，具体工艺为：

(1) 样品预处理：鳊鱼去内脏，称重 3kg；

(2) 发酵液制备：取鳊鱼等质量饮用水，以此为 100% 计，加入 6% 盐、1% 大葱、0.6% 姜、0.1% 八角、0.05% 茴香、0.05% 孜然、0.01% 辣椒、0.01% 花椒、300000U 中性蛋白酶，混匀，得发酵液；

(3) 接种：发酵液分成三份，一份以 10% 接种量向发酵液中接种菌液浓度为 10^7 cfu/mL

的复合菌液 Mix，另一份以 10%接种量向发酵液中接种菌液浓度为 10^7 cfu/mL 的江西糖多孢菌 J3，另一份不接种；

(4) 发酵：将鳊鱼浸于步骤(3)接种后的发酵液中，最上层用石头压实，20℃下发酵 6 天，得臭鳊鱼。

生物胺的测定方法：称取绞碎后鱼肉样品 5.0 g 于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 5% 的三氯乙酸并超声 30 min，转移至 50 mL 具塞离心管中，6000 r/min 离心 10 min，转移上清液至 50 mL 容量瓶中，残渣用 20 mL 上述溶液再提取 1 次，合并上清液并稀释至刻度。然后准确量取 1 mL 上清液于 15 mL 离心管中，加入 1 mL 饱和 NaHCO_3 溶液，混匀，加入 2 mL 丹磺酰氯 (5 mg/mL 丙酮) 试剂，混匀后置于 65℃ 恒温水浴锅中黑暗衍生 30 min，室温静置后，加入 0.5 mL 饱和 NaCl 溶液，混匀后加入 5 mL 乙醚，涡旋振荡 20 s，静置分层后，转移上层有机相于 15 mL 离心管中，下层水相再萃取一次，合并两次萃取液，50℃ 水浴下氮气吹干。

加入 1 mL 乙腈振荡混匀，溶解残留物，过 0.22 μm 滤膜，通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定。

发酵结束后，采取复合菌剂 Mix 强化的臭鳊鱼生物胺比对照组下降了 20.87%。

实施例 17：糖多孢菌用于料酒中降低生物胺含量

以实施例 1 中的方法进行生物胺含量的测定。

按照实施例 5 中酿造方法获得纯种发酵黄酒，向发酵黄酒中加入按质量计 10% 食盐，过灭菌机 85℃ 灭菌 30 min 热灌装。

对菌株在料酒中降生物胺的效果进行分析：用高效液相法检测料酒中生物胺含量，添加复合菌剂 Mix 和江西糖多孢菌 J3 的样品组与对照组相比，分别降低了 23.16% 和 18.91%。

实施例 18：糖多孢菌用于食醋中降低生物胺含量

按照实施例 5 中酿造方法获得纯种发酵黄酒，作为醋酸发酵原料；以实施例 1 中的方法进行生物胺含量的测定。

醋酸发酵采用固态发酵工艺：将大糠、麸皮、黄酒按照 1:4:10 的质量比拌匀，接入 5% 的醋醅，接种后前 2 天内每天从物料表面翻醅，保持温度为 35-42℃。到 6-8 天时翻到物料底部。第 8-12 天，每天从底部翻醅，温度自然下降。从醋醅中分离后得生醋，在经过 85℃ 灭菌 30 min 后陈酿 12 个月。在灌装前经过高温灭菌后热灌装。

复合菌剂 Mix 和江西糖多孢菌 J3 降生物胺效果分析：所得固态发酵酿造食醋中醋酸含量均为 55 g/L。检测样品中生物胺含量，添加复合菌剂 Mix 和江西糖多孢菌 J3 的样品组与对照组相比，分别降低了 25.08% 和 27.61%。

实施例 19：糖多孢菌用于奶酪发酵中降低生物胺含量

以实施例 1 中的方法进行菌种活化和生物胺含量的测定。分别制备披发糖多孢菌 J2 菌液、江西糖多孢菌 J3 菌液，将二者按 1:0.8~1.4 混合，获得复合菌液 mix。

将新鲜牛乳进行均质和巴氏杀菌处理后待其冷却至室温后添加 0.1 mL/L 的菌体数量比为 1:1 的保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌的混合菌液作为发酵剂（菌液中的菌体浓度为 $1 \times 10^8 \sim 10^9$ cfu/mL），搅拌均匀，在 32 ~ 35℃ 酸化 30 min 后添加 0.05 g/L 的凝乳酶，混匀待凝乳形成后切割、排乳清得到干酪凝块；在干酪凝块的表面喷洒 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的糖多孢菌菌剂，置于 30 ~ 37℃ 培养 3~5 d，待其生长成熟，加入 3.0 g/L 的食盐，然后压榨成型即得干酪成品。

对发酵干酪成品进行测定，添加江西糖多孢菌 J3 和复合菌剂 Mix 的干酪成品的生物胺含量相较于对照组降低了 13.33% 和 21.66%。

实施例 20：糖多孢菌用于香烟发酵中提质降害

以实施例 1 中的方法进行菌种活化。分别制备披发糖多孢菌 J2 菌液、江西糖多孢菌 J3 菌液，将二者按 1:0.7~1.5 混合，获得复合菌液 Mix。

将活化的菌液于 4℃、10000 g 离心 15 min，将收集的菌体用无菌水配制成 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的菌液，将菌液均匀喷洒在烟叶表面，充分混匀，以等量无菌水处理做对照，置于 30 ~ 37℃、

湿度 70 ~ 80% 的恒温恒湿箱中发酵培养 15 d，每天进行通风，培养结束后将烟叶烘干至水分低于 15%。

对发酵烟叶品质进行测定，所得发酵烟叶香气成分明显增加、杂气减轻，刺激性减弱；添加江西糖多孢菌 J3 发酵烟叶中有害成分-焦油量、HCN、苯酚、NH₃ 和亚硝酸盐的含量相较于对照组分别下降了 32.65%，17.55%，17.69%，25.36% 和 29.17%。添加复合菌剂 Mix 发酵烟叶中有害成分-焦油量、HCN、苯酚、NH₃ 和亚硝酸盐的含量相较于对照组分别下降了 30.12%，17.14%，22.01%，16.73% 和 27.15%。

实施例 21：糖多孢菌用于饲料发酵中提高营养转化率

以实施例 1 中的方法进行菌种活化。分别制备披发糖多孢菌 J2 菌液、江西糖多孢菌 J3 菌液，将二者按 1:0.5~1.2 混合，获得复合菌液 Mix。

将米糠、秸秆和豆粕按照 (1~5): (1~5): 2 的比例混合均匀，粉碎制成发酵物。按照料水比为 1:0.5~0.9 的比例加水，按照 10%~10% 的比例接种菌液浓度为 10⁵~10⁶ cfu/mL 的菌液，搅拌均匀，自然发酵，发酵温度为 30~40℃，发酵时间为 4~9 d，发酵结束后干燥至含水量低于 15%，即得生物发酵饲料。

对发酵饲料品质进行分析：所得发酵饲料具有特殊香气，且营养丰富、氨基酸均衡，添加江西糖多孢菌 J3 发酵饲料中有机酸的含量相较于对照组提高了 37.26%，氨基酸含量提高了 18.57%，粗蛋白含量提高了 23.41%。添加复合菌剂 Mix 发酵烟叶中有机酸的含量相较于对照组提高了 29.18%，氨基酸含量提高了 10.22%，粗蛋白含量提高了 14.48%。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

13
权 利 要 求 书

1. 披发糖多孢菌 (*Saccharopolyspora hirsuta*) J2, 所述糖多孢菌已于 2020 年 4 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2020103。

2. 含有权利要求 1 所述的披发糖多孢菌 J2 的微生物制剂。

3. 根据权利要求 2 所述的微生物制剂, 其特征在于, 每克或每毫升发酵剂中的披发糖多孢菌 J2 的数量 $\geq 1 \times 10^6$ CFU。

4. 应用权利要求 1 所述披发糖多孢菌 J2 制备的麦曲、麸曲、酒药或其他类型的曲。

5. 根据权利要求 4 所述的麦曲、麸曲、酒药或其他类型的曲, 其特征在于, 是将制曲的原料破碎、加水搅拌、灭菌后, 在无菌环境下加入所述的披发糖多孢菌 J2, 于 25~55℃培养 72~96 h。

6. 一种糖多孢菌组合物, 其特征在于, 含有权利要求 1 所述的披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3;

所述江西糖多孢菌 J3, 已于 2020 年 4 月 30 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2020104。

7. 根据权利要求 6 所述的糖多孢菌组合物, 其特征在于, 所述披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3 的菌体数量之比为 1: (0.8~1.2)。

8. 含有权利要求 6 或 7 所述糖多孢菌组合物的微生物制剂, 其特征在于, 每克或每毫升微生物制剂中的糖多孢菌数量 $\geq 1 \times 10^6$ CFU。

9. 根据权利要求 8 所述的微生物制剂, 其特征在于, 含有所述披发糖多孢菌 J2 和江西糖多孢菌 J3 的活细胞、冷冻干燥得到的干菌体、固定化的细胞, 或者以其他任何形式存在的微生物细胞。

10. 应用权利要求 6 或 7 所述糖多孢菌组合物制备的麦曲、麸曲、酒药或其他类型的曲。

11. 根据权利要求 10 所述的麦曲、麸曲、酒药或其他类型的曲, 其特征在于, 是将制曲的原料破碎、加水搅拌、灭菌后, 在无菌环境下加入所述的糖多孢菌组合物, 于 25~55℃培养 72~96 h。

12. 权利要求 6 或 7 所述的糖多孢菌组合物, 或权利要求 8 或 9 所述的微生物制剂, 或权利要求 10 或 11 所述的曲在生产发酵食品、调味品、饮品、香烟和饲料中的应用。

13. 根据权利要求 12 所述的应用, 其特征在于, 所述食品包括发酵或半发酵食品; 饮品包括黄酒或白酒; 所述调味品包括食醋、酱油、调味料、奶酪或香肠。

14. 权利要求 6 或 7 所述的糖多孢菌组合物, 或权利要求 8 或 9 所述的微生物制剂, 或权利要求 10 或 11 所述的曲在降低发酵食品或饮品中生物胺含量方面的应用。

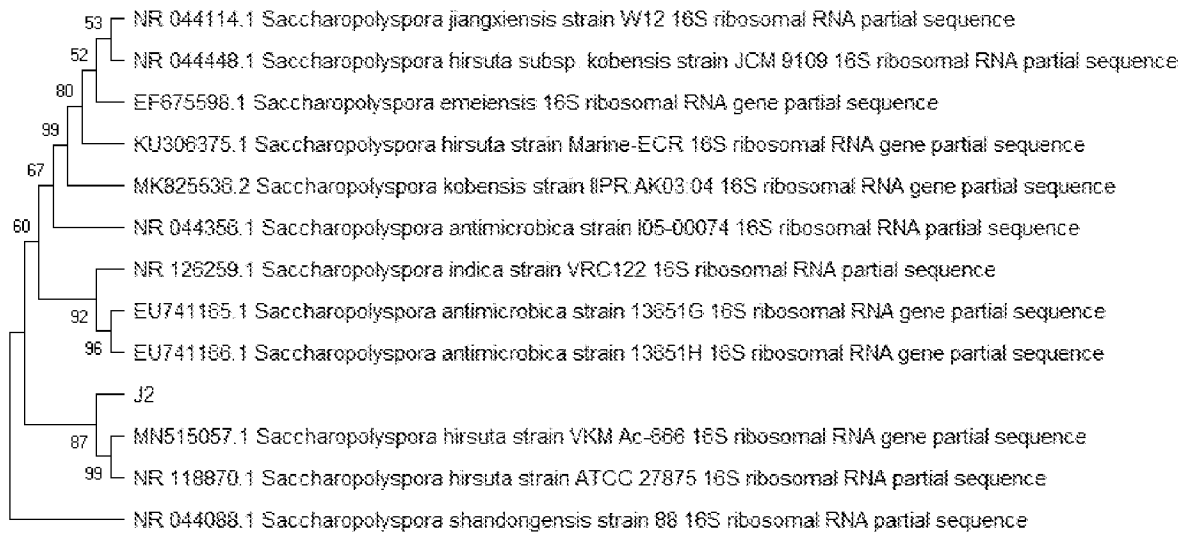


图 1

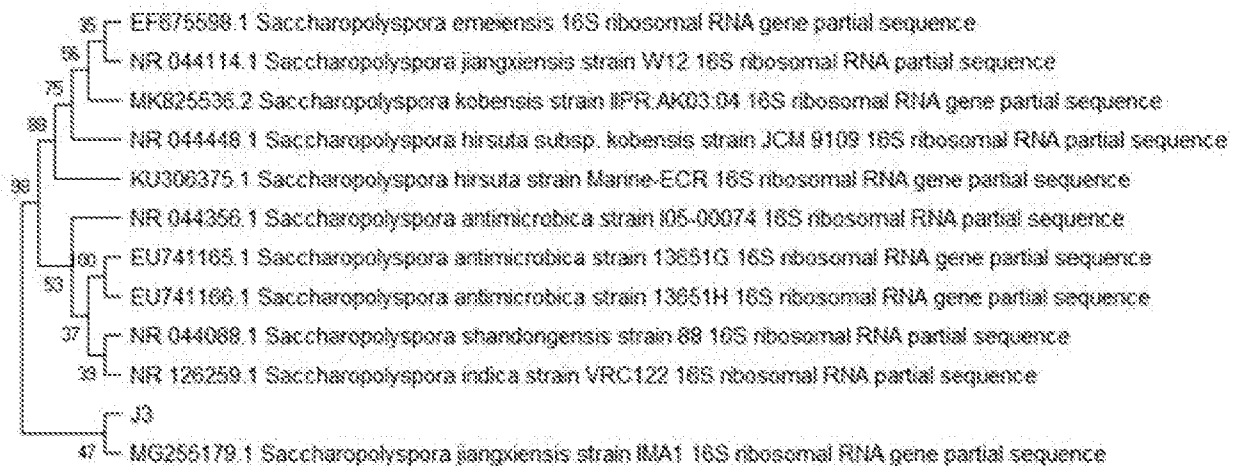


图 2

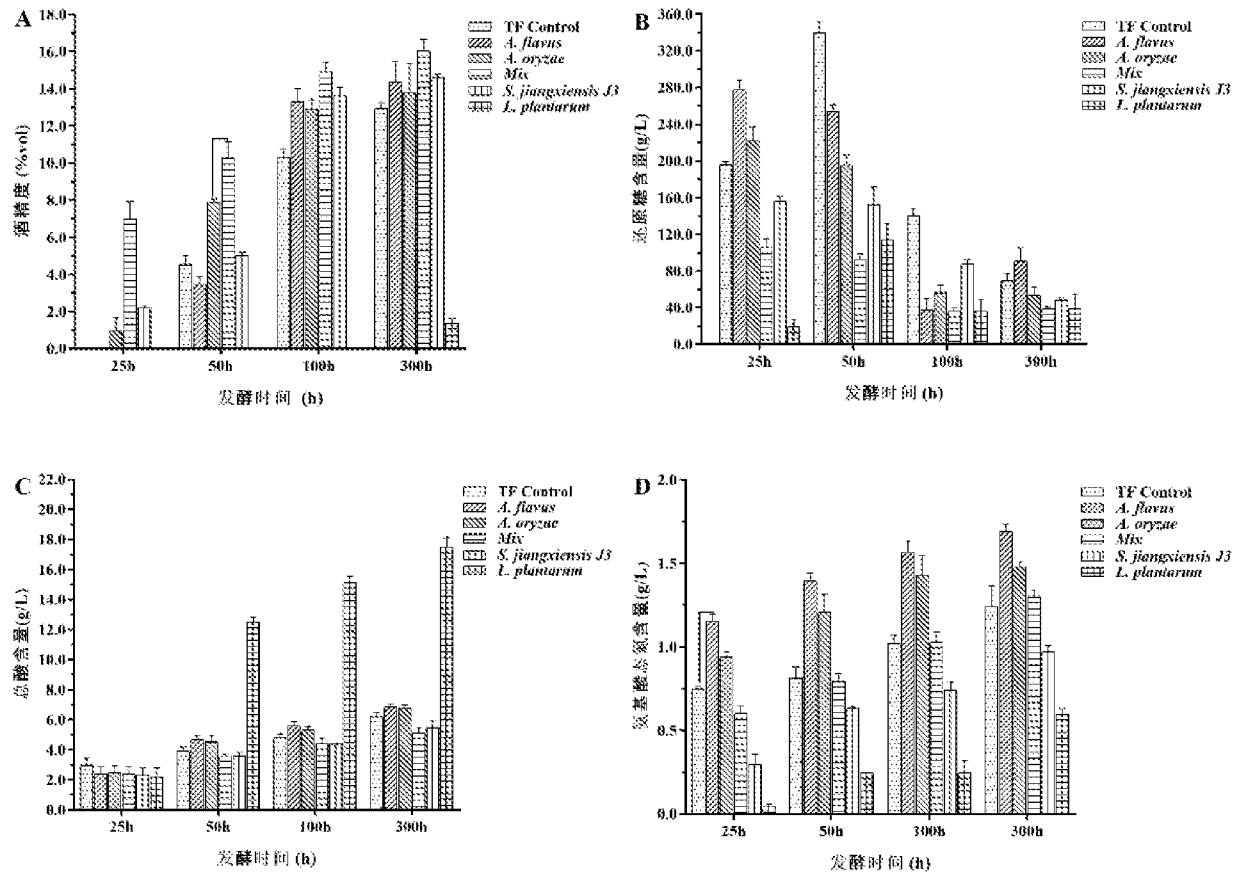


图 3

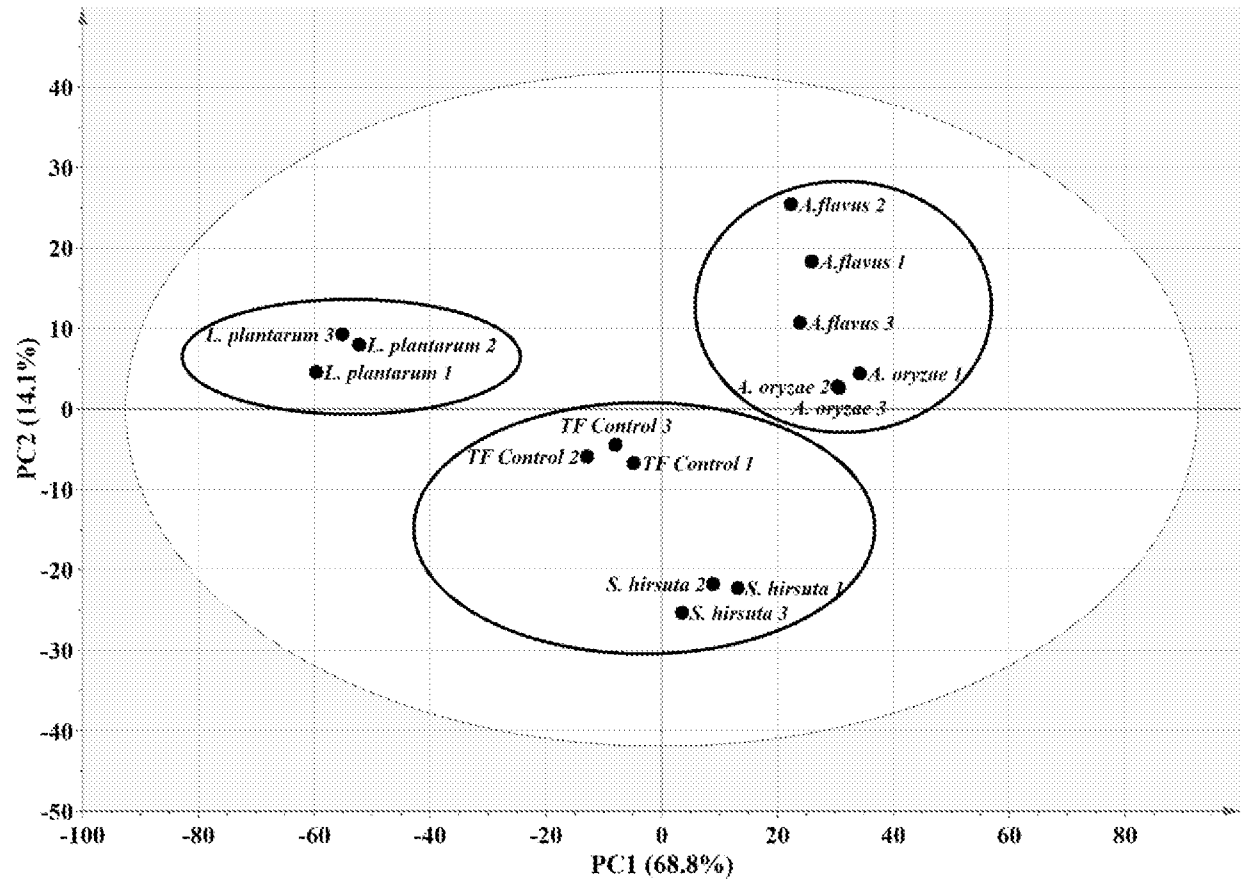


图 4

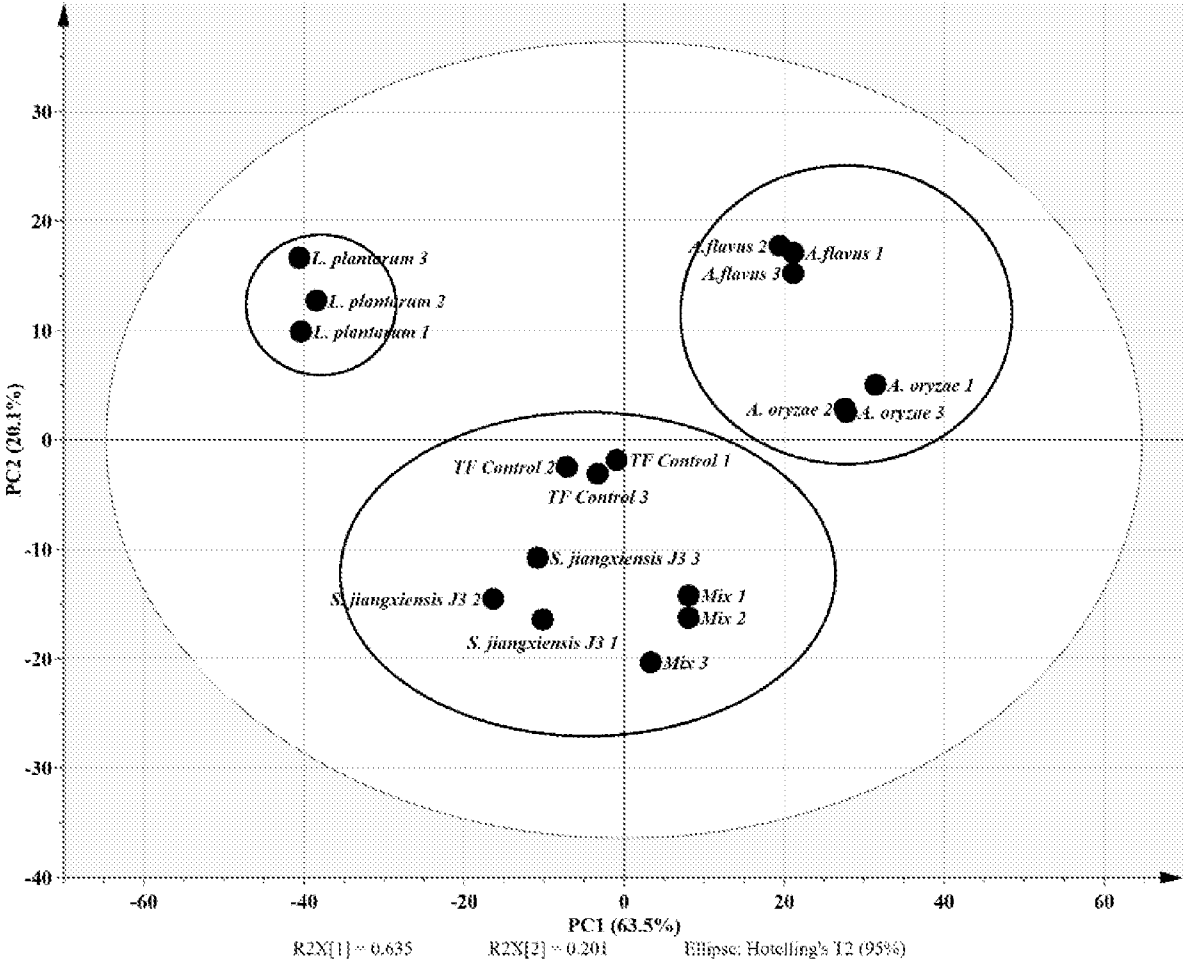


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/077377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C12G 3/022(2019.01)i; C12G 3/021(2019.01)i; C12J 1/04(2006.01)i; A23L 27/50(2016.01)i;
A23L 27/24(2016.01)i; A23L 17/10(2016.01)i; A23L 17/00(2016.01)i; A23L 5/20(2016.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N,C12G,C12J,A23L,C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, pubmed, isi web of science: 披发糖多孢菌, 江西糖多孢菌, 糖多孢菌, 生物胺, 胺, 酪胺, 组胺, 腐胺, 尸胺, 发酵, Saccharopolyspora hirsute, Saccharopolyspora jiangxiensis, Saccharopolyspora, biogenic amine, amine, tyramine, histamine, putrescine, cadaverine, fermented, fermentation; GenBank +EMBL+DDBJ+China Patents Biological Sequence Search System: search for SEQ ID NOs: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111961615 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 20 November 2020 (2020-11-20) see claims 1-10	1-14
PX	CN 111979148 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 November 2020 (2020-11-24) see claims 1-10	1-14
PA	CN 111979146 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 November 2020 (2020-11-24) see claims 1-10	1-14
A	WO 2008092950 A1 (LEK PHARMACEUTICALS et al.) 07 August 2008 (2008-08-07) see entire document	1-14
A	CN 110914425 A (ZYMERGEN INC.) 24 March 2020 (2020-03-24) see entire document	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2021

Date of mailing of the international search report

27 May 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/077377

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/077377

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111961615	A	20 November 2020	None			
CN	111979148	A	24 November 2020	None			
CN	111979146	A	24 November 2020	None			
WO	2008092950	A1	07 August 2008	EP	1953233	A1	06 August 2008
				EP	2115152	A1	11 November 2009
CN	110914425	A	24 March 2020	CA	3064619	A1	13 December 2018
				JP	2020524493	A	20 August 2020
				WO	2018226893	A3	10 January 2019
				WO	2018226893	A2	13 December 2018
				KR	20200015606	A	12 February 2020
				US	2020115705	A1	16 April 2020
				EP	3635110	A2	15 April 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/077377

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; C12G 3/022(2019.01)i; C12G 3/021(2019.01)i; C12J 1/04(2006.01)i; A23L 27/50(2016.01)i; A23L 27/24(2016.01)i; A23L 17/10(2016.01)i; A23L 17/00(2016.01)i; A23L 5/20(2016.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, C12G, C12J, A23L, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, SIPOABS, CNABS, USTXT, JPTXT, EPTXT, WOTXT, CNTXT, cnki, pubmed, isi web of science: 披发糖多孢菌, 江西糖多孢菌, 糖多孢菌, 生物胺, 酪胺, 组胺, 腐胺, 尸胺, 发酵, Saccharopolyspora hirsute, Saccharopolyspora jiangxiensis, Saccharopolyspora, biogenic amine, amine, tyramine, histamine, putrescine, cadaverine, fermented, fermentation; GenBank+EMBL+DDBJ+中国专利生物序列检索系统: 关于SEQ ID N0s:1-2的检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 111961615 A (江南大学) 2020年 11月 20日 (2020 - 11 - 20) 参见权利要求1-10	1-14
PX	CN 111979148 A (江南大学) 2020年 11月 24日 (2020 - 11 - 24) 参见权利要求1-10	1-14
PA	CN 111979146 A (江南大学) 2020年 11月 24日 (2020 - 11 - 24) 参见权利要求1-10	1-14
A	WO 2008092950 A1 (LEK PHARMACEUTICALS等) 2008年 8月 7日 (2008 - 08 - 07) 参见全文	1-14
A	CN 110914425 A (齐默尔根公司) 2020年 3月 24日 (2020 - 03 - 24) 参见全文	1-14

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 5月 12日

国际检索报告邮寄日期

2021年 5月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王启扬

电话号码 62411211

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/077377

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111961615	A	2020年 11月 20日	无			
CN	111979148	A	2020年 11月 24日	无			
CN	111979146	A	2020年 11月 24日	无			
WO	2008092950	A1	2008年 8月 7日	EP	1953233	A1	2008年 8月 6日
				EP	2115152	A1	2009年 11月 11日
CN	110914425	A	2020年 3月 24日	CA	3064619	A1	2018年 12月 13日
				JP	2020524493	A	2020年 8月 20日
				WO	2018226893	A3	2019年 1月 10日
				WO	2018226893	A2	2018年 12月 13日
				KR	20200015606	A	2020年 2月 12日
				US	2020115705	A1	2020年 4月 16日
				EP	3635110	A2	2020年 4月 15日