



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107699499 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201711135657.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.11.16

C12N 1/14(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12J 1/04(2006.01)

GDMCC No. 60180 2017.05.17

C12R 1/69(2006.01)

(71)申请人 佛山市海天(高明)调味食品有限公司

地址 528500 广东省佛山市高明区沧江工业园东园

申请人 佛山市海天调味食品股份有限公司
佛山市海天(江苏)调味食品有限公司

(72)发明人 周其洋 栗连会

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 张小勇

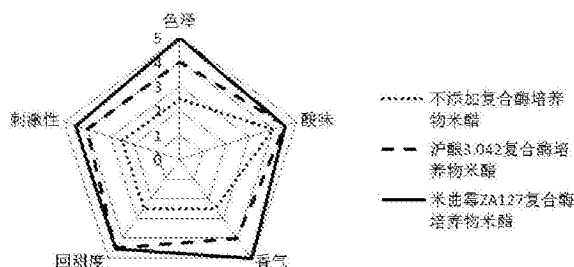
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一株米曲霉ZA127及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种适用于食醋生产的米曲霉ZA127,还涉及所述米曲霉在提升液态发酵食醋中氨基酸态氮与酯类物质含量、全面提升液态发酵米醋的风味与质量中的应用。本发明的米曲霉ZA127蛋白酶活力高、酯化酶活力高,适合用于原酿高鲜食醋的生产。本发明还涉及一种米曲霉复合酶培养物制备工艺,其显著提升液态发酵食醋中的氨基氮与总酯含量,大幅改善液态发酵米醋的口感与风味。



1. 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) ZA127, 其保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 地址: 广东省广州市先烈中路100号大院59号楼5楼, 邮编510075, 保藏编号为GDMCC No.60180。
2. 权利要求1的米曲霉ZA127在食品发酵中的用途。
3. 权利要求2所述的用途, 其中食品发酵为食醋发酵。
4. 权利要求1的米曲霉ZA127在制备复合酶培养物中的用途。
5. 权利要求4所述的用途, 其中所获得的复合酶培养物用于制备食醋。
6. 权利要求1的米曲霉ZA127在制备食醋中的用途。
7. 制备复合酶培养物的方法, 其以权利要求1的米曲霉ZA127为发酵菌剂。

一株米曲霉ZA127及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,涉及米曲霉(*Aspergillus oryzae*),具体涉及一株通过诱变技术获得的蛋白酶活力高、酯化酶活力高的米曲霉ZA127,还涉及所述米曲霉在提升发酵米醋风味与质量方面的应用。

背景技术

[0002] 液态深层发酵醋酸工艺起源并广泛应用在国外食醋酿造企业,由于其发酵周期短、劳动强度低、机械化程度高以及劳动生产效率高等特点,目前我国食醋酿造行业也逐渐推广开来。然而相对于固态发酵食醋的细菌、酵母、霉菌等多菌种混合发酵,液态深层发酵工艺采用醋酸菌纯种发酵,因此造成其风味色泽较差,鲜味较差,酸味刺激缺乏醇厚柔绵感。与传统固态发酵食醋风味成分相比,其氨基酸态氮、酯类、有机酸等物质的含量差异最大,而这些物质也是影响口感、风味的关键成分。

[0003] 目前,为提高液态发酵食醋的口感与风味,经文献调研总结大致有以下方法:(1)在大米之外添加一定量豆粕、麸皮,增加原料中蛋白质含量;(2)将乳酸菌与酵母混合发酵,提升食醋中乳酸含量;(3)将产酯酵母与产酒酵母混合发酵,利用产酯酵母的酯化能力促进酯类物质的生成;(4)发酵成熟的醋醅利用臭氧、微波、红外线或者超高压电场进行人工加速陈化。

[0004] 以上技术手段均报道有一定的效果,然而其在生产企业实现大规模应用具有一定难度,而利用米曲霉提升液态发酵食醋风味质量的文献报道与专利/专利申请均比较少见。

[0005] 经文献与专利调研,本发明人发现中国发明专利申请CN106434254A、中国发明专利ZL201410701656.6与中国发明专利ZL201110307690.1提供了获得高还原糖高氨基氮食醋的制作方法,然而其应用对象还是针对传统固态发酵食醋,而且其利用的发酵菌剂是来源常见的野生黑曲霉或者米曲霉菌株,菌株性能有待考究;中国发明专利ZL201410185333.6、ZL201410187376.8提供了两株高产糖化酶、 α -淀粉酶和酸性蛋白酶的塔宾曲霉、亮白曲霉,其具有较好的原料利用能力,然而这两株曲霉的应用对象是白酒行业,其主体风味物质与食醋有较大差异;中国发明专利申请CN105112303A公开了一株具有较好酯化能力的黑曲霉,能够极大程度的提高白酒中己酸乙酯的含量,然而己酸乙酯是浓香型白酒的主体香,对食醋而言并不重要,甚至有反作用;中国发明专利ZL200810169523.3提供了一种氨基酸多肽营养液的制备方法及其可能用途,中国发明专利ZL201410019288.7提供了一种利用醋糟进行产蛋白酶菌种的培养方法,其虽然与食醋、曲霉等关键词相近,事实上与本专利无直接相关性。同时,中国发明专利申请CN105733959A公开了一株从浙江玫瑰米醋中分离得到的米曲霉菌株及其应用,其在这浙江米醋的应用中表现出较好的效果,然而浙江玫瑰米醋是一种典型的地域性名醋,其来源于自然环境,发酵工艺与风味特点与本公司产品差异较大。

[0006] 上述提及的目前提升液态发酵食醋的若干技术手段虽然均报道有一定效果,但也存在一些问题与不足:(1)在大米原料之外增加蛋白质原料则必须在生产配料中标识,原料

组成改变也可能影响食醋特有风味；(2) 将产酒酵母与乳酸菌、产酯酵母混合发酵将会增加微生物种子液发酵罐等固定投资、工艺操作的复杂程度，该技术有一定研究价值，其具体效果还需要生产与实验进一步验证；(3) 微波、红外线和臭氧等人工催陈技术在生产企业实施的技术难度与投资成本较大。而上述检索到的专利/专利申请虽然也有部分涉及利用黑曲霉或米曲霉制曲技术提升食醋的氨基氮、还原糖、己酸乙酯等成分，但其基本是将原有发酵体系中的优势菌种进行生物强化，且其应用是为自身食醋品种服务，且对象主要是传统固态发酵食醋、甚至是白酒行业，并未有涉及液态发酵食醋的报道出现。

发明内容

[0007] 鉴于以上技术的不足，本发明的目的在于选育获得一株具有高蛋白酶活力、高酯化酶活力的米曲霉菌种，利用发酵原料接种该米曲霉菌种获得复合酶培养物，在大米糖化醪中添加该复合酶培养物进行酒精发酵、醋酸发酵，获得具有较高氨基氮水平、总酯含量的液态发酵食醋，改善液态发酵食醋的口感与风味。

[0008] 为了实现本发明的目的，本发明人通过大量的实验和不懈的探索，最终获得了如下实验方案：

[0009] 本发明提供了一株米曲霉菌株ZA127，该菌株已于2017年5月17日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，地址：广东省广州市先烈中路100号大院59号楼5楼，邮编510075，保藏编号为GDMCC No.60180。

[0010] 本发明提供的米曲霉是由常压室温等离子体诱变获得的，该菌株与出发菌株沪酿3.042相比，其具有蛋白酶活力高、酯化酶活力高的特点。

[0011] 本发明提供的米曲霉菌株ZA127，在麦芽汁蔗糖培养基上生长较快，28度培养5天菌落基本布满整个平板，质地紧密呈绒状；培养2天菌落中央开始生成白色孢子并向外蔓延，后逐渐变为黄绿色、绿色，菌落背面呈浅黄色，无渗出液。显微镜下观察该菌株菌丝发达粗壮，分生孢子头开始为球形，后变为辐射状，顶囊为球形，产孢结构单层，分生孢子为球形。

[0012] 本发明提供的米曲霉ZA127容易培养，在麸皮、大米、豆粕等发酵原料上培养与出发菌株沪酿3.042相比不需要特殊处理，具有较好的菌株替代性。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种米曲霉复合酶培养物生产工艺，该工艺是以大米、麸皮、豆粕中的一种或几种为原料、米曲霉ZA127为发酵菌剂的复合酶培养物，其可以显著提升液态发酵食醋中的氨基氮与总酯含量，大幅改善液态发酵米醋的口感与风味。

[0014] 本发明还涉及米曲霉ZA127在食品发酵中的用途。优选地，其中食品发酵为食醋发酵。

[0015] 本发明还涉及米曲霉ZA127在生产复合酶培养物中的用途。优选地，其中获得的复合酶培养物用于制备食醋。

[0016] 本发明还涉及米曲霉ZA127在制备食醋中的用途。

[0017] 本发明的有益效果：

[0018] 利用最新的菌种诱变技术获得了一株高蛋白酶活力、高酯化酶活力的米曲霉菌株，利用该菌株在发酵原料上扩培过程中生成的复合酶系提升大米蛋白质原料的利用率以及风味物质的积累，进而大幅提升液态发酵食醋中氨基氮与总酯含量，全面提升液态发酵

米醋的风味与质量,具有较好的可操作性和经济效益。

附图说明

[0019] 本发明采用以下附图来举例说明本发明的有益效果。应当理解的是,这些仅用于说明本发明的具体实施方案,并不意图限制本发明的范围。

[0020] 图1为菌株沪酿3.042与米曲霉ZA127在马铃薯蔗糖培养基上的菌落形态图。

[0021] 图2为菌株沪酿3.042与米曲霉ZA127的菌丝形态图。

[0022] 图3为液态深层发酵米醋生产工艺示意图。

[0023] 图4为不添加复合酶培养物米醋、沪酿3.042与米曲霉ZA127复合酶培养物发酵食醋感官鉴评结果。

[0024] 生物保藏信息

[0025] 本发明的米曲霉菌株ZA127,于2017年5月17日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,邮编510075,保藏编号为:GDMCC No.60180。

具体实施方式

[0026] 为了促进对本发明的理解,以下将参考某些实施方式,并且将使用特定语言来描述本发明。然而,应当理解的是,这些具体实施方式不意图限制本发明的范围。所描述的实施方式中的任何改变和进一步的修改,以及本发明的任何进一步应用,均为本领域技术人员通常会想到的。

[0027] 除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0028] 除非特别说明,本发明实施例所用培养基和试验条件为本领域常规培养基和试验条件。除非特别说明,本发明实施例所用试剂均为市购。

[0029] 下述实施例中,所述百分含量如无特别说明,均为质量百分含量。

[0030] 实施例1

[0031] 米曲霉菌株诱变育种与筛选

[0032] 1、材料准备

[0033] 出发菌株:沪酿3.042,保藏于佛山市海天调味食品有限公司的菌种保藏中心。

[0034] 马铃薯蔗糖培养基:称取200g去皮马铃薯,切成小块,加入1000mL蒸馏水煮沸30min,用双层纱布过滤得到清液,再加入20g蔗糖,自然pH,固体培养基补加20g琼脂,121℃灭菌20min。

[0035] 酪素筛选培养基:干酪素4g,磷酸二氢钾0.3g,硝酸钠3g,磷酸氢二钾1g,硫酸镁0.5g,硫酸亚铁0.01g,蔗糖30g,琼脂20~25g,蒸馏水1000mL,121℃灭菌20min。

[0036] 麸皮培养基:250mL的三角瓶,装料量为麸皮12g、黄豆粉3g、水15mL,自然pH,121℃灭菌20min。

[0037] 2、米曲霉菌株诱变与筛选

[0038] 2.1孢子悬浮液的制备

[0039] 取沪酿3.042培养5天的斜面,用生理盐水洗下孢子,将孢子打散后过滤得到孢子

悬浮液,用血细胞计数板计数,调节孢子数约为 10^6 个/mL,用无菌生理盐水10倍梯度稀释备用。

[0040] 2.2常压室温等离子体(ARTP)诱变

[0041] 将孢子悬浮液10 μ L,置于ARTP诱变装置(无锡源清天木生物科技有限公司,ARTP-IIIS诱变育种仪)中,诱变时间分别为10s、20s、60s、80s、120s、150s、180s、200s,处理0s作为对照,处理结束后用生理盐水进行洗脱,适当稀释后取100 μ L涂平板,30 $^{\circ}$ C培养箱中倒置培养3天,计算致死率。

[0042] 致死率=(对照平板菌落数-诱变平板菌落数)/对照平板菌落数 \times 100%

[0043] 2.3菌株初筛

[0044] 挑选紫外诱变后致死率在70~80%的平板上的菌落点种于酪素筛选培养基,30 $^{\circ}$ C培养3天,观察记录透明圈和菌落大小,计算出K值。挑取K值较大的菌落接种于马铃薯蔗糖试管斜面培养基,于30 $^{\circ}$ C培养3天,试管内布满淡绿色米曲霉菌丝停止,然后4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0045] K 值=透明圈直径/菌落直径

[0046] 2.4菌株复筛与保藏

[0047] 将初筛获得的菌株接种麸皮培养基,30 $^{\circ}$ C恒温培养3天,取成熟麸皮培养基混合物检测中性蛋白酶、酸性蛋白酶与酯化酶活力,取蛋白酶活与酯化酶活力较高的菌株保藏备用。

[0048] 中性蛋白酶检测方法:参照SB/T 10317-1999;

[0049] 酸性蛋白酶检测方法:称取发酵完成的成曲10g,加200mL 0.05mol/L乳酸-乳酸钠缓冲液(pH3.0)于500mL三角瓶中,37 $^{\circ}$ C、180r/min摇床震荡1h,4000r/min室温离心10min,上清用乳酸-乳酸钠缓冲液稀释10倍,即得粗酶液。采用福林酚法测定酸性蛋白酶活力,规定在40 $^{\circ}$ C下每分钟水解酪蛋白产生1 μ g酪氨酸,定义为1个蛋白酶活力单位(U);

[0050] 酯化酶活力测定方法:参照DB37/T 1231-2009。

[0051] 测定结果总结于表1中。

[0052] 表1 沪酿3.042与米曲霉ZA127酶活检测结果

菌株	酶活 (U/g)		
	中性蛋白酶	酸性蛋白酶	酯化酶
沪酿3.042	1350	140	45
ZA127	1820	230	80

[0054] 从表1的结果可以看到,相比于出发菌株沪酿3.042,米曲霉ZA127的中性蛋白酶活力提高约35%,酸性蛋白酶活力提高约64%,酯化酶活力提高约78%。可见,选育获得的米曲霉ZA127的中性蛋白酶活力、酸性蛋白酶活力和酯化酶活力均大大提高,尤其是酸性蛋白酶活力和酯化酶活力提高的幅度均超过50%。该米曲霉应可以提升液态发酵食醋中的氨基氮与总酯含量。

[0055] 该米曲霉菌株ZA127已于2017年5月17日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No.60180。

[0056] 实施例2

[0057] 米曲霉ZA127的遗传稳定性测试

[0058] 将实施例1获得的米曲霉ZA127接种于马铃薯蔗糖培养基,30℃培养3天,见孢子长满菌株即培养成熟,然后将该代孢子继续转接于马铃薯蔗糖培养基,30℃培养3天,依次类推获得不同代数的菌株。

[0059] 将获得不同代菌株接种麸皮培养基,拌匀后30℃恒温培养3天,获得的成曲孢子生长良好,曲香浓郁。不同代蛋白酶活、酯酶活力与孢子数结果见下表2:

[0060] 表2 不同代米曲霉ZA127麸曲酶活、孢子数检测结果

[0061]

检测项目	第1代	第5代	第10代
中性蛋白酶 (U/g)	1820	1826	1815
酸性蛋白酶 (U/g)	230	225	227
酯化酶 (U/g)	80	78	81
孢子数 (亿/g)	170	175	173

[0062] 从上述表2所示的各代菌种制得麸曲酶活、孢子数检测结果看,第1代、第5代、第10代菌种所制得的麸曲的各项指标均保持稳定。这表明米曲霉菌株ZA127的遗传稳定性好,非常适于工业化生产。

[0063] 实施例3

[0064] 米曲霉ZA127复合酶培养物制备

[0065] 将实施例1获得米曲霉ZA127分别接种于麸皮培养基、蒸熟大米上,米曲霉ZA127在麸皮培养基上培养条件为30度培养3天,而在大米原料上的培养条件为30~35度培养24~36小时,培养结束所得的菌体与发酵原料混合物即为复合酶培养物。取该培养物检测中性蛋白酶、酸性蛋白酶与酯化酶活力。麸皮培养基复合酶培养物酶活检测结果参见实施例1中的表1,大米复合酶培养物酶活检测结果见本实施例的表3。

[0066] 表3 米曲霉沪酿3.042与ZA127大米复合酶培养物酶活检测结果

菌株	酶活 (U/g)		
	中性蛋白酶	酸性蛋白酶	酯化酶
沪酿3.042	380	75	30
ZA127	570	110	50

[0068] 经检测,米曲霉ZA127大米复合酶培养物的中性蛋白酶、酸性蛋白酶均提高50%左右,而酯化酶提高了66%,且在培养过程中不需要特别处理,完全可以实现正常生产。

[0069] 实施例4

[0070] 米曲霉ZA127麸皮培养基复合酶培养物进行酒精、醋酸发酵试验

[0071] 为了进一步明确米曲霉ZA127对液态发酵食醋质量提升的效果,本发明人以实施例1中两株米曲霉制得的麸皮培养基复合酶培养物应用于酒精发酵和醋酸发酵中,具体操作为:将大米加适量自来水煮制,煮制过程中添加液化酶、糖化酶进行淀粉质原料的分解,待大米糖化醪冷却至室温后接入活性干酵母,同时加入米曲霉麸皮培养物,在温度为30~35度的条件下发酵5~7天,发酵结束后板框过滤压榨,将米酒清夜泵送至醋酸发酵罐进行

醋酸发酵。醋酸发酵阶段采用Frings深层液态发酵系统(德国福林斯公司,型号Acetator型、容积100L),发酵温度控制在29.5~30.5度,最终后获得酸度为6.0~6.5g/100mL的米醋;同时,本发明人以不使用米曲霉复合酶培养物发酵获得相应米醋作为对照样品。检测所得米醋的各项理化指标。

[0072] 米醋理化指标检测结果总结于表4中。

[0073] 表4 米醋理化指标检测结果

[0074]

菌株	理化指标					
	总酸	氨基氮	总酯	残酒	还原糖	不挥发酸
无发酵菌剂米醋	6.1	0.01	0.3	0.02	0.5	0.15
沪酿3.042	6.2	0.06	2.0	0.03	3.5	0.30
ZA127	6.1	0.10	3.1	0.03	3.6	0.40

[0075] 由表4可以看出:在同等酸度情况下,应用米曲霉ZA127麸皮培养基复合酶培养物所获得的米醋的理化指标要远远优于常规的深层液态发酵食醋,特别是其氨基氮、总酯、还原糖与不挥发酸;而且发酵菌剂米曲霉ZA127的效果也要好于对照菌株沪酿3.042,其优势也主要体现在提升氨基氮、总酯的含量上。

[0076] 在此基础上,本发明人将不添加复合酶培养物米醋、沪酿3.042与米曲霉ZA127复合酶培养物发酵米醋在公司内部组织鉴评人员进行了在色泽、香气、刺激性、回甜度、酸味等方面进行感官鉴评分析,感官鉴评由经过专业训练的专业人员进行,以上评价指标的分值为1~5分,分数越高,该项指标越好,其打分情况如表5和图4所示。

[0077] 表5 米醋感官鉴评结果(取平均值)

指标	不添加复合酶培养物米醋	沪酿 3.042	米曲霉 ZA127
色泽	2.5	4.0	5.0
酸味	4.0	4.5	4.5
香气	2.5	4.0	5.0
回甜度	2.5	4.5	4.5
刺激性	2.5	4.0	4.5

[0080] 如表5和图4的结果所示,与不添加复合酶培养物米醋相比,添加米曲霉复合酶培养物的发酵米醋在色泽、香气、回甜和刺激性等方面均有较大改善,而且米曲霉ZA127在香气、色泽和刺激性三个维度上表现也要优于沪酿3.042。综上所述,采用添加米曲霉ZA127复合酶培养物工艺可以显著改善液态深层发酵食醋的口感与风味,全面提升米醋质量。

[0081] 本文提供的任何和所有实施例或示例性语言的使用仅旨在更好地说明本发明,而不对本发明的范围构成限制,除非另有要求。说明书中的语言不应被解释为指示任何未要求保护的元素对于实施本发明是必要的。

[0082] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请通过引用并入本文,如同每个单独的出

出版物或专利申请被具体地和单独地指明通过引用并入。此外,本文所述的任何理论、机制、证明或发现旨在进一步增强对本发明的理解,并且不意图以任何方式将本发明限制到这样的理论、机制、证明或发现。尽管已经在附图和前面的描述中详细地示出和描述了本发明,但是本发明应当被认为是说明性的而不是限制性的。

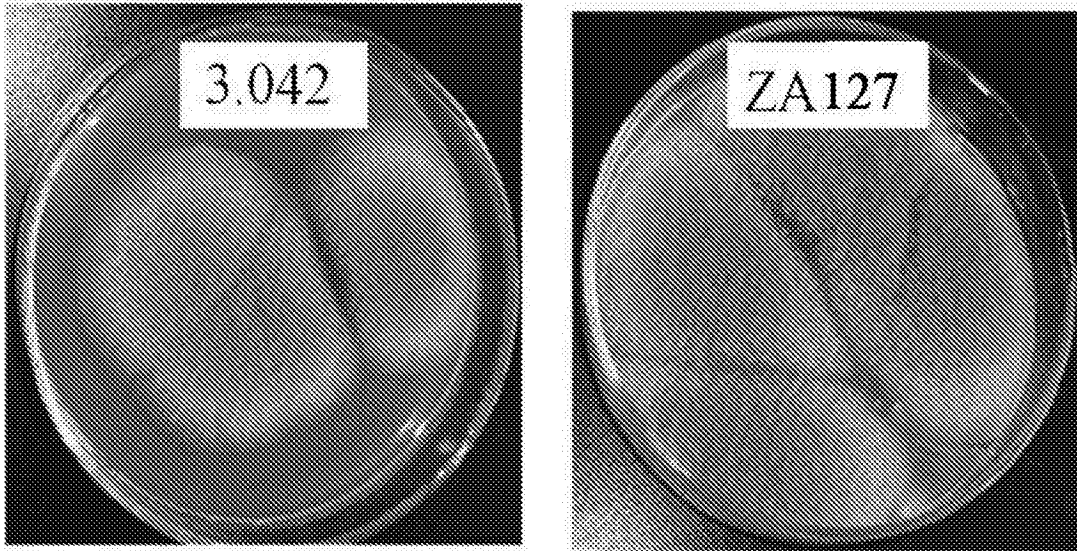


图1

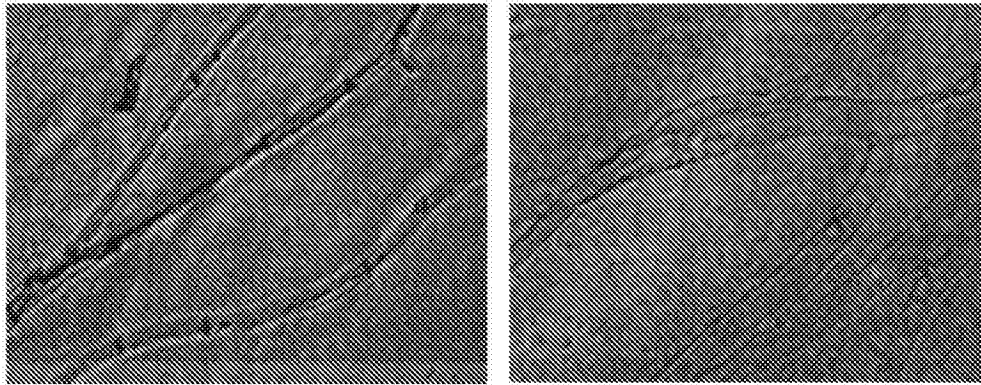


图2

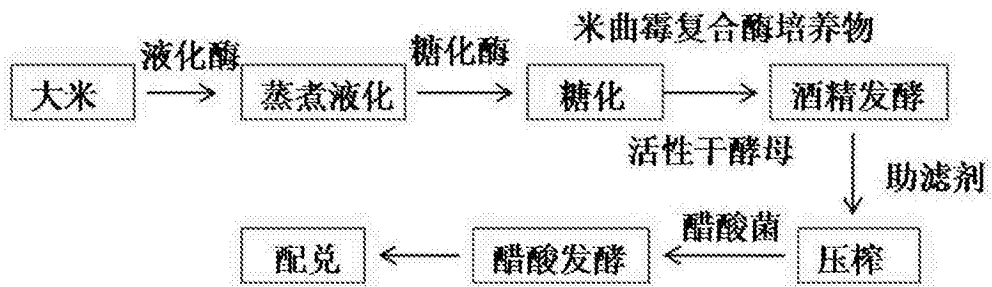


图3

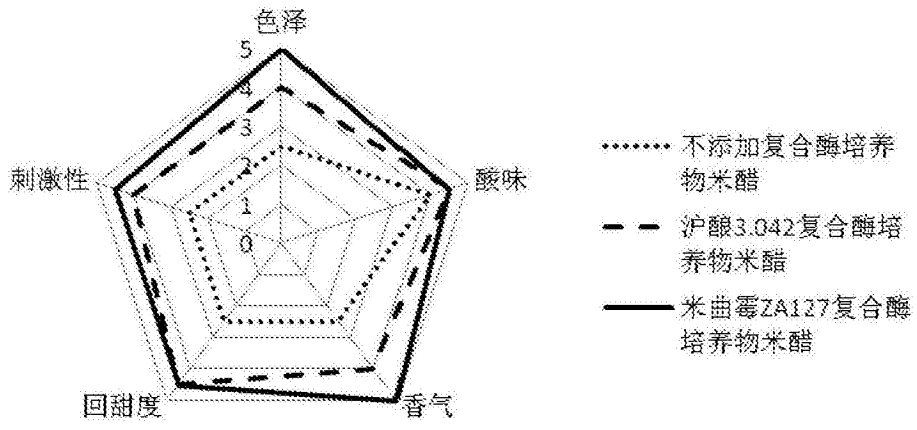


图4