

高蛋白酶活酱油发酵用米曲霉的复合诱变选育  
Multiple mutation breeding of *Aspergillus oryzae* with high  
protease activity in soy sauce fermentation

叶菁<sup>1</sup> 蒋雪薇<sup>1</sup> 罗晓明<sup>1</sup> 周尚庭<sup>2</sup>  
YE Jing<sup>1</sup> JIANG Xue-wei<sup>1</sup> LUO Xiao-ming<sup>1</sup> ZHOU Shang-ting<sup>2</sup>  
扬子江<sup>2</sup> 蒋小红<sup>2</sup> 黎耀波<sup>2</sup>  
YANG Zi-jiang<sup>2</sup> JIANG Xiao-hong<sup>2</sup> LI Yao-bo<sup>2</sup>

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410004; 2. 加加食品集团股份有限公司, 湖南 长沙 410600)  
(1. College of Chemical & Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Changsha Jiajia Food Co., Ltd, Changsha, Hunan 410600, China)

**摘要:**以市售曲精分离菌株米曲霉 CS3.03 为出发菌株, 经 UV—DES 复合诱变处理, 采用酪素平板法及琼脂块法进行初筛, 结合 Folin—酚法复筛结果对比其初筛效果, 低盐固态发酵试验测试高蛋白酶活突变株的发酵性能, 传代试验测试其遗传稳定性。结果表明: 琼脂块法的初筛效率明显高于酪素平板法; 对初筛菌株进行制曲复筛, 获得 5 株有生产潜力的高蛋白酶活突变株, 酱油发酵试验结果证明突变株氨态氮含量、全氮利用率均高于出发菌, 其中突变株 P7、Y5 发酵制得酱油氨态氮含量分别提高 14.56%, 11.26%, 全氮利用率分别提高 3.83%, 4.09%; 遗传稳定性测试证明 P7 具有良好工业应用价值且遗传稳定性好, 其蛋白酶活平均为 4 994.18 U/g 干基, 比出发菌株提高 173.92%。

**关键词:**米曲霉; 蛋白酶活; 复合诱变; 平板初筛; 酱油发酵  
**Abstract:** The original strain of *Aspergillus oryzae* CS3.03 isolated from koji powder was treated with the composite mutagen UV-DES. The mutants were screened with the method of casein plate and agar block. According to re-screening results detecting with the method of Folin-phenol, and the better screening means was found. At the same time, the fermentation ability of high protease activity mutants were tested in the state of low-salt solid-state fermentation technology, and the genetic stability of the best was tested by repeated multiplying. The results showed that the screening efficiency of agar block

method was significantly higher than casein plate method. Five mutants of high protease activity with production potential were obtained by re-screening. The result of soy sauce fermentation test proved that the content of ammonia nitrogen and the utilization ratio of total nitrogen were higher than those of the original strain. The ammonia nitrogen in soy sauce fermented by mutant P7 and Y5 increased 14.56% and 11.26% respectively, and the utilization ratio of total nitrogen increased 2.92% and 3.12% in the same situation. Genetic stability test showed that P7 had great industrial application value and genetic stability, and its average protease activity was 4 994.18 U/gdb, which was 173.92% higher than that of the original bacteria.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*; protease activity; multiple mutation; plate screening; soy sauce fermentation

米曲霉是酱油发酵的主要微生物, 其分泌的蛋白酶能够降解原料中的蛋白质, 生成氨基酸、多肽等小分子物质<sup>[1]</sup>。氨态氮含量是酱油分级的主要指标, 米曲霉的酶活大小直接影响到酱油原料蛋白质的降解程度, 进而影响到酱油的产量和质量, 因此, 米曲霉蛋白酶高产株的筛选一直是酱油发酵菌种选育的重点。早在 20 世纪 60 年代, 学者<sup>[2]</sup>就以 A.S.3.863 为母株进行紫外诱变获得了酶活高的沪酿 3.042。其后, 采用物理诱变、化学诱变以及复合诱变等方式提高米曲霉的蛋白酶活的研究也层出不穷。邵伟等<sup>[3]</sup>通过紫外与化学复合诱变, 得到一株高产蛋白酶菌株 A<sub>11</sub>, 其蛋白酶活由原始的 3 447 U/g 提高到 3 668 U/g。近年来出现了一些新的菌株改造手段, 如离子注入技术<sup>[4]</sup>、原生质融合技术<sup>[5]</sup>、基因调控技术<sup>[6-7]</sup>等。但离子注入技术设备昂贵、操作难度大<sup>[8]</sup>, 而基因工程等分子生物学技术改造的食品用菌中存在着安

**基金项目:**长沙市科技计划重大专项、重点项目 (编号: kq1601013, K1403029-11); 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心开放基金项目 (编号: 2015GCZX07)  
**作者简介:**叶菁, 女, 长沙理工大学在读硕士研究生。  
**通信作者:**蒋雪薇 (1972—), 女, 长沙理工大学副教授, 博士, 硕士生导师。E-mail: jxw\_72@sina.com  
**收稿日期:**2016-12-24

全风险等问题,因此诱变选育一直是酱油用米曲霉发酵性能提升的主要方法。

育种中采用科学的筛选方法是定向高效获得高酶活突变株的关键。酱油发酵用的米曲霉突变株大多选用酪素培养基进行平板初筛,通过水解圈和菌落直径比值(K 值)的大小反应蛋白酶活力的大小<sup>[9]</sup>。由于米曲霉在平板上常形成形状不规则菌落,导致利用 K 值筛选准确度低,误差大;此外,K 值相近的菌株无法在平板初筛中判断出蛋白酶酶活的高低<sup>[10]</sup>。琼脂块法<sup>[11]</sup>可以选择厚度一致的琼脂及生长均匀的菌落打孔,减少了平板初筛中培养基用量及菌种数量的影响,可使平板初筛的结果更为接近摇瓶初筛结果,提高筛选的准确性并减少筛选的工作量。本试验以酱油曲精分离菌株为出发菌,采用紫外—硫酸二乙酯(Ultraviolet-Diethyl sulfate,UV—DES)复合诱变处理,结合 Folin—酚法复筛结果,对比分析酪素平板法与琼脂块法的初筛结果,筛选出一株适用于酱油发酵米曲霉高蛋白酶活突变株,并应用于酱油发酵。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌种

米曲霉(*Aspergillus oryzae*):CS3.03,长沙理工大学微生物实验从市售迪发牌酱油曲精中分离纯化并保藏。

#### 1.1.2 培养基与筛选平板

斜面培养基:PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基<sup>[12]</sup>;  
酪素培养基:干酪素 4 g,磷酸二氢钾 0.36 g,硫酸锰 0.5 g,氯化锌 0.014 g,磷酸氢二钠 1.07 g,氯化钠 0.16 g,硫酸亚铁 0.002 g,氯化钙 0.002 g,去氧胆酸钠 1.0~2.0 g,琼脂粉 15~20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 6.5~7.0;

酪素—琼脂双层培养基:上层为酪素培养基,下层为纯琼脂培养基;

制曲培养基:豆粕 21 g,小麦 6 g,麸皮 3 g,水 27 mL。

#### 1.1.3 仪器

磁力搅拌器:79-2 型,金坛市普瑞斯机械有限公司;  
酸度计:FE28 型,瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司;

紫外分光光度计:Blue Star 型,北京莱伯泰科仪器股份有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 孢子悬液的制备 将 CS3.03 培养 2~3 d 至孢子成熟,紫外诱变时采用 0.85% 的无菌生理盐水洗脱,DES 诱变时采用 pH 7.0 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液洗脱,再制成 10<sup>7</sup> CFU/mL 的孢子悬液备用。

1.2.2 UV 诱变致死率曲线的测定 取 10 mL 孢子悬液至无菌平皿中,搅拌状态下,进行不同剂量的紫外照射,紫外照射条件:紫外灯 30 W、垂直照射距离 30 cm,照射时间分别为 0,15,30,45,60,75,90,105,120 s。以照射时间为 0 s 的菌悬液为对照,按式(1)计算不同照射时间的致死率,并确定最佳诱变剂量<sup>[13]</sup>。

$$L = \frac{n_1 - n_2}{n_1} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

$L$ ——致死率,%;

$n_1$ ——对照组活菌菌落形成单位,CFU/mL;

$n_2$ ——处理组活菌菌落形成单位,CFU/mL。

1.2.3 DES 诱变致死率曲线的测定 在 250 mL 的三角瓶中加入 100 mL 孢子悬液,取 1 mL DES 加至菌液中混匀,分别处理 0,15,30,45,60,75,90,120 min 后,取样 5 mL 用 2.5 mL 25% 的硫代硫酸钠溶液终止反应。统计致死率并确定最佳的诱变剂量。

#### 1.2.4 初筛

(1) 酪素双层平板法:将诱变后的孢子悬液适当稀释后涂布于酪素双层平板,待平板培养好后测定各菌落的 K 值(透明圈直径与菌落直径比)。

(2) 琼脂块法:将经复合诱变后的孢子悬液涂布于 PDA 平板,上述平板用黑布包好于 28 ℃ 培养 48 h。挑选菌落直径较大的菌株,打孔器打下,接种于酪素—琼脂双层平板,选取透明圈较大者作为进一步筛选菌株。

1.2.5 复筛 取 1 mL 10<sup>6</sup> CFU/mL 的初筛后菌株的孢子悬液于制曲培养基中,32 ℃ 恒温培养 36 h。采用 Folin—酚法<sup>[14]</sup>测定蛋白酶酶活力。

1.2.6 酱油发酵试验 按 0.3% 的接种量将发酵菌株接种于制曲培养基中,搅拌混匀,32 ℃ 保温发酵 36 h,不定时翻曲。按成曲:盐水为 1:1.2(g/mL)加入 16% 的盐水,置于 45 ℃ 保温发酵 12 d,再以成曲:盐水为 1:0.8(g/mL)添加 20% 的盐水,35 ℃ 后发酵 10 d,发酵期间每天循环淋浇一次,发酵结束后抽提头油。氨基酸态氮和全氮测定:分别按甲醛法和凯氏定氮法执行<sup>[15]</sup>。

$$U = \frac{M_1 \times C_1 + M_2 \times C_2}{M_3 \times C_3 + M_4 \times C_4 + M_5 \times C_5} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:

$U$ ——全氮利用率,%;

$M_1$ ——酱油头油总质量,kg;

$C_1$ ——酱油头油全氮含量,%;

$M_2$ ——酱油二油及三油总质量,kg;

$C_2$ ——酱油二油及三油混合物全氮含量,%;

$M_3$ ——豆粕质量,kg;

$C_3$ ——豆粕全氮含量,%;

$M_4$ ——小麦质量,kg;

$C_4$ ——小麦全氮含量,%;

$M_5$ ——麸皮质量,kg;

$C_5$ ——麸皮全氮含量,%。

1.2.7 遗传稳定性试验 将最终筛选所得的突变菌株进行 10 次试管斜面传代培养,然后制曲测其酶活,验证突变菌株的稳定性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 出发菌株的选择及性能测定

从曲精样品中分离得到 CS3.03,测定其在 PDA 平板上

的菌落直径,琼脂块酪素-琼脂平板上的透明圈直径以及蛋白酶活力见表 1。曲精酶活为 1 254.98 U/g 干基,CS3.03 的蛋白酶活力比原曲精提高了 45.28%,其具有较好的产蛋白酶基础,且生长良好,可以作为诱变育种出发菌株。

表 1 出发菌株 CS3.03 性能测定

Table 1 Performance measurement of the original strain CS3.03

| 出发菌株   | <i>d</i> 菌落/mm | <i>D</i> 透明圈/mm | 酶活/(U · g <sup>-1</sup> db) |
|--------|----------------|-----------------|-----------------------------|
| CS3.03 | 9.50           | 10.82           | 1 823.23                    |

2.2 复合诱变条件的确定

紫外(UV)诱变作为一种诱变频率高,不易回复突变的物理诱变方法,被广泛地应用于工业微生物育种<sup>[16]</sup>。DES 是单功能烷化剂,具有诱变剂量易控制,对基因组损伤小,诱变效果好的优点。诱变中采用一种诱变剂处理时突变的位点比较单一,难以产生较好的突变效果。采用两种以上诱变剂复合诱变,易产生协同效应,增加突变位点,使突变效率变高,且使获得正突变株的可能性增大。试验选取 UV—DES 复合诱变,经测定,紫外照射时间为剂量的诱变致死率曲线见图 1,1%DES 对孢子悬液进行诱变处理的致死率曲线见图 2。根据诱变剂致死与诱变效果双重效应,过高的致死率筛选量较少但不利于正突变,因此低于 80%的致死率处理将有利于获得正突变菌株,且减少筛选量。由图 1、2 可知,UV 照射时间为 30 s,致死率为 40%,DES 处理 30 min 时,致死

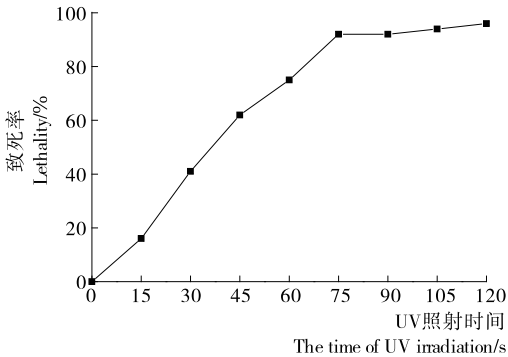


图 1 紫外诱变致死率曲线

Figure 1 Lethality of UV light mutagenesis

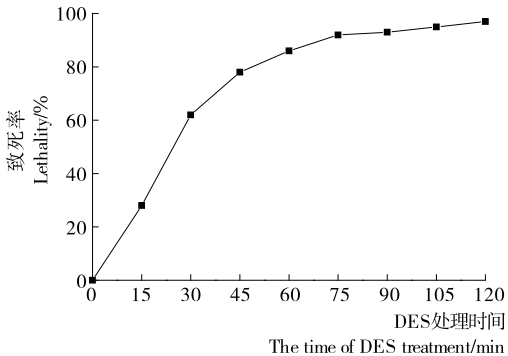


图 2 DES 诱变致死率曲线

Figure 2 Lethality of DES treatment

率为 60%。因此,选择 UV 对孢子悬液处理 30 s 后用 DES 处理 30 min,其致死率在 70%~80%,诱变效果较好且易筛选。复合诱变后平板初筛获得 200 株生长良好的突变株。

2.3 高蛋白酶酶活突变株平板初筛

2.3.1 酪素平板法 米曲霉具有产水解蛋白酶能力,能够分解酪素培养基中的酪蛋白,从而产生出透明圈。吴华昌等<sup>[17]</sup>研究表明,采用酪蛋白透明圈法可以初步估算曲霉蛋白酶的相对酶活性高低,从而大大减少复筛的工作量。从 200 株突变菌中选取 15 株进行编号并制曲测定酶活,其结果见图 3。由图 3 可知,酪素双层平板初筛突变菌中,Y9 号菌 K 值最大;而制曲复筛测定蛋白酶酶活的结果中,Y5 号菌的酶活最大,达到 4 972.89 U/g 干基,相比于出发菌提高了 172.8%。从图 3 还可以看出,蛋白酶酶活与 K 值存在一定的关系,但 K 值大的蛋白酶酶活不一定高,如 Y12 的 K 值高于 Y13,但蛋白酶酶活却低于 Y13,说明 K 值在一定程度上可以反映蛋白酶酶活的高低,但是对于 K 值相近的菌株此法的准确度较低。

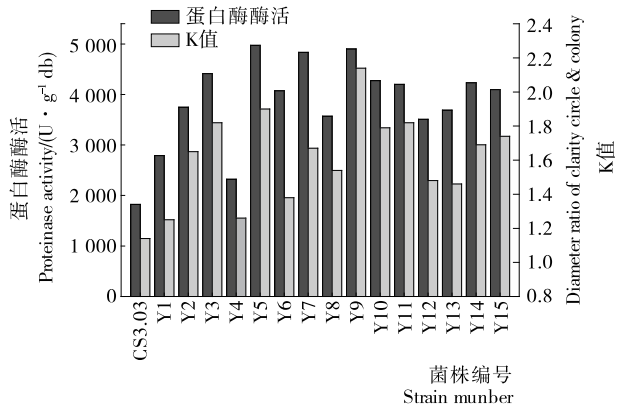


图 3 15 株突变株的 K 值与蛋白酶酶活对比

Figure 3 Diameter ratio of clarity circle & colony and proteinase activity of 15 mutants

2.3.2 琼脂块法 由于米曲霉的生长蔓延性好,其菌落形态不规则、边缘不清晰,透明圈直径较难测定,从而导致 K 值(透明圈直径与菌落直径比)的测定结果准确度较低;且各菌之间的 K 值很小,难以反应各菌之间产酶能力的差距。为提高初筛选效率,本试验还选用了琼脂块法,将突变株涂布 PDA 平板培养,选择 15 株单个长势较好且均匀的菌落用打孔器打下,置于酪素-琼脂平板上,经一段时间的培养后直接测定其透明圈直径,同时对各突变菌进行蛋白酶酶活测定,其结果见图 4。由图 4 可知,透明圈直径和蛋白酶酶活最大的都是 P7 号菌,其酶活为 5 020.98 U/g 干基,比出发菌提高了 175.39%,也高于采用酪素双层平板法筛选出的 Y5 号菌。琼脂块法的初筛结果与制曲法的复筛结果一致性较好,究其原因,是由于打孔器打下的琼脂块的厚度及直径一致,因此突变菌产蛋白酶的差异可以直接从透明圈上反映出来,所以利用该法可以较为迅速且准确地筛选出高产菌。

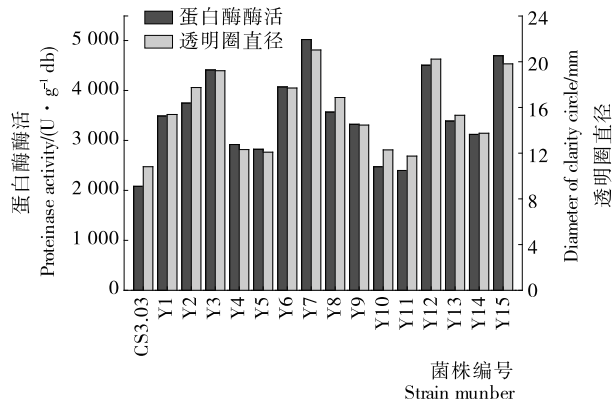


图 4 15 株突变株的透明圈直径及蛋白酶酶活  
Figure 4 Diameter of clarity circle and proteinase activity of 15 mutants

2.4 高蛋白酶酶活突变株酱油发酵试验

从 30 株突变菌株中优选出 5 株高酶活米曲霉与出发菌株 CS3.03 对比进行酱油发酵试验,测定其氨态氮含量、全氮利用率,结果见表 2。筛选得到的 5 株突变菌的蛋白酶酶活以及发酵酱油的氨态氮含量和全氮利用率都高于出发菌株 CS3.03,其中突变株 P7 和 Y5 对发酵酱油品质的提升作用比较明显。相比于出发菌株,P7、Y5 发酵酱油的氨态氮含量分别提高 14.56%,11.26%;全氮利用率分别提高 3.83%,4.09%,说明通过 UV—DES 诱变筛选得到的蛋白酶高产株蛋白质的利用能力具有明显增强,在酱油发酵中能够有效地提高全氮利用率。

表 2 CS3.03 与突变株蛋白酶酶活及发酵酱油质量对比  
Table 2 The comparison of proteinase activity and the quality of its fermented soy sauce between CS3.03 and the mutants

| 菌株     | 蛋白酶酶活/<br>(U · g <sup>-1</sup> db) | 头油氨态氮含量/<br>(g · L <sup>-1</sup> ) | 全氮利用率/<br>% |
|--------|------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| CS3.03 | 2 083.23                           | 8.79                               | 76.32       |
| P7     | 5 020.98                           | 10.07                              | 79.24       |
| Y5     | 4 972.89                           | 9.78                               | 79.44       |
| Y9     | 4 902.73                           | 9.93                               | 78.21       |
| Y7     | 4 832.98                           | 9.72                               | 77.34       |
| P15    | 4 695.48                           | 9.56                               | 76.95       |

2.5 突变株遗传稳定性试验

酱油发酵试验结果表明 Y5、P7 具有提高出品率 and 产品质量的作用,将两株蛋白酶高产菌进行传代 10 次培养并测定其蛋白酶酶活,结果见图 5。由图 5 可知,突变株 P7 平均酶活为 4 994.18 U/g 干基,说明突变菌株保持了较好的产酶稳定性,且蛋白酶活力高;Y5 平均酶活为 4 710.63 U/g 干基,Y5 传代培养中酶活较于 P7 酶活波动略大,由此看出,P7 的遗传稳定性更佳。综合考虑蛋白酶酶活以及遗传稳定性,P7 明显优于出发菌株和 Y5 菌株,可应用于酱油的工业化生产。

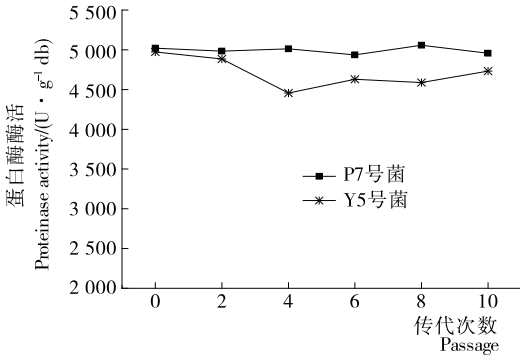


图 5 Y5 号菌和 P7 号菌的遗传稳定性  
Figure 5 Genetic stability of mutant Y5 and P7

3 结论

米曲霉是酱油发酵主要菌种,其蛋白酶酶活大小直接影响酱油产品质量,酱油生产中米曲霉蛋白酶酶活的保持及提升为酱油生产用菌改造的永恒主题。本试验研究证明 UV—DES 的理化复合诱变是比较方便有效的育种方法,初筛中采用琼脂块法可以减少酪素双层平板的工作量并提高其筛选准确性。经上述诱变及筛选方法获得了突变株 P7,其蛋白酶酶活达 4 994.18 U/g 干基,比曲精分离的出发菌株 CS3.03 提高了 173.92%,其发酵酱油的氨态氮含量提高 14.56%,全氮利用率提高 3.83%。P7 遗传稳定性良好,是一株良好的酱油生产用菌。

参考文献

[1] MULLER C, MCLNTYRE M, HANSEN K, et al. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1 827-1 836.

[2] 包启安. 酱油科学与酿造技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 114.

[3] 邵伟, 熊泽, 唐明. 沪酿 3.042 米曲霉菌种诱变选育研究[J]. 中国调味品, 2006(3): 21-04.

[4] 凌帅, 刘咏, 姚建铭, 等. 紫外线与 N<sup>+</sup> 注入复合诱变选育曲酸高产菌株[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 234-238.

[5] 汤斌, 张海龙, 张庆庆, 等. 基于紫外诱变原生质体法选育高活力蛋白酶产生菌[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 195-200.

[6] ZHENG X F, KOBAYASHI Y, TAKEUCHI M. Construction of a low-serine-type-carboxypeptidase-producing mutant of *Aspergillus oryzae* by the expression of antisense RNA and its use as a host for heterologous protein secretion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998(49): 39-44.

[7] KITAMOTO N Y, SHOKO Y Y, OHMIYA K I, et al. A Second Pectin Lyase Gene (pet2) from *Aspergillus oryzae* KBN616: Its Sequence Analysis and Overexpression, and Characterization of eht Gene Products[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(4): 378-381.

[8] 陈锡剑, 陈建华. 常压室温等离子体诱变选育高产曲酸米曲霉[J]. 化学与生物工程, 2015, 32(5): 52-60.

显变化,不易流动水( $T_{22}$ )信号强度和峰面积均明显增加,而自由水( $T_{23}$ )信号强度和峰面积明显减小。说明在磷酸化改性后,蛋白质带电量增加,斥力增大,蛋白质解聚,形成持水的空间网络结构,维持了坚固的四级空间立体结构,对于水分的束缚作用增强,体系中的氢质子所受束缚力提高。

L-NMR 结果表明,磷酸化改性后的蛋清蛋白持水性有所提高,蛋白质分子与水分子结合更加紧密,不易失水。

### 3 结论

(1) 利用 STP 对蛋清液进行磷酸化改性(反应 pH 7.5, STP 添加量 4%,反应温度 40 ℃,反应时间 4 h),改性后蛋白磷酸化程度达到 50.96 mg/g,并采用 LF-NMR 技术辅助观察了蛋白质内部水分的迁移变化,结果表明磷酸化改性后鸡蛋清液的功能性得到改善,这为拓展蛋白质的利用范围及适应各类食品的生产开发提供了依据。

(2) 现有鸡蛋清改性研究<sup>[23-24]</sup>多以喷雾干燥制备的蛋清粉为原料,本研究以蛋清液为原料,可最大程度地保留鸡蛋清的各项功能特性,并节约生产成本。

### 参考文献

[1] 王勇章,李睿,李智,等.谷氨酰胺转氨酶对鸡蛋全蛋液热凝固性的影响[J].食品与机械,2014,30(4):62-66.

[2] 张铭东,张根生,司森菲,等.盐和糖对巴氏杀菌蛋清液功能性质的影响[J].食品与机械,2014,30(6):7-9,42.

[3] FOEGEDING E A, LUCK J P Davis. Factors determining the physical properties of protein foams[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(2/3): 284-292.

[4] LE Floch-Fouere. Synergy between ovalbumin and lysozyme leads to non-additive interfacial and foaming properties of mixtures[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(2): 352-365.

[5] DICKINSON E. Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions[J]. Physicochem Eng Aspects, 2006, 288: 103-111.

[6] ZHAO Liang, WU Ren-an, HAN Guang-hui, et al. The highly selective capture of phosphopeptides by zirconium phosphonate-modified magnetic nanoparticles for phosphoproteome analysis[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008, 19(8): 1 176-1 186.

[7] DEAN E Mc Nulty, ROLAND S Annan. Hydrophilic interaction chromatography for fractionation and enrichment of the phos-

phoproteome[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 527(1): 93-105.

[8] ZHOU Yi-jun, GAO Fei, LI Xiao-feng, et al. Alterations in-phosphoproteome under salt stress in *Thellungiella* roots [J]. Chinese Science Bulletin, 2010, 55(32): 3 673-3 679.

[9] MATHEIS G. Phosphorylation of food Proteins with Phosphorus oxychloride-improvement of functional and nutritional properties [J]. Food Chemistry, 1991(39): 13-26.

[10] 李瑜. 三聚磷酸钠改性小麦面筋蛋白研究[J]. 粮食与油脂, 2002(2): 4-5.

[11] 刘丽莉, 向敏, 康怀彬, 等. 鸡蛋清蛋白磷酸化改性及功能性质的研究[J]. 食品工业科技, 2013(6): 154-158.

[12] 苗颖, 赵征. 低场核磁共振研究热烫对纤丝干酪水分状态的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 4-7.

[13] 刘斯琪, 林向阳, 朱丰, 等. 利用核磁共振技术研究食盐对鸭蛋黄品质的影响[J]. 食品工业科技, 2016(12): 160-165, 89.

[14] 姚玉静, 杨晓泉, 张新会. 大豆分离蛋白的磷酸化改性研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(10): 5-8.

[15] 程文红. 米糠谷蛋白磷酸化改性及性质的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2016: 10-34.

[16] ANTON Iliuk, KEERTHI Jayasundera, RACHEL Schluttenhofer, et al. Functionalized soluble nanopolymers for phosphoproteome analysis[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 790(1): 277-285.

[17] 孙学斌, 宋丹凤. 大豆蛋白磷酸化[J]. 植物研究, 2001, 21(1): 110-113.

[18] 卢寅泉, 陈彤华, 陈连就. 磷酸化大豆蛋白功能特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 1993(1): 17-24.

[19] 熊柳, 孙高飞, 王建化, 等. 花生分离蛋白磷酸化改性的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 35-41.

[20] ANA Cláudia, CARRARO Alleoni. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming[J]. Scientia Agricola, 2006, 63(3): 291-298.

[21] 石晓, 浮吟梅. 花生蛋白持水性研究[J]. 粮油加工, 2006(9): 56-60.

[22] 刘超. 蛋清蛋白的改性及其起泡特性研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2008: 10-34.

[23] 郑优, 贾亮. 响应面法优化可食性鸡蛋清蛋白膜的磷酸化改性工艺[J]. 食品工业科技, 2016(6): 242-249.

[24] 赵薇, 迟玉杰. 磷酸化改性提高蛋清粉凝胶性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 79-83.

(上接第 10 页)

[9] 张玉涛, 许学书, 王宏. 不同诱变方法对酱油发酵菌种性能的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 39-42.

[10] 周其洋, 陶文沂. 米曲霉多酶系优良菌株的诱变选育[J]. 中国调味品, 2009, 34(9): 57-60.

[11] 蒋雪薇, 盛灿梅, 周倩, 等. 琼脂块法快速平板初筛米根霉 *L*-乳酸高产菌[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 8-10.

[12] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 242.

[13] 岳希洁, 蒋雪薇, 罗晓明, 等. 酿酒酵母温度敏感性突变株的选育[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 9-12.

[14] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 205-209.

[15] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.39—2003 酱油卫生分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[16] 苗兰兰, 张东杰, 王颖. 复合诱变高产金属硫蛋白酵母菌株的筛选[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 261-264.

[17] 吴华昌, 邓静. 高产蛋白酶米曲霉的选育[J]. 四川食品与发酵, 2004, 40(2): 46-48.