

白酒大曲产酯化酶犁头霉的分离鉴定 及产酶条件优化

Isolation and identification of high-yield esterase *Absidia* in Daqu and
Optimization of enzyme production conditions

孙晓璐¹ 王明跃¹ 张源²

SUN Xiao-lu¹ WANG Ming-yue¹ ZHANG Yuan²

(1. 阜阳职业技术学院, 安徽 阜阳 236031; 2. 阜阳师范学院, 安徽 阜阳 236037)

(1. Fuyang Vocational Technical College, Fuyang, Anhui 236031, China;

2. Fuyang Normal University, Fuyang, Anhui 236037, China)

摘要:以安徽金种子集团中温大曲为原料,从中筛选能够产酯化酶的发酵菌种并鉴定其种类,再以酯化力为目标值研究该菌株产酯化酶的发酵培养基组成和发酵条件。结果表明,从金种子中温大曲中分离得到1株高产酯化酶的菌株LD06,通过形态学观察、分子鉴定及Biolog鉴定确定该菌株为犁头霉。以该菌株发酵产物中的酯化力为目标值,得到该犁头霉的固体发酵培养基组成为:麸皮10 g、玉米粉1.5 g、酵母粉2.0 g、亚麻籽油1 g/100 g·培养基、硫酸铵0.2 g、蒸馏水10 mL;培养条件分别为温度36℃、时间45 h。该条件下得到的犁头霉产酯化酶的酯化力为9.32 g/L,与该菌株初始酯化力相比提高了22.55%。

关键词:犁头霉;酯化酶;酯化力;产酶条件

Abstract: The aim of this study was to screen high-yield strains of esterase from Daqu in order to increase the content of esters in Daqu. Medium-temperature Daqu was used as material to screen high-yield esterase producing strains and identify the types of strain. Then we studied on enzyme production conditions of the strains with the target value of esterifying power. The result showed that high-yield esterase producing strain-LD06 was isolated from medium-temperature Daqu, and the morphological and molecular identification results confirmed that the strain was *Absidia*. Esterifying power was used as reference index to confirm the culture media, which was summed up as follows: 10 g wheat bran as culture substrate, corn flour as the optimum carbon source with the contents of 1.5 g, yeast as the optimum

nitrogen source with the contents of 2.0 g, flaxseed oil as inducer with the contents of 1 g/100 g; other composition and addition in the medium with 0.2 g (NH₄)₂SO₄ and 10 mL H₂O. With the increase of fermentation time and temperature, esterifying power showed significant increase firstly and then decreased. Culture conditions which concluded temperature and time was confirmed at 36℃ and 45 h, respectively. Under these fermentation medium and conditions the highest esterifying power was 9.32 g/L, which was increased by 22.55% than the control.

Keywords: *Absidia*; esterase; esterifying power; fermentation conditions

酯酶(Esterase E.C.3.1.1.2)也被称作羧基酯酶,在白酒行业中常称为酯化酶或酯分解酶,是由一类具有酸、醇酯化功能的特定微生物发酵产生^[1-2]。研究^[3]表明,酯酶大量存在于酵母菌、霉菌及其他细菌的发酵产物中,既可以水解酯类也可以催化合成低级脂肪酸酯。白酒发酵大曲中含有大量的能够产酯化酶的功能性菌(包含细菌、酵母菌、霉菌等),其代谢产物是构成白酒风味的前提^[4]。其中,霉菌作为一类白酒酿造过程中重要的产酯化酶菌之一,所产生的酯化酶能够将己酸和乙醇催化合成成为构成白酒主体呈香物质的己酸乙醇^[5-6]。因此,近年来能够催化酸、醇缩合的产酯化酶菌株逐渐成为酿酒行业的研究热点^[7]。众多学者^[8-9]分别通过筛选代谢产酯化酶活力较高的菌株,催化己酸乙酯的合成,并与己酸菌复合使用,极大地提高了己酸乙酯的合成效率,从而达到提高白酒品质、缩短发酵周期的目的。针对酒体增香,国内外研究较多的是红曲菌酯化酶酯化生成己酸乙醇^[10-12],但是对于犁头霉产酯化酶菌株的研究还未见报道。

目前,在白酒大曲中不同霉菌的鉴定大多采用基于ITS rDNA的分子生物学方法。例如,Li^[13]和Wang等^[14]分

基金项目:安徽省高等学校自然科学重点研究项目(编号:KJ2017A609);安徽省质量工程项目“名师工作室”(编号:2015msgzs170)

作者简介:孙晓璐(1981—),女,阜阳职业技术学院副教授,硕士。

E-mail:303028607@qq.com

收稿日期:2018-04-28

别采用分子生物学方法从芝麻香型白酒大曲及浓香型白酒大曲中鉴定了高产酯化酶的 *Schlegelellasp* 和 *Absidiablake sleana* 菌株;Li 等^[15] 通过 ITS rDNA 基因序列分离鉴定了中国传统醋大曲中的典型微生物。主要是因为该类方法直接对目标菌种的 DNA 进行提取,通过分析所提取的 DNA 种类,确定目标菌群的种类,是目前分析微生物菌群中常用的分子生物学方法。并且随着分子生物学技术的不断发展,利用 ITS rDNA 基因序列对微生物进行种属鉴定已经在不同领域得到了越来越广泛的应用。

本研究首先用生理生化的方法对白酒中温大曲中的菌株进行初步筛选分离,筛选出能够高产酯化酶的菌株,然后采用基于 ITS rDNA 基因的分子生物学方法对菌株进行鉴定,并确定该菌株的发酵培养基组成和发酵条件,在弥补白酒型头霉分离鉴定等相关研究空白的基础上,优化得到白酒大曲产酯化酶型头霉的发酵条件,以期为提高大曲中酯含量及提高优质酒率等领域的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大曲:安徽金种子酒业有限公司;

SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、DNA Marker:生工生物工程(上海)股份有限公司;

DNA 聚合酶、pMD19-T Vector:宝生物工程(大连)有限公司;

Ezup 柱式真菌基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;

氯化钠、葡萄糖、EDTA、CTAB、SDS 等其他生化试剂:分析纯,市售;

平板筛选培养基:按照牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 25 g,蒸馏水 1 000 mL 配制培养基,然后将 3% 的聚乙烯醇溶液和三丁酸甘油酯按照 9:1(体积比)混合均匀即为乳化液,最后将培养基与乳化液按照 4:1(体积比)混合均匀,121℃灭菌 20 min;

种子培养基:琼脂 20 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,1/3 000 的孟加拉红溶液 100 mL,蒸馏水 1 000 mL,混合均匀后 121℃灭菌 20 min;

固体培养基:麸皮 1 000 g,玉米粉 100 g,豆粕 200 g,硫酸铵 20 g,蒸馏水 1 000 mL,混合均匀后 121℃灭菌 20 min。

1.2 仪器设备

电子精密天平:AY120 型,北京赛多利斯天平有限公司;

灭菌锅:TOMY-SX-700 型,美国 Tomy 公司;

超净工作台:SW-CJ-IBU 型,苏州苏净集团;

高速离心机:5418 型,芬兰 Eppendorf 公司;

pH 计:Orion 3 STAR 型,美国 Thermo 公司;

光学显微镜:Eclipse 80i 型,日本 Nikon 公司;

多功能摇床:HYL-A 型,太仓强乐实验仪器有限公司;

PCR 仪:PTC100TM 型,美国 Thermo 公司;

高电流电泳仪:PowPacTM HC164-5052 型,美国 Bio-Rad 生命医学产品公司;

全自动数码凝胶成像分析仪:JS-380C 型,上海培清科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株初筛 将大曲原料磨碎过 60 目筛,称取 20 g 大曲原料添加到装有 200 mL 生理盐水的无菌锥形瓶中,25℃浸泡 1 h。3 层纱布过滤收集滤液。分别将滤液按照梯度稀释法稀释为 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 个/mL 的菌悬液。然后取 0.2 mL 不同梯度的菌悬液并均匀涂布于平板筛选培养基上,每个稀释梯度做 3 个平行,将涂布好的平板培养基置于 35℃恒温培养基中培养 4 d。分别测定菌落周围出现的透明圈(D)与菌落直径(d)的比值。选择 D/d 较大的菌株进行编号,然后将其保藏于 20% 的甘油管中,于 -20℃贮藏。

1.3.2 菌株复筛 将初选得到的菌株在平板上进行活化后,制备成 1×10^7 个/mL 的孢子悬液,然后取上述悬液 1 mL 于 100 mL 的种子培养基中,调整培养箱温度为 35℃、180 r/min 条件下培养 2 d。取 2 mL 涂布于固体发酵培养基中,在 35℃培养 3 d,取出后 50℃烘干,然后测定其酯化酶活力。

1.3.3 酶活力测定

(1) 酯化液制备:根据文献[16]。

(2) 酯含量测定:采用皂化法^[17]。

1.3.4 菌株鉴定方法

(1) 形态观察:采用美蓝染色液进行染色,做压片处理后于 40×油镜下观察,记录细胞形态特征、细胞大小、出芽情况。置于荧光倒置显微镜下进行采集,得到相关霉菌形态图像,进行形态学观察。

(2) 基因组 DNA 的提取:按操作说明书,使用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行真菌基因组 DNA 的提取,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行 PCR 扩增。

(3) ITS rDNA 分子鉴定:使用通用引物 5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3', 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 扩增内转录间隔区 1 和 2,PCR 反应体系为 25 μ L。PCR 扩增反应条件:94℃预变性 4 min,94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,然后在 72℃延伸 10 min,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压为 100 V。将条带采用 DNA 胶回收试剂盒(Omega)进行切胶回收,并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

(4) 系统发育树构建:将测得序列在 Gen Bank 中用 Blast 程序进行相似性分析,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^[18]。

(5) Biolog 鉴定:挑选培养平板上的单个菌落,采用 Biolog 专用培养基将菌株进行纯化,配制一定细胞浓度的菌悬液,将菌悬液接种至特定鉴定板培养一定时间,经 Biolog 微生物鉴定仪鉴定。

1.3.5 菌株 LD06 的发酵条件确定

(1) 碳源选择及最适添加量的确定:根据 1.1 中固体培养基的配制方法,分别以淀粉、玉米粉、果糖、葡萄糖、蔗糖作为碳源配制固体发酵培养基,添加量为 1 g,36℃培养 4 d 后测定酶活力,确定最佳碳源。然后选择最佳碳源添加量为

0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 g 时,测定酶活力以确定最佳碳源添加量。

(2) 氮源选择及最适添加量的影响:根据 1.1 中固体培养基的配制方法,分别以蛋白胨、牛肉膏、黄豆粉、酵母粉、硫酸铵、豆粕粉为氮源配制固体发酵培养基,添加量为 1 g,36 ℃ 培养 4 d 后测定酶活力,确定最佳氮源。然后选择最佳氮源添加量为 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 g 时,测定酶活力以确定最佳氮源添加量。

(3) 其他组成的影响:根据 1.1 中固体培养基的配制方法,分别在确定发酵培养基最佳氮源、碳源及其添加量后,各添加大豆油 1 g/100 g · 培养基,Tween 80 1 g/100 g · 培养基,亚麻籽油 1 g/100 g · 培养基,葵花籽油 1 g/100 g · 培养基,乙醇 5 g/100 g · 培养基,乳酸 0.4 g/100 g · 培养基,研究不同的添加物对酶活力的影响^[16-17]。

(4) 发酵条件对菌株 LD06 产酶的影响:在确定固体发酵培养基组成的基础上(麸皮 10 g,玉米粉 1.5 g、酵母粉 2.0 g、亚麻籽油 1 g/100 g · 培养基、硫酸铵 0.2 g、蒸馏水 10 mL),固定发酵温度分别为 32,36,40 ℃ 时,不同发酵时间 36,39,42,45,48,51,54 h 对菌株产酯化酶活力的影响。

1.4 数据统计

所有数据利用 Microsoft Excel 2010 进行整理及作图,试验数据用 SAS 8.2(SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)统计软件进行方差分析(ANOVA),不同平均值之间利用 Fisher's 最小显著差异法(LSD)进行差异显著性检验($P<0.05$)。所有试验都是随机抽取 3 个重复($n=3$)进行指标分析。

2 结果与分析

2.1 产酯化酶霉菌菌株的筛选

2.1.1 初筛结果 将试验大曲涂布后于 35 ℃ 培养 4 d,根据试验条件选取 D/d 相对较大的 8 株菌株,具体编号见表 1。从表 1 中选取 D/d 较大的 4 个菌株进行复筛。

表 1 菌株初选结果[†]

Table 1 Result of screening strains cm/cm

菌株编号	D/d	菌株编号	D/d
SG01	1.96 ± 0.15^{bc}	LD03	1.53 ± 0.19^d
TG03	1.79 ± 0.10^c	LD06	2.32 ± 0.10^a
YH01	1.52 ± 0.22^d	LD08	1.22 ± 0.18^d
ZL05	2.09 ± 0.08^b	LG03	2.05 ± 0.11^b

† 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.1.2 复筛结果 将 4 个菌株接种到种子培养基中,恒温摇瓶培养 2 d 后涂布于固体培养基上,35 ℃ 静置培养 3 d,分别测定不同菌株的酯化力,见表 2。从表 2 可以看出,菌株 LD06 有最高的酯化力为 7.605 g/L。因此,选用该菌株进行后续的研究。

2.2 高产酯化酶菌株 LD06 的形态特征及生理生化鉴定

2.2.1 菌株的形态特征 将菌株 LD06 在平板培养基上培

养 3 d 后,菌丝呈白色长毛状,不产色素,具有典型的霉菌菌落特征,见图 1(a)。通过在显微镜下观察可以看出[图 1(b)],菌株 LD06 菌丝存在较多的分支、无匍匐菌丝和假根、具隔、顶端膨大形成圆形的孢子囊。

表 2 菌株复筛结果[†]

Table 2 Result of re-screening strains g/L

菌株编号	酯化力	菌株编号	酯化力
SG01	7.107 ± 0.156^{bc}	LG03	6.967 ± 0.139^c
ZL05	7.287 ± 0.114^b	LD06	7.605 ± 0.177^a

† 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

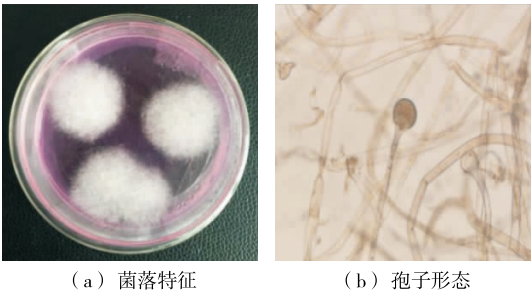


图 1 LDO6 菌株的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of LD06 strain

2.2.2 高产酯化酶 LD06 菌株基于 16S rDNA 基因的分子生物学鉴定 从图 2 可以看出,菌株 ITS rDNA 基因片段的扩增产物约为 600 bp 的单一 DNA 条带,与引物设计的目标片段大小相符。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的条带,连接到 pMD19-T 载体上进行测序。测序结果表明,扩增片段长度为 666 bp 个碱基序列。

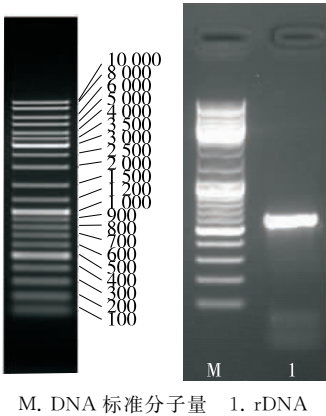


图 2 ITS rDNA 区 PCR 扩增产物电泳图

Figure 2 PCR agarose gel electrophoresis map of the ITS rDNA regions

将菌株 LD06 的 ITS rDNA 基因序列递交 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,选取与菌株 LD06 ITS rDNA 基因同源性较高的菌株的 ITS rDNA 序列进行比对,利用 DNA-MAN 构建系统发育树(图 3)。结果显示,菌株 LD06 与 *Lichtheimia ramosa* strain (KY072930.1)、*Lichtheimia corymbifera* strain F49 (KF278648.1)相似度均为 99%。因

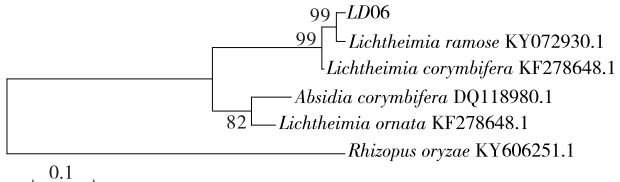


图 3 基于 ITS rDNA 基因序列构建的系统发育树
Figure 3 Phylogenetic tree derived from the ITS rDNA sequence

此,根据形态学和分子生物综合分析初步鉴定菌株 LD06 是 *Lichtheimia corymbifera* 或 *Lichtheimia ramosa*。

2.2.3 高产酯化酶 LD06 菌株 Biolog 鉴定 Biolog 鉴定方法是一种新型微生物鉴定方法,目前已广泛应用于大曲、窖泥等微生物的分离、纯化、鉴定。本研究将 LD06 通过 Biolog 微生物鉴定仪鉴定,具体见表 3。从表 3 可以看出,菌株 LD06 为 *Absidia corymbifera* (Cohn) Saccardo(伞枝犁头霉)。

表 3 Biolog 鉴定结果

Table 3 Result of Biolog identification

序号	PROB	SIM	DIST	种类
1	1.000	0.707	4.454	<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Saccardo
2	0.000	0.000	8.239	<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex Schroeter
3	0.000	0.000	13.759	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
4	0.000	0.000	13.987	<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen & Geerlings BGB

2.3 菌株 LD06 的发酵条件

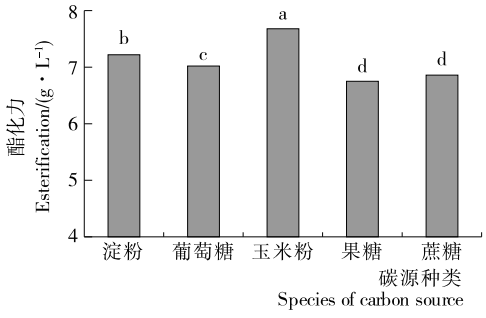
2.3.1 培养基组成对菌株 LD06 产酶的影响

(1) 碳源及添加量:从图 4(a)可以看出,淀粉和玉米粉作为碳源更适合于菌株 LD06 产酯化酶。比较 2 种碳源可以得出,玉米粉作为碳源时,LD06 产酯化酶的能力最强,分析原因主要是该类碳源中可能含有其他诸如维生素、氨基酸等促生长因子。因此,研究中选用玉米粉作为 LD06 产酯化酶发酵培养基的碳源。

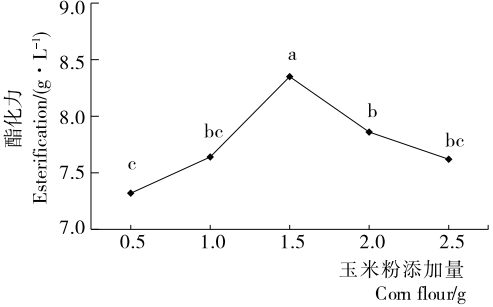
在发酵培养基中,不同的玉米粉添加量对菌株 LD06 产酯化酶的能力的影响结果见图 4(b)。当玉米粉添加量低于 1.5 g 时,由于培养基中碳源添加量太低,影响了菌株的生长及产酯化酶;而当玉米粉添加量超过 1.5 g 时,过量的碳源会极大地促进菌株的生长,加速了菌体代谢及凋亡的速率,从而降低了酯化酶的产量。因此,当玉米粉添加量为 1.5 g 时,能显著提高菌株 LD06 产酯化酶的能力。

(2) 氮源及添加量:在发酵培养基中添加 1.5 g 玉米粉作为碳源,氮源种类对 LD06 产酯化酶的影响结果见图 5(a)。从图 5(a)可以看出,酵母粉是菌株 LD06 产酯化酶发酵培养基中最合适的氮源,其次为黄豆粉和豆粕粉。

酵母粉添加量对 LD06 产酯化酶的影响作用见图 5(b)。从图 5(b)可以看出,酵母粉添加量对酯化力有显著的($P < 0.05$)影响,表现为酵母粉添加量低于 2.0 g/L 时,酯化力显



(a) 碳源种类对酯化力的影响

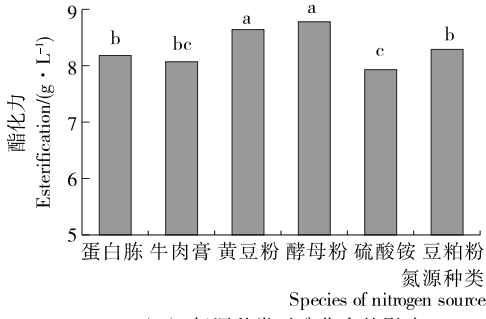


(b) 玉米粉添加量对酯化力的影响

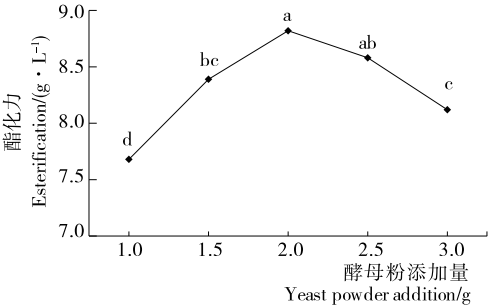
不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

图 4 碳源及添加量对酯化力的影响

Figure 4 Effect of different carbon source and content on esterifying power



(a) 氮源种类对酯化力的影响



(b) 酵母粉添加量对酯化力的影响

不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

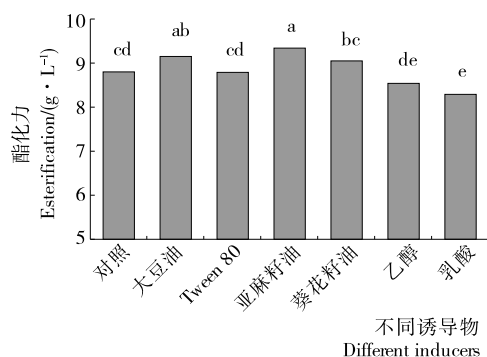
图 5 氮源及添加量对酯化力的影响

Figure 5 Effect of different nitrogen source and content on esterifying power

著($P < 0.05$)增加,而当酵母粉添加量超过 2.0 g 时,LD06 产酯化酶显著($P < 0.05$)降低。因此,选择 2.0 g 的酵母粉作为菌株 LD06 产酯化酶发酵培养基的氮源。

(3) 其他添加物:从图 6 可以看出,与对照组相比,油脂类添加物能够显著($P < 0.05$)提高 LD06 产酯化酶的能力,但

是表面活性剂(tween 80)、乙醇、乳酸对 LD06 产酯化酶的影响较小。主要是因为,在酿酒大曲中通过添加油类物质,可以促进霉菌菌株的生长和产酶量。Hama 等^[19]研究表明,油脂类成分不但可以作为酯化反应的产物,促进酯化反应的进行;还可以通过与霉菌细胞膜的作用,影响细胞膜的通透性,表现为促进酯化酶向细胞外分泌。因此,在后续的研究中采用 1% 亚麻籽油作为菌株 LD06 产酯化酶的发酵诱导物质。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)
图 6 不同诱导物对酯化力的影响

Figure 6 Effect of different additives on esterifying power

2.3.2 发酵条件对菌株 LD06 产酶的影响 从图 7 可以看出,36 °C 是菌株 LD06 的最适发酵温度,过高或过低都会降低其产酯化酶的能力。另外,在不同的发酵温度条件下,随着发酵时间的延长,菌株 LD06 产酯化酶的能力呈先增加后降低趋势。表现为当发酵温度为 36 °C、培养时间为 36 ~ 45 h 时,随着发酵时间的延长,微生物在体系中大量生长,大量的菌株 LD06 布满培养基中,使酯化力显著 ($P < 0.05$) 增加至最高;当发酵时间超过 45 h 并继续增加时,酯化酶活力不断降低,主要因为培养时间过长会导致菌株的菌丝逐渐衰老,并且产生了大量的孢子,导致产酶量逐渐降低。因此,发酵温度 36 °C、发酵时间 45 h 是菌株 LD06 发酵产酶的最适条件。

因此,综合上述结果可以看出,菌株 LD06 产酯化酶的固体发酵培养基组成为:麸皮(基质)10 g、玉米粉(碳源)1.5 g、酵母粉(氮源)2.0 g、亚麻籽油(诱导物)1 g/100 g · 培养基、硫酸铵 0.2 g、蒸馏水 10 mL;发酵培养条件为温度 36 °C、时间 45 h。该条件下得到的酯化力为 9.32 g/L,与初

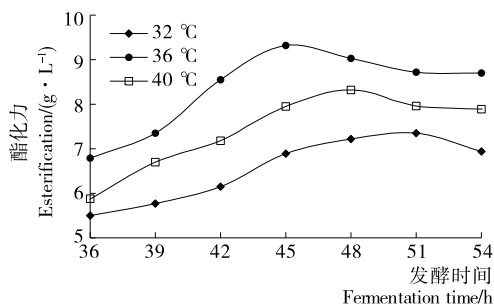


图 7 培养温度及培养时间对酯化酶活力的影响

Figure 7 Effect of different culture time and temperature on esterifying power

始酯化力相比提高了 22.55%。

3 结论

本试验以中温大曲为原料,从中筛选能够产酯化酶的发酶菌种并鉴定其种类,研究该菌株产酯化酶的发酵培养基组成和发酵条件。通过形态学观察和分子鉴定及 Biolog 鉴定结果确定该菌株为犁头霉,进一步证实了研究中采用菌株鉴定方法准确可靠。另外,本研究以酯化力为目标值,优化了该菌株的发酵培养基组成及发酵培养条件,与初始酯化力相比提高了 22.55%,与刘维英等^[9]、滕巍等^[16]对产酯化酶菌株发酵条件的研究结果相比存在差异,是对白酒大曲产酯化酶菌株相关研究的补充。

本研究仅涉及了犁头霉的分离鉴定及其产最高酯化酶活力的发酵条件优化,未涉及到该犁头霉产酯化酶的结构、作用条件等。因此,对该酯化酶的筛选及酶学特性等有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 唐取来, 李晶晶, 郭学武, 等. 清香型大曲酯化酶活力的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(1): 35-38.
- [2] 黄丹, 储玉龙, 尚志超, 等. 大曲酯化酶根霉菌的分离及产酶条件研究[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(3): 30-32.
- [3] 李永博, 李星, 唐敏, 等. 浓香型大曲中产 β -葡萄糖苷酶微生物的筛选鉴定及其产酶条件优化[J]. 食品科技, 2017(12): 17-22.
- [4] 侯小歌, 王俊英, 李学思, 等. 浓香型白酒窖池主要功能性微生物的研究进展[J]. 酿酒科技, 2013(2): 96-101.
- [5] 黄丹, 方春玉, 尚志超, 等. 一株酯化酶霉菌的分离、鉴定及代谢产物特征[J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2010, 29(3): 62-64.
- [6] 黄丹, 刘清斌, 刘达玉, 等. 一株产己酸乙酯酯化酶霉菌的分离鉴定及产酶条件研究[J]. 酿酒科技, 2008(2): 27-29.
- [7] WANG Peng, WU Qun, JIANG Xue-jian, et al. *Bacillus licheniformis*, affects the microbial community and metabolic profile in the spontaneous fermentation of Daqu, starter for Chinese liquor making[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 250: 59-67.
- [8] ZHANG Xiu-hong, ZHAO Juan, DU Xuan. Barcoded pyrosequencing analysis of the bacterial community of Daqu for light-flavour Chinese liquor[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(6): 549-555.
- [9] 刘维英, 韩亚杰, 胡坤, 等. 合成己酸乙酯酯化酶产生菌的筛选及发酵条件的研究[J]. 生物技术通报, 2009, 2009(3): 115-118.
- [10] LIU Jing-jing, CHEN Jing-yu, FAN Yi, et al. Biochemical characterization and dominance of different hydrolases in different types of Daqu-a Chinese industrial fermentation starter [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2017, 98(1): 113-121.
- [11] CHEN Mao-bin, LI Rui-li, PENG Nan, et al. Screening of higher yield of ethyl acetate yeast and researching of ester-producing conditions[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(12): 1383-1388.

(下转第 123 页)

糜及其制品中的抗冻性及其抗冻机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 2017 中国渔业统计年鉴[Z]. 北京: 中国农业出版社, 2017: II.
- [2] 张娅楠, 赵利, 刘华, 等. 水产品的冷冻变性及其抗冻剂研究进展[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2011, 32(6): 88-92.
- [3] YAMASHITA Y, ZHANG N, NOZAKI Y. Effect of chitin hydrolysate on the denaturation of lizard fish myofibrillar protein and the state of water during frozen storage [J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(5): 569-576.
- [4] MATSUMOTO I, OOIZUMI T, ARAI K. Protective effect of sugar on freeze-denaturation of carp myofibrillar protein [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1985, 51: 833-839.
- [5] 李向红, 刘忠祥, 邓海萍, 等. 鲢鱼酶解产物在冷冻鱼糜中的抗冻性能研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 125-130.
- [6] 李向红, 陈志军, 刘永乐, 等. 鲢鱼酶解产物分子质量组成与抗氧化性[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 28-32.
- [7] CHALAMAIAH M, KUMAR B D, HEMALATHA R, et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 3 020-3 038.
- [8] CHEUNG I W Y, LICEAGA A M, LI-CHAN E C Y. Pacific hake (Merluccius Productus) hydrolysates as cryoprotective agents in frozen Pacific cod fillet mince [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(8): 588-594.
- [9] 卫生部. GB 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] 卫生部. GB 5009.3—2010 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] 卫生部. GB 5009.4—2010 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] YANG Z, WANG W, WANG H, et al. Effect of a highly resistant rice starch and pre-incubation temperatures on the physicochemical properties surimi gel from grass carp (Ctenopharyngodon idella) [J]. Food Chemistry, 2014, 145(4): 212-219.
- [13] SÁNCHEZ-GONZÁLEZ I, CARMONA P, MORENO P, et al. Protein and water structural changes in fish surimi during

- gelation as revealed by isotopic H/D exchange and Raman spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 56-64.
- [14] DEBUSCA A, TAHERGORABI R, BEAMER S K, et al. Interactions of dietary fiber and omega-3-rich oil with protein in surimi gels developed with salt substitute [J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 201-208.
- [15] HIROKO S, YOSHIYUKI K, KUMAZAWA S, et al. Gel strength enhancement by addition of microbialtransglutaminase during on shore surimi manufacture [J]. Journal of Food Science, 1995, 60(2): 300-304.
- [16] WEN Si-ying, ZHOU Guang-hong, LI Li, et al. Effect of cooking on *in vitro* digestion of pork proteins: A peptidomic perspective [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(1): 250-261.
- [17] ESCUDERO E, SENTANDREU M A, TOLDRA N. Characterization of peptides released by *in vitro* digestion of pork meat [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(8): 5 160-5 165.
- [18] 杨万君, 周铁亭, 周光宏, 等. 三种品牌酱排骨中蛋白质体外消化研究[J]. 肉类工业, 2017, 65(3): 17-23.
- [19] 王崑, 马兴胜, 仪淑敏, 等. 面筋蛋白和大米蛋白对鲢鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2017(11): 46-51.
- [20] 黄金发, 刘雪平, 高昕, 等. 酶制剂对金线鱼鱼糜凝胶强度和质构变化的影响[J]. 农业工程, 2012, 2(10): 19-24.
- [21] LIU Yong-le, LI Xiang-hong, CHEN Zhi-jun, et al. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products [J]. Food Chemistry, 2014, 151: 459-465.
- [22] LANIER T C. Measurement of surimi composition and functional properties [M]// Surimi Technology. New York: Marcel Dekker Inc, 1992: 123-163.
- [23] NIKOO M, BENJAKUL S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: A review [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 48(19): 753-764.
- [24] CHEN N J, MORIKAWA J, HASHIMOTO T. Effect of amino acids on the eutectic behavior of NaCl solutions studied by DSC [J]. Cryobiology, 2005, 50(3): 264-272.

(上接第 44 页)

- [12] 王涛, 赵东, 游玲, 等. 浓香型白酒酿造环节中产酯化酶的霉菌多样性[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(5): 37-41.
- [13] LI Hui. Isolation and identification of a schlegeliasp from high temperature daqu of sesame flavor liquor [J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 41(11): 202-206.
- [14] WANG Hai-yun, XU Yan, FAN Qing-wen, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-DGGE [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53(2): 134-140.
- [15] LI Peng, AFLAKPUI F W K, YU Hai, et al. Characterization of activity and microbial diversity of typical types of Daqu for

- traditional Chinese vinegar [J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 2 019-2 027.
- [16] 滕巍, 李国莹, 刘小波, 等. 大曲中产酯化酶菌株的分离鉴定及固体发酵工艺优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(9): 971-977.
- [17] 刘念, 罗惠波, 常少健, 等. 己酸乙酯专用酯化曲产酯条件的优化 [J]. 四川理工学院学报: 自科版, 2008, 21(6): 63-64.
- [18] 李秀婷, 孙宝国, 宋焕禄, 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.
- [19] HAMA S, YAMAJI H, KAIEDA M, et al. Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production [J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 21(2): 155-160.