

文章编号:1673-1689(2007)05-0116-05

# 一株腐乳生产菌的筛选、鉴定及其生理特征

张丽英, 沈微, 方慧英, 诸葛健

(江南大学 教育部工业生物技术教育重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**以家制腐乳毛坯为对象,筛选出一株腐乳生产菌。这株菌产生以中性和碱性蛋白酶为主的蛋白酶系,酶活力高达1 100 U/g干曲。根据菌株在PSA上的菌落特征、菌丝形态、产孢结构及其孢子形态等对毛霉鉴定的基础上,结合18S rDNA序列分析表明,该株毛霉菌为雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans* WL3.006)。生产菌能在土豆、麸皮及豆腐坯等固体培养基上茂盛生长,对数生长期在12~36 h,最适生长温度为25~28℃,最适碳源为果糖,最适氮源为牛肉浸膏,适宜pH值为6~8;40 g/L NaCl对其生长有明显抑制;用卤水或石膏点制的豆腐白坯均适于此菌的生长。

**关键词:**腐乳;雅致放射毛霉;鉴定

**中图分类号:**TQ 920.1

**文献标识码:**A

## Screening, Identification and Measurement of Physiological Characteristics of a Sufu Production Strain

ZHANG Li-ying, SHENG Wei, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian

(Key Lab of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** A Sufu production strain was selected from raw sufu of home-made. It could produce neutral protease and alkaline protease. Proteinase activity was 1 100 U/g dry leaven. The strains were identified by their morphs of mycelial, hyphal, spore and 18S rDNA sequence analysis. The results showed that the strains are *Actinomucor elegans* WL3.006. This strain could grow on the solid culture medium such as potato wheat bran and bean curd etc. The range of its log growth phase was 12~36 h. The range of optimum growth temperature was 25~28℃. The optimum carbon source was fructose. Its optimum nitrogen source was yeast extract. The range of adequate pH was 6~8. 40 g/L NaCl had obvious effect on its growth. Doufu which was coagulated with salt brine or plaster was suit for the growth of the strain.

**Key words:** sufu; *Actinomucor elegans*; identification

腐乳是中国具有民族风味的发酵食品,有1 000多年的历史<sup>[1]</sup>。它是用豆浆的凝乳状物经微生物

发酵制成的一种干酪型产品,营养丰富,口感细腻,风味独特,含有多种生理活性成分及保健功能<sup>[2]</sup>,

收稿日期:2007-01-22.

作者简介:张丽英(1981-),女,浙江永康人,发酵学硕士研究生。E-mail:zly112112@163.com

通讯作者:诸葛健(1939-),男,浙江金华人,教授,博导,主要从事工业微生物育种与发酵工程方面的研究。

Email: jzhuge@sohu.com

深受海内外人民的喜爱,许多欧美地区的人称之为中国干酪(Chinese cheese)<sup>[3]</sup>。自古以来,腐乳的生产遍布中国各地,但以浙江的绍兴、杭州、江苏的无锡、苏州、广西的桂林、四川的五通桥最负盛名<sup>[4]</sup>。

20世纪50年代中期以来,由于搞清了发酵菌种的问题,腐乳的生产由自然接种逐渐转为人工接种,毛霉是人工接种法生产腐乳的主要菌种<sup>[5]</sup>。在前期培菌过程中,将纯培养毛霉菌孢子制成的菌悬液或粉状菌种喷洒在豆腐坯上培养长毛,给腐乳一个好的“体”,并分泌蛋白酶分解豆腐乳中的蛋白质,使产品具有良好的品味<sup>[6]</sup>。因此,毛霉菌种的优劣直接影响到腐乳的产量和质量。

作者采用点样初筛和固体发酵复筛相结合的方法,以家制毛豆腐为菌源,筛选到一株产蛋白酶活力较高的生产菌。根据形态学分析并结合18S rDNA序列分析,验证了该生产菌为雅致放射毛霉,确定了其在分类学上的地位,并为进一步研究新型腐乳的工艺提供良好的试验菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

由家制腐乳毛坯上分离得到。

### 1.2 培养基

马铃薯蔗糖琼脂(PSA)培养基<sup>[7]</sup>;分离纯化培养基:在PSA培养基中加入1 g/L脱氧胆酸钠;酪蛋白琼脂培养基:干酪素2 g,先用20 mL 0.1 mol/L NaOH溶液加热溶解后,再加2 g琼脂,用蒸馏水煮沸溶解后定容至100 mL后灭菌备用;察氏(Czapek's)培养基<sup>[7]</sup>;固体发酵培养基:豆粕7 g,麸皮3 g, H<sub>2</sub>O 11 mL,装入250 mL三角瓶拌匀,灭菌后及时振散备用;豆腐块培养基:将市售豆腐(凝固剂为石膏)切成2 cm×2 cm×2 cm小块,装入已灭过菌的250 mL三角瓶中,每瓶一块;豆汁培养基:取黄豆500 g,加水1 000 mL后煮沸1 h,再用双层纱布过滤,所得滤液补水至1 000 mL后灭菌备用。以上培养基均为121℃灭菌20 min。

### 1.3 菌种筛选

**1.3.1 菌种的分离** 取5 g毛坯于三角瓶中,加入100 mL无菌生理盐水,搅拌摇匀,用稀释分离法培养单菌落。挑取生长速度快、菌丝丰满、纯白的单菌落转接入斜面培养基,之后将菌悬液接入纯化培养基中,28℃培养,待长出单菌落移接斜面,重复4次后,转接于PSA斜面保存备用。

**1.3.2 初筛** 采用透明圈法。把菌悬液接入干酪素培养基,28℃培养48 h,加入几滴0.25 mol/L三

氯乙酸(TCA)沉淀未被分解的酪蛋白,于4℃冰箱放置48 h后,分别测定平皿中透明圈和菌落直径之比,比值较大的菌落接入斜面培养基。

**1.3.3 复筛** 取0.5 mL菌悬液(孢子数为10<sup>6</sup>个/mL),接入固体发酵培养基中,摇匀,28℃培养48 h。取一定量的鲜曲,制备得酸性、中性、碱性蛋白酶粗酶液后,测定相应的蛋白酶活力。其中,测定酸性、中性、碱性蛋白酶时,所用的缓冲液分别为pH 3.0乳酸—乳酸钠缓冲液、pH 7.2磷酸缓冲液、pH 10.0硼砂—氢氧化钠缓冲液。蛋白酶活力测定采用Fulin-酚法<sup>[8]</sup>。40℃下每分钟水解干酪素产生1 μg酪氨酸定义为1个酶活力单位(U)。

**1.3.4 发酵试验** 将毛霉菌悬液装在喷雾接种器内,喷洒在豆腐坯上,要求五面均匀,在28℃条件下培养,观测其生长、发酵情况。

### 1.4 菌株鉴定

**1.4.1 形态学** 将分离筛选得到的菌株在PSA培养基上观察其菌落形态,在光学显微镜下观察菌株的菌丝形态、产孢结构和孢子形态<sup>[8]</sup>。

**1.4.2 基因组DNA的提取** 将收集好的菌体烘干,用镊子捣碎,取0.5 g干菌丝于5 mL离心管中,分别加入1 mL TES液体(1 mmol/L Tris, 0.5 mmol/L EDTA, 100 g/L SDS),剧烈振荡后,加50 μL 10 μg/mL RNase, 65℃放置10 min,加入600 μL 7.5 mol/L乙酸铵溶液,冰浴8 min, 8 000 r/min离心5 min,转移上清液至另一无菌的5 mL离心管中,加入等体积的酚、氯仿, 8 000 r/min离心5 min,再转移上清液至另一无菌的1.5 mL离心管中,加入2.5倍无水乙醇, 8 000 r/min离心2 min,弃上清液,每升溶液加入750 mL乙醇洗, 8 000 r/min离心2 min,弃上清液后,把离心管置于37℃培养箱中,待乙醇挥发完全,加适量ddH<sub>2</sub>O溶解沉淀。

**1.4.3 18S rDNA的扩增** 使用真菌18S rDNA的通用引物进行扩增。

上游:5'-ACCGGAATTCGCCTGAGAAA  
CGGCTACC-3'

下游:5'-ACCGGAATTCGGCAGGGACGT  
AATCAAC-3'

**1.4.4 PCR扩增条件** 反应体系为:取DNA模板2 μL, PCR缓冲液5 μL, MgCl<sub>2</sub> 2 μL, dNTP 4 μL, 上下游18S通用引物各1 μL, Taq DNA聚合酶1 μL, 总反应体积为50 μL。循环参数:94℃预变性4 min, 94℃ 50 s, 52℃ 50 s, 72℃ 90 s, 35个循环, 72℃延伸10 min。取扩增产物10 μL用8 g/L琼脂糖凝胶电泳, 观测结果。

**1.4.5 PCR产物的克隆与18S rDNA序列测定及同源性比较、系统分析** 用胶回收博大泰克试剂盒纯化PCR扩增产物,电泳验证,上海申速生物公司测定胶回收产物18S rDNA序列。测序结果在美国国家生物信息中心(NCBI)中进行Blast后交送GenBank库,与数据库已有序列进行比较分析。

### 1.5 生长量的测定(菌体干重测定)

采用直接干燥法。将振荡培养获得的培养物用预先测定干重的定性滤纸滤得菌体后,水洗两次,然后在连同滤纸一起在105℃条件下烘干至恒重,测其质量,从而算出菌体干重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 初筛

筛选到的单菌落在28℃下于酪蛋白琼脂培养基中培养48h,测定透明圈直径和菌落直径之比。此毛霉菌株的透明圈直径和菌落直径分别为6~7cm和3~4cm,透明圈直径和菌落直径比值大约1.5~2.0,这说明此毛霉菌株产蛋白酶的情况良好。

### 2.2 复筛

毛霉菌株的各种蛋白酶活力见图1。结果表明,中性和碱性蛋白酶活力较高,达1100U/g干曲,酸性蛋白酶活力较低,这说明毛霉产生以中性和碱性蛋白酶为主的蛋白酶系。由于腐乳后酵过程的酸度近于中性<sup>[9]</sup>,所以起作用的蛋白酶是中性蛋白酶。

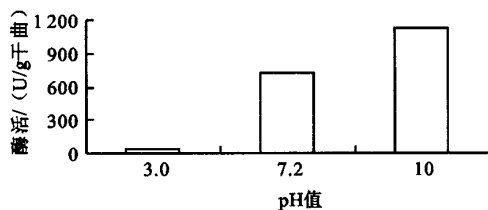


图1 毛霉产生的蛋白酶种类

Fig. 1 The proteases produced by *Mucor*

### 2.3 发酵试验

观察毛霉在豆腐坯上于28℃培养48h后的生长及发酵情况。表1表明,在28℃条件下,此毛霉菌株的生长、发酵情况较好,是良好的酿造腐乳的毛霉菌株。

表1 毛霉在豆腐坯培养基上的生长及发酵情况

Tab. 1 Growth and fermentation of *Mucor* on bean curd block

| 菌丛高度   | 颜色 | 长势 | 气味 | 初始老化时间 |
|--------|----|----|----|--------|
| 2 cm左右 | 纯白 | 稠密 | 清香 | 60 h左右 |

### 2.4 毛霉的菌落特征

将毛霉接种于PSA培养基上,于28℃下培养。12h时出现菌苔;24h时出现白色绒毛菌丝,菌丝体较疏松,直立并蔓延,高度可达1cm左右;36h时菌丝白色,菌丛高度可触及皿盖,菌丝体变得紧密整齐;48h时菌丝直立,旺盛,致密,白色,有较多的深黄色状孢子囊出现;60h时菌丝变成银白色,菌丛布满整个平皿,形成大量深黄色孢子囊;72h时,生长减弱,菌丝部分收缩,倒毛,浅黄色;84h时菌丝全部倒毛,呈银灰色。

### 2.5 毛霉的鉴定

菌丝白色,无横隔,有匍匐菌丝和不发达的假根,色泽同菌丝。营养菌丝能渗入琼脂培养基内1.5~2.0mm,气生菌丝广泛蔓延伸展,衰老时出现不少厚垣孢子,色深,卵形或椭圆形,气生菌丝直径8~19μm;孢囊梗白色,无横隔膜,直径12~20μm,直接由气生菌丝生出,单生,直立,孢囊梗在近顶端处常有分枝,呈单轴式,各分枝及主枝顶端均生孢子囊。孢子囊呈球形,直径约为63~91μm,分枝上的较小,直径约为20~50μm;较嫩时色浅、表面光滑,老熟时色深、表面粗糙有针刺状突出;最后囊壁碎裂释放出孢子和囊孢子,露出囊轴。囊轴呈卵形、洋梨形等形状,表面光滑,个体大小差异较大,一般为(43~65)μm×(24~46)μm。孢子囊孢子呈球形,直径大约在7~10μm。

利用BLAST软件将该毛霉序列与NCBI收录的DNA序列进行比对,结果表明,该序列与O'Donnell K<sup>[10]</sup>和鲁绯<sup>[11]</sup>报道的*Actinomucor elegans*的18S rDNA序列相似性最高,为99.5%。

根据毛霉的形态特征和18S rDNA序列对比分析,鉴定该菌属于毛霉属的雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*)<sup>[12]</sup>,编号为WL3.006。

### 2.6 雅致放射毛霉的培养条件和生理特性

**2.6.1 雅致放射毛霉的生长曲线** 在豆汁培养基(40mL/瓶)中,接入毛霉孢子悬液后,于28℃、150r/min下振荡培养。每隔12h取出3瓶,离心收集菌丝体,测其干重,求其平均值。以该值为纵轴,以时间为横轴绘图,结果见图2。可见,雅致放射毛霉在豆汁培养基的对数生长期大约在12~36h,稳定期大约在36~60h,之后就属于衰退期,而且,生长量高达225mg/40mL。

**2.6.2 雅致放射毛霉的最适生长温度** 将毛霉接种于PSA培养基中,置于不同温度下培养,每隔12h观测一次,观测结果见表2。由表2可知,雅致放射毛霉的最适生长温度为25~28℃,在48~60h

时菌丛较高,而且绒密洁白;20~25℃下生长良好,不过20℃时生长相对缓慢,但菌丛一直为纯白;35℃时毛霉菌丝的生长有所抑制,菌丛较低而稀疏,60 h时菌丛变成浅黄色,84 h时菌丛已经明显干缩;而在40℃时,毛霉未长。

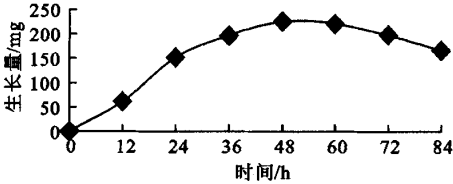


图 2 雅致放射毛霉的生长曲线  
Fig. 2 The growth curve of *Actinomucor elegans*

表 2 温度对雅致放射毛霉生长的影响

Tab. 2 Effect of temperature on *Actinomucor elegans* growth

| 时间/h | 20℃          | 25℃           | 28℃           | 35℃           | 40℃ |
|------|--------------|---------------|---------------|---------------|-----|
| 12   | 未长           | 未长            | 未长            | 初现菌苔          | 未长  |
| 24   | 白色绒毛状        | 白色绒毛状         | 白色绒毛状         | 白色菌丛高 0.7 cm  | 未长  |
| 36   | 白色菌丛高 1.0 cm | 白色菌丛高 1.2 cm  | 白色菌丛高 1.0 cm  | 白色菌丛高 0.9 cm  | 未长  |
| 48   | 白色菌丛高 1.5 cm | 白色菌丛高 1.8 cm  | 白色菌丛高 1.4 cm  | 银白色菌丛高 1.0 cm | 未长  |
| 60   | 白色菌丛高 1.7 cm | 白色菌丛高 2.1 cm  | 银白色菌丛高 1.8 cm | 浅黄色菌丛高 1.1 cm | 未长  |
| 72   | 白色菌丛高 2.0 cm | 白色菌丛高 2.3 cm  | 浅黄色菌丛高 1.6 cm | 银灰色菌丛高 0.8 cm | 未长  |
| 84   | 白色菌丛高 2.0 cm | 银白色菌丛高 2.0 cm | 银灰色菌丛高 1.5 cm | 菌丛干缩高 0.6 cm  | 未长  |

**2.6.3 雅致放射毛霉生长的最适碳源** 以察氏培养基为基础,分别以葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和淀粉为碳源(质量浓度均为 30 g/L),制成相应碳源培养基。重复 3 次。接种后于 28℃、150 r/min 下培养 48 h。取出后过滤得菌体,并测其菌体干重,结果见图 3。可见,单糖比双糖对菌体的生长更加有利,淀粉介于两者之间。而且,在单糖中,以果糖为佳,所以在察氏培养基中以果糖为最佳碳源,此时毛霉生长较良好。

**2.6.4 雅致放射毛霉生长的最适氮源** 以察氏培养基为基础,以果糖为碳源,并分别以硝酸钠、硫酸铵、硝酸铵、尿素、牛肉浸膏、蛋白胨和酵母浸出汁为氮源(质量浓度均为 3 g/L),制成相应的氮源培养基。3 次重复,每重复为 40 mL 培养基。接种后在 28℃、150 r/min 下培养 48 h。取出后过滤得菌体,并测其菌体干重,结果见图 4。结果表明,有机氮源比无机氮源有利于菌体的生长,而在有机氮中以牛肉浸膏较好。因此,确定最佳氮源是牛肉浸膏。

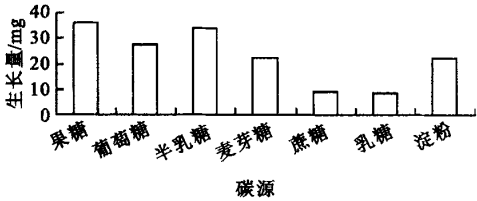


图 3 碳源对雅致放射毛霉生长的影响  
Fig. 3 Effect of carbon source on *Actinomucor elegans* growth

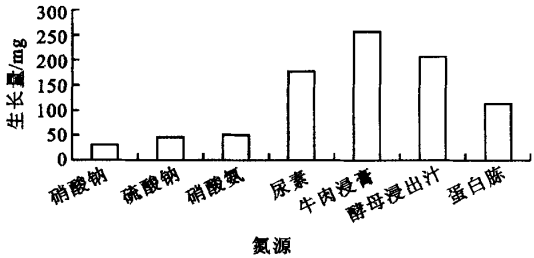


图 4 氮源对雅致放射毛霉生长的影响  
Fig. 4 Effect of nitrogen source on *Actinomucor elegans* growth

**2.6.5 雅致放射毛霉生长的最适起始 pH 值** 以察氏培养基为基础,碳源、氮源分别为果糖和牛肉浸膏,再用盐酸和氢氧化钠调节到一定 pH 值。3 次重复,每重复为 40 mL 培养基。接种后于 28℃、150 r/min 下培养 48 h。取出后过滤得菌体,并测其菌体干重,结果见图 5。

由图 5 看出,起始 pH 大于 6 时,生长量较高,毛霉生长良好,而当起始 pH 值为 4~6 时,生长量相对较低,毛霉生长受到抑制,在 pH≤4 时,毛霉几乎不能生长。所以,雅致放射毛霉的最适生长起始 pH 值为 6~7。而普通的豆腐白坯的 pH 值一般均在 6 左右,因此,豆腐白坯的 pH 值均适合此雅致放射毛霉菌株的生长。

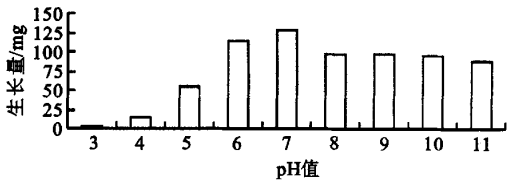


图 5 pH 对雅致放射毛霉生长的影响  
Fig. 5 Effect of pH on *Actinomucor elegans* growth

**2.6.6 耐盐性** 以豆汁培养基为对照,并以它为基质,分别调整 NaCl 质量浓度为 10、20、30、40、50、60、80、100 g/L。3 次重复,每重复为 40 mL 培养基。接种后在 28℃、150 r/min 下培养 48 h。取出后过滤得菌体,并测其菌体干重,结果见图 6。

由图 6 可知,NaCl 质量浓度在 20 g/L 以下能

促进雅致放射毛霉的生长;NaCl质量浓度在40~60 g/L的对雅致放射毛霉的生长有了明显的抑制;NaCl质量浓度在80 g/L以上使雅致放射毛霉几乎不能生长。因此,我国传统的腐乳生产腌制毛坯时所用的食盐质量浓度一般控制在100 g/L左右,足以防止毛霉菌的存活和生长,保证了腐乳产品的风味和质量。

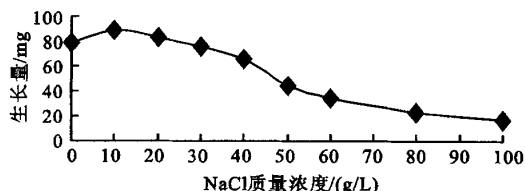


图6 NaCl质量浓度对雅致放射毛霉生长的影响

Fig. 6 Effect of the NaCl concentration on the growth of *Actinomucor elegans*

**2.6.7  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  对生长的影响** 以豆汁培养基为对照,并分别添加  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,调整培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  质量浓度分别为0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 g/L。3次重复,每重复为40 mL培养基。接种后于28℃、150 r/min下培养48 h。取出后过滤得菌体,并测其菌体干重,结果见图7。

由图7可知,在试验范围内,0.1~5 g/L  $\text{Ca}^{2+}$  能促进雅致放射毛霉菌株生长,其最大生长量在5 g/L  $\text{Ca}^{2+}$ 处;而0.1~5 g/L  $\text{Mg}^{2+}$ 也能促进雅致放射毛霉菌体的生长,其最大生长量在2 g/L  $\text{Mg}^{2+}$

处。所以,适量的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对雅致放射毛霉菌株的生长是有利的。

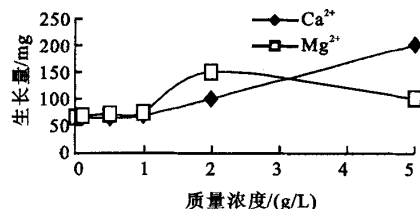


图7  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 对雅致放射毛霉生长的影响

Fig. 7 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  on *Actinomucor elegans* growth

结合实际讲,传统腐乳生产的豆腐坯所用的凝固剂,一般是石膏或卤水。石膏的主要成分是硫酸钙;卤水主要成分是氯化镁,还含有一定量的硫酸镁、氯化钙、氯化钠等。用石膏凝固成的豆腐坯中  $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度约为3~4 g/L,而用卤水凝固成的豆腐坯中  $\text{Mg}^{2+}$  质量浓度约为1~2 g/L<sup>[13]</sup>。因此,两种凝固剂所制的豆腐坯,均适合雅致放射毛霉的生长。

### 3 结 语

作者筛选到的生产菌种雅致放射毛霉,异名匍匐放射毛霉,是我国传统腐乳酿造中常用的菌种之一<sup>[5]</sup>。该菌生长繁殖快,菌丝洁白,能分泌出大量的、高活力的蛋白酶,能使产品质地细腻柔糯,气味正常良好,是一株极具生产潜力的菌株。

### 参考文献(References):

- [1] 赵雪松. 豆腐乳的一般制法[J]. 食品科学, 1984, (7): 59-61.  
ZHAO Xue-song. The conventional production in fermented beancurd [J]. *Food Science*, 1984, (7): 59-61. (in Chinese)
- [2] 程丽娟, 赵树欣. 豆腐乳中的功能性成分[J]. 中国调味品, 2005, 12(12): 10-13.  
CHENG Li-juan, ZHAO Shu-xin. Function compounds in fermented beancurd[J]. *Chinese Condiment*, 2005, 12(12): 10-13. (in Chinese)
- [3] Han B Z, Rombouts F M, Nout M J R A. Chinese fermented soybean food[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65: 1-10.
- [4] 扈文盛. 食品常用数据手册[M]. 北京: 中国食品出版社, 1987: 446-456.
- [5] 杨淑媛. 新编大豆食品[M]. 北京: 中国商业出版社, 1989: 180-206.
- [6] 牛天娇, 马莺. 中国传统发酵豆制品中微生物的发掘与利用[J]. 中国酿造, 2005, (2): 1-5.  
NIU Tian-jiao, MA Ying. Exploitation and utilization of microbial resources in Chinese traditional fermented soybean products[J]. *China Brewing*, 2005, (2): 1-5. (in Chinese)
- [7] 唐丽杰. 微生物学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.
- [8] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 205-209.
- [9] HAN B Z. Microbiological safety and quantity of commercial sufu—a Chinese fermented soybean food[J]. *Food Control*, 2002, (12): 542-547. (in Chinese)
- [10] O'Donnell K. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale[J]. *Mycologia*, 2001, 93(2): 286-296.
- [11] 鲁绯, 窦璐, 刘萍, 等. 雅致放射毛霉蛋白酶[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 18-21.  
LU Fei, DOU Jun, LIU Ping, et al. Research on protease produced by actinomucor elegans AS 3. 227[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(2): 18-21. (in Chinese)
- [12] 中国科学院微生物研究所. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 62-63.

(责任编辑: 李春丽)