

航天诱变黑曲霉ZM-8发酵玉米秸秆粉 产 β -葡萄糖苷酶的培养基组分优化

马旭光¹, 张宗舟¹, 霍建泰², 赵国婵¹, 柳 芸¹

(1.天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃天水 741001;

2.甘肃省航天育种工程技术研究中心, 甘肃天水 741030)

摘 要:以玉米秸秆粉为主要原料,在单因素实验基础上利用正交实验对航天诱变高产纤维素酶菌株黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的培养基组分进行了优化。研究表明,麸皮添加量($F = 32.414 > F_{0.01} = 6.01$)和含氮量($F = 13.716 > F_{0.01} = 6.01$)对该菌株产酶的影响达到极显著水平,含水量达到了显著水平($F = 4.251 > F_{0.05} = 3.55$)。该菌株产酶的最佳培养基组分为:麸皮添加量为 35%,氮源为 1.2% 的 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$,含水量为 250%,接种量为 1:18。在此条件下, β -葡萄糖苷酶活为 42.49U/mL。

关键词:黑曲霉 ZM-8, 玉米秸秆粉, β -葡萄糖苷酶, 培养基组分

Optimization on the culture medium components of space-flight mutation strain *Aspergillus niger* ZM-8 fermentation corn stalk powder for producing β -glucosidase

MA Xu-guang¹, ZHANG Zong-zhou¹, HUO Jian-tai², ZHAO Guo-chan¹, LIU Yun¹

(1.College of Life Science and Chemical, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China;

2.The Space Breeding Engineering Technology Research Center in Gansu Province, Tianshui 741030, China)

Abstract: Taking corn stalk powder as the main raw material, the medium components of the aerospace mutant *Aspergillus niger* ZM-8 with high cellulase activity for producing β -glucosidase by the orthogonal experiment was optimized based on the single factor experiment. The results showed that the effects of bran content ($F = 32.414 > F_{0.01} = 6.01$) and nitrogen content ($F = 13.716 > F_{0.01} = 6.01$) of the strain producing β -glucosidase were extremely significant level, the effect of water content was significant level ($F = 4.251 > F_{0.05} = 3.55$). The optimization medium components of the strain producing β -glucosidase was as follows: the bran content was 35%, the nitrogen source was 1.2% of $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, the water content was 250% and the inoculation amount was 1:18. Under these conditions, the β -glucosidase activity reached 42.49U/ mL.

Key words: *Aspergillus niger* ZM-8; corn stalk powder; β -glucosidase; culture medium components

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)06-0236-05

β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, EC3.2.1.21), 俗称 C_b 酶, 又称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 具有催化水解芳香基或烃基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖的功能^[1]。 β -葡萄糖苷酶在食品工业^[2]、医疗^[3]、纤维素降解^[4]、植物虫害防御^[5]和日用化工^[6]等领域都有重要的应用价值。自然界中的许多植物、昆虫、微生物在完成其正常生理代谢时都会产

生 β -葡萄糖苷酶,但因酶含量少、活性低、不易提取以及安全性等问题大大限制了 β -葡萄糖苷酶的规模化应用和工业化制备生产。目前,人们主要利用来源广泛、价格低廉、适合工业化生产的微生物发酵法制备 β -葡萄糖苷酶。而在能生产 β -葡萄糖苷酶的众多微生物中,黑曲霉因其不产生毒素、能在纤维质原料上分泌较其他真菌都高的胞外酶 β -葡萄糖苷酶^[7],在该领域具有明显优势。尽管如此, β -葡萄糖苷酶活低、产量不高、稳定性差的问题仍未得到解决。近年来,研究者主要通过高产 β -葡萄糖苷酶的优良黑曲霉菌种选育^[8]、基因克隆^[9]和选择最适的发酵条件^[10]等途径来解决上述问题。黑曲霉 ZM-8 是一株经航天诱变选育的高产纤维素酶菌株,尤其是能产生很高的 β -葡萄糖苷酶^[11]。本研究以资源量

收稿日期: 2011-06-02

作者简介: 马旭光(1981-),男,在读博士研究生,讲师,研究方向:微生物发酵与应用。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD89B17);甘肃省自然科学基金资助项目(1010RJZE029);甘肃省教育厅科研项目(1108B-02)。

丰富、成本低的玉米秸秆为原料,采用固态发酵法,对该菌株产 β -葡萄糖苷酶的麸皮添加量、氮源及其含量、含水量、接种量等培养基组分进行单因素实验并进行优化,以期为利用该菌株工业化生产 β -葡萄糖苷酶提供参数依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑曲霉 ZM-8 经航天诱变后由天水师范学院生命科学与化学学院微生物工程实验室和中国科学院天水航天育种基地联合选育而获得,保存于 PDA (马铃薯琼脂)斜面培养基;水杨酸苷 购自 Sigma; 3,5-二硝基水杨酸等其他试剂 均为国产分析纯;玉米秸秆粉 取无霉变、干燥的玉米秸秆,经粉碎机粉碎后过 40 目筛;麸皮 市售;种子培养基 玉米秸秆粉 10g, Mandels 营养盐溶液^[12] (2% (NH_4)₂SO₄, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% KH_2PO_4) 25mL, pH 自然;基础产酶培养基 玉米秸秆粉 60%, 麸皮 40%, Mandels 营养液 250% (v/w), pH 自然。

TGL-20M 型高速冷冻离心机 湘仪仪器厂;722 型分光光度计 上海欣茂仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵方法 将活化的黑曲霉 ZM-8 斜面种子,用无菌生理盐水洗脱,制成浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 的孢子悬浮液,按 6% (v/w) 的接种量接入到种子培养基,30℃ 恒温培养 72h 后,将制备的固体曲按 1:10 接种量接入基础产酶培养基上 35℃ 恒温培养 72h 后测定 β -葡萄糖苷酶。

1.2.2 各培养基组分的单因素实验

1.2.2.1 最佳麸皮添加量的确定 分别以 0、20%、40%、60%、80% 的麸皮添加量为产酶碳源,测定酶活。

1.2.2.2 最佳氮源的确定 分别以 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 和尿素为产酶氮源(含氮量均为 1%),测定酶活。

1.2.2.3 最佳含氮量的确定 在确定了最佳氮源的基础上,分别按含氮量为 0.2%、0.6%、1.0%、1.4%、1.8% 发酵,测定酶活。

1.2.2.4 最佳含水量的确定 按产酶培养基中水与固体的质量比分别为 100%、150%、200%、250%、300% 发酵,测定酶活。

1.2.2.5 最佳接种量的确定 按固体曲与干基质的质量比分别为 1:30、1:20、1:15、1:10、1:5 发酵,测定酶活。

1.2.2.6 各培养基组分的优化 在初步确定了最佳氮源的基础之上,通过正交实验对上述各因素进行优化以确定最佳产酶培养基组分。实验因素和水平依单因素实验结果而定。

1.2.3 粗酶液的提取 产酶培养基发酵后,取生长良好的固体曲 5g,加入一定量的蒸馏水,于 30℃ 保温 1h,用沙芯漏斗过滤,然后在转速 10000r/min 冷冻离心机上离心 10min,提取上清液定容至 100mL,得 1:20 粗酶液备用。

1.2.4 酶活力测定方法 按参考文献[13],略有改

进。取适当稀释的酶液 0.5mL,加入底物为 1.5mL 0.5% 的水杨酸苷缓冲液,并向对照试管中加入 1.5mL DNS 溶液以钝化酶活性,然后在 50℃ 保温 0.5h,取出后立即向待测试管中加入 1.5mL DNS 溶液以中止酶反应,充分摇匀后沸水浴 5min,冷却后在 540nm 的波长下测定 OD 值。

1.2.5 酶活力单位定义 在一定的反应条件下(pH、温度),每分钟由 1mL 粗酶液水解底物生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U/mL)。

1.2.6 数据处理方法 将测得的各项数据用 Excel 和 SPSS 软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 麸皮添加量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响

由图 1 可知,当发酵原料中的麸皮添加量为 40% 时,黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶酶活力最高,为 35.39U/mL。究其原因,麸皮含量过少时,固体培养基透气性较差,不利于好氧的黑曲霉的生长和产酶;麸皮含量过多时,不利于玉米秸秆粉中纤维素诱导其产酶;适宜的麸皮添加量,即由麸皮和玉米秸秆粉二者构成的复合纤维素,更有利于诱导菌株产酶^[14]。

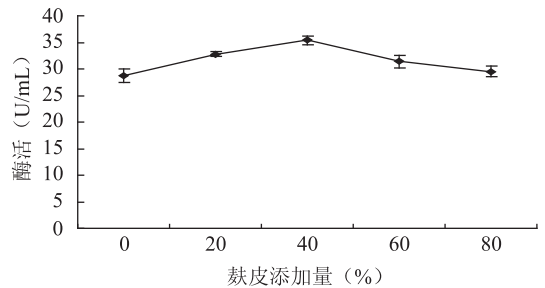


图1 麸皮添加量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响

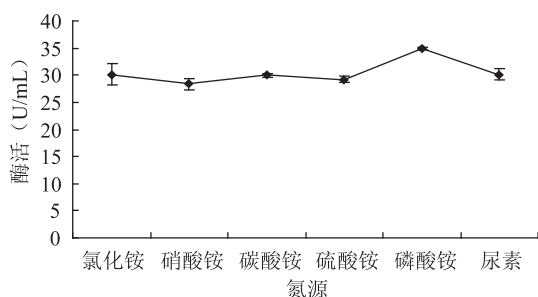
Fig.1 Effect of bran addition on *Aspergillus niger* ZM-8 β -glucosidase production

2.2 氮源对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响

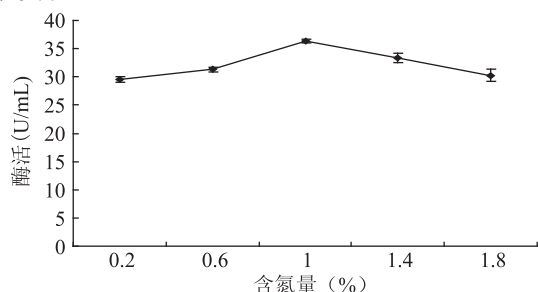
由图 2 可知,不同的氮源对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响较大。当氮源为磷酸铵时, β -葡萄糖苷酶的酶活最高,达到了 34.96U/mL;其次是尿素和氯化铵。究其原因,当用 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 为唯一氮源时,在培养基中会分解产生 NH_3 和 H_3PO_4 , NH_3 被菌体作为速效氮源利用后,剩下的酸性物质会引起菌体生长环境 pH 的变化,而 PO_4^{3-} 的存在更有利于保持菌体发酵过程中 pH 的相对稳定,同时也可能会提供菌株对磷元素的生长需求。

2.3 含氮量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响

在实验中发现,当 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 的含氮量为 1.0% 时,培养 24h 后可产生大量的白色菌丝,随着时间的延长,菌丝体生长旺盛并逐渐布满整个培养基表面。由图 3 可知,该氮含量下的酶活力也最高,为 36.36U/mL。推测可能是当含氮量过低时,会使发酵菌株得不到丰富的营养,不利于产酶;而高浓度的含氮量不仅会抑制微生物的生长,而且也会造成资源

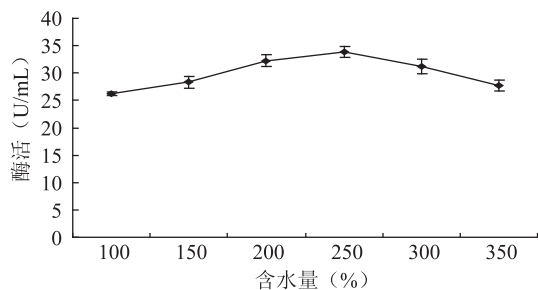
图2 氮源对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响Fig.2 Effect of nitrogen source on *Aspergillus niger* ZM-8 β -glucosidase production

的浪费。

图3 含氮量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响Fig.3 Effect of nitrogen content on *Aspergillus niger* ZM-8 β -glucosidase production

2.4 含水量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响

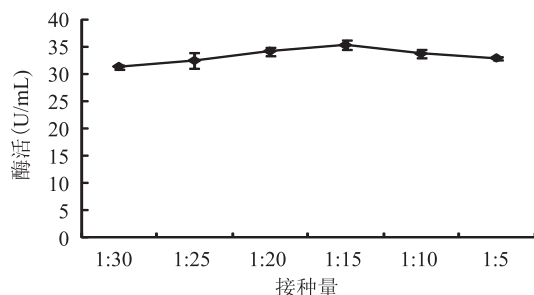
水分对固态发酵体系中菌株孢子的萌发、生长及酶的形成具有重要影响^[22]。在实验中发现,适宜的含水量在搅拌培养后发酵鲜曲结构疏松,基质内部和表面均有大量菌丝产生;加水量过低,发酵后期培养基表面干化严重,产孢子速度快;加水量过大,发酵前期培养基易结块,严重影响了菌株需氧量。由图 4 可知,当含水量为 250%,即产酶培养基中水与固体的质量比为 2.5:1 时,最有利于菌株产酶,此时酶活力可达最高值,为 33.89U/mL。

图4 含水量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响Fig.4 Effect of water content on *Aspergillus niger* ZM-8 β -glucosidase production

2.5 接种量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响

适宜的接种量对菌株产酶的影响较大。接种量过低,会延长发酵周期;接种量过大,则会导致曲中微生物量增长迅速,温度升高过快,对营养物质的需求量也较大,不利于微生物生长与产酶。由图 5 可

知,当接种量为 1:15,即固体曲与干基质的质量比为 1:15 时,有利于该菌株产酶,酶活达到了 35.25U/mL。

图5 接种量对黑曲霉 ZM-8 产 β -葡萄糖苷酶的影响Fig.5 Effect of inoculum amount on *Aspergillus niger* ZM-8 β -glucosidase production

2.6 培养基组分的优化结果

在上述单因素实验结果基础上,确定了最佳氮源为 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$,现通过正交实验 $L_9(3^4)^{[15]}$ 对麸皮添加量、含氮量、含水量和接种量 4 个因素进行优化,实验因素和水平表见表 1,正交实验结果极差分析和方差分析结果分别见表 2 和表 3。

表1 产酶培养基正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment of producing enzyme medium

水平	因素			
	A 麸皮添加量 (%)	B 含氮量 (%)	C 含水量 (%)	D 接种量
1	35	0.8	240	1:18
2	40	1.0	250	1:15
3	45	1.2	260	1:12

表2 产酶培养基组分正交实验极差分析表

Table 2 Extreme value analysis of orthogonal experiment of medium of production β -glucosidase

实验号	A	B	C	D	β -葡萄糖苷酶酶活 (U/mL)
1	1	1	1	1	34.94
2	1	2	2	2	35.38
3	1	3	3	3	35.85
4	2	1	3	2	33.22
5	2	2	1	3	34.13
6	2	3	2	1	37.07
7	3	1	2	3	31.70
8	3	2	3	1	31.22
9	3	3	1	2	33.31
k_1	35.24	33.14	33.98	34.41	
k_2	34.81	33.58	34.72	33.97	
k_3	32.08	35.41	33.43	33.89	
R	3.16	2.27	1.29	0.52	
优水平	A1	B3	C2	D1	

由表 2 和表 3 可知,各因素对 β -葡萄糖苷酶酶活影响的主次顺序是: $A > B > C > D$,即麸皮添加量和含氮量的极差 R 分居第一、二位,对 β -葡萄糖苷酶酶活的影响达到极显著水平;其次是含水量,达显著水平;接种量各水平间差异不显著。综合考虑,该菌株产 β -葡萄糖苷酶的最佳培养基组分配比为 $A_1B_3C_2D_1$,即麸皮添加量为 35%,含氮量为 1.2%,含

表3 产酶培养基组分正交实验方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment of medium of production β -glucosidase

变异来源	自由度 df	平方和 SS	均方 S ²	F	F _{0.05}	F _{0.01}
A	2	56.343	28.171	32.414 **	3.55	6.01
B	2	23.841	11.920	13.716 **	3.55	6.01
C	2	7.389	3.695	4.251 *	3.55	6.01
D	2	1.384	0.692	0.796	3.55	6.01
实验误差	18	15.644	0.869			
总变异	27	31485.468				

水量为250%,接种量为1:18。在此条件下进行优化结果的验证实验, β -葡萄糖苷酶活达42.49U/mL,优化效果较为理想。

3 讨论

我国经过20多年的微生物实验材料的空间诱变育种,已证实利用太空诱变选育微生物菌种具有变异效率高、幅度大、容易稳定、良性变异多、能显著提高微生物中某些基因的突变频率等特点。但从我国利用太空条件选育高产纤维素酶黑曲霉菌株的研究现状来看,由于参试单位缺乏优良的供试菌种,目前只有王景林等人对选育的黑曲霉X-15^[16]曾有报道,对于空间特殊条件——微重力、重离子辐射等对黑曲霉孢子DNA损伤的修复机理研究更是处于空白。因此,今后我们一方面应在通过其他物理、化学、生物等手段提高菌株纤维素酶活的性价比基础上,再利用航天特殊条件进行诱变,这样就更有利于诱变菌株投入生产;另一方面,空间特殊条件对微生物的诱变机制还有待于进一步研究。

β -葡萄糖苷酶属于黑曲霉纤维素酶系的诱导酶,发酵原料中碳源及其含量对酶活的影响是最大的,目前研究较多的是麸皮和纤维质原料。大量研究表明,麸皮在好氧微生物发酵生产纤维素酶过程中,起着疏松剂、碳源、氮源和提供维生素和矿物质元素等多重作用^[14,17]。本研究也证实了麸皮的这些作用。纤维素作为植物光合作用的主要多糖类产物,是地球上储量最丰富的可再生资源,具有极为诱人的开发前景。人们将来源广泛、价格低廉的各类纤维质资源作为生产 β -葡萄糖苷酶的主要碳源才刚刚起步^[16,18-19]。本研究为今后利用农业生产中生物收获量最大的玉米秸秆作为主要原料,经济高效、清洁化、工业化生产 β -葡萄糖苷酶提供了理论依据。

有研究表明,在培养基中添加适量的表面活性剂、金属离子以及鼠李糖等其他诱导物有利于黑曲霉纤维素酶的分泌^[13,17],但本实验未对这些因素进行研究,如在本研究基础上对上述因素作进一步研究,该菌株产酶量还有提高的潜力。

4 结论

本研究采用发酵菌株黑曲霉ZM-8是经航天诱变选育而得到的高产 β -葡萄糖苷酶的优良菌株,以玉米秸秆粉为主要原料,在单因素实验基础上利用正交实验对麸皮添加量、氮源、含水量、接种量等培养基组分进行了优化。结果表明,麸皮添加量和含氮量对产酶的影响达到极显著水平,含水量达到了

显著水平。该菌株产酶的最佳培养基组分为:麸皮添加量为35%,氮源为1.2%的 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$,含水量为250%,接种量为1:18。在此条件下, β -葡萄糖苷酶活为42.49U/mL,与目前国内相关报道的黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶水平相比^[13-14,17],处于前列。

参考文献

- [1] 孟宪文,宋小红,陈历俊,等. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J].乳品加工,2009(10):42-44.
- [2] Y H Pyo, T C Lee, Y C Lee. Enrichment of bioactive is of flavones in soy milk fermented with β -glucosidase producing lactic acid bacteria [J]. Food Research International, 2005, 38: 551-559.
- [3] 邵金辉,韩金祥,朱有名,等. β -葡萄糖苷酶在工农医领域的应用[J].生命的化学,2005,5(1):22-24.
- [4] Markku Saloheimo, Juha Kuja - Panula, Erko Ylösmäki, et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -Glucosidase BGLII (Cell1A) [J]. Applied Environment Microbiology, 2002, 68(9):4546-4553.
- [5] 潘利华,罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J].食品科学,2006,27(12):803-807.
- [6] T R Yan, J C Liau. Synthesis of alkyl β -glucosides from cellobiose with *Aspergillus niger* β -glucosidase II [J]. Biotechnology Letters, 1998, 20(7):653-657.
- [7] 戴四发,金光明,王立克,等.纤维素酶研究现状及其在畜牧业中的应用[J].安徽技术师范学院学报,2001,15(3):32-38.
- [8] 张玲,张芳琦,姚卫蓉. β -葡萄糖苷酶产生菌原生质体的诱变研究[J].食品研究与开发,2006,27(10):62-64.
- [9] 闫会平,吴兴泉,陈士华.黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的基因克隆[J].河南工业大学学报:自然科学版,2006,27(1):39-42.
- [10] 朱凤妹,李军,杜彬.黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶发酵培养基的优化研究[J].酿酒科技,2008(3):43-46.
- [11] 马旭光,张宗舟,简海明,等.黑曲霉高产纤维素酶活突变株ZM-8的筛选[J].中国饲料,2007(5):30-32.
- [12] Mandels M. 发酵法生产纤维素酶的某些问题和解决办法[J].应用微生物,1976(6):53-62.
- [13] 许晓鹏,袁士芳,刘立明.突变黑曲霉高产 β -葡萄糖苷酶的培养基优化[J].食品与生物技术学报,2008,27(5):124-127.
- [14] 杨胜远.黑曲霉(*As.n.XD-1*) β -葡萄糖苷酶产酶条件研究[J].食品科学,2002,23(11):59-62.
- [15] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学[M].第二版.

(下转第243页)

表3 基酒感官评定结果
Table 3 The sensory evaluation results of base-liquor

丙酸菌 (10 ⁵ 个/g 糟醅)	感官评定	评分
0	清亮透明、闻香舒适、有糟香、味较醇、入口稍辣、回味稍冲、后味较苦涩	69
0.13	清亮透明、香较纯正、有糟香、味较醇、入口稍甜、回味稍冲、后味较苦涩	69.5
0.67	清亮透明、香较纯正、稍有糟香、味较醇、味长谐调、后味稍苦涩	69.5
1.34	清亮透明、香纯正、稍有糟香、味较醇、酒体谐调、后味稍苦涩	70
6.7	清亮透明、香纯正、入口柔和、味较醇、味长谐调、后味稍苦涩	70.5
13.4	清亮透明、香较纯正、稍有糟香、味较醇、稍酸、回味稍冲、后味苦涩	69

表3。

由表3可以看出,入池发酵的酒醅中丙酸菌添加量 $1.34 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^5$ 个/g 糟醅时,所产基酒的风格突出、入口柔和、诸味谐调,感官评定酒体质量差别不大,但以酒醅中丙酸菌添加量 6.7×10^5 个/g 糟醅时产酒酒质为最好。

在入池发酵的酒醅中,若丙酸菌菌浓过低,对基酒品质影响较小;而菌浓过高,丙酸菌将发酵生成过量的丙酸和乙酸,导致基酒带有酸味。在酒醅其它初始条件不变的情况下,当丙酸菌添加量 $1.34 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^5$ 个/g 糟醅时,酒醅中菌系、酶系以及其它化学物质相互作用,达到新的平衡,使特型酒的风味更加协调。

3 结论

从特型窖泥中筛选得到的丙酸菌,应用于代谢乳酸。当丙酸菌添加量 6.7×10^5 个/g 糟醅时,与空白样对照,特型酒基酒中乳酸含量降低了3.67mg/100mL,乳酸乙酯含量降低了80.6mg/100mL,丙酸乙酯含量提高了0.5mg/100mL,且基酒风格突出、口感较好。不仅实现了“增丙降乳”的目的,同时提高了白酒的质量。

窖泥是白酒增香产酯的基础,它的质量直接影响特型酒的风格风味。己酸菌作为兼性厌氧菌,是窖泥的主要功能微生物,主要代谢产物己酸与酒醅中的乙醇反应形成己酸乙酯,强化了白酒的风味^[14]。四特酒酒厂已将己酸菌和酵母菌的混合菌液添加于窖泥中,通过理化检验,各项指标均优于普通窖泥^[15]。丙酸菌也是兼性厌氧菌,发酵生成有机酸,与己酸菌相似。分离得到的丙酸菌只是初步应用于白酒生产,为特型酒功能窖泥的进一步开发打好基础。

参考文献

[1] 李大和.浓香型曲酒乳酸乙酯偏高的原因及解决措施[J].酿酒科技,2007,152(2):100-103.

[16] 王景林,蒋兴村.纤维素酶产生菌黑曲霉 X-15 的选育及其产酶条件[J].中国兽医学报,2000,20(1):97-99.

[17] 田毅红,张鑫,李德莹,等.黑曲霉产β-葡萄糖苷酶培养基的优化研究[J].酿酒科技,2010(3):20-23.

[2] 张华峰,康慧.微生物发酵法生产丙酸[J].饲料工业,2004,25(8):29-33.

[3] Selina Hugenschmidt, Susanne Miescher Schwenninger, Nicole Gnehm, et al. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate [J]. International Dairy Journal, 2010(20):852-857.

[4] Jean-René Kerjean, Seamus Condon, Roberta Lodi, et al. Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria[J]. Food Research International, 2000, 33:281-187.

[5] 陈福民.降低浓香型曲酒中的乳酸乙酯含量措施浅析[J].酿酒,1999,132:51-52.

[6] 廖昶.特香型白酒勾兑浅议[J].酿酒科技,2004,122(2):44-46.

[7] 李平兰,贺稚非.食品微生物学实验原理与技术[M].北京:中国农业出版社,2005:71-80.

[8] R E 布坎南, N E 吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1984:876-888.

[9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:242-294.

[10] 袁方,邓亚红.丙酸菌代谢乳酸特征的研究(第1报)[J].酿酒科技,1992,54(4):16-18.

[11] 马小魁,姚培鑫.发酵法生产丙酸的研究进展[J].微生物学报,1999,26(6):443-446.

[12] Vincent Marcoux, Yvan Beaulieu, Claude P. Champagne, et al. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 74(2):95-99.

[13] 舒代兰,张丽莺,张文学,等.浓香型白酒糟醅发酵过程中香气成分的变化趋势[J].食品科学,2007,28(6):89-92.

[14] 周春红.浓香型大曲酒生产中己酸菌的制备[J].食品与发酵工业,2004,30(9):75-76.

[15] 廖昶,吴生文,黄小晖,等.特香型酒功能窖泥和普通窖泥理化指标对比分析[J].酿酒科技,2010,188(2):86-90.

(上接第239页)

北京:科学出版社,2000:149-153.

[18] 赵子高,吕世峰,杨付伟,等.黑曲霉产β-葡萄糖苷酶发酵条件的研究[J].山东化工,2010,39(9):12-15,18.

[19] 刘星斌,张宗舟,蔺海明,等.航天诱变黑曲霉 ZM-8 菌株固态发酵产β-葡萄糖苷酶的研究[J].甘肃农业大学学报,2009,44(2):144-148.