

白果醋酿造用米曲霉菌株筛选及其对白果醋 安全和品质的改善

杨碧月¹, 孙文祥¹, 成梦珂¹, 胡信玉¹, 孙文扬², 何丹丹², 徐浩宇², 朱琳^{1*}, 肖香^{1*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 江苏恒康生物科技有限公司, 江苏泰州 225316)

摘要: 白果是“药食两用”资源, 以其为原料酿造果醋可为我国丰富的白果资源利用提供新方向。然而, 如何兼顾白果毒素降解、活性成分保留以及苦涩风味改善是白果醋酿造过程中的瓶颈难题。该研究基于多相分类学方法从自然发酵豆酱块中分离鉴定6株米曲霉。其中, 菌株 *A. oryzae* SSC3-6 的菌丝具有最快的生长速度和最优的制白果曲覆盖效果, 且其淀粉酶、糖化酶和纤维素酶活力均为最高, 分别为 8.35、4.17 和 7.89 U/mL。与酶解白果醋相比, 菌株 *A. oryzae* SSC3-6 参与酿造的米曲白果醋成醋速度更快、醋液 MPN 含量从 84.65 $\mu\text{g/mL}$ 显著地下降至 24.30 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.05$)。γ-氨基丁酸和黄酮含量则分别从 0.15 mg/mL 和 83.00 mg/L 显著上升至 1.08 mg/mL 和 133.96 mg/L ($P<0.05$)。同时, 米曲白果醋的醋香和白果香明显, 回味甘甜, 挥发性成分组成更加多样、均衡和低丰度。因此, 米曲霉参与酿造白果醋可以有效控制白果醋 MPN 毒素含量、保持甚至提高活性物质含量, 以及改善白果特有的苦涩风味。该研究结果为我国白果醋优质且无有害酿造提供重要的参考。

关键词: 米曲霉; 多相分类学; 白果毒; γ-氨基丁酸; 白果醋

文章编号: 1673-9078(2025)08-83-91

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0744

Screening of *Aspergillus oryzae* Strains and Positive Effects on the Safety and Quality of *Ginkgo biloba* L. Seed Vinegar Brewing

YANG Biye¹, SUN Wenxiang¹, CHENG Mengke¹, HU Xinyu¹, SUN Wenyang², HE Dandan², XU Haoyu²,
ZHU Lin^{1*}, XIAO Xiang^{1*}

(1.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2.Jiangsu Hengkang Biotechnology Co. Ltd., Taizhou 225316, China)

Abstract: *Ginkgo biloba* L. seed (GBS) is a traditional Chinese medicinal and food resource, and its use as a raw material to brew fruit vinegar can provide a new direction for the utilization of abundant GBS resources. However, balancing ginkgotoxin degradation, active ingredient retention, and bitter flavor attenuation represents a bottleneck in the ginkgo vinegar brewing process. In this study, six strains of *Aspergillus oryzae* were isolated from naturally fermented soybean paste blocks

引文格式:

杨碧月,孙文祥,成梦珂,等.白果醋酿造用米曲霉菌株筛选及其对白果醋安全和品质的改善[J].现代食品科技,2025,41(8):83-91.

YANG Biye, SUN Wenxiang, CHENG Mengke, et al. Screening of *Aspergillus oryzae* strains and positive effects on the safety and quality of *Ginkgo biloba* L. seed vinegar brewing [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 83-91.

收稿日期: 2024-05-28

基金项目: 泰州市科技支撑计划(农业)项目(TN202202); 国家自然科学基金项目(31600069); 江苏省自然科学基金项目(BK20150497)

作者简介: 杨碧月(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 白果脱毒微生物, E-mail: 2222218050@stmailujs.edu.cn

通讯作者: 朱琳(1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 酿造及发酵微生物, E-mail: zhulin19820402@ujs.edu.cn; 共同通讯作者: 肖香(1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌发酵食品及其营养与功能, E-mail: xiaoxiang1@aliyun.com

and identified using multiphase taxonomy methods. Among them, strain *A. oryzae* SSC3-6 had the fastest growth rate and the best coverage effect for preparing ginkgo koji, and its amylase, glycosylase, and cellulase activities were all the highest, with values of 8.35, 4.17, and 7.89 U/mL, respectively. When comparing enzymatic hydrolysis rates, ginkgo vinegar produced using *A. oryzae* SSC3-6 has a faster production rate, and the MPN content in the vinegar decreased significantly from 84.65 to 24.30 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.05$). The contents of γ -aminobutyric acid and flavonoids increased significantly from 0.15 mg/mL and 83.00 mg/L to 1.08 mg/mL and 133.96 mg/L, respectively ($P<0.05$). Furthermore, the *A. oryzae* ginkgo vinegar exhibited obvious aromas of raw GBS, with a sweet aftertaste. Moreover, the composition of volatile components was more diverse and balanced, with a lower abundance. Therefore, the use of *A. oryzae* in the brewing of ginkgo vinegar can effectively control MPN content, maintain or even increase the content of active substances, and improve the unique bitter flavor of ginkgo fruit. The results of this study represent an important reference for the high-quality and non-toxic brewing of ginkgo vinegar in China.

Key words: *Aspergillus oryzae*; polyphasic taxonomy; MPN; γ -aminobutyric acid; ginkgo vinegar

白果是银杏的成熟种子, 具有抗肿瘤、抗氧化、降血脂和抑菌杀毒等多种生理活性, 是我国重要的“药食两用”资源^[1]。果醋是一种近年来迅速发展的酿造饮品, 可以兼具原料果品的果香风味和营养特征。白果中淀粉含量占种子干重的 60%~70%^[2], 且富含黄酮、萜内酯、 γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric Acid, GABA)等活性成分^[3]。这些淀粉分解成单糖后可以成为果醋酿造的发酵底物, 同时活性成分可以赋予果醋宝贵的营养价值。因此, 白果酿造果醋可以为我国丰富的白果资源利用提供新方向。然而, 白果中还含有可能导致呕吐、癫痫等不良后果的 4'-甲氧基吡哆醇(4'-O-Methylpyridoxine, MPN)^[4], 极大的限制了白果作为食品原料时的使用量, 从而影响了白果活性物质的摄入及利用。同时, 白果特有的苦涩味也会影响其作为原料的食品风味, 已有研究者以白果制酒时复配蓝莓、火龙果等水果来控制酒中白果毒素含量以及调节苦涩味道^[5]。目前, 如何兼顾白果 MPN 脱毒、活性成分保持以及苦涩风味改善是白果醋制造、乃至是白果加工产业的瓶颈难题。

微生物发酵可能为上述的白果加工难题提供可行的解决方法。米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是我国传统发酵微生物, 可以高效分泌淀粉酶、糖化酶、葡萄糖苷酶、纤维素酶等多种活性酶^[6,7]。在醋的酿造过程中, 米曲霉可以将淀粉转化单糖, 为后续酵母和醋酸杆菌的酒化作用和醋化作用提供碳源底物。米曲霉还会和酵母等微生物一起进行并行式发酵, 产生多种甜味物质, 具有抵消白果酿醋时苦涩味道的潜力。同时, 米曲霉超强的分泌酶体系可以分泌多样的生物酶, 可以降解含有苯环、呋喃环或者含氧杂环的诸多毒素, 如赭曲霉毒素和黄曲霉毒素等^[8,9]。因此, 米曲霉可能具有通过将吡啶环开环

降解白果中 MPN 的潜力。

综上所述, 以白果为原材料, 应用米曲霉制曲酿造果醋是兼顾 MPN 降解、活性成分保留以及风味改善的一种白果资源高效利用的可行策略。因此, 本研究聚焦于适合白果醋酿造的米曲霉菌株的筛选及应用。通过分离和鉴定米曲霉菌株; 并进一步针对白果理化特征筛选菌丝生长旺盛、快速覆盖白果成曲、相关酶活力高的米曲霉菌株酿造白果醋; 同时, 以使用淀粉酶和糖化酶裂解淀粉并接种酵母和醋酸杆菌酿造的白果醋作为对照, 从 MPN 残留浓度、活性物质 GABA、黄酮和萜内酯含量、感官评价和风味等方面评估本次研究筛选到的米曲霉菌株对白果醋的酿造效果。本研究将为我国白果资源的优质且无毒害的加工利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

材料: 白果, 采自江苏大学银杏林; 安琪高活性酵母, 湖北安琪酵母股份有限公司; 醋酸菌, 实验室保藏的 *Acetobacter pasteurianus* Pro 2。

试剂: 耐高温 α -淀粉酶(150 000 U/mL)、糖化酶(GAL 型, 260 000 U/mL), 上海夏盛生物科技有限公司; 葡萄糖、可溶性淀粉、碘化钾、氢氧化钠、3,5-二硝基水杨酸、苯酚、PDA 培养基(PDA 培养基: 称取 200 g 土豆加去离子水煮沸 30 min, 过滤后补足 1 L 水, 加入葡萄糖 20 g, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min, 固体平板加入 20 g 琼脂)、CYA 培养基(NaNO_3 3.0 g、 KH_2PO_4 1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、酵母膏 5.0 g、蔗糖 30.0 g、琼脂 15.0 g、蒸馏水 1.0 L)、产毒培养

基 AFPA (蛋白胨 10.0 g、酵母粉 20.0 g、柠檬酸铁 0.5 g、四氯醌 0.002 g、氯霉素 15.0 g、琼脂 15.0 g)、邻苯二甲酸氢钾, 上海国药集团化学试剂公司, 均为分析纯; 1-戊烷磺酸钠、磷酸钾, 上海迈瑞尔生化科技有限公司, 色谱级; 甲醇、乙腈, 美国 TEDIA 试剂公司, 色谱级; 真菌 DNA 提取试剂盒, 上海生物工程; PCR 引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 黄曲霉毒素总量 (Aflatoxin Total) ELISA 试剂盒, 普瑞邦北京科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津; UV-1601 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; M200Pro 多功能酶标仪, 上海天能科技有限公司; SW-CJ-1D 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; FE28 实验室 pH 计, 梅特勒-托利多公司; LE204E 电子天平, 梅特勒-托利多公司; TGL-16M 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; TS2 光学显微镜, 尼康公司。

1.3 试验方法

1.3.1 米曲霉菌株的分离

白果果仁(胚乳)具有坚韧的内种皮, 阻碍了米曲霉菌株在制备“白果曲”时的覆盖和穿刺过程。自然发酵豆酱原料用的黄豆同样具有韧性较强的种皮, 其栖息着的米曲霉种群可能包含着适合“白果曲”制备的菌株。因此, 对采集自黑龙江省肇东市、绥化市、齐齐哈尔市和吉林省延边市的 4 种自然发酵豆酱块进行米曲霉菌株的分离。去掉酱块表层 2 cm 后, 刮取酱块碎屑并直接接种于 pH 值为 10 的、含 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 CYA 培养基上, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d。将碎屑周围长出放射状菌丝体尖端转接于新的 CYA 培养基继续观察, 直至丝状真菌单菌落形成。

1.3.2 米曲霉菌株鉴定

首先将分离菌株接种于 CYA 培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~5 d, 利用光学显微镜进行显微形态的观察, 通过分生孢子梗末端的顶囊、分生孢子小梗以及分生孢子头等特征性结构初步鉴定曲霉属菌株。再利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取试验曲霉属候选菌株的基因组 DNA, 具体步骤参见真菌 DNA 提取试剂盒说明书。应用 β -Tubulin 基因特异性引物 Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') 和 Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')^[10] 进行 PCR 扩增, 并送上海生工进行测序分析。测序结果

使用 MEGA 7.0 进行邻接法聚类系统发育分析, 确定分离曲霉属菌株中的曲霉属黄绿组。再将黄绿组候选菌株应用杂色曲霉素 A 脱氢酶基因 *aflM* 特异性引物 AflM-1for (5'-AAGTTAATGGCGGAGACG-3') 和 AflM-2rev (5'-TCTACCTGCTCATCGGTGA-3')^[11] 进行 PCR 扩增, 通过是否具有产毒基因区分黄曲霉和米曲霉菌株。再将黄绿组候选菌株三点接种于 AFPA 固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 观察 AFPA 培养基上的菌落反面颜色特征。根据产毒黄曲霉菌落反面呈明显橙黄色和米曲霉菌落反面呈黄褐色或浅黄色这一特征区分黄曲霉和米曲霉^[12]。最后再应用竞争酶联免疫方法, 按照白飞荣等^[12]的描述检测黄绿组候选菌株是否产生黄曲霉毒素, 从而区分黄曲霉和米曲霉菌株。

1.3.3 白果醋酿造用米曲霉菌株筛选

白果胚乳种皮较为坚韧, 为米曲霉菌丝覆盖和穿刺增添了难度。预实验时选取 *A. oryzae* CICC 2339 (沪酿 3.042) 和 *A. oryzae* RIB 40 (ATCC 42149) 两株商用菌株进行“白果曲”制备时, 两菌株覆盖和穿刺白果果仁的效果不理想, 从而因糖化不足而导致难以成功酿造白果醋。因此, 我们拟通过菌丝生长速度、菌丝覆盖白果果仁程度、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、蛋白酶和漆酶酶活力等指标筛选适合制备“白果曲”的菌株酿造白果醋。米曲霉菌丝生长速度: 在 CYA 培养基中心点接米曲霉, 测量 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 120 h 后的菌落直径; 白果曲制备效果: 将 50 g 白果平铺于培养皿中, 将米曲霉 5 点法均匀接种于培养皿内, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养、85%~90% 湿度培养 120 h 后, 观测白果的菌丝覆盖度以及产孢情况; 淀粉酶活力检测: 参考文献^[13]的方法进行检测; 糖化酶活力检测: 参考文献^[13]的方法, 采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 比色法测定; 纤维素酶活力检测: 参考 GB/T 23874-2009; 中性蛋白酶活力检测: 参考国标 GB/T 28715-2012; 酸性蛋白酶活力检测: 参考 GB/T 28715-2012; 漆酶酶活力检测: 参考文献^[14]的方法进行检测; 谷氨酸脱羧酶酶活力检测: 参考文献^[15]的方法进行检测。

1.3.4 白果醋的酿造流程

目前已有的将白果资源应用在酿造食品中的研究中, 仍未见有关利用米曲霉糖化酿造白果的报道。而是仅有采用酶解法糖化白果淀粉并进行酿酒的报道。因此, 本研究选择了酶解法制备白果醋作为对照, 比较其与米曲霉糖化制备白果醋方法在解决 MPN 毒素残留、活性物质流失和风味不良等问题上

的效果。两种酿造方法的流程如下：

米曲白果醋酿造流程：白果→剥壳去皮→挑选→清洗并切半→蒸煮→冷却→米曲霉接种（湿度：85%~90%）→发酵（25℃）→加酿造水、酵母菌、白砂糖→酒精发酵→灭菌→接种醋酸菌发酵→过滤→灭菌→澄清→装瓶→检验

酶解白果醋酿造流程：白果→剥壳去皮→挑选→清洗→打浆→淀粉酶、糖化酶酶解→离心过滤→糖度调整→接种酵母→酒精发酵→灭菌→接种醋酸菌发酵→过滤→灭菌→澄清→装瓶→检验

1.3.5 白果原料和白果醋MPN和活性物质检测

MPN 检测：参考文献^[14]方法：采用高效液相色谱法进行检测：色谱柱：CNW-C18 柱（5 μm，4.6 mm×250 mm）；流动相：流动相 A：乙腈，流动相 B：5 mmol/L 磷酸钾 -5 mmol/L 戊烷磺酸钠水溶液，用磷酸调节 pH 值至 2.5。流动相配比：0 min，4% A~96% B；10 min，8% A~92% B；15 min，10% A~90% B；20 min，8% A~92% B；40 min，4% A~96% B；流量：1.0 mL/min；柱温：30℃；紫外检测波长：290 nm。

GABA 的测定：参考文献^[16]的比色法进行检测。
银杏黄酮的测定：参考文献^[16]的紫外分光光度计法进行检测。

银杏萜内酯的测定：参考文献^[16]方法：采用高效液相色谱法：色谱柱：CNW-C18 柱（5 μm，4.6 mm×250 mm）；流动相：甲醇-水，等度洗脱，甲醇与水为 32:68；流速：1.0 mL/min；柱温：35℃；紫外检测波长：220 nm。

基于上述方法检测本研究中白果原料中 MPN 含量为 169.8 μg/g，GABA 含量为 1.8 mg/g，黄酮含量为 3.6 mg/g，以及萜内酯含量为 1.9 mg/g。

1.3.6 白果醋的感官评价

感官评价参照猕猴桃醋^[17]和板栗醋^[18]的感官评分要求，结合白果醋本身特点，进行感官评价（满分 100 分），挑选 12 名食品专业相关的人员组成感官评定小组，按感官评定标准（见表 1）对白果醋的口感、色泽、香气进行打分，取平均分作为感官评分。

1.3.7 白果醋的风味物质检测

香气萃取方法^[19]：采用顶空固相微萃取（SPME）。准确量取 5 mL 白果醋样品于 20 mL 顶空瓶，密封，放入 60℃ 水浴中平衡 10 min，插入老化处理的萃取头吸附 30 min（250℃ 老化 30 min）。

色谱条件：进样口温度 250℃，气质接口温度 280℃，载气流量 1.5 mL/min，分流比 4:1。升温程序：

初始 50℃，保持 1 min，以 5℃/min 升温到 100℃保持 2 min；4℃/min 升温到 180℃保持 3 min；5℃/min 升温到 250℃保持 5 min。

表 1 白果醋感官评价指标

Table 1 Sensory evaluation indicators of ginkgo vinegar		
项目	评分标准	得分（分）
外观	果醋色泽呈亮黄色，醋汁澄清	14~20
	果醋色泽呈黄色，醋汁较清	7~13
	果醋色泽偏深或偏淡，醋汁浑浊	0~6
形态	几乎无悬浮物，无沉淀	14~20
	有悬浮物，颗粒较小，稍有沉淀	7~13
	悬浮物颗粒较大，沉淀较多	0~6
香气	较浓的醋香，无异味	14~20
	具有淡淡的醋香，无异味	7~13
	无醋香，有其他刺激性气味	0~6
风味	具有白果香气，回味甘甜	14~20
	隐有白果香气，回味稍偏苦或偏涩	7~13
	白果香气不足，回味偏苦偏涩	0~6
口感	口感好，酸甜适中，入口柔和	14~20
	口感一般，酸甜较适中，入口较柔和	7~13
	口感不好，过酸或过甜，入口刺激	0~6

质谱条件：离子源温度 230℃，四极杆温度 150℃，EI 电离 70 eV，全扫描 35~550 Da。

1.3.8 数据分析

所有试验均进行 3 次重复性试验，利用 Excel 2016 对数据进行收集和处理，采用 IBM.SPSS Statistics 22.0 统计软件进行单因素方差分析和差异显著性分析，使用 Origin 2021、Excel 2016、Mega 7.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 米曲霉菌株的分离鉴定

使用 pH 值为 10 的 DPY 培养基从采集的 4 种东北自然发酵豆酱块样品中分离获取丝状真菌 48 株。根据曲霉属形态学特征，即分生孢子梗末端的顶囊、分生孢子小梗以及分生孢子头等特征性结构，初步鉴定曲霉菌属候选菌株 13 株。基于 β -tubulin 基因构建的系统发育树结果显示，13 株候选菌株均为曲霉属，其中 9 株菌株与标准菌株米曲霉 *Aspergillus oryzae* NRRL 447 和黄曲霉 *Aspergillus flavus* ATCC 204304 的参考序列聚为一簇，属于曲霉属黄绿组（图 1）。

表 2 供试6株米曲霉菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of six strains of *Aspergillus oryzae*

菌株 编号	菌落直径 /(cm/120 h)	α -淀粉酶活 /(U/mL)	糖化酶活 /(U/mL)	纤维素酶活 /(U/mL)	中性蛋白酶酶 活/(U/mL)	酸性蛋白酶酶 活/(U/mL)	漆酶酶活 /(U/mL)	谷氨酸脱羧酶酶活 /(U/mg prot)
SSC1-1	6.65 ± 0.21	1.82 ± 0.17	1.84 ± 0.24	5.83 ± 0.26	3.84 ± 0.23	2.86 ± 0.12	—	0.86 ± 0.12
SSC1-4	8.35 ± 0.21	3.88 ± 0.19	2.12 ± 0.32	7.81 ± 0.26	2.87 ± 0.54	1.83 ± 0.14	—	1.92 ± 0.16
SSC3-6	8.65 ± 0.07	8.35 ± 0.24	4.17 ± 0.03	7.89 ± 0.15	2.54 ± 0.26	2.45 ± 0.35	2.12 ± 0.45	3.27 ± 0.45
SSC4-6	6.50 ± 0.14	2.15 ± 0.07	3.24 ± 0.22	4.84 ± 0.58	2.58 ± 0.45	1.86 ± 0.42	—	3.76 ± 0.72
SSC4-7	6.35 ± 0.07	1.95 ± 0.21	3.79 ± 0.15	4.76 ± 0.11	3.75 ± 0.30	2.70 ± 0.41	3.32 ± 0.30	2.67 ± 0.32
SSC4-11	6.20 ± 0.14	2.60 ± 0.14	1.57 ± 0.12	5.02 ± 0.13	3.59 ± 0.55	1.54 ± 0.48	0.88 ± 0.25	1.75 ± 0.66

注：—，代表未检测到酶活力。

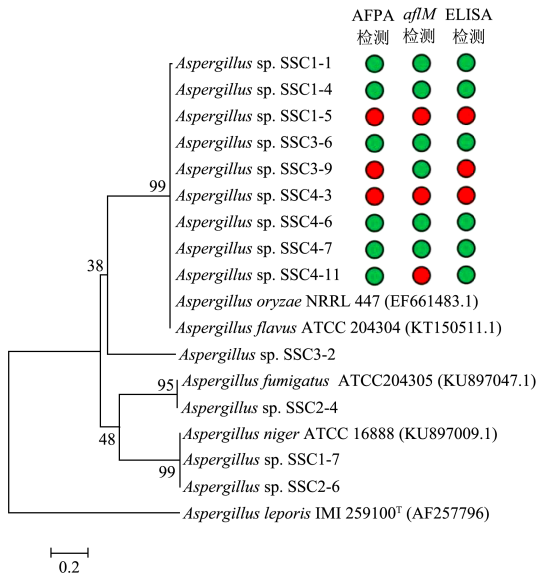


图 1 候选 13 株曲霉属菌株的多相分类鉴定

Fig.1 Polyphasic classification and identification of 13 candidate strains of *Aspergillus* sp

注：绿色圆代表检测反应为阴性，红色圆代表检测反应为阳性。

继续通过 AFPA 产毒培养基培养、杂色曲霉毒素 A 脱氢酶基因 *aflM* 特异性扩增，以及酶联免疫（ELISA）毒素检测等方法对该 9 株菌株进行多相鉴定（图 1）。其中，菌株 *Aspergillus* sp. SSC1-1、SSC1-4、SSC3-6、SSC4-6 和 SSC4-7 在 AFPA 产毒培养基培养 3 d 时的菌落反面呈较为明显的黄褐色，*aflM* 基因特异性扩增结果为阴性，且酶联免疫反应未检测到黄曲霉毒素产生。而菌株 *Aspergillus* sp. SSC4-11 的 *aflM* 基因特异性扩增结果虽然为阳性，但是 AFPA 检测和 ELISA 反应结果均为明显的阴性。因此，该 6 株曲霉属菌株被鉴定为米曲霉 *Aspergillus oryzae*，可用于后续的实验。菌株 *Aspergillus* sp. SSC1-5 和 SSC4-3 由于在 AFPA 培养

基上的菌落反面呈明显的橙黄色，*aflM* 基因特异性扩增结果为阳性，且酶联免疫反应检测到黄曲霉毒素产生，所以鉴定该两株菌株为黄曲霉 *Aspergillus flavus*。菌株 *Aspergillus* sp. SSC3-9 尽管 *aflM* 基因特异性扩增结果为阴性，但在 AFPA 产毒培养基上的菌落反面呈明显的橙黄色，且酶联免疫反应检测到黄曲霉毒素产生，因此仍然判定其为黄曲霉。

2.2 白果制曲及酿造用米曲霉菌株筛选

白果胚乳较为坚韧，这为米曲霉菌丝覆盖和穿刺白果的白果曲制备过程增添了难度。生长快速的菌丝具有更强的穿透能力和覆盖能力，更具酿造白果的优势。因此，菌丝生长速度是白果酿造用米曲霉菌株筛选的重要指标。前文鉴定的 6 株米曲霉菌株中，*A. oryzae* SSC3-6 和 SSC1-4 的菌丝生长速度最快，培养 120 h 培养后的直径可达 8.14~8.72 cm（表 2）。其中，*A. oryzae* SSC3-6 在制备白果曲时，表现出对白果更加出色的覆盖效果，且产孢子能力最强，这些生长特征有利于白果酿造过程（图 2）。

同时，比较 6 株米曲霉菌株的多种生物酶酶活力的结果表明，菌株 *A. oryzae* SSC3-6 具有 6 株菌株中最高的淀粉酶、糖化酶和纤维素酶活力，分别为 8.35、4.17 和 7.89 U/mL（表 2）。同时，菌株 *A. oryzae* SSC3-6 的漆酶酶活力和谷氨酸脱羧酶活力也较为突出。因此，米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 是具有高产多种生物酶的菌株，其对淀粉的分解能力和细胞壁纤维素的降解能力将十分有助于后续酵母菌的酒化作用和白果活性物质的释放，而漆酶氧化能力和谷氨酸脱羧能力将十分有助于白果 MPN 毒素降解和活性物质 GABA 的产生。综上所述，本研究选择米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 作为后续白果曲制备和白果醋酿造的功能菌株。

表 3 米曲白果醋和酶解白果醋的安全和营养特征

Table 3 Safety and nutritional characteristics of <i>A.oryzae</i> -ginkgo vinegar and enzyme-ginkgo vinegar					
处理	总酸达标 (3.50 g/100 mL) 时间/d	MPN 含量 /(μg/mL)	GABA 含量 /(mg/mL)	黄酮含量 /(mg/L)	赭内酯含量 /(mg/L)
米曲白果醋	35	24.30 ± 4.12*	1.08 ± 0.07*	133.96 ± 4.03*	210.86 ± 2.40
酶解白果醋	42	84.65 ± 0.75	0.15 ± 0.03	83.00 ± 3.59	222.15 ± 4.62

注：* 代表与酶解白果醋的数值差异达到了显著性水平（ $P<0.05$ ）。

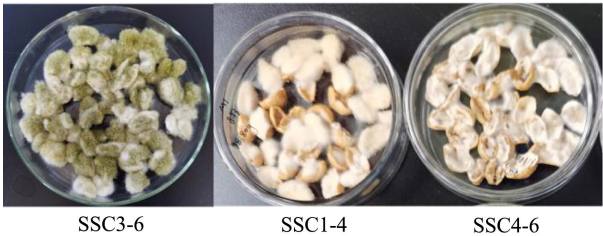


图 2 代表性米曲霉菌株制备白果曲的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of representative strains of *Aspergillus oryzae* in the preparation of ginkgo koji

2.3 米曲霉菌株*A. oryzae* SSC3-6酿造白果醋

本研究使用米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 制备白果曲，并添加酵母、醋酸杆菌和水进行酒化和醋化发酵制备米曲白果醋。同时，以酶解白果醋作为实验对照，检测当白果醋总酸达到国标规定的 3.50 g/100 mL（以乙酸计）时的毒素 MPN 含量和活性物质含量（表 3）。米曲白果醋和酶解白果醋总酸达到 3.50 g/100 mL（以乙酸计）分别用时 35 d 和 42 d；米曲白果醋总酸达标时醋液的 MPN 含量为 24.30 μg/mL，显著低于酶解白果醋的 84.65 μg/mL（ $P<0.05$ ）。该 MPN 含量也明显地低于基于乳酸菌发酵的白果汁中的 MPN 含量（41.53 μg/mL）^[20]；GABA 和黄酮的含量分别为 1.08 mg/mL 和 133.96 mg/L，显著地高于酶解白果醋的 0.15 mg/mL 和 83.00 mg/L（ $P<0.05$ ）。Chen 等^[21]利用发芽大米制备的米醋中 GABA 含量为 0.1 mg/mL，与本研究的酶解白果醋含量相似，但远低于本研究的米曲白果醋含量。同时，赵丽等^[22]和郭慧敏等^[23]在利用酶解法酿造白果酒时所保留的黄酮含量分别为 38.4 mg/L 和 40 mg/L，均远低于本研究中米曲白果醋中的黄酮含量；米曲白果醋赭内酯含量与酶解白果醋处于同一水平。这些结果表明，接种米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 可以促进白果醋的酿造过程，有效控制醋液中白果毒素 MPN 含量，保持赭内酯含量，以及增加 GABA 和黄酮含量。

2.4 米曲霉制备白果醋品质风味评价

感官评价结果表明米曲白果醋感官评价总分为 84.14，显著高于酶解白果醋的 67.46（ $P<0.05$ ）（图 3）。两种白果醋的外观和形态较为相似，均呈黄色，醋体较为透明清澈，几乎无悬浮物，因此感官评价得分较为接近，无显著差异性（ $P>0.05$ ）。米曲白果醋的口感、香气和风味方面感官得分为 17.14、16.18 和 16.91，分别显著高于酶解白果醋的 13.88、12.93 和 10.96（ $P<0.05$ ）。米曲白果醋的口感酸甜适中，入口柔和；醋香较浓，无异味；且具有白果香气，回味以甘甜为主。而酶解白果醋入口略有刺激；醋香弱于米曲白果醋；且白果香气较弱，回味偏苦涩。

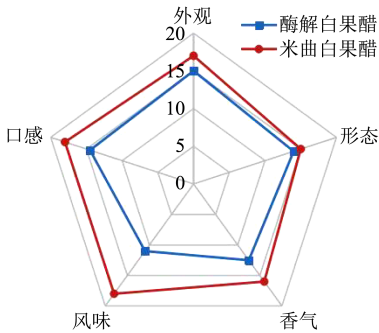


图 3 米曲白果醋和酶解白果醋的感官评价

Fig.3 Sensory evaluation of *A. oryzae*-ginkgo vinegar and enzyme-ginkgo vinegar

为了进一步解析米曲霉改善白果醋风味的原因，本次研究对米曲白果醋、酶解白果醋和白果原料的挥发性成分进行了检测（图 4）。结果表明，三种供试样品挥发性成分的组成和相对丰度有明显的不同。其中，白果原料的挥发性成分组成最为单一，酶解白果醋中挥发性成分的多样性较白果原料有所增加，但各物质类型中挥发性成分相对丰度的均匀性较差。例如，除乙酸外的酸类物质总相对丰度为 2.8%，其中己酸为 2.0%；醇类物质总相对丰度为 12.6%，其中异丁醇、异戊醇和 2,3-丁二醇 3 种含量过高易产生苦涩味的挥发性物质的相对丰度分别

为 1.9%、2.1% 和 7.5%。在三种供试样品中，米曲白果醋挥发性成分的多样性程度最高，所有物质类型中挥发性成分的种类均多于酶解白果醋和白果原料，且相对丰度普遍小于 0.5%。此外，酶解白果醋中绝对优势的己酸、乙酸异戊酯、异丁醇、异戊醇和 2,3- 丁二醇在米曲白果醋中的相对丰度均下降至 1% 以下。这些结果表明，接种米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 可以促使白果醋酿造过程中产生的优势且易产生苦涩味的挥发性物质转化为多样但含量较低的挥发性物质，从而改善白果醋的口感和风味。

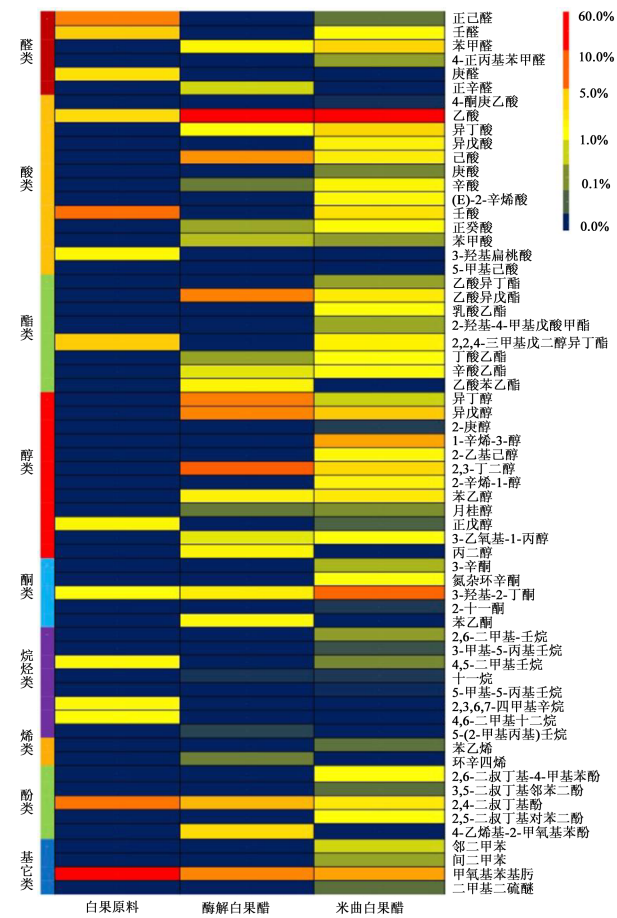


图 4 米曲白果醋、酶解白果醋以及原料白果的挥发性成分相对丰度的热图分析

Fig.4 Heat maps of analysis of relative abundance of volatile components in *A. oryzae*-ginkgo vinegar, enzyme-ginkgo vinegar, and raw ginkgo seed

3 讨论

米曲霉被长期用于传统食品发酵，是公认的安全菌株 GRAS (Generally Regarded as Safe, GRAS)。同时，因其高产蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、纤维素酶和果胶酶等多种酶的能力，被广泛应用于酶的工

业生产^[24]。近年来，随着基因重组技术的迅速发展，米曲霉因其杰出的蛋白分泌能力；相对于细菌和酵母、与哺乳动物类似的翻译后加工机制；远低于动植物的培养成本、且易于产业化生产；发酵工艺成熟、安全性高等优点越来越受到人们的关注，成为新一代杰出的外源蛋白表达分泌宿主，被研究者誉为蛋白质生产工厂^[25]。已有研究表明，在清酒酿造的制曲过程中，米曲霉菌丝顶端及其分枝不断生长向蒸熟大米内的底物拓殖，利用菌丝尖端结构和细胞间隔膜将大量酶分泌到胞外，将大米中的淀粉和蛋白质等底物降解为易被其自身以及共栖的酵母菌吸收的单糖等小分子物质，从而与酵母形成一种并行式发酵模式^[26]。本研究对白果醋酿造用的米曲霉菌株的筛选正是首先关注了菌丝对蒸熟白果的覆盖和穿刺能力，寻找更容易向白果中淀粉底物拓殖的菌株。然后，基于表 2 中的生物酶酶活力比较，最终锁定菌株 *A. oryzae* SSC3-6。而基于 *A. oryzae* SSC3-6 制备的白果曲也同样具有较高的淀粉酶、糖化酶、纤维素酶等生物酶活力，分别达到 3 373、1 051 和 7.3 U/g。已有研究中尽管仍尚未见到“白果曲”的相关报道，但由大米和麸皮等为原料制备的“米曲”中淀粉酶、糖化酶和纤维素酶酶活力范围分别为 1 845~2 500、700~1 840 和 8~450 U/g^[27-29]。由此可见，菌株 *A. oryzae* SSC3-6 是一株具有突出的淀粉酶酶活力的菌株，这一特点将十分有利于糖化分解白果中高浓度淀粉，为后续在白果醋酿造过程中的酵母酒化作用提供丰富的碳源底物。同时，本研究用该菌株制备白果醋的综合评价结果也进一步验证了这种筛选模式可以分离筛选到适合白果酿造用的米曲霉菌株，为今后的相关研究提供了有价值的参考。

已有研究结果表明，白果毒、氰化物和银杏酸是白果中致敏致毒的主要物质。其中，氰化物和银杏酸均受热易分解，在白果中易脱除。MPN 作为维生素 B6 的结构类似物，包含结构稳定和难以降解的吡啶环，是白果中的关键致毒物质。研究表明，来自 *Pseudomonas putida* KT2440 的 2,5- 二羟基吡啶双加氧酶 (2,5-Dihydroxypyridine Dioxygenase, Nicx)^[30] 和 *Ralstonia* sp. T6 具有的 3,6- 二羟基吡啶-2,5- 二酮水解酶 (3,5,6-trichloro-2-pyridinol degradation, DphJ)^[31] 可以通过水解作用裂解吡啶环。然而，*Pseudomonas putida* 和 *Ralstonia* sp. 是非食品级微生物，甚至具有条件致病性。以 Nicx 和 DphJ

编码基因为检索对象,在我国食品级微生物模式菌株和传统发酵微生物模式菌株(包括米曲霉)的全基因组序列中均未获得有效检索结果。邹敏敏^[14]的研究中发现漆酶-丁香醛体系能有效酶解白果悬浊液中的 MPN。还有报道表明米曲霉可以通过产生漆酶降解含有苯环、呋喃环的真菌毒素,如赭曲霉毒素和黄曲霉毒素等^[10-12]。在本研究中,米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 具有漆酶活性,且可以有效控制白果醋液中 MPN 的含量。这些结果暗示着菌株 *A. oryzae* SSC3-6 可能是通过产生漆酶来降解含吡啶环结构的 MPN 毒素,使米曲白果醋的 MPN 终质量浓度下降至 24.3 $\mu\text{g/mL}$ 。日本学者根据白果中毒患者血清中 MPN 的浓度推测成年人 MPN 的中毒剂量上限为 6.4 mg^[32]。尽管以该剂量上限为标准并参考食醋的饮用量表明,本研究米曲白果醋 MPN 浓度处于较为安全的范围内,但从安全性角度考虑,进行更加彻底的 MPN 降解仍十分必要。因此,在未来的研究中解析米曲霉产生漆酶以及该漆酶降解 MPN 的代谢机理,将对白果酿造食品中 MPN 毒素的彻底控制具有重要的意义。

γ -氨基丁酸是近几年被关注到的一种生物活性成分。GABA 是一种中枢神经的抑制性神经递质,具有降血压、抗抑郁、与改善睡眠等诸多作用,其食品安全性已得到广泛验证,并在 2009 年被国家批准为新资源食品,可作为食品添加剂使用^[33]。已有研究表明乳酸菌具有 GABA 的合成途径。通过谷氨酸脱氢酶(Glutamate Dehydrogenase, GDH)的催化作用,将 TCA 循环中的 α -酮戊二酸转化为 L-谷氨酸(L-glutamate, L-Glu),然后在谷氨酸脱羧酶(Glutamate Decarboxylase, GAD)的催化下 L-谷氨酸脱羧生成 GABA^[34]。其中的 GAD 是途径中的关键酶, GAD 酶活性的增强可以促进 GABA 的生成。本研究在米曲霉基因组中也检索到了与乳酸菌相似的 GABA 合成途径。因此,本次研究在利用菌株 *A. oryzae* SSC3-6 制备白果曲的同时也合成了大量的 GABA,赋予了白果曲以及后续酿造的白果醋富含 GABA 的特征。同时, *A. oryzae* SSC3-6 也具有分泌纤维素酶的能力,可以溶解破坏原料中植物细胞壁,使植物细胞中的黄酮和萜内酯等活性成分更加充分地释放至胞外,溶解在白果醋液中。由此可见,米曲霉菌株 *A. oryzae* SSC3-6 凭借其优秀的酶分泌能力可以使酿造的白果醋保持较高的活性成分。

4 结论

本研究从自然发酵的豆酱块中分离到 13 株曲霉属菌株。经过显微形态学、AFPA 产毒培养基菌落形态、*alfM* 产毒基因、免疫酶联检测等多相分类学方法,鉴定得到米曲霉菌株 6 株。其中,菌株 *A. oryzae* SSC3-6 菌丝生长快速,制白果曲时菌丝覆盖效果好,在 6 株米曲霉菌株中淀粉酶、糖化酶和纤维素酶活力最高。与酶解白果醋相比较,以菌株 *A. oryzae* SSC3-6 制备白果曲并酿造的白果醋具有成醋速度快、醋液 MPN 含量低、富含 GABA、保留黄酮和萜内酯等活性成分的特征,解决了酶解白果醋 MPN 含量高、活性物质保留量低的缺点。同时,米曲白果醋还具有更高的感官评价得分,尤其是醋香和白果香气明显,回味较为甘甜。米曲霉的发酵使白果醋苦涩风味、优势性明显的挥发性成分转化为更为多样、含量较低且平均的、以甘甜风味为主的挥发性物质,解决了白果醋苦涩口感的问题。本研究结果将为我国白果醋的酿造,以及白果资源的优质且无毒害的开发利用提供重要的参考。

参考文献

- [1] 吴瑞,钱允治.日用本草[M].北京:华夏出版社,1999.
- [2] 张彩虹,黄立新,谢普军,等.白果直链/支链淀粉的分离及性能研究[J].林产化学与工业,2017,37(4):103-109.
- [3] LIU X G, LU X, GAO W, et al. Structure, synthesis, biosynthesis, and activity of the characteristic compounds from *Ginkgo biloba* L [J]. Natural Product Reports, 2022, 39(3): 474-511.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编.上册[M].北京:人民卫生出版社,1975.
- [5] 于磊娟,张力,汪慧慧,等.银杏蓝莓复合果酒酿造工艺[J].食品工业,2020,41(10):17-20.
- [6] 李晨霞,向芷璇,李敬,等.米曲霉 β -半乳糖苷酶的定向进化、高效表达及应用[J].食品与生物技术学报,2022, 41(10):49-57.
- [7] ZHU L, MARUYAMA J, KITAMOTO K. Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption ($\Delta AosedD \Delta Aovps10$) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 6347-6357.
- [8] XIONG K, ZHI H, LIU J, et al. Detoxification of ochratoxin A by a novel *Aspergillus oryzae* strain and optimization of its biodegradation [J]. Revista Argentina de Microbiología, 2021, 53(1): 48-58.
- [9] WANG Y X, LEI Y, XU J H, et al. Applications of

- synthetic microbial consortia in biological control of mycotoxins and fungi [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2023, 53: 101074.
- [10] VARGA J, FRISVAD J C, SAMSON R A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi* [J]. *Studies in Mycology*, 2011, 69(1): 57-80.
- [11] GALLO A, STEA G AA, BATTILANI P, et al. Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2012, 51(1): 198-206.
- [12] 白飞荣,姚粟,凌空,等.黄曲霉和米曲霉的多相鉴定方法[J].*微生物学通报*,2018,45(1):215-226.
- [13] 路怀金,刘通讯,赵谋明,等.2株米曲霉的特色酶系对酱油理化指标及品质的影响[J].*中国食品学报*,2021,21(5): 230-237.
- [14] 邹敏敏.白果银杏毒的组织分布、贮藏加工变化及其酶催化脱除研究[D].南京:南京林业大学,2021.
- [15] TSUCHIYA K, NISHIMURA K, IWAHARA M. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(3): 283-287.
- [16] 余圆圆.白果毒/效成分及白果对阿尔兹海默病的干预作用研究[D].镇江:江苏大学,2017.
- [17] 郭雅娟,范军刚,李建珍.不同菌株发酵猕猴桃果醋中的香气成分分析[J].*中国调味品*,2023,48(7):181-185.
- [18] 刘庆双,杨晓宽.板栗醋发酵工艺优化及挥发性成分分析[J].*食品研究与开发*,2024,45(3):163-173.
- [19] GUO W, CHEN M, CUI S, et al. Effects of *Lactobacillus casei* fermentation on the bioactive compounds, volatile and non-volatile compounds, and physiological properties of barley beverage [J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102695.
- [20] YANG J, SUN Y, CHEN J, et al. Fermentation of *Ginkgo biloba* kernel juice using *Lactobacillus plantarum* Y2 from the ginkgo peel: Fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles, antioxidant activities *in vitro*, and volatile flavor compounds [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1025080.
- [21] CHEN C, CHEN F. Study on the conditions to brew rice vinegar with high content of γ -amino butyric acid by response surface methodology [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2009, 87(4): 334-340.
- [22] 赵丽,刘丽萍,刘建军.银杏果酒发酵条件的研究[J].*酿酒科技*,2014,6:87-90.
- [23] 郭慧敏,何杉杉,卢艳,等.银杏酒成分分析及品质鉴定[J].*中国酿造*,2018,37(12):57-60.
- [24] KITAMOTO K. Molecular biology of the Koji molds [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2002, 51: 129-154.
- [25] DABA G M, MOSTAFA F A, ELKHATEEB W A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 52.
- [26] HAYAKAWA Y, ISHIKAWA E, SHOJI J, et al. Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(1): 40-55.
- [27] 李园园.米曲霉产淀粉酶和纤维素酶的初步研究[D].天津:天津科技大学,2012.
- [28] GAO X, ZHAO H, FENG Y, et al. A comparative study on physicochemical properties of Chinese-type soy sauces prepared using pure koji and mixed kojis [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(40): 6740-6747.
- [29] 徐宁,孙娟,赵丽云,等.淀粉原料对酱油制曲酶系的影响研究[J].*中国酿造*,2011,11:79-82.
- [30] LIU G, ZHAO Y L, HE F, et al. Structure-guided insights into heterocyclic ring-cleavage catalysis of the non-heme Fe (II) dioxygenase NicX [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1301.
- [31] LI J, HUANG Y, HOU Y, et al. Novel gene clusters and metabolic pathway involved in 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degradation by *Ralstonia* sp. strain T6 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7445-7453.
- [32] HORI Y, FUJISAWA M, SHIMADA K, et al. Rapid analysis of 4-O-methylpyridoxine in the serum of patients with *Ginkgo biloba* seed poisoning by ion-pair high-performance liquid chromatography [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(4): 486-491.
- [33] 李冬龙.富含 γ -氨基丁酸豆酱制备及品质评价[D].南宁:广西大学,2020.
- [34] 林杨,唐琦勇,楚敏,等. γ -氨基丁酸的功能、生产及食品应用研究进展[J].*中国调味品*,2021,46(6):173-179.