

Doi:10.20062/j.cnki.CN 37-1453/N.2024.04.008

基于水解酶系均衡的米曲霉菌种复壮选育和诱变育种研究

范梦雪¹,贾玉晗¹,王玉芳²,陈卫卫¹,曲冠云³,王新杰³,程仕伟¹

(1.鲁东大学 a.生命科学学院;b.烟台市生物发酵与分离工程实验室,山东 烟台 264039;2.烟台职业学院,山东 烟台 264670;
3.山东食圣酿造食品有限公司,山东 烟台 261411)

摘要:针对米曲霉菌种在工业酿造过程中出现自发突变导致菌种衰退的问题,本研究以生产用米曲霉菌种 X3042 和 JN1 为研究对象,通过分纯单菌落并经固态发酵后测定其水解酶系活力的方法,复壮选育获得菌株 X3042-4 和 JN1-3。酶活测定结果显示,X3042-4 的蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶活力较初始菌株 X3032 分别增加了 22.37%、10.91%、15.23%和 27.71%,而 JN1-3 与初始菌株 JN1 相比分别增加了 10.71%、2.88%、7.81%和 7.17%。针对复壮菌株的淀粉酶活力偏低问题,紫外诱变选育出菌株 JN1-3-4,其淀粉酶活力是初始菌株 JN1-3 的 2.69 倍,并且蛋白酶、纤维素和脂肪酶活力也有不同程度的增加。本研究为工厂用发酵菌种的复壮选育和诱变育种提供了技术参考。

关键词:米曲霉;菌种复壮;诱变育种;发酵培养;水解酶系

中图分类号:Q939.97 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-8020(2024)04-0354-06

米曲霉是酱油酿造的关键菌种^[1],其在制曲原料上增殖的过程中可分泌酿造所需的各种酶类,如蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶、脂肪酶等,其中最主要的酶为蛋白酶,其次是淀粉酶/糖化酶^[2]。米曲霉在酱油酿造的制曲过程和发酵前期起着决定性作用,可利用碳源(如淀粉、糖类、有机酸和醇类)和氮源(如豆粕、大豆蛋白),将原料中的大分子物质转化为小分子成分,产生一系列的风味产物和营养物质,如氨基酸、蛋白肽、醇类、醛类和有机酸等,提升产品的营养价值^[3-5]。

米曲霉菌种质量决定了发酵生产效率和酿造产品质量,与发酵原料利用率、营养组分生成率直接相关,决定发酵成熟速度和成品酱油质量^[6-7]。因此,在工厂化酱油酿造生产过程中,保持米曲霉菌种的水解酶系均衡且具高酶活力,使其始终处于满足工厂酿造生产需求,就显得尤为重要^[8]。

在实际酿造生产中,由于米曲霉菌种的长时间使用、传代次数频繁以及技术人员操作不当造成杂菌污染等原因,经常会引起菌种衰退,导致菌种的水解酶活力降低、原有形态性状不典型、生长变慢、产孢量少、抵抗杂菌污染能力降低等不利因

素,进而影响生产能力和产品质量^[9-11]。考虑菌种自发突变是培养过程不可避免的因素,米曲霉作为重要的丝状真菌菌种也极易引起退化,从酿造生产高效运行的角度考虑,也需要定期进行菌种复壮选育,以选育高活力的米曲霉菌种来保障酿造生产正常运行^[12]。此外,诱变育种作为提高菌种性能的有力技术手段,通过正向变异的菌种选育,可进一步提升米曲霉菌种的发酵效能^[11]。

基于此,本研究通过对酿造生产用米曲霉菌种 X3042 和 JN1 分纯复壮,测定所产水解酶活力,分析其复壮效果,并经紫外诱变提升菌种的特定水解酶活力,为行业技术人员从源头出发提高米曲霉菌种质量来保障酿造生产运行提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) X3042 和 JN1,均由山东食圣酿造食品有限公司提供,其中菌种

收稿日期:2024-06-10;修回日期:2024-08-29

基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021LZGC023);烟台市科技计划发展项目(2022YT06000330)

通信作者简介:程仕伟(1976—),男,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向为微生物资源利用。E-mail:swbiotech@yeah.net

X3042 是由 3042 变种而来,菌种 JN1 为自主选育的米曲霉菌种。

1.2 培养基

复壮培养基(% ,质量体积比):马铃薯淀粉 0.5,葡萄糖 2,琼脂 1.8;pH 值 5.6。

发酵培养基(% ,质量分数):豆粕 38,面粉 11,麸皮 6,含水量 45;pH 值 6.8。

选择培养基(% ,质量体积比):玉米淀粉 2, NaNO_3 0.2, K_2HPO_4 0.1, KCl 0.05, MgSO_4 0.05, FeSO_4 0.001,琼脂 2;pH 值 6.8。

1.3 分纯复壮

挑取米曲霉 X3042 和 JN1 的孢子粉,用无菌水稀释涂布于复壮培养基平板,28 ℃ 恒温培养至长出白色丝状的单菌落,继续培养 2~3 d 后成熟至长出绿色孢子。从米曲霉 X3042 和 JN1 的培养平板中各选取生长良好、孢子旺盛的 6 个单菌落,自表层挑取孢子后转接试管斜面保藏备用。

1.4 发酵培养

米曲霉 X3042 和 JN1 分纯后保藏菌种,挑取 1 环后转接发酵培养基,28 ℃ 下静置培养 72 h。发酵产物用无菌水稀释,充分摇匀后,用双层尼龙布过滤,滤液在 6 ℃ 下 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后,取上清液测定其水解酶活力。

1.5 酶活测定

上清酶液用于测定酶活力,并按照稀释比折算为固体培养曲种的酶活力($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$),每组数据测定三次并取其均值。蛋白酶活力采用中华人民共和国国家标准 GB/T 28715—2012 测定^[13],以在 pH 值 6.8、40 ℃ 反应条件下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需酶量为 1 个酶活单位。纤维素酶活力依照中华人民共和国农业农村部行业标准 NY/T 912—2020 测定^[14],以在 pH 值 7.5、50 ℃ 反应条件下每分钟水解羧甲基纤维素产生 1 μg 葡萄糖所需酶量为 1 个酶活单位。淀粉酶活力采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 比色法测定^[15],以在 pH 值 7.0、60 ℃ 反应条件下每分钟水解可溶性淀粉产生 1 μg 麦芽糖所需酶量为 1 个酶活单位。脂肪酶活力参照中华人民共和国国家标准 GB/T 23535—2009 测定^[16],以 1 g 固体发酵料在 pH 值 7.2、40 ℃ 反应条件下水解橄榄油

底物产生 1 μmol 可滴定脂肪酸为 1 个酶活单位。

1.6 紫外诱变

选取待诱变处理的米曲霉 JN-1-3,取 3 mL 孢子悬液($10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)注入直径为 6 cm 的培养皿中(内含无菌搅棒),置于磁力搅拌器上,在距离 30 W 紫外灯 30 cm 处搅拌并照射 30、60、90、120、150、180 s,所有处理的孢子悬浮液梯度稀释后吸取 0.1 mL 涂布于选择培养基平板,28 ℃ 恒温避光培养 4.5 d。挑选淀粉水解圈直径与菌落直径比值大的诱变菌株,接种于发酵培养基并在 28 ℃ 培养 72 h,测其水解酶活力。

2 结果与分析

2.1 米曲霉 X3042 分纯复壮

米曲霉 X3042 分纯后的水解酶活力测定结果见图 1。米曲霉 X3042 分纯后得到 6 株菌,以 X3042-5 的蛋白酶活力最高($266.91 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),其次是 X3042-4 ($239.12 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 X3042-3 ($205.11 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),而 X3042-1、X3042-2、X3042-6 的蛋白酶活力低于初始菌株 X3042 ($195.40 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。分纯后 6 株菌的纤维素酶活力均高于初始菌株 X3042 ($11.37 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),其中 X3042-3 最高 ($28.23 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),其次是 X3042-2 ($23.07 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。淀粉酶活力以 X3042-4 和 X3042-1 最高,分别为 $24.33 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $21.78 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,其余菌株均低于初始菌株 X3042 ($20.62 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。分纯后 6 株菌经固态发酵后的脂肪酶活力差别较为显著,以菌株 X3042-4 为最高 ($5.90 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),其余 5 株菌均低于初始菌株 X3042 ($4.62 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),其中 X3042-2 的脂肪酶活力仅为 $0.80 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 米曲霉 JN1 分纯复壮

米曲霉 JN1 分纯后的水解酶活力测定结果见图 2。米曲霉 JN1 分纯后 6 株菌中以 JN1-3 的蛋白酶活力最高,为 $227.78 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,而其余 5 株菌的蛋白酶活力均低于初始菌株 JN1 ($205.75 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。分纯后 6 株菌的纤维素酶活力均高于初始菌株 JN1 ($2.78 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),除菌株 JN1-3 偏低 ($2.86 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) 外,其余菌株均显著高于初始菌株 JN1,其中菌株 JN1-2 的纤维素酶活力 ($30.25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) 为初始菌株 JN1 的 10.88 倍。与初始菌株 JN1 的淀粉酶活

力($19.12 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)相比,菌株 JN1-2、JN1-3、JN1-4 的淀粉酶活力较高,分别为 21.16 、 20.74 和 $21.17 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。分纯后,经固态发酵后的 6 株菌

脂肪酶活力差别也相对较大,除 JN1-3 的脂肪酶活力较高($3.29 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)外,其余菌株均低于初始菌株 JN1($3.07 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。

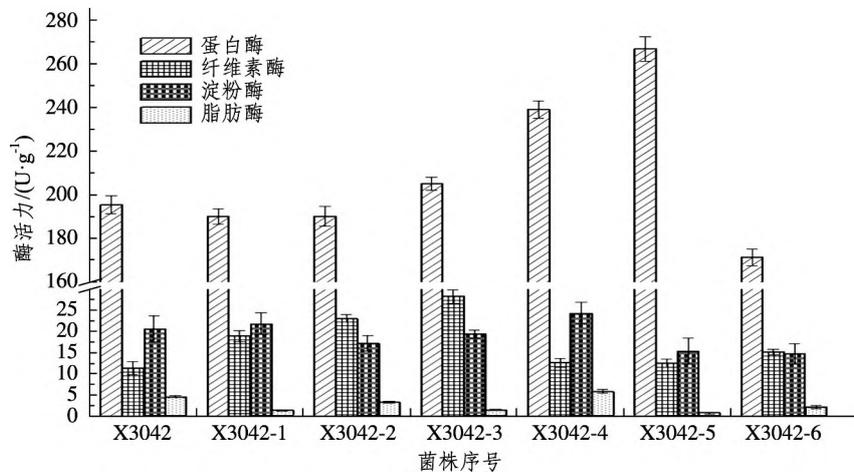


图 1 米曲霉 X3042 分纯菌株的水解酶活力

Fig.1 Hydrolase activity of purified strains from *A. oryzae* X3042

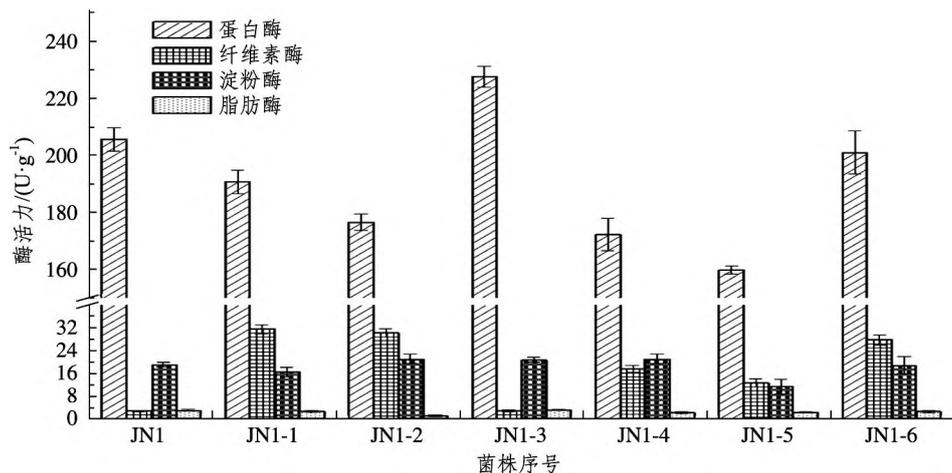


图 2 米曲霉 JN1 分纯菌株的水解酶活力

Fig.2 Hydrolase activity of purified strains from *A. oryzae* JN1

2.3 菌种复壮选育

酱油生产主要以豆粕和小麦为发酵原料,在酿造过程中利用米曲霉所产蛋白酶和淀粉酶将豆粕和小麦中的蛋白和淀粉降解为可利用的发酵基料,并在此过程中产生复杂的香气化合物,从而赋予酱油产品的特殊风味^[17-19]。因此,衡量米曲霉菌种优劣的最重要酶活指标是蛋白酶活力^[20],其次是淀粉酶^[21]。对于纤维素酶和脂肪酶,则是衡量米曲霉菌种优劣的从属酶活指标^[22-23]。

根据米曲霉 X3042 分纯复壮的菌株经固态发酵后的水解酶活力测定结果,X3042-4 的蛋白

酶、淀粉酶和脂肪酶活力都相对较高,分别为 239.12 、 24.33 和 $5.90 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,除 X3042-4 所产蛋白酶活力略低于 X3042-5($266.91 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)外,其淀粉酶和脂肪酶是所选育 6 株菌中活力最高的,且也有一定的纤维素酶活力($12.61 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) (表 1)。米曲霉 JN1 分纯复壮的菌株中,JN1-3 的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活力都相对较高,分别为 227.78 、 21.17 和 $3.29 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,且 JN1-3 所产蛋白酶和脂肪酶活力是所选育 6 株菌中活力最高的(表 2)。因此,综合考虑水解酶活力高且酶系均衡的原则,所选育的米曲霉 X3042-4 和 JN1-3 是适合工业发酵应用的菌种。

表1 米曲霉 X3042-4 与初始菌种 X3042 的水解酶活力比较

Tab.1 Comparison of hydrolase activity between *A.oryzae* X3042-4 and the starting strain X3042

水解酶	酶活力/(U·g ⁻¹)		提升率/%
	<i>A.oryzae</i> X3042	<i>A.oryzae</i> X3042-4	
蛋白酶	195.40±4.03	239.12±3.97**	22.37
纤维素酶	11.37±1.54	12.61±1.09*	10.91
淀粉酶	20.62±3.01	24.33±2.52*	15.23
脂肪酶	4.62±0.22	5.90±0.38**	27.71

注:**表示复壮选育前后差异极显著(P<0.01),*表示复壮选育前后差异显著(P<0.05)

表2 米曲霉 JN1-3 与初始菌种 JN1 的水解酶活力比较

Tab.2 Comparison of hydrolase activity between *A.oryzae* JN1-3 and the starting strain JN1

水解酶	酶活力/(U·g ⁻¹)		提升率/%
	<i>A.oryzae</i> JN1	<i>A.oryzae</i> JN1-3	
蛋白酶	205.75±4.15	227.78±3.69*	10.71
纤维素酶	2.78±0.19	2.86±0.31	2.88
淀粉酶	19.12±0.73	20.74±0.88*	7.81
脂肪酶	3.07±0.29	3.29±0.15*	7.17

注:**表示复壮选育前后差异极显著(P<0.01),*表示复壮选育前后差异显著(P<0.05)

米曲霉 X3042-4 的水解酶活力与初始菌种 X3042 相比,其蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶活力分别增加了 22.37%、10.91%、15.23% 和 27.71%(表 1),复壮选育效果明显恰恰说明初始菌种 X3042 已经出现了菌种衰退,因此在工厂酿

造生产中要定期进行菌种复壮选育。复壮选育后菌株 JN1-3 较初始菌种 JN1 也有不同程度的水解酶活力增加,其蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶活力分别增加了 10.71%、2.88%、7.81% 和 7.17%(表 2),其水解酶活力增加幅度明显小于 X3042-4,说明初始菌种米曲霉 JN1 的衰退程度小于 X3042,但仍要定期复壮选育以保持菌种的最佳状态。

2.4 米曲霉 JN1-3 的紫外诱变选育

从米曲霉 X3042 和 JN1 的复壮选育结果可以看出,相对于蛋白酶活力,复壮选育菌株的淀粉酶活力偏低,为更好地提高酿造原料中的淀粉利用率,可通过诱变选育进一步提升菌种的淀粉酶活力^[24]。因米曲霉 X3042 已经过多轮次的诱变选育,故常规诱变很难再有效提升其酶活力^[25],而菌种 JN1 的诱变选育尚有较大酶活力提升空间。因此,选用米曲霉 JN1-3 进行紫外诱变,诱变后代表性菌株的淀粉酶活力值见图 3。诱变选育后菌株的淀粉酶活力均有大幅度提升,其中菌株 JN1-3-4 的淀粉酶活力(55.87 U·g⁻¹)最高,为出发菌株 JN1-3 的 2.69 倍。此外,诱变选育后菌株 JN1-3-4 的蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶活力也有不同程度的增加,分别为 235.65、7.24、3.71 U·g⁻¹,分别提升了 3.46%、153.15%、12.77%。

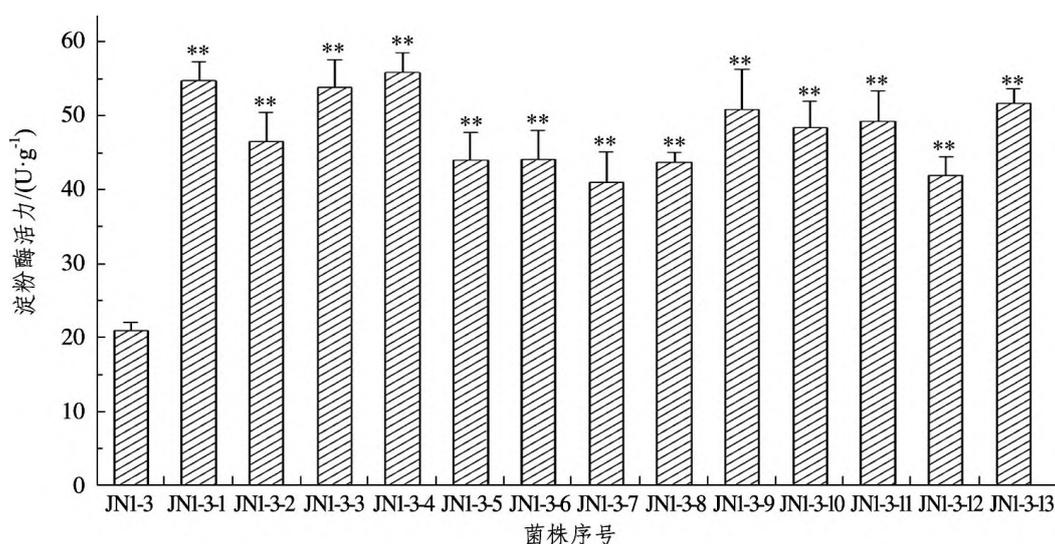


图3 米曲霉 JN1-3 紫外诱变后代表性菌株的淀粉酶活力

Fig.3 Amylase activity of representative strains after UV mutagenesis of *A.oryzae* JN 1-3

3 结论

本研究通过对酱油酿造工厂用米曲霉菌种 X3042 和 JN1 分纯复壮选育,测定其固态发酵后的水解酶活力,确定米曲霉 X3042-4 和 JN1-3 是适合工业发酵生产应用的菌种。米曲霉 X3042-4 的蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶活力,与初始菌株 X3042 相比分别增加了 22.37%、10.91%、15.23% 和 27.71%;米曲霉 JN1-3 的蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶活力较初始菌株 JN1 分别增加了 10.71%、2.88%、7.81% 和 7.17%。针对复壮选育菌种的淀粉酶活力与蛋白酶活力相比不突出的问题,采用紫外诱变处理米曲霉 JN1-3,诱变后菌种的淀粉酶活力均有显著提高,以 JN1-3-4 的诱变效果最突出,其淀粉酶活力为出发菌株 JN1-3 的 2.69 倍,且其蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶的酶活力也有不同程度的提高。

参考文献:

- [1] HU W K, LIU Z P, FU B, et al. Metabolites of the soy sauce Koji making with *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2022, 57(1): 301-309.
- [2] ZHANG X L, LIU Z P, KANG B, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* or *Enterococcus faecalis* as co-inoculants with *Aspergillus oryzae* in Koji making on the physicochemical properties of soy sauce [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(2): 714-727.
- [3] LI J Y, SUN C G, SHEN Z Y, et al. Untargeted metabolomic profiling of *Aspergillus sojae* 3.495 and *Aspergillus oryzae* 3.042 fermented soy sauce Koji and effect on moromi fermentation flavor [J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 184: 115027.
- [4] TAN G, HU M, LI X L, et al. Microbial community and metabolite dynamics during soy sauce Koji making [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 841529.
- [5] CHOI J, KWON T, PARK Y, et al. Characteristics of Koji using liquid starter for soy sauce production [J]. Fermentation-Basel, 2023, 9(11): 979.
- [6] SHAN P, HO C T, ZHANG L, et al. Degradation mechanism of soybean protein B3 subunit catalyzed by prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* during soy sauce fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(19): 5869-5878.
- [7] GAO X L, ZHAO X, HU F, et al. The latest advances on soy sauce research in the past decade: emphasis on the advances in China [J]. Food Research International, 2023, 173(2): 113407.
- [8] MATSUZAWA T. Plant polysaccharide degradation-related enzymes in *Aspergillus oryzae* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2024, 88(3): 276-282.
- [9] LIN S F, JIANG H, FU Q Q, et al. Effects of pulsed light on mycelium growth and conidiation in *Aspergillus oryzae* [J]. Fermentation-Basel, 2023, 9(7): 674.
- [10] 李雪玲, 颜喆, 胡文锋. 酱油酿造优良米曲霉菌株的高效选育 [J]. 中国调味品, 2021, 46(8): 20-23.
- [11] 范梦雪, 王璐瑶, 陈卫卫, 等. 酿造用米曲霉菌种选育的研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(5): 346-354.
- [12] ZHAO C, ZHANG Y X, LI S S, et al. Impacts of *Aspergillus oryzae* 3.042 on the flavor formation pathway in Cantonese soy sauce Koji [J]. Food Chemistry, 2024, 41: 138396.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定-分光光度计: GB/T 28715—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [14] 中华人民共和国农业农村部. 饲料纤维素酶活力的测定-分光光度计法: NY/T 912—2020 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [15] 陈伟峰, 刘雨星, 田润刚. 黄曲酿造中的麦曲淀粉酶活力影响因素分析 [J]. 中国酒, 2022, 8: 60-67.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 脂肪酶制剂: GB/T 23535—2009 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [17] WEN L F, LEI J P, YANG L X, et al. Metagenomics and untargeted metabolomics analyses to unravel the formation mechanism of characteristic metabolites in Cantonese soy sauce during different fermentation stages [J]. Food Research International, 2024, 181: 114116.
- [18] 冯云子, 周婷, 吴伟宇, 等. 酱油风味与功能性成分研究进展 [J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(4): 14-28.
- [19] CHEN C, WEN L F, YANG L X, et al. Metagenomic and metaproteomic analyses of microbial amino acid metabolism during Cantonese soy sauce fermentation [J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1271648.
- [20] CHEN C F, HOU S, WU C Z, et al. Improving protein utilization and fermentation quality of soy sauce by adding protease [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 121: 105399.
- [21] SIDDALINGESHWAR K G, SUDIPTA K M, CHETAN

- H, et al. Optimization of fermentation parameters for amylase synthesis from *Aspergillus oryzae* through submerged fermentation [J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2010, 4(2): 767-771.
- [22] DING C F, MENG M, JIANG Y Y, et al. Improvement of the quality of soy sauce by reducing enzyme activity in *Aspergillus oryzae* [J]. Food Chemistry, 2019, 292: 81-89.
- [23] SUZUKI S, OHMORI H, HAYASHIDA S, et al. Lipase and protease activities in Koji cheeses surface-ripened with *Aspergillus* strains [J]. Food Science and Technology Research, 2021, 27(3): 543-549.
- [24] ABDULLAH R, IKRAM H. Purification and characterization of α -amylase produced by mutant strain of *Aspergillus oryzae* EMS-18 [J]. Natural Product Research, 2015, 29(8): 710-716.
- [25] 邵伟,熊泽,唐明. 沪酿3.042米曲霉菌种诱变育种研究[J]. 中国调味品, 2006, 3: 21-24.

Rejuvenation and Mutation Breeding of *Aspergillus oryzae* Based on Hydrolase Series Balanced

FAN Mengxue¹, JIA Yuhan¹, WANG Yufang², CHEN Weiwei¹, QU Guanyun³, WANG Xinjie³, CHENG Shiwei¹

(1. a. Yantai Engineering Laboratory of Biological Fermentation and Separation; b. School of Life Sciences; Ludong University, Yantai 264039, China; 2. Yantai Vocational College, Yantai 264670, China; 3. Shandong Seasir Brewing Food Co., Ltd., Yantai 261411, China)

Abstract: Aiming at the problem of spontaneous mutation of *Aspergillus oryzae* in the process of industrial brewing, *A. oryzae* X3042 and JN1 that used commonly in factories was studied in this paper. The hydrolase activity was determined after separating pure single colony and solid fermentation culture, and then the new strains of X3042-4 and JN1-3 were selected by rejuvenation. The protease, cellulase, amylase and lipase activity of *A. oryzae* X3042-4 increased 22.37%, 10.91%, 15.23% and 27.71% respectively compared with the initial strain *A. oryzae* X3042, and the protease, cellulase, amylase and lipase activity of *A. oryzae* JN1-3 increased 10.71%, 2.88%, 7.81% and 7.17% respectively compared with the initial strain *A. oryzae* JN1. In addition, due to the amylase activity is slightly low, the new strain of *A. oryzae* JN1-3-4 was obtained by ultraviolet mutagenesis, and the amylase activity was 2.69 times that of initial strain JN1-3. Furthermore, the protease, cellulase and lipase activity also had a certain increase. This study provided a technical reference about rejuvenation and mutation breeding of fermentation strains.

Keywords: *Aspergillus oryzae*; rejuvenation; mutation breeding; fermental cultivation; hydrolase series

(责任编辑 李维卫)