

刘延波, 张丽婷, 赵志军, 等. 赊店老酒大曲中耐高温霉菌的筛选与产酶条件优化. [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(5): 268–275.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.053

# 赊店老酒大曲中耐高温霉菌的筛选与产酶条件优化

刘延波<sup>1,2</sup>, 张丽婷<sup>1,2</sup>, 赵志军<sup>1,2</sup>, 王 贤<sup>3</sup>, 孙西玉<sup>1,2,4</sup>, 潘春梅<sup>1,2</sup>

[1. 河南牧业经济学院食品与生物工程学院(酒业学院), 河南郑州 450046; 2. 河南牧业经济学院河南省白酒风格工程技术研究中心, 河南郑州 450046; 3. 赊店老酒股份有限公司, 河南社旗 473300; 4. 张弓老酒酒业有限公司, 河南宁陵 476733]

**摘要:**从赊店老酒大曲中分离筛选得到 1 株在 60 ℃ 仍能生长的霉菌, 将其命名为 B8。对该菌株进行菌落形态观察和种属鉴定, 确定其为根霉菌(*Rhizopus*), 最适生长温度为 45 ℃。以该菌株为出发菌株, 通过单因素试验测定其糖化酶活力和液化酶活力, 结合响应面分析法优化其培养条件, 测得其糖化酶活力在料水比为 5 g : 3 mL、氮源添加量为 0.4%、培养时间为 5 d 时最高, 经试验验证酶活力达到 162.38 U/g, 与预测值基本接近; 液化酶活力在料水比为 5 g : 3 mL、氮源添加量为 0.4%、培养时间为 5 d 时最高, 经试验验证酶活力达到 41.57 U/g, 与预测值基本接近。

**关键词:**赊店老酒; 大曲; 霉菌; 耐高温; 液化酶; 糖化酶; 响应面回归方程; 产酶条件

**中图分类号:** S182; TS262.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0268-08

白酒的产量与品质主要取决于大曲中微生物的协同参与作用<sup>[1-2]</sup>, 而在大曲的真菌群落中, 霉菌是很重要的一类微生物<sup>[3]</sup>。一方面, 霉菌为其他微生物提供生长因子; 另一方面, 霉菌产生的淀粉酶对白酒酿造有至关重要的作用<sup>[4-5]</sup>。淀粉酶主要包括液化酶和糖化酶, 对淀粉的水解能力极强<sup>[6-8]</sup>。

在制曲过程中, 中高温大曲温度达到 60 ℃ 以上时, 将大量耐热性差的微生物淘汰, 相当于一个富集嗜热菌的过程<sup>[9]</sup>。而嗜热功能霉菌对白酒的风味起着重要的作用, 具有重要的研究价值<sup>[10]</sup>。目前关于白酒大曲中耐高温细菌的研究较多, 如葛媛媛等从高温大曲中筛选出 85 株可以耐受 55 ℃ 温度的嗜热细菌<sup>[11]</sup>, 周瑞平等从偏高温大曲中筛选出可耐受 72 ℃ 高温的嗜热细菌<sup>[12]</sup>; 而对浓香型白酒中高温大曲中耐高温霉菌的研究较少。因此, 本研究以赊店老酒的中高温大曲为试验材料筛选得到耐高温霉菌, 并对其产酶条件进行研究, 以期揭示制曲过程和酿酒规律, 为后期运用优势菌优化白酒生产

工艺、提高白酒出酒率提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 材料和试剂 试验材料: 赊店老酒股份有限公司的中高温大曲。

培养基: PDA(马铃薯琼脂培养基); 孟加拉红培养基; 麸皮培养基。

0.2 mol/L 醋酸缓冲液: 称取乙酸钠 13.4 g, 以蒸馏水溶解, 加入冰醋酸 5.2 mL, 定容于 1 000 mL 容量瓶中, 摇匀, pH 值 4.6。

2% 可溶性淀粉: 称取 2 g 淀粉, 加入少量煮沸后的蒸馏水调成糊状, 再加入约 50 mL 煮沸的蒸馏水, 搅拌均匀, 再煮沸 1 min, 冷却, 加入 10 mL 0.2 mol/L 乙酸缓冲液, 于容量瓶中定容至 100 mL。

DNS 试剂: 称取 3,5-二硝基水杨酸 10 g, 置于约 600 mL 水中, 逐渐加入 NaOH 10 g, 在 50 ℃ 水浴锅中搅拌溶解, 再依次加入酒石酸钾钠 200 g、苯酚 2 g、无水亚硫酸钠 5 g, 待全部溶解并澄清后, 冷却至室温, 用水定容至 1 000 mL, 过滤。贮存于棕色试剂瓶中, 于暗处放置 7 d 后使用。

工作碘液: 500 mg I<sub>2</sub> 和 5 g KI 溶于 100 mL 水中, 即为贮藏碘液, 取 1 mL 贮藏碘液稀释至 100 mL 即为工作碘液。

1.1.2 仪器和设备 SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司); 752 型紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); 水浴

收稿日期: 2019-02-13

基金项目: 河南牧业经济学院青年科研创新基金(编号: XKYCXXJ2017015); 河南牧业经济学院博士科研启动资金; 河南省高等学校重点科研项目(编号: 17A180005); 河南省重大科技专项(编号: 181100211400); 河南牧业经济学院重点学科项目。

作者简介: 刘延波(1983—), 男, 博士, 讲师, 主要从事微生物学研究。E-mail: yanboliu@hnuhe.edu.cn。

通信作者: 潘春梅, 博士, 教授, 主要从事发酵工程研究。E-mail: sige518888@163.com。

锅(山东方科仪器有限公司);振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);GH-500ASB 型隔水式培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司);LDZX-50KBS 型高压灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 霉菌的分离纯化** 称取 10 g 大曲研磨,在无菌条件下加入到 90 mL 无菌水中,150 r/min 充分振荡 30 min。取上清液 1 mL 即为  $10^{-1}$  稀释度,加入 9 mL 的无菌水中制成  $10^{-2}$  稀释度,重复此步骤,直到稀释度为  $10^{-7}$ 。吸取各稀释度 100  $\mu$ L 涂布于已经凝固的 PDA 培养基上,1 个梯度做 3 个平行。30  $^{\circ}$ C 条件下培养 3~5 d,完成初步分离。将得到的菌株用平板划线法进行纯化,纯化 2~3 次即可得到纯菌落。镜检<sup>[13]</sup>,于孟加拉红斜面培养基试管中 4  $^{\circ}$ C 保藏。

**1.2.2 耐高温霉菌的筛选** 将保藏的霉菌分别接种到平板上,置于 28  $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h 后,缓慢将培养温度升高并将菌株继续转接,分别于 40、45、50、55、57、60  $^{\circ}$ C 温度下培养 3~5 d,直到获得最耐高温的菌株<sup>[14]</sup>。每株菌做 3 个平行。

**1.2.3 菌株 18S rDNA 分析**<sup>[15]</sup> 用 Ezup 柱式基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,真菌核糖体 rRNA 区通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 反应试剂:SanTaq PCR Mix 预混液、ddH<sub>2</sub>O、marker,生工生物工程(上海)股份有限公司。真菌核糖体扩增引物为通用引物对 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。反应体系为 50  $\mu$ L (SanTaq PCR Mix 预混液 25  $\mu$ L,引物各 2  $\mu$ L,DNA 模板 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L)。

PCR 扩增条件:94  $^{\circ}$ C 6 min;94  $^{\circ}$ C 45 s,53  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 120 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 3  $\mu$ L PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产量和特异性,PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,然后在 NCBI 上通过 BLAST 程序进行同源性比较与分析。采用 MEGA 6.0 软件作系统发育树。

## 1.2.4 酶活的测定方法

**1.2.4.1 液化酶活力:YOO 改良法**<sup>[16]</sup> 酶活力定义:于 40  $^{\circ}$ C 下,5 min 内水解 1 mg 淀粉(0.5% 淀粉)的酶量为 1 个活力单位,以“U/g”表示。

**1.2.4.2 糖化酶活力:DNS 法**<sup>[17]</sup> 葡萄糖标准曲线如图 1 所示。

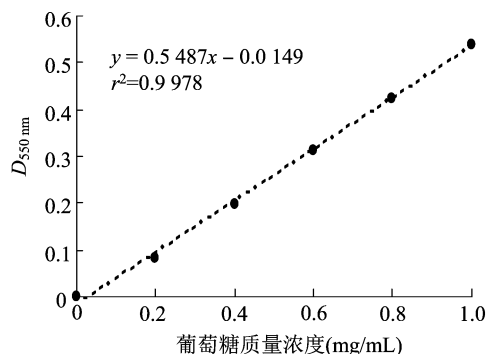


图1 葡萄糖标准曲线

酶活力定义:于 40  $^{\circ}$ C 下、pH 值为 4.6 的条件下,每 1 h 水解淀粉产生 1 mg 葡萄糖作为 1 个酶活力单位,以“U/g”表示。

## 1.2.5 耐高温霉菌的产酶条件优化

**1.2.5.1 不同料水比对菌株酶活的影响** 以麸皮和不同水分混合制成麸曲,为菌株生长提供物质基础,菌株在不同料水比麸曲中培养其产酶活力也不同。选取分离得到的耐高温菌株,设置料水比为 5 g : 1 mL、5 g : 2 mL、5 g : 3 mL、5 g : 4 mL、5 g : 5 mL,将料水混合均匀<sup>[18]</sup>,配制好麸皮培养基以相同的量分装到三角瓶中,0.1 MPa 灭菌 20 min,冷却后接种,每隔 12 h 进行 1 次摇瓶,置于 45  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 4 d。干燥 10 h 后以 pH 值为 7.5 的磷酸缓冲溶液浸提 1 h 配制成粗酶液<sup>[19]</sup>,对其进行液化酶活力和糖化酶活力的测定。

**1.2.5.2 不同氮源添加量对菌株酶活力的影响** 在麸曲中加入 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 不仅为菌株生长提供氮源,且对菌株生长环境中 pH 值也有一定的影响。因此本试验选取 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为氮源,分别以 0.1%、0.4%、0.7%、1.0%、1.3% 进行试验<sup>[20]</sup>,以最适料水比配制麸皮培养基,并以相同的量分装到三角瓶中,0.1 MPa 灭菌 20 min,冷却后接种,每隔 12 h 进行 1 次摇瓶,置于 45  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 4 d,干燥 10 h 后以 pH 值为 7.5 的磷酸缓冲溶液浸提 1 h 配制成粗酶液,对其进行液化酶活力和糖化酶活力的测定。

**1.2.5.3 不同培养时间对菌株酶活的影响** 以最适料水比和最适氮源添加量配制麸皮培养基,并以相同的量分装到三角瓶中,0.1 MPa 灭菌 20 min,冷却后接种,每隔 12 h 进行 1 次摇瓶,置于 45  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养。培养后 3 d 开始取样测酶活,直到

培养后 7 d。

**1.2.6 响应面试验** 在前期单因素试验的基础上选取 3 个影响因素,以酶活力为因变量,利用 DesignExpert 8.0.6 软件设计 Box - Behnken 试验,分别确定产糖化酶和液化酶的最佳发酵工艺参数组合并进行试验验证<sup>[21]</sup>。利用 Design - Expert 8.0.6 软件对二次响应面回归模型作出相应的响应曲面<sup>[22-23]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐高温菌株筛选结果

从陈店老酒大曲中分离筛选得到霉菌 200 株,通过耐高温试验最终获得 1 株霉菌 B8。B8 菌株在 60 ℃ 时仍能生长,且最适生长温度为 45 ℃。B8 菌株菌落形态如图 2 所示。

由图 2 可知,B8 菌株的菌落培养特征为:蔓延迅速,初为白色,后逐渐变为黑褐色,透明性差。菌丝无隔膜,假根发达,分枝呈指状,孢子囊呈球形或近球形。

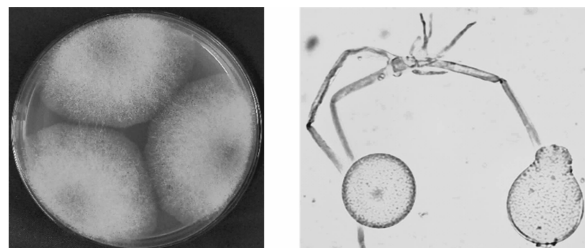


图2 B8 菌株菌落形态及镜检结果

### 2.2 分子生物学鉴定结果

利用特异性引物对 B8 的 18S rDNA 片段进行扩增,然后进行凝胶电泳。由图 3 可以看出,扩增所得 ITS 序列长度约为 574 bp,特异性好,与预期结果相符。

将所得 B8 菌株 574 bp ITS 序列在 NCBI 网站上通过 BLAST 程序进行同源性比较与分析。取与 B8 菌 ITS 序列一致性在 99% 以上的序列,用 MEGA 6.0 进行多序列比对并构建进化树,结果见图 4。结合生理生化试验表明菌株 B8 属于根霉属 (*Rhizopus*)。

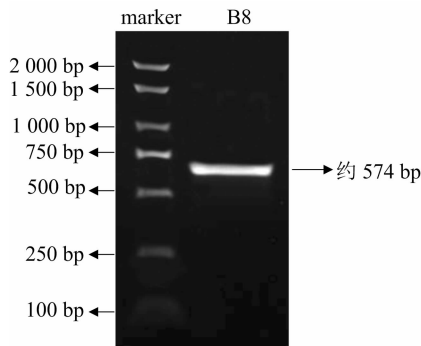


图3 B8 电泳结果

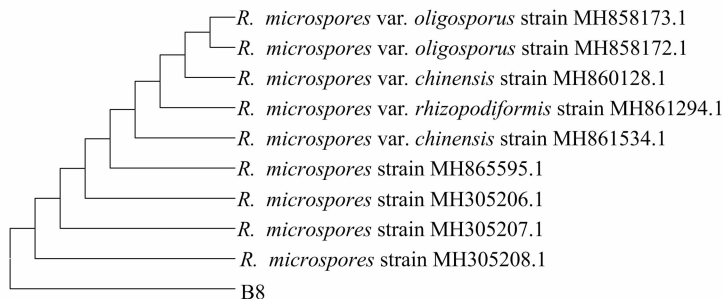


图4 B8 菌株 ITS 序列基因进化树

### 2.3 单因素条件优化结果

**2.3.1 不同料水比对菌株酶活的影响** 由图 5 可知,B8 产液化酶和糖化酶活力的能力具有同步性,都是随着水分的增多酶活力先慢慢升高再降低,即当水分含量过低或过高时,2 种酶活力都比较低,而当料水比为 5 g : 3 mL 时,2 种酶活力最高,此时液化酶活力达到 30.55 U/g,糖化酶活力达到 163.66 U/g。在制作麸曲中,水分是很重要的因素,过多或过少都会抑制菌株活力。因此,选择最佳料水比 5 g : 3 mL 做后续试验。

**2.3.2 不同氮源添加量对菌株酶活的影响** 由图 6 可知,液化酶活力和糖化酶活力随着添加量的增多而升高,当氮源添加量达 0.4% 时 2 种酶活都达到最大值,此时液化酶活力为 29.88 U/g,糖化酶活

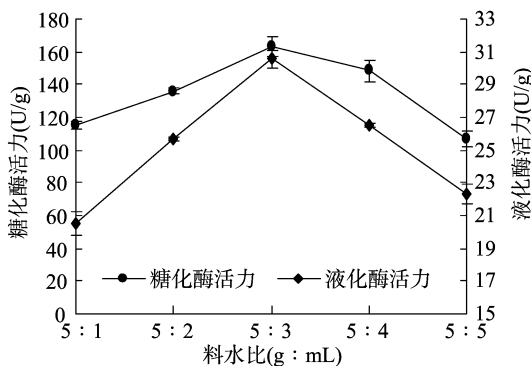


图5 不同料水比对产酶的影响

力为 142.34 U/g。之后随着添加量的增多,2 种酶活力都呈下降趋势,过量的氮源添加量会使 pH 值超过菌株的正常生长范围。因此,选择 0.4% 氮源为最佳添加量做后续试验。

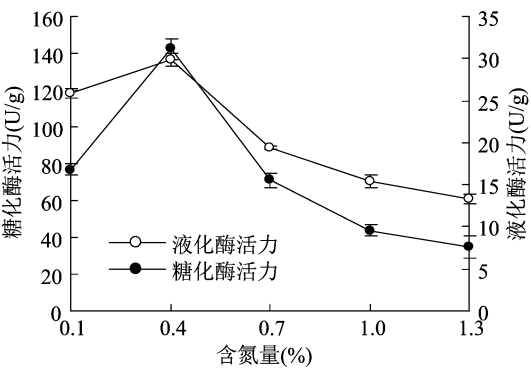


图6 不同氮源添加量对产酶的影响

2.3.3 不同培养时间对菌株酶活的影响 以料水比为 5 g : 3 mL,氮源添加量为 0.4% 制作麸曲培养基,灭菌冷却后接种,从培养后 3 d 开始测酶活。由图 7 可知,液化酶活力在培养后 3 ~ 5 d 呈上升趋势,培养后 5 d 达到酶活最大值,为 33.14 U/g;之后随着培养时间的增加、培养基内营养物质的消耗以及水分的减少,酶活力下降。糖化酶活力也是在培养后 3 ~ 5 d 逐渐上升,培养后 4 ~ 6 d 的酶活力相差甚小,分别是 172.23、175.51 U/g,培养后 5 d 酶活达到最大值;之后呈下降趋势。因此,最佳培养时间选择 5 d 做后续试验。

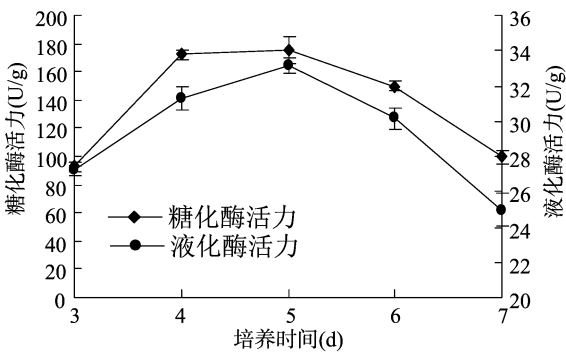


图7 不同培养时间对产酶的影响

2.4 糖化酶活力响应面试验结果

2.4.1 Box - Behnken 设计与结果 根据 Box - Behnken 试验设计原理<sup>[24]</sup>,设计 17 个试验点的响应面分析试验,以菌株的糖化酶活力作为响应值,选取 A 含水量(为了便于响应面分析数据的处理,料水比以下均采用水的百分含量表示,料水比 5 g : 2 mL、5 g : 3 mL、5 g : 4 mL 分别对应含水量 29%、38%、44%)、B 氮源添加量、C 培养时间 3 个具有显著影响的因素作为自变量,试验因素的水平选取:含水量 29%、38%、44%,氮源添加量 0.1%、0.4%、0.7%,培养时间 4、5、6 d,试验设计与结果如表 1 所示。

表 1 Box - Behnken 试验设计与结果

试验号	A:含水量 (%)	B:氮源添加量 (%)	C:培养时间 (d)	糖化酶活力 (U/g)
1	44	0.4	4	60.69
2	29	0.4	4	41.55
3	38	0.1	4	75.45
4	29	0.4	6	69.98
5	38	0.4	5	162.93
6	38	0.1	6	72.72
7	38	0.4	5	175.51
8	29	0.1	5	67.25
9	38	0.4	5	176.60
10	38	0.4	5	159.65
11	44	0.1	5	75.45
12	38	0.4	5	168.94
13	44	0.4	6	80.37
14	38	0.7	6	67.25
15	29	0.7	5	74.90
16	38	0.7	4	59.60
17	44	0.7	5	80.92

从方差分析结果(表 2)可以看出,回归模型  $F$  值为 43.890 0,且显著性检验为极显著,失拟项不显著( $P=0.182\ 3>0.05$ ),说明该模型可靠。

利用 Design - Expert 8.0.5 软件对表 2 数据进行回归拟合,得到糖比酶活力  $y$  对自变量  $A$  含水量、 $B$  氮源添加量、 $C$  培养时间的多元回归方程为: $y = 169.33 + 5.47A - 1.07B + 6.57C - 0.25AB - 1.82AC + 2.60BC - 50.45A^2 - 44.26B^2 - 55.74C^2$ 。

回归方程  $R^2 = 98.26\%$ ,说明响应值糖化酶活力的变化有 98.26% 来源于所选变量,即含水量、氮源添加量、培养时间。因此,回归方程能够较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该回归方程确定最佳培养条件。

2.4.2 各因素交互作用的响应面图 由回归模型绘制的响应面图见图 8 至图 10。

为求得糖化酶活力最佳发酵条件,对得到的回归拟合方程中的 3 个变量分别求一阶偏导数,组成方程组求解。所得结果即为最大酶活力时菌株 B8 所需最佳发酵条件,即  $A = 36.9\%$ 、 $B = 0.40\%$ 、 $C = 5.06$ 。为了便于操作,选择糖化酶活力最佳发酵条件为含水量 38%(即料水比 5 g : 3 mL)、氮源添加量 0.4%、培养时间 5 d。在此条件下理论预测最大酶活力为 169.674 U/g,试验的实际值为 162.38 U/g,与预测值基本接近,说明所建模型拟合良好且可靠。

表 2 响应面回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
模型	36 115.73	9	4 012.86	43.890 0	<0.000 1	**
A(含水量)	239.26	1	239.26	2.620 0	0.149 8	
B(氮源添加量)	9.16	1	9.16	0.100 0	0.760 9	
C(培养时间)	344.34	1	344.34	3.770 0	0.093 4	
AB	0.26	1	0.26	0.002 9	0.958 9	
AC	13.33	1	13.33	0.150 0	0.713 9	
BC	26.94	1	26.94	0.290 0	0.604 1	
A <sup>2</sup>	10 596.39	1	10 596.39	115.900 0	<0.000 1	**
B <sup>2</sup>	8 244.48	1	8 244.48	90.180 0	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	13 079.64	1	13 079.64	143.060 0	<0.000 1	**
残差	639.99	7	91.43			
失拟项	518.92	4	129.73	3.210 0	0.182 3	
误差项	121.07	3	40.36			
总和	36 755.73	16				

注：\*、\*\* 分别表示差异显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ )。表 4 同。

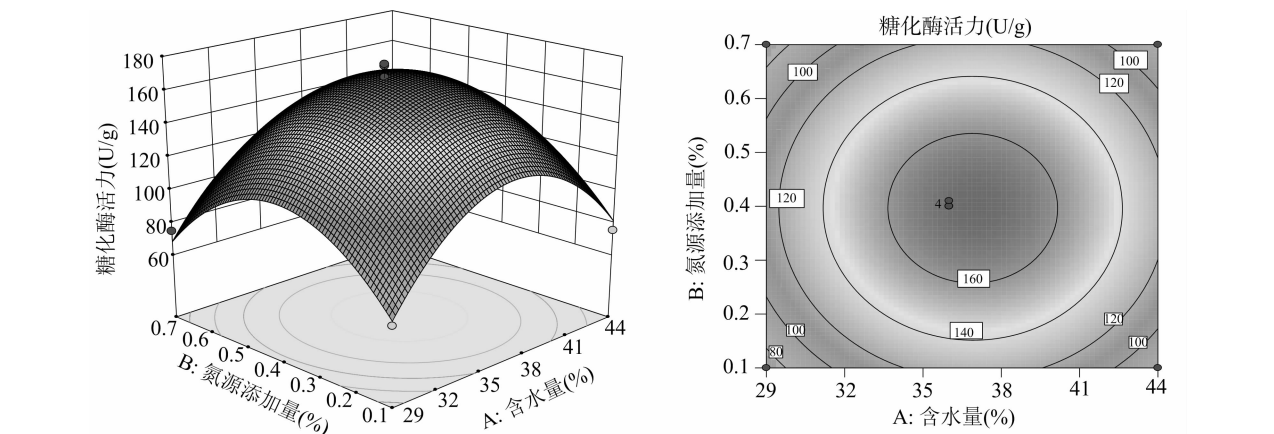


图8 糖化酶活力变量 A 和 B 相互作用的响应面和等高线图

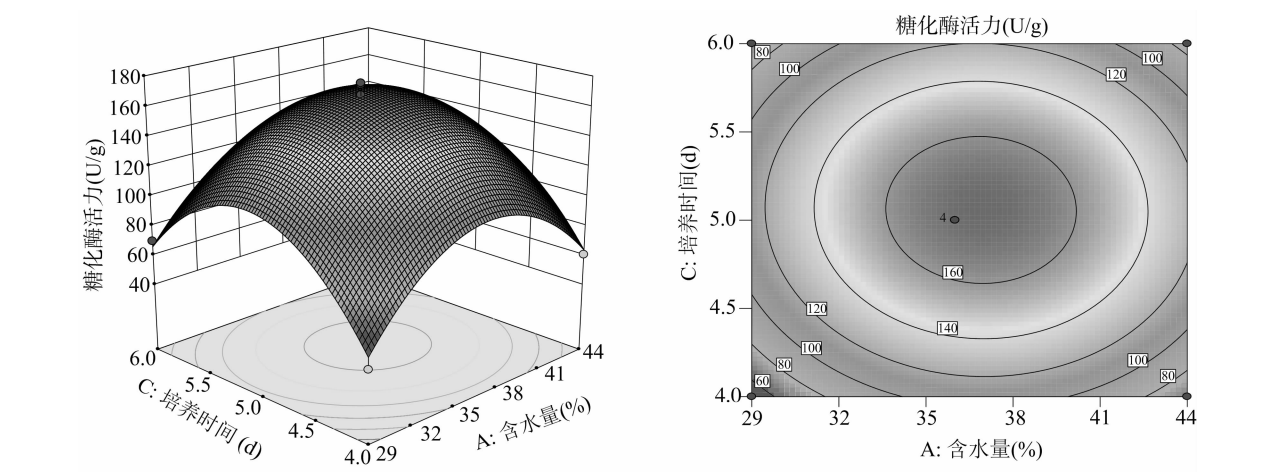


图9 糖化酶活力变量 A 和 C 相互作用的响应面和等高线图

2.5 液化酶活力响应面试验结果

2.5.1 Box - Behnken 设计与结果 根据 Box - Behnken 试验设计原理,设计 17 个试验点的响应面分析试验,以菌株的液化酶活力作为响应值,选取 A

含水量、B 氮源添加量、C 培养时间 3 个具有显著影响的因素作为自变量,试验因素的水平选取:含水量 29%、38%、44%,氮源添加量 0.1%、0.4%、0.7%,培养时间 4、5、6 d,试验设计与结果见表 3。

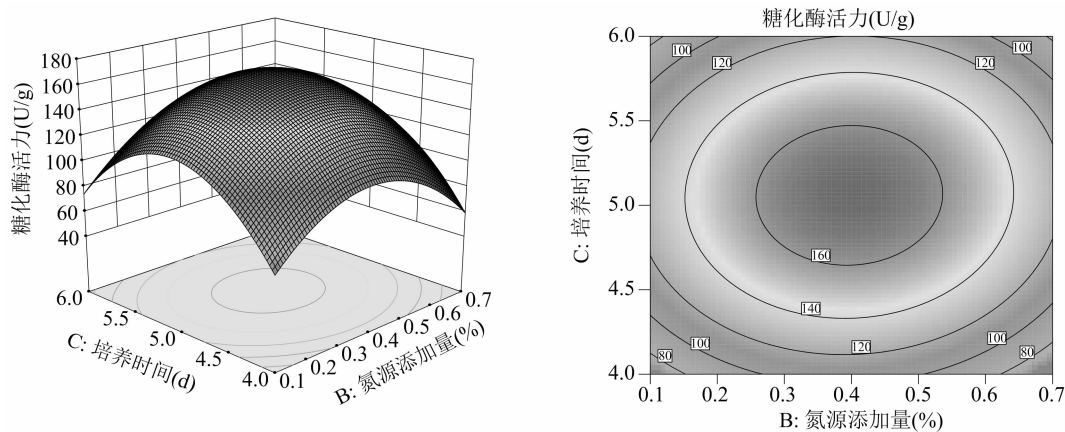


图10 糖化酶活力变量 *B* 和 *C* 相互作用的响应面和等高线图

表 3 Box – Behnken 试验设计与结果

试验号	A:含水量 (%)	B:氮源添加量 (%)	C:培养时间 (d)	液化酶活力 (U/g)
1	44	0.4	4	25.56
2	29	0.4	4	20.33
3	38	0.1	4	25.79
4	29	0.4	6	21.10
5	38	0.4	5	46.48
6	38	0.1	6	26.38
7	38	0.4	5	40.44
8	29	0.1	5	22.36
9	38	0.4	5	43.73
10	38	0.4	5	41.58
11	44	0.1	5	31.02
12	38	0.4	5	44.77
13	44	0.4	6	33.54
14	38	0.7	6	30.70
15	29	0.7	5	31.02
16	38	0.7	4	19.97
17	44	0.7	5	33.18

从方差分析结果(表 4)可以看出,回归模型 *F* 值为18.84,且显著性检验为极显著( $P=0.000\ 4$ ),失拟项不显著( $P=0.333\ 2>0.05$ ),说明该模型可靠。利用 DesignExpert 8.0.5 软件对表 4 数据进行回归拟合,得到液化酶活力 *y* 对自变量 *A* 含水量、*B* 氮源添加量、*C* 培养时间的多元回归方程为: $y=43.67+3.56A+1.11B+2.57C-1.52AB+1.78AC+2.54BC-7.56A^2-6.71B^2-10.98C^2$ 。

回归方程  $R^2=96.04\%$ ,说明响应值糖化酶活力的变化有 96.04% 来源于所选变量,即含水量、氮源添加量、培养时间。因此,回归方程能够较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该回归方程确定最佳培养条件。

2.5.2 各因素交互作用的响应面图 由回归模型绘制的响应面图见图 11 至图 13。

表 4 响应面回归方程的方差分析

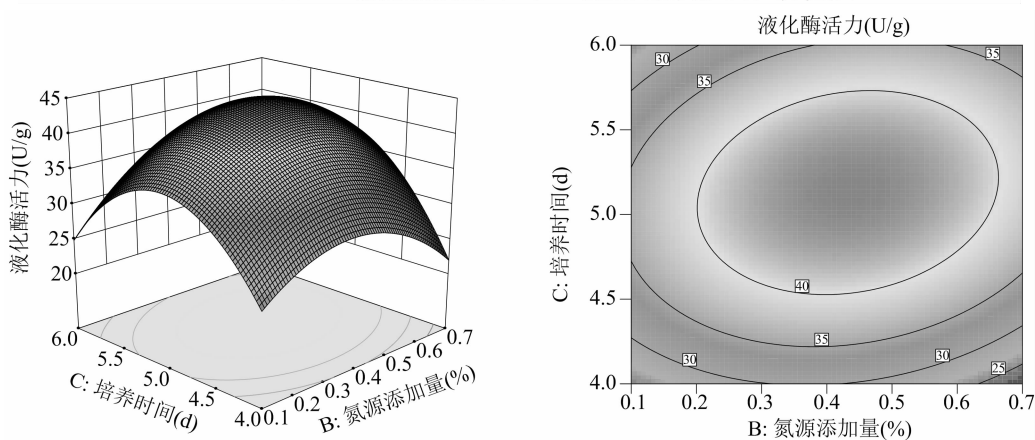
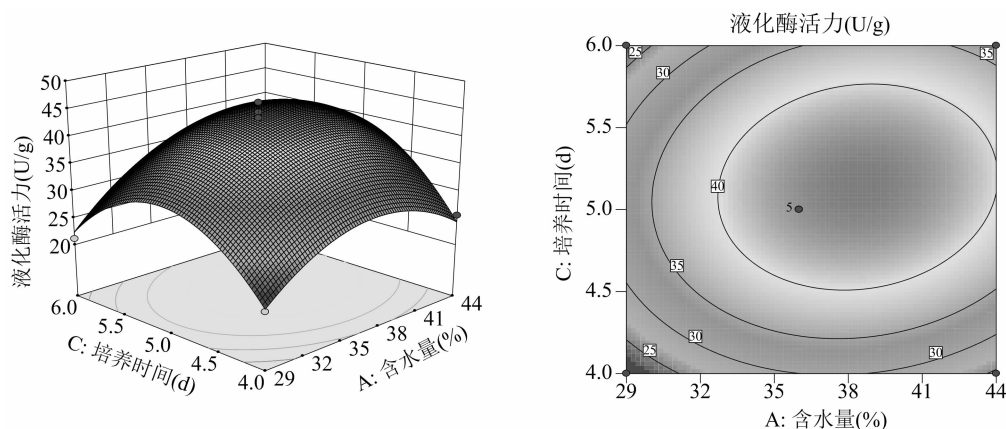
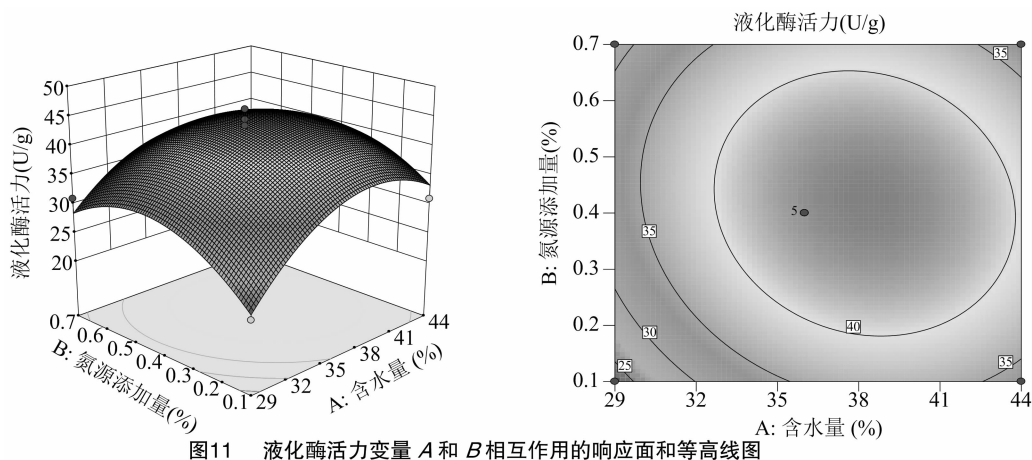
方差来源	平方和	自由度	均值	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	1231.98	9	136.89	18.84	0.000 4	**
<i>A</i> :含水量	101.46	1	101.46	13.96	0.007 3	**
<i>B</i> :含氮量	9.91	1	9.91	1.36	0.281 0	
<i>C</i> :培养时间	52.64	1	52.64	7.25	0.031 0	
<i>AB</i>	9.25	1	9.25	1.27	0.296 4	
<i>AC</i>	12.66	1	12.66	1.74	0.228 3	
<i>BC</i>	25.70	1	25.70	3.54	0.102 0	
<i>A</i> <sup>2</sup>	238.10	1	238.10	32.77	0.000 7	**
<i>B</i> <sup>2</sup>	189.79	1	189.79	26.12	0.001 4	**
<i>C</i> <sup>2</sup>	507.28	1	507.28	69.82	<0.000 1	**
残差	50.86	7	7.27			
失拟项	27.31	3	9.10	1.55	0.333 2	
误差项	23.55	4	5.89			
总和	1 282.84	16				

为求得液化酶活力最佳发酵条件,对获得的回归拟合方程中的 3 个变量分别求一阶偏导数,组成

方程组求解。所得结果即为最大酶活力时菌株 B8 所需最佳发酵条件,即  $A=38.33\%$  ,  $B=0.42\%$  ,  $C=$

5.15. 为便于操作,选择液化酶活力最佳发酵条件为:含水量 38% (即料水比 5 g : 3 mL)、氮源添加量 0.4%、培养时间 5 d。在此条件下理论预测液化酶

最大酶活力为 44.3402 U/g, 试验的实际值 41.57 U/g, 与预测值基本接近,说明所建模型拟合良好且可靠。



### 3 讨论与结论

本研究从赊店老酒大曲中得到 1 株在 60 ℃ 仍生长的霉菌 B8, 最适培养温度为 45 ℃。通过单因素试验结合响应面分析法优化其发酵条件, 测得其

糖化酶活力在料水比为 5 g : 3 mL、氮源添加量为 0.4%、培养时间为 5 d 时最高, 达到 162.38 U/g; 液化酶活力在料水比为 5 g : 3 mL、氮源添加量为 0.4%、培养时间为 5 d 时最高, 达到 41.57 U/g。

目前中高温大曲中关于耐高温细菌的研究报

道较多,研究数据也比较全面。如余婷婷等对高温大曲中产酱香、耐高温细菌进行了筛选与鉴定,得到 1 株产酱香功能细菌,其能够耐受 95 ℃ 的高温<sup>[25]</sup>。周平等从中高温大曲中筛选出 1 株耐热能力较好的细菌 NR2,鉴定为地衣芽孢杆菌,其能够耐受 80 ℃ 的温度<sup>[26]</sup>。汪江波等从白云边高温大曲中分离筛选得到 10 株耐高温细菌,皆可耐受 50 ℃ 高温<sup>[27]</sup>。而关于耐高温霉菌的研究相对较少,如武晋海等从茅台酒大曲中筛选得到 3 株在 50 ℃ 以上旺盛生长的霉菌,分别为孔球孢属(*Gilmaniella*)、孔球孢属(*Gilmaniella*)和犁头霉属(*Absidia*)。最适生长温度分别为 50、50、45 ℃,热致死温度分别为 70、70、65 ℃<sup>[28]</sup>。王忠彦等从中温大曲中分离了 1 株能在 60~62 ℃ 生长良好的耐高温霉菌,鉴定为假华根霉<sup>[29]</sup>。寇运同等从中温大曲中筛选得到 1 株耐高温霉菌,其最高生长温度为 58~60 ℃<sup>[30]</sup>。

本研究分离得到的耐高温霉菌鉴定为根霉菌,在 60 ℃ 时依然生长。与其他文献筛选出的耐高温菌株相比处于较高水平,且本研究还利用响应面法对其产酶条件进行优化。在单因素试验的基础上,结合响应面法分别优化耐高温霉菌产糖化酶和液化酶的能力,使耐高温霉菌的酶活力数据更加全面,提升了淀粉质酿酒原料的利用率,也为提高白酒出酒率提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 曾碧涛,魏明英,闫景丽,等. 五粮液产地自然环境研究进展[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):21-24.
- [2] 王邦坤. 微生物技术在高温大曲中的应用初探[J]. 食品工业,1991(3):14-15.
- [3] Wang H Y, Xu Y. Effect of temperature on microbial composition of starter culture for Chinese light aroma style liquor fermentation[J]. Letters in Applied Microbiology,2015,60(1):85-91.
- [4] 张玉芳,张振忠,王丰杰.  $\alpha$ -淀粉酶在液态法白酒生产上的应用[J]. 食品工业,1996(4):34.
- [5] 程伟,徐亚磊,岳腾飞,等. 双轮高温堆积发酵在浓香型白酒生产中的应用[J]. 食品工业,2014,35(9):151-154.
- [6] Xu Q S, Feng J X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1):216.
- [7] 张秀媛,袁永俊,何扩. 糖化酶的研究概况[J]. 食品研究与开发,2006(9):163-166.
- [8] Tester R F, Qi X, Karkalas J. Hydrolysis of native starches with amylases[J]. Animal Feed Science and Technology,2006,130(1/2):39-54.

- [9] 赵金松,郑佳,吴重德,等. 基于磷脂脂肪酸技术研究酱香大曲微生物群落结构[J]. 应用与环境生物学报,2014,20(4):558-563.
- [10] Yang J G, Dou X, Han P J, et al. Microbial diversity in Daqu during production of luzhou flavored liquor[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists,2017,75(2):136-144.
- [11] 葛媛媛,姚粟,刘洋,等. 芝麻香型白酒高温大曲嗜热细菌群落研究[J]. 食品与发酵工业,2012,38(11):16-19.
- [12] 周瑞平,陈云宗,唐代云,等. 偏高温大曲中一株嗜热细菌的分离与鉴定[J]. 酿酒科技,2010(1):36-38.
- [13] 朱晓聆,章炉军,张俊玲,等. 香菇工厂化栽培中常见霉菌的分离鉴定及抑菌剂筛选[J]. 上海农业学报,2016,32(3):83-90.
- [14] 王鑫昕,杨军山,郭军英,等. 丛台酒大曲中霉菌的初步分类及研究[J]. 酿酒科技,2015(5):34-36.
- [15] 李良,郑桂朋,吴昊,等. 浓香型白酒夏冬两季生产车间及大曲中霉菌与放线菌的分离纯化[J]. 中国酿造,2017,36(11):54-58.
- [16] 姜涌明,史永昶,隋德新. 枯草芽孢杆菌 86315  $\alpha$ -淀粉酶的研究. II. 分离提纯、性质及动力学[J]. 江苏农学院学报,1992(2):47-56.
- [17] 班世栋,王晓丹,陈孟强,等. 酱香型大曲中具产酶功能霉菌的分离筛选[J]. 酿酒,2014,41(4):31-36.
- [18] 谢玉球,时晓,周二干,等. 洋河大曲中糖化酶高产霉菌的筛选鉴定及固态发酵条件优化[J]. 酿酒科技,2016(4):39-42.
- [19] 龙茜萍,王晓丹,谭静,等. 一株高产糖化酶菌株的筛选与鉴定[J]. 酿酒科技,2013(8):7-9.
- [20] 刘磊,吴晖,刘冬梅,等. 黄酒生产用纯种根霉的筛选及其产酶条件的优化[J]. 中国酿造,2013,32(3):25-28.
- [21] 黄红霞,刘彩香,康旭,等. 传统甜面酱中米曲霉的分离与培养条件优化[J]. 湖北农业科学,2013,52(2):408-411,427.
- [22] Lu Y, Zhu J, Shi J, et al. Immobilized enzymes from *Geotrichum* spp. improve wine quality[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2017,101(17):6637-6649.
- [23] Zhang T, Mao C, Zhai N, et al. Influence of initial pH on thermophilic anaerobic co-digestion of swine manure and maize stalk[J]. Waste Management,2015,35:119-126.
- [24] 藏金萍,韩志校,姜军坡. 响应面法优化产纤维素酶菌株深层液体发酵的条件[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):368-370,374.
- [25] 余婷婷,赖世强,曹文涛,等. 高温大曲中产酱香耐高温细菌的筛选及鉴定[J]. 贵州农业科学,2013,41(11):109-112.
- [26] 周平,罗惠波,黄丹,等. 中高温大曲中一株耐热细菌的分离鉴定及其风味代谢产物分析[J]. 食品工业科技,2016,37(24):215-220.
- [27] 汪江波,沈玉洁,张明春,等. 白云边高温大曲中嗜热功能菌的分离筛选[J]. 酿酒,2010,37(5):28-31.
- [28] 武晋海,于亮,王昌禄,等. 茅台酒大曲中 3 株耐高温霉菌的分离纯化及鉴定[J]. 酿酒科技,2007(3):17-19.
- [29] 王忠彦,寇运同,胡永松,等. 中温大曲中一株高温霉菌的分离与鉴定[J]. 酿酒科技,1995(2):69-70.
- [30] 寇运同,王忠彦,胡永松,等. 中温大曲中一株高温霉菌的特性及功能的研究[J]. 酿酒科技,1995(2):71.