

中高温大曲中霉菌的分离及其麸曲制备

郑自强^{1,2}, 卫春会^{1,2}, 张立伟¹, 邓杰^{1,2}, 黄治国^{1,2}, 刘美君³, 任志强^{1,2*}

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644000) (2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000) (3. 长春工业大学化学工程学院, 吉林长春 130000)

摘要: 从中高温大曲中筛选产糖化酶菌株, 并制作霉菌麸曲, 对麸曲的制作条件和酿酒性能进行测定。分离得到两株高产糖化酶菌株 JQ-1、JQ-2, 其鉴定结果分别为米根霉菌 (*Rhizopusoryzae*) 和卷枝毛霉菌 (*Mucorcircinelloides*)。为了使菌株能更好的应用生产, 以 JQ-1、JQ-2 菌株制备霉菌麸曲, 制曲性能测试结果表明, 以全麸皮为制曲原料, 控制加水量为 55%, JQ-1 麸曲培养 96 h, JQ-2 麸曲培养 72 h, 干燥温度为 40 °C, 该条件利于麸曲糖化酶活力的保持, 所得 JQ-1 麸曲糖化酶活力达 1510.33 U/g, JQ-2 麸曲达 1388.26 U/g; 产酒性能测试结果表明, 麸曲 JQ-1 所酿基酒的出酒率达 44.42%, 酒精度为 41.22% vol, 麸曲 JQ-2 所酿基酒的出酒率达 37.32%, 酒精度为 35.84% vol, 麸曲 JQ-1 的酿造性能更为突出。综合制曲和生产性能, 发现菌株 JQ-1 和 JQ-2 能在酿造生产中较好的发挥其糖化作用, 且酿造性能麸曲 JQ-1>麸曲 JQ-2。该研究以期为大曲功能微生物的开发与生产应用提供一定的指导。

关键词: 大曲; 糖化酶; 霉菌; 麸曲; 生产性能

文章篇号: 1673-9078(2022)01-165-172

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0472

Isolation of Mold from Medium High Temperature Daqu and Preparation of Fuqu

ZHENG Ziqiang^{1,2}, WEI Chunhui^{1,2}, ZHANG Liwei¹, DENG Jie^{1,2}, HUANG Zhiguo^{1,2}, LIU Meijun³, REN Zhiqiang^{1,2*}

(1.School of Biological Engineering, Sichuan University of Technology, Yibin 644000, China)

(2.Liquor Making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China)

(3.School of Chemical Engineering, Changchun University of Technology, Changchun 130000, China)

Abstract: Strains producing glucoamylase were screened from the high temperature Daqu, used to make mould Fuqu, and its production conditions and brewing performance were determined. Two high glucoamylase producing strains JQ-1 and JQ-2 were isolated and identified as *Rhizopus oryzae* and *Mucor circinelloides*, respectively. To make the strains more suitable for production, JQ-1 and JQ-2 were used to making mould Fuqu, The test results of Fuqu making performance showed that using whole bran as Fuqu making raw material, controlling the amount (55%) of water (JQ-1 for 96 h and JQ-2 for 72 h) and drying temperature of 40 °C, these conditions were conducive to the maintenance of glucoamylase activity of Fuqu. The glucoamylase activity of JQ-1 Fuqu and JQ-2 Fuqu reached 1510.33 U/g and 1388.26 U/g, respectively. The results of liquor production performance test showed that the liquor yield of base liquor made by bran Fuqu JQ-1 was 44.42%, and the alcohol degree was 41.22% vol; the liquor yield of base liquor made by bran Fuqu JQ-2 was 37.32%, and the alcohol degree was 35.84% vol. The brewing performance of bran Fuqu JQ-1 was more outstanding. Based on the comprehensive Fuqu preparation and production performance results, strains JQ-1 and JQ-2 were found to play a good role in saccharification in brewing production. And in terms of brewing performance,

引文格式:

郑自强,卫春会,张立伟,等.中高温大曲中霉菌的分离及其麸曲制备[J].现代食品科技,2022,38(1):165-172

ZHENG Ziqiang, WEI Chunhui, ZHANG Liwei, et al. Isolation of mold from medium high temperature Daqu and preparation of Fuqu [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 165-172

收稿日期: 2021-04-29

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目 (2019YJ0474); 中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目 (2018JJ014); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目 (NJ2018-02)

作者简介: 郑自强 (1997-), 男, 在读研究生, 研究方向: 生物工程, E-mail: 1360276321@qq.com

通讯作者: 任志强 (1985-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 酿酒微生物与分子生物学, E-mail: zhiqren@foxmail.com

Fuqu JQ-1>Fuqu JQ-2. This study aims to provide some guidance for the development and production applications of functional microorganisms in Daqu.

Key words: Daqu; glycosylases; mould; Fuqu; production performance

中国白酒在食品饮料行业具有重要地位。酒曲在白酒酿造的糖化、产酒、生香过程均有参与,被称为“酒之骨”,有举足轻重的作用^[1]。大曲是酒曲的突出代表,其以小麦为主要原料,在酿造过程中作为微生物制剂和酶制剂参与风味物质的形成^[2],霉菌是大曲中主要的菌种之一,可分泌糖化酶、蛋白酶等多种功能酶,可促进原料的分解利用,如糖化酶可将淀粉中的 α -1,4键和 α -1,6键切断,使淀粉转化为可发酵性糖^[3],而霉菌在酿造生产中一般是通过制作麸曲来体现其酶学功能。俞剑葵等^[4]从曲块中分离出2株高产糖化酶和淀粉酶的曲霉菌株BR84和BR88,混合制曲后其糖化酶和蛋白酶活力分别达1099.82 U/g和284.44 U/g; HUI X^[5]通过优化一株米曲霉的产酶条件使酶产量增加了17.50%;宋克伟^[6]制作米根霉菌麸曲,应用于酿造,提高了成品酒的出酒率和优质酒率。麸曲是以麸皮为主要原料,蒸煮冷却后接入微生物,经培养繁殖产酶,然后低温烘干而成的散曲^[7],由于麸曲制作简单,原料成本低廉,且能够作为微生物培养的优良载体,在工业上已经广泛应用,包括菌种的改良、工艺的优化和应用的多样化等^[8]。应用大曲进行白酒生产存在出酒率低的局限性,而出酒率取决于酒曲的糖化能力,故选育出能在实际酿造生产中起作用的高产糖化酶菌株,具有重要意义^[9,10]。

本研究从中高温大曲中分离出2株高产糖化酶菌株,并用于强化麸曲,以糖化酶活力作为考察指标,从制曲原料、培养时间、加水量、干燥温度四个因素考察其对制曲生产性能的影响,并通过固态发酵测试成品麸曲的酿造性能,以期形成一套开发利用大曲微生物的方法体系,为实际生产提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

中高温大曲,取自川南某浓香型酒厂;麸皮、高粱、麸曲、活性干酵母、小曲,市售;NaOH、H₂SO₄、HCl(分析纯),成都市科龙化工试剂厂;蛋白酶K,德国Merck公司;DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒,北京智杰方远科技有限公司。

1.2 仪器和设备

CP214电子天平,奥豪斯仪器有限公司;GI54DS

立式自动压力蒸汽压灭菌器,致微仪器有限公司;LS-I201微生物培养箱,上海博讯生物仪器有限公司;DM3000显微照相机,德国Leica公司;5430R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;C1000Touch PCR仪,美国Bio-Rad公司;Super alcomat全自动酒精度测试仪,德国Julabo公司。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200 g/L、葡萄糖20 g/L、琼脂20 g/L,自然pH。

1.4 方法

1.4.1 霉菌的分离纯化

称取10 g大曲溶于加有玻璃珠的90 mL无菌水中,充分振荡20 min,计为10⁻¹,逐级稀释至10⁻⁶,使用PDA培养基进行平板涂布培养,适宜梯度下挑取不同形态菌落进行划线分离纯化,重复操作3次,将纯化的菌株转接斜面培养基,低温保存^[11]。

1.4.2 霉菌的形态学鉴定

将纯化菌株点植入PDA培养基,28℃恒温培养48 h~72 h,观察菌落形态结构,挑取菌丝,染色后于显微镜下观察菌株形态特征,对菌株进行鉴定^[12]。

1.4.3 霉菌的分子生物学鉴定

将恒温28℃,培养48 h的马铃薯液体培养基5000 r/min离心10 min集菌,提取真菌基因组DNA,以ITS1:5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3'为正向引物,ITS4:5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'为反向引物扩增菌株rDNA-ITS序列。

PCR反应体系:引物ITS1和ITS4均1 μL;模板(基因组)2 μL;Taq PCR Master Mix 25 μL;超纯水21 μL。

PCR反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s;55℃退火30 s;72℃延伸90 s;循环30次;72℃终延伸10 min;4℃保存。

PCR扩增产物送上海生物工程公司测序。测序结果在Gen Bank数据库对序列比较分析,利用MEGA7.0软件构建发育树。

1.4.4 测定方法

霉菌麸曲糖化酶活力的测定参照QB/T 4257-2011《酿酒大曲通用分析方法》中的方法,使用全自动酒精度测试仪测定酒精度^[13]。

糖化酶活定义：在 35 ℃、pH 4.6 条件下，1 g 大曲 1 h 转化可溶性淀粉生产葡萄糖的毫克数定义为一个酶活力单位 (U)，以 U/g 表示^[14]。

$$\text{出酒率} / \% = \frac{\text{酒精质量(以60\%vol计)}}{\text{高粱中消耗的淀粉质量}} \times 100\%$$

1.5 纯种霉菌麸曲生产性能测试

1.5.1 制曲性能测试

以 JQ-1、JQ-2 为出发菌株，以糖化酶活力为考察指标，通过前期预实验，固定培养温度为 35 ℃，分别考察在不同的制曲原料（麸皮:高粱=4:1、麸皮:米粉=4:1、麸皮:全麦粉=4:1、全麸皮）、培养时间（0、24、36、48、60、72、96、120、144 h）、加水量（40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%）和干燥温度（35、40、45、50、55 ℃）等条件下对麸曲糖化酶活力的影响。

制曲工艺流程^[15-16]：

原料→加水→拌曲→蒸麸→装瓶→灭菌→接种→恒温培养→干燥储藏→浅盘麸曲

加水、拌曲、蒸麸：称取原料于三角瓶，加去离子水混匀，使麸皮充分吸水，调节水分含量，于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌处理 30 min，保证其无菌状态^[17]。

接种、恒温培养、干燥储藏：将活化后的菌种在马铃薯葡萄糖液体培养基中培养至孢子数为 10⁶ CFU/mL 的菌悬液接种于无菌麸皮中，控制接种量为 5%，恒温培养，待菌种培育完成后控温烘干，储藏^[18]。

1.5.2 固态发酵酿造性能测试

固态发酵相较于液态发酵具有更好的稳定性和重现性，为探究麸曲的生产性能，进行固态酿造试验。以高粱为原料，麸曲和活性干酵母为糖化发酵剂进行固态发酵试验，检测麸曲白酒固态发酵条件下的出酒率和酒精度变化，初探其运用生产的酿造性能^[19]。

酿酒工艺流程：

高粱→泡粮→蒸粮→打量水→下曲→拌曲→堆积→发酵→蒸酒→储存

泡粮、打量水、蒸粮：称取高粱，加入沸水浸泡高粱过夜，将浸泡后的高粱蒸熟，打量水，使粮食最终含水量为高粱干重的 47%。

下曲、拌曲：试验组曲采用的是纯种霉菌麸曲，起糖化作用，缺乏酵母将生成的糖分转化为酒精，结合前期酵母和麸曲配比的预实验结果，确定以接种量为 0.4% 的纯种霉菌麸曲和 0.6% 的活性干酵母为试验组，以接种量为 0.4% 的 2 种纯种市售麸曲和 0.6% 的活性干酵母为对照 2 和对照 3。接入曲后，待粮食冷却，将曲拌入粮糟混匀。

堆积、发酵、蒸酒、储存：堆积 24 h，充分糖化以及保证酵母充分繁殖。入缸泥封发酵 15 d 后蒸酒。测定馏出酒的酒度，馏取酒精度高于 10% vol 的酒于适宜环境条件密封储存。

1.6 数据处理

结果采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示，运用 SPSS 16.0 软件对试验结果进行多重比较和显著性分析，每组试验重复三次。

2 结果与分析

2.1 菌株形态学鉴定

菌株在 PDA 培养基上 28 ℃ 培养 48 h 后，对菌落形态进行观察，以菌落的直径与透明圈直径的比值作为是否高产糖化酶的初步评判依据^[20]，初步分离出两株形态特征不同的可能高产糖化酶的菌株，编号为 JQ-1、JQ-2。菌株 JQ-1 为黑褐色，呈根状分枝，有孢子，孢子为球形黑色，菌丝无隔，分枝状；菌株 JQ-2 为灰白色，呈根状分枝；有球形孢子囊，无横托，菌丝无隔，分枝状。菌株菌落形态特征观察结果见表 1。

表 1 菌株 JQ-1 与菌株 JQ-2 的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of strain JQ-1 and strain

JQ-2		
编号	菌落形态	镜检形态
JQ-1		
JQ-2		

2.2 系统发育学分析

测序结果表明，菌株 JQ-1 和 JQ-2 的 rDNA-ITS 序列基因片段全长分别约 1050 bp 和 1010 bp（图 1），用 BLAST 软件在 Gen Bank 数据库中对分析，发现菌株 JQ-1 与根霉属 (*Rhizopus*) 的菌株高度相关，JQ-2 与毛霉属 (*Mucor*) 的菌株高度相关。用 MEGA7.0 软件构建系统进化树（图 2、图 3）。由系统发育树结果看出，菌株 JQ-1 与米根霉菌株 (*Rhizopusoryzae*) (序

列号 MT259131.1) 为同一支, 同源性为 100%, 菌株 JQ-2 与卷枝毛霉菌株 (*Mucorcircinelloides*) (序列号 HQ845293.1) 为同一支, 同源性 100%。

综合形态学鉴定和 rDNA-ITS 序列分析结果, 将 JQ-1 菌株鉴定为接合菌纲 (Zygomycetes)、毛霉目 (Mucorales)、毛霉科 (Mucoraceae)、根霉属 (*Rhizopus*)、米根霉菌 (*Rhizopusoryzae*); 将菌株 JQ-2 鉴定为藻状菌纲(Phycomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科 (Mucoraceae)、毛霉属 (*Mucorracemosus*)、卷枝毛霉菌 (*Mucorcircinelloides*)。

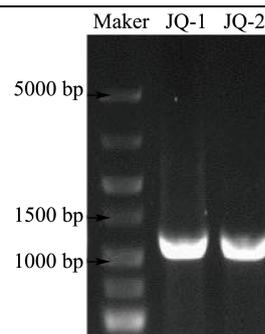


图1 JQ-1 和 JQ-2rDNA-ITS 的 PCR 扩增图谱

Fig.1 PCR amplification map of JQ-1 and JQ-2rDNA-ITS

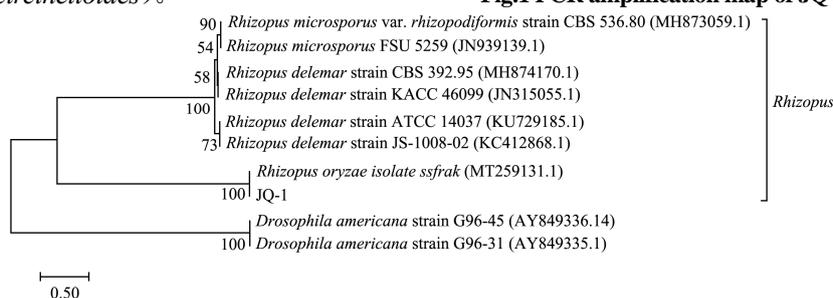


图2 JQ-1 基于 rDNA-ITS 基因序列构建的系统发育树

Fig.2 JQ-1 phylogenetic tree based on rDNA-ITS gene sequence

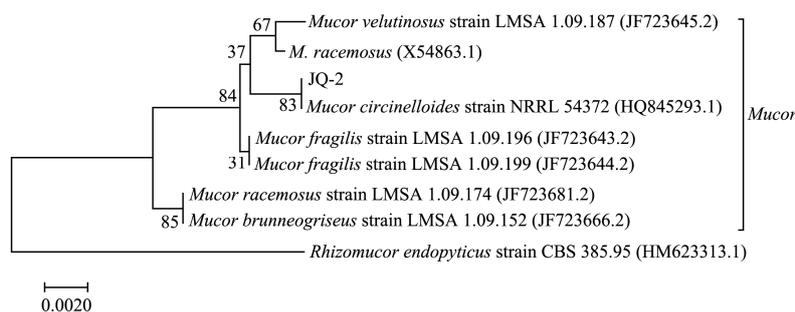


图3 JQ-2 基于 rDNA-ITS 基因序列构建的系统发育树

Fig.3 JQ-2 phylogenetic tree based on rDNA-ITS gene sequence

2.3 纯种霉菌麸曲生产性能测试

2.3.1 制曲条件优化

2.3.1.1 不同原料对麸曲酶活力的影响

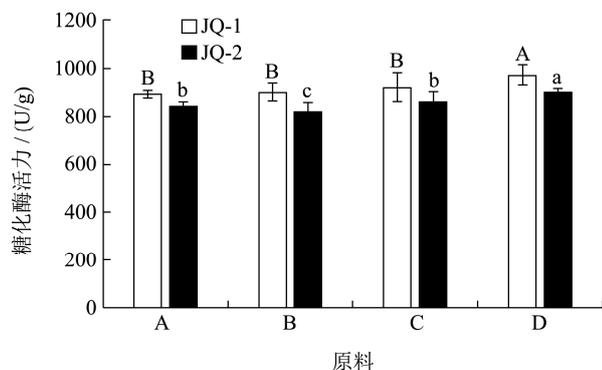


图4 不同原料对麸曲的酶活力的影响

Fig.4 Effect of raw materials of Fuqu on quality of Fuqu

注: 横坐标下 A 表示麸皮+高粱, B 表示麸皮+米粉, C

表示麸皮+全麦粉, D 表示全麸皮; 柱上大、小写字母表示糖化酶活力差异, 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

糖化酶又为葡糖糖淀粉酶, 葡糖糖淀粉酶是通过将淀粉转化为葡萄糖体现其酶活性的, 淀粉利用率高, 则糖化酶活性高。在原料中添加高淀粉含量的辅料如高粱、米粉、麦粉等可以保证糖化反应的充分进行, 但辅料的蓬松度一般较麸皮略低, 过量的加入会影响麸曲的疏松度, 从而影响微生物代谢作用^[21]。为此, 固定培养温度为 35 °C, 培养时间为 48 h, 加水量为 45%, 干燥温度为 40 °C, 分别以麸皮和高粱、麸皮和米粉、麸皮和全麦粉按 4:1 比例与全麸皮为原料对照进行试验。由图 4 可知, JQ-1 接种制作的麸曲糖化酶活力 D>C>B>A, JQ-2 接种麸曲糖化酶活力 D>C>A>B, JQ-1 表现出更好的糖化性能, JQ-1 和 JQ-2 均以全麸皮为原料制作的麸曲糖化酶活力最佳。可能是此条件下麸曲所含有的淀粉量充分, 不需要通过添

加辅料的方式来满足 JQ-1 和 JQ-2 的代谢产酶需求,且全麸皮原料结构疏松透气、吸水性强,更符合霉菌的生存环境要求。故最终确定 JQ-1 麸曲和 JQ-2 麸曲的原料为全麸皮。

2.3.1.2 培养时间对麸曲糖化酶活力的影响

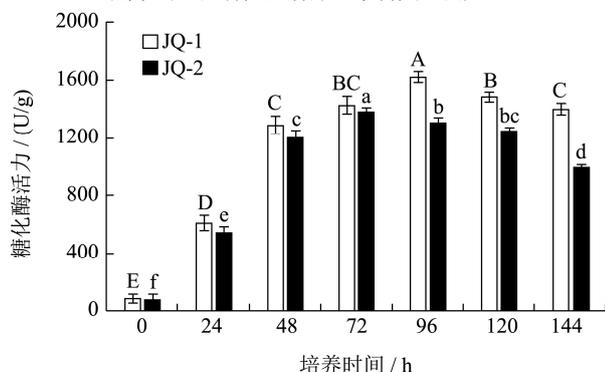


图5 培养时间对麸曲的酶活力的影响

Fig.5 Effect of culture time enzymatic activity of Fuqu

由图5可知,随着培养时间的延长,JQ-1和JQ-2菌株接种麸曲的糖化酶活力呈现先增后降趋势。在培养时间在72h~120h时,曲内微生物的代谢活动更为活跃,维持着较高的糖化酶活力,显著高于其他培养时间段($p < 0.05$),其中,JQ-1麸曲在培养时间为96h时达到峰值,达1620.00 U/g,JQ-2麸曲酶活在培养72h时达到峰值,为1382.00 U/g,随着培养时间的延长,JQ-1和JQ-2菌株表现为糖化酶活力有所下降,在培养时间达到144h时,JQ-1麸曲和JQ-2麸曲的糖化酶活力呈显著降低趋势($p < 0.05$)。由此可见,霉菌麸曲培养时间对菌株的酶活性的保持有较大影响,JQ-1和JQ-2麸曲的最佳培育时间有所差异,说明不同的菌种有着不同的培养时间要求,可能与菌种自身生理活动特征有关,综上所述,确定JQ-1麸曲培养时间为96h,JQ-2麸曲培养时间为72h更有利于麸曲糖化酶活的保持。

2.3.1.3 加水量对麸曲糖化酶活力的影响

水分是微生物生长繁殖的基本营养物之一,麸曲加水量的高低直接影响霉菌的代谢^[22],有必要在制曲工艺上对加水量进行考察。图6可知,JQ-1麸曲和JQ-2麸曲的糖化酶活力随加水量增加呈先上升后下降至稳定趋势。其中,JQ-1在加水量为55%时品质最好,糖化酶活力达到1621.00 U/g,且呈显著性差异($p < 0.05$),JQ-2在55%~60%加水量下,酶活较高,糖化酶活力为1440.00 U/g。加水量35%~45%时,霉菌麸曲表面可见明显的一层孢子,菌丝较少,在加水量高于50%时,菌丝茂盛,孢子较少。加水量过高时,不利于霉菌向麸皮内部生长,糖化酶活力较低;加水量过低时,麸皮较为干瘪,此时的环境因子抑制了菌株正常的生

理活动。故控制麸曲加水量为55%为宜。

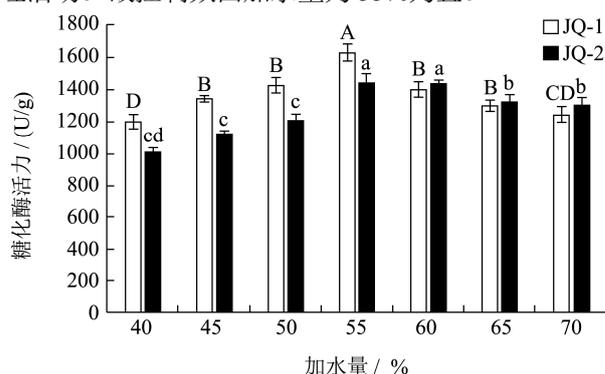


图6 加水量对麸曲的酶活力的影响

Fig.6 Effect of water addition on enzyme activity of Fuqu

2.3.1.4 干燥温度对麸曲糖化酶活力的影响

麸曲培育完成后,需要干燥,以方便麸曲的保藏,过高或过低的温度会对糖化酶活力的保持造成影响。由图7可知,在35℃~45℃温度区间范围内,干燥温度变化对JQ-1、JQ-2霉菌麸曲影响较小,不同温度下差异不显著($p > 0.05$),麸曲培养温度在50℃~60℃时仍有较高的糖化酶活力,JQ-1和JQ-2菌株来自中高温大曲,具有一定的热耐受性,故在较高干燥温度下,麸曲依旧有良好的糖化酶活力,从节约能源的角度考虑,确定干燥温度为40℃。

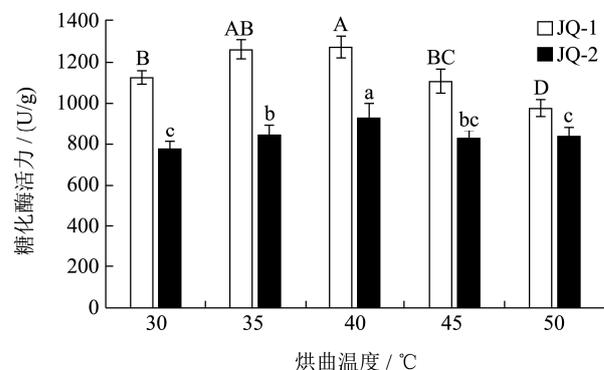


图7 干燥温度对麸曲的酶活力的影响

Fig.7 Effect of baking temperature on enzyme activity of Fuqu

2.3.1.5 麸曲酶活检测

通过对霉菌麸曲的生产性能测试,确定了以全麸皮为原料,(培养时间JQ-1麸曲为96h,JQ-2麸曲为72h),加水量为55%,干燥温度为40℃,此条件制作霉菌麸曲更有利于菌株糖化酶活的保持,所得浅盘麸曲JQ-1和麸曲JQ-2的糖化酶活力检测结果见表2。由表2知,麸曲JQ-1糖化酶活力在最佳工艺条件下为1510.33 U/g,麸曲JQ-2为1388.26 U/g,麸曲JQ-1与麸曲JQ-2皆有较好的糖化能力,麸曲JQ-1与麸曲JQ-2糖化酶活力具有显著性差异($p < 0.05$),其中麸曲JQ-1糖化能力更占优势。

表2 成品曲糖化酶活力检测

Table 2 Detection of saccharifying enzyme activity of finished Fuqu

麸曲	麸曲 JQ-1	麸曲 JQ-2	某市售霉菌麸曲
糖化酶活力/(U/g)	1510.33±30.52 ^a	1388.26±23.42 ^b	642.35±43.25 ^c

注：糖化酶活力差异用不同字母表示，不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

表3 麸曲 JQ-1 和麸曲 JQ-2 产酒性能测试

Table 3 Liquor production performance test of Fuqu JQ-1 and Fuqu JQ-2

指标	试验组		对照组	
	麸曲 JQ-1	麸曲 JQ-2	某市售麸曲 1	某市售麸曲 2
酒精度/(% vol)	44.42±1.06 ^a	37.32±1.23 ^b	28.33±0.36 ^c	32.18±0.48 ^d
出酒率/%	41.22±1.85 ^A	35.84±4.59 ^B	29.33±4.74 ^C	31.66±3.58 ^D

注：酒精度、出酒率差异用不同大、小写字母表示，不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

3.2.2 固态发酵酿造性能测试结果

麸曲白酒是以纯种培养的麸曲及酒母为糖化发酵剂，经发酵、蒸馏、贮存、勾兑而成的蒸馏酒^[23]。本研究采用固态发酵法，探究麸曲 JQ-1 和麸曲 JQ-2 的酿造性能，由表 3 可知，试验组较对照组具有明显的优势，出酒率和酒度与常规市售麸曲相比，酿造性能突出，显著提高了酒度和出酒率，麸曲 JQ-1 较麸曲 JQ-2 酿造能力更为优越，出酒率达 44.42%，酒精度为 41.22%vol，麸曲 JQ-2 的出酒率为 35.84%，酒精度为 37.32%vol，显著高于市售麸曲 ($p<0.05$)，说明此两株产糖化酶的菌株在固态发酵环境中保持了较高的酶活力，淀粉转化率高，随着麸曲 JQ-1 和麸曲 JQ-2 的添加，糖化、产酒过程均表现为促进作用。试验组出酒率和酒度较对照组皆有较大提升，呈显著差异 ($p<0.05$)，菌种本身来自于酿酒曲，进行固态发酵过程，环境差异较小，这可能是其能发挥较好的酿造性能的原因之一，麸曲 JQ-1 白酒与麸曲 JQ-2 差异显著 ($p<0.05$)，与成品曲糖化酶活力测定结果呈正相关。综合上述结果，麸曲 JQ-1 和麸曲 JQ-2 能较好的在酿造生产中发挥其糖化作用，其酿造性能 JQ-1>JQ-2。

3 讨论

环境中有多种霉菌参与白酒生产过程，包括曲霉属、青霉属、毛霉属、根霉属等，严启梅等^[24]从清香型白酒的酒醅中分离出 1 株米根霉菌株 (M2)，将其应用于霉菌麸曲，并优化制曲工艺，优化后的菌株 (M2) 纯种麸曲糖化力达到最大值，为 917 U/g；张东平^[25]通过制作米根霉和酵母的混合麸曲配合大曲进行酿造试验，提高了基酒出酒率和优质酒率；张翠翠等^[26]将黑曲霉 (186) 与米根霉 (774-2) 进行共培养，相较于黑曲霉纯培养，其蛋白酶、挥发性香气成分和有机酸产量得到显著提升；张杰等^[27]基于提高霉菌麸曲糖化酶活力和产酒性能等目的，优化一株高产

糖化酶霉菌 (Mxzd-001) 的麸曲工艺，优化后的霉菌麸曲糖化力达到 1032 U/g，应用于酿造生产中，其出酒率提高了 4.9%左右；孙科等^[28]以 1 株卷枝毛霉 (SN2017) 为研究对象，通过优化工艺提高了菌株的产黄酮能力；张映瞳^[29]通过分子生物学等手段获得了 1 株卷枝毛霉菌株，并对其发酵条件进行初探进一步提高了番茄红素产量；刘思佳等^[30]从豆酱上获得了产脂肪酶的卷枝毛霉，发现其具有生物催化的潜力。本课题从中高温大曲中分离出的米根霉菌株 JQ-1 和卷枝毛霉菌株 JQ-2，制得的 JQ-1 麸曲糖化酶活力达 1510.33 U/g，JQ-2 麸曲达 1388.26 U/g，相较于现有的研究，表现出较好的糖化能力和酿造能力，特别是目前卷枝毛霉菌有关其产糖化酶的代谢特性的报道极少，此发现可为全面的探究其代谢途径及酶学性质提供一定的参考价值。

4 结论

4.1 本试验采用生理生化特征与分子生物学结合的办法，从中高温大曲中筛选出 2 株霉菌 (JQ-1、JQ-2)，提取菌株基因组后，对扩增的 rDNA-ITS 基因片段测序，对测序结果构建基因序列进化树，鉴定得出菌株 JQ-1 为米根霉菌 (*Rhizopusoryzae*)，JQ-2 为卷枝毛霉菌 (*Mucorcircinelloides*)。

4.2 以 JQ-1 和 JQ-2 分别制备纯种霉菌麸曲，测试其生产性能。制曲性能测试结果表明，以全麸皮为原料，控制加水量为 55%，JQ-1 麸曲培养 96 h，JQ-2 麸曲培养 72 h，干燥温度控制在 40 °C，制得的 JQ-1 麸曲糖化酶活力达 1510.33 U/g，JQ-2 麸曲达 1388.26 U/g，证明 JQ-1 和 JQ-2 具有较高的糖化酶生产能力；产酒性能测试结果表明，纯种霉菌麸曲与活性干酵母作为糖化发酵剂在固态发酵中产酒性能麸曲 JQ-1>麸曲 JQ-2，JQ-1 菌株表现为更好的酿造能力，出酒率达 44.42%，酒度为 41.22% vol，麸曲 JQ-2 的出酒率为

35.84%，酒精度为 37.32% vol，与优化后的成品曲糖化酶活力测定结果呈正相关。综合纯种霉菌麸曲制备和产酒性能的结果，发现菌株 JQ-1 和 JQ-2 能在酿造生产中较好的发挥其糖化作用，且制得的纯种霉菌麸曲的酿造性能麸曲 JQ-1>麸曲 JQ-2。

4.3 大曲微生物种类繁多，能产生大量的生物酶，但其各类微生物分工合作的代谢机制尚不明朗，需进一步开发，并完善大曲中微生物在酿造中相互作用的机制。本课题为大曲功能微生物的开发与生产应用提供了一定的理论指导。

参考文献

- [1] 张宗启. 酱香型白酒大曲中功能微生物菌群及其酶系研究进展[J]. 酿酒科技, 2021, 3: 92-99
ZHANG Zongqi. Research progress in functional microbial community and enzymes in Jiangxiang Daqu [J]. Brewing Technology, 2021, 3: 92-99
- [2] 孙利林, 李立郎, 胡萍, 等. 酱香型白酒大曲的微生物菌群结构及风味成分分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 299-306, 193
SUN Lilin, LI Lilang, HU Ping, et al. Analysis of microbial community structure and flavor composition of maotai-flavor Daqu [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 299-306, 193
- [3] Jin G, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation [J]. Trend Food Sci Technol, 2017, 63: 18-28
- [4] 俞剑燊, 杨映津, 夏永军, 等. 黄酒酒曲中霉菌筛选及其制曲研究[J]. 江西农业学报, 2016, 28(5): 79-82
YU Jianshen, YANG Yijin, XIA Yongjun, et al. Studies on screening of mycetes from koji for Chinese rice wine and koji-making [J]. Journal of Jiangxi Agriculture, 2016, 28(5): 79-82
- [5] Hui X, Sun L, Zhao D, et al. Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* as 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate [J]. J Sci Food Agr, 2010, 88(3): 529-535
- [6] 宋克伟, 胡建华, 魏金旺, 等. 米根霉在牛栏山基酒生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2015, 2: 73-75
SONG Kewei, HU Jianhua, WEI Jinwang, et al. Application of *Rhizopusoryzae* in the production of Niulanshan base liquor [J]. Brewing Technology, 2015, 2: 73-75
- [7] 王玉霞, 李兵, 申孟林, 等. 浓香型白酒大曲在发酵和成熟过程中主要功能酶活力分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(11): 270-274, 286
WANG Yuxia, LI Bing, SHEN Menglin, et al. Activities analysis of main functional enzymes from strong-flavour Daqu of Chinese liquor during fermentation and storage stages [J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 39(11): 270-274, 286
- [8] 黄永光, 徐岩. 酱香白酒酿造环境曲霉的分离及 *Aspergillus hennebergii* 酶分泌胁迫条件[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(8): 814-821
HUANG Yongguang, XU Yan. Isolation of *Aspergillus* from Jiangxiang liquor fermentation environment and enzyme secretion stress conditions of *Aspergillus hennebergii* [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2015, 34(8): 814-821
- [9] Varalakshmi K N, Kumudini B S, Nandini B N, et al. Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore [J]. Polish J Microbiol, 2009, 58(1): 29-36
- [10] 翟磊, 信春晖, 许玲, 等. 芝麻香型白酒高温大曲产脂肪酶菌株的筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(12): 36-39
ZHAI Lei, XIN Chunhui, XU Ling, et al. Screening and identification of lipase-producing strains from high-temperature Daqu in sesameflavor liquor [J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41(12): 36-39
- [11] 张旭姣, 闫裕峰, 周景丽, 等. 强化多微麸曲制备工艺优化及其在陈醋酒精发酵阶段的应用[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 129-134
ZHANG Xujiao, YAN Yufeng, ZHOU Jingli, et al. Optimization of preparation technology of fortified Fuqu with multi-microorganisms and its application in alcohol fermentation of aged vinegar [J]. Brewing in China, 2020, 39(2): 129-134
- [12] Huang Y G, Wu Q, Xu Y. Isolation and identification of a black *Aspergillus* strain and the effect of its novel protease on the aroma of Moutai-flavoured liquor [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2014, 120(3): 268-276
- [13] QB/T 4257-2011. 全国食品发酵标准化中心. 酿酒大曲通用分析方法[S]
QB/T 4257-2011. National Food Fermentation Standardization Center. General Analysis Method of Daqu [S]
- [14] 雷学俊, 张霞. 包包曲及制曲环境中可培养霉菌的分离与鉴定[J]. 酿酒科技, 2019, 12: 17-22
LEI Xuejun, ZHANG Xia. Optimization of preparation technology of fortified Fuqu with multi-microorganisms and its application in alcohol fermentation of aged vinegar [J]. Brewing Technology, 2019, 12: 17-22
- [15] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
WANG Furong. Wine Analysis and Detection [M]. Beijing:

- Chemical Industry Press, 2005
- [16] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社, 1998
- SHEN Yifang. Baijiu Production Technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998
- [17] 程伟,卓毓崇,杨柳,等.不同工艺对麸曲中酸性蛋白酶活性的影响[J].酿酒科技,2016,12:40-42
- CHENG Wei, ZHUO Yuchong, YANG Liu, et al. Influence of different techniques on acid protease activity in Fuqu [J]. Brewing Technology, 2016, 12: 40-42
- [18] 王晓勇,荆旭,赵恒山,等.应用响应面法对产糖化酶菌株 M1 制曲工艺的优化研究[J].酿酒,2019,46(5):79-83
- WANG Xiaoyong, JING Xu, ZHAO Hengshan, et al. Optimization of koji-making process of strain M1 producing glucoamylase based on response surface methodology [J]. Brewing, 2019, 46(5): 79-83
- [19] 郭燕,钟迟迪,董晓山,等.中高温大曲中酵母菌的分离及其在小曲酒中发酵性能初探[J].食品与发酵工业,2020,46(8): 78-84
- GUO Yan, ZHONG Chidi, DONG Xiaoshan, et al. Isolation and identification of yeast strains from near high temperature Daqu and characterization of their fermentation performance via brewing Baijiu by purebred rice Qu [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(8): 78-84
- [20] 刘茗铭,周阳子,袁乐梅,等.酒曲中高产糖化酶霉菌的筛选及其固态发酵产酶条件优化[J].食品与发酵工业,2018,44(10):118-123
- LIU Mingming, ZHOU Yangzi, YUAN Lemei, et al. The selection of high yield glucoamylase starter and the optimization of its solid fermentation production enzyme [J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(10): 118-123
- [21] YUN Xiachen, XIAO Naguo, JUN Jiexing, et al. Effects of wheat tempering with slightly acidic electrolyzed water on the microbial, biological, and chemical characteristics of different flour streams [J]. LWT, 2020, 118
- [22] Beaumont M. Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* spp [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 75(3): 189-196
- [23] 郭学武,范恩帝,马冰涛,等.中国固态发酵白酒中功能细菌研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(1):280-286
- GUO Xuewu, FAN Endi, MA Bingtao, et al. Research progress in functional bacteria in solid-state fermented Baijiu in China [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(1): 280-286
- [24] 严启梅,陆其刚,沈晓波,等.根霉菌的初筛及在中试绵柔型酿酒中的应用[J].酿酒科技,2018,8:96-100
- YAN Qimei, LU Qigang, SHEN Xiaobo, et al. Screening of a *Rhizopus* strain and its application in pilot scale production of soft-type Baijiu [J]. Brewing Technology, 2018, 8: 96-100
- [25] 张东平.根霉酵母麸曲在牛栏山基酒生产中的应用[J].酿酒, 2011,38(4):29-31
- ZHANG Dongping. Application of *Rhizopus* and yeast bran koji in the production of the basic liquor of Niulanshan distillery [J]. Brewing, 2011, 38(4): 29-31
- [26] 张翠翠,郭波,陈雅轩,等.高质量酒曲的制备工艺及酒曲活力评价[J].安徽农业科学,2019,47(6):166-169,172
- ZHANG Cuicui, GUO Bo, CHEN Yaxuan, et al. Preparation technology of high quality starter and evaluation of starter vitality [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(6): 166-169, 172
- [27] 张杰,程伟,关玉权,等.高糖化力霉菌 Mxzd-001 麸曲的培养工艺优化及应用[J].酿酒科技,2021,1:17-23
- ZHANG Jie, CHENG Wei, GUAN Yuquan, et al. Optimization and application of culture technology of Fuqu using mould Mxzd-001 with high saccharifying power [J]. Brewing Technology, 2021, 1: 17-23
- [28] 孙科,冯希勇,于秋菊,等.卷枝毛霉 SN2017 发酵产银杏黄酮条件优化[J].中国酿造,2020,39(1):93-97
- SUN Ke, FENG Xiyong, YU Qiuju, et al. Fermentation conditions optimization of *Ginkgo biloba* flavonoids by *Mucorcircinelloides* SN2017 [J]. Brewing in China, 2020, 39(1): 93-97
- [29] 张映瞳.卷枝毛霉生物合成番茄红素的研究[D].无锡:江南大学,2017
- ZHANG Yingtong. The study of lycopene biosynthesis in *Mucorcircinelloides* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
- [30] 刘思佳,孙晓东,卢萌萌,等.传统发酵豆酱中产脂肪酶菌株的筛选[J].中国酿造,2015,34(12):34-37
- LIU Sijia, SUN Xiaodong, LU Mengmeng, et al. Screening of lipase-producing strains from traditional fermented soybean paste [J]. Made in China, 2015, 34(12): 34-37