

宋河浓香型白酒酒醅纯培养霉菌群落的组成及功能酶筛选

刘冰冰¹, 刘正宇¹, 宋豪锋¹, 王文丽¹, 田诗超¹, 李学思², 闫培勋², 郭书贤¹

(1. 南阳理工学院, 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室, 河南南阳 473004)

(2. 河南省宋河酒业股份有限公司, 河南鹿邑 477265)

摘要: 为探究宋河浓香型白酒酒醅纯培养霉菌群落组成, 检测纯培养菌株与酒醅发酵过程相关的功能酶活特征, 为白酒相关功能菌株发掘与利用提供依据, 本实验采用纯培养方法, 对不同发酵时间、不同位置酒醅样品中的霉菌进行分离; 根据形态特征去重复后进行 18S rRNA 基因克隆测序, 初步判断其分类地位; 采用点接法进行酒醅发酵相关 5 种功能酶筛选。结果表明, 宋河浓香型白酒酒醅中蕴含丰富霉菌类群, 共获得纯培养霉菌 63 株, 形态去重复后共计 15 株, 归属于: 草本枝孢 (*Cladosporium herbarum*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、沃特曼篮状菌 (*Talaromyces wortmannii*)、嗜松篮状菌 (*Talaromyces pinophilus*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、米曲菌 (*Aspergillus oryzae*)、毛栓菌 (*Trametes hirsuta*)、桔青霉 (*Penicillium citrinum*)、菲律宾青霉 (*Penicillium freii*)、雪白丝衣霉 (*Byssoschlamys nivea*) 及两个潜在新分类单元; 霉菌的纯培养检出率在宋河浓香型白酒酒醅发酵 3~15 d 较高, 之后随发酵时间增加逐渐降低; 酒醅中的纯培养霉菌菌株具有丰富的功能酶活特性, 淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、酯化酶的酶活筛选率分别为: 100%、93.3%、33.3%、73.3%、46.7%, 为后续进一步研究菌株的功能及开发利用奠定基础。

关键词: 宋河; 浓香型白酒; 酒醅; 霉菌; 组成; 功能酶

文章编号: 1673-9078(2019)12-197-207

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.026

Composition and Functional Enzymes of the Pure-culture Mold Community from Fermented Grains of Songhe Nongxiang Liquor

LIU Bing-bing¹, LIU Zheng-yu¹, SONG Hao-feng¹, WANG Wen-li¹, TIAN Shi-chao¹, LI Xue-si², YAN Pei-xun², GUO Shu-xian¹

(1. Henan Key Laboratory of Industrial Microbial Resources and Fermentation Technology, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China) (2. Henan Songhe Distillery Co. Ltd., Luyi 477265, China)

Abstract: In order to explore the community composition of pure-culture mold in the fermented grains of Songhe Nongxiang liquor, and to examine the activities of the functional enzymes related to the pure-culture fermentation process, the pure culture method was used to isolate the molds in fermented grains obtained after different fermentation times and from different positions. The 18S rRNA gene was cloned and sequenced according to the morphological characteristics (after the removal of those repeated ones) to determine preliminarily the classification status. Five kinds of functional enzymes related to fermented grains were screened by the point connection method. The results showed that the fermented grains of Songhe Nongxiang liquor were rich in molds, with totally 63 isolated strains, and 15 strains obtained after the removal of morphological repetition (which belonged to *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Talaromyces wortmannii*, *Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus oryzae*, *Trametes hirsuta*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium freii*, *Byssoschlamys nivea* and two potentially new taxa). The detection rate of pure-culture molds in the fermented grains of Songhe Nongxiang liquor was higher from Day 3 to 15 after fermentation, and then decreased gradually with the screening rates of amylase, cellulase, pectinase, protease and esterase were 100%, 93.3%, 33.3%, 73.3% and 46.7%, respectively, which lays a increase of fermentation time. The pure-culture mold strains in the fermented grains were

收稿日期: 2019-06-27

基金项目: 河南省重大科技专项 (181100211400); 河南省科技攻关计划项目 (162102210114; 172102210419); 南阳市科技攻关计划项目 (KJGG079); 河南省高等学校重点科研项目 (20A180019)

作者简介: 刘冰冰 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 极端环境微生物资源于应用

通讯作者: 郭书贤 (1963-), 男, 教授, 研究方向: 工业微生物资源与应用

rich in active functional enzymes, and the activity foundation for further development and utilization of the strains.

Key word: Songhe; Nongxiang liquor; fermented grains; mold; composition; functional enzymes

我国白酒按照香型一般可以分成酱香型、浓香型、清香型、米香型、凤香型和其它香型。浓香型白酒的酿制过程时间跨度较长,对于宋河浓香型白酒,酒醅的发酵时间历经 60 d。酒醅发酵是白酒产生的重要过程,其中的微生物在白酒酿造及白酒不同香型主要风味物质的生成方面具有重要的功能,研究白酒发酵过程中微生物的群落结构组成及特殊微生物的功能应用,对于进一步解析白酒发酵机理,提高白酒产量及品质具有重要意义^[1,2]。

浓香型白酒发酵过程中起主要作用的微生物为:霉菌、细菌、酵母菌、放线菌四大类^[3]。微生物的群落结构的变化与白酒发酵过程中的理化因子变化具有极其重要的相关性,推动和改变着白酒发酵中理化因子及风味物质的变化^[4]。霉菌作为酒醅微生物的重要组成部分,在酒醅发酵过程中具有重要的作用,其群落组成及酿造过程中的作用是白酒微生物研究的热点^[5]。孙剑秋^[6]等从酱香型白酒酒醅中分离到了链格孢、曲霉、枝孢、散囊菌、地霉、红曲、脉孢菌、拟青霉、青霉、葡萄穗霉和毛霉等。研究者采用纯培养及免培养的方法在茅台酒酒醅中检测到众多霉菌类型,其中曲霉及拟青霉属是主要的组成部分,具有重要的淀粉水解功能^[7]。

霉菌具有丰富的酶活特性,霉菌所产生的多种水解酶按照催化功效可以分为酯化酶、糖化酶、液化酶、蛋白酶、纤维素酶、单宁酶、果胶酶、淀粉酶、过氧化氢酶等^[8,9]。在酒醅发酵前期霉菌的糖化作用方面起着决定性作用,为其他类型的微生物提供用以发酵的能量;在酒醅发酵的中后期,霉菌的酯化作用能够将酵母、细菌等产生的醇、酸等前体物质合成酯类物质,在改善白酒风味和口感方面具有重要的作用^[8,9]。本研究通过传统纯培养方法探究宋河浓香型白酒酒醅霉菌的变化趋势及群落组成,同时对纯培养菌株的功能酶酶活(淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、酯化酶)进行初筛,为进一步工业应用提供宝贵菌种资源。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

2018年3月于宋河酒业股份有限公司浓香型酒池中取酒醅样本,按照酒醅发酵周期,分别采取0、1、3、5、7、9、11、15、21、33、48、60 d酒醅中间及贴近窖壁的上、中、下三个位置的样品,共采集 55

个样品,装于无菌采样袋中,4℃保藏。取不同时间的酒醅中间和贴近窖壁的上中下位置样品分别混合,总计合并为 19 个样品,样品信息如表 1 所示。

表 1 酒醅样品信息

Table 1 The samples information of fermented grains

序号	样品编号	样品描述
1	0	发酵 0 d 窖池中间酒醅样品
2	3Z	发酵 3 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
3	3B	发酵 3 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
4	6Z	发酵 6 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
5	6B	发酵 6 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
6	9Z	发酵 9 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
7	9B	发酵 9 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
8	15Z	发酵 15 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
9	15B	发酵 15 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
10	21Z	发酵 21 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
11	21B	发酵 21 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
12	27Z	发酵 27 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
13	27B	发酵 27 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
14	33Z	发酵 33 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
15	33B	发酵 33 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
16	48Z	发酵 48 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
17	48B	发酵 48 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)
18	60Z	发酵 60 d 窖池中间酒醅样品(上、中、下)
19	60B	发酵 60 d 窖池贴壁酒醅样品(上、中、下)

1.2 主要仪器与设备

生物显微镜(CX31-32RFL),奥林巴斯;立式高温灭菌锅(LD2X-50KBS),上海申安医疗器械厂;电子分析天平(MP2002),上海舜宇恒平科技仪器公司;双人净化工作台(SW-CJ-ZG),苏中净化公司;生化培养箱(BPS-150),上海讯博实验仪器公司;数显恒温摇床(HZQ-B),苏威尔试验仪器公司;高速冷冻离心机(Centrifuge 5430R),Eppendorf;PCR仪(S1000),Bio-Rad;电泳仪(DYY-BC),北京六一仪器厂;凝胶成像仪(JY04S-3C),北京君意东方电泳设备有限公司;超声波清洗仪(SB-800DT),宁波新芝;水纯化系统(SMART-N),立康生物医疗科技控股有限公司;海尔医用冷藏冰箱(HYC-390),海尔医疗电器有限公司;超低温冰箱(DW-86L288),海尔医疗电器有限公司。

1.3 主要培养基

1.3.1 分离培养基

(1) PDA 培养基: 土豆 200 g (切小块煮 20 min 后过滤去渣), 葡萄糖 12 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

(2) 改良 PDA 培养基 (MPDA): 土豆 200 g (切小块煮 20 min 后去渣), 葡萄糖 12 g, 6 d 浓香型酒醅浸出液 50 mL (过滤除菌, 倒板时加入), 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

(3) 燕麦培养基: 燕麦 20 g (20 min 后过滤去渣), 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

1.3.2 酶活检测培养基

1.3.2.1 淀粉酶酶活检测培养基

可溶性淀粉 10 g, 葡萄糖 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 硝酸钾 1 g, 微量盐 1 mL, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

1.3.2.2 纤维素酶活检测培养基

羟甲基纤维素钠 2 g, 葡萄糖 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 硝酸钾 1 g, 微量盐 1 mL, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。(羟甲基纤维素钠水浴加热溶解之后加入至培养基)

1.3.2.3 蛋白酶酶活检测培养基

脱脂牛奶 5 g, 葡萄糖 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 硝酸钾 1 g, 微量盐 1 mL, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。(牛奶 105 °C 分开灭菌, 倒板时混匀)。

1.3.2.4 果胶酶酶活检测培养基

果胶 5 g, 葡萄糖 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 硝酸钾 1 g, 溴酚蓝 0.1 g (与培养基分开灭菌, 倒板时加入), 微量盐 1 mL, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.5。

1.3.2.5 酯化酶酶活检测培养基^[10]

聚乙烯醇 (PVA) 乳化液 100 ml, 葡萄糖 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 硝酸钾 1 g, 微量盐 1 mL, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。聚乙烯醇乳化液: 30 mL 3% 聚乙烯醇, 加入 10 mL 甘油三丁酸酯, 放于冰箱 (5~10 °C) 静置 1~2 h, 超声波破碎仪 100 W 处理 1~2 h, 溶液由分层变成均匀乳白色, 且不再分层。乳化液与培养基分开灭菌, 按照每 100 mL 培养基加入 1 mL 乳化液, 混匀后倒平板 (聚乙烯醇乳化液现用现配)。

微量盐: 硫酸铁 2 g, 硫酸锰 1 g, 硫酸锌 1 g, 硫酸铜 1 g, 蒸馏水 100 mL, pH 自然。

1.4 试验方法

1.4.1 霉菌纯培养分离预实验

酒醅样品平铺于盛有双层灭菌滤纸的培养皿中, 置于超净工作台中鼓风机干 48 h。

1.4.1.1 稀释浓度选取实验

不同发酵时间风干样品经 50 °C 烘箱处理 30 min。取 10 g 样品加入盛有生理盐水 (100 mL) 的三角瓶中, 室温下 120 r/min 振荡 1 h; 三角瓶置于超声波清洗仪中处理 15 s, 以便使附着在酒醅上的微生物充分分散于生理盐水中, 配置成 10^1 的菌悬液; 采用梯度稀释法稀释成浓度为 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 的菌悬液, 分别取 100 μ L 不同浓度的菌悬液均匀涂布于 PDA 培养基上, 37 °C 培养 3 d, 观察不同稀释浓度对于霉菌的分离效果。

1.4.1.2 培养温度选取实验

取发酵 3 d、15 d、27 d、48 d 四个风干酒醅样品, 设置 50 °C 烘箱处理 30 min, 以不加处理样品为对照。采用梯度稀释法稀释样品浓度至 10^3 , 取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于 PDA 培养基, 分别在 22 °C、28 °C、37 °C 培养 3~4 d, 观察不同培养温度对于霉菌的分离效果。

1.4.1.3 抗生素选取

挑取发酵 3 d、15 d、27 d、48 d 四个风干样品, 稀释浓度为 10^3 选择 PDA 培养基分别添加萘啶酮酸 (终浓度为 30 μ g/L)、萘啶酮酸 (终浓度为 50 μ g/L)、氯霉素 (终浓度为 30 μ g/L)、氯霉素 (终浓度为 50 μ g/L)、萘啶酮酸 (终浓度为 30 μ g/L)+氯霉素 (终浓度为 30 μ g/L)、萘啶酮酸 (终浓度为 50 μ g/L)+氯霉素 (终浓度为 50 μ g/L), 同时选不添加抗生素的 PDA 培养基做对照。取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于以上培养基中, 37 °C 培养 3 d, 观察不同抗生素对于霉菌的分离效果。

1.4.2 霉菌纯培养分离、纯化及去重复

结合预实验结果将酒醅样品无菌条件下风干 48 小时, 50 °C 烘箱处理 30 min, 采用梯度稀释方法稀释浓度为 10^3 , 培养基添加萘啶酮酸 (50 μ g/L)+氯霉素 (50 μ g/L) 以抑制细菌的生长。取 100 μ L 菌悬液涂布于分离平板上, 37 °C 培养 3~5 d。所有分离菌株转接至 PDA 培养基上纯化至单菌落, 结合形态特征, 去除重复后作为代表菌株, 转接 PDA 培养基斜面及甘油管 (30% 甘油) 进行保藏, 记录代表菌株形态特征、分离样点及菌株数目。

1.4.3 酒醅中霉菌资源的光学显微镜观察

采用插片法接种代表菌株于 PDA 培养基固体平板上, 37 °C 培养 3~4 d, 取下 2 d、4 d、6 d 的盖玻片, 于 10 \times 、40 \times 光学显微镜下进行检测, 观察菌株形态特征。

1.4.4 18S rRNA 基因测序及系统进化分析

采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (生工, SK8259) 对代表菌株进行基因组的提取, 选用 18S rRNA 基因引物^[11] (NS1 : 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' , NS6 : 5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3') 进行 PCR 扩增。扩增体系为 2×Taq PCR StarMix (康润生物), 10 μL; 引物, 各 1 μL; 模板 DNA, 1 μL; 去离子水, 7 μL。具体反应条件为 94 °C, 预变性 5 min; 94 °C, 30 s; 54~57 °C, 30 s; 72 °C, 延伸 30 s; 循环 30 次。将 PCR 产物送上海生物工程 (上海) 股份有限公司进行 18S rRNA 基因克隆测序。选用 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 18S rRNA 基因序列比对, 初步判断菌株分类地位。从 NCBI 数据库下载相近序列, 利用 ClustalX^[12] 软件进行序列相似性比对, 采用邻接法通过 MEG 5^[13] 构建系统发育 N-J (Neighbour joining) 树^[14], 结合菌株形态特征, 判断菌株进化地位。结合酒醅不同发酵时间代表菌株分离数量, 构建不同发酵时间分离菌株的柱状图。

1.4.5 功能酶活筛选

挑选形态去重复后的代表菌株, 采用点植法, 分别接种于淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、酯化酶酶活检测平板中, 37 °C 培养箱 3~4 d。采用碘液染色, 观察菌株周边透明圈有无判断产淀粉酶特性; 采用 0.2% 的刚果红染色 30 min, 用 2% 的 NaCl 浸泡冲洗至洗脱液为无色, 观察菌株周边透明圈有无判断产纤维素酶特性; 果胶酶催化果胶分解, 产生果胶酸, 使溴酚蓝指示剂变色, 从而使初筛培养基上产生黄绿色或浅蓝紫色透明圈, 观察菌落周边有无淡蓝紫色或黄绿色透明圈判断菌株产果胶酶特性; 观察菌落周边透明圈有无, 判断产蛋白酶、酯化酶特性。观察并记录水解圈产生情况, 每组三个重复, 计算菌株的功能酶活菌株比例。

2 结果与分析

2.1 纯培养分离效果

2.1.1 预实验结果

采用 50 °C 预处理 30 min, 37 °C 培养, 尤其在发酵 15 d 之后的样品中能够减少酵母菌的影响, 对霉菌的分离效果较好。由于酒醅发酵时间的不同, 酒醅中的理化性质发生一定变化^[15], 采用稀释涂布法对宋河酒醅样品霉菌类群进行分离, 霉菌的种类及数量随发酵时间发生一定变化。不同样品不同浓度的霉菌检出数量如表 2 所示。结果表明, 酒醅发酵 15 d 之后, 霉

菌的纯培养分离数量逐步降低, 可能酒醅中的理化参数发生了变化, 尤其是酒精含量及酸度的增加, 使得霉菌的数量明显减少。15 d 后的样品相对于酒醅发酵的前期霉菌的分离数量减少明显。综上所述, 在分离试验中, 样品采用 50 °C 预处理 30 min、选用 10⁻³ 作为稀释浓度、培养基中添加萘啶酮酸 (50 μg/L) + 氯霉素素 (50 μg/L) 对于霉菌的分离效果较好。

表 2 酒醅样品不同稀释浓度霉菌检出数量

Table 2 Number of molds detected in fermented grains samples with different dilution concentrations

样品号	霉菌数			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
0	*	*	2	1
3Z	*	*	2	1
3B	*	*	3	1
6Z	*	*	2	1
6B	*	*	3	0
9Z	*	*	3	1
9B	*	*	2	0
15Z	*	1	3	0
15B	*	1	1	1
21Z	*	2	1	0
21B	*	2	2	0
27Z	*	0	1	0
27B	*	0	1	1
33Z	1	1	2	0
33B	0	0	0	0
48Z	0	1	1	0
48B	0	0	0	1
60Z	1	0	1	0
60B	0	0	0	0

注: *细菌或者酵母数量过多, 成片分布, 无法在平板上形成单个菌落形态。

2.1.2 纯培养分离效果及 18S rRNA 基因测序分析

三种培养基, 总计分离到 63 株霉菌。经形态去重后共获得 15 株霉菌。送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 18S rRNA 基因克隆测序, 经 NCBI 数据库比对, 初步判断这 15 株纯培养菌株的分类地位分别为: 草本枝孢 (*Cladosporium herbarum*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、沃特曼篮状菌 (*Talaromyces wortmannii*)、嗜松篮状菌 (*Talaromyces pinophilus*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、米曲菌 (*Aspergillus oryzae*)、毛栓菌 (*Trametes hirsuta*)、桔青霉 (*Penicillium citrinum*)、菲律宾青霉 (*Penicillium freii*)、雪白丝衣

霉 (*Byssochlamys nivea*) 以及两个潜在新分类单元 New taxon、New taxon 2。具体菌株分类信息如表 3 所示。

通过系统进化树构建 (图 1), 发现 GPF006 与 GPF022 单独位于一个分支, 他们的 18S rRNA 基因与 *Paecilomyces pascuus* 最为相似, 相似度分别为 94.90%、94.83%; 与 *Sagenomella griseoviridis* 的相似性分别为 93.90%、93.86%; 与壮观丝衣霉 (*Byssochlamys spectabilis*) 的相似性分别为 94.05%、93.90%, 从系统进化 NJ 树上也能看出, GPF006 与 GPF022 的分支与其他属明显处于不同分支, 且进化距离较远, 结合 18S rRNA 测序结果初步判断可能是代表一个新的分类单元。GPF007 与 GPF008 的 18S

rRNA 基因与壮观丝衣霉 (*Byssochlamys spectabilis*) 最相似, 相似性分别为 90.35%、90.71%, 与 *Byssochlamys zollerniae* 的相似性分别为 90.23%、90.60%, 与 *Paecilomyces pascuus* 的相似性分别为 90.01%、90.36%, 与 *Sagenomella griseoviridis* 的相似性分别为 89.90%、90.21%。从系统进化 NJ 树上也能看出, GPF007 与 GPF008 的分支与其他属明显处于不同分支, 且进化距离较远, 结合 18S rRNA 测序结果初步判断可能是代表一个新的分类单元。酒醅中的微生物主要来自于酒曲、窖泥及周围环境, 分离得到的两个潜在新分类单元主要出现在 6~15 d, 且最初是在靠近窖壁的地方分离到的, 所以判断其可能来自于宋河浓香型白酒窖池酒泥。

表 3 宋河浓香型酒醅纯培养霉菌 18S rRNA 基因相似性、形态特征及酶活性信息表

Table 3 The information of 18S rRNA gene similarity, strain morphological characteristics and functional enzymes screening of mold isolated from Songhe nongxiang liquor fermented grains

菌号	相似菌株	相似度/%	形态特征	淀粉酶	纤维素酶	果胶酶	蛋白酶	酯化酶
GPF001	草本枝孢 (<i>Cladosporium herbarum</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地绒状, 呈灰绿色, 中间微凸, 周边平铺; 菌落背面为白色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	+	+
GPF002	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地丝绒状, 呈黑褐色, 不规则的辐射状沟纹; 菌落背面为黄褐色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	+	+
GPF003	沃特曼篮状菌 (<i>Talaromyces wortmannii</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地绒状, 初白色、黄色, 后变为黄褐色; 背面无色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	-	+
GPF004	嗜松篮状菌 (<i>Talaromyces pinophilus</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地絮绒状, 中间突起边缘平铺, 颜色为白色; 菌落背面白色。显微特征如图 3 所示。	+	-	-	+	+
GPF005	杂色曲霉 (<i>Aspergillus versicolor</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地絮绒状, 中心突起, 呈橄榄绿色, 边缘白色绒毛状放射性平铺; 菌落背面呈淡褐色, 有黄褐色色素分泌于培养基中。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	-	-
GPF006	(<i>Paecilomyces pascuus</i>)	94.90	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地绒状, 中间突起为灰绿色, 边缘为灰白色; 菌落背面灰绿色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	+	+
GPF007	壮观丝衣霉 (<i>Byssochlamys spectabilis</i>)	90.35	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地绒状, 白色; 菌落背面白色。显微特征如图 3 所示。	+	+	+	+	+
GPF008	壮观丝衣霉 (<i>Byssochlamys spectabilis</i>)	90.71	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地绒状, 初为白色, 后为灰绿色, 边缘为灰白色; 菌落背面灰绿色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	+	+

转下页

接上页

GPF010	毛栓菌 (<i>Trametes hirsute</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质绒状, 中心平并呈现黄绿色, 边缘黄白色平铺; 菌落背面呈黄绿色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	+	+
GPF011	毛栓菌 (<i>Trametes hirsute</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质絮绒状, 中心突起并呈现深绿色, 边缘白色绒状平铺; 菌落背面呈黄绿色。显微特征如图 3 所示。	+	+	-	+	+
GPF012	菲律宾青霉 (<i>Penicillium freii</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落中心有脐状突起, 绒毛状, 边缘整齐, 初期白色, 渐变为橄榄绿色, 边缘白色; 菌落背面褐色, 有褐色分泌物。显微特征如图 3 所示。	+	+	+	+	+
GPF013	雪白丝衣霉 (<i>Byssochlamys nivea</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落呈白色散射状, 中间质地绒状, 凹凸不平, 边缘平铺散射; 菌落背面为白色。显微特征如图 3 所示。	+	-	-	-	+
GPF020	米曲菌 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落呈黄绿色质地疏松; 菌落背面无色。显微特征如图 3 所示。	+	+	+	+	+
GPF021	桔青霉 (<i>Penicillium citrinum</i>)	100.00	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地毡绒状, 中间为灰绿色, 边缘为灰白色; 菌落背面灰绿色。显微特征如图 3 所示。	+	+	+	-	-
GPF022	(<i>Paecilomyces pascuus</i>)	94.83	PDA 培养基上 37 °C 培养 3 d, 菌落质地绒状, 中间突起为灰绿色, 边缘为灰白色, 绒状, 背面无色。显微特征如图 3 所示。	+	+	+	+	+

注: +, 阳性; -, 阴性。

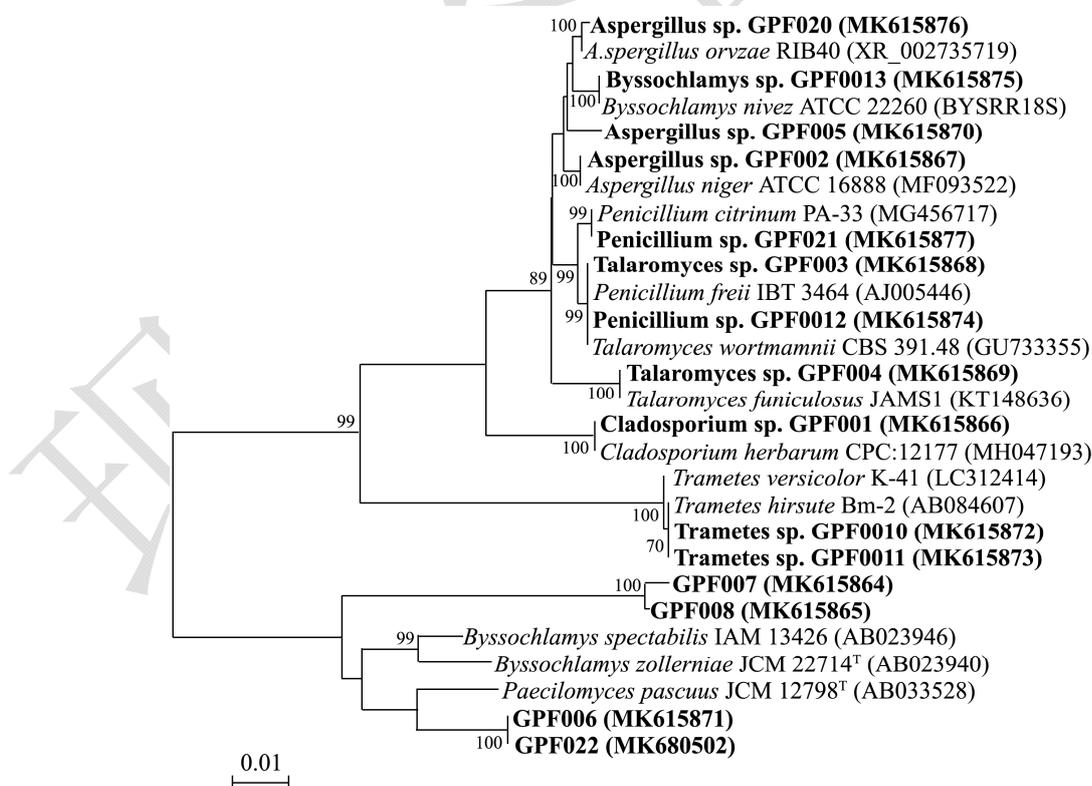


图 1 宋河浓香型白酒酒醅可培养霉菌 18S rRNA 基因系统发育 N-J 树

Fig.1 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequences of culturable mold isolated from Songhe nongxiang liquor fermented grains

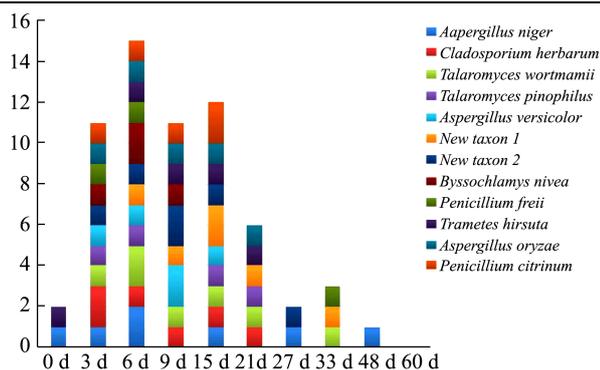


图1 宋河浓香型白酒酒醅不同发酵时间可培养霉菌群落组成分布情况

Fig.1 Community composition of culturable mold isolated from different fermentation stages of Songhe nongxiang liquor fermented grains

酒醅发酵是微生物动态变化的过程，酒醅中的理化参数与微生物的种类及数量具有一定变化规律^[16]。张晓娟等^[17]对四川浓香型白酒酒醅真菌采用纯培养的方法获得的菌株主要为曲霉属 (*Aspergillus sp.*)、红曲霉属 (*Monascus sp.*)、根霉属 (*Rhizopus sp.*)。孙剑秋等^[6]北大仓酱香型白酒酒醅中分离到链格孢、曲霉、枝孢、散囊菌、地霉、红曲、脉孢菌、拟青霉、青霉、葡萄穗霉和毛霉等；霉菌的数量随发酵时间的不同呈

现一定的规律，尤其是发酵后期，一直是处于降低的趋势。从纯培养的霉菌群落组成统计 (图 2) 来看，宋河浓香型白酒酒醅中霉菌的种类及数量随着酒醅发酵时间具有一定的变化规律。在发酵初期，0 d 的酒醅样品刚刚投入酒池，检出的霉菌数量及种类极少，主要来自于酒醅的材料及周围环境；随着生长环境适宜，营养成分充足，酒曲中及酒泥中的霉菌开始在酒醅中大量增殖，在 3~15 d 中，霉菌的检出种类及数目明显增加，共检出 47 株霉菌；21 d 之后，随着发酵的进行，分离到的霉菌种类及数量逐渐减少，尤其 33 d 之后的酒醅样品中分离到的霉菌非常少，这可能与发酵过程中窖池营养物质快速消耗、氧气含量降低、酸度迅速升高密切相关^[18]。李光辉等的研究中也报道了酒醅微生物功能多样性与 pH 值的显著降低有着明显的关系^[19]。酒醅中乙醇、总酸、总酯含量与微量香味成分随着发酵时间的延长呈现一定规律性，酒醅微生物的变化调控着理化因子及风味物质的变化^[20]。

2.1.3 纯培养菌株形态观察

通过平板形态观察及显微形态观察，记录菌株的形态特征，菌株形态特征描述见表 3，平板形态及显微形态 (40×) 如图 3 所示。

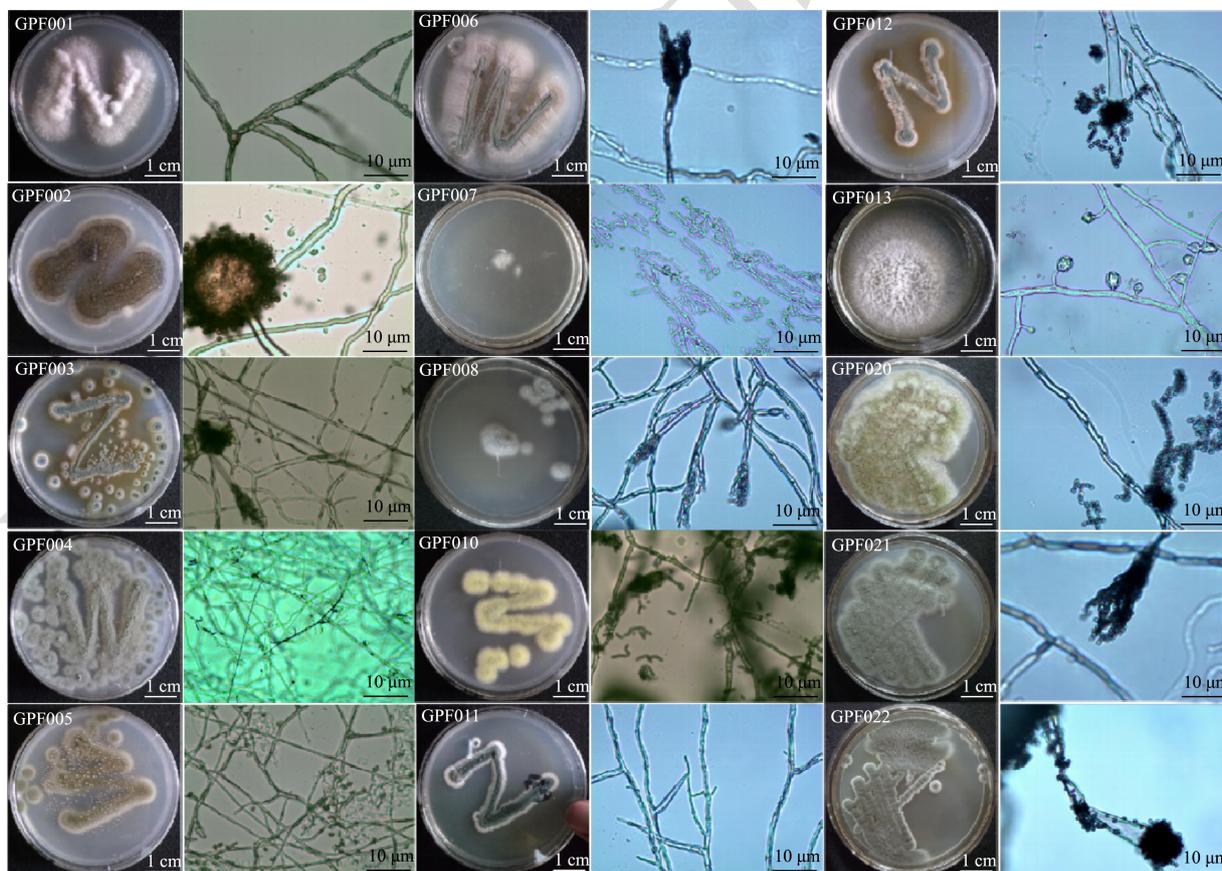


图3 分离菌种的菌落形态及显微形态

Fig.3 Colony morphology and microscopic morphology of isolated strains

2.2 菌株功能酶活性检测

从宋河浓香型白酒酒醅中分离出的霉菌具有丰富的酶活特性,酶活检测结果如表三所示。

白酒的酒醅富含丰富有机质,微生物具有丰富的酶系,在酿酒过程中起着非常重要的作用。微生物具有淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、脂肪酶等,能够把复杂的有机物降解成小分子的化学物质^[21];具有酯化酶,能够把小分子的化学物质合成更为复杂的化学物质^[22]。霉菌作为酒醅微生物的重要组成部分,在酒醅发酵各个时期,具有重要酶活作用^[4,6]。本研究采用平板法对淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、酯化酶等酶活进行初筛。酒醅经霉菌的糖化作用产生葡萄糖及小分子糖类,能够为其他微生物尤其是酵母菌的前期增殖及后期的无氧发酵产生乙醇提供物质基础。霉菌中的淀粉酶为 α -淀粉酶,可水解淀粉生成麦芽糖、葡萄糖及寡糖等,为其他微生物提供易利用碳源。研究表明酒醅中的淀粉含量及还原糖含量随发酵时间发生一定的变化,黄治国等^[23]对酒醅不同发酵时间的淀粉含量及还原糖含量的研究中发现,酒醅中淀粉含量随发酵时间的增加呈下降趋势,还原糖含量在发酵前期呈上升趋势,发酵中后期呈下降趋势。谢玉球等^[24]从洋河酒厂浓香型高温大曲中得到一株米曲霉,具有较高糖化酶作用。在浓香型白酒酿造过程中,黑曲霉主要产生糖化型淀粉酶,水解产物多为葡萄糖,能为酵母菌发酵所利用,促进出酒率的提高^[25]。黄曲霉(*Aspergillus flavus*)以液化型淀粉酶为优势酶,产物主要为糊精、麦芽糖和葡萄糖等,出酒率虽然低,但酒品质较好^[26]。根霉(*Rhizopus*)的淀粉酶活性很高,可以生成乳酸、反丁烯二酸、琥珀酸以及微量酒精,还能产生芳香脂类物质^[27]。

微生物的纤维素酶能够把大分子的纤维素水解成寡糖或单糖,在白酒酿制过程中可以促进淀粉释放,增强糖化作用^[28,29]。霉菌中的木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)等在工业纤维素酶的生产中具有广泛应用价值^[30]。王世伟等从北大仓酱香型白酒大曲中分离一株高产纤维素酶的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),其滤纸和羧甲基纤维素为底物的酶活力达到 181.32 U/mL 和 379.21 U/mL^[8]。本实验霉菌的淀粉酶、纤维素酶的初筛检出率分别为 100%、93.3%,绝大多数的菌株既具有淀粉酶活性、同时具有纤维素酶活性。

高等植物细胞壁中含有果胶,酒醅中的霉菌具有果胶酶,有助于降低大曲粘度及促进酒醅谷物原料细胞壁的降解,促进细胞内淀粉等物质的析出,在加速

霉菌糖化作用方面具有重要应用^[31]。目前已报道的具有果胶酶的霉菌主要集中在曲霉属(*Aspergillus*),其中黑曲霉(*Aspergillus niger*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)等具有较高的酶活特性;另外在灰霉菌属(*Botrytis*)、镰孢菌属(*Fusarium*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)、核盘菌属(*Sclerotium*)、木霉(*Trichoderma*)和玉圆斑菌属(*Cochliobolus*)等中也有报道^[32,33]。本实验果胶酶的初筛检出率为 33.3%,其中米曲菌(*Aspergillus oryzae*) (GPF020)及 New taxon 1 (GPF007)、New taxon 2 (GPF022)初筛酶活较明显。

微生物的蛋白酶能够水解蛋白质成短肽或者氨基酸,在白酒的发酵过程中,蛋白质的含量过高会影响白酒的口感,消解酒醅中的蛋白质含量,对于改善白酒口感有重要作用。黄永光等发现白酒酒曲中的米曲菌(*Aspergillus oryzae*)的蛋白酶活力达到 324.72 U/mL,具有较高的应用价值^[34]。茅台镇酱香白酒酿造过程中,*Aspergillus henneberguii*的蛋白酶具有重要的作用^[35]。魏丕伟等^[36]在对大曲中高产酸性蛋白酶霉菌的分离鉴定研究发现,*Penicillium polonicum*(意大利青霉)以及*Aspergillus oryzae*(米曲霉)具有较好的酶活特性。本实验蛋白酶的初筛检出率为 73.3%,其中黑曲霉(*Aspergillus niger*) (GPF002)、嗜松篮状菌(*Talaromyces pinophilus*) (GPF004)、毛栓菌(*Trametes hirsuta*) (GPF011)、米曲菌(*Aspergillus oryzae*) (GPF020)初筛酶活较明显。

白酒中的乳酸乙酯,乙酸乙酯,丁酸乙酯、己酸乙酯等是重要的风味物质^[8,37]。酯化酶是白酒的酿制过程中香味物质(酯类)合成的重要功能酶,能够催化酸类与醇发生酯化作用合成各种酯类,尤其是在浓香型白酒中起到增酯增香,提高白酒品质的作用^[38]。在白酒的酿制过程中,酯类物质的生成以细菌和霉菌的酯化作用为主^[34,39]。研究表明能够产生酯化酶的霉菌有:青霉、镰孢霉、红曲霉、黑曲霉、黄曲霉、根霉、毛霉、犁头霉、须霉、白地霉和核盘菌等^[40]。本次实验中酯化酶检测率为 46.7%,尤其是毛栓菌(*Trametes hirsuta*) (GPF010, GPF011)、New taxon 1 (GPF007)、New taxon 2 (GPF006)初筛酶活较明显。两个潜在新物种,在酯合成作用方面效果比较明显。宋河浓香型白酒酒醅中的霉菌的酶系种类丰富,酶活检测率较高,酶活检测结果如图表 3 所示。酒醅不同发酵时期,微生物的种类及数量发生一定变化,与之对应的酶活也随之发生一定变化^[41]。结合不同发酵时间分离菌株种类及数目,发现在酒醅发酵的前期,分离到的霉菌的淀粉酶、纤维素酶的检出率较高,在酒

醇发酵中后期,这两个时期分离到的霉菌的蛋白酶及酯化酶的检出率较高。

3 结论

3.1 从宋河浓香型白酒酒醅中共分离到 63 株霉菌,形态去重复之后保留 15 株,分别为:草本枝孢(*Cladosporium herbarum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、沃特曼篮状菌(*Talaromyces wortmannii*)、嗜松篮状菌(*Talaromyces pinophilus*)、杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)、米曲菌(*Aspergillus oryzae*)、毛栓菌(*Trametes hirsuta*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、菲律宾青霉(*Penicillium freii*)、雪白丝衣霉(*Byssochlamys nivea*)以及两个潜在新分类单元(New taxon 1 and New taxon 2)。浓香型白酒酒醅中蕴藏丰富的霉菌资源,在固态发酵的过程中,发酵初期 3~15 d,霉菌数量变化是逐步增加趋于稳定;15 d 之后,霉菌的检出数目锐减。酒醅霉菌具有丰富的功能酶活特性,在浓香型白酒酒醅固态发酵中起着重要的作用。酒醅中的霉菌淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、酯化酶活检测率分别为:100%、93.3%、33.3%、73.3%、46.7%。绝大多数霉菌都同时具有淀粉酶及纤维素酶活性,尤其在酒醅发酵的前期,为其他微生物的生长提供营养物;宋河浓香型白酒酒醅霉菌的蛋白酶活性检出率高,一方面能够降解蛋白质为其他微生物提供氮源,另一方面也有助于酒体的澄清。另外较高的酯化酶筛选率,说明宋河浓香型白酒酒醅霉菌在酒的风味物质的形成与变化过程中可能具有重要的作用,尤其是两个候选新物种在酯化酶方面具有一定优势,为后续进一步研究相关发酵产物、探究在宋河浓香型白酒酒醅发酵中的作用机制奠定基础。

3.2 霉菌作为重要的酒醅微生物组成部分,与细菌和酵母之间的相互作用,共同影响原料的利用率及出酒率,同时在酒的品质及风味物质的呈现方面具有重要的影响。中国是白酒消费大国,酒文化历史悠久,生产白酒的厂商也遍布全国各地。本论文针对宋河浓香型白酒酒醅的霉菌群落结构及相关功能酶进行研究,以期对酒醅霉菌的分离方法进行优化筛选一批具有酶活性质的菌株,探究浓香型白酒酒醅霉菌功能菌株的群落结构,对于揭示浓香型白酒酿造微生物作用机制,科学构建宋河浓香型白酒霉菌菌种资源库具有重要意义;筛选到的具有丰富酶系的酒醅霉菌资源,为今后科学选用适宜微生物进行白酒酿制生产工艺改进提供宝贵的菌种资源及实验数据支撑;为进一步提高宋河浓香型白酒产量及改善风味,增强企业自身竞争力奠定了基础。

参考文献

- [1] 赵爽,杨春霞,徐曼,等.浓香型白酒生产中酿酒微生物研究进展[J].食品与发酵科技,2012,48(1):24-29
ZHAO Shuang, YANG Chun-xia, XU Man, et al. A review of research progress about Luzhou-flavor liquor making microbes in liquor production [J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48(1): 24-29
- [2] 赵东,乔宗伟,彭志云.浓香型白酒发酵过程中酒醅微生物区系及其生态因子演变研究[J].酿酒科技,2007,7:37-39
ZHAO Dong, QIAO Zong-wei, PENG Zhi-yun. Investigation on the microflora in fermented grains & the evolution of its ecological factors during the fermentation of Luzhou-flavor liquor [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007, 7: 37-39
- [3] 黄治国,罗惠波,侯海波,等.浓香型白酒酒醅细菌群落结构及其变化规律[J].中国酿造,2012,31(3):100-104
HUANG Zhi-guo, LUO Hui-bo, HOU Hai-bo, et al. Constitute and changes of bacterial community in grains of Luzhou-flavor liquor [J]. China Brewing, 2012, 31(3): 100-104
- [4] 金伟,谢玉球,时晓,等.浓香型白酒生产中酿酒微生物研究与应用现状[J].酿酒科技,2016,3:106-109
JIN Wei, XIE Yu-qiu, SHI Xiao, et al. Research on & application of liquor-making microbes in Nongxiang baijiu production [J]. Liquor-making Science & Technology, 2016, 3: 106-109
- [5] 徐佳,邱树毅,胡宝东,等.酱香型白酒酿造过程中霉菌的功能性研究[J].酿酒,2015,42(5):32-38
XU Jia, QIU Shu-yi, HU Bao-dong, et al. Research on functions of the mold in Maotai-flavor liquor brewing [J]. Liquor Marking, 2015, 42(5): 32-38
- [6] 孙剑秋,刘雯雯,臧威,等.酱香型白酒酒醅中霉菌群落组成与功能酶活性[J].中国食品学报,2013,8:239-247
SUN Jian-qiu, LIU Wen-wen, ZANG Wei, et al. Community composition of moulds from fermented grains of Maotai-flavor liquor and their enzyme activities [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 8: 239-247
- [7] Chen, Bi, Qun Wu, and Yan Xu. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. International journal of food microbiology, 2014, 179: 80-84
- [8] 王世伟,王卿惠,芦利军,等.白酒酿造微生物多样性、酶系与风味物质形成的研究进展[J].农业生物技术学报,2017,

- 25(12):2038-2051
WANG Shi-wei, WANG Qing-hui, LU Li-jun, et al. Research progress of the microbial diversity, enzyme system and formation of flavor compounds in Chinese flavor liquor [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(12): 2038-2051
- [9] 李绍亮,李学思,侯小歌,等.宋河酒曲中主要霉菌的鉴定及其产酶特性的研究[J].酿酒,2016,43(6):24-29
LI Shao-liang, LI Xue-si, HOU Xiao-ge, et al. Study on the Identification of important mould isolated from songhe daqu and the function of enzyme production by mould [J]. Liquor Marking, 2016, 43(6): 24-29
- [10] 杜春迎.浓香型大曲中高产酯化酶菌株的筛选及产酶条件优化[D].哈尔滨:黑龙江大学,2012
DU Chun-ying. Screening of high yield esterifying enzyme strain in luzhou-flavor Daqu and optimization of enzyme producing conditions [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2012
- [11] 韩思宁,金龙国,蒋凌雪,等.抗草甘膦真菌的分离鉴定及其功能基因表达[J].作物杂志,2018,28(6):82-88
HAN Si-ning, JIN Long-guo, JIANG Ling-xue, et al. Isolation identification and functional gene expression of glyphosate-resistant fungus [J]. Crops, 2018, 28(6): 82-88
- [12] Bascom-Slack C A, Ma C, Moore E, et al. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests [J]. Microbial Ecology, 2009, 58(2): 374-383
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4 (4): 406-425
- [15] 方军,张宿义.浓香型白酒发酵过程中各因子动态变化研究[J].酿酒科技,2012,1:47-50
FANG Jun, ZHANG Su-yi. Research on dynamic change of each fermenting factor during the fermentation of Luzhou-flavor liquor [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2012, 1: 47-50
- [16] 刘凡,周新虎,陈翔,等.洋河浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构解析及其与有机酸合成的相关性[J].微生物学报,2018,58(12):2087-2099
LIU Fan, ZHOU Xin-hu, CHEN Xiang, et al. Microbial community of fermented grains and its correlation with organic acids biosynthesis during Yanghe strong-aroma liquor manufacturing process [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 2087-2099
- [17] 张晓娟,夏珊,徐坤,等.浓香型白酒酒醅可培养真菌的分离、鉴定及系统发育分析[J].酿酒科技,2015,7:28-33
ZHANG Xiao-juan, XIA Shan, XU Kun, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of culturable fungi in fermented grains of Nongxiang baijiu (liquor) [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 7: 28-33
- [18] Yan S, Wang S, Wei G, et al. Investigation of the main parameters during the fermentation of Chinese Luzhou flavour liquor [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(1): 145-154
- [19] 李光辉,程铁轶,黄治国,等.浓香型白酒酒醅微生物群落代谢分析[J].酿酒科技,2009,3:29-32
LI Guang-hui, CHENG Tie-yuan, HUANG Zhi-guo, et al. Metabolic analysis of the microbial community in the fermented grains of Luzhou-flavour liquor [J]. Liquor-making Science & Technology, 2009, 3: 29-32
- [20] 吕辉,张宿义,冯治平,等.浓香型白酒发酵过程中微生物消长与香味物质变化研究[J].食品与发酵科技,2010,46(3): 37-40,59
LYU Hui, ZHANG Su-yi, FENG Zhi-ping, et al. Investigation on the microbial variation and the change of aroma compositions during the fermentation of Luzhou-flavor liquor [J]. Food and Fermentation Technology, 2010, 46(3): 37-40, 59
- [21] 张志刚,吴生文,陈飞.大曲酶系在白酒生产中的研究现状及发展方向[J].中国酿造,2011,30(1):13-16
ZHANG Zhi-gang, WU Sheng-wen, CHEN Fei. Research and development of application of enzymes in Daqu in liquor production [J]. China Brewing, 2011, 30(1): 13-16
- [22] 张楷正,黄海.浓香型白酒酿造中的酯化酶研究及应用进展[J].酿酒科技,2016,2:93-96
ZHANG Kai-zheng, HUANG Hai. Research progress in and application of esterifying enzyme in the production of Nongxiang baijiu [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016, 2: 93-96
- [23] 黄治国,侯海波,罗惠波,等.浓香型白酒酒醅发酵过程中淀粉和还原糖的变化规律研究[J].中国酿造,2013,31(7):107-110
HUANG Zhi-guo, HOU Hai-bo, LUO Hui-bo, et al. Changes of starch and reducing sugars of fermented grains in fermentation of strong-flavor liquor [J]. China Brewing, 2013, 31(7): 107-110

- [24] 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
XIE Yu-qiu, SHI Xiao, ZHOU Er-gan, et al. Separation and identification of mold strain with high-yield of glucoamylase from Yanghe daqu and optimization of its solid-state fermentation conditions [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016, 4: 39-42
- [25] 黄河.酒用酸性蛋白酶在酒精浓醪发酵中的应用[J].酿酒科技,2010,10:72-74
HUANG He. Application of acid protease in high concentration mash fermentation of corn alcohol [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2010, 10: 72-74
- [26] 夏艳秋,朱强,汪志君.高产糖化酶黄曲霉菌的选育及初步应用[J].微生物学通报,2009,36(10):1542-1546
XIA Yan-Qiu, ZHU Qiang, WANG Zhi-Jun. Breeding of high-glucoamylase activity aspergillus flavus and application [J]. Microbiology, 2009, 36(10): 1542-1546
- [27] 田国政.优势酒曲根霉产酶条件及耐硒能力的研究[D].武汉:华中农业大学,2006
TIAN Guo-zheng. Research for superior jiuqu *Rhizopus* on enzyme producing conditions and selenium bearing capacity [J]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006
- [28] 郭建华,刘冀,郭宏文,等.白酒酒醅中纤维素酶产生菌的产酶活力与其生理生化特性的研究[J].食品工业科技,2013, 34(5):177-180
GUO Jian-hua, LIU Ji, GUO Hong-wen, et al. Study on cellulase activity production and physiological and biochemical characteristics of cellulase producing bacteria isolated from wine fermented grains [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34 (5): 177-180
- [29] 李永博,暴金磊,万敏,等.酒醅中高产纤维素酶菌株的筛选及其酶学性质[J].食品工业科技,2017,38(24):109-113
LI Yong-bo, BAO Jin-lei, WAN Min, et al. Study on screening of high-yield cellulase strains in the fermented grains and its enzymatic properties [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(24): 109-113
- [30] 李燕红,赵辅昆.纤维素酶的研究进展[J].生命科学,2005, 17(5):392-397
LI Yan-hong, ZHAO Fu-kun. Advances in cellulase research [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2005, 17(5): 392-397
- [31] 张志刚,吴生文,陈飞.大曲酶系在白酒生产中的研究现状及发展方向[J].中国酿造,2011,30(1):13-16
ZHANG Zhi-gang, WU Sheng-wen, CHEN Fei. Research and development of application of enzymes in Daqu in liquor production [J]. China Brewing, 2011, 30(1): 13-16
- [32] 薛长湖,张永勤,李兆杰,等.果胶及果胶酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2005,24(6):94-99
XUE Chang-hu, ZHANG Yong-qin, LI Zhao-jie, et al. Recent development of pectin and pectolytic enzyme [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24 (6): 94-99
- [33] 车鑫.高产酸性果胶酶霉菌的选育[D].咸阳:西北农林科技大学,2018
CHE Xin. Breeding of High-yield acid Pectinase strain [D]. Xianyang: Northwest agriculture and forestry university, 2018
- [34] 王鹏昊,关统伟,邓奥宇,等.酒曲中高产蛋白酶和 α -淀粉酶霉菌菌株的筛选与分子鉴定[J].酿酒科技,2016,6:61-64
WANG Peng-hao, GUAN Tong-wei, DENG Ao-yu, et al. Screening and molecular identification of fungal strains with high-yield of protease and α -amylase [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016, 6: 61-64
- [35] 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 Yong-guang, XU Yan. Isolation of *Aspergillus* from Jiangxiang liquor fermentation environment and enzyme secretion stress conditions of *Aspergillus hennebergii* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(8): 814-821
- [36] 魏丕伟,王凌云,罗惠波,等.大曲中高产酸性蛋白酶霉菌的分离鉴定[J].食品与发酵科技,2014,50(4):1-4
WEI Pi-wei, WANG Ling-yun, LUO Hui-bo, et al. Isolation and identification of acid-protease producing fungi from Daqu [J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(4): 1-4
- [37] 康文怀,徐岩.中国白酒风味分析及其影响机制的研究[J].北京工商大学学报(自然科学版),2012,30(3):53-58
KANG Wen-huai, XU Yan. Review on aroma compounds and its formation mechanism in Chinese liquors [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2012, 30(3): 53-58
- [38] 王世伟,王卿惠,芦利军,等.白酒酿造微生物多样性、酶系与风味物质形成的研究进展[J].农业生物技术学报,2017, 25(12):2038-2051
WANG Shi-wei, WANG Qing-hui, LU Li-jun, et al. Research progress of the microbial diversity, enzyme system and formation of flavor compounds in Chinese flavor liquor [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(12): 2038-2051