

# 宜宾多粮型白酒窖房空气中产糖化酶的霉菌

蒲 岚<sup>2</sup>, 王 涛<sup>1,2</sup>, 周宇科<sup>2</sup>, 姚 韬<sup>1</sup>, 游 玲<sup>2</sup>, 王 松<sup>1,2</sup>, 冯瑞章<sup>1,2</sup>

(1. 宜宾学院生命科学与食品工程学院, 四川 宜宾 644000; 2. 宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644000)

**摘要:** 对分离自窖房空气中的 104 株霉菌产糖化酶能力进行检测, 发现其中有 14 株具备产糖化酶能力。结合形态、特征和基于 ITS nu-rDNA 的系统发育分析, 此 14 株菌分属于 *Aspergillus* (6 株)、*Mucor* (3 株)、*Penicillium* (2 株)、*Rhizopus* (1 株)、*Gibberella* (1 株)、*Cladosporium* (1 株) 6 个属, *Aspergillus* 为优势属, 显示浓香型白酒窖房空气中存在多样性较为明显的产糖化酶霉菌。

**关键词:** 窖房; 霉菌; 糖化酶; ITS nu-rDNA

中图分类号: TS262.3; TS261.1; TS261.4; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)09-0029-03

## Research on Molds Producing Glucoamylase in the Air of Fermentation Workshop of Multi-grains Luzhou-flavor Liquor in Yibin

PU Lan<sup>2</sup>, WANG Tao<sup>1,2</sup>, ZHOU Yuke<sup>2</sup>, YAO Tao<sup>2</sup>, YOU Ling<sup>2</sup>, WANG Song<sup>1,2</sup> and FENG Ruizhang<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science & Food Engineering, Yibin, Sichuan 644000; 2. Key Lab of Fermentation Resources and Application, Yibin College, Yibin, Sichuan 644000, China)

**Abstract:** 104 mold strains were isolated in the air of fermentation workshop of multi-grains Luzhou-flavor liquor. Among them, 14 mold strains were capable of producing glucoamylase. According to the morphological features and ITS nu-rDNA analysis, 14 mold strains belonged to *Aspergillus* (6 strains), *Penicillium* (2 strains), *Mucor* (3 strains), *Rhizopus* (1 strain), *Gibberella* (1 strain), and *Cladosporium* (1 strain). *Aspergillus* was the dominant genera. The research results revealed that there existed diverse glucoamylase-producing mold strains in the air of fermentation workshop of Luzhou-flavor liquor.

**Key words:** fermentation workshop; molds; glucoamylase; ITS nu-rDNA

浓香型白酒的酿造是一种固态、厌氧的半自然发酵过程, 依赖于生产环境内众多微生物的协同参与, 其代谢机理复杂<sup>[1]</sup>。在浓香型白酒酿造工艺中, 发酵原料在窖房中混入曲粉后再入窖发酵, 此过程中窖房空气里的部分微生物会接种至发酵原料并参与白酒酿造。在窖内发酵过程中, 酿酒原料所含淀粉在糖化酶的催化下水解生成葡萄糖后, 才能被用于微生物增殖及各种代谢产物的合成<sup>[2]</sup>。因此, 糖化酶在浓香型白酒酿造过程中扮演着重要的角色, 而且目前行业内普遍认为, 淀粉质原料糖化发酵的不完全是浓香型白酒产酒率偏低的主要原因<sup>[3]</sup>。

对浓香型白酒窖房空气中具有产糖化酶能力的霉菌开展研究, 有利于认识浓香型白酒不同酿造环节的微生物

在酿造过程中所起的作用, 进而为生产环境中微生物区系的调控及改进生产提供基础数据。同时, 这些霉菌也是一类重要的生物资源, 具有潜在应用前景。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料、仪器

供试菌株: 分离自川南多家规模以上多粮浓香型白酒企业窖房空气, 经过菌落和孢子(菌丝)特征去除冗余的 104 株霉菌。

仪器试剂: PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品; 菌株 DNA 提取、ITS 片段扩增所用的各种酶、Marker、dNTPs、Buffer 等试剂为上海生物工程技术有限公司产品 (San-

基金项目: 四川省科技厅支撑计划项目(2008NZ0031 2010NZ0091); 四川省科技厅应用基础项目(2009JY0149); 四川省教育厅重大教育项目(09ZZ039, 11ZA225) 四川省属高校白酒生产技术创新团队建设计划资助 宜宾市科技专项研究项目(200805303, 2011ZGY010) 发酵资源与应用四川省高校重点实验室开放基金项目(2010KFJ005)。

收稿日期: 2012-05-23

作者简介: 蒲岚, 女, 四川自贡人, 讲师, 主要从事生物技术方面的研究。

通讯作者: 王涛。

优先数字出版时间: 2012-07-20; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120720.0849.001.html>。

gon);其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 产糖化酶能力检测

参照文献<sup>[4]</sup>配制产糖化酶检测平板。保存菌株活化后,制备孢子悬液,调整浓度至 $10^7$ /mL,点接 $10\ \mu\text{L}$ 于检测平板, $36\ ^\circ\text{C}$ 培养4~6 d,检测菌落(d)及其周围透明圈(D)的直径,计算D/d值。

### 1.2.2 产糖化酶霉菌的形态特征和pH值耐受检测

纯化培养7~10 d后,制片观察菌丝形态、孢子梗形态、孢子形态以及孢子与营养菌丝之间的着生关系,同时结合菌落特征,对照有关资料初步确定其真菌分类学地位<sup>[5]</sup>。采用混合有机酸(等体积比的乙酸、乳酸、己酸)调节液体PDA培养基pH值(5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5),装液量(200 mL/500 mL),10%接种量(孢子悬液), $28\ ^\circ\text{C}$ 下以120 r/min培养3 d,过滤,烘干,称重。

### 1.2.3 产糖化酶霉菌的系统发育分析

根据文献<sup>[6]</sup>提供的方法适当修改。提取霉菌基因组DNA后,使用引物ITS 1:5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3'和ITS 4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'扩增出ITS片段。PCR反应体系和反应条件参照White等的方法进行<sup>[6]</sup>。扩增的PCR产物送上海生物工程技术服务有限公司(Sangon)纯化并测序,测序长度500~700 bp,所得序列上传至GenBank,序列号在JN226906~JN226988之间。

所得序列用Blast在线进行相似性分析,用ClustalX按照最大同源性的原则进行比对,采用Kimura-2<sup>[7]</sup>计算序列相似值;采用ClustalX进行系统进化树的构建并用Mega 4.0进行系统进化树的构建、编辑与保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 产糖化酶霉菌及其pH值耐受

104株供试霉菌中,14株具备产生糖化酶的能力(占

供试菌株总数的13.79%),其水解圈直径与菌落直径之比(D/d)在1.01~1.74之间(见表1)。其中,产酶强度最高的J8M-53的D/d值达到了1.74,远高于其他菌株。其他13株菌D/d值均在1.10以下,其中仅4株(Z8M-58、W8M-30、W8M-33和J8M-57)的D/d值超过了1.05。从这些霉菌的pH值耐受情况来看,耐pH4.0和pH5.0的各有7株。耐pH4.0的7株菌中,产酶强度较高的只有Z8M-58(D/d=1.09),而其余产酶能力较强的4株菌(D/d>1.05)均只能耐受pH5.0的酸性环境。

表1 14株产糖化酶的霉菌

菌株编号	水解圈直径 (mm)	菌落直径 (mm)	D/d	产酶强度*	耐pH值
Z8M-12	1.53	1.50	1.02	+	4.0
Z8M-16	1.52	1.50	1.01	+	4.0
Z8M-56	1.52	1.50	1.01	+	4.0
Z8M-58	1.75	1.60	1.09	+++	4.0
W8M-30	1.70	1.60	1.06	++	5.0
W8M-33	1.70	1.60	1.06	++	5.0
W8M-54	1.55	1.50	1.03	+	4.0
J8M-39	1.60	1.50	1.07	++	5.0
J8M-53	2.70	1.55	1.74	++++	5.0
J8M-57	1.70	1.60	1.06	++	5.0
G8M-18	1.65	1.60	1.03	+	5.0
G8M-24	1.61	1.60	1.01	+	4.0
Z8M-41	1.65	1.60	1.03	+	4.0
W8M-17	1.52	1.50	1.01	+	5.0

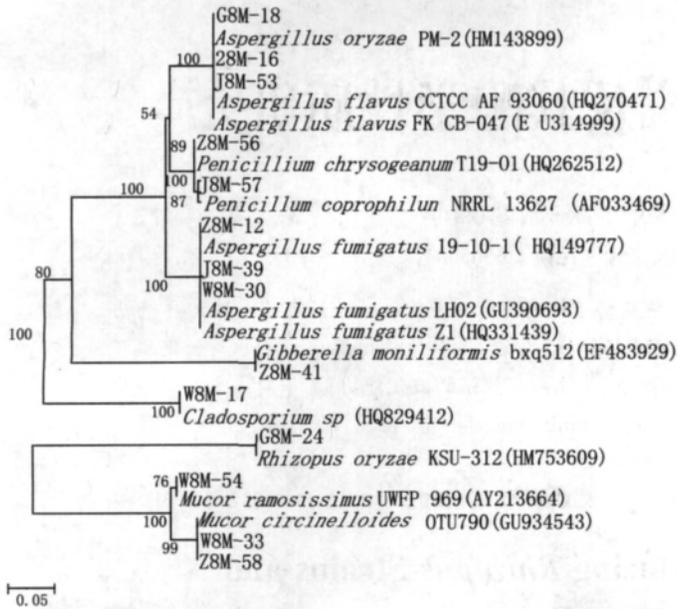
注:“+++”、“++”和“+”分别表示产酶能力强(D/d>1.07)、中等(1.07≥D/d≥1.06)、较弱(D/d<1.06)。

### 2.2 产糖化酶霉菌的系统发育分析

14株产糖化酶霉菌的ITS nu-rDNA序列与GenBank中对应菌株的相似度在99%~100%之间,其中有5株的Max ident达到100%(表2)。结合序列比对和系统发育分析结果(图1),发现14株分属于*Aspergillus*(6株)、*Penicillium*(2株)、*Mucor*(3株)、*Rhizopus*(1株)、*Gibberella*(1株)、*Cladosporium*(1株)6个属。这表明尽管

表2 14株霉菌的ITS nu-rDNA序列比对分析结果

属名	菌株编号	相似菌株种(基因登录号)	Max ident(%)	占产酶菌比例(%)
<i>Aspergillus</i>	Z8M-12	<i>Aspergillus fumigatus</i> (GU390693)	99	42.86
	W8M-30	<i>Aspergillus fumigatus</i> HQ331439	100	
	J8M-39	<i>Aspergillus fumigatus</i> HQ149777	100	
	Z8M-16	<i>Aspergillus flavus</i> EU314999	100	
	J8M-53	<i>Aspergillus flavus</i> HQ270471	99	
	G8M-18	<i>Aspergillus oryzae</i> HM143899	99	
<i>Penicillium</i>	Z8M-56	<i>Penicillium chrysogenum</i> HQ262512	100	14.29
	J8M-57	<i>Penicillium coprophilum</i> AF033469	99	
	Z8M-58	<i>Mucor circinelloides</i> GU934543	99	
<i>Mucor</i>	W8M-33	<i>Mucor circinelloides</i> GU934543	99	21.43
	W8M-54	<i>Mucor ramosissimus</i> AY213664	99	
<i>Rhizopus</i>	G8M-24	<i>Rhizopus oryzae</i> HM753609	99	7.14
<i>Gibberella</i>	Z8M-41	<i>Gibberella moniliformis</i> EU314968	99	7.14
<i>Cladosporium</i>	W8M-17	<i>Cladosporium sp</i> HQ829412	100	7.14



(自展数 1000,各分支上的数值表示聚类概率,比例尺显示水平线长度)

图 1 酿造环境产糖化酶霉菌基于 ITS nu-rDNA 系统发育分析  
窖房空气中糖化酶产生菌总数相对较少,宜宾多粮浓香型白酒酿造环节窖房空气中产糖化酶的霉菌种属分布和系统发育却呈现出丰富的多样性。

在系统发育树(图 1)上聚在 1 条直线上,属于 *Aspergillus* 的 J8M-53、G8M-18、Z8M-16 的 3 株菌,其序列虽然 100%相似,但在同样培养条件下 J8M-53 菌的菌落表面比后两者的更加致密,且菌丝和孢子均存在较大的差异;同样,同属于 *Aspergillus* 的 W8M-30、Z8M-12、J8M-393 的序列虽然完全一样,但在同样培养条件下,前者 W8M-30 的菌落颜色为绿色,而后两者为黄色。这些均表明,14 株霉菌在属一级以下的分类单位中,可能呈现出更加复杂的多样性。

从产酶能力来看,D/d 值大于 1.05 的 5 株菌分别属于 *Aspergillus* (2 株)、*Mucor* (2 株)、*Penicillium* (1 株),其中产酶能力最强的 J8M-53 (D/d 为 1.74) 属于 *Aspergillus*。这说明无论从产酶强度和产酶数量来讲,*Aspergillus* 的优势都比较明显。

### 3 讨论

在供试的 104 株霉菌中,产糖化酶的菌株达到了 14 株,占供试菌株的 13.46%,这表明具备产糖化酶能力的菌株在川南浓香型白酒窖房空气霉菌区系中占了一定的比例。由于糖化酶在浓香型白酒酿造中扮演着重要角色,窖房空气中相当数量的产糖化酶菌株的存在,间接表明窖房空气中微生物区系在浓香型白酒酿造中扮演着重要的角色。同时也在一定程度上表明大曲可能并不是浓香

型白酒酿造的唯一糖化酶来源。通过多年的选择富集,存在能分解淀粉,耐酸耐乙醇且可产孢子的霉菌在窖房内稳定存活下来,并以“空气中孢子接种至入窖糟醅-发酵早期霉菌生长产酶-发酵后期霉菌产孢-出窖时孢子逸散到空气中”的循环形式参与到各轮次窖内发酵过程中去,窖房空气作为这些霉菌孢子的暂居地,一是为霉菌孢子提供暂时的容留空间,二是其流动可带动这些霉菌进入到生产车间的每个角落,很大程度上造就并影响着窖房微生物生态系统。且尽管利用 ITS nu-rDNA 对真菌的系统发育分析不能完全确定其分类地位<sup>[8]</sup>,但据现有研究积累的信息,其能够区分霉菌属间关系<sup>[8-9]</sup>。通过对窖房空气中能够产生糖化酶菌株的 ITS nu-rDNA 的系统发育分析,发现其具一定的多样性。目前,已有广泛分布于各种环境中的 23 个属 35 个种的霉菌被报道具有产生糖化酶的能力<sup>[10]</sup>。本研究中检测到的 6 个属,均被报道具有产生糖化酶的能力<sup>[10-11]</sup>。此外,对酿酒环境空气中糖化菌的报道很少,仅见于张良<sup>[12]</sup>等对泸州古酿酒作坊空气中曲霉菌的研究,检测到窖房空气中的 5 种主要曲霉,仅米曲霉具有较高糖化能力,其曲霉种的分布也与本研究有一定区别,本研究发现除米曲霉之外,烟曲霉也具有较好的糖化能力。这在很大程度上说明宜宾浓香型白酒酿造环境窖房空气中相对独特的生态环境造成其产糖化酶霉菌种属、数量分布的特异性。

已有较多研究报道表明,淀粉水解圈大小与菌落直径之比(D/d)和产糖化酶酶活密切相关<sup>[4,13]</sup>。本研究仅采用观测淀粉水解圈的方法对霉菌产糖化酶能力进行初步评价,而这些菌株产酶能力和条件则有待于进一步深入研究。糖化酶活力最适 pH 值为 4.5~5.0<sup>[14]</sup>,这与糟醅出窖的 pH 值很接近<sup>[15]</sup>。本研究中产糖化酶的霉菌都能耐受 pH4.0 或 5.0。表明这些菌株可能在窖内发酵初期促进了酿酒原料的糖化。

本研究发现,多粮浓香型白酒窖房空气中存在多样性较为丰富的产糖化酶霉菌,为浓香型白酒行业控制(改良)生产环境,提高白酒出酒率和品质有重要意义。而且,通过对这些菌产酶条件、酶活系统研究使得这些菌在白酒和其他领域上具有应用潜力。

### 参考文献:

- [1] 郭来虎.中国第一窖[M].北京:中国工人出版社,1999.
- [2] 张秀媛,袁永俊,何扩.糖化酶的研究概况[J].食品研究与开发,2006,27(9):163-166.
- [3] 刘兴照.谈谈传统白酒发酵过程中糖化酶的应用[J].中国酿造,1998(4):27-29.
- [4] 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,2009,6(10):1542-1546.

(下转第 35 页)

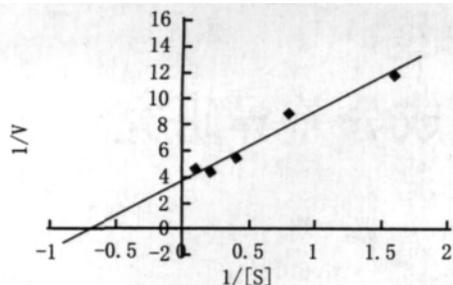


图9 动力学方程图

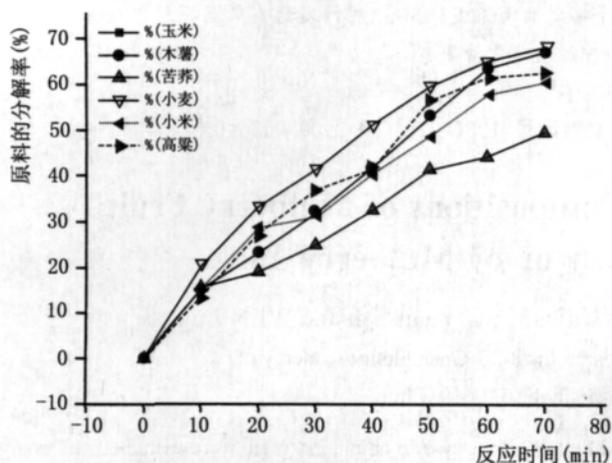


图10 糖化酶对酿酒原料的液化能力

其中,玉米粉、高粱粉、小麦粉的液化能力比小米粉、苦荞粉、木薯粉的强。云南玉米、高粱产量高,原料来源方便,该酶具较强现实应用价值。

### 3 结论

从样品中分离出6株酶活较高的菌株,选取酶活最高的菌株K-1作为出发菌株,初步鉴定为根霉,酶最适作用温度为55℃,而且随着温度的升高,酶活的变化较大。酶活在pH5.5~6之间较高。该菌株对传统酿酒原料

液玉米粉、小麦粉、木薯粉、苦荞粉、黄豆粉具有较强的液化能力,酶的动力学实验测得 $K_m=1.446\text{ mg/mL}$ , $V_m=0.269\text{ mg/mL}\cdot\text{min}$ 。将进一步对该菌株进行鉴定,研究酶的形成条件以及对其固体发酵产酶条件进行优化,提高产酶率,最终应用于酿酒生产。

### 参考文献:

- [1] 郑曼新.复合酶中糖化酶活力的测定[J].无锡轻工业大学学报,2003,24(3):90-93.
- [2] 武金霞,等.糖化酶的研究进展及趋势[J].自然杂志,2002,25(3):161-163.
- [3] 谷海先,张玉玲,曹钰.高活力糖化酶菌种选育及发酵研究[J].食品与发酵工业,1998,24(5):31-34.
- [4] KUMAR S, SATYANARAYANA T. Purification and kinetics of a raw starch-hydrolyzing, thermostable, and neutral glucoamylase of the thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae*[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(3): 936-944.
- [5] ELLAIAH P, A DINARAYANA K, B HAVANI Y, et al. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus species*[J]. Proc Biochem, 2002, 38(4): 615-620.
- [6] 李俊刚,方善康.生淀粉糖化菌NL-3的发酵条件[J].西南师范大学学报:自然科学版,1998,23(1):92-96.
- [7] 大连轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994:101.
- [8] 蔡定域.食用白酒分析[M].成都:成都科技大学出版社,1994:218,434.
- [9] 诸葛斌,姚惠源,诸葛健.生淀粉糖化酶高产菌的选育[J].微生物学报,2001,2(6):60-64.
- [10] 刘建军,姜鲁燕,赵祥颖.根酶PE-8菌株淀粉降解酶类的研究[J].食品科学,2002,23(11):34-37.

(上接第31页)

- [5] Ainsworth G C, Sparrow F K, Sussman A S. The fungi, an advanced treatise[M]. New York and London: Academic Press, 1973.
- [6] White TJ, Bruns TD, Lee SD, et al. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[M]. In PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, 1990: 315-322.
- [7] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16 (2): 111-120.
- [8] Shenoy BD, Jeewon R, Hyde KD. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi [J]. Fungal Diversity, 2007, 26: 1-54.
- [9] 匡治州,许杨.核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用

[J].生命的化学,2004,24(2):120-122.

- [10] 姚婷婷.糖化酶生产菌的遗传改良[D].无锡:江南大学,2006.
- [11] Haifeng Li, Wei Sun, Yunyun Gao, et al. Cloning, recombinant expression and characterization of a new glucoamylase gene from *Aureobasidium pullulans* NRRL 12974 and its potential application in raw potato starch degradation [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (45): 9122-9131.
- [12] 张良,李宗珍,张宿义,等.泸州古酿酒作坊空气曲霉菌初步研究[J].酿酒,2009,36(1):35-37.
- [13] 杨丹丹,钱志伟,陈茂彬,等.高糖化力菌种的筛选及诱变育种[J].中国酿造,2010(1):36-39.
- [14] 刘春莉.高效耐酸性液化糖化酶的制备及其应用[D].成都:四川大学,2003.
- [15] 赖登辉,薛常有,潘华文.入窖七因素的变化规律及相互关系的研究(四):入窖酸度[J].酿酒科技,2011(4):43-45.