

牛栏山酒厂拟内孢霉的分离与筛选

胡建华, 胡佳音, 周 森

(北京顺鑫农业股份有限公司牛栏山酒厂, 北京 101301)

摘 要: 牛栏山酒厂从清香大曲及酒醅中分离、纯化得到 12 株拟内孢霉。经过酶活力测定, 闻香, 品尝等筛选实验, 最终选出性能优良的拟内孢霉 4 株, 实验酒样在香气、口味上均有明显改善, 表现出醇甜、绵柔的特点。拟内孢霉具有一定产香能力, 在酿酒生产中对原料的糖化和生香起着重要作用, 将其确定为酿酒生产中的“综合菌种”。拟内孢霉的分离与应用丰富了酿酒微生物的实验范围。

关键词: 微生物; 拟内孢霉; 筛选; 牛栏山酒厂; 二锅头

中图分类号: TS262.3; TS261.4; Q93-3

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)03-0037-03

Separation & Screening of *Endomycopsis* in Niulanshan Distillery

HU Jian-hua, HU Jia-ying and ZHOU Shen

(Niulanshan Distillery, Beijing 101301, China)

Abstract: 12 *Endomycopsis* strains were separated from Fen-flavor Daqu and fermented grains in Niulanshan Distillery. Through screening process including enzyme activity measurement, aroma smelling, and tasting etc., 4 strains with good properties were finally screened out. The experimental liquor samples produced by such 4 strains had better improvement in taste (soft and mellow taste). As we know, *Endomycopsis* has aroma-producing capability and it plays important roles in aroma-producing and saccharification. Accordingly, it is regarded as comprehensive microbial species in liquor-making. The separation and the application of *Endomycopsis* in this study could enlarge the experimental scope of liquor-making microbes. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; *Endomycopsis*; screening; Niulanshan Distillery; Erguotou liquor

拟内孢霉^[1]是酿酒生产中常见的酵母属微生物, 数量众多, 在大曲表面呈白色小斑点, 或连成一大片, 俗称“上霉子”。在牛栏山酒厂大曲与酒醅中同样存在大量的拟内孢霉, 以本厂大曲和酒醅为原料, 共计分出拟内孢霉 12 株。经鉴定结果为拟内孢霉。本文主要介绍清香大曲及酒醅中拟内孢霉的分离与筛选的方法。

1 拟内孢霉的分离

1.1 材料

牛栏山酒厂生产用清香大曲, 酿酒车间酒醅。

1.2 分离用培养基

麦芽汁培养基: 12 °Bx 麦芽汁, 2 % 琼脂。121 °C, 灭菌 20 min。

1.3 分离方法

分别称取大曲干粉和酒醅各 5 g, 放入带有玻璃珠的 45 mL 无菌水三角瓶中, 摇床培养 30 min, 此为 10^{-1} 浓度菌液, 吸取 1 mL 至 9 mL 无菌水中, 此为 10^{-2} 浓度菌液, 依次稀释为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度菌液。分别吸取

0.1 mL 各梯度浓度菌液至麦芽汁平板中涂布。28 °C 培养 48 h。如材料中霉菌众多需要添加适量纳他霉素以抑制霉菌生长。

2 拟内孢霉鉴定

2.1 显微观察

肉眼观察, 拟内孢霉菌落圆形, 同心圆明显, 表面和边缘有致密白色菌丝, 长度 0.1~0.2 mm, 菌落突起明显(参见图 1)。

40×100 倍显微镜观察, 芽细胞个体中等大小, 为一端圆, 一端尖, 如高处往下滴的滴水状。圆端出芽, 尖端长菌丝, 菌丝体有芽殖和裂殖两种, 分节, 节有隔膜, 出芽分枝。见图 2。

2.2 分子测定

将 9# 所测序列与 Blast 和 *Saccharomycopsis fibuligera* 26SrDNA 进行序列比对。见图 3、图 4。

3 鉴定结果

通过肉眼和显微镜观察以及分子测序鉴定, 初步可

收稿日期: 2010-12-09

作者简介: 胡建华(1983-), 男, 北京怀柔人, 大学本科, 助理工程师。

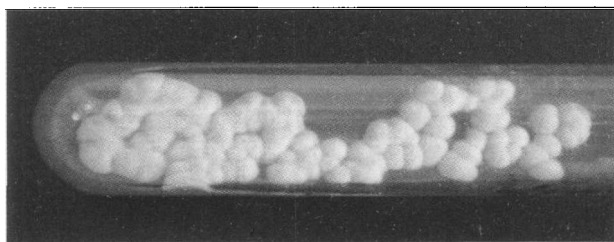


图1 拟内孢霉试管菌种



图2 40×100倍显微镜观察

以认定其属于真菌门、子囊菌纲、半子囊菌亚纲、酵母目、内孢霉科、拟内孢霉属、扣囊拟内孢霉。

4 筛选试验

4.1 糖化力测定(见表1)

表1 糖化力测定结果

菌株	糖化力 (U/g)	菌株	糖化力 (U/g)
1#	696	7#	791
2#	781	8#	717
3#	485	9#	797
4#	633	10#	611
5#	535	11#	584
6#	1268	12#	503

糖化力测定显示:拟内孢霉糖化力普遍都不高,基本处于500~800 U/g之间,分离的这12株拟内孢霉中,只有6#糖化力较高,为1268 U/g。

4.2 闻香实验

4.2.1 实验步骤

拟内孢霉麸曲培养^[2]:麸皮80%,玉米粉20%,料水比1:1,30℃堆积4h。天平称取50g湿料置于500mL三角瓶,121℃灭菌20min,趁热摇散。冷却后接入拟内孢霉菌种,28℃平放培养2~3d,每天摇瓶1次。

4.2.2 闻香

对12株麸曲培养的拟内孢霉分别进行闻香,将感官评比结果列表,见表2。

4.2.3 分析结论

闻香实验结果表明,1#、2#、4#、8#、9#、10#香气强度

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ475057.1	Saccharomycopsis fibuligera isolate A11 26S ribosomal RNA gene, s	1046	1046	100%	0.0	99%
AB550115.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1037	1037	100%	0.0	99%
EU057552.1	Saccharomycopsis fibuligera strain NRRL Y-2388 26S ribosomal RNA	1037	1037	100%	0.0	99%
DQ472024.1	Fungal sp. DQY-6 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1037	1037	100%	0.0	99%
U09238.1	Endomyces fibuliger 8014 26S rRNA gene, complete sequence	1037	1037	100%	0.0	99%
AB550119.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1022	1022	98%	0.0	99%
AB550117.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1022	1022	98%	0.0	99%
AB550114.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1022	1022	98%	0.0	99%
AB550110.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1022	1022	98%	0.0	99%
AB550109.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1022	1022	98%	0.0	99%
AB196495.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S rRNA, partial sequence, s	1013	1013	97%	0.0	99%
AB550105.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	1007	1007	96%	0.0	99%
AB500871.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S rRNA, partial sequence, s	1007	1007	96%	0.0	99%
AB195270.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S rRNA, partial sequence	1007	1007	96%	0.0	99%
U40088.1	Saccharomycopsis fibuligera 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	1007	1007	96%	0.0	99%
AB198183.1	Saccharomycopsis fibuligera 26S rRNA, partial sequence	1002	1002	96%	0.0	99%
AB196494.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S rRNA, partial sequence, s	983	983	95%	0.0	99%
AB550118.1	Saccharomycopsis fibuligera gene for 26S ribosomal RNA, partial se	959	959	92%	0.0	99%
EU057554.1	Saccharomycopsis capsularis strain NRRL Y-17639 26S ribosomal R	833	833	100%	0.0	93%
EU057553.1	Saccharomycopsis malanga strain NRRL Y-7175 26S ribosomal RNA	821	821	100%	0.0	92%
U40082.1	Saccharomycopsis capsularis 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	806	806	96%	0.0	93%
EU057556.1	Candida amapae strain NRRL Y-17845 26S ribosomal RNA gene, coi	800	800	100%	0.0	92%
AB196493.1	Saccharomycopsis capsularis gene for 26S rRNA, partial sequence,	798	798	95%	0.0	93%
EU057557.1	Saccharomycopsis selenospora strain NRRL Y-1357 26S ribosomal F	791	791	100%	0.0	91%
U40135.1	Saccharomycopsis malanga 26S ribosomal RNA gene, partial seque	791	791	96%	0.0	92%
EU057555.1	Saccharomycopsis crataegensis strain NRRL Y-5902 26S ribosomal	784	784	100%	0.0	91%
DQ466530.1	Saccharomycopsis sp. G13 26S ribosomal RNA gene, partial sequer	778	778	98%	0.0	91%

图3 9#所测序列Blast比对结果

>gb|FJ475057.1| Saccharomycopsis fibuligera isolate All 26S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=570

Score = 1046 bits (566), Expect = 0.0
Identities = 568/569 (99%), Gaps = 0/569 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TGCCTTAGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGT 60
Sbjct 1      TGCCTTAGTACGGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGT 60

Query 61     TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCCCTTGAACA 120
Sbjct 61     TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCCCTTGAACA 120

Query 121    GGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTA 180
Sbjct 121    GGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTA 180

Query 181    TCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC 240
Sbjct 181    TCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC 240

Query 241    TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTC 300
Sbjct 241    TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTC 300

Query 301    TGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTT 360
Sbjct 301    TGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTT 360

Query 361    GGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATAT 420
Sbjct 361    GGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATAT 420

```

图4 9#所测序列与 Saccharomycopsis fibuligera 26Sr DNA 序列比对

表2 闻香实验结果

菌株	香气	菌株	香气
1#	++++	7#	++
2#	++++	8#	++++
3#	++	9#	++++
4#	++++	10#	++++
5#	++	11#	+
6#	-	12#	+

注: +表示愉快香气强度, -表示不愉快气味。

强烈,3#、5#、7#有香味但并不突出,11#、12#略微显香味,6#气味不愉快。

4.3 甜味实验

4.3.1 麸曲培养

天平称取 200 g 麸曲湿料,置于 1000 mL 三角瓶,121 °C 灭菌 20 min,趁热摇散。冷却后接入拟内孢霉菌种,28 °C 平放培养 2~3 d,每天摇瓶 1 次。

4.3.2 串蒸实验

称取成熟固体麸曲 200 g 放入 2000 mL 圆底烧瓶中,添加 200 mL 75 %vol 食用酒精进行蒸馏,通过冷凝管进行冷凝,用量筒盛放冷凝出来的液体(注意密封)。蒸馏出 100 mL,存入磨口 250 mL 三角瓶密封。

4.3.3 品尝

将蒸馏出来的酒样和相同度数的食用酒精(标样)对

比品尝,进行甜味对比,见表3。

表3 甜味品尝实验结果

菌株	甜味	菌株	甜味
1#	++++	7#	+
2#	++	8#	+
3#	+++	9#	++++
4#	++++	10#	++++
5#	++	11#	+++
6#	+	12#	+

注: +表示甜味、柔和程度。

4.3.4 分析结论

甜味品尝实验结果表明,1#、4#、9#、10#样甜味明显,柔和发绵;3#、11#样甜味值明显但有酸涩感;2#、5#样入口微甜,发涩,刺激性较强;6#、7#、8#、12#样微弱的醇甜味,和标样类似。

4.4 筛选试验分析

糖化力实验结果表明,12株拟内孢霉的糖化力普遍不高,数值基本平行,唯有6#的糖化力较高,达到了1268 U/g,拟内孢霉虽然糖化力较低,但是在酿酒生产中数量众多,故对酒醅的糖化也起着重要作用。通过闻香实验评定,筛选出1#、2#、4#、8#、9#、10#6株香气值较明显的菌株。从甜味品尝实验结果,确定1#、4#、9#、10#4种酒样甜味值明显,口感较好。

(下转第42页)

2.7 中性蛋白酶酶活变化曲线的绘制

取7个三角瓶,以上面实验确定的最佳发酵培养条件为基础,在最佳培养条件下接种已在LB种子培养基中培养了18h的种子液,在最适温度下摇床培养,每12h取其中1瓶离心提取粗酶液,测定中性蛋白酶活力大小,然后根据酶活力与时间的关系作图,结果见图4。图4结果表明,在12h内基本不产蛋白酶,12h之后,蛋白酶活力迅速提高,发酵60h,蛋白酶活力达最大,随发酵时间的延长,酶活力有所下降。

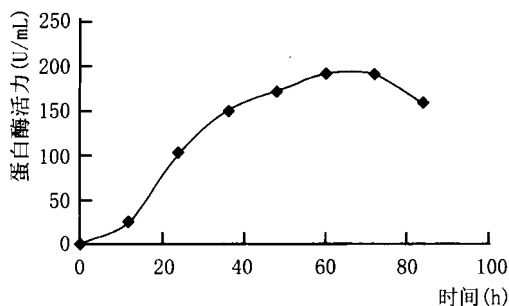


图4 中性蛋白酶的酶活增长曲线

3 结论

3.1 通过单因素培养条件对菌株产中性蛋白酶的影响研究,结果表明,地衣芽孢杆菌最适产中性蛋白酶的发酵培养基是玉米粉8g/L,黄豆粉2g/L,麸皮10g/L,此

时地衣芽孢杆菌发酵72h产中性蛋白酶的酶活力达最大,发酵上清液中,中性蛋白酶活力为180U/mL。

3.2 在单因素实验所得结果的基础上,选取接种量、培养温度和培养基初始pH3个对菌体量影响最大的因素,对地衣芽孢杆菌产中性蛋白酶培养条件进行分析,从而确定了产中性蛋白酶的最佳培养条件为40℃,发酵基质pH7.0,接种量为10%。

3.3 通过对不同时间发酵液中蛋白酶活力的测定发现,地衣芽孢杆菌在12h内基本不产蛋白酶,12h之后蛋白酶活力迅速提高,发酵60h,蛋白酶活力达最大,为192U/mL,随发酵时间延长,酶活力有所下降。

参考文献:

- [1] 信春晖,朱政,赵纪文,等.复粮芝麻香特征香味成分初探[J].酿酒科技,2008,(3):69-72.
- [2] 黄业立,张彬,武金华.试论芝麻香型白酒[J].酿酒科技,2007,(10):116-119.
- [3] 唐胜球,董小英,许梓荣.酒用酸性蛋白酶的研究进展[J].酿酒科技,2005,(1):41-44.
- [4] GB23527—2009 ICS67.220.22 X69—2009,蛋白酶制剂[S].
- [5] 胡承,彭勇,等.地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究[J].工业微生物,1999,29(4):27-30.
- [6] 黄红英,方海红,刘爱民,等.一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究[J].微生物学通报,2001,28(5):20-24.

(上接第39页)

综合产香闻味实验和甜味品尝实验结果,从12株拟内孢霉中筛选出1#、4#、9#、10#4株菌用于今后的生产实验。

5 总结与讨论

拟内孢霉糖化力较低,生长“泼辣”,以往认为对酿酒生产用处不大。但是这种菌数量众多,均有一定产香能力,能生成多种甜味物质,如甘油、阿拉伯糖等与酒甜味有关的物质。故其在酿酒生产中对原料的糖化和生香起

着重要作用,属于白酒生产中的“综合菌种”,对酒醅的健康发酵及生态稳定具有重要作用。实验筛选出的这4株拟内孢霉菌株显示出明显的醇甜、绵柔特性,对本厂醇甜型特色基酒的研发有着重要意义。

参考文献:

- [1] 白酒生产工艺和设备编写组.白酒生产工艺和设备[M].北京:轻工业出版社,1987.
- [2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1996.

苏酒实业召开年度工作会议

本刊讯:据《华夏酒报》报道,2月9日,江苏苏酒实业股份有限公司年度工作会议在宿迁市召开。苏酒集团领导及苏酒实业领导杨廷栋、张雨柏、赵凤琦等人参加了会议。苏酒集团总裁、苏酒实业董事长兼总经理张雨柏在会上作苏酒实业2010年工作报告。

张雨柏在报告中用“一个突破”、“两个优化”、“三个增强”概括了苏酒实业2010年取得的突出成绩,即企业规模大突破,产品结构更优化、市场结构更优化,产品力增强、品牌力增强、渠道力增强。张雨柏还给全体营销人员详细分析了企业所面临的三大机遇和三大挑战,从目标制定科学化和目标落实五围绕等方面阐述了新一年的营销工作目标,并从营销转型常态化等八个方面全面部署了2011年营销工作。

会上,苏酒集团董事长杨廷栋充分肯定了苏酒实业过去一年取得的显著工作成绩,还分析了企业新时期所面临的新形势、新任务,并对苏酒集团新一年的总体工作思路进行了详细阐述,指出集团2011年要全力推进“五大工程”建设,即全力推进集团一体化工程、市场全国化工程、技改扩建工程、管理升级工程、资本市场建设工程,共同谱写苏酒发展新篇章。

苏酒实业年度工作会议表彰和嘉奖了苏酒实业2010年度销售能手、先进单位、先进工作者、先进党支部、优秀党员等,并进行了现场颁奖。(小小荐)

来源:华夏酒报 2011-2-18