

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017311

引用格式: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 Ming-ming, ZHOU Yang-zi, YUAN Le-mei, et al. The selection of high yield glucoamylase starter and the optimization of its solid fermentation production enzyme[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(10):118-123.

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

刘茗铭,周阳子,袁乐梅,刘新玉,边名鸿*

(四川理工学院,酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川 自贡,643000)

摘要 从酒曲中筛选高产糖化酶菌株,并对筛选得到的菌株进行耐受性研究及固态发酵产酶条件的优化。耐受性试验结果表明:该菌株能耐受体积分数10%的酒精,在pH值4以上能较好生长,pH值3.5时生长受到明显抑制,在23~41℃范围内均能较好生长。通过单因素试验和正交试验,确定固态发酵产酶最佳条件为:糠壳添加量4%、接种量1.25%、初始pH值为5.5、料水比5:3(g:mL),在30℃下培养72h,其糖化酶活性高达1791.3U/g。该菌株制作成浅盘曲:外观符合要求、试饭糖分含量24.76g/100g。

关键词 糖化酶;霉菌;固态发酵;产酶优化

“曲为酒之骨”,小曲作为小曲白酒的糖化发酵剂,对于白酒的口感、风味起到至关重要的作用,是近年来研究的热点^[1-2]。在小曲微生物群落结构中,霉菌是微生物的主要菌群之一,在酿酒过程中主要起糖化作用。因其丰富的糖化型淀粉酶,能将淀粉结构中的 $\alpha-1,4$ 键和 $\alpha-1,6$ 键切断,使淀粉绝大部分转化为可发酵性糖,从而提高淀粉利用率^[3-4],因此糖化酶活力也是酿酒曲药质量评定的主要指标。

近年来,有许多科研工作者尝试直接使用糖化酶制剂作为糖化剂来提高小曲酒出酒率^[5-6],但此方法水解葡萄糖速度过快,极易导致生产过程中微生物生态环境失衡,酿造出的白酒存在口感辣冲、苦涩、不醇厚等缺点^[7]。糖化酶主要来源于米曲霉、黑曲霉、根霉等丝状真菌^[8]。唐玉明^[9]等通过传统的分离手段对小曲样中高产糖化酶的根霉进行了筛选,得到2株优良菌株,试饭糖分比Q303高出271%和218%,且大生产制曲效果好,出酒率和酒质均有提高。肖长清^[10]等通过制麸曲的方法,对高产糖化酶产生菌*Aspergillus niger*进行了分离筛选,同时对产酶条件进行了研究。宋毅^[11]通过物理诱变对黑曲霉菌株进行了诱变,得到了1株高产糖化酶菌株,产酶能力比出发菌株高31.7%。DONG^[12]通过紫外线氯化锂诱变糖化酵母As2.1548,成功获得1株遗传性能稳定的高

产糖化酶菌种。

本研究从酒曲中筛选出1株高产糖化酶的霉菌,初步鉴定为米曲霉,并研究该菌株在不同温度、pH值、酒精条件下的生长情况,再利用单因素和正交试验优化其固态发酵工艺,从而确定该菌株的最佳产酶条件,为小曲酒生产过程中高糖化酶酶活菌株的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基

菌种:前期从酒曲中筛选出的23株霉菌。

PDA固体培养基(g/L):马铃薯(去皮)200,葡萄糖20,琼脂20,pH值自然。

初筛培养基^[13](g/L):可溶性淀粉10,酵母膏1.5,NaNO₃1.5,K₂HPO₄1,NaCl0.5,MgSO₄0.5,FeSO₄0.01,琼脂15,链霉素0.0005,pH7.0。

PDA液体培养基(g/L):马铃薯(去皮)200g,葡萄糖20g,蒸馏水1000mL,pH值自然。

1.1.2 仪器与设备

全自动高压灭菌锅(MLS-3020),日本三洋公司;恒温恒湿培养箱(MJ-250),上海齐欣科学仪器有限公司;数控恒温摇床培养箱(BS-2F),常州精成国华仪器有限公司;紫外可见分光光度计(UV-2000型),上海尤尼柯有限公司;生物显微成像系统(E100),日本Nikon公司。

1.2 试验方法

第一作者:硕士研究生(边名鸿副教授为通讯作者,E-mail:edge_214@163.com)。

基金项目:泸州老窖奖学金项目(15ljzk08)

收稿日期:2018-03-19,改回日期:2018-05-11

1.2.1 检测分析方法

孢子个数的测定方法:血球计数板计数法^[14];糖化酶活力测定方法:比色法^[15];试饭糖分:DNS法^[16]。

1.2.2 高产糖化酶霉菌的筛选

初筛:用无菌接种针挑取少量各霉菌孢子分别点接在初筛培养基上,30℃恒温培养72 h后,检测透明圈直径*D*,菌落直径*d*,计算*D/d*值,选择*D/d*值较大的作为复筛出发菌株。

复筛:将初筛后纯种霉菌按文献[17]中所报道的方法制成麸曲,通过测定麸曲的糖化酶活力,从而筛选出产糖化酶活力高的菌株,4℃下斜面保藏。

1.2.3 菌种鉴定

采用 SDS-酚氯仿抽提法提取霉菌微生物的 DNA^[18],此为模版,采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAG-GTGAAC-CTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATAT-GC-3') 参照 WHITE 等^[19]的方法扩增 ITS 区基因,并将扩增产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序。将最终测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对,并对近似序列进行系统发育学分析。

1.2.4 孢子菌悬液的制备

取 1 支保藏菌株的试管,用无菌水将菌株洗到 150 mL 含有玻璃珠的三角瓶中,在 150 r/min 的摇床上振荡 10 min 后,稀释至孢子含量为 10⁶ 个/mL 备用。

1.2.5 霉菌耐受性研究

(1)霉菌对温度的耐受性:将霉菌接种于 PDA 液体培养基中,分别置于 23、26、29、32、35、38、41℃,摇床培养 72 h,称菌体干重。

(2)霉菌对 pH 值的耐受性:将霉菌接种于 pH 值分别为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 的 PDA 液体培养基中,摇床培养 72 h,称菌丝体干重。

(3)霉菌对酒精的耐受性:将霉菌接种于酒精体积分数分别为 0%、4%、6%、8%、10%、12%、14% 的液体培养基中,摇床培养 72 h,称菌丝体干重。

1.2.6 固态发酵产酶条件单因素研究

(1)培养温度:称取麸皮和糠壳共 20 g (糠壳添加量为 4%),12 mL 蒸馏水于 250 mL 的三角瓶中,混匀灭菌冷却后,接入 1 mL 的孢子菌悬液,分别于 26、28、30、32、34、36℃培养,72 h 后进行酶活力测定。

(2)接种量:称取麸皮和糠壳共 20 g (糠壳添加量为 4%),添加 12 mL 蒸馏水于 250 mL 的三角瓶

中,混匀灭菌冷却,分别接入 0.625%、1.25%、2.5%、5%、10%、20% 孢子菌悬液,30℃恒温培养 72 h 后进行酶活力测定。

(3)糠壳添加量:称取麸皮和糠壳共 20 g,其中糠壳添加量分别为 0%、2%、4%、6%、8%、10%,加 12 mL 蒸馏水于 250 mL 的三角瓶中,混匀灭菌冷却后,接入 1 mL 的孢子菌悬液,30℃培养 72 h 后进行酶活力测定。

(4)初始 pH 值:称取麸皮和糠壳共 20 g (糠壳添加量为 4%),12 mL 蒸馏水于 250 mL 的三角瓶中,调节 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,混匀灭菌冷却后,接入 1 mL 的孢子菌悬液,30℃恒温培养 72 h 后进行酶活力测定。

(5)料水比:称取麸皮和糠壳共 20 g (糠壳添加量为 4%),分别加入料水比为 2:1、20:11、5:3、20:13、10:7、4:3 (g:mL) 的蒸馏水于 250 mL 三角瓶中,混匀灭菌冷却后,接入 1 mL 的孢子菌悬液,30℃恒温培养 72 h 后进行酶活力测定。

1.2.7 正交试验

本试验在单因素结果分析的基础上,选取接种量(*A*),温度(*B*),料水比(*C*)3 个因子,每个因子设 3 个水平因素,正交试验优化固态发酵产酶条件,因素水平设计表见表 1。

表 1 正交试验因素水平设计表

| Table 1 Orthogonal test factor level design table | | | |
|---|-------------------|------------------|-----------------------|
| 水平 | 因素 | | |
| | 接种量(<i>A</i>)/% | 温度(<i>B</i>)/℃ | 料水比(<i>C</i>)(g:mL) |
| 1 | 1(1.25) | 1(28) | 1(5:3) |
| 2 | 2(2.5) | 2(30) | 2(20:13) |
| 3 | 3(5) | 3(32) | 3(10:7) |

1.2.8 试饭糖分

试饭糖分含量定义:100 g 米饭经过曲药糖化后的含糖质量(g)。

蒸饭:取大米 200 g,用水淘洗干净,加水至总质量为 420 g,进行蒸饭,上汽后蒸 40~50 min。要求饭粒熟而不烂,米饭含水量 60%。

培菌糖化:称取 60 g 米饭(称取 3 个样)凉至 35℃,拌入米饭质量 0.14% 的曲霉曲样品(即 84 mg),拌匀后装入灭过菌的培养皿中,于 30℃培养箱中培养 46 h 后取出,测定其试饭糖分含量。

1.3 数据分析

每组试验重复 3 组,试验结果以 $\bar{x} \pm Se$ 表示,用 Excel 对数据进行编辑作图。

2 结果与讨论

2.1 高糖化酶酶活霉菌筛选

2.1.1 初筛

将 23 株霉菌活化后接入选择培养基,培养 72 h 后,检测结果。霉菌菌落直径(d)、透明圈直径(D)以及比值(D/d)是表征霉菌糖化酶活力高低的指标。初筛部分透明圈图片及菌株显微形态见图 1;测量结果见表 2。由表 2 可知,透明圈直径 $D/d \geq 1.30$ 的菌株共有 3 株,其中 M21 最大, D/d 值达到 1.71,选择 M5、M21、M22, $D/d \geq 1.3$ 的菌株作为复筛菌株。

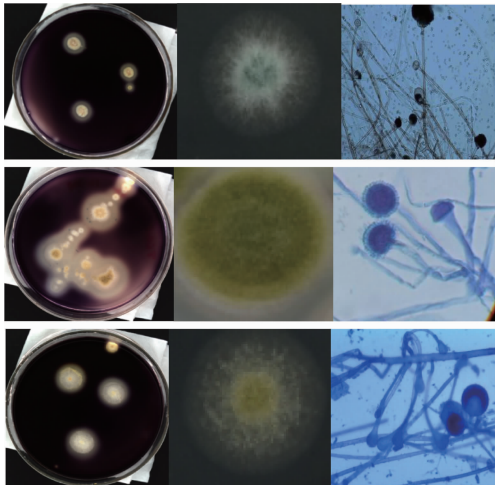


图 1 初筛部分透明圈

Fig.1 The initial screen is partially transparent

注:自上到下分别是 M5、M21、M22 菌株的透明圈、菌落及显微形态。

表 2 高产糖化酶菌株初筛结果

Table 2 The results of high yield glycosylase strain were first screened

| 霉菌编号 | 菌落直径 (d)/mm | 透明圈直径 (D)/mm | D/d |
|------|--------------------|---------------------|-------|
| M1 | 2.1 | 2.2 | 1.05 |
| M2 | 22.0 | 26.0 | 1.18 |
| M3 | 6.0 | 7.4 | 1.25 |
| M4 | 11.0 | 13.0 | 1.18 |
| M5 | 7.5 | 10.0 | 1.33 |
| M6 | 7.9 | 8.2 | 1.04 |
| M8 | 17.0 | 20.0 | 1.17 |
| M10 | 7.0 | 9.5 | 1.21 |
| M13 | 8.9 | 9.4 | 1.06 |
| M16 | 21.0 | 22.0 | 1.05 |
| M21 | 14.0 | 24.0 | 1.71 |
| M22 | 12.0 | 20.0 | 1.67 |

注:共有 23 株菌株,编号为 M1 ~ M23,以上表格中未出现编号的菌株即为无透明圈。

2.1.2 复筛

将 M5、M21、M22 三株菌分别制成麸曲,测定麸

曲的糖化酶活力,结果见表 3。由表 3 可知,M5、M21、M22 三株菌的糖化酶酶活均高于 1 000 U/g,但 M21 的糖化酶活力最高,为 1 512.7 U/g。因此,选择 M21 进一步研究其耐受性能和产酶特性。

表 3 高产糖化酶菌株复筛结果 单位:U/g

Table 3 The production of high yield glycosylated enzyme was rescreened

| 菌株编号 | M5 | M21 | M22 |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 糖化酶活力 | 1 037.1 \pm 43.10 | 1 512.7 \pm 88.21 | 1 333.2 \pm 99.22 |

2.1.3 菌种鉴定

采用 MEGA 软件进行系统发育树分析,结果见图 2。由图 2 可知,菌株 M21 与 3 株 *Aspergillus oryzae* (米曲霉)聚在一起,且相似度为 100%。结合细胞形态学观察,初步将该菌株归属于米曲霉。

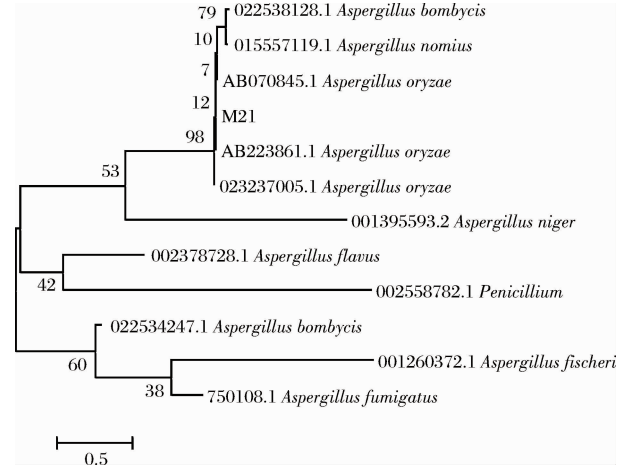


图 2 高产糖化酶菌株的系统发育学分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of high yield glucoamylase strains

2.2 霉菌 M21 的耐受性能研究

2.2.1 温度的耐受性

由于小曲酒糖化发酵时间短,在糖化发酵过程中升温幅度较大,耐高温的微生物更有利于小曲酒酿造。因此确定菌株对温度的耐受能力很有必要。由表 4 可知,温度的改变对霉菌 M21 的生长影响较小,菌株在 26 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 之间均能较好的生长;当温度为 38 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌株生长受到一定抑制,高温可导致细胞膜破坏、代谢活动减弱,而在 41 $^{\circ}\text{C}$ 时霉菌还能生长,说明其耐温性良好。

2.2.2 pH 值的耐受性

小曲酒发酵周期短,产酸快,pH 值较低^[20],因此对酿酒微生物耐酸性要求较高。同时 pH 值能改变微生物细胞中的电解质,从而对微生物的生长代谢

表 4 不同温度对霉菌 M21 生长的影响

Table 4 The effect of different temperatures on the growth of mould M21

| 温度/℃ | 23 | 26 | 29 | 32 | 35 | 38 | 41 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 菌丝体干重/(g·L ⁻¹) | 2.57±0.109 | 3.96±0.083 | 4.16±0.049 | 4.40±0.067 | 4.00±0.057 | 3.19±0.033 | 2.42±0.054 |

造成一定影响。由表 5 可知随着 pH 值的减小,霉菌的生长受到影响,pH 4 以下生长受到明显抑制,而在

pH 4 以上均能较好的生长,菌株 M21 的 pH 耐受性良好。

表 5 不同 pH 值对霉菌 M21 生长的影响

Table 5 The effect of different pH values on the growth of mould M21

| pH 值 | 3.5 | 4.0 | 4.5 | 5.0 | 5.5 | 6.0 | 6.5 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 菌丝体干重/(g·L ⁻¹) | 0.96±0.127 | 2.15±0.074 | 3.28±0.095 | 4.26±0.137 | 4.44±0.058 | 3.26±0.059 | 3.02±0.099 |

2.2.3 酒精的耐受性

酒精是小曲中酵母菌厌氧发酵产物,酒精浓度的高低直接影响白酒发酵,霉菌和酵母本身在高浓度酒精环境中都受到一定的抑制作用,因此在小曲发酵的过程中,霉菌酒精的耐受能力对小曲的出酒率也有较大影响。由表 6 可以看出,霉

菌随着酒精浓度的升高,菌体存活率逐渐减低。随着小曲酒发酵过程的进行,酒精体积分数逐渐升高,发酵后期能达到 14%,霉菌 M21 在 8% 的酒精环境生长受到抑制,但在 10% 的酒精体积分数仍有一定的生长能力,高于其他常见霉菌^[21],因此该菌株耐酒精性能较好。

表 6 不同酒精浓度对霉菌 M21 生长的影响

Table 6 The effect of different alcohol concentration on the growth of mould M21

| 酒精体积分数/% | 0 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 菌丝体干重/(g·L ⁻¹) | 4.87±0.106 | 4.47±0.062 | 2.96±0.034 | 1.82±0.129 | 0.71±0.052 | 0.11±0.017 | 0.045±0.007 |

2.3 固态发酵产酶条件单因素研究

2.3.1 培养温度对产糖化酶活力的影响

本试验选择 26~36℃ 温度区间,试验结果如图 3。由图 3 可知,霉菌糖化酶活力伴随着温度的上升呈现出先增加后降低的趋势。霉菌的生长代谢受温度的影响较大,同时温度对酶的代谢也有很大的影响^[22]。培养温度较低微生物生长缓慢,产酶稀少;培养温度过高会抑制甚至杀死微生物。当培养温度为 30℃ 产酶最多,因此选择 30℃ 为最佳培养温度。

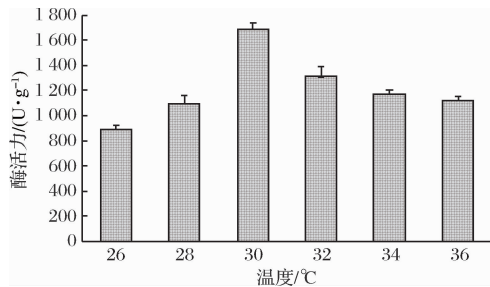


图 3 不同温度对发酵产糖化酶活力的影响

Fig. 3 The effect of different temperature on the enzyme activity of fermentation products

2.3.2 接种量对产糖化酶活力的影响

在固体发酵过程中,微生物的接种量对试验结果

有着较大的影响,接种量过大培养基营养不足,接种量过小菌体繁殖能力不够,发酵动力不足。由图 4 可知,随着接种量的逐渐增大,糖化酶活力呈先增加后降低的趋势,当接种量达到 2.5% 时,其糖化酶酶活达最大值 1 698.3 U/g。继续加大接种量,菌体变得密集,消耗培养基的速度加快,菌体所能利用的资源空间相对减少,不利于发酵产酶,因此 2.5% 为最佳接种量。

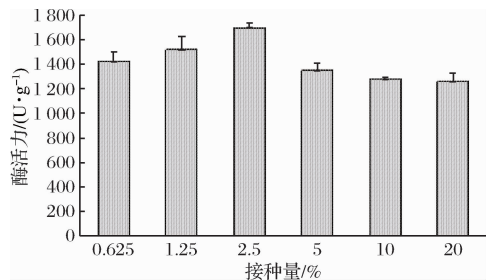


图 4 不同接种量对发酵产糖化酶活力的影响

Fig. 4 The effects of different inoculations on the enzyme activity of fermentation products

2.3.3 糠壳添加量对产糖化酶活力的影响

在固体发酵过程中,糠壳添加量的多少决定了曲料的疏松程度,同时也影响着微生物的繁殖与产酶。由图 5 可知,随着糠壳的加入,发酵产物糖化酶活力

先增大后减小。糠壳加量过少,曲饼过于紧实,氧气含量不足,同时不利于发酵散热;糠壳加量过大,曲料过于疏松造成麸皮曲不易形成饼状,保水性减弱,曲料容易干,影响糖化霉菌的生长及酶的合成^[23]。在糠壳添加量为4%时,曲料疏松度较好,氧气含量高,利于微生物前期增殖和酶的合成^[24],此时糖化酶活力最大,为1 639.0 U/g。

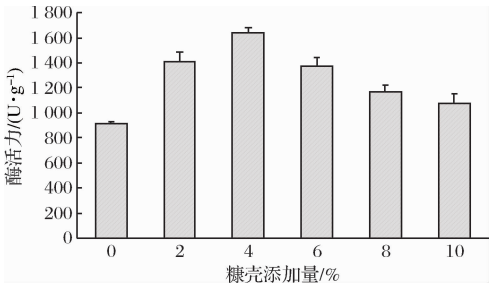


图5 不同糠壳添加量对发酵产糖化酶活力的影响

Fig. 5 The effect of the addition of different bran shells on the enzyme activity of fermentation products

2.3.4 初始 pH 值对产糖化酶活力的影响

由图6可知,随着pH值的增大,糖化酶活力先增大后减小,在初始pH值为5.5时,糖化酶活力达到最大为1 605.4 U/g。

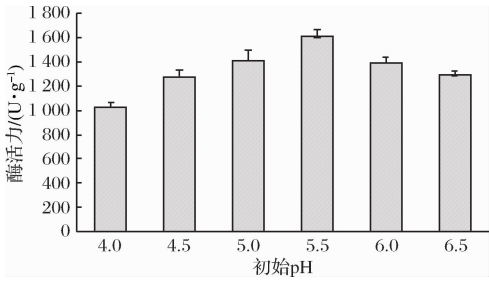


图6 不同初始 pH 值对发酵产糖化酶活力的影响

Fig. 6 The effect of different initial pH on the enzyme activity of fermentation products

2.3.5 料水比对产糖化酶活力的影响

合理料液比可以使培养基有较好的疏松性,增加空气传递,使菌体代谢产生的酶更好地传输^[20]。由图7可知,糖化酶活力随着水分的增加呈先增加后降低的趋势。水分含量过低,培养基后期表面会逐渐干燥,不利于微生物生长繁殖及产酶^[25];水分含量过高又会导致曲料结合紧密,无法充分散热,致使曲料温度难以控制,影响菌株的生长和产酶。当料水比为20:13 g/mL时,糖化酶活力达到最大值为1 621.7 U/g。

2.4 正交试验

通过正交试验的结果如表7所示,所选中的3种处理条件对固态发酵产酶效果的影响由大到小依次

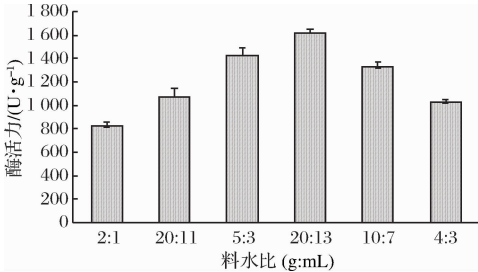


图7 不同料水比对发酵产糖化酶活力的影响

Fig. 7 The effect of different water content on the enzyme activity of fermentation products

为温度>料水比>接种量。通过比较3因素的水平均值,可以得出最佳处理条件为A1B2C1。以最佳处理条件进行验证,此时糖化力为1 791.3 U/g,相应的最佳糖化酶产酶条件为温度30℃、料水比5:3 g/mL、接种量1.25%。

表7 正交试验结果

| 组号 | 因素 | | | 糖化力/ (U·g ⁻¹) |
|----|-----------|----------|---------------|------------------------------|
| | 接种量/ % | 温度/ ℃ | 料水比 (g:mL) | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 705.52 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 1 612.05 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 1 560.44 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 1 595.76 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 658.23 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 1 533.28 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 1 574.03 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 1 707.13 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 576.74 |
| k1 | 1 626.00 | 1 625.10 | 1 648.64 | |
| k2 | 1 595.76 | 1 659.14 | 1 594.85 | |
| k3 | 1 619.30 | 1 556.82 | 1 597.57 | |
| R | 30.24 | 102.32 | 53.79 | |

注:“k”表示糖化力平均值,“R”表示极差。

2.5 试饭糖分

将霉菌 M21 进行试饭试验,46 h 后测定其试饭糖分。一般的糖化霉菌试饭糖度在20 g/100 g左右^[17,26],而经过优化发酵条件后的霉菌 M21 试饭糖分达到24.76 g/100 g,表明该菌株糖化能力良好,有一定的应用价值。

3 结论

采用淀粉平板透明光圈法从实验室保存的23株霉菌中初筛得到M5、M21、M22共3株糖化酶活力较高的霉菌菌株。通过制作纯种麸曲测定其糖化酶活力,复筛得到1株高糖化酶酶活菌株M21,初步鉴定

为米曲霉。该菌株能耐受体积分数 10% 的酒精,在 pH 4 以上能较好地生长,pH 3.5 时生长受到明显抑制,在 23 ~ 41 °C 范围内均能较好生长。该霉菌在培养温度 30 °C、糠壳添加量 4%、接种量 1.25%、初始 pH 值为 5.5、料水比 5:3 (g:mL) 条件下,培养 72 h 得到的固态发酵产物糖化酶活性可高达 1 791.3 U/g。将该菌株制作成浅盘曲:外观符合要求、试饭糖分含量 24.76 g/100 g,预期采用此方法可增加出酒率。

由于本试验主要对该菌株的产糖化酶条件进行了一定研究,并未研究该菌株蛋白酶活、发酵、生香等特性,所以对其综合能力尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李锦松,张怀山,张超,等. 提高小曲白酒出酒率的研究进展[J]. 酿酒科技,2017(10):107-110.
- [2] 张杰,程伟,彭兵,等. 小曲清香型白酒研究概述[J]. 酿酒科技,2017(9):91-95.
- [3] 贾瑞博,胡荣康,周文斌,等. 米曲霉 (*Aspergillus oryzae* FAFU) 淀粉酶的分离纯化及其酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业,2016,42(11):71-76.
- [4] 苏小军,熊兴耀,谭兴和,等. 产生淀粉酶菌株的诱变选育及酶学性质研究[J]. 食品与机械,2009,25(2):11-14.
- [5] 白利涛,张丽萍. 糖化酶活力测定方法研究[J]. 酿酒科技,2012(2):100-102.
- [6] MATTHEWS S L, BYRNE H, HENNIGAN G P. Preparation of a low carbohydrate beer by mashing at high temperature with glucoamylase[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2001, 107(3):185-194.
- [7] 王旭亮,王异静,张五九,等. 白酒发酵高糖化性能霉菌的筛选及鉴定[J]. 酿酒科技,2012(9):22-28.
- [8] 齐惠阳,高素杰,曹清发,等. 多菌种发酵提高糖化酶生产固态白酒质量的研究[J]. 微生物学杂志,1990,10(3):59-61.
- [9] 唐玉明,姚万春,任道群,等. 优良根霉菌株 C-24 和 LZ-24 的选育[J]. 中国酿造,2001,20(2):12-14.
- [10] 肖长清,戚天胜,赵海. 生淀粉糖化酶产生菌 *Aspergillus*

- niger*(6#) 的分离筛选及其产酶条件[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(1):76-79.
- [11] 宋毅. 糖化酶工业生产菌株选育及其种子制备工艺优化[D]. 无锡:江南大学,2009.
- [12] 董会平,夏帆,张华山. 紫外-LiCl 复合诱变选育高产糖化酶菌株[J]. 酿酒科技,2009(8):33-37.
- [13] 杨琦,张臻,任贤,等. 糖化酶生产菌的分离鉴定及其选育[J]. 安徽农业科学,2010,38(36):39-41.
- [14] 刘杰雄,陈号,陆雯,等. 淀粉酶高产菌株的筛选及其酶活的测定[J]. 食品工程,2010(1):45-47.
- [15] 周德庆. 微生物学实验教程. 第 2 版[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [16] 吕利华,梁丽绒,赵良启. 高糖化酶活菌株的选育及其在山西老陈醋酿造中的应用[J]. 食品与发酵工业,2007,33(9):83-85.
- [17] 罗惠波,谢军,黄治国,等. 纯种根霉麸曲制曲工艺优化研究[J]. 四川理工学院学报(自科版),2015,28(5):7-11.
- [18] 陈美军,孔繁翔,陈非洲,等. 太湖不同湖区真核微型浮游生物基因多样性的研究[J]. 环境科学,2008,29(3):769-775.
- [19] WHITE T J. A guide to methods and applications[M]. Academic Press, Inc, 1990:315-322.
- [20] 张翠英,张艳英,齐亚楠,等. 低产高级醇酿酒酵母工程菌株在小曲酒酿造中的应用[J]. 酿酒科技,2013(7):62-64.
- [21] 张琳,张也,王如福,等. 大曲中高产糖化酶菌株的筛选及环境耐受性分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2016,36(10):740-744.
- [22] 邱增钰,王亚平,李博艺,等. 温度对高温大曲液态培菌过程菌群结构的影响[J]. 中国酿造,2017,36(5):30-35.
- [23] 胡春耕,文祥明. 一种用于白酒生产的糠壳加工工艺:CN, CN102978058 A[P]. 2013.
- [24] 叶光斌,罗惠波,王毅,等. 根霉 3.866 在川法麸曲中的应用研究[J]. 酿酒科技,2014(9):56-58.
- [25] 戴超,冷云伟. 影响固态发酵的因素及控制策略[J]. 江苏调味副食品,2008,25(5):34-35.
- [26] 鲁珍,刘家扬,湛馥佳,等. 高温大曲中高产糖化酶菌株的筛选鉴定及固态发酵条件优化[J]. 湖南农业科学,2016(4):1-4.

The selection of high yield glucoamylase starter and the optimization of its solid fermentation production enzyme

LIU Ming-ming, ZHOU Yang-zi, YUAN Le-mei, LIU Xin-yu, BIAN Ming-hong*

(Liquor Making Biological Technology and Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

ABSTRACT The strain of high yield glycosylated enzyme was screened from the wine, and the tolerance study of the screened strains and the optimization of the enzymatic conditions of the solid fermentation were carried out. Tolerance test results showed that the strain was tolerant of 10% alcohol and the pH 4 above, and its growth was significantly inhibited at pH 3.5, while it could grow better at 23-41 °C. By single factor test and orthogonal test, the best conditions for solid-state fermentation determined as follows: enzyme addition of 4%, bran shell quantity of 1.25%, initial pH value of 5.5, water ratio 5:3 (g:mL), cultivation at 30 °C for 72 h. Under these conditions, the saccharifying enzyme activity was up to 1791.3 U/g. The strain was made into a light disc. The appearance was in accordance with the requirements, and the content of sugar was 24.76 g/100g.

Key words glycosylase; the mold; solid fermentation; enzyme production optimization