

红心曲来源 *Thermoascus aurantiacus* QH-1 的生长代谢特征

唐艺婧, 来欢欢, 赵微, 崔美林, 张秀红

Characteristics of Growth and Metabolism of *Thermoascus aurantiacus* QH-1 Derived Hongxinqu

TANG Yijing, LAI Huanhuan, ZHAO Wei, CUI Meilin, and ZHANG Xiuhong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023010052>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

赊店老酒大曲质量差异研究

Study on Quality Difference of Daqu in SheDianLaoJiu

食品工业科技. 2019, 40(23): 77-80,87 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.013>

张弓老酒大曲中耐高温酵母菌的分离鉴定及发酵条件优化

Isolation and Identification of High Temperature Yeast in Zhanggonglaojiu Daqu and Optimization of Fermentation Conditions

食品工业科技. 2020, 41(10): 124-130 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.021>

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

Activities analysis of main functional enzymes from strong-flavour Daqu of Chinese liquor during fermentation and storage stages

食品工业科技. 2018, 39(11): 270-274,286 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.11.046>

一株高产 β -苯乙醇酵母菌的筛选、鉴定及其发酵条件优化

Screening of a high-yield β -phenylethanol yeast and optimization of its cultural conditions

食品工业科技. 2017(05): 151-158 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.05.020>

基于磷脂脂肪酸分析技术的大曲微生物群落结构多样性研究

Studies on Daqu microbial community structure based on phospholipid fatty acid(PLFA) analysis

食品工业科技. 2017(01): 160-164 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.01.023>

低频静电场辐射对酿酒酵母生长代谢的影响

Effects of low frequency electrostatic field radiation on growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*

食品工业科技. 2018, 39(2): 124-127,133 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.02.024>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

唐艺婧, 来欢欢, 赵微, 等. 红心曲来源 *Thermoascus aurantiacus* QH-1 的生长代谢特征 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 117–124. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010052

TANG Yijing, LAI Huanhuan, ZHAO Wei, et al. Characteristics of Growth and Metabolism of *Thermoascus aurantiacus* QH-1 Derived Hongxinqu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 117–124. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010052

· 生物工程 ·

红心曲来源 *Thermoascus aurantiacus* QH-1 的生长代谢特征

唐艺婧¹, 来欢欢¹, 赵微², 崔美林², 张秀红^{2,*}

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西太原 030000;

2. 山西师范大学食品科学学院, 山西太原 030000)

摘要: 为探究黄嗜热子囊菌的生长代谢特征, 对红心曲来源的黄嗜热子囊菌 QH-1 的最适生长条件、乙醇耐受性、生长曲线及糖化酶液化酶等进行了分析。结果显示, 黄嗜热子囊菌 QH-1 在 PDA, MEA 和 SDA 丰富培养基中生长迅速且有色素, 在合成培养基察氏及 G25N 培养基上生长的菌落生长较慢几乎没有色素; 黄嗜热子囊菌 QH-1 的最适生长条件为: 温度 45 ℃, pH4.0, 接种量 3%, 装液量 160 mL; 该菌株最低和最高生长温度分别为 26 和 60 ℃; 制曲酿酒原料中, 高粱米为其生长最佳原料, 6% 的乙醇不会影响其生长; 在大麦豌豆固态培养基中前期生长缓慢, 糖化酶活性较低, 6~8 d 生长速度加快, 糖化酶活性增加, 生长曲线与糖化酶曲线较为相似, 第 10 d 检出液化酶。研究结果为该菌株进一步开发利用提供必要信息。

关键词: 大曲, 黄嗜热子囊菌, 生长代谢特征, 糖化力

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0117-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010052



本文网刊:

Characteristics of Growth and Metabolism of *Thermoascus aurantiacus* QH-1 Derived Hongxinqu

TANG Yijing¹, LAI Huanhuan¹, ZHAO Wei², CUI Meilin², ZHANG Xiuhong^{2,*}

(1. School of Life Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030000, China;

2. School of Food Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030000, China)

Abstract: To explore the growth metabolic characteristics of *Thermoascus aurantiacus*, the optimal growth conditions, ethanol tolerance, growth curve, saccharifying power and liquefaction power of *Thermoascus aurantiacus* QH-1 were analyzed. The results showed that *Thermoascus aurantiacus* QH-1 grew rapidly and had pigment in PDA, MEA and SDA mediums with rich in nutrients, and colonies growing on synthetic medium and G25N medium grew slowly and almost no pigment. The optimal growth conditions of *T.aurantiacus* QH-1 strain was as follows: Temperature 45 ℃, pH4.0, inoculum concentration 3%, liquied loading volume 160 mL. The lowest and highest growth temperatures of *Th. aurantiacus* QH-1 were 26 and 60 ℃, respectively. Among the raw materials for brewing Daqu, sorghum rice was the best for its growth, and the concentration of 6% ethanol had no effect on the growth of *T.aurantiacus* QH-1. *T.aurantiacus* QH-1 grew slowly with lower saccharifying power in the early stage, and the growth rate accelerated with the higher saccharifying power at 6~8 days in solid state medium of barley and pea. The growth curve of *T.aurantiacus* QH-1 was similar to its change curve of saccharifying power. However, its liquefying power was detected on day 10. The results provided necessary information for the further development and utilization of *T.aurantiacus* QH-1.

收稿日期: 2023-01-11

基金项目: 山西师范大学研究生教育创新项目 (2021XSY041); 山西省自然科学基金项目 (202103021223255); 山西省自然科学基金项目 (202203021221135)。

作者简介: 唐艺婧 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 应用微生物, E-mail: 1875625169@qq.com。

* 通信作者: 张秀红 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 应用微生物, E-mail: cwm_ming@163.com。

Key words: Daqu; *Thermoascus aurantiacus*; characteristics of growth metabolism; saccharifying power

嗜热子囊菌(*Thermoascus*)属于真菌门,子囊菌亚门,散囊菌目,耐热囊菌科(*Thermoascaceae*),是一类嗜热真菌,即最低生长温度为 20 或 20 °C 以上,最高生长温度为 50 °C 或 50 °C 以上的特殊真菌类群^[1]。嗜热子囊菌属具有橙黄或红棕的闭囊壳,含有 6~8 个子囊孢子,不同菌种的无性时代区较大,可以没有,也可以是拟青霉状或者多拟青霉状^[2]。自 1907 年首次被分离出来,目前的菌种并不多,只有六个种(*T.aegyptiacus*, *T.aurantiacus*, *T.crustaceus*, *T.isatschenkoi*, *T.taitungiacus* 和 *T.thermophilus*)和两个变种(*T.crustaceus* var. *verrucosus* 和 *T.aurantiacus* var. *levisporus*)^[3]。嗜热真菌多存在于堆肥、草堆、植物种子堆、沙漠、温泉等温度较高的自然环境中,能产生多种耐热的生物大分子水解酶类,尤其是纤维素酶、半纤维素酶和木质素酶等。如广西土壤分离的黄嗜热子囊菌 *T.aurantiacus* QS7-2-4 木聚糖酶最佳的合成温度是 50 °C,木聚糖酶的最适温度高达 70~80 °C^[4]; *T.crustaceus* JCM12803 的双功能木聚糖/纤维素酶对桦木木聚糖、小麦阿拉伯木聚糖、羧甲基纤维素钠和地衣多糖均有降解活性,最适 pH 和最适温度分别为 5.0 和 65~70 °C^[5];黄嗜热子囊菌几丁质酶的最适反应温度为 60 °C,最适反应 pH 值为 8.0,70 °C 处理 30 min 仍有 45% 的相对酶活,具有较好的热稳定性及工业应用价值^[6]。

近年来,在中国白酒酿造的大曲和酒醅中也发现大量嗜热子囊菌,如在浓香型中温大曲制曲过程中发现,嗜热子囊菌属为优势菌,在第 10 d 时比例高达 77.1%,之后一直保持在 40% 以上^[7];在生产酱香白酒的高温大曲真菌群落结构中,红曲和白曲中嗜热子囊菌属竟占到真菌的 84% 和 65%,黑曲和黄曲中略少,分别为 18% 和 13%^[8];河北酱酒大曲制曲过程中,发酵 10 d 时嗜热子囊菌属也占到真菌的 64.4%^[9];湖北襄阳高温大曲中,嗜热子囊菌属在白曲、黑曲和黄曲都是绝对优势真菌,比例高达 34.76%^[10];同时,在其他的大曲中也发现大量嗜热子囊菌存在^[11-15]。不仅在大曲中,在浓香白酒酒醅中也发现大量嗜热子囊菌。Zhang 等^[16]将四川绵竹浓香白酒厂的酒醅置于玻璃瓶中 30 °C 发酵 70 d,嗜热子囊菌属和曲霉属在整个发酵期平均丰度大于 10% 而成为核心真菌。郭敏等^[17]对酱香型白酒微生态多样性的研究中发现,嗜热子囊菌是酱香型白酒发酵过程真菌微生物中的绝对优势菌,它可以产生多种具有高活力及热稳定性的水解酶,有利于酿酒原料被其他微生物利用,起到促进微生物繁殖生长以及产酒生香的作用;黄嗜热子囊菌能产生 α -淀粉酶,与玉米、玉米芯、稻草和大豆相比,在麸皮培养基上 α -淀粉酶活性最高,而且其 α -淀粉酶在 10% 的酒精浓度下酶活性还能保留 90% 以上^[18]。嗜热子囊菌有可能是中国白酒酿造的

功能菌,但对于纯菌株的生长特性尚不清楚。本课题组发现嗜热子囊菌属是清香大曲红心曲红心部分的关键微生物,并且从清香大曲中的红心曲中分离到的一株可以产红色色素的黄嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus* QH-1),所以本文从培养基、起始 pH、装液量、接种量、制曲原料、乙醇含量及致死温度等方面探讨其生物学特性,并将其进行固态发酵,测量其理化指标,为该菌株后续开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus* QH-1)

分离自红心曲,保藏于本实验室;小麦、豌豆 山东菏泽;大麦 河南信阳;高粱米 四川成都;蛋白胨 北京奥博星生物技术有限责任公司;发酵专用麦芽浸粉、琼脂粉 北京索莱宝科技有限公司;蔗糖、 KH_2PO_4 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 分析纯,天津市光复科技发展有限公司;葡萄糖 分析纯,天津市北辰方正试剂厂;KCl 分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司; NaNO_3 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 MgSO_4 分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、三氯乙酸 分析纯,天津市大茂化学试剂厂;Yeast Extract Powder 酵母粉 优级纯,赛默飞世尔科技公司;VB₁ 生物试剂,广州硕谱生物科技有限公司;NaOH 分析纯,洛阳市化学试剂厂;马铃薯葡萄糖水、PDA 培养基 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;无水乙醇 分析纯,天津市北辰方正试剂厂;甘油 分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司;MEA 培养基 北京酷来博科技有限公司。

GI80DS 立式压力蒸汽灭菌锅 致微(厦门)仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计 上海雷磁仪器厂;ZHJH-C1112B 智城超净工作台、ZXMP-R1230 恒温恒湿培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司;D-37520 低速冷冻离心机 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;BSA124S 分析天平(感量 0.0001 g) 瑞士 METTLER TOLEDO 公司;电热鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;V-1800PC 型可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 SDA 培养基;察氏培养基;25% 甘油硝酸盐琼脂培养基(G25N);种子培养基:在马铃薯葡萄糖培养基中,加入的蛋白胨 18 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, VB₁ 0.05 g/L;发酵培养基:麦芽浸出粉 2 g/L, 酵母浸出粉 18 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, VB₁ 0.05 g/L;小麦浸出液:200 g 小麦,加入 800 mL 水,蒸煮 30 min,3 层纱布过滤;小麦、大麦浸出液:小麦与大麦共称取 200 g,其配比为 85:15,加入 800 mL 水,蒸煮 30 min,3 层纱布过滤;大麦、豌豆浸出液:大麦与豌豆共称取

200 g,其配比为 65:35,加入 800 mL 水,煮沸 30 min,3 层纱布过滤;高粱米浸出液:200 g 高粱米,加入 800 mL 水,煮沸 30 min,3 层纱布过滤^[19-20]。大麦豌豆培养基:大麦与豌豆粉碎过筛按照 65:35 的比例混匀,粗粉与细粉的比例为 6:4(粗粉为过 60 目筛,细粉为过 30 目筛),加水量为原料的 38%,随后用玻璃棒搅拌均匀^[21]。

1.2.2 黄嗜热子囊菌的培养 将黄嗜热子囊菌接种在 PDA 培养基上活化 5~7 d,铲出 1 cm×1 cm 的菌饼,采用“三点”接种法,分别将菌饼接种于在 PDA、MEA、SDA、察氏培养基和 G25N 培养基中,各菌饼相隔约 40 mm,每种培养基设置 3 个重复,于 45 ℃ 的培养箱中培养 5 d,每天观察黄嗜热子囊菌菌株在不同培养基上的菌丝长势、菌落形态、菌丝和菌落颜色变化^[22]。

1.2.3 种子液的制备 将储存于斜面的黄嗜热子囊菌接种在 PDA 培养基上活化 5~7 d,使用接种铲取出 1 cm×1 cm 的菌饼 7~8 块,放置于种子培养基中,在温度为 45 ℃,转速为 180 r/min 的摇床中培养 3 d,将一代种子液按 10% 的接种量转接于种子培养基中,在相同培养条件下培养 1 d,即得种子液^[23-24]。

1.2.4 培养条件对黄嗜热子囊菌生长的影响

1.2.4.1 温度“三基点”的确定 将直径为 1 cm 的菌饼置于 PDA 培养基中,分别培养在温度为 30、35、45、55、60 ℃ 的培养箱中,培养 5 d,观察菌丝生长,确定最低生长温度及致死温度的范围,再按 1 ℃ 温度梯度进行上述处理确定最终的菌株最低生长温度及致死温度^[25]。

1.2.4.2 pH 对黄嗜热子囊菌生长的影响 参照郭淑清^[26]的方法,使用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 将发酵培养基的 pH 调成 3、4、5、6、7。按照 5% 的接种量将种子液接种于发酵培养基中。培养一定时间后,把发酵液取出,按照菌丝干重的测定方法,对生长在不同 pH 发酵培养基中的菌丝干重进行测定。

1.2.4.3 接种量对黄嗜热子囊菌生长的影响 分别按照 3%、5%、7%、9%、11% 的接种量将种子液接种于发酵培养基中。培养一定时间后,把发酵液取出,按照菌丝干重的测定方法,对菌丝干重进行测定。

1.2.4.4 装液量对黄嗜热子囊菌生长的影响 将发酵培养基按照 80、100、120、140、160、180 mL 装入 250 mL 的锥形瓶中。以接种量为 5% 的种子液接入发酵培养基中。培养一定时间后,把发酵液取出,按照菌丝干重的测定方法,对生长在不同装液量发酵培养基中的菌丝干重进行测定。

1.2.4.5 制曲酿酒原料对黄嗜热子囊菌生长的影响

把种子液按 5% 的量接种于小麦、小麦和大麦、大麦和豌豆、高粱米浸出液培养基。培养一定时间后,把发酵液取出,按照菌丝干重的测定方法,对菌丝干重进行测定。

1.2.4.6 黄嗜热子囊菌乙醇耐受性分析 将种子液按 5% 的接种量接种于含有 0、3%、6%、9%、12%、15% 乙醇的发酵培养基中,培养一定时间后,把发酵液取出,按照菌丝干重的测定方法,对菌丝干重进行测定。

1.2.4.7 黄嗜热子囊菌的生长曲线及代谢分析 把种子液按 5% 的量接种于大麦和豌豆固体培养基中(培养温度 45 ℃),于培养天数为 2、4、6、8、10 d 时取出固态培养物,对固态培养物的生物量、pH、酸度、糖化力及液化力进行测定。pH、酸度、糖化力及液化力的测定方法参考 QB/T 4257-2011。黄嗜热子囊菌固态培养物生物量的测定:称取 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 g 的液体培养所得纯菌体,分别加入 25 mL 5% 的三氯乙酸溶液,80 ℃ 水浴 25 min,随即冰浴冷却,于 8000 r/min,4 ℃ 离心 15 min,以 5% 三氯乙酸作空白对照,于 260 nm 处测 OD 值,绘制标准曲线。随后取 0.25 g 固态培养物,适当研磨,按照纯菌体中核酸的提取方法进行提取,未经发酵的固态基质采用同样的方法处理作为空白对照,在 260 nm 处测定提取液的 OD 值,由所测 OD 值对照纯菌体标准曲线关系换算成菌体量^[27]。以纯菌体质量为横坐标,OD 值为纵坐标绘制标准曲线。本实验所得黄嗜热子囊菌生物量的标准曲线方程为 $y=26.17x+0.1011$, $R^2=0.9988$ 。

1.3 数据处理

试验测得的所有数据均利用 Microsoft Excel 2010 进行处理,运用 Origin 2021 软件完成相关图的绘制,其显著性用 SPSS 20.0 软件处理分析。

2 结果与分析

2.1 培养基对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

将活化的黄嗜热子囊菌 QH-1 接种在 PDA、MEA、SDA、察氏培养基和 G25N 培养基上,5 d 后菌落形态如图 1 所示。从图 1 中可以看出,PDA、MEA 和 SDA 三种培养基营养丰富,在 PDA、MEA 和 SDA 培养基上的生长速度较快,3 d 基本长满整个平板,而且菌丝致密呈辐射状生长,在 PDA、MEA 上有明显褶皱形成,并且还有色素的产生,在 PDA 和 SDA 上色素呈橙色,在 MEA 上则为暗红色;察氏培养基为合成培养基菌株,菌丝非常稀疏,生长较慢,也没有色

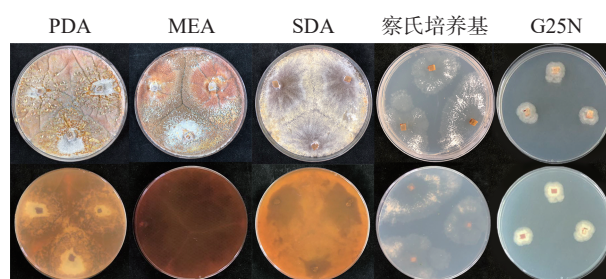


图 1 培养基对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

Fig.1 Effect of culture medium on *Thermoascus aurantiacus* QH-1 growth

素合成;G25N 培养基在察氏培养基的基础上添加了酵母浸出粉和大量甘油,在此培养基上黄嗜热子囊菌 QH-1 生长速度最慢,在 45 ℃ 培养 5 d 后,菌落直径仅 1.2 cm,几乎没有色素合成,说明甘油不是该菌株适宜的碳源。

2.2 黄嗜热子囊菌 QH-1 生长温度三基点的测定

温度是影响微生物生长的重要因素。将活化好的黄嗜热子囊菌 QH-1 接种到 PDA 培养基上,在不同温度下生长 5 d,其菌落直径如图 2。从图 2 中可以看出,黄嗜热子囊菌 QH-1 在不同温度下菌落直径相差较大,45 ℃ 生长最快,菌落直径高达 9 cm,而且在 3 d 时就铺满整个平板;其次是 55 ℃,直径为 3.7 cm,35 ℃ 生长比较弱,仅 1.4 cm,在 30 和 60 ℃ 几乎没有生长。可见最适生长温度为 45 ℃。为进一步确定其最低和最高生长温度,从 26~30 ℃ 和 56~60 ℃ 范围内,每相差 1 ℃ 考察其生长情况,结果见表 1。从表 1 可以看出,黄嗜热子囊菌 QH-1 在 26 和 60 ℃ 不能生长,因此 26 和 60 ℃ 就是该菌株的最低和最高生长温度,满足 20 ℃ 以下不能生长,最高生长温度大于 50 ℃,是典型的嗜热真菌。

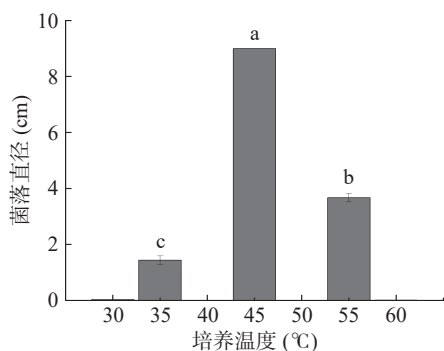


图 2 温度对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

Fig.2 Growth of *Thermoascus aurantiacus* QH-1 on different temperature

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);图 2~图 7 同。

表 1 黄嗜热子囊菌 QH-1 的最低及最高生长温度

Table 1 The maximum and minimum growth temperature of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

培养温度(°C)	生长状况	培养温度(°C)	生长状况
26	-	56	+++
27	+	57	+
28	+	58	+
29	+	59	+
30	++	60	-

注:+++表示菌株在当前培养温度下生长速度较慢,培养 5 d 有细微的菌丝出现;++表示菌株在当前培养温度下生长非常缓慢,5 d 后菌丝稀少;+表示菌株在当前培养温度下可以生长,5 d 菌落生长直径为 0,但可见菌丝萌发;-表示菌株在当前培养温度下 5 d 内未生长。

2.3 pH 对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

pH 也是影响微生物的生长繁殖及产物合成的关键因素^[28]。pH 对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出,随着 pH 的不断升高,菌株的生物量不断增高。在 pH4 时,黄嗜热

子囊菌 QH-1 的生物量最高,其干重可达 2.09 g,菌株在 pH4~6 范围内无显著性区别;而在 pH7 时,黄嗜热子囊菌 QH-1 的干重显著性降低,只有 1.09 g。整体看来,黄嗜热子囊菌 QH-1 适宜在 pH<7 的弱酸性环境生长。

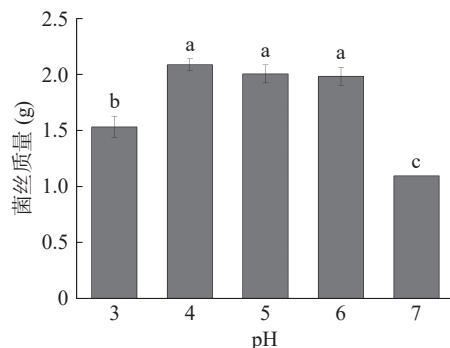


图 3 pH 对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

Fig.3 Effect of pH on the growth of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

2.4 接种量对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

接种量是影响菌株生长的重要因素。一般接种量过高,培养基营养物质有限,菌体密度过高,使得菌体营养供给不足;接种量过低,菌种密度低,繁殖速度较慢^[29]。黄嗜热子囊菌 QH-1 在不同接种量培养基中的生长情况如图 4 所示。从图中可以看出,黄嗜热子囊菌的接种量为 3% 时,菌株的生物量最高,为 2.59 g;而随着接种量的升高,生物量呈现降低的趋势,推测是由于接种量过高,菌种繁殖速度较快从而导致培养基的营养物质消耗过快,使后期生长受到影响导致最终生物量降低。

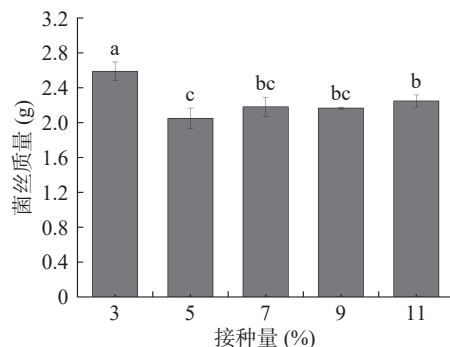


图 4 接种量对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

Fig.4 Effect of inoculum on the growth of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

2.5 装液量对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

装液量会影响培养基中的溶解氧而影响微生物的生长。一般装液量越少,传氧系数越大。由于黄嗜热子囊菌 QH-1 培养温度稍高,在液体培养过程中发酵液的蒸发不容忽视^[30]。所以在液态培养时,需要对摇瓶装液量进行研究,找出适合的装液量。黄嗜热子囊菌 QH-1 在不同装液量培养基中生长情况如图 5 所示。从图中可以看出,随着装液量的不断增加,微生物的生物量也在增加。在装液量达到 160 mL 时,

黄嗜热子囊菌 QH-1 的生物量最高, 为 3.31 g; 而在装液量为 180 mL 时, 生物量出现了下降, 为 2.99 g, 推测由于装液量过高, 使得锥形瓶内氧气含量降低, 导致菌体死亡。因此 160 mL 为黄嗜热子囊菌 QH-1 液态培养的最佳装液量。

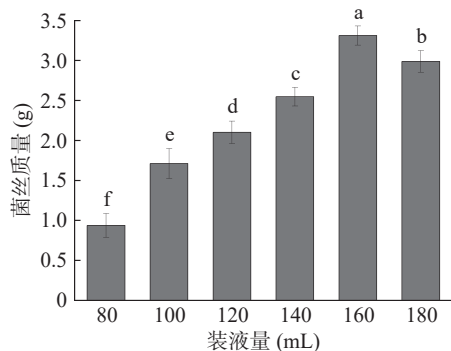


图 5 装液量对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

Fig.5 Effect of liquid volume on the growth of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

2.6 制曲原料对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

黄嗜热子囊菌在多种大曲中发现, 有可能是酿酒功能菌^[31-34]。不同的酿酒原料由于营养成分及比例不同, 会影响黄嗜热子囊菌 QH-1 的生长。将黄嗜热子囊菌 QH-1 接种在不同酿酒原料制成的液态培养基, 其生长情况如图 6 所示。从图中可以看出, 黄嗜热子囊菌 QH-1 在高粱米液态培养基中的生物量最高, 为 0.57 g; 而在小麦和大麦制成的混合培养基中的生物量最低, 仅 0.24 g/100 mL。此外, 从图 6 中可以看出, 黄嗜热子囊菌 QH-1 在 3 d 内的生长状况没有在以发酵培养基为营养成分培养的效果好, 其原因是微生物在短期生长时间内, 不能直接利用制曲原料中复杂的营养成分, 例如多糖、纤维素等, 而相对于制曲原料来说, 发酵培养基的成分比较简单, 黄嗜热子囊菌 QH-1 可以直接利用。因此, 黄嗜热子囊菌 QH-1 在合成培养基中的生长速度高于在天然培养基中培养, 而在天然培养基中, 高粱米是最佳培养原料。

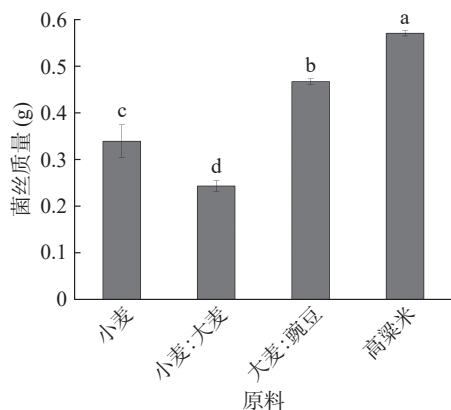


图 6 不同制曲原料对黄嗜热子囊菌 QH-1 生物量的影响

Fig.6 Effects of different materials on the biomass of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

2.7 黄嗜热子囊菌 QH-1 乙醇耐受性分析

在白酒的酿造过程中, 随着发酵时间的推移, 乙醇是最主要的代谢产物, 会影响很多酒醅微生物的生长代谢, 乙醇耐受性是酿酒微生物必备的重要特性^[35]。黄嗜热子囊菌 QH-1 在不同乙醇浓度培养基中的生长情况如图 7 所示。从图中可以看出, 黄嗜热子囊菌 QH-1 在 0~6% 乙醇含量的培养基中生长 3 d 后的生物量没有显著性差异, 为 1.16~1.26 g, 也就是说 6% 的乙醇对黄嗜热子囊菌 QH-1 的生长没有任何影响; 当乙醇含量增长为 9% 时生物量出现了显著下降为 0.77 g, 并且随着乙醇含量的不断增加, 生物量明显下降。因此低浓度乙醇含量不会影响黄嗜热子囊菌 QH-1 的生长, 但随着乙醇含量的不断增加, 其生长会受到影响。

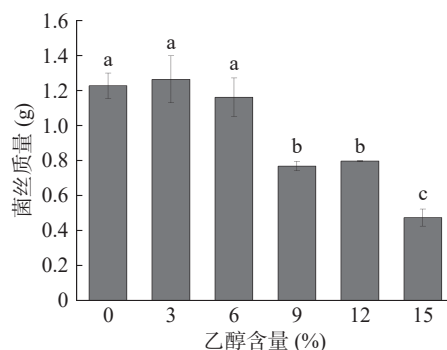


图 7 乙醇浓度对黄嗜热子囊菌 QH-1 生长的影响

Fig.7 Effects of different ethanol content on the biomass of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

2.8 黄嗜热子囊菌 QH-1 的生长曲线及产酸能力

为了进一步考察黄嗜热子囊菌 QH-1 在清香大曲制曲过程中的生长代谢, 为该菌的开发利用提供信息, 将黄嗜热子囊菌 QH-1 以 5% 的接种量接种于大麦和豌豆组成的固态培养基中, 培养不同时间后测定其生长量以及培养物的 pH 和酸度, 结果如图 8 所示。从图 8 中可以看出, 黄嗜热子囊菌 QH-1 在清香大曲原料中可以生长, 前期生长较为缓慢, 6~8 d 生长较快, 之后趋于平稳, 第 10 d 达到 0.45 g/g。黄嗜热子囊菌 QH-1 在大麦豌豆培养基中生长时, 能产生少量的酸, 在第 10 d 固态培养物中酸度达到 2.1 mmol/10 g, pH 则从 7.44 降到 6.86。酿酒过程中, 大曲糖化酶将高粱淀粉降解为还原糖后, 经酵母菌转化为酒精, 如果其他微生物将还原糖代谢为酸等其他代谢产物将会降低产酒率。酒醅中往往有大量乳酸菌, 把还原糖转化为乳酸, 形成白酒主要风味物质, 但是如果乳酸过多, 除了降低酒精产量外, 乳酸与乙醇酯化为乳酸乙酯, 改变酒醅中乙酸乙酯与乳酸乙酯的比例, 改变清香白酒的口感, 进而影响新产酒的质量^[36]。另外, 丝状真菌也在酒醅中出现, 如黑曲霉、红曲霉和米根霉等均可代谢产生有机酸, 也会影响产酒率^[37-43]。黄嗜热子囊菌 QH-1 在 45 °C 产酸较少, pH 仅下降 0.58, 在正常酿酒的条件下, 产酸可能会更少些, 不会

影响产酒率。

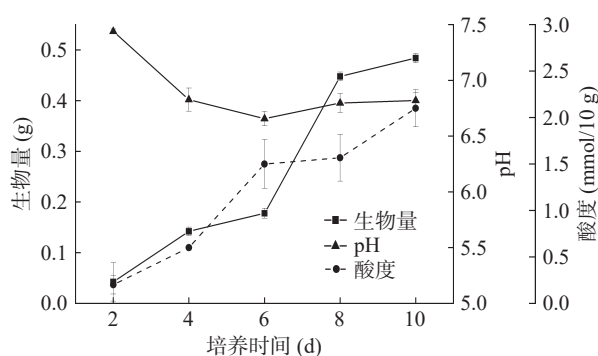


图8 黄嗜热子囊菌 QH-1 的生长曲线及产酸变化

Fig.8 Growth curve and changes in acid production of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

2.9 黄嗜热子囊菌 QH-1 糖化力和液化力分析

大麦和豌豆主要成分是淀粉,黄嗜热子囊菌 QH-1 纯菌株能在大麦豌豆固态培养基中生长,说明其能产生一定的淀粉酶。因此,考察了其糖化力和液化力,结果如图 9 所示。从图 9 可知,在培养前 4 d 几乎没有糖化酶,第 6 d 开始检测到糖化酶,之后糖化酶活性逐渐增强,第 10 d 时达到 349 U,糖化力的变化趋势与其生长曲线较为相似,说明黄嗜热子囊菌 QH-1 产生糖化力降解淀粉产生葡萄糖,提供碳源在黄嗜热子囊菌 QH-1 生长中起到重要作用。液化力直到第 10 d 才检测到,为 0.73 U。本课题组在跟踪大曲制作过程中液化力变化时,发现液化力也是在制曲后期出现,推测液化酶可能需要特殊的物质诱导才能合成。从图 8 的生长曲线可知,第 10 d 时黄嗜热子囊菌 QH-1 处于稳定期,会有大量次生代谢物出现,因而诱导液化酶合成并表现出活性。

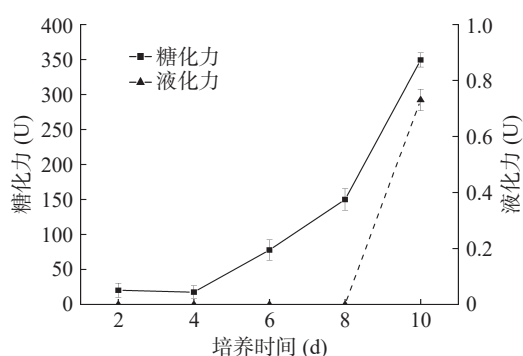


图9 黄嗜热子囊菌 QH-1 固态发酵过程中的糖化力与液化力

Fig.9 Saccharification and liquefaction power of solid-state fermentation of *Thermoascus aurantiacus* QH-1

3 结论

本研究对红心曲来源黄嗜热子囊菌 QH-1 的生物学特性进行了分析。黄嗜热子囊菌 QH-1 在营养丰富的 PDA、SDA、MEA 培养基上生长速率较快,菌丝呈放射性生长,呈现深浅不等色素;在察氏培养基及 G25N 培养基上生长速率较慢,且菌丝稀疏透

明。黄嗜热子囊菌 QH-1 的最适生长条件为: 45 ℃, pH4.0, 接种量为 3%, 装液量为 160 mL, 6% 的乙醇, 以高粱米浸出液为培养基。在清香大曲原料大麦豌豆中, 前期糖化力较低, 生长较慢, 6~8 d 时糖化力最高, 生长也最快, 第 10 d 检出有液化力, 在大麦豌豆中的生长曲线与糖化酶合成曲线较为相似, 生长过程中产生少量的酸。本研究结果丰富了大曲的功能微生物, 为黄嗜热子囊菌 QH-1 的进一步开发利用提供必要信息。但是, 红心曲的重要特征是红心, 黄嗜热子囊菌 QH-1 产生红色色素的条件还不确定, 在制曲酿酒中真正起作用的是色素, 还是与色素相平行的其他代谢产物尚不清楚, 都需要进一步的考察研究。

参考文献

- [1] 王冬梅. 嗜热真菌分类及嗜热子囊菌光孢变种内 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及特性研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2005. [WANG Dongmei. Taxonomic studies on thermophilic fungi and purification and properties endocellulase and β -glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporus*[D]. Jinan: Shandong agriculture university, 2006.]
- [2] HOUBRAKEN J, KOCSUBÉ S, VISAGIE C M, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species[J]. *Studies in Mycology*, 2020, 95: 5-169.
- [3] 赵春青. 中国嗜热真菌分类研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2006. [ZHAO C Q. Taxonomics studies on the *Thermophilic fungi* from China[D]. Jinan: Shandong agriculture university, 2006.]
- [4] 庞宗文, 郭法谋, 徐勇, 等. 高产木聚糖酶嗜热子囊菌固体发酵条件与酶学性质[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(3): 170-173, 236. [PANG Zongwen, GUO Famou, XU Yong, et al. Optimization of xylanase production conditions by *Thermoascus aurantiacus* QS7-2-4 in solid state fermentation and the properties of xylanase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(3): 170-173, 236.]
- [5] 李晓丽, 涂涛, 姚斌, 等. 嗜热子囊菌 JCM12803 来源的双功能木聚糖/纤维素酶[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(12): 1996-2006. [LI Xiaoli, TU Tao, YAO Bin, et al. A novel bifunctional xylanase/cellulase TcXyn10A from *Thermoascus crustaceus* JCM12803[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(12): 1996-2006.]
- [6] 张捷, 谢晨, 郭晓红, 等. 嗜热子囊菌原变种 *Thermoascus aurantiacus* var. *aurantiacus* 热稳定几丁质酶的克隆表达及活性研究[J]. *菌物学报*, 2010, 29(5): 691-697. [ZHANG Jie, XIE Chen, GUO Xiaohong, et al. Cloning, expression and characterization of a thermostable chitinase from *Thermoascus aurantiacus* var. *aurantiacus*[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(5): 691-697.]
- [7] XIAO Chen, LU Zhenming, ZHANG Xiaojuan, et al. Bio-Heat is a key environmental driver shaping the microbial community of medium-temperature Daqu[J]. *Applied and Environmental microbiology*, 2017, 83(23): e01550-17.
- [8] DENG Ling, MAO Xiang, LIU Dan, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu with different colors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 588117.
- [9] JIANG Qianer, WU Xianyu, XU Youqiang, et al. Microbial composition and dynamic succession during the Daqu production process of northern Jiang-flavored liquor in China[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(5): 224-239.

- [10] CAI Wenchao, XUE Yuang, WANG Yurong, et al. The fungal communities and flavor profiles in different types of high-temperature daqu as revealed by high-throughput sequencing and electronic senses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 784651.
- [11] 杨少勇,黎婷玉,蔡文超,等.襄阳地区高温大曲和中高温大曲真菌多样性解析[J]. *中国酿造*, 2021, 40(5): 76–80. [YANG Shaoyong, LI Tingyu, CAI Wenchao, et al. Analysis of fungal diversity in high-temperature Daqu and medium-high-temperature Daqu from Xiangyang[J]. *China Brewing*, 2021, 40(5): 76–80.]
- [12] 程伟,陈雪峰,陈兴杰,等.基于高通量测序解析浓香型大曲真菌群落结构及其与质量指标的关联性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(22): 194–200, 212. [CHENG Wei, CHEN Xuefeng, CHEN Xingjie, et al. Analysis of community structure diversity of fungal based on high-throughput sequencing and its correlation with quality indicators of Strong-flavor Daqu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(22): 194–200, 212.]
- [13] 周森,胡佳音,崔洋,等.应用高通量测序技术解析清香型大曲微生物多样性[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(6): 244–250. [ZHOU Sen, HU Jiayin, CUI Yang, et al. Application of high-throughput sequencing technology to resolve the microbial diversity of Light-flavor Daqu[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(6): 244–250.]
- [14] 赵志军,郇燕燕,刘延波,等.采用高通量测序技术分析宝丰清香型白酒大曲的真菌多样性[J]. *现代牧业*, 2022, 6(2): 45–52. [ZHAO Zhijun, GAO Yanyan, LIU Yanbo, et al. Analysis of fungal diversity of Baofeng light-flavor Baijiu Daqu by high-throughput sequencing technology[J]. *Modern Animal Husbandry*, 2022, 6(2): 45–52.]
- [15] 吴树坤,谢军,卫春会,等.四川不同地区浓香型大曲微生物群落结构比较[J]. *食品科学*, 2019, 40(14): 144–152. [WU Shukun, XIE Jun, WEI Chunhui, et al. Comparison of microbial community structure of starter cultures (Daqu) for Luzhou-flavor liquor in different regions of Sichuan[J]. *Food Science*, 2019, 40(14): 144–152.]
- [16] ZHANG Yanyan, ZHU Xiaoyu, LI Xiangzhen, et al. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese Strong-flavored liquor[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 196–206.
- [17] 郭敏,黄永光,邱树毅,等.高通量测序在酱香白酒微生物多样性研究中的应用[J]. *中国酿造*, 2017, 36(5): 146–151. [GUO Min, HUANG Yongguang, QIU Shuyi, et al. Application of high-throughput sequencing in microbial diversity of Moutai-flavor Baijiu[J]. *China Brewing*, 2017, 36(5): 146–151.]
- [18] DE OLIVEIRA A P, SILVESTRE M A, GARCIA N F, et al. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation[J]. *The Scientific World Journal*, 2016, 2016: 1–10.
- [19] 王小平,黄永光,周文美.产酱香风味菌株的分离筛选及鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(10): 179–184. [WANG Xiaoping, HUANG Yongguang, ZHOU Wenmei. Isolation, screening and identification of Maotai-flavor producing strains[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(10): 179–184.]
- [20] 周健,姚霞,崔小亮,等.一株嗜热红曲霉的分子鉴定及其风味物质初步分析[J]. *中国调味品*, 2016, 41(2): 1–5, 25. [ZHOU Jian, YAO Xia, CUI Xiaoliang, et al. The molecular identification and flavor compounds preliminary analysis of a *Thermophilic Monascus* strain[J]. *China Condiment*, 2016, 41(2): 1–5, 25.]
- [21] 黄武,唐绍培,班世栋,等.高温放线菌 FBKL4.010 对酱香大曲酶活、理化特性和挥发性成分贡献的研究[J]. *食品与发酵科技*, 2022, 58(2): 15–21, 46. [HUANG Wu, TANG Shaopei, BAN Shidong, et al. Study on the contribution of *Thermoactinomyces* FBKL4.010 to the enzyme activity, physicochemical properties and volatile[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2022, 58(2): 15–21, 46.]
- [22] 方旋,马星霞,温敬伟,等.出土木质文物中分离真菌的生长特性研究[J]. *北京林业大学学报*, 2022, 44(1): 123–131. [FANG Xuan, MA Xingxia, WEN Jingwei, et al. Growth characteristics of fungi isolated from unearthed wooden cultural relics[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2022, 44(1): 123–131.]
- [23] 王美娟.嗜热子囊菌产耐热木聚糖酶的条件及酶学性质的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017. [WANG M J. Production optimization and enzymatic properties of thermostable xylanase produced by *Thermoascus aurantiacus*[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017.]
- [24] PING Lifeng, WANG Meijuan, YUAN Xiaoli, et al. Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 1270–1279.
- [25] 李晨芹,李军乔,王鑫慈,等.蕨麻根腐病病原菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. *草业学报*, 2022, 31(4): 113–123. [LI Chenqin, LI Junqiao, WANG Xinci, et al. Isolation, identification, and biological characteristics of *Fusarium perseae* isolated from *Potentilla anserina* roots[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(4): 113–123.]
- [26] 郭淑清.马铃薯淀粉废液发酵生产凤尾菇菌丝的研究[J]. *辽宁科技学院学报*, 2020, 22(6): 13–15, 53. [GUO Shuqing. Study on the fermentation of potato starch waste stream for the production of mycelium of Anemone mushroom[J]. *Journal of Liaoning Institute of Science and Technology*, 2020, 22(6): 13–15, 53.]
- [27] 魏培莲,岑沛霖,盛春琦.3种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(1): 61–69. [WEI Peilian, CEN Peilin, SHENG Chunqi. Comparison of three biomass estimation methods in solid state fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(1): 61–69.]
- [28] 程爱芳,邓政东,陈文,等.多粘类芽孢杆菌 HD-1 产纤维素酶的条件优化[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(10): 173–177. [CHENG Aifang, DENG Zhengdong, CHEN Wen, et al. Optimization of producing conditions of the cellulase from *Paenibacillus polymyxa* HD-1[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(10): 173–177.]
- [29] 范光森,刘朋肖,吴秋华,等.有氧条件下酿酒酵母 YF1914 产乙醇发酵条件优化及其产香特性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 52–58. [FAN Guangsen, LIU Pengxiao, WU Qiuhua, et al. Optimization of cultural conditions for ethyl alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* YF1914 in aerobic conditions and its aroma-producing characteristics[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 52–58.]
- [30] 李欢欢,曾雪莹,谢娟,等.产香酵母的筛选鉴定及产酯条件优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(6): 87–92. [LI Huanhuan, ZENG Xueying, XIE Juan, et al. Screening and identification of aroma-producing yeasts and optimization of ester production conditions[J]. *China Brewing*, 2022, 41(6): 87–92.]
- [31] ZHENG Xiaowei, HAN Beizhong. Baijiu (白酒), Chinese liquor: History, classification and manufacture[J]. *Journal of Ethnic Foods*, 2016, 3(1): 19–25.
- [32] GAO Wenjun, FAN Wenlai, XU Yan. Characterization of the key odorants in light aroma type Chinese liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination,

and omission studies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(25): 5796–5804.

[33] HU Yunan, HUANG Xiaoning, YANG Bo, et al. Contrasting the microbial community and metabolic profile of three types of Light-flavor Daqu[J]. *Food Bioscience*, 44(A): 1–8.

[34] ZHENG Xiaowei, YAN Zheng, HAN Beizhong, et al. Complex microbiota of a Chinese “Fen” liquor fermentation starter (Fen-Daqu), revealed by culture-dependent and culture-independent methods[J]. *Food Microbiology*, 2012, 33(2): 293–300.

[35] 黄庆, 苏圆媛, 左勇, 等. 耐受高浓度乙醇酿酒酵母的定向驯化及其在桑葚果酒中的应用初探[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(12): 166–173. [HUANG Qing, SU Yuanyuan, ZUO Yong, et al. Directional domestication of *Saccharomyces cerevisiae* tolerant to high concentration ethanol and its application in mulberry wine brewing[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(12): 166–173.]

[36] 隋明, 岳文喜, 朱克永, 等. 酿酒微生物对酒体质量及风格的影响[J]. *酿酒*, 2018, 45(6): 24–25. [SUI Ming, YUE Wenxi, ZHU Keyong, et al. Effects of brewery microbes on the quality and style of liquor[J]. *Liquor Making*, 2018, 45(6): 24–25.]

[37] 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, 13(8): 239–247. [SUN Jianqiu, LIU Wenwen, 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, 13(8): 239–247.]

[38] 王雪山, 杜海, 徐岩. 清香型白酒发酵过程中微生物种群空间分布[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9): 1–8. [WANG Xueshan, DU Hai, TU Yan. Spatial distribution of microbial community during Chinese light-flavor liquor fermentation[J]. *Food and Fer-*

mentation Industries, 2018, 44(9): 1–8.]

[39] 田德雨, 闫子茹, 危晶晶, 等. 清香型白酒酿造微生物和风味物质的研究进展[J]. *中国酿造*, 2021, 40(4): 20–25. [TIAN Deyu, YAN Ziru, WEI Jingjing, et al. Research progress of brewing microorganism and flavor substances in Light-flavor Baijiu[J]. *China Brewing*, 2021, 40(4): 1–8.]

[40] 刘佳琦, 李留安, 胡鹏程, 等. 产柠檬酸黑曲霉合成柠檬酸钙工艺的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(12): 118–125. [LIU Jiaqi, LI Liuan, HU Pengcheng, et al. Study on the simultaneous synthesis process of calcium citrate with citric acid production *Aspergillus Niger*[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(12): 118–125.]

[41] 黄玲玲, 程凯森, 张美芳, 等. 黑曲霉和红曲霉酿造黄酒理化成分及挥发性物质的比较分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(15): 4896–4904. [HUANG Lingling, CHENG Kaisen, ZHANG Meifang, et al. Comparative analysis of physicochemical components and volatile components in rice wines brewed by *Aspergillus niger* and *Monascus purpureus*[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(15): 4896–4904.]

[42] 黄玉龙, 石鹏霞, 武泽, 等. 米根霉发酵木薯淀粉产L-乳酸的工艺优化[J]. *中国酿造*, 2018, 37(11): 95–101. [HUANG Yulong, SHI Pengxia, WU Ze, et al. Optimization of L-lactic acid fermentation technology with cassava starch by *Rhizopus oryzae*[J]. *China Brewing*, 2018, 37(11): 95–101.]

[43] 陈国浚, 杨翕森, 彭欢, 等. 黑曲霉 RAF106 菌丝球形成的影响因素及对结晶紫的吸附作用[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 72–87. [CHEN Guojun, YANG Ximiao, PENG Huan, et al. The pellet-formation factors of *Aspergillus niger* RAF106 and its application in the biosorption of crystal violet[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 72–87.]