

基于白酒发酵过程多组学数据挖掘大曲淀粉糖化酶及其协同应用效果解析

杨阳^{1,2}, 魏阳¹, 刘晓彤¹, 毛雪婷¹, 温福丽¹, 杨儒洁¹, 沈才洪¹, 许正宏⁴, 史劲松^{3*}, 王松涛^{1*}

1 泸州品创科技有限公司 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

4 四川大学 轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065

杨阳, 魏阳, 刘晓彤, 毛雪婷, 温福丽, 杨儒洁, 沈才洪, 许正宏, 史劲松, 王松涛. 基于白酒发酵过程多组学数据挖掘大曲淀粉糖化酶及其协同应用效果解析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2101-2118.

YANG Yang, WEI Yang, LIU Xiaotong, MAO Xueting, WEN Fuli, YANG Rujie, SHEN Caihong, XU Zhenghong, SHI Jinsong, WANG Songtao. Mining of starch-saccharifying enzymes in Daqu from multi-omics data of the Baijiu fermentation process and analysis of their synergistic effects in application[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2101-2118.

摘要: 大曲是中国传统白酒生产中的关键糖化发酵剂, 研究大曲糖化酶及其协同应用对酿酒工业的现代化升级具有重要意义。然而, 单纯针对大曲体系开展酶资源挖掘, 面临着目标范围广泛、工作量大、适用性不足等挑战。基于此, 本研究通过对白酒发酵过程的宏蛋白质组及宏基因组数据进行解析, 筛选出 17 种优势淀粉糖化酶蛋白并依据其基因序列设计引物, 成功从大曲中克隆出细菌、真菌和昆虫来源的 8 种淀粉糖化酶基因。本研究成功表达了象牙色克罗彭施泰特氏菌(*Kroppenstedtia eburnea*)来源的 α -1,4-葡萄糖苷酶 KeGA5 及微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)来源的 α -淀粉酶 RpAM11, 其中 KeGA5 为 *K. eburnea* 功能酶异源表达的首次报道。KeGA5 和 RpAM11 的最适反应温度分别为 55 °C 和 75 °C, 最适 pH 分别为 5.0 和 7.0–8.0, 且在 50 °C 以下和 pH 5.0–8.0 范围内表现出较好的稳定性。白酒发酵过程中的温度和乙醇浓度对酶活性影响显著, 但对稳定性影响较小; 发酵产生的酸性环境对酶活性和稳定性均有较大影响。此外, KeGA5 和 RpAM11 在水解多种含有 α -1,4-葡萄糖苷键的底物时表现出协同作用, 尤其对可溶性淀粉和糊精显示出最高水解活性。高粱底物孵育实验表明, 重组酶组合在释放麦芽糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸方面的效果与大曲粗酶体系相似。本研究提出了大曲糖化酶理性挖掘及功能特性研究的新策略, 为未来白酒工业中功能酶制剂和菌酶混合制剂的开发提供了科学参考。

资助项目: 国家自然科学基金(31901117); 泸州市科技计划(2024JYJ102)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31901117) and the Luzhou Science and Technology Plan (2024JYJ102).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Songtao, wangst@lzlj.com; SHI Jinsong, shijs@163.com

Received: 2024-09-14; Accepted: 2024-11-21; Published online: 2024-11-22

关键词：大曲糖化酶；白酒发酵；多组学；异源表达；酶学性质；协同作用

Mining of starch-saccharifying enzymes in Daqu from multi-omics data of the Baijiu fermentation process and analysis of their synergistic effects in application

YANG Yang^{1,2}, WEI Yang¹, LIU Xiaotong¹, MAO Xueting¹, WEN Fuli¹, YANG Rujie¹, SHEN Caihong¹, XU Zhenghong⁴, SHI Jinsong^{3*}, WANG Songtao^{1*}

1 Luzhou Pinchuang Technology Co., Ltd./National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan, China

Abstract: Daqu plays a role as an agent of saccharification and fermentation in the traditional production of Baijiu. Investigating the saccharifying enzymes in Daqu and their synergistic applications is vital for the modernization of the brewing industry. However, the enzyme resource mining focusing solely on Daqu faces challenges such as a broad target range, heavy workload, and limited applicability. To address these issues, we mined 17 dominant starch-saccharifying enzymes from the metaproteomic and metagenomic data of the Baijiu fermentation process and designed primers based on their gene sequences. A total of eight starch-saccharifying enzyme genes, originating from bacteria, fungi, and insects, were successfully cloned from Daqu. Additionally, an α -1,4-glucosidase KeGA5 from *Kroppenstedtia eburnea* and an α -amylase RpAM11 from *Rhizomucor pusillus* were successfully expressed, with KeGA5 representing the first reported functional enzyme from *K. eburnea*. KeGA5 and RpAM11 demonstrated the highest activities at 55 °C and 75 °C and pH 5.0 and 7.0–8.0, respectively. Both enzymes exhibited good stability below 50 °C and within the range of pH 5.0–8.0. The temperature and ethanol concentration in the fermentation process of Baijiu significantly affected enzyme activities but had little impact on enzyme stability, while the acidic environment had considerable impacts on the activities and stability of both enzymes. Furthermore, KeGA5 and RpAM11 exhibited synergistic effects in hydrolyzing the substrates containing α -1,4-glucosidic bonds, with the highest hydrolytic activity observed on soluble starch and dextrin. The incubation experiment with sorghum as the substrate demonstrated that the pure enzyme combination had similar effects to the Daqu crude enzyme system in releasing maltose, glucose, and glucuronic acid. This study presents a novel strategy for the rational exploration and functional characterization of saccharifying enzymes in Daqu, providing scientific insights for developing enzyme preparations and microorganism-enzyme mixtures in the future Baijiu industry.

Keywords: saccharifying enzymes in Daqu; Baijiu fermentation; multi-omics; heterologous expression; enzymatic properties; synergistic effect

在亚洲国家的传统酿造实践中,人们利用谷物等粮食制作酒精饮料和含酒精的食品时,常采用“多菌多酶”混合培养物作为糖化发酵剂,展现了鲜明的民族特色^[1-2]。中国的大曲是其中的典型代表,它主要由小麦等原料经开放式自然固态发酵制成,能够为白酒发酵体系提供丰富的酶系和微生物群落^[3]。大曲不仅有效促进了淀粉等大分子物质的分解,还推动后续多种生化反应,从而赋予产品独特的风味和品质^[4-5]。深入探究大曲中的糖化酶及其协同应用效果,不仅有助于加深对大曲微生物代谢和酶促反应的理解,也为传统酿酒工艺的科学创新与优化提供了依据。

传统的大曲糖化酶系研究主要依赖于对大曲来源菌株产酶特性的分析^[6-7]。然而,培养法不仅耗时耗力,且无法涵盖绝大多数微生物^[8],也难以复现微生物在大曲环境中的原位表达模式。工业研究中常用的大曲生化指标(糖化力、液化力等)虽能评估某些糖化酶的酶学性能,但仅反映多种酶的综合作用,难以对特定酶类进行表征^[9]。随着现代生物技术的发展,组学技术为大曲研究提供了大量生物数据,极大地丰富了对大曲系统的认知。Huang 等^[10]通过宏转录组学技术,在中温大曲升温和顶温阶段,观察到糖酵解、淀粉代谢和丙酮酸代谢等途径中关键酶基因的表达上调,并从顶温阶段样本中鉴定出 932 种潜在表达的碳水化合物活性酶。Zhu 等^[11]通过多组学分析研究了 6 轮成熟高温大曲中的糖化功能菌群,发现 23 种真菌和 5 种细菌能够分泌与主要碳水化合物代谢相关的 13 种糖苷水解酶,主要来源包括扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、紫红曲霉(*Monascus purpureus*)和壮观丝衣霉(*Byssoschlamys spectabilis*)等。另一项研究指出, α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)和 α -1,4-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.3)是低温大曲中最主要的淀粉糖化酶,两者的蛋白质丰度占比超过 95%,主要由横梗霉菌属(*Lichtheimia*)贡献^[12]。这些研究展

现了大曲体系中糖化酶系的多样性及来源的复杂性,但并未将数据转化为实用的生物资源,也未探讨这些酶在白酒发酵过程中的适应性及协同作用。

异源表达技术为酶的后续功能研究和应用开发提供了可能。赵海团队通过对大曲宏转录组数据的分析和挖掘,从顶温阶段(62 °C)样本中克隆了若干新型糖化酶基因并成功实现异源表达,主要包括 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)^[13]、 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)^[14]及 β -1,3-1,4-葡聚糖酶(EC 3.2.1.73)^[15]等,拓展了大曲糖化酶系的研究途径。然而,由于大曲发酵和白酒发酵是白酒酿造生态体系中 2 个关键但相对独立的环节,其生境特征(温度、总酸、乙醇浓度等)迥然不同,仅针对大曲发酵环节开展酶资源挖掘,可能面临着目标范围广、工作量大及适用性不足等问题。基于此,本研究从大曲应用场景——白酒发酵过程酒醅的多组学数据中提取出具有丰度优势的大曲淀粉糖化酶蛋白,并通过异源表达技术系统考察其酶学性质、底物谱及协同效应,建立了大曲糖化酶理性挖掘及功能特性研究的新策略,以期为酿酒体系的工业优化提供理论支撑和资源储备。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

中温大曲和清蒸整粒高粱来自四川省泸州市某酒厂;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21(DE3)菌株及 pET28a(+)质粒,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600 菌株及 pMA5 质粒均由本实验室保存;3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)等分析纯试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒小提试剂盒、一步法克隆试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;可溶性淀粉、支链淀粉等底物均购自上海源叶生物科

技有限公司; 土壤 DNA 试剂盒购自 Omega 公司; 色谱纯糖类标准品、硅胶板 F254 均购自 Sigma-Aldrich 公司。

BPS-500CL 恒温恒湿箱购自上海一恒科学仪器有限公司; HCB-1300V 超净工作台购自青岛海尔股份有限公司; ME20A 电子分析天平购自 Mettler-Toledo 公司; NanoDrop 2000 微量紫外可见分光光度计、Multiskan Sky 全波长酶标仪均购自 ThermoFisher Scientific 公司; C1000 PCR 仪、Gel Doc XR⁺凝胶成像系统均购自 Bio-Rad 公司; Sub System 70 电泳槽购自 Labnet 公司; Mini-300 电泳仪购自 Major Science 公司; 5804R 冷冻离心机购自 Eppendorf 公司; MLS-3751L-PC 高压蒸汽灭菌锅购自 SANYO 公司; GCMS-QP2020 气相色谱质谱联用仪购自 Shimadzu 公司。

1.2 组学数据采集及挖掘

1.2.1 酒醅采集

实验组酒醅按清蒸前原料质量的 12% 添加大曲, 不添加大曲的酒醅作为对照组。将酒醅按每罐 2 kg 分装至玻璃发酵容器, 覆盖双层聚乙烯薄膜并用橡皮筋固定, 随后加盖。将容器置于培养箱内控温培养 28 d, 前 20 d 温度设定为 28 °C, 后 8 d 温度调为 24 °C。分别在发酵 0、2、4、8、12、20、28 d 取样, 取样前充分混匀。取样后的酒醅直接舍弃, 不再继续用于发酵和取样。样品使用液氮冷冻, 随后转移至 -80 °C 保存。

1.2.2 样品制备及测序

使用土壤 DNA 试剂盒提取酒醅 DNA, 通过 1% (质量体积比) 琼脂糖凝胶电泳及微量紫外可见分光光度计检测 DNA 纯度和浓度。采用 SDT [4% (质量体积比) SDS, 100 mmol/L 二硫苏糖醇, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂] 裂解法提取酒醅蛋白质, 采用 BCA 法在 OD_{562} 处进行蛋白质定量。每份样品取适量蛋白质, 采用过滤辅助蛋白质

组制备方法进行胰蛋白酶酶解, 再采用 C18 固相萃取小柱对酶解肽段进行脱盐处理, 随后冻干并复溶^[16]。DNA 和蛋白质样品由上海美吉生物医药科技有限公司分别进行宏基因组和宏蛋白质组测序。

1.2.3 生物信息学分析及数据挖掘

构建宏基因组数据的非冗余基因集, 利用 Proteome Discoverer 2.2 软件对宏蛋白质组的原始数据进行数据库搜索, 将肽段与自建的基因组数据库匹配, 以得分最高的序列作为鉴定结果, 假发现率(false discovery rate, FDR) 阈值设定为不超过 1%^[17]。所有搜库鉴定到的蛋白质序列通过 KEGG 数据库进行注释。不同样品中蛋白质表达量分析采用归一化方法进行。将实验组与对照组间丰度差异倍数大于 2 (包含对照组丰度为 0 导致差异倍数无法计算) 的蛋白作为筛选对象。在组学数据中, 真核生物来源的核酸序列常因内含子移除等原因缺乏完整性, 因此需借助 NCBI 数据库获取参比编码序列, 并进行引物设计(首尾端序列有碱基重叠时, 以自有数据中的碱基替换)。引物序列见表 1。

本研究中活性表达的淀粉糖化酶基因序列数据已提交至国家微生物科学数据中心 (<http://nmcdc.cn/>), 编号为 NMDCN00060A7 (*kega5*) 和 NMDCN00060A8 (*rpam11*)。

1.3 重组酶制备及功能特性研究

1.3.1 淀粉糖化酶基因的克隆、表达及纯化

以大曲 DNA 为模板, 采用上述引物对目的片段进行扩增。经琼脂糖凝胶电泳检测, 切下符合目标长度的条带回收纯化。采用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600 这 2 种表达体系, 通过对测序验证的糖化酶基因进行异源表达(对于真核生物来源的基因, 需将外显子拼接序列进行基因合成)。

表 1 淀粉糖化酶的引物设计

Table 1 Primer design of starch-saccharifying enzymes

| Number | Forward primer sequences (5'→3') | Reverse primer sequences (5'→3') |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | ATGGCGTCCCTCGTTGCTG | TCACTGCCAACTATCGTCAAGAATGG |
| 2 | ATGAACCCGTCGATAAAGGCTTG | TTAAGCAGCAGGAGAGCCAG |
| 3 | ATGGTGAAGATCAGCATAAATCCCATCTC | TCACCGTCCCGTGCCATAG |
| 4 | ATGAAGAGCCTTTTCTCTACAGCAGC | CTAAGCAACAGGCTTGCCACTATGAG |
| 5 | ATGGGATTGGAGAAAAGCCGTA | TCACTCCACCGTCTCCATTTTCACT |
| 6 | ATGGACATCAAAATTAATAAGACAGATGACAG | CTATTTGAAACTCACCTGTGCAG |
| 7 | ATGACGATGTTGACCAAGCCCTTCTCT | CTACTGAATGGTCAGCTCCACCG |
| 8 | ATGCTCAGCTTCGCGGC | TTACCACTTAAGAACCCAGTCACTGC |
| 9 | ATGAAAAAAGCACAAAACACTTTTC | CTATTGAATTGAAAATAAGATCTTTTAAGGTG |
| 10 | ATGAGGAACTTTCTCCTATTCTCTTTG | CTAATGGAAAGTGATGGTAAACTTGGAAT |
| 11 | ATGAAATTCAGCATCTCTCTTTTCGGC | TTAAGCAGAGGTGAAGATAGCCGGAAGT |
| 12 | ATGAAATTCCAACGTCCATCGCGTT | TTACAGCACAAATCACGGCAGACATGG |
| 13 | ATGAAGGCGACTATTGCTTTGG | TTACAATTTAGCGTTAACGTGGATAG |
| 14 | ATAACCAAAATGAAGCTTCTATTGG | TTAACCTGTTTTGCGTTCACAT |
| 15 | ATGAAGTTTTCTATTCTCACCTTATCCAC | TTATGAAGAAGTGGTAAAGATAGCAG |
| 16 | ATGCACCTTCGATCATTCTCAATCCT | TTATTTCCACAGATACCGCTTCCTC |
| 17 | ATGAAGTCCCTCCTCTGCTGCT | CTAGTGCTTGTAGATATCCGAGTCAAAGT |

粗酶液通过 Ni-NTA 重力柱进行亲和层析, 利用不同咪唑梯度的缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mol/L NaCl, 10–500 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 进行洗脱, 收集洗脱液进行 SDS-PAGE 检测分析蛋白质纯化效果, 确定最适咪唑洗脱浓度。合并所有带有单一目的酶蛋白质的洗脱液, 采用截留分子量为 10 kDa 的透析袋置于 PBS 溶液中过夜透析, 其间数次更换 PBS 溶液。量化制备时, 采用 30 kDa 超滤管在 4 °C、4 000 r/min 条件下浓缩蛋白质。

1.3.2 淀粉糖化酶 KeGA5 和 RpAM11 的酶学性质分析

在最适温度和 pH 条件下, 将 200 μL 适当稀释的纯酶液加入 800 μL 1% (质量体积比) 可溶性淀粉溶液中, 水浴反应 20 min 后, 使用 DNS 法检测生成的还原糖^[18]。以同体积梯度浓度的葡萄糖溶液作同样处理, 建立标准曲线。酶液经热灭活后作为对照, 计算酶活时需扣除对照的吸光度值。每 min 释放出 1 μmol 还原糖

所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

于不同温度(10–90 °C)条件下测定酶活, 以确认其最适反应温度。于不同 pH (2.0–11.0)、最适温度条件下测定酶活, 以确认其最适反应 pH。于不同乙醇浓度(0–30%)、最适温度、最适 pH 条件下测定酶活, 以确认乙醇浓度对酶活的影响。将最适条件下的酶活设定为 100%。

分别在不同温度(20–90 °C)条件下孵育 30 min, 然后在最适条件下测定酶活。分别在不同温度条件下孵育不同时长, 再在最适条件下测定酶活。分别在不同 pH (2.0–11.0)条件下孵育 30 min, 再在最适条件下测定酶活。分别在不同乙醇浓度(0–30%)条件下孵育 30 min, 再在最适条件下测定酶活。将孵育后的最高酶活定义为 100%。

在反应体系中分别添加 NaCl、 NH_4Cl 、 NiCl_2 、KCl、 CaCl_2 、 CuSO_4 、 CoCl_2 、 FeCl_2 、 MnCl_2 、 BaCl_2 、 ZnSO_4 、 MgCl_2 、 FeCl_3 、 AlCl_3 、SDS、EDTA, 终浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L。于 37 °C 条件下孵育 30 min, 在最

适条件下测定酶活。将未添加化学试剂的体系酶活设定为 100%。

1.3.3 淀粉糖化酶 KeGA5 和 RpAM11 的底物谱及协同效应研究

取 50 mg/L 的 KeGA5 和 RpAM11 溶液, 将 3 种组合(KeGA5、RpAM11、KeGA5+RpAM11), 分别与 1% (质量体积比)底物溶液(可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉、糖原、糊精、 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精、蔗糖、海藻糖)混合, 在 60 °C、pH 6.0 下反应 20 min。将孵育后的最高酶活定义为 100%。协同程度(degree of synergy, DS)计算公式为 $DS=Y_{1+2}/(Y_1+Y_2)$, Y_{1+2} 为 2 种酶共同作用时的还原糖释放量, Y_1 和 Y_2 分别为单独作用时的释放量^[19]。

每种组合分别与 200 μ L 0.5% (质量体积比)的底物溶液(另含普鲁兰糖、麦芽五糖、麦芽四糖、麦芽三糖、麦芽二糖、麦芽糖、纤维二糖)混合, 在 50 °C、pH 6.0 下反应 24 h。酶解产物经热灭活, 离心收集上清, 根据文献方法进行薄层层析色谱(thin layer chromatography, TLC)分析^[20]。

1.3.4 大曲淀粉糖化酶对高粱底物的孵育实验

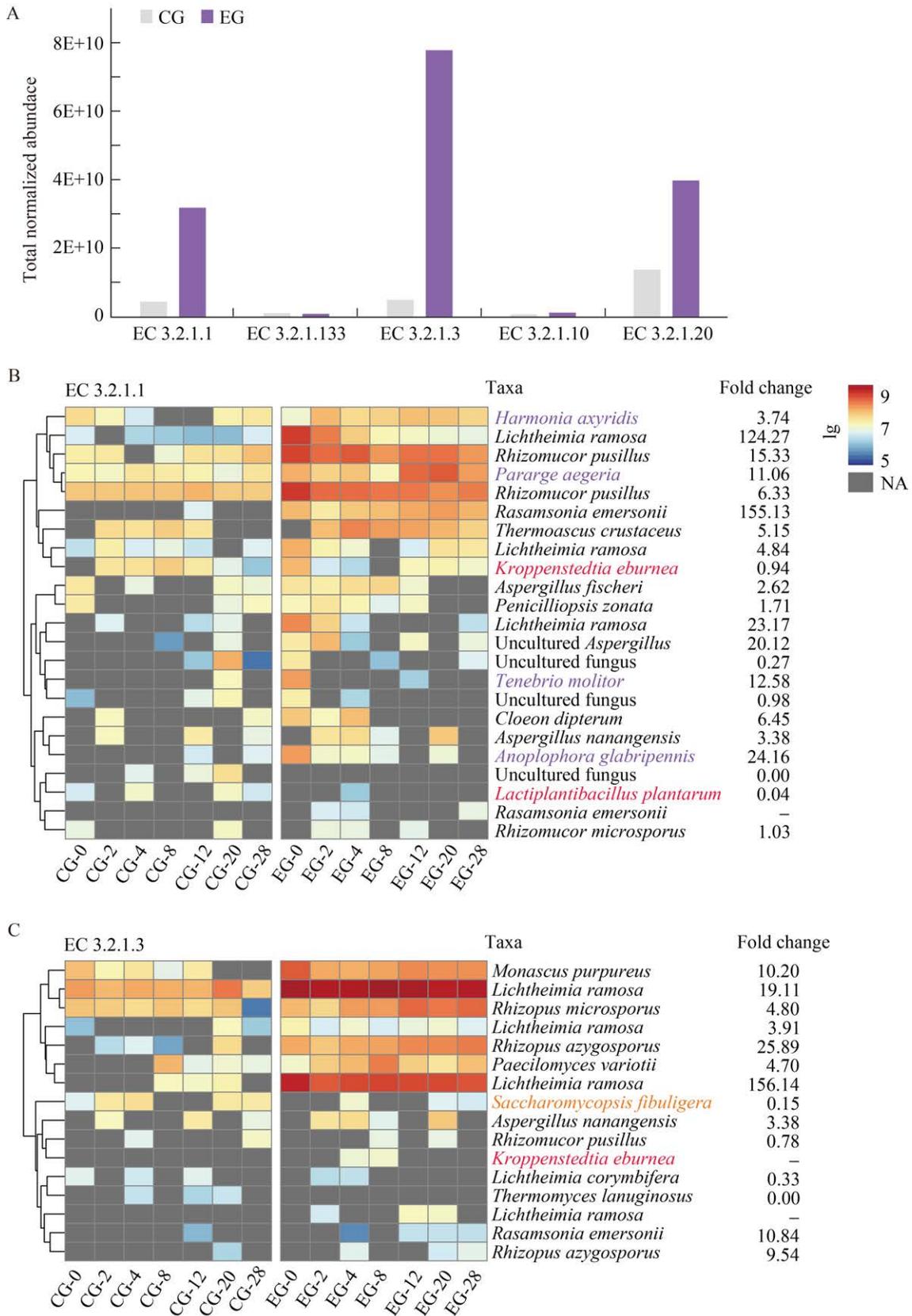
取适量曲粉与 PBS 溶液充分混合, 离心取上清, 通过 0.22 μ m 滤膜除菌, 制备大曲粗酶液(每 mL 对应 0.3 g 大曲可溶组分)。将 KeGA5 和 RpAM11 适当稀释并过滤除菌, 制备终浓度均为 50 mg/L 的混合重组酶液。取 3 g 过 40 目筛的糯高粱, 加入 46 mL 水, 115 °C 灭菌 15 min, 制备液态无菌糊化高粱。将其作为底物, 分别与 1 mL 大曲粗酶和 1 mL 混合重组酶液在 28 °C 下孵育 14 d, 以无菌 PBS 溶液为对照。采用气相色谱质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技术结合衍生化处理^[21], 对第 0、3、7、14 天孵育体系热灭活上清中的糖类物质进行定量检测。

2 结果与分析

2.1 基于白酒发酵组学数据的淀粉糖化酶基因挖掘

如图 1A 所示, 白酒发酵过程中的主要淀粉糖化酶为 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)、 α -1,4-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.3)和 α -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20), 且它们在实验组中的丰度显著高于对照组, 凸显出大曲来源酶在糖化过程中的核心作用。实验组中上调的优势 α -淀粉酶主要来源于微小根霉(*Rhizomucor pusillus*)、坚脆嗜热子囊菌(*Thermoascus crustaceus*)、埃默森罗萨氏菌(*Rasamsonia emersonii*)和分枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*) (图 1B)。 α -1,4-葡萄糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶同样主要来源于丝状真菌, 前者主要来自紫红曲霉(*Monascus purpureus*)、奇孢根霉(*Rhizopus azygosporus*)和 *L. ramosa*, 后者主要来自疏棉状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)、宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*)、*R. emersonii* 和 *L. ramosa* (图 1C、1D)。这些发现印证了丝状真菌在大曲糖化功能中的关键贡献^[6,22]。此外, 研究还检测到 4 种昆虫源的 α -淀粉酶(图 1B)。适度控制曲虫数量不仅有助于维持大曲香气, 还能在大曲贮存 1-2 个月时提升大曲糖化力^[23]。本研究通过组学数据分析, 为适量曲虫对大曲淀粉糖化功能及白酒发酵的积极影响提供了理论依据。

在细菌糖化酶中, 象牙色克罗彭施泰特氏菌(*Kroppenstedtia eburnea*)来源的 α -1,4-葡萄糖苷酶以及发酵粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)来源的 α -葡萄糖苷酶在实验组中的分布更优。*K. eburnea* 属于高温放线菌科, 是一种常见于高温环境的好氧细菌^[24]。*L. fermentum* 是乳酸菌重要菌种之一, 属兼性厌氧细菌, 广泛存在于发酵食品及人体肠道中^[25]。这 2 种细菌均为成熟大曲微生物群落中的高丰度成员, 被认为具有酿造功能^[7,26], 其分泌淀粉糖化酶的能力可能有助于它们在大曲这一淀粉质环境中发挥重要作用。



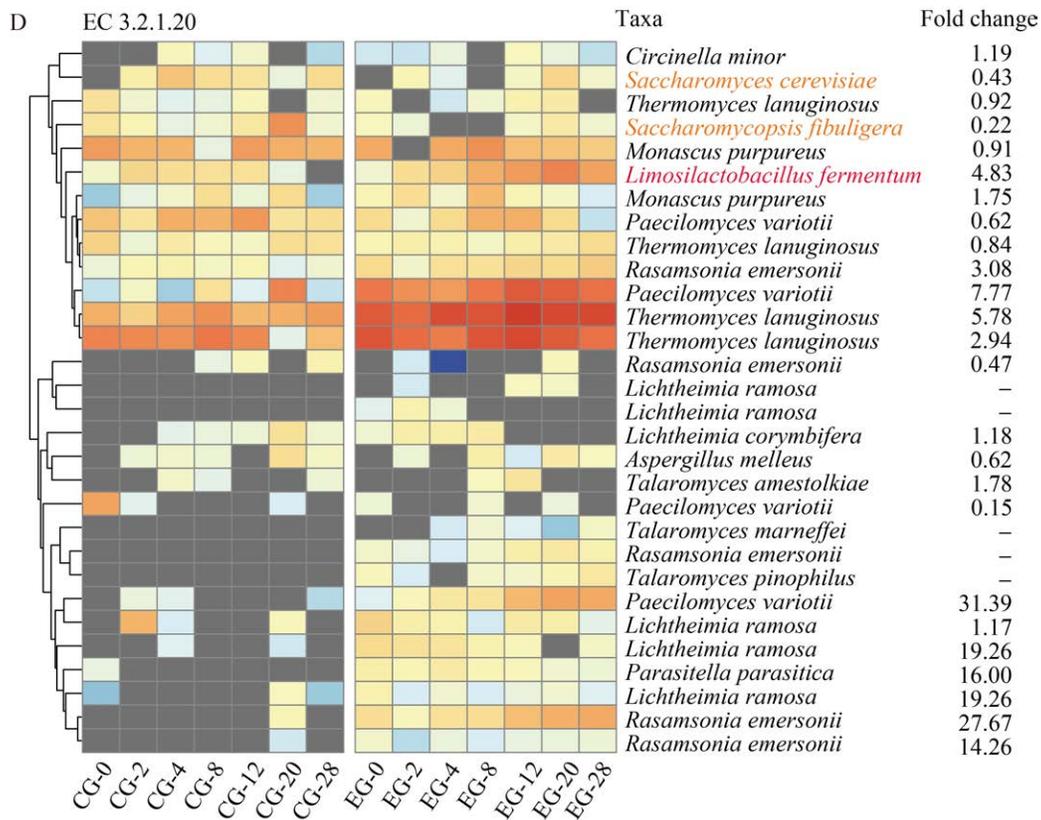


图 1 白酒发酵过程中淀粉糖化酶系蛋白质的丰度动态变化及组间差异倍数 A: 淀粉糖化酶系主要成员丰度概览。B-D: 基于 EC 3.2.1.1 (B)、EC 3.2.1.3 (C)、EC 3.2.1.20 (D) 标准化丰度的聚类热图。热图中的每行单独代表一种蛋白质。物种来源的不同大类以不同颜色进行区分(丝状真菌: 黑色; 酵母菌: 橙色; 细菌: 红色; 昆虫: 紫色)。差异倍数为实验组(EG)与对照组(CG)蛋白质总丰度的比值。

Figure 1 Dynamic changes in the abundance of proteins in the starch-saccharifying enzyme system during the *Baijiu* fermentation and fold differences between groups. A: Overview of the abundance of key members of the starch-saccharifying enzyme system. B-D: Cluster heatmaps of normalized abundance based on EC 3.2.1.1 (B), EC 3.2.1.3 (C), and EC 3.2.1.20 (D). Each row in the heatmap represents a single protein. Different colors indicate different major categories of species origin. Filamentous fungi: Black; Yeast: Orange; Bacteria: Red; Insects: Purple. The fold difference is the ratio of the total protein abundance in the experimental group (EG) to that in the control group (CG).

基于对白酒发酵过程酒醅样品的多组学数据分析, 共筛选出 17 个淀粉糖化酶基因, 包括 7 个 α -淀粉酶编码基因、5 个 α -1,4-葡萄糖苷酶编码基因及 5 个 α -葡萄糖苷酶编码基因。其中 13 个基因来源于丝状真菌, 2 个来源于昆虫, 2 个来源于细菌。由于真核生物来源拼接序列的不完整性, 在系统发育分析中, 真菌和昆虫来源的基因需使用 NCBI 数据库中的完整参比

序列, 细菌来源的基因则使用自有序列。如图 2 所示, 3 类淀粉糖化酶基因在系统发育树上各自形成了独立的聚类, 且每个聚类内部基因的聚集趋势进一步反映出不同来源物种间的亲缘关系。

2.2 淀粉糖化酶基因的克隆验证及异源表达

以大曲 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 3 所示。对疑似目的条带进行切胶后

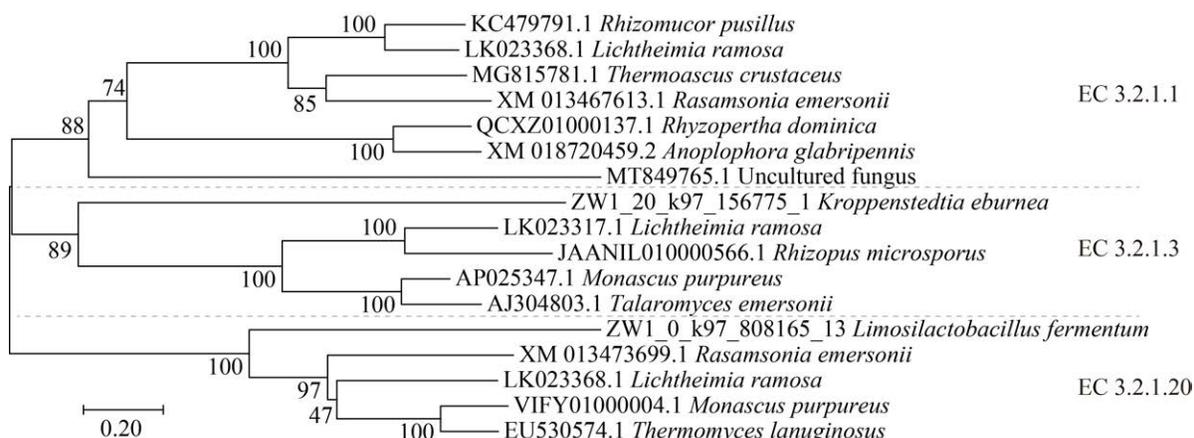


图 2 基于 17 条淀粉糖化酶基因同源性分析构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed based on the homology analysis of 17 starch-saccharifying enzyme genes.

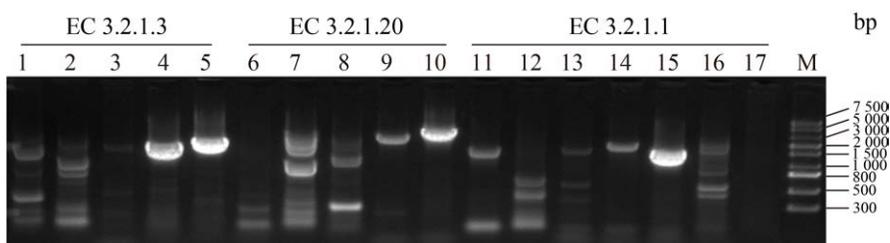


图 3 17 条淀粉糖化酶基因的扩增 泳道 M: DNA 分子量标准; 泳道 1-17: 1-17 号基因扩增结果。
Figure 3 Amplification of 17 starch-saccharifying enzyme genes. Lane M: DNA marker; Lane 1-17: Amplified results of genes number 1-17.

纯化及测序, 确认成功获得 8 条目的基因, 验证了基于白酒发酵过程组学数据挖掘大曲基因的可行性。根据 NCBI 数据库进一步比对, 这些序列分别来源于分枝横梗霉 (*Lichtheimia ramosa*, 4、11、15 号)、象牙色克罗彭施泰特氏菌 (*Kroppenstedtia eburnea*, 5 号)、疏绵状嗜热丝孢菌 (*Thermomyces lanuginosus*, 7 号)、发酵粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus fermentum*, 9 号)、微小根毛霉 (*Rhizomucor pusillus*, 11 号)、谷蠹 (*Rhizopertha dominica*, 14 号)。

随后重点对分别在 *B. subtilis* WB600 和 *E. coli* BL21(DE3) 中实现活性表达的 5 号和 11 号基因展开研究。5 号基因长 1 974 bp, 编码

657 个氨基酸, 理论分子质量为 74.04 kDa, 属于 GH15 家族, 与 *K. eburnea* 来源的 α -1,4-葡萄糖苷酶 (GenBank 登录号: WP_076526446.1) 具有 97.72% 的序列一致性。目前尚未见关于其详细表征的报道。编号中的“WP”前缀表明该序列是从多个不同物种来源的同源基因中推导出来, 并且在 NCBI RefSeq 数据库中具有非冗余的特征^[27]。根据 SignalP 和 TMHMM 的预测, 该酶无信号肽和跨膜螺旋, 提示其主要在细胞内发挥作用。11 号基因长 1 416 bp, 编码 471 个氨基酸, 理论分子质量为 51.77 kDa, 属于 GH13 家族, 与 *R. pusillus* 来源的 α -淀粉酶 (GenBank 登录号: AGJ52081.1)^[28] 具有 98.73% 的序列一

致性。该酶预测含有长为 21 个氨基酸的信号肽, 缺乏明显的跨膜螺旋结构, 表明其可能通过信号肽识别被分泌到细胞外。基于其来源及功能特性, 5 号和 11 号基因分别被重新标记为 *kega5* 和 *rpam11*。

SDS-PAGE 分析结果显示, 纯化后的 KeGA5 和 RpAM11 分别在 70 kDa 和 50 kDa 左右呈现单一蛋白质条带, 与其理论分子量一致(图 4)。其中, RpAM11 在实验组中的表达丰度明显高于对照组, 其对应蛋白质片段的标准化丰度在两组间的差异倍数分别为 6.33 和 15.33, 且在整个白酒发酵过程中均能检测到(图 1B)。作为本研究中大曲贡献的主要 α -淀粉酶蛋白之一, RpAM11 在未来的工业生产中具有通过强化表达提升大曲糖化力的潜力, 弥补大曲糖化效率不足、产酒率低等问题。

2.3 基于酶学性质探讨淀粉糖化酶在白酒发酵中的潜在适应性和影响因素

2.3.1 最适温度和温度稳定性

KeGA5 和 RpAM11 的最适反应温度分别为 55 °C 和 75 °C (图 5A), 在 50 °C 以下均表现出

良好的稳定性(图 5B)。根据酶活的动态保留情况, KeGA5 在 50 °C 处理 6 h 后, 残余酶活超 80%; 但在 55 °C 和 60 °C 条件下, 其半衰期仅分别约 60 min 和 10 min。相比之下, RpAM11 的温度稳定性更佳, 在 55 °C 处理 6 h 后, 残余酶活仍保持在 72%左右(图 5C、5D)。

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

KeGA5 的最适反应 pH 为 5.0, 其酶活在 pH 4.0–9.0 的范围内保持相对稳定。RpAM11 的最适反应 pH 为 7.0–8.0, 其酶活在 pH 3.0–8.0 的范围内保持相对稳定(图 5E、5F)。

在大曲发酵过程中, 酒醅 pH 值通常先降后升, 最终稳定在 6.0–7.0 之间, 这对 KeGA5 和 RpAM11 的稳定性几乎不构成影响。然而, 在白酒发酵初期, 由于活跃的乳酸菌, 乙酸、乳酸等有机酸含量迅速增加, 酒醅 pH 下降至 3.5–4.0 并持续至发酵结束^[29-30]。在这种酸性环境下, KeGA5 的活性和稳定性均受到较大影响。相比之下, RpAM11 受酒醅 pH 降低的影响较小, 更适合在白酒发酵的酸性环境中发挥功能。

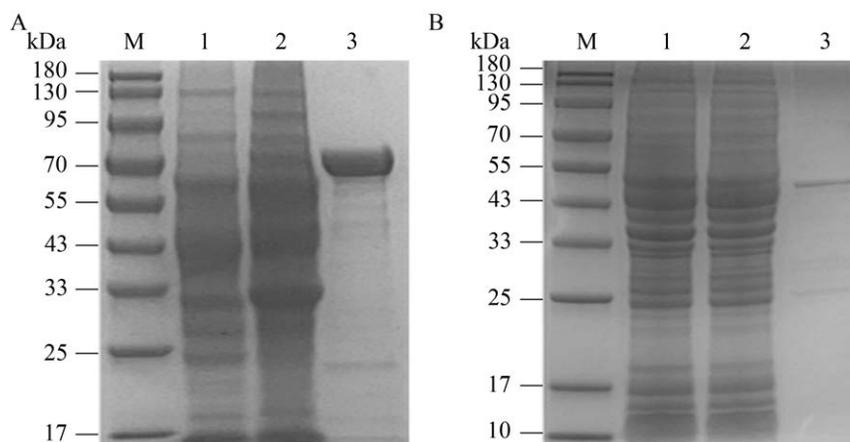


图 4 KeGA5 (A)和 RpAM11 (B)的 SDS-PAGE 分析 泳道 M: 蛋白质分子量标准; 泳道 1: 含空载质粒的宿主菌破碎液上清; 泳道 2: 含重组质粒的宿主菌破碎液上清; 泳道 3: 纯化后的重组酶。

Figure 4 SDS-PAGE analysis of KeGA5 (A) and RpAM11 (B). Lane M: Protein marker; Lane 1: Supernatant from host bacteria lysate containing empty vector; Lane 2: Supernatant from host bacteria lysate containing recombinant plasmid; Lane 3: Purified recombinant enzyme.

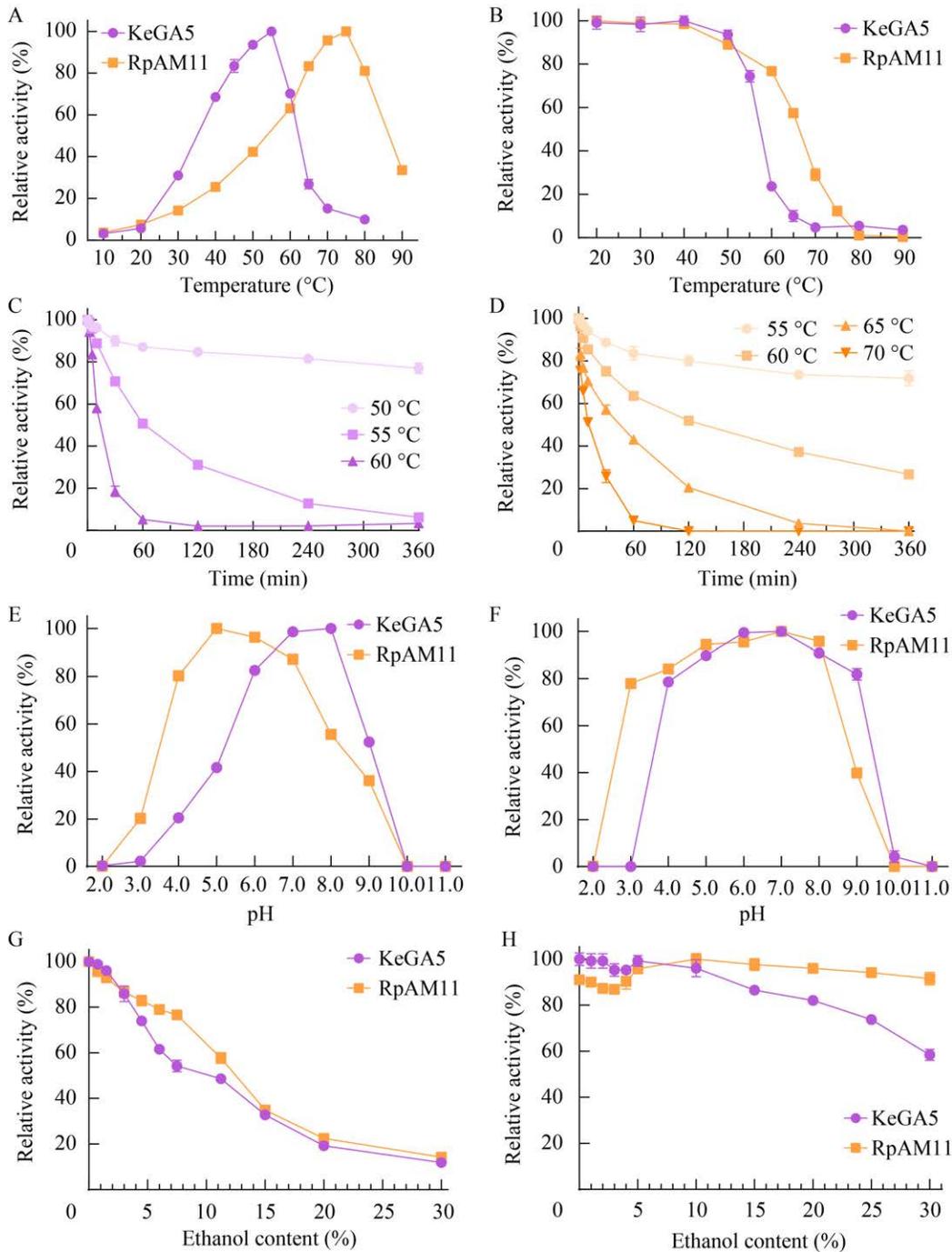


图 5 KeGA5 和 RpAM11 的酶学性质 A: 最适温度; B: 温度稳定性; C: KeGA5 在不同温度下酶活的动态变化; D: RpAM11 在不同温度下酶活的动态变化; E: 最适 pH; F: pH 稳定性; G: 乙醇浓度对酶活的影响; H: 乙醇浓度对稳定性的影响。

Figure 5 Enzymatic properties of KeGA5 and RpAM11. A: Optimal temperature; B: Thermal stability; C: Dynamic changes in enzyme activity of KeGA5 at different temperatures; D: Dynamic changes in enzyme activity of RpAM11 at different temperatures; E: Optimal pH; F: pH stability; G: Effect of ethanol concentration on enzyme activity; H: Effect of ethanol concentration on stability.

2.3.3 乙醇浓度对酶活及酶稳定性的影响

乙醇作为白酒发酵的主要产物和介质,其浓度能够直接或间接影响酶的构象和动态行为,进而调节酶的活性与稳定性。KeGA5 和 RpAM11 的活性均随乙醇浓度升高而下降,在乙醇浓度低于 3%和高于 15%时,两者的活性受到相似程度的抑制(图 5G)。然而,乙醇浓度对两者稳定性的影响差异显著。KeGA5 在 30%乙醇浓度下处理 30 min 后,残余酶活降至约 45%,而在相同条件下, RpAM11 仍能保持 90%以上的活性。特别是在 5%–30%的乙醇浓度范围内, RpAM11 的活性接近甚至高于无乙醇环境下的水平(图 5H)。这表明 RpAM11 对乙醇具有较强的耐受性,并可能通过影响酶活性位点附近的三维结构,增强了其与底物的结合能力。

在白酒发酵中后期,酒醅的乙醇浓度常会达到约 15%的平台期。在这一乙醇浓度下,虽然 KeGA5 和 RpAM11 的酶活受到一定程度的抑制,但两者仍能保持较高的稳定性,有利于

糖化功能的维持。

2.3.4 金属离子及化学试剂对酶活的影响

金属离子作为许多酶活性中心的关键辅基,在酶催化中起重要作用。例如, Ca^{2+} 通常能激活 α -淀粉酶的催化活性,同时提高其热稳定性并延长酶的半衰期^[31]。对于 KeGA5, 1 mmol/L 的 Co^{2+} 能显著增强其活性(164%), 而其他金属离子和化学试剂大多对其酶活具有抑制作用,尤其在 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 浓度为 10 mmol/L 时, KeGA5 酶活几乎完全被抑制(图 6A)。对于 RpAM11, 10 mmol/L 的 Ca^{2+} (156%)、 Co^{2+} (177%) 和 Mn^{2+} (252%) 能显著提升其活性,但 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 对其酶活有轻微抑制效果(90%)。此外, 10 mmol/L 的 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 显著抑制 RpAM11 活性,其中 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 抑制效果最强(图 6B)。

2.4 淀粉糖化酶的底物谱及协同效应研究

表 2 列出了 KeGA5 和 RpAM11 对不同多糖

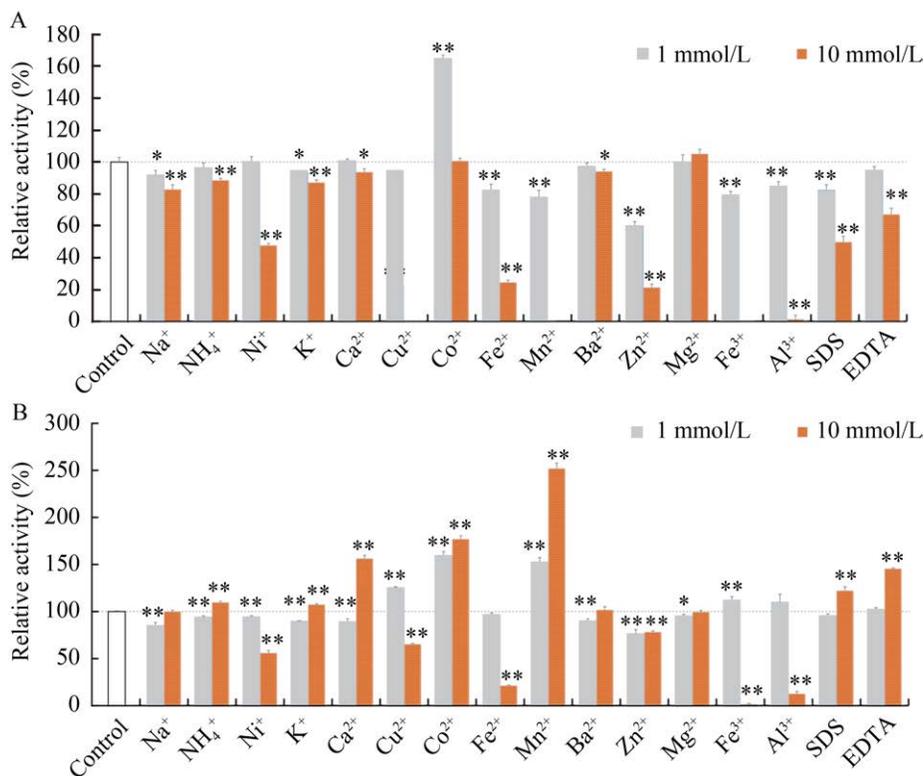


图 6 金属离子和化学试剂对 KeGA5 (A) 和 RpAM11 (B) 的影响

Figure 6 Impacts of metal ions and chemical reagents on activity of KeGA5 (A) and RpAM11 (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

表 2 单酶与双酶对不同多糖底物的水解效果

Table 2 Hydrolysis effect of single and dual enzymes on different polysaccharide substrates

| Substrate | KeGA5 | | RpAM11 | | Relative activity in synergy (%) | Degree of synergy |
|----------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------|
| | Specific activity (U/mg) | Relative activity (%) | Specific activity (U/mg) | Relative activity (%) | | |
| Soluble starch | 7.61±0.26 | 13.17±0.45 | 25.90±0.56 | 44.84±0.96 | 99.76±0.59 | 1.72 |
| Amylose | 0.09±0.04 | 0.16±0.07 | 24.28±0.42 | 42.03±0.72 | 90.56±0.96 | 2.15 |
| Amylopectin | 0.12±0.04 | 0.20±0.07 | 23.84±0.28 | 41.27±0.49 | 94.52±0.59 | 2.28 |
| Glycogen | 0.09±0.04 | 0.16±0.07 | 15.91±0.94 | 27.54±1.62 | 72.30±1.15 | 2.61 |
| Dextrin | 11.03±0.51 | 19.10±0.89 | 25.42±0.39 | 44.00±0.67 | 100.00±0.60 | 1.58 |
| α-cyclodextrin | ND | — | ND | — | — | — |
| β-cyclodextrin | ND | — | 1.06±0.11 | 1.84±0.18 | 9.32±0.07 | 5.07 |
| γ-cyclodextrin | ND | — | 20.81±0.22 | 36.03±0.39 | 83.79±1.15 | 2.33 |
| Sucrose | ND | — | ND | — | — | — |
| Trehalose | ND | — | ND | — | — | — |

The highest enzyme activity in all reaction systems is defined as 100%. ND: Not detected; —: Cannot be calculated.

底物的水解效率。KeGA5 在处理糊精和可溶性淀粉时表现出较高的水解效率(13.17%–19.10%),但对支链淀粉、直链淀粉和糖原的水解效率较低(0.16%–0.20%)。这种差异可能是由于糊精和可溶性淀粉的糖链较短,提供了更多非还原性末端,使其更易与酶活性部位结合。此外,环糊精因其独特的环状结构缺乏非还原性末端,外切酶 KeGA5 无法发挥作用。相比之下,RpAM11 对直链淀粉、可溶性淀粉、糊精和支链淀粉的水解效率均较高(41.27%–44.84%)。RpAM11 对环糊精的水解能力则取决于糖链的长度,仅对糖链最长的 γ-环糊精表现出较好的水解效果(36.03%)。

在水解释放还原糖的底物体系中,还观察到双酶之间显著的协同效应(协同程度: 1.58–5.07)。这一结果与 Wong 等^[32]使用双酶组合消化玉米和小麦淀粉颗粒的研究结果类似。具体表现为,内切酶 RpAM11 通过随机水解线性或环状分子内部的 α-1,4-葡萄糖苷键,生成更多的非还原性末端,为外切酶 KeGA5 提供了更多结合位点,从而增强糖化效果。

在 TLC 分析中,除了使用前述可水解的底物外,还加入了一些无法通过 DNS 法测定水解

效率的多糖底物。如图 7 所示, RpAM11 能够水解麦芽五糖和麦芽四糖等低聚糖,主要产物为麦芽糖,同时生成少量的单糖和三糖。KeGA5 则通过水解麦芽糖生成葡萄糖。当 RpAM11 和 KeGA5 共同作用时,能够将可溶性淀粉、直链淀粉、支链淀粉、糖原、糊精、β-环糊精、γ-环糊精等含有 α-1,4-葡萄糖苷键的大分子多糖水解得更加彻底。

2.5 淀粉糖化酶在高粱糖化中的应用效果

在白酒生产中,向摊晾后的高粱原料中添加曲粉,标志着糖化发酵阶段的开始。本研究在典型发酵温度下,以无菌糊化高粱为底物,考察了大曲粗酶及重组糖化酶组合(KeGA5+RpAM11)在 14 d 孵育中的糖化效果。结果显示,重组糖化酶组合在糖类物质释放效果上与大曲粗酶相似,表明 α-淀粉酶和 α-1,4-葡萄糖苷酶在白酒发酵糖化过程中起关键作用(图 8A、8B)。图 8C 展示了最终的酶解情况,大曲粗酶和重组酶组合在葡萄糖、麦芽糖和葡萄糖醛酸的释放上均表现出良好催化效果。此外,大曲粗酶能显著增强果糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖和半乳糖醛酸的释放,而重组酶组合效果较弱。

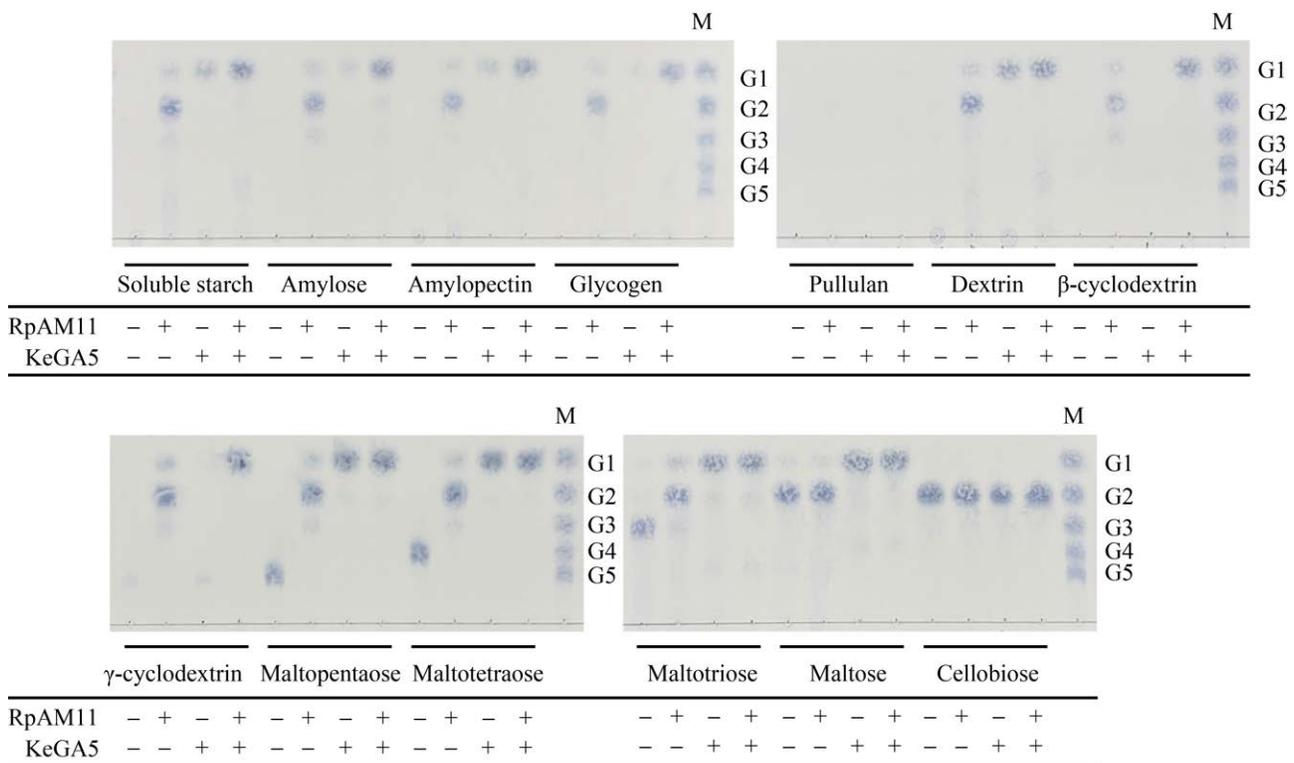


图7 单酶与双酶水解不同多糖底物的 TLC 分析 M: 麦芽低聚糖标准; G1–G5: 葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖。“+”代表体系中存在; “-”代表体系中不存在。

Figure 7 TLC analysis of hydrolysis of different polysaccharide substrates by single and dual enzymes. M: Maltooligosaccharide standard; G1–G5: Glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, and maltopentaose, respectively. +: Existence in the system; -: Absence in the system.

3 讨论与结论

作为一种复杂而传统的生物酶制剂, 大曲酶资源的解析和开发对传统白酒产业的可持续发展具有重要意义。本研究通过白酒发酵过程酒醅的多组学数据筛选, 成功从大曲 DNA 中获得 8 个淀粉糖化酶基因, 实现了 α -1,4-葡萄糖苷酶 KeGA5 及 α -淀粉酶 RpAM11 的活性表达, 其中 KeGA5 为 *K. eburnea* 功能酶异源表达的首次报道。

α -淀粉酶和 α -1,4-葡萄糖苷酶的最适温度通常在 37–60 °C 之间。例如, 从某中温大曲中鉴定出的 α -淀粉酶 NFAmy13A^[33] 和 NFAmy13B^[13], 最适温度分别为 60 °C 和 40 °C。本研究中的 RpAM11 在 75 °C 下表现出最佳活性, 显示出

在高温发酵过程中的应用潜力。在大曲发酵过程中, 曲心的最高温度可达 65 °C^[34], 虽然低于 RpAM11 的最适反应温度, 但这一温度已对酶的稳定性和活性构成挑战, 尤其是当发酵温度超过 55 °C 时, 2 种酶的活性均会显著下降。在白酒发酵过程中, 温度通常维持在 15–35 °C 之间, 最佳发酵温度为 25–30 °C, 这远低于 KeGA5 和 RpAM11 的最适反应温度, 导致它们的酶活性仅能发挥出 10%–30%。值得注意的是, 在酱香型白酒生产中的堆积发酵阶段, 酒醅温度可逐步升高至 45 °C 或更高^[35], 这有助于将 KeGA5 和 RpAM11 的活性提升至常温条件下的 3 倍以上, 因此堆积发酵可能是增强大曲糖化效率的重要环节。总的来说, 在白酒生产中, 精确控制发酵温度至关重要。在较高的大曲发

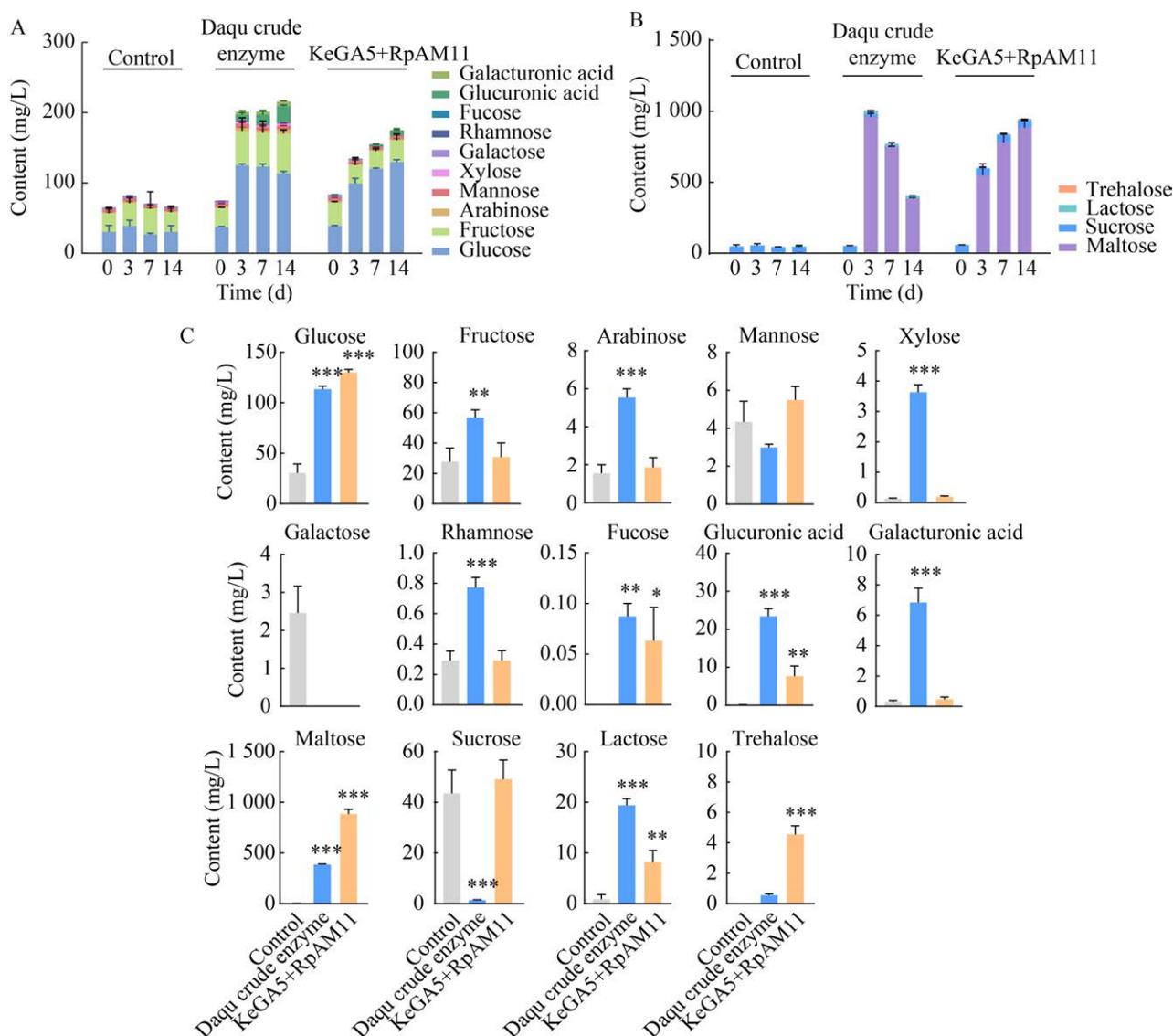


图 8 不同反应时间下大曲粗酶和重组酶组合孵育糊化高粱的产物分析 A: 单糖类产物含量分析; B: 二糖类产物含量分析; C: 终体系中糖类产物含量差异分析。

Figure 8 Analysis of products from gelatinized sorghum incubated with crude enzymes from Daqu and recombinant enzyme combinations at different reaction times. A: monosaccharide product content analysis; B: disaccharide product content analysis; C: analysis of the differences in the sugar product content of the final system. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

酵温度下，需注意保持糖化酶的稳定性；而在较低的白酒发酵温度下，应确保糖化酶活性得到最大限度地发挥。

研究发现，外切酶 KeGA5 和内切酶 RpAM11 在水解含 α -1,4-葡萄糖苷键的多种底

物时表现出协同效应，尤其对可溶性淀粉和糊精显示出最高相对酶活(99.76%–100.00%)，对 β -环糊精上显示出最高协同程度(5.07)。由于 RpAM11 是胞外酶，而 KeGA5 是胞内酶，因此在大曲发酵体系中，两者的协同作用存在传质

瓶颈。具体而言, RpAM11 等胞外酶将淀粉水解为麦芽糖等小分子物质, 这些产物需通过 ABC 转运系统^[36]、磷酸转移酶系统^[37]等途径跨膜进入微生物细胞, 才可能被 KeGA5 等胞内酶进一步水解。在这一阶段, 麦芽糖等产物可能更易被能生成相应胞内酶的微生物代谢利用。当大曲被投入白酒发酵体系后, 许多大曲来源的微生物大量死亡并发生裂解, 导致胞内酶被释放至外部环境。在这种无膜转运限制的条件下, RpAM11 和 KeGA5 更易相互作用, 呈现出与本研究类似的协同效果。同时, 这些协同生成的小分子产物也能被更广泛的微生物类群摄取和利用。

酶液孵育实验表明, 大曲粗酶及重组酶组合 (KeGA5 和 RpAM11) 均能稳定地促进高粱底物的糖化反应, 显著提升葡萄糖含量 (从约 35 mg/L 增加至约 120 mg/L)。随着孵育时间延长, 葡萄糖含量趋于稳定。这可能与产物抑制效应等有关, 即生成的葡萄糖等产物会在较高浓度下与酶结合, 抑制酶的活性^[38]。大曲粗酶还能显著降低蔗糖含量, 同时提高果糖含量, 提示其可能含有蔗糖水解酶。此外, 麦芽糖在孵育过程中显著增加 (最高值达 880–1 000 mg/L), 但在大曲粗酶组中随时间增加有所下降, 且未见转化为葡萄糖, 可能涉及某些酶将麦芽糖或葡萄糖转化为其他物质。因此, 相比大曲粗酶, 重组酶组合更有利于维持蔗糖及麦芽糖的水平。

Zheng 等^[12]研究发现, 低温大曲为白酒发酵初期贡献了 90% 的 α -淀粉酶和 99% 的 α -1,4-葡萄糖苷酶, 在糖化过程中发挥了重要作用。此外, Wang 等^[39]发现这 2 种酶在小曲白酒发酵过程中对乙醇生成具有协同效应, 表明它们对提高出酒率也密切相关。本研究表明, 重组酶组合在释放麦芽糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸方面与大曲粗酶表现相近, 但在释放果糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖和半乳糖醛酸方面存在明显差距。不同的糖类物质在参与特定代谢反应时, 可能会影响发酵产品的风味。单一的糖化酶制

剂难以满足白酒生产的复杂需求, 因此, 开发混合酶制剂甚至菌酶制剂, 是有效补充白酒发酵体系中酶系和菌系的重要手段。通过优化重组酶组合的成分, 有望实现对大曲糖化酶系功能的替代。

综上所述, 本研究基于白酒发酵多组学数据, 建立了大曲糖化酶理性挖掘及功能特性研究新策略, 强调了糖化酶酶学性质及其协同作用在白酒发酵复杂底物降解中的重要性, 为未来白酒工业中酶制剂和菌酶混合制剂开发提供了科学参考和资源支撑。需要指出的是, 尽管本研究已收集到一定数量的糖化酶基因和活性表达的酶种类, 但仍需进一步拓展。未来, 应扩大糖化酶的收集范围, 构建更为全面的酶资源库, 以更好地适应白酒发酵的复杂需求。

作者贡献声明

杨阳: 实验操作、数据分析、初稿写作; 魏阳: 方案设计、提供材料; 刘晓彤: 实验操作; 毛雪婷: 提供材料; 温福丽: 数据管理; 杨儒洁: 稿件润色修改; 沈才洪: 监督指导; 许正宏: 经费支持; 史劲松: 监督指导、稿件润色修改; 王松涛: 监督指导、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] NOUT MJR, AIDOO KE. Asian Fungal Fermented food[M]. Industrial Applications. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 29-58.
- [2] TAMANG JP, KAILASAPATHY K. Fermented Foods and Beverages of the World[M]. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- [3] ZHENG XW, TABRIZI MR, NOUT MJR, HAN BZ. *Daqu*-a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90.
- [4] KANG JM, XUE YS, CHEN XX, HAN BZ. Integrated multi-omics approaches to understand microbiome assembly in *Jiuqu*, a mixed-culture starter[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(5): 4076-4107.
- [5] XIA Y, LUO HB, WU ZY, ZHANG WX. Microbial

- diversity in jiuqu and its fermentation features: saccharification, alcohol fermentation and flavors generation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(1): 25-41.
- [6] 任飞, 韩珍珠. 白酒生产工艺[M]. 北京: 化学工业出版社, 2022.
REN F, HAN ZQ. *Liquor Production Technology*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2022 (in Chinese).
- [7] LI HD, LIU SY, LIU YB, HUI M, PAN CM. Functional microorganisms in Baijiu Daqu: research progress and fortification strategy for application[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1119675.
- [8] TORSVIK V, ØVREÅS L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245.
- [9] 中华人民共和国工业和信息化部. 酿酒大曲通用分析方法: QB/T 4257—2011[S]. 北京: 轻工业出版社, 2012.
Ministry of Industry and Information of the People's Republic of China. *General Methods of Analysis for Daqu: QB/T 4257—2011*[S]. Beijing: China Light Industry Press, 2012 (in Chinese).
- [10] HUANG YH, YI ZL, JIN YL, HUANG MJ, HE KZ, LIU DY, LUO HB, ZHAO D, HE H, FANG Y, ZHAO H. Metatranscriptomics reveals the functions and enzyme profiles of the microbial community in Chinese Nong-flavor liquor starter[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1747.
- [11] ZHU Q, CHEN LQ, PENG Z, ZHANG QL, HUANG WQ, YANG F, DU GC, ZHANG J, WANG L. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of Sauce-flavor *Daqu*[J]. *Food Research International*, 2023, 163: 112184.
- [12] ZHENG YF, LIANG F, WU Y, BAN SB, HUANG HQ, XU Y, WANG XL, WU Q. Unraveling multifunction of low-temperature Daqu in simultaneous saccharification and fermentation of Chinese light aroma type liquor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 397: 110202.
- [13] CHEN LC, YI ZL, FANG Y, JIN YL, HE KZ, XIAO Y, ZHAO D, LUO HB, HE H, SUN Q, ZHAO H. Biochemical and synergistic properties of a novel alpha-amylase from Chinese nong-flavor Daqu[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 80.
- [14] YI ZL, CHEN LC, JIN YL, SHEN Y, LIU N, FANG Y, XIAO Y, WANG X, PENG K, HE KZ, ZHAO H. Insight into broad substrate specificity and synergistic contribution of a fungal α -glucosidase in Chinese Nong-flavor daqu[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 114.
- [15] ALI B, YI ZL, FANG Y, CHEN LC, HE KZ, LIU DY, LUO HB, ZHAO D, ZHENG J, HE H, JIN YL, ZHAO H. Characterization of a fungal thermostable endoglucanase from Chinese Nong-flavor daqu by metatranscriptomic method[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 183-190.
- [16] WIŚNIEWSKI JR, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, MANN M. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [17] WU FS, DING XH, ZHANG Y, GU JD, LIU XB, GUO QL, LI J, FENG HY. Metagenomic and metaproteomic insights into the microbiome and the key geobiochemical potentials on the sandstone of rock-hewn Beishiku Temple in Northwest China[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 893: 164616.
- [18] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [19] Van DYK JS, PLETSCHE BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes: factors affecting enzymes, conversion and synergy[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1458-1480.
- [20] HWANG SY, NAKASHIMA K, OKAI N, OKAZAKI F, MIYAKE M, HARAZONO K, OGINO C, KONDO A. Thermal stability and starch degradation profile of α -amylase from *Streptomyces avermitilis*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(12): 2449-2453.
- [21] SCHUMMER C, DELHOMME O, APPENZELLER BMR, WENNIG R, MILLET M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis[J]. *Talanta*, 2009, 77(4): 1473-1482.
- [22] ZHENG XW, YAN Z, HAN BZ, ZWIETERING MH, SAMSON RA, BOEKHOUT T, NOUT MJR. Complex microbiota of a Chinese “*Fen*” liquor fermentation starter (*Fen-Daqu*), revealed by culture-dependent and culture-independent methods[J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(2): 293-300.
- [23] 何星, 卢红梅, 陈莉, 乔岩, 张丽, 安家静. 曲虫量对酱香大曲贮存质量的影响[J]. *中国酿造*, 2018, 37(10): 43-50.
HE X, LU HM, CHEN L, QIAO Y, ZHANG L, AN JJ. Effect of the number of insects on the storage quality of Daqu[J]. *China Brewing*, 2018, 37(10): 43-50 (in Chinese).
- [24] Von JAN M, RIEGGER N, PÖTTER G, SCHUMANN P, VERBARG S, SPRÖER C, ROHDE M, LAUER B, LABEDA DP, KLENK HP. *Kroppenstedtia eburnea* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated by environmental screening, and emended description of the family *Thermoactinomycetaceae* Matsuo *et al.* 2006 emend. Yassin *et al.* 2009[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(Pt 9): 2304-2310.
- [25] ZHAO Y, YU LL, TIAN FW, ZHAO JX, ZHANG H, CHEN W, XUE YZ, ZHAI QX. Environment-related genes analysis of *Limosilactobacillus fermentum* isolated from food and human gut: genetic diversity and adaptation evolution[J]. *Foods*, 2022, 11(19): 3135.
- [26] 崔丹曦, 李宁, 黄卫宁, 任聪, 吴群, 徐岩. 大曲来源淀粉利用型乳酸菌的筛选及其淀粉利用特性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(10): 4194-4208.
CUI DX, LI N, HUANG WN, REN C, WU Q, XU Y. Starch utilization characteristics of lactic acid bacteria isolated from Daqu[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(10): 4194-4208 (in Chinese).
- [27] O'LEARY NA, WRIGHT MW, BRISTER JR, CIUFO S, HADDAD D, McVEIGH R, RAJPUT B, ROBERTSE B, SMITH-WHITE B, AKO-ADJEI D, ASTASHYN A, BADRETDIN A, BAO YM, BLINKOVA O, BROVER V, CHETVERNIN V, CHOI J, COX E, ERMOLAEVA O, FARRELL CM, *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI:

- current status, taxonomic expansion, and functional annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D733-D745.
- [28] HE ZG, ZHANG LJ, MAO YZ, GU JC, PAN Q, ZHOU SX, GAO B, WEI DZ. Cloning of a novel thermostable glucoamylase from thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* and high-level co-expression with α -amylase in *Pichia pastoris*[J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14: 114.
- [29] WANG XS, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 244: 27-35.
- [30] 李璇, 戚居胜, 韩四海, 刘建学, 罗登林. 浓香型白酒杜康酒醅发酵过程中理化指标变化规律[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(11): 52-57.
- LI X, QI JS, HAN SH, LIU JX, LUO DL. Changes in physicochemical properties of fermented grains of strong-aroma liquor 'Dukang' during fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(11): 52-57 (in Chinese).
- [31] LI LZ, YANG J, LI J, LONG LJ, XIAO YZ, TIAN XP, WANG FZ, ZHANG S. Role of two amino acid residues' insertion on thermal stability of thermophilic α -amylase AMY121 from a deep sea bacterium *Bacillus* sp. SCSIO 15121[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(5): 871-879.
- [32] WONG DWS, ROBERTSON GH, LEE CC, WAGSCHAL K. Synergistic action of recombinant α -amylase and glucoamylase on the hydrolysis of starch granules[J]. *The Protein Journal*, 2007, 26(3): 159-164.
- [33] YI ZL, FANG Y, HE KZ, LIU DY, LUO HB, ZHAO D, HE H, JIN YL, ZHAO H. Directly mining a fungal thermostable α -amylase from Chinese Nong-flavor liquor starter[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 30.
- [34] WU MY, LUO Y, YAO YQ, JI W, XIA XL. Multidimensional analysis of wheat original crucial endogenous enzymes driving microbial communities metabolism during high-temperature Daqu fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 413: 110589.
- [35] REN TT, SU W, MU YC, QI Q, ZHANG DW. Study on the correlation between microbial communities with physicochemical properties and flavor substances in the Xiasha round of cave-brewed sauce-flavor Baijiu[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1124817.
- [36] EHRMANN M, EHRLE R, HOFMANN E, BOOS W, SCHLÖSSER A. The ABC maltose transporter[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(3): 685-694.
- [37] KONG XX, LI CX, SUN XD, NIU B, GUO DH, JIANG Y, YANG JL, CHEN Q. The maltose transporter subunit IICB of the phosphotransferase system: an important factor for biofilm formation of *Cronobacter*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2022, 370: 109517.
- [38] ANDRIĆ P, MEYER AS, JENSEN PA, DAM-JOHANSEN K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(3): 308-324.
- [39] WANG BW, WU Q, XU Y, SUN BG. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese Baijiu production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): e00013-20.