

浓香型白酒酒糟微生物分离及发酵试验*

郭霞

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

摘要:为了弄清浓香型白酒酒糟微生物以及发酵能力,通过平板分离得到酵母8株、细菌3株和霉菌4株。将各菌株通过糖发酵试验测定,发现均有产酒精能力。分别将其制曲后测定糖化酶活力、蛋白酶活力、液化酶活力。然后筛选出10株酶活力高的菌株,接种到按比例配好的5种粮食上混合发酵,以15株混合发酵为对照,混合发酵后测定产酒率。结果表明,筛选出的10株微生物混合发酵的产酒率为10%,较之15株混合发酵的产酒率15%低。就本实验在浓香型白酒发酵过程中,菌株在15株以上为宜。

关键词:白酒;酒糟;糖化力;蛋白酶活力;混合发酵

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2005)01-0050-03

Isolation of Microbes and Fermentation from Distiller's Grains of Luzhou-flavor Liquor

GUO Xia

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: In order to clarify distiller's grains microbes of Luzhou-flavor liquor and fermented ability, 15 microorganisms are isolated by streak plate method. It contains 8 yeast, 3 bacteria and 4 moulds. Results of the sugar fermentation test shows that they have the ability of producing liquor. After physiological and biochemical test, 10 strains of good characteristics are screened and fermented together in the five mixed grains, while 15 strains fermented by contrast. The results show that the output of liquor of the former at 10% are lower than that of latter at 15%. Therefore more than 15 strains are suitable for the fermentation of Luzhou-flavor liquor in this experiment.

Key words: liquor; distiller's grains; saccharification enzyme vigor; protease vigor; mixture fermentation

随着酿酒业的发展和市场反映,浓香型白酒以其独特的风味,深受消费者的喜爱。浓香型白酒以五粮液、泸州大曲酒著称,驰名中外,其质量高、价格昂贵、经济效益好。然而酒的发酵生产与微生物密切相关。一般说来,糖化力和液化力高的菌株分解淀粉产葡萄糖的能力强,蛋白酶活力高的菌株产香味物质的前体氨基酸能力强。本次实验是通过对五粮液酒糟中微生物的分离,得到高糖化力、蛋白酶活力强和液化力强的菌株,混和发酵后测定产酒率。

1 材料和方法

(1)样品来源:浓香型白酒五粮液酒糟,由重庆师范大学应用微生物研究所提供。

(2)仪器设备:YXQS6280-B 手提式压力蒸汽消毒器、超净台、调温调湿箱、COIC 显微镜、UNIC7200 可见分光光度仪、电烘箱、阿里斯顿冰箱、FA1004A 电子天平、PHS-1C 数字酸度计、离心机、试管振荡器、水浴锅、酒精计、三星蒸汽发生仪。

(3)培养基^[1,2]:麦芽汁培养基、土豆培养基、牛肉膏培养基、糖发酵试验培养基。

(4)微生物分离^[3]:通过稀释涂布平板法和平板划线分离法。

(5)纯化:在培养基上选取形状不同的菌落,再稀释划线分离,得到单个的菌落,用显微镜检查纯化。如不纯,再挑单个菌落,进行划线培养,直到菌株完全纯化。

* 收稿日期: 2004-09-07

作者简介: 郭霞(1982-),女,重庆人,2001级学生。

(6)菌种保存:把分离得到的微生物编号,细菌在牛肉膏试管斜面中低温保存,酵母在麦芽汁试管斜面中低温保存,霉菌在土豆试管斜面中低温保存。

(7)糖发酵试验^[1]:初步测量微生物是否具有产酒精的潜力。

(8)酶活力的测定:将分离到的菌株,分别制曲后,DNS法测定糖化酶活力^[4],考马斯亮蓝结合法测定蛋白酶活力^[5],碘量法测定液化酶活力^[4]。

(9)混合发酵测量产酒率。

2 结果与讨论

通过分离和纯化,得到酵母 8 株(编号为 1~8),细菌 3 株(9~11),霉菌 4 株(12~15)。

将分离到的微生物制成 5% 的菌悬液,接种到糖发酵试验液体培养基中,48h 后各菌株发酵完毕,打开塞子有浓郁的酒香味。

2.1 酶活力的测定

(1)糖化酶活力的测定。通过葡萄糖的减少量来衡量葡萄糖糖化酶活力的大小。葡萄糖标准曲线的制备(见表 1,图 1)。取 10g 曲加蒸馏水稀释 25 倍后,离心得到曲液,通过 DNS 法,用 1% 淀粉液、缓冲液、蒸馏水、曲液混合(见表 2),测得吸光光度值,对照标准曲线得到总葡萄糖含量(见表 3)。由于曲液中有葡萄糖,故测定了曲液中原葡萄糖含量。缓冲液、蒸馏水、曲液混合(见表 4),测定吸光光度值,对照标准曲线得到曲液中原葡萄糖含量(见表 4)。

表 1 葡萄糖标准曲线的绘制

样品号	1	2	3	4	5	6	7
0.1% 标准葡萄糖/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
蒸馏水/mL	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.4	0.2
3,5-2 硝基水杨酸/mL	4	4	4	4	4	4	4
平均吸光光度值/OD	0.000	0.112	0.174	0.324	0.417	0.679	0.889

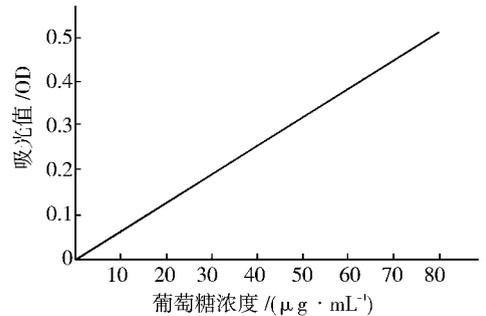


图 1 葡萄糖标准曲线

表 2 总葡萄糖含量测定的试剂配制

试剂	1% 淀粉液	缓冲液	蒸馏水	曲液	3,5-2 硝基水杨酸
空白管/mL	1	3	10	0	4
待测液/mL	1	3	0	10	4

表 3 曲液中原葡萄糖含量测定的试剂配制

试剂	缓冲液	蒸馏水	曲液	3,5-2 硝基水杨酸
空白管/mL	3	10	0	4
待测液/mL	3	0	10	4

表 4 总葡萄糖含量、曲液中原葡萄糖含量和实际葡萄糖生成量 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$

编号	总葡萄糖含量	曲液中原葡萄糖含量	实际葡萄糖产量	编号	总葡萄糖含量	曲液中原葡萄糖含量	实际葡萄糖产量	编号	总葡萄糖含量	曲液中原葡萄糖含量	实际葡萄糖产量
1	35.6	25.6	10.0	6	89.0	29.0	60.0	11	37.3	36.0	33.7
2	49.0	24.0	25.0	7	107.5	31.0	76.5	12	86.0	29.0	57.0
3	51.3	21.4	29.9	8	83.7	69.6	14.1	13	140.0	119.0	21.0
4	65.0	23.5	41.5	9	90.0	43.5	46.5	14	143.1	81.0	62.1
5	87.6	30.9	56.9	10	184.5	153.4	31.1	15	155.5	154.0	1.5

从表 4 可知在相同的条件下,各菌株糖化力有明显差异,从高到低依次是:7>4>6>12>5>9>4>11>10>3>2>13>8>1>15。

(2)蛋白酶活力的测定。通过牛血清白蛋白的减少量来衡量曲液中酶活力的大小。绘制牛血清白蛋白标准曲线(见表 5 和图 2)。通过考马斯亮蓝结合法,测量待测管吸光光度值(见表 6),对照标准曲线,计算结果(见表 7)。

表 5 牛血清白蛋白标准曲线绘制

样品号	1	2	3	4	5	6	7
	(空白)						
0.5% 标准牛血清白蛋白/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
0.9% NaCl/mL	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4
考马斯亮蓝/mL	4	4	4	4	4	4	4
平均吸光光度值/OD	0.000	0.087	0.132	0.210	0.256	0.378	0.468

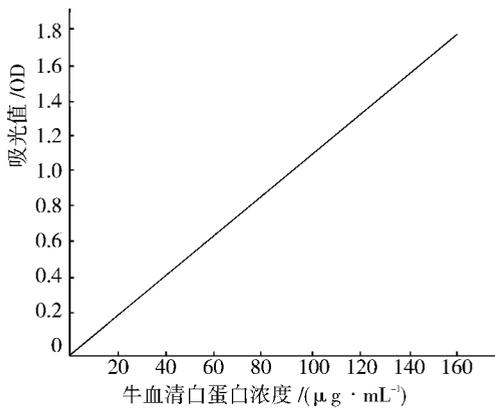


图2 牛血清白蛋白标准曲线

表6 蛋白酶活力测定的试剂配制

试剂	曲液/mL	0.5% 标准牛血清白蛋白/mL	0.9% NaCl/mL	考马斯亮蓝/mL
空白管	10	0.0	0.5	4
待测管	10	0.5	0.0	4

表7 牛血清白蛋白减少量测定结果 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$

编号	牛血清白蛋白减少量	编号	牛血清白蛋白减少量	编号	牛血清白蛋白减少量
1	14.7	6	12.8	11	11.3
2	14.1	7	13.8	12	1.7
3	11.0	8	14.0	13	12.0
4	8.17	9	7.0	14	14.5
5	14.3	10	13.7	15	11.8

由表7可知,在相同条件下各菌株产生的蛋白酶的活力不同,故牛血清白蛋白的减少量也不同。从其减少量中得到蛋白酶活力从高到低依次是:1 > 14 > 5 > 2 > 8 > 7 > 10 > 6 > 13 > 15 > 11 > 3 > 4 > 9 > 12。

(3)液化力的测定。通过碘液的褪色时间来衡量 α -淀粉酶活力大小。取2%淀粉20mL、缓冲液5mL、曲液10mL混合后,通过碘量法,于60℃水浴加热,每5min取一次与比色稀碘液反应,颜色直到与比色皿中标准稀碘液与标准糊精的反应颜色一致时为止。所需时间计为 t (见表8)。

表8 比色稀碘液褪色时间 min

试管号	t	试管号	t	试管号	t
1	>24	6	6	11	12
2	24	7	14	12	19
3	14	8	8	13	14
4	23	9	12	14	>24
5	14	10	22	15	24

由表8可知,在相同的条件下,各菌株 α -淀粉酶活力大小,从高到低依次是:6 > 8 > 11 > 9 > 13 > 7 > 3 > 5 > 12 > 10 > 4 > 2 > 15 > 1 > 14。

2.2 混合发酵

综合以上数据,筛选出了高糖化力,蛋白酶活力强,液化力强的菌株10株(1、2、5、6、7、8、9、11、12、14)。取高粱、大米、糯米、小麦、玉米,按18:11:9:8:4的比例混合^[6],吸水灭菌后,将有高糖化力、蛋白酶力、液化力的菌株10株混合接种发酵,15株微生物混合发酵作为对照^[7]。待发酵完毕后蒸馏得到酒,测量其产酒率,它们分别是10%和15%。

3 结语

通过对浓香型白酒酒糟的分离,得到微生物菌株15株。通过糖发酵试验及酶活力的测定,筛选出10株酶活力高的菌株混合发酵,同时以15株微生物菌株混合发酵为对照,发酵完成后测定产酒率。结果表明:分离到的菌株均有产酒能力,筛选出的10株微生物混合发酵的产酒率为10%,较之15株混合发酵的产酒率15%低,就本实验在浓香型白酒发酵过程中,菌株在15株以上为宜。同时发酵中的产酒率,即微生物的代谢产物与培养条件以及营养成分都有密切关系^[8]。

致谢:本文得到胡尚勤教授悉心指导和韦伟老师以及程俊霖等大力支持,特此衷心致谢!

参考文献:

- [1] 沈萍. 微生物实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [2] 胡尚勤,周开孝. 乳酸菌稳产高产培养基的研究[J]. 重庆师范学院学报,1994,11(1):16-19.
- [3] 钱存柔. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,1999.
- [4] 胡尚勤. 发酵工程试用教程[Z]. 重庆师范大学生命科学院内部教材,2004.
- [5] 陈钧辉,陶力. 生物化学实验(第3版)[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [6] 余乾伟. 再论浓香多粮型白酒的生产[J]. 酿酒科技,2003(4):53-55.
- [7] 丁正国. 浓香型白酒乳酸乙酯降低的技术措施[J]. 酿酒科技,1996(6):11.
- [8] 胡尚勤. 整肠生菌发酵中杆菌肽商产的代谢调控[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版)2004,21(4):46-48.