

制曲微生物及蛋白质分解力的关系初探

蒋红军,范光先

(贵州茅台酒厂技术中心微生物组, 贵州 仁怀 564501)

摘要: 通过对高温大曲入室发酵机理的探索,寻找高温大曲发酵过程中的各种微生物消长规律、微生物与蛋白质分解力的关系。结果表明,高温大曲在发酵初期微生物的数量、种类都最多,中后期芽孢菌占优势,而由于需满足微生物的生长及形成多种香味物质或其前驱物质,因而中期发酵大曲蛋白质分解力是最高的,可达 $16\sim 19\ \mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{min}$ (酪氨酸计)。

关键词: 高温大曲; 发酵机理; 蛋白质分解力; 微生物消长规律; 香味物质

中图分类号: TQ925.7; Q93-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2003)06-0032-03

Relationship Between Microbe and the Protein-decomposing Abilities

JIANG Hong-jun and FAN Guang-xian

(Guizhou Maotai Group. Co. Ltd. Renhuai, Guizhou 564501, China)

Abstract: Through exploring the fermentation theories of high-temperature Daqu, to find the rules of the microbic growth and decline, furthermore to find the relationship between the microbe and the protein-decomposing abilities of Daqu. As a result, there were more quantities and species of the microbe in the initial fermentation of Daqu but more quantities of the microbe with spores in the middle Daqu. Because of breeding the microbe and producing the flavour compounds, the protein-decomposing abilities of the in middle Daqu fermentation were highest, $16\sim 19\ \mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{min}$ Tyr.

Key words: high-temperature Daqu; the fermentation theories; the rules of the microbic growth and decline; the protein-decomposing abilities; the flavour compounds

茅台酒是世界名酒之一,蝉连五届国家名酒称号,素有国酒之称。其以淀粉质原料生产,具有独特的风格。其主要风格的形成,从生产技术角度分析,原料是前提,大曲是基础,而工艺是关键;从生物学角度而言,其特殊风格的形成则主要是各种微生物参与的共同代谢、共同发酵、共同作用的结果。因此,茅台大曲作为生产原料之一,提供部分微生物及酶类的同时,还直接或间接地提供了决定酒体质量、风格的香味物质或前驱物质。

茅台大曲的生产是靠传统工艺自然接种,它是富集、培养有益的微生物和其代谢产物的载体。其生产的实质就是通过调节制曲原料(如小麦、母曲等)、温度、氧气、水分(湿度)来宏观地控制各类大曲微生物的生长代谢。因此,茅台大曲生产的粗放性决定了大曲质量随生产环境和工艺条件的变化而波动较大,尤其是各种微生物之间存在的共生、互生、寄生、拮抗等多种复杂的相互关系更决定了生态区系的环境微生物种类的多样性,而正是这些微生物的多样性从多方面影响了大曲质量,进而影响到酒体质量、酒体风格。现就茅台大曲入室发酵过程中微生物的消长规律及蛋白质分解力的变化作一探讨,从中掌握茅台高温大曲的发酵规律,为生产积累技术参数,寻找科学可靠的依据,以便更好地协助和指导生产,达到稳定和提高大曲质量的目的。

1 材料及方法

1.1 实验材料

3-11仓、2-11仓入室发酵的大曲。

1.2 培养基

收稿日期:2002-07-17

作者简介:蒋红军(1978-),男,四川人,大学本科,助理工程师。

肉汤培养基、察氏培养基、麦芽汁培养基^[2,4]。

1.3 方法

1.3.1 微生物稀释平板法^[2,4]

1.3.2 福林-酚比色法^[5]

2 结果及分析

2.1 微生物消长规律(见图1、图2)

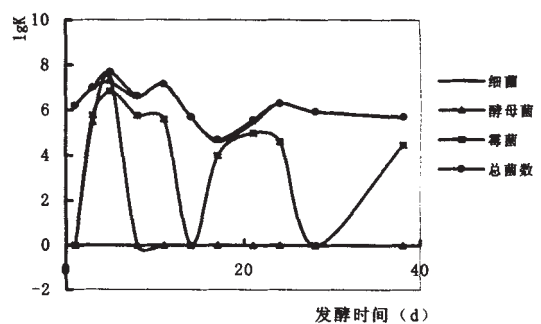


图1 微生物消长规律(2-11仓)

2.2 2-11仓微生物消长规律

2.2.1 2-11仓的大曲在进仓时优势微生物为细菌,数量为 1.51×10^6 个,种类有5种,其中芽孢菌为3种,占总菌数的82%。

2.2.2 经过一段时间(3-5 d)的环境适应后,由于充足的养分、适宜的温度,各种微生物都开始进入对数生长期,微生物细胞大量生长繁殖。尤其是进仓未检测到的酵母菌、霉菌上升的速度最快,但

种类都不多,其中酵母菌只有2种,以苹果酒结合酵母为主,霉菌以根霉为主。同时细菌的种类、数量也大幅度增加,此时在种类上非芽孢菌类占了较大的优势,约占60%;数量上仍旧是芽孢菌占了绝对优势。

2.2.3 到了第一次翻仓时,尽管此时的发酵温度上升到50~60℃甚至在60℃以上,但由于充足的水分、养料,使得细菌、霉菌等具有芽孢或孢子的菌类的生长繁殖速度仍旧大于死亡速度,因而其数量仍呈略上升趋势,只是趋势已变缓,而且有开始下降的趋势,不耐热的微生物如酵母菌、非芽孢细菌大量死亡。

2.2.4 第一次翻仓到第二次翻仓这段时间里,由于持续的高温,大量水分被蒸发,使得酵母菌很难检测到,霉菌数量也很少,而细菌中也以芽孢菌类为主,对分离的微生物鉴定,发现芽孢菌中以地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、热葡萄球菌(55℃)为主。此时陆续检测到15种芽孢菌作用,只是每次样品的种类、数量有差异。

2.2.5 第二次翻仓到出仓,此过程为曲块的干燥成香阶段。尽管温度降低,有利于微生物的生长繁殖,但因大量水分被蒸发,曲内水分的活性偏低,影响了微生物与环境、微生物与微生物之间的物质与能量的交换,进而影响到微生物的生长繁殖,使得微生物的死亡、繁殖速率相差不大,因而微生物的数量基本保持稳定,尤其是出仓前的12d左右,数量级都在 10^4 左右。非芽孢菌类略有增加,但数量也较少;霉菌的数量在 $(0\sim 10)\times 10^4$ 个左右,主要也以根霉为主。

2.3 两仓微生物对比情况^[5]

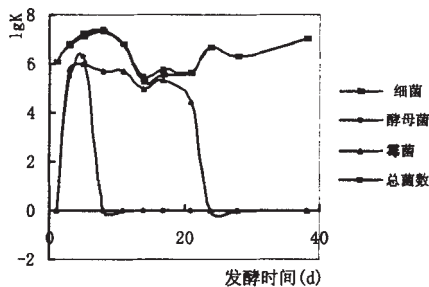


图2 微生物消长规律(3-11仓)

从图2可以看出,3-11仓的大曲在入仓时主要也以细菌为主,数量为 1.19×10^6 个,而在整个发酵过程中芽孢菌类共有14种。其微生物的消长规律与2-11仓的比较相似,差异主要表现在数量和种类上。

发酵时间(d)	细菌		酵母菌		霉菌		总菌数	
	2-11仓	3-11仓	2-11仓	3-11仓	2-11仓	3-11仓	2-11仓	3-11仓
1	151	119	—	—	—	—	151	119
3	930	540	30	30	60	60	1020	630
5	1700	1400	240	200	700	100	4800	1700
8	380	2340	—	—	60	50	440	2390
11	1390	600	—	—	40	50	1430	650
14	50	18	—	—	—	10	50	28
17	4	37	—	—	1	22	5	59
21	28	42	—	—	10	3	38	45
24	196	470	—	—	4	—	200	47
28	86	192	—	—	—	—	86	192
38	49	109	—	—	3	—	52	1090
黄曲	320	40	—	—	10	10	330	50
白曲	980	410	—	—	540	16	1520	570
黑曲	80	20	—	—	—	—	80	20

3-11仓曲块的微生物数量在大多数时间相对较少,但种类却较多,尤其是在第二次翻仓后,但在出仓前的10d左右时比2-11仓的微生物数量多,其中在曲块干燥时表现最明显。在3-11仓所能检测到的曲块微生物种类,尤其是芽孢菌类一般都有5~6种,而2-11仓则为3~4种。水分、温度是造成这一结果的主要因素。在取样过程中,我们发现在前期发酵,2-11仓的大曲因微生物的生长繁殖进行的新陈代谢活动更为剧烈,导致前期温度上升较快,水分蒸发比3-11仓快,而到了中后期由于水分较低,温度下降较快,而且各种蛋白质在湿热的环境中更容易变性失活,致使部分微生物死亡及各种酶活性降低,使微生物因无法合成自身所需的结构、功能的基础物质,而使微生物的遗传、繁殖受到影响,导致两仓的微生物种类及数量有较大的差异。

2.4 3种半成品曲的微生物情况(见表1)

从表1两个仓内黄、白、黑3种半成品曲的微生物对比来看,3种曲的微生物数量:白曲>黄曲>黑曲;微生物种类:白曲>黄曲>黑曲。而且3种曲的微生物都以芽孢菌为主,黑曲基本上未检测到霉菌,而白曲、黄曲偶有检测到,且多以根霉为主;酵母菌则在3种曲中均未检测到。

2.5 蛋白质分解力^[1,5]

发酵时间(d)	2-11仓	3-11仓
12	1.25	1.73
17	5.81	5.05
25	8.60	9.40
38	18.10	18.70
黄曲	15.45	13.70
白曲	5.45	3.05
黑曲	2.18	1.29

从表2可以看出,茅台大曲在入室发酵的过程中蛋白质分解力的变化规律为:前期的蛋白质分解力较低,上升趋势也比较缓,为 $1\sim 6\mu\text{g/g}\cdot\text{min}$ (酪氨酸计);第二次翻仓以后,随着大曲微生物中有芽孢的细菌占主导地位后,所产蛋白酶的种类和数量逐渐增加,而且代谢产物的形成需要大量的蛋白质降解产物,因此蛋白质分解力也逐渐上升,最大可以达到 $19\mu\text{g/g}\cdot\text{min}$ (酪氨酸计),而在大曲处于降温阶段,到出仓时略有下降。黄曲、白曲、黑曲3种半成品曲蛋白质分解力的大小依次为:黄曲>白曲>黑曲,黄曲最高,可达 $16\mu\text{g/g}\cdot\text{min}$ (酪氨酸计)。

3 讨论及结论

3.1 微生物消长规律的探讨^[4]

前期发酵,微生物的种类、数量都达到高峰,且多以非芽孢菌为主,酵母菌和霉菌所占的比例也较大;而在中后期无论是微生物的种类还是数量都在减少,且多以芽孢菌为主。造成这种微生物消长规律的主要因素是温度、水分、养分。前期适宜的温度、充足的水分、丰富的营养,满足了微生物生长繁殖的需求,致使各种微生物大量繁殖;而中后期由于温度较高,水分蒸发快,因而水的活度降低,阻碍微生物与环境、微生物与微生物之间的物质和能量的交换,打乱了各

种微生物的代谢规律,破坏了各种酶作用的适宜条件,影响了各种酶对微生物细胞的代谢调节作用,进而影响到蛋白质、多糖、脂肪以及核酸等生物大分子在细胞内的合成,使微生物遗传性状的表达受到影响,从而影响到微生物的生长繁殖。

3.2 微生物、蛋白质分解力关系

在相同的环境,蛋白质分解生成氨基酸的量主要由蛋白质分解力大小来决定的,而蛋白质分解力的大小主要取决于以下几个因素:酶活、酶量以及酶类,而其中以蛋白酶类的性质为关键^[1]。

从微生物生长规律与微生物产物代谢的角度来分析,从图1,图2以及表1,表2,可以看出:

3.2.1 发酵前期,由于微生物生长繁殖需要大量合成自身需要的蛋白质,它必须源源不断地从环境吸入外源氨基酸来满足自身需求,而这些外源氨基酸正是由各种微生物(主要是霉菌、芽孢菌等)代谢所产生的各种蛋白酶分解所致。因而随着微生物数量的增加,蛋白质分解力也逐渐上升,但由于它仅是分解蛋白质以满足微生物生长繁殖的需求,再加之各种蛋白酶的耐热性较差,一般都在55~60℃,因而尽管微生物数量增长较快,但蛋白质分解力却相对上升较缓。

3.2.2 中后期发酵,此过程是茅台大曲在高温环境,各种微生物及其代谢的酶类共同作用的成香阶段。而形成浓郁的酱香味物质的重要前驱物质之一的就是各种氨基酸,然后再由各种氨基酸发生系列反应,如:羧氨反应,发生褐变,生成带有各种香味的物质;脱氨、脱羧、转氨作用,生成对应高级醇及其他的香味物质^[1]。因此,这一过程中蛋白酶分解蛋白质生成氨基酸主要起着两个作用(1)满足微生物自身生长代谢的需求(2)为各种香味物质的形成提供前驱物质。氨基酸的大量需求,要求蛋白质的进一步分解,从而导致了酶量增加、酶活增强,尤其是耐高温的芽孢菌类所代谢

的各种蛋白酶增加。而到后期,由于各种代谢产物即各种香味物质的大量形成、积累,必然会对由蛋白质分解生成氨基酸这一代谢流产生反馈抑制^[2],导致微生物产酶数量下降,酶活钝化,具体表现为蛋白质分解力的下降。

3.3 黄曲、白曲、黑曲3种半成品曲微生物、蛋白质分解力的关系

本次测得的黄曲、白曲、黑曲3种半成品曲蛋白质分解力的大小依次为:黄曲>白曲>黑曲。黄曲最高,可达16 μg/g·min(酪氨酸计),这主要是温度、水分及微生物共同作用的结果。黑曲一般都形成于曲堆的中间,故黑曲的发酵温度最高,可达60℃或更高,而一般酶耐热的最高温度为50~55℃,同时由于大量代谢终产物的形成必然对酶的分解作用产生反馈抑制,导致微生物、蛋白酶数量减少、酶性失活,分解力降低;白曲位于曲堆的表层,水分蒸发较快,曲皮易干燥,微生物生长繁殖受到影响,所需氨基酸的量减少,因此蛋白酶数量减少,黄曲的发酵温度一般在55~60℃,适宜的发酵温度导致微生物在合成自身的物质的同时还合成了大量的次级代谢产物——各种香味物质。正是多种微生物进行的新陈代谢活动的差异,使得3种曲蛋白酶数量、种类、活性不同,从而决定了黄曲蛋白质分解力较高。

参考文献:

- [1] 沈同,等. 生物化学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1991.
- [2] 杜连祥,等. 工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.
- [3] 张克旭,等. 代谢控制发酵[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [4] 欧阳琨,等. 微生物学[M].北京:轻工业出版社,1993.
- [5] 实用白酒分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [6] 章克昌. 酒精与蒸馏酒[M].中国轻工业出版社,1991.

贵州龙 11·11 活动在羊城举行



白酒专家沈怡方、高月明在会上



贵州龙酒业、可迪公司老总向来宾敬酒

贵州龙酒的销售策略和营销方式的汇报,并给予高度评价和充分肯定,认为他们的合作是一种全新的营销理念。通过厂商合作,充分发挥各自优势,贵州龙酒有得天独厚的自然环境和传统生产工艺,酒质过得硬,有基础,有保障,有生产优势;可迪公司有经营基础,熟悉市场,有基本队伍,市场定位准确。经双方携手努力,定会拓展市场,实现双赢。专家们还为贵州龙酒业和可迪公司题词:

横空出世贵州龙
黔酒新秀香九州
盛世喜庆十六大
五谷丰登酒业兴

(单雨)



黔山秀水出佳酿



横空出世贵州龙

本刊讯:贵州龙黔威酒业有限公司“贵州龙 11·11 活动”于2002年11月11日在羊城中国大酒店举行,时逢其销售总代理广州市可迪贸易有限公司乔迁,因此,厂商共同举办了盛大酒宴。出席盛会的有著名的白酒专家沈怡方、高月明、高景炎等一行及广州市有关部门领导和贵州龙销售商及可迪公司员工等400余人。

其间,举行了厂商座谈会,专家们听取了贵州龙酒业及广州可迪公司就