

酿酒小曲菌种的保藏及复壮

沈发治

(扬州工业职业技术学院,江苏 扬州 225127)

摘要: 小曲是生产小曲酒的糖化发酵剂。菌种保藏不当会引起其性能的衰退,以致变异。介绍了酿酒小曲菌种根霉、酵母常用的保藏方法。短期保藏可采用低温斜面试管保藏法或液体试管保藏法等,且以橡胶塞斜面试管保藏法较好;长期保藏可采用液体石蜡保藏法、真空冷冻干燥保藏法、液氮罐超低温保藏法等,以真空冷冻干燥保藏法较好。菌种分离复壮中应注意活化液的选择、分离操作方法及有效菌种的选择等。

关键词: 微生物; 菌种保藏; 根霉; 酵母; 复壮

中图分类号:Q93-3;TS261.1

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2009)10-0072-03

Storage and Rejuvenation of Xiaoqu Strains

SHEN Fa-zhi

(Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

Abstract: Xiaoqu is the saccharifying ferment for the production of Xiaoqu liquor. Inadequate strains storage would induce physiology function decline and sometimes variation. In this paper, the common storage methods of Xiaoqu strains including *rhizopus* and yeast were introduced. For short-term storage, slant-face-tube method or liquid-culture-medium-tube method with rubber-cork instead of cotton-cork could be adopted. For long-term storage, liquid-olefin method, vacuum freeze-drying method (the best method) or liquid nitrogen super-low-temperature methods could be adopted. The separation and rejuvenation of strains was studied from the following three aspects: selection of activation fluid, separation methods, and selection of effective colonies.

Key words: microbe; strains storage; *rhizopus*; yeast; rejuvenation

酿酒小曲多用大米或米糠等为原料,有的添加少量中草药或辣蓼粉为辅料,有的添加少量白土为填料,接入一定量的母曲和适量水制成坯,在控制温湿度的条件下培养而成,主要用于生产黄酒、米香型白酒、清香型白酒和豉香型白酒^[1]。

小曲中主要微生物为霉菌和酵母菌。霉菌主要是根霉,常见的有河内根霉、日本根霉、爪哇根霉、华根霉、德式根霉、黑根霉和台湾根霉等。根霉在酿酒时主要起糖化作用,根霉含有丰富的糖化型淀粉酶,能将大米淀粉结构中的 α -1,4键和 α -1,6键切断,使淀粉绝大部分转化为可发酵性糖。因根霉含有酒化酶系,故能边糖化边发酵,使淀粉利用率提高。小曲中的酵母有酵母属、汉逊酵母属、假丝酵母属、拟内孢霉属、丝孢酵母等。但起主要作用的是酵母属和汉逊酵母属。酵母在酿酒时主要起酒化作用,产生一系列的酒化酶系将糖转化为酒精^[1]。

自古以来东方酿酒就有“欲酿酒,必先制曲”的说法,人们形象地称曲为“酒之骨”。所以,要酿好酒必先制得好曲,要制得好曲必须选用优良菌株并采用有效的菌种保藏方法。小曲的管理工作分3个方面,即选种、育种和保种。俗话说选种容易、保种难。一个好的菌种,如果保管不

当,就会发生混杂、退化,以致变异。保存菌种的基本要求是低温、缺氧和缺水,以降低霉菌、酵母菌的新陈代谢作用,使其处于生长繁殖受抑制的休眠状态,从而达到减慢衰退的目的。所以菌种保藏的任务是利用人工创造的条件,使微生物的代谢活动降至最低程度或处于休眠状态,其原理是基于生物体的遗传性与变异性。

1 酿酒小曲菌种的保藏方法

1.1 培养基配制

1.1.1 酵母培养基(5%YPD培养基):蛋白胨 20 g,葡萄糖 50 g,酵母膏 10 g,蒸馏水定容至 1000 L;固体 YPD 再加 20 g 琼脂,115℃灭菌 30 min。

1.1.2 根霉培养基

察氏培养基^[3]:量取所需水量约 2/3 加入到烧杯中,分别称取蔗糖、 NaNO_3 3 g、 K_2HPO_4 1 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、蔗糖 30 g,依次逐一加入水中溶解。按每 100 mL 培养基加入 1 mL 0.1%的 FeSO_4 溶液,加入 2%琼脂;待全部溶解后,加水 1000 mL;加热融化,补足失水。装瓶,98 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。

PDA 培养基:称取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加

收稿日期:2009-08-26

作者简介 沈发治(1963-),男,江苏姜堰人,硕士,系主任,副教授,高级工程师,主要从事化工及生物化工生产、教学和科研工作,发表论文 10 余篇。

1000 mL 水煮沸 30 min。用双层纱布滤成清液,加水至 1000 mL,加入 20 g 葡萄糖完全溶解,pH 自然。固体培养基为在液体 PDA 培养基成分上加 20 g 琼脂;115 °C 灭菌 30 min。

1.2 短期保藏

1.2.1 低温斜面试管保藏法

1.2.1.1 棉塞斜面试管保藏法

酵母、根霉分别接入相应斜面试管培养。取新鲜固体斜面培养基,分别做好标记(写上菌名,接种日期),然后用无菌操作方法,用接种环沾取少量待接菌种,在新鲜斜面上做“之”字形划线。注意划线要轻,不可把培养基划破。酵母 28~31 °C 培养 30 h 左右,根霉 28~30 °C 培养 48~72 h,使之长成菌落,然后置于 4 °C 保藏,2~3 月移接 1 次。为防止棉塞受潮长杂菌,管口棉花应用牛皮纸包扎^[2-4]。

影响斜面试管保存时间的一个突出问题是培养基水分蒸发收缩,使培养基成分浓度增大,造成“盐害”,更重要的是培养基脱水后表现收缩、板结,对菌种造成机械损伤导致菌种死亡。为了克服斜面培养基水分的蒸发,可采用橡胶塞斜面试管保藏法。

1.2.1.2 橡胶塞斜面试管保藏法

在棉塞斜面保藏法的基础上,采用橡胶塞代替棉塞,然后抽净管内空气,使之相对真空,达到相对低温、缺氧、干燥的必要保藏条件,克服棉塞受潮、长霉污染的缺点,延长保藏时间,提高菌种的保藏质量。

操作要点:试管处理、培养基制作、接种、培养同棉塞斜面试管;橡胶塞用 95 % 酒精浸泡 24 h;注射器用蒸汽杀菌后,用 95 % 酒精浸泡备用;取已培养成熟的斜面菌种试管和已杀菌的橡胶塞注射器等放入接种箱,开启紫外光灯杀菌 30 min,然后在接种箱点燃酒精灯,燎烧试管口(棉塞部分),稍冷却后,拔去棉塞,换上橡胶塞,稍用力压紧,用注射器(针头)多次插入胶塞伸入管内,抽净管内空气,直至注射器活塞被吸入为止(此时证明管内空气已被抽净,相对真空)。最后,用石蜡浸封管口胶塞,放入冰箱 0~4 °C 保藏。此法保存菌种效果好,保藏菌种广泛,特别适宜酵母、细菌(普性、厌氧细菌)和霉菌的保藏。在培养时将盖拧松,保存时将盖拧紧,在 1~4 °C 下可间隔 1 年移接 1 次^[5-6]。

斜面试管保藏法的缺点是容易变异,污染杂菌的机会较多。生产中为了避免移种多次产生变异,一般均是斜面传代保藏法和后面介绍的液体石蜡保藏法并列进行,起到双保险的作用。

1.2.2 液体试管保藏法

将要保存的根霉、酵母分别接入灭菌的装有液体 PDA 培养基和 5 % YPD 培养液的试管中,25~28 °C 培养 2~3 d,放入 4 °C 的冷藏室中保存。此方法需每 1~2 个月移植 1 次,以防活力下降或变异,使用时需移接活化

1 次才能投入扩大培养。该方法适用于发酵季节性强的菌种的保藏^[2,4]。

1.3 长期保藏法

1.3.1 液体石蜡斜面保藏法

此方法是将要保存的菌种在固体斜面培养基上繁殖后,选生长良好的斜面试管培养基上注入经高压蒸汽灭菌并干燥除去水分的优质液体石蜡(方法:在 250 mL 三角烧瓶中装入 100 mL 液体石蜡,塞上棉塞,并用牛皮纸包扎,121 °C 湿热灭菌 30 min,然后于 40 °C 温箱中放置 14 d 或置于 105~110 °C 烘箱中 1h,以除去石蜡中的水分),以隔绝空气。液体石蜡的液面要高于整个培养基 1 cm,再将顶部的棉塞剪平,或塞上灭菌胶塞,用熔化的硬质石蜡密封,然后将试管直立放置于 4~5 °C 的冷藏室保存。每隔 1~2 年移接 1 次。此方法能抑制微生物代谢,推迟细胞衰老,防止培养基水分蒸发,因而有延长微生物寿命的效果。这种方法简单易行,不要求任何特殊的设备,保藏时间长,能较好保持发酵活性,是最常用的方法。常用于工厂和科研单位酵母、霉菌菌种的长期保藏^[2,8]。

1.3.2 无菌蒸馏水保藏法

将待保藏酵母、霉菌菌种接种到相应固体斜面培养基上,酵母 27 °C 培养 3 d,根霉 28~30 °C 培养 48~72 h,分别加入 5 mL 左右的无菌蒸馏水,轻轻刮下菌体,制成菌悬液。分装到无菌试管内,用无菌胶塞塞紧,置 2~4 °C 的冰箱冷藏室保存^[9]。

张沧桑等通过连续 3 年对用无菌蒸馏水保藏的酵母菌种进行研究,证实该方法不影响保藏菌种的发酵特性,仍然保持原始菌种的优良特性。证明采用无菌蒸馏水保藏菌种的方法,可避免因频繁移种而造成菌种的污染、衰老和退化。其方法简单、易操作,不需要特殊的设备。

1.3.3 液氮罐超低温保藏法

此方法是将生长良好的酵母、霉菌等菌种悬液密封于安瓿管中,经程序降温冻结后,置于-196~-150 °C 液氮罐中。菌悬液可用 10 % 甘油或二甲基亚砜作为保护剂。由于微生物在-130 °C 以下,新陈代谢活动停止,因此菌种存活率较高。贾建华采用液氮罐低温冻结保藏酵母菌 48 个属 129 个种 1630 个菌株,10 年后,其存活率仍达 96.5 %。但此方法需一定的设备,主要适用于菌种保藏单位。

1.3.4 真空冷冻干燥保藏法

将保存菌种分别接种在对该菌最适宜斜面或平板上,经 37 °C 18 h 孵育后,用接种环刮取适量充分生长(生长稳定期)菌种放入 1 mL 脱脂牛奶中轻轻磨匀,充分混合,约以 80 亿为宜,然后用无菌长颈滴管吸取菌悬液滴入菌种管球部,每管 4 滴,用消毒眼科镊子抽取管口棉花少许,塞入管内细颈外,以松为好。放入低温(-40 °C)冰箱速冻 40 min,取出后以最快速度连同干燥器放入冰酒精锅中,接上真空泵,真空抽干(先保持冷温真空抽约 2 h 后),弃去冰酒精锅,干燥器内菌种在室温中继续抽约

6 h。或者菌种经过-40℃低温速冻 40 min 后取出直接放入冷冻机中真空抽干 6~7 h。然后在真空条件下火焰封口,于 5~7℃保藏。保存期 15~18 年再转种 1 次。此方法关键在于水分是否抽干,同时整个操作过程应确保在严格的无菌条件下完成。此方法具有低温、真空、干燥 3 个保藏菌种的条件。存活率高,变异少,但操作程序较麻烦,需一定设备条件,适用于菌种保藏单位使用^[2,13]。

2 菌种复壮

不管采用哪种保藏法,在长期的传代和保藏过程中,由于外界条件或某些因素的变化,使群体表现出衰退现象;或者受培养条件影响(如培养基营养不良、缺乏氧气、接种时间掌握不当等),菌种会发生衰老或者污染杂菌等现象,这些都会造成一些优良性状如发酵力等减弱或消失,所以对菌种进行复壮以恢复其性能显得非常重要。

2.1 根霉复壮

将培养基(如 PDA 培养基)加热溶解及融化,装入三角瓶中,在 0.1 MPa、121℃灭菌 20 min,然后倒入培养皿中制成平板。待平板凝固后,使用接种环,从待纯化的菌落或待分离的斜面菌种中沾取少量菌样,在平板中划线分离,划线的方法多样,目的是获得单个菌落,每次划线后要烧接种环,然后再划下一区。于 28~30℃中恒温培养 3~5 d,观察生长的菌落,先借用显微镜把仍保持原有典型优良性状的单细胞分离出来,并按照生产工艺、原料、条件培养试产。通常在生产中,常以糖化力、发酵力确定考察菌种的生产能力^[7,11-12]。糖化酶活力测定采用 GB8276—87 方法。

2.2 酵母复壮

2.2.1 菌种活化

用接种环沾取少量菌样接种在 5%YPD 固体斜面上,30℃恒温培养 1 d,重复 2 次。用灭菌牙签挑取适量活化的酵母菌斑接种于 5 mL 液体 YPD 培养基中,置于 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 12~16 h。此时可达到对数生长期。

2.2.2 初筛

为确定最适合酵母生长的培养基,分别取上述经活化的菌液 100 μL,置于不同的液体培养基中,置于 30℃、200 r/min 摇床振荡培养 12~16 h。分别稀释为 10 万倍和 100 万倍 2 个浓度梯度,取 50 μL 稀释液涂布到相应的培养基/培养基平皿中,30℃恒温培养 2 d,观察并记录菌落生长情况。

2.2.3 复筛

比较菌落生长情况,确定最适合酵母生长的培养基,再从中挑出光滑圆润、色泽乳白、形状规则且较大的菌斑,用灭菌牙签挑取少许置于相应的 5 mL 液体培养基中,30℃200 r/min 摇培过夜。取 1.5 mL 菌液

3500 r/min 离心 5 min 得菌体,加入 1 mL 相应液体培养基重悬,山梨醇、甘油处理过夜。各取 1 mL 处理后的菌液离心得菌体,分别加入 1 mL 相应液体培养基重悬,稀释 10 万倍后涂布在固体培养基上,30℃恒温培养,3 d 后观察记录。

2.2.4 摇瓶发酵验证

用灭菌牙签挑取复筛中生长较好的菌落,置于 5 mL 5%YPD 液体培养基中,30℃200 r/min 摇培过夜,制成发酵种子。取 1 mL 左右(保证接菌量一致)种子菌液于 50 mL 5%YPD 液体培养基中,于 30℃200 r/min 摇床振荡发酵,同时与复壮前的菌种对照,检测^[8,11]。小曲发酵力的测定直接采取纯酵母在一定时间内所能产生的 1.75 g CO₂ 为标准^[1]。

3 结语

小曲菌种保藏方法多种多样,低温斜面试管保藏法、液体试管保藏法、液体石蜡斜面保存法简单易行,应用得最多,最普遍。真空冷冻干燥保存法和液氮罐超低温保藏法因需要特殊的设备和制作技术,所以目前在酒厂应用较少。为了提高小曲的质量,应培养出优良的糖化、发酵菌种,采用有效的方法进行菌种保藏及复壮,使其在酿酒过程中对淀粉质的糖化、发酵起到很好的作用。

参考文献:

- [1] 徐成勇,郭波,周莲等.酿酒小曲研究进展[J].食品与发酵工业,2002,28(3):72-35.
- [2] 张予林,阮仕立,任亚梅.葡萄酒酿酒菌种的保藏方法[J].中外葡萄与葡萄酒,2001,(6):16-17.
- [3] 安万芬.麸曲酱香菌种保存初探与生产应用[J].酿酒科技,2008,173(11):57-58.
- [4] 姚万春,唐玉明,任道群.酿酒用根霉菌株培养特性研究[J].酿酒科技,2006,150(12):37-39.
- [5] 袁方.厌氧管斜面法保藏菌种初探[J].酿酒科技,1996,73(1):22-23.
- [6] 刘龙活.橡胶塞斜面试管真空保存酒精酵母[J].酿酒科技,1992,48(1):28-29.
- [7] 凌生才.根霉菌一、二级菌种接种方法[J].酿酒科技,2001,103(1):29-30.
- [8] 张云瑞.啤酒酵母的保存方法[J].中国酿造,1997,(4):31-32.
- [9] 张沧桑,张渝,金良媛.无菌蒸馏水长期保藏酵母菌种的研究[J].啤酒科技,2004,(8):25-26.
- [10] 张凤英,朱江,罗秋水.根霉菌 F6 的分离复壮研究[J].酿酒科技,2006,148(10):23-24.
- [11] 韩丽丽,赵泰,涂振东等.酵母菌的复壮研究[J].酿酒科技,2008,174(12):35-37.
- [12] 刘殿英,小曲米酒菌种的保存方法[J].厦门科技,2008,(4):60-62.
- [13] 陈秀英,菌种保存方法的比较[J].中国卫生检验杂志,2004,12(2):231-232.