

窖泥脱氢酶活性测定方法的研究

袁志强 高江婧 唐林 李安军

(安徽古井贡酒股份有限公司技术中心,安徽 亳州 236820)

摘要: 窖泥脱氢酶活性可反映窖泥的质量。研究了分光光度法测定窖泥脱氢酶活性的应用效果。结果表明,该方法具有简便、快捷、可靠性强的特点,是对窖泥质量检测方法的有益补充。该方法可运用于窖泥培养和酿酒生产中对窖泥质量的鉴定。

关键词: 窖泥; 检测; 脱氢酶活性; 分光光度法

中图分类号: TS262.3; TS261.4; Q814

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)04-0109-03

Study on the Determination Method of Dehydrogenase Activity of Pit Mud

YUAN Zhiqiang, GAO Jiangjing, TANG Lin and LI Anjun

(Technical Center, Anhui Gujing Distillery Co.Ltd., Bozhou, Anhui 236820, China)

Abstract: Dehydrogenase activity could reflect pit mud quality directly. In this study, spectrophotometry was applied to detect ehydrogenase activity of pit mud, and it was proved that such method had the advantages including simple and rapid operation and reliable detection results. Such method was a beneficial complement to the analysis methods of pit mud quality and could be used in pit mud culture and liquor-making in practice.

Key words: pit mud; analysis; dehydrogenase activity; spectrophotometry

浓香型大曲酒生产所用窖泥中含有丰富的菌系和酶系^[1],其中参与厌氧发酵的一类重要酶即为脱氢酶。脱氢酶是一类氧化还原酶,能使被氧化有机物的氢离子活化并传递给特定的氢受体。在生物质发酵过程中基质脱氢是生化反应的第一步,微生物脱氢酶是微生物降解有机物从而获得能量的必需酶。生物体的脱氢酶活性在很大程度上反映了生物体的活性状态,能直接表示生物细胞对其基质降解能力的强弱^[2]。

因此,研究浓香型白酒发酵中窖泥的脱氢酶活性,对了解窖泥群体微生物活性具有极其重要的意义。脱氢酶的正式命名应是“AH·B 氧化还原酶”,它能对一定的基质产生酶促作用而从中脱出氢进行氧化作用。单位时间内脱氢酶活化氢的能力表现为它的酶活性。通过测定脱氢酶活性,可以了解窖泥中微生物对有机物氧化分解能力及其对酿酒的产香能力。检测脱氢酶活性最常用的方法是 TTC-脱氢酶活性测定法,该方法已广泛应用于活性污泥活性检测、水质毒性检测、土壤污染等领域^[3]。目前,窖泥的酶学研究中已对酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、蛋白酶、尿酶、过氧化氢酶、蔗糖酶等进行了详细的分析和研究^[1],但至今还未进行有关窖泥脱氢酶活性的研究。本实验首次对窖泥的脱氢酶活性进行了检测分析。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

鲜窖泥,取自本公司正常生产车间;4 mg/mL TTC 溶液、Tris-HCl 缓冲液(pH8.16)、无氧水、甲醛、丙酮等,均为分析纯。

1.2 仪器

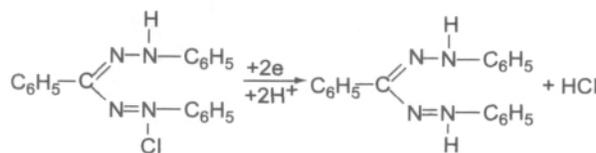
紫外-可见光分光光度计、分析天平、数显恒温水浴锅、离心机、恒温培养箱。

1.3 TTC-脱氢酶活性测定法

1.3.1 原理

利用已知受体能接受脱氢酶脱出的氢原子,如无色的氯化三苯基四氮唑(TTC,2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride),俗称红四唑,接受氢后变成红色的三苯基甲月替(TF,triphenyl formazan),根据产生红色进行比色定量分析,以判断脱氢酶活性。

TTC 作为受体,其还原过程可用下式表示。



收稿日期:2011-11-29; 修回日期:2012-02-10

作者简介:袁志强(1971-),男,工学学士,从事酿酒技术研究工作多年,发表论文数篇。

根据红色的深浅,测出相应的吸光值(A值),求出脱氢酶的活性。A值越大(红色深),脱氢酶活性越高。

1.3.2 绘制 TTC 标准曲线

①配制系列浓度的 TTC 标准溶液。先取 5 支 50 mL 带塞比色管,迅速依次加入 0.36% Na₂SO₃ 溶液 2.5 mL, Tris-HCl 缓冲液 7.5 mL 于各支比色管中;再分别吸取 0.4% TTC 溶液 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL,放入 5 支比色管中,用蒸馏水定容至 50 mL,配成 8 μg/mL、16 μg/mL、24 μg/mL、32 μg/mL、40 μg/mL 系列浓度;同时,另取 1 支 50 mL 比色管,加入 0.36% Na₂SO₃ 溶液 2.5 mL, Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)7.5 mL,以蒸馏水定容至 50 mL,作为空白对照。

②取 6 支 10 mL 带塞比色管,分别吸取 5 mL 上述系列溶液(按浓度由小到大依次吸取),向每支比色管中各加入少许(0.05 g)连二亚硫酸钠混匀,使 TTC 全部还原成红色的 TF。

③向各管滴加 0.5 mL 甲醛终止反应,摇匀后加入 5 mL 丙酮振荡摇匀,37 °C 水浴 10 min。

④4000 r/min 离心 5 min,吸取上清液 5 mL 在 485 nm 波长下测定吸光值 A。

⑤以 A 值为纵坐标,TTC 浓度为横坐标,绘制出 TTC 标准曲线。

1.3.3 窖泥脱氢酶活性的测定

①窖泥悬浮液的制备:取 10 g 鲜窖泥,放入三角瓶中,加 96 mL 0.9% 生理盐水,加入数粒玻璃珠剧烈摇动将污泥打碎,30 min 内振摇 3 次;

②取若干 10 mL 具塞比色管,分别加入 Na₂SO₃ 溶液 0.5 mL, Tris-HCl 缓冲液 2.0 mL,窖泥悬浮液 2 mL(吸前摇匀),0.4% TTC 液 0.5 mL(对照管不加 TTC 液,以 0.5 mL 蒸馏水取代),使最终体积都为 5 mL,盖紧塞子;

③将比色管摇匀,立即放入 37 °C 水浴中培养。一般新培养窖泥需 16 h,老窖泥需 5 h(以显色为准);

④各管分别加入 0.5 mL 甲醛终止反应。再向各管分别加入 5 mL 丙酮振荡数十次,37 °C 水浴保温 10 min;

⑤把各管分别倒入 50 mL 离心管中,4000 r/min 离心 5 min,取上清液 5 mL 在 485 nm 波长下测定 A 值并在标准曲线上查出相应 TTC 浓度。

1.4 窖泥己酸菌活菌数检测方法

己酸菌培养基的配制采用巴氏合成培养基,参考文献[4]。

2 结果与分析

2.1 脱氢酶活性的计算

脱氢酶活性=ABC;

式中:A——由标准曲线上查出的 TTC 浓度,μg/mL;

B——培养时间校正值,h;

C——比色时稀释倍数,当 A 值大于 0.8 时,要适当稀释,使 A 值在 0.8 以下。

在材料方法规定的检测步骤条件下,定义:每 1 g 干窖泥 1 h 产生 1 μg TF 的量为一个酶活力单位。

2.2 脱氢酶活性标准曲线

按 1.3.2 绘制脱氢酶活性标准曲线,见图 1。试剂重配或放置时间较长,都需要作标准曲线。图 1 所绘制的标准曲线,其线性关系较好。

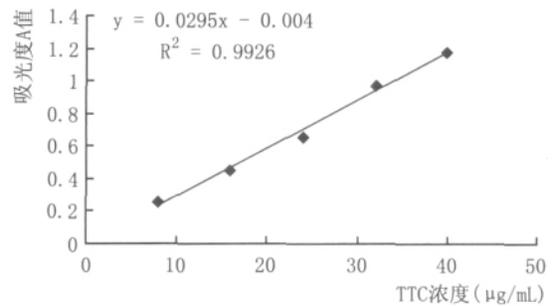


图 1 脱氢酶活性测定标准曲线

2.3 窖泥中脱氢酶活性的检测结果

从正常生产车间窖池中代表性地选取 4 个窖泥样品,直接制成鲜窖泥悬浮液,按 1.3.3 及 1.4 分别测定其脱氢酶活性和己酸菌活菌数,结果见表 1。

表 1 不同窖泥样品脱氢酶活性和己酸菌活菌数的比较

窖泥样品	取样时间	感官鉴定	脱氢酶活性	己酸菌活菌数 (10 ⁴ 个/g)
高温泥 1#	8 月 1 日	黄褐色, 香正	8.6	786
池底泥 2#	8 月 5 日	黄褐色, 香正	9.2	878
池底泥 3#	9 月 8 日	黄褐色, 香正	15.8	950
池壁泥 4#	8 月 10 日	灰褐色, 氨味	4.3	603

图 2 为不同窖泥样品脱氢酶活性测定值,图 3 为不同窖泥样品己酸菌活菌数测定值。对比可知,图 2 和图 3 变化趋势很相似,脱氢酶活性较高的窖泥,其己酸菌活菌数也高。由此可说明,己酸菌活菌数与脱氢酶活性之间存在着一定的相关性。

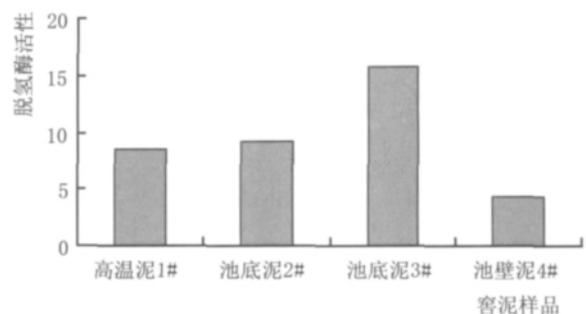


图 2 不同窖泥样品的脱氢酶活性

2.4 分析

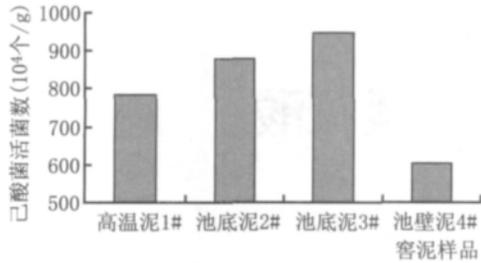


图3 不同窖泥样品己酸菌活菌数

通过实验发现,连续使用的窖池底其脱氢酶活性最高,一般在8~18之间,因为其所含己酸菌和其他功能菌都比较活跃;新窖池底和高温泥脱氢酶活性相对较少,一般在7~10之间,其中己酸菌数较高,而其他功能菌较少;总的来说感官较差的窖泥脱氢酶活性较小,这是因为其中积累了发酵阻碍物质或是由操作方法不当造成,其脱氢酶活性小于5的应在转排生产时及时更换新培养的优质窖泥或高温泥。

感官鉴定正常的老窖池窖泥脱氢酶活性很高,说明窖泥的整体微生物活性较强;而个别窖池中窖泥感官鉴定有氨味的,脱氢酶活性很低,这说明该窖泥整体微生物活性很低,也可说明其中微生物的总体数量、种类较少。对于这种窖泥应采取必要的补救措施,可自然挥发掉氨味等杂质后,再回收窖泥,并采用一定方法加以复壮。

通常检测窖泥质量是采用己酸菌的纯培养方法,但

是培养窖泥的己酸菌,检测其活菌数是一项繁琐冗长的工作,非常费工费时,而且检测的是纯种菌,菌种单一,不包含其他重要的功能菌的活性。而检测窖泥的脱氢酶活性,其最大优点是可以反映出窖泥活性微生物群体的相对数量,掌握窖泥中群体微生物对有机物氧化分解能力及后继产氢产香能力。该方法反映了窖泥的综合性能。

3 结论

窖泥的质量是和其所含的多种菌类密切相关的。本研究过程方法直接采用鲜窖泥悬浮液,检验窖泥的培养效果和其菌类活性,具有简便、快捷、可靠性强的特点,因此,该法是对窖泥质量检测方法的有益补充。可运用于窖泥培养和酿酒生产中对窖泥质量的鉴定,为指导实践提供依据。

参考文献:

- [1] 胡承,应鸿,许德富,等.窖泥微生物群落的研究及其应用[J].酿酒科技,2005(3):34-38.
- [2] 陈翔.脱氢酶在环境监测中的应用概况[J].解放军预防医学杂志,1997,15(6):496-462.
- [3] 解军,祈峰,裴海燕,等.脱氢酶活性检测方法及其在环境检测中的应用[J].中国环境监测,2006,22(5):14-17.
- [4] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工出版社,1998:601-622.

山东举办第七届省级白酒评委考评会

本刊讯 据《华夏酒报》报道,山东省第七届省级白酒评委考评会议于2012年3月5日至9日在淄博市桓台宾馆召开。中国酿酒工业协会、山东省轻工业协会、山东省白酒工业协会、淄博市轻工行业协会等有关领导参加了会议。8位国家级评委组成的专家组,对来自山东省内的125家白酒生产企业的240位生产技术骨干进行了培训考试,根据考试成绩,将产生新一届山东省白酒评委人选。

自1984年10月组建山东省第一届白酒评酒委员会至本次换届,已是第七届。随着白酒消费结构的升级以及向年轻化方向发展,本次参加评委培训的人员中,年轻的新生力量占40%以上。

“十一五”以来,山东白酒行业取得了巨大成就,5年来,经过改革创新和调整,全行业保持了较快的恢复性增长,特别是在科技创新和结构调整等方面,都取得了可喜业绩,已形成具有鲁酒风格的浓香型低度白酒和自主创新的芝麻香型白酒两大优势酒种,在全国享有较高声誉。

2011年山东省白酒行业规模以上企业达156家,白酒产量完成99.17万千升,增幅17.38%;实现销售收入299.81亿元,增幅27.18%;利税51.24亿元,增幅27.18%;利润19.37亿元,增幅32.41%。据山东省统计局的统计数据,156家规模以上企业中,销售收入过亿元的企业达73家,5亿元以上的企业达12家,10亿元以上的企业有扳倒井、景芝、古贝春、泰山酒业4家。

根据各企业生产技术骨干的资历和考试成绩,本次大会同时进行白酒品酒师国家职业资格认定。(于元辅文,小小荐)

来源:华夏酒报 2012-03-22