

浓香型白酒糟醅微生物分离培养基的选择研究^{*}

乔宗伟¹, 张文学¹, 张丽莺¹, 胡承², 门芸², 王忠彦²

(1.四川大学食品工程系, 四川 成都 610065; 2.四川大学生物工程系, 四川 成都 610064)

摘要: 选择了多种分别针对细菌、霉菌、酵母菌等微生物的培养基, 对中国浓香型白酒发酵过程中糟醅微生物区系的消长情况进行了探讨。实验结果表明, 牛肉膏蛋白胨培养基、YPD培养基、抗菌素淀粉培养基分别对糟醅中细菌、酵母菌和霉菌具有较好的分离培养效果。

关键词: 微生物; 分离培养基; 选择; 浓香型白酒; 窖池

中图分类号: Q93-33; TS261.1; TS262.31

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2004)06-0030-03

Selection of Isolation Media of Microbes in the Fermented Grains of Luzhou-flavour Liquors

QIAO Zong-wei¹, ZHANG Wen-xue¹, ZHANG Li-ying¹ and HU Cheng² et al.

(1.Department of Food Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065; 2.Department of Bioengineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: The changes of microbes in the fermented grains of Luzhou-flavour liquors were studied with the culture media for bacterium, yeasts and mold. The results of experiments showed that Beef extract-peptone medium, YPD medium, antibiotic starch medium could isolate bacterium, yeasts and mold very well, respectively.

Key words: microbe; isolation medium; selection; Luzhou-flavor liquor; fermentation pit

中国浓香型白酒的生产是以泥窖窖池发酵为基础, 发酵过程中, 庞大微生物区系的演替以及在糟醅固、液、气三相界面进行的复杂生化代谢过程, 决定了发酵糟醅的物质代谢和能量代谢的走向, 也决定了白酒各种风味物质的形成。发酵过程中产生的代谢产物黄水, 则充当了窖泥和糟醅物质交换的载体, 由于发酵起落、开窖蒸酒及封窖发酵等因素, 形成的窖内压力变化使酒糟中的养分和曲药微生物、环境微生物及其代谢产物不断通过黄水进入窖泥, 而窖泥中的特种微生物种群及其代谢产物又不断地进入糟醅中, 既实现窖泥自身的新陈代谢, 也完成窖泥与糟醅的物质能量交换^[1]。窖泥微生物经过长期的驯化和变异发展, 微生物种类不断丰富并逐渐趋于稳定。而同一生产环境, 由于自然的驯化和生产工艺的稳定, 环境微生物、曲药微生物的种类和数量也基本上变化不大。这样, 在每一轮发酵中, 由来自生产现场、曲药以及窖泥的微生物所构成的糟醅微生物区系, 在相对一致的气候条件及生产原材料状态下, 窖池发酵过程中糟醅微生物的消长规律及其生化代谢所左右的物质变化, 也基本趋于一致, 从而体现出特定浓香型白酒的产品风格和质量性状。

为了比较准确地把握发酵过程中糟醅微生物区系的演变规律, 弄清发酵过程中物质变化的趋势与产品质量及成分的相关关系, 以利于更有效地指导酿酒生产, 在有关研究报告^[2-4]的工作基础上, 我们进一步对发酵过程中糟醅微生物区系开展了动态跟踪研究。在对发酵糟醅微生物的分离培养中, 采用了平板稀释分离法。由于发酵过程中同时或先后有酵母菌、霉菌和细菌等各类微生物的存在, 我们选择了多种培养基分别对糟醅进行了分离培养和统计, 有关各种培养基的选择实验结果报道如下。

1 实验部分

1.1 实验材料

1.1.1 分离用酒糟样

四川丰谷酒厂出窖样, 四川全兴酒厂出窖样。

1.1.2 抗菌素

利福平及四环素盐酸盐原料药标准品, 由四川制药厂提供。

1.1.3 细菌培养基

牛肉膏蛋白胨培养基: 参照文献[5];

改进牛肉膏蛋白胨培养基: 原牛肉膏蛋白胨培养基每 1000 ml 分别添加中层出窖糟浸提液 5 ml, 20 ml, 60 ml, 200 ml;

增强梭菌培养基: 参照文献[6];

改进梭菌培养基: 原增强梭菌培养基每 1000 ml 分别添加中层出窖糟浸提液 5 ml, 20 ml, 60 ml, 200 ml。

1.1.4 霉菌培养基

基础淀粉培养基: 参照文献[7];

淀粉培养基: 参照文献[5];

查氏培养基: 参照文献[5];

PDA 培养基: 参照文献[5];

抗菌素淀粉培养基: 原淀粉培养基每 1000 ml 分别添加不同浓度的利福平或四环素盐酸盐 2 mg, 10 mg, 50 mg, 250 mg, 830 mg。

1.1.5 酵母培养基

YPD 培养基: 参照文献[7];

米曲汁培养基: 参照文献[8], 加 2% 琼脂;

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助(30270035)。

收稿日期: 2004-06-14

作者简介: 乔宗伟(1978-), 男, 硕士生, 研究方向为食品科学。

表 1 细菌用培养基的分离培养效果

培养基	对好氧细菌的分离效果			对芽孢杆菌的分离效果			对兼性厌氧细菌的分离效果		
	数量 (个/平板)	类别 (种/平板)	单离效果	数量 (个/平板)	类别 (种/平板)	单离效果	数量 (个/平板)	类别 (种/平板)	单离效果
增强梭菌培养基	25~30	5~6	较好	20~24	5~6	一般	20~24	3~4	较好
改进梭菌培养基 (浸液 0.5 %)	25~30	5~6	较好	25~30	5~6	一般	20~24	3~4	较好
改进梭菌培养基 (浸液 2 %)	25~30	5~6	较好	25~30	5~6	一般	15~19	3~4	较好
改进梭菌培养基 (浸液 6 %)	25~30	5~6	较好	25~30	5~6	一般	20~24	3~4	较好
改进梭菌培养基 (浸液 20 %)	20~24	5~6	较好	20~24	3~4	一般	20~24	3~4	较好
牛肉膏蛋白胨培养基	25~30	7~8	较好	25~30	5~6	较好	20~24	5~6	较好
改进肉膏蛋白胨培养基 (浸液 0.5 %)	25~30	7~8	较好	25~30	5~6	较好	20~24	5~6	一般
改进肉膏蛋白胨培养基 (浸液 2 %)	25~30	7~8	一般	25~30	5~6	一般	20~24	3~4	一般
改进肉膏蛋白胨培养基 (浸液 6 %)	25~30	7~8	一般	25~30	3~4	一般	20~24	3~4	一般
改进肉膏蛋白胨培养基 (浸液 20 %)	25~30	7~8	一般	25~30	3~4	一般	20~24	3~4	差

麦氏琼脂培养基:参照文献[5]。

1.1.6 糟醅浸提液

出窖糟醅样品 10 g,加煮沸过的蒸馏水 100 ml,摇床上振荡浸提 15 min 后过滤所得滤液。

1.2 实验方法

1.2.1 菌落分离

稀释平板菌落计数法,参照文献[5]。

1.2.2 微生物培养及观察

好氧细菌:35~37℃,培养 2~3 d,观察计数;

兼性厌氧细菌:涂布好的双蝶保持真空度 0.08 MPa,35~37℃,培养 2~3 d,观察计数;

芽孢杆菌:80℃,10 min 加热处理菌悬液后,涂布平板,35~37℃,培养 2~3 d,观察计数;

酵母菌:25~28℃,培养 2~3 d,观察计数;

霉菌:30℃,培养 5~7 d,观察计数。

1.2.3 分离效果的评价

主要从菌落数量、形态类别、单离效果等指标进行判断。

2 结果及讨论

2.1 细菌用培养基的微生物分离培养

细菌在增强梭菌培养基、改进梭菌培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、改进牛肉膏蛋白胨培养基的分离培养情况见表 1。所有的平板采用同一菌悬液稀释度(10⁻²)及涂布量(0.2 ml)进行培养和计数,实验中采用的是丰谷酒厂的出窖糟醅。从统计结果中可以看出,添加浸提液对几类细菌来看,并未见在菌落数量、菌落类别上有什么优势,虽然个别菌落生长较好,但一些菌落的较快生长,反而使单离效果变差。另外,对厌氧菌培养效果较好的增强梭菌培养基与牛肉膏蛋白胨培养基比较,即使在兼性厌氧细菌的统计上,也未表现出更好的培养及分离效果;虽然个别菌落在增强梭菌培养基上表现出不同的菌落形态,但转种到牛肉膏蛋白胨培养基上也能得到同等程度的生长,只是菌落形态上有些差异。比较而言,牛肉膏蛋白胨培养基与其他几种培养基相比,对好氧细菌、兼性厌氧细菌、芽孢杆菌都能达到较理想的培养及分离效果,从而证实采用牛肉膏蛋白胨培养基作为浓香型白酒糟醅一般性的细菌分离及培养用培养基是可行的[2-4]。

2.2 酵母菌用培养基的微生物分离培养

酵母在 YPD 培养基、米曲汁培养基、麦氏培养基的分离培养情况见表 2。所有的平板采用同一菌悬液稀释度(10⁻¹)及涂布量(0.2 ml)进行培养和计数,实验中采用的是丰谷酒厂的出窖糟醅。由实验结果可以看出,3 种培养基在酵母形态及类别上几乎一致,但从酵母的生长菌落数及单离效果而言,明显以 YPD 培养基为

好,可见采用 YPD 培养基可以对浓香型白酒糟醅中的酵母菌达到最好的分离培养效果。

表 2 酵母用培养基的分离培养效果

培养基类型	对酵母的分离效果		
	数量 (个/平板)	类别 (种/平板)	单离效果
YPD 培养基	40~50	3~4	好
米曲汁培养基	20~29	3~4	一般
麦氏 (Meclary) 琼脂	30~39	3~4	较好

2.3 霉菌用培养基的微生物分离培养

霉菌在查氏培养基、PDA 培养基、淀粉培养基、基础淀粉培养基的分离培养情况见表 3。所有的平板采用同一菌悬液稀释度(10⁻¹)及涂布量(0.2 ml)进行培养和计数,实验中采用的是丰谷酒厂的出窖糟醅。由实验结果可以看出,淀粉培养基和基础淀粉培养基对霉菌的培养及分离效果较好,但部分霉菌在基础淀粉培养基上可能由于营养不充足长势较差,造成形态生长不太分明,给分类统计增加了一定困难。从霉菌的生长菌落数、菌落类别数以及单离效果综合而言,以淀粉培养基相对最好,且受细菌生长的干扰相对最小,说明使用淀粉培养基作为从浓香型白酒糟醅中分离培养霉菌的培养基是可行的,这在结论上与罗志腾等人[2-4]使用 PDA 培养基、查氏培养基等的情况有一定差异。

表 3 霉菌用培养基的分离培养效果

培养基类型	对霉菌的分离效果		
	数量 (个/平板)	类别 (种/平板)	单离效果
查氏培养基	15~19	3~4	一般
PDA 培养基	15~19	3~4	一般
淀粉培养基	20~24	5~6	较好
基础淀粉培养基	20~24	3~4	较好

2.4 抗菌素淀粉培养基的微生物分离培养

考虑到酒糟在平板上的霉菌分离培养受细菌生长繁殖的干扰较大,实验中选用了对细菌具有较好抑制作用的广谱抗菌素利福平和四环素盐酸盐添加到淀粉培养基中,对霉菌的分离培养效果进行了进一步的观察(见表 4)。所有的平板采用同一菌悬液稀释度(10⁻¹)及涂布量(0.2 ml)进行培养和计数,实验中采用的是全兴酒厂的出窖糟醅。由实验结果可以看出,当抗菌素的加量在 50 mg/1000 ml 培养基以上时,利福平和四环素盐酸盐都能很好地抑制细菌的生长,且平板培养外观清爽,霉菌的生长状况观察容易,抗菌素的添加对霉菌的菌落数、类别数、单离效果等未见有影响。由于四环素盐酸盐的抑制细菌效果似乎更明显一些,从节约和稳妥的角度出发,可以把浓香型白酒糟醅中霉菌的分离培养基定为添加四环素盐酸盐的抗菌素淀粉培养基,添加量为 50 mg/1000 ml 培养基。

表4 抗菌素淀粉培养基对细菌生长的抑制作用

抗菌素淀粉培养基	细菌的抑制情况	
	利福平	四环素盐酸盐
不加抗菌素	每个碟子中平均长出12株细菌	
加2 mg 抗菌素	每个碟子中平均长出8株细菌	每个碟子中平均长出3株细菌
加10 mg 抗菌素	每个碟子中平均长出2株细菌	每个碟子中平均长出2株细菌
加50 mg 抗菌素	未发现细菌生长	未发现细菌生长
加200 mg 抗菌素	未发现细菌生长	未发现细菌生长
加1000 mg 抗菌素	未发现细菌生长	未发现细菌生长

3 结论

对特定环境微生物区系变化的研究,微生物的分离培养是基础,培养基的选择是关键。能较好地满足多种类型微生物的生长和繁殖的需要,才能最大限度和比较客观地反映糟醅中微生物的种类、数量及相对比例,探讨其变化规律。因而在窖池糟醅微生物区系的分离培养中,不宜采用对部分微生物种类明显有利的富集培养方式。根据实验结果,我们认为对浓香型白酒糟醅中细菌、酵母、霉菌的分离培养,分别以牛肉膏蛋白胨培养基、YPD培养基、抗菌素淀粉培养基为宜,各培养基的配方及配制情况如下:

牛肉膏蛋白胨培养基(1000 ml):牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 ml,pH 7.0~7.2,121℃灭菌 20 min;

YPD培养基(1000 ml):葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母膏 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 ml,pH 自然,113℃灭菌 30 min;

抗菌素淀粉培养基(1000 ml):蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5

g,可溶性淀粉 2 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 ml,pH 自然,121℃灭菌 20 min(培养基灭菌后添加四环素盐酸盐 50 mg)。

对浓香型白酒糟醅中的一些较难分离培养以及难以分离培养的微生物类别,我们拟采用分子生物学的方法进行专门的研究讨论。另外,出窖糟醅样中关于微生物菌落类别的统计,仅仅是根据形态外观及色泽等的观察结果,拟在进一步研究中进行准确的菌种鉴定。同时,我们的统计结果在微生物数量、类别上与其他研究报告^[2-4]的不同之处,可能与窖池生产环境、浓香型白酒产品风格、培养基及取样操作等多种因素有关,关于这方面的差异,将在今后的工作中作进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 郭来虎.中国第一窖[M].北京:中国工人出版社,1999.
- [2] 施安辉.浓香型白酒发酵过程窖中微生物区系的分析[J].酿酒,1986,(4):24-29.
- [3] 罗志腾.大曲发酵酒醅微生物区系的初步研究[J].微生物学通报,1986,(2):59-60.
- [4] 熊昌绪.浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物消长物质变化的研究[J].酿酒科技,1994,(2):25.
- [5] 沈萍,范秀容,李广武,等.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [6] 陈田寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [7] 张文学,等.从蒸馏废液中制造高香气米烧酒[J].酿酒,2001,(1):66-71.
- [8] 张文学,等.耐酸性 α -淀粉酶的分离纯化[J].四川大学学报(工学版),2002,(2):51-56.

(上接第29页)

态发酵或固、液结合生产浓香型酒上。

酯化酶技术包括产酶菌种培养,产酶条件,酯化过程控制。酯化酶技术理论上是己酸乙酯的产生基本为酶在有机溶剂里反应,将酸与醇酶促合成酸酯,该酶具有多项合成功能。若以己酸为基质与乙醇酶促合成己酸乙酯,若以乳酸、乙醇为基质则合成乳酸乙酯。酸、醇酯化的酯香液(酯化液)生产有赖酯化酶作用。

甘肃陇西渭水酒业集团2003年末引进该项技术,现在已经生产出己酸乙酯生物合成酯香液,合成酯香液的己酸乙酯含量以100 ml酯香液中酯含量计:酯化10 d生酯量为1080 mg,30 d为2370 mg,60 d为4180 mg,90 d达到7230 mg水平。据该厂反映,目前生产的酯香液已用于成品酒(中、低档酒)的勾调,认为明显好于外购香料。主要优点是酒体自然感强,绵甜,主体香突出。酯香液除用于调香外,计划在白酒生产上还将用于传统工艺白酒增香,丢糟酒串香,固液结合配制酒加香等多种用途。

3 后记

茅台拒绝恶性竞争

本刊讯:2004年9月23日上午,中国贵州茅台集团党委书记、总经理兼茅台酒股份有限公司董事长袁仁国在接受媒体采访时表示,“作为在海内外享有盛誉的中国国酒,我们必须对白酒市场的健康、良性发展负责,坚决不搞恶性竞争。事实证明,过去几年,正是坚持了这条诚信经营原则,茅台集团实现了连续的跨越式发展,路子越走越宽”。

袁仁国指出:白酒市场打造诚信,当务之急首先需要正本清源、去伪存真,以现代科学为武器,理直气壮地宣扬、阐释传统白酒文化中优秀的东西。

近年来,茅台酒相继获得国家绿色食品、有机食品认证,并被列为国家原产地域保护产品,三者集于一身,在所有的中国酒类食品中绝无仅有。伴随着茅台集团的连续跨越式发展,茅台酒有益人体健康的理念也日益深入人心。

袁仁国同时又指出,宣传自己,绝不意味着贬低别人,这是白酒市场打造诚信的另一个重要方面。茅台集团希望中国的名优白酒能够走出偏狭竞争局限,携起手来,在全球经济一体化和新的消费文化背景下,共同为创造中国白酒美好的明天努力。(小小)