

绿衣观音土曲中微生物种群区系分析及其功能研究

冯春¹,汪光明¹,杨强¹,孙细珍¹,梁运祥²,田焕章²,殷翱²,王丽新²

(1.劲牌有限公司,湖北大冶 435100; 2.华中农业大学,湖北武汉 430070)

摘要: 不同地区的绿衣观音土曲和母曲中微生物均表现出较高的一致性,酵母菌和霉菌数量的分布情况因曲而异。微生物类群主要为霉菌、棒曲霉、酵母、放线菌和细菌。绿衣观音土曲中根霉是主要的糖化菌,酵母菌主要代谢生产酒精,细菌可增加酒中风味物质,但若含量过大会影响酒风味的协调;棒曲霉在发酵中产风味物质,酯化生成乳酸乙酯。(丹妮)

关键词: 绿衣观音土曲; 微生物种群区系; 特点; 功能

中图分类号: TQ925.7; TS261.1; Q93-33 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)03-0039-04

Analysis of Microbe Groups of Green-covering-guanyintuqu and Research on Their Functions

FENG Chun¹, WANG Guang-ming¹ and LIANG Yun-xiang² et al.

(1. Jin Brand Co. Ltd., Daye, Hubei 435100; 2. Middle China Agriculture University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Microbes in green-covering-guanyintuqu and in maternal starter in different regions manifested high unanimity. And the quantity distribution of microzyme and mildew varied to different starter species. The microbe groups mainly included mildew, *aspergillus claviform*, yeast, actinozyceto and bacteria and their functions are as follows: rhizopus as the main saccharifying strains; microzyme as the main microbe producing alcohol; and bacteria could increase flavoring substances in liquor, however, excessive bacteria content would adversely influence the harmony of liquor taste; *aspergillus claviform* produced flavoring substances during fermentation mainly as ethyl lactate. (Tran. by YUE Yang)

Key words: green-covering-guanyintuqu; microbe groups; characteristics; function

1 微生物分离

1.1 培养基^[1]

1.1.1 土豆培养基:土豆 200 g,去皮,切片煮沸 30 min,纱布过滤,加 20 g 蔗糖,琼脂 15~20 g,水 1000 mL, pH 自然。用于分离霉菌和酵母。

1.1.2 麦芽汁培养基:麦芽:水为 1:4,在 65 °C 水浴锅中糖化 3~4 h,糖化程度可用碘液滴定。糖化液用 4~6 层纱布过滤,稀释到 5~6 波美度, pH 6.4,加琼脂 2%, 121 °C 灭菌 20 min。用于分离霉菌和酵母。

1.1.3 牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 15 g,琼脂 15~20 g,水 1000 mL, pH 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 30 min。用于分离细菌。

1.1.4 查氏培养基:硝酸钠 2 g,磷酸氢二钾 1 g,氯化钾 0.5 g,硫酸铁 0.01 g,硫酸镁 0.5 g,蔗糖 30 g,琼脂 15~20 g, pH 自然, 121 °C 灭菌 30 min。用于分离霉菌。

1.2 微生物及分离培养^[2]

黄豆芽-蔗糖-链霉素平板,马丁-孟加拉红-链霉素平板。

1.2.1 分离方法:取优质成曲 2 个,在无菌钵中研碎,取 10 g 置于装有 100 mL 无菌水并带玻珠的三角瓶中,摇动 20 min,作 10 倍稀释系列,取 0.1 mL 涂皿,分离,计数。

1.2.2 菌种鉴定^[1-3]:酵母鉴定按 J.Lodder 的方法,霉菌鉴定依魏景超及 K.B.Raper 等的方法。

1.2.3 发酵生理测定:糖化型与液化型淀粉酶活性测定,按常规法制三角瓶麸曲(麸皮:水=1:1.2)和 5% 麸皮浸出汁。糖化酶活力测定参照轻工业部部颁标准,但以 DNS 法定糖。液化酶活力测定参照《生化技术导论》。

2 微生物区系分析^[6]

2.1 母曲、土曲中的霉菌、酵母和细菌量分析

对劲牌有限公司土曲和母曲的微生物进行 3 次重复测数,结果见表 1。

收稿日期: 2004-09-13

作者简介:冯春(1970-),男,大学本科,工程师,发表论文 7 篇。

表1 母曲、土曲的霉菌、酵母和细菌数量 ($\times 10^7$ 个/g)

培养基	菌别	第一次	第二次	第三次	平均值
土曲.麦芽汁培养基	酵母	5.3	12	8.0	8.9
	霉菌	7.3	5.0	4.3	5.5
母曲.麦芽汁培养基	酵母	19	24	12	18
	霉菌	21	92	56	49
土曲.牛肉膏培养基	细菌	7.5	8.1	9.3	8.3
母曲.牛肉膏培养基	细菌	28	11	17	18
土曲.察氏培养基	霉菌	4.2	2.0	1.8	2.7
母曲.察氏培养基	霉菌	0.4	0.12	0.58	0.37

由表1可知,在麦芽汁培养基上,母曲的酵母数为 18×10^7 个/g,较土曲中酵母高2倍左右。母曲中的霉菌数较土曲中霉菌数高11倍左右。在牛肉膏蛋白胨培养基上,母曲中细菌数为土曲中的2倍左右。

在查氏培养基上,母曲中霉菌数比土曲中霉菌数低7倍左右。与麦芽汁上得到的结果不一致,可能是查氏培养基的营养比麦芽汁培养基贫乏,有些霉菌生长速度受到限制,被生长快的棒曲霉所覆盖,不能准确计数。

总的看来,母曲中微生物数量比土曲中高,并且通过平板分离发现母曲中霉菌、酵母和细菌种类也比土曲中丰富。

2.2 不同来源母曲、土曲微生物区系分析

将几种母曲和土曲进行微生物区系分析,计数结果见表2。

表2 几种观音土曲计数结果 ($\times 10^7$ 个/g)

观音土曲	酵母	霉菌	细菌
大冶.母曲	8.0	1.2	17
园林清.母曲	5.8	1.1	13
公安.富强.母曲	4.3	0.56	16
大冶.土曲	3.4	0.43	4.0
公安.刘新国.土曲	4.3	0.2	6.3
公安.张才文.土曲	1.2	0.27	9.7
卫农粮曲厂.土曲	1.7	0.6	9.3
岳阳.王承波.土曲	11	2.2	13
园林清.土曲	3.6	1.0	3.8
临澧.秋生.土曲	4.7	2.3	5.6

从表2可看出,劲牌有限公司的酵母和霉菌的数量比另两种母曲的酵母和霉菌数要多,而在土曲中,岳阳土曲中的酵母和霉菌数量最多。大冶土曲中的各种微生物数量居中。3种母曲中细菌数量最多,酵母次之,霉菌更少。7种土曲中也是细菌最多,酵母次之,霉菌更少。大冶和园林清的母曲中各类微生物数量比土曲多。总的来说,几种曲样中,酵母、霉菌和细菌的分布呈现出较高的一致性。

2.3 曲样表层和中心部分微生物区系比较

比较几种曲样表层和中心部分的霉菌和酵母菌的数量,结果见表3。

从表3可知,大冶和园林清的母曲和土曲表层的酵母菌、霉菌都较中心的多,土曲表层的酵母菌、霉菌比母

表3 曲的表层和中心部分微生物区系比较 ($\times 10^7$ 个/g)

项目	霉菌	酵母
大冶母曲.表层	2.5	9.0
大冶母曲.中心	0.6	3.1
大冶土曲.表层	22	25
大冶土曲.中心	0.36	1.3
园林清母曲.表层	3.7	11
园林清母曲.中心	2.3	7.6
园林清土曲.表层	6.7	22
园林清土曲.中心	0.3	1.8

曲的多,而土曲中心的酵母菌、霉菌却比母曲少。

3 微生物类群及其特征描述^[4-6]

经多次重复分离,共得到霉菌51株,酵母菌30株。经鉴定归类^[4-5],霉菌中FS41等10株为棒曲霉,FS13等8株为黄曲霉,FS19等8株为构巢曲霉,FS16等13株为毛霉,FS14等5株为白地霉。此外还有根霉1株,青霉2株,瓶梗青霉1株和镰刀霉2株。酵母菌中:YS51等10株为克鲁斯假丝酵母,YS53等13株为啤酒酵母;YS54等3株为克鲁维酵母,YS116等3株为异常汉逊酵母异常变种,还有1株粉状毕赤氏酵母,编号为YS58。

此外,还分离到放线菌和较多的细菌。细菌以芽孢菌占优势。

对上述已鉴定微生物类群,仅选取其中数量上占优势和具优良生产性能的霉菌和酵母菌进行形态和生理特征的描述。

3.1 棒曲霉.FS41

在察氏培养基中于26℃下培养10d,菌落直径为2.5~3.2cm,表面淡灰绿色,由基质内长出相当丰富的分生孢子头。菌落边缘有一薄层白色菌丝紧贴基质生长,宽2~3cm。菌落反面暗黄色,有近同心环状和少量近放射状深波皱,有渗出物。分生孢子头幼时呈棒状,老后裂开成几个短柱。分生孢子柄光滑无色,18~29 \times 750~1470 μ m。顶囊呈棒状,29~65 \times 130~254 μ m。小梗单层密集,全面着生,生于基部者2.8~3.5 \times 2.8~3.9 μ m,生于上部者2.8~3.8 \times 9.3~13 μ m。分生孢子呈卵形,3.8~5.4 \times 4.4~5.8 μ m和近圆形(3.9~4.4 μ m),表面光滑。

糖发酵:仅发酵葡萄糖

碳源利用:

葡萄糖	+	乙醇	+	菊糖	-
半乳糖	-	甘油	+	可溶性淀粉	-
L-山梨糖	-	赤藓糖醇	-	D-木糖	-
蔗糖	-	半乳糖醇	-	L-阿拉伯糖	-
麦芽糖	-	D-甘露醇	-	D-阿拉伯糖	-
纤维二糖	-	α -甲基-D-葡萄糖苷	-	D-核糖	-
海藻糖	-	水杨苷	-	琥珀糖	+
乳糖	-	乳酸	+	柠檬酸	+
密二糖	-	棉子糖	-	肌醇	-

鼠李糖	-	松三糖	-
裂解杨梅苷	-	硝酸钾利用	-
无维生素生长	+	耐 NaCl 浓度	9 %

3.2 克鲁斯假丝酵母

YS51 在麦芽汁平板上菌落扩展,无光泽,边缘不整齐。在麦芽汁液体培养基中形成白色璞及沉淀,璞沿管壁向上蔓延。细胞呈卵圆形,2.4~4×4~10 μm。此外,还有少量柱状体,3.5~4.5×14~27 μm。多边芽殖,在玉米粉培养基上形成丰富的假菌丝。

3.3 啤酒酵母

YS53 在麦芽汁平板上菌落呈圆形,边缘整齐,乳白色,表面光滑有光泽。液体培养形成沉淀,数日后,先形成环,后向中心扩展形成薄膜。细胞呈卵形,3.5~5.2×5.2~6.9 μm 和近圆形,3.8~6.9 μm,多边芽殖,无假菌丝。子囊圆形,内有 1~4 个子囊孢子,孢子表面光滑。

糖发酵:

葡萄糖	+	棉子糖	+	海藻糖	-
蔗糖	+	菊糖	-	可溶性淀粉	-
半乳糖	+	松三糖	-	乳糖	-
麦芽糖	+	纤维二糖	-	α-甲基-D 葡萄糖苷	+
密二糖	-				

碳源利用:

葡萄糖	+	松三糖	+	赤藓糖醇	-
半乳糖	+	菊糖	-	D-甘露醇	-
L-山梨糖	-	可溶性淀粉	-	甜醇	-
蔗糖	+	D-木糖	-	α-甲基-D-葡萄糖苷	+
麦芽糖	+	L-阿拉伯糖	-	水杨苷	-
纤维二糖	-	D-阿拉伯糖	-	乳酸	+
乳糖	-	L-鼠李糖	-	柠檬酸	-
密二糖	-	乙醇	-	肌醇	-
棉子糖	+	甘油	-		
裂解杨梅苷	-	同化硝酸钾	-		
无维生素生长	+	耐 NaCl 浓度	6 %		

4 霉菌及酵母菌的数量分布

在霉菌中,以棒曲霉为主,数量居首位,稀释皿中平均菌落数为 100 个(1×10^7 个/g 曲);黄曲霉、构巢曲霉、毛霉、白地霉等次之, 10^{-4} 次级出现菌落数为 1~2 个;青霉、根霉、瓶梗青霉和镰刀菌等为数很少,多次分离中偶有出现。酵母菌以克鲁斯酵母和啤酒酵母为主,在 10^{-5} 稀释皿中出现菌落数分别为 60 个(6×10^7 个/g 曲)和 12 个(1.2×10^7 个/g 曲);异常汉逊酵母异常变种和克鲁维酵母次之,在 10^{-5} 稀释皿中出现的菌落数为 1~2 个。粉状毕赤氏酵母偶有出现。

对于不同来源的土曲,酵母和霉菌的数量比例不同,这种数量上的差异对成曲质量和酒的风味有影响。

5 发酵生理测定

对霉菌作糖化型、液化型淀粉活性测定,对酵母菌

进行了发酵力、酒精忍耐力及产酯等项测定,并比较了几种菌的最高生长温度,结果列于表 4、表 5、表 6。结果表明,糖化型、液化型淀粉酶活力均以棒曲霉最强,该菌 28~32 °C 生长良好,37 °C 以上生长显著受抑制。酵母菌在豆芽汁葡萄糖液体培养基中生长,除粉状毕赤氏酵母外,均有较浓的酯香。其中异常汉逊氏酵母异常变种虽发酵力较低,但产酯能力强。发酵力、耐酒精力均以啤酒酵母 YS53 最强,它是该曲的主要乙醇产生菌。此菌 40 °C 生长时尚好,当温度为 42 °C 时,生长微弱。克鲁维酵母在 47 °C 下仍能生长。

表 4 霉菌糖化型液化型淀粉酶活性

菌株号	菌种名称	糖化酶活性 (mg 葡萄糖/g 曲·h)	液化酶活性
FS41	棒曲霉	3516	+++
FS13	黄曲霉	2903	++
FS19	构巢曲霉	151	-
FS16	毛霉	500	+
FS14	白地霉	-	-

表 5 酵母菌发酵力、耐酒精力和产酯

菌号	菌种名称	CO ₂ 生成 量(g)	耐酒 精力(%, v/v)	产酯
YS51	克鲁斯假丝酵母	0.7	12	酯香
YS53	啤酒酵母	5.1	14	酯香
YS54	克鲁维酵母	1.8	8	酯香
YS116	异常汉逊氏酵母 异常变种	1.8	10	乙酸乙酯
YS58	粉状毕赤氏酵母	0.4	6	后期稍有酯香

表 6 几种霉菌酵母菌最高生长温度 (°C)

菌号	温 度					
	37	40	42	45	47	50
FS41	+	±	-			
FS13	++	++	+	-		
FS19	++	++	++	++	+	-
FS16	++	++	++	++	+	-
FS14	+	-	-			
YS51	++	++	+	±	-	
YS53	++	++	±	-		
YS54	++	++	++	++	+	-
YS116	+	-	-			
YS58	++	++	+	±	-	

注: ++ 生长良好, + 生长差, ± 微弱生长, - 不生长。

表 4 中各菌液化型淀粉酶活力均较低,故以淀粉液化的相对快慢表示。

6 各种微生物的功能^[4-6]

6.1 绿衣观音土曲中根霉的功能

绿衣观音土曲中的根霉是主要的糖化菌,它可以产生糖化酶及液化酶,可将原料中的淀粉转化成微生物可以利用的糖类物质,这是发酵过程最基本的条件。另外,根霉还有一定的产酒精的作用,在发酵过程中,还可产生一些风味物质,如乙醛、乙酸乙酯、异丁醇、异戊醇、乳

酸乙酯、乙酸、苯乙醇。

6.2 绿衣观音土曲中酵母的功能

酵母菌是发酵过程中主要的产酒精菌,一般耐高温。酵母的发酵率直接影响到生产中的出酒率。这些酵母还可产生一些风味物质,也可产生一些影响酒质的物质,如正丙醇等。另外,还有一些产香酵母,可以增加酒体中的风味成分,使基酒具有比较完全的风味体系。

6.3 绿衣观音土曲中细菌的功能

经过对绿衣观音土曲中微生物种群的分析,可知绿衣观音土曲中含有大量的细菌,在车间进行小试,分别采用本厂的土曲,本厂土曲中加 60 mg/kg 的青霉素,本厂土曲加 100 mg/kg 的青霉素 3 个样,每个样用 13 kg 粮,装小袋,糖化 24 h 后拌糟,入池发酵 7 d,用小甑蒸酒,计算出酒率并进行色谱分析,了解细菌在发酵过程中的功能。色谱分析见表 7。

表 7 细菌功能试验结果 (mg/mL)

项目	细菌功能试验结果 (mg/mL)		
	1#土曲	2#土曲+青霉素 60mg/kg	3#土曲+青霉素 100mg/kg
乙醇(%)	7.317	6.193	9.609
甲酸乙酯	0.516	0.781	1.050
乙酸乙酯	225.687	204.686	295.810
甲醇	11.642	11.877	11.386
仲丁醇	71.747	49.644	30.543
正丙醇	594.459	394.704	314.251
异丁醇	37.931	43.637	55.628
戊酸乙酯	16.236	12.731	10.959
正丁醇	2.553	1.590	3.031
异戊醇	62.887	69.356	73.212
正戊醇	0.742	0.673	0.780
乳酸乙酯	101.712	100.864	51.478
正庚醇	0.702	0.836	—
乙酸	28.925	47.331	31.104
丙酸	9.505	8.361	7.051
苯乙醇	1.638	2.570	1.907
辛酸	0.004	—	—
棕榈酸乙酯	1.361	1.502	1.763
月桂酸乙酯	2.014	2.265	3.003
庚酸	—	1.659	1.775

从表 7 可以看出,降低发酵过程中细菌的量,可以减少一些风味物质的量,如仲丁醇、正丙醇、乳酸乙酯、戊酸乙酯、丙酸、辛酸等物质,细菌主要产酸和酯类物质,特别是乳酸乙酯。总的说来,细菌可以增加酒中的风味物质,但细菌的量越大,产的乳酸乙酯越多,从而影响酒中风味物质的协调。而且,细菌产正丙醇、仲丁醇等物质,这些都是构成杂醇油的主要物质,从而使基酒中杂醇油过高。

6.4 绿衣观音土曲中棒曲霉的功能^[4-6]

绿衣观音土曲中含有大量的棒曲霉,但对其在发酵过程中的功能却不清楚。我们对棒曲霉的功能进行了具体的研究。首先,分离出两株棒曲霉,从其在糖化过程中的作用进行了研究,纯种的棒曲霉几乎没有糖化率,也

无液化作用(见表 8)。

表 8 棒曲霉糖化功能试验结果

项目	棒曲霉糖化率	
	M1 本厂棒曲霉	M2 华农棒曲霉
麸皮二级母种	0	6.8
静置培养母种	0.8	2
摇床培养母种	1.8	1.1

注:糖化率:每 1 g 曲在 30 ℃, 24 h 糖化 100 g 大米米饭所生成葡萄糖的克数。

从表 8 可知,棒曲霉的糖化能力和发酵能力相当弱。再对棒曲霉在发酵过程中的作用进行研究。在车间小试中,以本厂土曲作对照,用不加棒曲霉和加棒曲霉的曲进行小试,蒸酒后做色谱分析,分析棒曲霉的功能。具体结果见表 9。

表 9 棒曲霉功能试验结果 (mg/mL)

项目	棒曲霉功能试验结果 (mg/mL)			
	1#土曲	2#根霉+酵母	3#根霉+30%棒曲霉+酵母	4#根霉+50%棒曲霉+酵母
乙醛	7.317	28.85	10.527	7.368
甲酸乙酯	0.516	1.390	—	—
乙酸乙酯	225.687	124.875	82.588	108.384
甲醇	11.642	15.775	11.299	11.001
仲丁醇	71.747	9.364	102.925	108.985
正丙醇	594.459	341.106	473.429	928.528
异丁醇	37.931	56.943	46.235	44.144
戊酸乙酯	16.236	22.078	23.147	19.549
正丁醇	2.553	0.879	—	—
异戊醇	62.887	97.387	89.314	82.332
正戊醇	0.742	—	0.011	—
乳酸乙酯	101.712	107.050	211.129	241.952
正庚醇	0.702	0.942	1.392	—
乙酸	28.925	15.005	38.482	—
丙酸	9.505	2.092	9.143	—
苯乙醇	1.638	—	1.405	—
辛酸	0.004	—	—	—
棕榈酸乙酯	1.361	—	—	—
月桂酸乙酯	2.014	—	—	—
庚酸	—	—	—	—

从表 9 可看出,棒曲霉主要是在发酵过程中产生一些风味物质,如仲丁醇、正丙醇、乳酸乙酯、丙酸、正庚醇、乙酸等,但其中仲丁醇和正丙醇构成杂醇油影响酒质。棒曲霉主要产生乳酸乙酯,造成酒中乳酸乙酯高于乙酸乙酯,使酒中风味成分比例不协调。

参考文献:

- [1] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学出版社,1977.
- [2] 中国科学院微生物研究所.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1978.
- [3] 王大铝.细菌分类基础[M].上海:上海科学出版社,1977.
- [4] 中科院微生物所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975.
- [5] 林万明,等.细菌分子遗传学分类鉴定法[M].北京:科学出版社,1990.
- [6] 武汉大学生物系微生物分类学教学组.微生物分类学实验(内部资料)[C]1991.