

黄水中乳酸菌的筛选及应用(一)

罗惠波^{1,2}, 曹 伦¹, 骆科弟¹, 张 磊¹

(1.四川理工学院, 四川 自贡 643000; 2.酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘 要: 黄水是白酒酿造过程中的副产物, 其含有丰富的乳酸菌、丁酸菌、己酸菌、酵母菌等微生物资源。从黄水中分离、筛选乳酸菌的结果表明, 分离、筛选得的菌株在黄水中利用淀粉和残糖发酵产生乳酸的能力明显高于直接从黄水中分离得的乳酸菌。(孙悟)

关键词: 白酒酿造; 黄水; 乳酸菌; 筛选

中图分类号: TS261.1; TS261.4; TS262.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001- 9286(2007) 08- 0042- 03

Screening & Application of Lactobacilli in Yellow Water (I)

LUO Hui-bo^{1,2}, CAO Lun¹, LUO Ke-di¹ and ZHANG Lei¹

(1.Sichuan Technical Institute, Zigong, Sichuan 643000; 2. Sichuan Liquor-making Biotech & Application Key Lab, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: Yellow water, as the byproduct in liquor production, contains rich lactobacilli, butyric acid bacteria, caproic acid bacteria and microzyme etc. The lactobacilli strains were separated and screened from yellow water. The results suggested that the separated strains had better performance in producing lactic acid than those directly separated from yellow water. (Tran. by YUE Yang)

Key words: liquor-making; yellow water; lactobacilli; screening

黄水, 又名黄浆水, 是白酒酿造过程中的副产物。其含有丰富的微生物, 如乳酸菌、丁酸菌、己酸菌、酵母菌等, 这些微生物长期生长在窖池中, 能够适应酒精度较高、酸度较大的环境, 是宝贵的微生物资源。此外, 黄水中还含有丰富的有机酸、酒精、淀粉、还原糖、酵母自溶物等, 其中乳酸含量可高达 6%, 具有很高的利用价值^[1]。就酒厂现有工艺讲, 对黄水利用率极低, 仅在蒸酒时倒入锅底提取其中部分醇、酯及少量有机酸, 其他有益成分则作为污水排放。这不仅造成资源浪费, 又污染了环境。对黄水的再利用, 有很高的经济效益和环保效益。

乳酸作为一种工业中的中间体广泛应用于酿造、医药、皮革、食品、卷烟、化工、印染等领域。可以作为防腐剂、酸味剂、风味剂、霉菌剂等, 具有广泛的应用前景^[2]。

由于黄水的酸度较大, 有机物浓度高, 黏性较强, 一般微生物很难在黄水中生存。因此, 从黄水中选育出优良的乳酸菌, 使它利用黄水中的淀粉和还原糖发酵生产乳酸, 达到变废为宝的目的, 为黄水利用的新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2007- 05- 29

作者简介: 罗惠波(1969-), 男, 副教授, 硕士生导师, 从事酒类发酵工程专业教学与研究工作, 完成科研课题 8 项, 发表论文 20 多篇。

新鲜黄水, 工业乳酸菌。

MRS 培养基: 琼脂 1.5%、蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、酵母膏 0.5%、磷酸二氢钾 0.2%、柠檬酸三铵 0.2%、乙酸钠 0.5%、葡萄糖 2%、吐温 80 为 0.01%、硫酸镁为 0.05%、硫酸锰 0.025%, 再另加碳酸钙 0.5%。调 pH 至 4.5 左右。

番茄汁培养基: 新鲜番茄汁 25%、葡萄糖 1%、蛋白胨 1%、硫酸锰 0.005%、硫酸镁 0.01%。调 pH 至 4.5 左右。

主要仪器: 全自动微生物鉴定仪, Biolog, 美国; 液相色谱- 质谱联用仪 Agilent 1100HPLC/MSD, 美国; 电热恒温培养箱 XMT- 152C, 重庆永生实验仪器厂; 电子天平 AR2140, 梅特勒- 托利多仪器(上海)有限公司; 正置生物显微镜 55i+Ds- 5M- V1 尼康, 日本; 全自动灭菌锅 SANYO, 日本。

1.2 方法

1.2.1 测定方法

1.2.1.1 淀粉和还原糖测定

向黄中水加入适量盐酸加热回流使淀粉水解为还

原糖。淀粉含量以还原糖计。还原糖测定采用斐林试剂法。

1.2.1.2 乳酸含量的测定

乳酸含量采用 EDTA 定钙法测定^[3]。由于黄水中可能含有其他有机酸与碳酸钙反应, 所以测定值可能大于实际值。

1.2.1.3 酸度值测定

利用氢氧化钠滴定测定总酸。

1.2.2 乳酸菌的分离和筛选

1.2.2.1 乳酸菌的分离

将新鲜黄水按 1 500 的体积比滴到番茄汁培养基中, 置于 35℃ 的恒温培养箱中培养 24 h, 取培养液稀释 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 梯度。取 3~4 滴稀释的富集样品倾注到 MRS 培养基平板上, 35℃ 培养 24 h, 选择圆形稍扁平的黄色且有透明圈的菌落, 初步判定这些菌落为乳酸菌。再将这些菌落采用划线分离, 得到纯的乳酸菌。

1.2.2.2 乳酸菌的鉴定

对分离出的菌种进行革兰氏染色, 乳酸菌应为阳性。在 10% 蔗糖液发酵的产物中检验有乳酸产生。经过 Bioiog 全自动微生物鉴定仪鉴定为 *Lactobacillus acetotolerans*。

1.2.2.3 诱变

采用紫外线照射诱变^[4]。诱变菌种选用透明圈(溶钙圈)最大的菌落。

1.2.2.4 乳酸菌的筛选

诱变后使用番茄汁培养基来富集培养菌种, 然后划线分离到 MRS 培养基 35℃ 培养。

将黄水在 80℃ 下灭菌 20 min 后与蒸馏水按 1 1 比例稀释。测定其还原糖、乳酸含量及总酸。再将其分装在 30 个编号为 1~30 的 100 mL 三角瓶中, 每个三角瓶装 60 mL。挑选透明圈大的乳酸菌落接入稀释的黄水中。在 35℃ 下发酵 72 h 后测定发酵液的还原糖、乳酸含量及总酸。

选择发酵后还原糖残留少, 乳酸含量增加多的三角瓶内的乳酸菌用于下一轮的诱变和筛选。通过几轮筛选, 得到 4 株在黄水中乳酸发酵性能比较优良的菌株。

1.2.2.5 选育菌株与普通菌株的比较

将筛选出的菌株、直接从黄水中分离出来的乳酸菌以及普通乳酸菌接种在与水按 1 1 稀释的黄水中, 在 35℃ 发酵 3 d。比较发酵前后发酵液中还原糖、总酸及乳酸的变化。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的初步筛选及诱变

将黄水中乳酸菌经过富集培养及分离后, 选择在加

碳酸钙的 MRS 培养基上 10 个透明圈最大的菌落编号为 A1~A10, 然后分别对它们进行诱变。乳酸菌的分离筛选平板见图 1。

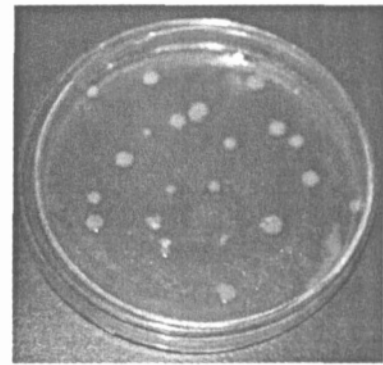


图 1 乳酸菌的分离筛选平板

2.2 选育结果

经过几轮筛选, 得到 4 株比较理想的菌株。把它们接种到与蒸馏水按 1 1 比例稀释的黄水中, 在 35℃ 下发酵 72 h, 比较发酵结果, 见表 1。

菌株	还原糖消耗量	乳酸增加量
R2	2.72	2.15
R3	3.12	2.36
R6	2.94	2.10
R7	3.47	2.62

从表 1 结果比较可知, R7 菌株在黄水中发酵产乳酸的性能好于其他菌株, 将其作为本实验最终选育的菌株。将 R7 在电子显微镜下观察为杆状菌, 见图 2。

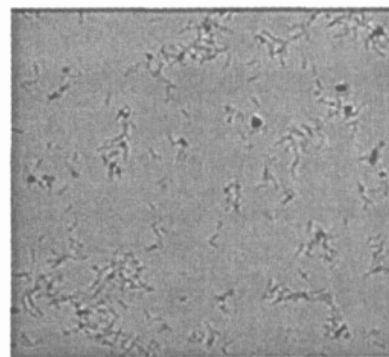


图 2 R7 电子显微镜观察形态

2.3 R7 菌株与普通菌株的比较

将 R7 菌株与 A1 及普通工业乳酸菌同时在稀释的黄水中发酵, 发酵前后发酵液中还原糖、总酸及乳酸的变化见表 2。

从表 2 可以看出, 1#、2# 样发酵前后还原糖略有下降, 但其总酸、乳酸含量都在降低(总酸及乳酸含量降低的原因尚未确定); 3#、4# 样发酵前还原糖平均下降了 2.49 g/100 mL, 乳酸含量平均升高 1.86 g/100 mL; 5#、6#

表 2 筛选菌株同其它乳酸菌
在黄水中的发酵比较 (g/100mL)

瓶号	菌株	发酵前			发酵后		
		还原糖	乳酸	总酸	还原糖	乳酸	总酸
1#	普通				4.76	5.11	3.88
2#	普通				4.72	5.10	3.89
3#	A1	4.80	5.12	3.95	2.45	6.91	5.20
4#	A1				2.18	7.05	5.27
5#	R7				1.25	7.87	5.85
6#	R7				1.20	7.89	5.87

注: A1 是直接从黄水中分离出来的透明圈最大的乳酸菌菌株。

样还原糖平均下降了 3.58 g/100 mL, 乳酸含量平均升高了 2.76 g/100 mL。由此可以看出, 筛选出的菌株在黄水中利用淀粉和残糖发酵产生乳酸的能力明显高于直接从黄水中分离出来的乳酸菌。普通工业乳酸菌几乎不能在黄水中发酵, 镜检发现接种的乳酸菌大部分已经死亡。这是由于黄水的酸度较大, 有机物浓度高, 黏性较强, 一般微生物很难在黄水中生存。

3 结论

黄水作为白酒工业的主要副产物, 虽然其中含有丰富的有机酸、淀粉和还原糖, 但是一直以来很难被利用。

作为工业废水也难以处理。于是人们希望能够利用微生物来处理黄水, 由于黄水特殊的物理化学性质使普通微生物很难在其中生存。因此, 从黄水中选育出能够利用和处理黄水的菌种成为利用黄水的一个新思路。本实验选育的乳酸菌与其他乳酸菌相比, 能够很好的在黄水中利用淀粉和还原糖发酵产生乳酸, 为工业上利用和处理黄水提供了新的选择。本实验选育的乳酸菌在黄水中的发酵条件优化及黄水的后处理将继后发表。

参考文献:

- [1] 罗惠波, 张宿义, 卢中明. 浓香型白酒黄水的应用探索[J]. 酿酒科技, 2004, (1): 40- 41.
- [2] 庞钦. 酒精浓醪发酵酒糟液生产乳酸的研究[M]. 无锡: 江南大学, 2002.
- [3] 郑志, 姜绍通, 等. EDTA 定钙法测定发酵液中乳酸含量的探讨[J]. 食品科学, 2003, (3): 84- 87.
- [4] 杜连祥, 路福平. 微生物实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.174- 177.
- [5] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.



(上接第 41 页)

有增强作用, 可防止人体及骨骼关节硬化, 促进新陈代谢, 增强活力。

3.3 新疆药桑果酒必需氨基酸 FAO/WHO 提供的参考蛋白模式值, 符合天然绿色食品的国际标准。利用药桑果酒, 治疗因患肝硬化、脂肪肝、痢疾等病引起的营养不良症有效; 科学研究表明, 桑椹对降脂和减轻神经衰弱、动脉硬化、性功能衰弱等均有显著疗效。桑椹所含蛋白质、人体必需的 18 种氨基酸、维生素及所需的微量元素, 其含量显著高于其他果类。现代科学研究证实, 桑椹中的微量元素硒对人体心脏及免疫等系统具有治疗和保护作用, 特别是桑椹中的白藜芦醇(RES), 能刺激人体内某些基因抑制癌细胞生长, 并能阻止血液栓塞形成, 桑椹中的黄酮类物质, 具有抗氧化作用, 能延缓人体衰老。药桑桑椹酒含有丰富的蛋白质和氨基酸, 多种维生素。动物试验表明, 桑椹提取汁具有中度促进淋巴细胞转化作用, 促进 T 淋巴细胞成熟, 使人类因衰老而减少的白细胞得以恢复, 延迟衰退, 防止因白细胞减少而引起的疾病。能有效增强身体的免疫力。

3.4 药桑果酒芸香甙、生物碱、1- 脱氧野尻霉素(DNJ)、 γ 氨基丁酸、类黄酮素、糖类等多种活性物质, 具有降血压、降血脂、降血糖、护肝、抗 A I D S、降胆固醇、利尿、

排毒等作用, 防止动脉硬化、调整机体免疫和抗衰老等功能; 药桑果酒含有白藜芦醇的抗肿瘤物质, 能刺激人体内某些基因发挥作用, 抑制癌细胞的生长, 还可阻止致癌物质引起的细胞突变, 使细胞内的溶酶体破裂放出水解酶, 使癌细胞溶解死亡。

3.5 药桑果酒为营养丰富的保健食品, 其具有乌发、生发、滋养毛发功能, 具有补肝肾、益精血的作用, 用于治疗肝肾亏虚所致的身体消瘦、腰膝酸软、遗精盗汗、头晕眼花、口渴咽干等症状。还有滋阴养血、健脾乌发之功能, 主治阴虚, 头晕目眩, 失眠健忘等多种病症。饮用桑椹汁, 能解酒中毒, 利水气, 消肿。

参考文献:

- [1] 宋大可, 买买提依明, 乃比江. 新疆药桑果汁化学成分及药物价值研究[J]. 蚕桑通报, 1994, 25(4): 34- 34.
- [2] 买买提依明, 郭洪荣, 吴丽莉, 等. 新疆果用桑种植资源研究[J]. 蚕学通讯, 2002, 22(3): 15- 17.
- [3] .买买提依明, 郭洪荣, 吴丽莉, 等. 新疆桑椹色素的分离及营养物质的分析研究[J]. 中国蚕业, 2002, (3): 15- 16.
- [4] 买买提依明, 卢红, 刘燕林, 等. 新疆药桑营养功能性成分及药理作用的分析研究[J]. 北方蚕业, 2006, 27(4): 16- 18.
- [5] 买买提依明, 吴丽莉. 新疆药桑的研究进展[J]. 北方蚕业, 2007, 28(1): 19- 21.