

小麦品种对曲药发酵过程中霉菌和细菌分布的影响

胡雨

1 四川轻化工大学, 四川宜宾, 644000;

2 泸州老窖股份有限公司 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川泸州, 646000;

摘要: 目的: 探究不同小麦种类酿制曲药的过程中霉菌和细菌数量变化对品质提升的影响, 来确定原料筛选方法提高产品质量。方法: 从 3 个普通小麦种类 (SW1、SW2、SW3) 和 3 个硬质小麦种类 (DW1、DW2、DW3) 中选择样品, 并对霉菌、酵母菌、细菌、芽孢杆菌的数量在发酵过程中变化进行分析。结果: 不同小麦种类中不同菌群的分布不同。如 DW1 中霉菌数量最多 (8210000CFU/g), 而 SW3 中的细菌数量最少 (29170000CFU/g); DW3 中芽孢杆菌的密度最大 (3610000CFU/g), DW1 中芽孢杆菌的密度最少 (1820000CFU/g)。小麦的种类对酿制中的微生物群体数量具有一定影响。结论: 硬质小麦种类中的霉菌数量会更高, 而普通的小麦种类中的细菌会更多。

关键词: 小麦种类; 霉菌; 酵母菌; 细菌; 芽孢杆菌

DOI: 10.69979/3041-0673.25.06.090

引言

在我国传统的粮食酿酒与发酵酒生产中, 都需要使用曲药来完成, 而曲药中菌群的种类与分布对产品的最终性能有着关键性作用。其中麦子是重要的曲药原料, 其不同含量的淀粉、蛋白可能影响着曲药中菌类的生长和代谢作用, 最终决定发酵性能。然而, 涉及不同小麦如何影响发酵中微生物生态环境的深入比较分析研究并不多见。为此, 选取了普通小麦 3 种 (SW1、SW2、SW3) 和耐高抗小麦 3 种 (DW1、DW2、DW3), 检测了制曲过程中霉菌、酵母菌、细菌和芽孢杆菌数量的变化情况, 以探讨不同小麦性能影响制曲中微生物群落结构, 并为选择更为优良的小麦原粮提供参照。

1. 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦品种: 选取不同类型的小麦, 包括强筋小麦 (SW1、SW2、SW3) 和弱筋小麦 (DW1、DW2、DW3)。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基; 酵母-葡萄糖-琼脂 (YGA) 培养基; 营养琼脂 (NA) 培养基; 改良巴氏培养基。

试剂: 无水乙醇 (AR 级); 无菌生理盐水 (0.85% NaCl); 染色试剂 (结晶紫、碘液、番红等); DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒 (购自国标试剂公司); 霉菌及细菌标准菌株 (购自中国微生物菌种保藏中心)。

1.2 仪器与设备

仪器: 高通量测序仪 (Illumina MiSeq); 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500); 高效液相色谱仪 (HPLC, Agilent 1260); 紫外分光光度计 (UV-2600); 扫描电子显微镜 (SEM); 光学显微镜 (Olympus CX23)。

设备: 恒温培养箱 (Thermo Fisher, 37°C, 30°C); 超净工作台 (Airtech SW-CJ-2F); 高压蒸汽灭菌器 (YXQ-LS-50SII); 振荡培养摇床 (Thermo Scientific)。

1.3 方法

1.3.1 原粮总淀粉含量的测定方法

本实验以总淀粉酶分解小麦原粮中淀粉为葡萄糖进行显色来确定总淀粉含量的方法, 即酶水解法。试验步骤为: 制样、酶解、显色、计算。

(1) 样品准备

首先, 选取 5 个麦种 (SW1、SW2、SW3、DW1 和 DW2、DW3)。在此过程中, 应保证数据测量的准确度, 对材料清理和混合杂拌进行。再进行研磨机进行 80 目的粉状, 增加接触表面积, 进一步提高淀粉的提取效率。依次把实验材料置 50°C 恒温至恒重, 剔除水分含量对实验数值的影响。最后取样, 从干燥的小麦面粉中取出 100mg 的面粉物质, 并放入干净、无水分含量的离心瓶中, 把瓶口进行密封处理。

(2) 酶解反应

称取样品 100mg, 在 0.2M 乙酸钠的 PH 为 4.8 体积的缓冲液中, 置入恒温器, 使环境温度保持恒定; 放入水中加温 5min 以至样品中淀粉粒完全糊化, 使酶解效

率更高;加入 50 μ L α -淀粉酶(50U/mL)水溶液,在(95 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 保持温度条件下,保温 30min,每隔 10min 晃动一次,使酶与底物结合。调整温度至(55 \pm 0.5) $^{\circ}$ C,加入 100 μ L 葡萄糖淀粉酶(100U/mL)溶液,在(55 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 恒温器中保温 1h。

(3) 反应终止与过滤

酶解处理后立即降温至室温终止酶活性,加入适量清洁水使总体积达到 10mL,摇匀以确保溶液均匀,用微孔滤膜 0.45 μ m 滤出未能完全消化的残渣,以此严格确保滤液能够进行准确的吸光度测定。滤清液体要及时显色,避免过量葡萄糖被氧化导致试验结果偏差。

(4) 葡萄糖含量测定

分别吸取 1mL 滤液加入 3mL DNS 试剂(3,5-二硝基水杨酸溶液)中,混合均匀后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中,水浴锅中水开后维持 10 分钟进行显色。冷却后立即停止加热,防止因高温影响颜色进一步变化从而对结果产生干扰。用紫外分光光度计,540nm 下分别读取吸收值,并在建立好的葡萄糖标准曲线的基础上得到结果样本中葡萄糖含量。

(5) 计算总淀粉含量

总淀粉含量可以由测得的葡萄糖含量计算得到,从而可以得出品种间淀粉含量的差异。计算公式如下:

$$\text{total starch (\%)} = (\text{glucose concentration} \times \text{dilution factor} \times 0.9) / \text{sample weight} \times 100\%$$

式中,0.9 代表的是葡萄糖转化为淀粉的转换比率。通过公式可以保证实验结果的精确性和可靠性。

(6) 数据处理与分析

小麦样品每次重复检测三次以减小检测误差,提高检测精确性。全部数据均采用 SPSS 软件处理、分析,包括算数均值、标准差、方差分析(ANOVA)等,分析不同小麦总糖含量间差异。依据数据分析,有利于深入掌握不同小麦品种影响酵母菌剂发酵机制。

1.3.2 原粮直/支链淀粉含量的测定方法

本试验采用碘比色法检测小麦原始样品中的直链淀粉和支链淀粉含量。原理是利用碘能与各种淀粉发生相应的颜色反应,按一定波长值所对应的吸光度来计算两者含量的相对百分比。包括样品处理、提取淀粉、显色和结果分析 4 个部分。

(1) 样品准备

选取 5 个不同品种的小麦(SW1、SW2、SW3、DW1、D

W2、DW3),为确保检测结果的准确可靠性,测试前进行选杂剔除和样本均匀混合,在破碎器内将样品研磨成细小颗粒,增加其表面积提高淀粉抽提率。在温度 50 $^{\circ}$ C 条件下将研磨好的试样放置一段时间使其晾干至恒重,以避免水分对实验结果产生影响,最后从该批干湿小麦粉样品中取出 100mg 加入干净离心管内,装入塑料袋备用。

(2) 淀粉提取液

取 100mg 试样加入 80%乙醇溶液 2mL,85 $^{\circ}$ C 水浴 15 min,去除自由糖等非淀粉质。5000r/min 涡旋 10min 弃上清,余下的加 1MNaOH 溶液 2mL,95 $^{\circ}$ C 水浴 30min 使淀粉水解。待至室温加入 10mL 纯净水至 10mL 容量瓶中并匀速搅拌使溶液均匀。

(3) 碘显色反应

从已经准备好的直链和支链淀粉溶液中各取 1mL,各加入 0.2mL 1M 醋酸缓冲液(PH4.5)进行同步化实验,然后各加 0.2mL 0.2%KI-KI 碘化钾-碘溶液,混匀后放置避光 30min 以进行饱和的碘-淀粉复合物,其间若碘离子与直链淀粉反应会产生蓝色的碘-淀粉复盐,而碘离子与支链淀粉反应则会形成红或紫的碘-淀粉复盐,颜色的深浅与直链淀粉/支链淀粉的比例呈正相关。

(4) 吸光度测定

采用紫外分光光度计分别在 620nm 和 550nm 两个吸光度位置对不同的样品进行两次检测,每组样品重复三次检测,取平均值。

(5) 计算直链淀粉和支链淀粉含量

根据吸光度数据,可以计算出小麦中直链淀粉和支链淀粉的含量。计算公式如下:

$$\text{直链淀粉 (\%)} = (A_{620} / (A_{620} + A_{550})) \times 100\%$$

$$\text{支链淀粉 (\%)} = (A_{550} / (A_{620} + A_{550})) \times 100\%$$

式中, A_{620} 与 A_{550} 表示样品中 620nm 和 550nm 吸光度数值。通过此分析式,能够比较清晰地了解不同品种小麦中直链淀粉含量与支链淀粉含量的比例。

(6) 数据处理与分析

为减少实验出错概率,同时增加实验精确性,对每一个小麦品种进行 3 次测定,用 SPSS 得出每一个小麦直链淀粉、支链淀粉的平均值以及偏差率和差异数进行统计。进行单因素方差(ANOVA)检验分析各类型小麦之间直链淀粉、支链淀粉含量的差异。根据结果可以分析不同小麦对曲药发酵上醅菌的影响。

2 结果与分析

本次实验采用不同种类的小麦样本分别进行小批量的发酵试验,并对其中存在的各类微生物进行统计绘图,评价这些小麦样品发酵过程中其微生物生态环境作用的强弱大小。参加本次实验的所有样本均在相同状态下进行发酵。

从表 1 中可以看出,不同类小麦中的曲霉菌数不同,

表 1 小麦曲药数据

小麦品种	霉菌 (*10 ⁶ 个)	酵母菌 (*10 ⁶ 个)	细菌 (*10 ⁶ 个)	芽孢杆菌 (*10 ⁶ 个)
SW1	6590000	695000	33500000	3090000
SW2	6120000	625000	34800000	3650000
SW3	6610000	675000	29170000	2060000
DW1	8210000	885000	34700000	1820000
DW2	8110000	765000	29700000	3010000
DW3	7530000	665000	38700000	3610000

不同类型的谷物对酵母含量的差异也十分明显, DW 1 的谷物酵母数量最多(885 万个/g), SW2 谷物酵母数量最少(625 万个/g)。酵母通过生物学反应产生酒精和香味物质,其数量的变化可能会改变其生产的曲药风味。

根据图 1 可知,基本是细菌占绝大多数,占大部分,

其中种型小麦 DW1 中曲霉菌最高(821 万 CFU/g), 种型小麦 SW2 中曲霉菌最少(612 万 CFU/g)。曲霉菌的产生量作为影响酿酒曲药的重要因素,直接决定了曲药的酶活力和糖化能力,因此含有较高曲霉菌的 DW1、DW2、DW3 等优质小麦可能是直链淀粉含量较高的原因。

其余占小部分的微生物是霉菌、酵母和芽孢杆菌;由此验证在造渣过程中占大多数的细菌也是主要的微生物是细菌;其中小麦品种 DW3 细菌种群最多,为每克 3870 万个;小麦品种 SW3 细菌种群最少,为每克 2910 万个;其中虽然细菌有助于发酵和生产酸度,但却有负面作用。

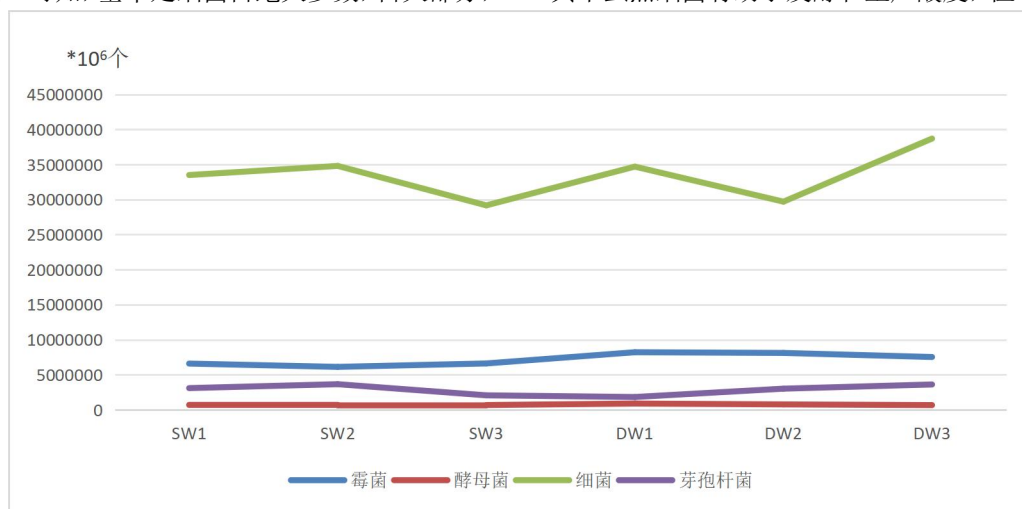


图 1 不同小麦品种的霉菌、酵母菌、细菌和芽孢杆菌分布

不同类群的小麦类作物芽孢杆菌含量有较大差异,其中芽孢杆菌数量最多为 DW3 为每克三百六十万个;反之,芽孢杆菌最少的数量为 DW1 为一百八十二万个。对周围环境比较敏感,因此不同类的小麦类作物的化合物可能会影响到不同类的芽孢杆菌在曲药的竞争力,添加适量的芽孢杆菌可以增强曲药的坚挺性和抑制污染的能力,但是超过适宜范围时,会导致出现发酵味道异常或者其他微生物受到抑制的情况。

综合来看, SW1、SW2、SW3 和 DW1、DW2、DW3 的微生物生长表现区别较大,硬质小麦的霉菌与酵母菌总数

高于普通小麦,而普通小麦的细菌总数高于硬质小麦。这可能与普通小麦较高的可溶性糖和蛋白质促进细菌的增长,而高直链淀粉比例的硬质小麦更适宜霉菌的生长有关。在分析对芽孢杆菌的生长影响时发现,小麦品种的不同会带来芽孢杆菌数量不同的情况,其中 DW3 的小麦品种芽孢杆菌总数为最高,这可能是由于 DW3 中富含蛋白质使其更适宜芽孢杆菌的生长。

3 结论

高直链淀粉含量的麦类品种有利于霉菌和酵母菌

的生长,但含有高比例支链淀粉的麦类品种可能促进细菌及芽孢杆菌的生长。曲药发酵中霉菌主要起到糖化作用和促进酶的释放来提高曲药的糖化能力。酵母菌的生长也可能对曲药发酵产生的酒精及其风味物质起积极作用。从细菌属群的分布特征可以推测出它们可能影响发酵过程中有机酸的产生,从而影响曲药的酸度和风味特征。由芽孢杆菌变化数量说明不同麦类品种对其芽孢杆菌的趋势发展作用各不相同,适当的芽孢杆菌数量有利于提高曲药的稳定性,但高浓度芽孢杆菌不利于其它有益微生物的生长。由于硬质小麦菌丝菌和酵母菌生长量较大,故使用硬质小麦可能用来酿造高产酶活力高的曲药;反之,普通小麦由于其细菌生长量高于霉菌和酵母,可能更适合一些菌丝作用为主的发酵过程,如乳酸菌作用主导的发酵等。

参考文献

- [1] 雒丽丽,张昊,杨美欣,等. 黄淮与东北麦区小麦赤霉菌温度相关的致病力分化研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(4):9.
- [2] 侯小歌,樊俊鹏,郭福利,等. 小麦品种对浓香大曲细菌群落与挥发性风味化合物的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(24):133.
- [3] 孙乐妮、郭迎雪、侯雪婷、庄杰、杨章泽、陈兆进、田伟. 镉耐性固定细菌的筛选及其对不同品种小麦镉吸收的阻控效应[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(9):10.
- [4] 王娜,主奕然,谢夏娟,等. 1 株桑叶内生促生细菌的筛选及对小麦幼苗的促生机制研究[J]. 微生物前沿, 2024, 13(3):155-165.