



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106591160 A

(43)申请公布日 2017. 04. 26

(21)申请号 201610778887.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2016.08.31

C12N 1/18(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12N 1/14(2006.01)

CCTCC M 2016410 2016.07.28

C12G 3/02(2006.01)

CCTCC M 2016411 2016.07.28

C12G 3/12(2006.01)

CCTCC M 2016412 2016.07.28

C12R 1/865(2006.01)

CCTCC M 2016413 2016.07.28

C12R 1/685(2006.01)

CCTCC M 2016400 2016.07.19

C12R 1/69(2006.01)

C12R 1/845(2006.01)

(71)申请人 长江师范学院

地址 408100 重庆市涪陵区李渡聚龙大道
98号

(72)发明人 王庆

(74)专利代理机构 南京正联知识产权代理有限公司 32243

代理人 顾伯兴

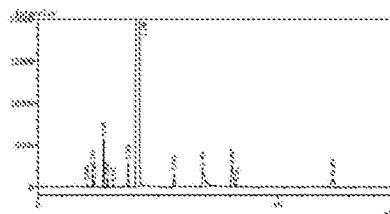
权利要求书2页 说明书19页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

一种复配小曲及小曲白酒的生产方法

(57)摘要

本发明提供了一种复配小曲,所述的复配小曲由母曲和酵母组成,所述的母曲中的微生物由黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉组成;所述的酵母由产酯酵母和酿酒酵母组成;所述的黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉的重量比为14:2:3:1;所述的母曲与产酯酵母的重量体积比为100g:20ml;所述的母曲与酿酒酵母的重量体积比为100g:10ml;所述的产酯酵母和酿酒酵母中的酵母数均不小于 1×10^8 个/mL。本发明的复配小曲具有如下技术效果:1.本复配小曲产酒能力有所提升,2.产酯能力强,3.通过气相色谱分析可知,产生的风味物质的数量和种类比一般小曲增加较多。



峰号	保留时间	面积	面积%	峰高	理论板数	分辨率
1	2.056	783	0.0022	480	37355.040	0.000
2	2.278	3830	0.0257	2268	46447.137	5.411
3	2.344	2117	0.0142	737	0.060	0.000
4	2.735	11847	0.0795	5652	36973.870	0.000
5	2.897	2428	0.0163	1664	40814.006	2.892
6	3.147	609	0.0041	317	59372.274	-6.604
7	3.765	8094	0.0543	2688	45635.621	10.144
8	4.190	14829232	99.4647	3782788	25793.967	4.869
9	5.685	6566	0.0440	1643	44996.065	14.177
10	6.865	17948	0.1204	2158	24632.747	8.383
11	8.097	14676	0.0984	2500	45159.287	7.549
12	8.291	2621	0.0136	312	0.000	0.000
13	12.297	8895	0.0597	1014	44137.572	0.000
总和		14869645	100.0000	3803928		

1.乙醇; 2.乙醇; 3.正丙醇; 4.乙酸乙酯; 5.乙醚; 6.未知; 7.正丁醇; 8.乙醇; 9.乙酸; 10.正丁醇; 11.异戊醇; 12.未知; 13.乳酸乙酯

1. 一种产酯酵母,其特征在于,所述的产酯酵母保藏编号为CCTCC M 2016400。

2. 一种复配小曲,其特征在于,所述的复配小曲由母曲和酵母组成,

所述的母曲中的微生物由黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉组成;

所述的酵母由产酯酵母和酿酒酵母组成;

所述的黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉的重量比为14:2:3:1;

所述的母曲与产酯酵母的重量体积比为100g:20ml;

所述的母曲与酿酒酵母的重量体积比为100g:10ml;

所述的产酯酵母和酿酒酵母中的酵母数均不小于 1×10^8 个/mL;

所述的黑曲霉保藏编号为CCTCC M 2016410;

所述的米曲霉保藏编号为CCTCC M 2016411;

所述的黑根霉保藏编号为CCTCC M 2016412;

所述的米根霉保藏编号为CCTCC M 2016413;

所述的产酯酵母保藏编号为CCTCC M 2016400。

3. 如权利要求2所述的复配小曲的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

A,母曲的制备:将黑根霉、米根霉、黑曲霉、米曲霉的霉菌孢子分别接种到带有麸皮的培养瓶中,培养24-48h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养3-6d;取出40℃下干燥4h,将黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉按照14:2:3:1的重量比混合,然后于4℃下保存,以备酿酒用;

B,酵母的制备:将产酯酵母和酿酒酵母分别扩大培养,使酵母数达到 1×10^8 个/mL后,备用。

4. 根据权利要求3所述的复配小曲的制备方法,其特征在于,所述的母曲的制备方法如下:

取小麦喷洒润粮,粉碎后与新鲜麦麸混合,加入水,拌料混合均匀;将混合均匀的料分装入三角瓶中,装料厚度不超过2cm,用8层纱布包扎封口,再用牛皮纸包扎灭菌,放入无菌室,待冷却至30℃时,用接种环挑取黑根霉、米根霉、黑曲霉、米曲霉的霉菌孢子分别接入三角瓶中,混匀;

黑根霉、米根霉放入28℃培养箱中培养24h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养3d;

黑曲霉、米曲霉放入30℃培养箱中培养48h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养6d;

培养好后分别取出在40℃下干燥4h,将黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉按照14:2:3:1的重量比混合,然后于4℃下保存,以备酿酒用。

5. 利用权利要求2所述的复配小曲生产小曲白酒的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 清蒸稻壳:称取稻壳,加水润湿,于115℃加热灭菌20min;

2) 蒸料:将清蒸结束后的稻壳和称取的大米在白瓷盘中混匀,加水,静置10min,分装进三角瓶中,用6层纱布封口,灭菌蒸料20min;

3) 糖化:将料倒至白瓷盘中,冷却至30℃左右,加入2%的母曲,即每100g原料加入2g母曲,拌匀,再装入三角瓶中,用6层纱布包扎,于32℃下糖化24h;

4) 发酵:将糖化好的料醅到入白瓷盘中,加入10%酵母菌液,混匀,分装入三角瓶中,接上瓶塞、导管,30℃下发酵7天;每天观察发酵情况及称重;

5) 蒸馏:向高压锅加水,电炉加热烧开,将发酵好的原料,一层一层探气撒在高压锅内,保证料的疏松均匀,上甑完料,立即上盖,接上导管,做好水封,此时小火蒸酒,保持锅内沸

腾,同时打开循环水开始冷凝。出酒时,最初10mL酒头单独接收,含有大量低沸点的甲醇等对人体有害物质。当酒精浓度低于30℃时停止接收,再接酒尾;

所述的原料为稻壳、大米和水;所述的10%酵母菌液,是由产酯酵母和酿酒酵母分别培养至酵母数达到 1×10^8 个/mL后,按每添加100g母曲,加入20ml产酯酵母液和10ml酿酒酵母液,再加入无菌水稀释至原料的10%即为10%酵母菌液;即每100g原料,加母曲2g,加产酯酵母和酿酒酵母0.2ml和0.1ml,再稀释成10ml,即为10%酵母菌液。

一种复配小曲及小曲白酒的生产方法

技术领域

[0001] 本发明提供了一种复配小曲及小曲白酒的生产方法,属于酿酒技术领域。

背景技术

[0002] 目前,小曲酒存在出酒率不高、放香不足的问题,本质在于酿酒微生物不能很好地发挥其作用。传统小曲酒生产工艺仅仅是从几个优良菌株出发,添加糖化力高的霉菌和高发酵力的酵母。这种简单复配制得的小曲,其出酒率及放香必然不足。

[0003] 传统麸曲白酒生产工艺主要使用黑曲霉作糖化剂,出酒率较高。黑根霉的糖化力最强,黑曲霉糖化力强,持续性好,出酒率高且耐酸,而米曲霉糖化快,不耐酸,糖化持续性差。在采用野生原料时,由于黑曲霉具有较多的单宁分解酶,能分解原料中的单宁,以减少对发酵的影响,因此用黑曲霉做糖化剂更适应。而从白酒质量考虑,黑曲霉所含酶系较杂,成品酒口感较差;米曲霉能抑制杂菌,且酸性蛋白酶和淀粉酶活高,生长速度快,蛋白质分解酶较多,成品酒风味足,酒质更高。因此,为了兼顾两者优点,解决酒率与生香之间的矛盾,应将其分别培养制曲,按一定比例混合使用。

[0004] 近年来,酿酒微生物的筛选、菌种选育及小曲复配等方面取得了很大进步。菌落组成上也变化巨大。

[0005] 黑根霉菌丝无隔,菌落呈黑灰色,雌雄异株,菌丝为白色、无隔多核,多呈絮状。米根霉是中国酒曲中的重要霉菌之一。根霉在酿酒生产上扮演着极其重要的作用。在生长过程中除了能产生大量的淀粉酶、蛋白酶,而且还能产生柠檬酸、乳酸、琥珀酸等有机酸。所以,在一定的条件下能产生乙酸乙酯、乳酸乙酯等风味物质。

[0006] 曲霉是白酒酿造中一大类微生物,在白酒生产中占的霉菌种类最多。有着比较强的耐热性,且能产生少量高酶活性的水解酶类,如糖化酶、淀粉酶、蛋白酶等。由于发酵过程中环境呈酸性,所以曲霉主要分泌酸性水解酶类,使曲霉能在酸性环境下正常生长繁殖代谢,及时地催化水解原料中的淀粉和蛋白质,提供后续发酵所需的材料。其中米曲霉与黑曲霉是酸性蛋白酶和 α -淀粉酶的重要来源,这两种酶在发酵过程的酸或强酸性条件下还能发挥作用,能产生酶活较高的糖化酶。

[0007] 目前,小曲酒制造的研究主要集中在国内。小曲酒因用曲量少、发酵周期短、淀粉出酒率高、原料选择广泛及工艺设备简单等特点,在我国的南部、西南地区以及城乡小作坊中均有分布。上个世纪30年代初,方心芳利用霉菌制作麸曲进行酿酒,但是未能得到推广。新中国成立后,原地方工业部组织总结了《烟台酿制白酒操作》,以“麸曲酒母,合理配料,低温入窖,定温蒸烧”为操作要点。麸曲白酒酿造中最重要的是曲霉和酵母的糖化发酵共同作用,整个白酒发酵的工艺条件,都取决于曲霉和酵母的生理特征。优良霉菌的选用对白酒生产具有重大影响。山东临沂酒厂作为第一个全国新工艺白酒试点提高出酒率。目前,不同酒厂使用的用以制作霉菌麸曲的菌种不同,部分酒厂自己从曲药中分离筛选,部分直接从其他制曲厂购买。其中米曲霉、黑曲霉等均可直接作为制备麸曲的菌种。筛选优良霉菌菌种一般是以糖化酶活力高,生长性能好为指标选取为最佳菌种。

[0008] 产酯酵母,又称生香酵母,是一类能在新陈代谢过程中产生大量酯类物质的酵母菌的总称,主要有假丝酵母和异性汉逊酵母,在用液体培养基静态培养产酯酵母时,液体表面会形成一层白色的菌膜,因此产酯酵母也称为产膜酵母。产酯酵母具备酒精和乙酸发酵能力的同时还具备乙酸乙酯的发酵能力。研究表明,产酯酵母在发酵pH较低时,生成的总酯含量较高。适合的发酵温度在25~30℃之间,在28℃恒温培养时,其总酯的生成量最高;当温度高于37℃,产酯酵母的代谢能力较弱,产酯能力就会大幅度下降。在白酒生产中添加产酯酵母可以增加白酒中乙酸乙酯含量,目前的白酒企业常在生产过程中添加酿酒酵母,以提高白酒的品质。

[0009] 我国近年在筛选产酯酵母方面取得了不菲的成果,选育优良的产酯酵母和优化其发酵条件,已经逐渐成为研究热点,李锐利等通过改变产酯酵母的培养环境,使发酵液中乙酸乙酯产量达到2.15g/L;万世旅等从曲药中筛选出的产酯酵母,用高粱发酵培养基进行发酵,使总酯含量达到为3.27g/L;刘源才等通过优化产酯酵母菌的产酯条件,在乙醇0.6%、乙酸0.4%、稻壳25%、温度28℃、时间72h和粉碎度25%的培养条件下,其乙酸乙酯产量达到4.81g/L;许玲等在白酒生产中添加筛选出产酯酵母,使乙酸乙酯含量达到7.36g/L,提升了原酒质量;李国红等优化产酯酵母的培养条件后,利用高粱复合培养基发酵生成的乙酸乙酯的量达8.00g/L;将产酯酵母从酿酒曲药中筛选、分离出来,应用于白酒生产中,对提高白酒的质量是很有必要的。因此,开发和筛选产酯能力良好的酵母菌种非常具有现实意义。但单独使用产酯酵母发现,白酒品质虽有很大提高,但产酒率会下降。

[0010] 近年来,我国在菌种复配方面取得了巨大的进步。江南大学吴群通过对几株不同来源的霉菌进行比较再与酵母作用,成功提高芝麻香型白酒生产的效率与品质,胡银川等将菌种混合酿造小曲米酒比传统方法提高了6.26%出酒率。柯文甫等以多微曲半固态法生产小曲白酒表明,比全根霉菌生产提高10%的出酒率,口感改善明显,香味宜人。胡建华等人从清香大曲中筛选出13株酿酒微生物,进行复配,蒸馏摘酒,所获得的白酒出酒率和风味物质均有所提高。包头酒厂在元山西省食品工业发酵研究所所长王元太的建议下,开始了多微麸曲的培养与应用,发现多微麸曲能增香。刘明明等将麸曲与大曲进行复配不仅提高了白酒的品质,还提高了出酒率与风味物质的含量。张东林将根霉与AS 3.4309菌种复配,不仅提高了白酒的品质,还提高了出酒率与风味物质的含量。许明明等将4种霉菌与酵母进行复配,提高了黄酒中风味物质的含量。因此,混菌制曲值得研究。

发明内容

[0011] 本发明的目的是克服现有技术的不足之处,提供一种复配小曲及小曲白酒的生产方法。

[0012] 本发明的第一个发明目的是提供一种产酯酵母,所述的产酯酵母保藏编号为CCTCC M 2016400。

[0013] 本发明的第二个发明目的是提供一种复配小曲,所述的复配小曲由母曲和酵母组成,

[0014] 所述的母曲中的微生物由黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉组成;

[0015] 所述的酵母由产酯酵母和酿酒酵母组成;

[0016] 所述的黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉的重量比为14:2:3:1;

- [0017] 所述的母曲与产酯酵母的重量体积比为100g:20ml;
- [0018] 所述的母曲与酿酒酵母的重量体积比为100g:10ml;
- [0019] 所述的产酯酵母和酿酒酵母中的酵母数均不小于 1×10^8 个/mL;
- [0020] 所述的黑曲霉保藏编号为CCTCC M 2016410;
- [0021] 所述的米曲霉保藏编号为CCTCC M 2016411;
- [0022] 所述的黑根霉保藏编号为CCTCC M 2016412;
- [0023] 所述的米根霉保藏编号为CCTCC M 2016413;
- [0024] 所述的产酯酵母保藏编号为CCTCC M 2016400。
- [0025] 本发明的第三个发明目的是提供所述的复配小曲的制备方法,包括如下步骤:
- [0026] A,母曲的制备:将黑根霉、米根霉、黑曲霉、米曲霉的霉菌孢子分别接种到带有麸皮的培养瓶中,培养24-48h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养3-6d;取出40℃下干燥4h,将黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉按照14:2:3:1的重量比混合,然后于4℃下保存,以备酿酒用;
- [0027] B,酵母的制备:将产酯酵母和酿酒酵母分别扩大培养,使酵母数达到 1×10^8 个/mL后,备用。
- [0028] 所述的母曲的制备方法如下:
- [0029] 取小麦喷洒润粮,粉碎后与新鲜麦麸混合,加入水,拌料混合均匀;将混合均匀的料分装入三角瓶中,装料厚度不超过2cm,用8层纱布包扎封口,再用牛皮纸包扎灭菌,放入无菌室,待冷却至30℃时,用接种环挑取黑根霉、米根霉、黑曲霉、米曲霉的霉菌孢子分别接入三角瓶中,混匀;
- [0030] 黑根霉、米根霉放入28℃培养箱中培养24h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养3d;
- [0031] 黑曲霉、米曲霉放入30℃培养箱中培养48h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养6d;
- [0032] 培养好后分别取出在40℃下干燥4h,将黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉按照14:2:3:1的重量比混合,然后于4℃下保存,以备酿酒用。
- [0033] 本发明的第四个发明目的是提供一种利用所述复配小曲生产小曲白酒的方法,包括如下步骤:
- [0034] 1)清蒸稻壳:称取稻壳,加水润湿,于115℃加热灭菌20min;
- [0035] 2)蒸料:将清蒸结束后的稻壳和称取的大米在白瓷盘中混匀,加水,静置10min,分装进三角瓶中,用6层纱布封口,灭菌蒸料20min;
- [0036] 3)糖化:将料倒至白瓷盘中,冷却至30℃左右,加入2%的母曲,即每100g原料加入2g母曲,拌匀,再装入三角瓶中,用6层纱布包扎,于32℃下糖化24h;
- [0037] 4)发酵:将糖化好的料醅到入白瓷盘中,加入10%酵母菌液,混匀,分装入三角瓶中,接上瓶塞、导管,30℃下发酵7天;每天观察发酵情况及称重;
- [0038] 5)蒸馏:向高压锅加水,电炉加热烧开,将发酵好的原料,一层一层探气撒在高压锅内,保证料的疏松均匀,上甑完料,立即上盖,接上导管,做好水封,此时小火蒸酒,保持锅内沸腾,同时打开循环水开始冷凝。出酒时,最初10mL酒头单独接收,含有大量低沸点的甲醇等对人体有害物质。当酒精浓度低于30℃时停止接收,再接酒尾;
- [0039] 所述的原料为稻壳、大米和水;所述的10%酵母菌液,是由产酯酵母和酿酒酵母分别培养至酵母数达到 1×10^8 个/mL后,按每添加100g母曲,加入20ml产酯酵母液和10ml酿酒

酵母液,再加入无菌水稀释至原料的10%即为10%酵母菌液;即每100g原料,加母曲2g,加产酯酵母和酿酒酵母0.2ml和0.1ml,再稀释成10ml,即为10%酵母菌液。

[0040] 本发明涉及到的几种微生物的保藏信息如下:

[0041] 1) 黑曲霉

[0042] 保藏日期:2016-7-28

[0043] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC);

[0044] 保藏编号:CCTCC M 2016410;

[0045] 分类命名:黑曲霉(*Aspergillus niger*)FLW-1。

[0046] 菌株特征:菌落表面呈颗粒状,有放射性凹沟、同心环形,反面在中央部分略带黄褐色、有放射性裂纹且与表面凹沟相对应。28℃培养7d,菌落直径为1.9-2.5cm。菌丝有时可见横隔,足细胞膨大不明显,顶囊明显膨大、多为球形,表面生辐射状小梗,小梗顶端分生孢子串生,分生孢子为球形,褐色。

[0047] 2) 米曲霉

[0048] 保藏日期:2016-7-28

[0049] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC);

[0050] 保藏编号:CCTCC M 2016411;

[0051] 分类命名:米曲霉(*Aspergillus oryzae*)FLW-2。

[0052] 菌株特征:菌落稠密,初期白色后多为黑褐色;匍匐菌丝爬行,无色,有发达的褐色指状假根;孢囊梗直立,极少数单生,多为2-4株成束,壁光滑,褐色,F1有囊状膨大。孢子囊球形,壁有微刺,黑色,直径60-250um;囊轴淡褐色,近球形、卵圆形或球形,直径50-90um;囊托楔形;孢囊孢子拟卵形、近球形,表面有条纹及棱角,颜色黄灰色,直径5-8um;厚垣孢子球形。

[0053] 3) 黑根霉

[0054] 保藏日期:2016-7-28

[0055] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC);

[0056] 保藏编号:CCTCC M 2016412;

[0057] 分类命名:黑根霉(*Rhizopus nigricans*)FLC-3。

[0058] 菌株特征:菌落较稠密,初期白色后灰褐色;假根非常发达;匍匐菌丝爬行,无色。孢囊梗2-7株成束,稍微弯曲,暗褐色,不分枝,表面光滑,长度在1500-3000um,直径20-25um;孢子囊球形或者近球形,老熟后颜色变为黑色,直径100-200um;囊轴近球形壁光滑、灰褐色,直径70-120um;囊托大而明显,楔形;孢囊孢子表面有明显条纹,有棱角,形状不规则,多为卵形,灰色;厚垣孢子卵圆形或球形。

[0059] 4) 米根霉

[0060] 保藏日期:2016-7-28

[0061] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC);

[0062] 保藏编号:CCTCC M 2016413;

[0063] 分类命名:米根霉(*Rhizopus oryzae*)FLC-4。

[0064] 菌株特征:菌落稠密,初期白色后多为黑褐色;匍匐菌丝爬行,无色,有发达的褐色指状假根;孢囊梗直立,极少数单生,多为2-4株成束,壁光滑,褐色,F1有囊状膨大。孢子囊

球形,壁有微刺,黑色,直径60-250um;囊轴淡褐色,近球形、卵圆形或球形,直径50-90um;囊托楔形;孢囊孢子拟卵形、近球形,表面有条纹及棱角,颜色黄灰色,直径5-8um;厚垣孢子球形。

[0065] 5) 产酯酵母

[0066] 保藏日期:2016-7-19

[0067] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC);

[0068] 保藏编号:CCTCC M 2016400;

[0069] 分类命名:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) QXC-2。

[0070] 菌株特征:酵母菌株的菌落凸起,较大,边缘略不规则,表面湿润光滑,呈米白色;细胞形态为椭圆形,单端芽殖。

[0071] 自古以来酿酒就有“欲酿酒,必先制曲”的说法,人们形象地称曲为“酒之骨”。根霉主要因为其产淀粉酶能力强,可以将淀粉质原料糖化生成糊精、葡萄糖,所以被广泛应用于白酒生产。根霉还有产酒精的能力,可以进行边糖化边发酵,且在发酵过程中能产生柠檬酸等有机酸,此外,在一定的条件下还能产生乙酸乙酯、乳酸乙酯等风味物质;曲霉是白酒酿造中一大类微生物,在白酒生产中占的霉菌种类最多。米曲霉与黑曲霉是酸性蛋白酶和 α -淀粉酶的重要来源,可以分解原料中的蛋白和淀粉,不仅可以产酒,而且增加白酒中的风味物质。

[0072] 多菌种制得的复配小曲,决不仅仅是几种微生物的简单混合,由于微生物生长的相互作用,相互影响导致微生物在白酒生产的各个过程中数量、种类和酶系有较大差异,最终的产物也有很大不同,本研究中利用的微生物是从几十种小曲中进行筛选、诱变后组合起来的,如:筛选的产酯酵母单独的产酯能力可达到9.51g/L,比目前国内报导的产酯酵母的产酯能力都高,其次,研究了各种微生物的生长、代谢条件,选择最适的培养条件后,分别培养,再通过正交的糖化实验来确定母曲的配比,再利用母曲的糖化条件、时间确定添加酵母的种类和数量,这是其它人没有做过的配比方法。通过采用这些方法发酵实验的结果表明:1.本复配小曲产酒能力有所提升,2.产酯能力强,3.通过气相色谱分析可知,产生的风味物质的数量和种类比一般小曲增加较多。

附图说明

[0073] 图1-1为酿酒曲药QXC的稀释涂布结果;

[0074] 图1-2为酿酒曲药HX的稀释涂布结果;

[0075] 图1-3为酿酒曲药CN的稀释涂布结果;

[0076] 图2-1为红色的产酒精能力高的酵母菌TTC法测定酵母呼吸强度;

[0077] 图2-2为粉红色的产酒精能力低的酵母菌TTC法测定酵母呼吸强度;

[0078] 图3-1为QXC-2酵母菌株在YPD培养基上的菌落特征;

[0079] 图3-2为HX-1酵母菌株在YPD培养基上的菌落特征;

[0080] 图3-3为CN-5酵母菌株在YPD培养基上的菌落特征;

[0081] 图4-1为QXC-2酵母菌株的细胞形态;

[0082] 图4-2为2HX-1酵母菌株的细胞形态;

[0083] 图4-3为CN-5酵母菌株的细胞形态;

[0084] 图5为酵母基因组DNA电泳图；

[0085] 图6为酵母基因组中5.8S rDNA-ITS序列PCR扩增产物电泳图；

[0086] 图7为QXC-2的测序结果；

[0087] 图8为望仙小曲酒气相色谱图；1. 甲醇；2. 乙醇；3. 乙酸乙酯；4. 未知；5. 异丁醇；6. 乙酸.；7. 正丁醇；8. 未知；9. 糠醛；10. 未知；

[0088] 图9为12号复配小曲白酒气相色谱图。其中，1. 乙醛；2. 甲醇；3. 正丙醇；4. 乙酸乙酯；5. 乙缩醛；6. 未知；7. 仲丁醇；8. 乙醇；9. 乙酸；10. 异丁酸乙酯；11. 异戊醇；12. 未知；13. 乳酸乙酯。

具体实施方式

[0089] 本发明所用的材料的来源。

[0090] 药品如表1。

[0091] 表1药品

[0092]

药 品	等 级	生 产 厂 家
醋酸钠·3H ₂ O	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
冰乙酸	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
无水碳酸钠	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
K ₂ Cr ₂ O ₇	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
KI	分析纯	天津市津北精细化工有限公司
硫酸	分析纯	重庆江川化工有限公司
可溶性淀粉	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
葡萄糖	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
碘	分析纯	天津市津北精细化工有限公司
氢氧化钠	分析纯	成都市科龙化工试剂厂

[0093]

无水乙醇	分析纯	成都市科龙化工试剂厂
36%乙酸	分析纯	成都市科龙化工试剂厂

[0094] 仪器如表2。

[0095] 表2仪器

[0096]

仪器	型号	生产厂家
电子分析天平	AL104	梅特勒-托利多仪器有限公司
数显恒温水浴锅	HH-6	金坛市荣华仪器制造有限公司
0.1g 电子天平	JY5002	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
电子调温万用电炉	DK-98-11	天津市泰斯特仪器有限公司
电热恒温培养箱	DHP-9082	上海齐欣科学仪器有限公司
磁力搅拌器	JB-5	金坛市荣华仪器制造有限公司
医用离心机	TD25-WS	长沙平凡仪器仪表有限公司
电热鼓风干燥箱	CS101-2EBN	重庆恒达仪器厂
自动压力蒸汽灭菌锅	DHP-9082	厦门致微仪器有限公司

[0097] 安琪酿酒酵母,市售,湖北宜昌安琪生物集团有限公司。

[0098] 小曲品种如表3。

[0099] 表3小曲种类及其来源

[0100]

序号	编号	名称	产地
1	HSQ	宏声桥小曲酒坊	重庆市涪陵区
2	DJ	垫江小曲	重庆市垫江县
3	GG	广西贵港市白制小曲	广西壮族自治区贵港市
4	ZF	宜都市众发酒曲	湖北省宜都市
5	XF	新发生物科技有限公司	杭州富阳新登古镇
6	HXC	都安好香醇酒饼厂	广西都安瑶族自治县
7	WMS	贵州毕节乌蒙山自制小曲	贵州毕节乌蒙山
8	LS	山东梁山县白制小曲	山东省梁山县
9	BY	四川百意生物科技有限公司	四川省成都市

[0101]

10	QXC	湖北省宜昌市屈香醇酒曲坊	湖北省宜昌市
11	HX	华西小曲	四川省成都市
12	YW	叶网黄酒曲	福建省宁德市
13	CN	长宁土特产白酒曲	湖南省衡阳市

[0102] 一、黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉的筛选,以及母曲的制备

[0103] 1.1分离方法

[0104] 采用稀释涂布法将小曲悬液进行稀释涂布,称1g研磨好的小曲加入100mL无菌水中混合均匀,梯度稀释后,在虎红琼脂、PDA和察氏培养基上取稀释菌液0.1mL涂布,于28℃培养48h。取出无杂菌的平板,挑取霉菌菌落点种于虎红琼脂培养基上,重复操作3至4次得到较纯种菌株。将上一步操作得到的菌株培养4-5天,得到成熟孢子按照上述方法梯度稀释涂布,重复涂布2至3次得到更纯的菌株。根据菌落形态及镜检结果验证纯种后分别接种到斜面保存在冰箱中备用,不纯菌株的再继续分离后保存,并对其进行初步归类。

[0105] 1.2菌株鉴定

[0106] 1) 插片培养

[0107] 预先配制好PDA培养基,以无菌操作倾斜45°插入灭菌后的载玻片约2-6片。用接种针从斜面上挑取少量孢子,点种时应该尽可能的靠近载玻片根部。将培养皿倒置于恒温箱内,28℃培养一定时间(根霉和毛霉5-6天,青霉菌10-14天),观察并记录菌落特征。

[0108] 2) 菌落形态和特征

[0109] (1) 生长或发育的速度:培养一定天数后,测量菌落直径,一般常以生长极慢、慢、中等、快等来加以说明。

[0110] (2) 菌落的颜色:表面和底部菌丝以及菌落背面的颜色及其变化。

[0111] (3) 菌落的表面:分别记录菌落的全部、中心部分、部分以及边缘部分等形态。

[0112] (4) 菌落的质地:菌落外观常见类型有羊毛状、毡状、皮革状、绒毛状、明胶状、棉絮状、粉粒状或束状。

[0113] (5) 菌落的边缘:纤毛状、锯齿状、全缘、树枝状等。

[0114] (6) 菌落的高度:菌落中心部分凸起或陷没或丘状隆起、菌落扁平,陷没等。

[0115] (7) 培养基颜色变化:颜色变化范围是仅仅菌丝体所覆盖部分,还是扩大到其他部分。

[0116] (8) 渗出物:有些真菌常常在菌落表面分泌带颜色的液滴。在观察时注意有无此现象,数量及色调等。

[0117] (9) 气味:芳香味,土气味或霉味等,当然也有无味者。

[0118] 3) 显微形态和特征

[0119] 将洁净的载玻片中央滴适量乳酸石碳酸棉蓝染液,取出培养成熟的菌落平板,在酒精灯无菌范围内从平板内取出盖玻片轻覆在载玻片上,染色一定时间后置于显微镜下观察并记录以下特征。

[0120] (1) 菌丝:菌丝有无横隔,以及颜色,宽度,形状等,是否存在根、足细胞、结节或隆起等特殊结构。

[0121] (2) 子实体的形态:观察子囊、子囊壳、孢子囊和担子果等的颜色,形状,大小,结构特征。

[0122] (3) 孢子:无性孢子和有性孢子的形状,颜色,表面的特征(如纹饰或突起等),孢子有无分隔(单细胞还是多细胞构成),孢子萌发的类型(单极出芽、两级出芽或多级出芽等)。

[0123] 1.3测定产糖化酶和液化酶性能

[0124] (1) 单菌种麸曲制备

[0125] 麸皮与水按照1:1的比例混合均匀,按约1cm的厚度分装于500ml三角瓶,注意控制三角瓶瓶口不要沾上麸皮,封口后于115℃高压蒸汽灭菌1h。冷却至45℃以下,摇匀使其疏

松,每瓶接种3环斜面菌种置于恒温箱中,28℃培养5天,期间每隔12h振荡一次,待麸曲板结后扣瓶培养,停止振荡。

[0126] 将麸曲从三角瓶取出,放入4层纱布内包裹编号,35℃烘干40小时,得到绝干麸曲。

[0127] (2)糖化力的测定

[0128] ①5%固体曲浸出液的制备:准确称取5.00g绝干麸曲,装入容量为250ml烧杯中,分离曲团结块后加pH=4.6的醋酸-醋酸钠缓冲溶液10mL以及蒸馏水90ml,摇匀后置于恒温水浴锅中35℃保温1h,每15min取出振荡混匀一次,过滤后收集滤液等待测定。

[0129] ②糖化:精确量取20g/L淀粉溶液25.0mL于50ml容量瓶,35℃恒温水浴锅中保温10min,使温度达到测定温度,吸取5.00ml试样浸出液于容量瓶,摇匀后放回水浴锅中准确糖化1h,快速加入1ml浓度为NaOH溶液,取出容量瓶摇匀,冷却至室温。

[0130] ③预实验:为了正确的掌握需要加入的标准溶液的体积,尽量在1min之内完成滴定,需要进行预实验。于150ml三角瓶中依次加入菲林试剂甲液、乙液、待测液各5ml,预先加入一定量的葡萄糖标准溶液,在功率为1000w的电炉上加热至沸腾,在沸腾状态下滴加1.0%甲基蓝指示剂1~2滴,以0.25%的标准葡萄糖溶液滴定至蓝浅黄色即为滴定终点,记下滴定用去葡萄糖总量V。

[0131] ④正式测定:于150ml三角瓶中依次加入菲林试剂甲液、乙液、待测液各5ml,蒸馏水10ml,预先加入少于预实验中V约1ml的葡萄糖标准溶液,把三角瓶放置于功率为1000w的电炉上加热至沸腾,在沸腾状态下滴加1.0%甲基蓝指示剂1~2滴,以0.25%的标准葡萄糖溶液滴定至蓝浅黄色即为滴定终点,记下滴定用去葡萄糖总量V₁。

[0132] ⑤空白试验:将正式滴定中的待测液换成蒸馏水,重复上述操作,记录消耗体积V₀。

[0133] ⑥计算

[0134] 曲药糖化力:在35℃,pH=4.6,1g绝干曲1h酶解可溶性淀粉产生1mg葡萄糖为1个糖化力单位。

[0135]
$$X = \frac{(V_0 - V_1) \times C}{5 \times \frac{5}{100} \times \frac{5}{30} \times t} \times 1000$$

[0136] 式1

[0137] 式中:

[0138] X——糖化力(mg/g·h);

[0139] V₀——空白滴定消耗葡萄糖标准溶液的量,mL;

[0140] V₁——试样正式测定时消耗葡萄糖标准溶液的量,mL;

[0141] C——葡萄糖标准溶液的浓度,g/mL;

[0142] t——酶解时间,h。

[0143] (3)液化力的测定

[0144] ①试样前处理:准确称取5.00g绝干曲,装入容量为250ml烧杯中,分离曲团结块后加pH=4.6的乙酸-乙酸钠缓冲液10mL以及蒸馏水90ml,摇匀后置于恒温水浴锅中35℃保温1h,每15min取出振荡混匀一次,过滤后收集滤液等待测定。

[0145] ②液化:量取浓度为20.0g/L淀粉溶液25ml和pH=4.6的醋酸-醋酸钠缓冲液于100

毫升试管中,于35℃恒温水浴锅中保温10min,使温度达到测定温度,吸取5.00ml试样浸出液于试管中,摇匀后放回水浴锅中,记录液化开始时间。每隔一段时间用玻璃棒蘸取反应液于预先加有碘液的白瓷滴定板上,直至颜色不再变化即为立液化终止时间。

[0146] ③计算

[0147] 固体曲液化力的定义:在35℃,pH=4.6反应条件下,1g绝干曲1h液化的可溶性淀粉质量。

$$[0148] \quad X = \frac{25.0 \times 0.020 \times 60}{0.25t}$$

[0149] 式2

[0150] 式中:

[0151] X——液化力(g/g.h);

[0152] 25.0——可溶性淀粉溶液用量,ml;

[0153] 0.020——可溶性淀粉溶液浓度,g/ml;

[0154] 0.25——5.0ml浸出液对应的绝干曲药的试样量,g;

[0155] 60——液化可溶性淀粉时间换算成1h的系数;

[0156] t——液化时间,min。

[0157] 筛选出形态良好,且组合后糖化力性能与产酒风味最佳的四种霉菌,分别进行了保藏:黑曲霉保藏编号为CCTCC M 2016410;米曲霉保藏编号为CCTCC M 2016411;黑根霉保藏编号为CCTCC M 2016412;米根霉保藏编号为CCTCC M 2016413。

[0158] 1.5霉菌的扩大培养

[0159] 扩大培养:将筛选出来的四种根霉接种到试管斜面培养基,28℃培养一周,观察菌丝体生长状况,以备用。

[0160] 1.6母曲的制备

[0161] 称取1kg新鲜麦麸于白瓷盘中,加入800mL的自来水,拌料混合均匀。将混合均匀的料分装入40个250mL三角瓶中,装料厚度不超过2cm,用8层纱布包扎封口,再用牛皮纸包扎灭菌。在0.1Mpa,121℃下灭菌30min。此时开启无菌室紫外线30min,灭菌完成后取出,放入无菌室,待冷却至30℃时,用接种环挑取霉菌孢子接入三角瓶中,混匀。黑根霉、米根霉、黑曲霉、米曲霉各接10个三角瓶。黑根霉、米根霉放入28℃培养箱中培养24h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养3d;黑曲霉、米曲霉放入30℃培养箱中培养48h,待麸皮表面长满菌丝时,扣瓶培养6d;培养好后分别取出在40℃下干燥4h,将黑曲霉、黑根霉、米根霉和米曲霉混合,然后于4℃下保存,以备酿酒用。

[0162] 二、产酯酵母的筛选和鉴定

[0163] 2.1产酯酵母的分离纯化

[0164] 将挑选的酿酒曲药(湖北省宜昌市屈香醇酒曲)取1g加入到100mL富集培养基中,在28℃的恒温摇床培养箱中培养48h,培养结束后,将培养液用无菌水稀释至10⁻⁶倍,分别吸取0.1mL涂布于YPD培养基中,于28℃恒温培养48h。挑选菌落和细胞形态不同的酵母菌按来源和挑选的先后顺序编号,反复进行分离纯化,直至得到纯菌落为止。

[0165] 分离纯化的酵母菌株在无菌环境下接种到PDA斜面培养基上,28℃培养48h后置于4℃冰箱保藏,每月定期转接。

[0166] 2.2产酯酵母的筛选

[0167] 1) TTC法测定酵母呼吸酶活力

[0168] 将纯化的酵母菌接种到TTC下层培养基上,在28℃的恒温培养箱中倒置培养48h,然后在无菌环境下向平板中倒入约12mL TTC上层培养基,左右摇动,使培养基覆盖全部菌落,用黑色布袋包裹平板后,继续在28℃的恒温培养箱中避光培养2~3h,根据菌落的颜色判断酵母产酒精能力的大小,挑选红色的菌落测定其产酯能力。

[0169] 2) 产酯酵母产酯能力的测定

[0170] 将挑选出来的产酯酵母接种到产酯培养基中,28℃发酵6天。发酵结束后,测定发酵液中总酯的含量,选择产酯能力高的酵母菌株进行分子鉴定。

[0171] 总酯含量测定方法如下:

[0172] 酿酒曲药酿制白酒的风味优劣主要依据其中酵母菌的产酯能力。总酯含量高的酿酒曲药,相应曲药中的酵母菌产酯能力就高。

[0173] 取发酵液50mL于50mL离心管中,4000r/min离心10min后,吸取上清液,按白酒中总酯(以乙酸乙酯计,g/L)的测定方法测定发酵液中总酯的含量。

[0174] 总酯(以乙酸乙酯计, g/L) = $\frac{0.0935 \times 15.00 - 0.1047 \times V_1}{5} \times 0.08812 \times 1000$

[0175] 式3

[0176] 式中0.0935——NaOH标准滴定溶液的实际浓度, mol/L;

[0177] 15.00——皂化时加入NaOH标准滴定溶液的体积, mL;

[0178] 0.1047——H₂SO₄标准滴定溶液的实际浓度, mol/L;

[0179] V₁——反滴定时消耗H₂SO₄标准滴定溶液的体积, mL;

[0180] 0.08812——与1.00mL NaOH标准滴定溶液 [c (NaOH) = 1.000mol/L] 相当的乙酸乙酯的质量, g;

[0181] 5——取样体积, mL。

[0182] 2.3产酯酵母鉴定

[0183] 1) 形态学鉴定

[0184] 将筛选的酵母菌在YPD固体培养基中进行培养,在对数生长期时挑取少量菌落用亚甲基蓝染色制片,在100×10倍油镜下进行显微观察。结合《真菌鉴定手册》中酵母菌的菌落特征及细胞形态,对产酯酵母进行鉴定。

[0185] 2) 分子鉴定

[0186] 取1环产酯能力高的菌株接种到10mL YPD液体培养基中,28℃下培养过夜。

[0187] A, 基因组DNA提取

[0188] 用移液枪吸取1.5mL酵母菌液到1.5mL无菌PE离心管中,4℃下10000r/min离心1min,弃上清液。采用Ezup柱式酵母基因组DNA抽提试剂盒,按使用说明书提取酵母DNA,将提取到的酵母基因组DNA放于-20℃冰箱中保存备用。

[0189] B, 基因组DNA纯度检测

[0190] 将DNA溶液稀释5倍,取5mL DNA稀释液进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶质量浓度0.8%,电压80V,电泳80min。电泳结束后在凝胶成像分析系统中观察凝胶,以判断提取的DNA的纯度。

[0191] C, PCR扩增

[0192] 酵母PCR扩增对象为酵母菌株的5.8S rDNA基因,以提取的酵母菌基因组DNA为模板,通过引物ITS (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增真菌核糖体ITS区基因。

[0193] D,PCR反应体系

[0194] PCR反应体系为:12.5 μ L 2 $\times$ Taq PCR MasterMix,0.5 μ L引物ITS1 (10 μ mol/L),0.5 μ L引物ITS4 (10 μ mol/L),2 μ L DNA模板,最后用双蒸水补充至25 μ L。

[0195] E,PCR反应程序

[0196] PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性4min,接下来34个循环包括94 $^{\circ}$ C变性1min,58 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1min,最后一个循环在72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0197] F,PCR产物琼脂糖凝胶电泳

[0198] 取5 μ L PCR产物用1.4%琼脂糖凝胶80V电压电泳1h,在凝胶成像分析系统中检测,比对DNA条带与DNA Marker的位置,初步判断PCR产物片段的大小。最后将含有目的条带的扩增产物送往英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

[0199] G,测序及结果分析

[0200] 测序所得序列输入www.ncbi.nlm.nih.gov,利用BLAST检索GenBank核酸序列数据库,确定其种属。

[0201] 2.4结果与分析

[0202] 2.4.1高产酯曲药的筛选结果

[0203] 高产酯曲药的筛选结果如表4所示。

[0204] 表4酿酒曲药产酯能力的测定

[0205]

序号	编号	取样体积	加入NaOH标准滴定溶液的体	消耗H ₂ SO ₄ 标准滴定溶液的体	总酯含量
----	----	------	----------------	---	------

[0206]

		(mL)	积 (mL)	积 (mL)	(g/L)
1	HSQ	5.00	15.00	12.55	1.56
2	DJ	5.00	15.00	12.53	1.60
3	GG	5.00	15.00	12.73	1.23
4	ZF	5.00	15.00	12.84	1.02
5	XF	5.00	15.00	12.28	2.06
6	HXC	5.00	15.00	12.36	1.91
7	WMS	5.00	15.00	12.45	1.74
8	LS	5.00	15.00	12.33	1.97
9	BY	5.00	15.00	12.36	1.91
10	QXC	5.00	15.00	8.43	9.16
11	HX	5.00	15.00	8.62	8.81
12	YW	5.00	15.00	12.43	1.78
13	CN	5.00	15.00	10.66	5.05

[0207]

序号	编号	名称	产地
1	HSQ	宏声桥小曲酒坊	重庆市涪陵区
2	DJ	垫江小曲	重庆市垫江县
3	GG	广西贵港市自制小曲	广西壮族自治区贵港市
4	ZF	宜都市众发酒曲	湖北省宜都市
5	XF	新发生物科技有限公司	杭州富阳新登古镇
6	HXC	都安好香醇酒饼厂	广西都安瑶族自治县
7	WMS	贵州毕节乌蒙山白制小曲	贵州毕节乌蒙山
8	LS	山东梁山县自制小曲	山东省梁山县
9	BY	四川百意生物科技有限公司	四川省成都市
10	QXC	湖北省宜昌市屈沱酒曲坊	湖北省宜昌市
11	HX	华西小曲	四川省成都市
12	YW	叶网黄酒曲	福建省宁德市
13	CN	长宁土特产白酒曲	湖南省衡阳市

[0208] 由表4可知,13种曲药中(上表列出),有9种曲药的产酯能力在2.00g/L以下;1种为2.06g/L,产酯能力属于下游水平;剩下的3种曲药的产酯能力达到5.00g/L以上,产酯能力高于其他品种。所以,对这3种高产酯曲药进行分离纯化,筛选出其中的产酯酵母。

[0209] 2.4.2产酯酵母的初筛结果

[0210] 产酯酵母的初筛结果,如图1-1、图1-2、图1-3所示。

[0211] 2.4.3产酯酵母的复筛结果

[0212] A,TTC法测定酵母呼吸酶活力

[0213] TTC法测定酵母呼吸酶活力结果如图2-1、图2-2所示。由图可知,平板上显现为颜色较深的深红色的酵母,表示筛选出的酵母菌种呼吸酶活力较高,产酒精能力较好;颜色较浅的粉红色的酵母产酒精能力较低。

[0214] B.产酯的测定

[0215] 产酯的测定结果如表5所示。

[0216] 表5酸碱滴定法测定酵母菌株的产酯能力

[0217]

编号	取样体积(mL)	加入 NaOH 标准滴定 溶液的体积(mL)	消耗 H ₂ SO ₄ 标准滴定 溶液的体积(mL)	总酯含量(g/L)
QXC-2	5.00	15.00	6.24	9.51
QXC-3	5.00	15.00	12.68	1.32
QXC-5	5.00	15.00	12.39	1.86
HX-1	5.00	15.00	8.30	9.40
HX-2	5.00	15.00	12.32	1.98
HX-5	5.00	15.00	12.58	1.50
CN-2	5.00	15.00	12.77	1.15
CN-4	5.00	15.00	12.72	1.25
CN-5	5.00	15.00	10.45	5.44

[0218] 从3种曲药中筛选出了9株酵母菌,有6种产酯能力低,为白酒生产提供酒精,另外3种不仅为白酒生产提供酒精,还在白酒生产中产生了大量的酯类物质。

[0219] 2.4.4产酯酵母鉴定结果

[0220] A、形态学鉴定

[0221] 酵母菌株的菌落特征鉴定结果如图3-1、3-2、3-3所示。从图中可以看出,三株酵母菌株的菌落有明显差异:QXC-2酵母菌株的菌落凸起,较大,边缘略不规则,表面湿润光滑,呈米白色,初步确定为酿酒酵母;HX-1酵母菌株的菌落凸起,边缘规则,表面湿润光滑,呈白色,初步鉴定为酿酒酵母;CN-5酵母菌株的菌落较平,面积大,整体为圆形,带“毛边”,表面不光滑,呈米白色,初步确定为异性汉逊酵母。

[0222] 酵母菌株的细胞形态鉴定结果如图4-1、4-2、4-3所示。从图中可以看出,由图可知,QXC-2酵母菌细胞形态为椭圆形,单端芽殖,结合菌落特征,鉴定为酿酒酵母;HX-1酵母

菌细胞形态为圆形,单端芽殖,结合菌落特征,鉴定为酿酒酵母;CN-5酵母菌细胞形态为短棒形,单端芽殖,结合菌落特征,鉴定为异性汉逊酵母。

[0223] B、分子鉴定

[0224] 酵母DNA电泳检测结果如图5所示。从图中可以看出,在全自动凝胶成像分析系统中可见三株酵母菌DNA条带清晰,没有杂带,说明提取的酵母菌基因组DNA纯度高。

[0225] 扩增产物电泳如图6所示。从图中可以看出,在全自动凝胶成像分析系统中可知,扩增产生的DNA片段条带单一,CN-5扩增片段大小约为550bp,QXC-2和HX-1的扩增片段大小约为600bp。并且空白组无条带出现(未显示),说明未出现污染、无非特异性扩增现象。

[0226] GenBank鉴定结果如图7和表6所示。

[0227] 表6酵母鉴定结果

[0228]

序号	菌株编号	PCR 产物/bp	GenBank 数据库名称	同源性分析
1	CN-5	460	Hansenula anomala	没有显著的相似性发现
2	QXC-2	570	Saccharomyces cerevisiae	90%
3	HX-1	570	Saccharomyces cerevisiae	90%

[0229] 从测定的基因序列来看,QXC-2核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,QXC-2和HX-1的序列完全一致,结合形态学鉴定,最终鉴定为同一种酿酒酵母,CN-5的分子鉴定结果也为异性汉逊酵母,但在GenBank数据库中没有显著的相似性发现。选取产酯高的QXC-2菌株进行保藏,保藏编号为CCTCC M 2016400,与安琪酿酒酵母组合,再与母曲进行复配实验。

[0230] 2.5酵母扩大培养

[0231] 麦汁斜面菌种在28℃,培养2天,挑单菌落3个,接种250mL三角瓶30℃,培养2天后计数,使菌数达到 1×10^8 个/mL,备用。

[0232] 三、小曲复配

[0233] 对四种真菌和两种酵母的复配,再与本地区最大小曲酒厂(望仙酒业)小曲对比,做设计正交实验,如表7。

[0234] 表7麸曲正交配比表

[0235]

编号	母曲中微生物的重量百分比				产酯酵母(m1)/100g 曲	酿酒酵母(m1) /100g 曲
	黑曲霉%	黑根霉%	米根霉%	米曲霉%		
1	60	20	20	0	10	5
2	60	20	15	5	10	10
3	60	20	10	10	10	15
4	60	20	5	15	10	20
5	60	20	0	20	10	25
6	65	15	20	0	15	5
7	65	15	15	5	15	10
8	65	15	10	10	15	15
9	65	10	10	15	15	20
10	65	5	10	20	15	25
11	70	10	20	0	20	5
12	70	10	15	5	20	10
13	70	10	10	10	20	15
14	70	5	10	15	20	20
15	70	5	5	20	20	25
16	75	20	5	0	25	5
17	75	15	5	5	25	10
18	75	10	5	10	25	15
19	75	5	5	15	25	20
20	75	0	5	20	25	25
21	80	20	0	0	5	5
22	80	15	5	5	5	10

[0236]

23	80	10	5	10	5	15
24	80	5	5	15	5	20
25	80	0	0	20	5	25
26 (对照)	望仙酒曲					

[0237] 四、小曲白酒发酵

[0238] 1、小曲白酒发酵,包括如下步骤:

[0239] 清蒸稻壳:称取630g稻壳,加水润湿,于115℃加热灭菌20min。

[0240] 蒸料:将清蒸结束后的稻壳和称取的4200g大米在白瓷盘中混匀,加水6300mL,静置10min,分装进14个1000mL三角瓶中,用6层纱布封口,115℃灭菌蒸料20min。

[0241] 糖化:将料倒至白瓷盘中,冷却至30℃左右,加入2%的母曲,即每100g原料加入2g母曲,拌匀,再装入三角瓶中,用6层纱布包扎,于32℃下糖化24h。

[0242] 发酵:将糖化好的料醅到入白瓷盘中,加入10%酵母菌液,混匀,分装入三角瓶中,

接上瓶塞、导管,30℃下发酵7天。每天观察发酵情况及称重。

[0243] 蒸馏:向高压锅加水,电炉加热烧开,将发酵好的原料,一层一层探气撒在高压锅内,保证料的疏松均匀,上甑完料,立即上盖,接上导管,做好水封,此时小火蒸酒,保持锅内沸腾,同时打开循环水开始冷凝。出酒时,最初10mL酒头单独接收,含有大量低沸点的甲醇等对人体有害物质。当酒精浓度低于30℃时停止接收,再接酒尾。

[0244] 所述的原料为稻壳、大米和水;所述的10%酵母菌液,是由产酯酵母和酿酒酵母分别培养至酵母数达到 1×10^8 个/mL后,按每添加100g母曲,加入20ml产酯酵母液和10ml酿酒酵母液,再加入无菌水稀释至原料的10%即为10%酵母菌液;即每100g原料,加母曲2g,加产酯酵母和酿酒酵母0.2ml和0.1ml,再稀释成10ml,即为10%酵母菌液。

[0245] 测定其酒精度,再换算成20℃下的酒精度,计算出酒率。

[0246] 计算出酒率:出酒率包括,理论出酒率、淀粉利用率、淀粉出酒率、原料出酒率,生产中用得较多的是原料出酒率,其计算方式如下:查看20℃时酒精体积分数、质量分数、密度对照表,将体积分数换算成质量分数,计算出产65%体积分数的质量,出酒率=(65%体积分数的质量/原料总质量)*100%

[0247] 2、小曲白酒色谱分析

[0248] 小曲酒风味成分测定(GC):色谱条件:色谱柱为DB-WAX毛细管色谱柱;进样口温度230℃;柱温箱程序升温:60℃保持3min,5℃/min升到200℃,然后再以10℃/min升到230℃保持1min;载气:99.999%高纯度氦气,载气流速:1mL/min。

[0249] 质谱条件:EI离子源,离子源温度为230℃,电离电压70eV,四极杆温度150℃,电离方式:EI,质量扫描范围为m/z:20-500;谱库NIST。

[0250] 香味物质的定性和量分析:与NIST谱库进行对比分析,并综合参考资料和相关背景信息,对物质进行定性分析。测其乙酸乙酯,甲醇,异丁醇等微量成分的含量。

[0251] 3、结果

[0252] 3.1小曲的出酒率:如表8所示

[0253] 表8发酵后酒精产量和出酒率

[0254]

编号	CO ₂ 总失重(kg)	酒精度(v/v)	出酒率(%)	提高量(%)
1	0.12	18.7	43.24	5.77
2	0.1	8.8	36.16	-11.55
3	0.1	11.5	38.08	-6.85
4	0.08	10.5	37.37	-8.59
5	0.1	18.7	43.24	5.77
6	0.1	13.5	39.51	-3.35
7	0.1	14.4	40.15	-1.79
8	0.12	20.9	44.84	9.69
9	0.1	18.1	42.81	4.72
10	0.12	16.6	41.73	2.08
11	0.1	10.5	37.37	-8.59
12	0.14	22	45.64	11.64
13	0.12	20.2	44.33	8.44
14	0.12	17.6	42.45	3.84
15	0.12	14.7	40.37	-1.25
16	0.1	12.8	39.01	-4.57
17	0.12	16.8	41.87	2.42
18	0.14	18.7	43.24	5.77
19	0.12	13.1	39.21	-4.09
20	0.12	19.4	43.75	7.02
21	0.08	15.4	40.88	0.00
22	0.1	19.4	43.75	7.02
23	0.08	15.2	40.58	-0.73

[0255]

24	0.1	18.5	43.1	5.43
25	0.1	15.2	40.72	-0.39
26	0.12	15.4	40.88	0.00

[0256] 由上表可以得出：

[0257] ①12号的酒精度最高、出酒率最高，出酒率提高了11.64%。

[0258] ②不同的小曲配比发酵消耗的原料质量不同。一般而言，呼吸消耗的原料越多，微生物代谢越旺盛，产生的酒精就越多。12、18号消耗了0.14kg，最多；10～20号霉菌呼吸几乎都消耗了0.12kg；而1～10以及20～25号仅仅消耗了0.10kg大米原料，其中4号、21号只消耗0.08kg。

[0259] ③12号、13号、14号、17号、18号、20号出酒率高，且复配复杂，筛选其和26号一起进行主要风味物质的测定，比较其含量，确定其最佳配比。

[0260] 3.2白酒中主要风味物质的含量：如表9所示

[0261] 表9 100mL白酒中主要风味物质的含量

[0262]

编号	甲醇 (g)	乙酸乙酯 (g)	乙酸乙酯提高量 (g)
12	0.000	0.152	0.148
13	0.030	0.081	0.077
14	0.000	0.102	0.098
17	0.040	0.096	0.092
18	0.040	0.071	0.067
20	0.016	0.082	0.078
26	0.035	0.004	0

[0263] 由图8和图9比较可知,12号中不仅乙酸乙酯含量远大于26号(望仙小曲酒),而且风味物质比26号也多。

[0264] 由上表可知,12号和14号不含甲醇,17号和18号含量最高为0.040g/100mL,高级醇是酒中最主要的呈香和口味物质之一,适量的高级醇能使香味协调但超出范围则是杂味的主要物质。甲醇是对人体有毒害的物质,对视觉危害非常严重,应严加控制其含量。

[0265] 结果表明:12号的出酒率最高,风味物质含量最多,是最佳的复配组。

[0266] 4、结论

[0267] 研究结果表明:在白酒生产中,小曲糖化力决定着出酒率的高低,但不成比例。霉菌以复配形式进行酿酒时,不仅促进糖化,还提高了酵母发酵。

[0268] 12号当黑曲霉:黑根霉:米根霉:米曲霉=14:2:3:1,每100g曲各加产酯酵母和酿酒酵母20ml和10ml,时出酒率最高,比本地单一菌株提高了11.64%,且风味物质种类最多,其中酯含量提高了0.148g/100mL,是最佳的复配组。选取优良菌株进行复配制曲再发酵可以提高出酒率,与此同时,风味物质的含量大大增加,白酒的香气最浓。通常,出酒率高则产酯能力偏低,而本研究中12号出酒率与产酯能力均最强。

Organization Applicant

<110> OrganizationName : 长江师范学院

Application Project

<120> Title : 一种复配小曲及小曲白酒的生产方法

<130> AppFileReference :

<140> CurrentAppNumber :

<141> CurrentFilingDate : ____-__-__

Sequence

<213> OrganismName : *Saccharomyces cerevisiae*

<400> PreSequenceString :

gcgcttaatt gcgcggcgat aaacettaca cacattgtct agtttttttg aactttgctt	60
tgggtggtga gcctggctta ctgccc aaag gtctaaacac atttttttta atgttaaaac	120
ctttaaccaa tagtcatgaa aatttttaac aaaaattaaa atcttcaaaa ctttcaacaa	180
cggatctctt ggttctcgca acgatgaaga acgcagcgaa atgcgatacg tattgtgaat	240
tgcagatttt cgtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcaccctctg gtattccaga	300
gggtatgcct gtttgagcgt ctttctctc tcaaaccttc gggtttggtta ttgagtgata	360
ctctgtcaag ggtaacttg aaatattgac ttagcaagag tgtactaata agcagtcttt	420
ctgaaataat gtattagggtt cttccaactc gttatatcag ctaggcaggt ttagaagtat	480
tttaggctcg gcttaacaac aataaactaa aagtttgacc tcaaatcagg taggactacc	540
cgctgaactt aagcatatca ataagcggag gaa	573

<212> Type : DNA

<211> Length : 573

SequenceName : 1

SequenceDescription :

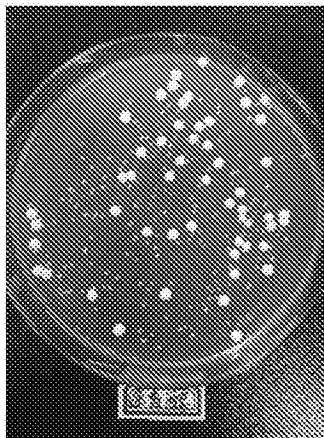


图1-1

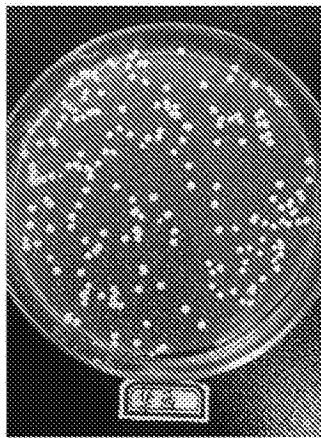


图1-2

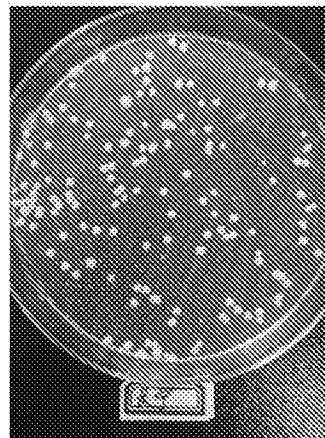


图1-3

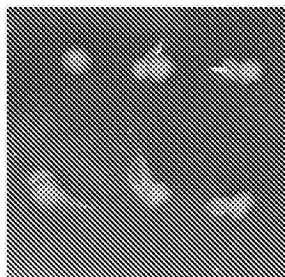


图2-1

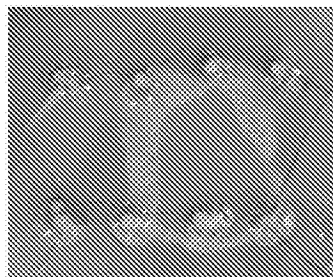


图2-2

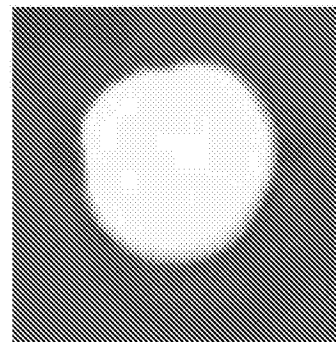


图3-1

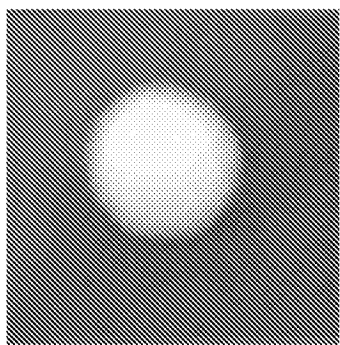


图3-2

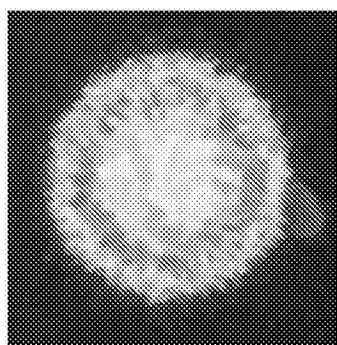


图3-3

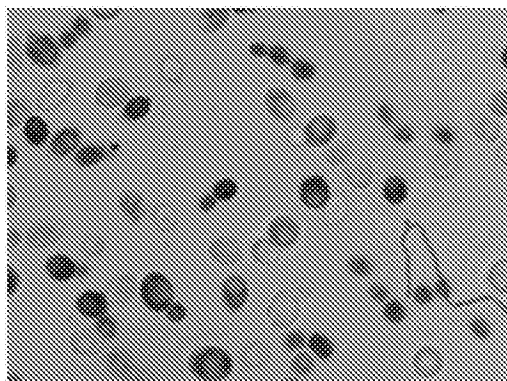


图4-1

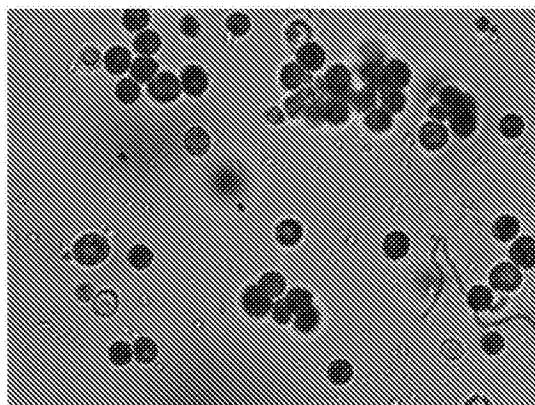


图4-2

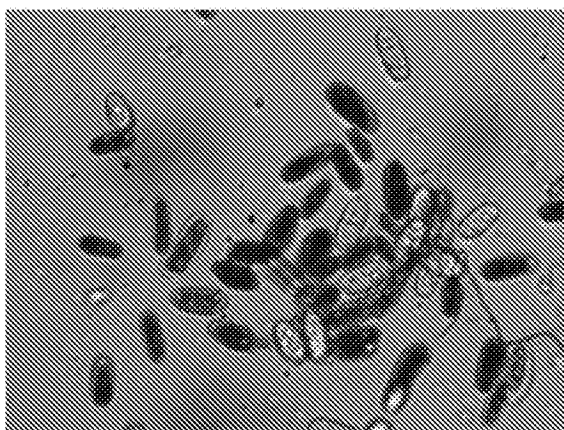


图4-3



图5

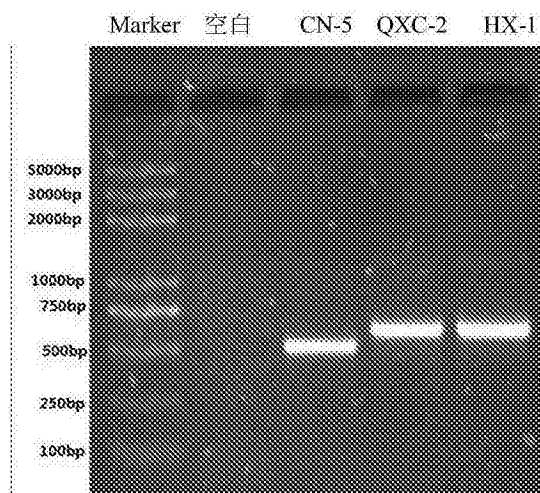
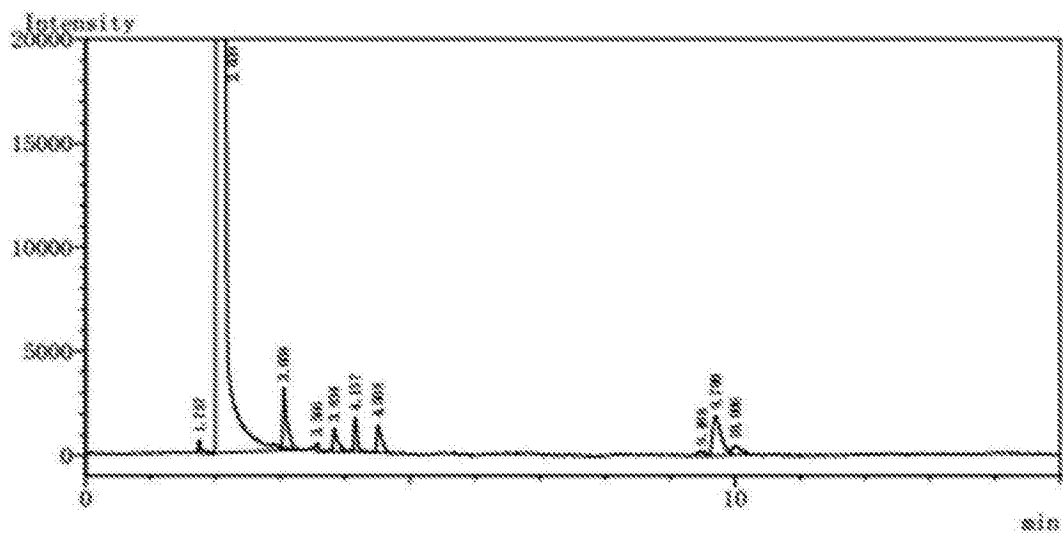


图6

1-60 GCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTT.
61-120 TGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTTAATGTTAAAAC.
121-180 CTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTAAACAAAATTAAAATCTTCAAACTTTCAACAA.
181-240 CGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAAT.
241-300 TGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGA.
301-360 GGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATA.
361-420 CTCTGTCAAGGGTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGACTAATAAGCAGTCTTT.
421-480 CTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACCTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTAT.
481-540 TTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACC.
541-573 CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.

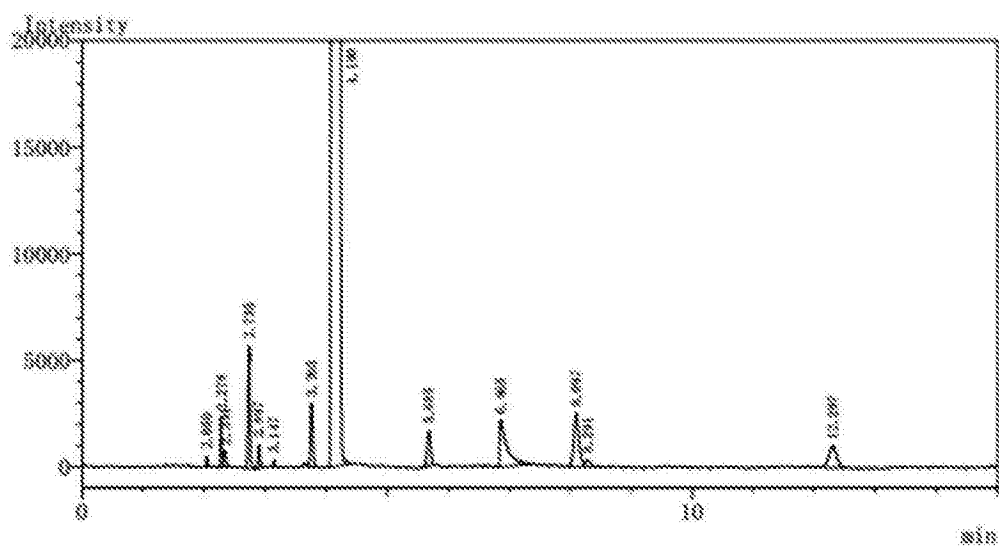
图7



峰号	保留时间	面积	面积%	峰高	理论塔板	分辨率
1	1.757	581	0.0108	633	15046.593	0.000
2	2.039	5350483	99.6991	2096804	28517.585	5.349
3	3.058	3435	0.0641	2875	19034.719	14.922
4	3.566	421	0.0078	374	24927.972	5.697
5	3.834	1543	0.0287	1106	20888.412	2.728
6	4.157	1532	0.0285	1649	45668.494	3.524
7	4.508	1956	0.0364	1306	19773.869	3.415
8	9.488	510	0.0095	227	28788.904	28.381
9	9.7	4904	0.0914	1878	28112.514	0.934
10	10.006	1271	0.0237	444	22377.786	1.229
全部		5366636	100.0000	2107296		

1.甲醇；2.乙醇；3.乙酸乙酯；4.未知；5.异丁醇；6.乙酸；7.正丁醇；8.未知；
9.糠醛；10.未知

图8



峰号	保留时间	面积	面积%	峰高	理论塔板	分辨率
1	2.050	782	0.0052	480	37555.040	0.000
2	2.278	3830	0.0257	2268	46447.137	5.411
3	2.344	2117	0.0142	737	0.000	0.000
4	2.735	11847	0.0795	5652	39973.870	0.000
5	2.897	2428	0.0163	1064	40814.006	2.892
6	3.147	609	0.0041	317	59372.274	4.604
7	3.765	8094	0.0543	2998	45635.621	10.144
8	4.190	14829232	99.4647	3782788	25793.967	4.869
9	5.685	6566	0.0440	1641	44996.065	14.177
10	6.865	17948	0.1204	2158	24632.747	8.383
11	8.097	14676	0.0984	2500	45159.287	7.549
12	8.291	2021	0.0136	312	0.000	0.000
13	12.297	8895	0.0597	1014	44127.572	0.000
全部		14909045	100.0000	3803929		

1. 乙醛; 2. 甲醇; 3. 正丙醇; 4. 乙酸乙酯; 5. 乙缩醛; 6. 未知; 7. 仲丁醇; 8. 乙醇; 9. 乙酸; 10. 异丁酸乙酯; 11. 异戊醇; 12. 未知; 13. 乳酸乙酯

图9